



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

ALINE DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DE UM CONJUNTO DE FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS ANTI-DLL1 COMO BASE PARA PROPOSIÇÃO DE UM NOVO
BIOFÁRMACO

FORTALEZA

2020

ALINE DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DE UM CONJUNTO DE FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS ANTI-DLL1 COMO BASE PARA PROPOSIÇÃO DE UM NOVO
BIOFÁRMACO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Multidisciplinar.

Orientador: Prof. Dr. João Hermínio Martins da Silva.

FORTALEZA

2020

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)

- A298a Albuquerque, Aline de Oliveira.
Avaliação computacional de um conjunto de fragmentos de anticorpos anti-DLL1 como base para proposição de um novo biofármaco / Aline de Oliveira Albuquerque. – 2020.
135 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. João Hermínio Martins da Silva.

1. scFv. 2. DLL1. 3. Câncer. I. Título.

CDD 660.6

ALINE DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO COMPUTACIONAL DE UM CONJUNTO DE FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS ANTI-DLL1 COMO BASE PARA PROPOSIÇÃO DE UM NOVO
BIOFÁRMACO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Multidisciplinar.

Aprovada em: 31/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Geancarlo Zanatta
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao Dr. João Hermínio Martins da Silva, pela excelente orientação fornecida durante diversas etapas de minha formação acadêmica, com ênfase nos dois últimos anos referentes à pós-graduação. Seu acompanhamento direto e sua disponibilidade, mesmo em meio aos seus diversos compromissos, durante todas as etapas de realização do projeto foi indispensável para o sucesso na finalização do mesmo.

Aos professores e doutores participantes da banca examinadora João Hermínio Martins da Silva, Geancarlo Zanatta e Geraldo Rodrigues Sartori, pelo tempo despendido na leitura do trabalho e pelas valiosas discussões levantadas e sugestões para a melhora do mesmo.

À Fiocruz Ceará, por disponibilizar toda a estrutura necessária para realização do projeto, e a todos os seus integrantes, dentre os estagiários, pesquisadores e pessoas envolvidas nos setores administrativos da instituição.

Aos amigos do grupo de Modelagem, Simulação e Evolução, *in silico*, de biomoléculas da Fiocruz-CE, que, além de tornarem o ambiente de trabalho sempre leve e descontraído, foram fundamentais na realização de diversas etapas do projeto: ao Geraldo Rodrigues Sartori, pelas diversas sugestões enriquecedoras e por todo auxílio, especialmente na realização do MM/PBSA; à Beatriz Chaves, pela ajuda na atualização dos arquivos de parâmetros do GROMACS e na validação da metodologia de *docking*; e aos demais membros do grupo – Andrielly Henriques, Disraeli Vasconcelos, Jean Sampaio e Luca Milério - por todas as sugestões, reflexões e críticas que auxiliaram na construção deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pelo companheirismo e descontração ao decorrer das disciplinas realizadas.

A meus pais, Maria Luciene de Oliveira Albuquerque e Francisco das Chagas Dias Albuquerque, a minha irmã, Andrea de Oliveira Albuquerque, e a minha família, em especial à minha tia Maria Auxiliadora Dias Albuquerque, por todo o afeto, cuidado e dedicação a me proporcionar uma educação de qualidade que me permitiu alcançar meus objetivos.

À Andressa Alexandre, pelo companheirismo e paciência em todos os momentos durante os último dois anos, pelos conselhos, risadas e por todos os momentos

compartilhados. Aos amigos da graduação em Biotecnologia e às amigas de colégio, Natália Freitas e Bianca Riedmiller, pela amizade e apoio.

RESUMO

Câncer é o nome que caracteriza um conjunto de distúrbios marcados pela presença de células que não respondem aos controles normais de divisão. Estima-se que no ano 2018, tais doenças acarretaram 9,6 milhões de óbitos mundialmente. Terapias convencionais não são direcionadas e, comumente, são acompanhadas da manifestação de diversos efeitos adversos. Nesse contexto, novos tratamentos, como a imunoterapia fazendo o uso de inibidores de *checkpoints* do sistema imune, têm ganhado grande destaque. O anticorpo monoclonal humanizado pidilizumabe foi inicialmente selecionado pela sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos e por sua atividade antitumoral. Um grande número de estudos clínicos promissores indicava que tal fármaco apresentava perfil farmacológico típico de antagonista à proteína de *checkpoint* PD-1. Porém, recentemente, foi elucidado que seu alvo molecular genuíno é a proteína DLL1, um ligante da via de sinalização de Notch cujo bloqueio tem sido associado a inibição da proliferação celular e indução da apoptose de células tumorais para glioma, demonstrando seu potencial como alvo terapêutico para o tratamento do câncer. Tendo em vista os bons resultados alcançados com o uso do pidilizumabe em diversos testes clínicos, este trabalho objetivou indicar alterações nos fragmentos de anticorpos scFv produzidos a partir do pidilizumabe, a fim de otimizar as interações com seus possíveis alvos moleculares, as proteínas PD-1 e DLL1. Para isso, foi feita a modelagem comparativa dos scFvs a partir das sequências das cadeias leve e pesadas obtidas no banco de dados Integrity. A adição de três peptídeos ligantes flexíveis de tamanhos distintos entre as cadeias resultou na produção de três scFvs. Tais moléculas foram docadas às proteínas PD-1 e DLL1 e os complexos resultantes, submetidos a simulações de dinâmica molecular. As simulações permitiram constatar a ausência completa de interações entre os scFvs e PD-1. Além disso, através da realização de cálculos de MM/PBSA, foi possível elucidar que o modo de ligação mais favorável energeticamente entre scFv e DLL1 é encontrado através do posicional do fragmento de anticorpo no domínio C2 do antígeno, e que os componentes de energia livre que mais contribuem para o estabelecimento da interação são os não polares, de Coulomb e de van der Waals. Finalmente, foram identificados os principais resíduos da interface de interação e identificadas mutações favoráveis na sequência do scFv. A aplicação e validação de tais mutações por dinâmica molecular resultou na proposição de um novo biofármaco otimizado.

Palavras-chave: scFv; DLL1; câncer.

ABSTRACT

Cancer is the name that characterizes a set of disorders marked by the presence of cells that do not respond to normal cell division controls. It is estimated that in 2018, such diseases caused 9,6 million deaths worldwide. Conventional therapies are not targeted and commonly are followed by the manifestation of various adverse effects. In this context, new treatments, such as immunotherapy using immune checkpoints inhibitors, have gained prominence. The humanized monoclonal antibody pidilizumab was initially selected for its ability to stimulate lymphocyte proliferation and its anti-tumor activity. A large number of promising clinical studies indicated that such antibody had a typical pharmacological profile of a PD-1 checkpoint protein antagonist. However, it has recently been elucidated that its genuine molecular target is the DLL1 protein, a Notch signaling pathway ligand whose blockade has been associated with inhibition of cell proliferation and induction of tumor cell apoptosis to glioma, demonstrating its potential as a therapeutic target for cancer treatment. Given the good results achieved with the use of pidilizumab in several clinical trials, this study aimed to indicate changes to scFv antibody fragments produced from pidilizumab in order to optimize interactions with their possible molecular targets, PD-1 and DLL1 proteins. For this, comparative modeling of scFvs light and heavy chain sequences obtained from Integrity databases was performed. The addition of three flexible linker peptides of different length between chains resulted in the production of three scFvs. These molecules were docked to PD-1 and DLL1 proteins through a previously validated methodology and the resulting complexes were submitted to molecular dynamics simulations. The simulations showed the complete absence of interactions between scFvs and PD-1. Furthermore, by performing MM/PBSA calculations, it was possible to elucidate that the most energetically favorable mode of binding between scFv and DLL1 is found through positioning the antibody fragment in the antigen C2 domain, and that the major free energy components contributing to the establishment of the interaction are the non-polar, Coulomb and van der Waals terms. Finally, the main interface residues involved in the interaction were identified and energetically favorable mutations were proposed on the scFv sequence. The application and validation of such mutations by molecular dynamics resulted in the proposition of a new optimized biopharmaceutical.

Keywords: scFv; DLL1; cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas de incidência e mortalidade do câncer estimadas e padronizadas por idade em 2018 para ambos os gêneros no Brasil	18
Figura 2	Principais interações envolvidas na ativação das células T	20
Figura 3	Mecanismo molecular de ação da PD-1	22
Figura 4	Representação esquemática da estrutura de um anticorpo	23
Figura 5	Representação esquemática de um scFv	25
Figura 6	Vias de bloqueio do CTLA-4 e PD-1	27
Figura 7	Representação da via canônica de sinalização por Notch	29
Figura 8	Domínios estruturais do DLL1	31
Figura 9	Súmula da metodologia computacional aplicada	39
Figura 10	Rampa de temperatura da DM com aquecimento	46
Figura 11	Esquema simplificado para uma simulação de DM utilizando o pacote GROMACS	48
Figura 12	Alinhamento das estruturas tridimensionais dos scFv, com os seus respectivos peptídeos ligantes destacados	58
Figura 13	Regiões Determinantes de Complementariedade dos scFvs modelados	59
Figura 14	Predição de erro por resíduo para os scFvs obtido com o ReFOLD	60
Figura 15	Gráficos de Ramachandran para os modelos refinados dos scFvs	62
Figura 16	Variação do RMSD do cristal 4ZQK e das estruturas resultantes do <i>docking</i> computacional entre PD-1 e PD-L1 durante simulações de DM com aquecimento	66
Figura 17	Variação do RMSD do cristal 5B8C e das estruturas resultantes do <i>docking</i> computacional entre o PD-1 e o Fv do mAb pembrolizumabe durante simulações de DM com aquecimento	69
Figura 18	Variação do RMSD das estruturas resultantes do <i>docking</i> computacional entre o PD-1 e os scFvs produzidos por modelagem comparativa durante simulações de DM com aquecimento	72

Figura 19	Varição do RMSD das estruturas resultantes do <i>docking</i> computacional entre DLL1 e os scFvs produzidos por modelagem comparativa durante simulações de DM com aquecimento	74
Figura 20	Análise do perfil eletrostático das interfaces de interação scFv-DLL1	75
Figura 21	Variações no RMSD do scFv, do ligante e da interface do complexo P10-DLL1 em função do tempo de simulação	77
Figura 22	Área de superfície acessível ao solvente nos complexos scFv-antígeno e no alvo DLL1	78
Figura 23	Variações no RMSD do scFv, do ligante e da interface do P12-DLL1 em função do tempo de simulação	79
Figura 24	Flutuação dos resíduos dos scFvs P10 e P12 nos complexos com DLL1	81
Figura 25	Flutuação dos resíduos do DLL1 livre e em complexo com P10 e P12	82
Figura 26	Varição do raio de giro total nos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1	83
Figura 27	Varição do número total de ligações hidrogênio totais em função do tempo nos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1	84
Figura 28	Varição da quantidade de ligações hidrogênio na interface dos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1 em função do tempo	85
Figura 29	Distância entre os átomos doadores e aceptores dos resíduos formadores de pontes salinas na interface do complexo P10-DLL1	86
Figura 30	Distância entre os átomos doadores e aceptores dos resíduos formadores de pontes salinas na interface do complexo P12-DLL1	87
Figura 31	<i>Hot-spots</i> da interação scFv-antígeno no complexo P10-DLL1	90
Figura 32	<i>Hot-spots</i> da interação scFv-antígeno no complexo P12-DLL1	91
Figura 33	Energia livre de ligação ao longo da simulação nos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1	93
Figura 34	Resíduos do antígeno próximos à ThrHR91 e à Gln165 do scFv no complexo P10-DLL1	94

Figura 35	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre DLL1 e os scFvs mutados através do programa ClusPro e variação do iRMS das mesmas durante simulações de DM com aquecimento	96
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estruturas cristalográficas de complexos com o receptor PD-1 utilizadas na validação do método de <i>docking</i>	42
Tabela 2	Moldes para V _H e V _L do pidilizumabe	57
Tabela 3	<i>Clashscore</i> dos scFvs antes e após refinamento com ReFOLD	61
Tabela 4	Estatísticas dos gráficos de Ramachandran referentes aos modelos de scFv P10, P12 e P15	63
Tabela 5	Percentual de resíduos com Escore 3D-1D adequados segundo o programa Verify3D	64
Tabela 6	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre PD-1 e PD-L1 com o HADDOCK	65
Tabela 7	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre PD-1 e PD-L1 com o ClusPro	66
Tabela 8	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre PD-1 e o Fv do pembrolizumabe com o HADDOCK	67
Tabela 9	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre PD-1 e o Fv do pembrolizumabe com o ClusPro	68
Tabela 10	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre PD-1 e os três scFvs utilizando o HADDOCK	70
Tabela 11	Exemplos de modelos resultantes do <i>docking</i> entre diversas estruturas cristalográfica do PD-1 e os scFvs com o servidor ClusPro	71
Tabela 12	Estruturas resultantes do <i>docking</i> entre DLL1 e os três scFvs utilizando o HADDOCK	73
Tabela 13	Exemplos de modelos resultantes do <i>docking</i> entre a proteína DLL1 e os scFvs utilizando o servidor ClusPro	74
Tabela 14	Energia livre de ligação nos complexos entre os scFvs e DLL1, obtidos pela análise por MM/PBSA	88
Tabela 15	Mutações benéficas em P10, preditas pelos servidores mCSM-Ab e BeAtMuSiC	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ACP	Análise do Componente Principal
ADAM	<i>A Disintegrin And Metaloproteinase</i>
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ASM	<i>Alanine Scanning mutagenesis</i>
ASR	<i>Age-standardized rate</i>
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
CAMEO	<i>Continuous Automated Model EvaluatiOn</i>
CAPRI	<i>Critical Assessment of PRedicted Interactions</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Citotoxicidade dependente do complemento
CDR	Região Determinante de Complementaridade
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4</i>
D1	Ligante de Notch <i>Delta</i>
DLL1	<i>Delta-like ligand 1</i>
DLL2	<i>Delta-like ligand 2</i>
DLL3	<i>Delta-like ligand 3</i>
DM	Dinâmica molecular
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
EGF	Fator de crescimento humano
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
FADE	<i>Fast Atomic Density Evaluation</i>
Fc	Fragmento, cristalizável
Fnat	<i>Fraction of Native Contacts</i>
fs	Femtosegundo
Fv	Fragmento, variável
GSI	Inibidor de γ -Secretase
HADDOCK	<i>High Ambiguity Driven Biomolecular Docking</i>

HAMA	Anticorpo humano anti-camundongo
HAT	Histona Acetiltransferase
HES	<i>Hairy Enhancer of Split</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulina
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IPP	Interação proteína-proteína
iRMS	Raiz do valor quadrático médio da interface
ITIM	Motivo de Inibição do Imunorreceptor Baseado em Tirosina
ITSM	Motivo de Troca do Imunorreceptor Baseado em Tirosina
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JAG1	<i>Jagged 1</i>
JAG2	<i>Jagged 2</i>
K-FADE	<i>Knowledge-based FADE</i>
K-CON	<i>Knowledge-based Biochemical Contact analysis</i>
LH	Linfoma de Hodgkin
LINCS	<i>Linear Constraint Solver</i>
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
LRMS	Raiz do valor quadrático médio do ligante
mAb	Anticorpo Monoclonal
MAML1	<i>Mastermind-like 1</i>
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MOF	Função objetiva do Modeller
MM/PBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
MM	Mecânica Molecular
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
Notch-IC	Região citoplasmática da proteína Notch
ns	Nanossegundo
PD-1	<i>Programmed Death 1</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

PD-L1	<i>Programmed Death ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed Death ligand 2</i>
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
ps	Picossegundo
RC	Resposta completa
Rg	Raio de giro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz do desvio quadrático médio
RMSF	Raiz da flutuação quadrática média
RP	Resposta parcial
SASA	Área superficial acessível ao solvente
scFv	Fragmento único de cadeia variável
Ser	Ligante de Notch <i>Serrate</i>
SKIP	<i>Ski-interacting protein</i>
Ssh	<i>Sonic-hedgehog</i>
TACE	Enzima conversora de TNF- α
TCR	Receptor de células T
TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
Treg	Células T reguladoras

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Caracterização do problema	17
<i>1.1.1</i>	<i>Imunoterapia do câncer</i>	18
<i>1.1.2</i>	<i>Anticorpo monoclonais</i>	22
<i>1.1.3</i>	<i>Anticorpos inibidores de checkpoint</i>	26
<i>1.1.4</i>	<i>Vias de sinalização Notch</i>	27
<i>1.1.5</i>	<i>Delta-like ligand 1</i>	30
<i>1.1.6</i>	<i>Pidilizumabe</i>	31
<i>1.1.7</i>	<i>Abordagem do problema</i>	33
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	METODOLOGIA	39
3.1	Modelagem computacional dos scFvs	39
3.2	Obtenção da estrutura tridimensional de DLL1 e PD-1	41
3.3	Docking computacional anticorpo-antígeno	42
<i>3.3.1</i>	<i>Validação da metodologia de docking</i>	42
<i>3.3.2</i>	<i>Docking dos scFvs à PD-1 e DLL1</i>	46
3.4	Simulações de dinâmica molecular dos complexos validados	47
<i>3.4.1</i>	<i>Dinâmica de produção</i>	47
<i>3.4.2</i>	<i>Análise do RMSD</i>	48
<i>3.4.3</i>	<i>Análise do RMSF</i>	49
<i>3.4.4</i>	<i>Análise do Raio de Giro</i>	49
<i>3.4.5</i>	<i>Análise das ligações de hidrogênio</i>	50
<i>3.4.6</i>	<i>Análise da formação de pontes salinas</i>	50
<i>3.4.7</i>	<i>Análise da área superficial acessível ao solvente</i>	50
<i>3.4.8</i>	<i>MM/PBSA</i>	50
3.5	Identificação dos hot-spots da interação anticorpo-antígeno	51
<i>3.5.1</i>	<i>Alanine scanning computacional</i>	51
<i>3.5.2</i>	<i>KFC2 webserver</i>	52
<i>3.5.3</i>	<i>HotRegion</i>	53

3.5.4	PREDHS	53
3.6	Mutagênese computacional	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Modelagem <i>in silico</i> dos fragmentos de anticorpo	56
4.2	Validação da metodologia de <i>docking</i> computacional	64
4.3	<i>Docking</i> dos scFvs à PD-1 e DLL1	69
4.4	Dinâmica molecular dos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1	76
4.5	Mutagênese computacional	89
5	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICE A – LISTA DE ESTRUTURAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE PARA O ECTODOMÍNIO DO PD-1	119
	APÊNDICE B - LISTA DE ESTRUTURAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE PARA O ECTODOMÍNIO DO DLL1	120
	APÊNDICE C – TESTES CLÍNICOS ENVOLVENDO ANTICORPOS ANTI-PD-1 CONTRA DIVERSAS MALIGNIDADES	121
	APÊNDICE D – TESTES CLÍNICOS ENVOLVENDO ANTICORPOS MONOCLONAIS INIBIDORES DA VIA DE NOTCH CONTRA O CÂNCER	124
	APÊNDICE E – TESTES CLÍNICOS ENVOLVENDO PIDILIZUMABE	125
	APÊNDICE F – RAIOS DE GIRO NOS EIXOS X, Y E Z PARA OS SCFVS NOS COMPLEXOS P10-DLL1 E P12-DLL1	126
	APÊNDICE G – ENERGIA TOTAL DOS COMPLEXOS P10-DLL1 E P12-DLL1	127
	APÊNDICE H – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A REPLICATA 1 DO COMPLEXO P10-DLL1	128
	APÊNDICE I – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A REPLICATA 2 DO COMPLEXO P10-DLL1	129
	APÊNDICE J – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A REPLICATA 3 DO COMPLEXO P10-DLL1	130
	APÊNDICE K – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A REPLICATA 1 DO COMPLEXO P12-DLL1	131

APÊNDICE L – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A REPLICATA 2 DO COMPLEXO P12-DLL1	132
APÊNDICE M - RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A REPLICATA 3 DO COMPLEXO P12-DLL1	133
APÊNDICE N – ANÁLISE DE <i>HOT-SPOTS</i> NO COMPLEXO P10-DLL1	134
APÊNDICE O - ANÁLISE DE <i>HOT-SPOTS</i> NO COMPLEXO P12-DLL1	135

1 INTRODUÇÃO

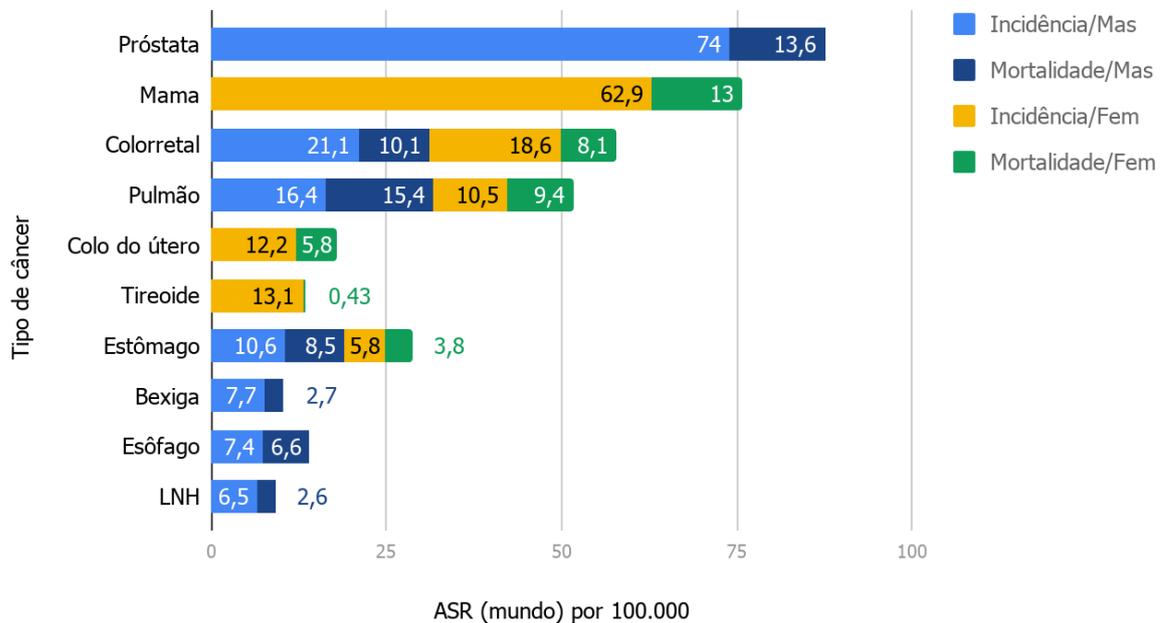
1.1 Caracterização do problema

Câncer é uma palavra que vem do grego “*karkínos*”, que quer dizer caranguejo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Atualmente, esse é o nome geral dado a um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizado por células que não respondem aos controles normais de divisão (PIERCE, 2016). Enquanto células saudáveis crescem, dividem-se, amadurecem e morrem em resposta a um complexo conjunto de sinais internos e externos, células cancerígenas têm um ou mais desses sinais comprometidos, levando as mesmas a se proliferarem rápida e continuamente, levando ao surgimento de tumores sólidos ou cânceres hematológicos (SANTOS, 2018).

Estimativas mundiais mostraram que, em 2018, ocorreram 18,1 milhões de novos casos de câncer, resultando em 9,6 milhões de óbitos, e estimou-se ainda que o número de novos casos deve chegar aos 29,5 milhões até 2040 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Os tipos de câncer mais incidentes no mundo são os de pulmão e de mama, com aproximadamente dois milhões de novos diagnósticos apenas em 2018 para cada; estes, juntamente ao câncer colorretal, são responsáveis por aproximadamente um terço das mortes por câncer mundialmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

No Brasil, para o biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano (SANTOS, 2018). Alguns fatores explicam a participação do câncer na mudança recente relacionada ao perfil de adoecimento da população brasileira - chamada de transição epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Alguns destes são: a maior exposição a agentes cancerígenos (agentes químicos, físicos e biológicos aos quais as pessoas são expostas como consequência de mudanças no estilo de vida e de um processo de industrialização intenso); o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento da população; o aprimoramento dos métodos para se diagnosticar o câncer; o aumento no número de óbitos pela doença; e a melhoria da qualidade e do registro das informações. A Figura 1 evidencia não somente os tipos de câncer com maior incidência no Brasil, como a diferença das frequências destes de acordo com o gênero.

Figura 1 - Taxas de incidência e mortalidade do câncer estimadas e padronizadas por idade em 2018 para ambos os gêneros no Brasil



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2019). Adaptado pelo autor (2019). Incidência/Mas - Incidência para indivíduos do gênero masculino. Mortalidade/Mas - Mortalidade para indivíduos do gênero masculino. Incidência/Fem - Incidência para indivíduos do gênero feminino. Mortalidade/Fem - Mortalidade para indivíduos do gênero feminino. LNH - Linfoma Não-Hodgkin. ASR (do inglês “*age-standardized rate*”) - Taxa de incidência e mortalidade estimada padronizada por idade, que é uma medida resumida da taxa que uma população teria se tivesse uma estrutura etária padrão; a padronização é necessária ao comparar várias populações que diferem em relação à idade, que é um fator que afeta tanto a incidência quanto a mortalidade para o câncer. As neoplasias mais incidentes no Brasil são os tumores de próstata e de mama, que também foram os mais letais em 2018 para homens e mulheres, respectivamente.

1.1.1 Imunoterapia do câncer

Um dos grandes problemas associados às terapias convencionais para o câncer - a exemplo da radioterapia e quimioterapia - é que estas não são direcionadas e possuem diversos efeitos nocivos ao corpo, uma vez que destroem as células em divisão ou interrompem a divisão celular, afetando também células saudáveis e tendo como resultado a manifestação de efeitos colaterais e altas taxas de mortalidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Com o objetivo de encontrar tratamentos com o melhor balanço entre uma alta eficácia e baixa toxicidade (MAHONEY; FREEMAN; MCDERMOTT, 2015), novos fármacos que utilizam abordagens alternativas - como as terapias hormonais, terapias alvo e

imunoterapia - vêm ganhando destaque (SIEGEL et al., 2012). Esta última tem como característica agir sobre o sistema imunológico, e não no tumor *per se* (COUZIN-FRANKEL, 2017), possuindo o potencial para ser um tratamento mais específico para neoplasias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

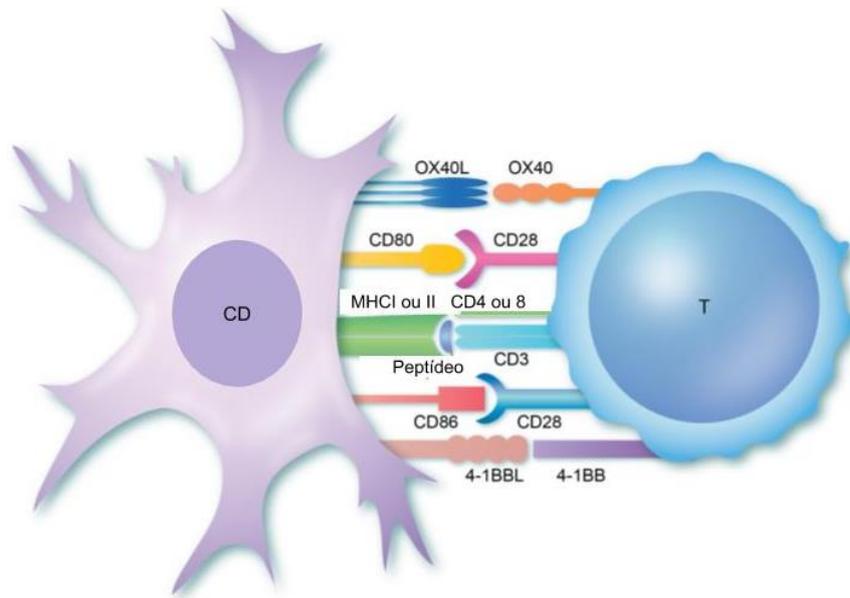
Alterações genéticas e epigenéticas são características de todos os cânceres e fornecem uma grande diversidade de antígenos que o sistema imune pode utilizar para distinguir as células tumorais das demais (PARDOLL, 2012). Tal reconhecimento, no caso das células T, é feito via receptor de células T (TCR, do inglês “*T-Cell receptor*”). As células T tem sido foco na manipulação terapêutica da imunidade antitumoral endógena graças a sua capacidade de reconhecer seletivamente peptídeos derivados de proteínas em todos os compartimentos celulares, de reconhecer e matar células que expressam os antígenos, através das células T CD8+ efetoras, e de iniciar diversas respostas imunes que integram os mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa (PARDOLL, 2012).

Após saírem do timo, onde passam pela etapa de maturação, os linfócitos circulam pelo corpo até reconhecerem um antígeno na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês “*antigen presenting cells*”) via Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC, do inglês “*Major Histocompatibility Complex*”) de classe I, no caso dos linfócitos T citotóxicos, ou de classe II, para interação com linfócitos T auxiliares (CAVANAGH; FINDLAY, 2019). O complexo é estabilizado pela interação do CD4 ou CD8 com o MHC.

Adicionalmente, são requeridos uma série de sinais secundários que determinam a força e duração da ativação (FREEMAN, 2000). No caso das células T CD4+, o primeiro desses sinais é provido pelo CD28, que interage com proteínas da família B7 presentes nas superfícies das APCs, levando ao início da expansão clonal dos linfócitos (CAVANAGH; FINDLAY, 2019). Não obstante, a interação CD28-B7 leva a produção de CTLA-4 (“*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4*”), um receptor de ponto de checagem (“*checkpoint*”) imunológico que atua no controle da resposta e reduz o sinal de ativação. Em circunstâncias normais, os *checkpoints* do sistema imune, em um balanço entre sinais estimulatórios, co-estimulatórios e inibitórios responsáveis por controlar a ativação dos linfócitos T, são essenciais para a manutenção da autotolerância, de forma a prevenir respostas autoimunes e proteger o tecido contra danos enquanto o sistema imunológico está respondendo a uma infecção patogênica. Entretanto, a expressão de proteínas de *checkpoint* pode ser desregulada por tumores como mecanismo de evasão ao sistema imune (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; ZOU; CHEN, 2008).

Já células T CD8⁺ são menos dependentes de CD28, mas requerem outros sinais co-estimulatórios, como os fornecidos pelo CD70 e 4-1BB (CD137), ilustrados na Figura 2. A sinalização pelas citocinas também é essencial para determinar como será a resposta ao antígeno (CAVANAGH; FINDLAY, 2019). Uma vez ativadas, as células T iniciam a produção de citocinas, como interferon- γ (IFN- γ) e interleucina 4 (IL-4), que induzem um aumento na expressão de receptores co-inibitórios, como o PD-1 (“*Programmed Death 1*”, também conhecido com CD279) e seus ligantes, de forma a criar um ciclo de retroalimentação que refreia as respostas imunológicas e limita o dano tecidual imunorelacionado, quando não sobrepujado por fortes sinais estimulatórios (FREEMAN, 2008).

Figura 2 – Principais interações envolvidas na ativação das células T



Fonte: CAVANAGH; FINDLAY (2019). Adaptado pelo autor (2019). A célula dendrítica (CD) é um tipo de APC, e pode apresentar o antígeno peptídico via MHC de classe I ou II para linfócitos T citotóxicos ou auxiliares, que o reconhecem via complexo TCR-CD3; simultaneamente, CD4 ou CD8 interagem com regiões não polimórficas do MHC. Os sinais co-estimulatórios são fornecidos através dos receptores ligados a APC CD86, CD80, OX40L e 4-1BBL, levando a ativação total das células T.

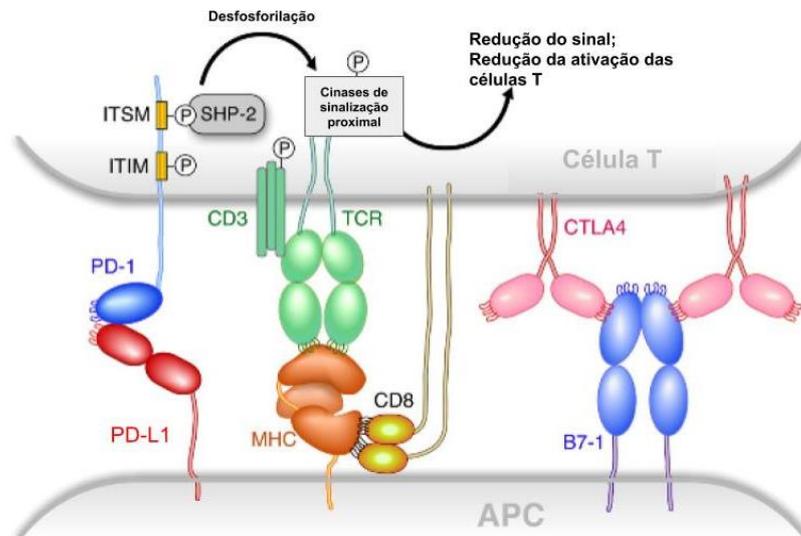
O receptor PD-1 e seus ligantes – membros da família B7/CD28 (ISHIDA et al., 1992) - ganharam destaque para imunoterapia após a utilização de um anticorpo anti-PD-1 na cura do tumor cerebral do ex-presidente dos Estados Unidos, Jimmy Carter (ROTTE; D’ORAZI; BHANDARU, 2018). PD-1 é uma proteína transmembrana composta de um domínio extracelular (ectodomínio) da superfamília das imunoglobulinas (Ig), um domínio

transmembrana e um domínio intracelular que contém um motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM, do inglês “*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*”) e um motivo de troca do imunorreceptor baseado em tirosina (ITSM, do inglês “*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*”) (KEIR et al., 2008). O tamanho total do receptor humano é de 268 resíduos de aminoácido, e seu gene está localizado no braço longo do cromossomo 2 – o segundo maior cromossomo - indicando que a proteína pode interagir com muitos outros produtos gênicos e estar envolvida em várias doenças importantes, como inflamação, câncer e doenças autoimunes (SHINOHARA et al., 1994).

O principal papel do PD-1 é conter a atividade de células T em tecidos periféricos quando há uma resposta inflamatória à infecção e limitar a autoimunidade, dessa forma inibindo as células T durante uma exposição de longo prazo ao antígeno, como ocorre durante infecções virais crônicas e no câncer (BARBER et al., 2006). Para além das células T ativadas, esse receptor também pode ser encontrado na superfície de células B, monócitos, células NK (“*Natural Killers*”) e muitos linfócitos infiltrantes de tumor (TILs, do inglês “*tumor-infiltrating lymphocytes*”) (KEIR et al., 2008; DOLAN; GUPTA, 2014).

Seus ligantes conhecidos são o PD-L1 (também chamado de B7-H1 ou CD274) e o PD-L2 (identicamente descrito como B7-DC ou CD273), que estão presentes na superfície de APCs, linfócitos, células endoteliais e fibroblastos. A interação da PD-1 com tais proteínas inibe cinases que estão envolvidas na ativação de células T em um processo que é mediado pela fosfatase SHP2 (FREEMAN et al., 2000; DU et al., 2018), como está ilustrado na Figura 3. Essa interação tem como consequências a inibição da proliferação de células T, redução de sua sobrevivência, e inibição da produção de IFN- γ , do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e da interleucina-2 (IL-2) (KEIR et al., 2008). Estudos utilizando ressonância plasmônica de superfície e microcalorimetria para quantificar a afinidade da PD-1 humana e de camundongo à PD-L1 e PD-L2 mostraram que esse efeito inibitório é mediado por interações fracas (CHENG et al., 2013).

Figura 3 – Mecanismo molecular de ação da PD-1



Fonte: FREEMAN (2008). Adaptado pelo autor (2019). A interação do ligante de PD-1 (PD-L1), presente nas células apresentadoras de antígeno (APCs), com o PD-1 na superfície da célula T leva a fosforilação de tirosina do domínio citoplasmático do PD-1 e ao recrutamento de fosfatases SHP-2, resultando na desfosforilação de moléculas sinalizadoras proximais de TCR, incluindo ZAP-70, PKC e CD3, causando uma atenuação do sinal TCR/CD28.

O ectodomínio do PD-1 humano, cuja as estruturas determinadas experimentalmente podem ser observadas no Apêndice A, é responsável pela interação com os seus ligantes, sendo composto por 150 aminoácidos, com quatro sítios de glicosilação (N49, N58, N74, e N116) e uma ponte dissulfeto (C54-C123) (DU et al., 2018). Com o intuito de restaurar a resposta antitumoral endógena, anticorpos monoclonais que interajam com essa região do receptor podem ser utilizados para bloquear a sua interação com PD-L1 e PD-L2 (PARDOLL, 2012).

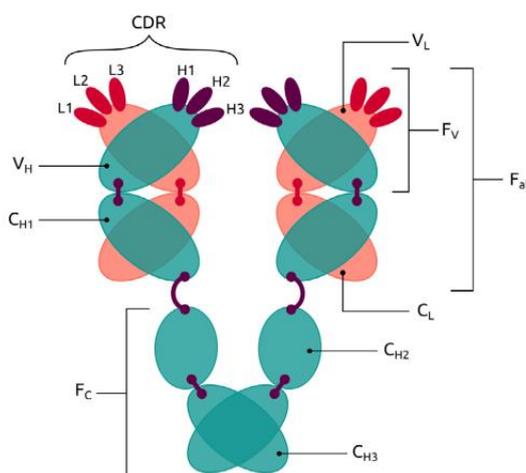
1.1.2 Anticorpos monoclonais

Anticorpos são imunoproteínas que estão presentes no soro, fluidos teciduais e, constitutivamente, na superfície das células B (ROQUE et al., 2007). Essas moléculas compartilham as mesmas características estruturais básicas, mas possuem uma variabilidade singular na região de ligação ao antígeno, que lhes permite acoplarem-se a um alvo correspondente, dessa forma atuando na detecção, localização, reconhecimento, interação, inativação e eliminação do antígeno (CARVALHO, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI,

2015).

Um anticorpo secretado possui uma estrutura simétrica composta por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas, como observado na Figura 4. Ambas as cadeias possuem uma série de unidades homólogas chamadas de domínios Ig, compostas por aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos que se dobram independentemente e são mantidos unidos por pontes dissulfeto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura de um anticorpo



Fonte: ROY et al. (2017). A estrutura de um anticorpo é dividida em uma região constante (Fc) e dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab), conectados por uma região de dobradiça. No Fab, é possível encontrar uma região variável (Fv) que é composta por uma porção variável na cadeia leve (VL) e outra na cadeia pesada (VH), e é a responsável pela interação com o antígeno propriamente dita. As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) presentes em VH e VL são responsáveis por determinar a especificidade e afinidade de interação e são compostas por alças hipervariáveis (L1, L2, L3, H1, H2, H3). As regiões constantes da cadeia pesada estão identificadas como CH1, CH2 e CH3, enquanto a região constante da cadeia leve está nomeada como CL.

A estrutura da imunoglobulina é dividida em uma fração constante, também conhecida por Fc (fragmento, cristalizável), devido a sua propensão a auto associar e cristalizar em forma de treliça; e uma porção variável (Fv) de interação ao antígeno. A região Fc é a responsável pelo aumento da meia vida plasmática do anticorpo e por mediar as suas funções efetoras, como a citotoxicidade celular mediada por células (ADCC, do inglês “*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*”) e a citotoxicidade celular mediada pelo sistema complemento (CDC, do inglês “*Complement-dependent cytotoxicity*”) (JAIN et al., 2007;

HOLLIGER; HUDSON, 2005). São alterações encontradas nessa região que levam a distinção dos anticorpos em cinco diferentes classes: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. Esta última está intimamente relacionada à imunidade neonatal, mas também age na opsonização e neutralização do antígeno e na ADCC e CDC. Também é a mais frequentemente utilizada para imunoterapia do câncer (WEINER et al., 2010; CARVALHO, 2013).

O fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês “*Fragment antigen-binding*”) é composto pelas regiões variável e constante da cadeia leve (V_L - C_L), pareadas a um fragmento V_H - C_{H1} . Dentro das regiões variáveis das cadeias leve (V_L) e pesada (V_H), existem três segmentos com maior diversidade em cada cadeia, conhecidos como regiões hipervariáveis (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Uma vez que essas sequências juntas formam uma superfície complementar a forma tridimensional do antígeno ligado, essas porções também são chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs, do inglês *Complementarity-determining regions*) (WEINER et. al, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

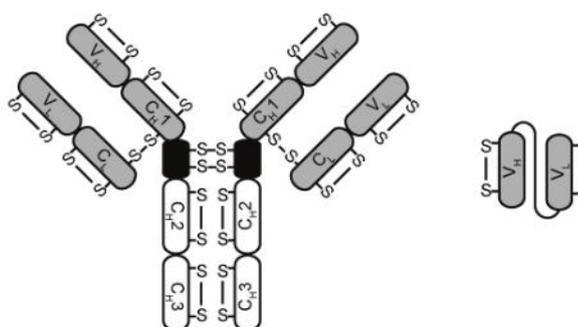
Os anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês “*monoclonal antibodies*”) são derivados de um mesmo clone de linfócito B cuja clonagem e propagação se efetuam em linhas de células contínuas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010), que são capazes de reconhecer e interagir com alvos específicos, desencadeando uma resposta imunobiológica (VIDAL; FIGUEIREDO; PEPE, 2018). Eles foram inicialmente produzidos em laboratório através da fusão de células B, obtidas a partir de camundongos imunizados com um antígeno conhecido, com uma linhagem celular imortalizada de mieloma (KOHLENER; MILSTEIN, 1975). As células resultantes desse processo, chamadas de hibridomas, são selecionadas e apenas o clone que produz anticorpos com a especificidade desejada é expandido. A grande limitação da utilização desta técnica para uso clínico é que pacientes tratados com anticorpos murinos podem passar a produzir anticorpos contra a imunoglobulina de camundongo (*HAMA*, do inglês “*human anti-murine antibodies*”), levando a um bloqueio de função ou eliminação do mAb, e podendo causar um distúrbio conhecido como doença do soro (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A tecnologia do ADN recombinante vem sendo utilizada para expandir a utilidade dos mAbs. Na produção de anticorpos quiméricos e humanizados, por exemplo, genes humanos são fusionados com genes de camundongos; no caso dos primeiros, mantém-se toda a região Fab murina, enquanto, nos últimos, apenas as CDRs do camundongo são preservadas (GUIMARÃES; SILVA; RANGEL, 2008). Isso garante que essas moléculas possuam uma menor imunogenicidade, aumentando a chance de sucesso com a terapia.

Exemplos de anticorpos quiméricos e humanizados são, respectivamente, o rituximabe (PLOSKER; FIGGITT, 2003) e o trastuzumabe (HUDIS, 2007). Outra alternativa na produção de imunoglobulinas terapêuticas é a utilização de anticorpos totalmente humanos, como ocorre no caso do ipilimumabe (VAUGHAN; OSBOURN; TEMPEST, 1998; HODI et al., 2010).

Novos desenhos estruturais para mAbs vêm sendo desenvolvidos em busca de moléculas que possuam afinidade e estabilidade aumentadas, e que permitam a seleção contra alvos refratários. Exemplos de anticorpos engenheirados são aqueles que dispensam a fração Fc, a exemplo dos fragmentos únicos de cadeia variável (scFv, do inglês “*single chain Fragment variable*”), representados na Figura 5. Tais compostos compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, conectados por um polipeptídeo ligante flexível (WEISSER; HALL, 2009). Geralmente, retêm a afinidade específica, monovalente e de ligação ao antígeno da IgG progenitora, enquanto demonstram farmacocinética aprimorada para a penetração no tecido (HOLLIGER; HUDSON, 2005) e um tempo para depuração plasmática reduzido (AHMAD et al., 2012).

Figura 5 - Representação esquemática de um scFv



Fonte: VERNET (2009). À esquerda, é possível observar a representação esquemática da estrutura de um anticorpo IgG, com seus domínios discriminados: o Fab encontra-se sombreado em cinza, a região de dobradiça em preto e a região Fc em branco. Os átomos de enxofre estão assinalados pela letra S, e formam pontes dissulfeto sob condições oxidantes. À direita, encontra-se uma estrutura de scFv, que é composta pelas regiões variáveis das cadeias leve (V_L) e pesada (V_H), unidas por um peptídeo ligante em uma única cadeia.

Dentre as vantagens da utilização desses fragmentos em relação à mAbs completos, pode ser citado o fato dos scFvs serem moléculas menores, que podem ser produzidas de forma mais econômica, além de serem facilmente modificadas através de

técnicas de manipulação genética (WEISSER; HALL, 2009), e produzidas em diversas plataformas, incluindo bactérias, leveduras e plantas (BIRD et al., 1988), além de poder ser utilizado numa gama de aplicações em que a função efetora mediada pela região constante não é desejável, como ocorre quando há a ativação inadequada das células que expressam o receptor Fc, que pode levar à liberação maciça de citocinas e a efeitos tóxicos associados (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

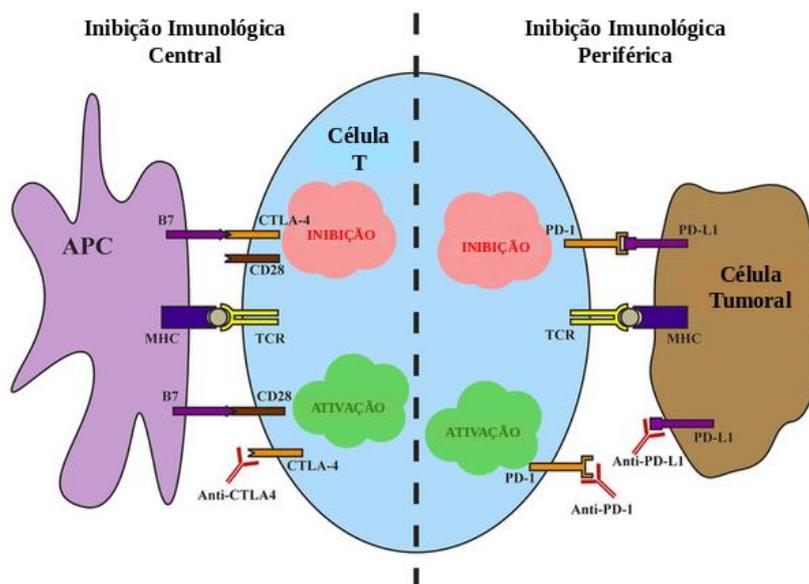
1.1.3 Anticorpos inibidores de *checkpoint*

Ao contrário de uma parte dos anticorpos utilizados na terapia do câncer, imunoglobulinas que bloqueiam *checkpoints* imunológicos não tem como alvo as células tumorais, mas sim os receptores de linfócitos ou os seus ligantes, a fim de melhorar a atividade antitumoral endógena (PARDOLL, 2012). O primeiro inibidor de *checkpoint* foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) - um órgão federal dos Estados Unidos análogo a ANVISA brasileira - em 2011, e em 2013 já haviam os primeiros relatos do uso dessas moléculas como agentes anticancerígenos (LI et al., 2016).

Desde então, diversos estudos clínicos e pré-clínicos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos desses antagonistas de sinais inibitórios que resultam na amplificação de respostas de células T específicas para antígenos em diversos tipos de neoplasia. Exemplos de moléculas-alvo para o desenvolvimento desses medicamentos são os receptores inibitórios PD-1 e CTLA-4, o ligante PD-L1, os receptores LAG3 e TIM3, e os ligantes inibitórios B7-H3 e B7-H4 (PARDOLL, 2012; QIN et al., 2019).

Testes pré-clínicos demonstraram uma redução do crescimento do tumor e um aumento da sobrevivência associados ao bloqueio das vias dos receptores PD-1 e CTLA-4 - este que é responsável por uma sinalização negativa nas primeiras fases da ativação das células T nos órgãos linfáticos secundários - demonstrando a eficácia da inibição de *checkpoints* no tratamento do câncer (LEACH; KRUMMEL; ALLISON, 1996; HIRANO et al., 2005). A Figura 6 ilustra como a inibição dessas duas proteínas atua na restauração da resposta ao tumor.

Figura 6 – Vias de bloqueio do CTLA-4 e PD-1



Fonte: SU; FISHER (2016). Adaptado pelo autor (2019). A inibição imunológica central, que acontece nos linfonodos, ocorre como resultado da interação do CTLA-4 com os ligantes coestimulatórios B7 nas APCs, impedindo a sinalização via CD28; o bloqueio de CTLA-4 por anticorpos anti-CTLA-4 permite a ativação e proliferação de clones de células T, e reduz a imunossupressão mediada por células T reguladoras (Treg). A inibição imunológica periférica, por sua vez, ocorre nos tecidos periféricos quando um ligante de PD-1 (PD-L1) presente na célula tumoral interage com o receptor PD-1 presente nas células T; o bloqueio desta via por anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1 restaura a atividade das células T antitumorais que se tornaram quiescentes. Essas vias não se sobrepõem, e o bloqueio de ambas pode ter efeito cumulativo.

Estudos clínicos demonstraram uma resposta durável obtida a partir da utilização de anticorpos anti-PD-1, com uma das maiores taxas de atividade antitumoral dentre muitas abordagens de imunoterapia utilizadas no tratamento do câncer, inclusive tendo atividade em tumores que são notoriamente resistentes a imunoterapia, como é o caso do câncer de pulmão (BRAHMER et al., 2012; TOPALIAN et al., 2012). Exemplos de fármacos anti-PD-1 que estão passando por estudos clínicos aprovados pelo FDA estão listados no Apêndice C.

1.1.4 Vias de sinalização Notch

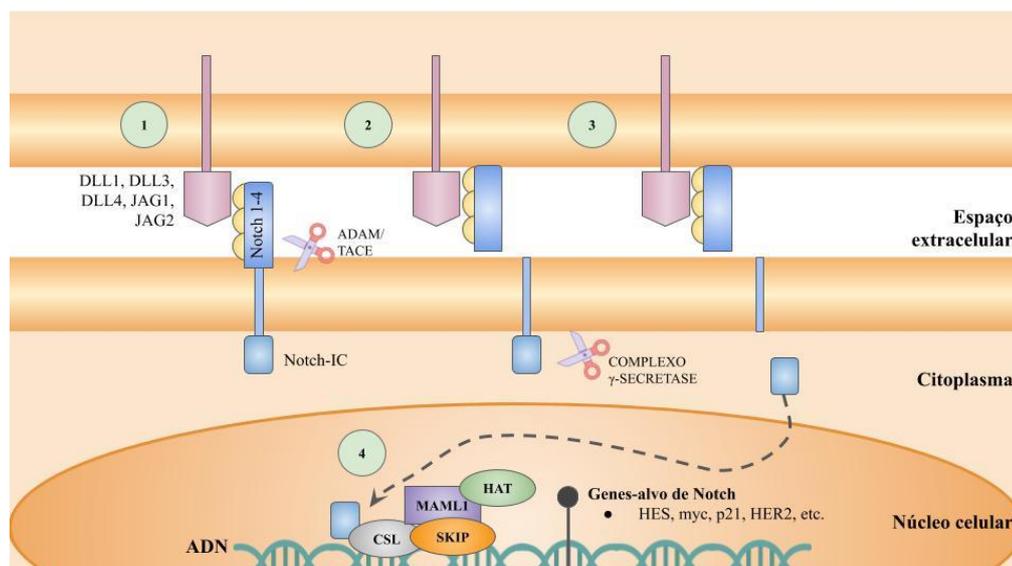
O gene *Notch* codifica para um receptor com um domínio transmembrana, que é sintetizado como precursor proteico único, e é ativado por clivagem proteolítica durante

o transporte até a superfície celular, por conseguinte existindo sob a forma de receptor heterodimérico (LOGEAT et al., 1998; BLAUMUELLER et al., 1997). Em *Drosophila*, aonde os efeitos do *Notch* foram inicialmente identificados, existe apenas uma proteína Notch e dois ligantes, *Delta* (D1) e *Serrate* (Ser). Já em mamíferos, são quatro receptores (Notch 1-4) e cinco ligantes, chamados de *Delta-like-1*, -3 e -4 (DLL1, DLL3 e DLL4) e *Jagged 1* e 2 (JAG1 e JAG2), que são similares a Ser (RADTKE; RAJ, 2003). Todas essas proteínas são polipeptídios transmembranares de passagem simples, apresentando múltiplas repetições do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês “*Epidermal Growth Factor*”) na região extracelular (RAMPAL et al., 2005). Notch1, por exemplo, possui um domínio extracelular com 36 repetições do tipo EGF (PUROW et al., 2005)

A sinalização via Notch inicia-se pela interação receptor-ligante entre duas células vizinhas, o que leva a duas sucessivas clivagens proteolíticas que liberam a porção citoplasmática da proteína (Notch-IC) da membrana, a qual é transportada ao núcleo (Figura 7) (JUNG et al., 2011). A interação de Notch-IC com membros da família de fatores de transcrição CSL converte-o em um complexo de ativação transcricional que está envolvido com a transcrição dos genes-alvo de Notch (TAKEBE; NGUYEN; YANG, 2014). Alguns desses são responsáveis por codificar: a família de proteínas HES (do inglês “*Hairy Enhancer of Split*”) e relacionadas a HES, como a HEY, e a proteína de repetição de anquirina regulada por Notch (KAO et al., 1998); p21 (RANGARAJAN et al., 2001); ciclinas D1 e D3 (RONCHINI; CAPOBIANCO, 2001; SICINSKA et al., 2003); c-myc (WENG et al., 2006); e HER2 (CHEN et al., 1997).

Um processo similar de liberação dos domínios intracelulares dos ligantes *Delta-like* e *Jagged* ocorre na célula adjacente para fins de sinalização, embora as vias envolvidas nestes casos ainda não estejam bem caracterizadas (PUROW et al., 2005). A sinalização por Notch pode influenciar positivamente ou negativamente diversos eventos celulares, dentre eles: a manutenção das células tronco; especificação do destino celular; diferenciação, proliferação e apoptose (ARTAVANIS-TSAKONAS; RAND; LAKE, 1999; OSBORNE; MIELE, 1999).

Figura 7 - Representação da via canônica de sinalização por Notch



Fonte: elaborado pelo autor. ADAM - “A Disintegrin And Metaloproteinase”; TACE - Enzima conversora de TNF- α ; HAT - Histona Acetiltransferase; MAML1 - “Mastermind-like 1”; SKIP - “Ski-interacting Protein”. Na via canônica de sinalização Notch, a interação de células adjacentes pelos ligantes de Notch (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2) com os receptores Notch (1-4) promove clivagens sucessivas no receptor, primeiro pelas enzimas ADAM/TACE, chamada clivagem S2 (1), e segundo pelo complexo γ -secretase, denominada clivagem S3 (2), causando a liberação de Notch-IC (3). Após ser transportado ao núcleo da célula, Notch-IC interage com reguladores transcripcionais (4), ativando a transcrição de seus genes-alvo, que regulam diversos eventos relacionados a definição do destino celular. Os inibidores terapêuticos potenciais dos alvos envolvidos na sinalização de Notch incluem inibidores de γ -secretase (GSI) e mAbs que interajam com Notch ou seus ligantes.

Dependendo do contexto celular, a via de sinalização Notch pode ser potencialmente oncogênica, ou contribuir para supressão tumoral, como foi observado no câncer de pele em ratos (NICOLAS et al., 2003). No estudo de Nicolas e colaboradores (2003), a repressão de Notch1 foi associada com a ativação aberrante de vias de sinalização associadas a diversos tipos de câncer, como é o caso das vias Ssh (*Sonic-hedgehog*) e Wnt. A sua ativação, por outro lado, aumenta a expressão de WAF1, o que causa uma parada no ciclo celular nas células basais do epitélio, que permite o início da diferenciação celular terminal. A atividade de Notch como supressor de tumor também passa por outras rotas metabólicas, com o intuito de garantir a diferenciação celular (NICOLAS et al., 2003).

Em contraste, o gene *Notch* pode funcionar como oncogene, onde a expressão aberrante do domínio citoplasmático predominantemente ativo nos receptores Notch em células hematopoiéticas - que ocorre devido a translocação cromossomal ou a integração viral - pode causar leucemias de células T em ratos e humanos, uma vez que, quando associado a

outras oncoproteínas, esse receptor defeituoso pode contribuir para sobreposição do ponto de checagem do ciclo celular entre as fases G1 e S (RADTKE; RAJ, 2003). O envolvimento de Notch também foi observado em casos de leucemia linfoblástica aguda e linfoma de células T, nos quais a translocação cromossomal t(7;9) produz um Notch1 truncado com grande parte da subunidade extracelular ausente (ELLISEN et al., 1991).

É importante observar que na maioria dos tumores sólidos humanos, como câncer de mama, de ovário ou de pulmão, mutações em Notch são pouco frequentes: as taxas de mutação para Notch1 são inferiores a 5% e menores ainda para os demais receptores e ligantes (EGLOFF; GRANDIS, 2012). Não obstante, a expressão desregulada de receptores Notch do tipo selvagem e de seus ligantes foi encontrada em um número crescente de tumores e está relacionada a piores prognósticos (TAKEBE; NGUYEN; YANG, 2014). Outras oncoproteínas podem estar relacionadas a essa desregulação. Ras oncogênico pode aumentar os níveis e a atividade da subunidade intracelular de Notch1 do tipo selvagem e aumentar a expressão de DLL1 e presenilina-1 (WEIJZEN et al., 2002). O fenótipo oncogênico transformado por Ras é mantido pela sinalização de Notch1 ativada, e, para reverter tal cenário, pode ser necessário co-inibir ambas as vias.

Também há evidências de que a sinalização por Notch está envolvida na angiogênese da região tumoral (NOGUERA-TROISE et al., 2006; RIDGWAY et al., 2006). Baseado nos mecanismos supracitados, há um crescente interesse no desenvolvimento de fármacos que têm como alvo a via Notch (TAKEBE; NGUYEN; YANG, 2014), sejam essas pequenas moléculas inibitórias - primariamente os inibidores de γ -secretase (GSIs, do inglês “*gamma-secretase inhibitors*”) - ou anticorpos monoclonais que tenham como alvos os receptores ou ligantes de Notch, como os que estão listados no Apêndice D.

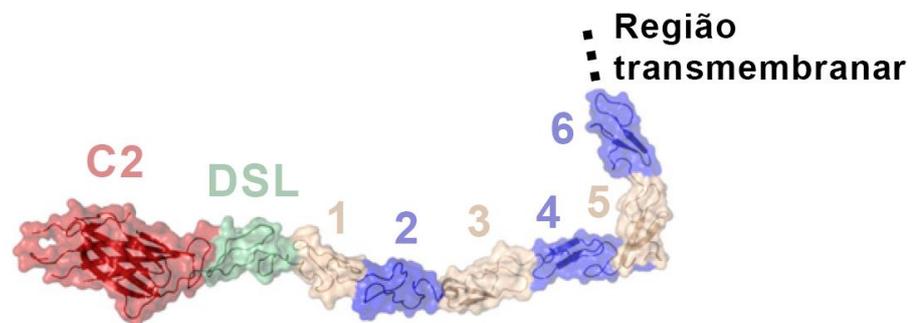
1.1.5 Delta-like ligand 1

DLL1 é uma proteína transmembranar cujo ectodomínio – responsável pela interação com o receptor Notch - possui 545 resíduos de aminoácidos e é caracterizado pela presença de oito regiões distintas (KERSHAW et al., 2015), como pode ser observado na Figura 8. A primeira destas, situada na porção N-terminal, compreende o domínio C2, que é um domínio de reconhecimento de membrana globular encontrado apenas em eucariotos, composto por duas folhas- β de quatro fitas organizadas de forma compactada, e conectadas por alças de superfície altamente variáveis (ZHANG; ARAVIND, 2010). Os ligantes JAG

também possuem um domínio C2, com a distinção de que, nestas proteínas, há um sítio de interação a cálcio que não é encontrado no DLL1 (KERSHAW et al., 2015).

A segunda região consiste de uma fração de sequência altamente conservada e bem caracterizada no que é chamado domínio DSL (“*Delta-Serrate-Lag*”) (KERSHAW et al., 2015). Os resíduos de aminoácidos presentes nesta região das proteínas JAG demonstraram ser essenciais para a ligação e ativação do receptor, e achados sugerem que esta também é uma seção chave para o reconhecimento ligante-receptor em DLL1. As últimas seis regiões consistem em repetições de domínios tipo EGF (KERSHAW et al., 2015).

Figura 8 - Domínios estruturais do DLL1



Fonte: KERSHAW et al. (2015). A estrutura do ectodomínio do DLL1 é subdividida em um domínio C2, um domínio DSL e seis regiões de repetição de domínio tipo EGF que conectam à região transmembranar da proteína.

Apesar da ativação de DLL1 e JAG1 ocorrer de forma similar a Notch1, onde há a liberação do domínio citoplasmático (LAVOIE; SELKOE, 2003), essas proteínas aparentam participar de vias de sinalização distintas. Em um estudo de Purow e colaboradores (2005), demonstrou-se que o bloqueio de DLL1 não apenas inibiu a proliferação celular de glioma, mas também induziu a apoptose das células tumorais, enquanto a inibição de JAG-1 levou a uma desaceleração geral do crescimento do glioma, mas induziu a apoptose em apenas uma das linhagens celulares de glioma testadas, demonstrando que DLL1 é um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer (PUROW et al., 2005), fazendo uso, por exemplo, do pidilizumabe.

1.1.6 *Pidilizumabe*

Pidilizumabe (CT-011; MDV9300) é um anticorpo humanizado do tipo IgG1k (ATKINS et al., 2014) que foi inicialmente obtido através da imunização de camundongos BALB/c com membranas de uma linhagem de células linfoblastóides B Daudi humanas (HARDY et al., 1994), na qual a seleção do anticorpo não foi feita com base na especificidade por dado antígeno, mas sim na capacidade de estimular a proliferação de linfócitos. A sua atividade antitumoral foi testada em três modelos: melanoma B16, carcinoma pulmonar de Lewis 3LL e fibrossarcomas induzidos por 3-metilcolantreno. Os resultados apontaram para atividade imunoestimulatória e citotóxica contra todas as linhagens de tumor, levando a diminuição ou total eliminação dos mesmos em ensaios *in vitro* (HARDY et al., 1994).

Posteriormente, iniciaram-se ensaios pré-clínicos e clínicos, que, então, sugeriam que tal anticorpo interagia com PD-1. Uma lista de todos estes pode ser encontrada no Apêndice E. Em um dos primeiro ensaios clínicos fase I conduzidos para avaliar o mAb, dezessete pacientes com malignidades hematológicas diversas - incluindo quatro com linfoma não-Hodgkin (LNH), um com linfoma de Hodgkin (LH), um com mieloma e três com leucemia linfocítica crônica (LLC) – foram tratados (BERGER et al., 2008). Nenhuma toxicidade limitante de dose foi alcançada no estudo e a sobrevivência ao longo dos 21 dias de avaliação foi de 76%. A continuação do acompanhamento dos pacientes permitiu observar que um destes, com linfoma folicular de células B, apresentou resposta completa (RC), com a eliminação total das massas tumorais observada por tomografia computadorizada após 10 meses do tratamento. Outros três pacientes – um com LH e dois com LLC – obtiveram respostas parciais (RP) e conseguiram estabilizar a doença (BERGER et al., 2008)

Westin e colaboradores (2014) demonstraram, em um estudo clínico fase II que incluiu 32 pacientes com linfoma folicular recidivante, que o pidilizumabe é um fármaco promissor para utilização em terapias combinadas, em que um medicamento direcionado especificamente ao sistema imunológico pode ser administrado juntamente à fármacos específicos às células patológicas, como o mAb anti-CD20 rituximabe, a fim de melhorar a resposta. No estudo, dos 66% dos pacientes que obtiveram respostas objetivas ao tratamento, 15 (52%) alcançaram RCs e quatro (14%) RPs (WESTIN et al., 2014), indicando uma boa eficácia e tolerabilidade da terapia combinada com rituximabe.

Apesar dos resultados promissores em diversos ensaios clínicos contra malignidades hematológicas avançadas (BERGER et al., 2008; BRYAN; GORDON, 2014; EYRE; COLLINS, 2015), melanoma metastático (ATKINS et al., 2014), carcinoma de células renais (PAL et al., 2014), glioma pontino intrínseco difuso (FRIED et al., 2018), e

após transplantes autólogos de células-tronco hematopoiéticas realizados em casos de linfoma difuso de grandes células B (ARMAND et al., 2013) e de mieloma múltiplo (ROSENBLATT et al., 2015), em 2016 os ensaios clínicos com pidilizumabe foram temporariamente interrompidos.

Durante o processo de aprovação do medicamento pelo FDA, verificou-se que não era claro o alvo de interação do pidilizumabe. Posteriormente, elucidou-se que, apesar de seus ensaios clínicos iniciais demonstrarem eficácia e tolerabilidade compatíveis com um perfil típico de anticorpo anti-PD-1, o seu alvo molecular genuíno é a proteína DLL1, e os estudos clínicos foram, então, continuados (STENNER; RENNER, 2018). Não obstante, uma pesquisa bibliográfica aprofundada revelou que não existem, até o momento, quaisquer estudos estruturais que revelem o caráter da interação de tal anticorpo com qualquer um dos possíveis ligantes, nem que elucidem se tais interações de fato ocorrem a nível molecular.

1.1.7 Abordagem do problema

Apesar da ausência de dados sobre as interações envolvendo o pidilizumabe, esse anticorpo tem apresentado boa eficácia e tolerabilidade em diversos estudos clínicos (EFEBERA et al., 2015; ROSENBLATT et al., 2015). Tal fato se torna relevante dentro de um contexto mundial que aponta que a terapêutica direcionada vem sendo um grande foco nos âmbitos da pesquisa e desenvolvimento para o mercado farmacêutico. Neste sentido, os anticorpos monoclonais – que fazem parte dos principais grupos de produtos biológicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010) – tem ganhado grande foco, sendo a classe mais vendida dentro deste grupo e movimentando 98 milhões de dólares em vendas mundialmente em 2016 (GRILO; MANTALARIS, 2019).

Doenças oncológicas têm sido um dos principais alvos no desenvolvimento de mAbs, cuja produção ainda é feita, majoritariamente, nos Estados Unidos (GRILO; MANTALARIS, 2019), como pode ser comprovado pelos registros de testes clínicos apontados nos Apêndices C e D. Os elevados valores que têm sido associados a essas inovações estão intrinsecamente relacionados ao alto investimento requerido para as etapas de pesquisa e desenvolvimento, que podem chegar ao patamar de 2,6 bilhões de dólares (MULLARD, 2014), colocando em risco a sustentabilidade do acesso ao tratamento oncológico inclusive em países desenvolvidos (VIDAL; FIGUEIREDO; PEPE, 2018).

No Brasil, os medicamentos biológicos são responsáveis por um percentual elevado das compras do Ministério da Saúde devido não apenas à adoção crescente desses

produtos como opção terapêutica de primeira linha, mas também ao alto valor agregado dessa classe de medicamentos. Enquanto em 2010 os gastos com imunobiológicos foram de aproximadamente 1,7 bilhão de reais, em 2016 tal valor superou 2,8 bilhões de reais, representando um crescimento de 64,7% em seis anos, fato fortemente relacionado à dependência da importação de biofarmacêuticos (MOTA; CASSIOLATO; GADELHA, 2014; VIEIRA, 2018).

Dos mAbs utilizados na terapia do câncer, quase 60% são registrados por apenas por duas empresas estrangeiras (VIDAL; FIGUEIREDO; PEPE, 2018), em uma hegemonia que contribui para a prática de altos preços. Em contrapartida, com a intenção de atenuar essa grande disparidade, o governo federal tem promovido diversas ações para incentivar o mercado nacional, dentre estas a promulgação do decreto nº 7.713 de 3 de abril de 2012 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2012), que estabelece margem de preferência de 25% nas compras do Ministério da Saúde para biomedicamentos fabricados no país, favorecendo a indústria local nos processos de licitação (MOTA; CASSIOLATO; GADELHA, 2014).

Ainda assim, estima-se que, no Brasil, o custo por regime de uso de um mAb antineoplásico seja 180% superior ao custo médio relativo com a utilização da quimioterapia endovenosa isoladamente, podendo chegar a um total de 907 mil reais (HYEDA; COSTA, 2015). Tudo isso evidencia a importância da produção e desenvolvimento de biofármacos e biossimilares nacionais, para o fortalecimento da indústria interna, barateamento e maior acessibilidade dos produtos (SALERNO; MATSUMOTO; FERRAZ, 2018). A produção de um biossuperior, através da otimização de um anticorpo com promissores resultados clínicos, é, portanto, associada a um grande apelo econômico.

Tal otimização pode ser alcançada pelo uso de técnicas engenharia de proteínas, a fim de aperfeiçoar características biofísica e bioquímicas de anticorpos (ARSLAN; KARADAG; KALYONCU, 2019). Metodologias *in vitro* e *in vivo* baseadas em evolução dirigida requerem a amostragem de inúmeros anticorpos ineficazes a caminho da identificação de um candidato possível (PAROLA; NEUMEIER; REDDY, 2018). Nesse contexto, o desenho racional de anticorpos com o uso de ferramentas computacionais tem ganhado destaque, propondo proteínas com características de interesse melhoradas - como afinidade e especificidade de ligação, estabilidade, solubilidade e agregabilidade - para investigação experimental (SORMANNI et al, 2017).

A predição da estrutura tridimensional (3D) de proteínas, por exemplo, possui aplicações práticas de grande impacto nos setores farmacêutico e biotecnológico, uma vez

que a função de uma proteína está intimamente ligada à sua estrutura (VERLI, 2014). Nas imunoglobulinas conhecidas, as regiões situadas entre as CDRs, conhecidas como regiões *framework*, são altamente conservadas tanto em relação a sequência quanto em relação ao enovelamento da cadeia principal (TRAMONTANO, 2006). Isso permite que essas moléculas sejam preditas com acurácia usando métodos empíricos, como a modelagem por homologia, também conhecida por modelagem comparativa (SALI; BLUNDELL, 1993), que se baseia no fato de que pequenas alterações na sequência das proteínas geralmente resultam em pequenas alterações em sua estrutura 3D (CHOTHIA; LESK, 1986). Por isso, é possível utilizar estruturas de proteínas determinadas experimentalmente como referências para prever a estrutura de outros polipeptídios com sequência de aminoácidos similar.

Não obstante, tendo em vista a compreensão de grande parte dos processos celulares e o planejamento racional de fármacos, é de suma importância o entendimento de como ocorrem as interações entre macromoléculas (VERLI, 2014). A identificação dos mecanismos de interação frequentemente requer um detalhamento estrutural a níveis atômicos, idealmente obtido por cristalografia de raios X. No entanto, a observação experimental dos mesmos pode apresentar diversos desafios devido às limitações dos métodos e a fatores como a flexibilidade das proteínas, tamanho e a força das interações (KOZAKOV et al., 2017; VAN ZUNDERT et al., 2016). A técnica de *docking* computacional proteína-proteína tem como objetivo prever os modos de ligação de um complexo a partir das estruturas iniciais de seus componentes (RODRIGUES; BONVIN, 2014), que podem ter sido determinadas experimentalmente ou mesmo preditas por modelagem molecular (RODRIGUES et al., 2013), dessa forma auxiliando no estudo das interações e identificando sítios ativos nos polipeptídios (MUKESH; RAKESH, 2011).

A compreensão do comportamento dinâmico das biomoléculas é outra etapa que merece destaque, uma vez que tais movimentações, que podem variar desde pequenas flutuações ao redor de um estado de equilíbrio até alterações conformacionais de grandes proporções desencadeadas por uma interação, estão intimamente ligadas às suas funções (CHILDERS; DAGGET, 2017). Para este fim, simulações de dinâmica molecular (DM) – definida pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês “*International Union of Pure and Applied Chemistry*”) como a computação do movimento dos átomos individualizados ou em uma molécula, ou de moléculas em sólidos, líquidos ou gases, seguindo as leis de movimento de Newton – têm sido utilizadas (VERLI, 2014; SANT’ANNA, 2002).

As aproximações baseadas na mecânica clássica partem de modelos preparados através de dados cristalográficos ou modelados computacionalmente. As forças que agem sobre o sistema são estimadas através de cálculos matemáticos que levam em consideração as interações entre átomos ligados e não-ligados (CORNELL et al., 1995). As ligações químicas e os ângulos entre os átomos são modelados utilizando molas virtuais simples, as forças não-ligadas derivadas das interações de van der Waals são obtidas utilizando o potencial de Lennard-Jones (LENNARD-JONES, 1924), e as interações eletrostáticas são modeladas usando a lei de Coulomb (DURRANT; MCCAMMON, 2011).

O conjunto de todos esses termos de energia parametrizados de forma a tentar reproduzir o comportamento real dos movimentos são chamados de campos de força. A DM possui diversas aplicações sobre o desenho de fármacos e pode ser utilizada para ranquear e avaliar modelos, obter informações gerais sobre a dinâmica da proteína e explicar a relação entre essa dinâmica e os mecanismos moleculares por trás da estabilização do polipeptídeo (CHILDERS; DAGGET, 2017).

Outro grande desafio no refinamento de propriedades de interesse em imunoglobulinas através de ferramentas de engenharia de anticorpos consiste na identificação de alterações nos resíduos de aminoácidos presentes nos sítios de interação proteína-proteína (IPP) favoráveis a formação do complexo. Isso se deve às grandes áreas de superfície envolvidas, à flexibilidade conformacional e às interações dinâmicas dos solventes e proteínas da região (SCHYMKOWITZ et al., 2005; MORIN; MEILER; MIZOUE, 2011).

Para propor tais alterações, é indispensável a identificação prévia de *hot-spots*, definidos como aqueles resíduos da interface de interação que possuem uma contribuição energética maior para formação do complexo do que os demais, e, por isso, são considerados essenciais ao seu estabelecimento (BOGAN; THORN, 1998). Esse seleto conjunto compõe aproximadamente 9,5% dos resíduos da interface, e a mutação de um desses aminoácidos pode impactar significativamente a formação do complexo, seja, dentre outros fatores, pela redução da área hidrofóbica, ou mesmo pela perda de interações eletrostáticas (CLACKSON; WELLS, 1995). Por outro lado, a conservação estrutural e funcional desses resíduos (KESKIN; MA; NUSSINOV, 2005) pode ajudar a melhor compreender os mecanismos que cercam o reconhecimento molecular e fornecer informações essenciais ao desenho racional de fármacos (SHARMA; RAMSEY; BAIR, 2002).

Apesar dos avanços no campo da biologia molecular e o desenvolvimento de diferentes técnicas, como a espectroscopia de interferência reflectométrica (PIEHLER; SCHREIBER, 2001) e o “*shotgun scanning*” (VAJDOS et al., 2002), ainda é desafiador

realizar, através de metodologias *in vitro*, a identificação de *hot-spots* em análises de alta eficiência sobre interfaces de IPPs. Nesse contexto, as análises teóricas e computacionais ganham grande importância (POTAPOV; COHEN; SCHREIBER, 2009). Exemplos de métodos *in silico* são aqueles baseados em energia, que podem fazer uso de simulações de DM para cálculos a níveis atômicos (MORROW; ZHANG, 2012), ou mesmo do *Alanine Scanning* computacional, no qual uma função numérica de energia é usada para avaliar as mudanças na energia de ligação entre a proteína original e a mutada por alanina em seus estados monoméricos e em complexo (TUNCBAG; GURSOY; KESKIN, 2009); métodos baseados em estrutura, que se utilizam do reconhecimento de ligações de hidrogênio, de interações hidrofóbicas e de van der Waals (GAO; WANG; LAI, 2004); baseados no *docking* molecular de pequenas moléculas orgânicas (BRENKE et al., 2009); baseados em aprendizado de máquina (MORROW; ZHANG, 2012); ou mesmo técnicas que combinam mais de um dos métodos supracitados (GUHAROY; CHAKRABARTI, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Indicar alterações nas estruturas primárias dos fragmentos de anticorpos scFv, produzidos a partir do anticorpo monoclonal pidilizumabe, que otimizam as interações com seus alvos moleculares.

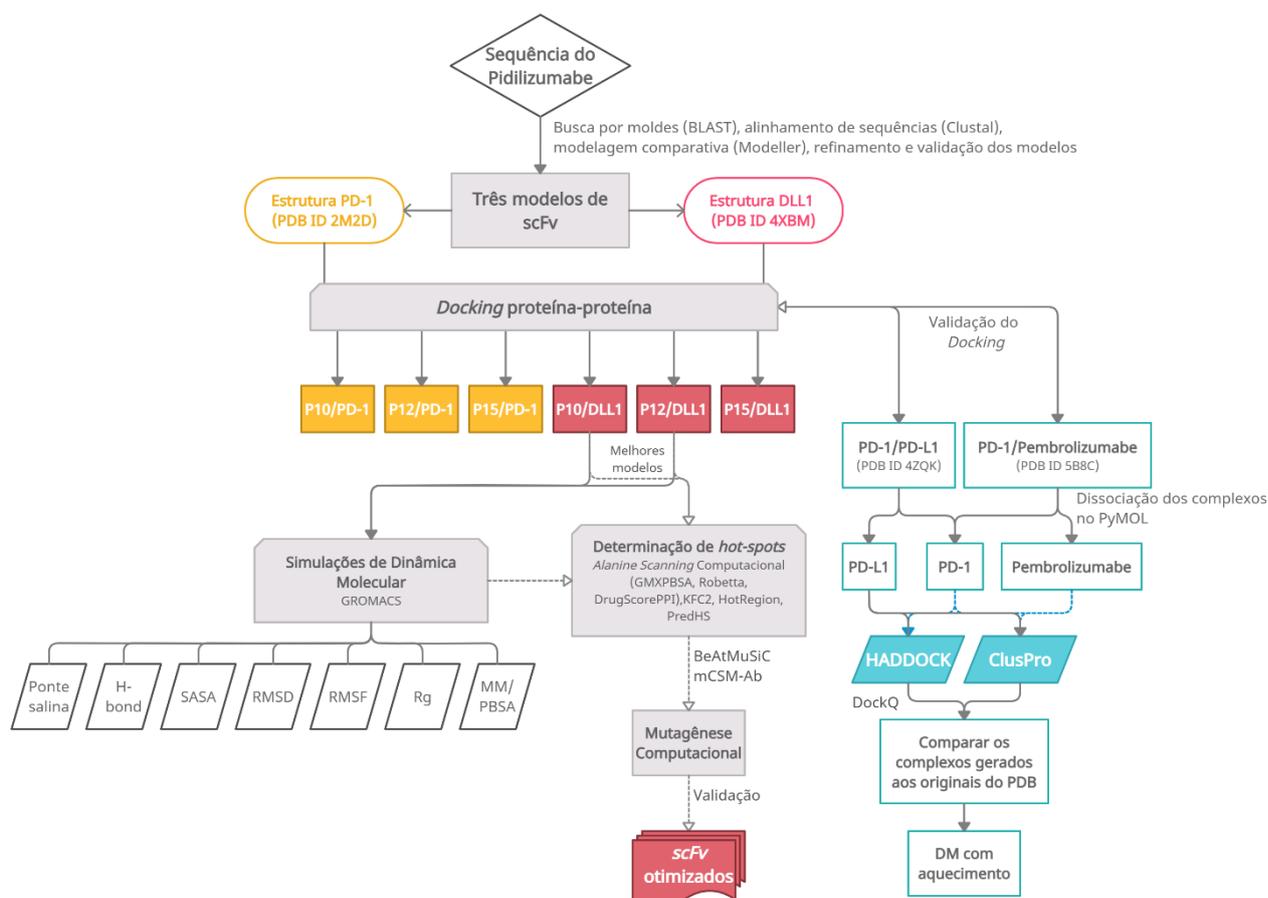
2.2 Objetivos específicos

- Modelar computacionalmente fragmentos de anticorpos scFv a partir da sequência do fármaco pidilizumabe;
- Validar um método para o *docking* molecular de anticorpos monoclonais;
- Testar a associação dos scFvs modelados a partir do pidilizumabe aos seus possíveis ligantes proteicos, as proteínas DLL1 e PD-1;
- Identificar e caracterizar os resíduos *hot-spots* da interação;
- Propor mutações na sequência dos scFvs, de forma a gerar uma sequência otimizada para o fragmento de anticorpo;
- Verificar a estabilidade do scFv otimizado em complexo à DLL1.

3 METODOLOGIA

A Figura 9 sintetiza, de forma cronológica e simplificada, as metodologias computacionais utilizadas ao decorrer deste trabalho. O detalhamento de todas as etapas, desde a modelagem dos scFvs até a obtenção de seqüências otimizadas para os mesmos, consta nos tópicos posteriores.

Figura 9 – Súmula da metodologia computacional aplicada.



Fonte: elaborado pelo autor. O diagrama sumariza a metodologia empregada na determinação da estrutura tridimensional dos scFvs, obtenção dos complexos anticorpo-antígeno, validação dos complexos, determinação de *hot-spots* e proposição de mutações.

3.1 Modelagem computacional dos scFvs

Inicialmente, a seqüência do anticorpo – obtida através da base de dados Thomson Reuters *Integrity* pelo número de acesso 395401 - foi comparada, através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology*

Information), com estruturas primárias de proteínas cujas estruturas tridimensionais já foram elucidadas e depositadas no RCSB *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN et al., 2000). Essa ferramenta de alinhamento local utiliza um algoritmo capaz de detectar, de forma rápida e robusta, similaridades fracas entre sequências que sejam biologicamente significativas (ALTSCHUL et al., 1990).

A partir do resultado do BLAST, foram selecionadas três estruturas moldes tanto para V_H quanto para V_L , cuja a sequência de aminoácidos apresentou maior identidade, representando uma maior similaridade percentual. Para realização da modelagem por homologia, é necessário que sejam obtidas sequências que tenham no mínimo de 25% a 30% de similaridade àquela que se deseja modelar (VERLI, 2014).

Além da identidade, também foram levados em consideração na escolha dos moldes a função biológica das proteínas encontradas, a resolução da estrutura cristalográfica, os valores de cobertura e o valor e , que representa o número distinto de alinhamentos, com uma pontuação igual ou melhor, que são esperados de ocorrerem na busca por sequências similares simplesmente por razões aleatórias (VERLI, 2014). Optou-se pela utilização do programa Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2014) para realizar o alinhamento das sequências de V_H e V_L com as sequências moldes obtidas através busca com o BLAST, uma vez que os arquivos de saída gerados por esse podem ser estruturados em diversos formatos, facilitando a sua utilização no *software* de modelagem.

O programa Modeller versão 9.23 (WEBB; SALI, 2016) foi utilizado para produção de modelos de homologia pela satisfação de restrições espaciais. Tais restrições podem ser obtidas, por exemplo, a partir dos comprimentos de ligação e valores de ângulos diedros das estruturas-molde. Tendo como base o alinhamento das sequência que deve ser modelada com as dos moldes, e de posse das coordenadas atômicas destes, o algoritmo de modelagem combina as restrições espaciais e os termos de energia em uma função objetiva, que perpassa métodos de otimização visando a minimização das violações das restrições espaciais (SALI; BLUNDELL, 1993).

Foram produzidos 250 modelos para cada cadeia. A função objetiva do Modeller (MOF, do inglês “*Modeller Objective Function*”), o escore DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) - um potencial estatístico otimizado para avaliação dos modelos (SHEN; SALI, 2006) - e o GA341 - que usa uma porcentagem da identidade entre o molde e a sequência que se deseja modelar como parâmetro (JOHN; SALI, 2003) - foram utilizados como parâmetros para seleção das estruturas mais adequadas.

Os arquivos de texto para os modelos de V_H e V_L escolhidos foram unidos

em um único, e a ferramenta *loopmodel* do Modeller (FISER et al., 2000) foi utilizada na adição dos peptídeos ligantes, constituídos de resíduos de serina e glicina, entre as cadeias, a fim de completar a estrutura do fragmento de anticorpo (PIERCE, 2016). Foram selecionados peptídeos ligantes de três tamanhos distintos: um com dez resíduos de aminoácidos, com sequência (GGGGS)₂; um segundo com doze resíduos, com sequência [GS(GGGGS)₂]; e um último com quinze, constituído por (GGGGS)₃. Para cada, o Modeller gerou um total de 200 modelos, dos quais os melhores foram escolhidos através da avaliação dos parâmetros supracitados. Os scFvs selecionado com peptídeos ligantes de dez, doze e quinze resíduos de aminoácidos foram nomeados P10, P12 e P15, de forma a facilitar sua identificação. As suas respectivas CDRs foram identificadas com base na sequência através da numeração de Kabat (KABAT et al., 1992).

O programa ReFOLD (SHUID; KEMPSTER; MCGUFFIN, 2017) foi utilizado no refinamento dos modelos. Este servidor identifica e corrige erros prováveis em modelos 3D de proteínas fornecidos pelo usuário através de sucessivas rodadas de refinamento iterativo rápido com 3Drefine (BHATTACHARYA et al., 2016) e simulações de dinâmica molecular com NAMD (PHILLIPS et al., 2005), combinado com a versão mais recente do método de estimativa de qualidade de modelo líder, ModFOLD (MAGHRABI; MCGUFFIN, 2017).

Após a construção dos modelos, foi necessário identificar possíveis erros relacionados aos métodos empregados, à escolha das referências e ao alinhamento com a sequência-molde (VERLI, 2014). Os servidores Procheck (LASKOWSKI et al., 1993; LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 2006) e Molprobity (CHEN et al., 2010) foram utilizados na realização de uma análise estereoquímica, a fim de detectar regiões de tensão angular e torcional, impedimentos estéricos e a presença de *outliers*, identificados através da análise do gráfico de Ramachandran. O programa Verify3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997) foi utilizado para determinar a compatibilidade dos modelos com suas respectivas sequências de aminoácidos e o servidor ProSA-web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) para avaliar a qualidade geral dos modelos.

3.2 Obtenção da estrutura tridimensional de DLL1 e PD-1

No *Protein Data Bank*, são encontradas estruturas cristalográficas para as regiões extracelulares tanto do PD-1, quanto do DLL1, como observado, respectivamente, nos Apêndices A e B. A priori, optou-se por utilizar a primeira conformação da estrutura

2M2D para PD-1, resolvida utilizando ressonância magnética nuclear (RMN) (CHENG et al., 2013). Para DLL1, o cristal 4XBM, elucidado pela metodologia de cristalografia e difração por raios X (KERSHAW et al., 2015), foi selecionado. Com o intuito de reduzir os custos computacionais e tendo em vista que tais regiões são consideradas desordenadas, compostas principalmente por estruturas de alça que poderiam gerar artefatos durante as simulações *in silico*, foram retirados os domínios EGF do cristal do DLL1, mantendo-se a região C2 e o domínio DSL de ligação à Notch1 para os estudos de interação.

3.3 Docking computacional anticorpo-antígeno

3.3.1 Validação da metodologia de docking

A validação do método de *docking* foi feita utilizando as estruturas cristalográficas depositadas no PDB do PD-1 nos seguintes complexos proteicos: com PD-L1 e com o Fv do mAb pembrolizumabe. Tais estruturas estão listadas na Tabela 1; o mesmo não pôde ser feito para o receptor DLL1, pois não existem, no momento, estruturas cristalográficas do mesmo em complexo com qualquer ligante.

Tabela 1 - Estruturas cristalográficas de complexos com o receptor PD-1 utilizadas na validação do método de *docking*

Ligante	PDB ID	Resolução (Å)	Referência
PD-L1	4ZQK	2.45	ZAK et al., 2015
Fv do Pembrolizumabe	5B8C	2.15	HORITA et al., 2016

Fonte: elaborado pelo autor. As estruturas tridimensionais para os complexos listados foram obtidas a partir do banco de dados do PDB.

Os complexos foram separados em seus componentes monoméricos com o auxílio do programa PyMOL (DELANO; BROMBERG, 2004). Dois programas de *docking* distintos avaliados pelo CAPRI (do inglês, “*Critical Assessment of PRedicted Interactions*”) (JANIN, 2005) foram utilizados. O primeiro é o servidor de *docking* automatizado ClusPro (KOSAKOV et al., 2013), que atua realizando as três etapas subsequentes: realiza o *docking* de corpos rígidos amostrando de bilhões de modos de ligação; agrupa as mil estruturas de menor energia obtidas com base na raiz do desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *Root*

Mean Square Deviation), formando *clusters* que representam os modelos mais prováveis para os complexos; e minimiza as estruturas selecionadas como etapa de refinamento (KOSAKOV et al., 2017; VAJDA et al., 2017). Neste servidor, foram fornecidas as estruturas tridimensionais e realizado o *docking* sob as configurações padrões. Os resultados foram tratados pelo modelo de pontuação ponderada e avaliados com base no tamanho dos *clusters*.

O segundo programa testado foi o HADDOCK (*High Ambiguity Driven Biomolecular Docking*) versão 2.2 (VAN ZUNDERT et al., 2016), que também atua em três fases: na primeira, é feita a randomização de orientações e minimização de energia de corpos rígidos; depois, realiza-se o recozimento simulado (SA, do inglês “*simulated annealing*”) semi-flexível, que se inicia através de uma busca de corpos rígidos à altas temperaturas e, então, adiciona gradualmente graus de flexibilidade na interface de interação durante o SA; e, finalmente, efetua-se um refinamento final em espaço cartesiano com solvente explícito (DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003).

Além das estruturas, é necessário fornecer ao programa a identificação dos resíduos passivos e ativos, estes definidos como todos os resíduos que mostram perturbações de deslocamento químico significativas na formação dos complexos, além de uma alta acessibilidade de solvente na proteína livre, sendo considerados as principais regiões de interação entre as proteínas (DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Os resíduos ativos foram identificados utilizando o servidor PredictProtein (YACHDAV et al., 2014). Já os resíduos passivos, definidos como aqueles que mostram uma perturbação de deslocamento químico menos significativa e potencialmente fazem parte da interface (DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003), foram definidos automaticamente como aqueles que estão a um raio de 6,5 Å dos resíduos ativos e têm alta acessibilidade ao solvente (DE VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010).

A metodologia do PredictProtein baseia-se na análise de sequências para prever características estruturais e funcionais de proteínas (YACHDAV et al., 2014). Através do algoritmo ISIS, que utiliza uma rede neural treinada em anotações de resíduos de aminoácidos em complexos proteína-proteína existentes, o servidor combina a predição de características estruturais e evolutivas para determinar os resíduos que estão presentes na interface da interação (OFRAN; ROST, 2007).

Ao final do *docking*, todas as estruturas são agrupadas de acordo com o RMSD em relação ao esqueleto polipeptídico na interface. Os grupos foram analisados e classificados de acordo com a pontuação do HADDOCK, que representa a soma ponderada das energias de van der Waals, eletrostáticas, de solvatação e de violação de restrição junto

com uma média da área superficial não-exposta (DE VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010).

Também foi utilizado um programa para o ranqueamento dos modelos produzidos: o DockScore identifica os resíduos da interface com base em critérios baseados em distância e, em seguida, considera vários parâmetros da interface, como área de superfície, conservação, hidrofobicidade, agrupamento espacial e contatos curtos para calcular a pontuação (MALHOTRA; SOWDHAMINI, 2015). Tal programa foi escolhido por ser capaz de discriminar com sucesso as melhores estruturas de diferentes complexos proteicos obtidos através de docking, inclusive em alvos do CAPRI (MALHOTRA; SANKAR; SOWDHAMINI, 2014).

O programa DockQ (BASU; WALLNER, 2016) foi utilizado para atestar a qualidade dos modelos gerados pelo ClusPro e HADDOCK e a capacidade do servidor de ranqueamento supracitado. Através da utilização de três parâmetros de avaliação de modelos do CAPRI - fração de contatos nativos (Fnat), RMS da interface (iRMS) e RMS do ligante (LRMS) - ele é capaz de segregar as estruturas fornecidas nas quatro diferentes classes de qualidade do CAPRI: modelos em que a pontuação gerada pelo DockQ seja menor que 0,23 são considerados incorretos; aqueles que estão entre 0,23 e 0,49 têm qualidade aceitável; os que estão entre 0,49 e 0,80 possuem média qualidade; e os que estiverem acima de 0,80 têm alta qualidade.

Exemplares de todas as classificações de qualidades consideradas foram submetidos a simulações de DM com aquecimento (RADOM; PLÜCKTHUN; PACI, 2018). A validação dessa metodologia foi feita a fim de comprovar sua capacidade na eliminação de falsos positivos, isto é, estruturas que apesar de obterem altas pontuações nos algoritmos de *docking* e ranqueamento, estão estruturalmente distantes da conformação nativa e que, portanto, ranquearam mal no DockQ. Ela se baseia no princípio de que modelos errados gerados pelos métodos supracitados de *docking* constituem estruturas instáveis ou metaestáveis, e que modos de ligação corretos são estáveis a temperaturas razoavelmente elevadas (RADOM; PLÜCKTHUN; PACI, 2018).

Os complexos obtidos e as estruturas cristalográficas originais foram submetidos a simulações utilizando o pacote de programas GROMACS (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995) versão 2019.3 e o campo de força CHARMM36 *all-atom*. As proteínas tiveram seus estados de protonação previamente corrigidos para o pH neutro, tendo como base as informações fornecidas pela ferramenta PROPKA do servidor PDB2PQR (DOLINSKI et al., 2004). Tais moléculas foram centralizadas em uma caixa cúbica a 15 Å da borda, que foi posteriormente preenchida com moléculas de água TIP3P

(JORGENSEN et al., 1983).

Moléculas de solvente foram substituídas por íons Na^+ e Cl^- a uma concentração de 0,154 M, a fim de tornar os sistemas mais próximos às condições fisiológicas. Subsequentemente, realizou-se uma etapa de minimização de energia de até 10.000 passos pelo método do máximo declive, com o limite de tolerância para força máxima de 250 kJ/mol.nm. Os raios de corte de Coulomb, de Lennard-Jones e distância de corte para a lista de vizinhos de curto alcance foram padronizados a 1,2 nm, e o método *Particle Mesh Ewald* (PME) foi utilizado no tratamento das forças eletrostáticas (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993). As ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram mantidas por constrições utilizando o algoritmo LINCS (HESS et al., 1997).

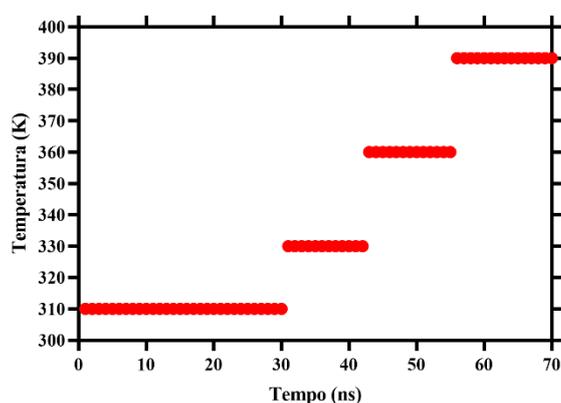
Os sistemas minimizados foram submetidos a equilíbrio em três etapas. A primeira, utilizada para adaptar o sistema à temperatura de simulação, foi feita em *ensemble* canônico (isotérmico-isocórico), ou NVT, que modela um sistema físico em contato com um reservatório térmico de temperatura fixa, supondo que o número de partículas e volume sejam mantidos constantes. Já as etapas dois e três utilizaram o *ensemble* NPT (isotérmico-isobárico), visando a manutenção de uma pressão atmosférica constante – como ocorre em condições experimentais ou *in vivo* – sem variar o número de partículas e a temperatura.

Passos de 2 fs foram utilizados em todos os estágios. Não obstante, enquanto as duas primeiras etapas foram conduzidas em 50.000 passos de simulação com restrição das posições, totalizando 100 ps para cada, a última empregou 500.000 passos, em um total de 1 ns de simulação livre de restrições. A equilíbrio NVT utilizou o termostato de Nose-Hoover (EVANS; HOLIAN, 1985) com um banho térmico externo que manteve a temperatura dos sistemas constantes à 310 K. Já na fase isotérmica-isobárica, os sistemas foram acoplados ao barostato isotrópico de Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1980) de forma a serem mantidos a pressão constante de 1 bar.

A dinâmica de produção utilizou o termostato e o barostato supracitados e teve duração de 70 ns. Nos primeiros 30 ns, a temperatura foi mantida a 310K; esta foi, então, elevada a 330 K por 12,5 ns, e novamente a 360 K por esse mesmo intervalo; os últimos 15 ns de simulação foram conduzidos a 390 K (Figura 10). Os arquivos de trajetórias obtidos ao final foram tratados pelo programa *gmx rms*, do pacote GROMACS, com o intuito de obter os valores de RMSD das estruturas ao longo da simulação, tendo como referência as coordenadas atômicas das proteínas previamente a minimização. Também foi feita a análise do RMSD considerando apenas os resíduos da interface (iRMS), de forma a ratificar a manutenção da estabilidade da interação proteína-proteína, ou verificar a dissociação do

complexo em suas subunidades. O valor de corte estabelecido para o RMSD para o descarte das estruturas foi de 0,5 nm. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism (SWIFT, 1997).

Figura 10 – Rampa de temperatura da DM com aquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. A dinâmica de produção para validação do docking inicia com o sistema equilibrado à 310 K, mantendo-se a mesma temperatura por 30 ns. Em 30 ns, é realizado o primeiro salto de temperatura para 330 K. A segunda mudança de temperatura ocorrem em 42,5 ns, e a terceira em 55 ns, passando pela temperatura de 360 K e terminando a simulação a 390 K. As mudanças de temperatura visam distinguir estruturas metaestáveis daquelas próximas a nativa, que devem se manter estáveis mesmo em temperaturas mais elevadas.

3.3.2 Docking dos scFvs à PD-1 e DLL1

Tendo em vista os resultados obtidos durante o passo 3.3.1, optou-se por realizar o *docking* utilizando a metodologia validada para o HADDOCK com as estruturas obtidas nos passos 3.1 e 3.2, realizando a seleção dos resíduos ativos pelo PredictProtein e a eliminação de falsos positivos através de simulações de DM com aquecimento, que utilizou os parâmetros definidos acima.

Não obstante, com o intuito de reduzir o enviesamento causado pela utilização de um servidor de *docking* dirigido sem a utilização de dados experimentais que confirmem a acurácia na seleção dos resíduos que participam da interação, foram feitos novos *dockings* no ClusPro. Para PD-1, além da estrutura obtida a partir de 2M2D, também foram utilizados os cristais 5WT9, 5GGS, 5B8C, 4ZQK e 2M2D (Apêndice A). As sequências obtidas para esse receptor foram padronizadas em todos os cristais, de forma a todos ficarem com uma

estrutura primária idêntica, e o *docking* foi conduzido sob configurações padrões utilizando os três scFvs.

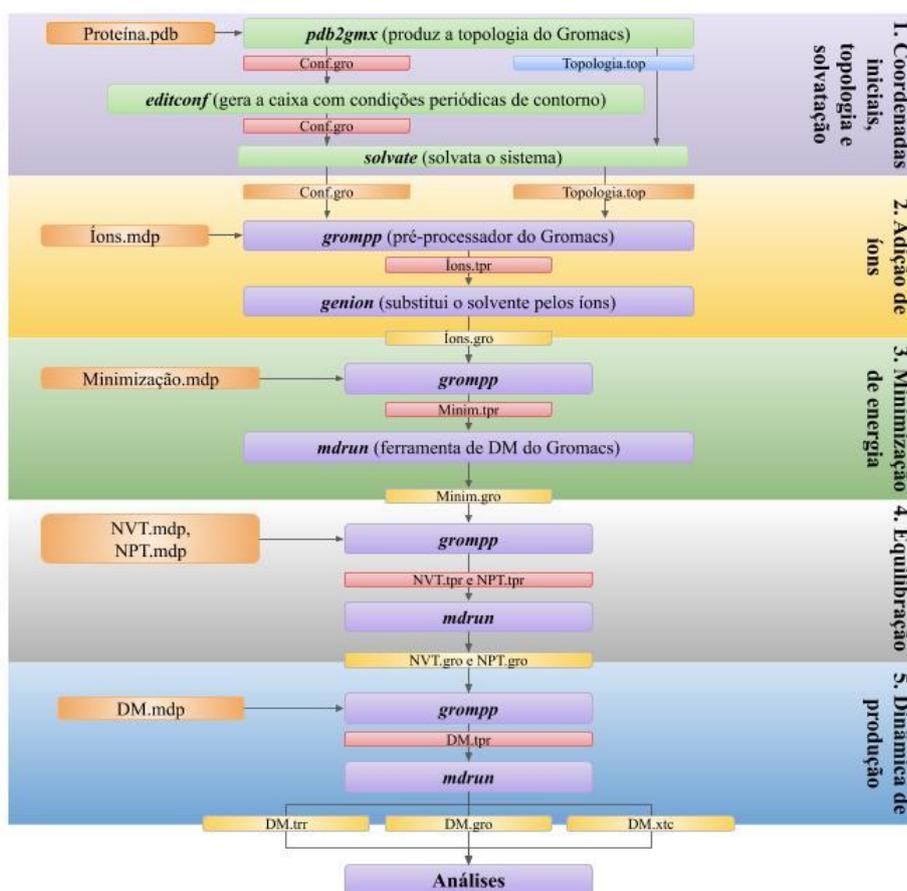
As estruturas de menor energia para os quatro modelos de pontuação gerados pelo ClusPro - balanceado, favorecendo interações eletrostáticas, favorecendo interações hidrofóbicas e favorecendo forças de van der Waals (KOSAKOV et al., 2017) - foram obtidas, totalizando 15 complexos gerados para cada scFv que seguiram para DM com aquecimento. O mesmo processo foi realizado para o receptor DLL1, utilizando sua única estrutura cristalográfica disponível (Apêndice B). As trajetórias das simulações foram tratadas e avaliadas pelo RMSD. O plugin APBS vinculado ao programa PyMOL foi utilizado para avaliar a complementaridade eletrostática da interface dos complexos produzidos pelas metodologias de *docking* supracitadas.

3.4 Simulações de dinâmica molecular dos complexos validados

3.4.1 Dinâmica de produção

Os complexos validados obtidos foram submetidos a simulações de DM seguindo o passo a passo ilustrado na Figura 11. Todas as etapas relacionadas a elaboração, minimização e equilíbrio dos sistemas foram feitas como previamente descrito no tópico 3.3.1. Já a dinâmica de produção foi realizada em triplicatas com 125.000.000 de passos de 2 fs, cada replicata representando 250 ns de um total de 750 ns de tempo simulado para cada sistema. Também foram realizadas simulações de controle dos antígenos em sua forma apo, sem os scFvs mas com todos os demais parâmetros idênticos às DM com os complexos. Os arquivos de trajetória gerados – que descrevem o movimento de todos os átomos dos sistemas ao longo do tempo da simulação – foram utilizados para análise do RMSD das estruturas durante a DM, do deslocamento individual de cada resíduo descrito pela raiz da flutuação quadrática média (RMSF, do inglês “*Root Mean Square Fluctuation*”), da formação de pontes salinas, do número de ligações hidrogênio, dentre outros parâmetros. Todos os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism.

Figura 11 - Esquema simplificado para uma simulação de DM utilizando o pacote GROMACS



Fonte: KHAN et al. (2016). Adaptado pelo autor (2019). No esquema, as caixas laranjas representam os arquivos de entrada necessários para utilização de cada programa; as caixas vermelhas, azuis e amarelas representam os arquivos gerados por cada etapa; caixas verdes foram utilizadas para os programas envolvidos na preparação do sistema e caixas roxas para os programas envolvidos nas etapas de minimização, equilibração e produção. Um procedimento básico de DM inicia-se com a criação da topologia para o sistema de trabalho, seguido da criação de uma caixa com condições periódicas de contorno, solvatação do sistema e adição de íons. Subsequentemente, são realizadas etapas de minimização e equilibração em *ensembles* NVT e NPT, para apenas então ser realizada a dinâmica de produção, da qual são extraídos os arquivos de trajetória que serão utilizados nas etapas posteriores de análises.

3.4.2 Análise do RMSD

A análise do RMSD é uma das principais estratégias utilizadas para o estudo por DM de proteínas (VERLI, 2014). Os RMSD dos átomos do anticorpo, do antígeno e da

interface do complexo em relação a uma estrutura de inicial de referência - neste caso, os sistemas previamente a qualquer etapa de minimização ou equilíbrio - foram calculados através da ferramenta *gmx rms* pelo ajuste do quadrado mínimo da estrutura indicada com relação à referência em cada passo da integração (PAULA, 2019), de acordo com a Equação 1.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i |r_i(t_1) - r_i(t_2)|^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

Onde M é igual a $\sum_{i=1}^N m_i$, $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t , e $t_2 = t_1 - \tau$ no qual τ é o tempo anterior.

3.4.3 Análise do RMSF

Para calcular a flutuação média dos resíduos dos scFvs e dos antígenos durante a simulação, o RMSF para os átomos C α das proteínas foi avaliado em função do número de resíduos utilizando o programa *gmx rmsf* do pacote GROMACS, que realiza tal cálculo de acordo com a Equação 2 (KHAN et al., 2016).

$$RMSFi = \left[\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

Onde $RMSFi$ é uma medida do desvio entre a posição da partícula i com a posição de referência, T é o tempo e r_i^{ref} é a posição de referência da partícula i . Essa análise permitiu obter informações sobre flexibilidade estrutural local ao longo da cadeia polipeptídica (KUZMANIC; ZAGROVIC, 2010).

3.4.4 Análise do Raio de Giro

O raio de giro (Rg) de uma proteína é uma medida do seu estado de compactação (LOBANOV; BOGATYREVA; GALZITSKAIA, 2008). Proteínas enoveladas em configurações estáveis devem sustentar valores de Rg sem muitas variações por todos os três eixos cartesianos. A ferramenta *gmx gyrate* do pacote GROMACS foi utilizada no cálculo do Rg total e do Rg nos eixos x, y e z dos scFvs em função do tempo.

3.4.5 *Análise das ligações de hidrogênio*

Ligações de hidrogênio são definidas, através de parâmetros da IUPAC, como interações inter ou intramoleculares de caráter atrativo envolvendo um átomo de hidrogênio de uma molécula ou fragmento X-H, no qual X é mais eletronegativo que H (ARUNAN et al., 2011). A análise das ligações de hidrogênio totais e das ligações de hidrogênio restritas a interface foi feita utilizando o programa *gmx hbond* do pacote GROMACS utilizando os critérios geométricos padrão: a distância entre o doador e o aceptor de hidrogênios deve ser inferior a 0,35 nm e o ângulo entre eles deve ser menor que 30° (BERGLUND et al., 2016).

3.4.6 *Análise da formação de pontes salinas*

Ponte salina é um termo que define uma ligação não-covalente dependente de pH entre resíduos com cargas opostas que estejam a uma distância máxima de 0,4 nm (BARLOW; THORNTON, 1983; BOSSHARD; MARTI; JELESAROV, 2004). A análise da formação ou extinção de pontes salinas entre o scFv e o antígeno em cada complexo a longo da simulação foi feita utilizando o arquivo de trajetória de cada simulação no plugin Salt Bridges versão 1.1, presente no *software* VMD versão 1.9.3 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

3.4.7 *Análise da área superficial acessível ao solvente*

A área superficial acessível ao solvente (SASA, do inglês “*Solvent Accessible Surface Area*”) é definida como a área da superfície de uma proteína que interage com suas moléculas de solvente (MAZOLA et al., 2015). O aumento desse valor ao longo da simulação pode ser representativo da desnaturação do polipeptídeo (KHAN et al., 2016) ou de alterações conformacionais que levem a exposição de resíduos internos causados por alguma interação (NAZ et al., 2018). Os cálculos da SASA nos complexos e para os ligantes sem o scFv foram realizados utilizando o módulo *gmx sasa* do GROMACS, com uma sonda de raio de 1.4 Å.

3.4.8 *MM/PBSA*

MM/PBSA (do inglês “*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area*”) é um método eficiente utilizado para estimar a energia livre de ligação em complexos

proteína-ligante, em que este último pode representar tanto um ligante proteico quanto uma molécula não-peptídica, ao longo de uma simulação de DM (WANG et al., 2018; KOLLMAN et al., 2000). O cálculo de energia livre de ligação (ΔG_{bind}) é feito, de forma simplificada, através da Equação 3 (PAISSONI et al., 2014).

$$\Delta G_{bind} = G_{complexo} - (G_{proteína} + G_{ligante}) \quad (3)$$

Os termos de energia livre ($G_{complexo}$; $G_{proteína}$; $G_{ligante}$) são calculados a partir de uma média dos quadros considerados da trajetória, seguindo a Equação 4.

$$(G) = (E_{MM}) + (G_{solv}) - T(S_{MM}) \quad (4)$$

E_{MM} inclui três termos calculados utilizando mecânica molecular (MM): E_{int} que indica energias de ligação, ângulo e ângulo de torção; E_{Coul} e E_{LJ} denotam as energias eletrostática intramolecular e Lennard-Jones, respectivamente. O termo de solvatação G_{solv} , por sua vez, é subdividido em suas contribuições polares e não polares, que são calculadas com o auxílio da ferramenta APBS (do inglês “*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*”) (JURRUS et al., 2018).

O *software* GMXPBSA versão 2.1 (PAISSONI et al., 2015) foi utilizado para calcular a energia livre de ligação nos complexos submetidos a DM, bem como para elucidar quais os termos de energia que mais contribuem para o estabelecimento das interações. Os cálculos foram performados a cada 2,5 ns, totalizando 100 quadros espaçados equidistantemente do arquivo de trajetória e respeitando o limite mínimo necessário para que os cálculos tenham confiabilidade estatística (PAISSONI et al., 2014). Os parâmetros para realização das análises de MM e de APBS foram mantidos nos valores padrões recomendados pelo programa. Os cinco quadros que apresentaram menor energia livre de cada replicata foram extraídos para uma posterior análise de mutações.

3.5 Identificação dos *hot-spots* da interação anticorpo-antígeno

3.5.1 *Alanine scanning computacional*

Um outro recurso presente no programa GMXPBSA utilizado é o *Alanine scanning mutagenesis* (ASM), que permite verificar a contribuição energética individual de cada resíduo de aminoácido para o estabelecimento da interação ao longo da simulação. Foi realizada a mutação automatizada por alanina de resíduos de interesse na interface, e aqueles cuja mutação levou a uma variação de energia livre de ligação ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) de no mínimo 1 kcal/mol foram considerados *hot-spots* (MORROW; ZHANG, 2012). Os resultados foram comparados com aqueles fornecidos pelos demais servidores descritos neste tópico.

Além do ASM computacional executado pelo GMXPBSA, os complexos foram submetidos a dois servidores que realizam a predição de *hot-spots* pelo cálculo do $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ em um complexo proteína-proteína a partir da mutação de um aminoácido para alanina, que leva a deleção da sua cadeia lateral para além do átomo de C_{β} .

O primeiro é Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004), uma implementação completa e de fácil uso do pacote de programas Rosetta. O servidor inclui uma ferramenta para identificação de cadeias laterais energeticamente importantes (KORTEMME; KIM; BAKER, 2004), que parte de uma função simples de energia livre para calcular as alterações na energia de ligação mediante a substituições únicas de cada resíduo por alanina, com a reordenação de elementos estruturais em até 5 Å da mutação, mantendo o resto da proteína inalterada. Como entrada, foram fornecidas as coordenadas atômicas dos complexos. Um resíduo é considerado *hot-spot* pelo programa quando a $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ é de, no mínimo, 1 kcal/mol (MORROW; ZHANG, 2012).

Já o DrugScore^{PPI} (KRÜGER; GOHLKE, 2010) realiza, inicialmente, uma etapa de preparo dos dados, que consiste na remoção de hidrogênios e de moléculas não-peptídicas, além da detecção dos resíduos da interface como aqueles que possuem pelo menos um átomo pertencente a outra cadeia do complexo a um máximo de 5 Å. Então, é computada a $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ pela subtração da ΔG do complexo mutado pela ΔG do complexo nativo, e valores maiores ou iguais a 1 kcal/mol são indicativos de *hot-spots*.

3.5.2 KFC2 webserver

KFC2 é um servidor que combina duas metodologias para predição computacional de *hot-spots* (DARNELL; PAGE; MITCHELL, 2007). Na primeira, chamada de K-FADE (*Knowledge-based FADE*), a densidade atômica da interface é utilizada para calcular a especificidade das formas pelo programa de Avaliação Rápida de Densidade

Atômica (FADE, do inglês “*Fast Atomic Density Evaluation*”) (ZHU; MITCHELL, 2011). Já na segunda, denominada K-CON (*Knowledge-based Biochemical Contact analysis*), é feita a identificação das interações não covalentes e de contatos atômicos no complexo utilizando o pacote de modelagem WHAT IF (VRIEND, 1990). A combinação dos métodos é feita para aumentar a acurácia da predição. Novamente, foram submetidos os arquivos de coordenadas dos complexos, e os resíduos que obtiveram valores positivos para os dois métodos simultaneamente foram considerados *hot-spots*.

3.5.3 *HotRegion*

No método HotRegion (CUKUROGLU; GURSOY; KESKIN, 2011), é definido que dois resíduos de aminoácidos de cadeias diferentes estão em contato se a distância entre quaisquer dois átomos dos mesmos for menor que a soma dos raios de van der Waals correspondentes mais 0.5 \AA (KESKIN et al., 2004; TSAI et al., 1996). Para predição dos *hot-spots*, é utilizado o HotPoint (TUNCBAG; KESKIN; GURSOY, 2010), um modelo empírico baseado na acessibilidade relativa ao solvente e no potencial total dos pares. Resíduos *hot-spots* são classificados como aqueles que possuem uma área superficial acessível, dentro do complexo, menor ou igual a 20% e um potencial de contato total maior ou igual a 18.0.

3.5.4 *PREDHS*

O servidor PREDHS (DENG et al., 2014) realiza a predição de *hot-spots* através de um método baseado em estrutura. Através de um arquivo “.pdb” contendo o complexo fornecido pelo usuário, é conduzida uma abordagem em três etapas: primeiro, são extraídas características energéticas, estruturais e sequenciais, além de dois tipos de vizinhanças estruturais (vizinhança Euclidiana e de Voronoi); depois, é feito um processo de seleção de características em duas etapas; e por último, dois preditores (PREDHS-SVM e PREDHS-Ensemble) são utilizados para identificação de *hot-spots* baseando-se nas características selecionadas.

3.6 Mutagênese computacional

Para análise de mutação, foram utilizados tanto os complexos obtidos diretamente dos programas de *docking*, como também os cinco quadros de menor energia obtidos através das simulações de DM e identificados pela análise de MM/PBSA em cada replicata. A combinação de métodos baseados em diferentes abordagens pode contribuir para obtenção de resultados computacionais mais confiáveis sobre os efeitos das mutações em complexos proteicos (CHEN; LIN; CHU, 2013). Por isso, primeiramente foi utilizado o BeAtMuSiC (DEHOUCK et al., 2013), um servidor voltado para predição de mudanças da afinidade de ligação causadas por mutações, que utiliza um conjunto de potenciais estatísticos adaptados a uma representação *coarse-grained* das estruturas proteicas que permite uma avaliação rápida de todas as mutações possíveis para os resíduos da interface.

A análise do BeAtMuSiC faz uso de dois modelos de ligação (DEHOUCK et al., 2013). Enquanto no primeiro, as duas moléculas do complexo são capazes de se enovelarem independentemente, no segundo isso não é permitido. A mudança na energia livre de ligação ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) é obtida a partir de uma avaliação do impacto da mutação sobre a energia de enovelamento das moléculas individualizadas e no complexo, onde valores negativos são indicativos de mutações estabilizantes. Resíduos que obtiveram valores negativos nas análises de ASM (tópico 3.5.1) foram considerados potenciais alvos para otimização e analisados individualmente para mutações por todos os dezanove demais aminoácidos; também foi utilizada a ferramenta de mutações sistemáticas de forma a gerar uma lista de mutações consideradas estabilizantes.

Todos esses dados foram comparados com os obtidos a partir do programa mCSM-AB, no intuito de procurar o consenso entre os dois servidores. O mCSM-AB (PIRES; ASCHER, 2016) utiliza o método mCSM (PIRES; ASCHER; BLUNDELL, 2013), que se baseia no uso de aprendizado de máquina na predição dos efeitos de mutações a partir da leitura de assinaturas estruturais. Isso é feito através do uso de uma representação gráfica do resíduo nativo para extrair padrões geométricos e físico-químicos que são usados para representar o ambiente químico tridimensional durante o aprendizado supervisionado. Esse conceito foi adaptado no intuito de levar em consideração as características estruturais únicas dos anticorpos. Os arquivos de entrada requeridos pelo servidor correspondem ao arquivo de coordenadas atômicas dos complexos e um arquivo de texto com a lista de mutações desejadas. O programa prediz os valores diferença de energia livre de Gibbs após a mutação ($\Delta\Delta G$), onde valores positivos são representativos de mutações que aumentam a afinidade.

Para garantir um maior sucesso na aplicação das modificações que visam melhorar os modelos para os scFvs quanto a afinidade de ligação aos antígenos, o programa

PyMOL foi utilizado a fim de determinar os átomos próximos aos resíduos que obtiveram consenso nos dois preditores. A distância de corte de 0,5 nm entre os átomos pesados dos resíduos de interesse e os demais foi utilizada para considerar os mesmos capazes de interagir (DENG et al., 2014).

Então, foi feita uma análise das características físico-químicas envolvendo tais aminoácidos, a exemplo da hidrofobicidade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, presença de grupos carregados e carga desses grupos, caso existissem. Mutações consideradas benéficas foram aplicadas à estrutura do scFv, que foi novamente docado ao antígeno. Novas simulações de DM com aquecimento foram conduzidas de acordo com as etapas descritas no tópico 3.3.1, a fim de verificar a termoestabilidade dos novos complexos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem *in silico* dos fragmentos de anticorpo

Uma vez que não existem dados cristalográficos para o anticorpo pidilizumabe, foi requerida a realização de uma etapa de modelagem molecular, a fim de produzir a sua estrutura tridimensional. Optou-se modelar o anticorpo na forma de um scFv por este ser um formato inovador de biofármaco que vem sendo crescentemente utilizado: apenas entre 1996 e 2009, foram depositadas 315 patentes de scFvs no Instituto Europeu de Patentes (PUCCA et al., 2011). Em 2017, foram contabilizados três fragmentos deste tipo perpassando ensaios clínicos fases dois e três, e um aprovado para o uso contra LLC pelo FDA (SHERIDAN, 2017). Além de conservar a capacidade de interação, importante para sua função inibitória, seu tamanho reduzido também está associado a uma diminuição do risco de manifestação da doença do soro (AHMAD et al., 2012) – considerada uma reação de hipersensibilidade tipo III que está associada a identificação de sequências imunogênica no imunobiológico, e a consequente formação de imunocomplexos que reduzem a efetividade e levam a manifestação de efeitos adversos (CHAMBEL, 2016) - e ao aumento da penetrabilidade em massas tumorais (AFANASIEVA et al., 2003).

Os resultados referentes a busca pelo BLAST podem ser visualizados na Tabela 2. Para a modelagem comparativa ser considerada um método adequado para predição da estrutura tridimensional de proteínas, o valor da identidade encontrado pelo alinhamento local deve ser de no mínimo 30% para sequências com mais de 100 resíduos (ESWAR et al., 2006). Como todas as estruturas encontradas possuem cobertura de quase 100% e identidade acima de 77%, pode-se afirmar que o uso da estratégia de modelagem comparativa, em detrimento de metodologias *ab initio*, como a utilizada pelo programa I-TASSER (ZHANG, 2008), por exemplo, foi a mais acertada. Os altos valores para identidade e cobertura das sequências-molde com as do scFv são esperados, uma vez que existe uma alta conservação na topologia geral entre as moléculas de anticorpo (LIVESAY; SUBRAMANIAM, 2004).

Tabela 2 - Moldes para V_H e V_L do pidilizumabe

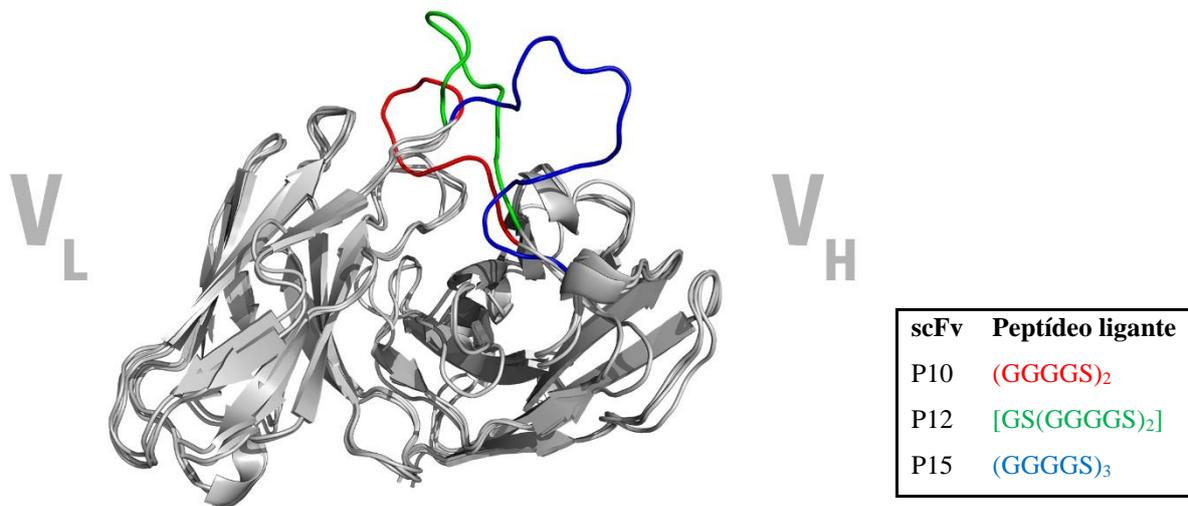
Cadeia	PDB ID	Cobertura (%)	Identidade (%)	Valor <i>e</i>	Resolução (Å)
Pesada	3T2N	100	79	$2e^{-64}$	2,55
	6B5P	99	78	$1e^{-62}$	2,29
	5BQ7	100	77	$7e^{-62}$	2,73
Leve	1MHP	99	84	$6e^{-57}$	2,80
	3C08	100	81	$2e^{-56}$	2,15
	5VSI	100	81	$3e^{-56}$	1,51

Fonte: elaborado pelo autor. Os moldes foram selecionados de acordo com a cobertura da sequência, identidade, resolução do cristal e valor-*e*, ou valor esperado, que é um parâmetro que descreve o número de ocorrências que se espera encontrar por acaso ao pesquisar em um banco de dados de um tamanho específico (número de falsos positivos).

Ao fim do processo de modelagem, foram obtidos três modelos para o scFv, que assumiram conformações comumente associadas a este tipo de molécula: tanto V_H quanto V_L estão enoveladas em uma estrutura típica de duas camadas de β-barril, formada por folhas-β conectadas por alças flexíveis (WANG; DUAN, 2011). As estruturas produzidas são praticamente idênticas, e se diferenciam apenas no comprimento e na conformação adotada pelo peptídeo ligante flexível que conecta o carboxiterminal de V_H ao aminoterminal de V_L.

A escolha pelo uso de peptídeos de diferentes tamanhos levou em consideração o fato de que tal comprimento é um dos fatores importantes que impacta diretamente diversas características do scFv, como avidéz e a especificidade contra o antígeno alvo (YUSAKUL et al., 2016). Na construção do conector, a utilização de resíduos de glicina - o menor aminoácido - visa proporcionar flexibilidade a estrutura do fragmento de anticorpo (WANG; DUAN, 2011); já a serina, exemplo de aminoácido pequeno e polar, fornece uma região hidrofílica que permite o estabelecimento de ligações hidrogênio ao solvente (SHAN et al., 1999). As estruturas tridimensionais para os scFvs, com os peptídeos ligantes em destaque, podem ser visualizadas na Figura 12.

Figura 12 - Alinhamento das estruturas tridimensionais dos scFv, com os seus respectivos peptídeos ligantes destacados



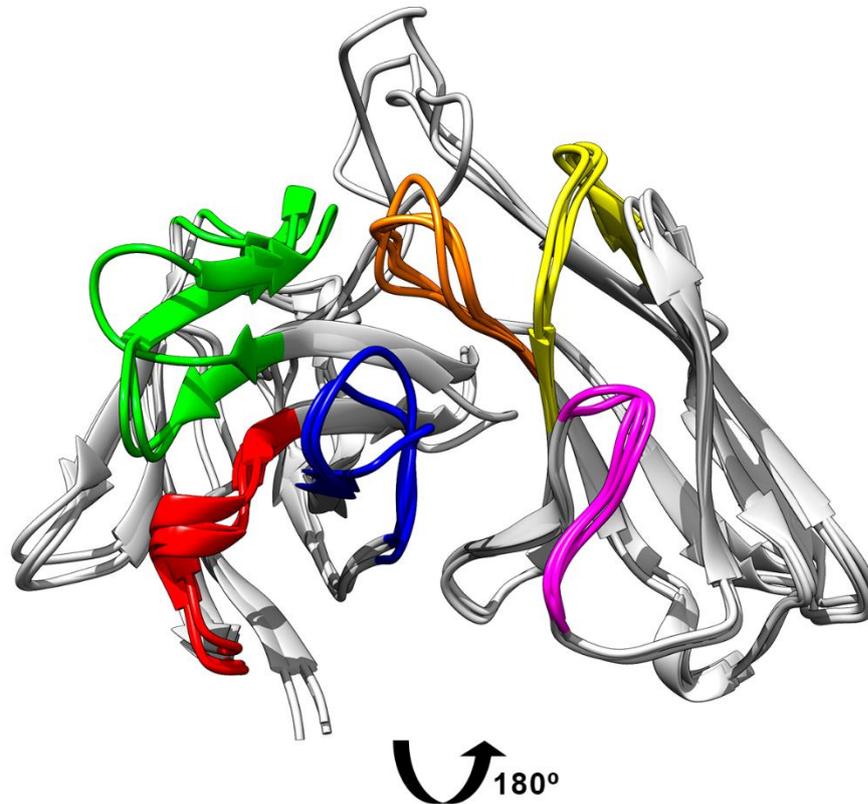
Fonte: elaborado pelo autor. As estruturas dos scFvs, obtidas por modelagem comparativa utilizando o programa Modeller, foram alinhadas utilizando o PyMOL. À esquerda, pode ser encontrada a cadeia variável leve (V_L), e à direita, a cadeia variável pesada (V_H). Entre as duas, encontram-se os peptídeos ligantes que diferenciam as três estruturas: em vermelho, está aquele com o comprimento de 10 resíduos de aminoácido; em verde, o de 12 resíduos; e em azul, o de 15 resíduos.

A especificidade ao antígeno na região de interação é basicamente determinada pelas CDRs (LANTTO; OHLIN, 2002). Dentre essas regiões hipervariáveis do anticorpo, a CDR3 da cadeia pesada é a que apresenta a maior variabilidade de tamanho e sequência (FERNÁNDEZ-QUINTERO et al., 2018). Apesar da grande variação, essas alças adotam um conjunto restrito de conformações com base na presença de certos resíduos em posições-chave nas CDRs e nas regiões *framework* vizinhas (AL-LAZIKANI; LESK; CHOTHIA, 1997). Assim, através do uso de alinhamentos de sequência, foi possível elaborar uma metodologia de numeração padronizada para identificação dessas regiões dentro das estruturas de anticorpo (KABAT et al., 1992).

Nos scFvs produzidos a partir do pidilizumabe, as CDRs 1, 2 e 3 de V_H foram localizadas nas posições 26-35, 50-66 e 99-106 da estrutura primária, respectivamente. Já em V_L , o tamanho do peptídeo ligante influenciou o posicionamento das CDRs na sequência. No P10, as CDRs 1, 2 e 3 da cadeia leve foram encontradas nas posições 152-161, 177-183 e 216-224; já no P12, as posições para as CDRs foram, respectivamente, 155-163, 179-185 e

218-226; finalmente, em P15, as CDRs foram encontradas nas posições 157-166, 182-188 e 221-229. Todas essas regiões foram evidenciadas na Figura 13.

Figura 13 - Regiões Determinantes de Complementariedade dos scFvs modelados



scFv	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
P10	26-35	50-66	99-106	152-161	177-183	216-224
P12	26-35	50-66	99-106	155-163	179-185	218-226
P15	26-35	50-66	99-106	157-166	182-188	221-229

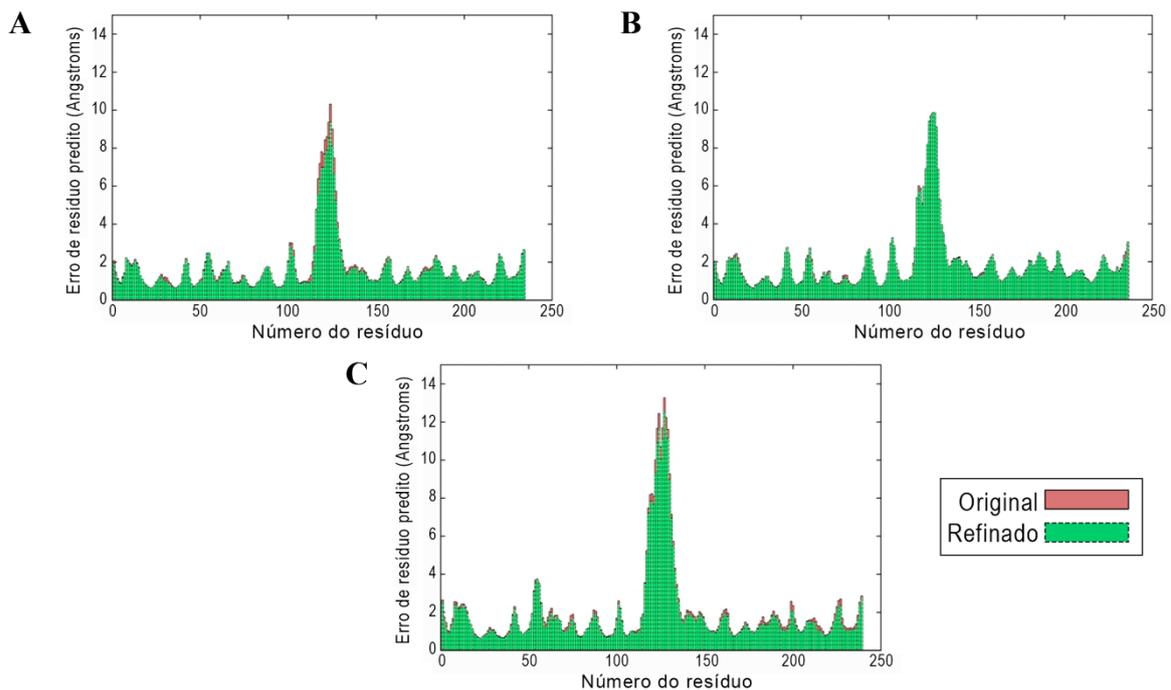
Fonte: elaborado pelo autor. A perspectiva da imagem está à 180° da Figura 12 para facilitar a visualização. As estruturas alinhadas dos scFvs tiveram suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) destacadas: as CDRs 1, 2 e 3 de V_H estão coloridas em vermelho, verde e azul, respectivamente, enquanto as CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 estão marcadas em amarelo, rosa e laranja. As cores e a numeração dos resíduos foram detalhadas na tabela.

Apesar da modelagem comparativa de proteínas ser um método amplamente utilizado, muitas aplicações biológicas das estruturas produzidas por tais protocolos são altamente dependentes de uma alta precisão na predição dos modelos tridimensionais desejados (KRYSHTAFOVYCH; FIDELIS, 2009), como é o caso da engenharia de

anticorpos. Melhorar a precisão de tais modelos para além das informações obtidas a partir dos moldes continua sendo um dos problemas proeminentes da bioinformática estrutural. Neste intuito, foi realizado o refinamento dos scFvs através do servidor ReFOLD (SHUID; KEMPSTER; MCGUFFIN, 2017).

A Figura 14 foi obtida a partir deste servidor, e fornece a estimativa do erro por resíduo para cada scFv. Tais gráficos ilustram a redução de erros locais nos modelos refinados em comparação com os originais fornecidos, o que é considerado importante pois, apesar de nem sempre ser possível alcançar o refinamento global de um modelo completo, as regiões ou domínios individuais podem, frequentemente, ser melhorados (SHUID; KEMPSTER; MCGUFFIN, 2017). A análise da imagem evidencia que a região em que se encontra o peptídeo ligante é a que acumula maior erro, o que é esperado, dada a alta flexibilidade desse segmento (SHAN et al., 1999). Não obstante, de forma geral, não é observada uma redução significativa deste parâmetro nos modelos otimizados.

Figura 14 - Predição de erro por resíduo para os scFvs obtido com o ReFOLD



Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos apresentam uma estimativa de erro por resíduo: enquanto no eixo horizontal são enumerados os números dos resíduos na sequência, no eixo vertical é colocada a estimativa de erro, dada em ângströms (Å). Os gráficos A, B e C são correspondentes à P10, P12 e P15, respectivamente. Em vermelho encontram-se os valores para os scFvs originais e em verde, aqueles obtidos a partir do refinamento com ReFOLD.

A importância da etapa de refinamento é evidenciada pela análise da qualidade dos modelos pelo MolProbity (CHEN et al., 2010). Este servidor de validação de estrutura fornece uma avaliação sólida de amplo espectro da qualidade do modelo fornecido à níveis global e local. Um de seus principais parâmetros de avaliação é o *clashscore*, que avalia o número de sobreposições estéricas desfavoráveis de átomos (WORD et al., 1999). Contraintuitivamente, quanto maior a porcentagem associada a esse valor, melhores são os modelos construídos. Fica claro na análise da Tabela 3, que contém os valores de *clashscore* antes e após a otimização com o ReFOLD, a melhora na qualidade estereoquímica dos modelos após a realização do refinamento.

Tabela 3 - *Clashscore* dos scFVs antes e após refinamento com ReFOLD

Modelo	<i>Clashscore</i> antes do refinamento com ReFOLD	<i>Clashscore</i> após o refinamento com ReFOLD
P10	0%	27%
P12	0%	97%
P15	0%	63%

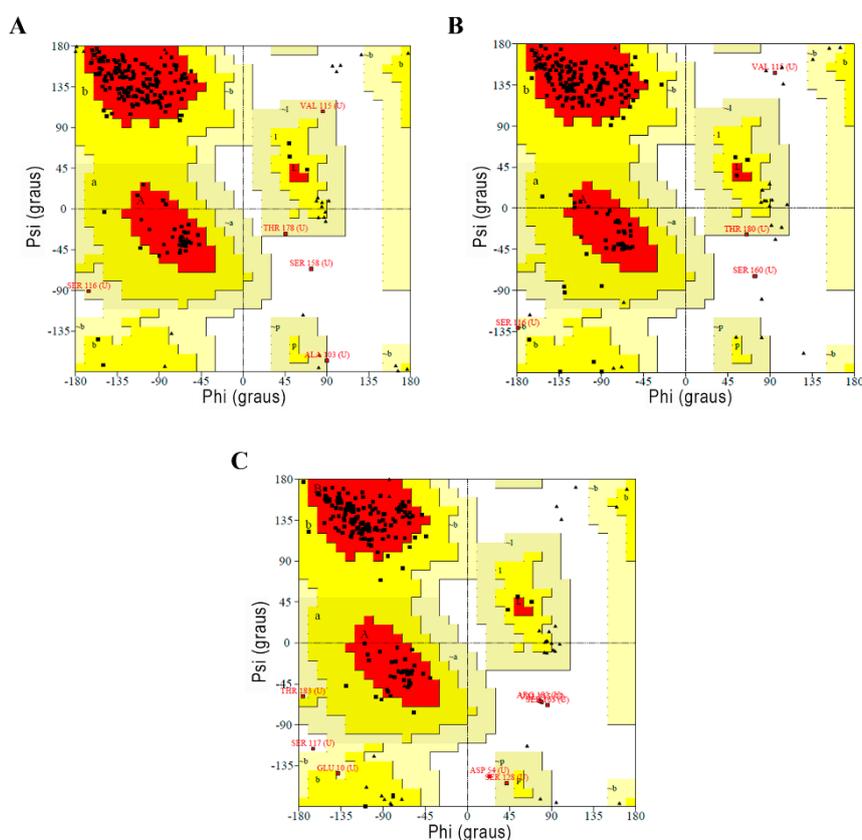
Fonte: elaborado pelo autor. Na classificação do *clashscore*, 100% é o melhor valor dentre as estruturas de resolução comparável, e 0% é o pior. É evidenciada a importância da etapa de refinamento pela grande melhora no parâmetro de *clashscore* nos modelos obtidos do ReFOLD, indicando um aumento da qualidade dos modelos.

Os gráficos de Ramachandran dos modelos refinados foram obtidos utilizando o PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). Os ângulos diedrais ϕ (phi), ψ (psi) e ω (ômega) são os principais determinantes para o enovelamento de uma proteína (HOOFT; SANDER; VRIEND, 1997). Ramachandran (1963) elaborou um gráfico de duas dimensões que comporta uma distribuição de pares de ângulos ϕ e ψ capaz de descrever grande parte das estruturas secundárias de proteínas. Com a exceção da glicina, que, por ser pequena, consegue assumir conformações estericamente proibidas aos demais aminoácidos (NELSON; COX, 2014), os resíduos devem ser encontrados em regiões permitidas do gráfico de Ramachandran, ou são considerados *outliers*.

Dessa forma, tal análise é um dos meios mais simples e sensíveis para avaliar a qualidade de um modelo de proteína na ausência de dados experimentais (KLEYWEGT; JONES, 1996). Com a análise dos gráficos contidos na Figura 15, foi possível elucidar a boa qualidade estereoquímica dos modelos produzidos: P10, P12 e P15 apresentaram,

respectivamente, 99%, 99% e 97,4% dos seus resíduos em regiões permitidas do gráfico (somando resíduos em regiões mais favoráveis, adicionalmente permitidas e generosamente permitidas). Em contrapartida, poucos resíduos foram encontrados em regiões não permitidas: no total, apenas 1%, 1% e 2,6% dos resíduos dos três scFvs foram considerados *outliers* e têm seus ângulos diedrais em valores estereoquimicamente desfavoráveis para a geometria da molécula.

Figura 15 - Gráficos de Ramachandran para os modelos refinados dos scFvs



Fonte: elaborado pelo autor. Em A, B e C estão, respectivamente, os gráficos de Ramachandran, produzidos pelo servidor PROCHECK, para P10, P12 e P15, respectivamente. Nos gráficos, as zonas sombreadas em vermelho marcam as regiões mais favoráveis para os pares ϕ e ψ ; as partes sombreadas em amarelo são regiões adicionalmente permitidas; os setores sombreados em amarelo claro são regiões generosamente permitidas; e em branco, estão as regiões não permitidas. Os pontos representam os resíduos de aminoácido da estrutura submetida.

A Tabela 4 sumariza as estatísticas dos gráficos, com a porcentagem de resíduos de cada estrutura em cada região de Ramachandran. A mesma serina localizada na região de CDR-L1, nas posições 158, 160 e 163 em P10, P12 e P15, respectivamente, foi considerada um *outlier* em todas as três estruturas, e ,provavelmente, deriva das estruturas

escolhidas como moldes. Ademais, o scFv com peptídeo ligante com 15 resíduos apresentou outros dois resíduos de CDRs dentro de regiões não permitidas do gráfico. Isso, juntamente ao fato de que este possui a maior porcentagem de resíduos outliers, é indicativo de que, dentre os três modelos, o de pior qualidade é o P15. Além disso, constatou-se que o tamanho do peptídeo ligante teve impacto sobre o arranjo estereoquímico dos resíduos. É importante ressaltar que a presença de alguns *outliers* é esperada mesmo em estruturas cristalográficas de alta resolução e que modelos com mais de 15% de *outliers* devem ser observados com cautela (KLEYWEGT; JONES, 1996), o que não corresponde aos achados para os modelos de scFvs produzidos.

Tabela 4 – Estatísticas dos gráficos de Ramachandran referentes aos modelos de scFv P10, P12 e P15

	P10	P12	P15
Resíduos em regiões mais favoráveis	90,7%	88,2%	86,7%
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas	6,7%	9,7%	9,2%
Resíduos em regiões generosamente permitidas	1,5%	1,0%	1,5%
Resíduos em regiões não permitidas	1,0%	1,0%	2,6%

Fonte: elaborado pelo autor. As porcentagens são referentes ao posicionamento dos resíduos dos modelos P10, P12 e P15 nos gráficos de Ramachandran ilustrados na Figura 15. Tais gráficos foram obtidos através do servidor PROCHECK.

Duas outras avaliações foram feitas a partir dos modelos produzidos. A primeira, realizada com o ProSA-web, visou a avaliação da qualidade geral dos modelos e a mensuração do desvio da energia total das estruturas em relação a uma distribuição de energia derivada de conformações aleatórias, dada pelo Escore Z (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Escores Z que fujam ao intervalo de valores característicos para proteínas nativas são indicativos de estruturas errôneas. Os modelos P10, P12 e P15 obtiveram escores Z de -6,67, -7,13, e -7,5, respectivamente, que estão dentro do intervalo permitido pelo programa.

Já a segunda fez uso do Verify3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997). Esse servidor avalia a precisão de um modelo tridimensional de proteína através da avaliação da compatibilidade do modelo com sua própria sequência de aminoácidos, usando um perfil 3D calculado a partir das coordenadas atômicas da estrutura (LÜTHY; BOWIE; BOWIE, 1992). Dentre as variáveis levadas em consideração estão: a área do resíduo “enterrado” na proteína e inacessível ao solvente; a fração da área da cadeia lateral coberta por átomos

polares (nitrogênio ou oxigênio); e a estrutura secundária local (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991). Resíduos com escore 3D-1D médio maior ou igual a 0,2 são considerados adequados. Proteínas em que mais de 80% dos aminoácidos possuam este perfil possuem boa correlação entre sequência e estrutura. Os valores calculados pelo Verify3D para os três modelos de scFv podem ser encontrados na Tabela 5. Todas as estruturas apresentaram pelo menos 98% dos seus resíduos com escore 3D-1D médio maior ou igual a 0,2, corroborando a qualidade dos modelos obtidos.

Tabela 5 - Percentual de resíduos com Escore 3D-1D adequados segundo o programa Verify3D

Modelo	Resíduos com Escore 3D-1D médio $\geq 0,2$ (%)
P10	100
P12	98,3
P15	100

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores percentuais são uma razão entre o número de resíduos cujo o escore 3D-1D é maior ou igual a 0,2 e o número total de resíduos de aminoácido presentes no arquivo de coordenadas atômicas submetidos ao servidor.

4.2 Validação da metodologia de *docking* computacional

O *docking* entre proteínas é uma metodologia adequada para fornecer informações sobre a função molecular dos polipeptídeos com base no reconhecimento, afinidade e especificidade (GRAY, 2006). Do ponto de vista termodinâmico, complexos próximos à conformação nativa devem estar no mínimo global de ΔG , onde o ΔG é a mudança de energia livre de formação do complexo em relação aos seus componentes separados (SMITH; STERNBERG, 2002). Um dos grandes desafios dos métodos de *docking* é determinar de forma constante, rápida e acurada esse mínimo de energia (VERKHIVKER et al., 2000).

Na ausência de dados bioquímicos ou evolucionários para guiar o *docking*, o método resultará em diversos modelos com o que são aparentemente boas pontuações, que representam aproximações do ΔG (RADOM; PLÜCKTHUN; PACI, 2018). Para ajudar a classificar esses complexos, diversos algoritmos de ranqueamento com diferentes funções de energia vêm sendo desenvolvidos (MOAL et al., 2013). Entretanto, apesar dessa

reclassificação poder ser útil para reduzir o número de modelos prováveis, dificilmente é possível identificar de maneira inequívoca os modelos corretos através da pontuação fornecida por tais programas.

Considerando que conformações docadas corretamente estão em um valor mínimo da superfície de energia livre e que existem grandes barreiras energéticas entre tais estruturas e as incorretas, que compõe conformações instáveis ou metaestáveis, é possível fazer uso de simulações de DM com aquecimento para discriminar estruturas nativas ou próximas e, dessa forma, reduzir a ocorrência de falsos positivos (RADOM; PLÜCKTHUN; PACI, 2018). Neste trabalho, foi avaliada a performance de dois programas de *docking* e um servidor de reclassificação dos modelos sobre dois complexos conhecidos com o receptor PD-1.

No complexo entre PD-1 e PD-L1 (PDB ID: 4ZQK), não foram recuperadas quaisquer estruturas adequadas a partir de ambas metodologias de *docking*, como pôde ser constatado pela avaliação do DockQ, que classificou todos os modelos produzidos tanto pelo HADDOCK quanto pelo ClusPro como incorretos. As pontuações geradas por ambos os programas (pontuação do HADDOCK e pontuação ponderada do ClusPro) foram insuficientes para distinguir as más conformações. A pontuação ponderada normalizada resultante do DockScore para a maioria dos modelos foi ruim, o que está de acordo com a baixa qualidade dos mesmos. Cinco estruturas (três obtidas pelo HADDOCK e duas pelo ClusPro) foram utilizadas para DM com aquecimento, e todos os valores encontrados para tais estão listados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Estruturas resultantes do *docking* entre PD-1 e PD-L1 com o HADDOCK

Nome para DM	Tamanho do cluster	RMSD (Å)	Pontuação do HADDOCK	Escore-Z	DockScore	DockQ
HADDOCK-1	16	14,1	-71,8	-0,7	0,4762	0,010
HADDOCK-2	9	6,5	-64,4	-0,3	0,3717	0,015
HADDOCK-3	19	0,9	-97,3	-2,3	0,9379	0,015

Fonte: elaborado pelo autor. As cores que estão colorindo os nomes dos complexos são a mesmas utilizadas nos gráficos de RMSD. Os modelos produzidos a partir do HADDOCK foram avaliados segundo o tamanho do cluster produzido, o seu RMSD, dado em ângströms (Å), a pontuação do HADDOCK e o Escore-Z. Para classificação do DockScore, fez-se o uso do parâmetro de pontuação ponderada normalizada. Os valores gerados para o DockQ são dependentes dos parâmetros Fnat, iRMS e LRMS. Os complexos foram renomeados a fim de facilitar a identificação dos mesmos durante as análises das simulações de DM.

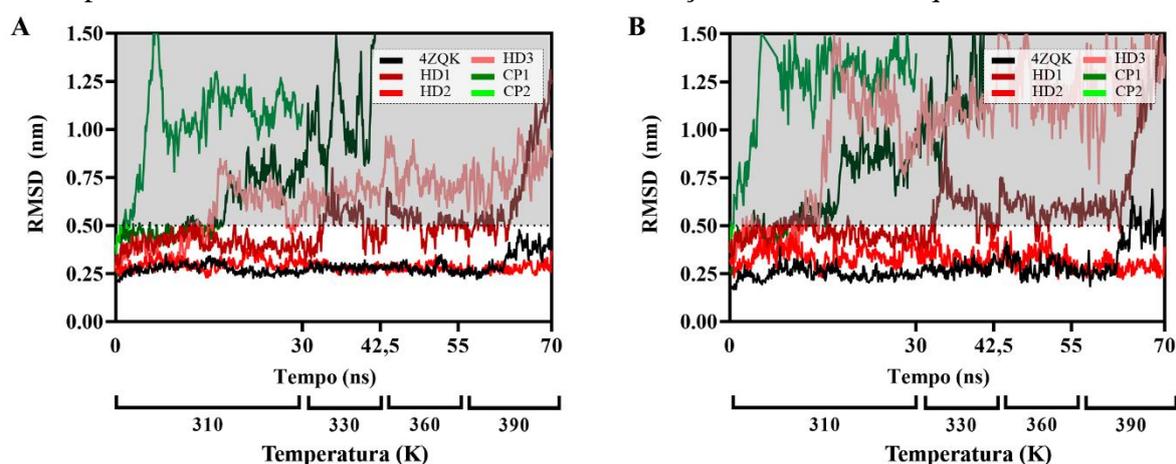
Tabela 7 - Estruturas resultantes do *docking* entre PD-1 e PD-L1 com o ClusPro

Nome para DM	Tamanho do <i>cluster</i>	Modelo de pontuação	Pontuação ponderada	DockScore	DockQ
ClusPro-1	76	vdW	-618,8	0,1888	0,009
ClusPro-2	76	vdW	-618,8	0,0400	0,040

Fonte: elaborado pelo autor. As cores que estão colorindo os nomes dos complexos são a mesmas utilizadas nos gráficos de RMSD. O ClusPro oferece quatro tipos de modelos de pontuação que favorecem tipos de interações distintas que podem predominar em dados complexos; as estruturas escolhidas, que representam o menor e o maior valor de DockQ, respectivamente, encontrados dentre as demais, utilizaram o modelo que favorece as forças de van der Waals. Além da pontuação ponderada, o tamanho dos clusters também foi avaliado. Também foi feita a análise dos modelos pelo DockScore e pelo DockQ. Os complexos foram renomeados para realização das simulações de DM.

As simulações de dinâmica molecular foram eficientes na eliminação de falsos positivos para este complexo: das cinco estruturas simuladas, apenas uma (HADDOCK-2) resistiu ao aquecimento e manteve um RMSD abaixo de 0,5 nm, representando uma taxa de erro de 20%. Os valores de iRMS estão em concordância com os obtidos a partir da análise da estrutura global. Tais informações podem ser visualizadas na Figura 16.

Figura 16 - Variação do RMSD do cristal 4ZQK e das estruturas resultantes do *docking* computacional entre PD-1 e PD-L1 durante simulações de DM com aquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. Em (A) estão os valores de RMSD para a estrutura global dos complexos e em (B) estão colocadas as variações do iRMS. As simulações foram conduzidas por 30 ns a 310 K, por 12,5 ns a 330 K e a 360 K e por 15 ns a 390 K. Os valores acima de 0,50 nm estão dessaturados.

Todo o processo de avaliação foi reproduzido para o complexo entre PD-1 e o Fv do anticorpo monoclonal pembrolizumabe (PDB ID: 5B8C). Não obstante, para esse conjunto, tanto o ClusPro quanto o HADDOCK mostraram ser eficazes em produzir bons modelos, uma vez que o primeiro destes gerou cinco estruturas classificadas como de alta qualidade pelo DockQ e o segundo produziu quatro. As métricas de pontuação utilizadas pelos programas de *docking* foram eficazes em classificar as melhores estruturas nesse sistema. O DockScore conseguiu destacar alguns dos melhores modelos produzidos pelos servidores, embora não na ordem exata da classificação produzida a partir do DockQ; entretanto, dois dos modelos de alta qualidade pontuaram mal no DockScore. Tais dados podem ser encontrados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Estruturas resultantes do *docking* entre PD-1 e o Fv do pembrolizumabe com o HADDOCK

Nome para DM	Tamanho do cluster	RMSD (Å)	Pontuação do HADDOCK	Escore-Z	DockScore	DockQ
HADDOCK-1	76	0,5	-172,2	-1,9	0,8907	0,856
-	76	0,5	-172,2	-1,9	0,5901	0,865
HADDOCK-2	76	0,5	-172,2	-1,9	0,9372	0,869
-	76	0,5	-172,2	-1,9	0,8289	0,863
HADDOCK-3*	84	13,8	-87,2	0	0,6009	0,005

Fonte: elaborado pelo autor. As cores que estão colorindo os nomes dos complexos são a mesmas utilizadas nos gráficos de RMSD. Os modelos produzidos a partir do HADDOCK foram avaliados segundo o tamanho do *cluster* produzido, o seu RMSD, dado em ângströms (Å), a pontuação do HADDOCK e o Escore-Z. No *cluster 2* foram encontrados todos os modelos que melhor foram pontuados pelo DockQ, dos quais dois (HADDOCK-1 e HADDOCK-2) foram submetidos a simulação com aquecimento. *HADDOCK-3 foi utilizado nas simulações de DM como controle negativo. Uma outra estrutura (não listada) que obteve a pior classificação pelo DockQ, nomeada HADDOCK-4, também foi usada como controle negativo.

Tabela 9 - Estruturas resultantes do *docking* entre PD-1 e o Fv do pembrolizumabe com o ClusPro

Nome para DM	Tamanho do <i>cluster</i>	Modelo de pontuação	Pontuação ponderada	DockScore	DockQ
ClusPro-1	118	B	-883,3	0,9368	0,894
ClusPro-2*	99	B	-565,3	0,6902	0,036
ClusPro-3	99	B	-565,3	0,937	0,881
-	86	IE	-576,7	0,9368	0,894
-	63	IH	-558,2	0,6905	0,894
-	50	vdW	-586,3	0,8951	0,893

Fonte: elaborado pelo autor. As cores que estão colorindo os nomes dos complexos são a mesmas utilizadas nos gráficos de RMSD. Os modelos obtidos pelos ClusPro foram avaliados quanto ao tamanho dos clusters e a pontuação ponderada fornecida. Os modos de ligação de boa qualidade, aferida pelo DockQ, foram obtidos através dos modelos de pontuação balanceado (B), favorecendo interações eletrostáticas (IE), favorecendo interações hidrofóbica (IH) e favorecendo forças de van der Waals. Cinco estruturas de alta qualidade foram produzidas, segundo o DockQ, das quais duas, denominadas ClusPro-1 e ClusPro-3, foram submetidas a DM com aquecimento. *ClusPro-2 e ClusPro-4 (não listado), representantes de estruturas docadas incorretamente, segundo o DockQ, foram utilizados como controles negativos.

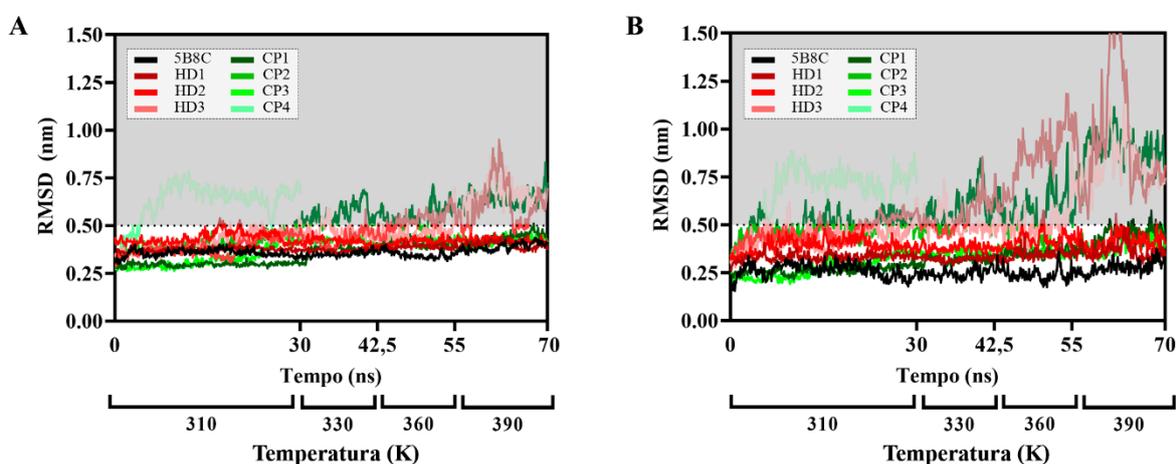
Para realização das DM com aquecimento, dois modelos de alta qualidade gerados por cada método foram utilizados como controles positivos e dois modelos gerados por ambos que pontuaram mal no DockQ, como controles negativos. Os respectivos resultados para variação do RMSD desses modelos e da estrutura cristalográfica estão ilustrados pela Figura 17. As simulações foram eficazes na distinção das estruturas corretas. Todas aquelas que pontuaram bem no DockQ mantiveram seu RMSD e iRMS abaixo do valor de corte ao decorrer simulação; já os controles negativos apresentaram variações bem superiores. Dessa forma, a metodologia de DM obteve uma taxa de acerto de 100% para esse complexo.

A importância da realização dessa etapa de validação para o método de *docking* é exacerbada pelo fato de que não existem dados estruturais sobre as interações envolvendo o pidilizumabe. Os testes realizados nos dois complexos supracitados permitiram concluir que: os programas de *docking* HADDOCK e ClusPro são capazes de produzir modelos de alta qualidade para complexos proteína-proteína, mas seus algoritmos de pontuação são, muitas vezes, insuficientes para identificar quais estruturas, dentre centenas

de modelos produzidos, são de fato as mais apropriadas, um problema que é considerado um dos maiores desafios no campo do *docking* molecular (KROVAT; STEINDL; LANGER, 2005); a classificação feita pelo DockScore é capaz, em linhas gerais, de identificar modelos incorretos, embora seja ineficiente em realizar um ranqueamento preciso dos bons modelos, tendo uma performance compatível com os achados de Moal e colaboradores (2013); as simulações de DM com aquecimento propostas por Radom e colaboradores (2018) foram eficazes na identificação dos modelos mais próximos ao complexo nativo, mas não eliminaram completamente a ocorrência de falsos positivos.

A surpreendente termoestabilidade de modos de ligação considerados incorretos pelo DockQ, a exemplo de ClusPro2 no complexo PD-1/PD-L1, capazes de manter uma variação baixa do RMSD mesmo a temperaturas muito elevadas, considerando o contexto biológico, pode sinalizar para a presença de tais estruturas dentro do funil na superfície de energia de livre do sistema, e sua difusão para conformações corretas durante o tempo de simulação (RADOM; PLÜCKTHUN; PACI, 2018).

Figura 17 - Variação do RMSD do cristal 5B8C e das estruturas resultantes do *docking* computacional entre o PD-1 e o Fv do mAb pembrolizumabe durante simulações de DM com aquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. Em (A) estão os valores de RMSD para a estrutura global dos complexos e em (B) estão colocadas as variações do iRMS. As simulações foram conduzidas por 30 ns a 310 K, por 12,5 ns a 330 K e a 360 K e por 15 ns a 390. A linha preta corresponde ao RMSD do cristal 5B8C. Os valores acima de 0,50 nm estão dessaturados.

4.3 *Docking* dos scFvs à PD-1 e DLL1

Seguiu-se utilizando a metodologia referente ao HADDOCK para realizar uma primeira rodada de *dockings* entre os scFvs e seus possíveis ligantes. Foi feito o uso integrado das pontuações fornecidas pelo HADDOCK e DockScore para selecionar os três melhores modelos para cada scFv, que estão listados na Tabela 10. Vale ressaltar que o DockQ não foi utilizado para essa etapa, visto que é uma ferramenta intrinsecamente ligada a validação e necessita de uma estrutura cristalográfica de referência para avaliar a qualidade do *docking*. Para simplificar a denominação dos modelos, os complexos entre os scFvs com os peptídeos ligantes de 10, 12 e 15 resíduos de comprimento e o receptor PD-1 foram nomeados de complexos P10-PD1, P12-PD1 e P15-PD1, respectivamente; já os modelos que utilizam esses scFvs, na mesma ordem, mas com a proteína DLL1, foram chamados de P10-DLL1, P12-DLL1 e P15-DLL1, respectivamente. Parâmetros como o RMSD, tamanho do *cluster*, e as demais métricas fornecidas pelo programa não são *per se* suficientes para aferir quais estruturas são próximas as nativas.

Tabela 10 - Estruturas resultantes do *docking* entre PD-1 e os três scFvs utilizando o HADDOCK

Complexo	Modelo	Tamanho do <i>cluster</i>	RMSD (Å)	Pontuação do HADDOCK	Escore-Z	Dock Score
P10-PD1	P10-PD1-1	5	3,5	-73,0	-1,7	0,932
	P10-PD1-2	5	3,5	-73,0	-1,7	0,910
	P10-PD1-3	8	14,4	-66,2	-1,0	0,879
P12-PD1	P12-PD1-1	18	14,6	-65,7	-1,3	0,907
	P12-PD1-2	18	14,6	-65,7	-1,3	0,820
	P12-PD1-3	18	11,3	-56,8	-0,7	0,748
P15-PD1	P15-PD1-1	17	9,9	-76,9	-2,1	0,856
	P15-PD1-2	5	9,0	-58,0	-1,1	0,753
	P15-PD1-3	5	11,5	-24,8	0,6	0,752

Fonte: elaborado pelo autor. As cores que estão colorindo o nome dos complexos são as mesmas utilizadas nos gráficos de RMSD. Os modelos produzidos a partir do HADDOCK foram avaliados segundo o tamanho do *cluster* produzido, o seu RMSD, dado em ângströms (Å), a pontuação do HADDOCK e o Escore-Z. Os modelos listados também foram selecionados, dentre os demais, através dos valores de DockScore.

Levando em consideração os valores altos de RMSD e da pontuação do HADDOCK, e tendo em mente que os dados utilizados para guiar o *docking* pelo HADDOCK foram preditos computacionalmente, considerou-se apropriada a realização de uma segunda rodada de *docking* utilizando o ClusPro, da qual foram extraídas as melhores estruturas correspondentes a todos os quatro modelos de pontuação do programa – ou seja, as que obtiveram melhores valores para a pontuação ponderada. Além do modelo cristalográfico já considerado para PD-1 (2M2D), foram utilizadas outras 4 estruturas para tal receptor, gerando, ao final do *docking*, 60 modelos para complexos entre o PD-1 e os scFvs. As estruturas, alinhadas utilizando o programa Chimera, demonstraram uma alta variabilidade; além da avaliação das métricas do ClusPro, foi realizada uma inspeção visual visando selecionar os modelos com maior similaridade de modo de ligação para realização da DM (Tabela 11).

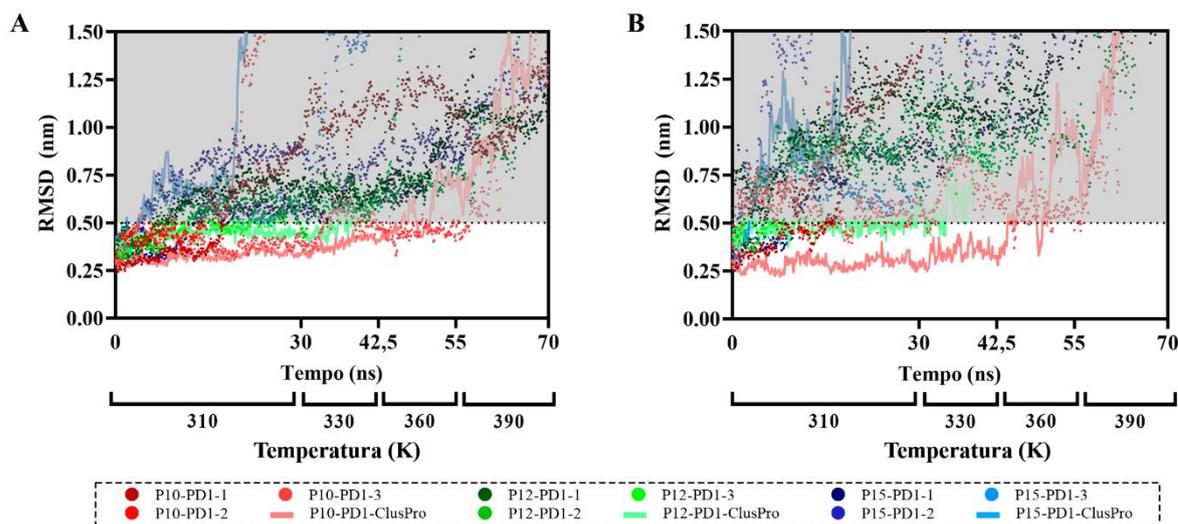
Tabela 11 - Exemplos de modelos resultantes do *docking* entre diversas estruturas cristalográfica do PD-1 e os scFvs com o servidor ClusPro

Complexo	Modelo	Cristal do PD-1 utilizado	Tamanho do <i>cluster</i>	Pontuação ponderada
P10-PD1	P10-PD1-ClusPro	4ZQK	176	-574,3
P12-PD1	P12-PD1-ClusPro	5GGS	117	-512,3
P15-PD1	P15-PD1-ClusPro	5B8C	117	-538,4

Fonte: elaborado pelo autor. As cores que estão colorindo os nomes dos complexos são a mesmas utilizadas nos gráficos de RMSD. Os modelos foram obtidos pelos ClusPro utilizando o modelo de pontuação balanceado.

Os doze modelos resultantes dessas duas metodologias de *docking* computacional – isto é, nove estruturas obtidas pelo HADDOCK e três pelo ClusPro - foram submetidos à DM com aquecimento. Os resultados, ilustrados pela Figura 18, evidenciaram que todos os complexos tiveram uma alta variação de RMSD e iRMS, nenhum destes mantendo valores abaixo da linha de corte estabelecida. Os altos valores de iRMS são indicativos da dissociação dos complexos (OH; CONSTA, 2017), fato que pôde ser comprovado pela visualização das trajetórias utilizando o *software* VMD.

Figura 18 - Variação do RMSD das estruturas resultantes do *docking* computacional entre o PD-1 e os scFvs produzidos por modelagem comparativa durante simulações de DM com aquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. Em A estão os valores de RMSD para a estrutura global dos complexos e em B estão colocadas as variações do iRMS. Os valores acima de 0,50 nm estão dessaturados, os pontos representam estruturas obtidas pelo HADDOCK, e as linhas, estruturas obtidas no ClusPro. Os valores elevados e inconstantes do RMSD e iRMSD em todos os complexos indicam o desprendimento das proteínas causado pela ausência de interações. De fato, é possível visualizar a ausência de interações na reprodução da trajetória pelo VMD.

O processo de desenvolvimento do anticorpo monoclonal pidilizumabe não levou em conta sua especificidade da interação, mas sim sua capacidade de suscitar uma resposta desejada (HARDY et al., 1994). Mesmo com a utilização do mesmo em diversos testes clínicos que alegavam que tal mAb correspondia a um anticorpo anti-PD-1 (PHILIPS; ATKINS, 2014), apenas em 2018 foram divulgadas as primeiras informações que essa proteína interagia primariamente com DLL1 (STENNER; RENNER, 2018). Não obstante, não há na literatura, até o momento, quaisquer trabalhos que elucidem as interações, se existentes, entre tal anticorpo e a PD-1. Portanto, este é o primeiro estudo estrutural a elucidar que o pidilizumabe, dentro dos modelos de *docking* validados aqui citados, não interage com a PD-1. Tal informação é de suma importância para a melhor compreensão das vias inibidas a partir da utilização desse mAb e das consequências biológicas por trás dessa inibição.

O mesmo processo foi replicado para os complexos entre os scFvs e DLL1. Os modelos obtidos pelo HADDOCK foram selecionados com auxílio das pontuações fornecidas pelo próprio programa de *docking* e pelo DockScore, e estão listados na Tabela

12.

Tabela 12 - Estruturas resultantes do *docking* entre DLL1 e os três scFvs utilizando o HADDOCK

Complexo	Modelo	Tamanho do <i>cluster</i>	RMSD (Å)	Pontuação do HADDOCK	Escore-Z	Dock Score
P10-DLL1	P10-DLL1-1	7	0,90	-108,9	-2,5	0,907
	P10-DLL1-2	7	0,90	-108,9	-2,5	0,802
	P10-DLL1-3	7	0,90	-108,9	-2,5	0,797
P12-DLL1	P12-DLL1-1	6	13,0	-100,6	-2,4	0,936
	P12-DLL1-2	6	13,0	-100,6	-2,4	0,869
	P12-DLL1-3	6	13,0	-100,6	-2,4	0,847
P15-DLL1	P15-DLL1-1	4	1,2	-74,4	-1,1	0,845
	P15-DLL1-2	6	24,2	-80,6	-1,4	0,815
	P15-DLL1-3	7	22,9	-54,1	-0,2	0,805

Fonte: elaborado pelo autor. Os modelos produzidos a partir do HADDOCK foram avaliados segundo o tamanho do *cluster* produzido, o seu RMSD, dado em ângströms (Å), a pontuação do HADDOCK e o Escore-Z. Os modelos listados também foram selecionados, dentre os demais, através da classificação pela avaliação das pontuações do HADDOCK e do DockScore. Valores iguais de pontuação do HADDOCK são referentes a estruturas oriundas do mesmo *cluster*.

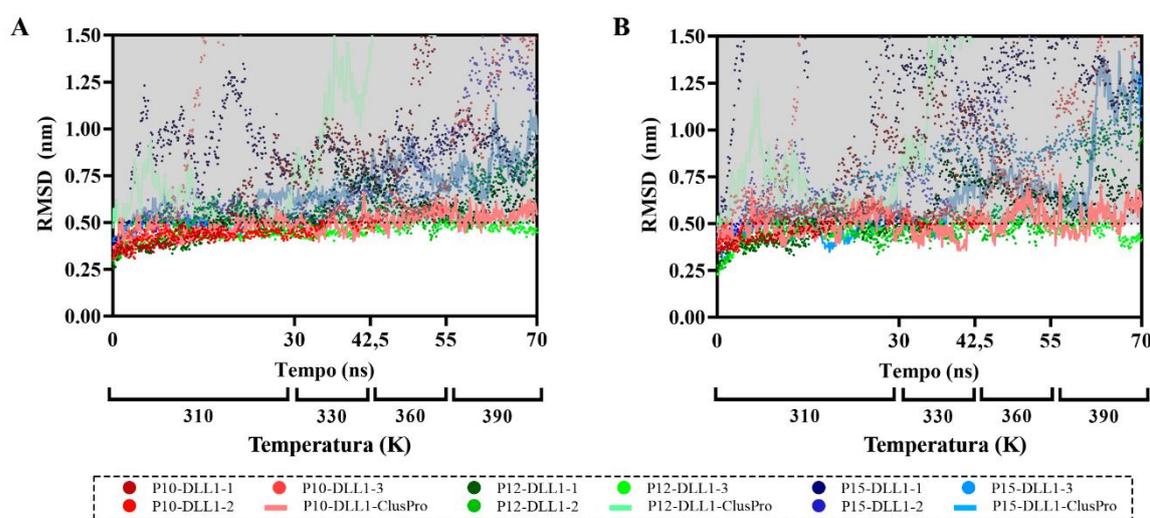
Assim como foi feito para as estruturas anteriores, um novo *docking* utilizando o ClusPro foi realizado; entretanto, como existe apenas um cristal para a proteína DLL1, o mesmo foi utilizado juntamente aos três scFvs, totalizando doze modos de ligação obtidos nesta etapa - considerando os quatro modelos de pontuação fornecidos pelo servidor – que foram selecionados através da mesma metodologia descrita nos complexos envolvendo PD-1. Tais estruturas estão listadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Exemplos de modelos resultantes do *docking* entre a proteína DLL1 e os scFvs utilizando o servidor ClusPro

Complexo	Modelo	Cristal do DLL1 utilizado	Tamanho do <i>cluster</i>	Pontuação ponderada
P10-DLL1	P10-DLL1-ClusPro	4XBM	80	-680,7
P12-DLL1	P12-DLL1-ClusPro	4XBM	107	-635,2
P15-DLL1	P15-DLL1-ClusPro	4XBM	97	-791,5

Fonte: elaborado pelo autor. Os modelos foram obtidos pelos ClusPro utilizando o modelo de pontuação balanceado.

Figura 19 - Variação do RMSD das estruturas resultantes do *docking* computacional entre DLL1 e os scFvs produzidos por modelagem comparativa durante simulações de DM com aquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. Em A estão os valores de RMSD para a estrutura global dos complexos e em B estão colocadas as variações do iRMS. Os valores acima de 0,50 nm estão dessaturados, os pontos representam estruturas obtidas pelo HADDOCK, e as linhas, estruturas obtidas no ClusPro. Os complexos denominados P10-DLL1-ClusPro e P12-DLL1-3 foram os que se mantiveram mais estáveis ao longo do aquecimento.

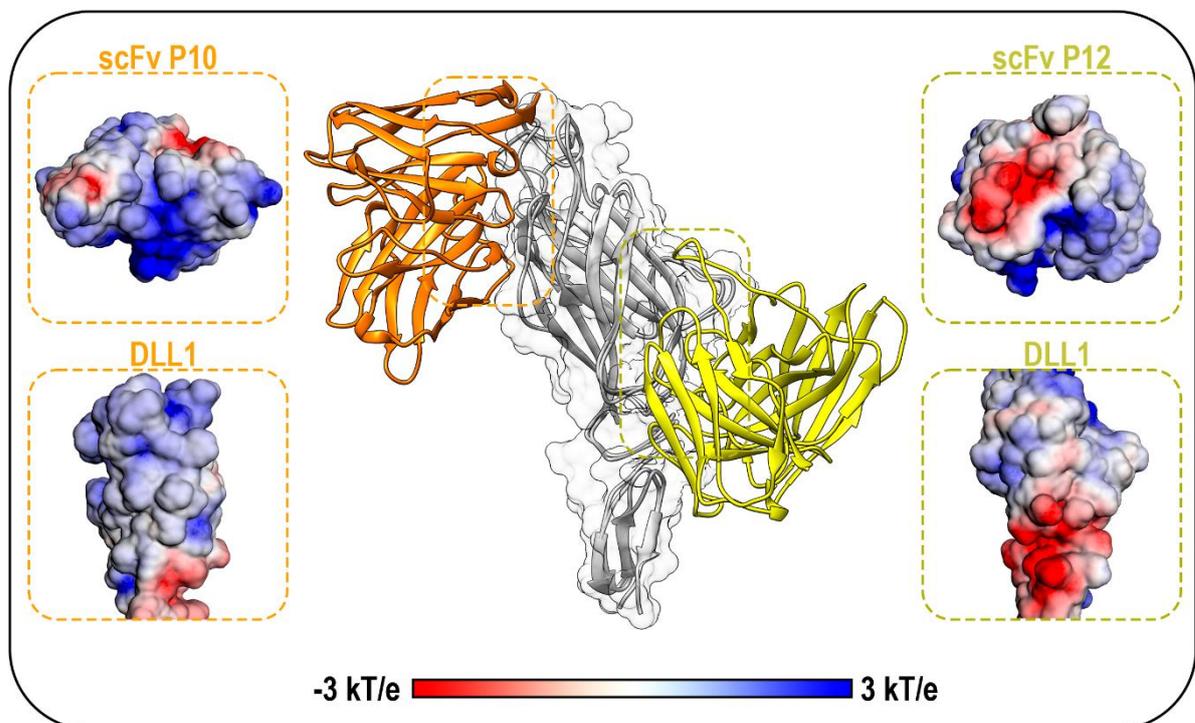
As simulações com aquecimento foram realizadas com essas doze estruturas e os valores para o RMSD total e da interface podem ser encontrados na Figura 19. Duas estruturas apresentaram maior termoestabilidade durante a DM: P10-DLL1-ClusPro e P12-DLL1-3 (a partir de agora referidas apenas como P10-DLL1 e P12-DLL1). Apesar da primeira ter concluído a simulação com RMSD acima do corte pré-estabelecido, sua variação

total média manteve-se próxima a 0,5 nm, motivo pelo qual optou-se por continuar com as duas estruturas para realização de simulações mais extensas.

Vale ressaltar que os fragmentos de anticorpo foram posicionados em sítios diferentes do DLL1 dentro desses complexos: enquanto em P10-DLL1 o scFv interage com a região C2, em P12-DLL1 a interação ocorre na transição entre C2 e o domínio de ligação ao antígeno CSL. Uma vez que a atração eletrostática, particularmente as interações carga-carga específicas na interface de interação, desempenha um papel importante no reconhecimento molecular (GABB; JACKSON; STERNBERG, 1997), foi feita a análise do perfil eletrostático nas regiões em que os scFvs foram docados (Figura 20).

No complexo com P10, não pode ser visualizada uma complementaridade de cargas entre as proteínas: enquanto a superfície de DLL1 está mais próxima da neutralidade, os resíduos da interface do scFv estão carregados positivamente ou não carregados; isso pode indicar que não existem forças atrativas ou repulsivas resultantes dessa interação. Já em P12-DLL1, existem, em alguns pontos da interface, regiões de encaixe entre cargas opostas, que podem favorecer a formação de interações eletrostáticas (EXNER; KEIL; BRICKMANN, 2002).

Figura 20 - Análise do perfil eletrostático das interfaces de interação scFv-DLL1



Fonte: elaborado pelo autor. Os complexos P10-DLL1 (laranja) e P12-DLL1 (amarelo) foram alinhados sobre a estrutura de DLL1 (cinza), utilizando o programa Chimera. As superfícies eletrostáticas estão ilustradas em um intervalo de -3 a 3 kT/e, com as cargas negativas coloridas em vermelho e cargas positivas em azul.

As informações obtidas através do *docking* dessas moléculas são imprescindíveis para guiar os estudos de mutagênese e orientar as aplicações no desenho de fármacos (DE RUYCK et al., 2016). Não obstante, para avaliar qual dos dois modos de ligação propostos para os scFvs é o mais provável de acontecer em um ambiente a condições fisiológicas e elucidar parâmetros como a estabilidade dos complexos, simulações de dinâmica molecular foram utilizadas.

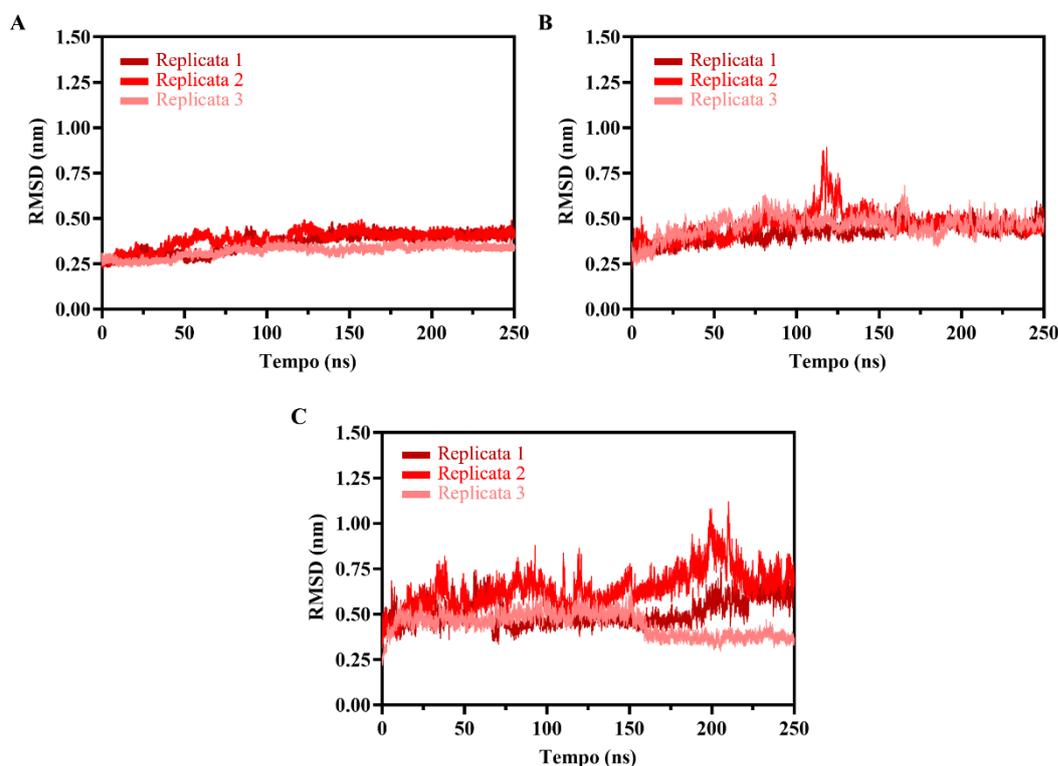
4.4 Dinâmica molecular dos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1

Simulações de DM foram utilizadas na obtenção de detalhes atomísticos das interações dinâmicas entre as moléculas que contribuem para a estabilidade e função das proteínas (CHILDERS; DAGGET, 2017). Dentre as análises realizadas, a avaliação da variação do desvio quadrático médio das coordenadas atômicas após a superimposição de um conjunto de estruturas é a escolha mais comum para quantificar diferenças nas estruturas e dinâmicas macromoleculares (SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017). Por isso, o estudo do RMSD é comumente usado em análises de trajetórias de dinâmica molecular para estabelecer o período de equilíbrio e a qualidade das simulações, e para rastrear alterações dinâmicas após a modificação de proteínas (LEE; QI; IM, 2015).

A Figura 21 ilustra a variação do RMSD dos componentes do complexo P10-DLL1: em 1 está o scFv com peptídeo ligante de 10 resíduos de aminoácidos; em 2 está o alvo DLL1; e em 3, estão os átomos da interface entre esses dois componentes. A análise dos gráficos permite afirmar que os RMSDs do fragmento de anticorpo e do DLL1 estabilizaram-se por volta de 0,4 e 0,5 nm, respectivamente, após os primeiros nanossegundos de simulação; este último sofreu uma maior variação por volta dos 120 ns da segunda replicata, mas logo retornou ao valor de equilíbrio.

A interface da interação scFv-antígeno apresentou uma maior variação na replicata 2, com um aumento do RMSD sendo identificada nos últimos 50 ns de simulação. Tomando esse dado em conjunto com a diminuição da área de superfície acessível ao solvente nessa mesma simulação (Figura 22), infere-se que tal variação está associada ao deslocamento da interface para uma conformação mais coesa, e não a uma instabilidade no complexo. Não obstante, enquanto a replicata 1 apresentou um sutil aumento de iRMS nos últimos nanossegundos da DM, o iRMS da replicata 3 teve valor praticamente constante que, ao longo de toda a simulação, variou em torno de 0,5 nm.

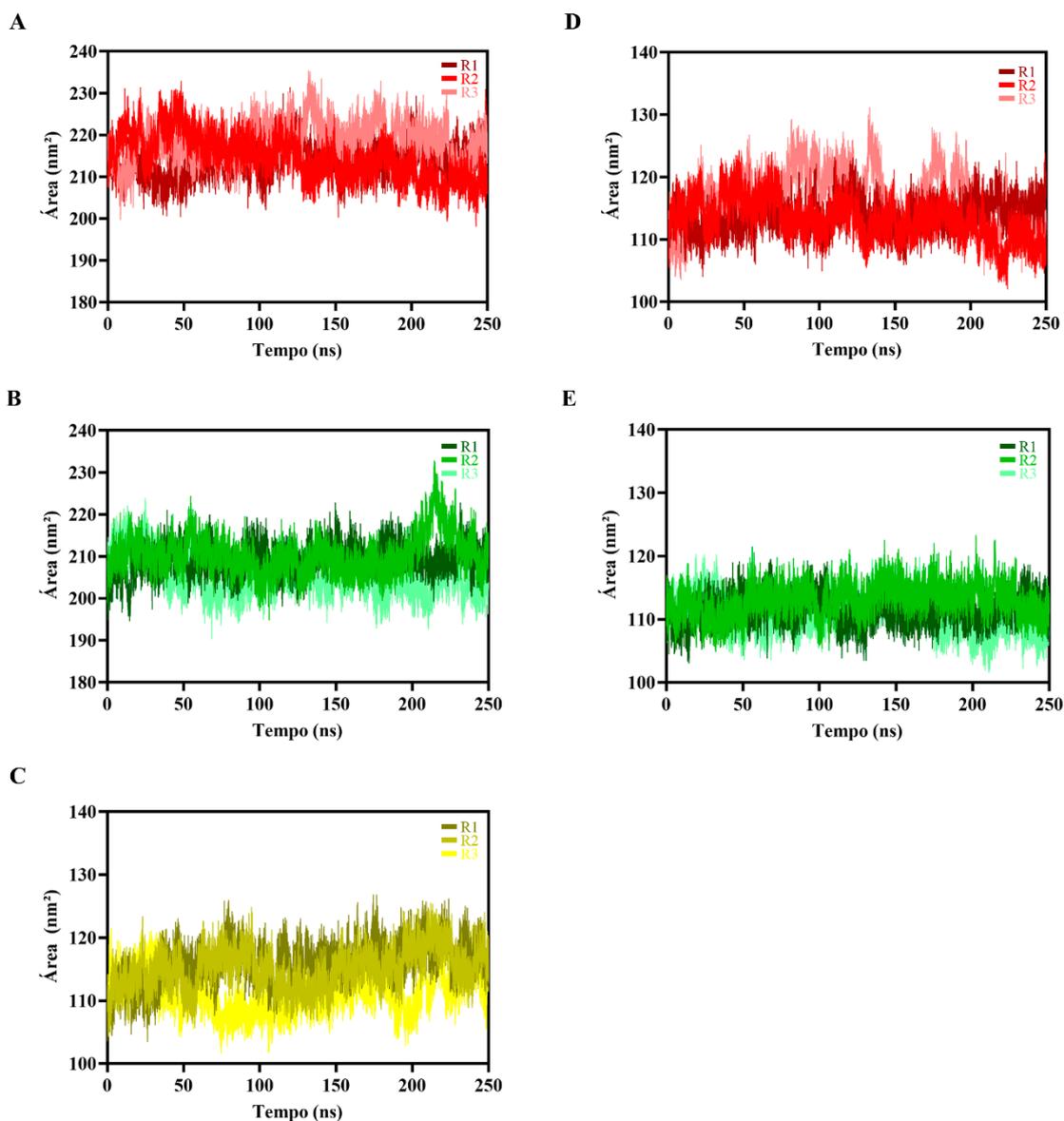
Figura 21 - Variações no RMSD do scFv, do ligante e da interface do complexo P10-DLL1 em função do tempo de simulação



Fonte: elaborado pelo autor. Na imagem, (A) ilustra o RMSD do scFv; (B) o RMSD do DLL1; e (C) o iRMS do complexo P10-DLL1. As linhas coloridas em tons de vermelho são representativas das replicatas 1, 2 e 3, respectivamente.

Os valores de SASA em ambos os complexos variou em torno de 210 nm² ao longo do tempo simulado, demonstrado a boa estabilidade dos mesmos (Figura 22). Também foi feita a comparação da SASA de DLL1 em sua forma não ligada com o mesmo nos sistemas com P10 e P12, o que resultou na constatação que a interação ao scFv pouco alterou a sua área superficial acessível. Porém, vale ressaltar que a tendência de diminuição de SASA previamente constatada na replicata 2 do complexo P10-DLL1 também foi observada na análise isolada de DLL1 nesse sistema, reiterando a hipótese do aumento do iRMS estar associado a um deslocamento para uma conformação que maximiza a interface scFv-antígeno e reduz a acessibilidade ao solvente.

Figura 22 – Área de superfície acessível ao solvente nos complexos scFv-antígeno e no alvo DLL1

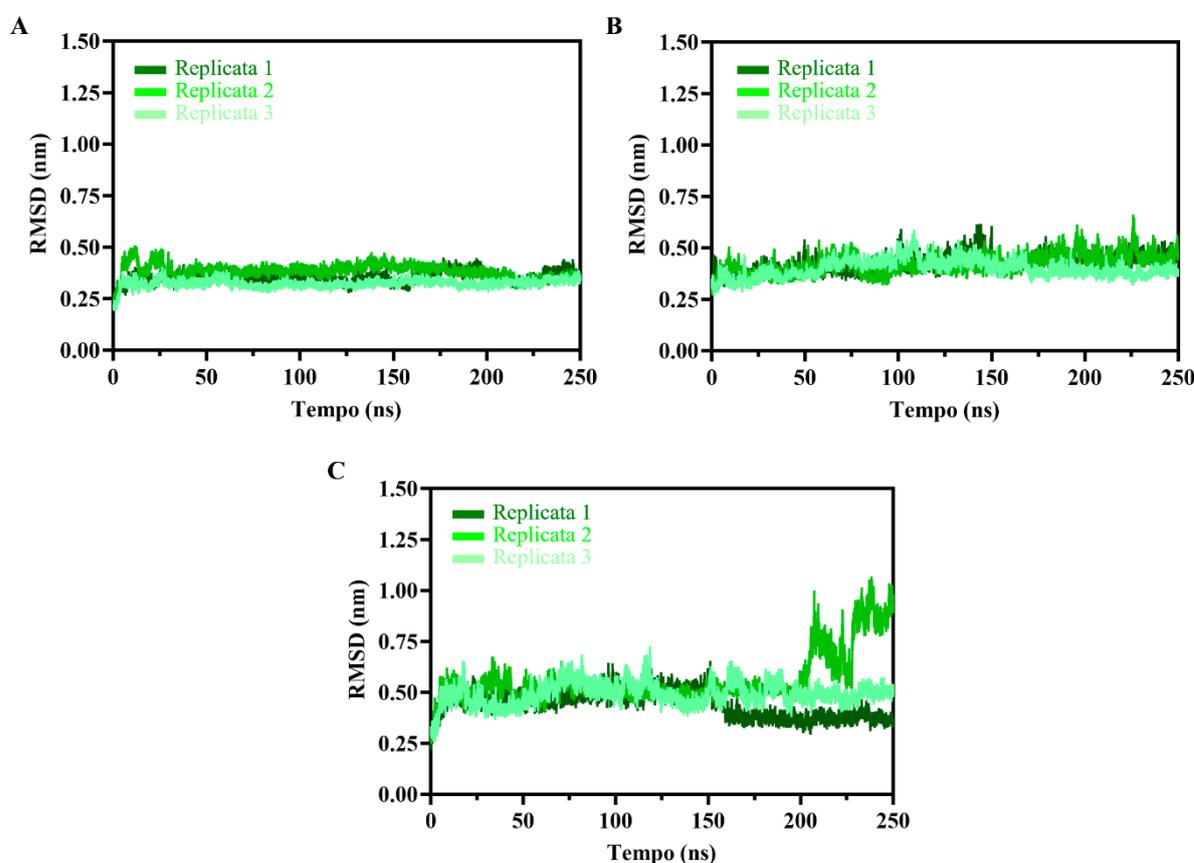


Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos A e B correspondem a variação da área superficial total acessível ao solvente nos sistemas P10-DLL1 (tons de vermelho) e P12-DLL1 (tons de verde), respectivamente. Já os C, D e E ilustram essa variação para o ligante DLL1, onde no primeiro está o ligante livre (tons de amarelo), no segundo está o mesmo em complexo à P10, e, no terceiro, em complexo à P12.

Na Figura 23, é possível visualizar a variação do RMSD dos componentes do complexo P12-DLL1. Para esse sistema, todos os valores de RMSD apresentaram pouca variação ao longo dos 250 ns simulados, a exceção do iRMS na replicata 2, que, apesar de ter se mantido estável por volta de 0,5 nm durante grande parte da DM, teve um súbito aumento nos últimos 50 ns. Essa alta do iRMS foi acompanhada do aumento da SASA nesse

sistema, o que pode ser indicativo da dissociação do complexo. No entanto, tal evento não pôde ser observado na reprodução da trajetória no VMD, tornando necessárias simulações mais extensas que comprovem a tendência a dissociação. Nas demais repetições, o iRMS permaneceu estável em aproximadamente 0,5 nm durante toda a simulação. Ademais, o RMSD do scFv em todas as replicatas manteve-se próximo a média de 0,35 nm. Já o do ligante cercou o valor de 0,5 nm.

Figura 23 - Variações no RMSD do scFv, do ligante e da interface do P12-DLL1 em função do tempo de simulação



Fonte: elaborado pelo autor. Na imagem, (A) ilustra o RMSD do scFv; (B) o RMSD do ligante; e (C) o iRMS do complexo P12-DLL1. As linhas coloridas em tons de verde são representativas das replicatas 1, 2 e 3, respectivamente.

O comportamento observado nas Figura 21 e 23 está de acordo com os achados reportados em outros estudos de dinâmica molecular. É comum verificar um momento inicial em que o RMSD aumenta ao longo do tempo, fato associado ao relaxamento do sistema. Os valores de RMSD passam a ser praticamente estacionários apenas quando é atingido um platô, e então é possível afirmar que o sistema alcançou o equilíbrio (STELLA;

MELCHIONNA, 1998). Esse comportamento é esperado mesmo em sistemas devidamente equilibrados previamente a dinâmica de produção, já que os mesmos estão em movimento e as posições dos átomos estão constantemente mudando, espera-se que RMSD aumente inicialmente (MELCHIONNA; FALCONI; DESIDERI, 1998).

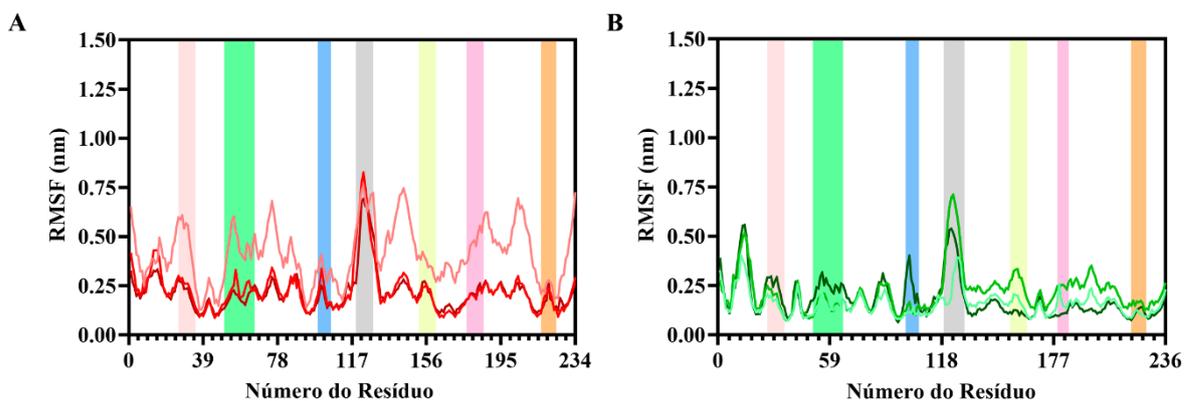
Entretanto, o fato de que existiu um incremento nos valores de iRMS em certas repetições da DM, tanto para complexo que envolve P10 quanto para aquele com P12, nos últimos nanossegundos de simulação leva a conclusão de que o platô de RMSD pode não ter sido atingido, revelando a necessidade da realização de simulações mais extensas. No caso do sistema P12-DLL1, o aumento do tempo simulado poderá permitir observar: se o aumento do iRMS observado foi, de fato, indício da dissociação completa neste complexo; e se o comportamento observado na segunda replicata está relacionado a um evento isolado, ou se há uma tendência à dissociação também nas demais repetições.

Uma das limitações da análise com RMSD é que ela não revela as regiões localmente mais flexíveis das macromoléculas (SARGSYAN; GRAUFFEL; LIM, 2017). Isto significa que a avaliação deste parâmetro não permite distinguir entre uma proteína com algumas regiões muito rígidas e outras muito flexíveis de um polipeptídeo em que todas as regiões são semiflexíveis (MARTÍNEZ, 2015). Para identificar a flutuação individual média de cada resíduo e calcular a flexibilidade local do scFv e do antígeno, foi feita a análise por RMSF.

A Figura 24 mostra a flutuação média dos C α dos resíduos de aminoácidos que compõe P10 e P12, quando complexados à DLL1, dando destaque para as regiões de CDR e para o peptídeo ligante flexível. Os resíduos da replicata 3 referentes ao complexo P10-DLL1 apresentaram uma flutuação superior as outras duas replicatas, que, por sua vez, comportaram-se de forma muito semelhante. No complexo P12-DLL1, todas as repetições apresentaram um perfil de RMSF praticamente idêntico.

De maneira geral, as CDRs das cadeias leves nas duas estruturas foram as regiões de menor variação, podendo indicar que os resíduos presentes nessas regiões estão envolvidos ativamente na interação. Não obstante, os aminoácidos que fazem parte dos peptídeos ligantes foram os que apresentaram maior flutuação média, o que é esperado dado o alto conteúdo de glicinas nessas alças.

Figura 24 - Flutuação dos resíduos dos scFvs P10 e P12 nos complexos com DLL1

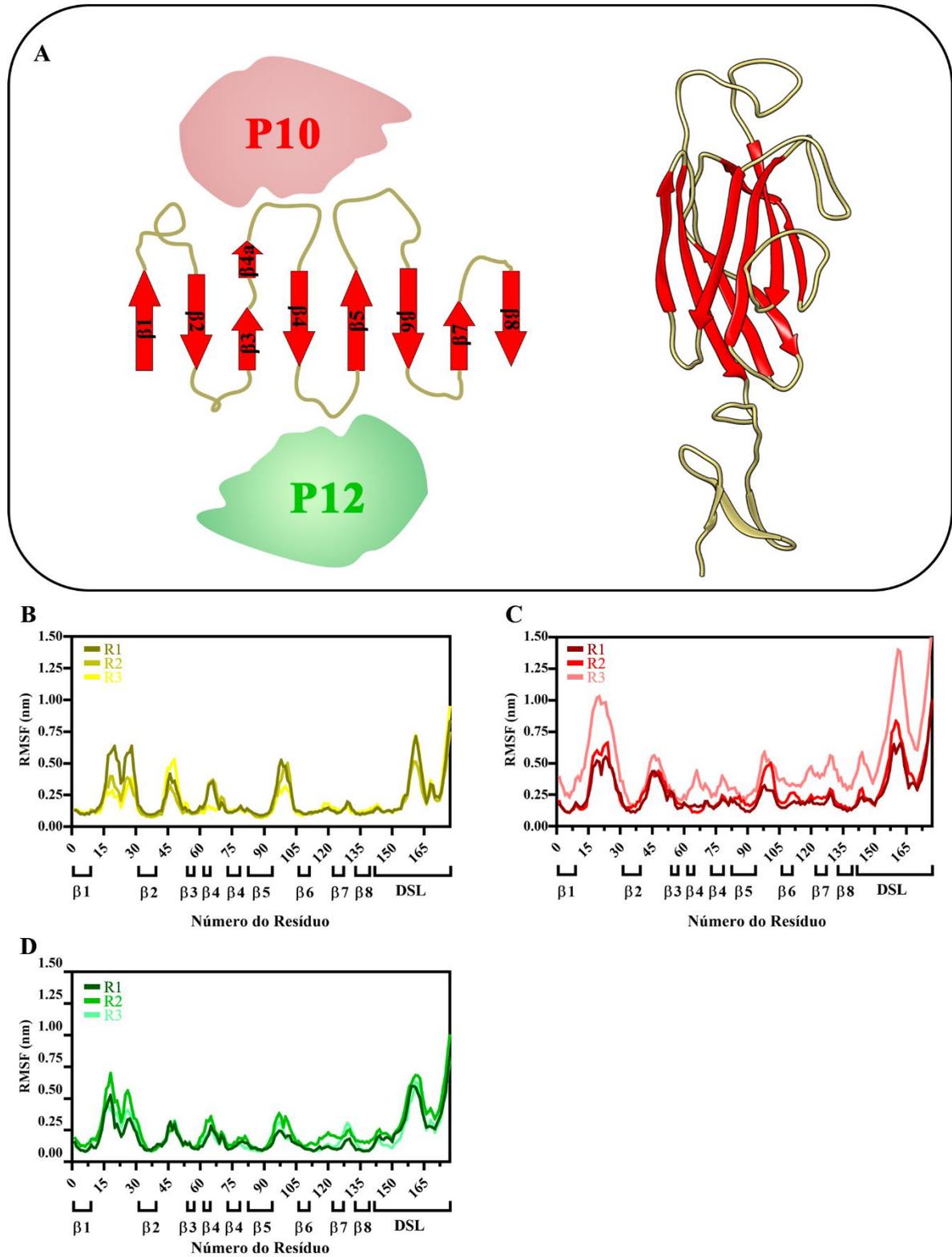


Fonte: elaborado pelo autor. Na imagem, A e B ilustram os RMSFs dos Cα nos resíduos dos scFvs P10 (replicatas em tons de vermelho) e P12 (replicatas em tons de verde) quando complexados à DLL1. As regiões correspondentes aos peptídeos ligantes flexíveis estão marcadas em cinza nos gráficos. Já os CDRs foram coloridos de acordo com o código de cores estabelecido na Figura 13, com CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 em tons de vermelho, verde, azul, amarelo, rosa, e laranja, respectivamente.

Na Figura 25, foram indicadas as flutuações dos resíduos do DLL1 (A) em sua forma não ligada (B), em complexo com o scFv com peptídeo ligante de 10 resíduos de aminoácidos (C) e em complexo com o scFv com 12 resíduos no conector (D). Assim como a flutuação do scFv na replicata 3 do complexo P10-DLL1 foi superior à das demais replicatas, o mesmo foi observado para flutuação dos resíduos do antígeno. O DLL1 presente em complexo à P10 apresentou redução no RMSF na alça $\beta 3$ - $\beta 4$; já quando complexado à P12, tal diminuição ocorreu principalmente nas alças $\beta 2$ - $\beta 3$ e $\beta 5$ - $\beta 6$. Tais regiões estão envolvidas nas interações.

Os resultados encontrados indicaram uma baixa flutuação média geral nos resíduos presentes dentro das regiões determinantes de complementariedade. A exceção de uma das replicatas do complexo P10-DLL1, todas as repetições apresentaram resultados muito semelhantes. Os valores mais altos de RMSF encontrados na replicata 3 de P10-DLL1 podem indicar uma flutuação na estrutura inteira ou podem refletir apenas grandes deslocamentos de um pequeno subconjunto estrutural dentro de uma estrutura geral mais rígida (MARTÍNEZ, 2015). Já no ligante, as regiões de maior flexibilidade em todos os casos foram o domínio DSL e a alça que conecta as fitas entre as duas folhas $\beta 1$ e $\beta 2$ que compõe o domínio C2.

Figura 25 - Flutuação dos resíduos do DLL1 livre e em complexo com P10 e P12



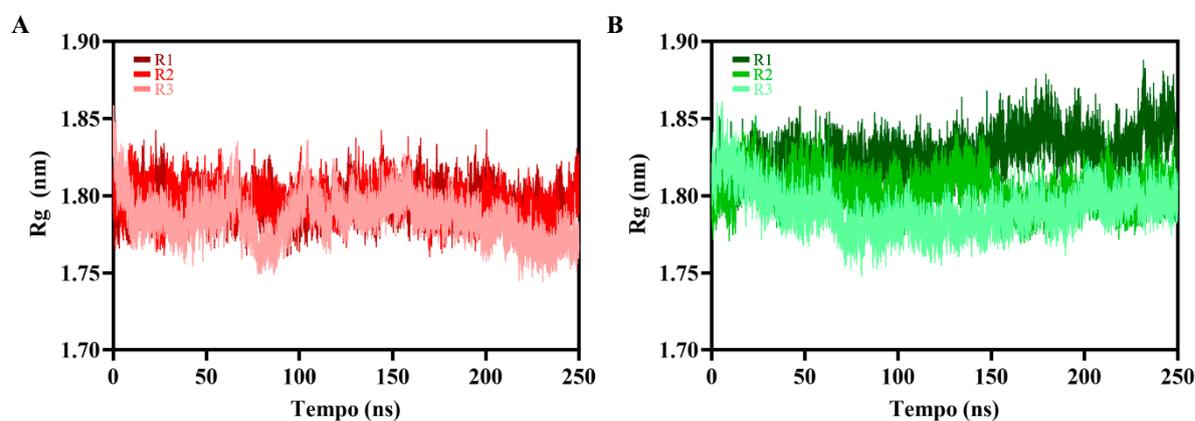
Fonte: elaborado pelo autor. Na imagem, A ilustra o arranjo de duas folhas- β de quatro fitas que formam o domínio C2; a direita, as fitas correspondentes estão marcadas em vermelho na estrutura 3D. B, C e D representam os valores de RMSF referente aos C α dos resíduos de DLL1 em sua forma livre (replicas em tons de amarelo) e nos complexos com P10 (tons de vermelho) e P12 (tons de verde), respectivamente.

O enovelamento adequado de macromoléculas biológicas está entre os principais problemas encontrados pela biologia molecular e biofísica. A correlação entre a taxa de enovelamento e os parâmetros que refletem a compactação de uma estrutura proteica pode ser encontrada em diversas classes de proteínas, e revelam o papel do raio de giro como uma medida da compactação de tais macromoléculas (LOBANOV; BOGATYREVA; GALZITSKAYA, 2008). Desta forma, o R_g está relacionado à forma global da molécula de proteína e reflete a propagação espacial da massa proteica (LIKIC et al., 2005).

A análise do R_g dos scFvs nos dois complexos revelou que tais estruturas não progridem para uma estrutura mais compacta nem, tampouco, tendem a desnaturação ao longo da simulação, mas mantêm valores estáveis próximos a 1,80 nm durante os 250 ns de DM (Figura 26). Tal fato é reiterado pela análise do R_g nos eixos x, y e z, onde quaisquer alterações em um dos eixos é imediatamente compensada por modificações nos demais de forma a manter uma média estável (Apêndice F).

Um tipo de interação intramolecular crucial em proteínas globulares é a interação hidrofóbica. Tais interações, estabelecidas entre os aminoácidos não polares, garantem a estabilidade das proteínas globulares em solução, protegendo os resíduos não polares em núcleos hidrofóbicos, longe do ambiente aquoso (PACE et al., 1996). O processo de desnaturação resulta no desenovelamento da proteína que, inevitavelmente, expõe seu núcleo hidrofóbico ao solvente, resultando no incremento da área superficial acessível ao solvente (ZHANG; LAZIM, 2017). Os valores de R_g e SASA (Figura 22) confirmam a manutenção das estruturas nativas.

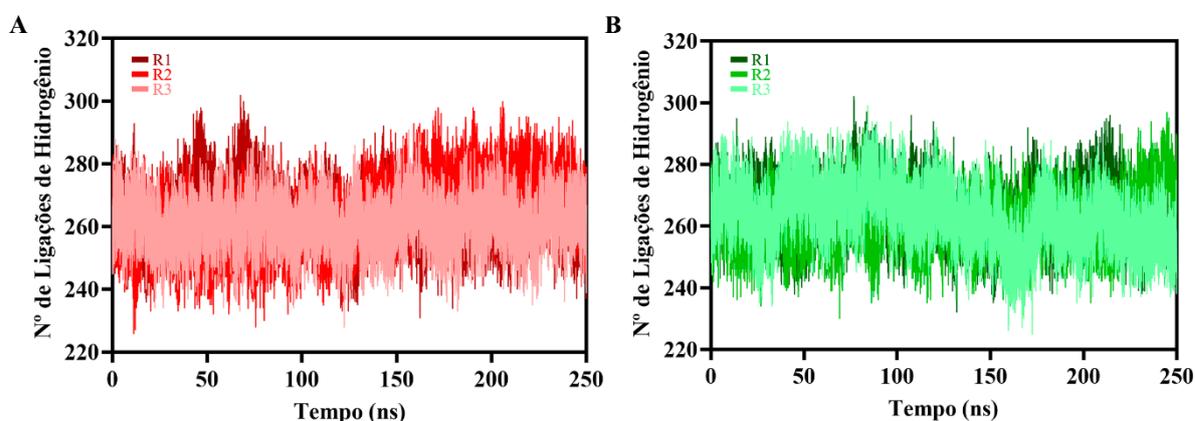
Figura 26 - Variação do raio de giro total nos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1



Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos A e B são representativos do raio de giro total nos complexos P10-DLL1 (tons de vermelho) e P12-DLL1 (tons de verde), respectivamente. Os valores de R_g em ambos os complexos se mantiveram estáveis e próximos a 1,80 nm ao longo do tempo simulado.

As ligações de hidrogênio têm um papel proeminente na formação da estrutura secundária e na estabilização da estrutura terciária devido às interações entre partes da proteína que estão distantes em sequência. Assim, elas estabilizam estruturalmente grandes partes das proteínas (GOHLKE; KUHN; CASE, 2004). Além disso, tais interações representam um ponto-chave no reconhecimento e especificidade molecular para formação de complexos proteicos (KURODA; GRAY, 2016).

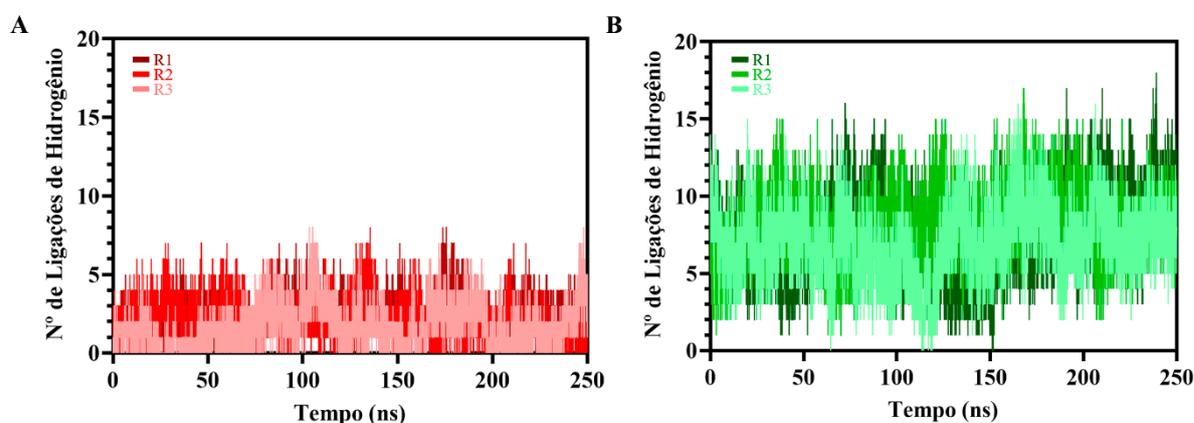
Figura 27 - Variação do número total de ligações de hidrogênio totais em função do tempo nos complexos de P10 e P12 com DLL1



Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos ilustram a variação do número total de ligações de hidrogênio ao longo da simulação. Enquanto em A encontram-se os valores obtidos para o complexo P10-DLL1, em B estão os obtidos para o complexo P12-DLL1.

Em ambos os complexos, há uma tendência geral a estabilização do número total de ligações de hidrogênio, onde ligações quebradas e formadas somam um valor médio próximo a 260 durante os 250 ns de simulação (Figura 27). Não obstante, o número médio de ligações de hidrogênio presentes na interface de interação do complexo contendo P12 é superior a tal valor para o complexo P10-DLL1: enquanto neste a média é de 3 ligações de hidrogênio, naquele a média é de 8 ligações (Figura 28). Essa diferença era previamente esperada diante da maior complementariedade eletrostática observada na interface entre P12 e DLL1. Tais interações encontradas nas interfaces de ambos os complexos são fonte de energia livre favorecendo o estabelecimento da ligação (XU; TSAI; NUSSINOV, 1997).

Figura 28 - Variação da quantidade de ligações de hidrogênio na interface dos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1 em função do tempo



Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos ilustram a variação do número de ligações de hidrogênio envolvendo apenas os resíduos da interface da interação ao longo da simulação. Em A encontram-se os valores obtidos para o complexo P10-DLL1 e em B estão os obtidos para o complexo P12-DLL1.

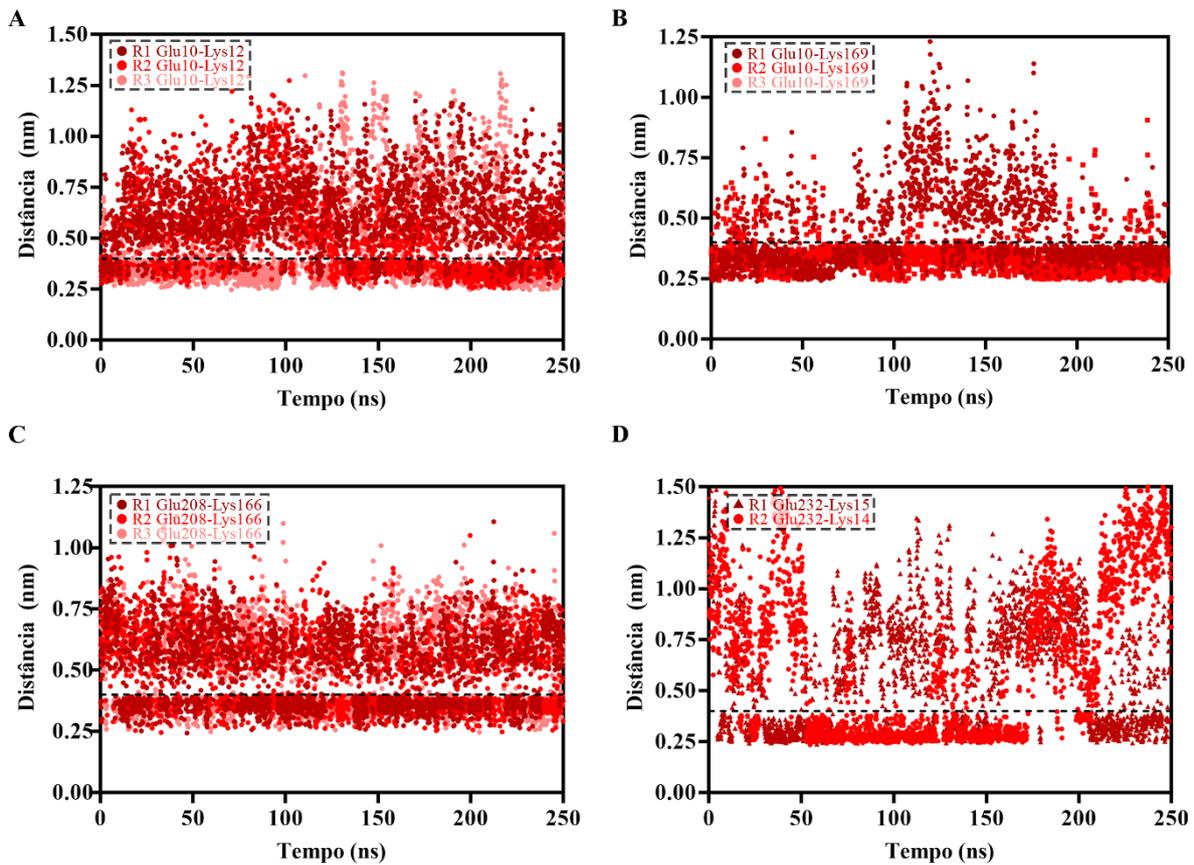
Enquanto as ligações de hidrogênio parecem ser fundamentais para a manutenção da interação no complexo P12-DLL1, as pontes salinas aparecem com prevalência no complexo P10-DLL1 (Figura 29). As pontes salinas são avaliadas pela distância entre átomos doadores (N^ζ da lisina; N^ζ , $N^{\eta 1}$ e $N^{\eta 2}$ da arginina; $N^{\delta 1}$ e $N^{\epsilon 2}$ da histidina; e o N-amida presente na extremidade aminoterminal) e aceptores ($O^{\epsilon 1}$ e $O^{\epsilon 2}$ do ácido glutâmico; $O^{\delta 1}$ e $O^{\delta 2}$ do ácido aspártico; e os dois átomos oxigênio do grupo carboxil presente na extremidade carboxiterminal), que deve ser menor ou igual a 0,4 nm (BARLOW; THORNTON, 1983).

Apesar de, a princípio, não ter sido verificada evidência de uma complementaridade de cargas na interface de P10-DLL1, a realização de simulações de dinâmica molecular *all-atom* pode levar a uma redistribuição de cargas que tem profundo efeito sobre as dinâmicas de interação (CHEHELAMIRANI; TANG, 2017). Na interface do sistema P10-DLL1, foram evidenciadas a formação de cinco pontes salinas: duas destas partem do mesmo resíduo de ácido glutâmico do alvo (Glu10), mas interagem com resíduos de lisina diferentes no scFv (Lys12 e Lys169); outras duas lisinas, desta vez do DLL1 (Lys14 e Lys15), interagem com Glu232 do scFv.

A interação entre Glu10 do DLL1 e Lys12 do scFv aparenta ter caráter transiente na replicata 1, mas se mantém de forma satisfatória a partir dos 100 ns de simulação na replicata 2 e durante toda a replicata 3. Já aquela formada entre Glu10 e Lys169, apesar de ser recorrente apenas em duas das repetições, se mantém de forma consideravelmente

estável nas mesmas. A ponte salina formada entre Glu232 do fragmento de anticorpo e Lys14 do ligante permanece estável entre os 50 ns e 175 ns de simulação, mas é rompida ao fim da mesma. Quatro das cinco pontes salinas identificadas envolvem resíduos presentes na cadeia leve do scFv, fato que pode ser correlacionado a menor flutuação dessa região identificada pela análise de RMSF.

Figura 29 - Distância entre os átomos doadores e aceptores dos resíduos formadores de pontes salinas na interface do complexo P10-DLL1

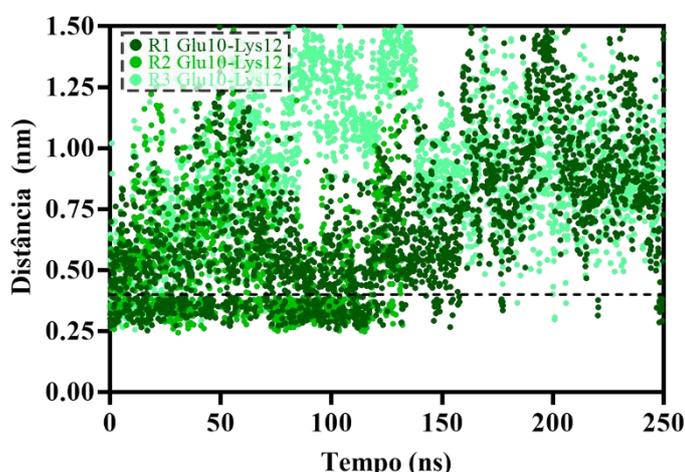


Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos mostram a distância entre os átomos doadores e aceptores dos resíduos que formam pontes salinas na interface de interação do complexo P10-DLL1. Em A, encontra-se o par de resíduos Glu10, do DLL1, e Lys12, do scFv; em B, o mesmo ácido glutâmico do ligante interage com a Lys169 do scFv; em C, Glu208 do fragmento de anticorpo é pareado a Lys166 do DLL1; e em D, Glu232 do scFv interage em uma das repetições com Lys14, e em outra com Lys15. Os diferentes tons de vermelho ilustram as diferentes replicas de simulação, e em D, símbolos diferentes foram designados para cada interação estabelecida a partir de Glu232.

Um estudo estatístico sobre a presença de ligações hidrogênio e pontes salinas em 319 interfaces de interação proteína-proteína de complexos determinados experimentalmente depositados no PDB demonstrou que o número médio de pontes salinas

por interface é igual a dois (XU; TSAI; NUSSINOV, 1997). As pontes salinas encontradas na interface do complexo P10-DLL1, portanto, superam tal média, e podem ser consideradas preponderantes a manutenção da especificidade e estabilidade na mesma. No complexo P12-DLL1, em contrapartida, apenas uma ponte salina transitente foi encontrada na interface. A interação, formada a partir do par de resíduos Glu10 do ligante e Lys12 do scFv, consegue se manter de maneira oscilante apenas durante os primeiros 125 ns de simulação. Tal informação foi retirada da Figura 30.

Figura 30 - Distância entre os átomos doadores e aceptores dos resíduos formadores de pontes salinas na interface do complexo P12-DLL1



Fonte: elaborado pelo autor. O gráfico mostra a distância entre os átomos doadores e aceptores dos resíduos que formam a ponte salina entre os resíduos Glu10 e Lys12 na interface de interação do complexo P12-DLL1. Os diferentes tons de verde ilustram as diferentes replicas de simulação.

A energia total calculada para os dois complexos comprovou a validade física das simulações, uma vez que tais valores não demonstraram grandes variações ao longo do tempo (Apêndice G). Não obstante, os valores substancialmente mais negativos de energia para o complexo P10-DLL1 em detrimento ao complexo P12-DLL1 forneceram os primeiros indícios da maior estabilidade do mesmo. No intuito de elucidar de forma mais assertiva o modo de ligação mais favorável ao scFv no seu ligante, foram calculadas as energias livres de ligação em todas as replicatas dos dois complexos fazendo uso do método MM/PBSA.

MM/PBSA é considerado o método mais popular para estimativa de energia livre de ligação (ΔG_{bind}) e tem sido usado com sucesso para avaliar as interações proteína-proteína (KOLLMAN et al., 2000; ROY et al., 2019). Como o programa GMXPBSA não considera o termo entropia nos cálculos de energia livre de ligação, os resultados obtidos são

adequados apenas para comparar ligantes semelhantes, como os aqui estudados (ESLAMI et al., 2015). Não obstante, exemplos na literatura mostraram que a inclusão do termo entrópico nos cálculos de MM/PBSA não melhorou a precisão da predição da energia livre de ligação e, portanto, poderia ser negligenciado com segurança (HOU et al., 2011).

Vale ressaltar que o modo de ligação com o menor ΔG_{bind} é aquele considerado mais favorável energeticamente (WANG et al., 2001), e no qual a utilização do fragmento de anticorpo resultará em efeitos inibitórios mais significativos (ESLAMI et al., 2015). Os valores para os termos de energia calculados pelo GMXPBSA para as três replicatas do complexo contendo P10 podem ser encontrados nos Apêndices H, I e J; já os resultados para o sistema com o scFv P12 estão contidos nos Apêndices K, L e M. Um sumário dos mesmos pode ser visualizado na Tabela 14.

Tabela 14 – Energia livre de ligação nos complexos entre os scFvs e DLL1, obtidos pela análise por MM/PBSA

Complexo/Replicata	Contribuições Polares			Contribuições não-polares			ΔG_{bind}
	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG não polar	ΔG solv, não polar	ΔG vdW	
P10-DLL1/1	-21,94	113,66	-135,59	-75,49	-8,35	-67,11	-97,42
P10-DLL1/2	-23,69	170,51	-194,20	-70,24	-8,78	-61,47	-93,93
P10-DLL1/3	2,77	77,21	-74,44	-71,19	-7,92	-63,24	-68,42
P12-DLL1/1	130,55	357,55	-226,99	-99,81	-11,60	-88,2	30,73
P12-DLL1/2	127,16	329,24	-202,08	-103,75	-11,15	-92,60	23,40
P12-DLL1/3	113,33	291,03	-177,70	-95,68	-10,70	-85,00	17,65

Fonte: elaborado pelo autor. Todos os valores de energia livre estão dados em kcal/mol. Quanto mais negativo for o ΔG , maior a contribuição do componente ao estabelecimento do complexo.

Os valores encontrados para a ΔG_{bind} no complexo P10-DLL1 são consideravelmente melhores que no P12-DLL1, mesmo considerando a margem de erro fornecida pelo programa. Os valores positivos para a energia livre de ligação no sistema P12-DLL1 (30,73 kcal/mol; 23 kcal/mol; 17,65 kcal/mol) demonstram que o estabelecimento da interação entre o scFv com peptídeo ligante de 12 resíduos e o antígeno no modo de ligação

obtido pelo HADDOCK é energeticamente desfavorável e, portanto, improvável de ocorrer naturalmente. Adicionalmente, as contribuições mais prejudiciais à interação são fornecidas pelos termos polares do MM/PBSA (ΔG polar e ΔG de solvatação polar).

Já em P10-DLL1, a energia livre de ligação nas três replicatas é de, respectivamente, -97,42 kcal/mol, -93,93 kcal/mol e -68,42 kcal/mol. A análise dos resultados mostrou que os termos coulômbicos, de van der Waals e não polares foram os mais favoráveis à formação do complexo, enquanto o termo de solvatação polar foi o mais prejudicial.

A partir do uso do MM/PBSA, foi possível elucidar a natureza precisa das forças motrizes que levam a interação entre scFv-antígeno. Tendo em vista os valores de energia de ligação obtidos juntamente ao incremento do iRMS e da área acessível ao solvente na replicata 2 do sistema P12-DLL1, evidencia-se uma forte tendência ao rompimento desse complexo. Em contraste, os valores negativos de ΔG_{bind} do complexo P10-DLL1 comprovam a coesão da interface entre essas proteínas estabelecida através do iRMS e SASA. Portanto, a combinação do *docking* molecular à DM seguida da análise por MM/PBSA - considerada uma abordagem de interesse na modelagem de complexos proteicos (WANG et al., 2001) - permitiu identificar o modo de ligação assumido pelo complexo P10-DLL1 como aquele no qual a interação entre as duas proteínas é mais energeticamente favorável.

4.5 Mutagênese computacional

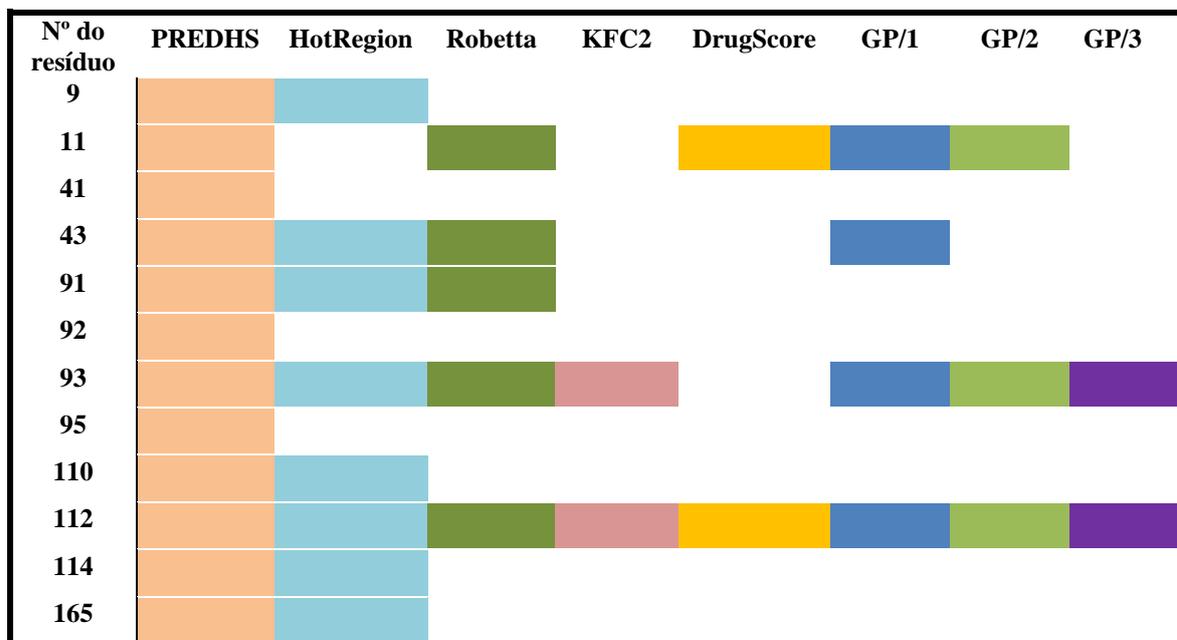
A formação do complexo P12-DLL1 não é energeticamente favorável e, por conseguinte, é improvável de acontecer naturalmente em sistemas biológicos. Mesmo assim, prosseguiu-se com a análise computacional para mutagênese em ambos os complexos, a fim de obter estruturas otimizadas que potencialmente obtivessem melhores resultados na análise por MM/PBSA.

A procura pelos *hot-spots* da interação é uma etapa indispensável na busca da otimização dos modelos proteicos analisados. Em três dos métodos utilizados, mutações únicas por alanina foram realizadas para avaliar qualitativamente a contribuição de resíduos da interface para interação (PAISSONI et al., 2014); dentre estes, o software GMXPBSA apresenta o método mais robusto, por fazer os cálculos de ASM em todos os 100 quadros obtidos de cada trajetória. As substituições por alanina que produziram valores de diferença de energia livre de ligação ($\Delta\Delta G_{\text{bind}}$) positivos na análise pelo GMXPBSA têm todos os seus

termos de energia descritos nos Apêndices H, I e J para o complexo P10-DLL1; e nos Apêndices K, L e M para o sistema P12-DLL1.

Os resultados para os demais programas podem ser visualizados nos Apêndices N e O. Um sumário das análises com o GMXPBSA nas três replicatas do complexo P10-DLL1 em conjunto com os produtos obtidos através dos cinco servidores usados está ilustrado na Figura 31. Em P10, todos os *hot-spots* foram identificados dentro das regiões de *framework*, e todos, à exceção do resíduo 165, estão localizados na cadeia pesada. O resíduo de número 112 - uma leucina adjacente a CDR3 da cadeia pesada - foi o único identificado como *hot-spot* por todos os métodos. Os aminoácidos leucina, glutamina e treonina foram os que apareceram com mais frequência como resíduos de alta importância.

Figura 31 - *Hot-spots* da interação scFv-antígeno no complexo P10-DLL1



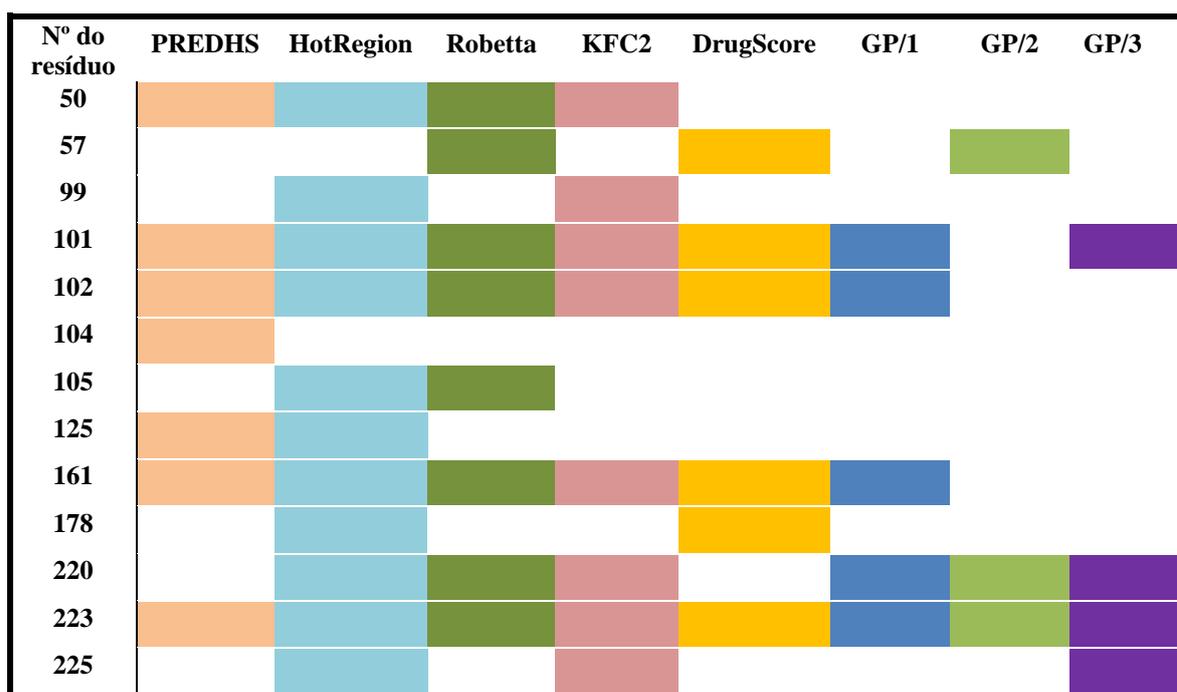
Fonte: elaborado pelo autor. GP/1 – GMXPBSA replicata 1; GP/2 - GMXPBSA replicata 2; GP/3 - GMXPBSA replicata 3. Múltiplas metodologias para identificação de *hot-spots* foram utilizadas a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados; o empilhamento dos retângulos coloridos - cada um representando um método diferente empregado - permite identificar em quais resíduos houve maior consenso entre os programas, tais aminoácidos sendo aqueles considerados os mais importantes ao estabelecimento do complexo. No complexo P10-DLL1, dois dos mais importantes *hot-spots* foram os resíduos 93 e 112.

Vale ressaltar que os *hot-spots* identificados neste complexo não estão contidos dentro das CDRs, regiões onde as principais interações com o epítipo antigênico devem ser estabelecidas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Não obstante, grande parte dos aminoácidos identificados está na interface da interação. Além disso, existem relatos de

que alguns aminoácidos presentes em regiões de *framework* podem participar ativamente da interação e contribuir para especificidade de ligação (JEFFREY et al., 1993). Análises mais completas de mutação dentro das CDRs podem levar a um melhor entendimento do papel desses resíduos para o estabelecimento do complexo.

No sistema P12-DLL1, onze dos treze resíduos identificados como *hot-spots* na Figura 32 estão contidos dentro das regiões determinantes de complementariedade. Além disso, cinco desses aminoácidos estão na CDR3 da cadeia pesada, o que está concordância com o fato dessa região altamente diversa ser a principal determinante da especificidade no reconhecimento dos antígenos (XU; DAVIES, 2000). A fenilalanina localizada na posição 223 - contida na CDR3 da cadeia leve - foi o único resíduo a ser identificado como *hot-spot* em todos os métodos.

Figura 32 - *Hot-spots* da interação scFv-antígeno no complexo P12-DLL1



Fonte: elaborado pelo autor. GP/1 – GMXPBSA replicata 1; GP/2 - GMXPBSA replicata 2; GP/3 - GMXPBSA replicata 3. Cada retângulo é representativo da identificação, através das metodologias indicadas, dos resíduos como *hot-spots*; o reconhecimento de um mesmo resíduo por mais de um programa contribui para maior confiabilidade dos resultados. No complexo P12-DLL1, os *hot-spots* mais recorrentes foram os resíduos 101, 102, 161, 220 e 223.

Dentro dos resíduos encontrados em posições de alta importância em P12, o aminoácido que aparece com mais frequência é a tirosina, representando 23% do total de *hot-spots*. A notória diferença na frequência em que os aminoácidos aparecem como *hot-spots* e

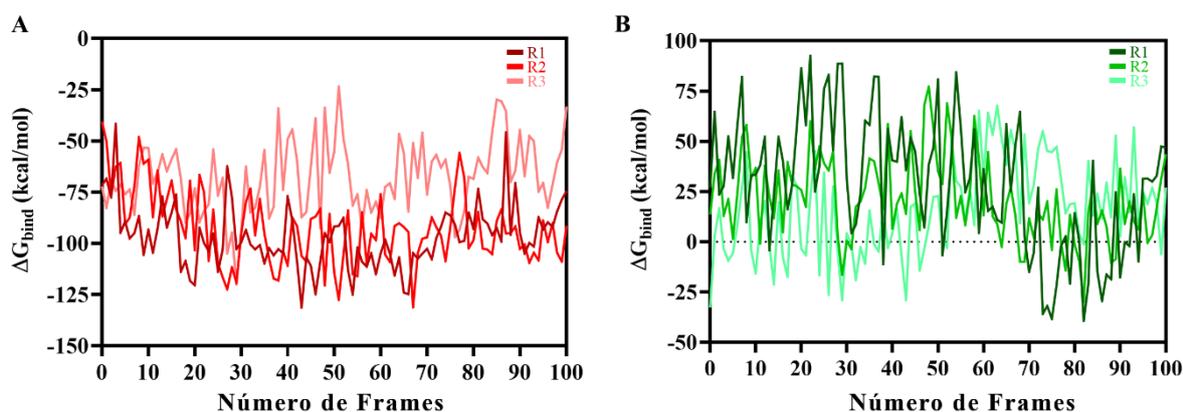
a grande relevância da participação de resíduos de natureza hidrofóbica para o estabelecimento de complexos proteína-proteína já havia sido relatada por Bogan e Thorn (1998). Nesse contexto, a relevância da tirosina é dada pela sua capacidade de estabelecer tanto interações π -aromáticas quanto ligações hidrogênio em seu grupo 4-hidroxil (BOGAN; THORN, 1998).

De posse das informações de quais resíduos são essenciais para o estabelecimento dos complexos, e em cuja realização de mutações poderiam acarretar a manifestação de efeitos deletérios, seguiu-se com a análise para realização da mutagênese computacional. Para obtenção de resultados mais acurados, foi feito o uso combinado de dois métodos baseados em diferentes paradigmas e que exploram diferentes características estruturais da proteína (CHEN; LIN; CHU, 2013). Enquanto o BeAtMuSiC é baseado em um conjunto de potenciais estatísticos adaptados a representação *coarse-grained* de proteínas que permitem uma avaliação rápida de todas as mutações possíveis no complexo, o mCSM-Ab é um servidor baseado em aprendizado de máquina voltado para avaliação de complexos envolvendo anticorpos que faz uso de assinaturas estruturais que modelam as propriedades geométricas e físico-químicas da interação (DEHOUCK et al., 2013; PIRES; ASCHER, 2016).

Além de fazer uso da estrutura inicialmente docada, também foram selecionados os cinco quadros com a menor energia de ligação em cada replicata para análise das mutações a fim elucidar os efeitos das alterações nas conformações mais favoráveis geradas pelas DM. Tal seleção foi possível através da análise dos resultados obtidos com MM/PBSA. Assim, para uma mutação ser considerada benéfica, a mesma deve ser considerada favorável por ambos os programas em todas as dezesseis estruturas submetidas aos servidores para cada complexo (a estrutura inicial e as cinco de menor energia de cada replicata obtidas a partir da DM).

Na Figura 33, é possível identificar os valores de ΔG_{bind} ao longo dos 100 quadros calculados pelo GMXPBSA nos dois sistemas. Na replicata 1 do complexo P10-DLL1, os quadros selecionados foram o 20, 40, 46, 54 e 66; na replicata 2, foram escolhidos os quadros 27, 29, 48, 51 e 67; e na replicata 3, foram destacados os quadros de menor energia 27, 28, 29, 30 e 76. Já no complexo P12-DLL1, os quadros escolhidos para as repetições 1, 2 e 3 foram, respectivamente: 73, 74, 75, 82 e 86; 29, 69, 78, 82 e 88; 0, 14, 26, 29 e 43.

Figura 33 - Energia livre de ligação ao longo da simulação nos complexos P10-DLL1 e P12-DLL1



Fonte: elaborada pelo autor. Os gráficos mostram os valores de energia livre de ligação (ΔG_{bind}) em função do número de quadros extraídos das trajetórias das simulações pelo GMXPBSA. Em A estão os números referentes ao complexo P10-DLL1, e em B aqueles que são representativos do complexo P12-DLL1.

Para o complexo contendo o scFv P12, excluindo quaisquer alterações sugeridas para os resíduos previamente identificados como *hot-spots* por pelo menos três dos métodos utilizados, não foram encontradas modificações que atendessem os requisitos supracitados. Já no sistema P10-DLL1, duas possíveis alterações benéficas foram identificadas. A mutação da treonina na posição 91 para triptofano obteve valor de alteração de afinidade prevista pelo mCSM-AB ($\Delta\Delta G$) igual a 0,31 kcal/mol e a mudança no $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ predita pelo BeAtMuSiC igual a -0,52 kcal/mol, ambos indicando um aumento da afinidade associado a mutação.

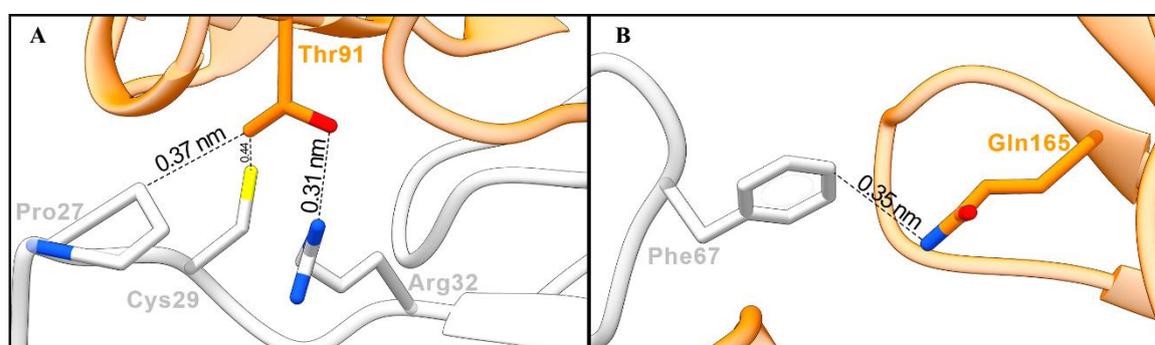
Tabela 15 – Mutações benéficas em P10, preditas pelos servidores mCSM-Ab e BeAtMuSiC

Resíduo	Mutação	$\Delta\Delta G$ (mCSM-Ab)	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (BeAtMuSiC)
Thr91	W	0,31 kcal/mol	-0,52kcal/mol
	W	0,538 kcal/mol	-0,31 kcal/mol
Gln165	Y	0,351 kcal/mol	-0,38 kcal/mol
	F	0,281 kcal/mol	-0,55 kcal/mol

Fonte: elaborado pelo autor. Enquanto valores positivos de $\Delta\Delta G$ são representativos de um ganho na afinidade para o servidor mCSM-Ab, valores negativos de $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ no BeAtMuSiC são indicativos da melhora na afinidade a partir da mutação. A avaliação do impacto de cada mutação em um total de dezesseis estruturas permitiu a identificação de alterações benéficas na treonina localizada na posição 91 de P10, e na glutamina de número 165.

Já para a glutamina na posição 165, foram identificadas três alterações favoráveis: as substituições pelo triptofano, tirosina e fenilalanina resultaram em valores de $\Delta\Delta G$ e $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ iguais a, respectivamente, 0,538 kcal/mol e -0,31 kcal/mol; 0,351 kcal/mol e -0,38 kcal/mol; 0,281 kcal/mol e -0,55 kcal/mol. Em todos os quadros utilizados, as análises de tais mutações por ambos os servidores resultaram em aumento da afinidade. Tais resultados estão sumarizados na Tabela 15. A Figura 34 mostra os resíduos do antígeno mais próximos aos dois aminoácidos citados.

Figura 34 - Resíduos do antígeno próximos à Thr91 e à Gln165 do scFv no complexo P10-DLL1



Fonte: elaborada pelo autor. Os resíduos do scFv estão coloridos em laranja e os do antígeno, em cinza claro. Em azul estão destacados os átomos de nitrogênio; em vermelho, os de oxigênio; e em amarelo, os de enxofre. Em A pode ser visualizada a treonina na posição 91, que está a 0,31 nm de uma arginina, a 0,44 nm de uma cisteína e a 0,37 nm de uma prolina do DLL1; já em B, a glutamina na posição 165 do fragmento de anticorpo encontra-se em destaque, que por sua vez está a 0,35 nm de uma fenilalanina do DLL1.

A treonina é considerada um aminoácido levemente polar, embora seja bastante neutro em relação a mutações (BETTS; RUSSELL, 2003). A treonina na posição 91 do scFv encontra-se a menos de 0,5 nm de uma prolina, uma arginina e uma cisteína do DLL1. Resíduos prolina e aromáticos podem interagir favoravelmente entre si, devido ao efeito hidrofóbico e à interação entre a porção aromática e as ligações C-H polarizadas - resultantes do deslocamento de elétrons dos átomos de hidrogênio adjacentes ao nitrogênio carbonil e amida - através da interação CH/ π , que pode ocorrer intermolecularmente em interações proteína-proteína (ZONDLO, 2012).

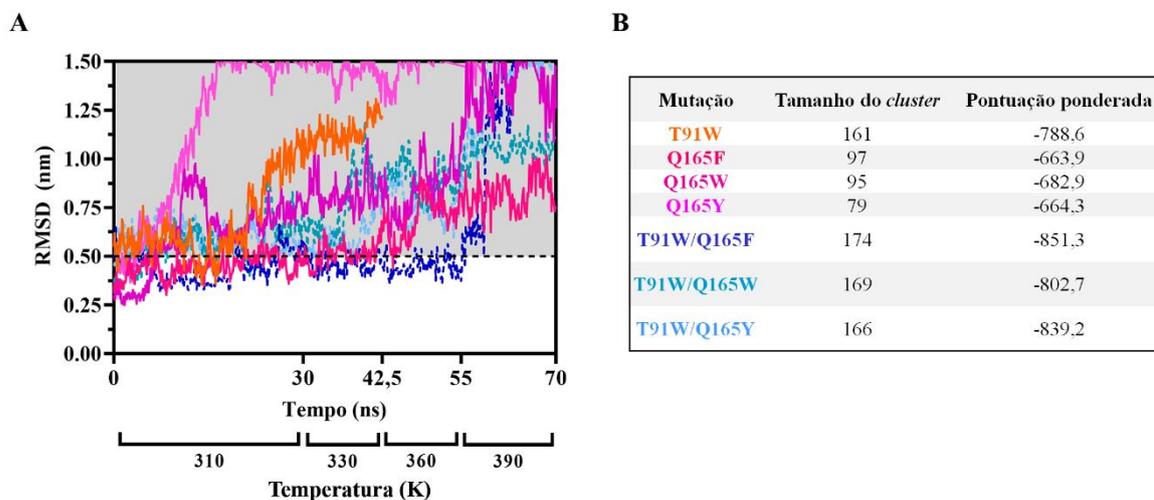
Interações cátion- π são reconhecidas como um tipo importante interação não covalente para a biologia estrutural. Nestas, cátions de aminoácidos positivamente carregados se ligam à face pi de uma estrutura aromática com uma força surpreendentemente forte (DOUGHERTY, 1996). O posicionamento do grupo -NH próximo à anéis aromáticos

é, inclusive, mais favorável do que uma interação análoga envolvendo uma amina neutra (MEOT-NER; DEAKYNE, 1985). Apesar de nem todos os contatos cátion-aromáticos representarem interações cátion- π energeticamente favoráveis, estudos sugerem que o triptofano é o aromático mais provável de estar envolvido em uma interação cátion- π , com 26% dos triptofanos nas estruturas tridimensionais avaliadas envolvidos em interações cátion- π energeticamente significativas; além disso, resíduos de arginina são mais prováveis do que os de lisina de participarem desse tipo de interação (GALLIVAN; DOUGHERTY, 1999).

A substituição da treonina por um triptofano na posição 91 pode levar ao estabelecimento de novas interações com os resíduos de arginina e prolina do DLL1 favoráveis ao estabelecimento do complexo. Já Gln165 encontra-se próximo a uma fenilalanina do antígeno. A glutamina é um aminoácido polar e, por isso, é preferencialmente substituída por outros resíduos polares (BETTS; RUSSELL, 2003). Não obstante, estudos aprofundados sobre as interações anticorpo-antígeno indicam que cadeias laterais aromáticas, principalmente de grupos tirosil, constituem grande parte dos paratopos funcionais (PENG et al., 2014). Interações não-covalentes entre anéis aromáticos (π - π) podem estar envolvidas na estabilização de complexos intermoleculares; por isso, a substituição da glutamina por um dos três aminoácidos aromáticos sugeridos pode levar a formação de novas interações.

Apesar da avaliação preliminar dos parâmetros bioquímicos envolvendo as substituições, e as possíveis novas interações formadas a partir da realização das mutações sítio-específicas, apenas com a avaliação através de simulações de dinâmica molecular é possível elucidar de forma mais concisa os efeitos de cada troca no estabelecimento do complexo entre o fragmento de anticorpo com peptídeo ligante flexível com 10 resíduos e o antígeno DLL1. A partir da reprodução da metodologia de *docking* utilizada na obtenção deste complexo, que fez uso do programa ClusPro, foram recuperados os modos de ligação de menor energia utilizando o modo de pontuação balanceado para cada mutante. A avaliação do iRMS, proveniente da análise da trajetória das simulações de DM com aquecimento para tais estruturas, pode ser feita a partir da Figura 35.

Figura 35 - Estruturas resultantes do *docking* entre DLL1 e os scFvs mutados através do programa ClusPro e variação do iRMS das mesmas durante simulações de DM com aquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. Em B estão listados o tamanho dos *clusters* e a pontuação ponderada referente ao modelo de pontuação balanceado para os modos de ligação obtidos através do *docking* ente DLL1 e os scFvs mutados fazendo uso do programa ClusPro. Já em A estão colocadas as variações do iRMS, dadas em nanômetros, ao longo do tempo (em nanossegundos) das simulações de DM com aquecimento às quais tais complexos foram submetidos. As cores das mutações na tabela são as mesmas utilizadas no gráfico. Enquanto as mutações simples estão representadas em linhas contínuas, mutações duplas estão representadas em linhas tracejadas.

Apesar dos valores referentes a pontuação ponderada do ClusPro terem sido, em sua maioria, melhores do que aqueles encontrados para o scFv nativo (-680,7), observou-se que, em todos os complexos contendo os fragmentos de anticorpos mutados, os valores de iRMS superaram a linha de corte estabelecida em 0,5 nm. O duplo mutante T91W/Q165F apresentou os melhores resultados tanto para a pontuação fornecida pelo ClusPro, quanto para variação do iRMS, onde tal estrutura manteve a termoestabilidade em todas as etapas de aquecimento, à exceção da última, que eleva a temperatura à 390 K.

Não obstante, vale ressaltar que foi simulada apenas uma estrutura para cada mutação proposta. Como discutido no tópico 4.2, as funções de ranqueamento dos programas de *docking* nem sempre são eficientes em classificar as estruturas mais próximas as nativas como aquelas que possuem a melhor pontuação. Portanto, os resultados obtidos não são significativos para afirmar que as mutações propostas não favorecem as interações, mas ressaltam a necessidade da realização de novas simulações aquecidas testando outras

estruturas que utilizem tanto o modelo de pontuação balanceado como outros modelos de pontuação na classificação do ClusPro.

5 CONCLUSÕES

Através deste trabalho, obtiveram-se dados estruturais inéditos que reiteram que o alvo molecular genuíno do anticorpo monoclonal pidilizumabe é a proteína ligante de Notch DLL1, e não o receptor de *checkpoint* PD-1, como havia sido conjecturado anteriormente. A metodologia de *docking* validada utilizada levou a identificação de dois modos de ligação distintos para os scFvs na superfície desse antígeno. Com o uso de simulações de dinâmica molecular seguidas de cálculos de MM/PBSA, foi possível identificar que a posição biologicamente mais plausível para interação entre o fragmento de anticorpo à DLL1 é no domínio C2 desta proteína. Ainda dentro desses dois sistemas, elucidou-se que as contribuições energéticas que mais favorecem a formação dos complexos advêm dos termos coulômbicos, de van der Waals e não polares.

Finalmente, foram identificadas mutações energeticamente favoráveis à interação nos resíduos 91 e 165 do scFv com peptídeo ligante flexível de dez resíduos, que podem levar a otimização das interações com seu alvo molecular. A validação dos complexos contendo as estruturas mutadas juntamente ao DLL1 através de simulações com aquecimento não levou a recuperação de complexos termoestáveis. Não obstante, foi utilizado na simulação apenas o modo de ligação de melhor pontuação ponderada do ClusPro para cada mutante, e, como foi demonstrado na etapa de validação, frequentemente as funções dos programas de *docking* falham em reconhecer a melhor estrutura produzida como aquela de melhor pontuação. Faz-se necessária, assim, a realização de simulações de DM utilizando outros modos de ligação para que seja feita uma avaliação mais ampla dos efeitos das mutações sobre o complexo.

Portanto, através da aplicação de tais mutações, foram obtidas sequências otimizadas para o fragmento de anticorpo produzido a partir do pidilizumabe. A avaliação de tais mutantes através de testes *in silico* e *in vitro*, a exemplo do ensaio de imun absorção enzimática (ELISA, do inglês “*Enzyme-linked immunosorbent assay*”) para avaliação da reatividade ao ligante, ou da microcalorimetria e da ressonância plasmônica de superfície, para averiguação do aumento ou diminuição da afinidade entre as proteínas a partir da realização das mutações, permitirão elucidar se o novo biofármaco proposto é superior ao inicial.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 . ed. [S. l.]: ELSEVIER, 2015.
- AFANASIEVA, T. *et al.* Single-chain antibody and its derivatives directed against vascular endothelial growth factor: application for antiangiogenic gene therapy. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 10, n. 21, p. 1850-1859, 2003.
- AHMAD, Z. A. *et al.* ScFv antibody: principles and clinical application. **Clinical and Developmental Immunology**, [S. l.], v. 2012, p. 1-15, 2012.
- AL-LAZIKANI, B.; LESK, A.; CHOTHIA, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 273, n. 4, p. 927-948, 1997.
- ALTSCHUP, S. F. *et al.* Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ARMAND, P. *et al.* Disabling Immune Tolerance by Programmed Death-1 Blockade With Pidilizumab After Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results of an International Phase II Trial. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 31, n. 33, p. 4199-4206, 2013.
- ARSLAN, M.; KARADAĞ, D.; KALYONCU, S. Protein engineering approaches for antibody fragments: directed evolution and rational design approaches. **Turkish Journal of Biology**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 1-12, 2019.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M. D.; LAKE, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. **Science**, [S. l.], v. 284, n. 5415, p. 770-776, 1999.
- ARUNAN, E. *et al.* Defining the hydrogen bond: An account(IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, [S. l.], v. 83, n. 8, p. 1619-1636, 2011.
- ATKINS, M. B. *et al.* Phase 2, multicenter, safety and efficacy study of pidilizumab in patients with metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 32, n. 15_suppl, p. 9001-9001, 2014.
- BARBER, D. E. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, [S. l.], v. 439, n. 7077, p. 682-687, 2005.
- BARLOW, D. J.; THORNTON, J. M. Ion-pairs in proteins. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 168, n. 4, p. 867-885, 1983.
- BASU, S.; WALLNER, B. DockQ: a quality measure for protein-protein docking models. **PloS one**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1-9, 2016.
- BHATTACHARYA, D. *et al.* 3Drefine: an interactive web server for efficient protein

structure refinement. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W406-W409, 2016.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, [S. l.], v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

BERGER, R. *et al.* Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of CT-011, a Humanized Antibody Interacting with PD-1, in Patients with Advanced Hematologic Malignancies. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 3044-3051, 2008.

BERGLUND, J. *et al.* A molecular dynamics study of the effect of glycosidic linkage type in the hemicellulose backbone on the molecular chain flexibility. **The Plant Journal**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 56-70, 2016.

BETTS, M. J.; RUSSELL, R. B. Amino acid properties and consequences of substitutions. *In*: BETTS, M. J.; RUSSELL, R. B. **Bioinformatics for geneticists**. 289. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2003. v. 317, cap. 14, p. 289-316. ISBN 9780470867303.

BIRD, R. E. *et al.* Single-chain antigen-binding proteins. **Science**, [S. l.], v. 242, n. 4877, p. 423-426, 1988.

BLAUMUELLER, C. M. *et al.* Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. **Cell**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 281-291, 1997.

BOSSHARD, H. R.; MARTI, D. N.; JELESAROV, I. J. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1-16, 2004.

BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, [S. l.], v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.

BRAHMER, J. R. *et al.* Phase I Study of Single-Agent Anti-Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 28, n. 19, p. 3167-3175, 2010.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA (Brasil). Subchefia para Assuntos Jurídicos, Casa Civil. Decreto Nº 7.713, de 3 de abril de 2012. Estabelece a aplicação de margem de preferência nas licitações realizadas no âmbito da Administração Pública Federal para aquisição de fármacos e medicamentos descritos no Anexo I, para fins do disposto no art. 3º da Lei nº 8.666, de 21 de junho de 1993, Brasília, DF: **Diário Oficial da União**, p. 13, 4 abr. 2012.

BRENKE, R. *et al.* Fragment-based identification of druggable 'hot spots' of proteins using Fourier domain correlation techniques. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 621-627, 2009.

BRYAN, L. J.; GORDON, L. I. Pidilizumab in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. **Expert opinion on biological therapy**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 1361-1368, 2014.

BOGAN, A. A.; THORN, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces1. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 280, n. 1, p. 1-9, 1998.

CARVALHO, A. P. F. **Estudos Clínicos e Patentes de Anticorpos Monoclonais para o Tratamento do Câncerum Estudo Exploratório**. 2013. 169 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

CAVANAGH, M.; FINDLAY, E. G. **Schematic of early T cell activation**. 2016. 1 ilustração. Disponível em: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation>. Acesso em: 30 out. 2019.

CHAMBEL, M. Hipersensibilidade a fármacos: Manifestações menos frequentes. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 117-119, 2016.

CHEHELAMIRANI, M.; TANG, T. Effect of charge redistribution on the binding of DNA nucleotide to carbon nanotube in molecular dynamics. **Molecular Simulation**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 610-624, 2017.

CHEN, C. W.; LIN, J.; CHU, Y. W. IStable: off-the-shelf predictor integration for predicting protein stability changes. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 1-14, 2013.

CHEN, D. The FG loop of PD-1 serves as a “Hotspot” for therapeutic monoclonal antibodies in tumor immune checkpoint therapy. **IScience**, [S. l.], v. 14, p. 113-124, 2019.

CHEN, S. Y. *et al.* Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. **Nature**, [S. l.], v. 385, n. 6611, p. 78-80, 1997.

CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.

CHENG, X. *et al.* Structure and Interactions of the Human Programmed Cell Death 1 Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 17, p. 11771-11785, 2013.

CHILDERS, M. C.; DAGGETT, V. Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. **Molecular systems design & engineering**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 9-33, 2017.

CHOTHIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 823-826, 1986.

CLACKSON, T.; WELLS, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. **Science**, [S. l.], v. 267, n. 5196, p. 383-386, 1995.

CORNELL, W. D. *et al.* A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 117, n. 19, p. 5179-5197, 1995.

COUZIN-FRANKEL, J. Supply of promising T cell therapy is strained. **Science**, [S. l.], v.

356, n. 6343, p. 1112-1113, 2017.

CUKUROGLU, E.; GURSOY, A.; KESKIN, O. HotRegion: a database of predicted hot spot clusters. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 40, n. D1, p. D829-D833, 2012.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, [S. l.], v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.

DARNELL, S. J.; PAGE, D.; MITCHELL, J. C. An automated decision-tree approach to predicting protein interaction hot spots. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 813-823, 2007.

DELANO, W. L.; BROMBERG, S. **PyMOL User's Guide**. San Carlos, Califórnia: DeLano Scientific LLC, 2004. 66 p. Disponível em: <http://pymol.sourceforge.net/newman/userman.pdf>. Acesso em: 30 set. 2019.

DEHOUCK, Y. *et al.* BeAtMuSiC: prediction of changes in protein–protein binding affinity on mutations. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 41, n. W1, p. W333-W339, 2013.

DENG, L. *et al.* PredHS: a web server for predicting protein–protein interaction hot spots by using structural neighborhood properties. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 42, n. W1, p. W290-W295, 2014.

DE RUYCK, J. *et al.* Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry**, [S. l.], v. 9, p. 1, 2016.

DE VRIES, S. J.; VAN DIJK, M.; BONVIN, A. M. J. J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. **Nature protocols**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 883, 2010.

DOLINSKY, T. J. *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 32, n. suppl_2, p. W665-W667, 2004.

DOMINGUEZ, C.; BOELEN, R.; BONVIN, A. M. J. J. HADDOCK: a protein–protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 125, n. 7, p. 1731-1737, 2003.

DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. **Science**, [S. l.], v. 271, n. 5246, p. 163-168, 1996.

DU, S. *et al.* Blockade of tumor-expressed PD-1 promotes lung cancer growth. **Oncoimmunology**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. e1408747, 2018.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC biology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 71, 2011.

EDISON, A. S. Linus Pauling and the planar peptide bond. **Nature structural biology**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 201, 2001.

- EFEBERA, Y. A. *et al.* First Interim Results of a Phase I/II Study of Lenalidomide in Combination with Anti-PD-1 Monoclonal Antibody MDV9300 (CT-011) in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. **Blood**, [S. l.], v. 126, n. 23, p. 1838, 2015.
- EGLOFF, A. M.; GRANDIS, J. R. Molecular pathways: context-dependent approaches to Notch targeting as cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 18, n. 19, p. 5188-5195, 2012.
- EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in enzymology**, [S. l.], v. 277, p. 396-404, 1 jan. 1997.
- ELLISEN, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 649-661, 1991.
- ESLAMI, M. *et al.* Computational evidence to design an appropriate candidate for the treatment of Alzheimer's disease through replacement of the heptamethylene linker of bis (7) tacrine with S-allylcysteine. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, n. 82, p. 66840-66851, 2015.
- ESWAR, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current protocols in bioinformatics**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 5.6. 1-5.6. 30, 2006.
- EVANS, D. J.; HOLIAN, B. L. The nose–hoover thermostat. **The Journal of chemical physics**, [S. l.], v. 83, n. 8, p. 4069-4074, 1985.
- EXNER, T. E.; KEIL, M.; BRICKMANN, J. Pattern recognition strategies for molecular surfaces. II. Surface complementarity. **Journal of computational chemistry**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 1188-1197, 2002.
- EYRE, T. A.; COLLINS, G. P. Immune checkpoint inhibition in lymphoid disease. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 170, n. 3, p. 291-304, 2015.
- FENWICK, C. *et al.* Tumor suppression of novel anti–PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 216, n. 7, p. 1525-1541, 2019.
- FERNÁNDEZ-QUINTERO, M. L. *et al.* Characterizing the diversity of the CDR-H3 loop conformational ensembles in relationship to antibody binding properties. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 9, p. 3065, 2018.
- FISER, A. *et al.* Modeling of loops in protein structures. **Protein science**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1753-1773, 2000.
- FREEMAN, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 192, n. 7, p. 1027-1034, 2000.

FREEMAN, G. J. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 30, p. 10275-10276, 2008.

FRIED, I. *et al.* Preliminary results of immune modulating antibody MDV9300 (pidilizumab) treatment in children with diffuse intrinsic pontine glioma. **Journal of neuro-oncology**, [S. l.], v. 136, n. 1, p. 189-195, 2018.

GABB, H. A.; JACKSON, R. M.; STERNBERG, M. J. E. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. **Journal of molecular biology**, [S. l.], v. 272, n. 1, p. 106-120, 1997.

GALLIVAN, J. P.; DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in structural biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 96, n. 17, p. 9459-9464, 1999.

GAO, Y.; WANG, R.; LAI, L. Structure-based method for analyzing protein-protein interfaces. **Journal of molecular modeling**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 44-54, 2004.

GOHLKE, H.; KUHN, L. A.; CASE, D. A. Change in protein flexibility upon complex formation: analysis of Ras-Raf using molecular dynamics and a molecular framework approach. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 322-337, 2004.

GRAY, J. J. High-resolution protein-protein docking. **Current opinion in structural biology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 183-193, 2006.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 23, p. 515-548, 2005.

GRILO, A. L.; MANTALARIS, A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. **Trends in biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 9-16, 2019.

GUHARROY, M.; CHAKRABARTI, P. Empirical estimation of the energetic contribution of individual interface residues in structures of protein-protein complexes. **Journal of computer-aided molecular design**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 645-654, 2009.

GUIMARÃES, M. C. C.; SILVA, I. V.; RANGEL, L. B. A. Anticorpos na terapia contra o câncer. **PerspectivasOnLine 2007-2011**, [S. l.], v. 2, n. 6, 2008.

HARDY, B. *et al.* A monoclonal antibody against a human B lymphoblastoid cell line induces tumor regression in mice. **Cancer research**, [S. l.], v. 54, n. 22, p. 5793-5796, 1994.

HESS, B. *et al.* LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.

HIRANO, F. *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. **Cancer research**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 1089-1096, 2005.

- HODI, F. S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.
- HOU, T. *et al.* Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods: II. The accuracy of ranking poses generated from docking. **Journal of computational chemistry**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 866, 2011.
- HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 1126, 2005.
- HOOFT, R. W. W.; SANDER, C.; VRIEND, G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 425-430, 1997.
- HORITA, S. *et al.* High-resolution crystal structure of the therapeutic antibody pembrolizumab bound to the human PD-1. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 35297, 2016.
- HUDIS, C. A. Trastuzumab: mechanism of action and use in clinical practice. **New England journal of medicine**, [S. l.], v. 357, n. 1, p. 39-51, 2007.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- HYEDA, A.; DA COSTA, E. S. M. Uma análise preliminar do desperdício de quimioterapia no tratamento do câncer. **Value in Health Regional Issues**, [S. l.], v. 8, p. 107-111, 2015.
- ISHIDA, Y. *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 3887-3895, 1992.
- JAIN, M.; KAMAL, N.; BATRA, S. K. Engineering antibodies for clinical applications. **Trends in biotechnology**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 307-316, 2007.
- JANIN, J. Assessing predictions of protein–protein interaction: the CAPRI experiment. **Protein science**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 278-283, 2005.
- JEFFREY, P. D. *et al.* 26-10 Fab-digoxin complex: affinity and specificity due to surface complementarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 90, n. 21, p. 10310-10314, 1993.
- JOHN, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 31, n. 14, p. 3982-3992, 2003.
- JORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 926-935, 1983.
- JUNG, J. *et al.* Regulation of Notch1 signaling by Delta-like ligand 1 intracellular domain through physical interaction. **Molecules and Cells**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 161-165, 2011.

JURRUS, E. *et al.* Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 112-128, 2018.

KABAT, E. A. *et al.* **Sequences of proteins of immunological interest**. 5. ed. Nova Iorque, NY: Bethesda, MD, 1991. 2597 p. v. 1.

KAO, H. Y. *et al.* A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. **Genes & development**, [S. l.], v. 12, n. 15, p. 2269-2277, 1998.

KEIR, M. E. *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 26, p. 677-704, 2008.

KERSHAW, N. J. *et al.* Notch ligand delta-like1: X-ray crystal structure and binding affinity. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 468, n. 1, p. 159-166, 2015.

KESKIN, O. *et al.* A new, structurally nonredundant, diverse data set of protein–protein interfaces and its implications. **Protein Science**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 1043-1055, 2004.

KESKIN, O.; MA, B.; NUSSINOV, R. Hot regions in protein–protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 345, n. 5, p. 1281-1294, 2005.

KHAN, F. I. *et al.* Current updates on computer aided protein modeling and designing. **International journal of biological macromolecules**, [S. l.], v. 85, p. 48-62, 2016.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. suppl_2, p. W526-W531, 2004.

KITAO, A.; GO, N. Investigating protein dynamics in collective coordinate space. **Current opinion in structural biology**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 164-169, 1999.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. **Structure**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 1395-1400, 1996.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, [S. l.], v. 256, n. 5517, p. 495, 1975.

KOLLMAN, P. A. *et al.* Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of chemical research**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 889-897, 2000.

KORTEMME, T.; KIM, D. E.; BAKER, D. Computational alanine scanning of protein–protein interfaces. **Science's STKE**, [S. l.], v. 2004, n. 219, p. pl2-pl2, 2004.

KOZAKOV, D. *et al.* How good is automated protein docking?. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 81, n. 12, p. 2159-2166, 2013.

KOZAKOV, D. *et al.* The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature protocols**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 255, 2017.

- KROVAT, E. M.; STEINDL, T.; LANGER, T. Recent advances in docking and scoring. **Current Computer-Aided Drug Design**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 93-102, 2005.
- KRÜGER, D. M.; GOHLKE, H. DrugScorePPI webserver: fast and accurate in silico alanine scanning for scoring protein–protein interactions. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 38, n. suppl_2, p. W480-W486, 2010.
- KRYSHTAFOVYCH, A.; FIDELIS, K. Protein structure prediction and model quality assessment. **Drug discovery today**, [S. l.], v. 14, n. 7-8, p. 386-393, 2009.
- KURODA, D.; GRAY, J. J. Shape complementarity and hydrogen bond preferences in protein–protein interfaces: implications for antibody modeling and protein–protein docking. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 32, n. 16, p. 2451-2456, 2016.
- KUZMANIC, A.; ZAGROVIC, B. Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors. **Biophysical journal**, [S. l.], v. 98, n. 5, p. 861-871, 2010.
- LANTTO, J.; OHLIN, M. Functional consequences of insertions and deletions in the complementarity-determining regions of human antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 277, n. 47, p. 45108-45114, 2002.
- LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. **International Tables for Crystallography**, [S. l.], v. F, p. 722-725, 2006.
- LAVOIE, M. J.; SELKOE, D. J. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by α -secretase and presenilin/ γ -secretase and release signaling fragments. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 36, p. 34427-34437, 2003.
- LÁZÁR-MOLNÁR, E. *et al.* Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 30, p. 10483-10488, 2008.
- LEACH, D. R.; KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. **Science**, [S. l.], v. 271, n. 5256, p. 1734-1736, 1996.
- LEE, H. S.; QI, Y.; IM, W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. **Scientific reports**, [S. l.], v. 5, p. 8926, 2015.
- 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**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 1190, 2019.

- LEE, J. Y. *et al.* Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. **Nature communications**, [S. l.], v. 7, p. 13354, 2016.
- LENNARD-JONES, J. E. On the determination of molecular fields. II. From the equation of state of gas. **Proceedings of the Royal Society of London**, [S. l.], v. 106, p. 463-477, 1924.
- LI, Y. *et al.* A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway & translational blockade of immune checkpoints. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 1151, 2016.
- LIKIĆ, V. A. *et al.* A statistical approach to the interpretation of molecular dynamics simulations of calmodulin equilibrium dynamics. **Protein science**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 2955-2963, 2005.
- LIN, D. Y. *et al.* The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 8, p. 3011-3016, 2008.
- LIU, H. *et al.* Glycosylation-independent binding of monoclonal antibody toripalimab to FG loop of PD-1 for tumor immune checkpoint therapy. **MAbs**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 681-690, 2019.
- LIU, J. *et al.* Study of the interactions of a novel monoclonal antibody, mAb059c, with the hPD-1 receptor. **Scientific reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.
- LIVESAY, D. R.; SUBRAMANIAM, S. Conserved sequence and structure association motifs in antibody–protein and antibody–hapten complexes. **Protein Engineering Design and Selection**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 463-472, 2004.
- LOBANOV, M.; BOGATYREVA, N. S.; GALZITSKAIA, O. V. Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure. **Molekuliarnaia biologii**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 701-706, 2008.
- LOGEAT, F. *et al.* The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 95, n. 14, p. 8108-8112, 1998.
- LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [S. l.], v. 356, n. 6364, p. 83, 1992.
- MAGHRABI, A. H. A.; MCGUFFIN, L. J. ModFOLD6: an accurate web server for the global and local quality estimation of 3D protein models. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. W1, p. W416-W421, 2017.
- MAHONEY, K. M.; FREEMAN, G. J.; MCDERMOTT, D. F. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. **Clinical therapeutics**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 764-782, 2015.

MALHOTRA, S.; MATHEW, O. K.; SOWDHAMINI, R. DOCKSCORE: a webserver for ranking protein-protein docked poses. **BMC bioinformatics**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 127, 2015.

MALHOTRA, S.; SANKAR, K.; SOWDHAMINI, R. Structural interface parameters are discriminatory in recognising near-native poses of protein-protein interactions. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. e80255, 2014.

MARTÍNEZ, L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. **PloS one**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e0119264, 2015.

MAZOLA, Y. *et al.* A comparative molecular dynamics study of thermophilic and mesophilic β -fructosidase enzymes. **Journal of molecular modeling**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 228, 2015.

MELCHIONNA, S.; FALCONI, M.; DESIDERI, A. Effect of temperature and hydration on protein fluctuations: molecular dynamics simulation of Cu, Zn superoxide dismutase at six different temperatures. Comparison with neutron scattering data. **The Journal of chemical physics**, [S. l.], v. 108, n. 14, p. 6033-6041, 1998.

MEOT-NER, M.; DEAKYNE, C. A. Unconventional ionic hydrogen bonds. 2. NH^+ - π complexes of onium ions with olefins and benzene derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 107, n. 2, p. 474-479, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. **ABC do Câncer**: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 5. ed. rev. atual. e aum. Rio de Janeiro, RJ: Inca, 2019. 111 p. ISBN 978-85-7318-378-8. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/abc-do-cancer-abordagens-basicas-para-o-controle-do-cancer>. Acesso em: 11 dez. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 55, de 16 de dezembro de 2010. **Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências**, Brasília, DF: Diário Oficial da União, n. 241, 17 dez. 2010.

MOAL, I. H. *et al.* The scoring of poses in protein-protein docking: current capabilities and future directions. **BMC bioinformatics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 286, 2013.

MOREIRA, I. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Hot spots: A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 803-812, 2007.

MORIN, A.; MEILER, J.; MIZOUE, L. S. Computational design of protein-ligand interfaces: potential in therapeutic development. **Trends in biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 159-166, 2011.

MORROW, J. K.; ZHANG, S. Computational prediction of protein hot spot residues. **Current pharmaceutical design**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 1255-1265, 2012.

MOTA, F. B.; CASSIOLATO, J.; GADELHA, C. Futuro da pesquisa, desenvolvimento

tecnológico e produção industrial de biofarmacêuticos no Brasil. **Revista Eletrônica de Comunicação Informação e Inovação em Saúde**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 461-477, 2014. DOI <https://doi.org/10.3395/reciis.v8i4.433>. Disponível em: <https://www.reciis.icict.fiocruz.br/index.php/reciis/article/view/433>. Acesso em: 12 nov. 2019.

MUKESH, B.; RAKESH, K. Molecular docking: a review. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 1746-1751, 2011.

MULLARD, A. New drugs cost US \$2.6 billion to develop. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 13, p. 877, 2014.

NA, Z. *et al.* Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. **Cell research**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 147, 2017.

NAZ, F. *et al.* Investigation of molecular mechanism of recognition between citral and MARK4: A newer therapeutic approach to attenuate cancer cell progression. **International journal of biological macromolecules**, [S. l.], v. 107, p. 2580-2589, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [S. l.]: Artmed, 2014. 1328 p. ISBN 8582710720.

NICOLAS, M. *et al.* Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. **Nature genetics**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 416, 2003.

NOGUERA-TROISE, I. *et al.* Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. **Nature**, [S. l.], v. 444, n. 7122, p. 1032, 2006.

OFRAN, Y.; ROST, B. ISIS: interaction sites identified from sequence. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. e13-e16, 2007.

OH, M. I.; CONSTA, S. Stability of a transient protein complex in a charged aqueous droplet with variable pH. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 80-85, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Agência Internacional para Pesquisa em Câncer. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. [S. l.: s. n.], 2018. 3 p. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/PRGglobocanFinal.pdf>. Acesso em: 27 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Observatório Global do Câncer. **Cancer Tomorrow: A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden worldwide from the current estimates in 2020 up until 2040**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>. Acesso em: 27 out. 2019.

OSBORNE, B.; MIELE, L. Notch and the immune system. **Immunity**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 653-663, 1999.

PACE, C. N. *et al.* Forces contributing to the conformational stability of proteins. **The FASEB journal**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 75-83, 1996.

- PAISSONI, C. *et al.* GMXPBSA 2.0: A GROMACS tool to perform MM/PBSA and computational alanine scanning. **Computer Physics Communications**, [S. l.], v. 185, n. 11, p. 2920-2929, 2014.
- PAISSONI, C. *et al.* GMXPBSA 2.1: A GROMACS tool to perform MM/PBSA and computational alanine scanning. **Computer Physics Communications**, [S. l.], v. 186, p. 105-107, 2015.
- PAL, S. K. *et al.* Programmed death-1 inhibition in renal cell carcinoma: clinical insights and future directions. **Clinical Advances in Hematology and Oncology**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 90-99, 2014.
- PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 252, 2012.
- PAROLA, C.; NEUMEIER, D.; REDDY, S. T. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering. **Immunology**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 31-41, 2018.
- PARRINELLO, M; RAHMAN, A. Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. **Physical Review Letters**, [S. l.], v. 45, n. 14, p. 1196, 1980.
- PASCOLUTTI, R. *et al.* Structure and dynamics of PD-L1 and an ultra-high-affinity PD-1 receptor mutant. **Structure**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1719-1728, 2016.
- PATNAIK, A. *et al.* Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. **Clinical cancer research**, [S. l.], v. 21, n. 19, p. 4286-4293, 2015.
- PAULA, G. A. P. **Estudo da estabilidade estrutural em solução aquosa da enzima Acetolactato Sintase (ALS) utilizando Dinâmica Molecular**. 2019. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2019.
- PAULING, L.; COREY, R. B.; BRANSON, H. R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 205-211, 1951.
- PENG, H. P. *et al.* Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 111, n. 26, p. E2656-E2665, 2014.
- PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PHILIPS, G. K.; ATKINS, M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. **International immunology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 39-46, 2014.

PHILLIPS, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of computational chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.

PIEHLER, J.; SCHREIBER, G. Fast transient cytokine–receptor interactions monitored in real time by reflectometric interference spectroscopy. **Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 289, n. 2, p. 173-186, 2001.

PIERCE, B. A. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. 5. ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2016. 780 p. ISBN 8527729059.

PIRES, D. E. V.; ASCHER, D. B.; BLUNDELL, T. L. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 335-342, 2013.

PIRES, D. E. V.; ASCHER, D. B. mCSM-AB: a web server for predicting antibody–antigen affinity changes upon mutation with graph-based signatures. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W469-W473, 2016.

PLOSKER, G. L.; FIGGITT, D. P. Rituximab. **Drugs**, [S. l.], v. 63, n. 8, p. 803-843, 2003.

POTAPOV, V.; COHEN, M.; SCHREIBER, G. Assessing computational methods for predicting protein stability upon mutation: good on average but not in the details. **Protein engineering, design & selection**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 553-560, 2009.

PUCCA, M. B. *et al.* Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 31-38, 2011.

PUROW, B. W. *et al.* Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. **Cancer research**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 2353-2363, 2005.

QIN, S. *et al.* Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. **Molecular cancer**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 155, 2019.

RADOM, F.; PLÜCKTHUN, A.; PACI, E. Assessment of ab initio models of protein complexes by molecular dynamics. **PLoS computational biology**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. e1006182, 2018.

RADTKE, F.; RAJ, K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 756, 2003.

RAMACHANDRAN, G. N. Protein Structure and Crystallography. **Science**, [S. l.], v. 141, n. 3577, p. 288-291, 1963.

RAMPAL, R. *et al.* Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 37, p. 32133-32140, 2005.

RANGARAJAN, A. *et al.* Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 20, n. 13, p. 3427-3436, 2001.

RIDGWAY, J. *et al.* Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. **Nature**, [S. l.], v. 444, n. 7122, p. 1083, 2006.

RODRIGUES, J. P. G. L. M. *et al.* Defining the limits of homology modeling in information-driven protein docking. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 81, n. 12, p. 2119-2128, 2013.

RODRIGUES, J. P. G. L. M.; BONVIN, A. M. J. J. Integrative computational modeling of protein interactions. **The FEBS journal**, [S. l.], v. 281, n. 8, p. 1988-2003, 2014.

RONCHINI, C.; CAPOBIANCO, A. J. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notchic: implication for cell cycle disruption in transformation by Notchic. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 21, n. 17, p. 5925-5934, 2001.

ROQUE, A. C. A.; SILVA, C. S. O.; TAIPA, M. A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1160, n. 1-2, p. 44-55, 2007.

ROSENBLATT, J. *et al.* Blockade of PD-1 in Combination with Dendritic Cell/Myeloma Fusion Cell Vaccination Following Autologous Stem Cell Transplantation Is Well Tolerated, Induces Anti-Tumor Immunity and May Lead to Eradication of Measureable Disease. **Blood**, [S. l.], v. 126, n. 23, p. 4218, 2015.

ROTTE, A.; D'ORAZI, G.; BHANDARU, M. Nobel committee honors tumor immunologists. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 262, 2018.

ROY, A. *et al.* In silico methods for design of biological therapeutics. **Methods**, [S. l.], v. 131, p. 33-65, 2017.

SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. **Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para seu desenvolvimento**. Brasília: [s. n.], 2018. 78 p.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

SÁNCHEZ, R.; ŠALI, A. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 29, n. S1, p. 50-58, 1997.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de farmacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, [S. l.], v. 25, p. 505-512, 2002.

SANTOS, M. O. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 119-120, 2018.

- SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. **Journal of chemical theory and computation**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.
- SCHYMKOWITZ, J. *et al.* The FoldX web server: an online force field. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 33, n. suppl_2, p. W382-W388, 2005.
- SEO, M. J. **Development of high throughput screening systems for the efficient production of antibody fragments in Escherichia coli**. 2008. 162 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - University of Texas, Austin, TX, 2008.
- SHAN, D. *et al.* Characterization of scFv-Ig constructs generated from the anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 162, n. 11, p. 6589-6595, 1999.
- SHARMA, S. K.; RAMSEY, T. M.; BAIR, K. W. Protein-protein interactions: lessons learned. **Current Medicinal Chemistry. Anti-cancer agents**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 311-330, 2002.
- SHEN, M. Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 2507-2524, 2006.
- SHERIDAN, C. Ablynx's nanobody fragments go places antibodies cannot. **Nature biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 12, p. 1115-1118, 2017.
- SHINOHARA, T. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). **Genomics**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 704-706, 1994.
- SHKURTI, A. *et al.* pyPcazip: A PCA-based toolkit for compression and analysis of molecular simulation data. **SoftwareX**, [S. l.], v. 5, p. 44-50, 2016.
- SHUID, A. N.; KEMPSTER, R.; MCGUFFIN, L. J. ReFOLD: a server for the refinement of 3D protein models guided by accurate quality estimates. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. W1, p. W422-W428, 2017.
- SICINSKA, E. *et al.* Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 451-461, 2003.
- VAJDOS, F. F. *et al.* Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 320, n. 2, p. 415-428, 2002.
- SIEGEL, R. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 220-241, 2012.
- SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega: Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. In: RUSSELL, D. **Multiple Sequence Alignment Methods**. 1. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. v. 1079, p. 105-116. ISBN 978-1-62703-645-0.

SITTEL, F.; JAIN, A.; STOCK, G.. Principal component analysis of molecular dynamics: On the use of Cartesian vs. internal coordinates. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 141, n. 1, p. 07B605_1, 2014.

SMITH, G. R.; STERNBERG, M. J. E. Prediction of protein–protein interactions by docking methods. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 28-35, 2002.

SORMANNI, P. *et al.* Rapid and accurate in silico solubility screening of a monoclonal antibody library. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 8200, 2017.

STELLA, L.; MELCHIONNA, S. Equilibration and sampling in molecular dynamics simulations of biomolecules. **The Journal of Chemical Physics**, [S. l.], v. 109, n. 23, p. 10115-10117, 1998.

SWIFT, M. L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. **Journal of chemical information and computer sciences**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 411-412, 1997.

ROY, P. *et al.* Molecular characterization, constitutive expression and GTP binding mechanism of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) Myxovirus resistance (Mx) protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 136, p. 1258-1272, 2019.

RENNER, C.; STENNER, F.. Cancer immunotherapy and the immune response in Hodgkin lymphoma. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 8, p. 193, 2018.

TAKEBE, N. *et al.* Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 97, 2011.

TAKEBE, N.; NGUYEN, D.; YANG, S. X. Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. **Pharmacology & therapeutics**, [S. l.], v. 141, n. 2, p. 140-149, 2014.

TAN, S. *et al.* An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, p. 14369, 2017.

TANG, S.; KIM, P. S. A high-affinity human PD-1/PD-L2 complex informs avenues for small-molecule immune checkpoint drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 116, n. 49, p. 24500-24506, 2019.

TOPALIAN, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti–PD-1 antibody in cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 366, n. 26, p. 2443-2454, 2012.

TRAMONTANO, A. The role of molecular modelling in biomedical research. **FEBS letters**, [S. l.], v. 580, n. 12, p. 2928-2934, 2006.

TSAI, C. J. *et al.* A dataset of protein–protein interfaces generated with a sequence-order-independent comparison technique. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 260, n. 4, p. 604-620, 1996.

TUNCBAG, N.; GURSOY, A.; KESKIN, O. Identification of computational hot spots in protein interfaces: combining solvent accessibility and inter-residue potentials improves the accuracy. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 1513-1520, 2009.

TUNCBAG, N.; KESKIN, O.; GURSOY, A. HotPoint: hot spot prediction server for protein interfaces. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 38, n. suppl_2, p. W402-W406, 2010.

VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. Protein-protein docking: is the glass half-full or half-empty?. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 110-116, 2004.

VAJDA, S. *et al.* New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 435-444, 2017.

VAN ZUNDERT, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 428, n. 4, p. 720-725, 2016.

VAUGHAN, T. J.; OSBOURN, J. K.; TEMPEST, P. R. Human antibodies by design. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 535, 1998.

VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014. 282 p. ISBN 978-85-69288-00-8.

VERNET, E. **Affinity protein based inhibition of cancer related signaling pathways**. 2009. 79 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Molecular) - School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, KTH, Estocolmo, SE, 2009.

VIDAL, T. J.; FIGUEIREDO, T. A.; PEPE, V. L. E. The Brazilian market for monoclonal antibodies used in cancer treatment. **Cadernos de saúde pública**, [S. l.], v. 34, n. 12, 2018.

VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. **Journal of molecular graphics**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 52-56, 1990.

WANG, C. *et al.* Recent developments and applications of the MMPBSA method. **Frontiers in molecular biosciences**, [S. l.], v. 4, p. 87, 2018.

WANG, J. *et al.* HLA class I expression predicts prognosis and therapeutic benefits from tyrosine kinase inhibitors in metastatic renal-cell carcinoma patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 79-87, 2018.

WANG, J. *et al.* Use of MM-PBSA in reproducing the binding free energies to HIV-1 RT of TIBO derivatives and predicting the binding mode to HIV-1 RT of efavirenz by docking and MM-PBSA. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 123, n. 22, p. 5221-5230, 2001.

WANG, M. *et al.* Identification of a monoclonal antibody that targets PD-1 in a manner requiring PD-1 Asn58 glycosylation. **Communications Biology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1-10, 2019.

- WANG, T.; DUAN, Y. Probing the stability-limiting regions of an antibody single-chain variable fragment: a molecular dynamics simulation study. **Protein Engineering, Design & Selection**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 649-657, 2011.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modelling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, [S. l.], v. 54, p. 5.6.1- 5.6.37, 2016.
- WEIJZEN, S. *et al.* Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 979, 2002.
- WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 317, 2010.
- WEISSER, N. E.; HALL, J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnology advances**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 502-520, 2009.
- WENG, A. P. *et al.* c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. **Genes & development**, [S. l.], v. 20, n. 15, p. 2096-2109, 2006.
- WESTIN, J. R. *et al.* Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 69-77, 2014.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 35, n. suppl_2, p. W407-W410, 2007.
- WORD, J. M. *et al.* Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 285, n. 4, p. 1711-1733, 1999.
- XU, J. L.; DAVIS, M. M. Diversity in the CDR3 region of VH is sufficient for most antibody specificities. **Immunity**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 37-45, 2000.
- XU, D.; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. **Protein engineering**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 999-1012, 1997.
- YACHDAV, G. *et al.* PredictProtein: an open resource for online prediction of protein structural and functional features. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 42, n. W1, p. W337-W343, 2014.
- YUSAKUL, G. *et al.* Effect of linker length between variable domains of single chain variable fragment antibody against daidzin on its reactivity. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [S. l.], v. 80, n. 7, p. 1306-1312, 2016.
- ZAK, K. M. *et al.* Structure of the complex of human programmed death 1, PD-1, and its ligand PD-L1. **Structure**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 2341-2348, 2015.

ZHANG, D.; ARAVIND, L. Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. **Gene**, [S. l.], v. 469, n. 1-2, p. 18-30, 2010.

ZHANG, D.; LAZIM, R. Application of conventional molecular dynamics simulation in evaluating the stability of apomyoglobin in urea solution. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, p. 44651, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. **Immunity**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 337-347, 2004.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 40, 2008.

ZHU, X.; MITCHELL, J. C. KFC2: a knowledge-based hot spot prediction method based on interface solvation, atomic density, and plasticity features. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 79, n. 9, p. 2671-2683, 2011.

ZONDLO, N. J. Aromatic–proline interactions: Electronically tunable CH/ π interactions. **Accounts of chemical research**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 1039-1049, 2012.

ZOU, W.; CHEN, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 467, 2008.

**APÊNDICE A – LISTA DE ESTRUTURAS DETERMINADAS
EXPERIMENTALMENTE PARA O ECTODOMÍNIO DO PD-1**

Número	PDB ID	Molécula Cocrystalizada	Tamanho	Resolução (Å)	Valor-R	Detalhes	Referência
1	3RRQ	-	129	1.8	0.214	1 mutação	LAZAR-MOLNAR et al. (2012)
2	2M2D	-	118	RMN	-	S/ mutações	CHENG et al. (2013)
3	6UMV	-	129	1.424	0.161	2 mutações	TANG; KIM (2019)
4	6UMU	-	129	1.183	0.154	3 mutações	TANG; KIM (2019)
5	4ZQK	PD-L1	115	2.45	0.207	S/ mutações	ZAK et a. (2015)
6	5IUS	PD-L1	129	2.889	0.207	11 mutações	PASCOLUTTI et al. (2016)
7	6UMT	PD-L2	140	1.986	0.198	3 mutações	TANG; KIM (2019)
8	5B8C	Fv do Pembrolizumabe	139	2.146	0.184	1 mutação	HORITA et al. (2016)
9	5GGS	Fab do Pembrolizumabe	123	1.997	0.179	1 mutação	LEE et al. (2016)
10	5JXE	Fab do Pembrolizumabe	114	2.9	0.261	1 mutação	NA et al. (2017)
11	5GGR	Fab do Nivolumabe	125	3.3	0.222	1 mutação	LEE et al. (2016)
12	5WT9	Fab do Nivolumabe	173	2.401	0.187	S/ mutações	TAN et al. (2017)
13	6JBT	Fab do Toripalimabe	157	2.47	0.201	S/ mutações	LIU et al. (2019)
14	6HIG	Fab do NBO1a	118	2.2	0.215	1 mutação	FENWICK et al. (2019)
15	6JJP	Fab do MW11-h317	147	2.9	0.207	S/ mutações	WANG et al. (2019)
16	6J15	Fab do GY-5	120	2.6	0.212	S/ mutações	CHEN et al. (2019)
17	6J14	Fab do GY-14	115	1.4	0.215	S/ mutações	CHEN et al. (2019)
18	6K0Y	Fab do mAb059c	143	1.7	0.171	1 mutação	LIU et al. (2019)

Fonte: elaborado pelo autor. O tamanho das sequências faz referência ao número de resíduos de aminoácido que às constituem.

**APÊNDICE B - LISTA DE ESTRUTURAS DETERMINADAS
EXPERIMENTALMENTE PARA O ECTODOMÍNIO DO DLL1**

Número	PDB ID	Tamanho (nº de resíduos)	Resolução (Å)	Valor-R	Detalhes	Referência
1	4XBM	531	3.2	0.258	S/ mutações	KERSHAW et al. (2015)

Fonte: elaborado pelo autor.

**APÊNDICE C – TESTES CLÍNICOS ENVOLVENDO ANTICORPOS ANTI-PD-1
CONTRA DIVERSAS MALIGNIDADES**

Identificador do Teste Clínico	Compostos	Indicação	Fase	Status	Responsável
NCT01352884	AMP-224	Carcinoma avançado	1	Concluído (2014)	MedImmune LCC (EUA)
NCT01714739	Nivolumabe + Lirilumabe; Nivolumabe + Ipilimumabe + Lirilumabe	Tumores sólidos avançados refratários	1/2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT00730639	Nivolumabe	Câncer de próstata metastático resistente à castração; Melanoma; NSCLC; RCC	1	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01876511	Pembrolizumabe	Câncer colorretal com instabilidade de microssatélite	2	Em andamento	<i>Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins</i> (EUA)
NCT01848834	Pembrolizumabe	Câncer gástrico; câncer de cabeça e pescoço; tumor urotelial; TNBC	1	Em andamento	MSD (EUA)
NCT01928394	Nivolumabe +/- Ipilimumabe	Câncer gástrico; Adenocarcinoma pancreático; Câncer de bexiga; Câncer de ovário; TNBC; SCLC	1/2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT02017717	Nivolumabe +/- Ipilimumabe vs Bevacizumabe	Glioblastoma recorrente	1/3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01658878	Nivolumabe +/- Ipilimumabe; Nivolumabe vs Sorafenib	Carcinoma hepatocelular	1/2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01953692	Pembrolizumabe	Malignidades hematológicas	1b	Em andamento	MSD (EUA)
NCT01844505	Nivolumabe +/- Ipilimumabe vs Ipilimumabe	Melanoma	3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01927419	Nivolumabe + Ipilimumabe vs Ipilimumabe	Melanoma	2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01024231	Nivolumabe + Ipilimumabe	Melanoma	1b	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01783938	Nivolumabe sequencialmente ao Ipilimumabe	Melanoma	2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)

Continua

Continuação

Identificador do Teste Clínico	Compostos	Indicação	Fase	Status	Responsável
NCT01721746	Nivolumabe vs Dacarbazina ou Carboplatina/Placitaxel após Ipilimumabe	Melanoma	3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01721772	Nivolumabe vs Dacarbazina	Melanoma	3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01176461	Nivolumabe + múltiplos peptídeos de classe 1 e montanide ISA 51 VG	Melanoma	1	Em andamento	H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute (EUA)
NCT01176474	Nivolumabe +/- Ipilimumabe + múltiplos peptídeos de classe 1 e montanide ISA 51 VG	Melanoma	1	Em andamento	H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute (EUA)
NCT01621490	Nivolumabe + Ipilimumabe; Ipilimumabe; Nivolumabe	Melanoma	1	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01704287	Pembrolizumabe vs quimioterapia	Melanoma	2	Concluído (2019)	MSD (EUA)
NCT01866319	Pembrolizumabe vs Ipilimumabe	Melanoma	3	Concluído (2019)	MSD (EUA)
NCT01295827	Pembrolizumabe	Melanoma; NSCLC	1	Concluído (2018)	MSD (EUA)
NCT01454102	Nivolumabe +/- Gencitabina/ Cisplatina, Pemetrexede/ Cisplatina, Carboplatina/Placitaxel, Bevacizumabe, Erlotinibe, Ipilimumabe	NSCLC	1	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01673867	Nivolumabe vs Docetaxel	NSCLC	3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01642004	Nivolumabe vs Docetaxel	NSCLC	3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01721759	Nivolumabe	NSCLC	2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01928576	Nivolumabe +/- Azacitidina/ Entinostat	NSCLC	2	Em andamento	Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins (EUA)
NCT01905657	Pembrolizumabe vs Docetaxel	NSCLC	2/3	Em andamento	MSD (EUA)
NCT02007070	Pembrolizumabe	NSCLC	1b	Concluído (2017)	MSD (EUA)
NCT01472081	Nivolumabe + Sunitinib, Pazopanibe ou Ipilimumabe	Tumores sólidos; RCC	1	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01354431	Nivolumabe	Tumores sólidos; RCC	2	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01668784	Nivolumabe vs Everolimo	Tumores sólidos; RCC	3	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01358721	Nivolumabe	Tumores sólidos; RCC	1	Concluído (2019)	Bristol-Myers Squibb (EUA)

Continua

Continuação

Identificador do Teste Clínico	Compostos	Indicação	Fase	Status	Responsável
NCT02014636	Pembrolizumabe + Pazopanibe	Tumores sólidos; RCC	1/2	Concluído (2019)	Novartis Pharmaceuticals (Suíça)
NCT01968109	BMS-986016 +/- Nivolumabe	Tumores sólidos; RCC	1/2a	Em andamento	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT01629758	Nivolumabe + interleucina-21	Tumores sólidos; RCC	1	Concluído (2014)	Bristol-Myers Squibb (EUA)
NCT02013804	AMP-514	Tumores sólidos; RCC	1	Concluído (2017)	MedImmune LCC (EUA)
NCT01840579	Pembrolizumabe +/- Cisplatina, Pemetrexede, Carboplatina, Paclitaxel, Nab-paclitaxel, Ipilimumabe, Etoposido, G-CSF	Tumores sólidos; NSCLC	1	Em andamento	MSD (EUA)

Fonte: elaborado pelo autor. NSCLC – Câncer de pulmão de células não pequenas; RCC – carcinoma de células renais; TNBC – câncer de mama triplo negativo.

**APÊNDICE D – TESTES CLÍNICOS ENVOLVENDO ANTICORPOS
MONOCLONAIS INIBIDORES DA VIA DE NOTCH CONTRA O CÂNCER**

Identificador do Teste Clínico	Compostos	Alvo	Indicação	Fase	Status	Responsável
NCT01577745	MEDI0639	DLL4	Tumores sólidos	1	Concluído (2015)	MedImmune LCC (EUA)
NCT01703572	OMP-52M51	Notch1	Malignidades linfóides refratárias	1	Concluído (2016)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01778439	OMP-52M51	Notch1	Tumores sólidos	1	Concluído (2016)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT02662608	OMP-52M51	Notch1	Carcinoma Adenóide Cístico	-	Concluído (2016)	M.D. Anderson Cancer Center (EUA)
NCT00871559	REGN42	DLL4	Tumores sólidos avançados	1	Concluído (2014)	Regeneron Pharmaceuticals (EUA)
NCT01189929	Demcizumabe + Gemcitabina +/- Abraxane	DLL4	Câncer pancreático localmente avançado ou metastático	1b	Concluído (2016)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01189968	Demcizumabe + Carboplatina + Pemetrexede	DLL4	NSCLC	1b	Concluído (2016)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01189942	Demcizumabe + FOLFIRI	DLL4	Câncer colorretal metastático	1b	Concluído (2011)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT00744562	Demcizumabe	DLL4	Tumores sólidos	1	Concluído (2012)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT02722954	Demcizumabe + Pembrolizumabe	DLL4	Tumores sólidos localmente avançados ou metastáticos	1b	Concluído (2017)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01952249	Demcizumabe + Paclitaxel	DLL4	Carcinoma Peritoneal Primário	1	Descontinuado	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01647828	OMP-59R5 + Nab-paclitaxel + Gemcitabina	Notch2/3	Câncer pancreático estágio IV	1b/2	Concluído (2016)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01277146	OMP-59R5	Notch2/3	Tumores sólidos	1	Concluído (2013)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)
NCT01859741	OMP-59R5 + Etoposido + Platina	Notch2/3	Câncer pulmonar de células pequenas	1b/2	Descontinuado (com resultados)	OncoMed Pharmaceuticals, Inc. (EUA)

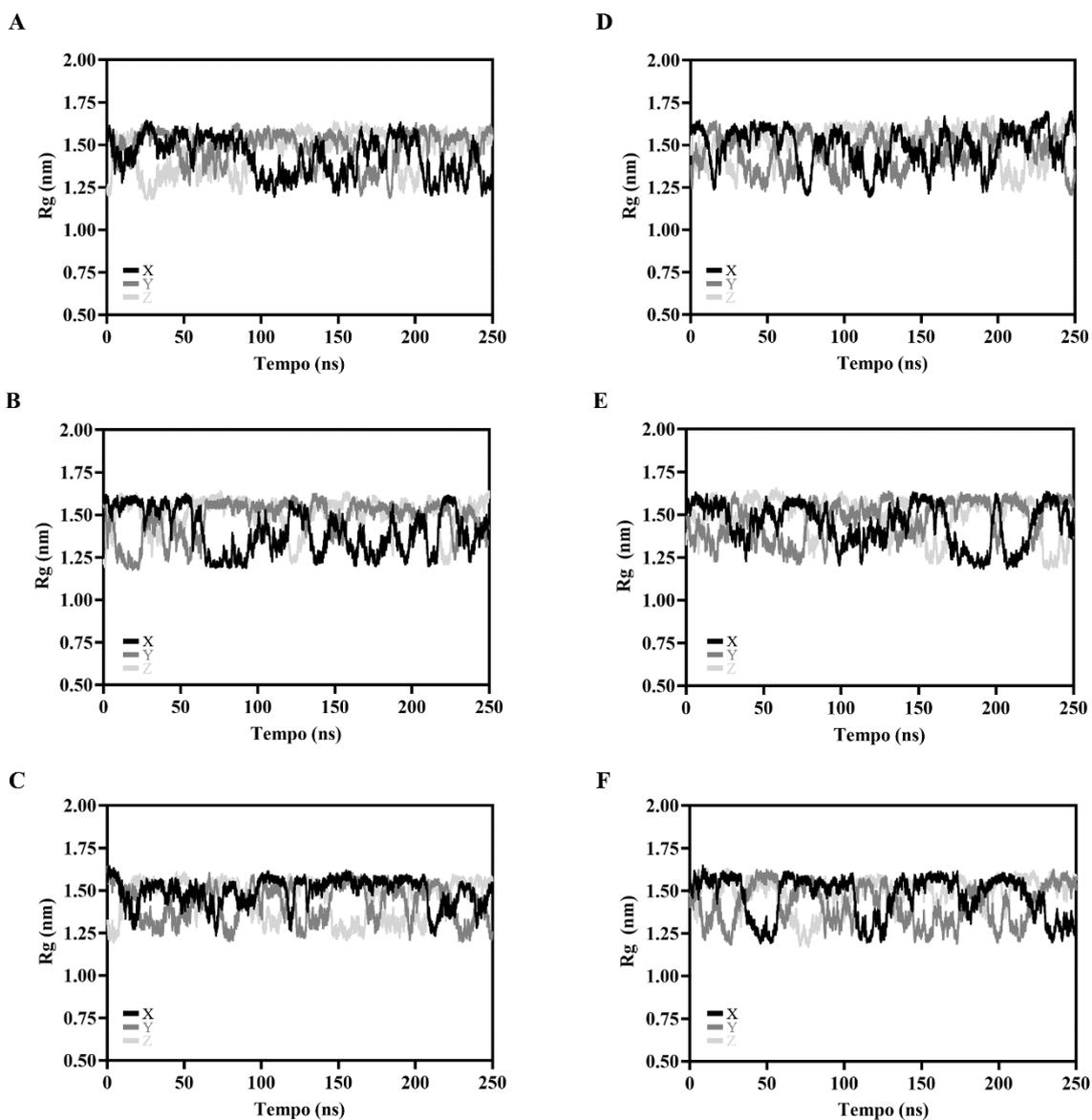
Fonte: elaborado pelo autor. NSCLC – Câncer de pulmão de células não pequenas.

APÊNDICE E – TESTES CLÍNICOS ENVOLVENDO PIDILIZUMABE

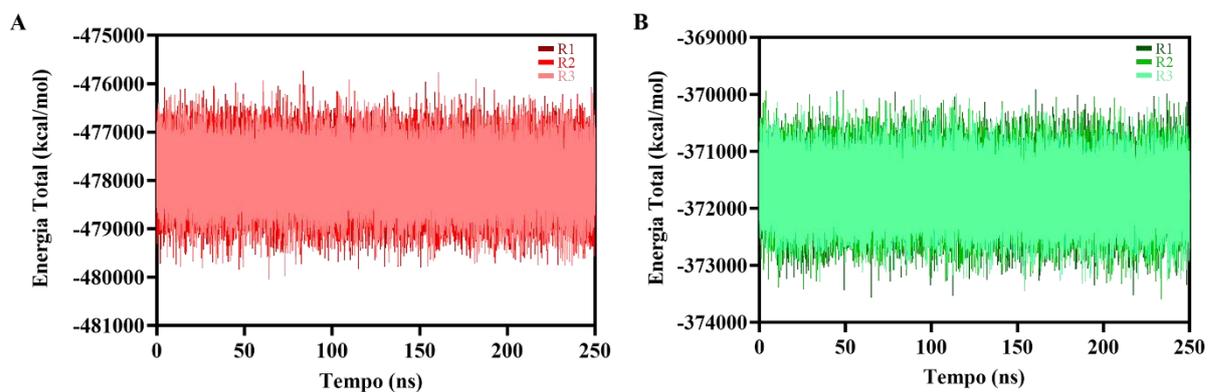
Identificador do Teste Clínico	Compostos	Indicação	Fase	Status	Responsável
NCT01952769	Pidilizumabe	Glioma pontino intrínseco difuso	1/2	Desconhecido	<i>Hadassah Medical Organization (Israel)</i>
NCT01313416	Pidilizumabe + Gemcitabina	Câncer de pâncreas	2	Descontinuado* (com resultados)	Augusta University (EUA)
NCT01420965	Pidilizumabe + Sipuleucel-T + Ciclofosfamida	Câncer de próstata	2	Descontinuado* (com resultados)	Augusta University (EUA)
NCT01441765	Pidilizumabe +/- vacinação com células de fusão RCC/DC	Tumores sólidos; RCC	2	Descontinuado* (com resultados)	Beth Israel Deaconess Medical Center (EUA)
NCT00890305	Pidilizumabe + quimioterapia vs quimioterapia	Câncer colorretal metastático	2	Concluído (2013)	Medivation Inc (EUA)
NCT01386502	Pidilizumabe + Vacina genética p53	Câncer de mama, câncer de cólon, sarcoma, câncer de ovário e câncer pancreático	1	Retirado	National Cancer Institute (EUA)
NCT02077959	Lenalidomida + Pidilizumabe	Mieloma múltiplo	1/2	Concluído (2019)	Ohio State University Comprehensive Cancer Center (EUA)/CureTech Ltd (Israel)
NCT01067287	Pidilizumabe + vacinação com células de fusão MC/DC	Mieloma múltiplo	2	Em andamento	Beth Israel Deaconess Medical Center (EUA)
NCT00532259	Pidilizumabe	Linfoma difuso de grandes células B	2	Concluído (2014)	CureTech Ltd (Israel)
NCT01435369	Pidilizumabe	Melanoma metastático	2	Concluído (2013)	Medivation Inc (EUA)
NCT00966251	Pidilizumabe	Carcinoma hepatocelular primário	1/2	Descontinuado*	CureTech Ltd (Israel)
NCT02530125	Pidilizumabe	Linfoma difuso de grandes células B	2	Descontinuado* (com resultados)	Northwestern University (EUA)
NCT00904722	Pidilizumabe + Rituximabe	Linfoma folicular	2	Concluído (2015)	M.D. Anderson Cancer Center (EUA)/CureTech Ltd (Israel)

Fonte: elaborado pelo autor. *As principais causas para descontinuação dos estudos foi a falta de financiamento e problemas no fornecimento do imunobiológico.

APÊNDICE F – RAIOS DE GIRO NOS EIXOS X, Y E Z PARA OS SCFVS NOS COMPLEXOS P10-DLL1 E P12-DLL1



Fonte: elaborado pelo autor. Os itens (A), (B) e (C) correspondem ao raio de giro nas replicatas 1, 2 e 3 do complexo P10-DLL1 respectivamente; já os números (D), (E) e (F) representam o raio de giro nas três replicatas do sistema P12-DLL1. As linhas preta, cinza e cinza claro indicam as variações nos eixos x, y e z, respectivamente.

APÊNDICE G – ENERGIA TOTAL DOS COMPLEXOS P10-DLL1 E P12-DLL1

Fonte: elaborado pelo autor. Os gráficos (A) e (B) ilustram a energia total em função do tempo nos complexos P10-DLL1 (tons de vermelho) e P12-DLL1 (tons de verde), respectivamente.

**APÊNDICE H – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A
REPLICATA 1 DO COMPLEXO P10-DLL1**

Mutação	Contribuições Polares			Contribuições não-polares				
	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG não polar	ΔG solv, não polar	ΔG vdW	ΔG_{bind}	$\Delta\Delta G_{bind}$
-	-21,94	113,66	-135,59	-75,49	-8,35	-67,11	-97,42	-
LEU11ALA	-22,54	112,11	-134,66	-72,96	-8,14	-64,82	-95,49	1,93
GLN43ALA	-22,85	111,66	-134,51	-73,25	-8,19	-65,06	-96,11	1,31
MET93ALA	-22,18	112,01	-134,20	-72,68	-8,33	-64,32	-94,86	2,55
LEU112ALA	-22,85	111,97	-134,80	-69,55	-8,19	-61,35	-92,38	5,03
GLN165ALA	-22,33	112,49	-134,82	-74,63	-8,33	-66,30	-96,97	0,45

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores de ΔG e $\Delta\Delta G$ estão dados em kcal/mol.

**APÊNDICE I – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A
REPLICATA 2 DO COMPLEXO P10-DLL1**

Mutaç�o	Contribui�es Polares			Contribui�es n�o-polares				
	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG n�o polar	ΔG solv, n�o polar	ΔG vdW	ΔG_{bind}	$\Delta\Delta G_{bind}$
-	-23,69	170,51	-194,20	-70,24	-8,78	-61,47	-93,93	-
LEU11ALA	-24,83	168,24	-193,08	-67,56	-8,47	-59,11	-92,43	1,50
GLN43ALA	-24,62	166,88	-191,50	-68,35	-8,57	-59,80	-92,98	0,95
MET93ALA	-23,86	170,24	-194,11	-68,14	-8,76	-59,37	-92,00	1,93
LEU112ALA	-25,00	169,41	-194,42	-65,25	-8,62	-56,65	-90,25	3,67
GLN165ALA	-23,38	169,05	-192,43	-69,62	-8,76	-60,83	-93,00	0,93

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores de ΔG e $\Delta\Delta G$ estão dados em kcal/mol.

**APÊNDICE J – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A
REPLICATA 3 DO COMPLEXO P10-DLL1**

Mutação	Contribuições Polares			Contribuições não-polares				
	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG não polar	ΔG solv, não polar	ΔG vdW	ΔG_{bind}	$\Delta\Delta G_{bind}$
-	2,77	77,21	-74,44	-71,19	-7,92	-63,24	-68,42	-
LEU11ALA	0,66	74,37	-73,70	-68,19	-7,64	-60,54	-67,52	0,90
GLN43ALA	2,65	77,21	-74,56	-71,08	-7,92	-63,15	-68,42	0
MET93ALA	2,74	76,40	-73,66	-68,45	-7,83	-60,61	-65,68	2,74
LEU112ALA	1,71	74,63	-72,91	-66,13	-7,71	-58,39	-64,41	4,01
GLN165ALA	2,46	76,98	-74,54	-70,86	-7,92	-62,93	-68,40	0,02

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores de ΔG e $\Delta\Delta G$ estão dados em kcal/mol.

**APÊNDICE K – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A
REPLICATA 1 DO COMPLEXO P12-DLL1**

Mutação	Contribuições Polares			Contribuições não-polares				
	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG não polar	ΔG solv, não polar	ΔG vdW	ΔG_{bind}	$\Delta\Delta G_{bind}$
-	130,55	357,55	-226,99	-99,81	-11,60	-88,2	30,73	-
TYR101ALA	125,53	351,19	-225,66	-93,12	-11,01	-82,13	32,38	1,65
ASP102ALA	133,82	395,07	-261,24	-98,90	-11,56	-87,34	34,91	4,18
LEU104ALA	130,60	357,60	-226,97	-99,76	-11,60	-88,15	30,85	0,12
SER125ALA	130,98	357,91	-226,92	-99,81	-11,58	-88,20	31,16	0,43
TYR161ALA	126,85	350,86	-224,01	-93,72	-11,03	-82,68	33,12	2,39
ARG220ALA	139,27	320,36	-181,09	-96,75	-11,56	-85,24	42,53	11,8
PHE223ALA	127,75	355,25	-227,50	-93,55	-11,29	-82,25	34,20	3,46
LEU225ALA	130,57	357,57	-226,99	-99,50	-11,60	-87,89	31,07	0,34

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores de ΔG e $\Delta\Delta G$ estão dados em kcal/mol.

**APÊNDICE L – RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A
REPLICATA 2 DO COMPLEXO P12-DLL1**

Mutação	Contribuições Polares			Contribuições não-polares				
	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG não polar	ΔG solv, não polar	ΔG vdW	ΔG_{bind}	$\Delta\Delta G_{bind}$
-	127,16	329,24	-202,08	-103,75	-11,15	-92,60	23,40	-
GLU57ALA	128,11	278,70	-150,59	-102,67	-10,86	-91,81	25,41	2,00
VAL99ALA	126,92	329,01	-202,08	-103,13	-11,10	-92,02	23,76	0,35
LEU104ALA	127,16	329,22	-202,06	-103,68	-11,15	-92,52	23,47	0,07
ARG220ALA	134,92	300,73	-165,80	-101,19	-11,10	-90,09	33,70	10,29
PHE223ALA	125,27	326,93	-201,65	-98,42	-11,03	-87,39	26,84	3,43
LEU225ALA	127,23	329,32	-202,08	-103,46	-11,15	-92,31	23,76	0,35

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores de ΔG e $\Delta\Delta G$ estão dados em kcal/mol.

**APÊNDICE M - RESULTADOS DO CÁLCULO DE MM/PBSA PARA A
REPLICATA 3 DO COMPLEXO P12-DLL1**

Contribuições Polares				Contribuições não-polares				
Mutação	ΔG polar	ΔG solv, polar	ΔG Coul	ΔG não polar	ΔG solv, não polar	ΔG vdW	ΔG_{bind}	$\Delta\Delta G_{bind}$
-	113,33	291,03	-177,70	-95,68	-10,70	-85,00	17,65	-
TYR101ALA	109,82	286,35	-176,53	-89,56	-10,15	-79,41	20,27	2,62
ASP102ALA	115,21	318,40	-203,18	-97,06	-10,72	-86,34	18,15	0,50
ARG220ALA	116,34	275,31	-158,97	-94,15	-10,70	-83,45	22,18	4,53
PHE223ALA	112,37	290,00	-177,65	-89,08	-10,48	-78,60	23,28	5,63
LEU225ALA	113,21	290,89	-177,70	-94,53	-10,70	-83,81	18,67	1,02

Fonte: elaborado pelo autor. Os valores de ΔG e $\Delta\Delta G$ estão dados em kcal/mol.

APÊNDICE N – ANÁLISE DE *HOT-SPOTS* NO COMPLEXO P10-DLL1

Resíduo	Robetta ($\Delta\Delta G$; (kcal/mol)	DrugScore ($\Delta\Delta G$; (kcal/mol)	KFC2- A	KFC2- B	HotRegion	PREDHS
9	0,93	0,25	-0,52	-0,67	Hot-spot	Hot-spot
11	1,18	1	-0,91	-0,64	-	Hot-spot
41	-	-	-	-	-	Hot-spot
43	3,43	0,13	-1,50	-0,88	Hot-spot	-
91	2,84	0,54	0,44	-0,23	Hot-spot	Hot-spot
92	-	-	-	-	-	Hot-spot
93	1,03	0,48	0,75	0,26	Hot-spot	Hot-spot
95	-	0,23	-0,69	-0,01	-	Hot-spot
110	-	-	-	-	Hot-spot	-
112	2,04	1,59	1,36	0,28	Hot-spot	Hot-spot
114	0,01	0,58	0,98	-0,17	Hot-spot	Hot-spot
165	0,37	0,34	-1,73	-0,45	Hot-spot	Hot-spot

Fonte: elaborado pelo autor.

APÊNDICE O - ANÁLISE DE *HOT-SPOTS* NO COMPLEXO P12-DLL1

Resíduo	Robetta ($\Delta\Delta G$; (kcal/mol)	DrugScore ($\Delta\Delta G$; (kcal/mol)	KFC2- A	KFC2- B	HotRegion	PREDHS
50	1,08	0,80	1	0,28	Hot-spot	Hot-spot
57	2,43	1,06	1,07	-0,06	-	-
99	-0,11	0,71	0,6	0,02	Hot-spot	-
101	3,02	2,32	0,88	0,12	Hot-spot	Hot-spot
102	1,40	3,77	1,76	0,04	Hot-spot	Hot-spot
104	-	0,13	-0,42	-0,11	-	Hot-spot
105	1,67	0,82	-0,92	-0,71	Hot-spot	-
125	0,77	0,55	0,32	-0,62	Hot-spot	Hot-spot
161	3,70	4,46	0,89	0,09	Hot-spot	Hot-spot
178	0,93	1,81	0,40	0	Hot-spot	-
220	1,38	0,34	1,07	0,33	Hot-spot	-
223	3,43	1,35	1,38	0,28	Hot-spot	Hot-spot
225	0,46	0,49	1,15	0,24	Hot-spot	-

Fonte: elaborado pelo autor.