



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

ANDRIELLY HENRIQUES DOS SANTOS COSTA

DESCRIÇÃO DE SÍTIO CRÍPTICO INÉDITO E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
LIGANTES PARA A PROTEÍNA PD-L1 POR DINÂMICA MOLECULAR COM
COSSOLVENTES

FORTALEZA

2022

ANDRIELLY HENRIQUES DOS SANTOS COSTA

DESCRIÇÃO DE SÍTIO CRÍPTICO INÉDITO E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
LIGANTES PARA A PROTEÍNA PD-L1 POR DINÂMICA MOLECULAR COM
COSSOLVENTES

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

Orientador: Dr. João Hermínio Martins da Silva.

Coorientador: Dr. Geraldo Rodrigues Sartori

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C87d

Costa, Andrielly Henriques dos Santos.

Descrição De Sítio Críptico Inédito E Identificação De Novos Ligantes Para A Proteína PD-L1 Por Dinâmica Molecular Com Cossolventes / Andrielly Henriques dos Santos Costa. – 2022.
94 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.

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

Coorientação: Prof. Dr. Geraldo Rodrigues Sartori.

1. PD-L1. 2. Cossolvente. 3. Simulação de dinâmica molecular. I. Título.

CDD 660.6

ANDRIELLY HENRIQUES DOS SANTOS COSTA

DESCRIÇÃO DE SÍTIO CRÍPTICO INÉDITO E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS
LIGANTES PARA A PROTEÍNA PD-L1 POR DINÂMICA MOLECULAR COM
COSSOLVENTES

Dissertação apresentada ao Curso 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: Biologia computacional.

Aprovada em: 29 / 04 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Manuela Leal da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Roberto Dias Lins Neto
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - PE)

A Deus, por ser meu guia nessa jornada que é a vida.

Aos meus pais, Iran Medeiros da Costa e Josefa Adriana Santos Costa, por todo o amor, carinho e cuidados investidos em mim.

A Clesiano Rodrigues, Igor Henriques, Iago Henriques e Elaine Oliveira, por dar luz aos meus dias.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Dr. João Hermínio Martins da Silva, pela excelente orientação, pela confiança, pelos anos de aprendizado na carreira acadêmica e pela oportunidade em trabalhar em um ambiente inspirador.

Ao Dr. Geraldo Sartori, pelo auxílio na execução deste projeto. Pelos conselhos, paciência, por aguçar meu senso crítico e pelos ensinamentos nesse período.

Aos professores e doutores participantes da banca examinadora, Manuela Leal da Silva e Roberto Dias Lins Neto pelo tempo empregado na leitura, avaliação do trabalho e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus colegas do grupo de Modelagem, Simulação e Evolução, in sílico, de biomoléculas da Fiocruz-CE, em especial, Aline Albuquerque, Beatriz Chaves, Disraeli Vasconcelos e Luca Milério, pelas discussões científicas, pela troca de conhecimento, pelos momentos de descontração e por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável.

À Fiocruz Ceará por disponibilizar a infraestrutura necessária para a realização do projeto e a todos os servidores e colaboradores da instituição.

Aos meus amigos de graduação e pós-graduação, em especial, Luzia Zeferino, Paulo Eduardo Cavalcante e Everson Magalhães, pelas reflexões, conselhos, momentos de descontração, companheirismo e apoio.

“O conhecimento é uma aventura interminável na borda da incerteza.” (FRANK HERBERT, 1965).

RESUMO

O bloqueio da via de *checkpoint* PD-1–PD-L1 tem ganhado destaque no tratamento de tumores com alta instabilidade gênica, de forma que o entendimento sobre o modo de interação entre as proteínas da via vem dando suporte para o desenvolvimento de inibidores efetivos da classe de anticorpos, peptídeos e pequenas moléculas. Entretanto, o uso de pequenas moléculas para a modulação de PD-L1 apresenta limitações, tendo em vista a baixa susceptibilidade da região de interface à interação com essa classe de moléculas, o que abre espaço para busca de novas cavidades. Dessa forma, a investigação de sítios crípticos (sítios oclusos transientes) aparece como uma alternativa para a modulação da proteína PD-L1. Pesquisas nessa área têm sido aplicadas para o desenvolvimento racional de fármacos para proteínas de interesse farmacológico com baixo potencial de interação com pequenos ligantes. Nesse contexto, ferramentas *in silico* surgem como uma abordagem efetiva para busca de novas cavidades e compreensão da dinâmica estrutural dos sistemas. O presente trabalho teve como objetivo a identificação de um novo sítio críptico na PD-L1 através de simulações de dinâmica molecular com cossolvente (MixMD), bem como a investigação de um ligante para a cavidade alvo. Mostramos que sondas apolares aromáticas foram mais efetivas para interagir com a superfície da PD-L1. Em destaque, o benzeno foi responsável pela exposição de um sítio críptico, que se mostrou altamente flexível, possuindo duas aberturas transitórias. A análise preditiva do *drugscore* (0,84) sugere que a cavidade pode ser modulada por pequenas moléculas. Ademais, a triagem virtual identificou o fármaco indacaterol, que mostrou induzir efeito semelhante à seleção conformacional na interface de PD-L1. A descrição energética dos complexos com a proteína sugere que o indacaterol desfavorece a interação da PD-L1 com a PD-1, mostrando resultados promissores para a seleção de novos fármacos. Dessa forma, o trabalho sugere novas regiões de interação que podem ser alvo para o desenho racional de moléculas e para o tratamento de doenças oncológicas, assim como um possível ligante a ser utilizado como ponto de partida.

Palavras-chave: PD-L1; cossolvente; simulação de dinâmica molecular.

ABSTRACT

Blockage of the PD-1–PD-L1 checkpoint pathway has emerged as a promising treatment for tumors with high gene instability. Understanding the mode of interaction between the proteins involved in this pathway has supported the development of effective inhibitors of the class of antibodies, peptides, and small molecules. However, the use of small ligands for PD-L1 modulation has limitations given the low susceptibility of the interface region to interact with this class of molecules, hence opening space for the search for new cavities. In this context, the investigation of cryptic sites (transient occluded sites) emerges as an alternative for the modulation of the PD-L1 protein. Research in this emerging field has allowed the rational development of the drugs for proteins of significant pharmacological interest and low potential for interaction with small ligands. Accordingly, *in silico* tools emerge as a powerful approach in searching for new cavities and understanding systems' structural dynamics. Thus, the present work aimed to identify a new cryptic site in PD-L1 through molecular dynamics simulations with cosolvent (MixMD) and investigate a small molecule for the target cavity. We showed that nonpolar aromatic probes were more effective in interacting with the surface of PD-L1. Prominently, benzene was responsible for exposing a cryptic site close to the C'D loop. This cavity proved to be highly flexible, having two transient openings. The predictive analysis of the drugscore (0.84) suggests that small molecules can act modulating such a cavity. Furthermore, virtual screening identified the indacaterol, which has been shown to induce an effect like conformational selection at the PD-L1 interface. The energetic description of the protein complexes suggests that indacaterol disfavors the interaction of PD-L1 with PD-1, showing promising results for the selection of new drugs. Thereby, this work suggests new PD-L1 interaction regions that can be targeted for the rational design of molecules for the treatment of oncological diseases, as well as a possible ligand to be used as a starting point.

Keywords: PD-L1; cossolvents; molecular dynamic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	14
Figura 2	– Sinalização intracelular da PD-1.....	18
Figura 3	– Estrutura tridimensional da PD-L1.....	20
Figura 4	– Pequenos ligantes bloqueadores de PD-L1 desenvolvidos pela empresa Bristol-Myers Squib (BMS).....	22
Figura 5	– Estrutura geral de compostos patenteados como bloqueadores da via PD-1 - PD-L1.....	23
Figura 6	– Bloqueio da região de interface proteína-proteína da PD-L1 pelo ligante BMS- 202.....	25
Figura 7	– Representação da abertura de um sítio críptico.....	26
Figura 8	– Variação do RMSD ao longo das simulações de PD-L1 com cossolvente.....	37
Figura 9	– Flutuação quadrática média dos átomos pesados da PD-L1.....	38
Figura 10	– Fator de deslocamento da porção IgV do cristal 5JDS.....	39
Figura 11	– Somatório de contatos entre sonda/ resíduo.....	41
Figura 12	– Somatório de interações entre o benzeno e a PD-L1.....	42
Figura 13	– Destaque dos resíduos para um novo sítio exposto através da interação com benzeno.....	43
Figura 14	– Representação estrutural dos sítios preditos com uso da dinâmica molecular com cossolvente.....	44
Figura 15	– Somatório de interações para os ligantes de PD-L1 reportados na literatura.....	45
Figura 16	– Representação da alteração estrutural para abertura de novo sítio em PD-L1, representada pela rotação da Tyr81.....	47
Figura 17	– Volume do sítio para as replicatas das simulações com cossolvente.....	48
Figura 18	– Descrição da abertura das duas entradas do sítio separadamente (C2 e C3) e concomitantemente (C2C3).....	51
Figura 19	– Descrição da abertura do sítio para a replicata de 500 ns com benzeno.....	52
Figura 20	– Representação dos estados de maior população assumido pelo benzeno.....	53
Figura 21	– Estados conformacionais das sondas para as replicatas com benzeno.....	54

Figura 22	– Estados conformacionais das sondas para a simulação estendida com benzeno.....	55
Figura 23	– Estruturas cristalográficas com presença de água na região do sítio.....	56
Figura 24	– Predição de pockets através do DogSite.....	57
Figura 25	– Conformações adotadas pelo sítio críptico durante as simulações com benzeno.....	60
Figura 26	– Variação estrutural da alça C''D.....	61
Figura 27	– Distribuição de frequência de moléculas que possuem determinados intervalo de afinidade para cada estrutura da proteína selecionada para o ensemble docking.....	62
Figura 28	– Estrutura bidimensional das moléculas selecionadas para interação com sítio críptico em PD-L1.....	63
Figura 29	– RMSD das moléculas selecionadas através do docking proteína-ligante....	66
Figura 30	– Desvio quadrático médio dos ligantes indacaterol e ácido picossulfúrico para as replicatas curtas e estendidas.....	67
Figura 31	– Representação tridimensional do posicionamento dos ligantes na cavidade e diagrama bidimensional das interações para o indacaterol.....	68
Figura 32	– Representação tridimensional do posicionamento dos ligantes na cavidade e diagrama bidimensional das interações para o ácido picossulfúrico.....	69
Figura 33	– Sistemas tridimensionais adotados para estudo da interface de PD-L1.....	71
Figura 34	– Variabilidade conformacional dos resíduos de interface de PD-L1 para as simulações convencionais (cMD).....	73
Figura 35	– Variabilidade conformacional dos resíduos de interface de PD-L1 para as simulações aceleradas (GaMD).....	74
Figura 36	– Energia livre de ligação para os complexos binários e ternários.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos anti-PD-L1 aprovados para o tratamento de câncer.....	21
Tabela 2 – Pequenas moléculas desenvolvidas para bloqueio da PD-L1.....	21
Tabela 3 – Perfil de interação das sondas orgânicas.....	30
Tabela 4 – Média dos parâmetros físicos para as cavidades preditas através da simulação com cossolvente.....	46
Tabela 5 – Filtros para seleção da cavidade aberta.....	50
Tabela 6 – Predição de ensaio ADMETox para os ligantes-alvo para sítio em PD- L1.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Caracterização do problema	13
<i>1.1.1</i>	<i>Oncogênese</i>	15
<i>1.1.2</i>	<i>Panorama atual sobre o tratamento do câncer</i>	15
1.2	Imunoterapia	16
<i>1.2.1</i>	<i>A via de checkpoint imunológico PD-1 – PD-L1</i>	17
<i>1.2.2</i>	<i>PD-L1 como alvo oncológico</i>	19
1.3	Problematização	24
1.4	Novas estratégias de modulação proteica – busca por sítios críticos	25
1.5	Técnicas computacionais	27
1.6	Hipótese	27
2	OBJETIVO GERAL	29
2.1	Objetivos específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Simulação de dinâmica molecular com cossolvente	30
<i>3.1.1</i>	<i>Parametrização das sondas orgânicas</i>	30
<i>3.1.2</i>	<i>Seleção da estrutura proteica</i>	31
<i>3.1.3</i>	<i>Preparo dos complexos e protocolo de rotina das simulações</i>	31
3.2	Simulação de dinâmica molecular acelerada gaussiana	32
3.3	Análise de trajetória	33
<i>3.3.1</i>	<i>Desvio quadrático médio (RMSD)</i>	33
<i>3.3.2</i>	<i>Flutuação média quadrática (RMSF)</i>	33
<i>3.3.3</i>	<i>Análise dos contatos não nativos</i>	33
<i>3.3.4</i>	<i>Análise de componente principal (PCA)</i>	34
<i>3.3.5</i>	<i>Clusterização</i>	34
<i>3.3.6</i>	<i>Análise do volume das cavidades</i>	34
3.4	Triagem virtual de moléculas	34
<i>3.4.1</i>	<i>Preparo do banco de moléculas</i>	35
<i>3.4.2</i>	<i>Seleção das poses de docking</i>	35
<i>3.4.3</i>	<i>Rotina de docking</i>	36
<i>3.4.4</i>	<i>Seleção das moléculas ativas</i>	36
3.5	Cálculo de energia livre de interação (MM/GBSA)	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

4.1	Avaliação da eficiência da técnica	37
4.1.1	<i>Estabilidade proteica</i>	37
4.1.2	<i>Análise de contatos entre sonda-proteína</i>	39
4.2	Descrição de regiões de interação para a PD-L1	41
4.3	Identificação dos sítios e validação estrutural	44
4.3.1	<i>Estudo das regiões descritas na literatura</i>	45
4.3.2	<i>Proposição de um sítio alvo</i>	46
4.4	Investigação de novo sítio crítico de ligação da PD-L1	47
4.4.1	<i>Estudo da dinâmica de abertura do sítio</i>	49
4.4.2	<i>Estados conformacionais assumidos pelo sítio crítico</i>	52
4.4.3	<i>Evidências experimentais da cavidade</i>	56
4.4.4	<i>Avaliação da estrutura como alvo terapêutico</i>	57
4.5	Triagem virtual de moléculas	58
4.5.1	<i>Avaliação da variabilidade conformacional da cavidade</i>	59
4.5.2	<i>Seleção de ligantes para PD-L1</i>	61
4.6	Avaliação da modificação conformacional da interface PD-L1 – PD-1	70
4.7	Descrição energética dos sistemas	75
5	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A – SOMATÓRIO DE INTERAÇÕES ENTRE O COSSOLVENTE E A PD-L1. OS CONTATOS ESTÃO MARCADOS EM ESCALA DE CORES QUENTES, QUE VARIA ENTRE O BRANCO (SEM CONTATO), O AMARELO (VALOR MÉDIO DE CONTATOS) E O VERMELHO (NÚMERO MÁXIMO DE CONTATOS).	88
	APÊNDICE B – ESTADOS CONFORMACIONAIS DOS COSSOLVENTES NA CAVIDADE EM PD-L1.	90
	APÊNDICE C – VALORES DE AFINIDADE PARA AS POSES RESULTANTES DO DOCKING RECEPTOR-LIGANTE (KCAL/MOL).	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

O fluxo correto de todos os processos em um organismo é direcionado pela organização espaço-temporal de cada evento, assim como pela correlação e coordenação dos intermediários que compõem cada reação. Essa ideia de paralelismo é mantida ao longo de todos os níveis de organização de um indivíduo, desde a primeira cascata de sinalização até o movimento final de um grupo muscular. A comunicação e a ordem entre as reações metabólicas são o que permitem que um ser vivo mantenha a homeostase, reafirmando que o fino equilíbrio que rege as partes influencia diretamente ao todo (LEHNINGER, 2009).

Quando especificamos o microambiente tecidual, é possível entender como as células mantêm sua capacidade de autopreservação sem prejudicar o ambiente adjacente. Esse comportamento é exemplificado durante a morte celular programada, quando uma célula reconhece uma série de padrões internos ou responde à estímulos que ameaçam a vida do organismo, como mutações seriadas ou infecção viral. De modo inverso, a proliferação de uma unidade é controlada pelo conjunto de células das imediações através do balanço de espaço para expansão e a disponibilidade de recursos para o tecido – interleucinas, hormônios e segundos mensageiros expressos por células vizinhas possuem a capacidade de regular o crescimento celular e outras funções de uma determinada célula – de forma que a taxa metabólica da vizinhança, ou até mesmo de outros tecidos, podem alterar o seu próprio desempenho, como pode ser visto no desenvolvimento embrionário (ABBAS, 2015; ALBERTS, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dada a complexidade do metabolismo, é fácil entender que qualquer alteração fora dessa rede resulta em um dano drástico e caso não seja revertido – ou controlado – irá desencadear em prejuízo ao organismo. A maior parte das injúrias causadas em uma célula resulta em degradação de proteínas ou, em maior escala, apoptose. Por outro lado, os danos causados no código genético – mutações gênicas ou cromossômicas – podem ser propagados e permanecer nas linhagens seguintes. Dentre as mutações, algumas destas são contornadas pela maquinaria de checagem e reparo do DNA e, mesmo que haja a produção de uma proteína defeituosa, os sistemas de degradação de polipeptídeos, como a marcação por ubiquitina e recrutamento do proteassoma, são uma forma alternativas de suprimir possíveis alterações metabólicas (ABBAS, 2015; ALBERTS, 2017; LEHNINGER, 2009).

Outra parcela das mutações não é facilmente corrigida. O dano causado nos genes de proteínas regulatórias ou participantes da divisão celular – dentre eles os oncogenes e os genes supressores de tumor – são, em especial, problemáticos. Seus efeitos são acumulativos. A ausência de um componente com função reguladora inibitória ou a produção de proteínas defeituosa, que são acumuladas no citoplasma ou na membrana, resultam em danos oxidativos, instabilidade genômica e desregulação do metabolismo. Nesses casos, o próprio formato da célula, ou a composição da camada lipídica são alterados e estímulos para acionar a apoptose podem ser ignorados. Um quadro onde uma célula atinge tal estado de desordem e, ainda sim, consegue manter sua taxa de reprodução ativa, pode ser caracterizado como câncer (ABBAS, 2015; ALBERTS, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Câncer é o termo genérico utilizado para descrever uma série de doenças originadas da desordem sistêmica na maquinaria divisão celular, replicação e reparo ao DNA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de dez milhões de mortes ao redor do mundo tenham sido devido ao câncer, apenas durante 2020 (DIEGUEZ et al., 2019). No Brasil, são estimados 625 mil novos casos para cada ano do triênio 2020-2022 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). A Figura 1 destrincha a distribuição dos tipos de câncer estimados no Brasil. A incidência entre homens e mulheres possui pouca variação em termos numéricos totais, liderados pelo câncer de mama feminino, seguido do câncer de próstata.

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional de Câncer, (2019, p. 52).

Em termos de custo aos cofres públicos, o SUS destina cerca de 3,4 bilhões do seu orçamento para o tratamento oncológico (INCA, 2021). Somada ao grande número de brasileiros afetados pelo câncer, um dos motivos da necessidade desse montante se dá pela complexidade do tratamento da doença, atrelado à alta diversidade de tipos de neoplasias.

1.1.1 Oncogênese

O processo de formação de uma neoplasia inicia-se, na maioria dos casos, mediante à exposição a agentes externos. O contato prolongado com agentes químicos ou radiação ionizante são causas fortemente associadas a um ambiente de trabalho insalubre ou desconhecimento das boas práticas no manuseio de produtos tóxicos. Além disso, maus hábitos alimentares, obesidade, sedentarismo e consumo excessivo de psicoativos são exemplos de fatores de risco associados ao estilo de vida e que podem influenciar no aumento do número de casos de câncer. Doenças oncológicas também podem surgir por meio de herança hereditária, mutações aberrantes provenientes de falhas naturais da maquinaria de replicação ou com a idade avançada do indivíduo. Em geral, a formação de um tumor é um processo lento, e este pode demorar anos para ser descoberto e tratado (DIEGUEZ et al., 2019).

Cada tecido origina um tipo de célula cancerígena e, ao passo que vai progredindo, a massa tumoral adquire uma série de características que agravam o quadro do paciente. São considerados como marca registrada do câncer, dentre esses atributos estão a imortalidade, o escape do sistema imune ou a evasão de tecidos e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Tumores mais agressivos atingem tal estado de variabilidade gênica que gera subpopulações distintas dentre as próprias células, caracterizado como heterogeneidade tumoral. O sucesso e desenvolvimento de cada subclones é um fator determinante na plasticidade e progressão do tumor, o que reflete na dificuldade, tanto da realização de um diagnóstico preciso, quanto da adoção de tratamentos dedicados a cada perfil específico (MARUSYK; POLYAK, 2010; OISETH; AZIZ, 2017).

1.1.2 Panorama atual sobre o tratamento do câncer

Os métodos convencionais para o tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A cirurgia é um método invasivo que pode ser eficaz para o tratamento de tumores sólidos em estágios iniciais de desenvolvimento. É uma alternativa de baixa especificidade, que não garante a retirada de todas as células cancerígenas no tecido. A radioterapia também é um tratamento local, mas com mecanismo de ação baseado em radiação ionizante, causando agressão química no tecido e destruição da massa tumoral. Em geral, acarreta uma série de efeitos colaterais ao paciente.

A quimioterapia, por outro lado, tem ação sistêmica. Consiste na administração controlada de moléculas citotóxicas, de efeito antineoplásico, através da

via oral, intravenosa, intramuscular, entre outros. É utilizada nos casos em que as alternativas anteriores não são viáveis, mas também é usada como adjuvante para a cirurgia, como forma de eliminar células metastáticas residuais.

A escolha do tratamento varia de acordo com o tipo de câncer e a progressão da doença, apesar de que na maior parte dos casos é exigido o uso de mais de um desses métodos em conjunto. Esses procedimentos acarretam em uma série de efeitos colaterais ao paciente, são desagradáveis e possuem baixa eficácia para uma série de tipos de câncer, principalmente nos casos com alto índice de mutação e adaptação (OISETH; AZIZ, 2017).

1.2 Imunoterapia

Com o avanço da ciência moderna e das tecnologias, novas formas de tratamento têm sido buscadas para obter aumento da eficácia, especificidade ao tumor e segurança ao paciente. Essas abordagens têm buscado a modulação de componentes biológicos para realizar o ataque às células cancerígenas, como é o caso das terapias hormonais e a imunoterapia. Em especial, a imunoterapia do câncer vem se destacando pela sua especificidade e versatilidade (SCHUSTER; NECHANSKY; KIRCHEIS, 2006).

O sistema imunológico é o primeiro desafio que uma célula cancerígena precisa transpassar para garantir sua evolução e adaptação em outros tecidos. E isso ocorre devido ao sistema imune ser sensível às pequenas mudanças ocorridas no organismo. Um tumor com alta instabilidade genômica e grande exigência metabólica produz altas taxas de neoantígenos – fragmentos de proteínas mal enoveladas ou defeituosas – que se espalham pelo citoplasma e passam a compor a membrana citoplasmática (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011). Através do processo chamado imunovigilância, as células do sistema imune avaliam a viabilidade e integridade sistêmica do alvo pelo reconhecimento dessas moléculas. Assim, as células apresentadoras de antígeno (APC) realizam a captura e processamento dos fragmentos, que são incorporados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*). Dessa forma, os epítomos tumorais são apresentados aos linfócitos, por meio da interação entre o complexo MHC e o receptores de célula T (TCR, do inglês T-cell receptor), desencadeando uma resposta efetora contra o tumor (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Porém, as células cancerígenas possuem uma série de mecanismos de defesas para escapar da morte celular programada induzida pelos linfócitos. É comum que tumores apresentem a expressão de quimiocinas, citocinas e outras biomoléculas

inativadoras, como o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β), prostaglandina E2 (PGE2) (CHOUAIB et al., 1985), indolamina 2,3,dioxigenase (IDO) (KOBILISH et al., 2010), conhecidas pela indução metabólica da conversão de uma célula-T efetora em regulatória (OISETH; AZIZ, 2017). Outro mecanismo usado para burlar o sistema imune é o uso de das vias de regulação inibitórias para inativar células-T, como as vias CTLA-4 (do inglês, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) e PD-1 (do inglês, Programmed cell death protein-1) (SCHUSTER; NECHANSKY; KIRCHEIS, 2006), (VANDENBORRE et al., 1999), (MESQUITA JÚNIOR; SILVA, 2010).

A imunoterapia é uma forma de tratamento que se baseia na modulação do sistema imune para contornar os mecanismos de proteção desenvolvidos pelas células tumorais. Em geral, tem-se como alvo os processos discutidos anteriormente – desde a apresentação de antígenos, até a inibição do linfócito – de forma que os imunoterápicos possuem formulações e mecanismos de ação bastante variados, como o uso de linfócitos engenheirados, chamados de células CAR-T (XUE et al., 2021), (PORTER et al., 2011), a imunização através de vacinas contra neoantígenos (DAS et al., 2021), (HARZSTARK; SMALL, 2006; SCHWARTZENTRUBER et al., 2011) ou o uso de bloqueadores contra as vias inibitórias do sistema imune (LEE; LEE; HEO, 2019), (MICHOT et al., 2016), (KEIR et al., 2008), (GURAM et al., 2019).

São produtos na fronteira do desenvolvimento, idealizados com base em um grande conhecimento sobre a área e elaborados com uso da tecnologia de DNA recombinante e ferramentas de edição gênica complementares. Esse fator reflete no alto custo de produção dos imunoterápicos, o que se torna um grande limitante na aplicação do tratamento. Uma outra limitação do tratamento é o balanço correto entre a aplicação do fármaco e a reação do sistema imune no organismo. Para certos pacientes o uso de alguns imunoterápicos causam reações adversas imunomediadas, como endocrinopatias, colite e hepatite. É fato que a imunoterapia ainda pode ser amplamente explorada e possui um grande potencial no tratamento de doenças oncológicas.

1.2.1 A via de checkpoint imunológico PD-1 – PD-L1

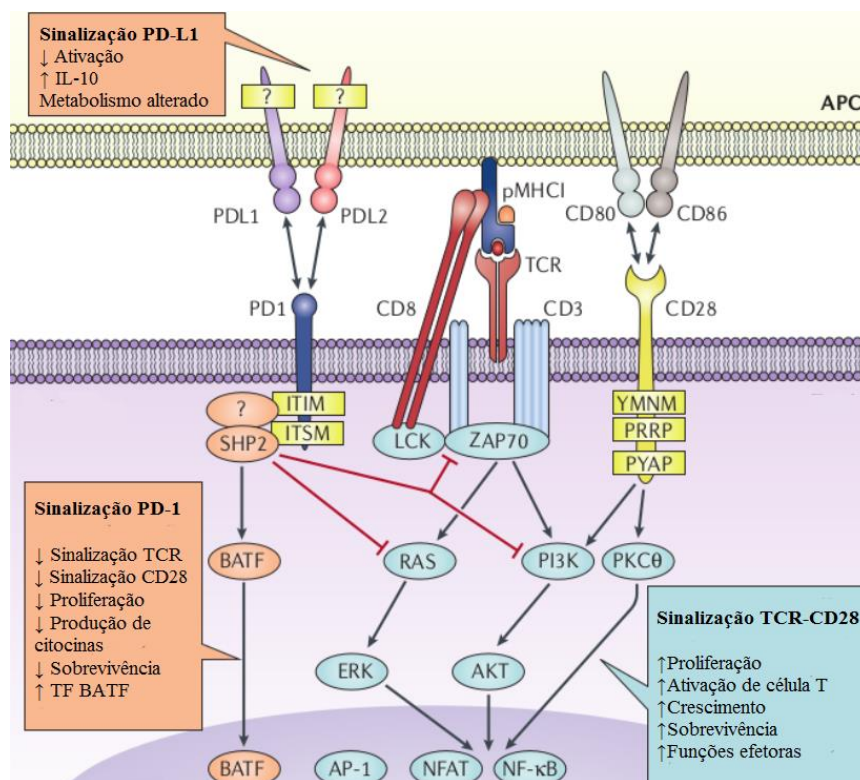
Dentre as imunoterapias, o bloqueio das vias inibitórias tem obtido grande destaque nos últimos anos (JACOB; JACOB; PARAJULI, 2021; LEE; LEE; HEO, 2019; LIU et al., 2021a). As células normais passam por uma checagem periódica realizada pelo sistema imune e essa comunicação é complexa e sensível, para garantir um que haja um balanço entre a indução de uma resposta efetora destrutiva e a tolerância aos epítomos nativos. As vias inibitórias são responsáveis pela segurança dos tecidos normais,

controlando quadros de inflamação ou impedindo que haja reações autoimunes, sendo a via PD-1 uma das principais vias estudadas como alvo terapêutico.

Principal proteína desta via, a proteína de morte celular programada-1 é expressa na membrana dos linfócitos ativados, células NK (do inglês, natural killer), linfócitos B, células dendríticas, entre algumas outras células do sistema imune. É uma proteína composta por um domínio IgV-like, um domínio transmembrana e um domínio intracelular com dois motivos inibitórios, o motivo imunoreceptor de inibição baseado em tirosina (ITIM) e o motivo imunoreceptor comutador (*switch*) baseado em tirosina (ITSM) (DAËRON et al., 2008).

O evento de inativação do linfócito está representado na Figura 2. O linfócito inicia os estímulos para a propagação celular, ativação das funções efetoras, para atingir o estado de aptidão ao combate de organismos estranhos.

Figura 2 – Sinalização intracelular da PD-1.



Fonte: Adaptado de Nature Reviews *Immunology*. (2018). As caixas de texto em azul representam uma cascata de sinalização positiva, induzida pelo reconhecimento de um epítipo através dos TCRs e as setas cinzas indicam a interação positiva entre as proteínas. Em laranja estão representados os efeitos da ativação da via PD-1 – PD-L1 e as setas vermelhas demarcam a relação proteína-proteína inibitória. As caixas em amarelo indicam as porções intracelulares conhecidas e desconhecidas [?].

Nesse contexto, a proteína transmembranar PD-1 é ativada mediante interação com seus ligantes, PD-L1 ou PD-L2, no domínio IgV-like localizado na porção extracelular. No estado ligado, os dois domínios intracelulares baseados em tirosina encontram-se fosforilados, o que induz o recrutamento de proteínas fosfatases, como a

SHP2 (Src homology 2 domain–containing tyrosine phosphatase 2) e deflagra uma cascata de sinalização inibitória na célula pela inativação de cinases, como fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K), cinase regulada pela sinalização extracelular (ERK), fosfolipase C γ (PLC γ), entre outras (PHARES et al., 2009; YAO et al., 2009). O resultado é a inativação das funções efetoras do linfócito e inibição dos sinais de crescimento e proliferação celular.

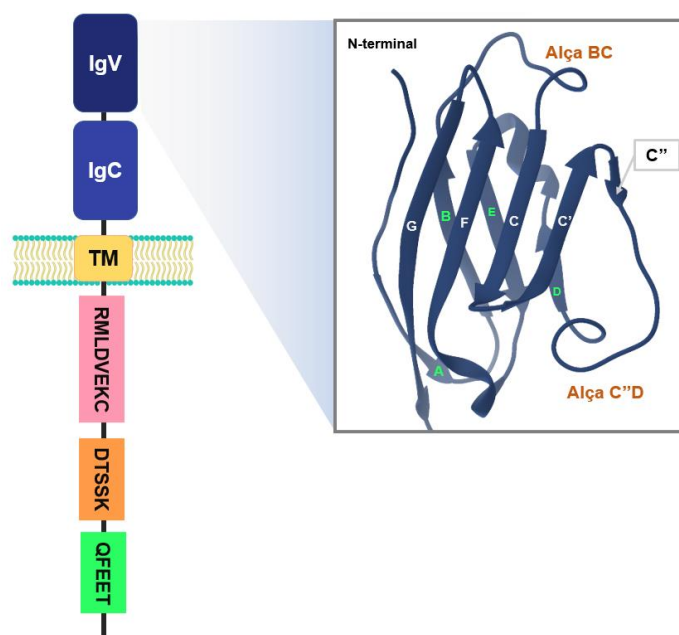
Como citado anteriormente, a ligação PD-1 com seus ligantes PD-L1 ou PD-L2 desempenha uma função importante de proteção durante a checagem de um tecido saudável. Sinais inibitórios causados pela formação do complexo PD-1-ligante limitam as respostas imunes exacerbadas, impedindo que reações autoimunes ocorram. Entretanto, essa via se torna um mecanismo de escape para os tipos de tumores que apresenta a superexpressão da PD-L1. De forma que, mesmo que sejam direcionados para acionar mecanismos de ataque ao tumor, os linfócitos circulantes serão inativados pela via de *checkpoint* e tornam-se incapazes de induzir a morte celular no tumor, o que se torna um fator positivo para a progressão do tumor (ESCORS et al., 2018; MICHOT et al., 2016).

1.2.2 PD-L1 como alvo oncológico

Nesse contexto, a PD-L1 se tornou um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos, inicialmente pelo controle do sistema imune, devido à importância biológica da PD-1 na regulação do linfócito e proteção dos tecidos saudáveis. Além disso, existem evidências que associam a PD-L1 com funções secundárias, como envolvimento na captação de glicose, que podem contribuir para sobrevivência do tumor (CHANG et al., 2015).

A PD-L1 (também conhecida como CD274 ou B7H1) é um receptor de membrana tipo I, com uma porção semelhante a imunoglobulina variável (IgV) e uma porção imunoglobulina constante (IgC) na região extracelular, seguidos de uma cadeia transmembrana e uma porção intracelular curta com três sequências de aminoácidos conservadas entre os mamíferos, os motivos DTSSK, QFEET e RMLDVEKC. A região de maior importância na PD-L1 é a interface de interação com a proteína PD-1, que corresponde à superfície GFCC' da porção IgV (Figura 3) (AHMED; BARAKAT, 2017; ESCORS et al., 2018).

Figura 3 – Estrutura tridimensional da PD-L1.



Fonte: Adaptado de Escors et al. (2018). As porções extracelulares estão representadas em azul. O domínio transmembrana (TM) está representado em amarelo, cercado pela bicamada lipídica. Em rosa, laranja e verde estão representados os domínios intracelulares da PD-L1. O quadro destaca a porção IgV em detalhes estruturais. A legenda das fitas da região de interface com PD-1 está em grafia branca e a legenda da interface oposta em verde. As regiões de alça estão identificadas por legendas em cor terra.

Os resíduos Tyr56, Arg113, Met115 e Tyr123 em PD-L1 são considerados como *hotspots* necessários para estabelecer a comunicação entre as proteínas. Juntos formam um pequeno *pocket* que comporta a Ile132 em PD-1 e essa interação é flanqueada pelos resíduos Asn66, Tyr68, Leu128, Ile126, Ile134 e Glu136 (DING; LIU, 2019; LIM et al., 2019; SHI et al., 2018).

Atualmente existem três inibidores de PD-L1 aprovados para o tratamento de doenças oncológicas, todos da classe de anticorpos (mAB), como pode ser visto na Tabela 1. Esses fármacos possuem o uso limitado quando referido aos tipos de câncer que possuem aprovação para uso, apesar de que algumas dessas biomoléculas estarem em fase de testes para outros tipos de câncer, como melanoma, carcinoma hepatocelular (atezolizumab) e carcinoma de células renais (avelumab). Apesar disso, o uso do tratamento baseado em anticorpos tem mostrado resultados bastante promissores, seja o uso exclusivo ou o combinado com outros tipos de terapia (ESCORS et al., 2018; LIU et al., 2021a; WU et al., 2019).

A escolha desse método de tratamento é feita para casos de alta prevalência de mutações somáticas, quando a quimioterapia e a cirurgia são ineficazes. Esse perfil geralmente é associado com tumores de rápida progressão e maior agressividade (ALEXANDROV et al., 2013).

Tabela 1 – Anticorpos anti-PD-L1 aprovados para o tratamento de câncer.

Nome	Ano de aprovação	Tipos de tumor	Citação
Atezolizumab	2016	Carcinoma urotelial	(RITTMAYER et al., 2017)
		Câncer pulmonar	
		Câncer de mama triplo negativo	
Avelumab	2016	Tumor de Merkel metastático	(KAUFMAN et al., 2016)
		Carcinoma urotelial metastático	
Durvalumab	2017	Carcinoma urotelial metastático	(ANTONIA et al., 2017)
	2018	Câncer pulmonar	

Fonte: Elaborado pela autora.

Ademais, outras classes de moléculas se encontram em fase de testes. A Tabela 2 destaca os pequenos ligantes desenvolvidos para interação com a região de interface de PD-L1. A abordagem com pequenas moléculas também pode ter efeitos diferentes na proteína, como o desenvolvimento de moléculas que induzem a degradação da PD-L1 ou agem diretamente na expressão do gene (AHMED; BARAKAT, 2017; ZHONG et al., 2019).

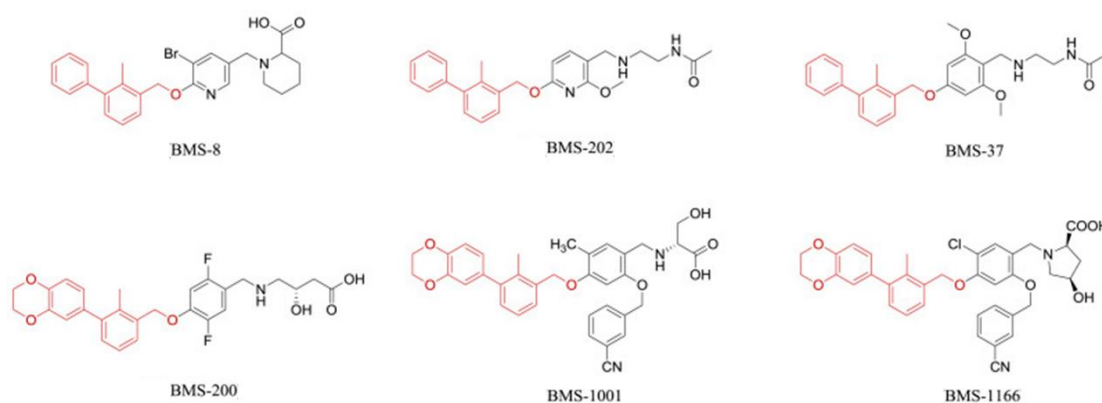
Tabela 2 – Pequenas moléculas desenvolvidas para bloqueio da PD-L1.

Nome	Alvo	Tipos de tumor	Citação
BMS-202	Bloqueio da interação PD-1–PD-L1	-	(ZAK et al., 2016)
CA-170		Câncer de pulmão	(SASIKUMAR; RAMACHANDRA, 2018)
TPP-1		Câncer de pulmão	(SUN et al., 2016)
AUNP-12		Melanoma	(SASIKUMAR et al., 2011)
DPPA-1		Câncer de cólon	(LI et al., 2018)
JQ1	Inibição da expressão	Linfoma	(FANG et al., 2014)
PlatycodinD		Câncer de pulmão	(HUANG et al., 2019)
Osimertinib		Câncer de pulmão	(WANG; KLIONSKY, 2003)
eFT508		Câncer de fígado	(AZUMA et al., 2014)
PD-LYLSO	Degradação da PD-L1	-	(LIM et al., 2016)
Metformin		Câncer de mama	(CHA et al., 2018)

Fonte: Adaptado de Wu et al., (2019)

Pequenos ligantes bloqueadores da interface de interação são desenvolvidos para induzir a dimerização da PD-L1. Em geral, essas moléculas possuem uma estrutura bem definida e possuem o grupamento bifênil como núcleo de interação com o dímero. A estabilidade é garantida pela compactação hidrofóbica (BAILLY; VERGOTEN, 2020; GANESAN et al., 2019; SHI et al., 2018). A empresa Bristol-Myers Squibb (BMS) é pioneira no desenvolvimento de ligantes para a região de interface, possuindo diversos compostos em estudo, como as moléculas BMS-202, BMS-8 (ZAK et al., 2016), BMS-200, BMS-37 (GUZIK et al., 2017), BSM-1001 (SKALNIAK et al., 2017), BMS-936559 (SHI et al., 2018), BMS-105 (PERRY et al., 2019) e BMS-1166 (MUSZAK et al., 2021), exemplificados na Figura 4. Algumas dessas formulações apresentam citotoxicidade, sendo uma limitação na encontrada durante os ensaios clínicos.

Figura 4 – Pequenos ligantes bloqueadores de PD-L1 desenvolvidos pela empresa Bristol-Myers Squib (BMS).

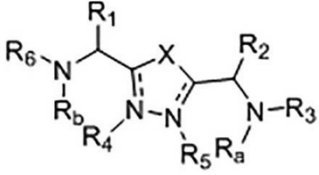
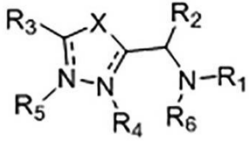
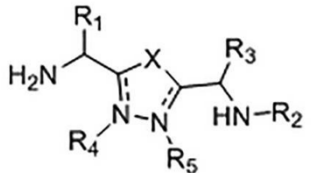
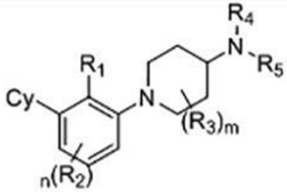
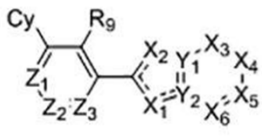
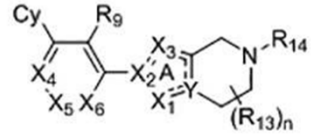
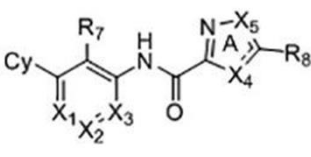
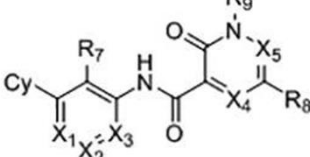
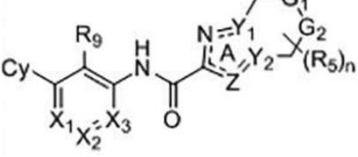
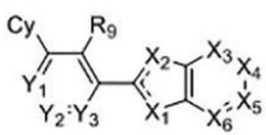
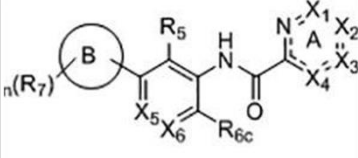
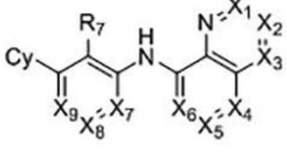
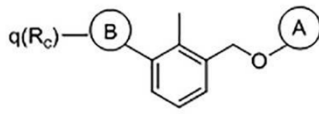
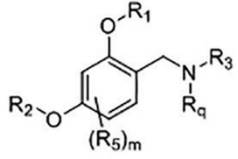
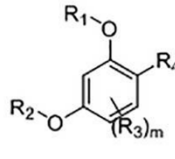
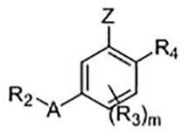
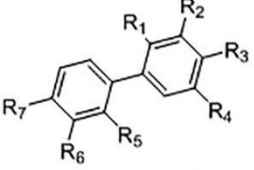
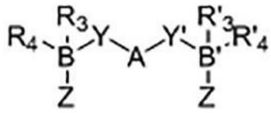
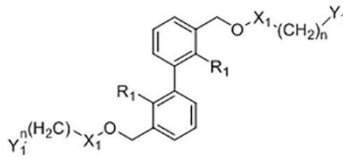
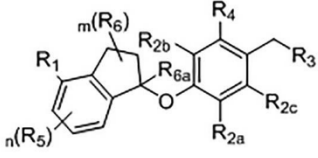
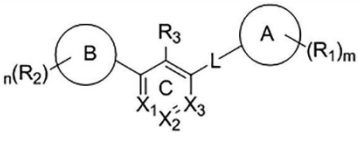


Composto	Scarffold	IC ₅₀ (nM)	Estequiometria	Hotspot de interação
BMS-8		146	1:2	Tyr56, Met115, Ile116, Ala121 e Tyr123
BMS-202	(2-metil-3-bifenilil) metanol	18	1:2	Tyr56, Met115, Ile116, Ala121 e Tyr123
BMS-37		6 – 100	1:2	Tyr56, Met115, AAla121, BGIln66 e AAsp122
BMS-200	[3-(2,3-dihidro-1,4-	80	1:2	Tyr56, Ala121, Met115, AThr20, BGIln66
BMS-1001	benzodioxina-6-il)-2-	2,25	1:2	ATyr56, AAsp122, ALys124, ATyr123,
BMS-1166	metilfenil] metanol	1,4	1:2	AArg125
				ATyr56, BTyr123, BArg125, BLys124

Fonte: Adaptado de LIN et al., 2020. Em vermelho está destacado o grupamento bifênil.

Entretanto, existe uma série de variações estruturais baseadas no grupamento bifênil, inclusive desenvolvidas por diferentes empresas, conforme pode ser visto na Figura 5. Todas se baseiam na construção de um centro aromático capaz de induzir a dimerização e todos os ligantes interagem primordialmente com os resíduos Tyr56, Arg113, Met115 e Tyr123.

Figura 5 – Estrutura geral de compostos patenteados como bloqueadores da via PD-1 - PD-L1.

 <p>Aurigene Discovery Technologies Ltd.</p>	 <p>Aurigene Discovery Technologies Ltd.</p>	 <p>Aurigene Discovery Technologies Ltd.</p>
 <p>Incyte Corporation</p>	 <p>Incyte Corporation</p>	 <p>Incyte Corporation</p>
 <p>Incyte Corporation</p>	 <p>Incyte Corporation</p>	 <p>Incyte Corporation</p>
 <p>Incyte Corporation</p>	 <p>Incyte Corporation</p>	 <p>Incyte Corporation</p>
 <p>Bristol-Myers Squibb</p>	 <p>Bristol-Myers Squibb</p>	 <p>Bristol-Myers Squibb</p>
 <p>Bristol-Myers Squibb</p>	 <p>Bristol-Myers Squibb</p>	 <p>Arising International LLC.</p>
 <p>Polaris Pharmaceuticals Inc.</p>	 <p>Chemocentryx Inc.</p>	 <p>Guangzhou Maxinovel Pharmaceuticals</p>

Fonte: Adaptado de SHAABANI et al., 2018. Na legenda está o nome da companhia que patenteou o composto.

De fato, existem limitações acerca da aprovação do uso de pequenos ligantes. Algumas dessas moléculas podem apresentar promiscuidade ou dúvidas em relação à interação com a via, como é o caso do CA-170. Existem contradições quanto à eficácia do CA-170 e indícios de que a molécula não interage com a PD-1 ou PD-L1 (MUSIELAK et al., 2019; SHAABANI et al., 2018).

1.3 Problematização

Tendo em vista a PD-L1 como alvo farmacológico, entende-se que existem certas problemáticas no desenho de novos bloqueadores para a proteína. É evidente que os anticorpos ainda possuem um grande potencial a ser explorado. Entretanto, o desenvolvimento de novos mABs, apesar de parecer a estratégia mais próxima do sucesso – visto que todas as moléculas aprovadas são dessa classe – está ligado à uma série de limitações, como imunogenicidade causada por múltiplas dosagens ou a indução de efeitos adversos imuno-relatados, que podem provocar lesões cutâneas, inflamação (pneumonite e miosite) e trombocitopenia imune. Apesar da eficácia da aplicação de anticorpos monoclonais, a maior problemática do uso é que apenas uma pequena parcela dos pacientes respondem ao tratamento, dependendo do tipo de câncer (LEE et al., 2016; LIN et al., 2020; SHAABANI et al., 2018).

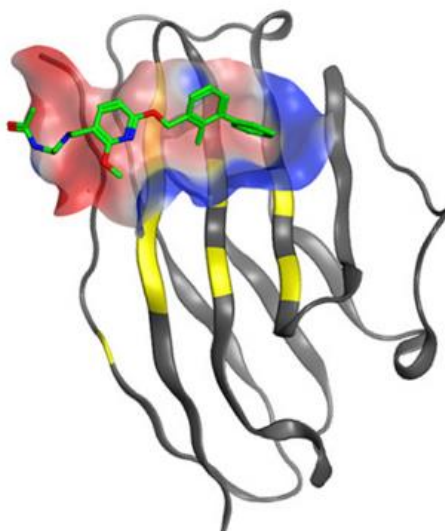
Anticorpos também possuem limitações farmacocinéticas, como baixa penetrabilidade nos tecidos, tempo de meia-vida longo (que é a provável causa dos efeitos adversos imuno-relatados) e baixa biodisponibilidade oral. Além disso, outras questões surgem na produção dessas biomoléculas. A produção heteróloga de proteínas exige um ambiente controlado e o uso de plataformas seguras, livre de contaminante. Geralmente essas plataformas são células de mamíferos, que demandam grandes volumes de meios de cultura complexos e de alto custo. A produção também é um problema em termos de escalonamento, exigindo tecnologias avançadas e investimento de maquinarias complexas (SCHMIDELL et al., 2001). A produção de anticorpos é de grande complexidade, o que reflete no alto valor de mercado do produto (BECKMAN; WEINER; DAVIS, 2007; SCHWEIZER; SERNO; GOEPFERICH, 2014).

A busca por pequenos ligantes inibidores para PD-L1 é um estratégia complementar para contornar os problemas inerentes aos anticorpos. Essas moléculas possuem características farmacocinéticas que conferem certas vantagens, como a alta penetrabilidade nos tecidos, um tempo de meia-vida curto, podem ser administradas pela via oral, além do processo de síntese ser mais barato do que o dos anticorpos e escalonável.

Pequenos ligantes podem ser usados como quimioterápicos para o tratamento de tipos de câncer de alta taxa de mutações somáticas. Conforme discutido no tópico 1.2.2, muitos grupos de pesquisa e empresas já vislumbram essa possibilidade desde o início das pesquisas com a via de checkpoint imunológico. De fato, já está publicado quais grupamentos químicos possuem melhor desempenho visando a região de interface de PD-L1 (Figura 5).

Focando no uso voltado para a PD-L1, a grande problemática para os pequenos ligantes é o sítio alvo. As regiões de interação proteína-proteína possuem características físico-químicas desfavoráveis para a interação com pequenas moléculas – a interface planar e hidrofóbica tem poucos pontos de ancoragem (Figura 6), diferente de um *pocket* concavo, que pode rodear a molécula e criar um microambiente de carga e polaridade ideais para garantir a afinidade (BEGLOV et al., 2018). Assim, a investigação de novas cavidades e o desenho racional de moléculas se mostram como necessidades para enriquecer a diversidade de fármacos disponíveis.

Figura 6 – Bloqueio da região de interface proteína-proteína da PD-L1 pelo ligante BMS-202.



Fonte: Adaptado de YANG; HU, 2019. PD-L1 representada em cinza (PDB ID 5J89), com os *hotspots* de interação destacados em amarelo. BMS-202 representado em verde (*stick*). Superfície colorida em vermelho, branco e azul, representando regiões hidrofílicas, neutras e lipofílicas, respectivamente.

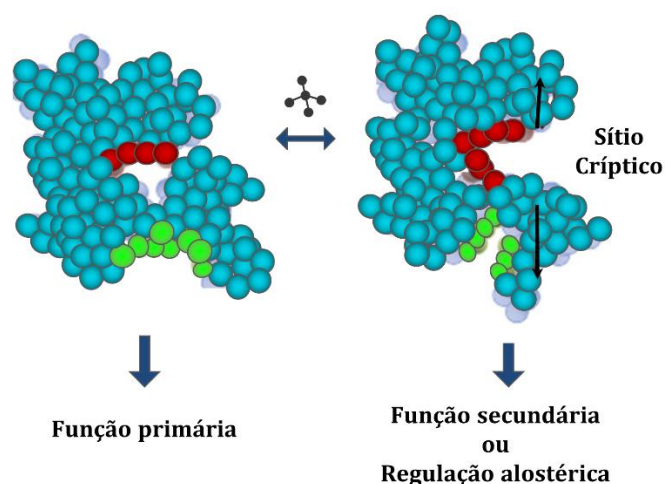
1.4 Novas estratégias de modulação proteica – busca por sítios críticos

O desenvolvimento de inibidores para a PD-L1 atualmente explora especificamente a região de interface com a PD-1, de modo que as estratégias para desassociação do complexo PD-1 – PD-L1 se baseiam, até então, no bloqueio físico das proteínas. É um sítio saturado, mas com pouca informação sobre a rede de interações com

outras partes da proteína. Apesar de não haver indícios de que a PD-L1 sofre modulação alostérica, podem existir cavidades ainda inexploradas na superfície da proteína que ampliem as opções disponíveis para proposição de ligantes que modulem o papel da proteína nas condições de superexpressão da PD-L1.

Tais cavidades podem ser sítios crípticos, pequenos *pockets* oclusos que possuem baixa interação com o meio (solventes e íons) na proteína em sua forma não-ligada. Geralmente se encontram distantes do sítio ativo da proteína e são expostos após uma mudança conformacional induzida por ligante, seja diretamente com o sítio ou indiretamente, em regiões adjacentes (Figura 7). É uma alternativa adotada para modular alvos biológicos relevantes, mas que não são passíveis de regulação pelas vias convencionais (BEKKER et al., 2021; COMITANI; GERVASIO, 2018; VAJDA et al., 2018).

Figura 7 – Representação da abertura de um sítio críptico.



Fonte: Elaborado pela autora. As esferas representam uma proteína monomérica. A região colorida em verde representa o sítio ortostérico da proteína. A porção em vermelho representa os resíduos do sítio críptico.

O problema com esse tipo de cavidade é a limitação na detecção dessas regiões e compreensão dos mecanismos envolvidos. A maior parte dos sítios crípticos descritos experimentalmente foram encontrados de modo inesperado, por vezes através da interação da proteína com o solvente ou ligante durante o processo de cristalização (BEGLOV et al., 2018). Em compensação, sítios crípticos têm sido propostos e descritos com precisão por intermédio das ferramentas computacionais. O estudo *in silico* das estruturas permite compreender as mudanças conformacionais na proteína em escalas nanométrica, com alta resolução e acurácia, principalmente pelo uso da dinâmica molecular com cossolvente (MixMD) (BEGLOV et al., 2018; UNG et al., 2016).

1.5 Técnicas computacionais

A biologia computacional é uma área de grande contribuição para a pesquisa com biomoléculas, que permite acompanhar processos biológicos com precisão e acurácia. Técnicas computacionais envolvidas nessa área permitem transpassar limitações metodológicas encontradas em técnicas experimentais. Toma-se como exemplo a modelagem de proteínas de difícil cristalização, a predição da interação proteína-ligante a nível atômico ou acompanhar a dinâmica de uma proteína (ou um conjunto de proteínas) em solvente explícito. Desta forma, as ferramentas *in silico* são uma opção viável a previsão do comportamentos de sistemas complexos, que possuem estudo limitado por meio de outras técnicas, o que tem servido na integração de dados e barateamento de custos (VERLI, 2014).

A simulação de dinâmica molecular (DM) é uma excelente alternativa para o estudo de sítios crípticos. A DM permite a flexibilização do sistema através do cálculo de campos de força, vibração das moléculas, ligação dos átomos e outros descritores que regem as interações interatômicas. Através desta técnica é possível acompanhar o movimento de abertura e fechamento de regiões oclusas e entender a flutuação estrutural dentro de um período (MOMTAZ; POSTOW, 2014). As simulações são realizadas de modo a mimetizar as condições ambiente em que a proteína está naturalmente inserida, como densidade e volume dentro das condições normais de temperatura e pressão, assim como concentração adequada de íons e pH semelhante ao fisiológico.

Como a exposição de sítios crípticos demanda a presença de ligantes, tem-se observado a adoção de simulações na presença de sondas orgânicas, também chamado cossolvente (MixMD) (BANSIA et al., 2021; BEKKER et al., 2021; COMITANI; GERVASIO, 2018; VAJDA et al., 2018). Esse tipo de técnica permite que pequenas moléculas explorem a superfície da proteína gradativamente, induzindo alterações estruturais e rearranjo das ligações, favorecendo a exposição de cavidades oclusas. Dentro da problemática do câncer, a busca por novas cavidades em PD-L1 se mostra uma alternativa para o uso de pequenas moléculas para a modulação da proteína, de modo que este trabalho pode contribuir com novos achados para a área de desenvolvimento de fármacos.

1.6 Hipótese

O câncer é um problema prioritário de saúde pública. As características intrínsecas da doença refletem na problemática do diagnóstico precoce e no tratamento adequado, de forma que cada tipo de tumor exige um estudo prévio que permita a adoção

de medidas específicas para o seu tratamento. Nesse contexto, novas abordagens de tratamento, como as imunoterapias, têm surgido como alternativa aos tratamentos convencionais, visando aumento da eficácia do tratamento e segurança ao paciente. Dentre as imunoterapias, tem-se dado grande destaque ao bloqueio da via de *checkpoint* imunológica PD-1–PD-L1.

Dado o alto custo de produção, baixa penetrabilidade de tecidos e imunogenicidade de anticorpos, observa-se a oportunidade do uso de pequenas moléculas como uma alternativa viável. São facilmente escalonáveis, possuem alta penetrabilidade nos tecidos, podem ser administradas por diferentes vias de acesso e são mais fáceis de alcançar o sistema público de saúde.

As pequenas moléculas desenvolvidas para bloqueio da PD-L1 são todos voltados para a região de interface, porém, o formato planar e a prevalência de resíduos hidrofóbicos dessa região dificulta o desenvolvimento de novos ligantes. Assim, sítios crípticos se tornam uma alternativa para a proposição de novos moduladores. Frente a isso, este trabalho teve como hipótese que a interação-chave da via PD-1 – PD-L1 pode ser modulada por meio de pequenas moléculas que se liguem em sítios localizados fora da região de interface. Para este fim, a estratégia adotada neste trabalho foi o uso de ferramentas computacionais como forma de estudar todo o processo, inicialmente destrinchar a superfície proteica em busca de novas cavidades, bem como prever a estabilidade e flutuação da região após contato com o ligante e o solvente e sugerir novos ligantes para a região alvo que possam induzir efeitos negativos na região de interface com PD-1.

De fato, a busca por novas cavidade se revela como uma alternativa mediante o panorama atual de fármacos desenvolvidos para PD-L1. Um novo sítio críptico para a proteína possibilita a variabilidade de estratégias desenvolvidas para o bloqueio da via de *checkpoint* imunológico e contribui para que possam ser desenvolvidos novas alternativas para o tratamento de doenças oncológicas.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi descrever um novo sítio críptico para a proteína PD-L1, propor o redirecionamento de um ligante como potencial modulador e avaliar o efeito deste na interação com a PD-1.

2.1 Objetivos específicos

- a) Descrever as alterações conformacionais em PD-L1 induzidas pela interação com o solvente;
- b) Identificar novos sítios de interação para PD-L1;
- c) Descrever as características intrínsecas da nova cavidade selecionada como sítio críptico;
- d) Identificar ligantes de alta afinidade para interação no sítio críptico;
- e) Descrever a influência da abertura da cavidade na região de interação proteína-proteína;
- f) Descrever influência da presença do ligante na cavidade para a interação PD-L1 – PD-1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Simulação de dinâmica molecular com cossolvente

3.1.1 Parametrização das sondas orgânicas

A simulação de dinâmica molecular (DM) é uma técnica de grande importância no estudo de macromoléculas, que permite acompanhar o comportamento de sistemas a nível atômico (VERLI, 2014). A DM consiste no cálculo de movimentos atômicos como estiramento, torções e rotações, tendo como base a adoção dos princípios da mecânica clássica. Dessa forma, é possível acompanhar eventos moleculares como interação entre proteína e ligante ou calcular a energia de interação entre biomoléculas, no decorrer de uma fração temporal. O princípio da DM se baseia na adoção de campos de força para o cálculo da trajetória, que podem ser descritos um conjunto de funções matemáticas para parametrizar o comportamento dos átomos, como informações de carga e massa, atreladas a informação da vibração das moléculas e ligação entre os átomos (GHANAKOTA; CARLSON, 2016; MAIER et al., 2015). No conjunto geral, a simulação de dinâmica molecular permite definir um ambiente químico com condições de densidade e pressão de acordo com o encontrado na natureza. O pH – mais precisamente, o estado de protonação dos resíduos – e a concentração salina também são termos que podem ser definidos para se assemelhar com o fisiológico (VERLI, 2014).

O uso de simulações com cossolvente (MixMD) tem sido amplamente adotado para busca de novas cavidades em uma série de estudos, principalmente na busca de sítios crípticos (BANSIA et al., 2021; BEGLOV et al., 2018; BEKKER et al., 2021; COMITANI; GERVASIO, 2018). Para este trabalho foram escolhidas cinco sondas orgânicas com diferentes características químicas, conforme pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3 – Perfil de interação das sondas orgânicas.

Sonda orgânica	Perfil químico	Resíduo mimético
Acetato (ACT)	Negativamente carregado	Ácido aspártico
Benzeno (BEN)	Aromático não polar	Fenilalanina
Imidazol (IMI)	Aromático heterocíclico	Histidina
N-metil-acetamida (NMA)	Alifático polar	Cadeia principal de proteínas
Fenol (PNL)	Aromático, doador/aceptor de hidrogênio	Tirosina

Fonte: Elaborado pela autora.

Nas concentrações corretas, as sondas orgânicas possuem liberdade para interagir com toda a proteína de maneira uniforme, dessa forma, a concentração utilizada foi 0,2 M (GHANAKOTA; CARLSON, 2016; UNG et al., 2016). A estrutura

tridimensional dos cossolventes foi obtida no banco de moléculas PubChem (KIM et al., 2019; WANG et al., 2009) e as cargas parciais foram derivadas através do programa R. E. D. Server (VANQUELEF et al., 2011) pelo método de derivação de cargas Restrained Electrostatic Potential (RESP) (CORNELL et al., 1993).

A obtenção dos arquivos de topologia e coordenada das moléculas de acordo com o padrão interno do programa Amber 18 (CASE et al., 2005) foram realizada pelas ferramentas Antechamber e tLEaP (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2013) , com base no campo de força General Amber Force Field 2 (gaff2) (VASSETTI; PAGLIAI; PROCACCI, 2019).

3.1.2 Seleção da estrutura proteica

A escolha da estrutura teve como base uma análise da plasticidade estrutural feita por Ahmed et al (AHMED; BARAKAT, 2017) que mostrou a discrepância entre a pose da PD-L1 co-cristalizada com o nanocorpo KN035 (código 5JDS, resolução de 1,70 Å) com as demais estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB). Assim, para a simulação com cossolvente, foram removidos o nanocorpo e demais heteroátomos do arquivo, sendo selecionado apenas o domínio IgV da PD-L1 humana (BERMAN et al., 2000; ZHANG et al., 2017). O estado de protonação dos resíduos foi determinado através do servidor PDB2PQR – PropKa, com base no pH fisiológico (7,4) (ROSTKOWSKI et al., 2011). Os resíduos ácidos e básicos foram mantidos na sua forma carregada. Para a proteína foi adotado o campo de força ff14SB (MAIER et al., 2015). As extremidades da proteína foram capeadas com os grupos N- e C-terminais (ACE e NME) e não foi necessário realizar nenhuma correção de mutação na sequência.

3.1.3 Preparo dos complexos e protocolo de rotina das simulações

A proteína foi solvatada com água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983), com a concentração salina semelhante ao fisiológico (0,16M) e concentração de 0,2M de cossolvente. A ferramenta Packmol (MARTÍNEZ et al., 2009) foi utilizada para realizar a distribuição aleatória dos componentes em torno da proteína, centralizada em uma caixa com arestas a pelo menos 15 Å de qualquer átomo da proteína em cada uma das três dimensões. O programa tLEaP foi usado para gerar os arquivos iniciais de trajetória e coordenadas para performance das simulações no Amber18.

A construção dos sistemas para execução das simulações em solvente explícito precisa passar por um tratamento prévio que envolve a relaxação do sistema, o aquecimento lento – que impacta na velocidade inicial dos átomos – e a equilibração da densidade e do volume da caixa (CERUTTI; CASE, 2019).

Inicialmente, o gradiente de minimização dos sistemas foi realizado em quatro etapas, (1) 7000 passos para acomodação das moléculas de água, com restrição de 500 kcal.mol⁻¹.Å⁻² nos demais componentes do sistema; (2) 7000 passos para ajuste dos íons, com restrição de 500 kcal.mol⁻¹.Å⁻² no cossolvente e na proteína; (3) 7000 passos para acomodação do cossolvente, com restrição de 500 kcal.mol⁻¹.Å⁻² na proteína; (4) 20000 passos sem restrição para relaxação de todo o sistema. Os sistemas foram aquecidos gradativamente durante 160 ps para a temperatura de 310 K e estabilizados nesta temperatura durante 40 ps a volume constante (*ensemble* NVT). O procedimento ocorreu com restrição da proteína e cossolvente sob constante de força 10 kcal.mol⁻¹.Å⁻² e adoção do termostato de Langevin. O ajuste de densidade ocorreu por 500 ps com restrição de 10 kcal.mol⁻¹.Å⁻² na proteína e cossolvente, seguido da equilibração da pressão do sistema (*ensemble* NPT, 1 atm) com barostato Monte Carlo e sem restrições, durante 5 ns. A produção das simulações foi executada sob temperatura e pressão constantes de 310 K e 1atm, respectivamente. A técnica de repartição de massa do hidrogênio (do inglês, *Hydrogen Mass Repartitioning*) (HOPKINS et al., 2015) foi utilizada para possibilitar um timestep de 4 fs, otimizando a capacidade de processamento. Foram realizadas dez replicatas de 50 ns para cada cossolvente adotado, somado com dez replicatas de um sistema adicional, sem cossolvente, como controle negativo das simulações. Além disso, a replicata cujo benzeno teve melhor estabilidade de interação foi estendida para 500 ns, como forma de avaliar a permanência das ligações realizadas.

3.2 Simulação de dinâmica molecular acelerada gaussiana

A dinâmica molecular acelerada gaussiana é um método de amostragem conformacional que permite a suavização do potencial energético através de uma função harmônica (MIAO; FEHER; MCCAMMON, 2015). A GaMD permite o aumento amostragem sem aplicar restrições e sem a necessidade de predefinir coordenadas de reação. Os parâmetros adotados durante a equilibração do sistema foram os mesmos adotados nas dinâmicas convencionais (cMD). O método escolhido utiliza a aplicação do impulso na energia potencial total e de diedro (dual-boost). A linha de corte para os valores de energia foi $E = V_{max}$ (sendo E uma energia referência e V o potencial máximo do sistema) e o valor máximo de desvio padrão para os dois potenciais aplicados foi de 6,0 kcal/mol. Após a etapa final da equilibração, é necessário realizada uma etapa adicional para extração do potencial energético aplicado durante a produção da GaMD. Nesta etapa, o número de passos iniciais para a cMD foi de 1.000.000, sendo 750.000

passos utilizados para o preparo da cMD. A aplicação da dinâmica acelerada gaussiana nessa etapa foi realizada por 12.500.000 passos, cujo 750.000 foram utilizados para a preparação. A energia e o desvio padrão foram calculados a cada 250.000 passos. Após a extração das energias, a produção da GaMD foi feita por 50.000.000 (200 ns) e o cálculo da energia e desvio padrão foram feitos a cada 5.000 passos. Para cada sistema foram feitas três replicatas.

3.3 Análise de trajetória

A visualização dos sistemas foi realizada através do programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) e o VMD (do inglês, Visual Molecular Dynamics) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) foi utilizado para análise visual interativa das trajetórias. A flexibilidade e variação estrutural da PD-L1 e das sondas ao longo das simulações (descritos nos subtópicos) foram analisados com o auxílio do pacote de ferramentas implementado no Ambertools, o CPPTRAJ (ROE; CHEATHAM, 2013).

3.3.1 Desvio quadrático médio (RMSD)

O RMSD reflete a variação estrutural do conjunto de frames adotada durante as simulações. A avaliação é feita com base em uma referência, que nesse trabalho foi a pose cristalográfica da 5JDS, que corresponde à estrutura inicial dos sistemas (pré-equilíbrio). Foram selecionados os átomos pesados da cadeia principal da proteína para a análise.

3.3.2 Flutuação média quadrática (RMSF)

O RMSF calcula a média geral da posição atômica para todos os frames da seleção, fornecendo então o valor médio da flutuação estrutural por resíduo. Foi adotado para compreensão da mobilidade geral dos sistemas e comparação com *b-factor* do cristal. Para análise, a estrutura de cada *frame* da trajetória foi previamente alinhada em relação à estrutura de referência, de modo a eliminar os efeitos de rotação e translação do sistema. Foram considerados apenas os átomos pesados para os cálculos.

3.3.3 Análise dos contatos não nativos

A formação de novos contatos durante a simulação é a informação primordial para descrição geral das interações realizadas entre as sondas e a proteína. Considera-se contatos nativos as interações pontuadas no primeiro frame do conjunto, assim, para acompanhar a formação de novos contatos foram analisadas as interações não nativas. Esse parâmetro é extraído ao longo do tempo, para cada resíduo e fornece o número total

de contatos – interação com uma sonda ou mais, consecutivamente – assim como o valor dos contatos consecutivos e a média de contatos. A distância máxima para pontuação foi 4 Å e a definição dos *hotspots* de interação levou em conta apenas os contatos consecutivos.

3.3.4 *Análise de componente principal (PCA)*

A PCA é uma técnica de redução de dimensionalidade que realiza a transformação das coordenadas da proteína em uma série de vetores, chamado componente principal (PC). Os componentes expressam os conjuntos de maior variação das coordenadas e projeta uma matriz bidimensional nos eixos de abcissas e coordenadas (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). Para análise da cavidade foram selecionados os átomos pesados dos resíduos Trp57, Met59, Ile64, Ile65, Tyr81, Arg84, Ala85, Lys87, Leu99, Ile101, Asp108 e Tyr112. A PCA da interface de interação PD-1 – PD-L1 considerou os resíduos Ala52, Ile54, Tyr56, Asp61, Ile64, Gln66, Val111, Arg113, Met115, Ala121 e Tyr123.

3.3.5 *Clusterização*

Aplicado no contexto da biologia estrutural, o agrupamento (clusterização) é uma técnica de análise de dados que permite explorar a variação estrutural das conformações obtidas na simulação de dinâmica molecular (SEIF, 2018). Essa análise foi realizada para agrupar as poses do benzeno na cavidade e para avaliação das conformações adotadas pela cadeia lateral dos resíduos do sítio. O algoritmo k-means foi utilizado para agrupamento dos conjuntos de dados, adotando um número de iterações máximo como 500 e tomando como base métricas de distância (RMSD). O frame inicial foi escolhido aleatoriamente e a análise foi realizada a cada dez frames.

3.3.6 *Análise do volume das cavidades*

O programa Fpocket (LE GUILLOUX; SCHMIDTKE; TUFFERY, 2009) foi utilizado para determinar o volume das cavidades na proteína. O protocolo adotado foi específico para detecção de pequenas cavidades (-m 2.8 -M 5.5 -i 3 -n 2), através do módulo mdpocket, que projeta a informação ao longo da simulação utilizando um algoritmo Monte Carlo, baseado em mosaico de Voronoi (KIM et al., 2008).

3.4 *Triagem virtual de moléculas*

A interação receptor/ ligante é um evento fundamental para o controle dos processos metabólicos, de forma que o entendimento sobre esse fenômeno é de grande

importância para a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na propagação de informação (ZHOU; RIVAS; MINTON, 2008). O *docking* molecular (também conhecido como atracamento molecular) é uma técnica computacional de alta resolução que permite a visualização do modo de interação entre proteínas e ligantes de diferentes classes, como pequenas moléculas e proteínas, assumindo um papel de grande importância para o planejamento racional de fármacos (BAEK et al., 2021; KITCHEN et al., 2004). O cálculo do *docking* se baseia em duas etapas distintas, (1) a geração das poses de interação do ligante, baseado na variação dos graus de liberdade da molécula e nas interações realizadas entre a molécula e a cadeia lateral dos resíduos, seguido da (2) predição da afinidade e classificação das estruturas por meio de funções de *scoring*. Essas funções refletem a probabilidade de a pose ser representante do modo de ligação real (SHAN et al., 2011; VERLI, 2014). Uma rotina de *docking* leva em consideração a flexibilidade apenas do ligante e assume uma conformação rígida do receptor, visando a redução do custo computacional exigido. Essa limitação pode ser contornada adotando abordagens como o *ensemble docking*, que leva em conta o uso de diversas poses da proteína contra os cálculos de *docking* (SCIOR et al., 2012).

3.4.1 Preparo do banco de moléculas

As estruturas tridimensionais das moléculas utilizadas na triagem virtual foram obtidas pela base de dados Drugbank (WISHART et al., 2018), na extensão *.sdf*. Dentre as estruturas disponíveis, foi selecionado apenas o repositório de moléculas aprovadas pelo FDA, que abrange um total de 1759 ligantes, de forma que não houve necessidade de filtrar os ligantes conforme as regras de Lipinski ou realizar predição ADMETox em etapas futuras. O programa Open Babel (O'BOYLE et al., 2011) foi utilizado para converter as estruturas para a extensão *.pdbqt* – formato exigido pelo programa de *docking* – com estado de protonação definido em pH 7,4.

3.4.2 Seleção das poses de docking

As etapas de *docking* receptor-ligante foram realizadas assumindo a abordagem semi-flexível, o que implica que o receptor adota uma conformação rígida representativa e o ligante é flexibilizado dentro da caixa de seleção para o cálculo. O *ensemble docking* foi a abordagem selecionada para aumentar a variabilidade de poses da cavidade estudada e melhorar a acurácia da seleção de moléculas.

Dessa forma, foi realizada a filtragem dos frames que possuíam a cavidade no estado aberto e posteriormente realizada uma PCA dos resíduos da cavidade (descritos no tópico 3.2.4) para seleção de seis estruturas representativas para o conjunto. As

estruturas foram convertidas para a extensão pdbqt no Autodock tools (MORRIS et al., 2009) levando em conta apenas os resíduos polares.

3.4.3 Rotina de docking

O programa Quickvina 2 (ALHOSSARY et al., 2015) foi utilizado para realizar a triagem de moléculas. A caixa foi centralizada no sítio críptico alvo ($x = 7.388$, $y = 2.479$ e $z = -5.45$) e teve como dimensões de aresta os valores $14 \times 18 \times 16 \text{ \AA}$ para os eixos x, y e z. O valor de exaustividade (do inglês, *exhaustiveness*) adotado foi 12.

3.4.4 Seleção das moléculas ativas

A escolha dos candidatos mais promissores se iniciou com o ranqueamento dos ligantes, baseado nos valores de energia de afinidade preditos pelo Quickvina2. Conforme supracitado, foi realizado um *ensemble docking* como forma de avaliar a interação entre o ligante e a região alvo, considerando a flutuação natural da região. Dessa forma, para cada ligante foi feita a média dos valores de energia obtidos nas seis estruturas submetidas. Em paralelo, como forma de considerar ligantes com interações mais fortes, foram contabilizadas as ligações de hidrogênio, de modo as poses que não realizaram esse tipo de interação de caráter mais forte tiveram seu valor de energia zerado. Os 200 melhores candidatos ranqueados sob esses critérios foram selecionados para a análise visual, que por sua vez levou em consideração a complementaridade química da molécula na cavidade, bem como grupamentos apolares alocados no interior da cavidade ou o posicionamento de grupamentos carregados ou polares voltados para o solvente.

3.5 Cálculo de energia livre de interação (MM/GBSA)

Como forma de mensurar a energia de interação entre a PD-1 e a PD-L1 nos diferentes complexos, utilizou-se o método MM/GBSA (do inglês, Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area) calculado pelo MMPBSA.py, implementado no Amber21 (MILLER et al., 2012). A energia de interação foi calculada durante a simulação individualmente para cada frames, espaçados a cada 2 ps. A molaridade da concentração salina foi definida no valor de 0,1 M e os demais parâmetros foram adotados o default do programa. Para a análise foi necessária a obtenção dos arquivos de topologia do receptor e ligante livre, bem como a exclusão de íons e água do complexo original, para isso, foi utilizado o script ante-MMGBSA.py (MILLER et al., 2012), disponível no AmberTools.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

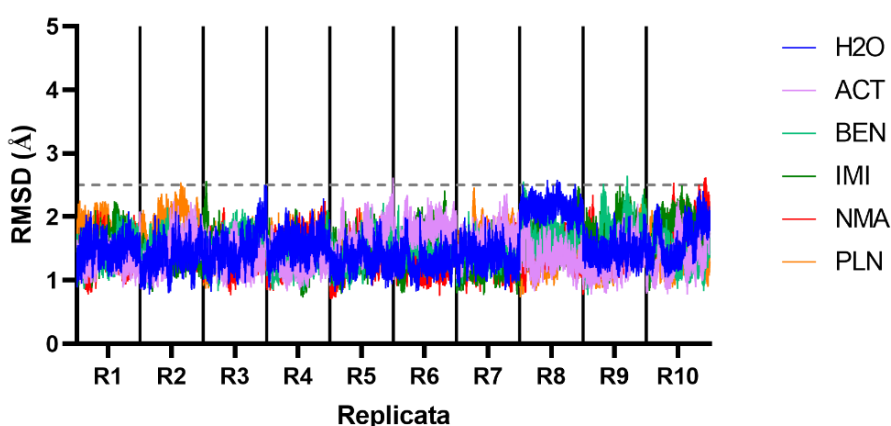
4.1 Avaliação da eficiência da técnica

O uso da dinâmica molecular com cossolvente já foi amplamente aplicado para exposição de sítios crípticos e outras cavidades em geral. Dentre os parâmetros utilizados para a avaliação da performance da técnica, a estabilidade da proteína e o número de contatos realizados entre as sondas e a cadeira lateral são dois critérios iniciais importantes, determinados pela concentração de cossolvente adotada para o sistema. Cossolventes apolares em concentração em torno de 1 M (alta concentração) podem apresentar tendência para agregar ou promover a desnaturação de sistemas proteicos. De forma oposta, sondas miscíveis em água presentes em baixas concentrações apresentam pouca eficácia e um somatório de interações com a proteína ineficiente para exposição de sítios (GHANAKOTA; CARLSON, 2016; UNG et al., 2016).

4.1.1 Estabilidade proteica

Inicialmente, o desvio quadrático médio (RMSD) foi utilizado para avaliar a estabilidade da proteína ao longo da simulação, conforme pode ser observado na Figura 8. Foram selecionados os átomos pesados da cadeia principal, levando em consideração todos os resíduos da PD-L1.

Figura 8 – Variação do RMSD ao longo das simulações de PD-L1 com cossolvente



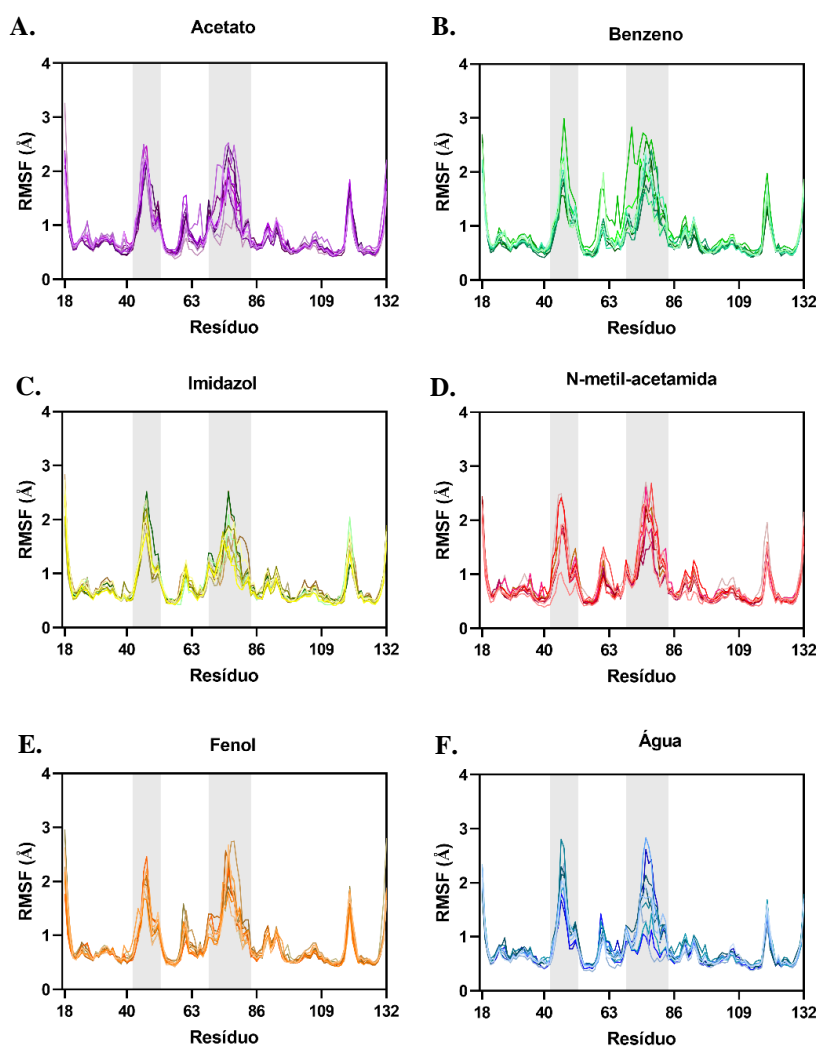
Fonte: Elaborada pela autora. As replicatas para cada sistema estão dispostas consecutivamente. As cores representam cada sistema, sendo a água, acetato, benzeno, n-metil-acetamida e fenol representado pelas cores azul, roxo, turquesa, verde, vermelho e laranja, respectivamente. A linha tracejada indica a linha de corte para indicar sistemas estáveis.

De forma geral, o RMSD observado para todas as replicatas se manteve abaixo de 2,5 Å, valor de referência na literatura adotado para descrever sistemas controlados (BOLHUIS, 2006). Isso demonstra que a presença do cossolvente não

desestabilizou a conformação proteica durante os 50 ns e grandes mudanças não foram observadas dentro da faixa de seleção, como esperado. É importante destacar que a variação da cadeia principal entre o sistema controle (com apenas água e íons) e os sistemas com cossolvente é bastante semelhante, o que corrobora com a informação anterior.

A análise de RMSD é uma descrição limitada, que reflete a relação dos resíduos selecionados como um todo, o que impossibilita visualizar regiões mais rígidas ou flexíveis da proteína. Para entender a influência exercida por cada resíduo da PD-L1 e especificar quais destes foram mais significativos na flutuação da proteína foi realizado uma análise do RMSF (Figura 9 –

Figura 9 – Flutuação quadrática média dos átomos pesados da PD-L1.



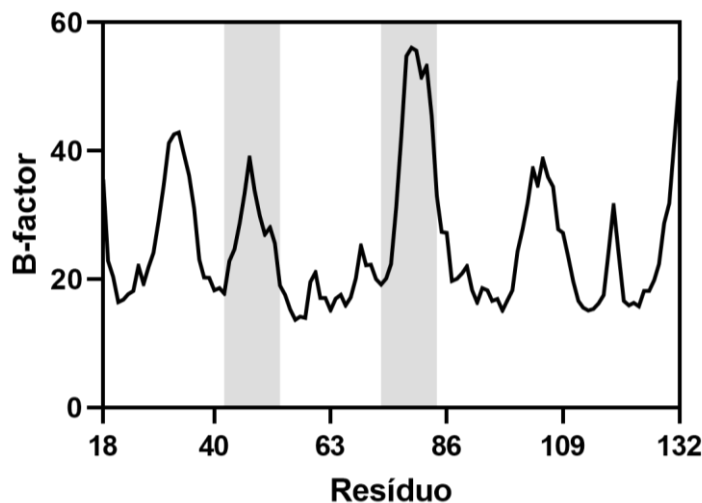
Fonte: Elaborado pela autora. Em cinza estão destacadas regiões das alças BC (42-53) e C''D (73-84) presentes na proteína. Cada replicata está representada com diferentes escalas de saturação dentro da mesma cor.

As alças BC (resíduos 42-53) e C''D (resíduos 73-84) – destaque em cinza na Figura 9 – são as regiões de maior flutuação durante a simulação, o que já era esperado,

visto que são regiões conhecidamente mais flexíveis por serem ricas em glicina (LEHNINGER, 2009). Em geral, a flutuação da posição atômica da PD-L1 possui um padrão muito semelhante entre os diferentes sistemas. Em comparação com a água, os sistemas com cossolvente possuem o deslocamento da vibração em algumas partes da proteína, como é possível observar um acentuamento do pico nas imediações do resíduo 62 (região de fita antiparalela) para duas replicatas do benzeno (Figura 9.B). O sistema de maior variação entre as replicatas foi o benzeno. Uma explicação para esse comportamento vem das características químicas da sonda. Por ser apolar e aromático, o benzeno interage bem com a superfície da PD-L1, que é predominantemente apolar.

Como forma de validar o comportamento observado na flutuação da proteína, a Figura 10 traz as informações sobre o fator de deslocamento (b-factor) para cada átomo do cristal de PD-L1. O padrão de vibração da estrutura cristalográfica é análogo ao comportamento observado na Figura 9. Durante as simulações, os pontos de maior flutuação estão presentes nas alças, assim como regiões secundárias como o resíduo 62 e o 120 se destacam nos gráficos. Comparado ao RMSF, o *b-factor* possui mais pontos de vibração na proteína, o que pode ser reflexo do efeito da desordem do cristal (VERLI, 2014).

Figura 10 – Fator de deslocamento da porção IgV do cristal 5JDS.



Fonte: Elaborado pela autora. Em cinza estão destacadas as regiões correspondentes às alças BC (42-53) e C'D (73-84).

4.1.2 Análise de contatos entre sonda-proteína

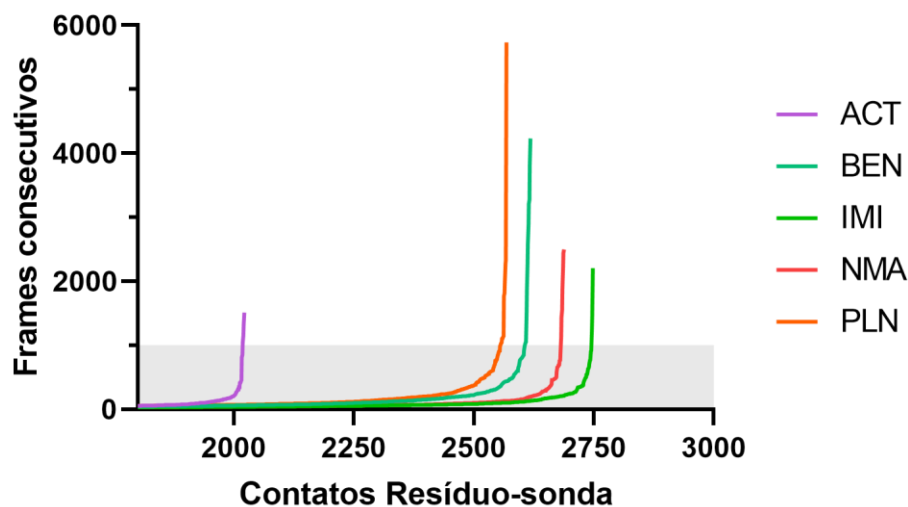
O entendimento do modo de interação entre a proteína e os diferentes tipos de sonda é a parte inicial e central da busca por novas cavidades. Como citado no tópico anterior, a concentração molar é o fator que determina o ambiente ideal para exploração de novas conformações da cadeia lateral sem que prejudique a estabilidade proteica. Em

paralelo, é necessário filtrar quais são os contatos duradouros e efetivos – futuramente chamado de *hotspot* – para que se possa definir um agrupamento de pontos de ancoragem. Um sítio é formado por vários resíduos que contribuem para formar um microambiente favorável para a interação com um ligante (PETSKO; RINGE, 2003). Assim, sendo cada resíduo um *hotspot*, um agrupamento dos *hotspots* (cluster) seria o mais próximo de descrever uma região de interação. Para a identificação desses hotspots são necessários que (1) estes tenham um número alto de contatos consecutivos, para que se possa mapear bem as regiões de real afinidade com as sondas e (2) os *hotspots* encontrados precisam ser mapeados também em outros tipos de sonda, para diminuir a chance da cavidade ser um falso-positivo (GHANAKOTA; CARLSON, 2016). A importância de analisar os contatos consecutivos se dá pelo entendimento que o tempo de contato realizado entre a cadeia lateral da proteína e a sonda reflete diretamente na estabilidade da interação. É uma forma de observar possíveis novas regiões de interação e fazer a triagem de novas cavidades. A Figura 11 apresenta a combinação de todos os contatos realizados na PD-L1, uma curva representativa para cada sistema. Corresponde, de forma geral a afinidade que cada cossolvente tem pela superfície proteica, de forma que sondas como o fenol (Figura 11, em laranja) possui alta afinidade pela superfície da proteína, ao passo que o acetato (Figura 11, em lilás) tem preferência para interagir com o solvente e baixo acesso à proteína.

Na curva laranja (fenol) é possível observar que alguns contatos realizados entre cadeia lateral e sonda chegam a quase 6000 *frames* consecutivos, o que representa 30ns de simulação. O fenol é uma sonda cíclica apolar capaz de fazer ligações de hidrogênio, o que possibilita que ocorra interação com quase todos os resíduos expostos da proteína.

Os *hotspots* foram definidos de acordo com o ponto de inflexão das curvas da Figura 11. Inicialmente, foi definida uma linha de corte de 1000 frames consecutivos (5 ns de simulação) para a triagem dos pontos de ancoragem, um valor para não impor muito rigor na seleção, mas que pudesse separar o que era ruído e o que era propriamente afinidade de interação. Dessa forma, todas as interações que adotaram mais de 1000 contatos consecutivos foram analisadas visualmente e agrupadas de acordo com a dinâmica do modo de ligação. Alguns resíduos realizaram contatos com mais de uma sonda ao mesmo tempo, isso explica o porquê dos sistemas fenol e benzeno poderem acessar valores tão altos.

Figura 11 – Somatório de contatos entre sonda/ resíduo.



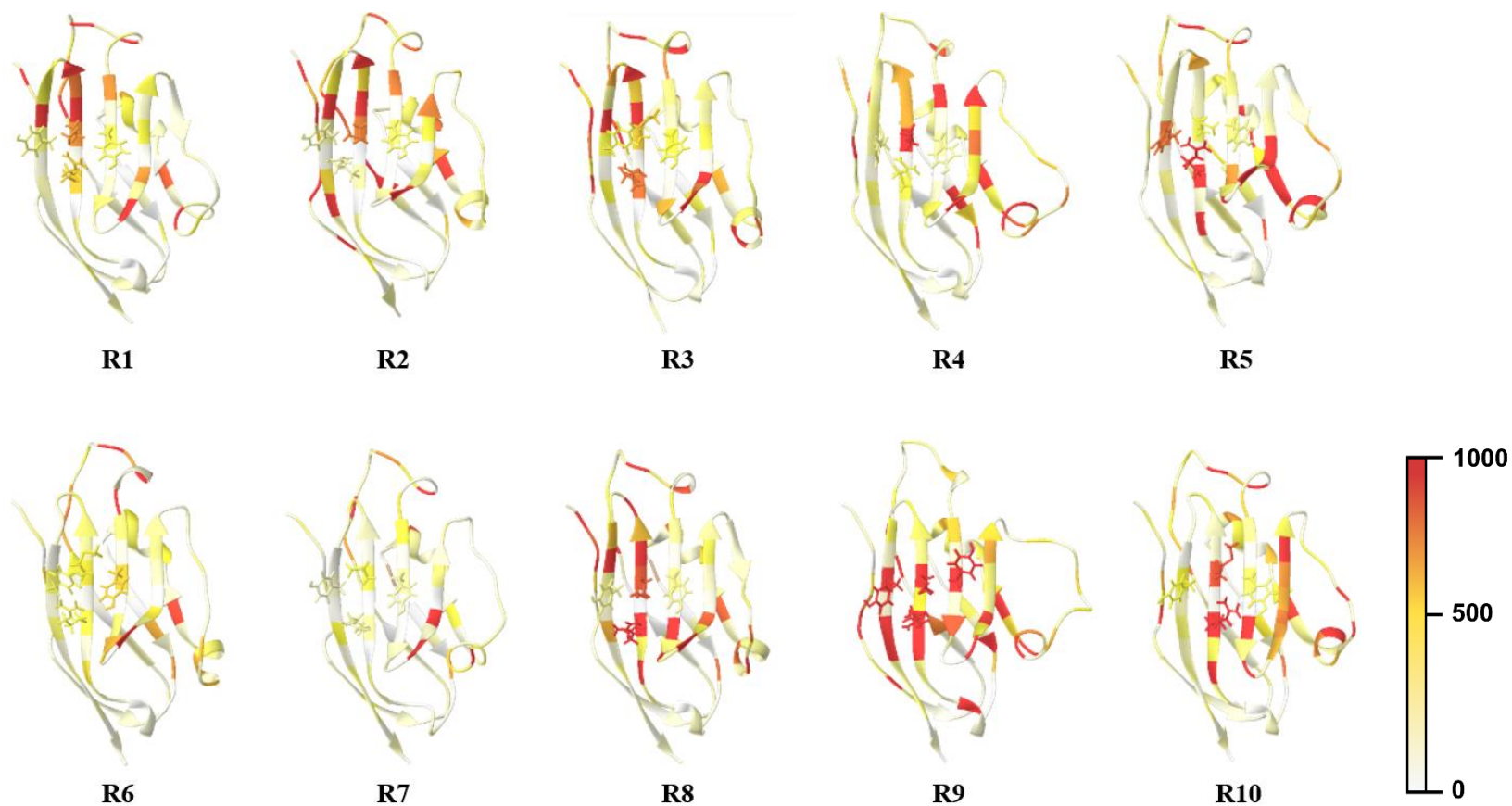
Fonte: Elaborado pela autora. Os sistemas acetato, benzeno, imidazol, n-metil-acetamida e fenol estão coloridos em lilás, ciano, verde, vermelho e laranja, respectivamente. Em cinza está representada a linha de corte para os contatos esporádicos (baixa afinidade).

Os sistemas com acetato, por outro lado, possuem poucas possibilidades de interação – a curva correspondente possui o ponto de inflexão mais precoce, com menores números de interações pontuados, assim como também realiza poucos contatos consecutivos. Isso se deve à competição entre o solvente e a superfície predominantemente apolar da PD-L1 (AHMED; BARAKAT, 2017). O acetato é um cossolvente carregado negativamente e possui preferências de interação por poucos locais na proteína.

4.2 Descrição de regiões de interação para a PD-L1

Como visto no tópico anterior, sondas polares, carregadas ou alifáticas tiveram um desempenho inferior ao das sondas cíclicas apolares (benzeno e fenol). O Apêndice 1 e a Figura 12 trazem a projeção dos valores de contatos na estrutura da PD-L1, em escala gradativa de cores quentes. O branco representa as regiões que não tiveram contato com o cossolvente, destacando regiões de baixa afinidade. Resíduos em vermelho marcam o valor da linha de corte adotada de 1000 frames consecutivos (Figura 11). De forma geral, a análise dos *hotspots* demonstrou dois comportamentos predominantes, (1) regiões de alto acesso na PD-L1 e (2) regiões de baixo acesso, com indicação de interação em poucas replicatas.

Figura 12 – Somatório de interações entre o benzeno e a PD-L1.

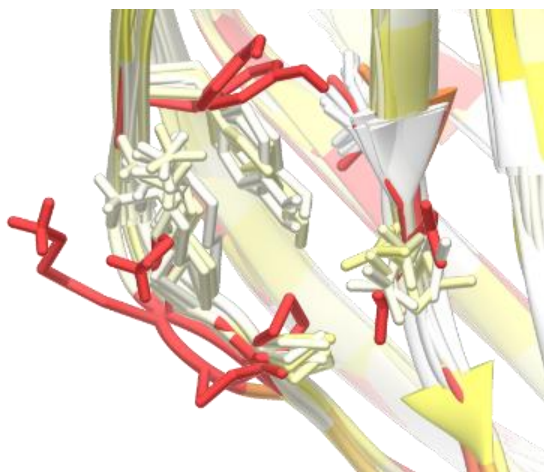


Legenda: Elaborado pela autora. Os contatos estão marcados em escala de cores quentes, que varia entre o branco (sem contato), o amarelo (até 500 *frames* consecutivos) e o vermelho (> 1000 *frames* consecutivos). Os resíduos-chave para a interação da PD-L1 com a PD-1 estão destacados em *stick*.

Regiões que se encaixam no primeiro caso descrevem áreas expostas de caráter predominantemente apolar, aparecem em várias replicatas, mesmo que o padrão varie entre as replicatas. A interface de interação proteína-proteína é um exemplo desse comportamento, conforme pode ser observado na Figura 12. A representação em *stick* na imagem representa a região-chave de interação com PD-1, caracterizada pelos resíduos Tyr56, Arg113, Met115 e Tyr123. Como é possível observar, essa região é bem acessada em todas as replicatas do benzeno, mas também em determinadas replicatas do fenol, imidazol e n-metil-acetamida (Apêndice 1).

As regiões de alça também são bastante acessadas pelas sondas de caráter apolar. No caso do acetato houve grande preferência por resíduos de arginina, glutamina e lisina, como esperado, mas poucos pontos de acesso na proteína foram detectados (Apêndice 1). Quando voltado para a busca de sítio críptico, esse tipo de comportamento é desconsiderado. Um resíduo por destacado em todas as replicatas e com valores altos de contato é considerado promiscuo, de fácil acesso, característico de regiões de grande área acessível ao solvente. Já as regiões que se encaixam na segunda situação são capazes de descrever casos que se aproximam com o perfil de um sítio críptico.

Figura 13 – Destaque dos resíduos para um novo sítio exposto através da interação com benzeno.



Fonte: Elaborado pela autora. Os contatos estão marcados em escala de cores quentes, que varia entre o branco (sem contato), o amarelo (até 500 frames consecutivos) e o vermelho (> 1000 frames consecutivos). Os resíduos-chave que compõem essa região estão destacados em *stick*.

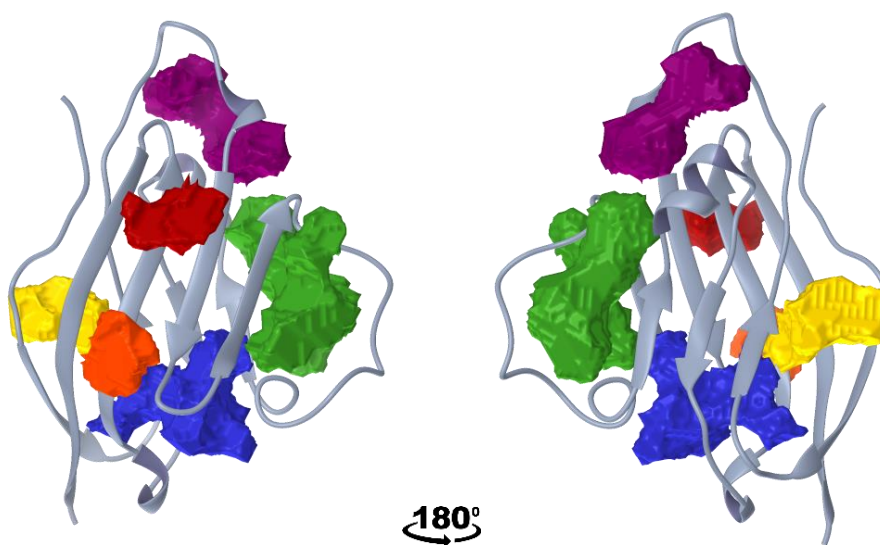
A Figura 13 exemplifica um desses casos, onde é possível observar as dez replicatas do sistema com benzeno para um sítio composto pelos resíduos Pro24, Lys25, Tyr28, Ile38 e Glu39. A maioria das replicatas tiveram valores de contato abaixo da linha de corte, considerados ruído, algumas dessas indicaram valores suaves para os resíduos mais externos – Pro24 e Glu39 (coloridos em amarelo). Porém, a região foi fortemente

acessada por duas replicatas (em vermelho), sugerindo que um evento específico para os dois casos foi responsável pela abertura dessa região, não acessada em outras replicatas ou outros sistemas com cossolvente. O evento representado nesse sistema resultou da quebra de ligação cátion- π entre a Lys25 e a Tyr28, causada pela interação com a sonda. A cadeia lateral da Lys25 passa a interagir com o benzeno e seu deslocamento e permite a entrada de uma sonda secundária na cavidade exposta.

4.3 Identificação dos sítios e validação estrutural

A identificação dos sítios de interação foi feita com base na análise visual dos *hotspots*, seguindo do agrupamento dos resíduos. A Figura 14 reporta os seis sítios catalogados, dois dispostos nas alças BC e C''D (área em roxo e verde, respectivamente), dois expostos na região de interações PD-1 – PD-L1 (área em vinho e laranja) e dois sítios enterrados (área em amarelo e azul).

Figura 14 – Representação estrutural dos sítios preditos com uso da dinâmica molecular com cossolvente.



Fonte: Elaborado pela autora. Cada volume representa uma região descrita em PD-L1 através da MixMD.

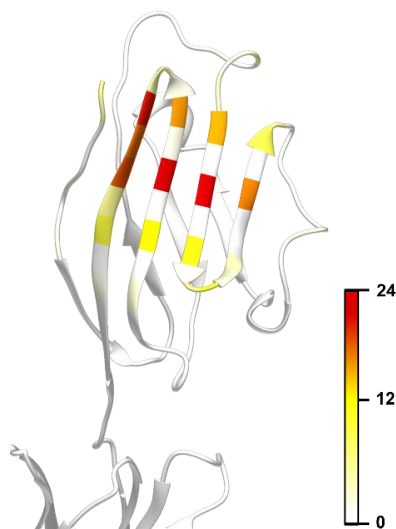
A região de interação caracterizada pela área laranja foi identificada por todos os cossolventes. Juntamente com a área em vinho, a região laranja representa superfície de interação proteína-proteína, onde ocorre a formação do complexo com a PD-1. É uma região de grande área acessível ao solvente e justifica-se o seu acesso. A região em vinho teve baixo acesso nas replicatas do acetato.

As regiões de alça – área em roxo e verde – foram bem acessadas no decorrer dos cinco sistemas, excetuando-se do acetato (baixo ou nenhuma interação com alça BC) e o n-metil-acetamida (baixa sensibilidade para alça C''D). Com relação aos sítios enterrados, a região em amarelo foi identificada por três sistemas – acetato, benzeno e fenol – ao passo que os resíduos mais expostos da região em azul foram identificados por todos os cossolventes, apesar de que as interações estáveis, de valores consecutivos maiores, foram observadas apenas nas replicatas do fenol e benzeno.

4.3.1 *Estudo das regiões descritas na literatura*

Em contrapartida, a Figura 15 traz os pontos de contato para as regiões de interação descritas na literatura. Estão destacados em gradiente de cores quentes o número de pontos de ancoragem para cada ligante reportado através de co-cristalização ou Ressonância Magnética nuclear (RMN). A região alvo para interação de anticorpos (ANTONIA et al., 2017), fragmentos de mAB (GANESAN et al., 2019) e pequenas moléculas (ZAK et al., 2016) é a interface de interação proteína-proteína.

Figura 15 – Somatório de interações para os ligantes de PD-L1 reportados na literatura.



Fonte: Elaborado pela autora. Os contatos estão marcados em escala de cores quentes, que varia entre o branco (sem contato), o amarelo (valor médio de contatos) e o vermelho (número máximo de contatos).

Mesmo as regiões destacadas por preditores se concentram nessa mesma área. Isso se deve pelo fato que o desenho racional de fármacos para a PD-L1 é voltado para o bloqueio da área e inibição da interação com PD-1. Com relação aos pequenos ligantes, além do bloqueio físico, alguns são desenhados para forçar dimerização da proteína no contexto biológico.

De fato, os ligantes para PD-L1 possuem estruturas químicas em comum, como a presença de grupamentos metoxipiridina, dimetoxifenil ou grupo aminoetil-acetamida, capazes de realizar interações de caráter hidrofóbico, como interações π - π stacking, π -alquil ou interações- π de par solitário mediadas por água (GUZIK et al., 2017; PERRY et al., 2019; ZAK et al., 2016; ZHONG et al., 2019).

Confrontar os sítios preditos e os reportados na literatura é importante para validar o uso do método de simulação na presença de cossolvente para a PD-L1. O perfil de interação entre as sondas e a proteína varia de acordo com a composição das cadeias laterais e, sendo o domínio IgV da PD-L1 pequeno e de caráter majoritário apolar, estava propensa a descrever poucos sítios, dependendo do caráter do cossolvente. Comparando as regiões encontradas pelos cossolventes com os pontos de ancoragem reportados na Figura 14, pode-se dizer que a área em vinho e laranja abrangem parte das áreas descritas. Trabalhos com predição de farmacóforo também já reportaram também a região delimitada pela região em amarelo (LIU et al., 2021b).

4.3.2 *Proposição de um sítio alvo*

Com base no que foi visto no tópico anterior, as simulações descreveram quatro regiões de acesso inexploradas na literatura, representadas pelas cores roxo, verde e azul. Como o objetivo do trabalho é a busca por sítios críticos, alguns critérios foram levados em consideração para a discriminação. Primeiramente, as regiões de alça foram desconsideradas como provável sítio crítico por possuírem um comportamento promíscuo. As sondas fenol e benzeno tiveram alta preferência por essas regiões e, em geral foi difícil encontrar casos em que a sonda permanecesse presa na região sem que sofresse interferência de sondas circundantes.

Tabela 4 – Média dos parâmetros físicos para as cavidades preditas através da simulação com cossolvente.

Identificação	Volume (Å ³)	Superfície (Å ²)	Profundidade (Å)
Amarelo	198,98	381,2	12,43
Azul	323,78	492,3	14,89

Fonte: Elaborado pelo autor

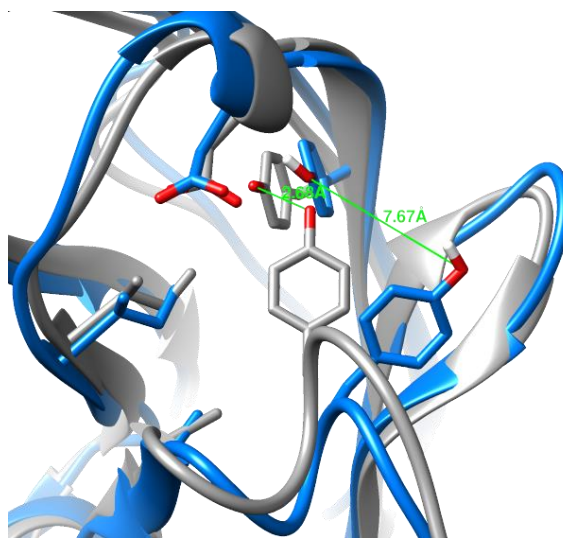
Dentre as regiões ressaltadas em amarelo e azul, os critérios analisados para a seleção de um sítio foram o volume da região, a profundidade do *pocket* e o comportamento da sonda durante as análises visuais.

De acordo com a Tabela 4, as características do *pocket* representado em azul se sobressaíram em todos os critérios em relação ao amarelo. Um volume maior implica necessariamente na capacidade de abrigar uma diversidade maior de ligantes. Uma boa parte dos resíduos que compõe a cavidade estão enterrados na proteína, o que aproxima o *pocket* das características de um sítio críptico. Diante disso, a região da proteína caracterizada pela região azul foi selecionada como possível sítio críptico.

4.4 Investigação de novo sítio críptico de ligação da PD-L1

O sítio selecionado possui grande maleabilidade e é capaz de assumir diferentes volumes durante a simulação. Isso ocorre porque a região é intimamente ligada à alça C''D e a flutuação desta é capaz de alterar o formato do *pocket*. O sítio prioritário é composto pelos resíduos Trp57, Met59, Ile64, Ile65, Ser80, Tyr81, Arg84, Ala85, Leu99, Ile101, Asp108 e Tyr112, cujo aminoácidos polares e carregados são situados na região mais externa, em contato com o solvente.

Figura 16 – Representação da alteração estrutural para abertura de novo sítio em PD-L1, representada pela rotação da Tyr81.



Fonte: Elaborado pela autora. A estrutura cristalográfica 5JDS está representada em cinza. O frame representativo da cavidade aberta está em azul. Em verde está representada a distância entre os oxigênios da Tyr81 e Tyr112.

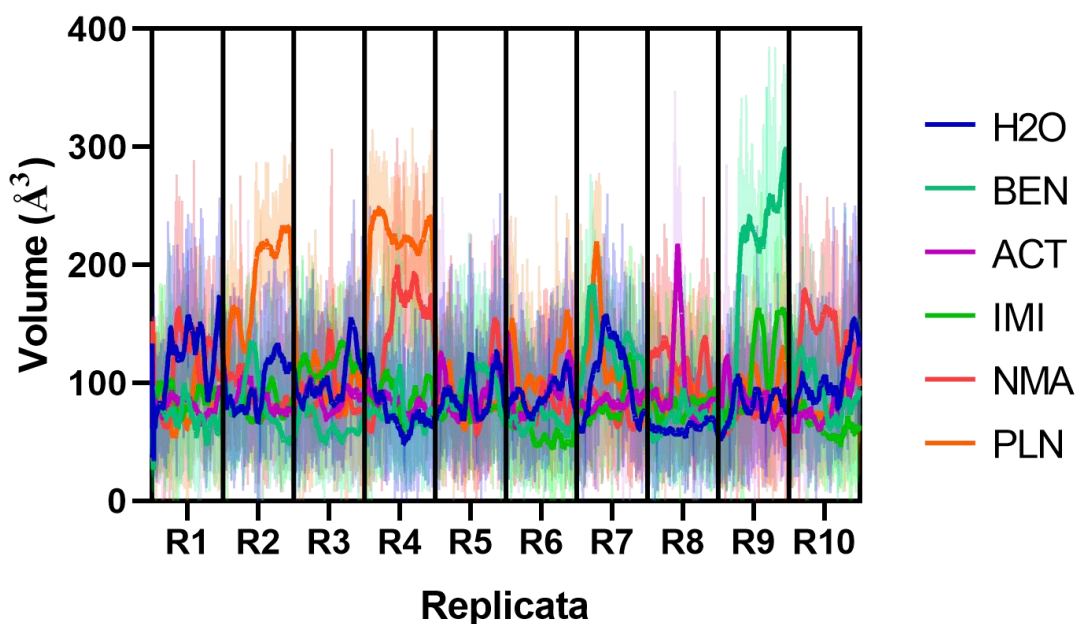
O núcleo da cavidade é enterrado em uma região entre as folhas- β , assume caráter majoritário hidrofóbico e é a região que mais sofre impacto com a flutuação da alça. A profundidade da cavidade também pode variar de acordo com o número de resíduos com os quais a sonda interage, ou de acordo com a flutuação geral da proteína. A Figura 16 mostra o principal movimento realizado para a abertura da cavidade. A estrutura cristalográfica (cinza) apresenta uma ligação de hidrogênio entre a Tyr81

(presente na alça C''D) e Tyr112 (disposta na região interna da cavidade). As análises visuais mostram que a presença do cossolvente perturba a interação nativa e favorece o deslocamento da Tyr81. Este resíduo atua como *gatekeeper* e seu deslocamento cede o acesso à cavidade. Esse comportamento foi observado majoritariamente nas simulações com cossolventes apolares – benzeno e fenol – o que indica que interações do tipo π -stacking possuem força suficiente para favorecer a abertura da cavidade e sustentar a permanência da sonda na região. Um comportamento não esperado foi a abertura da cavidade por uma segunda entrada. A comunicação com a alça C''D favoreceu a ampliação da área acessível ao solvente, que permite a entrada de moléculas na cavidade por uma via secundária.

Para entender melhor a flutuação do sítio, o volume da cavidade foi acompanhado durante todas as replicatas dos sistemas realizados, através do programa Fpocket. Analisando o perfil assumido pela água (

Figura 17 - azul) é possível entender que o sítio possui um volume basal que pode alcançar até 250 \AA^3 . A replicata 9 do benzeno foi a região de maior destaque, no qual foi possível observar a abertura da cavidade e permanência da sonda por toda a simulação. Esse resultado era esperado, visto que o perfil de contatos da replicata 9 (Figura 12) assumiu altos valores para a cavidade e a interação benzeno-sítio foi confirmada através das análises visuais.

Figura 17 – Volume do sítio para as replicatas das simulações com cossolvente.



Fonte: Elaborado pela autora. Os sistemas acetato, benzeno, imidazol, n-metil-acetamida e fenol estão coloridos em lilás, ciano, verde, vermelho e laranja, respectivamente. Os valores reais estão suavizados com transparência e a média entre os valores está destacada na linha espessa.

A análise do volume também mostra que outras sondas também são capazes de abrir a cavidade (replicatas 2 e 4 do sistema com fenol,

Figura 17, em laranja). Apesar de um volume acentuado na replicata 4, o n-metil-acetamida não foi capaz de induzir a abertura da cavidade (análise visual). De modo que a análise apenas da variação do volume não permite entender a permanência das sondas ou real abertura da cavidade. O resultado não possui uma boa acurácia, o que dificulta determinar um valor de corte mínimo para definir os estados aberto e fechado para a cavidade.

4.4.1 Estudo da dinâmica de abertura do sítio

Diante dessa limitação, foi dado seguimento para definição através de descritores estruturais. Descrever corretamente os estados no qual ocorre a abertura do sítio é algo essencial para entender a natureza críptica da cavidade. Conforme discutido no tópico 1.3, um sítio críptico encontra-se naturalmente fechado, apenas um ligante – ou raras vezes alguma mudança conformacional nas redondezas – pode induzir sua abertura. Isso implica que nas simulações com a água a cavidade deve estar fechada, assim como a saída do ligante da região deve ocasionar o fechamento do sítio.

No tópico anterior, foi descrito como o centro da cavidade pode ser acessado através de duas entradas distintas. A participação da alça C''D se mostra muito efetiva durante as simulações com benzeno, o que é uma boa característica quando se pensa no desenho racional de fármacos como estratégias de ataque à região. Entretanto, o sítio ter grande variabilidade de conformações também amplia a dificuldade de definir os estados de abertura e fechamento, como foi visto na

Figura 17.

A Tabela 5 detalha quantos parâmetros utilizados para cada abertura, levando em consideração a entrada principal (C2), a entrada pela região da alça C''D (C3) e o estado da cavidade com as duas entradas disponíveis (C2_C3). Dois descritores foram utilizados, a distância e a variação do ângulo da cadeia lateral (χ).

Os descritores foram selecionados com base em interações importantes que foram rompidas durante o processo de abertura da cavidade. Algumas dessas distâncias são percebidas apenas com grande distanciamento entre os resíduos, como é o caso da Arg86(CA) e Ile65(CD1), que representa a abertura da cavidade em distâncias acima de 6 Å. Outros resíduos são mais sensíveis, como a distância entre Glu71(CD) e Arg82(CZ), que precisam de um distanciamento de 4 Å. Pelo número de descritores adotados entende-se a complexidade para determinar os estados aberto e fechado para o sítio. É fato que

não é apenas a movimentação da cadeia lateral dos resíduos que cede espaço para um ligante, mas também movimentação de cadeia principal, que pode ser causada inclusive pelo cossolvente ligado em outras regiões.

A Figura 18 retrata a abertura do sítio, de acordo com os parâmetros da Tabela 5. Inicialmente é possível determinar que as sondas de caráter apolar – benzeno e fenol – foram as de maior influência para abertura da entrada principal (C2).

Tabela 5 – Filtros para seleção da cavidade aberta.

Região de acesso	Átomos	Parâmetro	Intervalo (Å)
C2	Tyr81(OH) – Tyr112(OH)	Distância	> 5
	Tyr81(CG) – Ile64(CG2)		> 6
	Met59(CE) – Tyr81, Tyr112(OH)		> 3,8
	Tyr81(OH) – Ala85(CB)		> 6
	Leu74(CG) – Arg86(CA), Ile65(CB)		> 5
C2_C3	Ala85(CB) – Ile64(CG2)	Distância	> 5,5
	Arg86(CA) – Ile65(CD1)		> 6
	Tyr81(OH) – Tyr112(OH)		> 5
	81(CG) – Ile64 (CG2)		> 6
	Met59(CE) – Tyr81, Tyr112(OH)		> 3,8
	Tyr81(OH) – Ala85(CB)		> 6
	Leu74(CG) – Arg86(CA), Ile65(CB)		> 5
	Glu71(CD) – Arg82(CZ)		> 4
C3	Ile64	Ângulo chi	< 230
	Ala85(CB) – Ile64 (CG2)	Distância	> 5,5
	Arg86(CA) – Ile65(CD1)		> 6
	Leu74(CG) – Arg86(CA), Ile65(CB)		> 5
	Glu71(CD) – Arg82(CZ)		> 4
Ile64	Ângulo chi		< 230

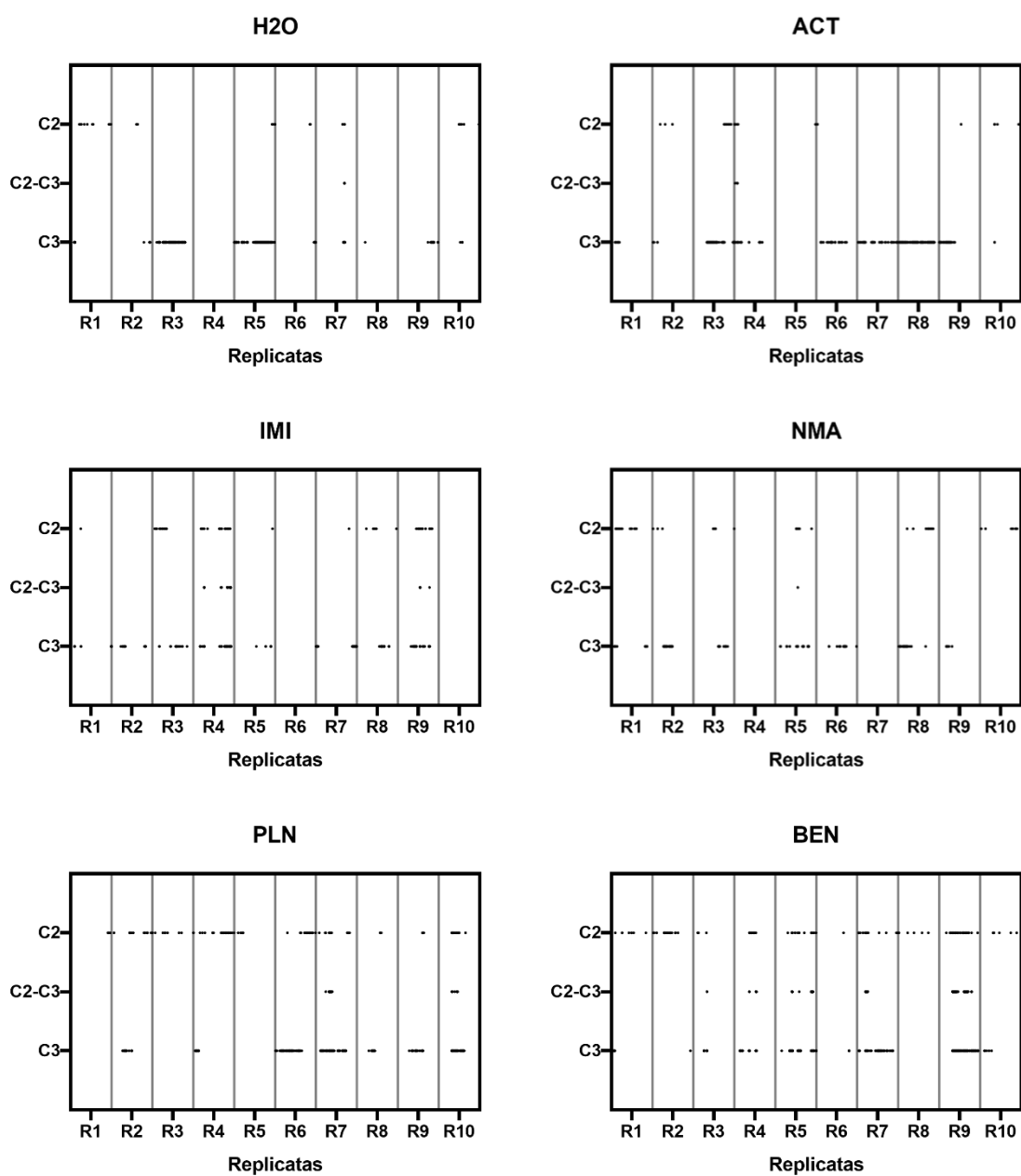
Fonte: Elaborado pela autora. A entrada principal e a secundária possuem os códigos C2 e C3, respectivamente.

As demais sondas também induziram a exposição de C2, mesmo que brevemente, o que corrobora com o número de contatos observado para a região, Apêndice 1. Com relação a entrada secundária (C3), a figura revela uma facilidade maior de ser exposta em relação à C2. A entrada C3 teve maior abertura no sistema com acetato, principalmente pela presença da Lys75 e da Arg82 na alça C''D.

A replicata 9 do benzeno é o sistema que mais se destaca dentre os demais pela maior detecção da abertura de ambas as cavidades, inclusive simultaneamente. Conforme pode ser observado, o benzeno se manteve no interior da região após o fim dos 50 ns de simulação, assim, essa replicata foi estendida ao longo de mais 500 ns para melhor compreensão da estabilidade do cossolvente na cavidade.

Sítios críticos são expostos mediante interação com ligante, assim, era de se esperar que nas simulações com a água não fosse observada nenhuma abertura. O que aconteceu nesse caso foi a detecção repentina da abertura cavidade em algumas replicatas sem cossolvente. De fato, a entrada principal mal é observada dentro dos sistemas e não existe tendência de se manter aberto por longos períodos (Figura 18, sistema sem cossolvente).

Figura 18 – Descrição da abertura das duas entradas do sítio separadamente (C2 e C3) e concomitantemente (C2C3).

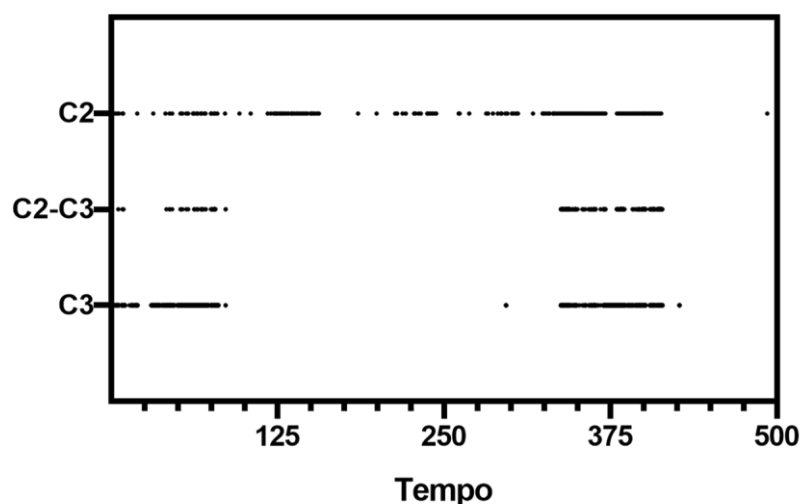


Fonte: Elaborado pela autora. Cada ponto representa um frame em estado aberto.

A abertura da entrada C3 foi observada com mais frequência e, provavelmente, está relacionada ao movimento natural da alça C''D durante a simulação, já que tal abertura é observada reiteradamente dentre todos os sistemas. A Figura 19 representa os estados de abertura das cavidades ao longo da simulação. Nos 120 ns iniciais o benzeno estabilizou a cavidade com as duas entradas acessíveis ao solvente (entradas C2 e C3 abertas). É possível presumir que mais de uma sonda possa ter interagido com a região nesse período, ou que as entradas possam ter uma rede de interações entre os resíduos que permite esse evento apenas com o posicionamento do benzeno.

Não é possível afirmar apenas através desse gráfico que o benzeno saiu da cavidade nos 15 ns finais. Isso porque existe a possibilidade de as duas cavidades fecharem, mesmo com o benzeno alocado na região interna.

Figura 19 – Descrição da abertura do sítio para a replicata de 500 ns com benzeno.



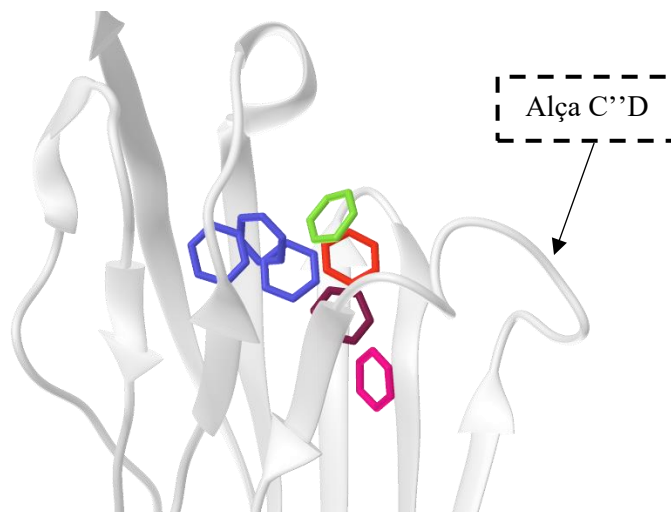
Fonte: Elaborado pela autora. Cada ponto representa um frame em estado aberto.

4.4.2 Estados conformacionais assumidos pelo sítio críptico

Apesar de conseguir determinar a abertura e fechamento da cavidade, é necessário destrinchar o comportamento assumido pela sonda na cavidade. É fundamental entender a dinâmica de interação entre o cossolvente e os resíduos da cavidade. Para isso, os frames das simulações que continham o benzeno presente no sítio – dez replicatas de 50ns e uma replicata de 500ns – foram filtrados e, em seguida, o posicionamento do benzeno foi agrupado (clusterização), com auxílio do Ambertools. Cada centro de cluster descreve a tendência do benzeno em um ponto na cavidade, como pode ser visto na Figura 20. Foram encontrados sete principais centros de permanência, dois deles se referindo a posições próximas da entrada C2 – estruturas coloridas em verde (estado 4) e vermelho (estado 3) – três posições no centro da cavidade (região mais interna, estado 2, em azul)

e duas estruturas localizadas na entrada C3, pertencente à alça C''D – cluster vinho (estado 1) e rosa (estado 0).

Figura 20 – Representação dos estados de maior população assumido pelo benzeno.



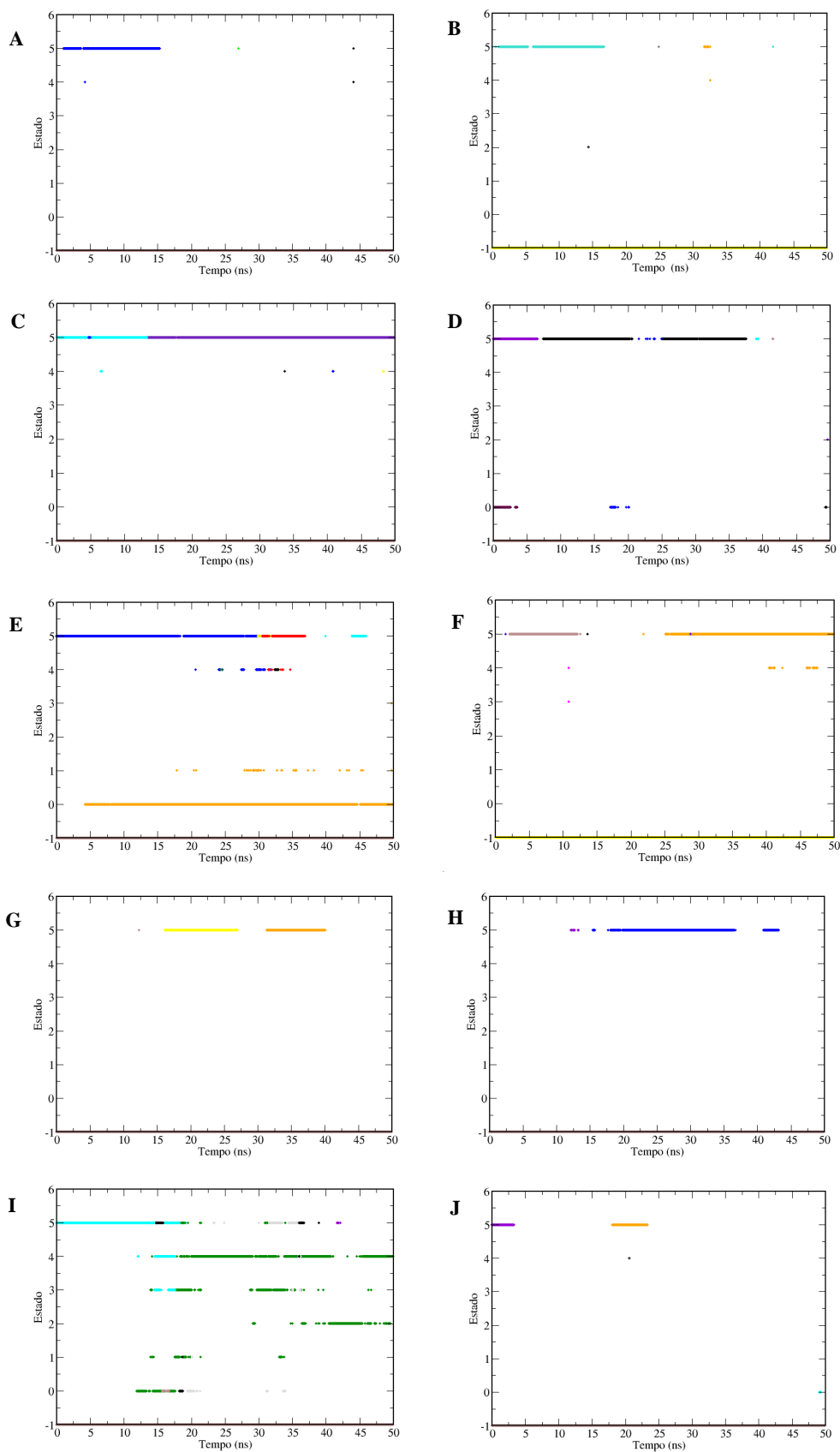
Fonte: Elaborado pela autora. Cada cor representa um estado preferencial adotado pelo benzeno durante a simulação

A importância da participação da alça na dinâmica da cavidade é evidenciada nessa figura. De fato, é possível que a abertura da entrada C2 do sítio tenha uma relação intrínseca com a entrada C3, como talvez uma codependência da abertura simultânea. Uma observação importante é a possibilidade de a cavidade comportar mais de uma sonda ao mesmo tempo, evidência importante no desenho racional de fármacos. Assim, cada centro de cluster foi categorizado como um estado conformacional. Baseado na flutuação do benzeno na cavidade, foi possível aprofundar as questões referentes a posição assumida pela sonda durante as simulações.

Em primeira análise, comparando as simulações com benzeno, é possível afirmar que o cossolvente tem grande prevalência para a interação com a entrada C2 (Estado 5). Para facilitar a descrição, os cluster mais internos foram definidos como um só estado (estado 2, em azul).

Assim, a Figura 21 mostra cinco principais estados conformacionais (estado 0 ao 4) acessados durante as simulações e um estado extra que descreve a interação com a Tyr81 (*gatekeeper*) sem que haja abertura da cavidade (Estado 5). Em algumas replicatas, a sonda interage com a entrada C2, sem acessar estados mais internos na cavidade (estado 5), como pode ser visto na Figura 21.B, C, G e H. O mesmo comportamento pode ser observado com os demais cossolventes (Apêndice 2). Além do benzeno, o fenol foi o único cossolvente que entrou na cavidade (cluster 3 e 4 do Apêndice 2.4 (A,B,D,G)) de forma contínua e estável.

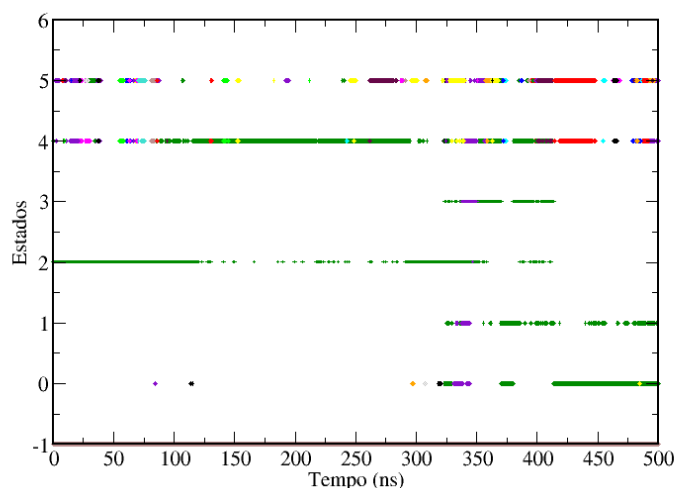
Figura 21 – Estados conformacionais das sondas para as replicatas com benzeno.



Fonte: Elaborado pela autora. A disposição das replicatas está em ordem alfabética. Cada cor representa um benzeno diferente.

Esse resultado indica que a abertura da entrada C3 não é estritamente necessária para a abertura da entrada C2 (movimento da Tyr81) e não existem muitas evidências que corroborem a necessidade de uma codependência entre as entradas. A informação é corroborada pelo perfil de abertura observado na Figura 18, para o sistema do benzeno. A replicata 9 do benzeno é o sistema com maior informação sobre o comportamento da cavidade. Inicialmente, é possível observar a disputa espacial entre dois benzenos, que entram simultaneamente na cavidade (Figura 21.I), como pode ser visto entre 10 e 20 ns, representados nas cores ciano e verde e nos estados 3 e 4. Outro detalhe importante nessa replicata é que o benzeno proveniente da entrada C3 (estado 0) é o que acessa o interior da cavidade primeiro. Sua presença facilita o deslocamento da Tyr81 e expõe o sítio para uma sonda secundária. Com relação à preferência entre os clusters, fica claro que o benzeno possui tendência de se acomodar na posição do Estado 2, que descreve a região mais interna da cavidade, ao passo que flutua pelo Estado 4 e compartilha a posição com outras sondas circundantes (Figura 21.I).

Figura 22 – Estados conformacionais das sondas para a simulação estendida com benzeno.



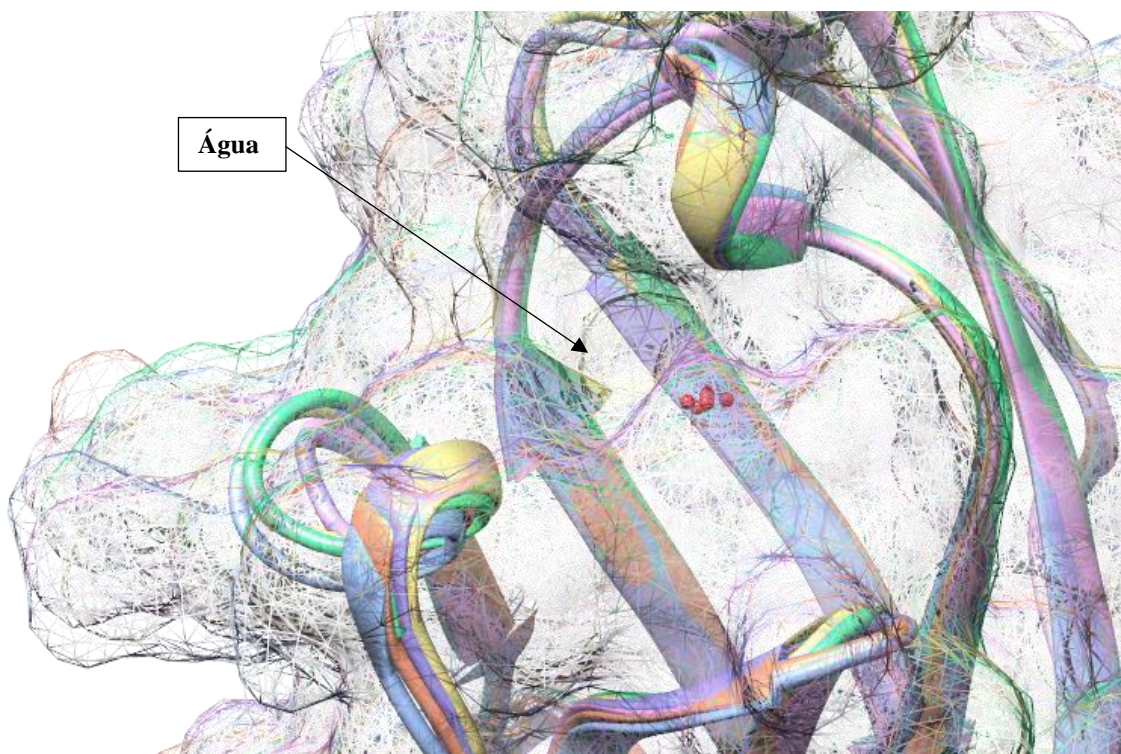
Fonte: Elaborado pela autora. Cada cor representa um benzeno diferente.

A simulação estendida da replicata 9 mostrou o comportamento detalhado para os cossolventes. Conforme especulado no tópico 4.4.1, a Figura 22 confirma que nos 120ns iniciais o benzeno se estabiliza na região mais interna da cavidade (estado 2, benzeno representado em verde). A presença de outros benzenos nas imediações faz com que a sua pose oscile para um estado mais externo, próximo a Tyr81, o que causa instabilidade na região e faz com que a sonda assumira um estado mais inferior, próximo à entrada C3 (estado 0).

4.4.3 Evidências experimentais da cavidade

Ainda com intenção de corroborar a característica críptica do novo sítio e de forma a complementar as informações acerca dessa região, foram analisadas as estruturas tridimensionais da PD-L1 disponíveis no PDB, a fim de dar suporte para a informação sobre a abertura da cavidade em condições experimentais. Os casos onde existe a presença de água localizada no sítio atestam que sob determinadas situações – como condições cristalográficas que exigem a presença de um cofator ou alta concentração de adjuvantes – o sítio seja exposto. Desse modo, espera-se que seja observada a presença de água situado no sítio. A Figura 23 mostra o caso de seis estruturas onde é possível identificar água dentro da nova cavidade estudada. A superfície da proteína, representada em *grid* semitransparente, mostra a entrada C2 do sítio completamente fechada, porém os cristais apresentam água na região, em uma posição conservada e equivalente ao estado 3, demonstrando que houve a exposição da cavidade ao solvente durante o processo. Essas estruturas são identificadas pelos códigos 5IUS (cadeias C/ D), 5O45 (cadeia A), 5XJ4 (cadeia A) e 6NNV (cadeias B/ D).

Figura 23 – Estruturas cristalográficas com presença de água na região do sítio.



Fonte: Elaborado pela autora. A água está representada em esferas vermelhas. A superfície da proteína está em *grid* semitransparente.

Curiosamente, em todos os casos a PD-L1 estava na forma ligada, interagindo com a PD-1 mutada, um peptídeo sintético, com a porção VH/VL do Durvalumab e com um macropeptídeo cíclico, respectivamente (MAGIERA-MULARZ et al., 2017;

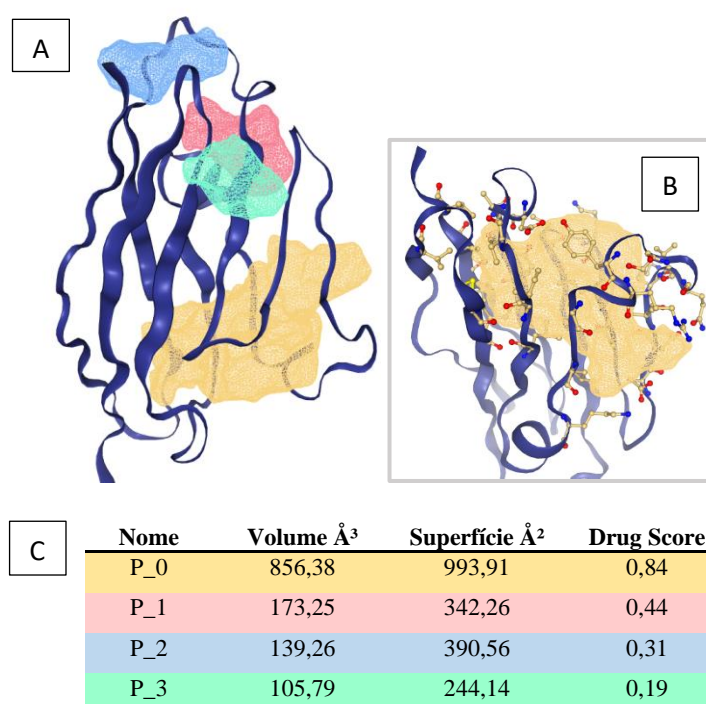
PASCOLUTTI et al., 2016; PERRY et al., 2019; TAN et al., 2018). De fato, as informações até aqui corroboram fortemente com a descrição do sítio como uma cavidade críptica. O comportamento nas simulações na ausência de cossolvente, o perfil da abertura da cavidade, a presença da água em dados experimentais, todas essas informações juntas levam a crer que a região alvo é de fato um sítio críptico.

4.4.4 Avaliação da estrutura como alvo terapêutico

Com intuito de avaliar o sítio como alvo promissor para interação com pequenos ligantes, o preditor Dogsite foi utilizado para fornecer o valor de *drug score* referente à cavidade. O *drug score* é uma função de pontuação preditiva que determina a capacidade de uma região ser modulada por compostos de baixo peso molecular e varia entre os status não suscetível (0) e suscetível (1). A linha de corte para determinar um sítio como suscetível à modulação por pequenos ligantes é de 0,5 (VOLKAMER et al., 2012).

Na Figura 24 o sítio críptico alvo deste trabalho está representado em grid amarelo. Ao todo, foram identificados 33 resíduos para a formação do *pocket* neste estado. Como destacado no item C, o valor de *drug score* de 0.84 obtido para a cavidade determina a região como um alvo promissor para desenho racional de fármacos.

Figura 24 – Predição de *pockets* através do DogSite.



Fonte: Elaborado pela autora. Cada cor representa as informações sobre um *pocket* específico.

A pontuação destaca que além da profundidade e do volume, o *pocket* também apresenta uma fração de aminoácidos polares equilibrada, um número relativo

de doadores e aceptores de hidrogênio, entre outras características que são levadas em conta para determinação da pontuação (VOLKAMER et al., 2012). Comparado com as demais regiões destacadas, a cavidade mostra excelentes valores para volume e área de superfície. De fato, não é importante apenas atestar que a região é de fato um sítio críptico, mas também fornecer indícios que esse novo sítio é promissor para o uso como alvo terapêutico.

4.5 Triagem virtual de moléculas

Apesar de serem necessárias técnicas experimentais – como a cristalografia de proteínas – para comprovar que o sítio estudado é de fato um sítio críptico (COMITANI; GERVASIO, 2018), até o momento, as informações geradas pelas técnicas *in silico* sugerem que a cavidade estudada possui comportamento semelhante ao dessas regiões. Ressalta-se que a presença de um ligante é importante para estabilizar essa cavidade (VAJDA et al., 2018). Dessa forma, com o entendimento amplo da composição, flexibilidade e dinâmica da região, é possível propor moléculas que possam interagir e estabilizar o sítio alvo. Os resultados anteriores apontam que a cavidade tem características estruturais e químicas favoráveis para comportar bem um ligante e essa informação é corroborada através da predição com o Dogsite (Figura 24. C). Desse modo, foi dado o seguimento para identificar uma molécula que atenda as características supracitadas para o sítio em estudo, através da técnica de triagem virtual e utilizando o método de *docking* molecular. O *docking* molecular é uma abordagem computacional que permite prever o modo de ligação e a energia de afinidade entre a região alvo na PD-L1 e um possível ligante (KITCHEN et al., 2004). A partir disso, é possível fazer uma triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*) em larga escala, que visa a seleção e classificação de um grande conjunto de moléculas, para a identificação de possíveis compostos ativos para o alvo farmacológico (KRISTENSEN; NIELSEN; PEDERSEN, 2013).

O uso de *docking* molecular para a realização da triagem virtual faz com que a técnica adotada nesse trabalho seja categorizada como *Virtual Screening* baseado no alvo (TBVS, do inglês, *Target-Based Virtual Screening*), que utiliza a estratégia do *docking* de diversos compostos contra uma proteína alvo. Essa metodologia permite a flexibilização das ligações rotacionáveis da pequena molécula, enquanto o receptor será considerado como um corpo rígido (VERLI, 2014). Como já mostrado no decorrer deste trabalho, o sítio críptico deste trabalho possui uma complexidade intrínseca, cujas conformações podem variar dependendo da interação com o ligante e do comportamento

da alça C''D, o que necessitaria considerar também o receptor flexível. Porém, esta é uma estratégia de custo computacional bastante elevado. Desse modo, foi aderido também o uso do *ensemble docking*, que é a adoção de diferentes poses representativas da cavidade, selecionadas cuidadosamente para que fossem representativas do conjunto de conformações adotadas pela PD-L1. A escolha da estrutura precisaria ser bem fundamentada e representativa do conjunto de conformações.

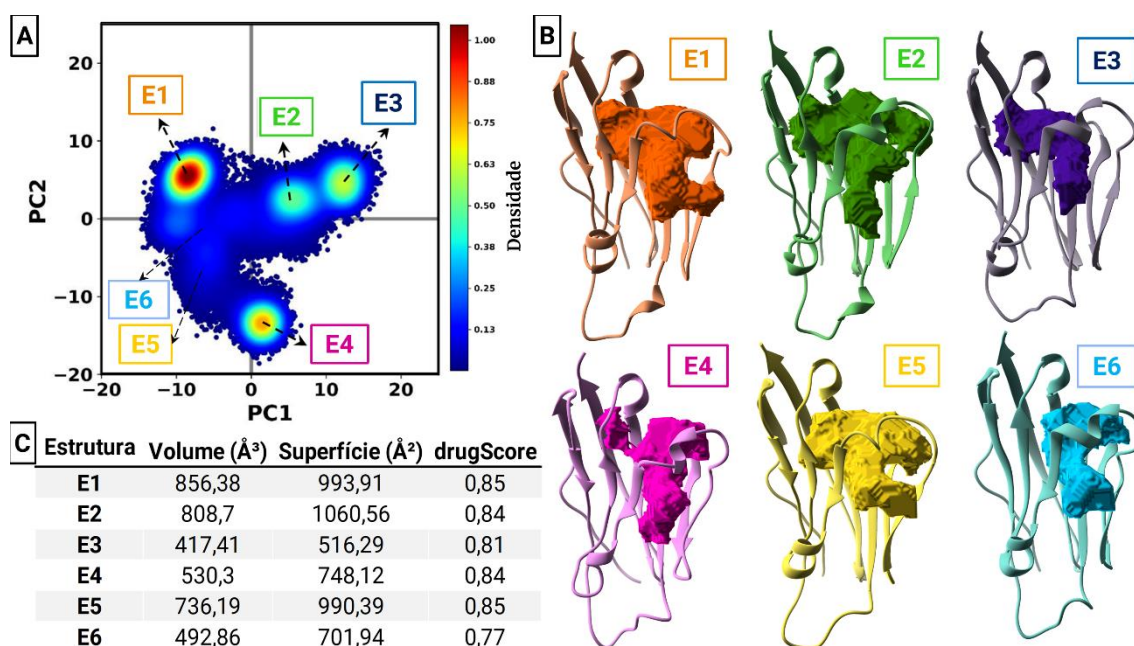
4.5.1 Avaliação da variabilidade conformacional da cavidade

O primeiro passo então foi selecionar as conformações mais adequadas para o *ensemble docking*. No tópico 4.4.2, foi utilizado um conjunto de coordenadas filtrado previamente para conter apenas conformações da PD-L1 que apresentaram o benzeno contido no sítio (a partir das simulações curtas e estendidas). Essa seleção abrange as conformações da PD-L1 com a cavidade no estado aberto (para as duas entradas separadamente ou simultaneamente), que serviu para a compreensão da variação conformacional do benzeno dentro do sítio – conforme discutido no tópico 4.4.2 e representado nas Figura 20, Figura 21 e Figura 22. Nesta etapa, esse mesmo conjunto de dados foi utilizado para compreender a variação estrutural dos resíduos pertencentes à cavidade.

Desse modo, foi realizada uma análise de componente principal (PCA) dos resíduos que compõem a cavidade para agrupar as diferentes conformações adotadas pelo sistema. Na Figura 25.A essa informação está retratada como um mapa de calor, no qual a densidade de pontos está relacionada com a frequência em que uma determinada conformação foi acessada durante as simulações. Existem quatro centros de maior acesso para a cavidade, três deles (os centros E1, E3 e E4) posicionados nas extremidades da distribuição de pontos, ou seja, carregam as variações mais intensas assumidas dentro do conjunto. Com isso, entende-se que a cavidade possui quatro mínimos energéticos, dos quais três apresentam conformações tridimensionais muito distintas entre si.

Ademais, existe uma grande região em azul escuro pouco explorada, que reflete basicamente as poses adotadas durante a transição de estados. O centro E1 é o estado predominante e corresponde à conformação de maior preferência durante as simulações. O formato correspondente a esse centro está próximo da configuração adotada por E2 e a transição entre ambos é representado pelo estado E6. A região E5 e E6 representam as alterações na cadeia lateral necessárias para alcançar a conformação representada por E4 e de modo semelhante, E3 só pode ser acessado após passar pela conformação E2, não sendo observado transição direta para os demais estados.

Figura 25 – Conformações adotadas pelo sítio crítico durante as simulações com benzeno.

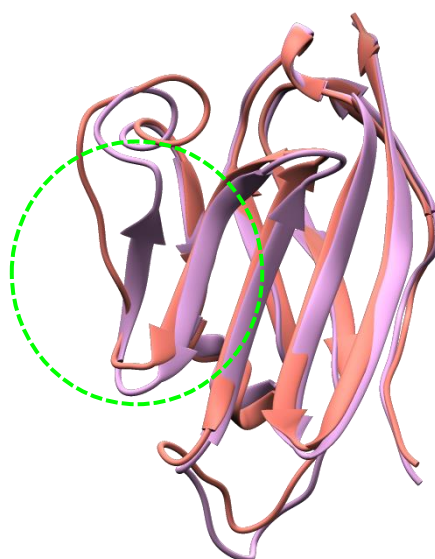


Fonte: Elaborado pela autora. (A) Os pontos estão coloridos pela densidade populacional. Cada caixa destaca um agrupamento de conformações específicas. (B) O volume correspondente ao pocket está representado em superfície. (C) Valores previstos pelo Fpocket.

Curiosamente, os centros de cluster possuem uma característica estrutural incomum quando comparadas com as estruturas cristalográficas. A alça C''D se encontra estabilizada na forma de uma fita antiparalela, conforme pode ser visto na Figura 26, destacado em verde. A mudança de uma alça para uma fita significa maior estabilidade estrutural para a proteína, o que provavelmente ocorre devido ao novo ambiente químico criado pelo benzeno presente nas imediações. A ampla variação de conformações se torna um limitante para a escolha de uma pose representativa para o *docking molecular* semiflexível. Conforme observado na Figura 25, a cavidade de PD-L1 pode adotar vários mínimos locais, sendo necessária a adoção de uma abordagem que considere a diversidade de poses durante o *Virtual screening*.

Dessa forma, foi selecionada uma conformação representativa para cada centroide (E1, E2, E3 e E4) equivalente ao ponto máximo de densidade dentro do cluster e uma representativa da região pouco explorada, mas que intermedeia três centros de alto acesso (E5 e E6). As cinco estruturas possuíam diferentes volumes e formatos da cavidade.

Figura 26 – Variação estrutural da alça C''D.



Fonte: Elaborado pela autora. A estrutura tridimensional da PD-L1 com a cavidade aberta está representada em lilás, o cristal 5JDS em rosa. Em verde está destacada a região da alça C''D.

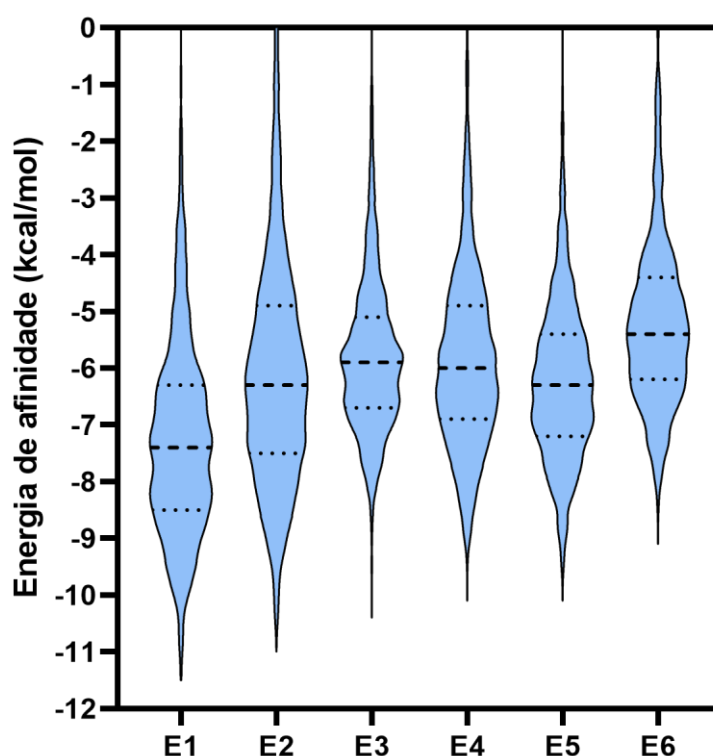
4.5.2 Seleção de ligantes para PD-L1

Após a seleção das seis estruturas da PD-L1, foram realizadas as etapas de *docking* contra o banco de dados de moléculas aprovadas pelo FDA, conforme descrito no tópico 3.3.3. Feita a predição estrutural e energética, iniciou-se a etapa de análise das energias de afinidade, como um primeiro passo para a seleção de moléculas. A Figura 27 traz um panorama geral dos valores para cada estrutura utilizada no *ensemble docking*. Inicialmente, observa-se que a média da energia de afinidade entre os ligantes e as poses se concentrou entre os valores -5 a -8 kcal/mol. Essa distribuição é uniforme entre as estruturas E2 à E5. A estrutura E6 teve valores de energia mais altos em relação às demais estruturas, enquanto a estrutura E1 obteve a distribuição de energias de afinidade mais baixa. É importante considerar que o erro médio dos valores de energia preditos pelo QuickVina2 é de 1,56 Kcal/mol (ALHOSSARY et al., 2015), o que indica que apesar da diferença geral de energia entre as estruturas, as demais poses são representantes da variabilidade estrutural e semelhantes em termos de interação com os ligantes. Dessa forma, a classificação das moléculas foi realizada com base na média dos valores de energia para cada estrutura, como forma de considerar a flutuação estrutural da cavidade.

Além das energias, o número de ligações de hidrogênio também foi um critério utilizado para a classificação. Ligantes que não realizaram ligação de hidrogênio com a proteína foram penalizados e tiveram o valor de afinidade zerados, como forma de priorizar ligantes que possam ser mais específicos. O Apêndice 3 mostra a classificação das 40 melhores moléculas de acordo com esse filtro inicial. Comparando o resultado

entre as poses da proteína, é observado que o valor das energias de afinidade varia bastante para a mesma molécula, o que indica que as estruturas da PD-L1 escolhidas conseguiram varrer uma amplitude de conformações variadas. As 200 moléculas mais bem ranqueadas considerando o valor médio de pontuação de interação seguiram então para a seleção visual.

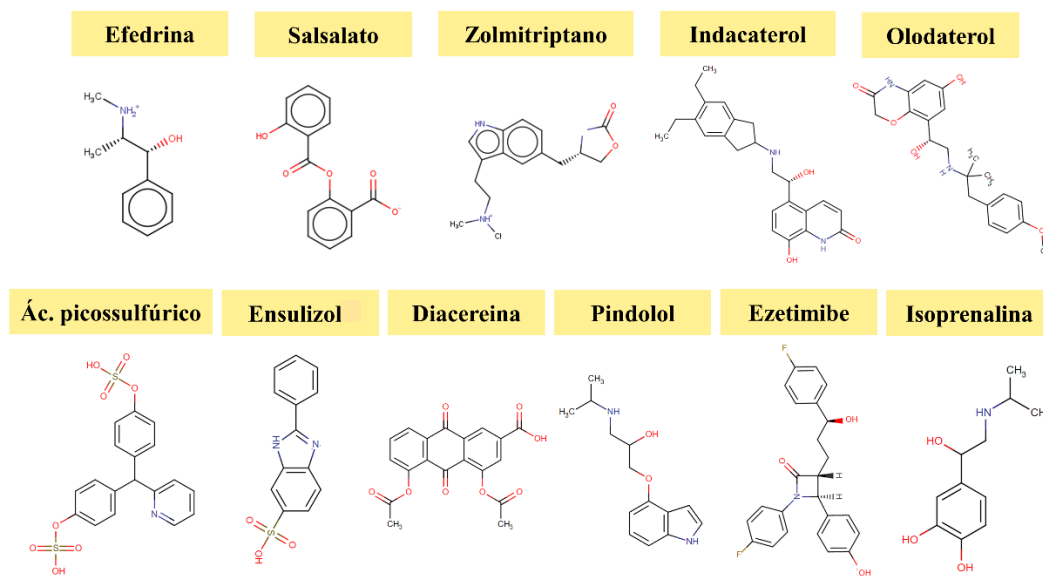
Figura 27 – Distribuição de frequência de moléculas que possuem determinados intervalo de afinidade para cada estrutura da proteína selecionada para o *ensemble docking*.



Fonte: Elaborada pela autora. O tracejado marca a média obtida para os valores de energia de afinidade para cada estrutura. O pontilhado representa a separação dos quartis.

Durante a seleção visual, foi analisada a complementaridade química da molécula na cavidade, os possíveis pontos de interação apolar (como π -stacking ou cátion- π), ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Também foi analisado o posicionamento de grupamentos carregados ou polares voltados para o solvente e grupamentos apolares comportados no interior da cavidade. Do montante de 200 estruturas, onze passaram no critério de seleção visual. As estruturas químicas dessas moléculas estão representadas na Figura 28.

Figura 28 – Estrutura bidimensional das moléculas selecionadas para interação com sítio críptico em PD-L1.



Fonte: Elaborado pela autora.

Todas as moléculas possuem um grupamento aromático, condição necessária para a interação com o sítio críptico. Os ligantes também possuem grupamentos polares nas extremidades, selecionados devido à possibilidade de ancorar em resíduos carregados que circundam a entrada principal da cavidade. A seleção também considerou a variabilidade estrutural, de forma que se pudesse estudar a interação da cavidade com moléculas de diferentes tamanhos, flexibilidade e natureza química, como pode ser visto através da Figura 28. A razão para a escolha dessa abordagem foi a falta de informações na literatura sobre a interação de ligantes com a cavidade e pela preferência em fazer uma varredura do espaço químico.

Apesar do banco de dados ser composto por moléculas aprovadas pelo FDA, é interessante compreender o perfil farmacocinético dessas moléculas visando o potencial uso no mercado interno e a necessidade da aprovação pelo órgão regulador brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2004). Desse modo, foi realizada a predição dos ensaios ADMTox e análise das características físico-químicas para os ligantes selecionados (Tabela 6). Inicialmente, é possível observar que a seleção abrange diferentes classes químicas, conforme esperado. Apesar do banco de moléculas ser composto apenas por ligantes aprovados pelo FDA, nota-se que a diacereína e a isoprenalina possuem alto risco de toxicidade, o que de fato é observado na literatura (HOSSEINI et al., 2022; KOŁODZIŃSKA et al., 2022).

Tabela 6 – Predição de ensaio ADMETox para os ligantes-alvo para sítio em PD-L1.

	Características físico-químicas											Risco de toxicidade			
	Peso molecular*	Classe química	n° ligações rotaveis*	aceptores de H*	doadores de H*	TPSA*	Log P o/w*	Log S*	Solubilidade*	Acessibilidade sintética*	Druglikeness°	Mutagenico°	Tumorigenico°	Irritante°	Efeito reprodutivo°
Efedrina	165,23	Alcaloide	3	2	2	32,26	1,45	-1,62	Muito solúvel	1,76	3,45	-	-	-	-
Salsalato	258,23	Salicilato	4	5	2	83,83	2,26	-3,56	Solúvel	2,03	0,16	-	-	alto	-
Zolmitriptan	287,36	Triptano	5	3	2	57,36	2,05	-2,98	Solúvel	2,88	-11,16	-	-	-	-
Indacaterol	392,49	Mono-hidroxi-quinolina	6	4	4	85,35	3,56	-4,4	Moderadamente solúvel	3,68	2,12	-	-	-	-
Olodaterol	386,44	Benzoxazina	7	6	4	100,05	2,01	-3,21	Solúvel	3,72	7,69	-	-	-	médio
Picosulfato	437,44	Piridina	7	9	2	156,85	1,84	-3,59	Solúvel	0,11	1,15	-	-	-	-
Ensulizole	274,3	Benzimidazola	2	4	2	91,43	1,88	-3,25	Solúvel	2,17	0,87	-	-	alto	-
Diacereína	368,29	Quinona	5	8	1	124,04	1,99	-3,32	Moderadamente solúvel	3,08	0,31	alto	-	alto	-
Pindolol	248,32	Indol	6	3	3	57,28	1,94	-2,46	Solúvel	2,51	7,25	-	-	-	alto
Ezetimiba	409,43	Azetidinona	6	5	2	60,77	4,33	-4,92	Moderadamente solúvel	3,37	4,6	-	-	-	-
Isoprenalina	211,26	Catecolamina	4	4	4	72,72	0,18	1,02	Muito solúvel	2,04	9,1	alto	-	-	alto

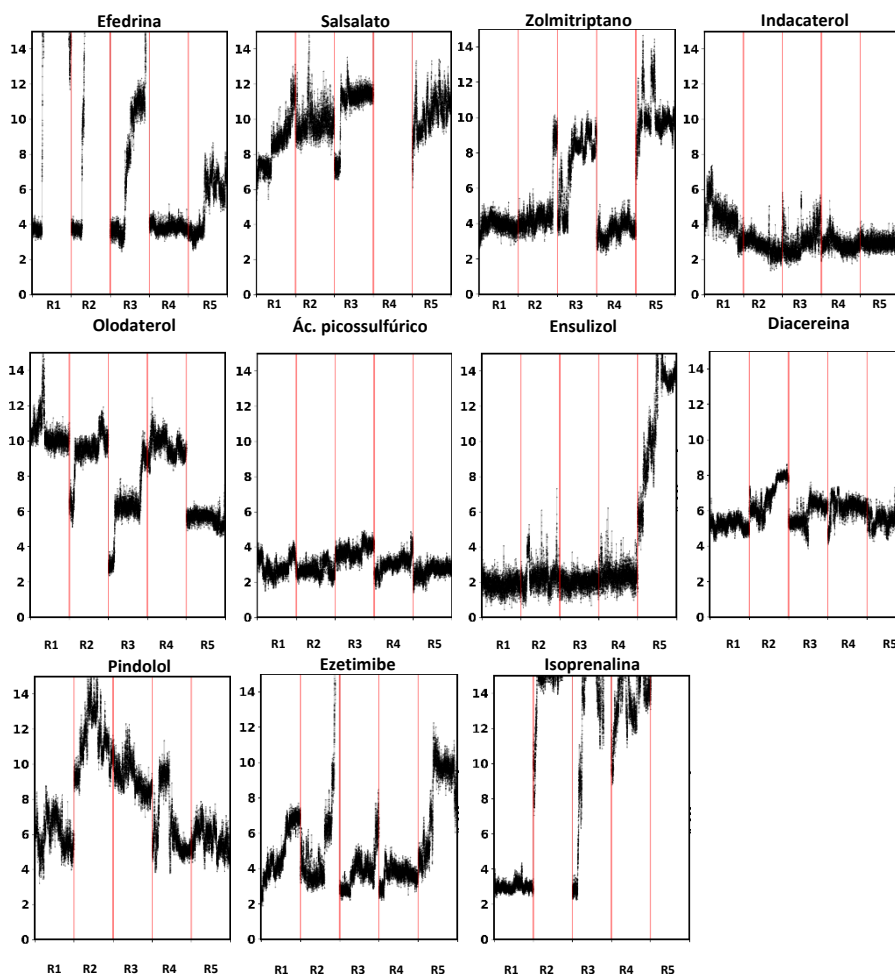
Fonte: Elaborado pela autora. Peso molecular dado em g/mol. Topological Polar Surface Area (TPSA) dado em Å². A acessibilidade sintética varia de 1 (moléculas facilmente sintetizadas) até 10 (moléculas de alta dificuldade de síntese). Moléculas sem indicação de risco (-). Descritores fornecidos pelo SwissADME (*). Descritores fornecidos pelo Osiris property explorer (°).

Isso provavelmente se deve ao fato dessas moléculas pertencerem à classe das quinonas e dos catecois, que estão dentre as estruturas químicas classificadas como PAINS (do inglês, *pan-assay interference compounds*), ou seja, consideradas artefatos que podem ser altamente reativos ou gerar falsos resultados em uma série de ensaios (BAELL; WALTERS, 2014).

Com exceção do ácido picossulfúrico, todos os demais ligantes passaram nas regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001), Ghose (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999), Veber (VEBER et al., 2002) e Egan (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000). O ácido picossulfúrico viola a regra para valor de TPSA abaixo de 140 e 131,6 Å² para Veber e Egan, respectivamente. Ademais, para os outros ligantes, estarem dentro dos limites estabelecidos para cada descritor significa atender os critérios de biodisponibilidade, permeabilidade em tecidos, peso molecular apropriado e capacidade de interação adequada para ser considerado bom ligante (que é resumidamente caracterizado como *druglikeness*). As características supracitadas foram previstas pelo SwissADME e podem ser comparadas com o parâmetro *druglikeness* previsto pelo *Osiris property explorer* (Tabela 6). No geral, houve discordância apenas com a predição para o zolmitriptan, que obteve valor de -11,16, mas atendeu aos critérios previstos do SwissADME. Em última análise, todos os ligantes selecionados possuem grande acessibilidade sintética, o que remete à facilidade de produzir ou comprar tais compostos.

Os onze ligantes foram submetidos a cinco replicatas de 25 ns de simulação de dinâmica molecular para discriminação entre as estruturas de acordo com a sua estabilidade na pose prevista pelo docking, permanência na cavidade e posterior seleção das espécies mais promissoras. O desvio quadrático médio para as cinco replicatas de cada sistema estão retratadas na Figura 29. Um ligante bem acomodado em uma região possui uma flutuação estrutural que varia em torno de 2,5 Å (BOLHUIS, 2006). Como a pose de docking foi usada como referência para o RMSD, é normal se observar uma elevação desse valor para algumas estruturas. Isso representa as limitações que o método de docking pode apresentar, uma vez que o cálculo da pose de interação é feito com descritores limitados e o uso do receptor rígido desconsidera a flutuação natural da região e adaptação da proteína à presença do ligante (ALHOSSARY et al., 2015). A simulação possibilita avaliar com maior precisão as interações moleculares realizadas durante um período de tempo e isso fornece condições suficientes para que haja convergência do modo de ligação.

Figura 29 – RMSD das moléculas selecionadas através do docking proteína-ligante.



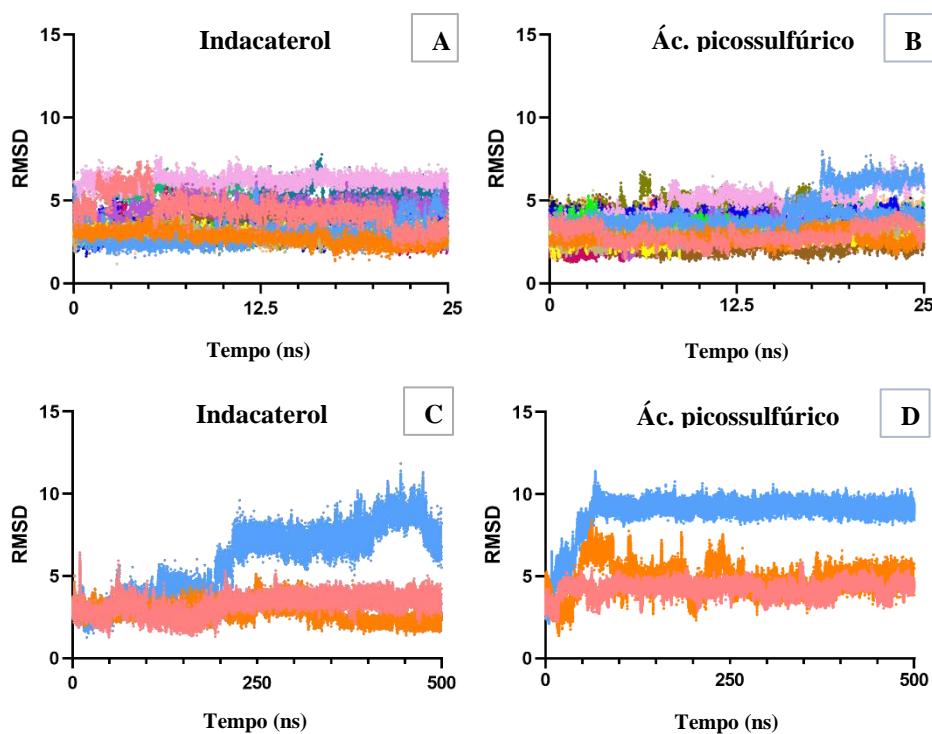
Fonte:Elaborado pela autora.

O que se observa na Figura 29 é que a grande maioria dos ligantes não permanecem na cavidade. Os ligantes efedrina, salsalato, olodaterol, pindolol e isoprenalina não possuem estabilidade para se manter ligados à região. Os ligantes efedrina, salsalato e isoprenalina possuem o menor peso molecular dentre as estruturas, com poucos pontos de ancoragem na cavidade e preferência de interação com o solvente ou resíduos polares presentes nas imediações externas do sítio. Já o olodaterol e o pindolol possuem regiões com vários graus de liberdade, o que confere uma alta flexibilidade ao ligante. O ensulizol, apesar de demonstrar bons valores de RMSD para a maioria das replicatas, foi dispensado por ter uma estrutura muito rígida, sendo observado pouca complementaridade à cavidade em alguns *frames*.

Os ligantes com melhor interação com o sítio crítico em PD-L1 foram os ligantes indacaterol e ácido picossulfúrico. As duas estruturas se mantiveram bem acomodadas na cavidade durante todo o tempo em todas as replicatas de simulação. Assim, para aumentar a amostragem dos conjuntos foi realizado o aumento do número de

replicatas (ao total vinte replicatas de 25 ns) e a simulação de replicatas estendidas (três replicatas de 500 ns), como pode ser visto na Figura 30. Os valores de RMSD nas replicatas curtas tiveram pequenas variações, oscilando em torno dos 4 Å.

Figura 30 – Desvio quadrático médio dos ligantes indacaterol e ácido picossulfúrico para as replicatas curtas e estendidas.



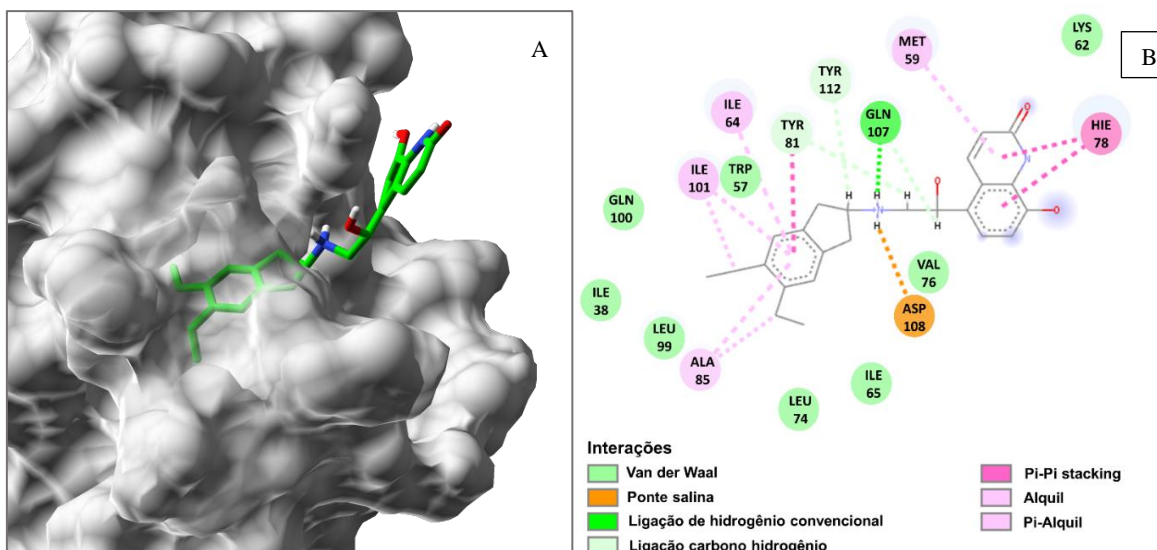
Fonte: Elaborado pela autora. Foram considerados apenas os átomos pesados para o cálculo.

A maior flutuação do indacaterol corresponde ao grupamento mono-hidroxi-quinolina. Essa porção da molécula fica exposta ao solvente interage primordialmente com a Met59 e a His78 através de interações pi-alquil e pi-stacking (Figura 31.B), mas também pode interagir com três resíduos adjacentes, Lys62, Glu60 e Gln107 (Figura 31.A). Essas interações não ocorrem simultaneamente, variando os pontos de ancoragem durante a simulação. A transição entre o estado ligado com Lys62 e ligado com Gln107 é o que causa a rotação da molécula e consequente aumento no RMSD representado na linha azul da Figura 30.C. A região que mantém a molécula ancorada na cavidade é o grupamento 5,6-dietil-lindano (Figura 31).

As simulações longas mostram que houve convergência de estado para duas replicatas. Na terceira replicata (representada em azul, Figura 30.D) a porção do mono-hidroxi-quinolina se desloca para uma região mais exterior na proteína, o núcleo apolar se desloca da porção mais profunda da cavidade para se manter na região de entrada da cavidade, propensa à interação com o solvente.

O indacaterol é estabilizado na cavidade prioritariamente por interações de natureza apolar, como pi-alquil, alquil ou ligações carbono-hidrogênio. A região carregada da molécula é estabilizada por uma ponte salina com o Asp108 e por uma ligação de hidrogênio com o Gln107 (Figura 31.B).

Figura 31 – Representação tridimensional do posicionamento dos ligantes na cavidade e diagrama bidimensional das interações para o indacaterol.



Fonte: Elaborado pela autora. (A) O ligante está representado em verde. A superfície da proteína possui transparência para melhor visualização da posição adotada pelo ligante. (B) O pontilhado em cinza representa os centros aromáticos da molécula.

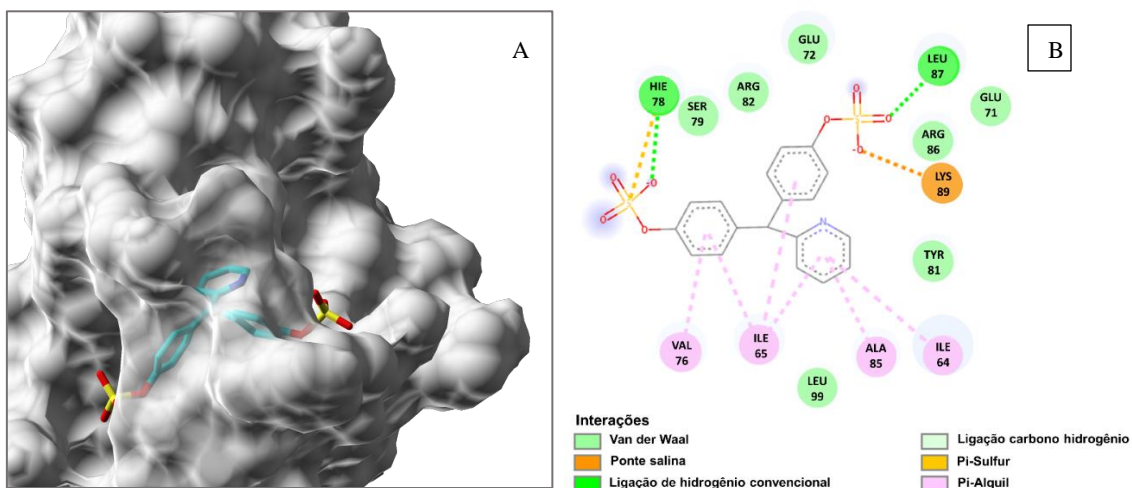
Em relação ao ligante ácido picossulfúrico, a variação do RMSD se dá pelos grupos sulfonados, posicionados na entrada principal (C2) e na entrada secundária (C3) (Figura 32.A). Era esperado que o RMSD alcançasse valores menores, visto que o ligante deveria estabilizar a cavidade em uma conformação específica, mas o que foi observado é que o ácido picossulfúrico tem alta mobilidade estrutural, inclusive em uma das replicatas foi observada a saída do ligante da cavidade (Figura 30. D – Replicata em azul).

A estrutura tridimensional mostra que apesar do ácido picossulfúrico ter a maior parte da superfície envolta pelos resíduos da cavidade, poucas interações são realizadas. A piridina é a estrutura mais importante para ancoragem da molécula e representa a maior porcentagem de interações realizadas (Figura 32.B), semelhante à rede de interações realizada com o indacaterol. Por outro lado, as interações mais fortes são realizadas com os grupos sulfonados na molécula.

Comparando a estabilidade durante as simulações, o ligante indacaterol se sobressaiu ao ácido picossulfúrico quando aumentada a amostragem do sistema, enquanto as simulações longas demonstraram uma alta vibração do ácido picossulfúrico na região, o indacaterol se mostrou mais bem acomodado. Além do mais, a estrutura tridimensional

do indacaterol é favorecida quando são considerados os mecanismos necessários para levar à abertura da cavidade. Como o movimento principal para a abertura da cavidade é a movimentação da Tyr81 (Figura 16), o espaço hábil para a entrada da cavidade favorece o arcabouço estrutural do indacaterol.

Figura 32 – Representação tridimensional do posicionamento dos ligantes na cavidade e diagrama bidimensional das interações para o ácido picossulfúrico.



Fonte: Elaborado pela autora. (A) O ligante está representado em azul. A superfície da proteína possui transparência para melhor visualização da posição adotada pelo ligante. (B) O pontilhado em cinza representa os centros aromáticos da molécula.

As duas moléculas possuem amplo uso no mercado farmacêutico. O indacaterol é um broncodilatador administrado por via inalatória e utilizado para o tratamento de doenças pulmonares crônicas (NOVARTIS, 2014). O indacaterol promove o relaxamento do músculo liso das vias aéreas através da interação com o receptor adrenérgico beta-2 (KAGAN et al., 2012). Possui uma ação rápida e uma baixa dissociação com o receptor, o que torna um diferencial pelo seu efeito prolongado (NALINE et al., 2007). Esta molécula quando administrada por via intravenosa apresenta uma extensiva distribuição, cuja infusão possui volume de distribuição de até 2,557 L (DRUGBANK, 2022).

O ácido picossulfúrico é utilizado na forma de sal (picossulfato) como produto laxativo. É administrado por via oral e é utilizado para tratamento de constipação ou para lavagem do cólon em casos de cirurgia ou exames – como a colonoscopia (BOEHRINGER INGELHEIM, 2013). Seu mecanismo de ação não está bem esclarecido, sabe-se que a molécula é capaz de provocar o aumento da secreção do lúmen intestinal através da inibição da absorção de água e eletrólitos. O sal é posteriormente metabolizado por bactérias nativas para uma forma ativa, o bis-(p-hidroxi-fenil)-piridil-2-metano

(BHPM), cuja forma é capaz de estimular os movimentos peristálticos (DRUGBANK, 2020; KIM et al., 1992).

Não há informações estruturais validadas que descrevam a interação dos ligantes com seus respectivos alvos. Também não há descrição do reuso dessas moléculas para outros fins farmacêuticos, de modo que a interação desses ligantes com uma nova proteína abre caminho para o reposicionamento de fármacos. É interessante destacar que os grupamentos 5,6-dietil-lindano e mono-hidroxi-quinolina, responsáveis pela interação e estabilidade da molécula na cavidade, não se assemelham quimicamente com a estrutura geral dos compostos patenteados para a interface da PD-L1, conforme discutido no tópico 1.2.2. Isso é importante para garantir a especificidade da interação – visando o direcionamento correto do ligante para o sítio – e contribuir para a variação química de compostos usados para o tratamento anti-PD-L1. Tendo em vista que alguns pacientes não respondem aos tratamentos atuais com a via, aumentar a variabilidade de fármacos pode fornecer maior chances de responsividade.

Com base nos resultados obtidos na simulação, o indacaterol se mostrou mais estável no sítio crítico em PD-L1, conforme discutido anteriormente neste tópico. Para estudo da alteração estrutural em PD-L1 induzida pela abertura da cavidade, é necessária uma boa dinâmica de interação e o indacaterol tem predileção pelo maior número de interações realizadas na cavidade (Figura 31.B). Assim, as etapas futuras do projeto se desdobram sobre o entendimento dos efeitos estruturais causados na PD-L1, focando principalmente na região de interface com PD-1.

4.6 Avaliação da modificação conformacional da interface PD-L1 – PD-1

Como discutido no tópico 1.3, a abertura de um sítio crítico pode alterar a região ortostérica através da modificação das redes de interações na proteína e esse é o comportamento desejado para prejudicar a ligação da PD-L1 com a PD-1. Para entender o efeito na proteína causado pela interação com o indacaterol, foi necessário mimetizar algumas condições que podem acontecer no microambiente celular.

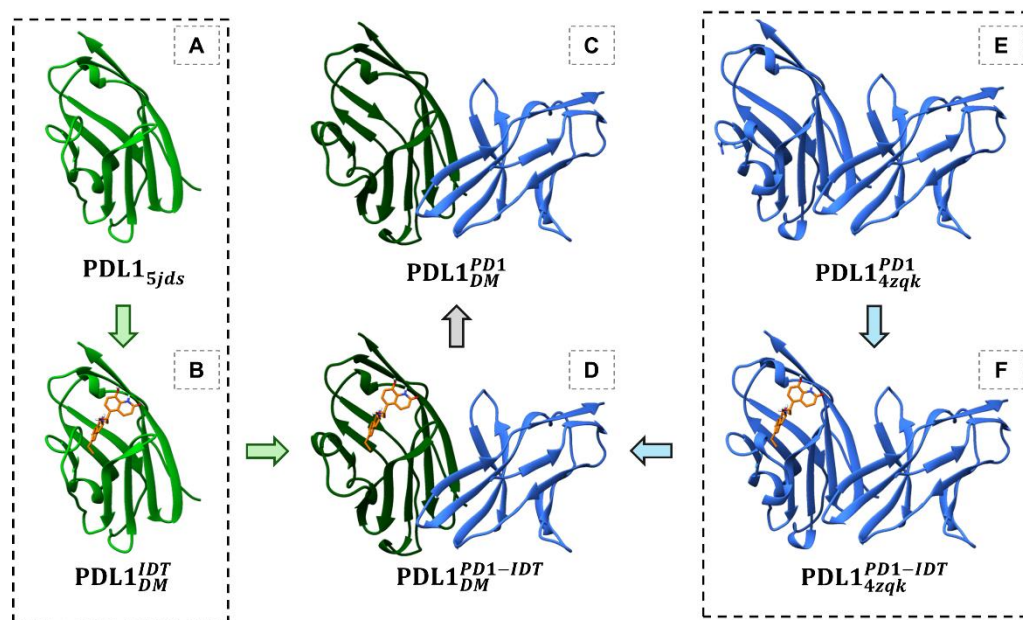
Inicialmente, a proteína na forma livre (forma apo, PDL1_{5jds}) foi adotada como sistema controle para observação do espaço conformacional total alcançado pela PD-L1 (Figura 33 –A). Em seguida, o complexo PD-1 – PD-L1 (proveniente do cristal 4ZQK, complexo PDL1^{PD1}_{4zqk}) foi adotado como segundo sistema controle, de forma que as conformações da proteína nesse estado são as de menor energia para o complexo (Figura 33 –E). O sistema da PD-L1 com o indacaterol foi explorado anteriormente para

avaliação da estabilidade do ligante e será levado em consideração para avaliação da restrição espacial causada pelo ligante (Figura 33 –B, complexo $PDL1_{DM}^{IDT}$).

Em seguida, foi necessário avaliar o efeito do indacaterol na PD-L1 complexada com PD-1. Entende-se que, mesmo que o ligante restrinja a conformação da proteína, a interação com a PD-1 pode não ser prejudicada e forçar a PD-L1 a retornar ao mesmo arranjo tridimensional que o adotado no complexo sem ligante. A intenção foi observar se a interação na interface era capaz de restaurar as conformações nativas da PD-L1. Para isso, foi idealizada a montagem dois complexos ternários: (1) complexo $PDL1_{4zqk}^{PD1-IDT}$, com a pose cristalográfica (PDB ID: 4ZQK) como conformação inicial para as duas proteínas (Figura 33.F), com a inclusão artificial no sítio, por meio de ajuste de rotâmeros, e (2) complexo $PDL1_{DM}^{PD1-IDT}$ (Figura 33.B), com conformação inicial para PD-1 a pose cristalográfica de 4ZQK e a conformação de PD-L1 iniciando a partir da simulação com indacaterol (Figura 33.D).

Para validar o complexo ternário $PDL1_{DM}^{PD1-IDT}$, a mesma pose para PD-L1 foi complexada com PD-1 sem o indacaterol ($PDL1_{DM}^{PD1}$, Figura 33.C). É esperado que esse sistema retorne ao mínimo conformacional assumido pelo complexo $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ sem ligante (sistema controle em Figura 33.E).

Figura 33 – Sistemas tridimensionais adotados para estudo da interface de PD-L1.



Fonte: Elaborado pela autora. O indacaterol está representado em laranja. Em azul estão as estruturas cristalográficas originárias do complexo PD-1 – PD-L1 (PDB ID: 4ZQK). Em verde estão as estruturas de PD-L1 referentes ao cristal 5JDS ($PDL1_{5jds}$) ou da simulação da 5JDS com o benzeno ($PDL1_{DM}^{IDT}$, $PDL1_{DM}^{PD1}$ e $PDL1_{DM}^{PD1-IDT}$). As setas indicam a progressão do sistema e a correlação entre estruturas.

Para avaliar o comportamento da região de interface de PD-L1, o arranjo conformacional de cada complexo foi analisado através da PCA dos resíduos à 5 Å de

PD-1, usando a estrutura cristalográfica 4ZQK como referência. A Figura 34 mostra a variação conformacional colorida pela densidade de frames pertencentes a região destacada nos eixos. A proteína na forma livre (Figura 34. A) possui acesso a dois *clusters* distintos, sendo o segundo pouco povoado (pertencente à região positiva para os dois eixos). A interação com PD-1 (Figura 34. B) revela uma restrição espacial que remete ao mecanismo de seleção conformacional, conforme esperado. Esse comportamento é corroborado por outros trabalhos que discutem a importância da seleção conformacional e do ajuste induzido para a ligação do complexo $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ (AHMED; BARAKAT, 2017; LIU et al., 2017).

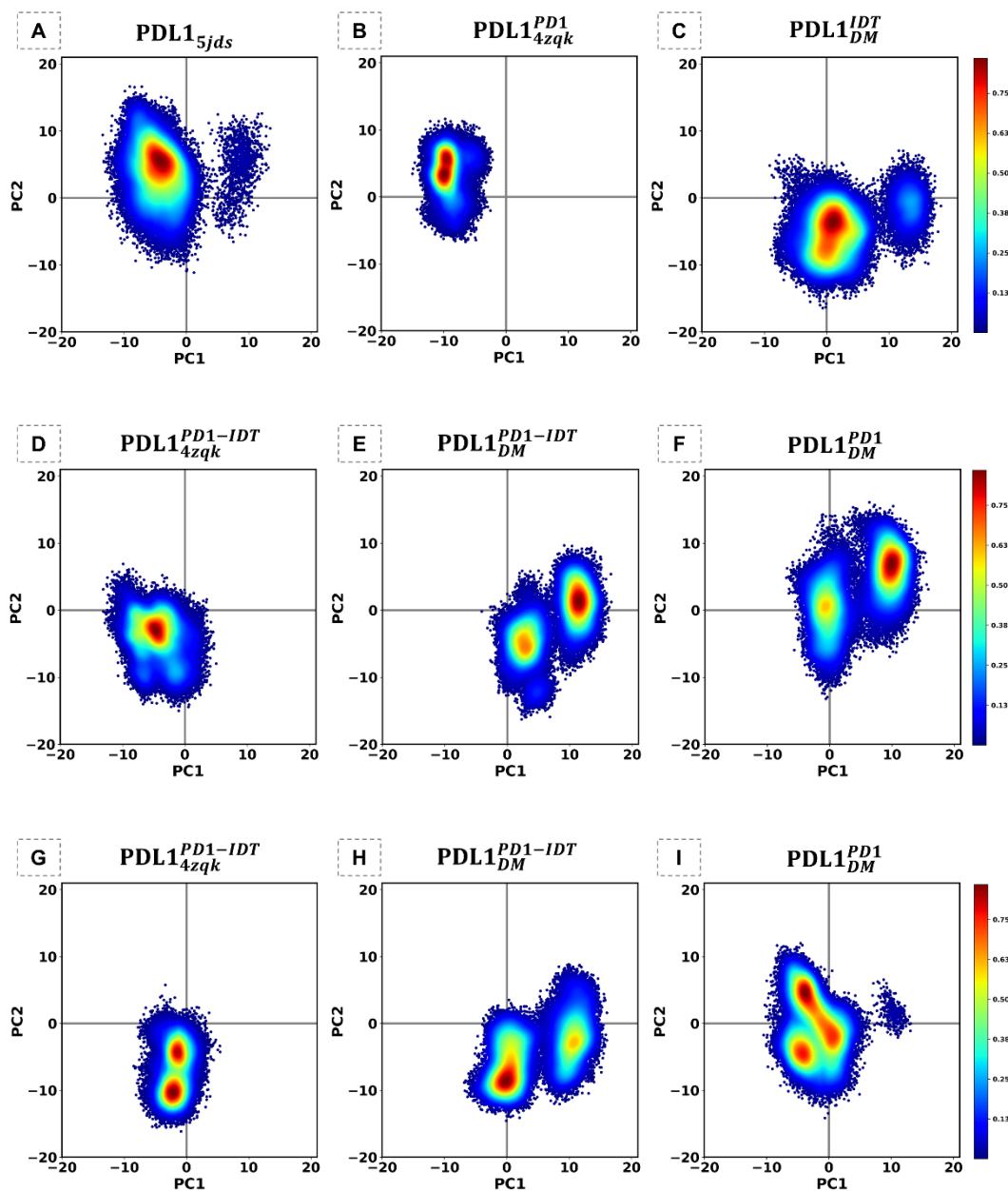
Na presença do indacaterol, as conformações assumidas pela região de interface de PD-L1 sofrem um deslocamento e se concentram nas regiões negativas para o eixo da PC2 (Figura 34. C). Esse resultado implica que ligante restringe a PD-L1 a assumir poses diferentes das assumidas pelo complexo $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ (Figura 34. B), que pode significar o desfavorecimento da interação do complexo e a perturbação do encaixe durante a interação das proteínas, o que se torna um resultado promissor diante do objetivo deste trabalho.

Mesmo com a restrição conformacional do complexo, a ligação com PD-1 pode não ser prejudicada. Para ampliar as análises e compreender o efeito do ligante na interação proteína-proteína, dois complexos ternários foram criados, conforme discutido no início do tópico. O complexo ternário $PDL1_{4zqk}^{PD1-IDT}$ (Figura 33.F) mimetiza a ação do ligante após a ligação do complexo PD-1 – PD-L1. O que se pode observar é que em dez replicatas de 50 ns (Figura 34.D) houve um deslocamento das poses assumidas pelo completo ternário 1, não muito acentuado, mas a maior parte das conformações estão presentes na região negativa do eixo de PC2, diferente do observado em $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ (Figura 33.B). Provavelmente esse leve deslocamento se deve à limitação da amostragem de poses, seja pelo pouco tempo de simulação ou pelo pouco número de replicatas. Entretanto, esse resultado indica que mesmo após o complexo formado, o indacaterol pode causar perturbações na região de interação proteína-proteína, modificando o acesso preferencial da região de interface.

O sistema $PDL1_{DM}^{PD1-IDT}$ mimetiza os momentos iniciais da interação com PD-1 após a ligação de PD-L1 com o indacaterol (Figura 33.D). Na Figura 34.E é possível observar que as dez replicatas mantiveram o acesso de regiões muito semelhantes ao da proteína PD-L1 ligada apenas com indacaterol (Figura 34.C). Pode-se atribuir a isso dois significados, primeiro é que o indacaterol consegue restringir a região de interface de PD-L1 mesmo na presença da PD-1, o que indica que o ligante de fato tem efeito na região

de interação, como esperado. Segundo é que esse comportamento pode ter sido efeito da limitação da amostragem, como no caso de $PDL1_{4zqk}^{PD1-IDT}$.

Figura 34 – Variabilidade conformacional dos resíduos de interface de PD-L1 para as simulações convencionais (cMD).



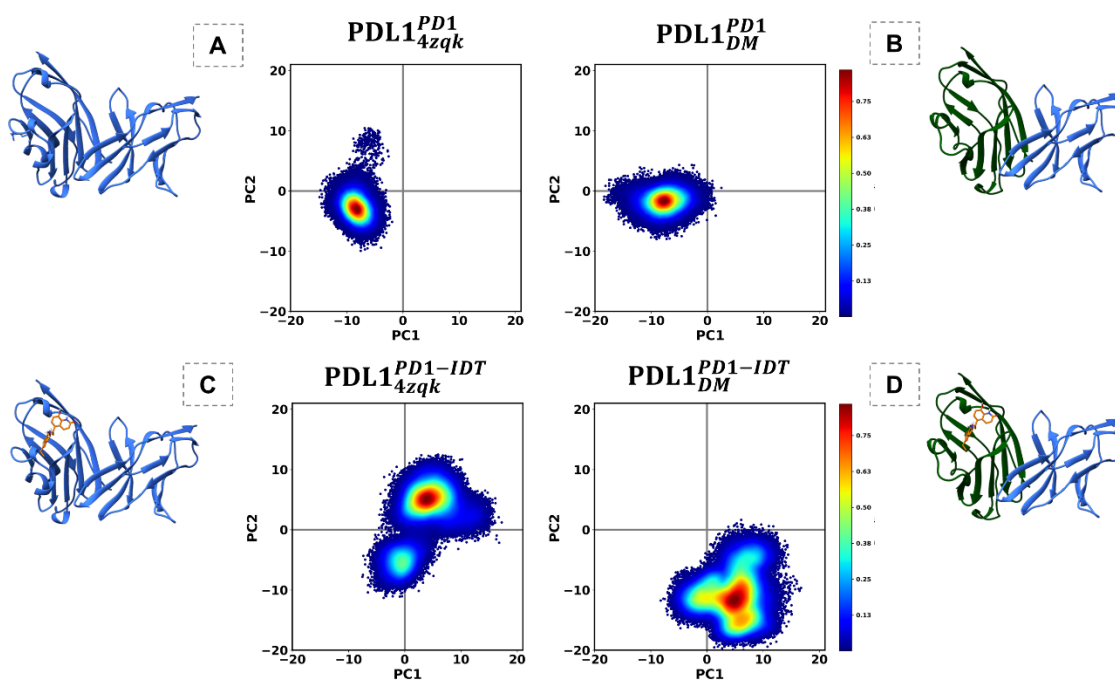
Fonte: Elaborado pela autora. Os pontos estão coloridos pela densidade populacional. (A-F) a amostragem se refere à dez replicatas de 50 ns. (G-I) amostragem se refere à uma replicata de 1 μ s.

Em última análise, o complexo de validação $PDL1_{DM}^{IDT}$ (Figura 33.C) mostrou um deslocamento para valores positivos no gráfico e uma pequena tendência para assumir poses em valores negativos para PC1, semelhante as poses do complexo cristalográfico $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ (Figura 34.F). Era esperado que esse sistema atingisse por completo o mesmo cluster adotado por $PDL1_{4zqk}^{PD1}$, mas como pode ser observado, essa tendência é muito

suave e assim como os demais sistemas, mostrou limitações em varrer um espaço conformacional maior.

Dessa forma, foram adotadas duas estratégias para aumento de amostragem. Inicialmente, uma replicata dentre cada complexo foi estendida para 1 μ s como iniciativa para observar a convergência de pose e permitir que a região de interface explore novas conformações por mais tempo, que estão representadas na Figura 34.(G, H e I). Em seguida, foi realizada uma técnica de amostragem através da dinâmica molecular acelerada gaussiana (GaMD), discutido no tópico 3.5 (três replicatas de 200 ns). Esse método permite uma caracterização eficiente da cinética e termodinâmica de interação proteína-proteína e permite sobrepor barreiras energéticas como forma de explorar novos estados conformacionais, representados na Figura 35.

Figura 35 – Variabilidade conformacional dos resíduos de interface de PD-L1 para as simulações aceleradas (GaMD).



Fonte: Elaborado pela autora. Os pontos estão coloridos pela densidade populacional. A amostragem se refere à três replicatas de 200 ns para cada sistema.

Em análise às simulações estendidas (1 μ s), quando levado em consideração o complexo $PDL1_{4zqk}^{PD1-IDT}$ (Figura 34.G), é possível ver o completo deslocamento das poses em relação ao sistema $PDL1_{4zqk}^{PD1}$, o que implica que, partindo da mesma pose (complexo cristalográfico), o sistema com o indacaterol converge para conformações completamente distintas do complexo sem ligante. O mesmo pode ser observado em $PDL1_{DM}^{PD1-IDT}$ (Figura 34.H), que mesmo após 1 μ s de simulação, a interface de PD-L1

não alcança as poses de $PDL1_{4zqk}^{PD1}$, o que sustenta para ambos os casos a relação do indacaterol com a modificação da região ortostérica.

Para o complexo de validação $PDL1_{DM}^{PD1}$, as dez replicatas de 50 ns assumem dois *clusters* distintos, com centroide em PC1 próximos ao valor de 10 e 0, respectivamente (Figura 34.F). Ao aumentar uma das replicatas para 1 μ s é possível observar o deslocamento da população para o centro do gráfico (*cluster* com centro em $PC1 = 0$) e uma leve tendência dos frames se deslocarem para a posição semelhante à $PDL1_{4zqk}^{PD1}$. Esse comportamento indica que o tempo de simulação estendido foi determinante para o ajuste dos rotâmeros da região de interface em PD-L1 e que é necessária uma amostragem adequada para entender o comportamento dos complexos e a transição de estados.

Diante disso, optou-se pela execução da GaMD para observar a transição dos complexos através da diminuição da barreira energética entre os estados. Foram realizadas três replicatas de 200 ns para os complexos duplos e ternários para observar o efeito direto do ligante na interface da proteína complexada com PD-1. A simulação acelerada da pose cristalográfica (sistema $PDL1_{4zqk}^{PD1}$) teve um perfil semelhante ao observado na cMD, a concentração de pontos em um cluster bem definido no gráfico (Figura 35.A). O sistema $PDL1_{DM}^{PD1}$ se concentrou em pontos bastante semelhantes ao $PDL1_{4zqk}^{PD1}$, como esperado. Isso implica dizer o complexo $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ tende naturalmente convergir para um conjunto de poses restritas e específicas. Percebe-se que mesmo iniciando com a pose de PD-L1 desfavorável para a interação, é necessária a presença do ligante na cavidade para manter a alteração na conformação da interface de PD-L1. Todos os sistemas com o ligante tenderam a se distanciar do centro assumido pelos complexos binários PD-1 – PD-L1, o que reforça o ligante é capaz de estabilizar a conformação da interface em poses distintas do complexo com PD-1.

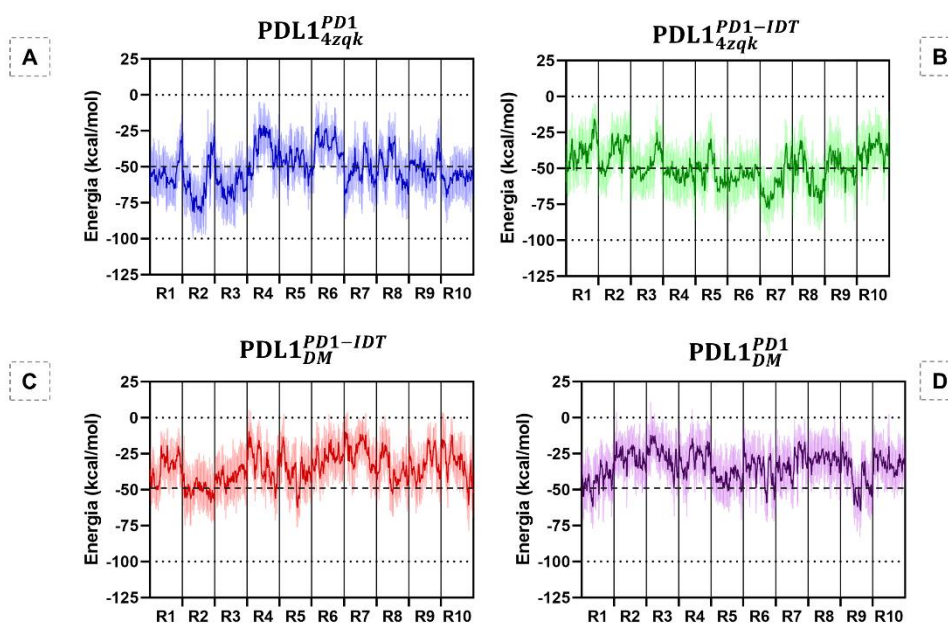
4.7 Descrição energética dos sistemas

A modificação estrutural é um indício promissor para seleção de novos ligantes, mas é essencial entender em termos energéticos se essa alteração é disruptiva e de fato prejudicial para a interação proteína-proteína (ROY et al., 2017). Como forma de compreender a alteração no modo de ligação entre PD-1 e PD-L1, foi realizado o cálculo de energia livre através do método MM/GBSA.

A amostragem dessa análise abrange dez replicatas de 50 ns, de forma que os gráficos na Figura 36.A, B, C e D possuem variação conformacional representadas na Figura 34.B, D, E e F, respectivamente. Conforme discutido no tópico anterior, as

simulações representadas na Figura 34.B e Figura 34.D possuem um agrupamento de configurações tridimensionais posicionadas em centroides muito próximos. Como a simulação do cristal $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ retrata a flutuação do estado mais favorável para a interação, espera-se que as replicatas deste sistema (Figura 36.A) sejam as de menor energia. Comparando a média da energia de ligação entre os sistemas, é possível acompanhar que para $PDL1_{4zqk}^{PD1}$ a maior parte das replicatas se mantem abaixo de -50 kcal/mol (Figura 36.A), apesar de que algumas replicatas, como a R4 e a R6, possui altos valores de energia de ligação, bastante próximos ao observado nos demais complexos. Algumas replicatas de $PDL1_{4zqk}^{PD1-IDT}$ (Figura 36.B) também assumem valores abaixo de -50 kcal/mol, apesar da grande maioria das replicatas se deslocarem para valores mais positivos.

Figura 36 – Energia livre de ligação para os complexos binários e ternários.



Fonte: Elaborado pela autora. Os valores de energia reais estão suavizados com transparência e a média entre os valores está destacada na linha espessa.

De modo semelhante, a região de interface da PD-L1 nos complexos $PDL1_{DM}^{PD1-IDT}$ e $PDL1_{DM}^{PD1}$ também estão agrupados em regiões muito próximas no gráfico (Figura 34.E e F, respectivamente). Vale lembrar que o frame inicial para os dois sistemas parte da mesma conformação (sítio críptico aberto) e a única diferença entre os complexos é a presença do indacaterol em PD-L1. Como discutido no tópico anterior, foi necessário um aumento significativo na amostragem para observar as diferenças entre os complexos, de forma que as dez replicatas de 50 ns representam estados muito parecidos. Essa informação é corroborada pelo perfil energético dos sistemas (Figura 36. C e D).

Conforme pode ser observado, a diferença dos valores de energia de ligação nos complexos é suave, de modo que várias replicatas assumem valores semelhantes, independente do sistema estudado. Supõe-se que a baixa sensibilidade seja atribuída à derivação de energia através da técnica de MM/GBSA. O movimento da cadeia lateral da região de interface da PD-L1 pode ser um movimento sutil para ser captado, se revelando ser uma limitação no estudo desses sistemas.

Apesar da suave diferença entre os valores de energia, existe, de fato, o indício que a abertura da cavidade prejudica em termos energéticos a interação entre PD-1 e PD-L1, tendo em vista o comportamento da interface estudado no tópico 4.6 e a média dos valores de energia. Levando em consideração que os sistemas que iniciaram a simulação com a cavidade alvo aberta oscilam entre -50 e 0 kcal/mol, entende-se que existe uma certa prejuízo na interação entre PD-1 e PD-L1, que é causado pela abertura do sítio críptico.

Em análise final, reiteramos que os resultados obtidos sobre a interação do indacaterol com o sítio críptico e os consequentes efeitos na proteína dão indícios seguros de que é possível modular a estrutura da PD-L1 tendo como alvo uma cavidade não associada com a região ortostérica – diferente de como é visto para os demais bloqueadores de PD-L1 da classe de pequenos ligantes.

5 CONCLUSÃO

A porção IgV da PD-L1 é pequena e com caráter predominante apolar, características essas que limitam o desenho racional de ligantes para essa proteína. Apesar disso, as pequenas moléculas ainda são estudadas como forma de modular a proteína, visto que possuem características farmacocinéticas favoráveis para produção e administração ao paciente. Dessa forma, a busca por novas regiões de interação se mostra crucial para adotar uma abordagem mais dinâmica e efetiva para o tratamento de doenças oncológicas.

De fato, foi possível revelar novos sítios em PD-L1, com o auxílio da simulação de dinâmica molecular com cossolvente. As sondas apolares foram mais eficientes para explorar a maior parcela da superfície, em especial o benzeno, que foi o cossolvente capaz de expor um novo sítio críptico na PD-L1. Tal sítio é caracterizado por uma região protegida pela Tyr81, que funciona como um *gatekeeper*, mantendo a área excluída de contato com o solvente. O deslocamento desse resíduo foi o movimento-chave para permitir a entrada da sonda na cavidade. Os sítios crípticos possuem uma importância especial, visto que podem induzir alterações alostéricas por meio da alteração

na rede interna de resíduos. No caso da PD-L1, surge assim uma nova cavidade que pode ser adotada para o desenvolvimento de novos ligante com efeito modulador negativo para a interação com PD-1.

Pela proximidade da cavidade com a alça C''D, o volume do sítio críptico possui grande variação durante as simulações e essa alta flexibilidade pode ser uma característica interessante para aumentar a variabilidade da escolha de moléculas, tendo em vista a possibilidade de selecionar ligantes com diferentes valores de peso molecular. De fato, foi observada também a existência de uma abertura secundária (entrada C3), que se comunica com a alça C''D. Foi observado que nas conformações com as duas entradas expostas, a alça C''D tende a se estabilizar formando uma fita-beta antiparalela à fita C', diminuindo a flutuação da região, em contrabalanço com a presença do ligante na cavidade.

As análises dos cristais de PD-L1 revelam a presença de água na região da cavidade para algumas estruturas co-complexadas com outra proteína, anticorpo ou pequena molécula. Isso corrobora com os resultados das análises *in silico*, que a cavidade alvo neste estudo adota o perfil de um sítio críptico. Ademais, a predição realizada com o Dogsite indica que a cavidade também tem boas características para realizar interação com pequenos ligantes, apresentando um *drugscore* de 0,84. O que destaca a importância de um novo sítio críptico para a modulação da PD-L1

Fomos também capazes de identificar o indacaterol, fármaco utilizado como broncodilatador, como um possível ligante para esta cavidade, a partir de um virtual screening do banco de dados de moléculas aprovadas pelo FDA. A molécula apresenta um centro hidrofóbico (5,6-dietil-lindano) que permite a ancoragem no sítio críptico, enquanto a porção mono-hidroxi-quinolina realiza interações polares com resíduos circundantes carregados para garantir a estabilidade no sítio.

A análise da interface da PD-L1 mostrou que a presença do ligante é capaz de induzir um movimento semelhante à seleção conformacional, e que restringe as conformações para estados diferentes do adotado no complexo PD-1 – PD-L1. Esse comportamento é observado tanto com a proteína não-ligada a PD-1, quanto no complexo ternário (PD-1, PD-L1 e indacaterol) o que destaca a relação intrínseca dos resíduos da cavidade com a região da interface. Esse comportamento abre espaço para a discussão sobre regulação alostérica, que até o presente momento, é desconhecido para PD-L1. Entretanto, mecanismos complexos como a alosteria demandam uma série de análises robustas que exigem um certo tempo e esforço. Desse modo, fica aberto o tema para se desbravar em etapas futuras.

A análise energética dos sistemas corrobora com a flutuação da interface, de modo que as poses resultantes da simulação do cristal da PD-L1 complexada com PD-1 tiveram os menores valores de energia (conforme esperado). Para os sistemas com o indacaterol foi visto que os valores de energia de ligação tendem a se aproximar do zero, o que destaca que a presença do ligante prejudica a interação proteína-proteína.

De fato, as informações ressaltadas destacam a importância de análises voltadas para regiões ainda não exploradas em proteínas de interesse farmacológico. O potencial efeito alostérico do ligante, ou a proposição do reuso dessa molécula reafirmam a relevância do desenvolvimento racional de fármacos como uma estratégia para busca de novos tratamentos para o câncer.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular 8ª EDIÇÃO**. [s.l: s.n.].
- AHMED, M.; BARAKAT, K. The Too Many Faces of PD-L1: A Comprehensive Conformational Analysis Study. **Biochemistry**, v. 56, n. 40, p. 5428–5439, 10 out. 2017.
- ALBERTS, B. Fundamentos da Biologia Celular. p. 837, 2017.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature** **2013 500:7463**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 14 ago. 2013.
- ALHOSSARY, A. et al. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. **Bioinformatics**, v. 31, n. 13, p. 2214–2216, 1 jul. 2015.
- ANTONIA, S. J. et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 20, p. 1919–1929, 16 nov. 2017.
- ANVISA. Política Vigente para a Regulamentação de Medicamentos no Brasil. 2004.
- AZUMA, K. et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 25, n. 10, p. 1935–1940, 1 out. 2014.
- BAEK, M. et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, v. 373, n. 6557, p. 871–876, 20 ago. 2021.
- BAELL, J.; WALTERS, M. A. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. **Nature** **2014 513:7519**, v. 513, n. 7519, p. 481–483, 24 set. 2014.
- BAILLY, C.; VERGOTEN, G. **Protein homodimer sequestration with small molecules: Focus on PD-L1** *Biochemical Pharmacology* Elsevier Inc., , 1 abr. 2020.
- BANSIA, H. et al. Small Glycols Discover Cryptic Pockets on Proteins for Fragment-Based Approaches. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 3, p. 1322–1333, 22 mar. 2021.
- BECKMAN, R. A.; WEINER, L. M.; DAVIS, H. M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. **Cancer**, v. 109, n. 2, p. 170–179, 15 jan. 2007.
- BEGLOV, D. et al. Exploring the structural origins of cryptic sites on proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 15, p. E3416–E3425, 2018.
- BEKKER, G.-J. et al. Cryptic-site binding mechanism of medium-sized Bcl-xL inhibiting compounds elucidated by McMD-based dynamic docking simulations. **Scientific Reports** |, v. 11, p. 5046, 2021.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
- BOEHRINGER INGELHEIM. GUTTALAX PROFESSIONAL. 2013.
- BOLHUIS, P. G. Sampling Kinetic Protein Folding Pathways using All-Atom Models. **Lecture Notes in Physics**, v. 703, p. 393–433, 2006.
- CASE, D. et al. **The Amber Molecular Dynamics Package**. Disponível em:

<<https://ambermd.org/>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

CERUTTI, D. S.; CASE, D. A. Molecular Dynamics Simulations of Macromolecular Crystals. **Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science**, v. 9, n. 4, 1 jul. 2019.

CHA, J. H. et al. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. **Molecular cell**, v. 71, n. 4, p. 606-620.e7, 16 ago. 2018.

CHANG, C. H. et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1229–1241, 10 set. 2015.

CHOUAIB, S. et al. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down-regulation of transferrin receptor expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 135, n. 2, p. 1172–9, 1 ago. 1985.

COMITANI, F.; GERVASIO, F. L. Exploring Cryptic Pockets Formation in Targets of Pharmaceutical Interest with SWISH. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 6, p. 3321–3331, 12 jun. 2018.

CORNELL, W. D. et al. Application of RESP Charges To Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 21, p. 9620–9631, 1 out. 1993.

DAËRON, M. et al. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. **Immunological Reviews**, v. 224, n. 1, p. 11–43, 1 ago. 2008.

DAS, K. et al. A modular self-adjuvanting cancer vaccine combined with an oncolytic vaccine induces potent antitumor immunity. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 31 ago. 2021.

DIEGUEZ, C. et al. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

DING, H.; LIU, H. Mapping the Binding Hot Spots on Human Programmed Cell Death 1 and Its Ligand with Free-Energy Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2019.

DRUGBANK. **Picosulfuric acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB09268>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

DRUGBANK. **Indacaterol**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB05039>>. Acesso em: 4 abr. 2022.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 19 out. 2000.

ESCORS, D. et al. **The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells** *Signal Transduction and Targeted Therapy* Springer Nature, , 1 dez. 2018.

FANG, W. et al. EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12189–12202, 21 out. 2014.

GANESAN, A. et al. Comprehensive in vitro characterization of PD-L1 small molecule inhibitors. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

GHANAKOTA, P.; CARLSON, H. A. Moving Beyond Active-Site Detection: MixMD Applied to Allosteric Systems. **The journal of physical chemistry. B**, v. 120, n. 33, p. 8685–8695, 25 ago. 2016.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 19 mar. 2010.

GURAM, K. et al. **A threshold model for T-cell activation in the era of checkpoint blockade immunotherapy** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2019.

GUZIK, K. et al. Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 5857–5867, 13 jul. 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** *Cell*, 4 mar. 2011.

HARZSTARK, A. L.; SMALL, E. J. Sipuleucel-T. **Drugs in R & D**, v. 7, n. 3, p. 197–201, 2006.

HOPKINS, C. W. et al. Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 4, p. 1864–1874, 14 abr. 2015.

HOSSEINI, A. et al. Attenuation of isoprenaline-induced myocardial infarction by *Rheum turkestanicum*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, p. 112775, 1 abr. 2022.

HUANG, M. Y. et al. Platycodin D triggers the extracellular release of programmed death Ligand-1 in lung cancer cells. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 131, 1 set. 2019.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.

INCA, I. N. DE C. **Gastos do SUS com cânceres associados ao excesso de peso somam 41,1% do investimento em tratamento oncológico**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/noticias/gastos-do-sus-com-canceres-associados-ao-excesso-de-peso-somam-411-do-investimento-em>>. Acesso em: 22 dez. 2021.

JACOB, J. B.; JACOB, M. K.; PARAJULI, P. Review of immune checkpoint inhibitors in immuno-oncology. **Advances in Pharmacology**, v. 91, p. 111–139, 1 jan. 2021.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.

KAGAN, M. et al. Metabolism and pharmacokinetics of indacaterol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 9, p. 1712–1722, set. 2012.

KAUFMAN, H. L. et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 10, p. 1374–1385, 1 out. 2016.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 677–704, 27 abr. 2008.

- KIM, D. et al. Pocket extraction on proteins via the Voronoi diagram of spheres. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 7, p. 1104–1112, 1 abr. 2008.
- KIM, D. H. et al. The role of intestinal bacteria in the transformation of sodium picosulfate. **Japanese journal of pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 1–5, 1992.
- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery** 2004 3:11, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.
- KOBLISH, H. K. et al. Hydroxyamidine Inhibitors of Indoleamine-2,3-dioxygenase Potently Suppress Systemic Tryptophan Catabolism and the Growth of IDO-Expressing Tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 489–498, 1 fev. 2010.
- KOŁODZIŃSKA, A. et al. Isoprenaline induced Takotsubo syndrome: Histopathological analyses of female rat hearts. **Cardiology Journal**, v. 29, n. 1, p. 105–114, 23 fev. 2022.
- KRISTENSEN, T. G.; NIELSEN, J.; PEDERSEN, C. N. S. METHODS FOR SIMILARITY-BASED VIRTUAL SCREENING. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 5, n. 6, p. e201302009, 1 fev. 2013.
- LE GUILLOUX, V.; SCHMIDTKE, P.; TUFFERY, P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 168, 2 jun. 2009.
- LEE, H. T.; LEE, S. H.; HEO, Y.-S. Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 6, 26 mar. 2019.
- LEE, J. Y. et al. Structural basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. **Nature Communications** 2016 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–10, 31 out. 2016.
- LEHNINGER. **Principles of Biochemistry, 6th ed.** [s.l: s.n.].
- LI, C. et al. Peptide Blocking of PD-1/PD-L1 Interaction for Cancer Immunotherapy. **Cancer immunology research**, v. 6, n. 2, p. 178–188, 1 fev. 2018.
- LIM, H. et al. Investigation of protein-protein interactions and hot spot region between PD-1 and PD-L1 by fragment molecular orbital method. **Scientific Reports** 2019 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–11, 13 nov. 2019.
- LIM, S. O. et al. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. **Cancer cell**, v. 30, n. 6, p. 925–939, 12 dez. 2016.
- LIN, X. et al. Progress in PD-1/PD-L1 pathway inhibitors: From biomacromolecules to small molecules. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 186, p. 111876, 15 jan. 2020.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.
- LIU, J. et al. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 2339, 1 set. 2021a.
- LIU, W. et al. Molecular dynamics simulations elucidate conformational selection and induced fit mechanisms in the binding of PD-1 and PD-L1. **Molecular BioSystems**, v. 13, n. 5, p. 892–900, 2 maio 2017.

- LIU, Y. et al. Structure-Based Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, Molecular Docking, ADMET, and Molecular Dynamics (MD) Simulation of Potential Inhibitors of PD-L1 from the Library of Marine Natural Products. **Marine Drugs** **2022**, Vol. **20**, Page **29**, v. 20, n. 1, p. 29, 25 dez. 2021b.
- MAGIERA-MULARZ, K. et al. Bioactive Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. **Angewandte Chemie**, v. 129, n. 44, p. 13920–13923, 23 out. 2017.
- MAIER, J. A. et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of chemical theory and computation**, v. 11, n. 8, p. 3696–713, 11 ago. 2015.
- MARTÍNEZ, L. et al. Software News and Update Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. 2009.
- MARUSYK, A.; POLYAK, K. **Tumor heterogeneity: Causes and consequences** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, jan. 2010.
- MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480–489, 21 dez. 2011.
- MESQUITA JÚNIOR, D.; SILVA, N. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 522–580, 2010.
- MIAO, Y.; FEHER, V. A.; MCCAMMON, J. A. Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. 2015.
- MICHOT, J. M. et al. **Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: A comprehensive review** *European Journal of Cancer* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2016.
- MILLER, B. R. et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 11 set. 2012.
- MOMTAZ, P.; POSTOW, M. A. Immunologic checkpoints in cancer therapy: focus on the programmed death-1 (PD-1) receptor pathway. **Pharmacogenomics and personalized medicine**, v. 7, p. 357–65, 2014.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785, dez. 2009.
- MUSIELAK, B. et al. CA-170 – A Potent Small-Molecule PD-L1 Inhibitor or Not? **Molecules**, v. 24, n. 15, 1 ago. 2019.
- MUSZAK, D. et al. Terphenyl-Based Small-Molecule Inhibitors of Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 Protein-Protein Interaction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 15, p. 11614–11636, 12 ago. 2021.
- NALINE, E. et al. Effect of indacaterol, a novel long-acting β 2-agonist, on isolated human bronchi. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 3, p. 575–581, mar. 2007.
- NOVARTIS. **Onbrize (indacaterol)**, 2014.
- O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 10, p. 1–14, 7 out. 2011.
- OISETH, S. J.; AZIZ, M. S. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v.

3, n. 10, p. 250, 31 out. 2017.

PASCOLUTTI, R. et al. Structure and Dynamics of PD-L1 and an Ultra-High-Affinity PD-1 Receptor Mutant. **Structure**, v. 24, n. 10, p. 1719–1728, 4 out. 2016.

PERRY, E. et al. Fragment-based screening of programmed death ligand 1 (PD-L1). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 6, p. 786–790, 15 mar. 2019.

PETSKO, G. A.; RINGE, D. Protein Structure and Function. p. 180, 2003.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 1 out. 2004.

PHARES, T. W. et al. Target-Dependent B7-H1 Regulation Contributes to Clearance of Central Nervous System Infection and Dampens Morbidity. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5430–5438, 1 maio 2009.

PORTER, D. L. et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 8, p. 725–733, 25 ago. 2011.

RITTMAYER, A. et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 255–265, 21 jan. 2017.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 7, p. 3084–3095, 9 jul. 2013.

ROY, A. et al. In silico methods for design of biological therapeutics. **Methods**, v. 131, p. 33–65, 1 dez. 2017.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 3, n. 2, p. 198–210, 1 mar. 2013.

SASIKUMAR, P. G. N. et al. **Immunosuppression Modulating Compounds**, 24 jun. 2011.

SASIKUMAR, P. G.; RAMACHANDRA, M. Small-Molecule Immune Checkpoint Inhibitors Targeting PD-1/PD-L1 and Other Emerging Checkpoint Pathways. **BioDrugs** **2018 32:5**, v. 32, n. 5, p. 481–497, 30 ago. 2018.

SCHMIDELL, W. et al. **Biociencia industrial. Volume II, Engenharia bioquímica**. [s.l.: s.n.].

SCHUSTER, M.; NECHANSKY, A.; KIRCHEIS, R. Cancer immunotherapy. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 138–147, 1 fev. 2006.

SCHWARTZENTRUBER, D. J. et al. gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 22, p. 2119–2127, 2 jun. 2011.

SCHWEIZER, D.; SERNO, T.; GOEPFERICH, A. Controlled release of therapeutic antibody formats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 2, p. 291–309, 1 out. 2014.

SCIOR, T. et al. Recognizing Pitfalls in Virtual Screening: A Critical Review. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 4, p. 867–881, 23 abr. 2012.

SEIF, G. **The 5 Clustering Algorithms Data Scientists Need to Know**. Disponível em: <<https://towardsdatascience.com/the-5-clustering-algorithms-data-scientists-need->

to-know-a36d136ef68>.

SHAABANI, S. et al. A patent review on PD-1/PD-L1 antagonists: small molecules, peptides and macrocycles (2015–2018). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 28, n. 9, p. 665, 2 set. 2018.

SHAN, Y. et al. How does a drug molecule find its target binding site? **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 24, p. 9181–9183, 22 jun. 2011.

SHI, D. et al. Understanding the structural and energetic basis of PD-1 and monoclonal antibodies bound to PD-L1: A molecular modeling perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 576–588, 1 mar. 2018.

SKALNIAK, L. et al. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 72167–72181, 7 ago. 2017.

SUN, L.-Q. et al. **Macrocyclic peptides as Immunomodulators**. **PCT Int. Appl.**, 12 nov. 2016.

TAN, S. et al. **Distinct PD-L1 binding characteristics of therapeutic monoclonal antibody durvalumab** **Protein and Cell**, 2018. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb>>

UNG, P. M. U. et al. Identifying binding hot spots on protein surfaces by mixed-solvent molecular dynamics: HIV-1 protease as a test case. **Biopolymers**, v. 105, n. 1, p. 21–34, 1 jan. 2016.

VAJDA, S. et al. **Cryptic binding sites on proteins: definition, detection, and druggability** **Current Opinion in Chemical Biology** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2018.

VANDENBORRE, K. et al. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 413–421, nov. 1999.

VANQUELEF, E. et al. R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W511–W517, 1 jul. 2011.

VASSETTI, D.; PAGLIAI, M.; PROCACCI, P. Assessment of GAFF2 and OPLS-AA General Force Fields in Combination with the Water Models TIP3P, SPCE, and OPC3 for the Solvation Free Energy of Druglike Organic Molecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 3, p. 1983–1995, 12 mar. 2019.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 6 jun. 2002.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Moleculares**. 1° ed. [s.l.] Grupo de Bioinformática Estrutural da UFRGS, 2014.

VOLKAMER, A. et al. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 360–372, 27 fev. 2012.

WANG, C. W.; KLIONSKY, D. J. The Molecular Mechanism of Autophagy. **Molecular Medicine**, v. 9, n. 3–4, p. 65, 2003.

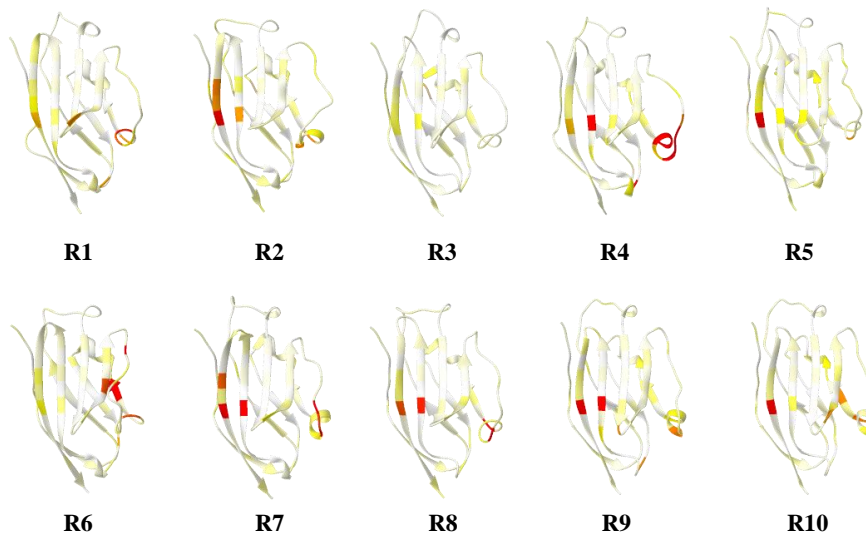
WISHART, D. S. et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1074–D1082, 1 jan. 2018.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1 ago. 1987.

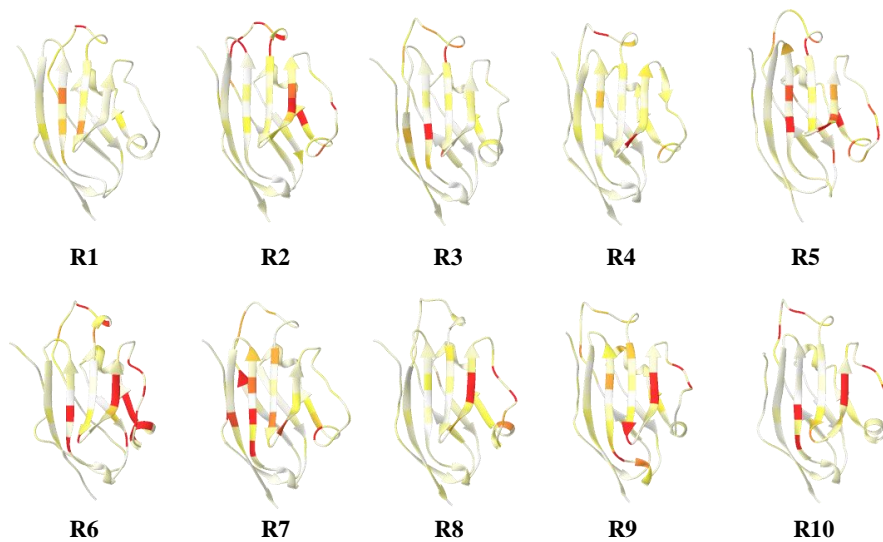
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 4 nov. 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WU, Y. et al. **PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy—blockade, knockdown, or inhibition** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 2019.
- XUE, L. et al. Chimeric antigen receptor T cells self-neutralizing IL6 storm in patients with hematologic malignancy. **Cell Discovery** **2021 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 14 set. 2021.
- YANG, J.; HU, L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 1, p. 265–301, 1 jan. 2019.
- YAO, S. et al. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. **Blood**, v. 113, n. 23, p. 5811–5818, 4 jun. 2009.
- ZAK, K. M. et al. Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1). **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 30323–30335, 13 abr. 2016.
- ZHANG, F. et al. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. **Cell discovery**, v. 3, p. 17004, 2017.
- ZHONG, Y. et al. The characteristics of PD-L1 inhibitors, from peptides to small molecules. **Molecules**, v. 24, n. 10, 20 maio 2019.
- ZHOU, H. X.; RIVAS, G.; MINTON, A. P. **Macromolecular crowding and confinement: Biochemical, biophysical, and potential physiological consequences** *Annual Review of Biophysics*, 2008.

**APÊNDICE A – SOMATÓRIO DE INTERAÇÕES ENTRE O
COSSOLVENTE E A PD-L1. OS CONTATOS ESTÃO MARCADOS EM
ESCALA DE CORES QUENTES, QUE VARIA ENTRE O BRANCO (SEM
CONTATO), O AMARELO (VALOR MÉDIO DE CONTATOS) E O
VERMELHO (NÚMERO MÁXIMO DE CONTATOS).**

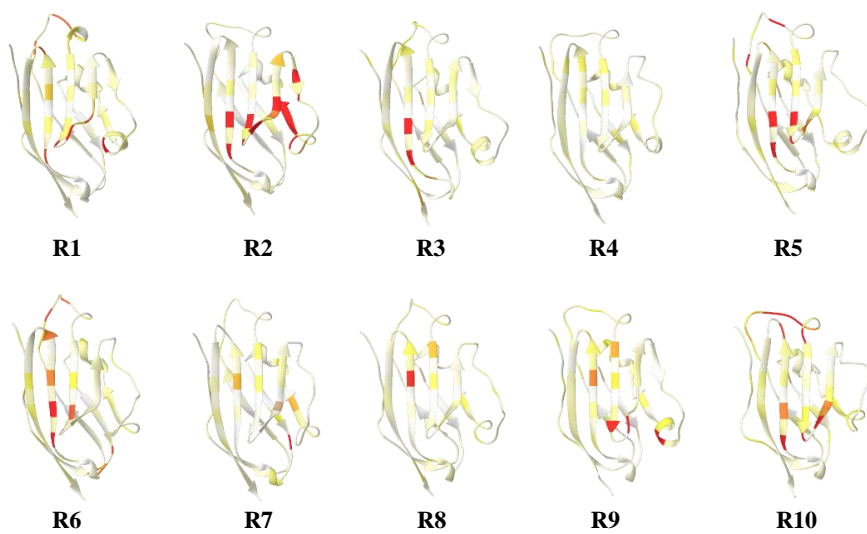
ACT



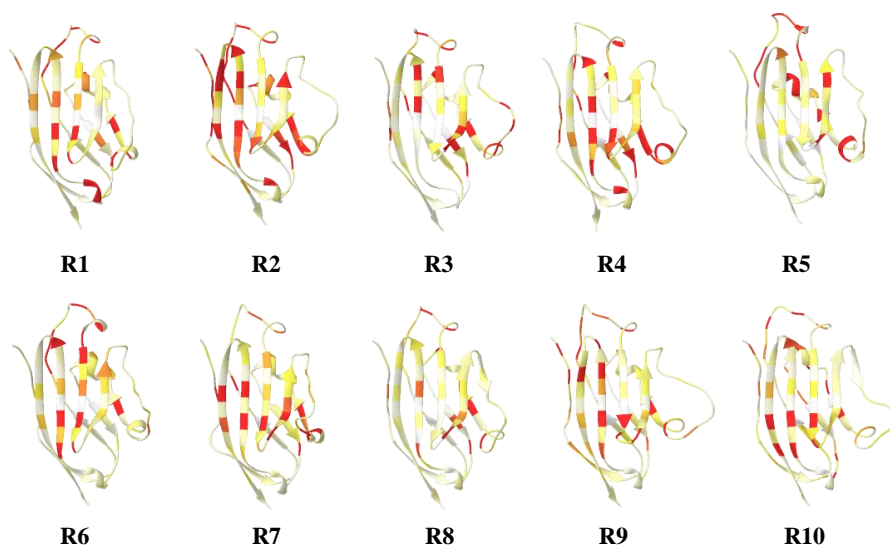
IMI



NMA

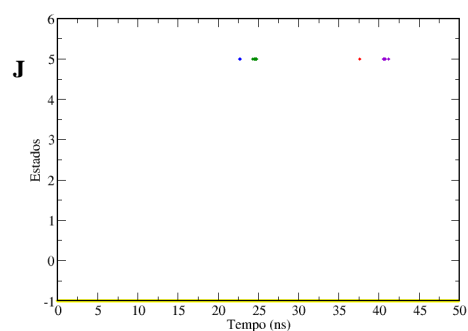
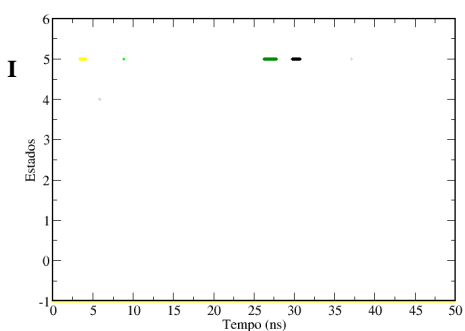
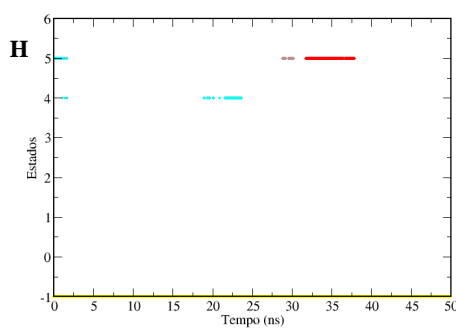
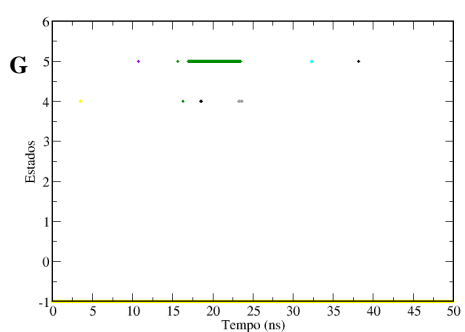
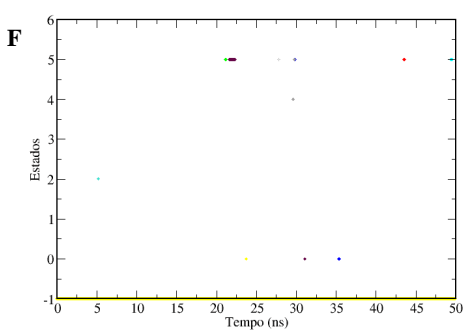
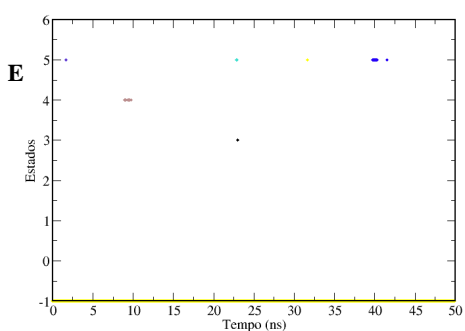
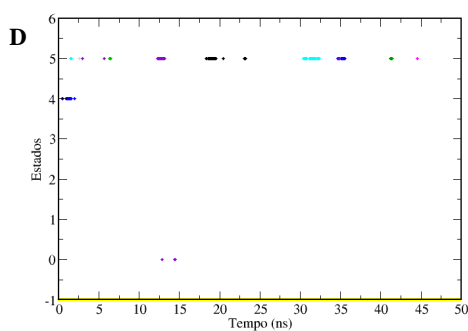
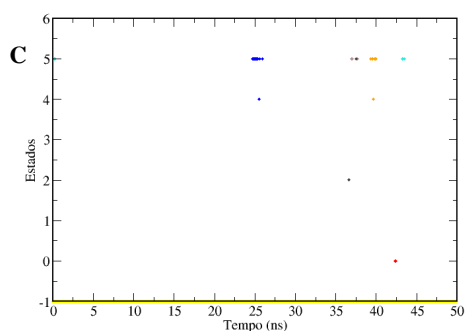
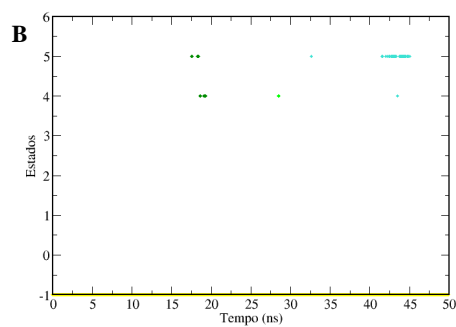
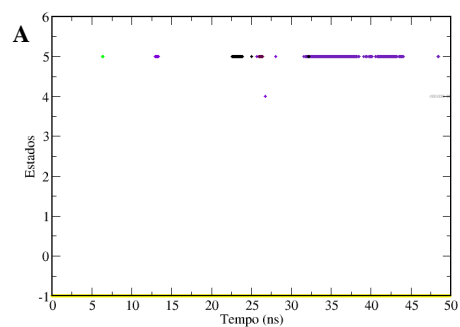


PLN

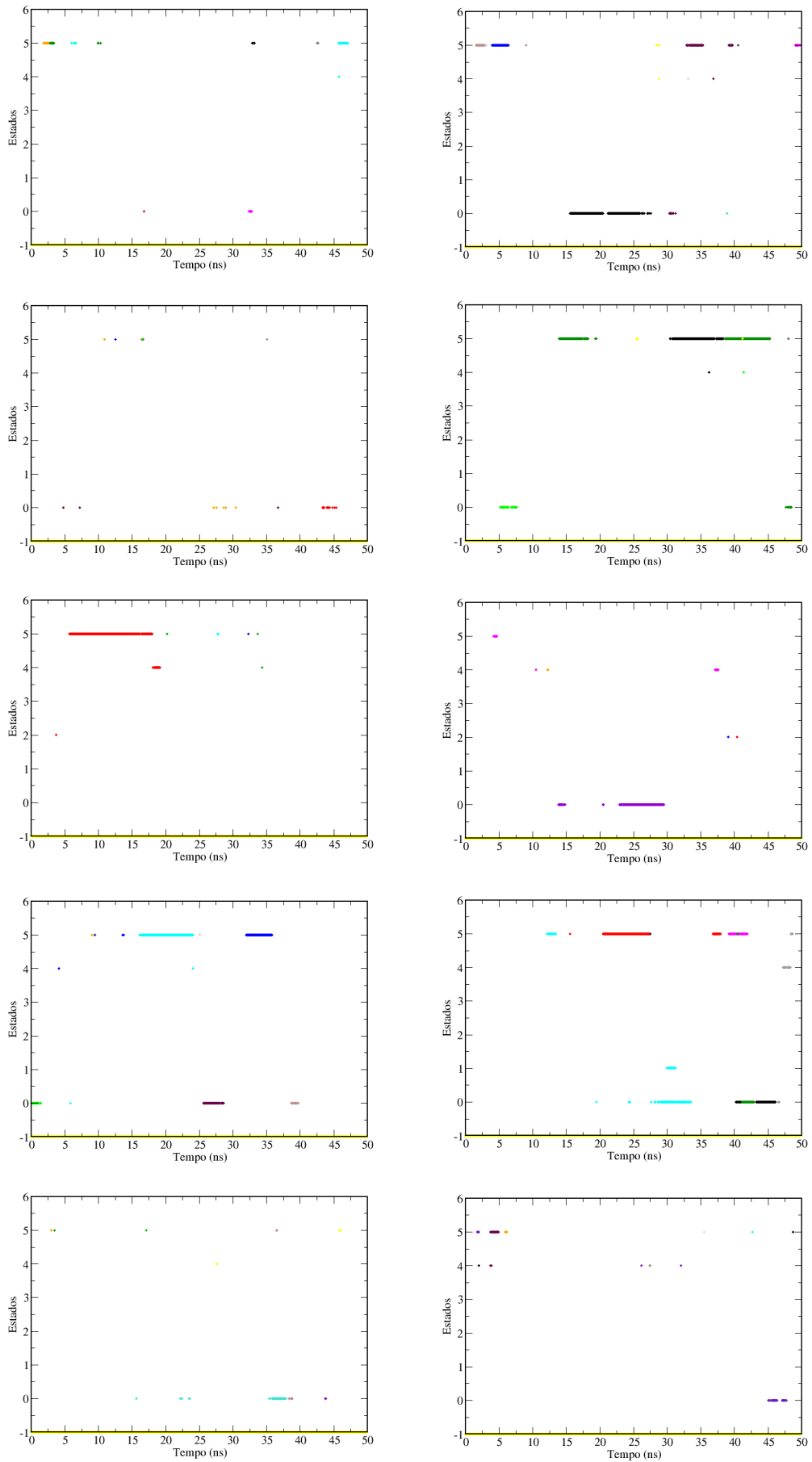


APÊNDICE B – ESTADOS CONFORMACIONAIS DOS COSSOLVENTES NA CAVIDADE EM PD-L1.

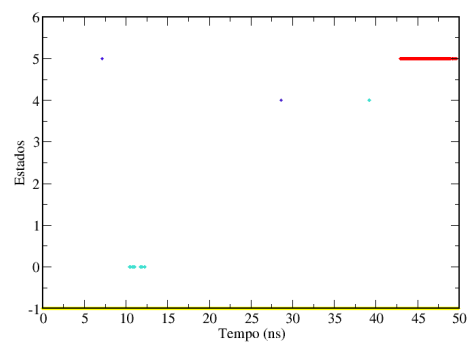
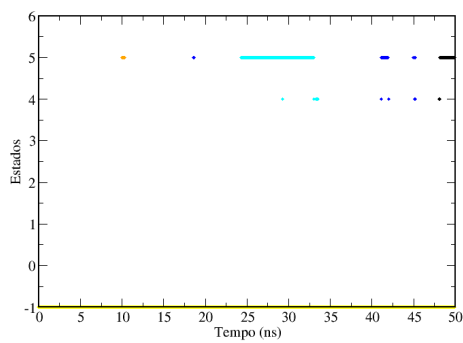
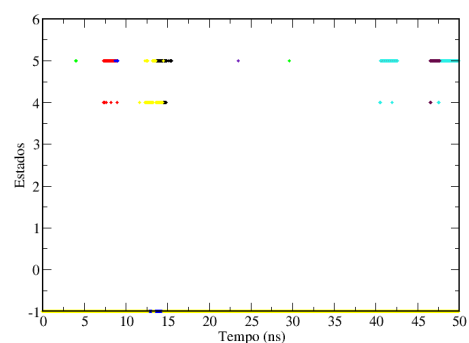
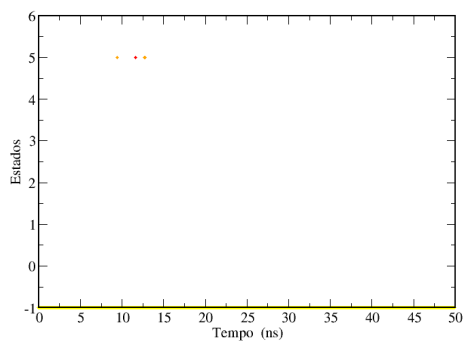
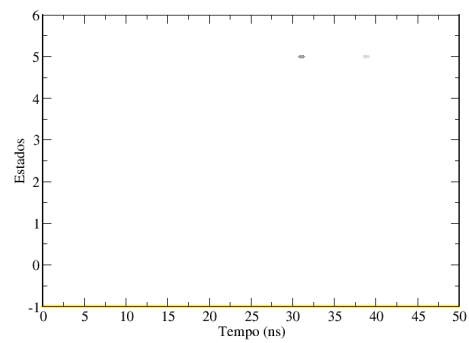
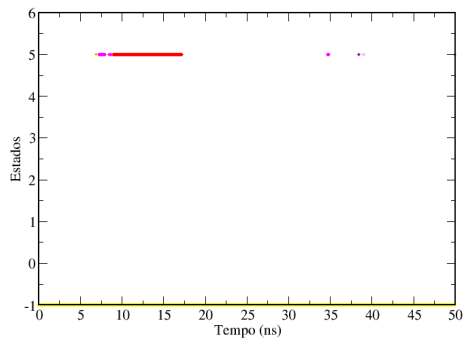
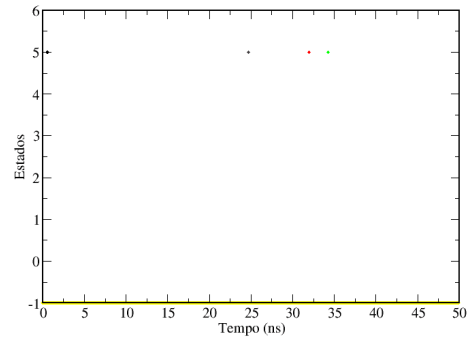
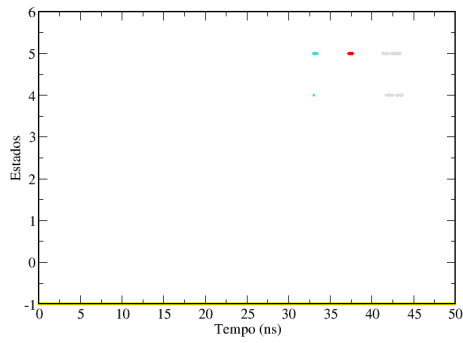
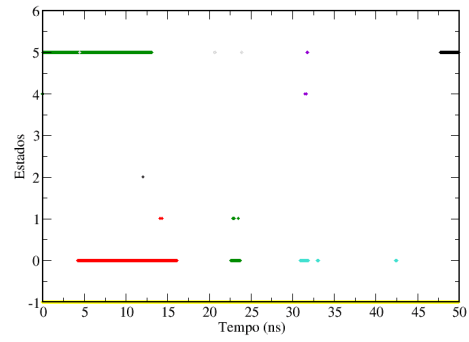
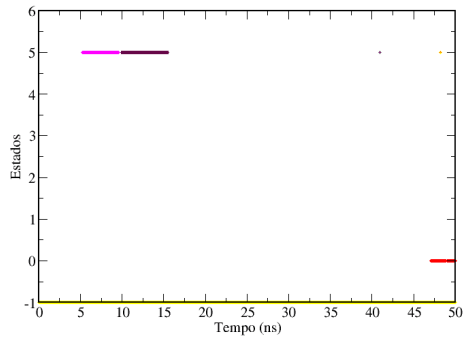
ACT



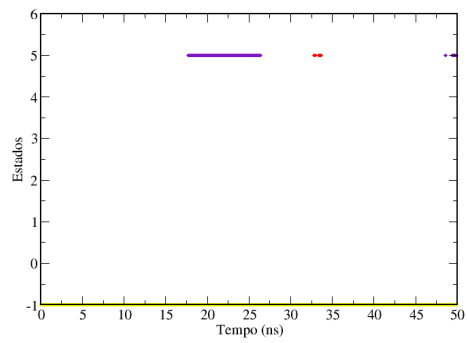
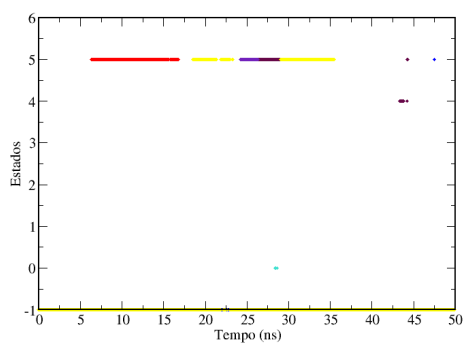
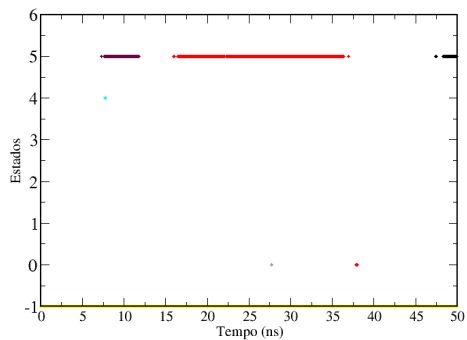
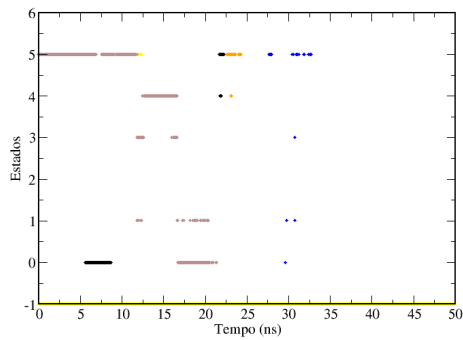
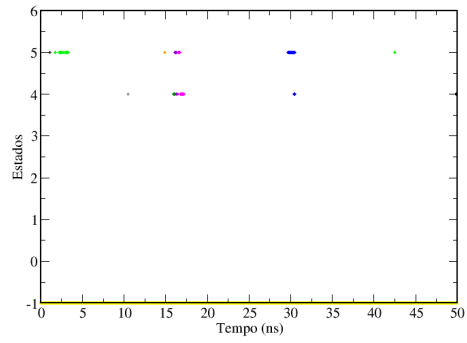
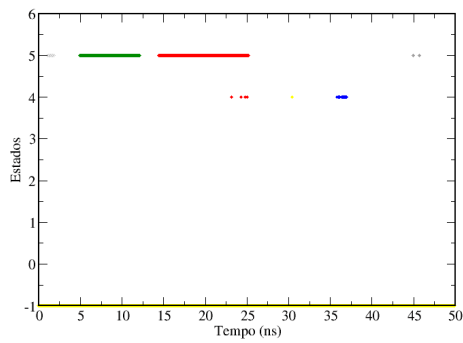
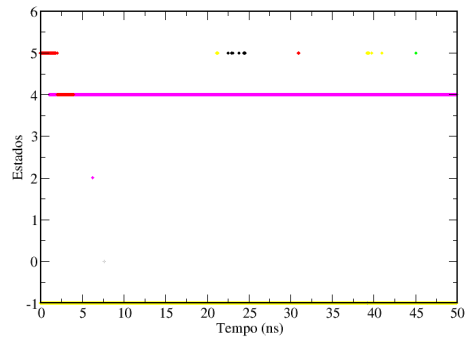
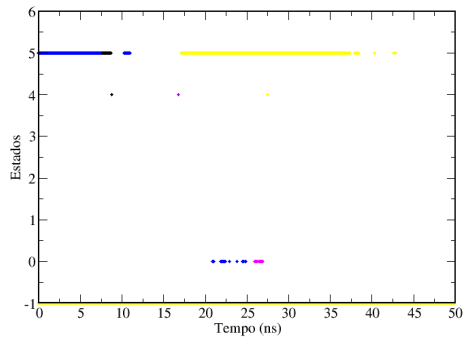
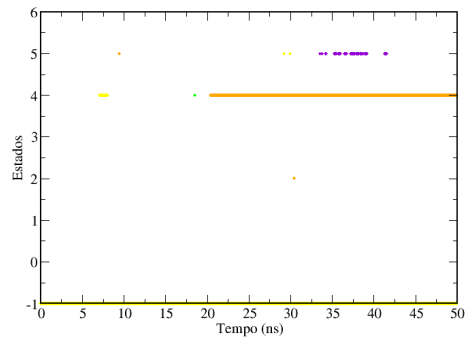
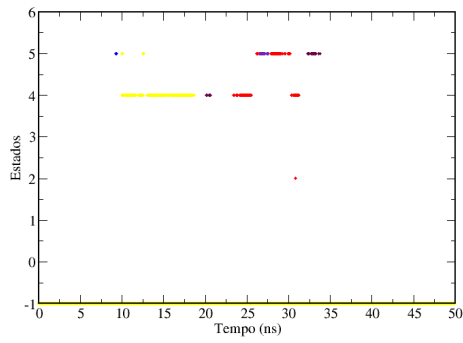
IMI



NMA



PLN



**APÊNDICE C – VALORES DE AFINIDADE PARA AS POSES
RESULTANTES DO DOCKING RECEPTOR-LIGANTE (KCAL/MOL).**

ID	E1		E2		E3		E4		E5		E6		Av
	Afinidade	Hb	Afinidade	Hb	Afinidade	Hb	Afinidade	Hb	Afinidade	Hb	Afinidade	Hb	
4178	-9,9	2	-8,7	3	-8,6	2	-9,5	4	-8,6	3	-7,3	4	-8,8
3811	-9,9	2	-9,3	1	-7,9	1	-8,4	2	-8,8	3	-7,1	3	-8,6
4296	-9,5	3	-7,2	1	-7,8	1	-9,4	4	-8,9	2	-7,8	3	-8,4
246	-9,7	1	-9,5	1	-7,6	2	-9	1	-8	1	-6,6	1	-8,4
410	-8,7	4	-8,4	4	-7,7	5	-8,1	6	-8,3	3	-6,9	5	-8
529	-8,6	4	-8,1	3	-7,4	2	-8,3	3	-8	3	-7,2	3	-7,9
6449	-9	3	-8,8	2	-6,7	3	-7,7	6	-8,2	2	-7,2	3	-7,9
7502	-9,3	2	-8,5	2	-6,9	2	-7,8	5	-7,5	3	-7,4	5	-7,9
1951	-7,8	4	-8,3	4	-8,2	6	-8,1	4	-8,1	5	-6,8	2	-7,9
615	-8,6	8	-8,8	3	-7,1	6	-7,9	3	-7,6	2	-6,8	4	-7,8
4294	-8,7	6	-8,6	2	-6,9	2	-8,5	2	-7,4	3	-6,6	5	-7,8
1039	-8	1	-8,2	3	-7,7	1	-7,7	1	-7,5	5	-7,2	1	-7,7
6212	-8,2	4	-7	1	-7	2	-8	3	-7,5	3	-7,1	1	-7,5
8340	-8,8	3	-7,7	2	-7,1	1	-8,4	2	-7,5	1	-4,5	1	-7,3
6157	-8,8	5	-7,1	5	-6,8	10	-6,8	13	-7,6	5	-6,8	8	-7,3
4068	-8,8	1	-6,7	3	-6,9	5	-7,5	3	-7,3	1	-6,3	3	-7,3
941	-7,7	4	-8,5	1	-6,5	5	-6,7	3	-6,8	1	-7,3	1	-7,3
376	-7,7	5	-8,4	2	-6,4	2	-7,4	3	-6,9	3	-6,5	4	-7,2
972	-9,5	5	-6,3	1	-5,4	1	-6,1	3	-8,2	1	-7,6	1	-7,2
502	-7,7	3	-8,3	5	-7,4	4	-6,5	3	-7,1	2	-5,8	3	-7,1
6861	-9,7	1	-6,8	2	-6,9	2	-6,4	1	-7,6	3	-5,3	3	-7,1
8492	-9,7	2	-8,5	3	-7,4	0	-8,5	2	-8,2	2	-7,4	1	-7,1
326	-8,3	4	-8	4	-6,1	6	-6,8	1	-6,1	4	-6,4	2	-7
844	-7,9	2	-7,2	2	-6,7	1	-6,9	1	-6,8	2	-5,7	2	-6,9
8085	-7,5	4	-7	1	-6,3	3	-6,9	2	-7	4	-6,4	1	-6,9
6080	-8,6	0	-8,7	3	-7,6	4	-8,8	1	-8,2	2	-7,4	4	-6,8
178	-8	1	-8,5	2	-7,3	2	-8,6	2	-8	3	-6,3	0	-6,7
2546	-7,3	4	-7,9	3	-6,1	3	-6,8	2	-5,9	1	-6	5	-6,7
731	-9,8	3	-9,1	0	-7,7	2	-7,5	3	-8,4	2	-6,2	1	-6,6
996	-7,2	3	-7,3	1	-5,8	1	-6,6	1	-6,4	3	-6,2	1	-6,6
6193	-9,6	0	-8,6	2	-8	5	-6,6	2	-8	1	-8,1	1	-6,6
1229	-9,1	2	-5,4	1	-5,5	1	-5,6	2	-6,7	2	-6,8	1	-6,5
721	-6,9	2	-7,7	2	-6,2	5	-6,4	1	-6	5	-5,9	2	-6,5
8248	-7,3	8	-6,8	1	-6,2	5	-5,3	4	-6,9	8	-6,5	6	-6,5
133	-6,4	3	-7,3	1	-6,2	4	-6,8	1	-6	2	-6	2	-6,5
6416	-8,4	1	-8,4	0	-6,8	2	-8,1	1	-8,2	3	-7,1	2	-6,4
881	-7,3	3	-6,2	2	-5,8	2	-6,8	3	-6,5	5	-5,8	4	-6,4
4000	-8,5	4	-8,9	0	-7,4	1	-7,5	2	-8,1	3	-6,7	3	-6,4
8785	-6,3	3	-6,6	3	-6,8	3	-6,3	1	-5,8	3	-6,4	3	-6,4
6335	-8,8	0	-9,1	1	-6,7	3	-7,7	2	-7,2	2	-7,4	2	-6,4
811	-6,5	3	-6,9	3	-6,4	2	-6,3	2	-6	2	-5,9	3	-6,3
1027	-5,9	1	-6,2	1	-7	2	-6,6	2	-5,9	1	-5,7	1	-6,2
6618	-8,4	2	-8	0	-6,1	1	-8,2	3	-7,3	2	-7,2	2	-6,2
1218	-9	2	-7,6	1	-6	0	-5,9	1	-7,2	4	-7,3	2	-6,2