



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

**ALINE DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE**

**DESENHO DE BIOBETTERS BASEADOS NO ANTICORPO ANTI-NOTCH1  
BRONTICTUZUMABE USANDO ABORDAGENS DE OTIMIZAÇÃO *IN SILICO***

**FORTALEZA  
2025**

ALINE DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

DESENHO DE BIOBETTERS BASEADOS NO ANTICORPO ANTI-NOTCH1  
BRONTICTUZUMABE USANDO ABORDAGENS DE OTIMIZAÇÃO *IN SILICO*

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

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

FORTALEZA

2025

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)

---

A298d Albuquerque, Aline de Oliveira.

Desenho de biobetters baseados no anticorpo anti-Notch1 Brontictuzumabe usando abordagens de otimização in silico / Aline de Oliveira Albuquerque. – 2025.

193 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. João Hermínio Martins da Silva.

1. Notch. 2. Brontictuzumabe. 3. biobetter. I. Título.

CDD 660.6

ALINE DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

DESENHO DE BIOBETTERS BASEADOS NO ANTICORPO ANTI-NOTCH1  
BRONTICTUZUMABE USANDO ABORDAGENS DE OTIMIZAÇÃO /N S/L/CO

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

Aprovada em: 26/02/2025

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Bruno Lopes de Souza  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE)

---

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brigido  
Universidade de Brasília (UNB)

---

Profa. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

## AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, Dr. João Hermínio Martins da Silva, pela acolhida em seu laboratório desde 2017, pela orientação e pelas oportunidades oferecidas ao longo de diversas etapas de minha formação acadêmica, da iniciação científica ao doutorado.

À banca examinadora, composta pela Profa. Dra. Priscila Crapiles e pelos Prof. Dr. Marcelo Brigido, Prof. Dr. Gilvan Furtado e Prof. Dr. Bruno Lopes, pelo tempo dedicado à leitura detalhada deste trabalho, bem como pelas valiosas discussões levantadas e sugestões construtivas que contribuíram significativamente para o aprimoramento desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais (PPGBiotec), que, por meio de sua secretaria, coordenação, corpo docente e discente, proporcionou todo o suporte necessário ao longo da minha pós-graduação. Também direciono o meu apreço à toda a Universidade Federal do Ceará, que, desde 2014, de forma gratuita, fomentou minha formação acadêmica através do curso de Bacharelado em Biotecnologia, sediado no Departamento de Bioquímica, e do PPGBiotec, do Departamento de Engenharia de Pesca.

À Fiocruz Ceará, por disponibilizar toda a infraestrutura necessária à realização deste projeto. Estendo o meu agradecimento a todos os seus integrantes, incluindo estagiários, alunos, pesquisadores, equipes administrativas e colaboradores terceirizados, cujo trabalho é essencial ao funcionamento dessa instituição primordial ao Sistema Único de Saúde e ao estado do Ceará. Adicionalmente, agradeço à Fiotec: Fundação de apoio à Fiocruz, pelo apoio financeiro.

Aos colegas do grupo de Modelagem, Simulação e Evolução *in silico* de Biomoléculas da Fiocruz Ceará, que, além de tornarem o ambiente de trabalho leve e descontraído, contribuíram de forma fundamental para discussões que levaram a diversas melhorias deste projeto e colaboraram efetivamente na execução de algumas de suas etapas. Agradeço especialmente ao Luca Milério, pela amizade e por tantas colaborações acadêmicas.

Às colaboradoras com quem tive a oportunidade de trabalhar ao longo do

doutorado e que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal: Dra. Adriana Bonomo (IOC/Fiocruz) e Dra. Melina Mottin (Universidade Federal de Goiás).

Por fim, à minha mãe, Maria Luciene de Oliveira Albuquerque, pelo exemplo em todos os sentidos da vida, especialmente na superação de adversidades, e por me proporcionar a melhor educação, sempre com muito amor e cuidado. Ao meu pai, Francisco das Chagas Dias Albuquerque, por ser exemplo de trabalho e dedicação incessantes. À minha irmã, Andrea de Oliveira Albuquerque, pela acolhida em todos os momentos que precisei, e a toda a minha família, em especial à minha tia Maria Auxiliadora Dias Albuquerque, pelo afeto, cuidado, apoio e dedicação em me proporcionar, com tanto amor, uma educação de qualidade que me permitiu alcançar meus objetivos. À Andressa Alexandre, pelo amor, companheirismo e paciência em todos os momentos ao longo dos últimos cinco anos de doutorado que me ajudaram a superar as adversidades encontradas, pelos conselhos, risadas e por todos os momentos compartilhados. À Natália Freitas e Bianca Riedmiller, pela amizade e apoio constante.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O câncer, uma das principais causas de mortalidade global, representa um conjunto de doenças de etiologia multifatorial que engloba alterações genéticas e epigenéticas, incluindo mutações em vias de sinalização celular como a de Notch, crucial para processos como diferenciação e apoptose. Mutações ativadoras ou a superexpressão do receptor Notch1 são encontradas em pacientes com leucemia linfocítica crônica, linfoma difuso de grandes células B e carcinoma adenoide cístico. Nesse contexto, o anticorpo monoclonal Brontictuzumabe (BRON), que bloqueia a ativação de Notch1 ao se ligar à Região Reguladora Negativa (NRR), surge como base promissora para o desenvolvimento de novos *biobetters* com potencial terapêutico. Este trabalho teve como objetivo desenvolver computacionalmente novos desenhos de anticorpos baseados no Brontictuzumabe, focando na otimização de afinidade e na proposição de fragmentos de cadeia única (scFvs), visando a ampliação do seu potencial terapêutico. Inicialmente, foi modelada a estrutura tridimensional de BRON, aplicada na predição de interações com NRR via *docking* molecular. O complexo foi simulado por dinâmica molecular, com predições de energia de interação e dissociação. As conformações predominantes identificadas foram usadas para otimizações por mutagênese de saturação, enxerto e otimização de CDRs, dobramento inverso e através de modelos de linguagem generalizados. Solubilidade e outros parâmetros relevantes ao desenvolvimento para anticorpos terapêuticos foram avaliados. scFvs baseados em BRON também foram modelados e tiveram suas interações analisadas. Dessa forma, o modo de ligação do complexo BRON-NRR foi identificado, sugerindo um novo mecanismo de inibição mediado pela CDR-H2 de BRON que reduz a acessibilidade ao sítio S2, essencial para a ativação de Notch1. Foram testados 10.072 mutantes, identificando *hot-spots* em resíduos como Thr28, Thr74, Gly101 e Gly104 na cadeia pesada e Gly52 na cadeia leve. AbSeldon R3 demonstrou estabilidade, solubilidade e  $\Delta G_{bind}$  comparável ao BRON nativo, aumentando a participação da cadeia leve na interface e sendo compatível com parâmetros biofísicos de outros anticorpos terapêuticos. Dentre os scFvs construídos, o com *linker* de 12 aminoácidos apresentou estabilidade e interações com S2. Desta forma, este trabalho resultou na proposta de *biobetters* promissores, abrindo caminho para novas terapias antineoplásicas anti-Notch1 baseadas no Brontictuzumabe.

**Palavras-chave:** Notch; Brontictuzumabe; *biobetter*.

## ABSTRACT

Cancer, one of the leading causes of global mortality, represents a set of diseases with multifactorial etiologies that encompass genetic and epigenetic alterations, including mutations in cell signaling pathways such as Notch, crucial for processes such as differentiation and apoptosis. Activating mutations or overexpression of the Notch1 receptor, for example, are found in patients with chronic lymphocytic leukemia, diffuse large B-cell lymphoma, and adenoid cystic carcinoma. In this context, the monoclonal antibody Brontictuzumab (BRON), which blocks Notch1 activation by binding to its Negative Regulatory Region (NRR), emerges as a promising basis for the development of new biobetters with therapeutic potential. This study aimed to computationally design new antibodies based on Brontictuzumab, focusing on affinity maturation and the proposal of single-chain fragment variables (scFvs), with the goal of enhancing its therapeutic potential. Initially, the three-dimensional structure of BRON was modeled and used to predict interactions with NRR through molecular docking. The complex was simulated via molecular dynamics, with interaction and dissociation energy predictions. The predominant conformations identified were used for optimizations through saturation mutagenesis, CDR grafting, inverse folding and generalized language models. Solubility and other development parameters for therapeutic antibodies were evaluated. BRON-based scFvs were also modeled and their interactions analyzed. Thus, the binding mode of the BRON-NRR complex was identified, suggesting a new inhibition mechanism mediated by BRON's CDR-H2, which reduces accessibility to the S2 cleavage site, essential for Notch1 activation. A total of 10,072 mutants were tested, identifying hot spots in residues such as Thr28, Thr74, Gly101, and Gly104 in the heavy chain and Gly52 in the light chain. The AbSeldon R3 design demonstrated stability, solubility and  $\Delta G_{bind}$  comparable to native BRON, increasing the participation of the light chain at the interface and being compatible with biophysical parameters of other therapeutic antibodies. Among the scFvs constructed, the one with a 12-amino acid linker showed stability and interactions with S2. Thus, this work resulted in the proposal of promising biobetters, paving the way for new anti-Notch1 antineoplastic therapies based on Brontictuzumab.

**Keywords:** Notch; Brontictuzumab; *biobetter*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo de marcos importantes no estudo de Notch .....	19
Figura 2 - Estrutura de um receptor Notch e via canônica de sinalização .....	21
Figura 3 - Frequência de alterações em Notch relacionadas a diversos tipos de câncer .....	24
Figura 4 - Marcos do Câncer influenciados por Notch .....	26
Figura 5 - Inibidores terapêuticos da via de Notch .....	29
Figura 6 - Mecanismos efetores dos anticorpos no combate ao tumor .....	35
Figura 7 - Formatos de anticorpos .....	37
Figura 8 - Estratégia computacional aplicada para obtenção de biomoléculas otimizadas a partir de BRON .....	44
Figura 9 - Fluxograma de simulação de dinâmica molecular .....	48
Figura 10 - Simulações de dinâmica molecular aquecida .....	50
Figura 11 - Condições geométricas para estabelecimento da ligH e redução de dimensionalidade por PCA .....	52
Figura 12 - Conformações de NRR simuladas .....	53
Figura 13 - Parâmetros de execução do <i>Umbrella Sampling</i> com sistema de referência barnase-barstar .....	56
Figura 14 - Termos que compõe o campo de força usado pelo Amber .....	57
Figura 15 - <i>Umbrella sampling</i> do sistema Fv-BRON .....	58
Figura 16 - Mutagênese de saturação utilizando os módulos do FoldX .....	60
Figura 17 - Rotina de otimização de anticorpos pelo RAbD e AbSeldon .....	62
Figura 18 - Comparação dos modelos estruturais gerados pelos diferentes programas .....	66
Figura 19 - Validação da modelagem do Fv de BRON .....	68
Figura 20 - <i>Redocking</i> de um complexo Fab-NRR .....	70
Figura 21 - Estabilidade e interações do complexo Fab-NRR .....	71

Figura 22 - Docking BRON-NRR .....	73
Figura 23 - Dinâmica molecular aquecida de BRON-NRR .....	74
Figura 24 - Caracterização do complexo anticorpo-antígeno .....	76
Figura 25 - Interações de BRON com resíduos de S2 em NRR .....	78
Figura 26 - RMSD das simulações estendidas de BRON-NRR .....	80
Figura 27 - RMSF de NRR em diferentes sistemas e em complexo com BRON e RMSF de BRON .....	82
Figura 28 - Área acessível ao solvente de S2 .....	84
Figura 29 - Ligações de hidrogênio entre BRON e NRR .....	85
Figura 30 - PCA de NRR em sistemas monomérico, heterodimérico, ligado e não-ligado .....	87
Figura 31 - Análise do componente principal do complexo anticorpo-antígeno ..	89
Figura 32 - Cálculo de energia livre de interação por MM/GBSA .....	91
Figura 33 - <i>Hot-spots</i> da interação BRON-NRR .....	93
Figura 34 - Validação da DM-US com o sistema barnase-barstar .....	95
Figura 35 - <i>Umbrella sampling</i> do complexo BRON-NRR .....	98
Figura 36 - Mutações positivas ou consenso .....	100
Figura 37 - Mutagênese de saturação de BRON .....	101
Figura 38 - Enxerto e otimização de CDRs com o RAbD .....	103
Figura 39 - Tamanho dos enxertos e contatos dos desenhos produzidos pelo RAbD com NRR .....	104
Figura 40 - Enxerto e otimização de CDRs com o AbSeldon .....	106
Figura 41 - Ligações de hidrogênio entre os desenhos gerados pelo AbSeldon e NRR .....	107
Figura 42 - Comparação das CDRs obtidas pelo AbSeldon e RAbD e validação por DMa .....	109

Figura 43 - iRMS, área acessível ao solvente do sítio S2 em NRR complexado aos modelos otimizados e energia livre de ligação .....	111
Figura 44 - Predição de solubilidade .....	113
Figura 45 - Interações de BRON e AbSeldon R3 com os receptores Notch2 e 3	115
Figura 46 - Modelagem dos fragmentos a partir do Brontictuzumabe .....	118
Figura 47 - Validação dos complexos de fragmentos de anticorpo com BRON ..	120
Figura 48 - Complexos entre os scFvs e NRR .....	121
Figura 49 - Simulações de DM com os complexos scFv-NRR .....	123
Figura 50 - Ligações de hidrogênio relevantes entre scFv e BRON e energia de interação .....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbSeldon	<i>Antibody Structural Enhancement Leveraging Diversity for Optimization of iNteractions</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i> (uma desintegrina e metaloproteinase)
ADC	<i>Antibody-Drug Conjugate</i> (Conjugado Anticorpo-Fármaco)
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis</i> (Fagocitose Celular Dependente De Anticorpos)
ADCP	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (Toxicidade Celular Dependente De Anticorpos)
Akt/PKB	Akt/Proteína quinase B
ANK	Repetições tipo cdc10/anquirina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BiTE	<i>bispecific T-Cell Engager</i> (engajador de células T biespecífico)
BRON	Brontictuzumabe
Cα	Carbonos-alfa
CAC	Carcinoma Adenoide Cístico
CCC	Colangiocarcinoma
CCE	Carcinoma De Células Escamosas
CCR	Câncer Colorretal
CDC	Citotoxicidade Dependente De Complemento
CDM	Centro de Massas
CDRs	<i>Complementarity Determining Regions</i> (Regiões Determinantes De Complementaridade)
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CITs	Células Iniciadoras De Tumor
CPCP	Carcinoma Pulmonar De Células Pequenas
DLL	<i>Delta-like ligand</i> (ligante tipo Delta)
DM	Dinâmica Molecular
DMa	Dinâmica Molecular Aquecida
DM-US	Dinâmica Molecular com <i>Umbrella Sampling</i>

DSSP	<i>Dictionary of Secondary Structures in Proteins</i> (Dicionário de Estruturas Secundárias em Proteínas)
DTX	Docetaxel
DVD-Ig	<i>Dual Variable Domain Immunoglobulin</i> (Imunoglobulina De Domínio Variável Duplo)
EEL	<i>Componente Eletrostático</i>
EGF-like	<i>Epidermal Growth Factor-like</i> (semelhante ao Fator de crescimento epidérmico)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
ESURF	Energia livre associada ao enterramento da superfície acessível ao solvente
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fv	Fragmento variável
GEM	Gemcitabina
GSI	<i>Gamma-Secretase Inhibitor</i> (Inibidor De $\gamma$ -Secretase)
GSM	<i>Gamma-Secretase Modulator</i> (Modulador De $\gamma$ -Secretase)
HAMA	<i>Human Anti-Mouse Antibody</i> (Anticorpos Humanos Anti-Imunoglobulina Murina)
HD	<i>Heterodimerization Domain</i> (Domínio de heterodimerização)
Herp	<i>Hes-related repressor protein</i> (Proteína Repressora Relacionada a Hes)
HMR	<i>Hydrogen Mass Repartition</i> (Reparticionamento de Massa dos Hidrogênios)
Ig	Imunoglobulinas
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INN	<i>International Nonproprietary Name</i> (Nomes Não-proprietários Internacionais)
JAK/STAT	<i>Janus kinase/Signal transducers and activators</i> (Janus quinase/sinalizadores de transdução e ativadores)

LCPO	<i>Linear Combination of Pairwise Overlaps</i>
IDDT	<i>Local Distance Difference Test</i> (Teste de diferença de distância local)
LDGCB	Linfoma Difuso De Grandes Células B
ligh	Ligações de Hidrogênio
LLA-B	Leucemia Linfooblástica Aguda De Células B
LLA-T	Leucemia Linfooblástica Aguda De Células T
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LNR	<i>LIN12/Notch Repeats</i> (Repetições LIN12/Notch)
LOOCV	<i>Leave-One-Out Cross-Validation</i>
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i> (Anticorpo Monoclonal)
MAML	<i>Mastermind Like Transcriptional Coactivator</i> (Coativador Transcricional Tipo Mastermind)
MM/GBSA	<i>Molecular Mechanics with Generalized Born and Surface Area Solvation</i>
NCR	<i>Notch cytokine response</i> (Resposta De Citocina De Notch)
NECD	<i>Notch Extracellular Domain</i> (Domínio Extracelular de Notch)
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i> (Domínio Intracelular de Notch)
NK	<i>Natural Killer</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signals</i> (Sinais De Localização Nuclear)
Nrarp	<i>Notch-regulated ankyrin repeat protein</i> (Proteína De Repetição De Anquirina Regulada Por Notch)
NRR	<i>Negative Regulatory Region</i> (Região Reguladora Negativa)
OAS	<i>Observed Antibody Space</i>
PNC	<i>Patches of Negative Charge</i> (Fragmentos de carga negativa)
PPC	<i>Patches of Positive Charge</i> (Fragmentos de carga positiva)
PSH	<i>Patches of Surface Hydrophobicity</i> (Fragmentos de superfície hidrofóbica)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PD-1	<i>Programmed Death-1</i>

PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand 1</i>
PEST	Sequência carboxi-terminal Pro-Glu-Ser-Thr
PME	<i>particle mesh Ewald</i>
PMF	<i>Potential Mean Force</i> (Força Potencial Média)
PTX	Nab-Paclitaxel
RAbD	<i>RosettaAntibodyDesign</i>
RAM	<i>RBPjK Association Module</i> (Modulo de associação RBPjK)
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Raiz do Desvio Quadrático Médio)
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i> (Raiz da Flutuação Quadrática Média)
REU	<i>Rosetta Energy Units</i>
SASA	<i>Solvent-accessible Surface Area</i> (Área de Superfície Acessível ao Solvente)
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i> (Design De Medicamentos Baseado em Estrutura)
scFv	Single-Chain Fragment Variable (Fragmentos Variáveis de Cadeia Única)
SERCA	<i>Sarcoendoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-Atpase</i>
SFvCSP	<i>Structural Fv Charge Symmetry Parameter</i>
SPC/E	<i>Extended Simple Point Charge Model</i>
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TAD	<i>Transcriptional activation domain</i> (Domínio de ativação transcricional)
TEM	Transição Epitelial-Mesenquimal
TriTAC	<i>Trispecific T Cell–Activating Construct</i> (Construção Tri-Específica Ativadora De Células T)
VDWAALS	Energia de van der Waals
WHAM	<i>Weighted Histogram Analysis Method</i> (Método de Análise De Histograma Ponderado)

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	<b>A via de Notch</b>	19
1.1.1	<i>Marcos temporais do estudo da via de Notch</i>	19
1.1.2	<i>A estrutura dos receptores Notch</i>	20
1.1.3	<i>A arquitetura da via de sinalização canônica</i>	22
1.1.4	<i>A via não-canônica de sinalização</i>	23
1.1.5	<b>A via de Notch no câncer</b>	23
1.1.5.1	<i>Notch em cânceres hematológicos</i>	26
1.1.5.2	<i>Notch em tumores sólidos</i>	27
1.1.6	<b>Notch como alvo oncoterapêutico</b>	28
1.1.6.1	<i>Inibidores de clivagem</i>	29
1.1.6.2	<i>Anticorpos contra receptores ou ligantes</i>	31
1.1.7	<b>Brontictuzumabe</b>	32
1.2	<b>Anticorpos monoclonais</b>	33
1.2.1	<b>Engenharia de anticorpos</b>	35
1.2.2	<b>Mercado dos anticorpos terapêuticos</b>	38
1.3	<b>Biologia estrutural e bioinformática no <i>drug discovery</i></b>	39
1.4	<b>Abordagem do problema</b>	41
2	<b>OBJETIVOS</b>	43
2.1	<b>Objetivo geral</b>	43
2.2	<b>Objetivos específicos</b>	43
3	<b>METODOLOGIA</b>	44
3.1	<b>Modelagem computacional do Fv de BRON</b>	45
3.2	<b>Docking do Fv de BRON ao domínio NRR de Notch1</b>	45
3.2.1	<i>Validação da metodologia de docking para um complexo envolvendo NRR</i>	45
3.2.2	<b>Docking BRON-NRR</b>	49
3.3	<b>Amostragem conformacional do complexo BRON-NRR</b>	51
3.3.1	<i>Simulações de dinâmica molecular convencionais</i>	51
3.3.2	<i>Energia livre de interação</i>	54
3.3.3	<i>Umbrella Sampling</i>	54

3.3.3.1	<i>Validação da metodologia de Umbrella Sampling</i> .....	55
3.3.3.2	<i>Aplicação da DM-US no sistema BRON-NRR</i> .....	57
3.4	<b>Design computacional de biobetters baseados em BRON</b> .....	59
3.4.1	<i>Mutagênese de saturação</i> .....	59
3.4.2	<i>Enxerto de CDRs e design de sequência</i> .....	60
3.4.3	<i>Dobramento inverso e aplicação de modelos de linguagem</i> .....	62
3.4.4	<i>Validação dos designs</i> .....	63
3.4.5	<i>Construção dos scFvs</i> .....	64
3.5	<i>Visualização e tratamento de dados</i> .....	65
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	66
4.1	<i>Estrutura do fragmento variável de BRON e qualidade do modelo</i> ..	66
4.2	<i>Validação e modos de ligação do complexo BRON-NRR</i> .....	69
4.3	<i>Estabilidade e dinâmica conformacional do complexo BRON-NRR</i> ..	78
4.4	<i>Estimativa da energia de interação e exploração do perfil de energia livre do complexo anticorpo-antígeno</i> .....	90
4.5	<i>Desenho de biobetters</i> .....	99
4.6	<i>Avaliação do potencial de aplicação</i> .....	112
4.7	<i>Proposição de novos scFvs baseados em BRON</i> .....	116
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	128
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	130
	<b>APÊNDICE A - COMPARAÇÃO DOS RESÍDUOS DE NRR NAS CONFORMAÇÕES LIGADA E NÃO-LIGADA</b> .....	179
	<b>APÊNDICE B – PREDIÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO COMPLEXO BRON-NRR AO LONGO DA DINÂMICA MOLECULAR AQUECIDA</b> .....	180
	<b>APÊNDICE C – DINÂMICA MOLECULAR AQUECIDA DO COMPLEXO BRONNRR GERADO NO MODO ANTICORPO</b> .....	181
	<b>APÊNDICE D – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS EM NRR</b> .....	182
	<b>APÊNDICE E – PCA DE NRR NAS DUAS PRIMEIRAS REPLICATAS DE SIMULAÇÃO COM 3L95</b> .....	183
	<b>APÊNDICE F – AUTOVALORES E VARIÂNCIA CUMULATIVA DA PCA DE NRR</b> .....	184

<b>APÊNDICE G – PCA DE S2 EM SIMULAÇÕES COM NRR LIGADO E NÃO-LIGADO .....</b>	<b>185</b>
<b>APÊNDICE H - AMOSTRAGEM DAS JANELAS DE DM-US PARA BARNASE-BARSTAR COM JANELAS DE 0,5 Å .....</b>	<b>186</b>
<b>APÊNDICE I – DISTÂNCIA INICIAL ENTRE OS CENTROS DE MASSA DE BRON E NRR PARA DM-US .....</b>	<b>187</b>
<b>APÊNDICE J – MUTAÇÕES QUE GERARAM GANHO DE <math>\Delta G_{bind}</math> DE PELO MENOS 0,5 kcal/mol .....</b>	<b>188</b>
<b>APÊNDICE K – SUPERFÍCIE ELETROSTRÁTICA DE NRR .....</b>	<b>189</b>
<b>APÊNDICE L – PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS NA CDR QUE CONSERVEM O MESMO DOBRAMENTO, CALCULADO PELO ANTIFOLD COM NUMERAÇÃO IMGT .....</b>	<b>190</b>
<b>APÊNDICE M – MODIFICAÇÕES EM BRON PROPOSTAS ATRAVÉS DE MODELOS DE LINGUAGEM .....</b>	<b>192</b>
<b>APÊNDICE N – AVALIAÇÃO DO ABSELDON R3 COM O PROTEIN- SOL E THERAPEUTIC ANTIBODY PROFILER .....</b>	<b>193</b>
<b>APÊNDICE O – DOCKING COM O CLUSPRO DOS SCFVS COM BRON NO MODO ANTICORPO .....</b>	<b>194</b>
<b>APÊNDICE P – ANÁLISE DAS INTERFACES SCFV-BRON COM PDBSUM .....</b>	<b>195</b>

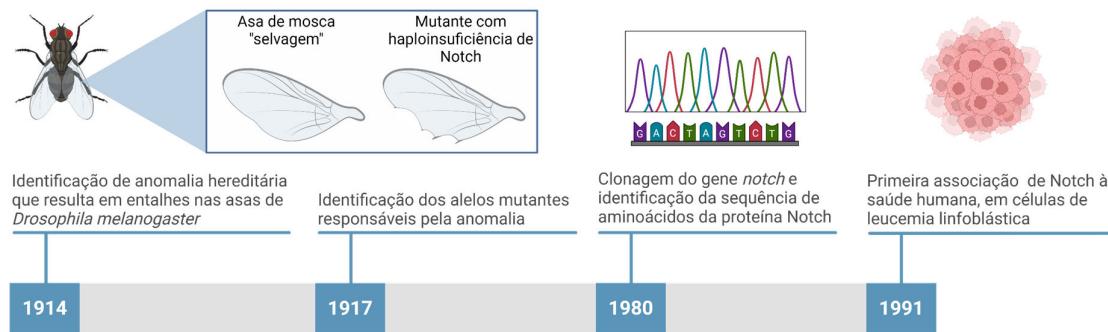
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A via de Notch

#### 1.1.1 Marcos temporais do estudo da via de Notch

A via de Notch, nomeada devido a sua identificação inicial a partir de uma anormalidade hereditária associada a presença de entalhes nas asas de moscas (*Drosophila melanogaster*), teve seus alelos mutantes identificados em 1917 (Dexter, 1914; Morgan, 1917) (Figura 1). O contínuo avanço das técnicas de biologia molecular permitiu a clonagem do gene *notch* de *Drosophila melanogaster* e a identificação da sequência de aminoácidos que compõe a proteína Notch na década de 1980, o que, por sua vez, facilitou o estudo da organização estrutural e funcional de tal molécula (Kidd; Kelley; Young, 1986; Wharton *et al.*, 1985).

Figura 1. Linha do tempo de marcos importantes no estudo de Notch



Fonte: elaborada pelo autor (2024).

A associação da via de sinalização de Notch à diversos processos celulares em organismos-modelo culminaram na descoberta da primeira conexão de tal via à saúde humana em 1991, a partir da identificação da realocação anormal de um gene homólogo à *notch* em células de leucemia linfoblástica (Ellisen *et al.*, 1991). Desde então, os diferentes componentes da via de Notch têm sido vinculados a várias funções no desenvolvimento de mamíferos, incluindo neurogênese, somitogênese, miogênese, cardiotipose, hematopoiese e angiogênese (Cormier *et al.*, 2007; Gering; Patient, 2010).

A sinalização por Notch é altamente pleiotrópica, afetando quase todos os tecidos e regulando escolhas do destino celular de maneira específica ao contexto, podendo promover proliferação ou apoptose. Dessa forma, a integração com outras vias determina o resultado de seu sinal para o destino celular (Hori; Sen; Artavanis-Tsakonas, 2013). Em células-tronco, Notch pode enviar sinais para diferenciação, manutenção e proliferação nos sistemas digestivo e hematopoiético, e no tecido epitelial (Bigas; Espinosa, 2012; Kim; Shivedasani, 2011; Koch; Lehal; Radtke, 2013).

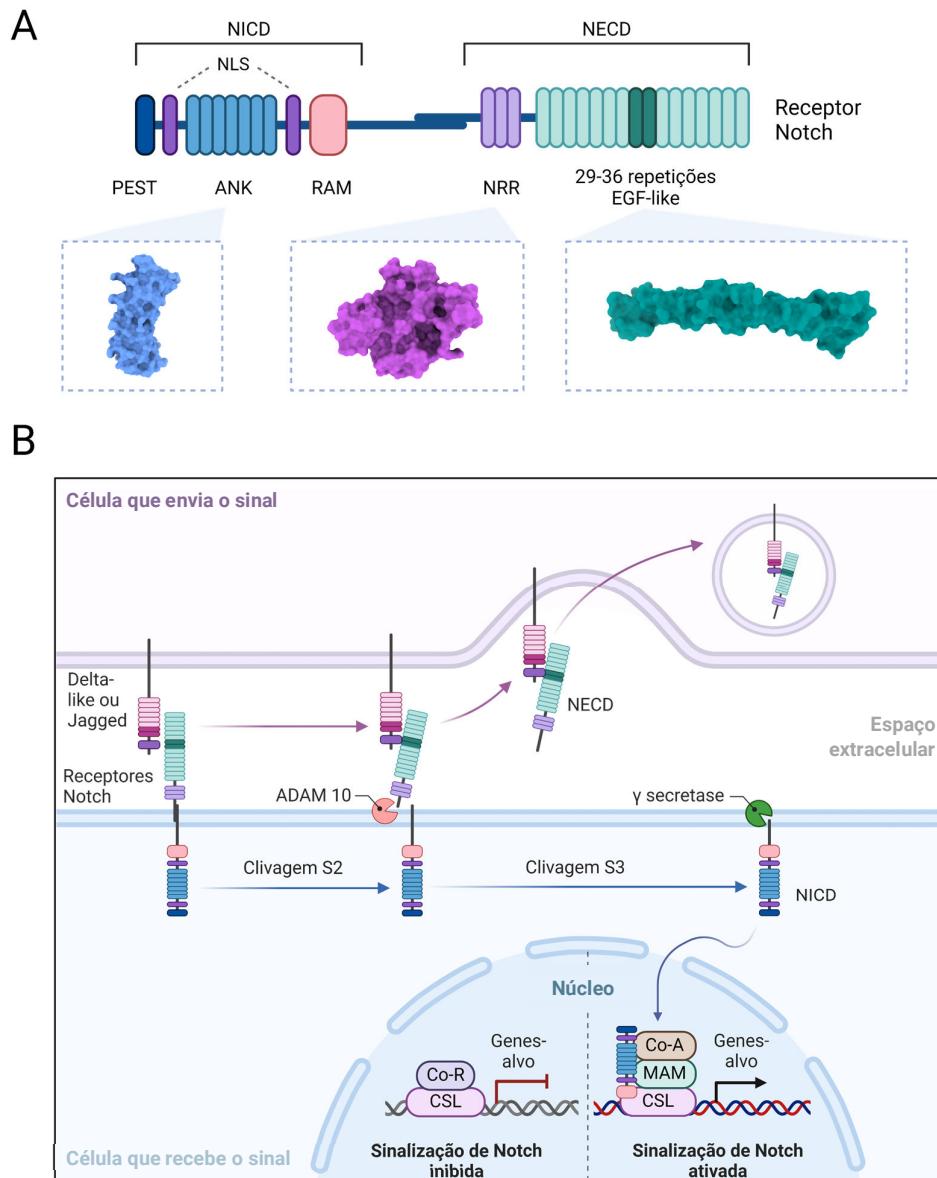
### **1.1.2 A estrutura dos receptores Notch**

A via de Notch consiste em receptores, ligantes, modificadores e fatores de transcrição que são, em grande parte, conservados da *Drosophila* aos humanos devido ao seu papel central no desenvolvimento e na diferenciação celular em organismos multicelulares (Allenspach *et al.*, 2002). Na mosca, o gene *notch* codifica um receptor que é ativado pelos ligantes Delta e Serrate. Já em mamíferos, encontram-se quatro receptores Notch (Notch 1-4) e cinco ligantes (Delta-like-1, -3, -4 e Jagged-1 e 2) (Bray, 2006).

Os receptores Notch são proteínas transmembrana tipo I, com uma região extracelular que interage com os ligantes e uma região citoplasmática relacionada à transdução de sinal (Bolós; Grego-Bessa; De La Pompa, 2007) (Figura 2A). O domínio extracelular (NECD, do inglês “*Notch Extracellular Domain*”) possui entre 29 a 36 repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF-*like*, do inglês “*Epidermal Growth Factor-like*”) nas quais são adicionadas glicosilações (Rana; Haltiwanger, 2011; Rebay *et al.*, 1991).

Essas repetições EGF são sucedidas pela região reguladora negativa (NRR, do inglês “*Negative Regulatory Region*”), composta por três repetições LIN12/Notch (LNR, do inglês “*LIN12/Notch Repeats*”) e o domínio de heterodimerização (HD, do inglês “*Heterodimerization Domain*”) (Hori; Sen; Artavanis-Tsakonas, 2013). NRR enovelha-se de forma a impedir o acesso de metaloproteinases ao sítio 2 (S2), prevenindo uma ativação da cascata de sinalização independente de ligante (Kopan; Ilagan, 2009).

Figura 2. Estrutura de um receptor Notch e via canônica de sinalização



Fonte: elaborada pelo autor (2024). (A) Estrutura esquemática de um receptor Notch genérico. A constituição do domínio extracelular NECD inclui repetições EGF-like, que participam da interação com os ligantes Delta e Jagged, e NRR que, na ausência de sinalização, está em uma conformação auto-inibida mantida por interações entre as regiões LNR e HD, impedindo a ativação independente de ligante. A região intracelular NICD é subdivida no módulo de associação RBPjK (RAM), repetições de cdc10/anquirina (ANK), sinais de localização nuclear (NLS) e a sequência terminal PEST. A representação de superfície das estruturas cristalográficas das regiões EGF-like (PDB: 5MWB), NRR (PDB: 3L95) e ANK (PDB: 2QC9) foram visualizadas com o ChimeraX. (B) Representação simplificada da via canônica de Notch. Criado com BioRender.com.

A região transmembrana é seguida pelo domínio intracelular (NICD, do inglês “*Notch Intracellular Domain*”) composto por um módulo de associação RBPjK (RAM, do inglês “*RBPjK Association Module*”), sete repetições iteradas do tipo

cdc10/anquirina (ANK), dois sinais de localização nuclear (NLS, do inglês “*Nuclear Localization Signals*”) e uma sequência carboxi-terminal Pro-Glu-Ser-Thr (PEST) (Blank; Kourilsky; Israël, 1992; Rechsteiner, 1988; Tamura *et al.*, 1995). Adicionalmente, Notch1, 2 e 3 possuem regiões de resposta de citocina (NCR, inglês “*Notch cytokine response*”), e Notch1 e 2 contém domínios C-terminais de ativação transcrecional (TAD, inglês “*Transcriptional activation domain*”) (Allenspach *et al.*, 2002).

### 1.1.3 A arquitetura da via de sinalização canônica

Os receptores Notch, sintetizados como proteínas precursoras, são clivados por uma furina-convertase no sítio 1 (S1) durante o transporte para a membrana celular, assumindo sua forma heterodimérica (Logeat *et al.*, 1998). O processamento pós-traducional também inclui a O-glicosilação de NECD, essencial ao seu correto enovelamento e interação com a região DSL nos ligantes proteicos (Brückner *et al.*, 2000; Rana; Haltiwanger, 2011).

Antes da ativação pelo ligante, Notch é mantido em uma conformação de repouso resistente à metaloprotease, garantida por interações extensivas entre LNR e HD no domínio NRR do receptor (Gordon *et al.*, 2007). A sinalização é desencadeada pela interação receptor-ligante entre células vizinhas, levando a duas clivagens proteolíticas sucessivas do receptor (Figura 2B). A primeira ocorre em S2, localizado em NRR, e é exercida por metaloproteases da família ADAM (do inglês “*a disintegrin and metalloproteinase*”).

O domínio extracelular recém-clivado é endocitado pela célula que expressa o ligante após a monoubiquitinilação de sua cauda citoplasmática (Radtke; Fasnacht; MacDonald, 2010). Dessa forma, a força mecânica exercida pela endocitose de NECD-ligante pode ser a responsável pela exposição de S2. Entretanto, também se cogita que a interação produza um efeito alostérico propagado da região de interação até o domínio NRR, expondo o sítio para processamento proteolítico (Gordon *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2007; Parks *et al.*, 2000).

Uma segunda clivagem ocorre no domínio transmembrana no sítio 3 (S3) pela ação de um complexo multiproteico  $\gamma$ -secretase, resultando na liberação do NICD, que é transportado para o núcleo (Tagami *et al.*, 2008). NICD liga-se ao fator de transcrição CSL formando um complexo de transcrição temporário que recruta

coativadores, como as proteínas MAML1-3 (do inglês “*Mastermind Like Transcriptional Coactivator*”) (Canalis; Zanotti, 2016; Lv *et al.*, 2024).

Por fim, o complexo mediador de ativação de transcrição MED-8 é recrutado, promovendo a transcrição dos genes-alvo, incluindo: Hes (do inglês “*Hairy/Enhancer of Split*”) e relacionados à família Hes bHLH (do inglês “*basic Helix-Loop-Helix*”); a família de fatores de transcrição HRT/Herp (do inglês “*Hes-related repressor protein*”); o regulador do ciclo celular p21; a proteína de repetição de anquirina regulada por Notch (Nrarp); dltex1 e o gene do receptor- $\alpha$  de células pré-T (Canalis; Zanotti, 2017; Devgan *et al.*, 2005; Iso; Kedes; Hamamori, 2003; Krebs *et al.*, 2001; Radtke *et al.*, 2004).

#### **1.1.4 A via não-canônica de sinalização**

A via não-canônica distingue-se pela influência de Notch na expressão gênica em rotas regulatórias que não dependem de CSL, podendo iniciar-se por mecanismos que não requerem interação com ligantes ou processamento proteolítico do receptor (Sanders *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2024). Notch pode, assim, modular as vias de sinalização Wnt/β-catenina, JAK/STAT, PI3K/AKT e NF-κB em nível pós-traducional (Andersen *et al.*, 2012; Hurlbut *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019).

A sinalização não-canônica de Notch3 em células epiteliais mamárias pode modular a sinalização Wnt através do receptor Frizzled7 (FZD7), participando da diferenciação de células luminais (Bhat *et al.*, 2016). No câncer de mama, a sinalização não-canônica regula positivamente a expressão da Interleucina-6 (IL-6), levando à ativação autócrina e parácrina da JAK/STAT (do inglês “*Janus kinase/Signal transducers and activators*”) (Jin *et al.*, 2013).

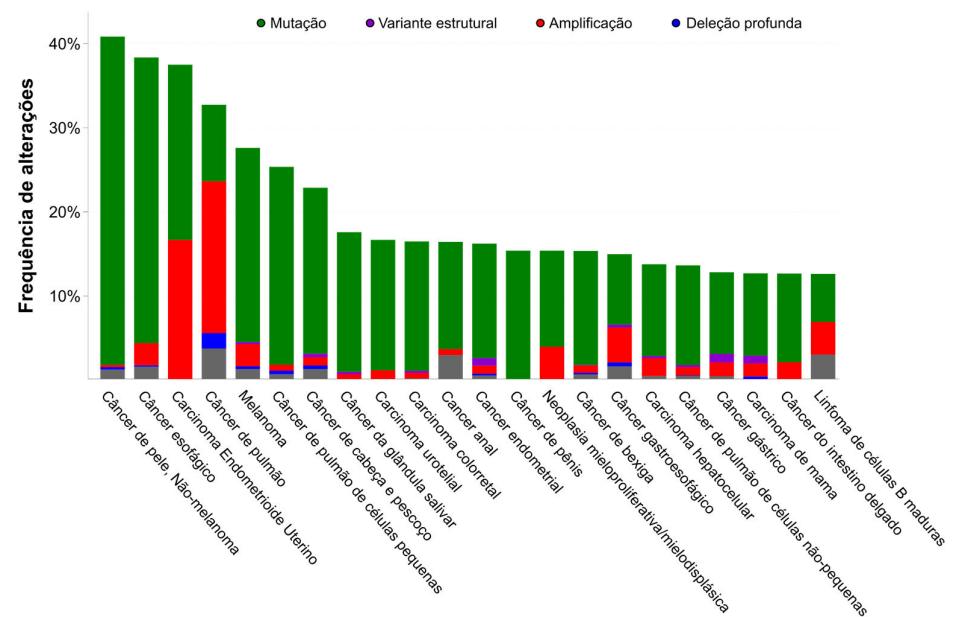
Outro exemplo está na interação de NICD com o complexo mTOR-Rictor, que ativa Akt/PKB (Akt/Proteína quinase B), regulando a sobrevivência celular (Perumalsamy *et al.*, 2009). Dessa forma, os mecanismos não clássicos permitem que a sinalização Notch execute funções específicas e podem revelar novos alvos terapêuticos à medida que mais mecanismos são descobertos e associados a patologias (Shi *et al.*, 2024).

#### **1.1.5 A via de Notch no câncer**

Devido seu papel central na diferenciação e determinação do destino celular, a sinalização Notch tem sido implicada em diversos processos patológicos, como observado na doença de Alzheimer, em doenças ósseas e cardíacas, além de tumores sólidos e cânceres hematológicos (MacGrogan; Luna-Zurita; De La Pompa, 2011; Pakvasa *et al.*, 2021; Woo *et al.*, 2009).

Desde a primeira associação de Notch à leucemia (Ellisen *et al.*, 1991), sua função ambígua como supressor tumoral ou oncogene tem sido investigada. A análise de dados de estudos pan-câncer aponta para prevalência de mutações como a alteração oncogênica mais frequente em Notch (Cerami *et al.*, 2012; De Bruijn *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2013) (Figura 3).

Figura 3. Frequência de alterações em Notch relacionadas a diversos tipos de câncer



Fonte: elaborado pelo autor com os dados do cBioPortal for Cancer Genomics (2024). Foram selecionados os genes NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, DLL1, DLL2, DLL4, JAG1 e JAG2 em dez estudos pan-câncer: MSK-IMPACT Clinical Sequencing Cohort (MSK, Nat Med 2017), Metastatic Solid Cancers (UMich, Nature 2017), MSS Mixed Solid Tumors (Broad/Dana-Farber, Nat Genet 2018), SUMMIT - Neratinib Basket Study (Multi-Institute, Nature 2018), TMB and Immunotherapy (MSK, Nat Genet 2019), Tumors with TRK fusions (MSK, Clin Cancer Res 2020), Cancer Therapy and Clonal Hematopoiesis (MSK, Nat Genet 2020), China Pan-Cancer (OriMed, Nature 2022), Pan-cancer analysis of whole genomes (ICGC/TCGA, Nature 2020), MSK MetTropism (MSK, Cell 2021). Em combinação, os estudos contêm 76.639 amostras, das quais 7.021 (9%) possuem alterações nos genes selecionados, dentre mutações, variações estruturais, amplificações ou deleções profundas.

Tais mutações podem ser ativadoras ou inativadoras, e suas posições, identidades e efeitos refletem os variados papéis de Notch em diferentes contextos neoplásicos (Aster; Pear; Blacklow, 2017). Outras alterações incluem a superexpressão de receptores ou ligantes, regulação epigenética e modificações pós-traducionais, como a fucosilação e ubiquitinação das proteínas da via (Ntziachristos *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2007).

Além disso, estudos funcionais associam a sinalização por Notch em, essencialmente, todos os Marcos do Câncer (“*Hallmarks of Cancer*”), considerados um conjunto de capacidades funcionais cruciais para a formação tumores malignos, adquiridas pelas células à medida que passam da normalidade para os estados de crescimento neoplásico (Aster; Pear; Blacklow, 2017).

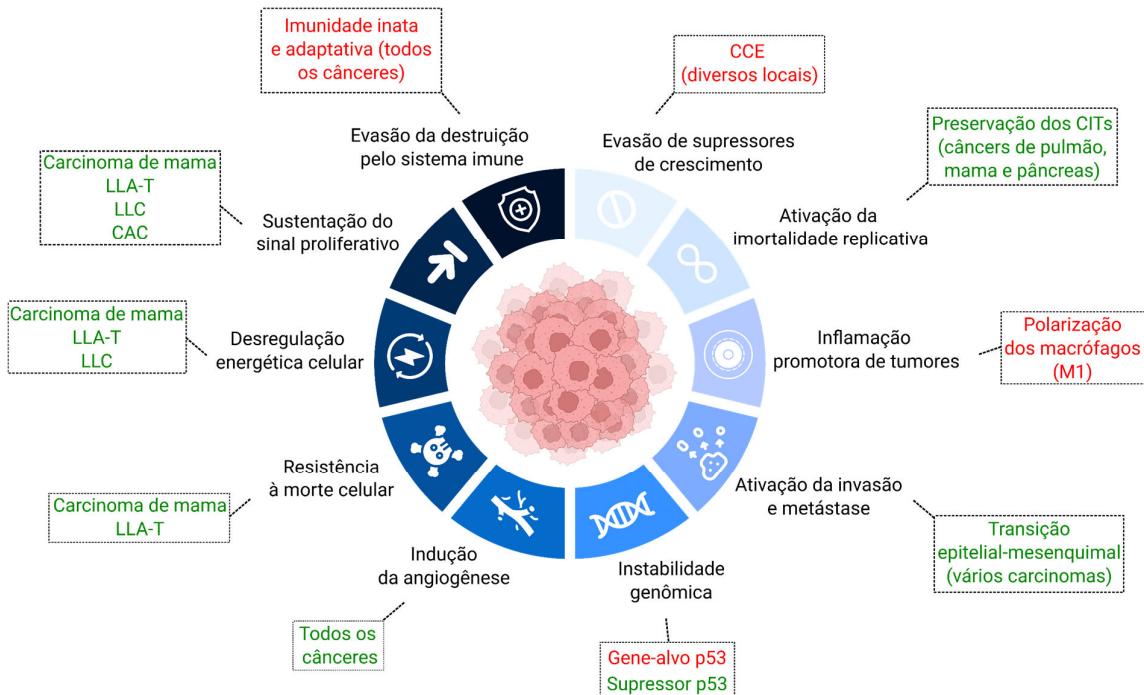
Dentre os Marcos, estão: a capacidade para sustentar a sinalização proliferativa; evasão a supressores de crescimento e a destruição imunológica; resistência à morte celular; imortalidade replicativa; indução e acesso à vasculatura; ativação da invasão e metástase; reprogramação do metabolismo celular; inflamação promotora de tumor; instabilidade genômica e mutações (Hanahan, 2022) (Figura 4).

O receptor Notch1 e os ligantes DLL4 e Jagged-1, por exemplo, estão associados à progressão da angiogênese e à prognósticos desfavoráveis, sendo Notch1 e DLL4 reguladores da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês “*Vascular Epidermal Growth Factor*”) (Wang *et al.*, 2020; Eelen *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2023; Wieland *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2016). Além disso, Notch1 e Notch4, ao regular HEY1, promovem a transição epitelial-mesenquimal (TEM), permitindo que células epiteliais adquiram características mesenquimais, facilitando a migração, invasão e resistência a quimioterapias (Marconi *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2021; Natsuzaka *et al.*, 2017; Fukusumi *et al.*, 2018; Jing *et al.*, 2020).

A ativação anômala da via Notch está ligada à manutenção de propriedades semelhantes a células-tronco em tumores, favorecendo a autorrenovação (Aoki *et al.*, 2016; Jitschin *et al.*, 2015; Slaninova *et al.*, 2016). Notch também modula o microambiente tumoral e regula componentes do sistema imunológico, recrutando neutrófilos e remodelando a matriz extracelular, contribuindo, dessa forma, para a formação de um ambiente imunossupressor (Gu *et al.*, 2019; Jackstadt *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2024). Finalmente, a ativação irregular de Notch contribui para a quimiorresistência, sendo Notch2 associado à resistência à gemcitabina (GEM) e Notch1 conferindo resistência ao docetaxel (DTX) (Güngör *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2014;

Huang *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2019).

Figura 4. Marcos do Câncer influenciados por Notch



Fonte: adaptado de Aster; Pear; Blacklow (2017). Efeitos oncogênicos (verde) e efeitos supressores de tumor (vermelho) associados a Notch são mostrados. Abreviações: CAC, carcinoma adenoide cístico; LLC, leucemia linfocítica crônica; CCE, carcinoma de células escamosas; LLA-T, leucemia linfoblástica aguda de células T; CITs, células iniciadoras de tumor.

#### 1.1.5.1 Notch em cânceres hematológicos

Notch é um fator de transcrição importante para imunidade inata e adaptativa, sendo essencial na diferenciação de linhagens de células T (Radtke; MacDonald; Tacchini-Cottier, 2013; Li; von Boehmer, 2011). Na leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T), aproximadamente 50% dos casos apresentam mutações ativadoras de Notch1, que ocorrem no domínio de heterodimerização de NRR e resultam na ativação contínua da sinalização, favorecendo a oncogênese (Weng *et al.*, 2004).

Mutações no domínio PEST são encontradas em até 25% dos casos de LLA-T e levam ao truncamento ou perda deste domínio, resultando em um aumento da concentração celular de NICD (Ntziachristos *et al.*, 2014). Além disso, mutações no gene FBXW7, que codifica uma enzima envolvida na degradação de NICD,

também estão ligadas à LLA-T, destacando a importância do Notch1 na manutenção das propriedades leucêmicas (O'Neil *et al.*, 2007; Asnafi *et al.*, 2009).

Na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), cerca de 10 a 12% dos casos exibem mutações ativadoras de Notch1 no domínio PEST, resultando em proteínas truncadas e a um prognóstico adverso (Ntziachristos *et al.*, 2014; Fabbri *et al.*, 2011; Weissmann *et al.*, 2013). Em contraste, Notch desempenha um papel supressor na Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B (LLA-B), onde sua reativação inibe o crescimento e provoca apoptose nas células cancerígenas (Zweidler-McKay *et al.*, 2005).

A ação supressora tumoral também é relatada em leucemias mieloides (Ntziachristos *et al.*, 2014; Klinakis *et al.*, 2011). Nesses casos, a supressão da sinalização Notch está frequentemente associada a processos epigenéticos, a exemplo da metilação do DNA nos promotores dos genes-alvo da via (Kuang *et al.*, 2013). A reativação da via de Notch em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) pode levar à remissão da doença, sugerindo um potencial terapêutico para moléculas ativadoras nesse contexto (Kannan *et al.*, 2013).

Em linfomas, Notch1 e Notch2 desempenham, em geral, um papel oncogênico. No linfoma de Burkitt, Notch1 apresenta mutações de ganho de função em cerca de 10% dos pacientes (Love *et al.*, 2012). Já no linfoma de Hodgkin, Notch1 é ativado através da regulação positiva de seus ligantes no ambiente tumoral, levando a supressão de genes importantes para a identidade das células B (Jundt *et al.*, 2008; Schwarzer; Dörken; Jundt, 2012). Por fim, no linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), Notch2 é mutado em aproximadamente 8% dos casos, sendo associado a um prognóstico adverso (Lee *et al.*, 2009; Kiel *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2012).

#### 1.1.5.2 *Notch em tumores sólidos*

Assim como nas malignidades hematológicas, a sinalização por Notch tem funções diversas em tumores sólidos. A ativação de Notch, especialmente de Notch4 e em interação com outras vias como Ras e Wnt, está ligada ao câncer de mama (Ayyanan *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2010). Em contraste, a hiperativação de Notch3 pode induzir senescência celular, sugerindo um papel supressor (Cui *et al.*, 2013).

Algo semelhante é observado no câncer de pulmão, aonde o papel de Notch varia conforme o subtipo tumoral. No adenocarcinoma de pulmão, Notch tem

sido associado à promoção da expansão e manutenção das células tumorais (Licciulli *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013). Em contrapartida, no carcinoma espinocelular do pulmão e no carcinoma pulmonar de células pequenas (CPCP), a sinalização por Notch é considerada supressora de tumor (Wang *et al.*, 2011; Sriuranpong *et al.*, 2001).

No câncer colorretal (CCR), a ativação do receptor Notch1 está associada a mudanças fenotípicas e funcionais nas células cancerígenas consistentes com a TEM (Siegel *et al.*, 2022; Tyagi; Sharma; Damodaran, 2020; Noseda *et al.*, 2004). Não obstante, Notch1 e Notch2 aparentam desempenhar funções opostas no desenvolvimento desse tumor, visto que a co-expressão de Notch1(+) e Notch2(-) está associada a uma menor sobrevida global, destacando ambos como alvos terapêuticos e marcadores prognósticos no CCR (Chu *et al.*, 2011).

A via de Notch tem sido associada à progressão do melanoma, com Notch1 promovendo o avanço da doença em condições de hipóxia (Zhang *et al.*, 2012; Bedogni *et al.*, 2008). Além dos mencionados, alterações na via de Notch1 também foram atreladas a papéis oncogênicos no carcinoma espinocelular de esôfago (Lubin *et al.*, 2018), carcinoma espinocelular oral (Yoshida *et al.*, 2013), carcinoma de células renais (Wu; Hu; Hou, 2016), câncer gástrico (Huang *et al.*, 2019), câncer pancreático (Büchler *et al.*, 2005), câncer de bexiga (Hayashi *et al.*, 2016), câncer de próstata (Stoyanova *et al.*, 2016), câncer cervical (Yousif *et al.*, 2015), câncer de tireoide (Piana *et al.*, 2019), e glioma (Hai *et al.*, 2018).

A participação multifacetada da sinalização por Notch nessas patologias revela um desafio significativo para sua modulação terapêutica, uma vez que sua função pode variar de oncogênica a supressora, dependendo do contexto celular e do subtipo tumoral envolvido (Shi *et al.*, 2024). Tal complexidade exige o uso abordagens terapêuticas altamente personalizadas, tornando-a um alvo tão promissor quanto desafiador.

### 1.1.6 Notch como alvo oncoterapêutico

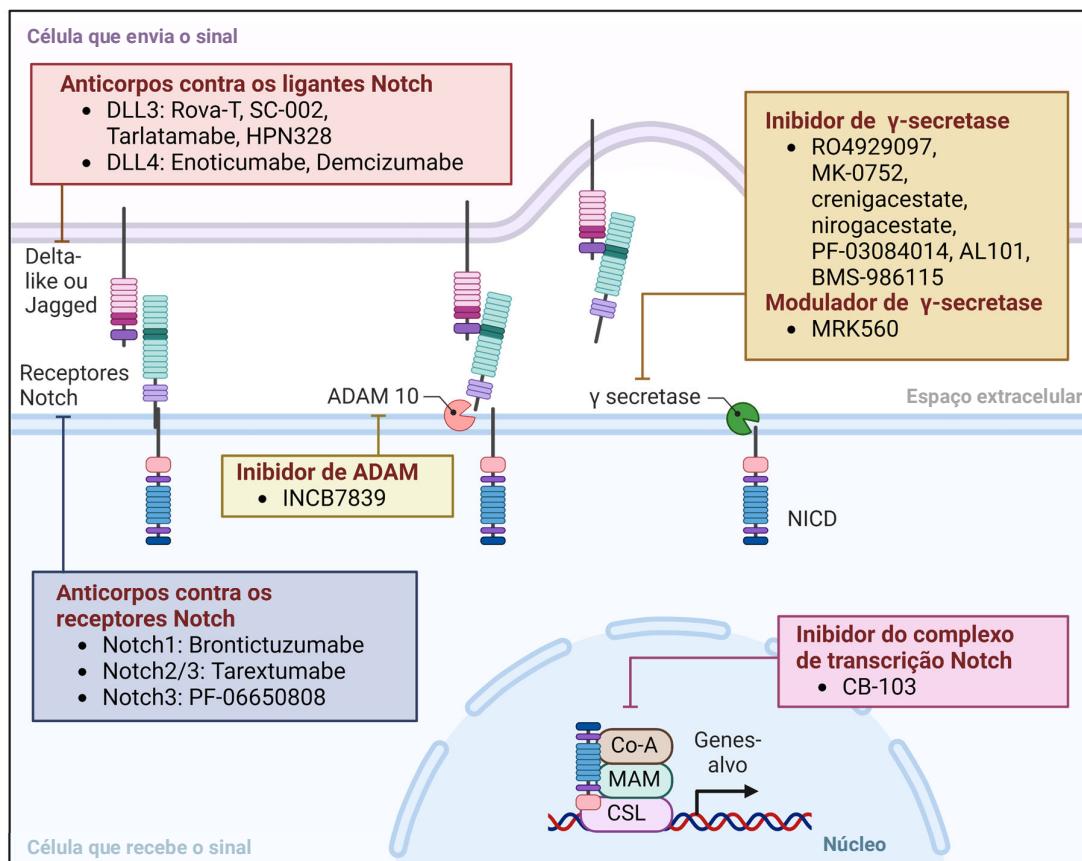
O papel de Notch na patogênese e quimiorresistência de diversos subtipos de câncer vêm impulsando os esforços para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas a essa via, que podem ser divididas em: inibidores de clivagem, anticorpos contra receptores ou ligantes, bloqueadores da transcrição e agonistas da sinalização (Zhou *et al.*, 2022). Alguns desses agentes estão listados na Figura 5 e

serão discutidos a seguir.

#### 1.1.6.1 Inibidores de clivagem

Os receptores Notch perpassam três clivagens proteolíticas desde a sua síntese até o final da cascata de sinalização. Tentativas de modulação da clivagem S1, tendo como alvo o fator acessório SERCA (do inglês “*Sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*”), têm sido aplicadas em modelos pré-clínicos de câncer de mama e leucemia (Periz, 1999; Pagliaro; Marchesini; Roti, 2021). Algumas moléculas, como CPA e CAD204520, alcançaram o estágio clínico, mas não apresentaram resultados encorajadores (Roti *et al.*, 2018; Treiman; Caspersen; Christensen, 1998; Roti *et al.*, 2013; Marchesini *et al.*, 2020).

Figura 5. Inibidores terapêuticos da via de Notch



Fonte: adaptado de Shi *et al.* (2024). Os inibidores da via de Notch subdividem-se em anticorpos contra receptores ou ligantes, inibidores da clivagem por ADAM ou  $\gamma$ -secretase, moduladores de  $\gamma$ -secretase e inibidores do complexo transcricional. Criado com BioRender.com.

Visando bloquear a clivagem S2, o inibidor INCB7839, também conhecido como Aderbasib, atua sobre a enzima ADAM e foi avaliado em ensaios clínicos contra o câncer de mama HER2+, apresentando toxicidade restritiva (Friedman *et al.*, 2009; Duffy *et al.*, 2011; Amar; Minond; Fields, 2017). Já a molécula INCB7839 demonstrou o potencial de inibição de ADAM10 em xenoenxertos de glioblastoma pediátricos derivados de pacientes, sem efeitos neurotóxicos evidente (Venkatesh *et al.*, 2017).

A inibição específica de ADAM10 foi avaliada com o uso do anticorpo monoclonal (mAb, do inglês “*monoclonal antibody*”) humano 1H5 em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer colorretal (Saha *et al.*, 2023). O mAb reconheceu uma conformação ativada de ADAM10 presente em células tumorais e, em combinação com o quimioterápico irinotecano, inibiu o crescimento do tumor sem toxicidade aparente (Saha *et al.*, 2023).

Estudos pré-clínicos mostraram a atividade antitumoral de inibidores de  $\gamma$ -secretase (GSI, do inglês “*gamma-secretase inhibitor*”) – responsável pela clivagem S3 – em diversos tipos de câncer, incluindo mama, carcinoma hepatocelular, pulmão de células não pequenas, colorretal, próstata e gliomas (Das *et al.*, 2019; Han, 2015; Pine, 2018; Akiyoshi *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2015; Gilbert *et al.*, 2015). Apesar de muitos desses ensaios apresentarem resultados encorajadores, a exemplo da redução de 45% na massa mediastinal em pacientes com leucemia, grande parte foi descontinuada devido à toxicidade limitante de dose (Deangelo *et al.*, 2006).

Apenas alguns GSIs, como RO4929097 e PF-03084014 (nirogacestate ou OGSIVEO™), avançaram além dos ensaios clínicos de fase II (Strosberg *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Kummar *et al.*, 2015). O nirogacestate demonstrou resultados promissores em tumores desmoides, levando a sua aprovação para uso nos Estados Unidos em novembro de 2023 (Keam, 2024). Já no caso do RO4929097, sua combinação com imunossupressores ou anticorpos monoclonais demonstrou boa tolerância em tumores sólidos avançados (Diaz-Padilla *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2016).

O potencial terapêutico dos GSIs é, no entanto, restringido pelos efeitos adversos advindos de sua natureza não seletiva e da importância do complexo  $\gamma$ -secretase no processamento de múltiplos substratos por todo organismo (Hur, 2022; Haapasalo, Kovacs, 2011). O uso de inibidores inespecíficos é prejudicial, inclusive, considerando a atividade antagônica de diferentes receptores Notch no ambiente tumoral, o que foi demonstrado no CCR pelo efeito pró-tumorigênico de Notch1 e

supressor de Notch2 (Chu *et al.*, 2011).

Uma alternativa superior aos GSIs são os moduladores de  $\gamma$ -secretase (GSM, do inglês “*gamma-secretase modulator*”), que visam modificar a atividade catalítica do complexo proteolítico ao em vez de inibi-lo de forma não seletiva, atenuando a manifestação de efeitos adversos (Golde *et al.*, 2013). MRK-560, por exemplo, é um exemplo de GSM direcionado à presenilina-1, uma importante subclasse catalítica de  $\gamma$ -secretase expressa em subtipos leucêmicos, que foi associado a redução do processamento de Notch1 e a indução de parada do ciclo celular em LLA-T, aumentando a sobrevida dos pacientes (Habets *et al.*, 2019).

#### 1.1.6.2 *Anticorpos contra receptores ou ligantes*

Anticorpos direcionados as proteínas de Notch têm sido desenvolvidos como alternativa aos GSIs, que, embora eficazes, apresentam como limitação, em sua maioria, uma inibição inespecífica. Dessa forma, o desenvolvimento de mAbs para alvos individuais visa permitir uma modulação mais precisa da sinalização de Notch (Shi *et al.*, 2024).

Os ligantes de Notch, como DLL1, DLL3, DLL4, Jagged-1 e Jagged-2, têm papéis importantes, com DLL1 sendo crucial para a diferenciação dos linfócitos B (Hozumi *et al.*, 2004). Análises estruturais do anticorpo Pidilizumabe (MDV9300), que tem atividade contra glioma pontino intrínseco difuso e linfoma folicular, sugeriram a associação de seu efeito antineoplásico ao bloqueio de DLL1 (Westin *et al.*, 2014; Fried *et al.*, 2018; Albuquerque *et al.*, 2022; Nastoupil *et al.*, 2022).

O Rovalpituzumabe tesirina (Rova-T) é um ADC direcionado ao ligante DLL3 que apresentou atividade antitumoral e toxicidade controlável na dose recomendada em carcinomas neuroendócrinos, melanoma, carcinoma medular da tireoide e glioblastoma (Johnson *et al.*, 2021; Mansfield *et al.*, 2021). Um outro ADC direcionado a DLL3, o SC-002, apresentou toxicidade sistêmica e eficácia limitada em ensaios clínicos com CPCP avançado e carcinoma neuroendócrino (Morgensztern *et al.*, 2020).

Resultados mais promissores têm sido encontrados com formatos multiespecíficos. O Tarlatamabe (AM757), um engajador de células T biespecífico (BiTE, do inglês “*Bispecific T-Cell Engager*”) que tem como alvos DLL3 e CD3, demonstrou atividade antitumoral com respostas duradouras e melhora da sobrevida

em pacientes com CPCP recorrente (Ahn *et al.*, 2023; Paz-Ares *et al.*, 2023). O HPN328, uma construção tri-específica ativadora de células T (TriTAC, do inglês “*trispecific T cell–activating construct*”) direcionada à DLL3 para identificação da célula tumoral, à CD3 para o engajamento com as células T, e a um ligante de albumina para extensão de sua meia-vida está sendo avaliado em ensaios clínicos fase I/II quanto a sua segurança e eficácia (Molloy *et al.*, 2024).

Além desses, o Enoticumabe (REGN421) e o Demcizumabe (OMP-21M18) são mAbs anti-DLL4 que foram, em geral, bem tolerados no tratamento de tumores sólidos avançados em ensaios fase I (Chiorean *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2014; Coleman *et al.*, 2020). Já ABT-165 e o Navicixizumabe são exemplos de imunoglobulinas de domínio variável duplo (DVD-Ig, do inglês “*dual variable domain immunoglobulin*”) que têm como alvos DLL4 e VEGF (Li *et al.*, 2018; Jimeno *et al.*, 2019).

No contexto da inibição dos ligantes Jagged, 15D11 é um mAb anti-Jag1 com potencial para aumentar a sensibilidade à quimioterapia e reduzir o crescimento neoplásico em metástases ósseas (Zheng *et al.*, 2017). Não obstante, o uso de um mAb anti-Jag2 inibiu o crescimento tumoral em modelos pré-clínicos de câncer de pulmão de células não pequenas e ativou a imunidade antitumoral mediada por macrófagos (Mandula *et al.*, 2024).

Voltando-se para os receptores de Notch, Notch2 e 3 são os alvos do Tarextumabe (OMP-59R5) no tratamento de tumores sólidos, apresentando boa tolerabilidade geral (Smith *et al.*, 2019). A associação desse mAb a quimioterápicos, como o nab-paclitaxel (PTX) e GEM, no entanto, não levou a um aumento da sobrevivência de pacientes com câncer de pâncreas metastático (Hu *et al.*, 2019). PF-06650808, que também visa Notch3, é um conjugado anticorpo-fármaco (ADC, do inglês “*antibody-drug conjugate*”) associado a auristatina que demonstrou sinais iniciais de segurança e atividade antitumoral contra câncer de mama avançado em um ensaio fase I (Rosen *et al.*, 2020).

### **1.1.7 Brontictuzumabe**

Entre os receptores Notch, Notch1 se destaca por sua alta centralidade de intermediação, influenciando o fluxo de informações na rede de sinalização gênica (Jamil *et al.*, 2012). Tamanha importância rende a alterações na via desta proteína

significativo impacto na tumorigênese e quimiorresistência em diversos tipos de câncer, tornando-o um alvo terapêutico promissor (Gharaibeh *et al.*, 2020).

Brontictuzumabe (OMP-52M51, Oncomed), ou BRON, é um mAb anti-Notch1 humanizado que se liga ao domínio NRR (Agnusdei *et al.*, 2014). Além de sua atividade pré-clínica demonstrada em modelos de LLA-T, o que é particularmente relevante dada a alta prevalência de mutações ativadoras em NRR nesse subtipo leucêmico, esse imunobiológico demonstrou tolerabilidade e eficácia moderada em estudos clínicos fase I em pacientes com outras malignidades hematológicas e tumores sólidos avançados, sendo diarreia a sua principal reação adversa relatada (Agnusdei *et al.*, 2019; Munster *et al.*, 2015; Casulo *et al.*, 2016; Ferrarotto *et al.*, 2018).

Além disso, BRON reduziu significativamente o crescimento tumoral em modelos de xenoenxertos derivados de pacientes com carcinoma adenoide cístico (Xie *et al.*, 2018). Vale ressaltar que mutações de ganho de função em Notch1 ocorrem em cerca de 16% desses tumores, causando a estabilização de NICD e estando associadas a uma menor sobrevida global (Xie *et al.*, 2018).

Além dos dados clínicos, um estudo transcriptômico visando investigar a relação entre conectividade cerebral, expressão genética e sobrevivência analisou 84 potenciais terapias para glioma difuso, com BRON figurando como melhor candidato (Kesler *et al.*, 2024). Não obstante, BRON também exibiu efeito superior ao obtido com o uso de GSIs na inibição da invasão celular de glioblastomas (Herrera-Rios *et al.*, 2020). No carcinoma adenoide cístico salivar, o uso desse mAb reduziu a proliferação celular e o processo de TEM, além de induzir a morte celular e a sensibilidade de linhagens de CAC à ferroptose (Li *et al.*, 2024).

Tais resultados não apenas reforçam o potencial terapêutico do BRON como agente anti-Notch1, mas também indicam a viabilidade deste ser utilizado como base para o desenvolvimento de novos anticorpos. A especificidade e eficácia demonstradas sugerem que modificações estruturais ou combinações estratégicas com outras abordagens terapêuticas podem ampliar seu alcance clínico, abrindo caminho para o aprimoramento de imunoterapias direcionadas contra Notch1.

## 1.2 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos estão entre os principais formatos terapêuticos utilizados contra as anormalidades na via de Notch. Tais moléculas pertencem à superfamília

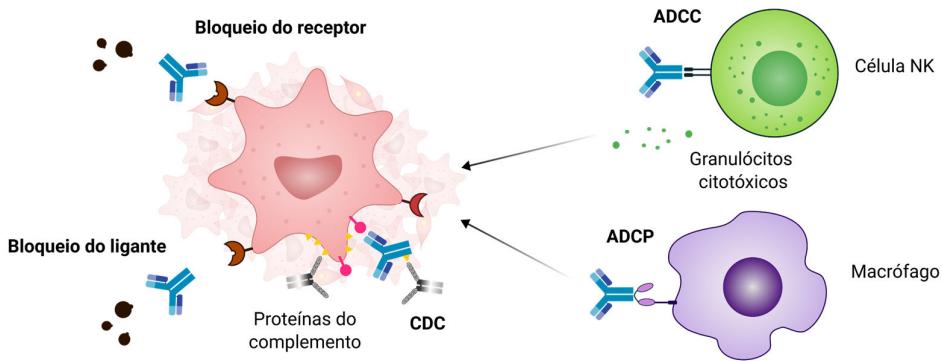
das imunoglobulinas (Ig), sendo glicoproteínas cuja estrutura básica consiste em duas cadeias pesadas e duas leves, organizadas em formato de Y e unidas por pontes dissulfeto (Davies; Chacko, 1993). Na base do Y está a porção Fc (Fragmento cristalizável), que medeia as interações com outros componentes do sistema imune e ativa diversas das funções efetoras associadas ao anticorpo (Davies; Chacko, 1993). Alterações em Fc diferenciam os isótipos de anticorpos, que se distinguem em estrutura e função imune (Fesseha; Degu; Endashaw, 2020).

Já nas pontas superiores do Y, encontra-se a porção Fab (Fragmento de ligação ao antígeno). As cadeias pesada e leve que compõe esse fragmento dividem-se em regiões constantes e variáveis (Stanfield; Wilson, 2015). O fragmento variável (Fv) contém o *framework*, uma porção que possui sequência conservada e é organizada predominantemente como folhas  $\beta$ , conferindo estabilidade estrutural aos *loops* hipervariáveis que constituem o sítio de ligação do antígeno, nomeados de regiões determinantes de complementaridade (CDRs, do inglês “*complementarity determining regions*”) (Foote; Winter, 1992; Gabrielli *et al.*, 2009).

Os repertórios estruturais demonstram a existência de estruturas canônicas para todos os segmentos CDR exceto H3, que apresenta grande variabilidade em seu tamanho, sequência e estrutura (Chothia *et al.*, 1989; North; Lehmann; Dunbrack, 2011; Nowak *et al.*, 2016; Fernández-Quintero *et al.*, 2020; Schmitz *et al.*, 2022). A diversidade dos receptores de células B, estimada em mais de  $10^{11}$ , garante a interação específica a uma vasta gama de antígenos e é resultante dos processos de recombinação dos segmentos gênicos variáveis (V), de diversidade (D), e de junção (J), associado à adição ou deleção de nucleotídeos nas junções entre esses segmentos e ao processo de hipermutação somática (Janeway *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002) (Figura 6).

Convencionalmente, os anticorpos podem interferir de forma direta no crescimento tumoral ao bloquear a interação de receptores celulares com seus ligantes, como ocorre no caso do receptor HER2 no câncer de mama, ou dos ligantes aos receptores, a exemplo da inibição de PD-L1 (Zahavi; Weiner, 2020; Baselga; Albanell, 2001; De Sousa Linhares *et al.*, 2019). Já os mecanismos indiretos de ação dos anticorpos são mediados pela região Fc e requerem o envolvimento de outros componentes do sistema imunológico, como os macrófagos e células NK (Figura 6) (Zahavi; Weiner, 2020; Gómez Román; Murray; Weiner, 2014; Gül; van Egmond, 2015; Boross; Leusen, 2012).

Figura 6. Mecanismos efetores dos anticorpos no combate ao tumor



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Mecanismos efetores de anticorpos naturais ou terapêuticos no combate a uma célula cancerígena. Dentre os mecanismos indiretos, estão a citotoxicidade dependente de complemento (CDC), a fagocitose celular mediada por anticorpos (ADCP, do inglês “*antibody-dependent cellular phagocytosis*”) e a toxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC, do inglês “*antibody-dependent cellular cytotoxicity*”).

### 1.2.1 Engenharia de anticorpos

O advento da teoria da seleção clonal, que atribuiu a produção de um anticorpo específico a um único clone de célula B, abriu o caminho para a aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais, passando a ser gerados pela clonagem de um linfócito B e direcionados a uma região específica do antígeno denominada epítopo (Nossal; Lederberg, 1958; Zahavi; Weiner, 2020).

O desenvolvimento da tecnologia dos hibridomas permitiu a produção em larga escala de tais anticorpos (Köhler; Milstein, 1975; Schwaber; Cohen, 1973). Nesse método, camundongos são imunizados com um antígeno, gerando plasmócitos que são, então, fundidos com células de mieloma (células cancerosas imortalizadas) para formar hibridomas. As células que produzem o anticorpo desejado são selecionadas e clonadas, permitindo armazenamento indefinido para produção contínua (Little *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2021).

O uso de anticorpos murinos, entretanto, está atrelado com a produção, pelo paciente, de anticorpos humanos anti-imunoglobulina murina (HAMA, do inglês “*human anti-mouse antibody*”), que aumentam a depuração plasmática do anticorpo ao mesmo tempo que reduzem o seu direcionamento ao tumor (Reynolds *et al.*, 1989). Clinicamente, os HAMA reduzem a eficácia do anticorpo administrado e resultam em reações de hipersensibilidade que podem limitar a continuidade do tratamento (Courtenay-Luck *et al.*, 1986). Os anticorpos quiméricos começaram a lidar com o

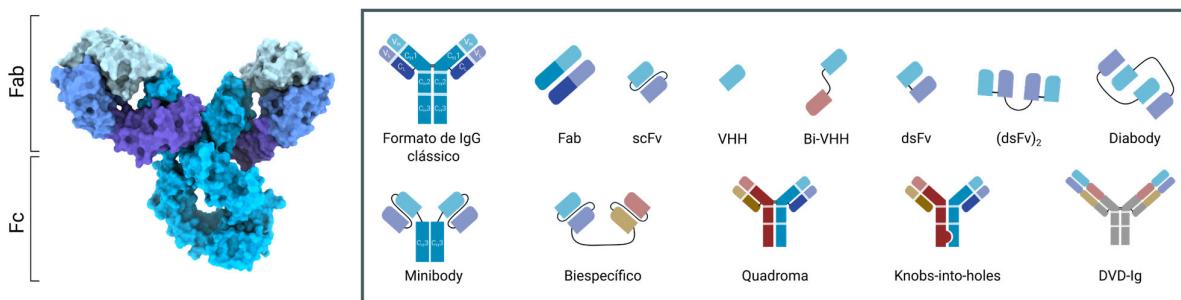
problema da imunogenicidade pela substituição da região constante murina por regiões humanas equivalentes, melhorando interação com os receptores Fc humanos (Shin, 1991).

Posteriormente, a tecnologia de humanização de anticorpos tornou possível a transferência dos CDRs murinos para um *framework* humano, otimizando sua farmacocinética e reduzindo ainda mais sua imunogenicidade (Winter; Harris, 1993). O contínuo avanço biotecnológico levou a obtenção de anticorpos totalmente humanos, que representam um avanço no desenvolvimento de imunoterapias mais seguras e eficazes (Weiner, 2006). Métodos para produção de mAbs humanos incluem a fusão de células B humanas com células mieloma, o uso de camundongos transgênicos e a tecnologia de *phage display* (Jakobovits, 1995; Lonberg, 2008; Silkina *et al.*, 2022).

O progresso técnico do campo da expressão de proteínas recombinantes resultou na produção de anticorpos em formatos alternativos ao Y convencional que, com peso molecular aproximado de 150 kDa, encontram dificuldade em difundir-se do leito vascular para massas tumorais sólidas, além de ser eliminado lentamente do corpo (Dickopf; Georges; Brinkmann, 2020). Já os fragmentos de anticorpos têm melhor depuração, maior penetração tecidual, além de poderem ser produzidos em larga escala a partir de plataformas bacterianas, sendo uma alternativa para contornar os obstáculos associados a utilização de células de mamífero necessárias para anticorpos completos (Xenaki; Oliveira; Henegouwen, 2017; Fesseha; Degu; Endashaw, 2020).

O menor fragmento que retém a especificidade de ligação ao antígeno do anticorpo completo é o Fv (Figura 7). Para compensar pela instabilidade da associação não covalente entre  $V_H$  e  $V_L$ , os domínios podem ser conectados por uma ligação dissulfeto, produzindo um dsFv, ou por um peptídeo ligante flexível – como o *linker* Gly<sub>4</sub>Ser e suas variações – para formar fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv), que pesam aproximadamente 28 kDa (Fesseha; Degu; Endashaw, 2020; Nelson; Reichert, 2009).

Figura 7. Formatos de anticorpos



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Representação de superfície da estrutura cristalográfica representativa de um IgG genérico (PDB: 5DK3), com destaque para as regiões Fc e Fab, ao lado de diferentes formatos de anticorpos terapêuticos.

Blinatumomabe foi o primeiro scFv terapêutico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da LLA-B refratária, sendo um biespecífico anti-CD3/anti-CD19 (Przepiorka *et al.*, 2015) (Figura 7). Já o Moxetumomabe pasudotox é um scFv produzido a partir da fusão de um fragmento anti-CD22 a uma exotoxina de *Pseudomonas* aplicado ao tratamento de leucemia de células pilosas (Dhillon, 2018).

Não obstante, existem, na natureza, anticorpos que dispensam a cadeia leve e interagem com o antígeno a partir de um domínio simples, pesando entre 12 e 15 kDa. Esse é o caso dos nanocorpos ( $V_{HH}$ , Figura 7), encontrado em camelos, alpacas e lhamas, e dos domínios variáveis de ligação ao antígeno ( $V_{NAR}$ ), presente nos tubarões (Muyldermans, 2013; English; Hong; Ho, 2020). Essas moléculas são estáveis em diferentes valores de pH e temperatura, exibem fortes afinidades de ligação ao alvo e são capazes reconhecer epítopos côncavos e ocultos (Duan *et al.*, 2022). Além disso, nanocorpos com especificidades distintas podem ser associados através de peptídeos flexíveis para produção de Bi-VHH (Wang *et al.*, 2022).

Um outro formato é o dos fragmentos de anticorpos diméricos, ou *diabodies*, que consistem em homodímeros de scFvs covalentemente ligados por um *linker* peptídico que força a formação de um complexo intermolecular entre domínios cognatos (Holliger; Prospero; Winter, 1993) (Figura 7). De forma semelhante, os dsFvs também podem ser associados com a adição de um peptídeo ligante para formar fragmentos biespecíficos, os  $(dsFv)_2$  (Bera *et al.*, 1998). Já os *minibodies* são proteínas de fusão homodiméricas resultantes da associação de scFvs à região constante  $C_{H3}$  (Hu *et al.*, 1996). Além desses, moléculas biespecíficas podem ser produzidas em mais de cinquenta formatos, incluindo quadromas e anticorpos “knobs-

*into-holes*", que possuem regiões constantes projetadas para que ocorra a associação heterofílica das duas cadeias pesadas (Merchant *et al.*, 1998).

### **1.2.2 Mercado dos anticorpos terapêuticos**

A primeira aprovação de anticorpo terapêutico murino para uso humano ocorreu em 1986 com o Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), utilizado para reduzir a chance de rejeição em pacientes de transplante renal (Jaffers *et al.*, 1986). Desde então, 48 anticorpos foram aprovados pelo FDA para tratamento do câncer, com 37 registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) até 2024. Destes, 8% têm origem murina, 15% são quiméricos, 33% são humanos e 44% são humanizados (Menezes *et al.*, 2024; Leonel *et al.*, 2022).

O mercado global de anticorpos deve atingir a receita de quase meio trilhão de dólares em 2030. Entretanto, o acesso à imunoterapia é limitado pelo seu elevado custo (Stone; Spiller; Smith, 2023; Vidal; Figueiredo; Pepe, 2018). Um exemplo pode ser encontrado no Pembrolizumabe: a caixa desse mAb anti-PD-1, usado no tratamento do melanoma avançado, custa aproximadamente R\$ 18,8 mil reais, com um valor estimado de R\$ 580 mil reais para o tratamento anual (Carvalho, 2019).

No Brasil, a aquisição de imunobiológicos representa um percentual crescente dos gastos do Ministério da Saúde graças a adoção desses produtos como opção terapêutica de primeira linha (Vidal; Figueiredo; Pepe, 2018). Por conta do elevado custo, diversos mAbs não se encontram disponíveis na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) e, por conseguinte, no Sistema Único de Saúde (SUS). A judicialização tornou-se uma forma comum de acesso ao tratamento, com gastos crescentes, de R\$ 26 milhões em 2007 para R\$ 1,32 bilhões em 2016 (Leonel *et al.*, 2022).

Visando a ampliação do acesso, as empresas biofarmacêutica têm demonstrado maior atenção à produção e comercialização de medicamentos biossimilares. Estes são definidos como versões "genéricas" dos mAbs originais, contendo a mesma sequência de aminoácidos, mas sendo produzidos a partir de diferentes plataformas ou processos de fabricação (Santos-Neto *et al.*, 2021; Beck, 2011). Desde 2005, mais de 40 biossimilares foram aprovados apenas na Europa, incluindo o CT-P6 (Herzuma), uma alternativa mais acessível ao Trastuzumabe para o tratamento do câncer de mama HER2+. (Gherghescu; Delgado-Charro, 2020; Dias;

Kudo; Garcia, 2020)

Já os *biobetters* são anticorpos direcionados ao mesmo epítopo de um anticorpo já existente. No entanto, essas moléculas diferenciam-se por apresentarem propriedades química, moleculares ou funcionais aprimoradas que incluem, mas não estão limitadas, a um aumento da meia-vida, redução da toxicidade, redução da imunogenicidade e otimização dos efeitos farmacodinâmicos (Sassi; Nagarkar; Hamblin, 2015; Beck, 2011; Correia, 2010).

Da perspectiva de custos e riscos para o desenvolvimento, os *biobetters* estão entre os biossimilares e os medicamentos de referência, uma vez que não precisam esperar pela expiração da patente, mas podem apresentar desafios nos estágios iniciais do desenvolvimento. Após a etapa pré-clínica, no entanto, os *biobetters* apresentam chances significativamente maiores de sucesso em ensaios clínicos do que novos medicamentos (Torres-Obreque *et al.*, 2022).

### 1.3 Biologia estrutural e bioinformática no *drug discovery*

O desenvolvimento de medicamentos é um processo extenso e dispendioso, envolvendo várias etapas como a identificação e validação de alvos, desenvolvimento de ensaios, identificação de compostos líderes, otimização de candidatos, testes pré-clínicos e clínicos, além da aprovação regulamentar (Malathi; Ramaiah, 2018). Esse processo pode levar entre 10 e 15 anos e custar até 4 bilhões de dólares por fármaco aprovado (Khan; Akhtar, 2023).

Uma alternativa mais eficiente e econômica é encontrada no desenho racional de medicamentos, ou farmacologia reversa, que se inicia pela identificação de um alvo proteico promissor, seguida da busca por estruturas tridimensionais adequadas para tal proteína (Batool; Ahmad; Choi, 2019; Frye *et al.*, 2021). Com os avanços das técnicas de biologia estrutural, como a criomicroscopia eletrônica, a determinação de estruturas tridimensionais de macromoléculas tornou-se mais acessível e precisa (Subramaniam *et al.*, 2016).

Além disso, o surgimento de técnicas de predição de estruturas de proteínas por inteligência artificial, como o AlphaFold2, também oferece novas oportunidades para desenvolver medicamentos visando alvos sem estrutura resolvida (Jones; Thornton, 2022; Lee; Su; Tseng, 2022). Repositórios de estruturas de

macromoléculas, como o *Protein Data Bank* (PDB) e o *AlphaFold Protein Structure Database*, colecionam mais de 200 mil estruturas experimentais e mais de 1 milhão de modelos computacionais (Burley *et al.*, 2024; Varadi *et al.*, 2024).

A disponibilidade de estruturas 3D de proteínas estabelece a base para o desenho de medicamentos baseado em estrutura (SBDD, do inglês “*structure-based drug design*”), uma forma mais eficiente de identificar e otimizar compostos-líderes abordando a patologia a nível molecular (Batoor; Ahmad; Choi, 2019). São exemplos de técnicas atreladas ao SBDD o *docking* e a dinâmica molecular (Malathi; Ramaiah, 2018).

O *docking* proteína-proteína produz uma série de *poses* – definidas como o conjunto de conformações e orientações de interação que refletem os possíveis modos de ligação – que são ranqueadas através de uma função de pontuação (Torres *et al.*, 2019; Depetris *et al.*, 2022). Com isso, é possível realizar a identificação de epítopos e a descrição dos complexos anticorpo-antígeno, levando à caracterização funcional da proteína e direcionando a sua otimização (Depetris *et al.*, 2022).

Simulações de dinâmica molecular (DM) oferecem dados atomísticos sobre sistemas complexos, incluindo informações sobre as interações, a flexibilidade e o perfil eletrostático das macromoléculas (Al Qaraghuli; Kubiak-Ossowska; Mulheran, 2018). Durante sua execução, é realizado o cálculo das forças de interação que atuam sobre cada átomo, propagando as velocidades e posições atômicas por integração numérica das equações de movimento de Newton (Cheng; Ivanov, 2012).

Simulações de DM são uteis, dentre outras coisas, para avaliar a estabilidade conformacional de anticorpos, investigar o papel de aminoácidos individuais para manutenção dos complexos com os antígenos, calcular a energia de interação, guiar otimizações e, fundamentalmente, acelerar o desenvolvimento de bioterapêuticos (Hu; Zhang; Chen, 2011; Korthkongjai *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2014; Al Qaraghuli; Kubiak-Ossowska; Mulheran, 2018).

Outras técnicas *in silico* podem ser utilizadas para otimização racional dos mAbs e seus fragmentos. Exemplos aplicados a maturação de afinidade de anticorpos são a mutagênese de saturação e o enxerto de CDRs, este que realiza a troca dos *loops* hipervariáveis por outros de diferentes tamanhos e composições (Xin *et al.*, 2018; Adolf-Bryfogle *et al.*, 2018). Além disso, os métodos computacionais também podem ser utilizados para predição e otimização de outros aspectos relacionados ao

desenvolvimento, como a solubilidade e a estabilidade das moléculas terapêuticas (Harris; Cohen, 2024; Sormanni *et al.*, 2017).

#### 1.4 Abordagem do problema

O câncer é um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte no mundo e um obstáculo significativo ao aumento da expectativa de vida da população (Sung *et al.*, 2021). Em 2023, o Brasil registrou mais de 700 mil novos casos de câncer, com gastos em tratamentos oncológicos próximos a 4 bilhões de reais (Instituto Nacional de Câncer, 2022). Entre 2018 e 2022, houve um aumento de cerca de 402% nos custos médios, o que pode ser associado, em partes, à incorporação de novas tecnologias, como a imunoterapia (Valverde, 2023).

Enquanto a Constituição Federal de 1988, em seu artigo 196, determina que a saúde é um direito de todos e dever do Estado, o Projeto de Lei 5514/23 busca efetivar esse direito constitucional pela garantia do acesso à imunoterapia no SUS (Brasil, 1988; Reis, 2023). A importância de tal projeto é ressaltada pelo elevado número de ações judiciais movidas por pacientes que tiveram seus tratamentos negados, gerando um ônus de R\$1,4 bilhão ao Estado apenas em 2018 (Melo, 2019).

Esse cenário reforça a importância do fortalecimento da indústria brasileira de imunobiológicos, seja pela transferência de tecnologias ou pela pesquisa e desenvolvimento inteiramente nacional como meio para baratear custos e ampliar o acesso (Guimarães, 2021; Rangel; Augusto; Manuel, 2023). A proposição de *biobetters* – incluindo anticorpos e fragmentos modificados para otimização da afinidade, eficácia, termoestabilidade ou segurança – pode constituir uma alternativa para acelerar a obtenção de protótipos antineoplásicos (Liu *et al.*, 2020).

Os *biobetters* são medicamentos inovadores que não dependem da expiração da patente da referência a partir do qual foi construído (Royzman; Cohen, 2015; Silva, 2021). As modificações, quando atreladas a um aumento da eficácia, podem reduzir a frequência de administração. Tal redução é benéfica tanto do ponto de vista da segurança do paciente, podendo atenuar a manifestação de efeitos adversos, quanto do conforto, diminuindo a necessidade de deslocamento até unidades hospitalares ou ambulatoriais para receber a administração intravenosa, além de poder diminuir em até 40% o custo ao sistema de saúde (Verma; Jain; Chauhan, 2018).

O planejamento de *biobetters* frequentemente utiliza métodos computacionais para prever mudanças eficazes, diminuindo o número de etapas experimentais necessárias (Kuyucak; Kayser, 2017). A maturação de afinidade *in silico*, assim como o SBDD, tem se beneficiado do ganho de poder computacional, tornando-se uma ferramenta efetiva para otimização das propriedades biofísicas dos anticorpos (Li *et al.*, 2023). Dessa forma, metodologias computacionais podem ser implementadas no desenho de fragmentos para epítopos específicos, na adição de *linkers* e na otimização da interação e da termoestabilidade (Krokhotin *et al.*, 2019; Codina *et al.*, 2019; Aguilar Rangel *et al.*, 2022).

O anticorpo Brontictuzumabe (BRON) pode servir como base para modificações em novas moléculas terapêuticas devido à sua capacidade de bloquear a ativação da via de sinalização Notch1, crucial para a sobrevivência celular em tumores (Gharaibeh *et al.*, 2020). A ativação atípica de Notch1 foi relatada em diversas malignidades, incluindo em metade dos casos de LLA-T, com seu bloqueio resultando em um melhor prognóstico (Chu *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2015; Gharaibeh *et al.*, 2020).

Devido à ausência de estruturas experimentais desse anticorpo no PDB, o mecanismo molecular pelo qual BRON inibe a ativação de Notch não está completamente elucidado. A compreensão detalhada da interface de ligação é crucial para a proposição de mutações que aumentam a afinidade ou especificidade do anticorpo (Clark *et al.*, 2006; Kiyoshi *et al.*, 2014). Nesse sentido, modelos computacionais podem ser empregados tanto para entender o mecanismo molecular de inibição quanto para prever os impactos de mutações otimizadoras ou da modificação do formato de um anticorpo, guiando o desenvolvimento de biomoléculas com perfil terapêutico otimizado (Abdolmaleki; Ganjalikhani hakemi; Ganjalikhany, 2024).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Propor e desenvolver novos desenhos de anticorpos baseados no anti-Notch1 Brontictuzumabe, utilizando abordagens de otimização *in silico*, explorando tanto a otimização de afinidade quanto a introdução de formatos alternativos, como scFvs, para ampliar o seu potencial terapêutico

### 2.1 Objetivos específicos

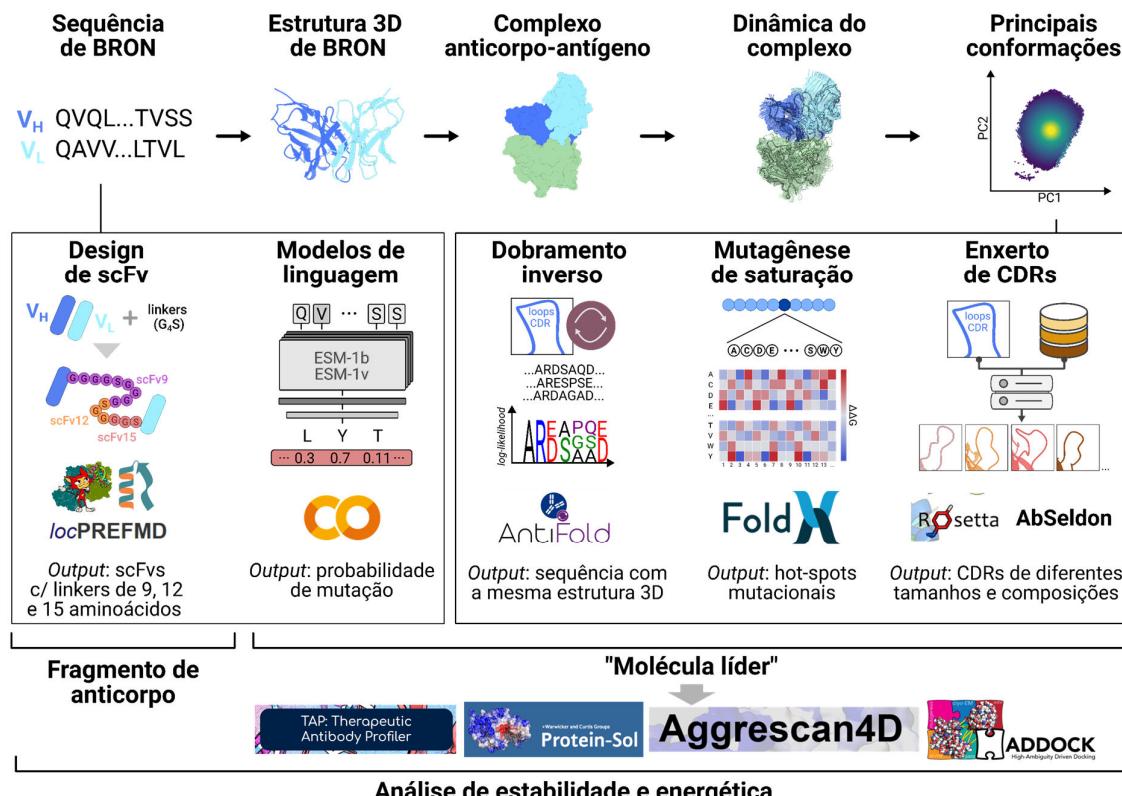
- Modelar computacionalmente o fragmento variável de BRON;
- Validar a metodologia de *docking* proteína-proteína para NRR e aplicá-la para propor o seu modo de ligação à BRON;
- Avaliar a estabilidade, as interações e as conformações do complexo anticorpo-antígeno;
- Calcular a energia livre de interação entre BRON e NRR e caracterizar a dissociação de tal complexo, a fim de estimar sua afinidade de interação;
- Realizar mutagênese de saturação na interface do anticorpo para desvendar os *hot-spots* mutacionais na interface;
- Propor *biobetters* por enxerto de CDRs e otimização de sequência;
- Validar os desenhos otimizados quanto à estabilidade, interação com o NRR, interações com outros receptores Notch, solubilidade, além de outras propriedades físico-químicas;
- Propor e avaliar modelos de scFvs com base no BRON, visando sua aplicação em novas estratégias terapêuticas.

### 3 METODOLOGIA

O desenvolvimento de *biobettters* pode utilizar ferramentas *in silico* na caracterização e seleção de candidatos promissores visando a sua futura validação *in vitro* e *in vivo*. As etapas computacionais utilizadas neste trabalho estão sintetizadas na Figura 8. A estrutura do fragmento variável do Brontictuzumabe foi obtida por modelagem molecular e utilizada para identificar os seus modos de interação ao antígeno NRR de Notch1.

O complexo resultante do *docking* foi validado e caracterizado por simulações de dinâmica molecular extensivas, e as conformações predominantes foram empregadas nas etapas subsequentes de desenho, que envolveram mutagênese de saturação, enxerto de CDRs e dobramento inverso. A sequência do anticorpo foi também submetida a modelos de linguagem visando a realização de uma evolução dirigida.

Figura 8. Estratégia computacional aplicada para obtenção de biomoléculas otimizadas a partir de BRON



Fonte: elaborada pelo autor (2024).

Concomitantemente, foi realizada a construção de scFvs a partir do Brontictuzumabe, considerando as vantagens associadas ao uso desses fragmentos. Por fim, as novas moléculas passaram por avaliações detalhadas de estabilidade, interações e solubilidade, assegurando sua viabilidade para as próximas fases de validação experimental.

### 3.1 Modelagem computacional do Fv de BRON

A sequência do BRON foi recuperada do Clarivate Integrity Database, um banco de dados que contém informações detalhadas sobre compostos biofarmacêuticos. A sequência, datada de junho de 2015, foi identificada pelos códigos 52M51, OMP-52M51, ou UNY2TQA40E. Para modelar os fragmentos variáveis, foram utilizados os métodos ABodyBuilder, da plataforma SAbPred, e RoseTTAFold, através do servidor Robetta (Leem *et al.*, 2016; Baek *et al.*, 2021). A numeração de Martin foi aplicada na anotação das posições das CDRs e inserções (Abhinandan; Martin, 2008).

A validação das estruturas modeladas utilizou três ferramentas de análise global e local. O programa MolProbity foi empregado para uma avaliação estereoquímica detalhada, com enfoque nos parâmetros de *clashscore* e de *outliers* no gráfico de Ramachandran (Williams *et al.*, 2017). Já a avaliação pelo QMEANDisCo fornece uma estimativa da qualidade global da estrutura com base em aprendizado de máquina (Studer *et al.*, 2019). Por fim, o VoroMQA, avalia a qualidade com base em um método geométrico de análise de vizinhança (Studer *et al.*, 2019; Olechnovič; Venclovas, 2017).

### 3.2 Docking do Fv de BRON ao domínio NRR de Notch1

#### 3.2.1 Validação da metodologia de docking proteína-proteína para um complexo envolvendo NRR

A validação da metodologia de *docking* foi feita através do *redocking* do PDB: 3L95, um complexo entre um Fab de um anticorpo antagonista e NRR de Notch1 obtido por difração de raios X com resolução de 2,19 Å (Wu *et al.*, 2010). Usando o programa PyMOL 3.0.3 (Schrödinger, LLC, 2015), foram gerados arquivos de estrutura separados para o Fab e o antígeno. O estado de protonação das proteínas foi corrigido

para pH 7,4 usando o PDB2PQR disponível no servidor Poisson-Boltzmann (Dolinsky *et al.*, 2004; Jurrus *et al.*, 2018).

O *docking* utilizou dois programas distintos: o HADDOCK2.2 para *docking* dirigido, utilizando os aminoácidos de CDR como resíduos ativos; e o ClusPro, tanto no modo normal quanto no modo anticorpo, para *docking* cego (van Zundert *et al.*, 2016; Kozakov *et al.*, 2017). Os complexos gerados foram comparados à estrutura experimental utilizando o DockQ, que produz um escore baseado no RMSD de interface (iRMS), no RMSD do ligante (LRMSD) e na fração de contatos nativos (Fnat) (Basu; Wallner, 2016).

O cálculo da raiz do desvio quadrático médio, ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*), é feito a partir do alinhamento das estruturas e da diferença das posições dos resíduos correspondentes em relação a uma referência, sendo a medida quantitativa mais comum para avaliar a similaridade entre duas coordenadas atômicas sobrepostas (Maiorov; Crippen, 1994; Kufareva; Abagyan, 2012). A Equação 1 ilustra o cálculo do RMSD, onde N é o número de átomos,  $m_i$  é a massa do átomo  $i$ ,  $X_i$  é o vetor de coordenadas para o átomo alvo  $i$ ,  $Y_i$  é o vetor de coordenadas para o átomo de referência  $i$  e M é a massa total.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N [m_i * (X_i - Y_i)^2]}{M}} \quad (1)$$

Enquanto iRMS refere-se à diferença na posição dos átomos na interface de interação anticorpo-antígeno, o LRMSD considera a diferença na posição de todos os átomos do ligante em relação ao complexo experimental. Fnat refere-se aos contatos atômicos entre o ligante e o receptor presentes na estrutura experimental e conservados no modelo gerado (Méndez *et al.*, 2003; Gao; Skolnick, 2011). No DockQ, esses três parâmetros são combinados de acordo com a Equação 2, e o escore gerado subdivide os complexos gerados na classificação CAPRI: incorretos ( $0 \leq DockQ < 0,23$ ); qualidade aceitável ( $0,23 \leq DockQ < 0,49$ ); qualidade média ( $0,49 \leq DockQ < 0,80$ ); e alta qualidade ( $DockQ \geq 0,80$ ) (Basu; Wallner, 2016).

$$DockQ (F_{nat}, LRMSD, iRMS, d_1, d_2) = \\ (F_{nat} + RMS_{scaled} (LRMSD, d_1) + RMS_{scaled} (iRMS, d_2)) / 3 \quad (2)$$

Para avaliar a manutenção de interações fundamentais ao cristal no complexo gerado por *docking*, foram realizadas duas replicatas de dinâmica molecular com duração de 100 ns, usando a mesma estrutura inicial e diferentes sementes aleatórias. Inicialmente, a nomenclatura dos resíduos foi ajustada àquela utilizada pelo Amber no estado de protonação equivalente ao pH 7,4 com o PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004; Jurrus *et al.*, 2018) (Figura 9).

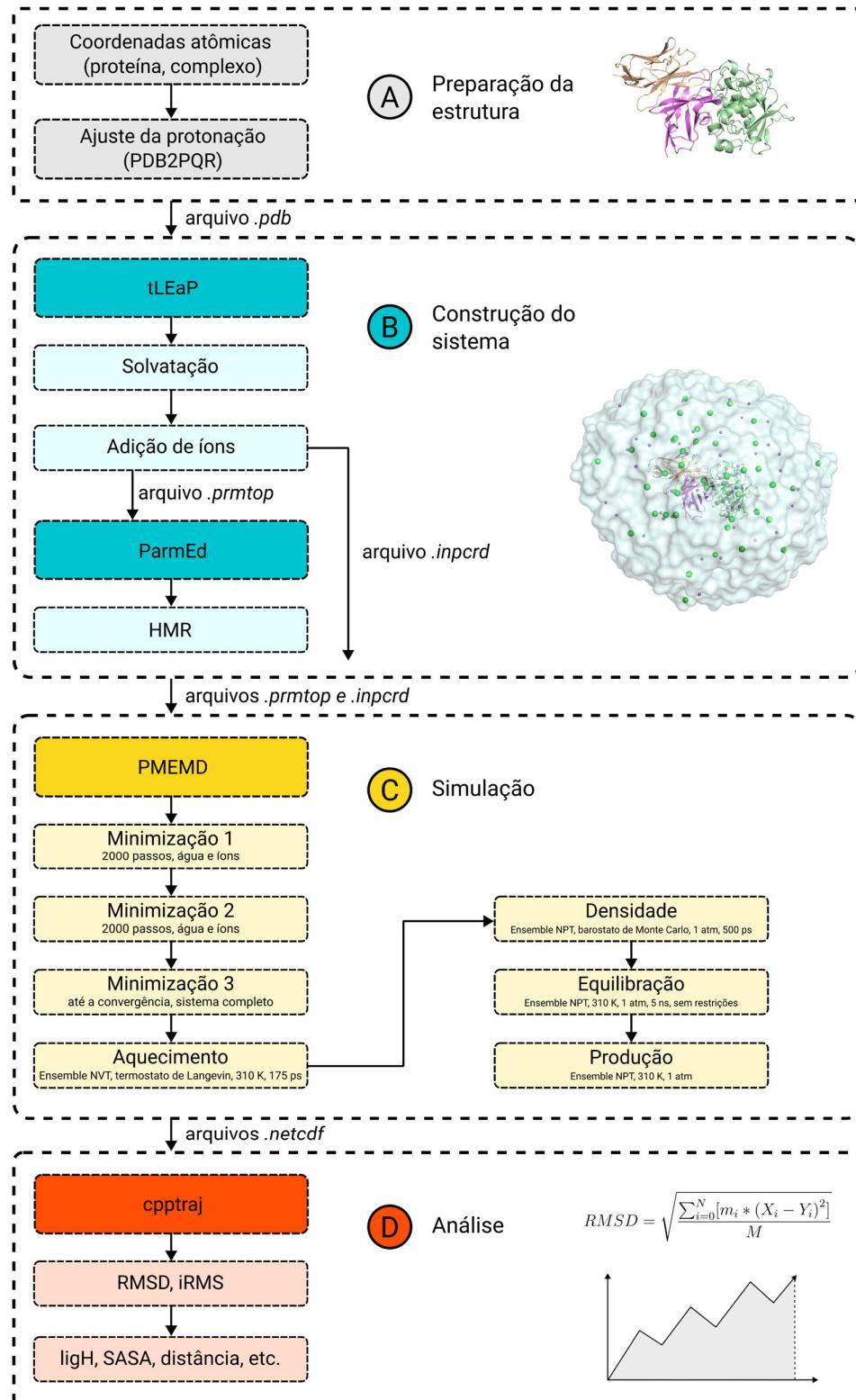
Em seguida, o sistema de simulação foi preparado com o *t leap* do AmberTools19, sob o campo de força ff14SB (Maier *et al.*, 2015). O complexo foi inserido em uma caixa de água SPC/E (“*extended simple point charge model*”) em formato de octaedro truncado, que foi solvatada até 15 Å de distância do último átomo da proteína a fim de evitar interações entre suas imagens periódicas (Berendsen; Grigera; Straatsma, 1987; Chatterjee *et al.*, 2008).

O sistema foi neutralizado com a adição de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , e a concentração salina foi ajustada para  $\text{NaCl}$  0,15 M, a fim de mimetizar as condições fisiológicas (Kříž *et al.*, 2013). O cálculo da quantidade de átomos de cloreto e sódio necessários para atingir a osmolaridade desejada usou o servidor SLTCAP (Schmit *et al.*, 2018). Em seguida, a topologia do sistema foi modificada utilizando o módulo *parmed* do AmberTools19 para realizar o reparticionamento de massa dos hidrogênios (HMR, do inglês “*Hydrogen Mass Repartition*”), permitindo o uso de um passo de integração de 4 fs (Hopkins *et al.*, 2015).

As simulações foram realizadas na versão CUDA do Amber18 com o módulo PMEMD (Case *et al.*, 2018; Salomon-Ferrer *et al.*, 2013). O método *particle mesh Ewald* (PME) foi usado para tratar interações eletrostáticas de longo alcance. Um *cut-off* de 10 Å foi aplicado às interações não ligadas e o algoritmo SHAKE foi utilizado para restringir as ligações envolvendo átomos de hidrogênio (Darden; Pedersen, 1993; Essmann *et al.*, 1995; Ryckaert; Ciccotti; Berendsen, 1977).

A minimização dos sistemas foi realizada em três etapas. Nas duas primeiras, com as proteínas fixas por uma restrição de posição de 500 kcal/mol, os íons e as moléculas de solvente passaram por 2.000 ciclos de minimização, sendo os primeiros 1.000 ciclos com o algoritmo *steepest descent* seguidos de 1.000 ciclos utilizando o método de gradiente conjugado. Na terceira etapa, todo o sistema foi minimizado sem restrições, começando com 2.000 ciclos utilizando *steepest descent*, seguidos pelo gradiente conjugado até a convergência (Nazareth, 2009; Meza, 2010).

Figura 9. Fluxograma de simulação de dinâmica molecular



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Os arquivos de estrutura no formato .pdb seguem as etapas de preparação e montagem do sistema, gerando arquivos de topologia .prmtop e de coordenadas .inpcrd, que são utilizados pelo Amber18 para executar a simulação, gerando arquivos de trajetória no formato .netcdf.

O procedimento de equilíbrio também foi realizado em três etapas. Na primeira, o sistema foi gradualmente aquecido à 310 K ao longo de 175 ps em *ensemble* canônico (NVT) usando o termostato de Langevin (Nauchitel', 1981; Farago, 2019). Após o aquecimento, o equilíbrio da densidade utilizou *ensemble* NTP, com o barostato de Monte Carlo ajustando a pressão para 1 atm durante 500 ps (Åqvist *et al.*, 2004). Ambas as etapas usaram restrições de posição de 10 kcal/mol·Å<sup>2</sup> nos átomos das proteínas. Finalmente, um equilíbrio estendido foi realizado por 5 ns livre de restrições.

As simulações de produção com duração de 100 ns foram conduzidas em *ensemble* isotérmico-isobárico (NTP). As trajetórias resultantes foram analisadas com o *cpptraj* para determinar o RMSD, as ligações de hidrogênio e as distâncias relevantes (Roe; Cheatham, 2013). A Figura 9 contém o fluxograma completo da preparação até a análise das simulações da DM. Todas as execuções utilizaram um *cluster* computacional HPC-HPE com 10 nodes de cálculo e dois principais com 60 TB de capacidade de armazenamento, sendo 1 *Compute Node* HPE DL380 2U, configurado como *Headnode*, 20 cores, 192GB, 36 TB, uma máquina similar com 24 TB de armazenamento, 2 *nodes* de cálculo, cada um com 32 cores, 192GB de DDR4, 2 GPU NVIDIA P100 12GB, e mais 8 *nodes* com GPU K20.

### 3.2.2 *Docking BRON-NRR*

Previamente ao docking de BRON em NRR, foi realizada a predição de epítopenos do antígeno a partir da sua sequência com o BepiPred-3.0, aplicando um *cut-off* de 0,15 ao escore predito para identificação dos resíduos-alvo (Clifford *et al.* 2022). O *docking* do Fv modelado de BRON foi realizado com o NRR de Notch1, extraído do PDB: 3L95. A conformação ligada de NRR, em complexo a um anticorpo, foi escolhida por apresentar ajustes estruturais, como mudanças nas conformações das cadeias laterais dos resíduos de interface, que favorecem a interação (Apêndice A).

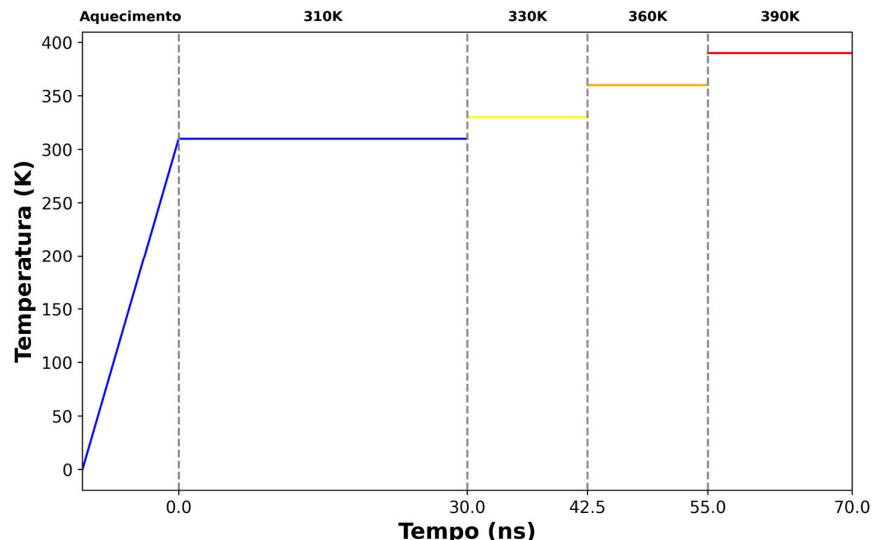
Vale ressaltar que os resíduos que participaram das interações descritas em 3L95 não foram utilizados como âncoras de interação para o complexo BRON-NRR, sendo aplicada a metodologia de *docking* cego que garante a livre exploração da superfície do antígeno sem a imposição de restrições conformacionais.

O estado de protonação das proteínas foi ajustado e o *docking* foi realizado utilizando o *software* ClusPro nos modos normal e anticorpo. As estruturas com os

menores escores de energia foram submetidas a validação por meio de simulações de dinâmica molecular aquecidas (DMA). Essa abordagem consiste em submeter as estruturas obtidas por *docking* a aumentos subsequentes de temperatura, com o objetivo de separar as *poses* verdadeiras de *decoys* (*poses* falsas) (Radom; Plückthun; Paci, 2018).

A preparação do sistema iniciou pelo capeamento do N- e C-terminal das proteínas com grupamentos acetil (ACE) e N-metilamida (NME). As demais etapas seguiram o fluxograma da Figura 9, incluindo três passos de minimização e três de equilíbrio. A dinâmica de produção foi iniciada na temperatura de 310 K (36,85 °C), a mesma na qual o sistema foi equilibrado. Após 30 ns, foram realizados três aumentos de temperatura: entre 30 e 42,5 ns, a simulação foi conduzida à 330 K (56,85 °C); no intervalo seguinte, de 42,5 a 55 ns a temperatura utilizada foi de 360 K (86,85 °C); e os últimos 15 ns de simulação usaram 390 K (116,85 °C) (Figura 10).

Figura 10. Simulações de dinâmica molecular aquecida



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Após a etapa de aquecimento de 0 a 310 K, são executadas as demais etapas de equilíbrio. A DM de produção é iniciada na temperatura de 310 K. A temperatura é elevada para 330 K, 360 K e 390 K em 30 ns, 42,5 ns e 55 ns, e a simulação é encerrada em 70 ns.

As trajetórias resultantes foram analisadas com o *cpptraj* para o cálculo do RMSD total e do iRMS, com um valor de corte de 5 Å aplicado na identificação de *poses* estáveis. O complexo que se manteve dentro do *cut-off* foi avaliado também

quanto a manutenção das estruturas secundárias ao longo da simulação via DSSP (*Dictionary of Secondary Structures in Proteins*).

Os programas PDBSum e RING 4.0 foram então aplicados para identificar o número de resíduos envolvidos na interação, a área de interface, a formação de pontes salinas, ligações de hidrogênio e de contatos não ligado (de Beer *et al.*, 2014; Laskowski *et al.*, 1997; Del Conte *et al.*, 2024). Essas informações foram utilizadas para caracterizar o perfil dos resíduos que compõem a interface e compreender a contribuição das CDRs de BRON para interação. Além disso, foi feito o alinhamento das estruturas oriundas do *docking* à estrutura cristalográfica 3L95 usando o programa de visualização de estruturas ChimeraX, a fim de analisar comparativamente o mecanismo de inibição (Meng *et al.*, 2023; Pettersen *et al.*, 2020; Goddard *et al.*, 2017).

### 3.3 Amostragem conformacional do complexo BRON-NRR

#### 3.3.1 Simulações de dinâmica molecular convencionais

Para aprofundar o entendimento sobre a dinâmica e estabilidade do complexo Fv-NRR, foram realizadas quatro replicatas de DM de 400 ns. As simulações foram iniciadas a partir das caixas de simulação octaédricas previamente preparadas para a DMA, que foram submetidas a novas etapas de minimização e equilíbrio (Figura 9). Os 400 ns de produção foram subdivididos em 80 etapas de 5 ns cada, cada uma consistindo em 1.250.000 passos de 4 fs, uma condição possibilitada pelo uso do HMR. As coordenadas foram registradas no arquivo de trajetória a cada 1.250 passos, resultando em um total de 80.000 *frames*.

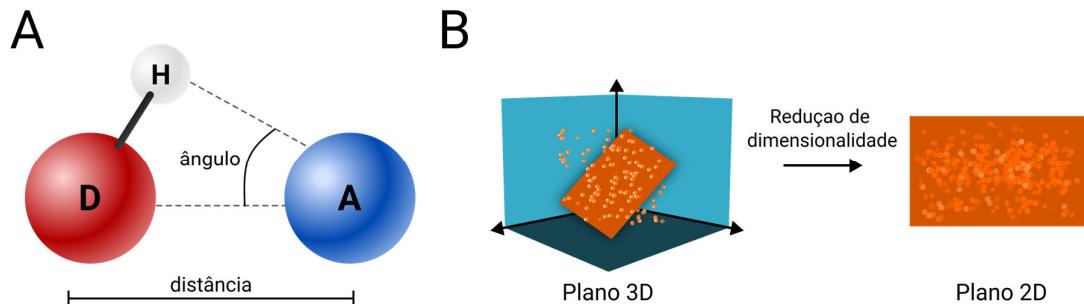
O *cut-off* de distância para as interações de van der Waals e eletrostáticas foi estabelecido em 10 Å. O controle de pressão foi realizado utilizando o barostato de Monte Carlo, mantendo o sistema a uma pressão de 1 atm, enquanto o controle de temperatura foi feito com o termostato de Langevin, fixando a temperatura em 310 K, sendo estes parâmetros, assim como a concentração iônica de 0,15 M, escolhidos para mimetizar condições fisiológicas. As trajetórias geradas foram comprimidas e analisadas usando o *cpptraj* para o avaliação de diversas métricas.

O RMSD foi calculado tanto para o complexo quanto para o anticorpo e antígeno individualmente. O iRMS, em particular, focou na interface entre BRON e NRR, fornecendo *insights* sobre a manutenção da interação ao longo do tempo. Já o RSMF (“Root Mean Square Fluctuation”) foi calculado para os átomos da cadeia principal das proteínas a fim de avaliar amplitude das flutuações, permitindo identificar regiões de maior flexibilidade (Kuzmanic; Zagrovic, 2010). O cálculo do RSMF é baseado na Equação 3, onde  $x_{i(j)}$  denota a posição átomo  $i$  no *frame*  $j$  e  $\langle x_i \rangle$  é a posição média de  $i$  em todos os frames que compõe a trajetória.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_j^N (x_{i(j)} - \langle x_i \rangle)^2} \quad (3)$$

As ligações de hidrogênio (ligH) foram identificadas através de critérios geométricos, sendo que a distância entre um átomo pesado aceitador A – átomos com elevada eletronegatividade, a exemplo do flúor, oxigênio e nitrogênio – e um átomo pesado doador D deve ser inferior a 3 Å, e o ângulo A-H-D deve ser superior a 135º (Arunan *et al.*, 2011; Roe; Cheatham, 2013) (Figura 11A).

Figura 11. Condições geométricas para estabelecimento da ligH e redução de dimensionalidade por PCA



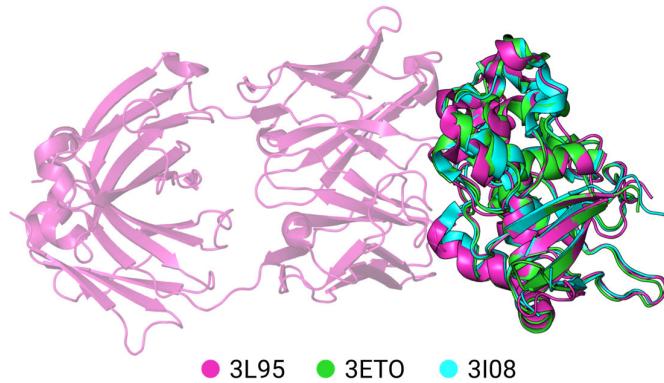
Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) A formação de ligH depende de condições geométricas. Para o cpptraj, essas condições correspondem a uma distância A – D menor que 3 Å e o ângulo A-H-D maior que 135º. (B) A PCA é uma técnica capaz de reduzir conjuntos de dados multidimensionais, como as trajetórias de DM, em 2 dimensões principais, facilitando sua interpretação gráfica.

Para uma análise mais aprofundada das conformações adotadas pelo complexo durante as simulações, foi realizada uma redução de dimensionalidade utilizando a Análise de Componentes Principais (PCA) (Cox, Cox, 2008; David; Jacobs, 2014) (Figura 11B). Nessa etapa, a trajetória foi reduzida uniformemente para 20.000

*frames*, diminuindo o custo computacional. A matriz de covariância foi construída utilizando apenas os átomos da cadeia principal (C, Ca, N, O) das proteínas. Essa abordagem permitiu identificar o número de componentes necessários para descrever o espaço multidimensional amostrado e, dentro dos dois primeiros componentes principais, as conformações representativas do complexo em cada replicata.

Além das DM com o complexo BRON-NRR, foram realizadas simulações de 100 ns para diferentes conformações do NRR de Notch: em cadeia única pré-S1 (PDB: 3ETO); heterodímero não-ligado (PDB: 3I08); heterodímero na conformação ligada sem o Fab (PDB: 3L95); heterodímero em complexo com o Fab (Figura 12) (Gordon *et al.*, 2009a; Gordon *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2010). Enquanto os primeiros três sistemas foram simulados em duplicatas, o último foi alvo de quatro réplicas, que foram analisadas utilizando o *cpptraj* e o *pyPcaZip* (Shkurti *et al.*, 2016).

Figura 12. Conformações de NRR simuladas



Fonte: elaborado pelo autor (2024). As estruturas de NRR na forma monomérica (verde), heterodimérica não-ligada (azul) e heterodimérica ligada (rosa) foram recuperadas do PDB pelos códigos 3ETO, 3I08 e 3L95, respectivamente. Apenas átomos das proteínas estão sendo exibidos na exibição de estrutura secundária do PyMOL.

O algoritmo LCPO (*Linear Combination of Pairwise Overlaps*) calculou a área acessível ao solvente (SASA, do inglês “Solvent-accessible Surface Area”) para todo o sistema e especificamente para o sítio de clivagem S2 (resíduos 1710 e 1711) (Weiser; Shenkin; Still, 1999). Já o *pyPcaZip* foi utilizado na redução de dimensionalidade, realizando a diagonalização de trajetórias de diferentes sistemas e as projetando sobre o mesmo espaço bidimensional, garantindo a identificação das conformações de NRR partindo de diferentes posições iniciais.

### 3.3.2 Energia livre de interação

Com o intuito de avaliar a energia livre de interação e a contribuição individual dos resíduos para a estabilidade do complexo BRON-NRR, foi empregada a metodologia de MM/GBSA (*Molecular Mechanics with Generalized Born and Surface Area Solvation*) (Srinivasan *et al.*, 1998; Kollman *et al.*, 2000). Este método permite a decomposição da energia livre de ligação em termos entálpicos e entrópicos, fornecendo uma visão detalhada das interações moleculares e das forças estabilizadoras do complexo (Tuccinardi, 2021). A energia livre de ligação ( $\Delta G_{bind}$ ) é obtida pela soma da energia de interação molecular na fase gasosa ( $\Delta E_{MM}$ ), da energia livre de solvatação ( $\Delta G_{solv}$ ) e da mudança na entropia conformacional associada à interação ao ligante ( $-T\Delta S$ ) (Equação 4).

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (4)$$

$\Delta E_{MM}$  é o somatório da variação nas energias internas correspondentes às energias de ligação, ângulos e diedros, da energia eletrostática e das energias de van der Waals.  $\Delta G_{solv}$  inclui contribuições polares e não-polares, e é calculado com base no modelo de Born Generalizado (GB) (Feig *et al.*, 2004; Onufriev; Case; Bashford, 2002; Bashford; Case, 2000). Por fim, as mudanças na entropia conformacional são usualmente omitidas na avaliação da energia livre de interação relativa entre ligantes semelhantes devido ao elevado custo computacional (Wang *et al.*, 2019).

Para a análise MM/GBSA do complexo BRON-NRR, foi utilizado o *script* MM/PBSA.py disponível no AmberTools19 (Miller *et al.*, 2012). Foram selecionados 400 *frames* igualmente espaçados, coletados dos últimos 100 ns das simulações de 400 ns, garantindo que apenas as conformações equilibradas fossem analisadas. A decomposição da energia livre também foi realizada para identificar os resíduos que desempenham papéis significativos na estabilização do complexo, denominados *hot-spots*. Essa etapa visou a orientar a etapa de otimização, indicando sítios promissores para realização de mutações que possam melhorar a afinidade, e resíduos que devem ser conservados para não comprometer a formação do complexo (Moreira; Fernandes; Ramos, 2006).

### 3.3.3 Umbrella Sampling

### 3.3.3.1 Validação da metodologia de *Umbrella Sampling*

A metodologia de *Umbrella Sampling* (DM-US) é amplamente utilizada para calcular o perfil de energia livre em processos moleculares complexos, como a dissociação de complexos proteicos (Siebenmorgen; Zacharias, 2019). Na DM-US, a coordenada de reação, que representa a progressão do sistema de um estado inicial para um estado final, é amostrada de forma eficiente, mesmo em regiões de alta energia que são raramente acessadas em simulações convencionais (Kästner, 2011).

Essa amostragem é possibilitada pela aplicação de um potencial de viés ao longo de janelas, que restringe a coordenada de reação  $\xi$  a uma determinada faixa de valores, sem, no entanto, impor uma restrição rígida (Torrie; Valleau, 1977). A combinação das distribuições obtidas em cada janela é realizada por meio de métodos tais quais a análise de histograma ponderado (WHAM), que permite calcular a calcular a Força Potencial Média (PMF, do inglês “*Potential Mean Force*”) (Kumar *et al.*, 1995).

A qualidade da amostragem é crucial para a obtenção de um PMF confiável. Para isso, é necessário garantir uma sobreposição adequada entre as distribuições das diferentes janelas, facilitando a combinação dos dados na análise final. Outro aspecto fundamental na metodologia de US é a escolha da coordenada de reação (Kästner, 2011). Portanto, com a finalidade de obter resultados fidedignos, o método de DM-US foi validado pelo estudo da dissociação do complexo barnase-barstar.

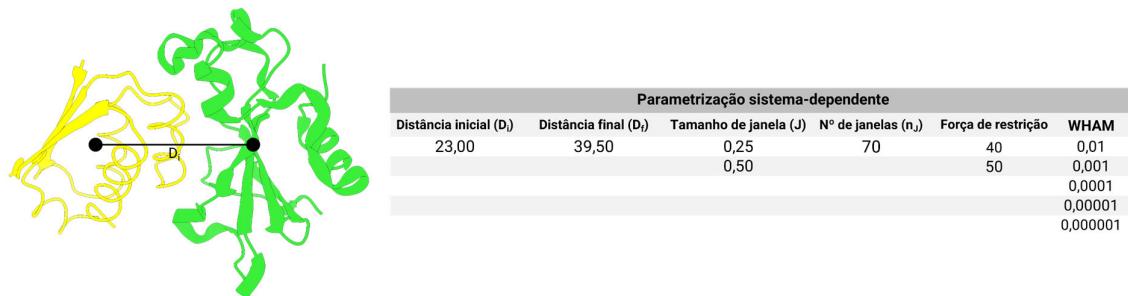
Este sistema foi escolhido por ser bem caracterizado, com disponibilidade de dados estruturais de cristalografia de raios-X com alta resolução, parâmetros termodinâmicos obtidos por calorimetria e dados cinéticos, além de possuir um tamanho moderado de aproximadamente 200 resíduos, o que torna viável seu uso para simulações extensas (Schreiber; Fersht, 1995; Urakubo; Ikura; Ito, 2008; Gumbart; Roux; Chipot, 2013; Zhang *et al.*, 2023).

A fim de comparar os resultados obtidos com a literatura disponível, inicialmente, foram obtidas as cadeias A e D da estrutura cristalográfica PDB: 1BRS (Buckle; Schreiber; Fersht, 1994; Wang *et al.*, 2010). O estado de protonação dos resíduos das proteínas foi ajustado ao pH 7,4, e as etapas de preparação seguiram as diretrizes apresentadas na Figura 9. A caixa de simulação foi dimensionada para 112,733 Å em todas as direções, utilizando a água com o modelo SPC/E.

A estrutura final obtida após as etapas de minimização e equilíbrio, que utilizaram o campo de força ff14SB com um tempo de integração de 2 fs e sem o uso

de HMR, serviu como ponto de partida para a DM-US. Durante essas simulações, a coordenada de reação foi definida como a distância entre os centros de massa das duas proteínas, calculada a partir dos C<sub>α</sub> usando o *cpptraj*.

Figura 13. Parâmetros de execução do *Umbrella Sampling* com sistema de referência barnase-barstar



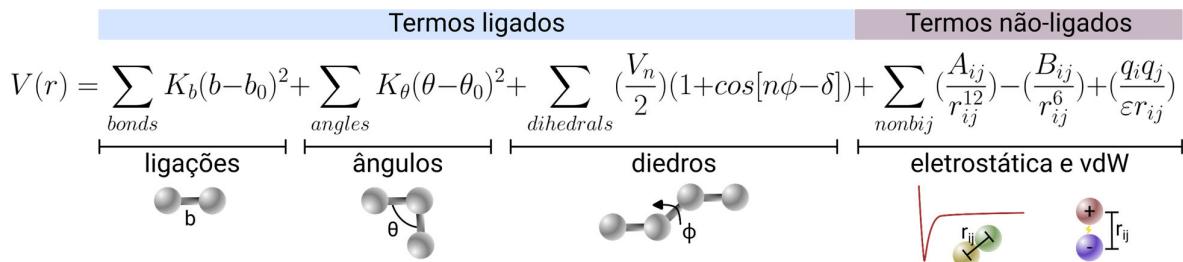
Fonte: elaborado pelo autor (2024). A estrutura secundária do PDB: 1BRS do complexo barnase (verde) e barstar (amarelo) foi observada no ChimeraX.

Para induzir a dissociação do complexo barnase-barstar, foi aplicado um potencial harmônico ao longo da coordenada de reação, restringindo o movimento das proteínas ao longo do eixo Z (Wang *et al.*, 2010). Um protocolo disponibilizado pelo grupo de pesquisa MoBioChem, situado na *Autonomous University of Madrid*, foi adaptado (Palmisano, 2022). Os valores de constante de força de restrição selecionados para avaliação equivalem a 40 e 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup>.

A distância inicial (D<sub>i</sub>) foi definida em 23 Å, seguindo a metodologia estabelecida por Wang e colaboradores (2010), e tamanhos de janela de 0,25 e 0,50 Å foram testados (Figura 13). As simulações utilizaram 70 janelas de 5 ns cada, totalizando 350 ns e 35 mil frames, com *snapshots* da trajetória salvos a cada 10 ps. A sobreposição entre as janelas foi verificada utilizando um *script* Python de elaboração própria.

Já o PMF foi calculado utilizando o WHAM. Inicialmente, um *script* perl foi aplicado para criar um arquivo de metadados levando em consideração que o programa *wham*, que implementa o método homônimo, usa a forma  $0,5K(b - b_0)^2$ , diferenciando-se da descrição utilizada pelo campo de força do Amber, que é derivada equação de Hooke (Figura 14) (Case *et al.*, 2018; Ngan *et al.*, 2008). Portanto, na conversão das forças utilizadas no Amber para execução pelo *wham*, é necessário multiplicá-la por dois (Luo *et al.*, 2023).

Figura 14. Termos que compõe o campo de força usado pelo Amber



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Para execução do *wham*, foi utilizada a temperatura de 310 K com os valores de tolerância de convergência variando de 0,01 a 0,000001 k<sub>B</sub>T (Grossfield, 2014). As iterações do WHAM param quando as probabilidades mudam menos que a tolerância (Hub; de Groot; van der Spoel, 2010). O erro foi estimado através de 10 ciclos de análise de *bootstrap* (Efron, 1979). A etapa de refinamento do perfil de energia livre considerou que o primeiro nanossegundo de simulação em cada janela corresponde ao período de acomodação do sistema à nova coordenada de reação, sendo este, portanto, removido do cálculo do PMF (Ruano; Cárdenas; Nogueira, 2021).

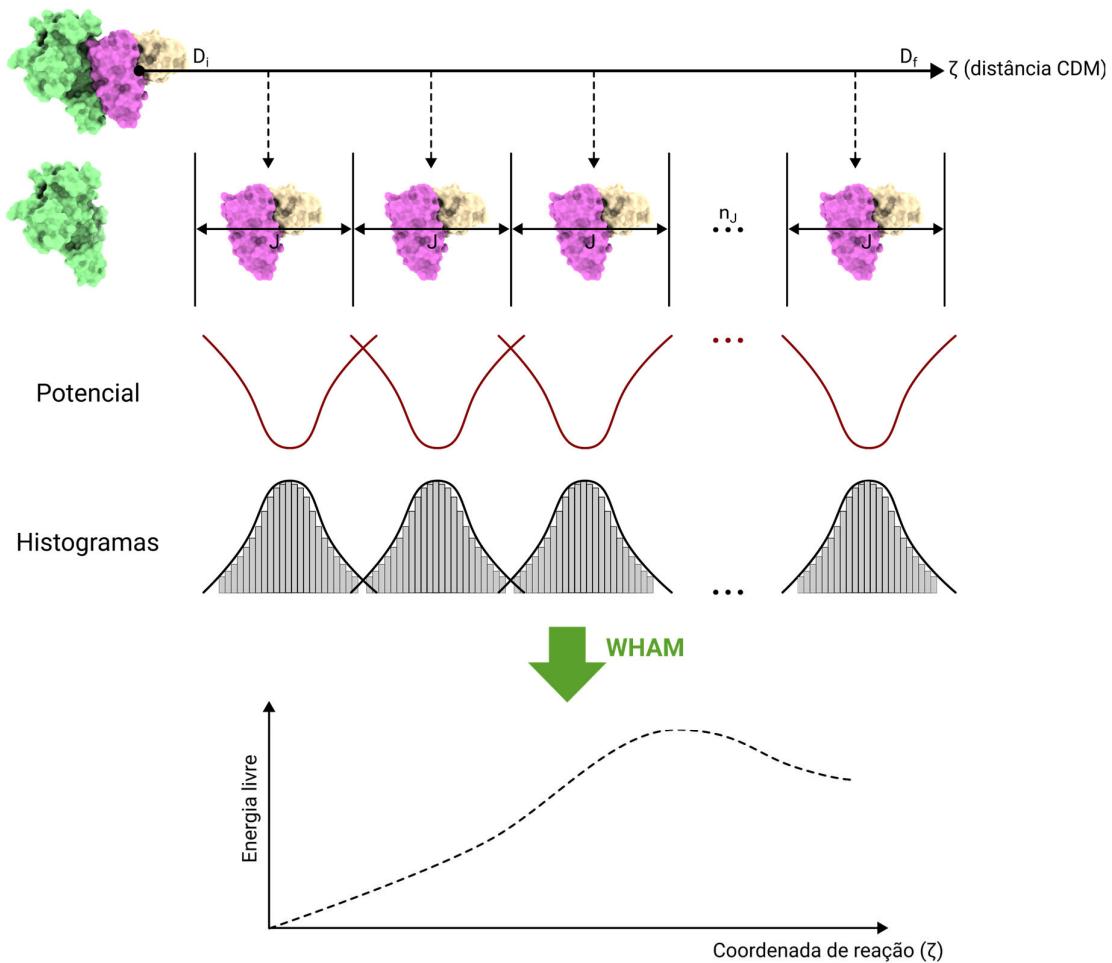
### 3.3.3.2 Aplicação da DM-US no sistema BRON-NRR

Para a aplicação da DM-US no sistema anticorpo-antígeno BRON-NRR, as conformações predominantes de cada uma das quatro replicatas de simulação convencional de 400 ns foram identificadas por PCA e extraídas da trajetória com o *cpptraj*. Esse sistema, que na DM anterior havia passado pelo reparticionamento das massas de hidrogênios, foi reparametrizado sem a utilização do HMR para gerar novos arquivos de coordenadas e topologia que passaram, então, pelas etapas de minimização e equilíbrio ilustradas na Figura 9.

Respaldado pelos resultados do sistema de validação, o tamanho de janela para DM-US de BRON-NRR foi mantido em 0,25 Å e a constante de força em 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup>, tendo cada janela uma duração de 10 ns. O primeiro nanossegundo de cada janela foi excluído da análise de reponderamento, sendo considerado o período de equilíbrio para a nova coordenada de reação, e 100 ciclos de análise de erro de

*bootstrap* foram realizados. A tolerância de convergência para o processamento com o *wham* foi avaliada entre 0,01 e 0,0001  $k_B T$ .

Figura 15. *Umbrella sampling* do sistema Fv-BRON



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Esquema ilustrativo do método de *Umbrella Sampling* aplicado ao sistema BRON-NRR. O complexo está representado como superfície, sendo NRR colorido em verde claro,  $V_H$  em violeta, e  $V_L$  em bege. A distância entre os centros de massa (CDM) das proteínas (indicada pelo traço preto) é usada como a coordenada de reação, partindo da distância inicial  $D_i$  e indo até a distância final  $D_f$ . As simulações são conduzidas em número de janelas  $n_J$  ao longo de diferentes distâncias, sendo aplicado um potencial harmônico responsável por manter os valores de coordenada variando dentro de  $J$ . Cada janela gera uma distribuição de amostragem (representada pelos gráficos de barras em cinza) com a respectiva variação das distâncias. As distribuições obtidas de cada janela são combinadas usando o método WHAM para gerar o perfil de energia livre da interação entre as proteínas.

Para determinar a melhor tolerância, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, uma medida estatística que quantifica a força e a direção da relação linear entre duas variáveis. Esse coeficiente varia de -1 a 1, onde valores próximos a 1 indicam uma forte correlação positiva (ou seja, à medida que uma variável aumenta, a outra também tende a aumentar), valores próximos a -1 indicam uma forte correlação negativa (quando uma variável aumenta, a outra tende a diminuir), e valores próximos de 0 indicam ausência de correlação linear (Benesty *et al.*, 2009).

O coeficiente foi calculado entre os valores de  $\Delta G$  obtidos com diferentes tolerâncias e as estimativas de  $\Delta G_{bind}$ , geradas pelo método MM/GBSA, e  $\Delta G_{sep}$ , obtidas pelo módulo InterfaceAnalyzer do Rosetta, permitindo identificar a tolerância que resultou na maior consistência entre os métodos (Sedgwick, 2009; Miller *et al.*, 2012; Stranges; Kuhlman, 2012). As simulações totalizaram 1  $\mu$ s por conformação e a afinidade foi estimada como a diferença entre o maior e o menor valor encontrado na curva de PMF (Ngo *et al.*, 2019; Lan *et al.*, 2019). A metodologia utilizada para o sistema BRON-NRR está ilustrada na Figura 15.

### 3.4 Desenho computacional de *biobetters* baseados em BRON

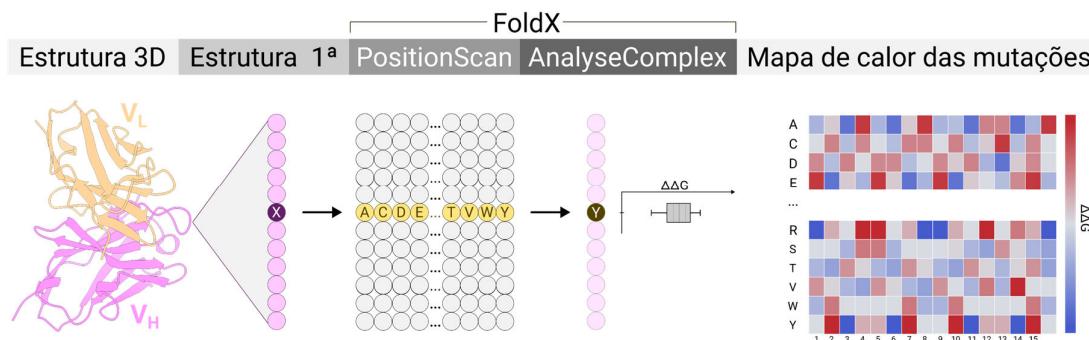
#### 3.4.1 Mutagênese de saturação

Com as informações obtidas sobre as conformações predominantes do complexo BRON-NRR, o perfil energético e a identificação dos *hot-spots* de interação anticorpo-antígeno, foi possível avançar para a otimização do Brontictuzumabe. O primeiro passo envolveu a execução da mutagênese de saturação, utilizando as quatro conformações predominantes identificadas nas simulações de 400 ns através da PCA. Essa tarefa foi realizada empregando três sub-rotinas do programa FoldX v.5.1 (Figura 16) (Guerois; Nielsen; Serrano, 2002; Delgado *et al.*, 2019). O fluxograma de aplicação dos módulos do FoldX para automação da mutagênese de saturação baseou-se em no *pipeline* utilizado pelo programa MutateX (Tiberti *et al.*, 2022).

Inicialmente, o *RepairPDB* foi utilizado para minimizar a energia e reparar as estruturas, identificando e corrigindo resíduos com ângulos de torção inadequados, choques de van der Waals, ou energias totais desfavoráveis (Van Durme *et al.*, 2011).

Em seguida, foi aplicado o *PositionScan*, que substitui um aminoácido genérico X por cada um dos 20 aminoácidos possíveis, ajustando também os resíduos vizinhos para minimizar interações desfavoráveis (Jones; Olsen; Gajhede, 2018). As mutações foram direcionadas para os resíduos localizados na interface anticorpo-antígeno de BRON, considerando condições experimentais de 310 K de temperatura, força iônica de 0,15 M e pH 7,4.

Figura 16. Mutagênese de saturação utilizando os módulos do FoldX



Fonte: elaborado pelo autor (2024). A estrutura tridimensional do complexo BRON-NRR é, inicialmente, reparada e, então passa pelos módulos do PositionScan e AnalyseComplex do FoldX, a fim de predizer os impactos das mutações por todos os 20 aminoácidos em cada posição da interface proteína-proteína. Essas informações foram condensadas em mapas de calor contendo os valores de  $\Delta\Delta G$ . Na imagem, a estrutura secundária de  $V_H$  e  $V_L$  de BRON está colorida em violeta e bege, respectivamente, e é realizada a mutagênese de saturação de um resíduo genérico X por todos os resíduos.

Por fim, o módulo *AnalyseComplex* foi utilizado para avaliar a energia de interação entre as duas moléculas ( $\Delta G_{bind}$ ). O FoldX calcula a energia livre de ligação de um complexo AB a partir das energias livres do complexo ( $\Delta G_{AB}$ ) e das moléculas isoladas ( $\Delta G_A$  e  $\Delta G_B$ ), sendo  $\Delta G_{bind} = \Delta G_{AB} - (\Delta G_A + \Delta G_B)$  (Schymkowitz *et al.*, 2005). Um *script* em Python processou os arquivos gerados pelo FoldX, consolidando as mutações individuais em cada posição em um único arquivo de texto, e calculou o  $\Delta\Delta G$  pela subtração do valor de energia do complexo inicial do valor do complexo mutado ( $\Delta G_{wt} - \Delta G_{mut}$ ). Mutações favoráveis, portanto, resultaram em valores positivos de  $\Delta\Delta G$ , indicando uma maior estabilidade energética do mutante (Figura 16).

### 3.4.2 Enxerto de CDRs e desenho de sequência

Os programas RosettaAntibodyDesign (RAbD) e AbSeldon foram aplicados no enxerto de CDRs e desenho de sequência de BRON. O RAbD opera por meio de

um ciclo externo, que, quando habilitado pelo usuário, executa o enxerto das CDRs, passando a estrutura resultante para um ciclo interno, onde ocorre a otimização da sequência, reempacotamento da cadeia lateral e minimização dos CDRs (Adolf-Bryfogle *et al.*, 2018). Em seguida, é executada uma minimização de energia com a função de energia do Rosetta e, caso a estrutura minimizada possua energia menor do que a inicial, ela é aceita. Já se a energia for superior, o novo modelo é aceito com a probabilidade  $\exp(-\Delta E/RT)$ , onde  $\Delta E$  é a diferença de energia, seguindo o critério de Monte Carlo (Nayeem; Vila; Scheraga, 1991) (Figura 17).

As conformações mais acessadas durante as simulações de 400 ns de BRON-NRR foram usadas como ponto de partida. A numeração dos anticorpos foi ajustada ao esquema AHo utilizando o ANARCI, adequando-se ao padrão utilizado pelo RAbD (Dunbar; Deane, 2016). Devido à pouca contribuição das CDRs L1 e L2 na interface com NRR, esses dois *loops* foram selecionados para o enxerto. Já o desenho de sequência foi aplicado a todas as CDRs, exceto a H2, que apresentou interações críticas para a estabilidade do complexo.

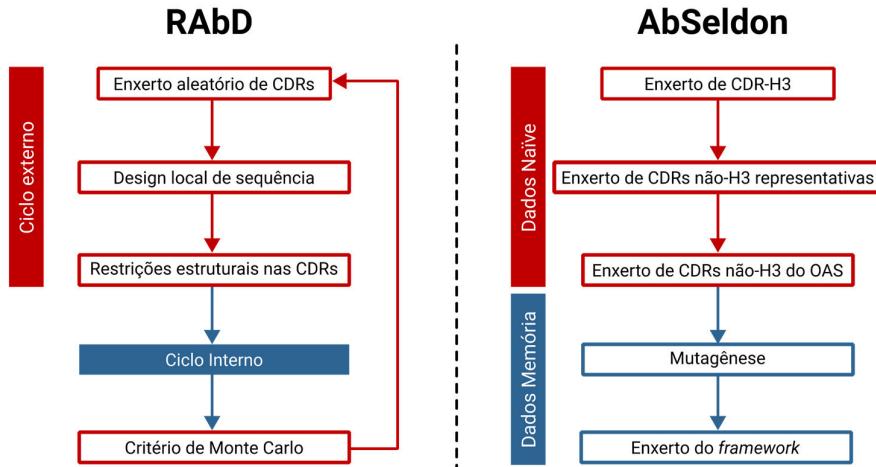
Seguindo as recomendações do manual do RAbD, o número de passagens pelo ciclo externo foi ajustado para 100, e o número de estruturas geradas foi de 250 por conformação inicial. Considerando as quatro estruturas iniciais utilizadas, o programa produziu um total de 1.000 anticorpos modificados. Os complexos gerados foram avaliados usando o módulo InterfaceAnalyzer do Rosetta, que calcula, dentre outros parâmetros, a energia de interação dos complexos proteína-proteína (Lewis; Kuhlman, 2011; Stranges; Kuhlman, 2012). Desse modo, a diferença de energia livre entre o complexo nativo e o mutante ( $\Delta\Delta G$ ) foi estimada.

O segundo programa utilizado foi o AbSeldon (*Antibody Structural Enhancement Leveraging Diversity for Optimization of iNteractions*), desenvolvido pelo Grupo de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos da Fiocruz Ceará (Sampaio, 2024). Simplificadamente, o *pipeline* do AbSeldon envolve seis etapas principais. Inicialmente, um arquivo de estrutura do complexo anticorpo/antígeno e um com a sequência em formato *FASTA* do anticorpo são preparados para modificação. Então, é executado o enxerto de CDR-H3, onde sequências H3 *naïve* são enxertadas a partir de dados de anticorpos humanos presentes no banco de dados OAS (*Observed Antibody Space*) (Kovaltsuk *et al.*, 2018; Olsen; Boyles; Deane, 2022).

A terceira etapa consiste no enxerto de CDRs não-H3, onde é testada a substituição dos *loops* canônicos por um conjunto reduzido de conformações

conhecidas. Em seguida, é executada busca por sequências *naïve* de CDRs não-H3 de anticorpos humanos do OAS. Os passos seguintes utilizam informações de anticorpos de memória, e incluem uma etapa de mutagênese, com introdução de mutações pontuais, e a maturação do *framework* (Sampaio, 2024) (Figura 17).

Figura 17. Rotina de otimização de anticorpos pelo RAbD e AbSeldon



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Uma limitação do uso do AbSeldon está nos dados de anticorpos de memória, que possuem, majoritariamente, sequências de cadeias leves do tipo *kappa* (Sampaio, 2024). Uma vez que BRON é um anticorpo IgG2-*lambda*, é possível que as alterações implementadas confiram ao desenho uma característica de anticorpo não-maturado. Novamente, as quatro estruturas de DM foram utilizadas, com a produção de aproximadamente 640 resultados por conformação, totalizando 2.560 desenhos.

### 3.4.3 Dobramento inverso e aplicação de modelos de linguagem

O dobramento inverso é um processo computacional que busca determinar sequências de aminoácidos compatíveis com uma determinada estrutura tridimensional da proteína (Godzik; Kolinski; Skolnick, 1993). No caso de anticorpos, a probabilidade posicional de um resíduo está correlacionada à afinidade ao antígeno. O software AntiFold, disponível no repositório OPIG da Universidade de Oxford, foi aplicado no dobramento inverso das CDRs do Brontictuzumabe (Høie *et al.*, 2024). Quatro conformações predominantes do anticorpo, obtidas por dinâmica molecular, e

quatro desenhos oriundos da metodologia de enxerto, foram submetidos ao programa, produzindo 800 sequências. Os resultados foram analisados quanto a recuperação de sequência, escore global e probabilidade de ocorrência dos resíduos em cada posição.

Complementarmente, foi feita maturação de afinidade de BRON a partir de modelos de linguagem gerais de proteínas utilizando a metodologia proposta por Hie e colaboradores (2024). De forma geral, modelos de linguagem têm o potencial de aprender padrões em sequências de proteínas ao longo da evolução (Lin *et al.*, 2023). A abordagem aplicada utiliza o transformador ESM-1b juntamente a um conjunto de cinco modelos ESM-1v treinados com base em quase cem milhões de sequências de proteínas naturais (Hie *et al.*, 2024). A partir da sequência de BRON, o *script* gerou uma lista de substituições acompanhadas do número de modelos de linguagem que as recomendaram.

#### **3.4.4 Validação dos desenhos**

A validação das modificações geradas iniciou-se pela identificação de alterações consenso através do AbAlign (Zong *et al.*, 2023). Como os diferentes programas de otimização empregam esquemas de numeração distintos — o RAbD utiliza, por padrão, a numeração AHo, o AbSeldon renumerá para Martin, o AntiFold usa IMGT e os programas de *docking* e simulação utilizam a numeração sequencial — os anticorpos foram alinhados e renumerados de acordo com o esquema Martin, garantindo consistência entre os métodos.

Não obstante, as estruturas resultantes do enxerto de CDRs foram submetidas a simulações de DMa. Somente as estruturas que mantiveram um valor de RMSD abaixo do corte de 5 Å passaram também por simulações estendidas de 400 ns, permitindo a identificação do melhor desenho em termos de estabilidade e interações. Os parâmetros de simulação aplicados foram os mesmos das simulações com Fv nativo.

O potencial de reatividade cruzada dos anticorpos nativo e otimizado foi avaliado pelo *docking* desses modelos à Notch2 e Notch3 usando o HADDOCK2.4 (Honorato *et al.*, 2024). As estruturas dos receptores foram obtidas a partir do PDB com os IDs 2OO4 e 5CZV, respectivamente, e suas sequências comparadas por alinhamento no ClustalW (Bernasconi-Elias *et al.*, 2016; Gordon *et al.*, 2007; Thompson; Gibson; Higgins, 2002). Os resultados do *docking* foram avaliados quanto

ao Escore HADDOCK, tamanho do cluster, área de superfície enterrada, dentre outros parâmetros fornecidos pelo programa.

Para verificar a viabilidade das modificações no que tange à solubilidade, a estrutura otimizada foi submetida ao AggreScan4D (Bárcenas *et al.*, 2024). O programa *Therapeutic Antibody Profiler*, incluso na plataforma SAbPred, foi aplicado para comparar a sequência de domínio variável com cinco diretrizes de desenvolvimento derivadas de anticorpos terapêuticos em estágio clínico: tamanho das CDRs; *patches* na vizinhança das CDRs, incluindo de hidrofobicidade de superfície (PSH), de carga positiva (PPC) e de carga negativa (PNC); e simetria de carga estrutural Fv (SFvCSP) (Raybould *et al.*, 2019).

Por fim, a carga e estabilidade do desenho foram estimadas através da plataforma Protein-Sol, onde também foi realizada uma metanálise baseada em 12 parâmetros biofísicos (Hebditch, Warwicker, 2019a; Hebditch, Warwicker, 2019b). Esses testes complementaram a validação estrutural, fornecendo informações cruciais sobre a compatibilidade do anticorpo modificado com futuras aplicações terapêuticas.

### 3.4.5 Construção dos scFvs

Considerando as facilidades na produção e as vantagens de utilização de fragmentos variáveis de cadeia simples, foram adicionados peptídeos ligantes flexíveis entre as cadeias  $V_H$  e  $V_L$  do Brontictuzumabe. O tamanho do *linker* pode influenciar a afinidade ao antígeno, sendo o peptídeo mais utilizado aquele de 15 resíduos composto por repetições de glicina e serina ((GGGGS)<sub>3</sub>), garantindo a flexibilidade do fragmento adicionado (Wang *et al.*, 2008). Além do linker de 15 resíduos, foram construídos scFvs com *linkers* de 9 (GGGGSGGGG) e 12 resíduos ((GGGGS)<sub>2</sub>GG).

A modelagem dos fragmentos scFv foi realizada com o RoseTTAFold, utilizado anteriormente para modelagem do Fv de BRON, e com o AlphaFold2, implementado no ColabFold, como segunda ferramenta de modelagem (Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022). Além disso, foi avaliada a aplicação do locPREFMD, que realiza o refinamento local da estrutura da proteína por meio de simulações de dinâmica molecular (Feig, 2016). A validação dos modelos utilizou novamente os programas MolProbity, QMEANDisco e o VoroMQA (Williams *et al.*, 2017; Studer *et*

al., 2019; Olechnovič; Venclovas, 2017).

Assim como no caso do Fv, o *docking* dos scFvs utilizou o *software* ClusPro, tanto no modo normal quanto no modo específico para anticorpos (Kozakov *et al.*, 2017). Os complexos gerados foram analisados com base em valores de energia, tamanho de cluster e similaridade da interface com BRON-NRR, sendo selecionados cinco com cada scFv para submissão à DMa. Foram selecionados para as etapas seguintes os complexos que apresentaram ligH com os resíduos 1501 ou 1710 de NRR, considerados críticos para o estabelecimento da "pinça molecular" que bloqueia o acesso ao sítio S2, e que mantiveram o RMSD abaixo de 5 Å.

Esses complexos foram, então, avaliados pelo PDBSum e RING 4.0, a fim de analisar a composição da interface e a participação das CDRs na interação (Beer *et al.*, 2014; Del Conte *et al.*, 2024). Adicionalmente, os complexos com os fragmentos foram submetidos a duas replicatas de DM longas, com 400 ns de simulação, para verificar a estabilidade dos scFvs e comparar a interação desses fragmentos de cadeia única com o Fv de BRON através dos parâmetros de iRMS, SASA e raio de giro. Através da PCA, foi avaliado o impacto da introdução do *linker* e de seu comprimento no espaço conformacional percorrido por NRR.

### 3.5 Visualização e tratamento de dados

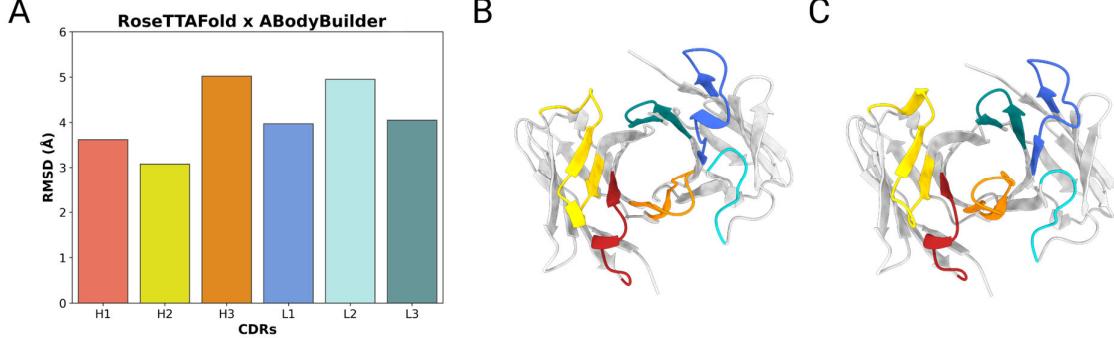
Neste trabalho, o tratamento de dados foi realizado utilizando bibliotecas gratuitas do Python3. Informações estatísticas foram extraídas com *Pandas*, enquanto os gráficos foram gerados por meio das bibliotecas *MatPlotLib* e *Seaborn*. Para a visualização dos arquivos de estrutura, foram utilizados os programas PyMOL 3.0.3 (Schrödinger, LLC) e ChimeraX 1.8 (Meng *et al.*, 2023; Pettersen *et al.*, 2020; Goddard *et al.*, 2017). A visualização das trajetórias de simulação contou, além do PyMOL, com o *software* VMD 1.9.3 (Humphrey; Dalke; Schulten, 1996). As imagens esquemáticas foram produzidas com os programas Inkscape e BioRender, facilitando a apresentação gráfica dos resultados e da metodologia.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estrutura do fragmento variável de BRON e qualidade do modelo

A obtenção de modelos estruturais precisos de proteínas é fundamental para entender sua função e avaliar sua adequação para aplicações específicas, como o desenho de fármacos (Schwede, 2013). Na ausência de dados cristalográficos disponíveis para o anticorpo Brontictuzumabe, foi necessário utilizar a modelagem molecular para obter sua estrutura tridimensional. Dois métodos foram empregados, sendo o primeiro deles o ABodyBuilder, que utilizou como moldes para as *frameworks* dos domínios  $V_H$  e  $V_L$  as estruturas depositadas no PDB identificadas como 3HC4 e 6MTR, com escores de 0,92 e 0,87, respectivamente. Esse programa usa o método FREAD, baseado em banco de dados, para modelar os *loops* CDR, e o ABangle para determinar a orientação entre  $V_H$  e  $V_L$  (Leem *et al.*, 2016; Choi; Deane, 2009; Dunbar *et al.*, 2013). O segundo método utilizado foi o RoseTTAFold, que gerou o modelo estrutural aplicando aprendizagem profunda (Baek *et al.*, 2021).

Figura 18. Comparação dos modelos estruturais gerados pelos diferentes programas



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) RMSD das CDRs dos modelos obtidos pelo RoseTTAFold e ABodyBuilder, obtido após o alinhamento das estruturas no PyMOL. Estrutura secundária dos modelos obtidos pelo (A) ABodyBuilder e (B) RoseTTAFold. As CDRs H1, H2, H3, L1, L2 e L3 estão coloridas com vermelho, amarelo, laranja, azul, ciano e cerceta, respectivamente.

As estruturas obtidas a partir de ambos os programas foram comparadas, revelando diferenças, especialmente nos *loops* hipervariáveis. As CDRs apresentaram variações de até 5 Å, com as maiores discrepâncias observadas em H3 e L2 (Figura 18). A predição precisa da variabilidade conformacional de *loops* flexíveis permanece um desafio para os métodos de modelagem, especialmente no caso de

anticorpos, devido à alta variabilidade em sequência e conformação da CDR-H3 (Barozet; Chacón; Cortés, 2021; Nishigami, Kamiya, Nakamura, 2016).

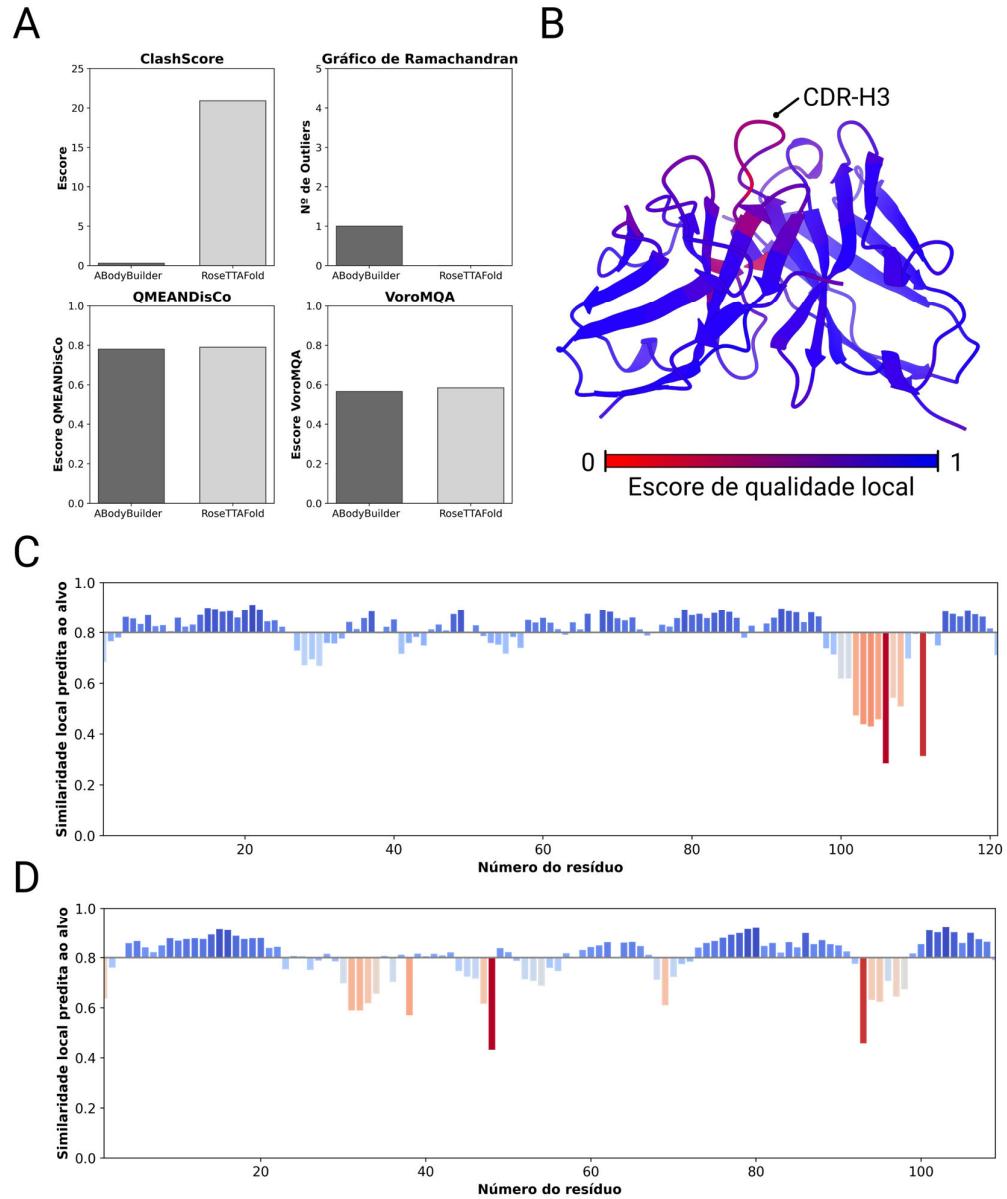
A fim de selecionar o modelo mais adequado para as etapas subsequentes, três ferramentas de validação foram empregadas (Figura 19A). O MolProbity foi utilizado para validação estereoquímica local e global, com o modelo gerado pelo ABodyBuilder apresentando um *clashscore* de 0,29 (apenas um caso de sobreposição estérica), em contraste com os 72 choques estéricos observados no modelo do RoseTTAFold (escore de 20,90). Tais choques são definidos como sobreposições maiores ou iguais à 0,4 Å de átomos que não sejam hidrogênio (Word *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2017).

O gráfico de Ramachandran, que avalia os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  de resíduos, identificou um único *outlier* na CDR-H3 do modelo do ABodyBuilder (Asn98 na numeração de Martin), enquanto o modelo do RoseTTAFold não apresentou nenhum. *Outliers* são resíduos que apresentam valores de diedros que os colocam em regiões não-permitidas do gráfico de distribuição, sua presença podendo indicar erros de modelagem, especialmente quando ultrapassam o limite de 0,2% (Ramachandran, 1963; Smith *et al.*, 2017).

O modelo oriundo do ABodyBuilder ultrapassa essa margem em apenas 0,2%, sobressaindo-se em termos de *clashscore* (1 choque estérico comparado aos 79 do RoseTTAFold), sendo considerado mais adequado segundo as análises estereoquímicas do MolProbity. No entanto, a relevância do *outlier* para a interação com o antígeno ainda deve ser avaliada, a fim de determinar o impacto desse rotâmero na estabilidade e afinidade do complexo.

O VoroMQA, que avalia as interações interatômicas, confirmou que ambos os modelos possuem pontuações superiores a 0,4, um indicativo de boa qualidade estrutural (Olechnovič; Venclovas, 2017). Já o QMEANDisCO, ferramenta que combina potenciais estatísticos e restrições de distância, calculou escores globais de 0,78 e 0,79 para as estruturas provenientes do ABodyBuilder e do RoseTTAFold, respectivamente (Studer *et al.*, 2019). Tendo em vista que o ABodyBuilder se baseia em conhecimentos específicos sobre estruturas de anticorpos, o que aumenta a precisão na modelagem de CDRs e na determinação do ângulo  $V_H$ - $V_L$ , sua estrutura foi selecionada para as próximas análises.

Figura 19. Validação da modelagem do Fv de BRON



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Validação global dos modelos pelo MolProbity, VoroMQA e QMEANDisCo. (B) Estrutura secundária do Fv obtido com o ABodyBuilder colorida de acordo com os escores locais produzidos pelo QMEANDisCo, que também é representado pelos gráficos de similaridade local predita ao alvo para as cadeias (C) pesada e (D) leve.

O IDDT (*Local Distance Difference Test*), calculado pelo QMEANDisCO, é uma pontuação que avalia diferenças entre os pares de distâncias interatômicas de um modelo e de uma estrutura de referência. Resíduos com IDDT superiores à 0,6 são classificados como modelados corretamente (Studer *et al.*, 2019). Em geral, todos os resíduos da cadeia pesada, exceto 8 presentes na CDR-H3, possuem qualidade aceitável (Figura 19B,C). Já na cadeia leve, as regiões L2 e L3 apresentaram um único

resíduo com qualidade inferior a 0,6, reforçando a adequação do modelo para estudos de interação e desenho molecular (Figura 19D).

#### 4.2 Validação e modos de ligação do complexo BRON-NRR

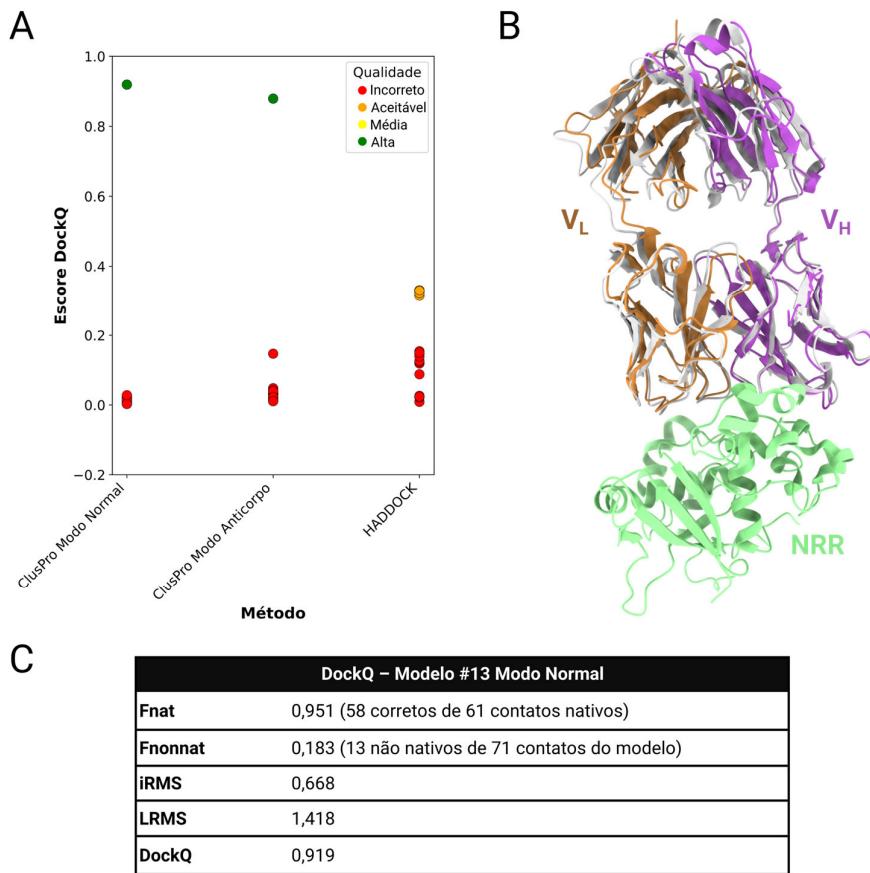
As interações proteína-proteína, incluindo aquelas envolvendo a formação de complexos anticorpo-antígeno, desempenham um importante papel em diferentes processos biológicos, tornando seu entendimento essencial para elucidar as funções das biomoléculas envolvidas em termos de reconhecimento, afinidade e especificidade (Gray, 2006; Tsuchiya; Yamamori; Tomii, 2022).

Sob o ponto de vista termodinâmico, a mudança na energia livre de formação do complexo, em comparação aos seus componentes isolados, resulta em uma conformação nativa localizada em um mínimo global de  $\Delta G$  (Smith; Sternberg, 2002). Dessa forma, o desafio das estratégias computacionais de predição de complexos proteína-proteína consiste em determinar, com rapidez e precisão, a conformação que melhor representa tal mínimo energético (Verkhivker *et al.*, 2000).

Entretanto, quando não há dados bioquímicos ou evolutivos para guiar o processo, o *docking* pode resultar em múltiplos modelos com pontuações energéticas similares, cabendo aos algoritmos de ranqueamento, que utilizam diferentes funções de energia, classificar adequadamente tais complexos (Moal *et al.*, 2013). Tais algoritmos podem reduzir o número de possíveis conformações, porém identificar o modelo correto com base apenas nessas pontuações ainda é uma tarefa complexa, ressaltando a importância da validação. Neste sentido, o *redocking* permite avaliar a precisão das *poses* preditas a partir da sua comparação com estruturas cristalográficas conhecidas (Friesner *et al.*, 2004).

Para o *docking* de complexos envolvendo o domínio NRR de Notch1, avaliou-se a eficiência dos programas ClusPro e HADDOCK por meio do *redocking* do complexo com estrutura determinada experimentalmente depositada no PDB (3L95) e posterior avaliação dos resultados com o DockQ (Van Zundert *et al.*, 2016; Kosakov *et al.*, 2017; Basu; Wallner, 2016). Enquanto o HADDOCK produziu estruturas classificadas como aceitáveis ou incorretas, o ClusPro produziu modelos de alta qualidade tanto no modo normal quanto no específico para anticorpos (Figura 20A).

Figura 20. Redocking de um complexo Fab-NRR

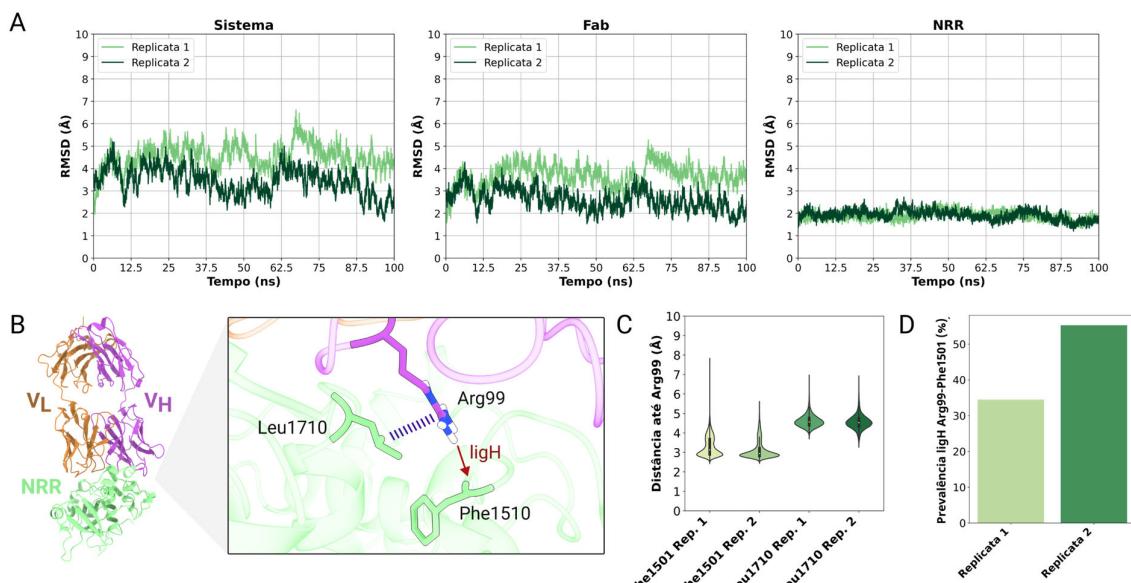


Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Escore de DockQ de todos os complexos proteicos gerados pelo HADDOCK e ClusPro, este sendo aplicado nos modos normal e anticorpo. Os pontos estão coloridos de acordo com a qualidade dos complexos, estando em vermelho os modelos incorretos, laranja aqueles aceitáveis, em amarelo os que tem qualidade média, e em verde os de alta qualidade. (B) Sobreposição da estrutura secundária do complexo cristalográfico com o resultado do docking pelo ClusPro no modo normal. NRR está em verde claro, e o Fab em sua posição cristalográfica está colorido em cinza. Já VH e VL, nas posições do Modelo 13 gerado por docking, estão ilustrados em roxo e marrom, respectivamente. (C) Resultado do DockQ para o Modelo 13, gerado pelo ClusPro no modo normal. O escore do DockQ agrupa as informações dos contatos nativos, não-nativos, iRMS e LRMS em seu cálculo, e valores próximos a 1 indicam complexos de alta qualidade.

A melhor pose obtida (Modelo #13 no modo normal) foi identificada como a estrutura de menor escore de energia pelo ClusPro, indicando que a função de energia aplicada no ranqueamento pode ser utilizada para identificação de conformações adequadas (Figura 20B). O complexo produzido preservou 58 dos 61 contatos nativos encontrados na estrutura cristalográfica original, e apresentou apenas 13 contatos não nativos (Figura 20C). Ademais, o RMSD da interface Fab-NRR foi inferior a 1 Å, demonstrando uma alta semelhança com a conformação cristalográfica e validando a adequação do ClusPro para o docking de um sistema comparável ao complexo entre o Brontictuzumabe e NRR.

Simulações de dinâmica molecular convencionais foram realizadas para avaliar a pose proposta pelo programa de *docking*. Ao longo das simulações em duas replicatas, o RMSD do domínio NRR manteve-se em torno de 2 Å, sugerindo estabilidade do antígeno (Figura 21A). O RMSD do sistema como um todo acompanhou as variações do Fab, permanecendo abaixo de 6 Å, o que é consistente com um heterodímero que contém cerca de 450 resíduos (Hermanto *et al.*, 2017).

Figura 21. Estabilidade e interações do complexo Fab-NRR



Fonte: elaborada pelo autor (2024). (A) RMSD do complexo anticorpo-antígeno, apenas do Fab e apenas de NRR ao longo dos 100 ns de simulação em duas replicatas. (B) Estrutura secundária do complexo anticorpo-antígeno, com NRR em verde claro, VH em roxo e VL em marrom, e detalhamento das interações formadas pela CDR-H3 do anticorpo, que, pelo estabelecimento de uma ligação de hidrogênio (seta vermelha) entre Arg99 e Phe1510 e pelo empacotamento entre Arg99 e Leu1710 (tracejado roxo), oculta o sítio S2. (C) Distâncias dos resíduos Phe1510 e Leu1710 à Arg99. (D) Prevalência da ligação de hidrogênio formada entre Arg99 e Phe1510.

Wu e colaboradores (2010) propuseram um mecanismo de inibição do receptor Notch1 no qual a formação de um "grampo molecular" impede o acesso ao sítio S2, cuja clivagem pela enzima ADAM é essencial para a ativação do receptor. Nesse mecanismo, a CDR-H3 do anticorpo se insere na cavidade formada entre os domínios LNR e HD do NRR. A Arg99 interage diretamente com a Leu1710 do domínio HD, o resíduo que antecede a posição de clivagem enzimática, e forma uma ligação de hidrogênio com a carbonila de Phe1501, localizada no domínio LNR (Figura 21B). Essa interação polar é fundamental para estabilizar NRR em sua conformação auto-inibida, bloqueando as mudanças conformacionais necessárias para a ativação do

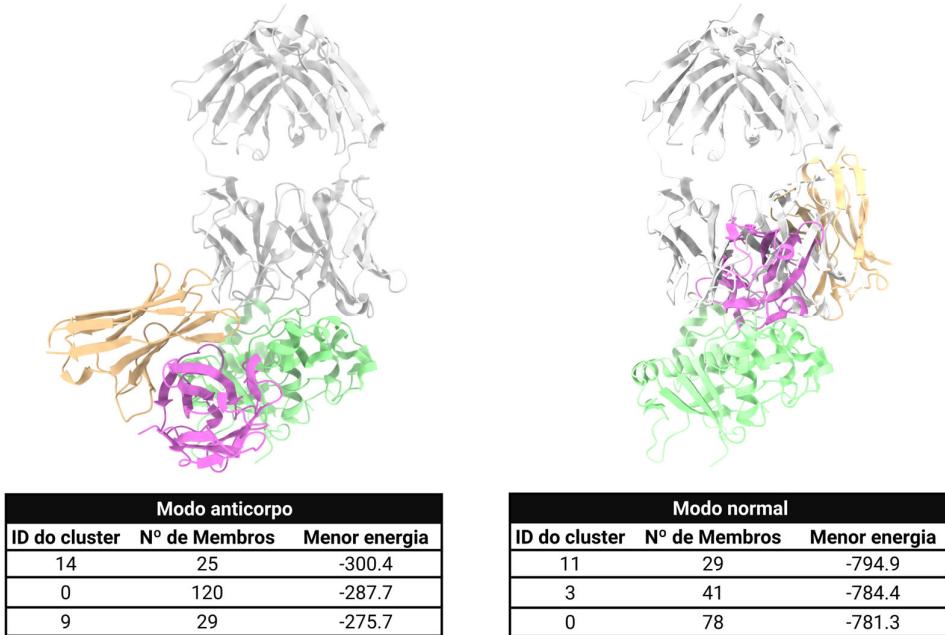
receptor (Wu *et al.*, 2010).

Nas simulações realizadas com o complexo Fab-NRR, verificou-se que a Arg99 da CDR-H3 se manteve dentro de uma distância geométrica favorável para a formação de uma ligação de hidrogênio com Phe1501 (Fabiola *et al.*, 2009) (Figura 21C). Essa interação foi observada nas duas replicatas, sendo detectada em cerca de 33% do tempo simulado da primeira e em mais de 50% da segunda, sugerindo que o mecanismo de inibição descrito por Wu e colaboradores (2010) está presente no complexo obtido por *docking* (Figura 21D). Além disso, a distância entre Arg99 e Leu1710 permaneceu inferior a 7 Å, o que está dentro do raio de *cut-off* para interações de cadeia lateral, corroborando a manutenção dessa interação relevante (Jumper *et al.*, 2018).

Os dados de simulação não apenas reiteram o “grampo molecular” que obstrui S2 como mecanismo de inibição de NRR, como também comprovam a capacidade do *docking* de reproduzir fidedignamente interações experimentais. Em concordância, a capacidade do ClusPro de propor interações anticorpo-antígeno corretamente, levando em consideração sua simetria particular, já foi documentada anteriormente na literatura (Chaves *et al.*, 2020). O protocolo validado para o *docking* com o ClusPro foi, assim, empregado para predição não enviesada da interação entre BRON e NRR.

Sem aplicação de restrições que direcionem a posição de encaixe, as estruturas do anticorpo e do antígeno foram submetidas ao programa e os complexos de menor energia resultantes, oriundos tanto no modo normal quanto no modo anticorpo, foram avaliados. Inicialmente, foi verificado se os valores de escore associados a essas estruturas seguem a "regra dos 5%", que sugere que, quando a diferença entre o valor de menor energia do primeiro e do segundo modelo for igual ou superior a 5%, o primeiro modelo na classificação de menor energia é o correto (Chaves *et al.*, 2020). As diferenças encontradas entre o primeiro e o segundo modelo de menor energia foram de 4,22% para o modo anticorpo e 1,32% para o modo normal, ambos fora do corte proposto pela regra (Figura 22).

Figura 22. *Docking* BRON-NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). As estruturas de menor energia resultantes do *docking* Fv-NRR estão coloridas, sobrepostas a estrutura secundária do Fab, em cinza, complexado à NRR (verde claro). As cadeias pesadas e leves estão coloridas de violeta e bege, respectivamente. As tabelas exibem o número de membros para os três clusters de menor energia nas execuções do ClusPro nos modos normal e anticorpo.

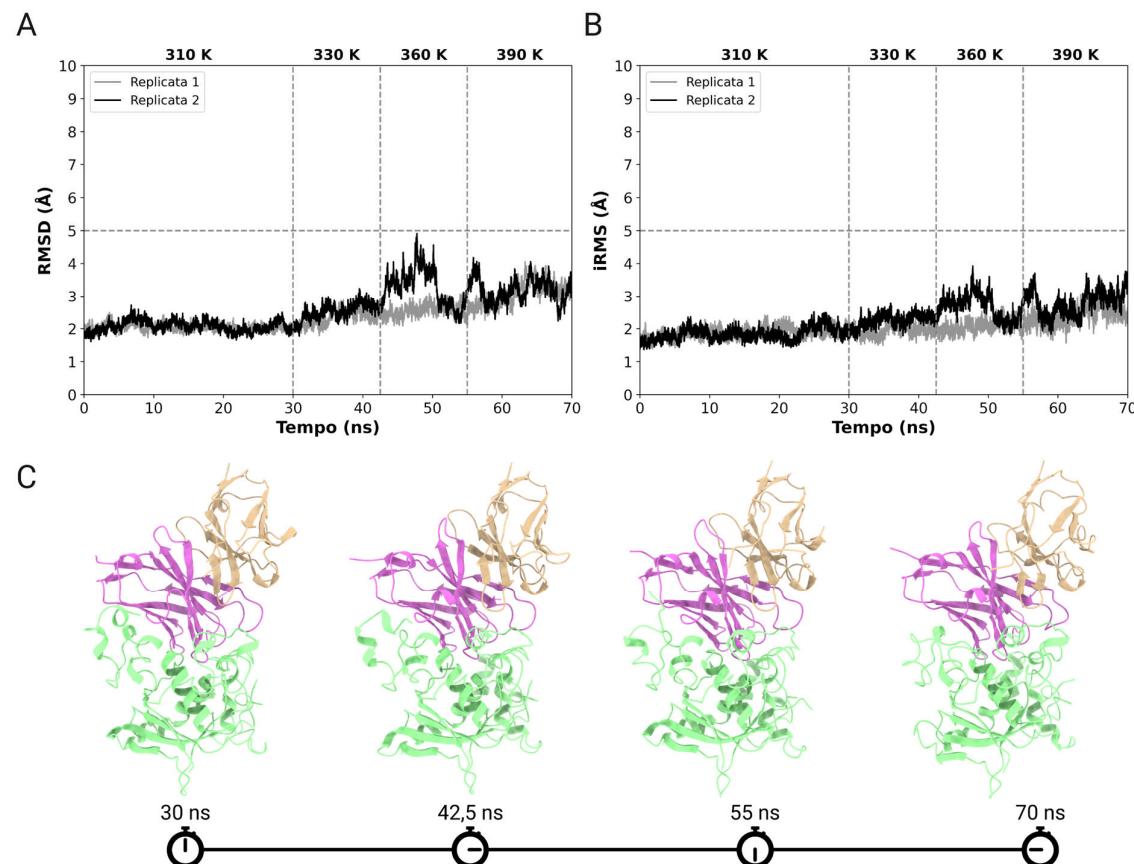
Dada a ausência de dados experimentais que possam auxiliar na seleção da conformação mais adequada, uma estratégia válida para identificar poses verdadeiras envolve o uso de simulações de Dinâmica Molecular com aquecimento (DMA). Este método baseia-se no princípio de que conformações corretas se encontram em mínimos da superfície de energia livre, enquanto conformações incorretas ou metaestáveis estão separadas por barreiras energéticas significativas (Radom; Plückthun; Paci, 2018). Para testar se as estruturas propostas podem escapar de possíveis “armadilhas” de conformações metaestáveis, são realizados sucessivos aquecimentos, e a estabilidade dos complexos avaliada pelo cálculo do RMSD. Estruturas estáveis após o aquecimento tendem a representar as conformações corretas (Radom; Plückthun; Paci, 2018).

A partir das simulações de DMA, foi possível confirmar a estabilidade do complexo BRON-NRR gerado no modo normal. Durante as duas replicatas, o RMSD total e de interface manteve-se abaixo do *cut-off* de 5 Å, com o valor final próximo à 3 Å mesmo após o último ciclo de aquecimento, que atingiu 390 K (Figura 23A,B). A integridade do sistema foi corroborada pela análise de estruturas secundárias,

demonstrando sua manutenção ao longo das simulações (Apêndice B). A avaliação visual do complexo confirmou sua estabilidade (Figura 23C). Já a estrutura gerada no modo anticorpo do ClusPro apresentou um RMSD superior ao valor de corte (Apêndice C). Deste modo, a conformação obtida pelo ClusPro no modo normal foi considerada a mais adequada para descrever o complexo BRON-NRR.

Essa pose coloca BRON em uma posição semelhante à do Fab na estrutura cristalográfica de 3L95, sugerindo que BRON pode atuar bloqueando um epítopo similar e apresentar mecanismo inibitório análogo (Figura 22). Além disso, a predição de epítopos revelou que 22 resíduos da interface apresentaram um escore acima do *cut-off* de 0,15. Esses resíduos não estão dispostos de forma contínua na sequência, indicando a formação de um epítopo conformacional (Apêndice D).

Figura 23. Dinâmica molecular aquecida de BRON-NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) RMSD e (B) iRMS da simulação do complexo BRON-NRR, obtido pelo *docking* no modo normal. (C) Representação da estrutura secundária do complexo anticorpo-antígeno ao final de cada ciclo de temperatura, aos 30, 42,5, 55 e 70 ns.

A pose validada do complexo BRON-NRR foi detalhadamente caracterizada, revelando uma contribuição significativa da cadeia pesada em comparação com a leve, tanto em termos de área de interface quanto no número de interações formadas. A cadeia pesada abrangeu 1.235 Å<sup>2</sup> de interface, enquanto a leve cobriu apenas 191 Å<sup>2</sup>. Em relação às interações, V<sub>H</sub> formou 2 pontes salinas, 22 ligações de hidrogênio e 223 contatos não ligados, ao passo que V<sub>L</sub> esteve envolvido em apenas 1 ligação de hidrogênio e 11 contatos não ligados, sem participação na formação de pontes salinas (Figura 24A).

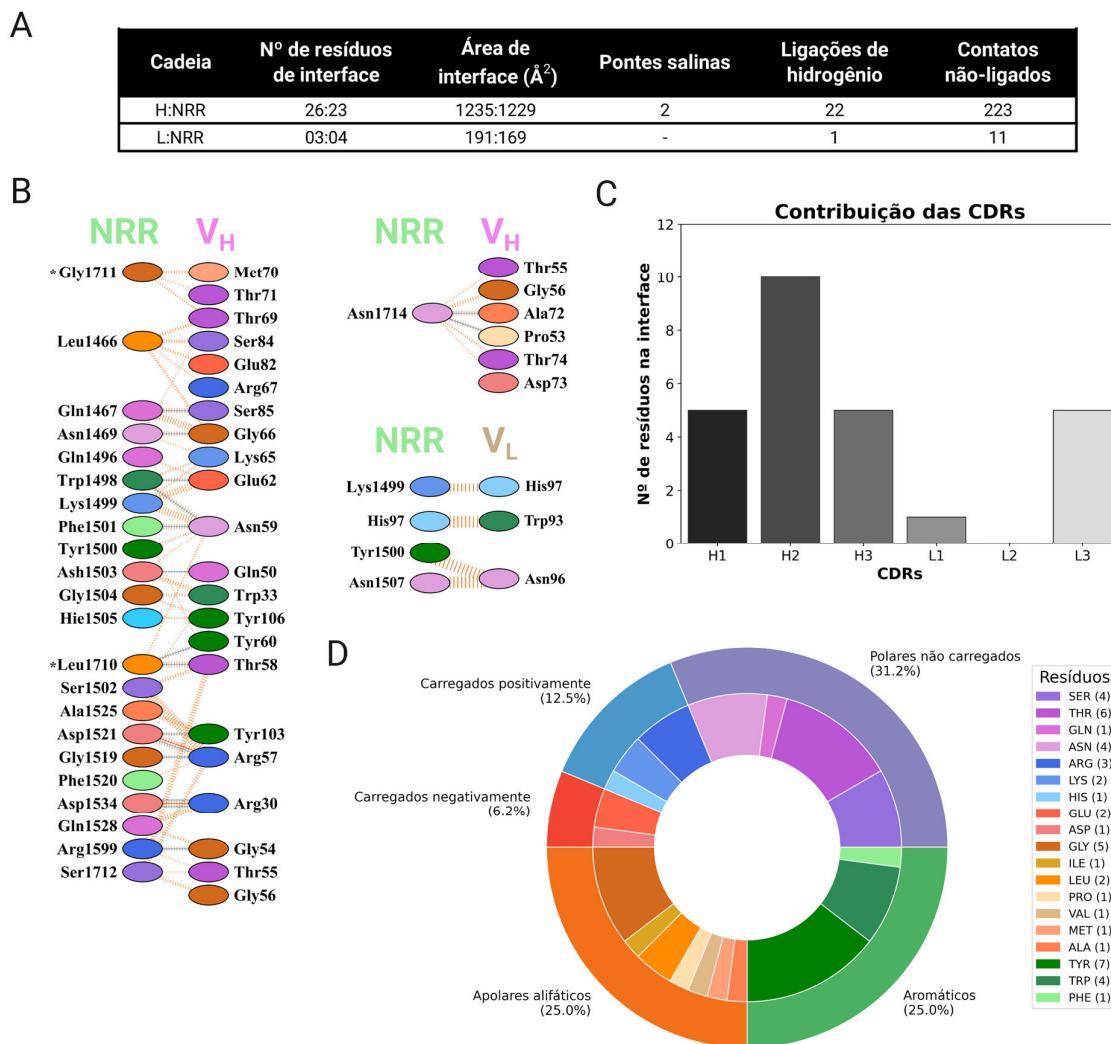
Essa predominância da cadeia pesada está em concordância com estudos estruturais prévios, que apontaram que cerca de 70% das ligações de hidrogênio em complexos anticorpo-antígeno obtidos a partir do PDB envolvem CDRs da cadeia pesada (Osajima; Hoshino, 2016). Na natureza, camelídeos possuem anticorpos que, inclusive, dispensam a cadeia leve e interagem exclusivamente via o domínio VHH, com alta afinidade ao antígeno (Muyldermans *et al.*, 2009).

A análise de interações não identificou contatos entre o resíduo *outlier* Asn102 (Asn98 na numeração de Martin) e o antígeno, sugerindo que sua conformação não influencia diretamente a interface de ligação e validando a escolha do modelo do ABodyBuilder. Além disso, os resíduos críticos para a clivagem S2 em NRR interagiram diretamente com a cadeia pesada do Fv (Figura 24B). Leu1710 forma ligações de hidrogênio com os resíduos Thr58, na CDR-H2, e Tyr60, que está na primeira posição de *framework* 3 (equivalentes às posições 57 e 59 na numeração de Martin). Já a Phe1501, envolvida no "grampo molecular" descrito por Wu e colaboradores (2010), interage via ligação de hidrogênio com Asn59 (ou Asn58, utilizando a numeração de Martin), possibilitando a formação de um mecanismo de inibição similar ao observado experimentalmente.

Resíduos fora das CDRs, particularmente da região de *framework* 3 da cadeia pesada, presente entre H2 e H3, também participaram da interação. Exemplos estão localizados no intervalo entre Arg67 e Ser85 (Figura 24B). De fato, estima-se que 20% dos resíduos de anticorpos que interagem com o antígeno estão situados fora das CDRs (Kunik; Peters; Ofran, 2012). Um exemplo encontra-se na região de alça denominada DE, por vezes referida como CDR4, que é codificada por segmentos gênicos V e está localizada estruturalmente de forma adjacente às CDRs 1 e 2 (Kelow; Adolf-Bryfogle; Dunbrack, 2020). Já na sequência, ela está entre as CDRs 2 e 3

conectando as fitas D e E, constituindo um exemplo de contribuição fora das CDRs tradicionais com impacto na afinidade anticorpo-antígeno (Kelow; Adolf-Bryfogle; Dunbrack, 2020).

Figura 24. Caracterização do complexo anticorpo-antígeno



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Informações sobre a interface proteína-proteína obtidos com o PDBSum, incluindo o número de resíduos de cada cadeia que a compõe, área, número de pontes salinas, ligH e contatos não-ligados. (B) Diagramas de interação resíduo-resíduo gerados pelo PDBSum. Pontes salinas e ligH são ilustradas por linhas contínuas de cores vermelha e azul, respectivamente. Já os contatos não-ligados são representados por linhas tracejadas laranjas. Os resíduos 1710 e 1711 de NRR, que constituem S2, estão marcados com asterisco. (C) Número de resíduos de CDR que compõe a interface proteína-proteína. A interface foi avaliada sob o critério de distância entre os Cα no programa PyMOL, sob *cut-off* de 8  $\text{\AA}$ . (D) Constituição química da interface, sob a ótica do perfil de aminoácidos que a compõe. A mesma definição de distância utilizada para avaliação da contribuição das CDRs foi aplicada para avaliação dos resíduos.

Um critério comumente utilizado para definir a interface proteína-proteína baseia-se na distância entre carbonos-alfa (Ca), no qual o resíduo é considerado de interface caso seu Ca esteja a até 8 Å do Ca de um resíduo presente em outra cadeia (Xue *et al.*, 2015). Com essa definição, a contribuição de cada CDR para a interface foi analisada, corroborando a predominância da cadeia pesada, com destaque para a CDR-H2 (Figura 24C). A CDR-L3, por outro lado, apresentou uma contribuição moderada para a formação do parátopo.

A composição química da interface também foi examinada, revelando um predomínio de resíduos polares não carregados, que representaram aproximadamente um terço dos aminoácidos analisados (Figura 23D). O resíduo mais frequente foi a tirosina, com 7 ocorrências, estando de acordo com o padrão observado em interações parátopo-epítopo, na qual os parátopos são frequentemente enriquecidos em aminoácidos aromáticos, especialmente em tirosina, e polares não carregados (Akbar *et al.*, 2021).

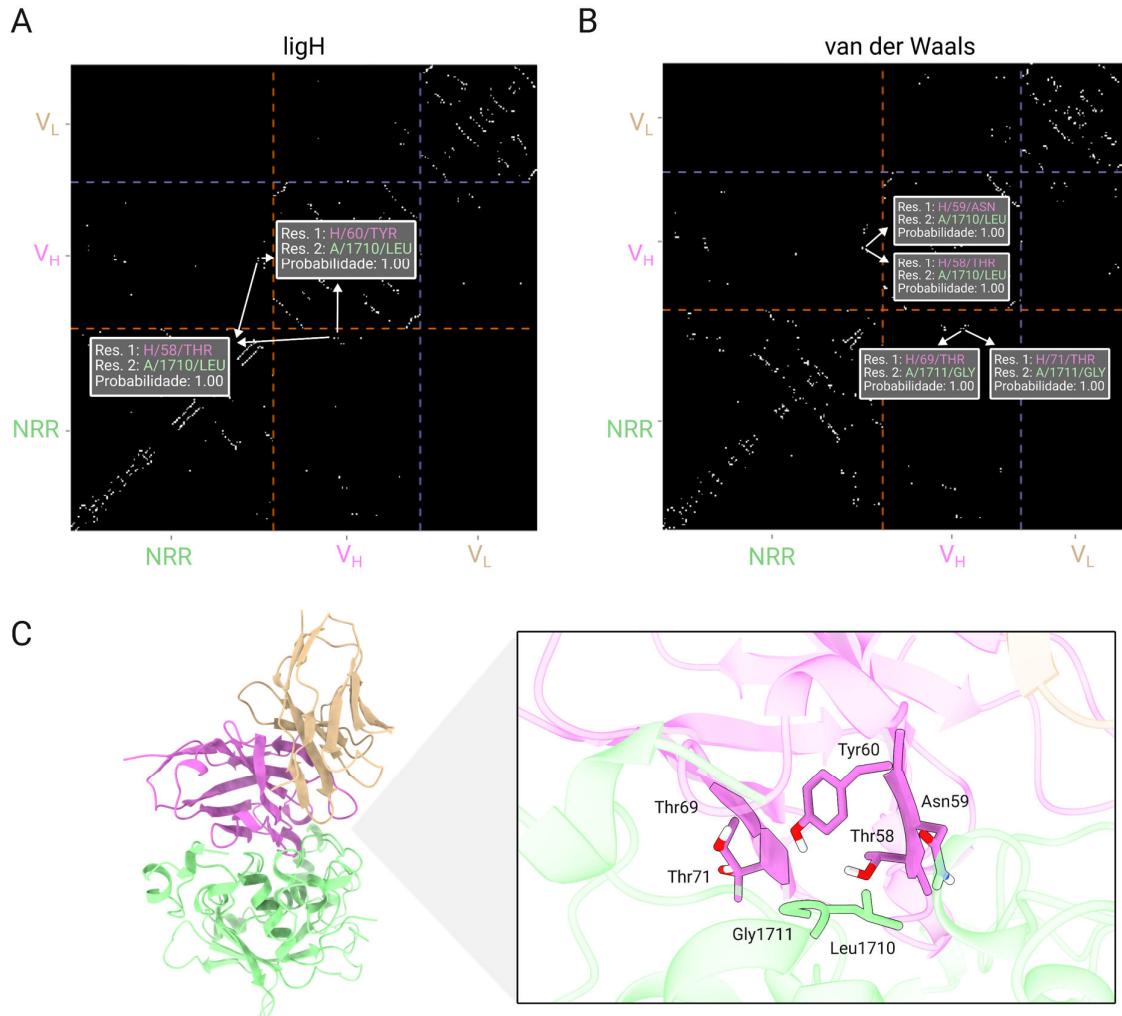
Por outro lado, os epítopos são geralmente ricos em resíduos carregados, como lisina e arginina (Akbar *et al.*, 2021). Resíduos de serina também são comuns em interfaces de anticorpos (Osajima; Hoshino, 2016). No complexo BRON-NRR, tal aminoácido foi o quarto mais encontrado, aparecendo em menor número que a tirosina, treonina e glicina, e sendo tão frequente quanto o triptofano e a asparagina.

Além da avaliação da interface pelo critério de distância e análise das interações e área de interface utilizando o servidor PDBSum, foi realizada uma etapa complementar de identificação das interações com base em parâmetros geométricos com o programa RING (de Beer *et al.*, 2013; Del Conte *et al.*, 2024). Foram reconhecidas, novamente, as ligH partindo dos resíduos Thr58 e Tyr60 do anticorpo, que atuam como doadores de hidrogênio a partir dos grupos hidroxila de suas cadeias laterais. A Leu1710, presente no domínio HD do NRR, atua como acceptor dessas ligações (Figura 25A,C).

Além das ligações de hidrogênio, foram observadas interações de van der Waals entre os resíduos Thr58 e Asn59 de BRON e a Leu1710 de NRR (Figura 25B). Interações semelhantes também foram detectadas entre Thr69 e Thr71 de BRON e a Gly1711 de NRR, que também está envolvida no sítio S2. Em complexos proteicos, as interações de van der Waals geralmente dominam as interfaces de ligação e desempenham um papel crucial na manutenção da estabilidade do complexo. Elas

operam em conjunto com as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, formando uma rede de interações sinérgicas que assegura a integridade estrutural de complexos proteína-proteína (Kangueane; Nilofer, 2018). A identificação dessas interações pelo RING reforça a relevância funcional da CDR-H2 na interface do complexo.

Figura 25. Interações de BRON com resíduos de S2 em NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Mapas de probabilidade da ocorrência de (A) ligações de hidrogênio e (B) interações de van der Waals entre BRON e NRR, obtido com o programa RING. A probabilidade da interação varia de 0 (preto) a 1 (branco). Os contatos com os resíduos 1710 e 1711, que constituem S2, estão destacados. (C) Estrutura secundária do complexo entre BRON (violeta, bege) e NRR (verde claro), destacando os resíduos que interagem com o sítio de clivagem S2.

#### 4.3 Estabilidade e dinâmica conformacional do complexo BRON-NRR

A dinâmica molecular e o *docking* oferecem perspectivas distintas, mas complementares, sobre interações biomoleculares (Santos; Ferreira; Caffarena, 2019). Ao estimar a pose de ligação ideal, o *docking* geralmente fornece uma perspectiva estática sobre a possível configuração de ligação entre um pequeno ligante ou uma macromolécula e um receptor e, por vezes, consiste apenas no primeiro estágio do processo de desenvolvimento de medicamentos (Ivetac; McCammon, 2011). No entanto, a natureza dinâmica das biomoléculas não é levada em consideração. Considerando tal caráter flexível, as simulações de DM são cruciais, investigando a evolução de um sistema ao longo do tempo, capturando o comportamento do ligante e do receptor e as alterações conformacionais geradas pelas interações entre as proteínas e destas com água ou íons ao seu redor (Badar *et al.*, 2022).

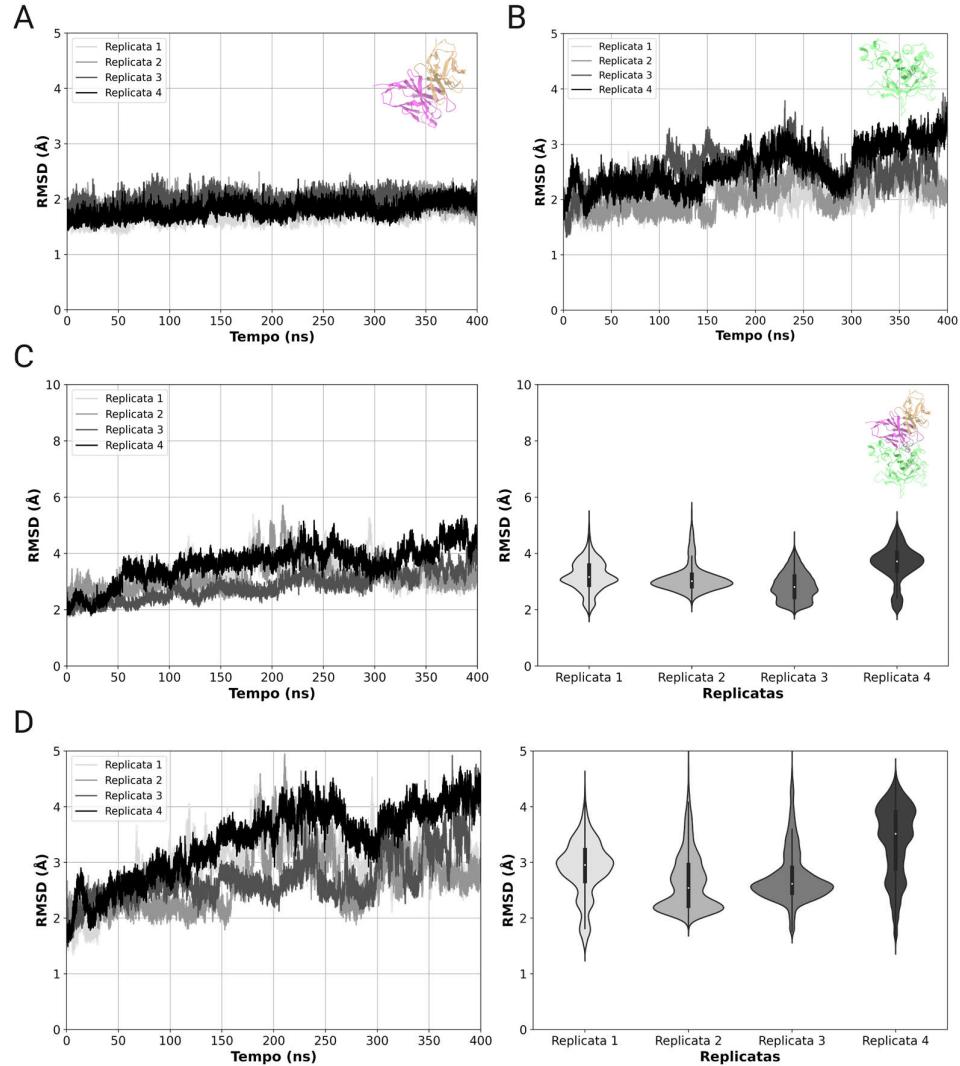
A fim de explorar tal evolução no sistema BRON-NRR, foram executadas quatro réplicas de 400 ns de DM a partir de sistema oriundo do *docking*. Uma vez que a superfície de energia livre costuma ser considerada rugosa, pequenas diferenças nas velocidades iniciais, por exemplo, podem fazer com que simulações com parâmetros idênticos (réplicas) tomem caminhos diferentes (Knapp; Ospina; Deane, 2018). Por conseguinte, o número de réplicas e o tempo necessário para descrever apropriadamente um sistema dependerá da pergunta que se deseja responder. Vale ressaltar que, em estudos prévios, após 400 ns de simulação, as diferenças entre diferentes réplicas começam a reduzir rapidamente até cerca de 1200 ns, quando essa redução começa a ser mais lenta (Knapp; Ospina; Deane, 2018).

Dentre as análises comumente aplicadas à DM, o RMSD é a medida do deslocamento médio do átomo em relação a uma estrutura de referência (Bhardwaj *et al.*, 2022). Essa métrica permite monitorar a estabilidade estrutural e as flutuações conformacionais de sistemas biológicos ao longo do tempo, sendo um parâmetro essencial para investigar o comportamento dinâmico de proteínas e complexos (Lee; Qi; Im, 2015). Nas replicatas de simulação conduzidas para o complexo BRON-NRR, o RMSD foi utilizado para analisar as variações conformacionais ao longo de 400 ns, tomando como referência a estrutura inicial obtida por *docking*.

Conforme observado na Figura 26, as avaliações de RMSD indicaram variações inferiores a 5 Å, sugerindo a manutenção do complexo durante as simulações. O anticorpo apresentou variações em torno de 2 Å em todas as replicatas, refletindo um comportamento conformacional consistente ao longo do tempo (Figura

26A). Já o antígeno mostrou maior variabilidade, especialmente nos últimos 50 ns das replicatas 3 e 4 (Figura 26B). Tais variações impactaram tanto o RMSD do complexo quanto o RMSD da interface (Figura 26C,D).

Figura 26. RMSD das simulações estendidas de BRON-NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). RMSD do (A) Fv de BRON, (B) de NRR, (C) do complexo anticorpo-antígeno e (D) da interface. As simulações de 400 ns foram conduzidas em 4 replicatas.

Em particular, a replicata 4 exibiu um aumento progressivo no RMSD de interface ao longo dos primeiros 250 ns de simulação, evoluindo de 2 até 4,5 Å. Após esse período, houve uma redução no desvio, seguida por um novo aumento nos últimos 100 ns. Como resultado, a média de RMSD de interface para essa replicata foi a mais alta entre as simulações, com 3,39 Å, comparada às médias de 2,90 Å, 2,65 Å e 2,74 Å observadas nas replicatas 1, 2 e 3, respectivamente. Embora essas

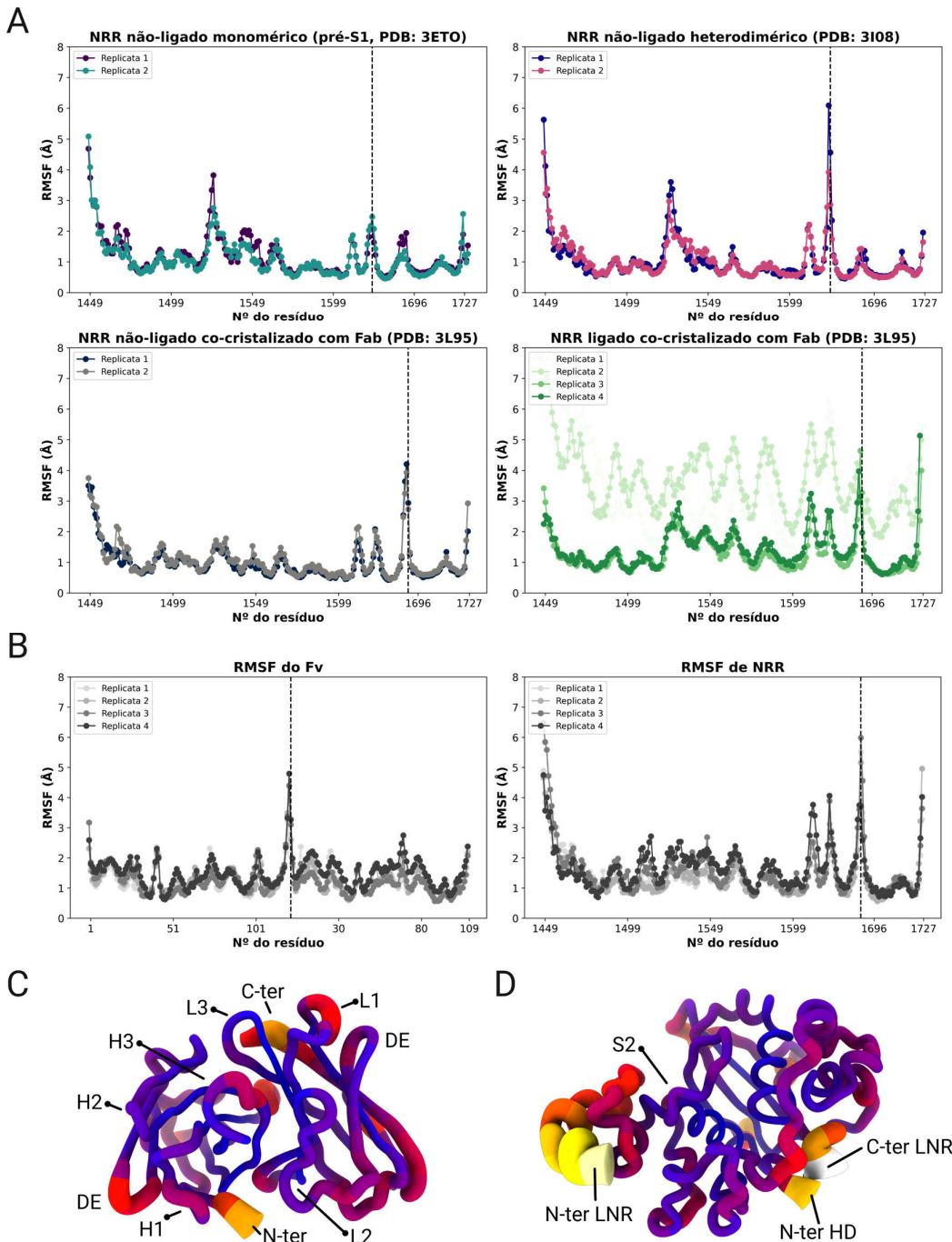
flutuações sejam indicativas de maior mobilidade do antígeno em relação ao anticorpo, a integridade do complexo foi mantida em todas as replicatas. Para compreender melhor o impacto dessas variações conformacionais, análises complementares foram realizadas.

O RMSF captura o deslocamento atômico em relação a uma posição média ao longo de simulações, sendo utilizado para avaliar a flexibilidade local de proteínas e permitindo a identificação de regiões com maior mobilidade ao longo do tempo (Martínez; Kleinjung, 2015; Fuglebakk; Echave; Reuter, 2012; Bhardwaj *et al.*, 2022). Para uma análise comprehensiva das alterações conformacionais no antígeno resultantes das interações com BRON, foram computados os RMSFs do complexo BRON-NRR, das conformações não-ligadas, incluindo formas monoméricas e heterodiméricas (3ETO e 3I08), de uma conformação ligada, porém sem o ligante (3L95), e de NRR na conformação ligada em complexo com o Fab (3L95) (Figura 27A).

Na primeira e segunda replicatas do sistema Fab-NRR, foi observada uma maior variação de RMSF em relação as demais. Esse comportamento também foi identificado por meio de técnicas de redução de dimensionalidade, sugerindo a possibilidade de um caminho conformacional distinto amostrado por essas simulações (Papaleo *et al.*, 2009) (Apêndice E).

Como esperado, as maiores variações de flexibilidade foram observadas nas regiões terminais de LNR e HD do NRR. Essas regiões tendem a possuir maior mobilidade devido a sua localização na superfície da proteína e à ausência de restrições estruturais (Bhardwaj *et al.*, 2022). Por outro lado, o núcleo de NRR, composto por segmentos compactados com estruturas secundárias bem definidas, formado de hélices e fitas, apresentou mobilidade reduzida, conforme previsto (Skopalík; Anzenbacher; Otyepka, 2008). A menor flexibilidade observada no C-terminal de LNR e no N-terminal de HD no sistema monomérico (3ETO) reflete o fato dessas regiões estarem covalentemente conectadas.

Figura 27. RMSF de NRR em diferentes sistemas e em complexo com BRON e RMSF de BRON



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) RMSF dos sistemas envolvendo NRR monomérico (PDB: 3ETO) e heterodimérico (PDB: 3I08) na conformação não-ligada, e NRR na conformação ligada (PDB: 3L95) na ausência e com a presença do Fab, respectivamente. As simulações têm a duração de 100 ns e foram realizadas em duplicatas para os sistemas não-ligados, e em quatro replicatas para o sistema ligado ao Fab. (B) RMSF do Fv e de NRR para as quatro replicadas de DM de 400 ns. Representação em “minhoca” da estrutura de (C) BRON e (D) NRR, na qual a espessura dos segmentos e sua cor são vinculadas a flexibilidade apresentada na DM. Regiões relevantes, como as CDRs e o loop DE do anticorpo e a região S2 de NRR, além do carboxi- e aminoterminais de ambas as proteínas, incluindo dos domínios LNR e HD do antígeno, estão em destaque.

Uma diferença significativa entre os estados ligados e não-ligados foi observada na alça localizada entre os resíduos 1520 e 1530, que faz parte da interface anticorpo-antígeno. Em NRR livre, essa região apresentou RMSF de até 4 Å. Já na conformação ligada (3L95), essa flutuação foi reduzida para 3 Å. De forma interessante, a flexibilidade foi ainda menor na estrutura de 3L95 sem o Fab, sugerindo que o tempo de simulação pode não ter sido suficiente para que a proteína fizesse a transição do estado ligado para o estado não-ligado, possivelmente devido a presença de barreiras energéticas significativas, resultando em uma alça mais rígida mesmo na ausência de interações (Ren *et al.*, 2021). A presença de BRON teve efeito semelhante na interface com NRR, com uma redução no RMSF para aproximadamente 2,8 Å (Figura 27A).

Não obstante, um aumento na flexibilidade foi observado na alça entre os resíduos 1605 e 1619, uma região que não faz parte da interface. Já a alça onde se localiza o sítio S2 manteve-se estável, exibindo baixa flutuação no RMSF mesmo na ausência de ligantes (Figura 27C). Essa característica pode ser associada à presença de resíduos como a prolina, cuja cadeia lateral forma um ciclo pirrolidina que restringe sua liberdade conformacional (Theillet *et al.*, 2013). Além disso, a presença de resíduos polares na interface, como a serina e asparagina encontradas nesses segmentos, confere certa rigidez que minimiza o custo entrópico da interação (Ma *et al.*, 2003).

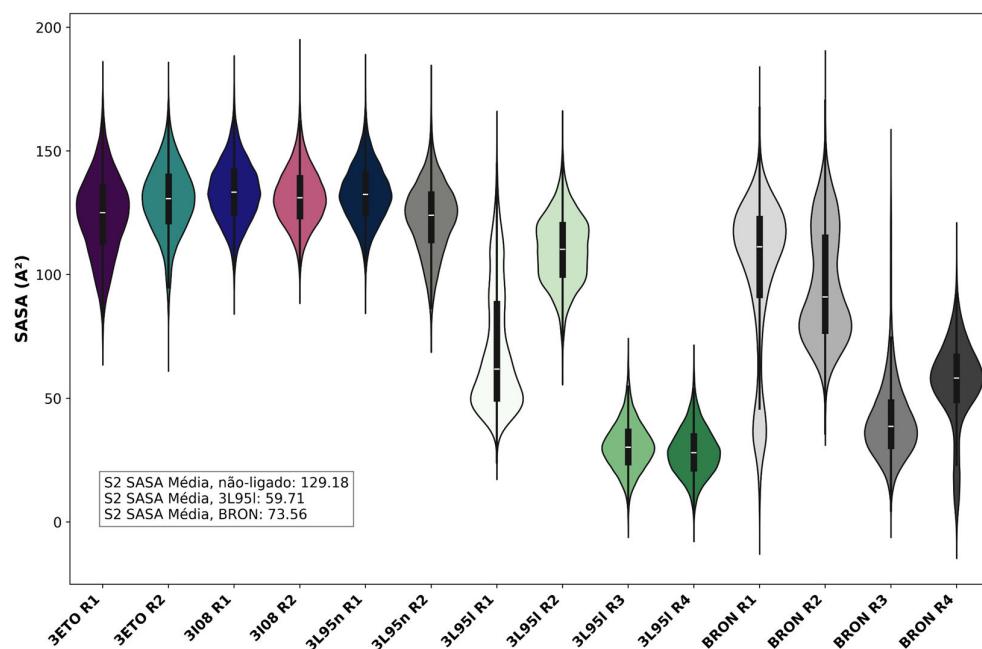
No que se refere ao anticorpo BRON, a análise do RMSF revelou que, de forma geral, as CDRs mantiveram flutuações próximas a 2 Å. O *loop* DE em ambas as cadeias, localizado em torno do resíduo 80, apresentou maior flexibilidade, o que é consistente com a sua participação limitada na interface, especialmente pela cadeia leve (Figura 27B). A CDR-L1 também mostrou uma variação superior, também se correlacionando à pouca contribuição de VL para a interface, permitindo uma maior liberdade conformacional a esse segmento.

Os mesmos sistemas avaliados quanto à flexibilidade também foram investigados em relação à acessibilidade do sítio S2. Segundo os dados estruturais fornecidos por Wu e colaboradores (2010), a obstrução do sítio de clivagem da proteína ADAM é essencial para a inibição da ativação enzimática de Notch1. As simulações dos sistemas não-ligados resultaram em uma acessibilidade média de aproximadamente 129 Å<sup>2</sup> para S2 (Figura 28). A presença do Fab, na simulação do complexo identificado no PDB como 3L95, reduziu essa média para cerca de 60 Å<sup>2</sup>.

Vale ressaltar que o aumento da flexibilidade do NRR, observado nas duas primeiras replicatas de simulação, refletiu-se em um aumento de SASA do S2 nesses sistemas, especialmente na replicata 2.

Não obstante, variações maiores também foram encontradas nas duas primeiras replicatas das simulações com o BRON. A média para o sistema BRON-NRR foi de  $73,6 \text{ \AA}^2$ , resultando em uma redução na acessibilidade de cerca de 43% em relação à proteína não ligada. A variação observada para o sítio S2 nas duas primeiras replicatas não foi constatada quando o cálculo com o algoritmo LCPO foi aplicado ao Fv, ao NRR ou ao complexo, mantendo-se estável durante todas as quatro simulações (Apêndice F). As informações obtidas pela análise de SASA reforçam a hipótese de inibição por uma obstrução estérica sítio-específica (Grigoriu *et al.*, 2013).

Figura 28. Área acessível ao solvente de S2



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Comparação da área de superfície acessível ao solvente do sítio S2, constituído pelos resíduos 1710 e 1711, calculada através do algoritmo LCPO. Os sistemas analisados incluem NRR não-ligado monomérico (3ETO), NRR não-ligado heterodimérico (3I08), NRR não-ligado na conformação ligada (3L95n), NRR ligado a um Fab (3L95) e NRR ligado a BRON. Os sistemas não-ligados foram simulados em duas replicatas, e os ligados em quatro.

A redução mais acentuada na área de superfície acessível de S2 nas replicatas 3 e 4 está correlacionada ao estabelecimento de ligações de hidrogênio estáveis com o resíduo Leu1710. O resíduo Tyr60 (Tyr59 quando numerado por Martin), previamente identificado na análise da interface proteína-proteína do

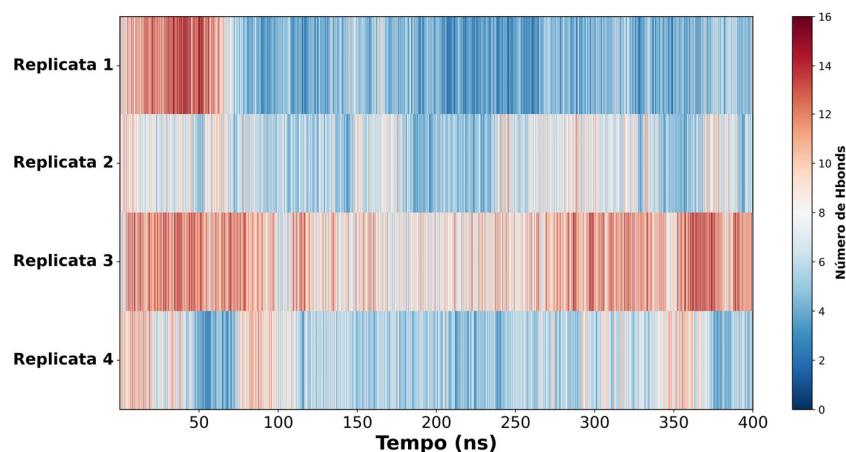
PDBSum e do RING, é responsável por essa interação, que esteve presente em 30% do tempo de simulação na replicata 3 e mais de 76% na replicata 4 (Figura 29A).

Figura 29. Ligações de hidrogênio entre BRON e NRR

A

Replicata	Aceptor	Doador	Região	Ocupação (%)
1	GLY_54@O	ARG_1599@NH1	CDR-H2	33,4
1	CYS_1529@O	ARG_30@NH1	CDR-H1	84,1
2	SER_95@O	ASP_1503@OD2	CDR-L3	90,1
2	SER_95@OG	ASN_1507@ND2	CDR-L3	52,2
2	ASP_1521@O	TYR_103@OH	CDR-H3	33,1
3	GLN_50@OE1	ASP_1503@OD2	CDR-H2	99,1
3	GLY_54@O	ARG_1599@NH1	CDR-H2	65,1
3	ALA_72@O	ASN_1714@ND2	FWR-H3	33,2
3	THR_58@OG1	SER_1712@OG	CDR-H2	32,4
3	ASP_1503@OD2	ASN_59@ND2	CDR-H2	35,1
3	LEU_1710@O	TYR_60@OH	CDR-H2	30,1
4	LEU_1710@O	TYR_60@OH	CDR-H2	76,3
4	ALA_1525@O	ARG_57@NH2	CDR-H2	47,6

B



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Descrição das ligH que tiveram pelo menos 30% de ocupação em relação ao tempo total simulado. Os átomos doadores e aceptores e a região correspondente do aminoácido do anticorpo segundo a numeração de Martin foram destacados. (B) Mapa de calor do número de ligações de hidrogênio entre BRON e NRR ao longo dos 400 ns das 4 replicatas de DM, sendo valores próximos a zero representados por azul, e os próximos de 16 coloridos com vermelho.

Apesar da menor ocupação da ligação de hidrogênio na replicata 3, essa diminuição é compensada por outras interações envolvendo resíduos localizados na alça do sítio S2, como Ser1712 e Asn1714. A ligação mais estável foi observada entre

Gln50, na CDR-H2 de BRON, e Asp1503 de NRR, que, por estar adjacente ao Phe1501, pode atuar na formação de um grampo molecular semelhante ao encontrado no PDB 3L95.

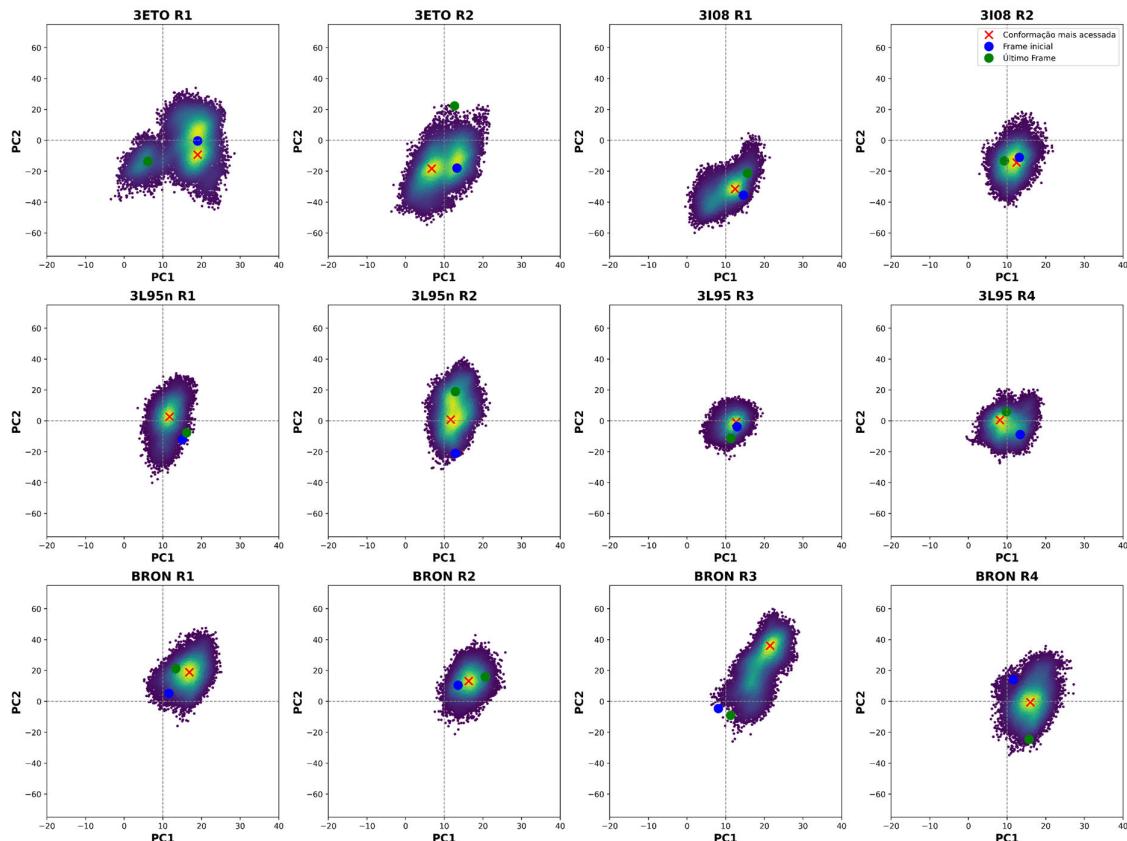
A replicata 3 não apenas apresentou o maior número de ligações de hidrogênio, como tais interações se mantiveram ao longo de toda a simulação (Figura 29B). Já a replicata 1 teve cerca de 16 ligações de hidrogênio na interface, que, após os primeiros 100 ns de simulação, foram, em grande parte, rompidas. A replicata 2 apresentou uma variação de 6 a 10 ligações de hidrogênio, enquanto a replicata 4 mostrou um aumento no número dessas interações próximo aos 350 ns. Tais variações ao longo do tempo, assim como as distinções entre replicatas, ressaltam a importância de um tempo de simulação suficiente para amostrar o estabelecimento e a ruptura dessas interações, bem como a necessidade de replicatas que capturem eventos distintos (Krishnan; Walton; Van Vliet, 2009).

Entretanto, extrair informações significativas mesmo das menores simulações de dinâmica molecular é uma tarefa desafiadora, considerando a enorme quantidade de dados gerados por essa técnica. A crescente complexidade dos sistemas e simulações mais extensas tornam essa tarefa ainda mais difícil (Stein *et al.*, 2006). Uma trajetória de DM é, por definição, um conjunto de dados multivariados, onde um número elevado de variáveis — correspondendo às posições atômicas em cada quadro — são tipicamente inter-relacionadas, correlacionadas ou dependentes entre si. Para simplificar a visualização dos dados e explicar os principais modos de movimento, técnicas de redução de dimensionalidade, como a Análise de Componentes Principais, são aplicadas (Papaleo *et al.*, 2009; Baltrukevich; Podlewska, 2022).

O objetivo desses métodos é reduzir o grande número original de variáveis dependentes (coordenadas atômicas) para um conjunto menor de variáveis independentes, capaz de explicar os fenômenos de interesse. Quando aplicadas às simulações, três ou menos componentes principais, compostos por combinações lineares das coordenadas cartesianas originais, são tipicamente identificados para esclarecer movimentos biomoleculares importantes (Stein *et al.*, 2006). A técnica de PCA foi aplicada para comparar o espaço conformacional amostrado pelo NRR (Figura 30), com os dois primeiros componentes capturando aproximadamente 60% da variância total, o que os qualifica como representativos para a avaliação desse sistema (Apêndice G).

O NRR monomérico, em uma conformação equivalente à do receptor Notch antes de sofrer a clivagem S1, apresentou uma cobertura mais ampla do espaço bidimensional, explorando conformações na PC1 entre (-5, 28) e na PC2 entre (-50, 35). A ocorrência da clivagem S1, que resulta na heterodimerização do receptor, restringiu as conformações exploradas em PC1 (0, 23) e causou uma transição nos valores de PC2 (-57, 17). Na simulação de NRR na conformação ligada, mas sem a presença do anticorpo, o espaço de PC1 foi ainda mais restrito (4, 20), com PC2 variando entre (-22, 40).

Figura 30. PCA de NRR em sistemas monomérico, heterodimérico, ligado e não-ligado



Fonte: elaborado pelo autor (2024). A análise de componente principal foi executada com o programa pyPcazip. As trajetórias de 400 ns foram processadas com o *cpptraj* para usarem o mesmo número de frames das trajetórias de 100 ns, uniformizando a análise. Os sistemas analisados incluem NRR não-ligado monomérico (3ETO), NRR não-ligado heterodimérico (3I08), NRR não-ligado na conformação ligada (3L95n), NRR ligado a um Fab (3L95) e NRR ligado a BRON. Os sistemas não-ligados foram simulados em duas replicatas, e os ligados em quatro. Na escala de cor, pontos mais acessados estão em amarelo, e os menos acessados estão em azul escuro. Os círculos verde e azul marcam os frames inicial e final de cada replicata, e o X vermelho indica a conformação mais acessada pela simulação.

Nas duas primeiras replicatas de simulação de NRR ligado ao Fab, nas quais foram identificados valores elevados de RMSF e SASA, indicando uma

interação desfavorável, observou-se uma amostragem em PC1 em valores não explorados pelas demais simulações (-92, -69), com PC2 entre (-22, 40) (Apêndice E). Nas outras duas replicatas, os valores explorados em PC1 foram semelhantes aos da conformação ligada do 3L95 simulada sem o Fab (4, 20), mas uma significativa restrição foi observada em PC2 (-20, 20). Tendo em vista os valores de área acessível identificados, evidencia-se que a área explorada por PC1 nessas simulações é mais favorável para inibição de Notch.

De acordo, os complexos associados ao BRON amostraram PC1 em um intervalo semelhante (7, 25), variando PC2 entre (-10, 40). Em particular, a replicata 3, que apresentou o maior número de ligações de hidrogênio e uma acessibilidade reduzida de S2, explorou uma faixa mais ampla de PC2 (-10, 60), não observada em outros sistemas.

Dois modelos diferentes foram sugeridos para explicar as diferenças conformacionais observadas experimentalmente entre proteínas ligadas e não ligadas (Peters; de Groot; Levit, 2012). O modelo de ajuste induzido postula que, quando duas moléculas começam a interagir, a estrutura da proteína não está completamente preparada para a ligação desde o início. Em vez disso, a aproximação do ligante provoca mudanças na forma da proteína, adaptando-se gradualmente para acomodar o ligante de maneira mais eficiente (Koshland, 1958).

Já o modelo de seleção conformacional leva em consideração a flexibilidade inerente das proteínas, propondo que proteínas não ligadas podem, com uma certa probabilidade, explorar as mesmas conformações observadas quando ligadas (Monod; Wyman; Changeux, 1965). Neste modelo, mudanças na superfície de energia livre da proteína, devido às interações no complexo, deslocam a densidade conformacional em direção à estrutura complexa após a ligação.

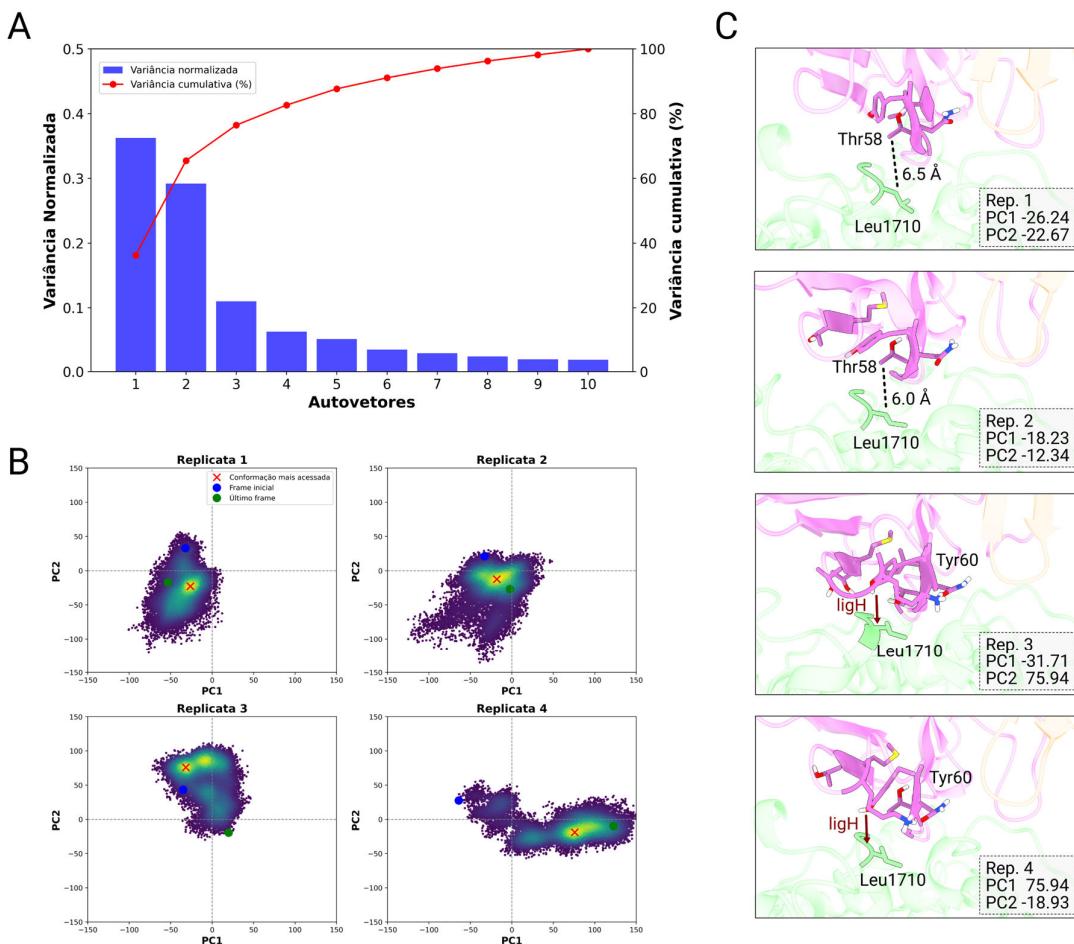
Estudos mais recentes indicam que elementos de ambos os modelos desempenham um papel na ligação de proteínas, com uma etapa inicial de seleção conformacional seguida por rearranjos de ajuste induzido (Boeh; Nussinov; Wright, 2009). As restrições observadas em PC1 e a possível exploração de novas conformações em PC2 são indicativas dessa possibilidade de modulação de NRR pelo Brontictuzumabe.

Também foram avaliadas as conformações exploradas especificamente pelos resíduos que constituem S2 e os aminoácidos em seu flanco (Apêndice H). Entretanto, uma vez que esse sítio é constituído por apenas 2 resíduos, não foram

constatadas alterações significativas entre os sistemas não-ligados e ligados.

Finalmente, a PCA também foi utilizada para identificar as conformações mais relevantes exploradas por cada replicata de simulação, visando a sua utilização em etapas posteriores de otimização. Avaliando-se a cadeia principal de todo o complexo, não se restringindo à NRR, a variância cumulativa revelou que os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) são responsáveis por cerca de 80% da variância do sistema (Figura 31A), tornando-os ideais para análises mais detalhadas.

Figura 31. Análise do componente principal do complexo anticorpo-antígeno



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Variância cumulativa (linha vermelha) e normalizada (barra azul) ao longo de 10 autovetores após análise simultânea das trajetórias das 4 replicatas de DM por PCA com *cpptraj*. (B) Projeção bidimensional do espaço conformacional amostrado pelo complexo sobre PC1 e PC2. Na escala de cor, pontos mais acessados estão em amarelo, e os menos acessados estão em azul escuro. Os círculos verde e azul marcam os frames inicial e final de cada replicata, e o X vermelho indica a conformação mais acessada pela simulação. (C) Sítio S2 de NRR nas conformações de cada replicata.

Entre as replicatas 1 a 4, os pontos de maior densidade no espaço conformacional foram identificados com os valores de PC1 e PC2 em torno de (-26,24; -22,67), (-18,23; -12,34), (-31,71; 75,94) e (75,7; -18,93), respectivamente (Figura 31B). Essas diferenças indicam uma maior distinção nas conformações exploradas pelas replicatas 3 e 4, que também coincidem com os menores valores de acessibilidade do sítio S2 e com a formação de ligações de hidrogênio estáveis entre Tyr60 e Leu1710 (Figura 31C). Ainda assim, após alinhamentos sobre NRR e comparações com a estrutura do complexo gerada por *docking* molecular, a variação do Fv nas poses de simulação não ultrapassa 2,8 Å.

Essas observações corroboram a ideia de que as replicatas 3 e 4 amostraram conformações mais compactas e estáveis, associadas ao bloqueio estérico de S2, o que poderia ser um fator chave no processo de inibição mediado por Brontictuzumabe. A correlação entre as mudanças no espaço conformacional e as interações moleculares reforça a importância de avaliar diferentes replicatas, dado que elas podem capturar diferentes aspectos do comportamento dinâmico do sistema.

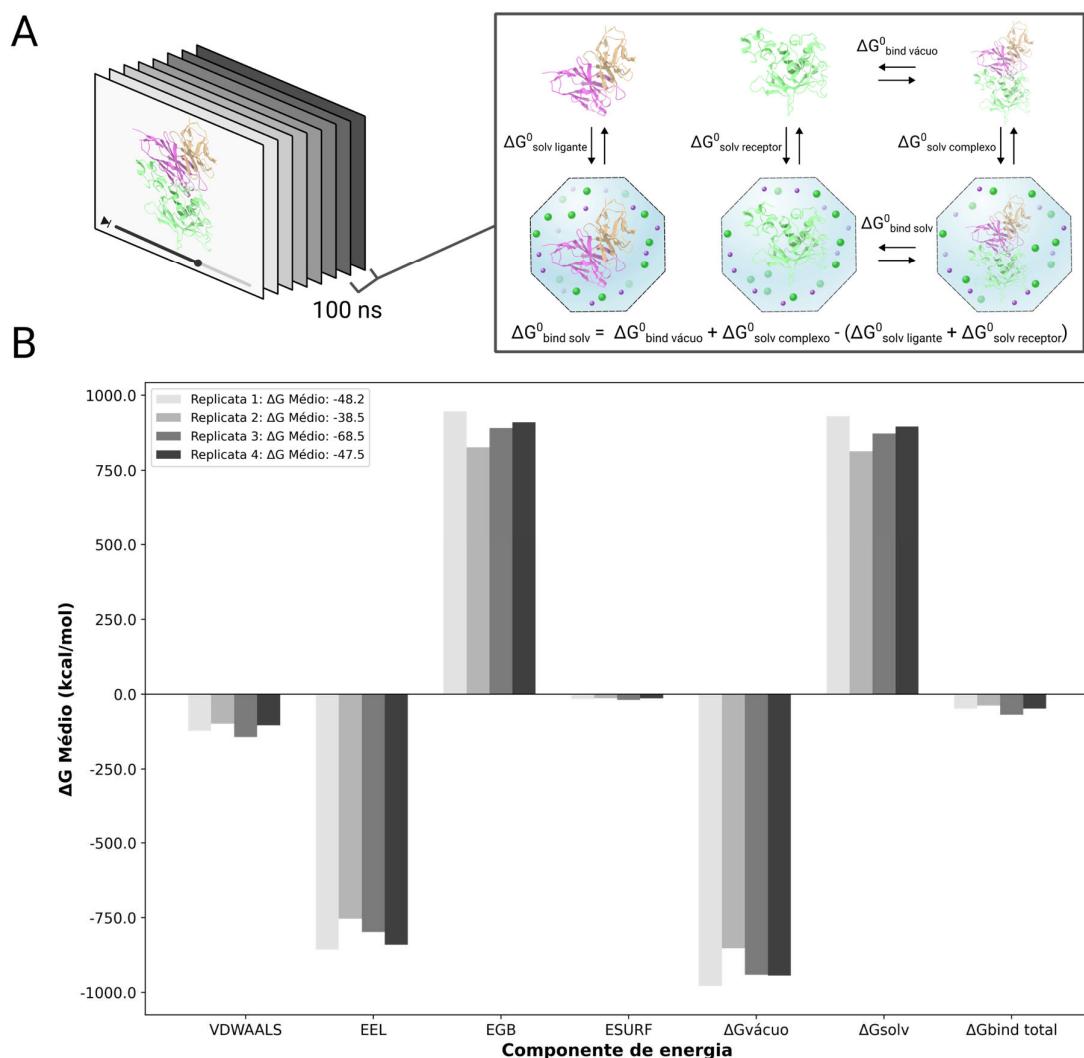
#### **4.4 Estimativa da energia de interação e exploração do perfil de energia livre do complexo anticorpo-antígeno**

No desenho de medicamentos, a energia livre de ligação é uma métrica essencial para caracterizar a força de interação entre um receptor e um fármaco (Wang *et al.*, 2019). Nesse contexto, os métodos MM/PBSA e MM/GBSA oferecem um equilíbrio eficaz entre precisão e eficiência computacional, permitindo, ainda, a análise detalhada das contribuições energéticas de resíduos individuais por meio da decomposição de energia livre (Zoete; Irving; Michielin, 2010; Zoete; Michielin, 2007). Essa abordagem detalhada facilita a identificação das interações dominantes no processo de ligação, sendo amplamente aplicada também a complexos proteína-proteína (Ongaro *et al.*, 2021; Wang; Kollman, 2000).

O método MM-GBSA calcula a diferença de energia livre entre o estado ligado e o estado não-ligado de moléculas em solução (Forouzesh; Mishra, 2021). Idealmente, isso se daria pela comparação direta das energias desses estados, mas as flutuações de energia, geradas principalmente devido a interações solvente-solvente, tornam essa abordagem ineficiente. Para superar esse desafio, é empregado um ciclo termodinâmico que resulta em uma simplificação do cálculo

(Forouzesh; Mishra, 2021). No caso do sistema BRON-NRR, foram utilizados 400 frames uniformemente espaçados dos últimos 100 ns de simulação, garantindo o equilíbrio adequado do sistema (Figura 32A).

Figura 32. Cálculo de energia livre de interação por MM/GBSA



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Ilustração esquemática do cálculo de energia de interação por MM/GBSA. 400 frames foram extraídos dos últimos 100 ns das simulações de 400 ns. A fim de tornar essa metodologia mais efetiva computacionalmente, as etapas de cálculos são divididas de acordo com o ciclo termodinâmico. (B) Decomposição dos componentes de que são levados em consideração no cálculo da energia de interação ( $\Delta G_{bind}$ ), incluindo os termos de van der Waals (VDWALLS), energia eletrostática (EEL), contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação calculada por GB (EGB) e a contribuição apolar para a energia livre de solvatação (ESURF).

Os resultados indicaram que a replicata 3 apresentou o valor de  $\Delta G_{bind}$  mais favorável (-68,5 kcal/mol), enquanto as replicatas 1 e 4 tiveram valores similares (-

48,2 e -47,5 kcal/mol, respectivamente). A replicata 2 mostrou a interação mais fraca, com  $\Delta G_{bind}$  de -38,5 kcal/mol (Figura 32B). O componente eletrostático (EEL) foi o principal contribuinte para a formação do complexo proteína-proteína, seguido energias de van der Waals (VDWAALS) e a energia livre associada ao enterramento da superfície acessível ao solvente (ESURF), tais contribuições estando de acordo com achados prévios da literatura (Xu *et al.*, 2017).

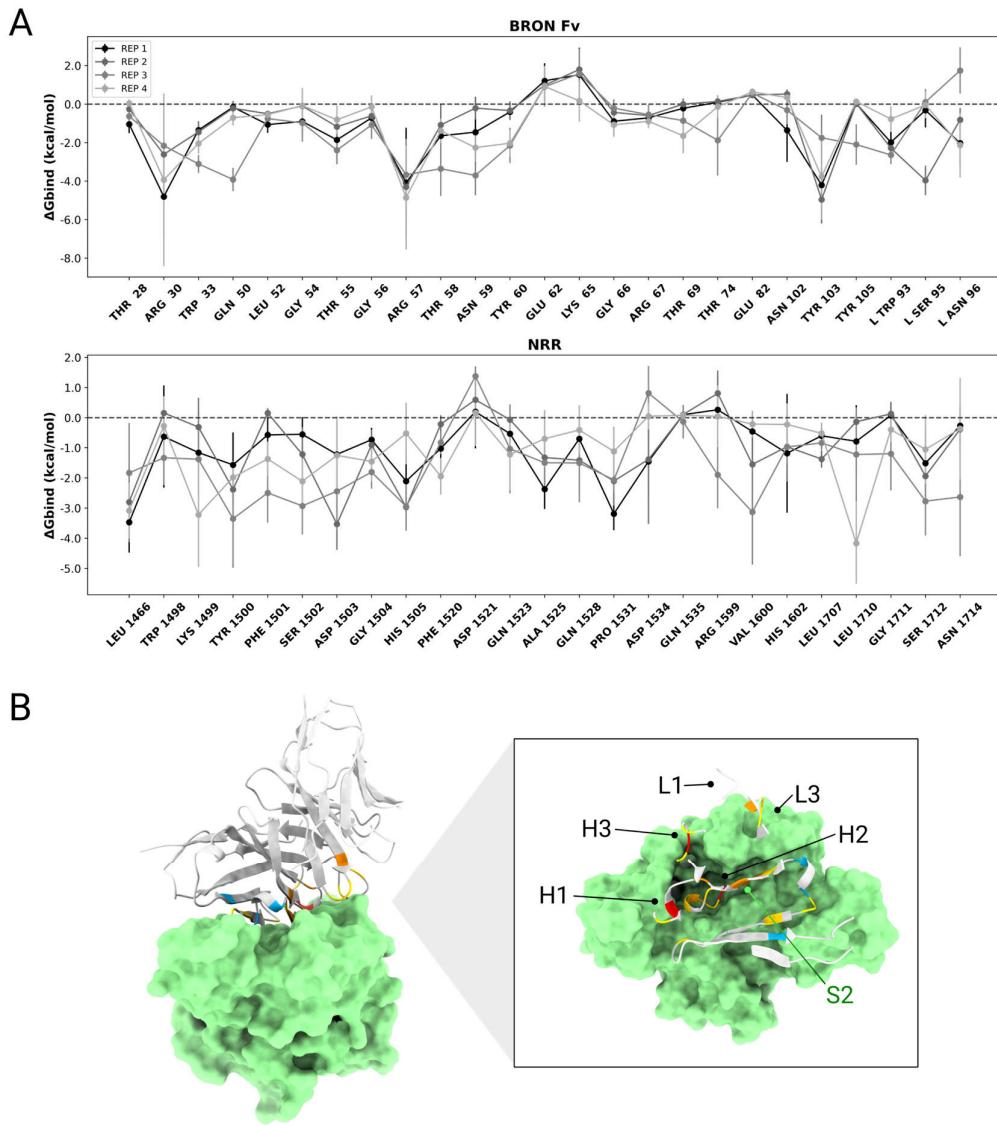
Além disso, foi realizada a análise das contribuições energéticas individuais dos resíduos. Em NRR, os aminoácidos de interface, que apresentaram contribuição média de pelo menos 2 kcal/mol em alguma das replicatas, foram: Leu1466, Lys1499, Tyr1500, Phe1501, Ser1502, Asp1503, His1505, Ala1525, Gln1528, Val1600, Leu1710, Ser1712 e Asn1714 (Figura 33A). Desses, os resíduos 1466, 1469, 1499, 1500, 1501, 1503, 1710 e 1712 já haviam sido destacados por Wu e colaboradores (2010) na interação Fab-NRR. A Leu1710 foi o *hot-spot* mais importante na replicata 4, tal contribuição estando correlacionada a ligação de hidrogênio estável formada com a Tyr60, encontrada em quase 80% da simulação.

Já no anticorpo, os principais resíduos, seguindo a numeração sequencial, foram: Arg30, Trp33, Gln50, Thr55, Arg57, Thr58, Asn59, Tyr60, Tyr103 da cadeia pesada, além de Trp93, Ser95 e Asn96 da cadeia leve (Figura 33A). Esses resultados corroboram as análises de interface anteriores, que destacaram a importância da CDR-H2 na interação. Ao mapear esses *hot-spots* sobre a superfície da NRR, nota-se que a CDR-H2 se insere na cavidade entre as regiões LNR e HD, bloqueando o acesso ao sítio de clivagem proteolítica S2 e reforçando esta obstrução como possível mecanismo de inibição de Notch1 (Figura 33B).

A metodologia de *Umbrella Sampling* pode ser utilizada de forma complementar ao MM/GBSA para o estudo de interações moleculares, fornecendo uma perspectiva mais detalhada sobre o perfil de energia livre ao longo de trajetórias específicas de dissociação ou associação (Santini *et al.*, 2024). Enquanto o MM/GBSA fornece uma estimativa global da energia livre de ligação em estados de equilíbrio, o *Umbrella Sampling* permite explorar o caminho de dissociação do complexo, capturando as mudanças na energia livre ao longo de coordenadas de reação, como a distância entre os centros de massa das moléculas envolvidas (Joshi; Lin, 2019; Sun *et al.*, 2015). Esse método é particularmente eficaz para investigar barreiras energéticas associadas ao processo de ligação ou desvinculação, que podem ser mascaradas em uma análise baseada exclusivamente em estados ligados e não-

ligados (Kästner, 2011).

Figura 33. *Hot-spots* da interação BRON-NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Decomposição da contribuição de energia livre por resíduos de BRON e NRR, calculado por MM/GBSA. (B) Complexo anticorpo-antígeno, com NRR representado pela sua superfície e BRON em sua estrutura secundária. Em destaque, estão os resíduos que compõe a interface, utilizando um valor de corte de 8 Å. A contribuição energética dos aminoácidos é representada por uma escala de calor, estando coloridos em azul aqueles resíduos com  $\Delta G$  positivo e em vermelho aqueles com  $\Delta G$  mais negativo.

A validação da metodologia de *Umbrella Sampling* foi realizada utilizando o sistema barnase-barstar, escolhido devido à sua interação forte e específica, com uma interface de ligação bem caracterizada (Wang *et al.*, 2004; Buckle; Schreiber; Fersht, 1994; Hartley, 1989). A interação entre barnase, uma ribonuclease que degrada

fragmentos de RNA extracelular, e barstar, seu inibidor intracelular, é associada a uma baixa constante de dissociação ( $k_D = 10^{-14}$  M) e uma entalpia de associação de -18,9 kcal/mol (Schreiber; Fersht, 1993).

A interface de ligação entre essas duas proteínas é altamente polar, aonde as cargas positivas em barnase, contendo resíduos de lisina e arginina, são complementares às cargas negativas em barstar, que se assemelha ao RNA, o substrato natural da enzima (Lee; Tidor, 2001; Schreiber; Fersht, 1996). A disponibilidade de dados experimentais detalhados sobre essa interação torna o sistema barnase-barstar ideal para o *benchmarking* e validação de métodos computacionais, permitindo avaliar a precisão das estimativas de energia livre geradas pelo *Umbrella Sampling* (Saglam; Chong, 2019; Gumbart; Roux; Chipot, 2013; Spaar; Helms, 2005).

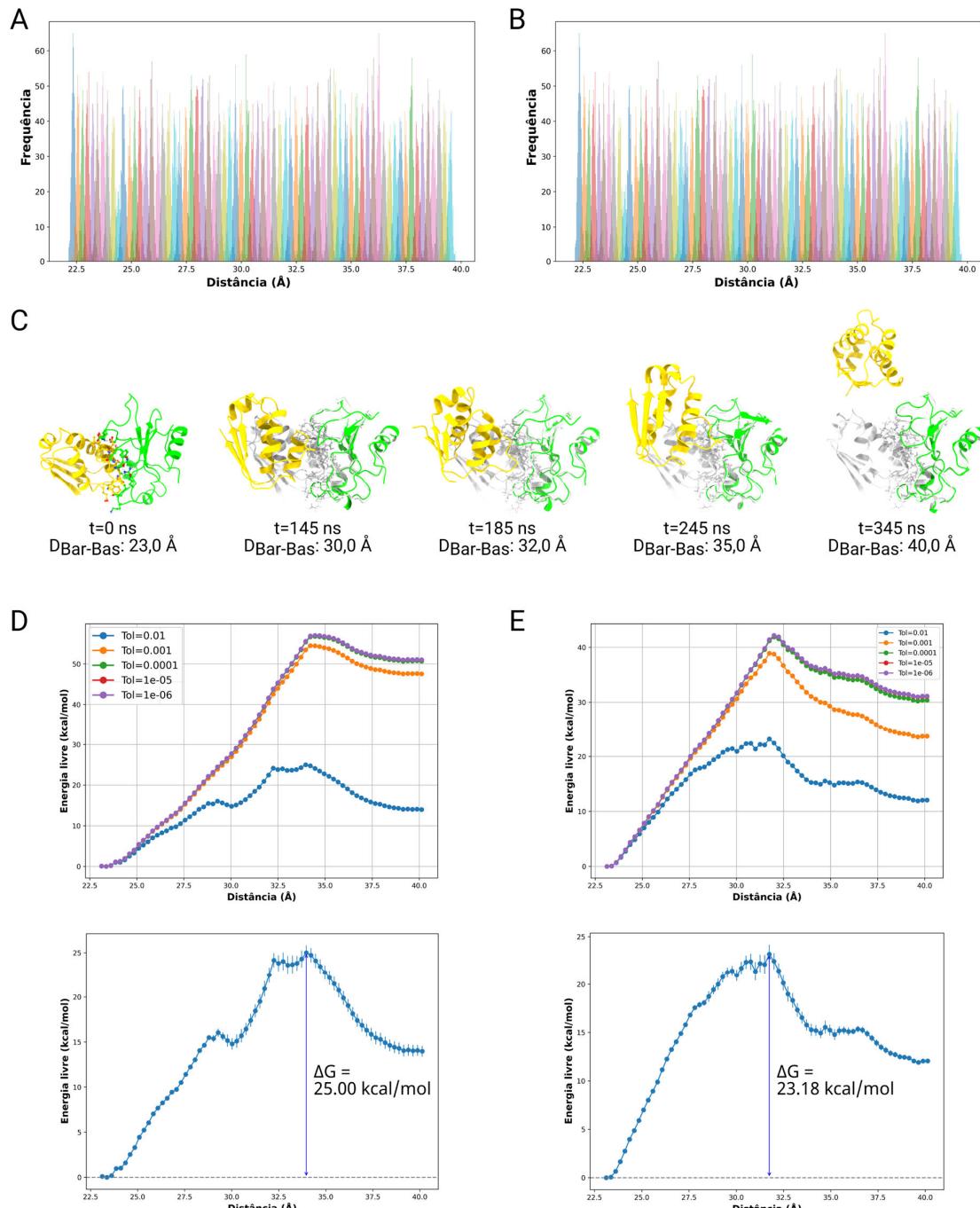
Um dos parâmetros críticos avaliados foi o tamanho das janelas de simulação. Observou-se que um espaçamento de 0,50 Å entre as janelas não resultou em sobreposições adequadas nas distribuições de frequência de distância, mesmo ao variar a força de restrição aplicada (Apêndice I). No entanto, ao reduzir o espaçamento para 0,25 Å, obteve-se uma sobreposição satisfatória entre as janelas para forças de 40 e 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup> (Figura 34A), em concordância com o requisito de que janelas consecutivas se sobreponham para uma reconstrução precisa do perfil de energia livre (Marti *et al.*, 2008).

Outro fator importante foi a escolha adequada da constante de força para garantir uma amostragem eficiente da superfície de energia potencial (Marti *et al.*, 2008). Avaliou-se o uso de constantes de 40 e 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup>, juntamente com diferentes valores de tolerância de convergência, variando de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  k<sub>B</sub>T para reconstrução do perfil de energia livre utilizando o método WHAM (Figura 34C,D). O  $\Delta G$  foi calculado pela diferença entre o maior e o menor valor da curva de PMF, conforme descrito por Ngo e colaboradores (2019) e Lan e colaboradores (2019).

Durante as simulações, foi possível observar a dissociação progressiva do complexo barnase-barstar. A uma distância de 30 Å entre os centros de massa ( $D_{bar-bas}$ ), a função de detecção de interface do ChimeraX, feita pelo cálculo da área de superfície enterrada, não foi mais capaz de identificar interações entre as moléculas, coincidindo com a superação de uma primeira barreira energética (Pettersen *et al.*, 2020). Essa barreira foi mais proeminente quando aplicada uma força de 40 kcal/mol·Å<sup>2</sup>, com um pico adicional observado em 34 Å para esse potencial, e em 32

Å para a força de 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup> (Figura 34B).

Figura 34. Validação da DM-US com o sistema barnase-barstar



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Histograma de distribuição das distâncias entre os centros de massa das proteínas nas simulações que aplicaram constantes de força de (A) 40 kcal/mol·Å<sup>2</sup> e (B) 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup>. (C) Evolução temporal do sistema ao longo da simulação com restrição de 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup> aplicado. A estrutura secundária do complexo formado por barnase (verde) e barstar (amarelo) está sendo exibida, bem como os átomos resíduo de interface. A estrutura inicial, que serve de referência para comparação em relação as distâncias encontradas durante o caminho de dissociação, está colorida em branco. Comparação do perfil de energia livre utilizando diferentes valores de tolerância e  $\Delta G$  das simulações que usaram força de (D) 40 e (E) 50 kcal/mol·Å<sup>2</sup>.

Ao final da simulação ( $D_{\text{bar-bas}} = 40 \text{ \AA}$ ), o complexo estava completamente dissociado (Figura 34C). O valor de  $\Delta G$  mais próximo ao experimental, de 23,18 kcal/mol, foi obtido com a força de 50 kcal/mol· $\text{\AA}^2$  e uma tolerância de convergência de 0,01, superestimando o  $\Delta G$  experimental em apenas 4,28 kcal/mol, o que está em concordância com outros estudos utilizando *Umbrella Sampling* para estimativas de energia livre (Ghosh, Cho, 2022). Em contraste, o trabalho de Wang et al. (2010) reportou uma subestimação de quase 6 kcal/mol para o mesmo sistema, sugerindo que os parâmetros aqui utilizados são adequados para a estimativa de energia livre.

Com base nas configurações utilizadas durante a validação, foram realizadas simulações de DM-US a partir das quatro conformações predominantes do complexo BRON-NRR, identificadas pela PCA das DM de 400 ns. A distância inicial de 32  $\text{\AA}$  entre os centros de massa de BRON e NRR foi escolhida com base nas distâncias amostradas ao longo das simulações prévias, garantindo uma cobertura equilibrada da primeira janela de *Umbrella Sampling* (Apêndice J). Foram percorridas 100 janelas com incrementos de 0,25  $\text{\AA}$ , totalizando um deslocamento de 25  $\text{\AA}$  ao longo da variável coletiva. A análise da sobreposição entre as janelas demonstrou que a amostragem foi adequada, sem lacunas capazes de comprometer a qualidade da reconstrução do perfil de energia livre (Figura 35B-E).

Para a obtenção do PMF, diferentes valores de tolerância foram testados, dado o impacto crítico que esse parâmetro pode ter nos resultados. Embora 0,01  $k_B T$  tenha sido o valor que mais se aproximou do  $\Delta G$  experimental na validação utilizando o sistema barnase-barstar, trabalhos anteriores indicam que uma tolerância mais rigorosa, de 0,001  $k_B T$ , é frequentemente utilizada para atingir um equilíbrio entre a eficiência computacional e a precisão dos cálculos (Finol-Urdaneta et al., 2014; Wang; Chamberlin; Noskov, 2014). Esse valor tem sido um padrão amplamente adotado, capaz de reduzir o ruído nos dados e aumentar a confiabilidade da estimativa de energia livre. Também há casos de sistemas mais complexos, onde são adotadas tolerâncias ainda mais rígidas a fim de minimizar as incertezas estatísticas (Chamberlin et al., 2015; Yang et al., 2015).

A escolha da tolerância, portanto, deve ser feita considerando as características específicas do sistema em estudo. No caso do BRON-NRR, foram avaliadas as correlações entre os diferentes métodos de cálculo de energia livre. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a consistência entre o

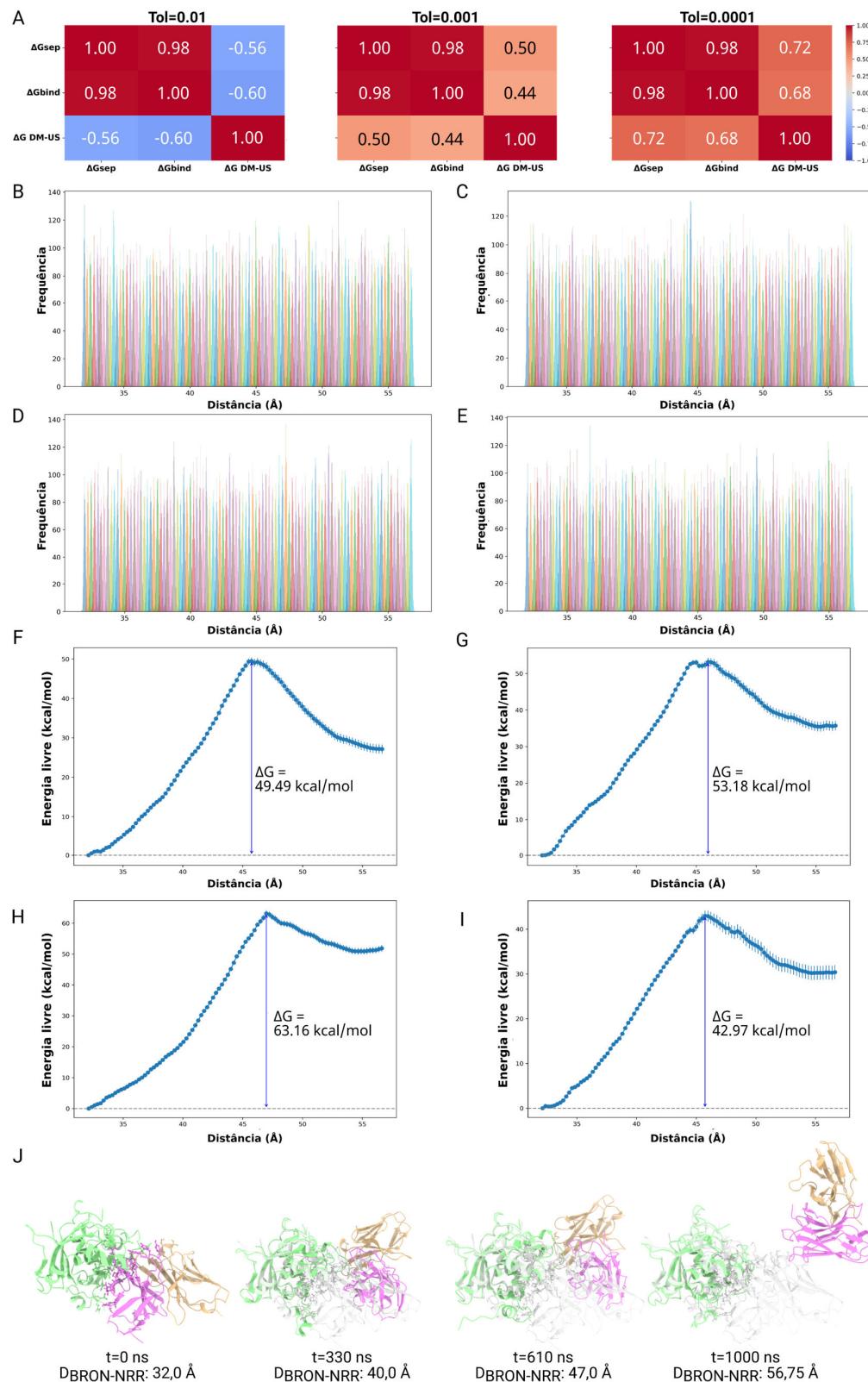
$\Delta G$  obtido pela DM-US, o  $\Delta G_{bind}$  calculado através do MM/GBSA, e o  $\Delta G_{sep}$  estimado pelo módulo InterfaceAnalyser do Rosetta (Figura 35A). Este representa a mudança de energia ao separar as cadeias formadoras de interface, comparando-se o estado complexo com o estado dissociado, fornecendo uma estimativa da energia de ligação (Stranges; Kuhlman, 2012).

Quando a tolerância de  $0,01 k_B T$  foi empregada, observou-se uma correlação moderadamente negativa entre os resultados, sugerindo que o ruído introduzido por uma maior permissividade nos critérios de convergência pode comprometer a qualidade da estimativa. Já com uma tolerância de  $0,001 k_B T$ , o coeficiente de correlação foi de aproximadamente 0,5, indicando uma relação moderadamente direta entre os métodos.

Por fim, com uma tolerância de  $0,0001 k_B T$ , a correlação aumentou para 0,7, apontando uma relação mais forte e consistente, o que reforça a ideia de que tolerâncias mais rigorosas melhoram a qualidade dos resultados, ao custo de maior demanda computacional. No entanto, devido à alta sensibilidade da reconstrução do PMF a essas variações, recomenda-se a avaliação das trajetórias com metodologias alternativas de análise, como MBAR ou TRAM, a fim de garantir a robustez dos perfis de energia livre gerados (Shirts; Chodera, 2008; Wu *et al.*, 2016; Galama *et al.*, 2023).

Os valores de  $\Delta G$  obtidos nas quatro réplicas variaram entre 42,97 e 63,16 kcal/mol (Figura 35F-I). Variações entre 2 e 20 kcal/mol entre diferentes execuções de DM-US em um mesmo sistema são esperadas e devem ser atribuídas à pequenas variações nos caminhos de ligação percorridos, podendo minimizadas pelo uso de métodos adaptativos (Aho; Groenhof; Buslaev, 2024).

As curvas de energia livre apresentaram um perfil semelhante, com uma barreira energética principal sendo superada quando a distância entre os centros de massa atingiu cerca de 46 Å. Na réplica 3, o complexo BRON-NRR não se dissociou completamente, mantendo-se próximo a um platô energético após a transposição de tal barreira, sugerindo a necessidade de mais janelas para atingir uma dissociação completa (Figura 35H). Esse resultado está de acordo com as análises anteriores de energia de interação, que indicaram a alta estabilidade dessa conformação, com valores de  $\Delta G_{bind}$  mais negativos.

Figura 35. *Umbrella sampling* do complexo BRON-NRR

Fonte: elaborada pelo autor (2024). (A) Correlação de Pearson entre os valores de  $\Delta G_{sep}$ , derivado do Rosetta InterfaceAnalyzer, e  $\Delta G_{bind}$ , obtido pelo cálculo por MM/GBSA, e os valores de  $\Delta G$  derivados das curvas de energia livre de DM-US com tolerância de convergência 0,01; 0,001; e 0,0001  $k_B T$ . Tons

de azul e vermelho indicam correlações negativa e positiva, respectivamente. Os valores do coeficiente de Pearson estão anotados no gráfico. Histogramas de distribuição de frequência referentes as amostragens das janelas durante as DM-US que utilizaram as conformações predominantes extraídas das replicatas (B) 1, (C) 2, (D) 3 e (E) 4. Perfil de energia livre das replicatas (F) 1, (G) 2, (H) 3 e (I) 4, com valor de tolerância do WHAM de 0,0001. (J) Evolução temporal do complexo formado por NRR (verde claro) e BRON (violeta e bege) na replicata 1 de DM-US.

Nas demais replicatas, o complexo sofreu um deslocamento progressivo na interface até superar a principal barreira energética por volta dos 610 ns, com a dissociação completa sendo visualizada após 1  $\mu$ s de simulação (Figura 35J). Esses resultados fornecem novos *insights* sobre a interação entre o anticorpo Brontictuzumabe e NRR, detalhando o mecanismo de dissociação desse complexo anticorpo-antígeno. A correlação positiva observada entre o  $\Delta G_{sep}$  calculado pelo Rosetta, o  $\Delta G_{bind}$  do MM/GBSA e o  $\Delta G$  obtido pelas simulações de DM-US reforça a confiabilidade dos parâmetros empregados. O  $\Delta G_{sep}$ , em particular, foi escolhido para seleção das biomoléculas otimizadas por enxerto de CDRs.

#### 4.5 Desenho de *biobetters*

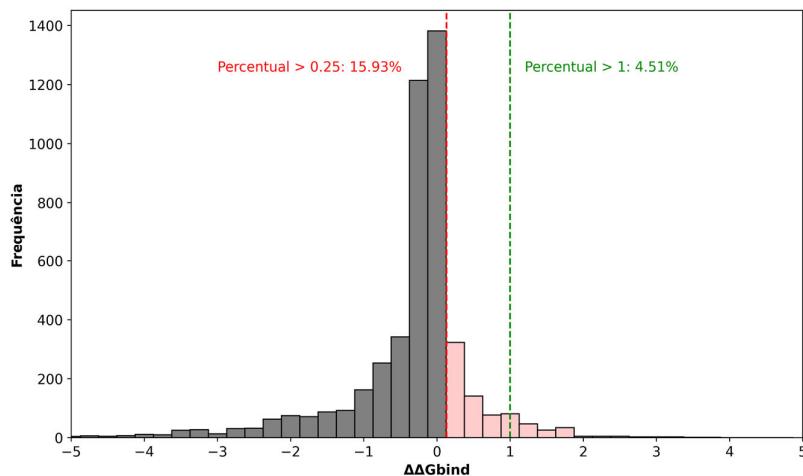
Uma das metodologias mais eficazes para compreender o papel funcional dos aminoácidos que compõe as proteínas, como anticorpos, é a mutagênese de saturação, que avalia as 19 substituições possíveis para cada aminoácido (Burks *et al.*, 1997; Rizvanovic *et al.*, 2021). Contudo, essa abordagem enfrenta obstáculos logísticos significativos, envolvendo a análise de centenas ou até milhares de mutantes. O processo requer a construção genética de cada variante, transformação em organismos hospedeiros, triagem de transformantes e produção de proteínas recombinantes, antes da subsequente análise funcional (Warren; Marolewski; Benkovic, 1996; Hilton *et al.*, 1996).

Uma alternativa promissora a esse processo experimental laborioso é a mutagênese de saturação *in silico*, que possibilita a análise sistemática de mutações em uma sequência de entrada, permitindo a predição das mudanças na energia livre de ligação (Geng *et al.*, 2019). Ferramentas como o FoldX destacam-se nesse contexto, demonstrando precisão moderada na classificação de mutações estabilizadoras, neutras ou desestabilizadoras, com boa correlação entre os valores de  $\Delta\Delta G$  preditos e os experimentais (Nisthal *et al.*, 2019; Guerois; Nielsen; Serrano, 2002).

O FoldX calcula mudanças na energia livre utilizando apenas uma conformação por vez. Entretanto, proteínas são flexíveis e podem atingir múltiplos estados em solução que estão intimamente relacionadas à sua função (Karplus; Kuriyan, 2005; Villali; Kern, 2010). Para contornar a sensibilidade da ferramenta à estrutura de entrada, as previsões podem utilizar em múltiplas conformações da proteína (Caldararu; Blundell; Kepp, 2021).

De acordo, as principais conformações do complexo BRON-NRR, extraídas por meio da avaliação por PCA das simulações de 400 ns, foram submetidas a um protocolo que agrupa aplicações do FoldX de maneira semelhante ao estabelecido pelo programa MutateX (Tiberti *et al.*, 2022). Ao todo, foram gerados 6.088 mutantes simples. Como o  $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$  é calculado pela subtração da energia do complexo não-mutado da do complexo mutado, valores positivos indicam que a mutação foi favorável à formação do complexo. A análise conjunta dos resultados das quatro replicatas revelou que cerca de 16% dos mutantes levaram a um incremento mínimo de 0,25 kcal/mol na energia de ligação. Apenas 4,5% das mutações promoveram uma melhora de  $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$  superior a 1 kcal/mol (Figura 36).

Figura 36. Mutações positivas ou consenso

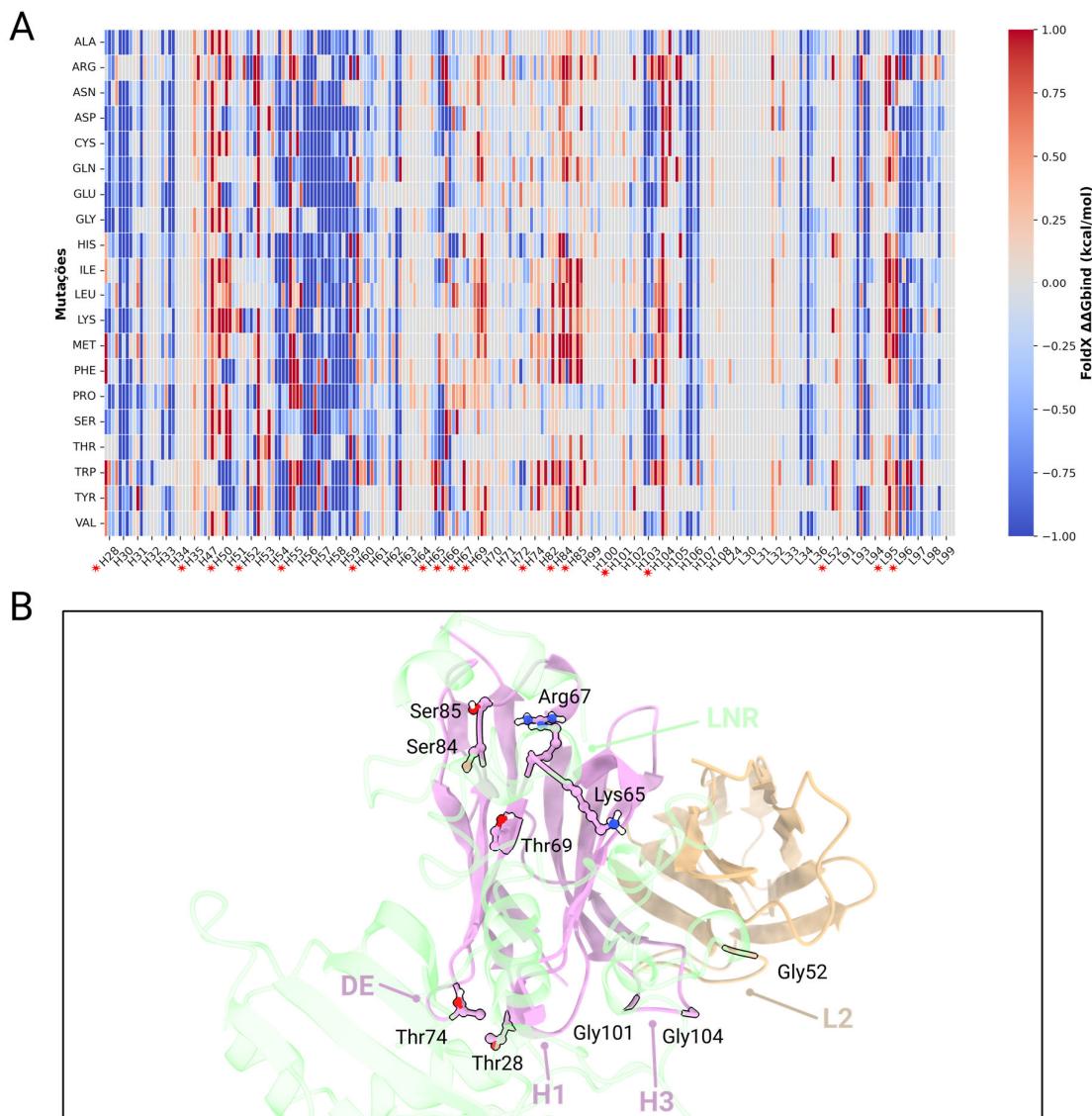


Fonte: elaborado pelo autor (2024). Frequência de mutações que geraram um incremento positivo de pelo menos 0,25 ou 1 kcal/mol em  $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ .

Dentre as mutações benéficas, foram identificadas 18 posições consenso, chamadas de *hot-spots* mutacionais, consideradas favoráveis em pelo menos três das quatro conformações analisadas (Figura 37A, Apêndice K). Entre estas, os resíduos Gln50, Thr55 e Tyr60 na cadeia pesada, e Ser95 e Asn96 na cadeia leve,

considerando a numeração sequencial, foram previamente destacados pela análise decomposição da energia de interação por MM/GBSA. Não obstante, Glu35 e Trp47 estão localizados nas fitas que compõe a interface V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> e foram desconsiderados, uma vez que alterações nessas posições podem comprometer o empacotamento do domínio Fv (Abhinandan; Martin, 2010; Dunbar *et al.*, 2013).

Figura 37. Mutagênese de saturação de BRON



Fonte: elaborada pelo autor (2024). (A) Mapa de calor do  $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$  decorrente da mutagênese de saturação. Como os cálculos foram feitos utilizando quatro conformações distintas, para cada posição, quatro colunas subsequentes indicam os valores referentes às replicatas 1, 2, 3 e 4 de cada posição, respectivamente. As posições de consenso estão marcadas com uma estrela vermelha. (B) Posições para as quais foram encontradas mutações positivas em pelo menos 3 das 4 conformações testadas. Os resíduos estão numerados de acordo com sua ordem na sequência.

Dessa forma, onze posições de interesse podem ser alvos de mutações, das quais quatro são ocupadas por resíduos de glicina (Figura 37B). Uma delas está na CDR-L2, região que, em análises prévias de interação, não demonstrou contribuições significativas para a interface. As mutações sugeridas para resíduos carregados, como lisina, ou aromáticos, como tirosina e triptofano, podem promover o estabelecimento de novas interações nessa posição (Stites, 1997; Dourado; Flores, 2014).

Foi identificada uma mutação no loop DE da cadeia pesada, que participa da composição da interface anticorpo-antígeno. Por fim, também foram detectadas mutações favoráveis em resíduos de *framework* que interagem, majoritariamente, com o N-terminal do domínio LNR. O impacto positivo dessas mutações sobre a interação pode ser limitado, entretanto, pela alta flexibilidade desse segmento, demonstrada pela análise de RMSF.

Embora a mutagênese de saturação seja uma metodologia promissora para a exploração do espaço químico, permitindo testar a substituição de aminoácidos por outros com características diversas, como carga e hidrofobicidade, ela é limitada pela ausência de exploração do espaço conformacional. Em contrapartida, métodos baseados em enxerto de CDRs permitem alterar o comprimento, a composição e a conformação do parátopo, podendo contribuir para a maturação de afinidade *in silico* do anticorpo (Schoeder *et al.*, 2021).

Considerando as interações chave entre o BRON e o NRR identificadas nas simulações de DM, foi conduzido o enxerto de CDRs e o desenho de fragmentos variáveis utilizando o RosettaAntibodyDesign com o objetivo de aumentar a contribuição da cadeia leve para a interface de interação. Dessa forma, foram gerados 250 fragmentos variáveis para cada uma das quatro estruturas predominantes do complexo BRON-NRR. Mantendo a CDR-H2 inalterada, o enxerto foi realizado nas CDRs L1 e L2, seguido da otimização das três CDRs restantes.

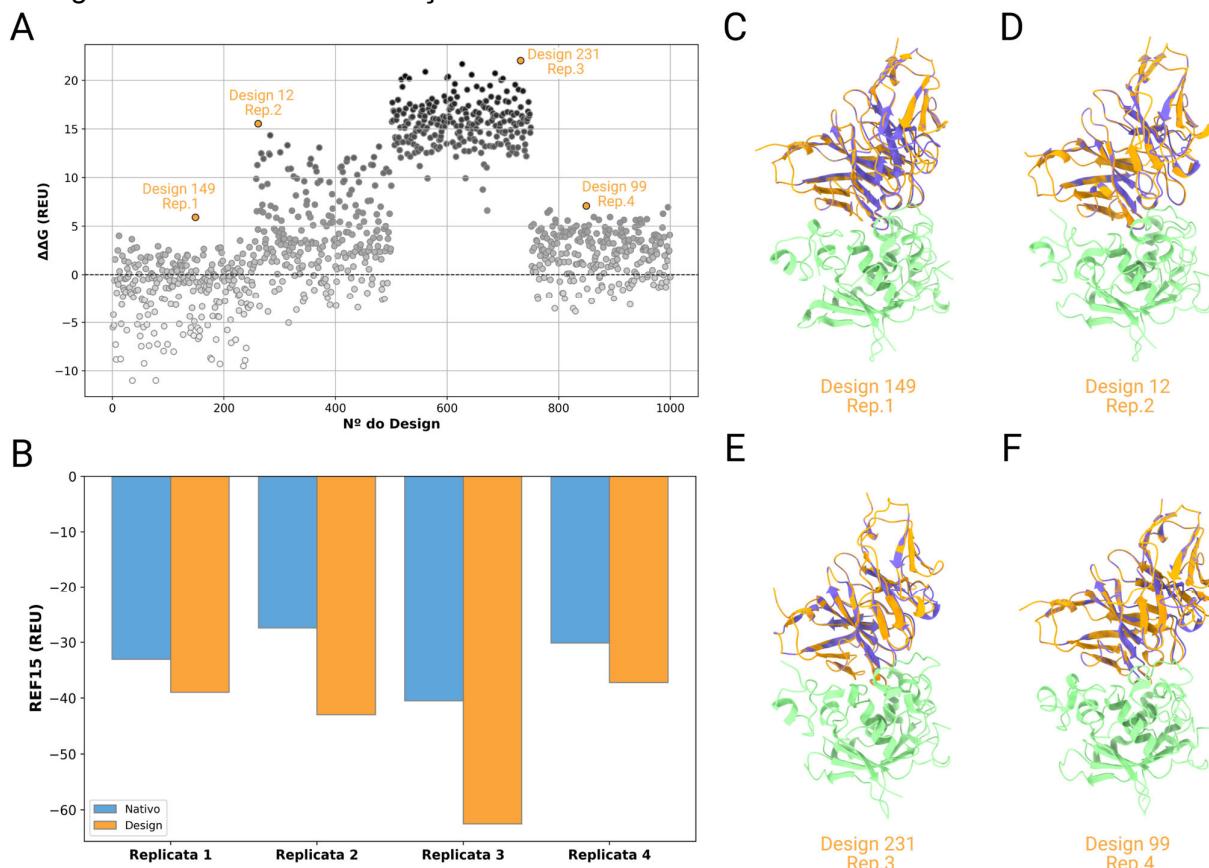
A avaliação de desempenho dos desenhos foi feita através do cálculo de  $\Delta\Delta G$ , subtraindo o valor de  $\Delta G_{sep}$  do anticorpo nativo em relação ao mutante. Esse cálculo é baseado na função de energia REF15, implementada no Rosetta, que fornece resultados em termos de *Rosetta Energy Units* (REU) (Alford *et al.*, 2017). Valores mais elevados de  $\Delta\Delta G$  indicam uma melhora no desenho, sugerindo uma interação mais estável e favorável.

A seleção da melhor estrutura derivada da execução com a conformação

predominante de cada replicata de DM indicou que os desenhos de número 149, 12, 231 e 99 foram aqueles que apresentaram  $\Delta\Delta G$  mais favoráveis para as replicatas 1, 2, 3 e 4, respectivamente, com destaque para os resultados oriundos da conformação 3 (Figura 38A,B).

A análise apontou que partir de uma estrutura de menor energia, potencialmente representando uma conformação mais estável, resultou em desenhos com  $\Delta\Delta G$  superiores, reforçando a importância de selecionar conformações iniciais adequadas no processo de otimização. A Figura 38C-F ilustra que as alterações na sequência de H1, H3 e L3 não resultaram em alterações conformacionais consideráveis, sendo as maiores distinções encontradas nas CDRs enxertadas, como esperado.

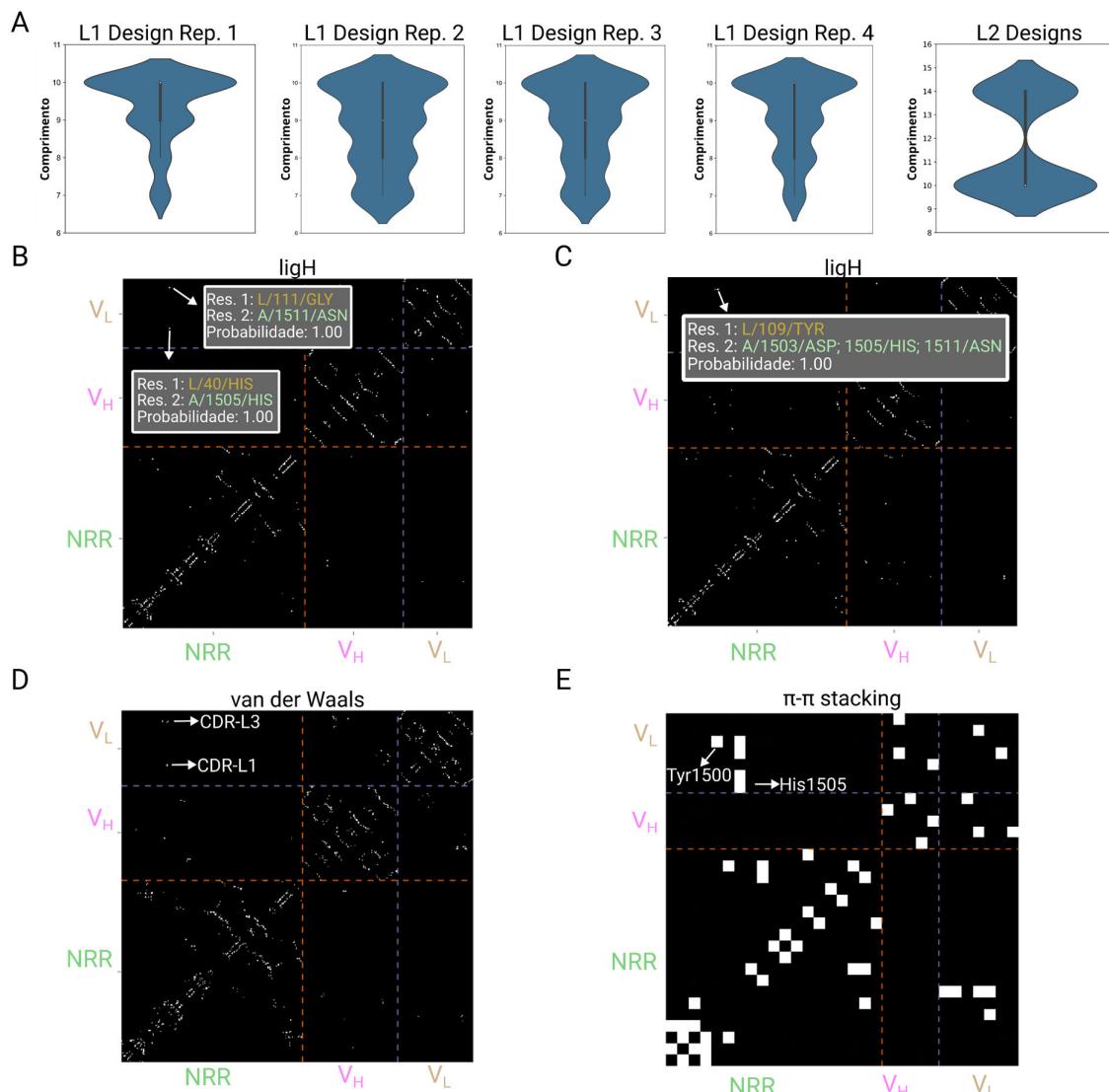
Figura 38. Enxerto e otimização de CDRs com o RAbD



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A)  $\Delta\Delta G$  dos modelos gerados pelo RosettaAntibodyDesign, expresso em unidades de energia do Rosetta (REU). 250 desenhos foram gerados utilizando como ponto de partida a conformação mais frequente das simulações de 400 ns, totalizando 1000 modelos. (B) Comparação do  $\Delta G_{sep}$ , analisado através do REF15 do Rosetta, entre as estruturas iniciais e o melhor desenho produzido para cada replicata. Sobreposição das estruturas secundárias do Fv nativo (azul) e do resultante do enxerto e otimização de CDRs (laranja) com a estrutura de partida das replicatas (C) 1, (D) 2, (E) 3 e (F) 4.

O enxerto da CDR-L2 foi uniforme em termos de comprimento, com os segmentos enxertados tendo entre 10 e 14 resíduos, independentemente da estrutura inicial. Já para L1, o enxerto variou entre segmentos de 7 a 10 resíduos, com uma maior incidência de *loops* mais longos (Figura 39A).

Figura 39. Tamanho dos enxertos e contatos dos desenhos produzidos pelo RAbD com NRR



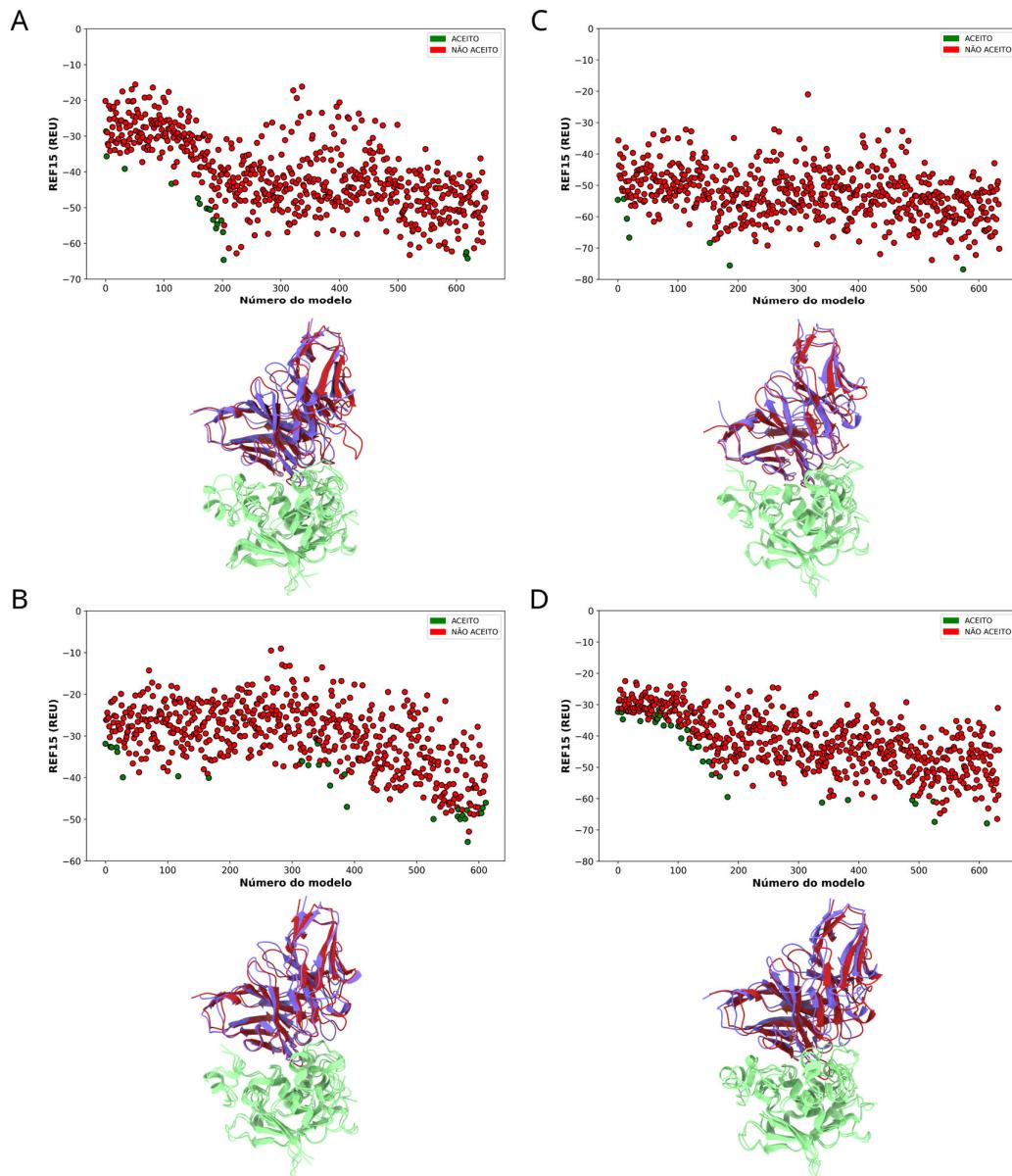
Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Comprimento das CDRs L1 e L2 enxertadas na cadeia leve de BRON pelo RAbD. (B) Mapa de ligações de hidrogênio da replicata 1, representativo dos desenhos gerados a partir de 2 e 4. (C) Mapa de ligH para replicata 3. (D) Contatos de van der Waals e (E) interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking entre os desenhos e NRR. Nos mapas de contato, as cores preto e branco correspondem a probabilidades de ocorrência de 0 e 1, respectivamente. Vale ressaltar que os resíduos do anticorpo estão numerados pelo padrão do RAbD, usando o esquema de AHo.

As alterações da CDR-L1 sucederam em formar novas interações com o NRR. Em três das quatro replicatas, foi observada a formação de ligações de hidrogênio adicionais, como entre a His40 (ou His32 pela numeração de Martin) e a His1505 do NRR, sendo este o caso da replicata 1 (Figura 39B). Além disso, a CDR-L3 também passou a desempenhar um papel importante na interface, a partir das ligações de hidrogênio formadas pelos resíduos Tyr109 (91 pela numeração de Martin) e Gly111 (93 em Martin) (Figura 39B,C). Tanto L1 quanto L3 formaram interações adicionais de van der Waals e  $\pi$ - $\pi$  stacking com NRR (Figura 39D,E). Em contraste, o enxerto da CDR-L2 não gerou novas interações nos modelos avaliados e as alterações propostas desfizeram interações polares com a Leu1710, podendo ter impactos negativos na eficácia inibitória dos anticorpos projetados.

Com o intuito de avaliar a possibilidade do estabelecimento de novas interações com a cadeia leve sem a perda de contatos de interface importantes, utilizou-se o software AbSeldon, que adota uma abordagem baseada na diversidade do *Observed Antibody Space* para realizar o enxerto e otimização de CDRs (Sampaio, 2024). Assim como no RAbD, a energia de interação é calculada usando a função de energia REF15, possibilitando uma comparação direta entre os métodos.

No AbSeldon, foram gerados um total de 2560 desenhos, sendo cerca de 640 oriundos de cada conformação predominante das simulações do complexo BRON-NRR. Diferentemente do RAbD, que permitiu a exclusão da CDR-H2 do processo de otimização, o AbSeldon realiza modificações em todas as CDRs. Os resultados de afinidade predita variaram de -78 a -55 REU, sendo mais baixos do que aqueles obtidos com o RAbD, indicando uma maior afinidade (Figura 40A-D).

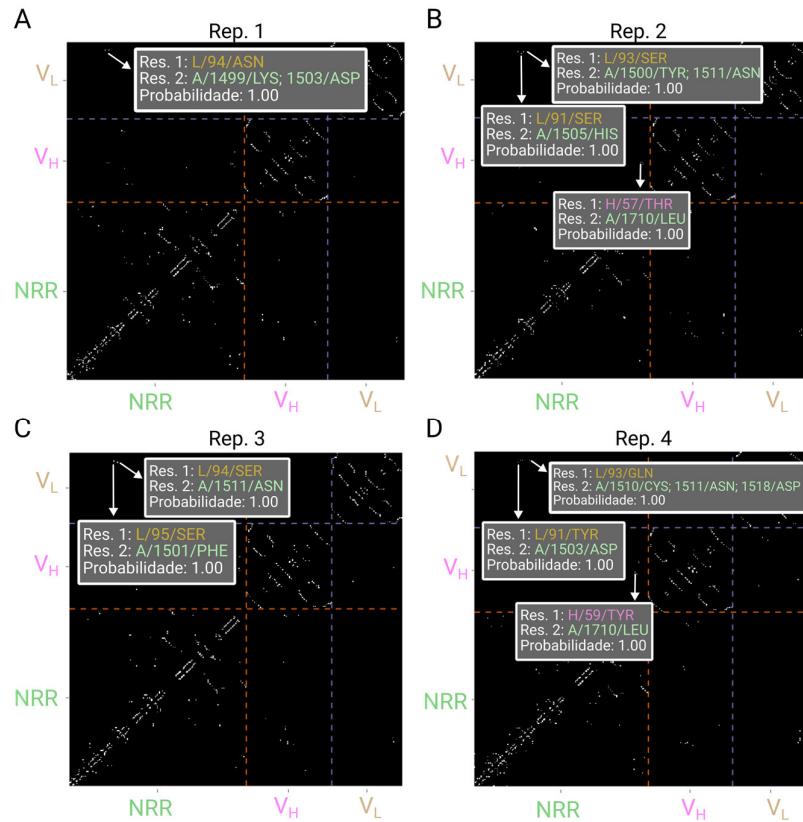
Figura 40. Enxerto e otimização de CDRs com o AbSeldon



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Resultados de REF15 e estrutura secundária dos desenhos gerados pelo AbSeldon (vinho), comparados com o Fv nativo (azul), para as replicatas (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (D) 4. Os pontos estão coloridos em verde ou vermelho, de acordo com a classificação de aceito ou não aceito pelo AbSeldon.

A avaliação da interface dos quatro melhores modelos com o antígeno indicou a introdução de interações polares entre L3 e NRR, com destaque ao segmento presente entre os resíduos 91 e 95, que foi capaz de estabelecer ligH com LNR no intervalo entre 1499 e 1518. Notavelmente, o AbSeldon conseguiu preservar as importantes interações com Leu1710 em duas replicatas (Figura 41A-D).

Figura 41. Ligações de hidrogênio entre os desenhos gerados pelo AbSeldon e NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Ligações de hidrogênio entre NRR e os desenhos do AbSeldon que tiveram como estrutura inicial a conformação predominante das replicatas (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (D) 4. Nos mapas de contato, as cores preto e branco correspondem a probabilidades de ocorrência de 0 e 1, respectivamente.

A análise de frequência de aminoácidos nas posições das CDRs e do loop DE demonstrou que, apesar da tentativa de enxerto de L2 através dos dois programas, houve uma limitada exploração do espaço químico, com apenas dois aminoácidos predominando em todas as posições avaliadas. Tentativas de inserções nas posições 52A-D não resultaram em interações adicionais relevantes na avaliação pelo RING. Já o desenho de L1, L3 e H3 foi mais eficiente em explorar uma maior variedade de aminoácidos e gerar inserções com diferentes comprimentos e perfis químicos (Figura 42A).

Em concordância com os dados de mutagênese de saturação, quatro *hot-spots* mutacionais previamente identificados foram alterados nos desenhos. A substituição de Thr28 por isoleucina foi observada na replicata 1 da mutagênese, enquanto a alteração da Gly101 (Gly97 na numeração de Martin) para tirosina foi

detectada nas replicatas 1 e 3, e para lisina na replicata 3. Além disso, a mutação de Gly104 (Gly100 na numeração de Martin) para arginina também foi identificada em um dos desenhos. A introdução de resíduos positivamente carregados é coerente com a superfície eletrostática predominantemente negativa de NRR, favorecendo a complementariedade de carga na interface (Apêndice L).

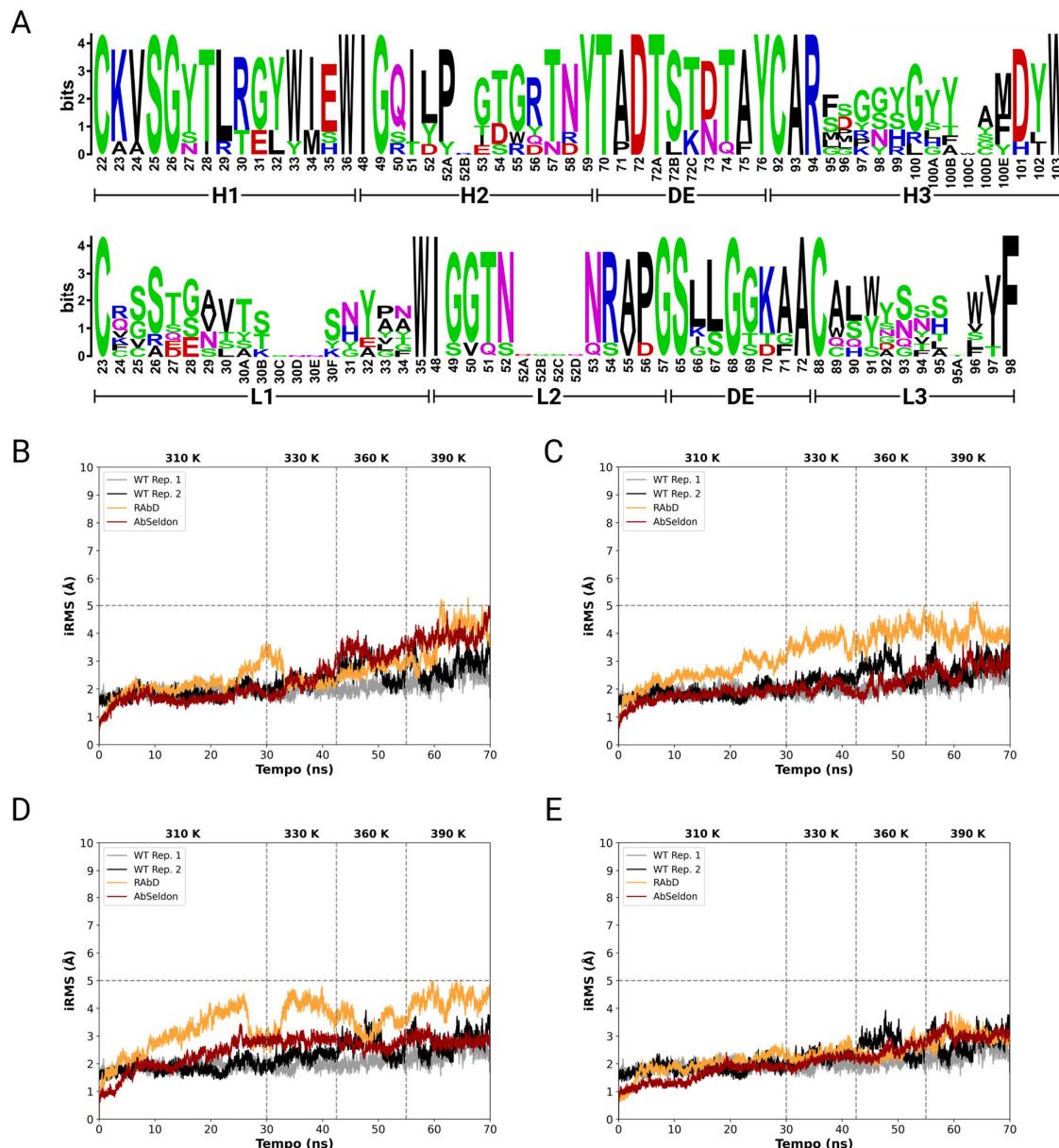
Já na cadeia leve, o resíduo 52 foi apontado como um *hot-spot* mutacional, mas as mutações propostas diferiram entre os métodos: nos enxertos, o resíduo foi substituído por uma valina, enquanto a mutagênese sugeriu aminoácidos carregados ou aromáticos. A identificação de posições e mutações consenso entre as duas metodologias de otimização reforça o potencial dessas modificações para melhora da interação.

Não obstante, as alterações foram comparadas àquelas sugeridas a partir da metodologia de dobramento inverso, que podem levar a otimização da afinidade de um complexo anticorpo-antígeno (Høie *et al.*, 2024). As principais conformações amostradas pelo anticorpo, identificada por DM, bem como os modelos enxertados foram submetidos ao AntiFold, produzindo sequências contendo entre 7 a 12 mutações nas CDRs. No entanto, essas sequências obtiveram escores de dobramento inverso (*log-likelihood*) inferiores aos da molécula nativa.

Seguiu-se, então, com a análise de probabilidade de resíduos por posição (Apêndice M). Na CDR-H1, as diferenças mais significativas de frequência de aminoácidos ocorreram nas posições 30 e 33 pela numeração de Martin, onde treonina/isoleucina e tirosina predominaram nas sequências geradas. Na CDR-H2, a posição 52 apresentou variações com a presença de tirosina e ácido aspártico; a posição 54 foi predominada por serina; e a posição 56 mostrou a ocorrência de aminoácidos carregados negativamente, como ácido aspártico e glutâmico. A ampla variabilidade observada na CDR-H3 dificultou a identificação de modificações predominantes, sendo notável a prevalência de resíduos de tirosina.

Já na cadeia leve, especificamente em L1, os aminoácidos mais frequentes encontrados pelo AntiFold foram consistentes com as sequências enxertadas. As principais variações surgiram nas estruturas derivadas de AbSeldon R3 e R4, com um *loop* mais curto e com a presença de serina na posição 27, glicina/asparagina na 28, e serina/asparagina na 29. A CDR-L2 sofreu poucas alterações, exceto pela possível asparagina na posição 51.

Figura 42. Comparação das CDRs obtidas pelo AbSeldon e RAbD e validação por DMA



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Frequência de ocorrência dos resíduos nas posições das CDRs e do loop DE das cadeias pesada e leve. O alinhamento foi obtido com o AbAlign e os anticorpos renumerados de acordo com Martin. RMSD de interface correspondente as simulações de dinâmica molecular aquecida com os modelos obtidos pelo RAbD (laranja) e AbSeldon (vinho) a partir das estruturas predominantes das replicatas (B) 1, (C) 2, (D) 3 e (E) 4 das DM de 400 ns. As linhas em cinza correspondem aos resultados previamente obtidos na DMA de BRON nativo.

Na CDR-L3, as principais modificações ocorreram nas posições 89, com predominância de leucina, e 97, onde valina foi frequente. O AntiFold correlacionou o *log-likelihood*, isto é, a frequência dos resíduos em cada posição, com um possível ganho de afinidade (Høie *et al.*, 2024). Assim como a metodologia de dobramento

inverso, a combinação de seis modelos de linguagem generalizados mostrou-se eficiente na maturação de afinidade de anticorpos *naïve* e daqueles já maturados (Hie *et al.*, 2024). O uso dessa estratégia para guiar a evolução artificial indicou um total de 24 mutações otimizadoras em BRON, das quais 10 são em  $V_H$  e 14 são em  $V_L$  (Apêndice N).

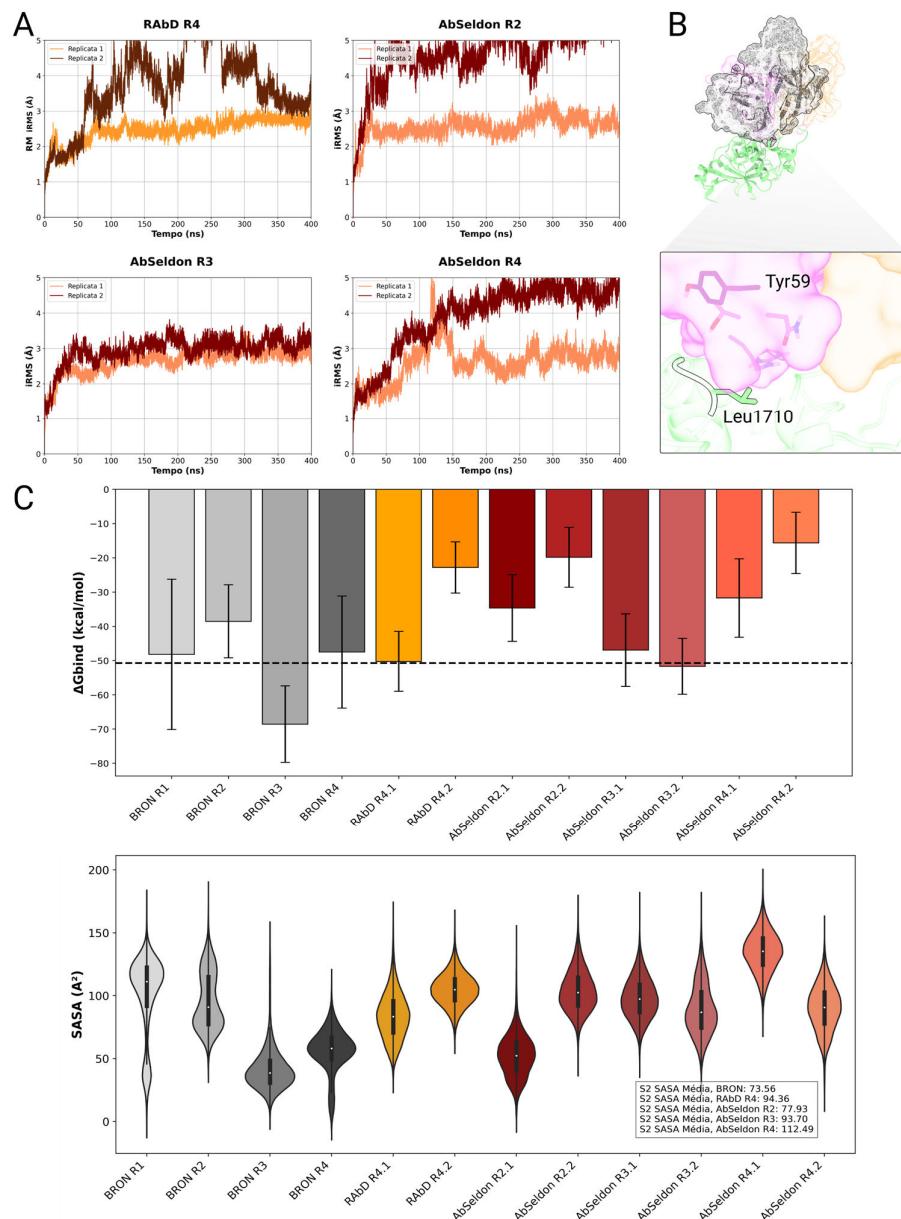
Metade das alterações na cadeia pesada já haviam sido reportadas na etapa de enxerto (Figura 42A). Dentre elas, está Met100<sub>E</sub>Tyr, uma alteração na CDR-H3 também registrada em AbSeldon R3. Já na cadeia leve, 5 das 14 modificações coincidem com as propostas pelo RAbD e AbSeldon, reforçando o desafio associado a otimização da cadeia leve. Vale ressaltar que tais metodologias oferecem novas oportunidades de otimização, mas que as modificações propostas, seja individualmente ou em combinações, devem passar por avaliações computacionais baseadas em dinâmica molecular para validar e determinar o seu impacto funcional.

Procedeu-se com a análise dos modelos gerados por enxerto de CDR por simulações de DMa. Ao final de 70 ns de simulação, os valores de iRMS para todos os modelos ficaram abaixo de 5 Å (Figura 42B-E). No entanto, a comparação entre os perfis dos novos anticorpos e do Fv nativo indicou que os modelos do AbSeldon originários das conformações das replicatas 2, 3 e 4, assim como o modelo da replicata 4 do RAbD, apresentaram variações semelhantes. Estes modelos foram, então, selecionados para avaliações adicionais quanto a sua estabilidade, acessibilidade do sítio S2 e energia de interação.

Embora a análise com o RING não tenha identificado interações com Leu1710, as simulações de DM revelaram uma ligH transiente com a Tyr59, presente em cerca de 5% da simulação, sendo esse um aminoácido que teve uma participação importante na interface descrita com o anticorpo nativo (Figura 43B). Em contrapartida, as ligações de hidrogênio detectadas nos desenhos AbSeldon R2 e R4 não foram mantidas durante as simulações, possivelmente sendo desfeitas ainda durante o equilíbrio.

Os resultados de RMSD foram corroborados pelas análises de MM/GBSA, nas quais as simulações com alta variação de iRMS apresentaram valores de  $\Delta G_{bind}$  superiores a -25 kcal/mol. AbSeldon R3 foi o único modelo que apresentou valores de energia de interação consistente entre as réplicas e semelhantes à média do anticorpo nativo (Figura 43C). Esse modelo demonstrou uma acessibilidade ao sítio S2 ligeiramente superior à do anticorpo original, mas ainda inferior à do antígeno livre.

Figura 43. iRMS, área acessível ao solvente do sítio S2 em NRR complexado aos modelos otimizados e energia livre de ligação



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) iRMS dos desenhos RAbD R4, AbSeldon R2, R3 e R4, simulados em duplicatas por 400 ns. (B) Ilustração do complexo anticorpo-antígeno, na qual a estrutura secundária de NRR está colorida em verde, a superfície de BRON nativo está representada por uma malha cinza, e as superfícies de  $V_H$  e  $V_L$  de AbSeldon R3 estão coloridas em violeta e bege respectivamente. Em destaque, está a Leu1710 de NRR e a Tyr59 do modelo, que formam uma ligH identificada em aproximadamente 5% da simulação. (C)  $\Delta G_{bind}$  e área de superfície acessível ao solvente do sítio S2 com BRON nativo e com desenhos otimizados submetidos a simulação.

Esses dados indicam que a metodologia de enxerto de CDRs aplicada ao desenho AbSeldon R3 foi eficaz em estabelecer novas interações que estabilizaram a interface, aumentando a participação da cadeia leve, sem comprometer a energia de

interação. Yang e colaboradores (2023) utilizaram o enxerto de CDR para otimização de anticorpos neutralizantes contra o domínio RBD de SARS-CoV-2. Utilizando o RAbD para modificar todos os *loops* hipervariáveis, a exceção de H3, considerado essencial à interação com o epítopo, foram obtidos desenhos com alta afinidade e capacidade neutralizante (Yang *et al.*, 2023). Esses resultados foram atribuídos à formação de novas interações anticorpo-antígeno, reforçando a importância do enxerto de CDR como método para o desenho racional de anticorpos.

No presente estudo, essa metodologia foi complementada e comparada a três abordagens adicionais: a análise de *hot-spots* mutacionais via mutagênese de saturação, a avaliação da probabilidade de ocorrência de aminoácidos em cada posição por dobramento inverso e a maturação de afinidade por modelos de linguagem. A validação dos anticorpos projetados foi conduzida por meio de simulações de dinâmica molecular que forneceram *insights* sobre a estabilidade estrutural e o comportamento dinâmico dos complexos formados pelos anticorpos modificados.

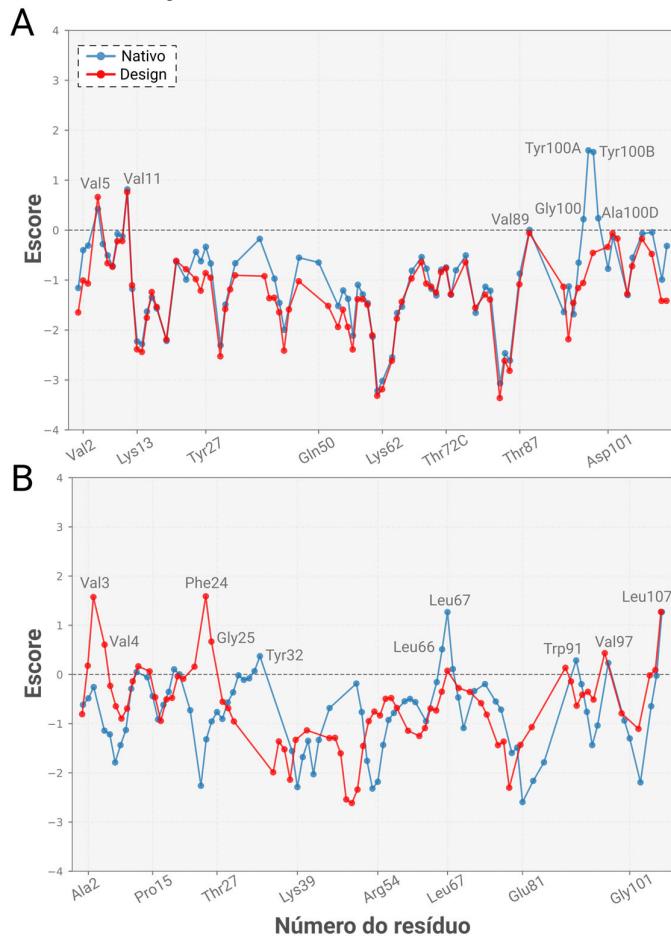
#### 4.6 Avaliação do potencial de aplicação

A partir do melhor modelo obtido na etapa de enxerto, AbSeldon R3, foram avaliados parâmetros críticos para sua aplicação *in vitro* e *in vivo*. No desenvolvimento de biofármacos, altas concentrações de proteínas são frequentemente utilizadas, gerando desafios relacionados à solubilidade, separação de fases, aumento da viscosidade e propensão à agregação, dificultando a fabricação, entrega, estabilidade e o prazo de validade do produto (Pindrus *et al.*, 2015; Shire; Shahrokh; Liu, 2009). Tendo em vista a superação de tais dificuldades na etapa inicial do desenvolvimento, a solubilidade do Brontictuzumabe nativo e do AbSeldon R3 foi avaliada utilizando o programa Aggregescan4D.

A análise de solubilidade por posição mostrou que os enxertos nas CDRs H1 e H3 melhoraram o escore de solubilidade da cadeia pesada, especialmente nos resíduos ao redor da posição 100 (Figura 44A). Já os enxertos na cadeia leve prejudicaram a solubilidade inclusive fora das CDRs, com Val3 e Phe24 sendo identificados como os principais pontos propensos à agregação (Figura 44B). Ainda assim, os escores globais de solubilidade normalizada foram de -0,61 para o Brontictuzumabe nativo e -0,58 para o AbSeldon R3. Portanto, infere-se que as

modificações não comprometeram significativamente a solubilidade global do anticorpo (Bárcenas *et al.*, 2024).

Figura 44. Predição de solubilidade



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Predição de solubilidade com o AggreScan4D para as cadeias (A) pesada e (B) leve do Brontictuzumabe nativo (azul) e modificado pelo AbSeldon na replicata 3 (vermelho). Valores mais negativos de escore indicam uma maior solubilidade.

Em seguida, AbSeldon R3 foi comparado com 754 anticorpos terapêuticos fase I através do *Therapeutic Antibody Profiler*, mostrando adequação em todas as cinco métricas avaliadas (Apêndice O). O comprimento total das CDRs foi de 48 resíduos, coincidindo com a média encontrada na literatura (Raybould *et al.*, 2019). O escore de hidrofobicidade em CDRs, que está relacionado a propensão de agregação, foi de 140,7, estando próximo a média reportada de 133,8 (Raybould *et al.*, 2019; Kyte; Doolittle, 1982).

As cargas dos resíduos da proteína foram adequadas para o pH 7,4 para realização do cálculo de *patches* de superfície de cargas positiva e negativa, sendo

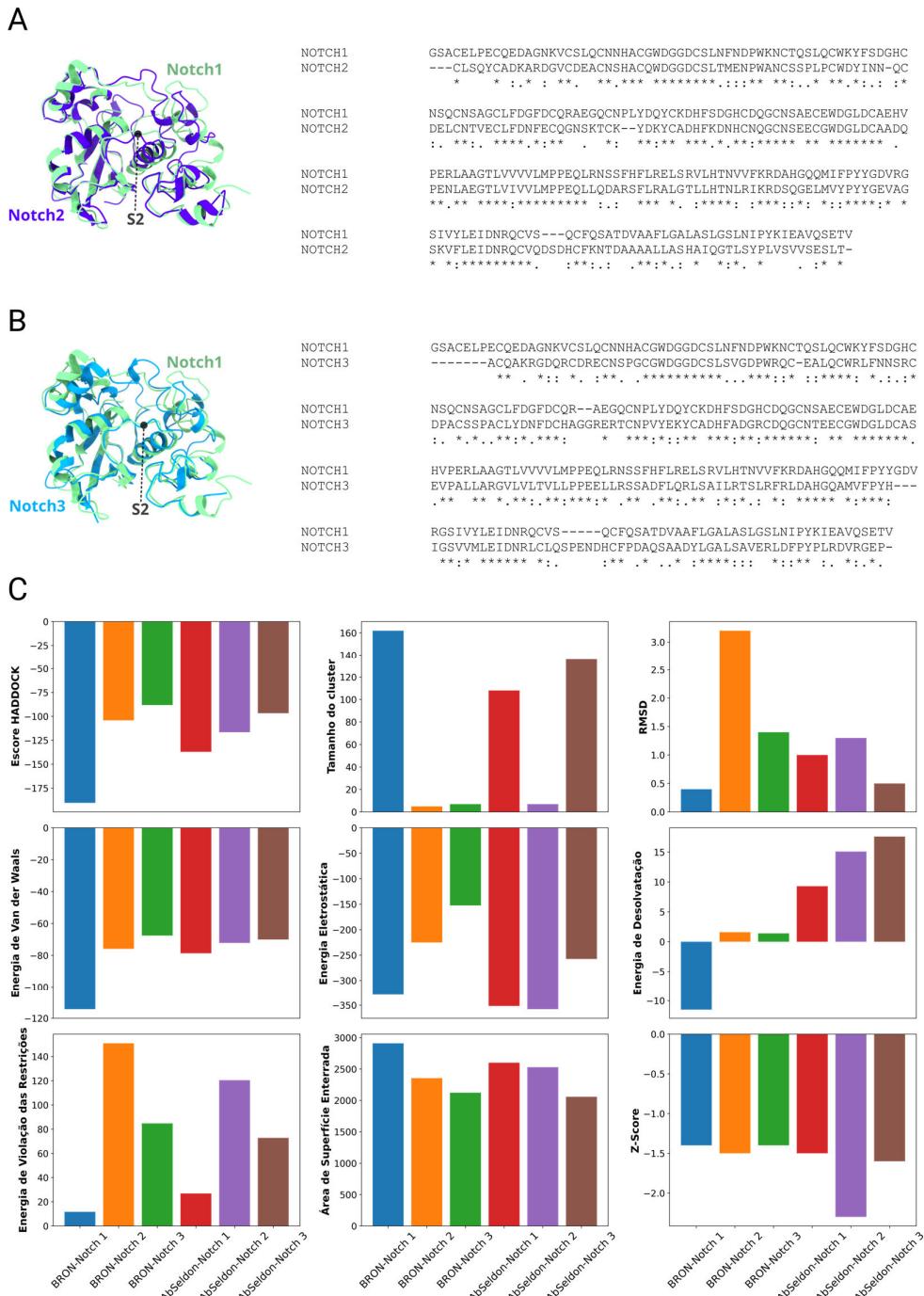
os seus valores 0,04 e 0,0, respectivamente. Estes foram considerados adequados, uma vez que *patches* de superfície carregados são associados a características biofísicas indesejadas (Popovic *et al.*, 2017; Datta-Mannan *et al.*, 2015). A análise do mapa de calor de cargas em diferentes pHs e concentrações iônicas, fornecido pelo Protein-Sol, corrobora com um perfil neutro de cargas em pH 7,5 e 0,15 M (Hebditch; Warwicker, 2019b) (Apêndice O).

O Protein-Sol também indicou a estabilidade do estado enovelado em todas as faixas de concentração salina testadas entre os pHs 5 e 8. Por fim, a avaliação da simetria de carga estrutural Fv (SFvCSP) foi utilizada para avaliar a atração eletrostática indutora de agregados, tendo em vista que um mAb tende a ser mais viscoso se o produto das cargas líquidas  $V_H$  e  $V_L$  for negativo (Sharma *et al.*, 2014). O SFvCSP de AbSeldon R3 foi 10,2, indicando uma menor viscosidade. A metanálise realizada por aprendizado de máquina a partir de 12 propriedades biofísicas, feita com o Protein-Sol, colocou o AbSeldon R3 dentro de uma faixa adequada entre outros anticorpos aprovados ou que passam por testes clínicos fases II ou III (Hebditch; Warwicker, 2019a).

Uma outra consideração fundamental foi a comparação do potencial de interação dos anticorpos nativo e modificado com outras proteínas da família Notch. Notch2 e Notch3 apresentam diversas modificações em suas sequências quando comparadas à Notch1 (identidades de 52,89% e 50,66%, respectivamente). Entretanto, tais proteínas mantêm o seu mesmo padrão de enovelamento (Figura 45A,B). Essa observação está em conformidade com o princípio de que a estrutura das proteínas tende a ser mais conservada do que sua sequência, uma vez que a função proteica está diretamente relacionada à sua conformação tridimensional, sendo, portanto, favorecida ao longo da evolução (Sousounis *et al.*, 2012).

A avaliação das interações foi conduzida por meio de *docking* molecular utilizando o HADDOCK, que, diferentemente do ClusPro, fornece dados quantitativos sobre a interação, como a área de superfície enterrada e os componentes de energia de van der Waals e eletrostática. A definição dos resíduos ativos com base no complexo previamente validado levou a recuperação de um sistema BRON-NRR semelhante ao oriundo do ClusPro, validando o uso desse programa nessa aplicação.

Figura 45. Interações de BRON e AbSeldon R3 com os receptores Notch2 e 3



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Alinhamento da estrutura e sequência de Notch1 à (A) Notch2 e (B) Notch3. (C) Resultados do HADDOCK2.4 para os *dockings* de BRON e AbSeldon R3 a Notch1, Notch2 e Notch3.

Os escores HADDOCK foram mais negativos nos complexos formados por BRON e AbSeldon com Notch1, indicando interações mais favoráveis, ainda que o escore do AbSeldon tenha sido inferior ao da proteína nativa (Figura 45C). O escore

HADDOCK é composto por uma combinação linear de diversos parâmetros energéticos e de área de superfície enterrada, porém, não apresenta correlação direta com a afinidade de interação (Vangone *et al.*, 2016; Kurkcuoglu *et al.*, 2017).

Além disso, os tamanhos dos *clusters* foram, de modo geral, maiores nos complexos com Notch1, acompanhados de RMSD inferiores a 1 Å, demonstrando a uniformidade do agrupamento. Uma exceção foi o complexo AbSeldon-Notch3, que também obteve um *cluster* com mais de cem estruturas e RMSD abaixo de 1 Å. Os valores de área de superfície enterrada, energia de van der Waals e energia de violação das restrições favoreceram, no entanto, os complexos com Notch1, sugerindo que, em uma análise preliminar, esses complexos são mais favoráveis. No entanto, a possibilidade de reações cruzadas não pode ser descartada sem investigações mais aprofundadas, tanto *in silico* quanto *in vitro*.

#### 4.7 Proposição de novos scFvs baseados em BRON

Anticorpos são moléculas estruturalmente complexas, compostas por cadeias leves e pesadas organizadas em um formato de Y, estabilizadas por pontes dissulfeto. Devido à necessidade de modificações pós-traducionais e sistemas de expressão específicos, a produção de anticorpos completos pode ser desafiadora (Zhang *et al.*, 2016). O uso de fragmentos de anticorpos, como os scFvs, caracterizados pela fusão dos domínios variáveis por um *linker*, oferece diversas vantagens, como a produção eficiente em sistemas bacterianos e codificação por um único gene, eliminando problemas relacionados à estequiometria de cadeias (Filpula, 2007).

Além disso, esses fragmentos apresentam maior capacidade de penetração tecidual e rápida depuração plasmática, tornando-os atraentes para aplicações terapêuticas e diagnósticas (Arslan *et al.*, 2022; Li; Krippendorff; Shah, 2017). Embora os scFvs apresentem estabilidade reduzida quando comparada aos anticorpos completos, seu acoplamento em outros formatos, como os scFv-Fc, pode ser uma alternativa (Bujak *et al.*, 2014). Ademais, os scFvs podem ser incorporados em construções bi-específicas ou utilizados como carreadores de pequenos ligantes, expandindo ainda mais suas aplicações em imunoterapia e como ferramentas de direcionamento molecular (Brinkmann; Kontermann, 2017; Smith *et al.*, 2021).

Tendo em vista os potenciais usos dos fragmentos de anticorpos, foram

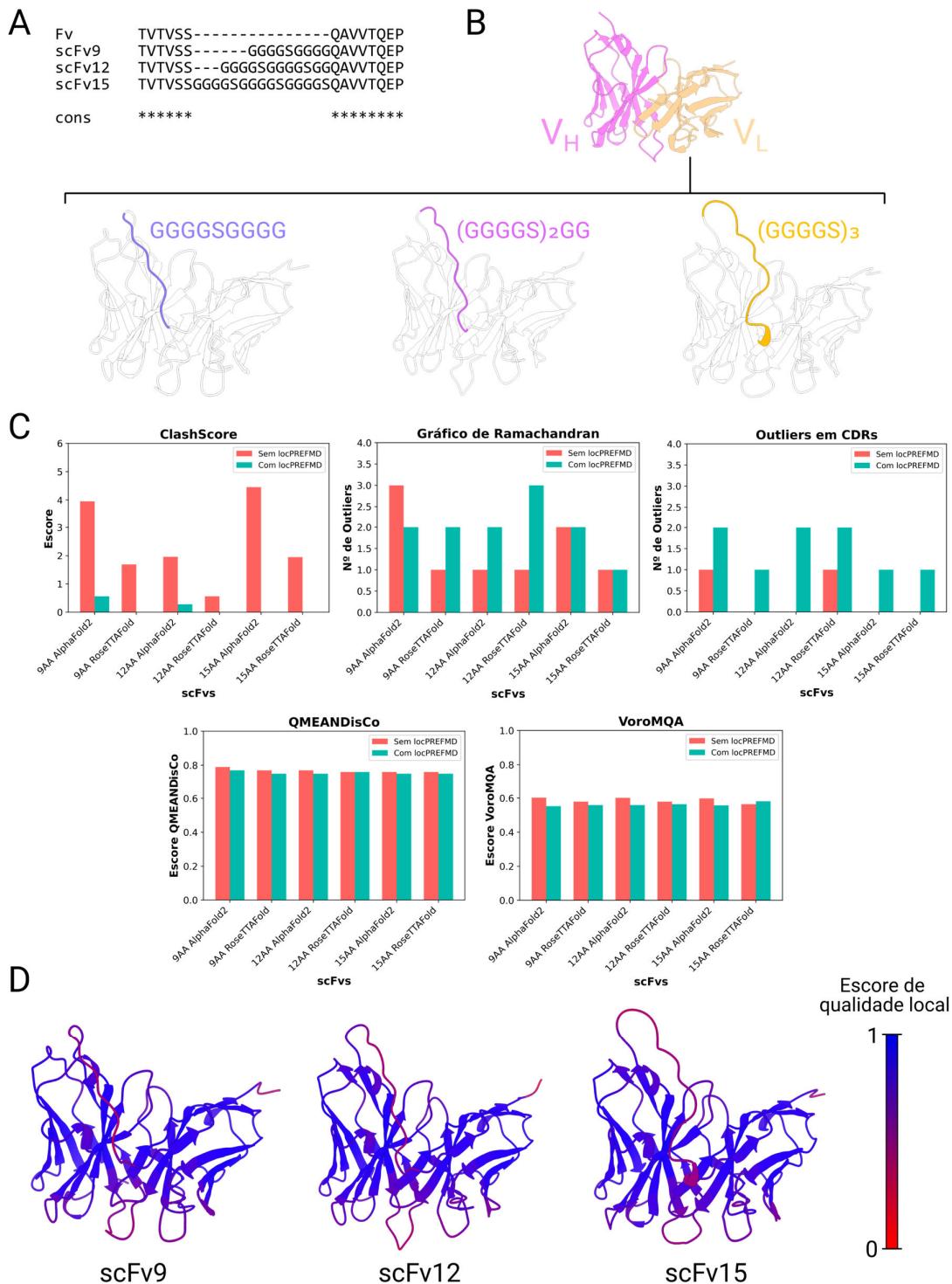
incorporados peptídeos ligantes flexíveis de três comprimentos distintos entre os domínios  $V_H$  e  $V_L$  do Brontictuzumabe, avaliando-se, em seguida, a interação dos fragmentos de cadeia simples gerados com NRR de Notch1. O tamanho do *linker* afeta diferentes comportamentos estruturais e funcionais de scFvs (Arslan *et al.*, 2022; Dolezal *et al.*, 2000). A literatura reporta que scFvs conectados por peptídeos menores que 12 aminoácidos tendem a formar multímeros, combinando-se com outros fragmentos. Em contrapartida, o uso de *linkers* de pelo menos 12 resíduos frequentemente resulta em moléculas monoméricas funcionais (Hudson; Kortt, 1999; Le Gall *et al.*, 1999).

Dessa forma, foram escolhidos fragmentos de 9 (scFv9), 12 (scFv12) e 15 aminoácidos (scFv15), compostos por repetições de glicina e serina ( $[G_4S]_n$ ), para conectar os domínios variáveis de BRON (Figura 46A). Os scFvs gerados possuem orientação entre  $V_H$ - $V_L$  diferentes do Fv (Figura 46B). Tal alteração é esperada, não devendo afetar a atividade biológica ou a capacidade de reconhecimento de tais moléculas, mas podendo levar a redução da especificidade ao antígeno (Riaño-Umbarila *et al.*, 2020; Krokhotin *et al.*, 2019).

A comparação entre os modelos gerados pelo RoseTTAFold e pelo AlphaFold2 revelou que, embora ambos os programas foram capazes de produzir estruturas com qualidade global semelhante, indicada pelos escores do QMEANDisCo e VoroMQA, os modelos do AlphaFold2 apresentaram um maior número de sobreposições estereoquímicas desfavoráveis e de *outliers* no gráfico de Ramachandran (Figura 46C).

O refinamento das estruturas com o locPREFMD levou a redução do número de choques estereoquímicos (Figura 46C). No entanto, esse processo também resultou em um aumento de ângulos diedros fora das regiões permitidas no gráfico de Ramachandran dentro das CDRs, afetando diretamente os aminoácidos envolvidos no parátopo, levando a escolha dos modelos gerados pelo RoseTTAFold sem refinamento.

Figura 46. Modelagem dos fragmentos a partir do Brontictuzumabe



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Alinhamento das sequências do Fv de BRON com os fragmentos de linkers de 9, 12 e 15 resíduos, respectivamente, na região de inserção dos peptídeos ligantes. (B) Estrutura secundária de BRON, com as cadeias pesada e leve coloridas em violeta e bege, respectivamente, e dos scFvs, com os *linkers* destacados em azul, roxo e laranja, respectivamente. (C) Parâmetros de validação das estruturas antes e após refinamento com locPREFMD, obtidos através do MolProbity, QMEAN e VoroMQA. (D) Estrutura secundária dos fragmentos, coloridos de acordo com a qualidade local, onde laranja indica uma pior qualidade e azul representa uma melhor.

A etapa seguinte consistiu no *docking* dos fragmentos à NRR. Inicialmente, os modelos foram submetidos ao ClusPro em dois modos distintos. Enquanto o modo normal não conseguiu gerar complexos com interfaces compatíveis com a do complexo BRON-NRR, o modo anticorpo demonstrou maior semelhança (Figura 47A). Vale ressaltar que, na validação realizada previamente com o complexo 3L95, os dois modos do ClusPro conseguiram gerar poses de alta qualidade.

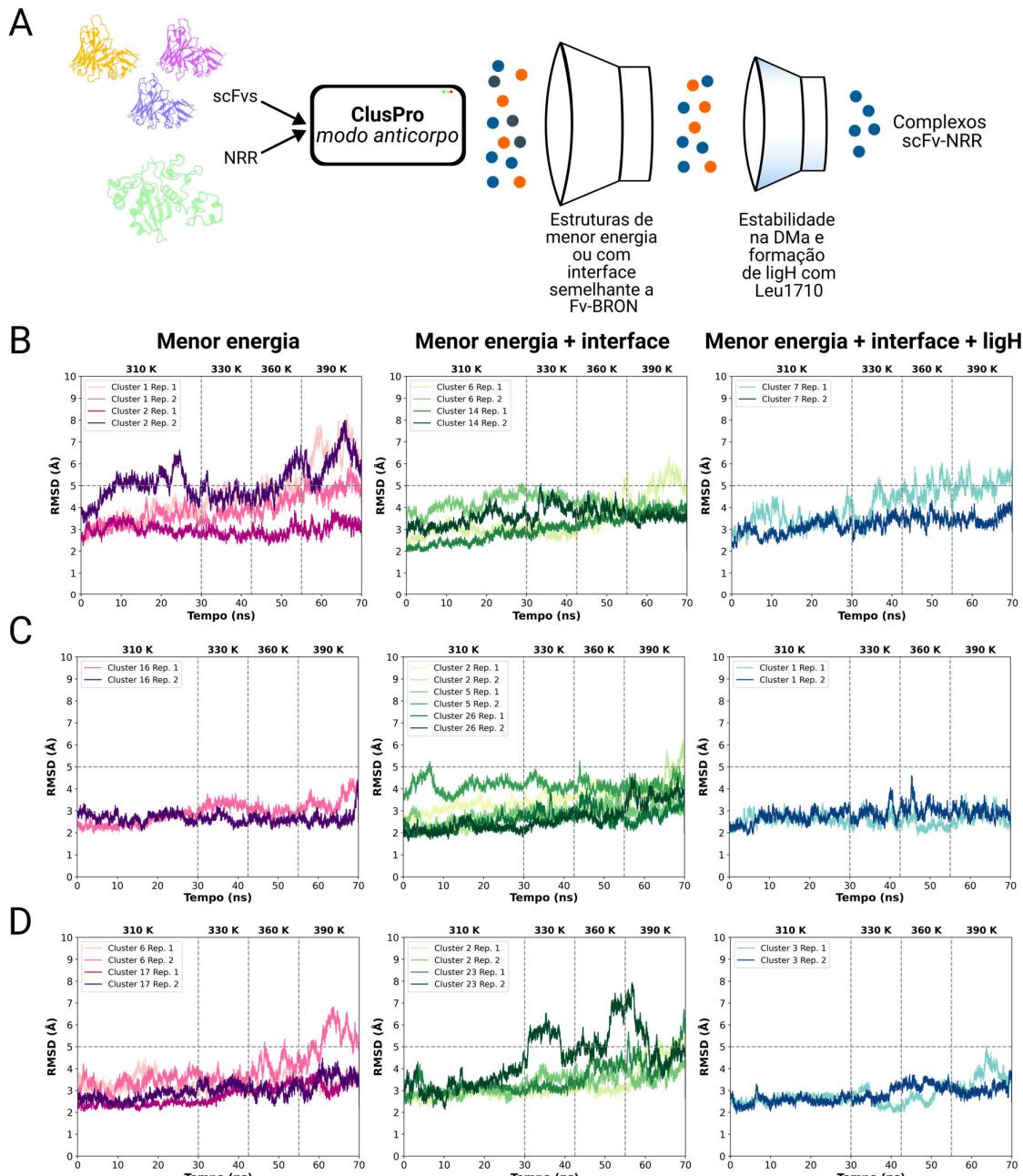
Dentre os complexos produzidos para cada scFv, foram selecionados cinco para submissão à DMA com base nas seguintes especificações: menor energia, similaridade da interface com o BRON-NRR e a formação de interações com o resíduo Leu1710 do NRR, conforme identificado pela análise de PDBSum (Apêndice P,Q). O cluster 7 para o scFv com *linker* de 9 resíduos, o cluster 1 para o *linker* de 12 resíduos, e o cluster 3 para o *linker* de 15 resíduos atenderam aos critérios definidos (Figura 47B-D). Conformações de baixa energia ligadas a epítocos alternativos também foram identificadas, como nos casos do cluster 16 (scFv12) e do cluster 17 (scFv15). Esses complexos demonstraram estabilidade durante as simulações de aquecimento, sugerindo que outros epítocos no NRR podem ser alvos viáveis para interações estáveis.

Não obstante, apesar da metodologia de DMA ser eficaz na redução das múltiplas poses geradas por programas de *docking* àquelas que se assemelham à conformação cristalográfica, ela ainda pode apresentar falsos positivos que se mantêm estáveis durante o aquecimento (Chaves *et al.*, 2020). Considerando o mecanismo inibitório previamente descrito para o Fv de BRON, seguiu-se com a análise das poses que permaneceram estáveis ao longo da DMA e que mostraram capacidade de interagir com o epítoco-alvo.

Assim como no complexo BRON-NRR, foi analisada a contribuição das CDRs para a interface e o perfil químico dos resíduos nos complexos scFv-antígeno. Observou-se uma menor dependência da CDR-H2 para a interação, que, no Fv, era responsável por 38% dos resíduos de interface. Nos scFvs com *linkers* de 9, 12 e 15 resíduos, essa contribuição foi reduzida para 7%, 10% e 18%, respectivamente (Figura 48A-C). No scFv com *linker* de 9 resíduos, a interface foi dominada pela CDR-L1, que não havia desempenhado um papel significativo no fragmento de duas cadeias. No scFv com *linker* de 12 resíduos, a interação foi majoritariamente mediada pelas CDRs H3 e L1. Já no scFv com *linker* de 15 resíduos, a interface

apresentou uma distribuição equilibrada entre as CDRs, com leve predominância da cadeia pesada.

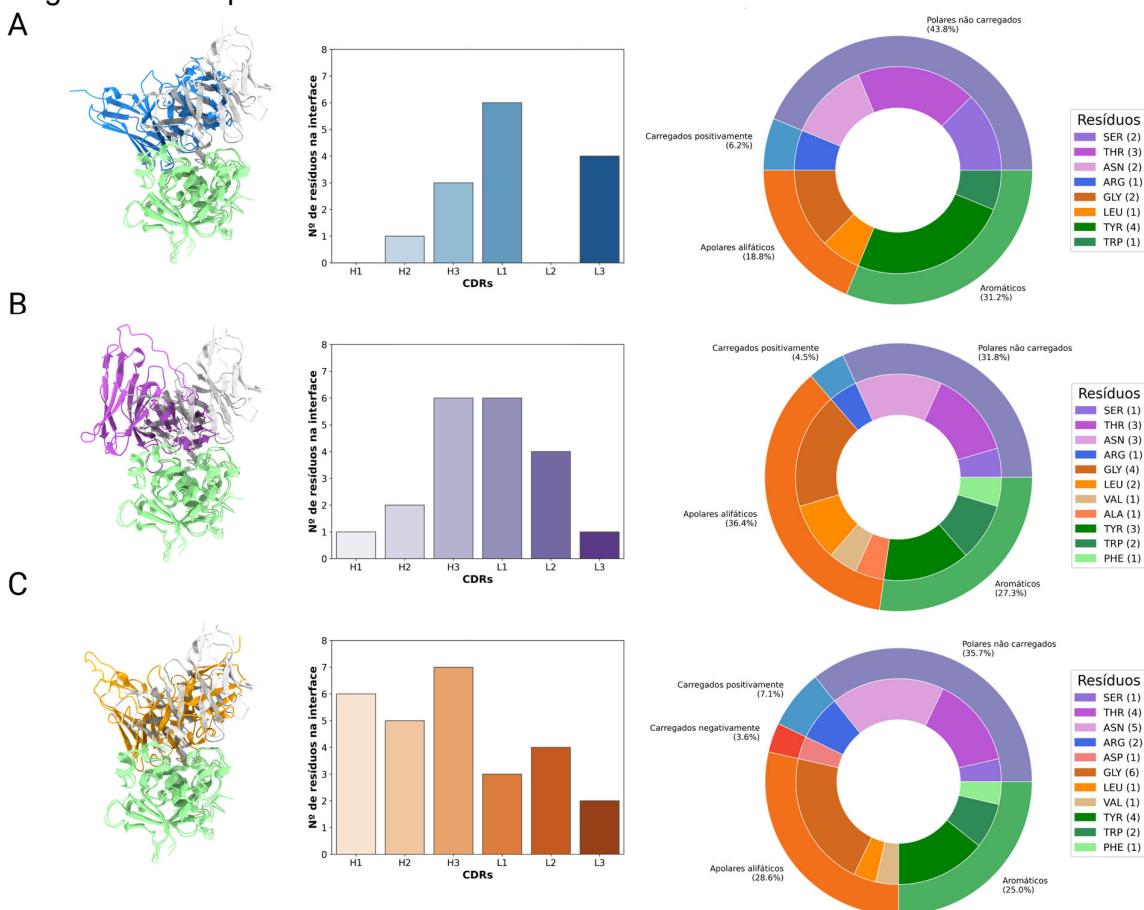
Figura 47. Validação dos complexos de fragmentos de anticorpo com BRON



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Filtro para seleção de complexos scFv-NRR. As estruturas de menor energia ou com interface similar ao complexo entre Fv de BRON e NRR, geradas pelo ClusPro no modo anticorpo, foram submetidas a simulações com aquecimento, em duplicatas, e selecionadas de acordo com a estabilidade e formação de ligH com Leu1710. RMSD dos complexos scFv-NRR para os fragmentos com *linker* de (B) 9, (C) 12 e (D) 15 resíduos.

O perfil químico da interface do scFv com *linker* de 15 resíduos foi o mais próximo do observado no Fv, sendo predominantemente composto por resíduos polares não carregados, seguidos por quantidades semelhantes de resíduos apolares alifáticos e aromáticos. No scFv com *linker* de 12 resíduos, observou-se um aumento na presença de resíduos apolares alifáticos na interface. Já no scFv com *linker* de 9 resíduos, a interface foi formada, predominantemente, por aminoácidos polares não carregados, seguidos dos aromáticos. É importante destacar que essa composição, assim como a pose de interação, pode ser modificada pela multimerização do fragmento de *linker* mais curto.

Figura 48. Complexos entre os scFvs e NRR



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Alinhamento dos complexos scFv-NRR à BRON-NRR, com o antígeno colorido em verde claro, o Fv colorido em cinza, e os scFvs com *linker* de (A) 9, (B) 12 e (C) 15 resíduos coloridos em azul, roxo e laranja, respectivamente. Ao lado, estão contabilizadas as contribuições das CDRs para interface scFv-NRR, e a composição química do parátopo.

Os complexos foram submetidos a simulações de 400 ns para avaliar a estabilidade, acessibilidade do sítio S2 e a amostragem conformacional, em

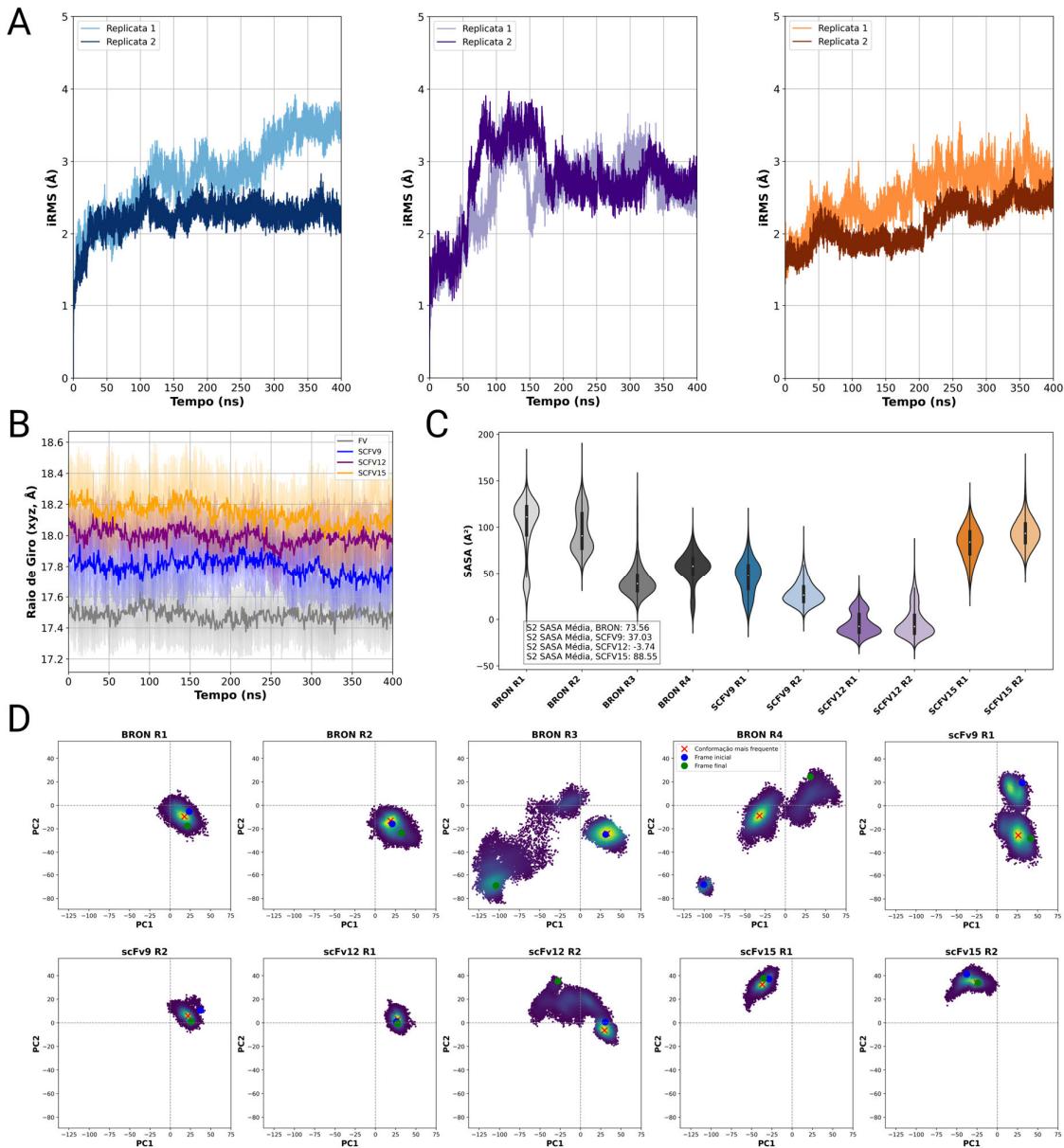
comparação com o Fv de BRON. Em todos os casos, o iRMS permaneceu abaixo de 5 Å (Figura 49A). Embora tenha sido observado um aumento na replicata 2 do scFv9 e em ambas as replicatas do scFv12, isso não resultou em maior acessibilidade do S2, analisada comparativamente nos gráficos de violino (Figura 49C).

Contrariamente, o scFv12 teve os menores valores de acessibilidade, inclusive apresentando SASA média negativa, o que pode ser atribuído a artefatos do algoritmo LCPO quando utilizado no cálculo de área acessível em fragmentos de um sistema (Weiser; Shenkin; Still, 1999). Assim, pode-se inferir que a variação observada na interface desse fragmento entre 50 e 200 ns, seguida pela estabilização em torno de 3 Å em relação à conformação inicial de *docking*, reflete uma transição da interface para um estado estável, que prevalece pelos 200 ns finais de simulação e resulta em maior ocupação do espaço ao redor do sítio S2.

O cálculo do raio de giro indicou que a introdução dos *linkers* resultou em uma diminuição da compactação entre  $V_H$  e  $V_L$  (Figura 49B). Tal redução foi inversamente proporcional ao comprimento do fragmento utilizado para conectar os domínios variáveis e está de acordo com os achados de Arai e colaboradores (2004), que indicaram que um maior raio de giro está associado a um aumento da distância entre os domínios de uma proteína de fusão. Essa separação pode ter influenciado a capacidade do scFv15 de obstruir o sítio S2, indicado pela análise de SASA. Não obstante, a manutenção do raio de giro em patamares semelhantes mesmo com as variações de iRMS reforçam que a alteração da interface não decorre de um processo de desnaturação (Starzyk; Cieplak, 2011)

A PCA é uma ferramenta eficaz para decodificar os movimentos em conjuntos de conformações, como nas trajetórias de simulação (Orellana *et al.*, 2016). Ao projetar o comportamento conformacional de NRR nas simulações dos fragmentos de cadeia simples e o de duas cadeias sobre mesmo espaço bidimensional, observou-se que, apesar de uma variação abrupta de RMSD entre 50 e 200 ns para o scFv12, essa variação resultou apenas em uma alteração conformacional do antígeno na segunda replicata, que passou a ocupar posições também encontradas nas simulações com o scFv15 (Figura 49C). Este último apresentou variações de iRMS inferiores a 3,5 Å e acessibilidade ao S2 superior à observada no Fv, embora ainda menor do que na média das simulações com o NRR livre.

Figura 49. Simulações de DM com os complexos scFv-NRR.



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) iRMS dos sistemas contendo os scFvs com *linker* de 9,12 e 15 aminoácidos, coloridos em azul, roxo e laranja, respectivamente. (B) Raio de giro do Fv e dos scFvs ao longo das simulações com NRR. (C) Gráfico de violino da área de superfície acessível ao solvente do sítio S2 de NRR em complexo com Fv de BRON e com os scFvs. (C) PCA de NRR, obtido a partir de diagonalização das trajetórias de Fv-BRON e scFvs-BRON.

Também foi identificado um aumento do iRMS nos últimos 100 ns de simulação do scFv9 replicata 1, acompanhado por uma transição nos valores de PC2, que passaram a amostrar regiões predominantemente observadas nas replicatas de DM do Fv, aproximando-se também nos valores de SASA do sítio S2.

Ao avaliar os quadrantes formados pelos dois primeiros componentes principais, observou-se que o antígeno, quando complexado ao Fv, tende a ocupar principalmente o quadrante inferior direito, com algumas incursões para o inferior esquerdo. Os scFv9 e scFv12 apresentam regiões de interseção com o Fv.

A replicata 1 do scFv9 transiciona para o quadrante inferior direito, enquanto a replicata 2 do mesmo fragmento e a replicata 1 do scFv12 demonstram uma restrição conformacional mais significativa. Por outro lado, a replicata 2 do scFv12 transiciona para o quadrante superior esquerdo, o que não resulta em um aumento do RMSD de interface nem em maior acessibilidade ao S2. Curiosamente, esse quadrante também foi amostrado nas replicatas do scFv15, onde está associado a valores mais altos de SASA no sítio S2. Essa análise evidencia a diversidade de comportamentos conformacionais de NRR proporcionados pelos diferentes ligantes.

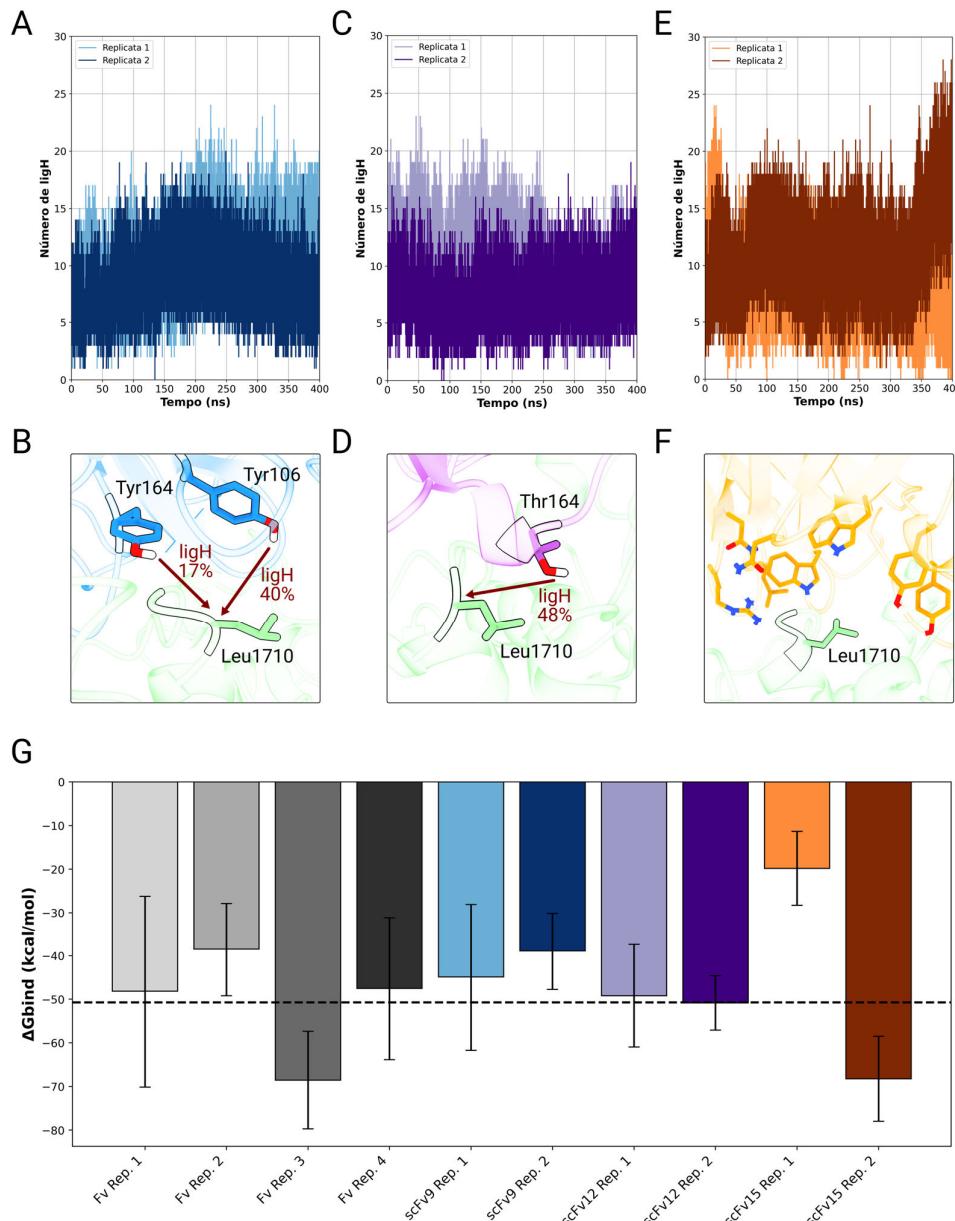
A fim de investigar as causas e efeitos das alterações conformacionais detectadas por PCA e pela análise de RMSD, foi realizada a avaliação da formação de ligações de hidrogênio e da energia de interação entre os diferentes scFvs e o NRR (Figura 50). O scFv com *linker* de 15 resíduos apresentou o maior número total de ligH entre o fragmento e o antígeno, atingindo um máximo de 28 interações (Figura 50E). Contudo, nenhuma ligação de hidrogênio estável foi observada com Leu1710, o que pode justificar os valores mais elevados de acessibilidade à região S2, em comparação com os demais scFvs (Figura 50F).

Os fragmentos com *linkers* de 9 e 12 resíduos registraram valores máximos de 23 e 24 ligH, respectivamente, além de apresentarem ligações de hidrogênio estáveis com Leu1710 (Figura 50A-D). No scFv9, as ligações foram mediadas pelos resíduos Tyr106 e Tyr164, enquanto no scFv12, a interação estável ocorreu com Thr164. Isso reforça a relevância de resíduos doadores de ligH na posição 164 para a formação de interações com o sítio S2 do NRR. Em contrapartida, o aminoácido 164 do scFv15 é uma alanina, cuja cadeia lateral é composta por grupamento metílico incapaz de formar ligH (Gaur; Klotz, 2004).

A menor acessibilidade de S2 observada no scFv12 correlaciona-se, também, com os valores médios de  $\Delta G_{bind}$ , que se aproximaram dos resultados médios obtidos com o Fv de BRON (Figura 50G). Já o aumento no número total de ligH na replicata 2 do scFv15 ajuda a explicar a discrepância nos valores de  $\Delta G_{bind}$  entre as replicatas, apesar dos comportamentos conformacionais semelhantes do

NRR em ambas.

Figura 50. Ligações de hidrogênio relevantes entre scFv e BRON e energia de interação



Fonte: elaborado pelo autor (2024). Número de ligações de hidrogênio entre NRR e os scFvs com *linkers* de (A) 9, (C) 12 e (E) 15 ao longo das duas replicatas de 400 ns. Interfaces scFv-antígeno, com enfoque nas ligH formadas a partir de resíduos do (B) scFv9 e do (D) scFv12. (F) Como não foram identificadas ligações de hidrogênio entre o scFv15 e NRR, estão ilustrados os resíduos até 5 Å de distância do sítio S2. (G) Energia de interação, calculada por MM/GBSA nas réplicas de simulação, do Fv de BRON e dos fragmentos derivados. A linha preta tracejada indica a média de  $\Delta G_{bind}$  entre as quatros DM de BRON-NRR.

As variações nos valores de energia livre de interação obtidos por

MM/GBSA entre réplicas de dinâmica molecular podem ser atribuídas a uma série de fatores, incluindo a natureza estocástica das simulações, cujas trajetórias podem variar devido às condições iniciais e às forças aleatórias que atuam no sistema (Frenkel; Smit; Ratner, 1997). Essa variabilidade pode resultar em diferentes estados conformacionais dos complexos entre réplicas, afetando os valores de energia livre de ligação calculados conforme observado na análise de Salih (2022).

Portanto, considerando o mecanismo de inibição proposto para o Brontictuzumabe, pode-se inferir, com base em dados teóricos, que o scFv com peptídeo ligante de 12 aminoácidos é aquele que mais se aproximaria dos efeitos inibitórios proporcionados pelo anticorpo. O *linker* de 12 resíduos garante a expressão de um fragmento monomérico funcional que, pela formação de uma ligação de hidrogênio estável com Leu1710, consegue reduzir a acessibilidade de S2 a valores inferiores aos encontrados no complexo com o Fv de BRON.

Essa interação, associada ao  $\Delta G_{bind}$ , indica que esse scFv é um fragmento promissor para aplicação terapêutica em construções mono ou biespecíficas, ou até mesmo para fins diagnósticos. Além disso, esses resultados sugerem que um peptídeo ligante de 12 aminoácidos poderia ser utilizado no desenho de scFvs baseados nas estruturas desenvolvidas a partir do Brontictuzumabe, como as sugeridas neste trabalho.

De forma global, os anticorpos otimizados e fragmentos de anticorpo propostos constituem bases para novos estudos de maturação de afinidade *in silico* e *in vitro*, e podem representar um avanço no desenvolvimento de antagonistas de Notch1. As metodologias computacionais aplicadas, de forma integrada, representam uma *pipeline* promissora para a compreensão do mecanismo molecular de inibição de um biofarmacêutico, como o Brontictuzumabe, bem como para aplicação no desenho de *biobetters*.

Não obstante, técnicas recentes baseadas em modelos de linguagem específicos para anticorpos e difusão de proteínas podem ser adicionadas a esse fluxo de trabalho, de forma a obter otimizações mais significativas da afinidade (Peng *et al.*, 2023; Luo *et al.*, 2022). Vale ressaltar que muitos dos modelos obtidos através de tais metodologias, que fazem uso de aprendizado profundo, ainda precisam ser validados experimentalmente. Além disso, o uso dessas ainda é, por vezes, limitado pelos conjuntos de dados utilizados em seu treinamento, que podem variar em qualidade ou serem específicos a um estudo em questão, levando a uma

alta taxa de falha quando utilizado em outras aplicações (Bennet *et al.*, 2024; Bennett *et al.*, 2023).

Em contrapartida, estudos envolvendo enxerto e otimização de CDRs que integram avaliações conformacionais encontraram sucesso na maturação de afinidade de anticorpos, especialmente em aplicações recentes contra a proteína Spike de SARS-CoV-2 (Boorla *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2023; Ferraz *et al.*, 2024). Dessa forma, o desenho de medicamentos baseado em estrutura aplicado à anticorpos tem demonstrado eficácia na seleção precisa de painéis de variantes com afinidade otimizada (Cannon *et al.*, 2019).

A proposição de novas terapias que tenham como alvo Notch1 tem repercussões em diferentes tipos de câncer. Destaca-se o seu impacto sobre os pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células T, uma neoplasia agressiva, que incide principalmente em crianças e adolescentes (Lima, 2015). Nessa malignidade, cerca de metade dos pacientes são carreadores de mutações em NRR que diminuem a proteção contra clivagem proteolítica independente de ligante em S2 (Weng *et al.*, 2004). O uso de derivados do Brontictuzumabe direcionados à NRR constitui, portanto, uma opção de terapia-alvo promissora não apenas para esse subtipo cancerígeno, mas para diversas outras malignidades que envolvem alterações na via de Notch (Cordo *et al.*, 2021; Ferrarotto *et al.*, 2018).

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, metodologias computacionais foram aplicadas para explorar e otimizar a interação do Brontictuzumabe com seu alvo, o domínio regulatório negativo de Notch1, visando o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos. A investigação permitiu identificar os principais determinantes estruturais e energéticos dessa interação, além de estabelecer estratégias para aprimorar sua afinidade e estabilidade.

O Fv do anticorpo foi modelado e utilizado em um ensaio validado de *docking* para elucidar as interações moleculares do complexo Brontictuzumabe-NRR. Simulações com aquecimento e simulações convencionais estendidas demonstraram que o modo de interação anticorpo-antígeno proposto é estável. A análise energética e estrutural sugeriu um possível mecanismo inibitório de Notch1 por BRON baseado no impedimento estérico do acesso da protease ADAM à S2 (Leu1710-Gly1711). Esse sítio de clivagem, localizado na cavidade entre os domínios LNR e HD, é o principal alvo da CDR-H2 do anticorpo, que contribui significativamente para a energia de interação. A avaliação conformacional indicou que o anticorpo modula NRR através de um mecanismo misto, combinando seleção conformacional e ajuste induzido.

As conformações predominantes do complexo foram identificadas, servindo de base para a otimização racional do anticorpo. A aplicação das técnicas de mutagênese de saturação, enxerto de CDRs, dobramento inverso e modelos de linguagem resultou em um conjunto de 10.072 mutantes. A mutagênese revelou *hot-spots* nos resíduos Thr28, Thr74, Gly101 e Gly104 de V<sub>H</sub>, além de Gly52 de V<sub>L</sub>. Modificações em tais posições estão associadas a redução da energia de interação. Considerando a baixa contribuição da cadeia leve para interface, o enxerto de CDRs foi empregado na otimização do parátopo. O desenho AbSeldon R3 destacou-se por apresentar interações adicionais partindo das CDRs L1 e L3, estabilidade em simulações prolongadas e valores de  $\Delta G_{bind}$  e acessibilidade ao sítio S2 comparáveis ao anticorpo nativo, sendo considerado um candidato de *biobetter* promissor.

Em trabalhos futuros, a validação desse modelo deve incluir novas avaliações *in silico*, além de testes enzimáticos e celulares. Ensaios como o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) permitirão a análise qualitativa e quantitativa da interação com o antígeno, enquanto experimentos celulares poderão avaliar diretamente o impacto da inibição de Notch1 sobre a proliferação e metabolismo de

linhagens de células tumorais. Dentre estas, destacam-se CCRF-CEM e JM/JURKAT no estudo da Leucemia Linfocítica Aguda de Células T, que frequentemente apresenta mutações ativadoras em NRR.

Além disso, foram desenvolvidos fragmentos de anticorpo baseados no Brontictuzumabe. A análise de diferentes *linkers* apontou que o scFv com um peptídeo de 12 aminoácidos teve a maior estabilidade, mantendo um  $\Delta G_{bind}$  semelhante ao anticorpo nativo e interagindo com Leu1710. Esse formato é considerado adequado para expressão de scFvs monoméricos funcionais, com a vantagem de permitir uma produção mais eficiente e escalonável. Dessa forma, o fragmento tem potencial para atuar em construções mono ou biespecíficas, além de atuar como carreador de pequenas moléculas inibidoras, ampliando o hall de aplicações terapêuticas do Brontictuzumabe.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKI, S.; HAKEMI, M. G.; GANJALIKHANY, M. R. An in silico investigation on the binding site preference of PD-1 and PD-L1 for designing antibodies for targeted cancer therapy. **PLoS ONE**, v. 19, n. 7, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0304270>. Acesso em: 12 jul. 2024.
- ABHINANDAN, K. R.; MARTIN, A. C. R. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 14, p. 3832–3839, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.05.022>. Acesso em: 16 set. 2024.
- ABHINANDAN, K. R.; MARTIN, A. C. R. Analysis and prediction of VH/VL packing in antibodies. **Protein Engineering Design & Selection**, v. 23, n. 9, p. 689–697, 30 jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/gzq043>. Acesso em: 16 set. 2024.
- ADOLF-BRYFOGLE, J. *et al.* RosettaAntibodyDesign (RAbD): A general framework for computational antibody design. **PLOS Computational Biology**, v. 14, n. 4, p. e1006112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006112>. Acesso em: 16 fev. 2024.
- AGNUSDEI, V. *et al.* Dissecting molecular mechanisms of resistance to Notch1-targeted therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia xenografts. **Haematologica**, p. haematol.2019.217687, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.217687>. Acesso em: 11 jan. 2025.
- AGNUSDEI, V. *et al.* Therapeutic antibody targeting of Notch1 in T-acute lymphoblastic leukemia xenografts. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 278–288, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.183>. Acesso em: 19 jan. 2025.
- AGUILAR RANGEL, M. *et al.* Fragment-based computational design of antibodies targeting structured epitopes. **Science Advances**, v. 8, n. 45, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abp9540>. Acesso em: 30 ago. 2024.
- AHN, J. *et al.* Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. **Biomaterials**, v. 39, p. 23–30, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.069>. Acesso em: 10 dez. 2024.
- AHN, M. *et al.* Tarlatamab for Patients with Previously Treated Small-Cell Lung Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 389, n. 22, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2307980>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- AHO, N.; GROENHOF, G.; BUSLAEV, P. Do All Paths Lead to Rome? How Reliable is Umbrella Sampling Along a Single Path? **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.4c00134>. Acesso em: 12 set. 2024.
- AKBAR, R. *et al.* A compact vocabulary of paratope-epitope interactions enables predictability of antibody-antigen binding. **Cell Reports**, v. 34, n. 11, p. 108856, 16

mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108856>. Acesso em: 10 jun. 2024.

AKIYOSHI, T. *et al.*  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Enhance Taxane-Induced Mitotic Arrest and Apoptosis in Colon Cancer Cells. **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 131–144, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.008>. Acesso em: 31 maio 2024.

AL QARAGHULI, M.; KUBIAK-OSSOWSKA, K.; MULHERAN, P. Thinking outside the Laboratory: Analyses of Antibody Structure and Dynamics within Different Solvent Environments in Molecular Dynamics (MD) Simulations. **Antibodies**, v. 7, n. 3, p. 21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antib7030021>. Acesso em: 16 fev. 2024.

ALBERTS, B. *et al.* The Generation of Antibody Diversity. **Molecular Biology of the Cell**. [S.I.]: Garland Science, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26860/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

ALBUQUERQUE, A. de O. *et al.* Computationally-obtained structural insights into the molecular interactions between Pidilizumab and binding partners DLL1 and PD-1. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 14, p. 6450–6462, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1885492>. Acesso em: 22 nov. 2023.

ALFORD, R. F. *et al.* The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 6, p. 3031–3048, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00125>. Acesso em: 13 ago. 2024.

ALLENSPACH, E. J. *et al.* Notch Signaling in Cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 466–476, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cbt.1.5.159>. Acesso em: 16 jun. 2024.

AMAR, S.; DMITRIY MINOND; FIELDS, G. B. Clinical Implications of Compounds Designed to Inhibit ECM-Modifying Metalloproteinases. **PROTEOMICS**, v. 17, n. 23-24, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201600389>. Acesso em: 31 maio 2024.

ANDERSEN, P. *et al.* Non-Canonical Notch Signaling: Emerging Role and Mechanism. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 257–265, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348455/>. Acesso em: 12 ago. 2024.

AOKI, S. *et al.* Aberrant activation of Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathological features and therapeutic potential for cancer stem cell-like properties. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2919-4>. Acesso em: 18 abr. 2024.

ÅQVIST, J. *et al.* Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. **Chemical Physics Letters**, v. 384, n. 4, p. 288–294, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.039>. Acesso em: 19 mar. 2024.

- ARAI, R. *et al.* Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. **Proteins Structure Function and Bioinformatics**, v. 57, n. 4, p. 829–838, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.20244>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- ARSLAN, M. *et al.* Effect of non-repetitive linker on in vitro and in vivo properties of an anti-VEGF scFv. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 5449, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09324-4>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- ARUNAN, E. *et al.* Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 8, p. 1637–1641, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/pac-rec-10-01-02>. Acesso em: 16 fev. 2024.
- ASNAFI, V. *et al.* NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 3918–3924, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-184069>. Acesso em: 10 fev. 2024.
- ASTER, J. C.; PEAR, W. S.; BLACKLOW, S. C. The Varied Roles of Notch in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 12, n. 1, p. 245–275, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100127>. Acesso em: 11 maio 2024.
- ASTUDILLO, L. *et al.* The Small Molecule IMR-1 Inhibits the Notch Transcriptional Activation Complex to Suppress Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 76, n. 12, p. 3593–3603, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-0061>. Acesso em: 11 nov. 2024.
- AYYANAN, A. *et al.* Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast epithelial cells by a Notch-dependent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 10, p. 3799–3804, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0600065103>. Acesso em: 11 nov. 2024.
- BADAR, M. S. *et al.* Molecular Dynamics Simulations: Concept, Methods, and Applications. **Integrated Science**, p. 131–151, 1 jan. 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-94651-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-94651-7_7). Acesso em: 10 dez. 2024.
- 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, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>. Acesso em: 9 dez. 2024.
- BALTRUKEVICH, H.; PODLEWSKA, S. From Data to Knowledge: Systematic Review of Tools for Automatic Analysis of Molecular Dynamics Output. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 10 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.844293>. Acesso em: 11 jan. 2025.
- BÁRCENAS, O. *et al.* Aggescan4D: structure-informed analysis of pH-dependent protein aggregation. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W170–W175, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae382>. Acesso em: 30 dez. 2024.
- BAROZET, A.; CHACÓN, P.; CORTÉS, J. Current approaches to flexible loop

modeling. **Current Research in Structural Biology**, v. 3, p. 187–191, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2021.07.002>. Acesso em: 1 nov. 2023.

BASELGA, J.; ALBANELO, J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. **Annals of Oncology**, v. 12, n. suppl 1, p. S35–S41, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl\\_1.s35](https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_1.s35). Acesso em: 1 out. 2024.

BASHFORD, D.; CASE, D. A. Generalized Born Models Of Macromolecular Solvation Effects. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 129–152, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.51.1.129>. Acesso em: 20 out. 2024.

BASU, S.; WALLNER, B. DockQ: A Quality Measure for Protein-Protein Docking Models. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161879>. Acesso em: 11 ago. 2024.

BATOOL, M.; AHMAD, B.; CHOI, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2783, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20112783>. Acesso em: 22 maio 2024.

BECK, A. Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. **mAbs**, v. 3, n. 2, p. 107–110, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.14785>. Acesso em: 11 dez. 2023.

BEDOGNI, B. *et al.* Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3660–3670, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci36157>. Acesso em: 15 jan. 2024.

BEHRING; KITASATO. Ueber das zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 16, p. 1113–1114, 1890. Disponível em: <https://doi.org/10.17192/eb2013.0164>. Acesso em: 1 dez. 2022.

BENESTY, J. *et al.* Pearson Correlation Coefficient. **Noise Reduction in Speech Processing**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00296-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00296-0_5). Acesso em: 1 out. 2023.

BENNETT, N. *et al.* Improving *de novo* Protein Binder Design with Deep Learning. **Nature Communications**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.06.15.495993>. Acesso em: 30 dez. 2024.

BERA, T. K. *et al.* A bivalent disulfide-stabilized fv with improved antigen binding to erbB2. **Journal of Molecular Biology**, v. 281, n. 3, p. 475–483, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1948>. Acesso em: 15 set. 2023.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/j100308a038>. Acesso em: 10 dez. 2023.

BERNASCONI-ELIAS, P. *et al.* Characterization of activating mutations of NOTCH3 in T-cell acute lymphoblastic leukemia and anti-leukemic activity of NOTCH3

- inhibitory antibodies. **Oncogene**, v. 35, n. 47, p. 6077–6086, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2016.133>. Acesso em: 31 maio 2021.
- BHARDWAJ, P. *et al.* Exploration of binding mechanism of triclosan towards cancer markers using molecular docking and molecular dynamics. **Chemosphere**, v. 293, p. 133550–133550, 1 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133550>. Acesso em: 10 set. 2024.
- BHAT, V. *et al.* Notch-Induced Expression of FZD7 Requires Noncanonical NOTCH3 Signaling in Human Breast Epithelial Cells. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0315>. Acesso em: 10 set. 2024.
- BIGAS, A.; ESPINOSA, L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3226–3235, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-355826>. Acesso em: 11 set. 2024.
- BLANK, V.; KOURILSKY, P.; ISRAËL, A. NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 4, p. 135–140, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90321-Y](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90321-Y). Acesso em: 11 out. 2024.
- BOEHR, D. D.; NUSSINOV, R.; WRIGHT, P. E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 11, p. 789–796, 10 out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.232>. Acesso em: 9 dez. 2023.
- BOLÓS, V.; GREGO-BESSA, J.; POMPA, J. L. Notch Signaling in Development and Cancer. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 3, p. 339–363, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2006-0046>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- BOORLA, V. S. *et al.* De novo design and Rosetta-based assessment of high-affinity antibody variable regions (Fv) against the SARS-CoV -2 spike receptor binding domain (RBD). **Proteins (Print)**, v. 91, n. 2, p. 196–208, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.26422>. Acesso em: 12 jun. 2024.
- BOROSS, P.; LEUSEN, J. H. W. Boosting antibody therapy with complement. **Blood**, v. 119, n. 25, p. 5945–5947, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-420760>. Acesso em: 10 fev. 2024.
- BORTHAKUR, G. *et al.* Phase 1 study to evaluate Crenigacestat (LY3039478) in combination with dexamethasone in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. **Cancer**, v. 127, n. 3, p. 372–380, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.33188>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**. [S.l: s.n.], 1988. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicao.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm). Acesso em: 6 set. 2024.
- BRAY, S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2009>. Acesso em: 10 maio 2024.

BRINKMANN, U.; KONTERMANN, R. E. The making of bispecific antibodies. **mAbs**, v. 9, n. 2, p. 182–212, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>. Acesso em: 1 maio 2024.

BRÜCKNER, K. et al. Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch–Delta interactions. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 411–415, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35019075>. Acesso em: 1 set. 2023.

BÜCHLER, P. et al. The Notch Signaling Pathway Is Related to Neurovascular Progression of Pancreatic Cancer. **Annals of surgery**, v. 242, n. 6, p. 791–801, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000189115.94847.f1>. Acesso em: 1 dez. 2023.

BUCKLE, A. M.; SCHREIBER, G.; FERSHT, A. R. Protein-protein recognition: Crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-.ANG. resolution. **Biochemistry**, v. 33, n. 30, p. 8878–8889, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00196a004>. Acesso em: 5 jan. 2024.

BUJAK, E. et al. Reformatting of scFv Antibodies into the scFv-Fc Format and Their Downstream Purification. **Methods in molecular biology**, p. 315–334, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_20). Acesso em: 1 maio 2024.

BURKS, E. A. et al. *In vitro* scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 2, p. 412–417, 21 jan. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.412>. Acesso em: 2 fev. 2024.

BURLEY, S. K. et al. Impact of structural biology and the protein data bank on us fda new drug approvals of low molecular weight antineoplastic agents 2019–2023. **Oncogene**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41388-024-03077-2>. Acesso em: 10 jan. 2025.

CALDARARU, O.; BLUNDELL, T. L.; KEPP, K. P. A base measure of precision for protein stability predictors: structural sensitivity. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, 25 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04030-w>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CANALIS, E.; ZANOTTI, S. Hairy and Enhancer of Split-Related With YRPW Motif-Like (HeyL) Is Dispensable for Bone Remodeling in Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 7, p. 1819–1826, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.25859>. Acesso em: 20 fev. 2024.

CANNON, D. A. et al. Experimentally guided computational antibody affinity maturation with de novo docking, modelling and rational design. **PLOS Computational Biology**, v. 15, n. 5, p. e1006980, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006980>. Acesso em: 1 out. 2022.

CASE, D. A. et al. **Amber 2018**. [S.I.]: University of California, San Francisco, 2018.

CASULO, C. et al. Safety and Preliminary Efficacy Results of a Phase I First-in-Human Study of the Novel Notch-1 Targeting Antibody Brontictuzumab (OMP-

52M51) Administered Intravenously to Patients with Hematologic Malignancies.

**Blood**, v. 128, n. 22, p. 5108–5108, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.5108.5108>. Acesso em: 1 mar. 2024.

CERAMI, E. *et al.* The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401–404, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-12-0095>. Acesso em: 15 jan. 2024.

CHAMBERLIN, A. *et al.* Mapping the Gating and Permeation Pathways in the Voltage-Gated Proton Channel Hv1. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 1, p. 131–145, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.018>. Acesso em: 10 maio 2024.

CHATTERJEE, S. *et al.* A computational investigation of thermodynamics, structure, dynamics and solvation behavior in modified water models. **Journal of Chemical Physics**, v. 128, n. 12, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.2841127>. Acesso em: 15 jan. 2024.

CHAVES, B. *et al.* Guidelines To Predict Binding Poses of Antibody–Integrin Complexes. **ACS Omega**, v. 5, n. 27, p. 16379–16385, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00226>. Acesso em: 10 fev. 2024.

CHEN, P.-M. *et al.* Down-regulation of Notch-1 expression decreases PU.1-mediated myeloid differentiation signaling in acute myeloid leukemia. **International Journal of Oncology**, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.32.6.1335>. Acesso em: 10 maio 2024.

CHENG, X.; IVANOV, I. Molecular Dynamics. **Methods in molecular biology**, p. 243–285, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-050-2_11). Acesso em: 1 maio 2024.

CHIOREAN, E. G. *et al.* A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (DII4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 12, p. 2695–2703, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-2797>. Acesso em: 5 dez. 2023.

CHOI, Y.; DEANE, C. M. FREAD revisited: Accurate loop structure prediction using a database search algorithm. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 6, p. 1431–1440, 24 nov. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.22658>. Acesso em: 10 jan. 2024.

CHOTHIA, C. *et al.* Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. **Nature**, v. 342, n. 6252, p. 877–883, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/342877a0>. Acesso em: 1 dez. 2023.

CHU, D. *et al.* Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 11, p. 2440–2447, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq776>. Acesso em: 1 dez. 2024.

CLARK, L. A. *et al.* Affinity enhancement of an in vivo matured therapeutic antibody

using structure-based computational design. **Protein Science**, v. 15, n. 5, p. 949–960, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1110/ps.052030506>. Acesso em: 12 dez. 2021.

CLIFFORD, J. et al. BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. **Protein Science**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.4497>. Acesso em: 2 out. 2024.

CODINA, N. et al. Insights into the stability of a therapeutic antibody Fab fragment by molecular dynamics and its stabilization by computational design. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/644369>. Acesso em: 1 nov. 2024.

COLEMAN, R. L. et al. Demcizumab combined with paclitaxel for platinum-resistant ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancer: The SIERRA open-label phase Ib trial. **Gynecologic oncology**, v. 157, n. 2, p. 386–391, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.01.042>. Acesso em: 1 dez. 2024.

CORDO, V. et al. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. **Blood Cancer Discovery**, v. 2, n. 1, p. 19–31, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2643-3230.bcd-20-0093>. Acesso em: 1 out. 2024.

CORREIA, I. Stability of IgG isotypes in serum. **mAbs**, v. 2, n. 3, p. 221–232, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mabs.2.3.11788>. Acesso em: 12 jan. 2024.

COSTA, S. **Caso com nota de ensino: o acesso a imunoterapia no Sistema Único de Saúde no Brasil: um desafio complexo**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso–Fundação Getulio Vargas, 2019. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10438/27994>. Acesso em: 13 dez. 2024.

COURTENAY-LUCK, N. S. et al. Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. **Cancer Research**, v. 46, n. 12 PT 1, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2430699/>. Acesso em: 1 dez. 2022.

COWAN, A. J. et al.  $\gamma$ -Secretase inhibitor in combination with BCMA chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy for individuals with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 1, first-in-human trial. **Lancet Oncology**, v. 24, n. 7, p. 811–822, 2023. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(23\)00246-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(23)00246-2). Acesso em: 1 out. 2024.

COX, M. M.; COX, T. J. Multidimensional Scaling. **Springer eBooks**, p. 315–347, 2008.

CUI, D. et al. Notch Pathway Inhibition Using PF-03084014, a  $\gamma$ -Secretase Inhibitor (GSI), Enhances the Antitumor Effect of Docetaxel in Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 20, p. 4619–4629, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0242>. Acesso em: 14 dez. 2024.

CUI, H. et al. Notch3 Functions as a Tumor Suppressor by Controlling Cellular Senescence. **Cancer Research**, v. 73, n. 11, p. 3451–3459, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-3902>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: AnN·log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.464397>. Acesso em: 1 out. 2022.

DAS, A. *et al.* A novel triazole, NMK-T-057, induces autophagic cell death in breast cancer cells by inhibiting  $\gamma$ -secretase-mediated activation of Notch signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 17, p. 6733–6750, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.007671>. Acesso em: 2 out. 2023.

DATTA-MANNAN, A. *et al.* Balancing charge in the complementarity-determining regions of humanized mAbs without affecting pI reduces non-specific binding and improves the pharmacokinetics. **mAbs**, v. 7, n. 3, p. 483–493, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1016696>. Acesso em: 31 maio 2023.

DAUPARAS, J. *et al.* Robust deep learning–based protein sequence design using ProteinMPNN. **Science**, v. 378, n. 6615, p. 49–56, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.add2187>. Acesso em: 15 nov. 2023.

DAVID, C. C.; JACOBS, D. J. Principal Component Analysis: A Method for Determining the Essential Dynamics of Proteins. **Protein Dynamics**, p. 193–226, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0_11). Acesso em: 15 jan. 2024.

DAVIES, D. R.; CHACKO, S. Antibody structure. **Accounts of Chemical Research**, v. 26, n. 8, p. 421–427, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ar00032a005>. Acesso em: 16 out. 2023.

DE BEER, T. A. P. *et al.* PDBsum additions. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D292–D296, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt940>. Acesso em: 12 set. 2024.

DE BRUIJN, I. *et al.* Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. **Cancer Research**, v. 83, n. 23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-23-0816>. Acesso em: 26 ago. 2023.

DE SOUSA LINHARES, A. *et al.* Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47910-1>. Acesso em: 1 dez. 2022.

DEANGELO, D. J. *et al.* A phase I clinical trial of the notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18\_suppl, p. 6585–6585, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18\\_suppl.6585](https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18_suppl.6585). Acesso em: 19 jan. 2024.

DEL CONTE, A. *et al.* RING 4.0: faster residue interaction networks with novel interaction types across over 35,000 different chemical structures. **Nucleic acids research**, n. W1, 30 abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae337>. Acesso em: 28 jun. 2024.

- DELGADO, J. *et al.* FoldX 5.0: working with RNA, small molecules and a new graphical interface. **Bioinformatics**, v. 35, n. 20, p. 4168–4169, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz184>. Acesso em: 15 jul. 2024.
- DEPETRIS, R. S. *et al.* Functional antibody characterization via direct structural analysis and information-driven protein-protein docking. **Proteins Structure Function and Bioinformatics**, v. 90, n. 4, p. 919–935, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.26280>. Acesso em: 1 out. 2024.
- DEVGAN, V. p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. **Genes & Development**, v. 19, n. 12, p. 1485–1495, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.341405>. Acesso em: 5 nov. 2024.
- DEXTER, J. S. The Analysis of a Case of Continuous Variation in Drosophila by a Study of Its Linkage Relations. **The American Naturalist**, v. 48, n. 576, p. 712–758, 1914. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/279446>. Acesso em: 1 jan. 2024.
- DHILLON, S. Moxetumomab Pasudotox: First Global Approval. **Drugs**, v. 78, n. 16, p. 1763–1767, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1000-9>. Acesso em: 19 jan. 2024.
- DIAS, D. Q. B.; KUDO, C. R. S.; GARCIA, D. M. Impacto de medicamentos biossimilares utilizados na imunoterapia contra o câncer de mama no Brasil. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 274, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31415/bjns.v3i1.80>. Acesso em: 15 nov. 2024.
- DIAZ-PADILLA, I. *et al.* A phase Ib combination study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, and temsirolimus in patients with advanced solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 5, p. 1182–1191, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-013-0001-5>. Acesso em: 1 nov. 2023.
- DICKOPF, S.; GEORGES, G. J.; BRINKMANN, U. Format and geometries matter: Structure-based design defines the functionality of bispecific antibodies. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 1221–1227, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.006>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- DOLEZAL, O. *et al.* ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in VL to VH orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 13, n. 8, p. 565–574, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/13.8.565>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- DOLINSKY, T. J. *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. suppl\_2, p. W665–W667, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>. Acesso em: 5 nov. 2022.
- DOURADO, D. F. A. R.; FLORES, S. C. A multiscale approach to predicting affinity changes in protein-protein interfaces. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 82, n. 10, p. 2681–2690, 5 jul. 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/prot.24634>. Acesso em: 16 jan. 2024.

DREYER, F. A. *et al.* Inverse folding for antibody sequence design using deep learning. **arXiv (Cornell University)**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.48550/arxiv.2310.19513>. Acesso em: 1 dez. 2024.

DU, X. *et al.* Alteration of the Intrinsic Apoptosis Pathway Is Involved in Notch-induced Chemoresistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 1, p. 15–20, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.001>. Acesso em: 19 nov. 2022.

DUAN, Y. *et al.* Tuning the ignition of CAR: optimizing the affinity of scFv to improve CAR-T therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04089-x>. Acesso em: 5 nov. 2023.

DUAN, Z. *et al.* Production and Purification of Shark and Camel Single-Domain Antibodies from Bacterial and Mammalian Cell Expression Systems. **Current Protocols**, v. 2, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpz1.459>. Acesso em: 12 maio 2024.

DUFFY, M. J. *et al.* The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? **Clinical Proteomics**, v. 8, n. 1, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1559-0275-8-9>. Acesso em: 1 out. 2023.

DUNBAR, J. B. *et al.* ABangle: characterising the VH-VL orientation in antibodies. **Protein Engineering Design & Selection**, v. 26, n. 10, p. 611–620, 24 maio 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/gzt020>. Acesso em: 6 out. 2023.

DUNBAR, J.; DEANE, C. M. ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification. **Bioinformatics**, p. btv552, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv552>. Acesso em: 15 set. 2022.

EELEN, G. *et al.* Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. **Circulation Research**, v. 127, n. 2, p. 310–329, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/circresaha.120.316851>. Acesso em: 5 out. 2024.

ELLISEN, L. W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 649–661, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90111-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90111-b). Acesso em: 15 out. 2022.

ENGLISH, H.; HONG, J.; HO, M. Ancient species offers contemporary therapeutics: an update on shark VNAR single domain antibody sequences, phage libraries and potential clinical applications. **Antibody Therapeutics**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa001>. Acesso em: 13 jan. 2024.

ESSMANN, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.470117>. Acesso em: 30 jan. 2021.

FABBRI, G. *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 7,

p. 1389–1401, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20110921>. Acesso em: 15 nov. 2023.

FABIOLA, F. *et al.* An improved hydrogen bond potential: Impact on medium resolution protein structures. **Protein Science**, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1110/ps.4890102>. Acesso em: 14 jan. 2024.

FARAGO, O. Langevin thermostat for robust configurational and kinetic sampling. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 534, p. 122210, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.122210>. Acesso em: 1 dez. 2023.

FEIG, M. Local Protein Structure Refinement via Molecular Dynamics Simulations with locPREFMD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 7, p. 1304–1312, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00222>. Acesso em: 1 jan. 2024.

FEIG, M. Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 265–284, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.10378>. Acesso em: 1 dez. 2023.

FERNÁNDEZ-QUINTERO, M. L. *et al.* Antibody CDR loops as ensembles in solution vs. canonical clusters from X-ray structures. **mAbs**, v. 12, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1744328>. Acesso em: 1 nov. 2023.

FERNÁNDEZ-QUINTERO, M. L. *et al.* Challenges in antibody structure prediction. **mAbs**, v. 15, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2175319>. Acesso em: 1 dez. 2024.

FERRAROTTO, R. *et al.* A phase I dose-escalation and dose-expansion study of brontictuzumab in subjects with selected solid tumors. **Annals of Oncology**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy171>. Acesso em: 14 nov. 2023.

FERRAZ, M. V. F. *et al.* Design of nanobody targeting SARS-CoV-2 spike glycoprotein using CDR-grafting assisted by molecular simulation and machine learning. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2024.09.30.615772>. Acesso em: 21 dez. 2024.

FESSEHA, H.; DEGU, T.; ENDASHAW, D. Therapeutic application of monoclonal antibodies: A review. **Journal of Life Science and Biomedicine**, v. 10, n. 5, p. 59–69, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.51145/jlsb.2020.8>. Acesso em: 12 ago. 2023.

FILPULA, D. Antibody engineering and modification technologies. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 2, p. 201–215, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.03.004>. Acesso em: 15 nov. 2022.

FINOL-URDANETA, R. K. *et al.* Sodium channel selectivity and conduction: Prokaryotes have devised their own molecular strategy. **Journal of General Physiology**, v. 143, n. 2, p. 157–171, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1085/jgp.201311037>. Acesso em: 1 nov. 2022.

FOOTE, J.; WINTER, G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. **Journal of Molecular Biology**, v. 224, n. 2, p. 487–499, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91010-m](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91010-m). Acesso em: 15 jan. 2023.

FOROUZESH, N.; MISHRA, N. An Effective MM/GBSA Protocol for Absolute Binding Free Energy Calculations: A Case Study on SARS-CoV-2 Spike Protein and the Human ACE2 Receptor. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2383, 20 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26082383>. Acesso em: 1 dez. 2023.

FORTINI, M. E.  $\gamma$ -Secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 673–684, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm910>. Acesso em: 14 jan. 2024.

FRENKEL, D.; SMIT, B.; RATNER, M. A. *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*. **Physics Today**, v. 50, n. 7, p. 66–66, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.881812>. Acesso em: 1 dez. 2022.

FRIED, I. *et al.* Preliminary results of immune modulating antibody MDV9300 (pidilizumab) treatment in children with diffuse intrinsic pontine glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 136, n. 1, p. 189–195, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2643-1>. Acesso em: 12 jan. 2024.

FRIEDMAN, S. *et al.* Clinical Benefit of INCB7839, a Potent and Selective Inhibitor of ADAM10 and ADAM17, in Combination with Trastuzumab in Metastatic HER2 Positive Breast Cancer Patients. **Cancer Research**, v. 69, n. 24\_Supplement, p. 5056–5056, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.sabcs-09-5056>. Acesso em: 1 dez. 2022.

FRIESNER, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm0306430>. Acesso em: 15 out. 2022.

FRYE, L. *et al.* From computer-aided drug discovery to computer-driven drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.08.001>. Acesso em: 15 jan. 2024.

FUGLEBAKK, E.; ECHAVE, J.; REUTER, N. Measuring and comparing structural fluctuation patterns in large protein datasets. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2431–2440, 1 out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts445>. Acesso em: 31 maio 2023.

FUKUSUMI, T. *et al.* The NOTCH4–HEY1 Pathway Induces Epithelial–Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 3, p. 619–633, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1366>. Acesso em: 21 nov. 2022.

GABRIELLI, E. *et al.* Antibody Complementarity-Determining Regions (CDRs): A Bridge between Adaptive and Innate Immunity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8187, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008187>. Acesso em: 12 set. 2022.

GALAMA, M. M. *et al.* Stochastic Approximation to MBAR and TRAM: Batchwise Free Energy Estimation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 19, n. 3, p. 758–766, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c00976>. Acesso em: 1 dez. 2024.

GAO, J. *et al.* Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, p. p1-1, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160307/>. Acesso em: 1 nov. 2022.

GAO, M.; SKOLNICK, J. New benchmark metrics for protein-protein docking methods. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 5, p. 1623–1634, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.22987>. Acesso em: 1 dez. 2022.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Accessibility of the peptide backbone of protein ligands is a key specificity determinant in *Candida albicans* SRS adherence. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 277–284, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.26738-0>. Acesso em: 15 set. 2022.

GENG, C. *et al.* Finding the  $\Delta\Delta G$  spot: Are predictors of binding affinity changes upon mutations in protein–protein interactions ready for it? **WIREs Computational Molecular Science**, v. 9, n. 5, 15 jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wcms.1410>. Acesso em: 12 jan. 2024.

GERING, M.; PATIENT, R. Notch signalling and haematopoietic stem cell formation during embryogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, n. 1, p. 11–16, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.21905>. Acesso em: 1 nov. 2022.

GHARAIBEH, L. *et al.* Notch1 in Cancer Therapy: Possible Clinical Implications and Challenges. **Molecular Pharmacology**, v. 98, n. 5, p. 559–576, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000006>. Acesso em: 1 dez. 2024.

GHERGHESCU, I.; DELGADO-CHARRO, M. B. The Biosimilar Landscape: An Overview of Regulatory Approvals by the EMA and FDA. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 48, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010048>. Acesso em: 10 jan. 2024.

GILBERT, C. A. *et al.*  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Enhance Temozolomide Treatment of Human Gliomas by Inhibiting Neurosphere Repopulation and Xenograft Recurrence. **Cancer research**, v. 70, n. 17, p. 6870–6879, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-1378>. Acesso em: 1 nov. 2022.

GODDARD, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 14–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3235>. Acesso em: 1 out. 2023.

GODZIK, A.; KOLINSKI, A.; SKOLNICK, J. De novo and inverse folding predictions of protein structure and dynamics. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 7, n. 4, p. 397–438, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02337559>. Acesso em: 1 dez. 2021.

GOLDE, T. E. *et al.*  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators. **Biochimica et**

**Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 12, p. 2898–2907, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.005>. Acesso em: 1 dez. 2022.

GÓMEZ ROMÁN, V. R.; MURRAY, J. C.; WEINER, L. M. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC). **Antibody Fc**, p. 1–27, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394802-1.00001-7>. Acesso em: 1 dez. 2022.

GORDON, W. R. *et al.* Effects of S1 Cleavage on the Structure, Surface Export, and Signaling Activity of Human Notch1 and Notch2. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6613, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006613>. Acesso em: 12 dez. 2022.

GORDON, W. R. *et al.* Structural basis for autoinhibition of Notch. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 14, n. 4, p. 295–300, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsmb1227>. Acesso em: 1 dez. 2023.

GORDON, W. R. *et al.* Structure of the Notch1-negative regulatory region: implications for normal activation and pathogenic signaling in T-ALL. **Blood**, v. 113, n. 18, p. 4381–4390, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-174748>. Acesso em: 12 jan. 2024.

GRAY, J. J. High-resolution protein–protein docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 2, p. 183–193, abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.003>. Acesso em: 1 dez. 2022.

GRIGORIU, S. *et al.* The Molecular Mechanism of Substrate Engagement and Immunosuppressant Inhibition of Calcineurin. **PLoS Biology**, v. 11, n. 2, p. e1001492, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001492>. Acesso em: 12 jan. 2022.

GROSSFIELD, A. **An implementation of WHAM: the Weighted Histogram Analysis Method Version 2.0.10.** [S.l: s.n.], 2014.

GU, G. *et al.* NKAP alters tumor immune microenvironment and promotes glioma growth via Notch1 signaling. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1281-1>. Acesso em: 1 dez. 2023.

GUEROIS, R.; NIELSEN, J.; SERRANO, L. Predicting Changes in the Stability of Proteins and Protein Complexes: A Study of More Than 1000 Mutations. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, n. 2, p. 369–387, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00442-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00442-4). Acesso em: 12 jan. 2023.

GUIMARÃES, R. Vacinas: Da Saúde Pública ao Big Business. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 1847–1852, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232021265.03062021>. Acesso em: 15 jan. 2024.

GUL, N.; VAN EGMOND, M. Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 23, p. 5008–5013, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-15-1330>. Acesso em: 15 jan. 2022.

GUMBART, J. C.; ROUX, B.; CHIPOT, C. Efficient Determination of Protein–Protein Standard Binding Free Energies from First Principles. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 8, p. 3789–3798, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct400273t>. Acesso em: 10 jan. 2023.

GÜNGÖR, C. *et al.* Notch Signaling Activated by Replication Stress–Induced Expression of Midkine Drives Epithelial–Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 14, p. 5009–5019, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-11-0036>. Acesso em: 1 fev. 2024.

HAAPASALO, A.; KOVACS, D. M. The Many Substrates of Presenilin/γ-Secretase. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 25, n. 1, p. 3–28, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/jad-2011-101065>. Acesso em: 1 dez. 2022.

HABETS, R. A. *et al.* Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 494, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau6246>. Acesso em: 11 jan. 2024.

HAI, L. *et al.* Notch1 is a prognostic factor that is distinctly activated in the classical and proneural subtype of glioblastoma and that promotes glioma cell survival via the NF-κB(p65) pathway. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0119-z>. Acesso em: 1 dez. 2022.

HAN, B. Notch1 downregulation combined with interleukin-24 inhibits invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 33, p. 9727, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i33.9727>. Acesso em: 1 set. 2023.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>. Acesso em: 15 jan. 2024.

HANNA, G. J. *et al.* A Phase I Study of the Pan-Notch Inhibitor CB-103 for Patients with Advanced Adenoid Cystic Carcinoma and Other Tumors. **Cancer research communications**, v. 3, n. 9, p. 1853–1861, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2767-9764.crc-23-0333>. Acesso em: 6 maio 2024.

HARRIS, C. T.; COHEN, S. Reducing Immunogenicity by Design: Approaches to Minimize Immunogenicity of Monoclonal Antibodies. **BioDrugs**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00641-2>. Acesso em: 1 dez. 2024.

HARRISON, H. *et al.* Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling through the Notch4 Receptor. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 709–718, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1681>. Acesso em: 15 jan. 2022.

HARTLEY, R. W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 11, p. 450–454, 1 nov. 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90104-7](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90104-7). Acesso em: 5 jan. 2022.

HAYASHI, T. *et al.* Not all NOTCH Is Created Equal: The Oncogenic Role of NOTCH2 in Bladder Cancer and Its Implications for Targeted Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 12, p. 2981–2992, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-2360>. Acesso em: 1 maio 2023.

HEBDITCH, M.; WARWICKER, J. Charge and hydrophobicity are key features in sequence-trained machine learning models for predicting the biophysical properties of clinical-stage antibodies. **PeerJ**, v. 7, p. e8199, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.8199>. Acesso em: 21 maio 2023.

HEBDITCH, M.; WARWICKER, J. Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36950-8>. Acesso em: 1 jan. 2023.

HERMANTO, S. *et al.* Molecular dynamic simulation of Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub>structure in corporation with HER2 as a theranostic agent of breast cancer. **Journal of physics. Conference series**, v. 835, p. 012005–012005, 17 maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/835/1/012005>. Acesso em: 1 fev. 2023.

HERRERA-RIOS, D. *et al.* A computational guided, functional validation of a novel therapeutic antibody proposes Notch signaling as a clinical relevant and druggable target in glioma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72480-y>. Acesso em: 12 jan. 2023.

HIE, B. L. *et al.* Efficient evolution of human antibodies from general protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 42, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01763-2>. Acesso em: 10 jul. 2024.

HILTON, D. J. *et al.* Saturation Mutagenesis of the WSXWS Motif of the Erythropoietin Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4699–4708, mar. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.4699>. Acesso em: 1 dez. 2022.

HODIS, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–63, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>. Acesso em: 1 maio 2022.

HØIE, M. H. *et al.* AntiFold: Improved antibody structure-based design using inverse folding. **arXiv (Cornell University)**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.48550/arxiv.2405.03370>. Acesso em: 1 dez. 2024.

HONORATO, R. V. *et al.* The HADDOCK2.4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes. **Nature protocols**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41596-024-01011-0>. Acesso em: 1 dez. 2024.

HOLLIGER, P.; PROSPERO, T.; WINTER, G. “Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6444–6448, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6444>. Acesso em: 1 maio 2023.

HORI, K.; SEN, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signaling at a glance.

- Journal of Cell Science**, v. 126, n. 10, p. 2135–2140, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.127308>. Acesso em: 1 set. 2022.
- HOZUMI, K. *et al.* Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 5, n. 6, p. 638–644, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1075>. Acesso em: 1 out. 2023.
- HSU, C. *et al.* Learning inverse folding from millions of predicted structures. **bioRxiv**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.04.10.487779>. Acesso em: 12 dez. 2024.
- HU, G.; ZHANG, Q.; CHEN, L. Y. Insights into scFv:drug binding using the molecular dynamics simulation and free energy calculation. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 8, p. 1919–1926, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0892-4>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- HU, S. *et al.* Minibody: A Novel Engineered Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (Single-Chain Fv-CH3) Which Exhibits Rapid, High-Level Targeting of Xenografts1. **Cancer Research**, v. 56, n. 13, p. 3055–3061, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8674062/>. Acesso em: 1 fev. 2023.
- HU, Z. I. *et al.* A randomized phase II trial of nab-paclitaxel and gemcitabine with tarextumab or placebo in patients with untreated metastatic pancreatic cancer. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 11, p. 5148–5157, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cam4.2425>. Acesso em: 1 maio 2024.
- HUANG, B. *et al.* Elevated Expression of NOTCH1 Associates with Lymph Node Metastasis of Gastric Cancer and Knock-Down of NOTCH1 Attenuates Tumor Cell Progression. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 9939–9948, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.12659/msm.918703>. Acesso em: 1 set. 2023.
- HUANG, J. *et al.* Notch-1 Confers Chemoresistance in Lung Adenocarcinoma to Taxanes through AP-1/microRNA-451 Mediated Regulation of MDR-1. **Molecular Therapy — Nucleic Acids**, v. 5, n. 5, p. e375–e375, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.82>. Acesso em: 12 maio 2022.
- HUANG, Q. *et al.* The Carcinogenic Role of the Notch Signaling Pathway in the Development of Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 6, p. 1570–1579, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/jca.26847>. Acesso em: 24 abr. 2024.
- HUB, J. S.; DE GROOT, B. L.; VAN DER SPOEL, D. g\_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 6, n. 12, p. 3713–3720, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct100494z>. Acesso em: 30 jan. 2021.
- HUDSON, P. J.; KORTT, A. A. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 231, n. 1, p. 177–189, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00157-X). Acesso em: 21 maio 2021.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics.

- Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5). Acesso em: 21 maio 2022.
- HUR, J.-Y.  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's disease. **Experimental & Molecular Medicine**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00754-8>. Acesso em: 29 abr. 2023.
- HURLBUT, G. D. *et al.* Crossing paths with Notch in the hyper-network. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 166–175, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.012>. Acesso em: 30 jun. 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. [S.l.: s.n.], 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2024.
- ISO, T.; KEDES, L.; HAMAMORI, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 194, n. 3, p. 237–255, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.10208>. Acesso em: 15 dez. 2021.
- IVETAC, A.; MCCAMMON, J. A. Molecular Recognition in the Case of Flexible Targets. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 17, p. 1663–1671, 1 jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161211796355056>. Acesso em: 29 set. 2023.
- JACKSTADT, R. *et al.* Epithelial NOTCH Signaling Rewires the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer to Drive Poor-Prognosis Subtypes and Metastasis. **Cancer Cell**, v. 36, n. 3, p. 319-336.e7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.08.003>. Acesso em: 1 maio 2024.
- JAFFERS, G. J. *et al.* Anti-Idiotypic And Non-Anti-Idiotypic Antibodies To Okt3 Arising Despite Intense Immunosuppression. **Transplantation**, v. 41, n. 5, p. 572–578, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00007890-198605000-00004>. Acesso em: 1 dez. 2021.
- JAKOBOVITS, A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 561–566, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80093-x](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80093-x). Acesso em: 21 maio 2022.
- JAMIL, K. *et al.* In Silico Evidence Of Signaling Pathways Of Notch Mediated Networks In Leukemia. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. e201207005, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5936/csbj.201207005>. Acesso em: 15 jan. 2024.
- JANEWAY, C. A. *et al.* The generation of diversity in immunoglobulins. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. Nova Iorque: Garland Science, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27140/>. Acesso em: 15 abr. 2023.
- JIMENO, A. *et al.* A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab (OMP-305B83) in patients with previously treated solid

tumors. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 3, p. 461–472, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0665-y>. Acesso em: 21 dez. 2022.

JIN, S. *et al.* Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . **Oncogene**, v. 32, p. 4892–4902, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.517>. Acesso em: 30 nov. 2023.

JITSCHIN, R. *et al.* Stromal cell-mediated glycolytic switch in CLL cells involves Notch-c-Myc signaling. **Blood**, v. 125, n. 22, p. 3432–3436, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-607036>. Acesso em: 25 fev. 2024.

JOHNSON, M. L. *et al.* Rovalpituzumab Tesirine as a Maintenance Therapy After First-Line Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Extensive-Stage–SCLC: Results From the Phase 3 MERU Study. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 16, n. 9, p. 1570–1581, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.03.012>. Acesso em: 13 out. 2024.

JONES, D. T.; THORNTON, J. M. The impact of AlphaFold2 one year on. **Nature Methods**, v. 19, n. 1, p. 15–20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01365-3>. Acesso em: 28 set. 2024.

JONES, S. E.; OLSEN, L.; GAJHEDE, M. Structural Basis of Histone Demethylase KDM6B Histone 3 Lysine 27 Specificity. **Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 585–592, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01152>. Acesso em: 22 maio 2023.

JONES, T. *et al.* The INNs and outs of antibody nonproprietary names. **MAbs**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1114320>. Acesso em: 5 nov. 2022.

JORDAN, E. *et al.* Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-2>. Acesso em: 30 abr. 2023.

JOSHI, D. C.; LIN, J. Delineating Protein–Protein Curvilinear Dissociation Pathways and Energetics with Naïve Multiple-Walker Umbrella Sampling Simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 40, n. 17, p. 1652–1663, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.25821>. Acesso em: 14 out. 2024.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with alphafold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>. Acesso em: 14 set. 2023.

JUMPER, J. M. *et al.* Accurate calculation of side chain packing and free energy with applications to protein molecular dynamics. **Plos Computational Biology**, v. 14, n. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006342>. Acesso em: 29 abr. 2023.

JUNDT, F. *et al.* Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. **Leukemia**, v. 22, n. 8, p. 1587–1594, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2008.101>. Acesso

em: 1 out. 2021.

JURRUS, E. *et al.* Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112–128, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3280>. Acesso em: 19 set. 2023.

KALIM, M.; AKHTAR, S. Novel drug design and bioinformatics: an introduction. **Physical Sciences Reviews**, v. 8, n. 8, p. 1571–1591, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0158>. Acesso em: 30 set. 2023.

KANGUEANE, P.; NILOFER, C. Heterodimer Protein Complexes. **Springer eBooks**, p. 55–68, 1 jan. 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7347-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7347-2_4). Acesso em: 18 fev. 2023.

KANNAN, S. *et al.* Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 321–337, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20121527>. Acesso em: 31 maio 2022.

KARPLUS, M.; KURIYAN, J. Molecular dynamics and protein function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 19, p. 6679–6685, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0408930102>. Acesso em: 4 jan. 2024.

KÄSTNER, J. Umbrella sampling. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 1, n. 6, p. 932–942, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wcms.66>. Acesso em: 12 dez. 2022.

KEAM, S. J. Nirogacestat: First Approval. **Drugs**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02002-x>. Acesso em: 29 dez. 2024.

KELOW, S.; ADOLF-BRYFOGLE, J.; DUNBRACK, R. L. Hiding in plain sight: structure and sequence analysis reveals the importance of the antibody DE loop for antibody-antigen binding. **mAbs**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1840005>. Acesso em: 21 jun. 2024.

KESLER, S. R. *et al.* Strength of spatial correlation between gray matter connectivity and patterns of proto-oncogene and neural network construction gene expression is associated with diffuse glioma survival. **Frontiers in Neurology**, v. 15, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2024.1345520>. Acesso em: 1 dez. 2024.

KIDD, S.; KELLEY, M. R.; YOUNG, M. W. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 9, p. 3094–3108, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.6.9.3094>. Acesso em: 1 dez. 2022.

KIEL, M. J. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 9, p. 1553–1565, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20120910>. Acesso em: 25 out. 2021.

KIM, T.-H.; SHIVDASANI, R. A. Notch signaling in stomach epithelial stem cell homeostasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 4, p. 677–688, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20101737>. Acesso em: 26 nov. 2021.

KIYOSHI, M. *et al.* Affinity Improvement of a Therapeutic Antibody by Structure-Based Computational Design: Generation of Electrostatic Interactions in the Transition State Stabilizes the Antibody-Antigen Complex. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087099>. Acesso em: 25 fev. 2023.

KLINAKIS, A. *et al.* A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 230–233, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09999>. Acesso em: 21 nov. 2022.

KNAPP, B.; OSPINA, L.; DEANE, C. M. Avoiding False Positive Conclusions in Molecular Simulation: The Importance of Replicas. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 12, p. 6127–6138, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00391>. Acesso em: 24 out. 2023.

KOCH, U.; LEHAL, R.; RADTKE, F. Stem cells living with a Notch. **Development**, v. 140, n. 4, p. 689–704, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.080614>. Acesso em: 31 maio 2023.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/256495a0>. Acesso em: 30 out. 2021.

KOLLMAN, P. A. *et al.* Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 889–897, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ar000033j>. Acesso em: 1 dez. 2022.

KOPAN, R.; ILAGAN, Ma. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 216–233, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>. Acesso em: 25 jan. 2023.

KORTKHONJIA, E. *et al.* Probing antibody internal dynamics with fluorescence anisotropy and molecular dynamics simulations. **mAbs**, v. 5, n. 2, p. 306–322, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mabs.23651>. Acesso em: 21 jan. 2023.

KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1 fev. 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.44.2.98>. Acesso em: 31 maio 2021.

KOVALTSUK, A. *et al.* Observed Antibody Space: A Resource for Data Mining Next-Generation Sequencing of Antibody Repertoires. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 8, p. 2502–2509, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800708>. Acesso em: 12 dez. 2022.

KOZAKOV, D. *et al.* The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>. Acesso em: 21 jan. 2023.

KREBS, L. T. *et al.* The Nrarp Gene Encodes an Ankyrin-Repeat Protein That Is Transcriptionally Regulated by the Notch Signaling Pathway. **Developmental Biology**, v. 238, n. 1, p. 110–119, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0408>. Acesso em: 30 jul. 2022.

KRISHNAN, R.; WALTON, E. B.; VAN VLIET, K. J. Characterizing rare-event property distributions via replicate molecular dynamics simulations of proteins. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, p. 1383–1389, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0504-3>. Acesso em: 1 jan. 2024.

KŘÍŽ, Z. *et al.* How Ionic Strength Affects the Conformational Behavior of Human and Rat Beta Amyloids – A Computational Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62914, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062914>. Acesso em: 6 nov. 2022.

KROKHOTIN, A. *et al.* Computationally Guided Design of Single-Chain Variable Fragment Improves Specificity of Chimeric Antigen Receptors. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 15, p. 30–37, 2019. Disponível em: <https://doi.org/>. Acesso em: 29 abr. 2024.

KUANG, S.-Q. *et al.* Epigenetic Inactivation of Notch-Hes Pathway in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61807, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061807>. Acesso em: 15 ago. 2023.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 857, p. 231–257, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10). Acesso em: 12 maio 2021.

KUMAR, D. *et al.* Notch1-MAPK Signaling Axis Regulates CD133+ Cancer Stem Cell-Mediated Melanoma Growth and Angiogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 12, p. 2462–2474, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.024>. Acesso em: 21 jan. 2024.

KUMAR, S. *et al.* Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 1339–1350, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.540161104>. Acesso em: 21 jan. 2024.

KUNIK, V.; PETERS, B.; OFRAN, Y. Structural Consensus among Antibodies Defines the Antigen Binding Site. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 2, p. e1002388, 23 fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002388>. Acesso em: 30 jan. 2023.

KURKCUOGLU, Z. *et al.* Performance of HADDOCK and a simple contact-based protein–ligand binding affinity predictor in the D3R Grand Challenge 2. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 32, n. 1, p. 175–185, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0049-y>. Acesso em: 10 jan. 2024.

KUYUCAK, S.; KAYSER, V. Biobetters From an Integrated Computational/Experimental Approach. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 138–145, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.003>. Acesso em: 29 set. 2023.

KUZMANIC, A.; ZAGROVIC, B. Determination of Ensemble-Average Pairwise Root Mean-Square Deviation from Experimental B-Factors. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 5, p. 861–871, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.011>. Acesso em: 31 maio 2021.

KWON, C. *et al.* Notch post-translationally regulates  $\beta$ -catenin protein in stem and progenitor cells. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 1244–1251, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb2313>. Acesso em: 21 maio 2023.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 1982. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0). Acesso em: 1 out. 2022.

LAI, B. *et al.* Molecular Dynamics Simulation of the Crystallizable Fragment of IgG1—Insights for the Design of Fcabs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 438–455, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms15010438>. Acesso em: 12 mar. 2024.

LAN, N. T. *et al.* Prediction of AChE-ligand affinity using the umbrella sampling simulation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 93, p. 107441, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.107441>. Acesso em: 12 maio 2023.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PDBsum: a web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 488–490, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01140-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01140-7). Acesso em: 2 nov. 2022.

LE GALL, F. *et al.* Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. **FEBS Letters**, v. 453, n. 1-2, p. 164–168, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00713-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00713-9). Acesso em: 5 dez. 2022.

LEE, C.; SU, B.-H.; TSENG, Y. J. Comparative studies of AlphaFold, RoseTTAFold and Modeller: a case study involving the use of G-protein-coupled receptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbac308>. Acesso em: 1 dez. 2024.

LEE, H. S.; QI, Y.; IM, W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 9 mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep08926>. Acesso em: 12 maio 2023.

LEE, L.-P.; TIDOR, B. Optimization of binding electrostatics: Charge complementarity in the barnase-barstar protein complex. **Protein Science**, v. 10, n. 2, p. 362–377, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ps.40001>. Acesso em: 11 dez. 2021.

LEE, S. *et al.* Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer Science**, v. 100, n. 5, p. 920–926, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01130.x>. Acesso em: 30 jan. 2023.

LEE, S. M. *et al.* Phase 2 study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, in metastatic melanoma: SWOG 0933. **Cancer**, v. 121, n. 3, p. 432–440, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.29055>. Acesso em: 21 jan. 2023.

LEEM, J. *et al.* ABodyBuilder: Automated antibody structure prediction with data–driven accuracy estimation. **mAbs**, v. 8, n. 7, p. 1259–1268, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1205773>. Acesso em: 30 ago. 2022.

LEHAL, R. *et al.* Pharmacological disruption of the Notch transcription factor complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 28, p. 16292–16301, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1922606117>. Acesso em: 12 maio 2024.

LEONEL, R. M. *et al.* Assistência Farmacêutica a Pacientes Oncológicos em Uso de Anticorpos Monoclonais em um Hospital de Referência do Oeste de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68, n. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2022v68n3.2316>. Acesso em: 15 jan. 2024.

LEWIS, S. M.; KUHLMAN, B. A. Anchored Design of Protein-Protein Interfaces. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20872, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020872>. Acesso em: 13 nov. 2021.

LI, J. *et al.* Affinity maturation of antibody fragments: A review encompassing the development from random approaches to computational rational optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 247, p. 125733–125733, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125733>. Acesso em: 30 nov. 2024.

LI, K. *et al.* Modulation of Notch Signaling by Antibodies Specific for the Extracellular Negative Regulatory Region of NOTCH3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 12, p. 8046–8054, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.m800170200>. Acesso em: 31 maio 2021.

LI, R. *et al.* Anti-NOTCH1 therapy with OMP-52 M51 inhibits salivary adenoid cystic carcinoma by depressing epithelial-mesenchymal transition (EMT) process and inducing ferroptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 484, p. 116825, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.116825>. Acesso em: 20 dez. 2024.

LI, X.; VON BOEHMER, H. Notch Signaling in T-Cell Development and T-ALL. **ISRN Hematology**, v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5402/2011/921706>. Acesso em: 12 maio 2022.

LI, Y. *et al.* ABT-165, a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig) Targeting DLL4 and VEGF, Demonstrates Superior Efficacy and Favorable Safety Profiles in Preclinical Models. **Molecular cancer therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 1039–1050, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-17-0800>. Acesso em: 10 jun. 2021.

LI, Z.; KRIPPENDORFF, B.-F.; SHAH, D. K. Influence of Molecular size on the clearance of antibody fragments. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 10, p. 2131–2141, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2219-y>. Acesso em:

12 maio 2024.

LICCIULLI, S. *et al.* Notch1 Is Required for Kras-Induced Lung Adenocarcinoma and Controls Tumor Cell Survival via p53. **Cancer Research**, v. 73, n. 19, p. 5974–5984, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-1384>. Acesso em: 29 out. 2021.

LIMA, N. J. R. **Prognóstico de crianças e adolescentes com leucemia linfoblástica aguda-t no Brasil**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência Multiprofissional em Oncologia)–Instituto Nacional de Câncer, 2015. Disponível em: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/handle/123456789/10960>. Acesso em: 10 maio 2024.

LIN, Z. *et al.* Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model. **Science**, v. 379, n. 6637, p. 1123–1130, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.ade2574>. Acesso em: 10 fev. 2024.

LITTLE, M. *et al.* Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunology Today**, v. 21, n. 8, p. 364–370, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(00\)01668-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01668-6). Acesso em: 10 jun. 2021.

LIU, J. *et al.* JAG1 enhances angiogenesis in triple-negative breast cancer through promoting the secretion of exosomal lncRNA MALAT1. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 5, p. 2167–2178, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.07.006>. Acesso em: 5 jan. 2024.

LIU, L. *et al.* Non-canonical Notch Signaling Regulates Actin Remodeling in Cell Migration by Activating PI3K/AKT/Cdc42 Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 370, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00370>. Acesso em: 5 ago. 2022.

LIU, P. *et al.* An Omalizumab Biobetter Antibody With Improved Stability and Efficacy for the Treatment of Allergic Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.596908>. Acesso em: 12 maio 2024.

LOBANOV, M. Yu.; BOGATYREVA, N. S.; GALZITSKAYA, O. V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. **Molecular Biology**, v. 42, n. 4, p. 623–628, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0026893308040195>. Acesso em: 1 out. 2022.

LOGEAT, F. *et al.* The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8108–8112, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8108>. Acesso em: 30 abr. 2022.

LONBERG, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 4, p. 450–459, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.co.2008.06.004>. Acesso em: 12 maio 2023.

LOVE, C. *et al.* The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. **Nature genetics**, v. 44, n. 12, p. 1321–1325, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/ng.2468>. Acesso em: 1 nov. 2023.

LUBIN, D. J. *et al.* The notch pathway is activated in neoplastic progression in esophageal squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v. 72, p. 66–70, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.11.004>. Acesso em: 9 set. 2023.

LUO, S. *et al.* Antigen-Specific Antibody Design and Optimization with Diffusion-Based Generative Models for Protein Structures. **36th Conference on Neural Information Processing Systems**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.07.10.499510>. Acesso em: 20 nov. 2024.

LUO, S. *et al.* Examining asymmetric pairwise pre-reaction and transition states in enzymatic catalysis by molecular dynamics simulation and quantum mechanics/molecular mechanics calculation. **STAR Protocols**, v. 4, n. 2, p. 102263–102263, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102263>. Acesso em: 1 dez. 2024.

LV, Y. *et al.* Evolution and Function of the Notch Signaling Pathway: An Invertebrate Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3322, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25063322>. Acesso em: 30 out. 2024.

MA, B. *et al.* Protein–protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5772–5777, maio 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1030237100>. Acesso em: 15 maio 2021.

MACGROGAN, D.; LUNA-ZURITA, L.; DE LA POMPA, J. L. Notch signaling in cardiac valve development and disease. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, n. 6, p. 449–459, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bdra.20815>. Acesso em: 30 abr. 2023.

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. 3696–3713, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>. Acesso em: 30 maio 2024.

MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of Root-Mean-Square Deviation in Comparing Three-dimensional Structures of Globular Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 625–634, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1017>. Acesso em: 30 jan. 2023.

MALATHI, K.; RAMAIAH, S. Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 34, n. 2, p. 243–260, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1502984>. Acesso em: 11 set. 2022.

MANCARELLA, S. *et al.* Crenigacestat, a selective NOTCH1 inhibitor, reduces intrahepatic cholangiocarcinoma progression by blocking VEGFA/DLL4/MMP13 axis. **Cell Death and Differentiation**, v. 27, n. 8, p. 2330–2343, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0505-4>. Acesso em: 9 set. 2024.

- MANDULA, J. K. *et al.* Jagged2 targeting in lung cancer activates anti-tumor immunity via Notch-induced functional reprogramming of tumor-associated macrophages. **Immunity**, v. 57, n. 5, p. 1124-1140.e9, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.020>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- MANSFIELD, A. S. *et al.* A phase I/II study of rovalpituzumab tesirine in delta-like 3-expressing advanced solid tumors. **npj Precision Oncology**, v. 5, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00214-y>. Acesso em: 22 dez. 2023.
- MARCHESINI, M. *et al.* Blockade of Oncogenic NOTCH1 with the SERCA Inhibitor CAD204520 in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 6, p. 678-697.e13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.04.002>. Acesso em: 15 maio 2023.
- MARCONI, G. D. *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1587, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10071587>. Acesso em: 9 dez. 2023.
- MARTI, M. A. *et al.* Nitric Oxide Reactivity with Globins as Investigated Through Computer Simulation. **Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology**, p. 477–498, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(07\)37024-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(07)37024-9). Acesso em: 30 abr. 2021.
- MARTÍNEZ, L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119264, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119264>. Acesso em: 27 jan. 2023.
- MASSARD, C. *et al.* A phase 1b study of crenigacestat (LY3039478) in combination with gemcitabine and cisplatin or gemcitabine and carboplatin in patients with advanced or metastatic solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 90, n. 4, p. 335–344, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00280-022-04461-z>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- MAYRHOFER, P.; KUNERT, R. Nomenclature of humanized mAbs: Early concepts, current challenges and future perspectives. **Human Antibodies**, v. 27, n. 1, p. 37–51, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/hab-180347>. Acesso em: 9 dez. 2023.
- MCDANIELL, R. *et al.* NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogeneous Disorder of the Notch Signaling Pathway. **The American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 1, p. 169–173, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/505332>. Acesso em: 1 maio 2021.
- MELO, I. **Processos que buscam tratamento via judicial salvam vidas, mas têm implicações legais e financeiras | GZH**. Disponível em: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/saude/noticia/2019/11/processos-que-buscam-tratamento-via-judicial-salvam-vidas-mas-tem-implicacoes-legais-e-financeiras-ck3aa4vk03wl01ph6yt86n5p.html>. Acesso em: 6 set. 2024.

MÉNDEZ, R. et al. Assessment of blind predictions of protein-protein interactions: Current status of docking methods. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 1, p. 51–67, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.10393>. Acesso em: 2 jun. 2021.

MENEZES, J. T. de et al. Fármacos Anticorpos Monoclonais para o Tratamento do Câncer: uma Perspectiva Brasileira. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 70, n. 1, p. e–174462, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2024v70n1.4462>. Acesso em: 1 dez. 2024.

MENG, E. C. et al. UCSF ChimeraX: Tools for Structure Building and Analysis. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 32, n. 11, p. e4792, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.4792>. Acesso em: 12 jan. 2024.

MERCHANT, A. M. et al. An efficient route to human bispecific IgG. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 677–681, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt0798-677>. Acesso em: 7 set. 2021.

MEZA, J. C. Steepest descent. **WIREs Computational Statistics**, v. 2, n. 6, p. 719–722, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wics.117>. Acesso em: 8 ago. 2021.

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, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct300418h>. Acesso em: 5 jul. 2021.

MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, p. 1–4, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>. Acesso em: 30 ago. 2024.

MOAL, I. H. et al. The scoring of poses in protein-protein docking: current capabilities and future directions. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, 1 out. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-286>. Acesso em: 5 nov. 2021.

MOELLERING, R. E. et al. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 182–188, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature08543>. Acesso em: 19 mar. 2022.

MOLLOY, M. E. et al. HPN328, a Trispecific T Cell-activating Protein Construct Targeting DLL3-Expressing Solid Tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-23-0524>. Acesso em: 22 dez. 2024.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J.-P. On the nature of allosteric transitions: A plausible model. **Journal of Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 88–118, maio 1965. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80285-6). Acesso em: 30 out. 2021.

MORAES, J. Z. et al. Hybridoma technology: is it still useful? **Current Research in Immunology**, v. 2, p. 32–40, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2021.03.002>. Acesso em: 21 jan. 2024.

- MOREIRA, I. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Unravelling Hot Spots: a comprehensive computational mutagenesis study. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 117, n. 1, p. 99–113, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00214-006-0151-z>. Acesso em: 8 set. 2021.
- MORGAN, T. H. The Theory of the Gene. **The American Naturalist**, v. 51, n. 609, p. 513–544, 1917. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/279629>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- MORGENSZTERN, D. *et al.* Efficacy and Safety of Rovalpituzumab Tesirine in Third-Line and Beyond Patients with DLL3-Expressing, Relapsed/Refractory Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase II TRINITY Study. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 23, p. 6958–6966, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-19-1133>. Acesso em: 31 maio 2024.
- MORGENSZTERN, D. *et al.* SC-002 in patients with relapsed or refractory small cell lung cancer and large cell neuroendocrine carcinoma: Phase 1 study. **Lung Cancer**, v. 145, p. 126–131, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.04.017>. Acesso em: 31 maio 2024.
- MUNSTER, P. *et al.* Abstract C42: Safety and preliminary efficacy results of a first-in-human phase I study of the novel cancer stem cell (CSC) targeting antibody brontictuzumab (OMP-52M51, anti-Notch1) administered intravenously to patients with certain advanced solid tumors. **Clinical Trials**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.targ-15-c42>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- MUYLDERMANS, S. *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 178–183, mar. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.299>. Acesso em: 1 set. 2022.
- MUYLDERMANS, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 775–797, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>. Acesso em: 15 jan. 2023.
- NAM, Y. *et al.* Structural Basis for Cooperativity in Recruitment of MAML Coactivators to Notch Transcription Complexes. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 973–983, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.037>. Acesso em: 1 set. 2022.
- NASTOUPIL, L. J. *et al.* Safety and activity of pembrolizumab in combination with rituximab in relapsed or refractory follicular lymphoma. **Blood Advances**, v. 6, n. 4, p. 1143–1151, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006240>. Acesso em: 1 nov. 2024.
- NATSUIZAKA, M. *et al.* Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01500-9>. Acesso em: 1 jan. 2023.
- NAUCHITEL, V. V. Energy distribution function for the NVT canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 42, n. 5, p. 1259–1265, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00268978100100941>. Acesso em: 1 dez. 2020.

NAYEEM, A.; VILA, J. A.; SCHERAGA, H. A. A comparative study of the simulated-annealing and Monte Carlo-with-minimization approaches to the minimum-energy structures of polypeptides: [Met]-enkephalin. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 594–605, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.540120509>. Acesso em: 16 set. 2021.

NAZARETH, J. L. Conjugate gradient method. **WIREs Computational Statistics**, v. 1, n. 3, p. 348–353, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wics.13>. Acesso em: 1 out. 2021.

NELSON, A. L.; REICHERT, J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 331–337, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt0409-331>. Acesso em: 1 dez. 2020.

NGAN, S.-C. *et al.* Scoring Functions for De Novo Protein Structure Prediction Revisited. **Humana Press eBooks**, p. 243–281, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-574-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-574-9_10). Acesso em: 21 nov. 2021.

NGO, S. T. *et al.* Effective Estimation of Ligand-Binding Affinity Using Biased Sampling Method. **ACS Omega**, v. 4, n. 2, p. 3887–3893, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03258>. Acesso em: 21 jan. 2023.

NICHOLS, J. T. *et al.* DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 4, p. 445–458, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200609014>. Acesso em: 1 dez. 2023.

NISHIGAMI, H.; KAMIYA, N.; NAKAMURA, H. Revisiting antibody modeling assessment for CDR-H3 loop. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 29, n. 11, p. 477–484, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/gzw028>. Acesso em: 21 nov. 2022.

NISTHAL, A. *et al.* Protein stability engineering insights revealed by domain-wide comprehensive mutagenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 33, p. 16367–16377, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1903888116>. Acesso em: 30 jan. 2023.

NORTH, B.; LEHMANN, A.; DUNBRACK, R. L. A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 406, n. 2, p. 228–256, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.030>. Acesso em: 12 set. 2022.

NOSEDA, M. *et al.* Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. **Circulation Research**, v. 94, n. 7, p. 910–917, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000124300.76171.C9>. Acesso em: 1 nov. 2022.

NOSSAL, G. J. V.; LEDERBERG, J. Antibody Production by Single Cells. **Nature**, v. 181, n. 4620, p. 1419–1420, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/1811419a0>. Acesso em: 30 dez. 2020.

NOWAK, J. *et al.* Length-independent structural similarities enrich the antibody CDR canonical class model. **mAbs**, v. 8, n. 4, p. 751–760, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1158370>. Acesso em: 19 abr. 2023.

NTZIACHRISTOS, P. *et al.* From Fly Wings to Targeted Cancer Therapies: A Centennial for Notch Signaling. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 318–334, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.018>. Acesso em: 1 out. 2020.

O'NEIL, J. *et al.* FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to  $\gamma$ -secretase inhibitors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1813–1824, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20070876>. Acesso em: 12 ago. 2022.

OLECHNOVIČ, K.; VENCLOVAS, Č. VoroMQA: Assessment of protein structure quality using interatomic contact areas. **Proteins**, v. 85, n. 6, p. 1131–1145, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.25278>. Acesso em: 1 jan. 2023.

OLSEN, T. H.; BOYLES, F.; DEANE, C. M. Observed Antibody Space: A diverse database of cleaned, annotated, and translated unpaired and paired antibody sequences. **Protein Science**, v. 31, n. 1, p. 141–146, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.4205>. Acesso em: 30 jan. 2024.

ONGARO, A. *et al.* Insight into the LFA-1/SARS-CoV-2 Orf7a Complex by Protein–Protein Docking, Molecular Dynamics, and MM-GBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 6, p. 2780–2787, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00198>. Acesso em: 27 maio 2023.

ONUFRIEV, A.; CASE, D. A.; BASHFORD, D. Effective Born radii in the generalized Born approximation: The importance of being perfect. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 14, p. 1297–1304, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.10126>. Acesso em: 21 dez. 2020.

ORELLANA, L. *et al.* Prediction and validation of protein intermediate states from structurally rich ensembles and coarse-grained simulations. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms12575>. Acesso em: 30 abr. 2023.

OSAJIMA, T.; HOSHINO, T. Roles of the respective loops at complementarity determining region on the antigen-antibody recognition. **Computational Biology and Chemistry**, v. 64, p. 368–383, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.combiolchem.2016.08.004>. Acesso em: 1 out. 2021.

PAGLIARO, L.; MARCHESINI, M.; ROTI, G. Targeting oncogenic Notch signaling with SERCA inhibitors. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01015-9>. Acesso em: 31 maio 2023.

PAKVASA, M. *et al.* Notch signaling: Its essential roles in bone and craniofacial development. **Genes and Diseases**, v. 8, n. 1, p. 8–24, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.04.006>. Acesso em: 16 abr. 2024.

PALMISANO, V. F. **Umbrella Sampling - First Case Study**. Disponível em: [https://www.mobiochem.com/\\_files/ugd/49fe21\\_e2972b2422cf43dc8dfaf348bf54f83.pdf](https://www.mobiochem.com/_files/ugd/49fe21_e2972b2422cf43dc8dfaf348bf54f83.pdf). Acesso em: 1 out. 2024.

PAN, B. *et al.* Targeted inhibition of RBPJ transcription complex alleviates the exhaustion of CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04521-x>. Acesso em: 1 nov. 2024.

PAN, E. *et al.* Phase I study of RO4929097 with bevacizumab in patients with recurrent malignant glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 130, n. 3, p. 571–579, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2263-1>. Acesso em: 1 set. 2022.

PAPALEO, E. *et al.* Free-energy landscape, principal component analysis, and structural clustering to identify representative conformations from molecular dynamics simulations: The myoglobin case. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, n. 8, p. 889–899, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2009.01.006>. Acesso em: 30 set. 2021.

PARKS, A. L. *et al.* Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. **Development**, v. 127, n. 7, p. 1373–1385, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.127.7.1373>. Acesso em: 3 dez. 2020.

PATEL, P. N. *et al.* Hesperetin Activates the Notch1 Signaling Cascade, Causes Apoptosis, and Induces Cellular Differentiation in Anaplastic Thyroid Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n. S4, p. 497–504, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3459-7>. Acesso em: 21 jan. 2024.

PATEL, S. A. *et al.* Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 30–39, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-22-1366>. Acesso em: 21 maio 2024.

PAZ-ARES, L. *et al.* Tarlatamab, a First-in-Class DLL3-Targeted Bispecific T-Cell Engager, in Recurrent Small-Cell Lung Cancer: An Open-Label, Phase I Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 16, p. 2893–2903, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/jco.22.02823>. Acesso em: 1 dez. 2024.

PENG, Z. *et al.* Generative Diffusion Models for Antibody Design, Docking, and Optimization. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.09.25.559190>. Acesso em: 10 jun. 2024.

PERIZ, G. Ca<sup>2+</sup>-ATPase function is required for intracellular trafficking of the Notch receptor in Drosophila. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 21, p. 5983–5993, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5983>. Acesso em: 5 jan. 2021.

PERUMALSAMY, L. R. *et al.* A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR–Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells. **Cell Death Differ**, v. 16, p. 879–889, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.20>. Acesso em: 21 set. 2021.

PETERS, J. H.; DE GROOT, B. L. Ubiquitin Dynamics in Complexes Reveal Molecular Recognition Mechanisms Beyond Induced Fit and Conformational Selection. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 10, p. e1002704, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002704>. Acesso em: 4 out. 2022.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3943>. Acesso em: 1 jan. 2023.

PIANA, S. *et al.* Expression of NOTCH1 in thyroid cancer is mostly restricted to papillary carcinoma. **Endocrine Connections**, v. 8, n. 8, p. 1089–1096, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/ec-19-0303>. Acesso em: 21 jan. 2024.

PINDRUS, M. *et al.* Solubility Challenges in High Concentration Monoclonal Antibody Formulations: Relationship with Amino Acid Sequence and Intermolecular Interactions. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 3896–3907, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00336>. Acesso em: 1 out. 2022.

PINE, S. R. Rethinking Gamma-secretase Inhibitors for Treatment of Non–small-Cell Lung Cancer: Is Notch the Target? **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 24, p. 6136–6141, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-1635>. Acesso em: 21 dez. 2022.

POPOVIC, B. *et al.* Engineering the expression of an anti-interleukin-13 antibody through rational design and mutagenesis. **Protein Engineering Design and Selection**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/gzx001>. Acesso em: 21 out. 2022.

PRIHODA, D. *et al.* BioPhi: A platform for antibody design, humanization, and humanness evaluation based on natural antibody repertoires and deep learning. **mAbs**, v. 14, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2020203>. Acesso em: 1 jun. 2024.

PRZEPIORKA, D. *et al.* FDA Approval: Blinatumomab. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 18, p. 4035–4039, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0612>. Acesso em: 21 jan. 2024.

RADOM, F.; PLÜCKTHUN, A.; PACI, E. Assessment of ab initio models of protein complexes by molecular dynamics. **PLOS Computational Biology**, v. 14, n. 6, p. e1006182–e1006182, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006182>. Acesso em: 31 maio 2021.

RADTKE, F. *et al.* Notch regulation of lymphocyte development and function. **Nature Immunology**, v. 5, p. 247–253, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1045>. Acesso em: 10 ago. 2021.

RADTKE, F.; FASNACHT, N.; MACDONALD, H. R. Notch signaling in the immune system. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 14–27, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2010.01.004>. Acesso em: 1 nov. 2022.

RADTKE, F.; MACDONALD, H. R.; TACCHINI-COTTIER, F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 427–437, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3445>. Acesso em: 31 maio 2023.

RAMACHANDRAN, G. N. Protein Structure and Crystallography. **Science**, v. 141, n.

- 3577, p. 288–291, 1963. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.141.3577.288>. Acesso em: 26 maio 2021.
- RANA, N. A.; HALTIWANGER, R. S. Fringe Benefits: Functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 5, p. 583–589, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.008>. Acesso em: 1 set. 2022.
- RANGEL, D.; AUGUSTO, C.; MANUEL, J. Estratégias de inovação em medicamentos e vacinas no âmbito do Ceis – modelos, mecanismos e expectativas. **Saúde em Debate**, v. 47, n. 138, p. 377–392, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-1104202313801>. Acesso em: 1 maio 2024.
- RAYBOULD, M. I. J. *et al.* Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 10, p. 4025–4030, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1810576116>. Acesso em: 1 jan. 2022.
- REBAY, I. *et al.* Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and serrate: Implications for notch as a multifunctional receptor. **Cell**, v. 67, n. 4, p. 687–699, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90064-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90064-6). Acesso em: 12 jan. 2021.
- RECHSTEINER, M. Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 27, p. 121–131, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(88\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0065-2571(88)90014-3). Acesso em: 7 jun. 2021.
- REIS, R. **Projeto de Lei 5514/2023**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=2403963>. Acesso em: 6 set. 2024.
- REN, W. *et al.* Unraveling the Coupling between Conformational Changes and Ligand Binding in Ribose Binding Protein Using Multiscale Molecular Dynamics and Free-Energy Calculations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 125, n. 11, p. 2898–2909, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c11600>. Acesso em: 17 mar. 2023.
- REYNOLDS, J. C. *et al.* Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: Clinical findings and implications. **International journal of radiation applications and instrumentation. Part B, Nuclear medicine and biology/International journal of radiation, applications and instrumentation. Part B, Nuclear medicine and biology**, v. 16, n. 2, p. 121–125, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(89\)90182-7](https://doi.org/10.1016/0883-2897(89)90182-7). Acesso em: 10 maio 2021.
- RIAÑO-UMBARILA, L. *et al.* Comparative assessment of the VH-VL and VL-VH orientations of single-chain variable fragments of scorpion toxin-neutralizing antibodies. **Molecular Immunology**, v. 122, p. 141–147, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.04.015>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- RIZVANOVIC, A. *et al.* Saturation mutagenesis charts the functional landscape of *Salmonella*ProQ and reveals a gene regulatory function of its C-terminal domain. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 17, p. 9992–10006, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1093/nar/gkab721>. Acesso em: 30 maio 2022.

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, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct400341p>. Acesso em: 9 jan. 2023.

ROSEN, L. S. et al. A phase I, dose-escalation study of PF-06650808, an anti-Notch3 antibody–drug conjugate, in patients with breast cancer and other advanced solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 38, n. 1, p. 120–130, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00754-y>. Acesso em: 19 mar. 2024.

ROSSI, D. et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 9, p. 1537–1551, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20120904>. Acesso em: 14 ago. 2021.

ROTI, G. et al. Complementary Genomic Screens Identify SERCA as a Therapeutic Target in NOTCH1 Mutated Cancer. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 390–405, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.015>. Acesso em: 8 ago. 2023.

ROTI, G. et al. Leukemia-specific delivery of mutant NOTCH1 targeted therapy. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 197–216, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20151778>. Acesso em: 3 set. 2022.

ROYZMAN, I.; COHEN, A. **Biobettors: The Advantages and Challenges of Being Better**. Patterson Belknap. [S.I.]: National Affairs, Inc, 2015. Disponível em: <https://www.pbwt.com/publications/biobettors-the-advantages-and-challenges-of-being-better>. Acesso em: 30 abr. 2024.

RUANO, L.; CÁRDENAS, G.; NOGUEIRA, J. J. The Permeation Mechanism of Cisplatin Through a Doleoylphosphocholine Bilayer\*\*. **ChemPhysChem**, v. 22, n. 12, p. 1251–1261, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cphc.202100059>. Acesso em: 1 set. 2023.

RUFFOLO, J. A.; GRAY, J. J. Fast, accurate antibody structure prediction from deep learning on massive set of natural antibodies. **Biophysical Journal**, v. 121, n. 3, p. 155a156a, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.1942>. Acesso em: 21 jan. 2024.

RUFFOLO, J. A.; SULAM, J.; GRAY, J. J. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. **Patterns**, p. 100406, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.patter.2021.100406>. Acesso em: 7 set. 2023.

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5). Acesso em: 1 out. 2021.

SAGLAM, A. S.; CHONG, L. T. Protein–protein binding pathways and calculations of rate constants using fully-continuous, explicit-solvent simulations. **Chemical**

- Science**, v. 10, n. 8, p. 2360–2372, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C8SC04811H>. Acesso em: 21 dez. 2023.
- SAHA, N. *et al.* ADAM proteases: Emerging role and targeting of the non-catalytic domains. **Cancer Letters**, v. 467, p. 50–57, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.003>. Acesso em: 28 set. 2023.
- SAHA, N. *et al.* Fully human monoclonal antibody targeting activated ADAM10 on colorectal cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 161, p. 114494–114494, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114494>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- SALIH, N. T. Evaluating the Reliability of MM-PB/GB-SA Method for the Protein-Ligand Binding Free Energies Using Penicillopepsin-Inhibitor ligands. **Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 51–64, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.32947/ajps.v22i3.889>. Acesso em: 12 jun. 2024.
- SALOMON-FERRER, R. *et al.* Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 9, p. 3878–3888, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct400314y>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- SAMPAIO, J. V. **Desenvolvimento de método de modificação de CDRs para uso em desenho computacional de anticorpos**. 2024. Dissertação—Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2024.
- SANDERS, P. G. T. *et al.* Ligand-Independent Traffic of Notch Buffers Activated Armadillo in Drosophila. **PLoS Biology**, v. 7, n. 8, p. e1000169, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000169>. Acesso em: 1 nov. 2021.
- SANTINI, B. L. *et al.* Rational design of glycosaminoglycan binding cyclic peptides using cPEPmatch. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 23, p. 2985–2994, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.07.016>. Acesso em: 1 dez. 2024.
- SANTOS, L. H. S.; FERREIRA, R. S.; CAFFARENA, E. R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. **Methods in Molecular Biology**, p. 13–34, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2). Acesso em: 1 jun. 2022.
- SANTOS-NETO, J. F. *et al.* Technological Advancements in Monoclonal Antibodies. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 1–19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/6663708>. Acesso em: 30 set. 2023.
- SARAH, C. *et al.* Voie de signalisation Notch et développement précoce des mammifères. **médecine/sciences (Paris)**, v. 23, n. 1, p. 26–28, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/medsci/200723126>. Acesso em: 12 out. 2021.
- SASSI, A. B.; NAGARKAR, R. P.; HAMBLIN, P. F. Biobetter Biologics. **Novel Approaches and Strategies for Biologics, Vaccines and Cancer Therapies**, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416603-5.00009-2>. Acesso em: 1 dez. 2022.

SCHMIEDL, A.; BREITLING, F.; DÜBEL, S. Expression of a bispecific dsFv–dsFv' antibody fragment in Escherichia coli. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 13, n. 10, p. 725–734, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/13.10.725>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SCHMIT, J. D. *et al.* SLTCAP: A Simple Method for Calculating the Number of Ions Needed for MD Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 4, p. 1823–1827, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b01254>. Acesso em: 11 set. 2022.

SCHMITZ, S. *et al.* The human antibody sequence space and structural design of the V, J regions, and CDRH3 with Rosetta. **mAbs**, v. 14, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2068212>. Acesso em: 31 maio 2024.

SCHOEDER, C. T. *et al.* Modeling Immunity with Rosetta: Methods for Antibody and Antigen Design. **Biochemistry**, v. 60, n. 11, p. 825–846, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00912>. Acesso em: 21 jan. 2024.

SCHREIBER, G.; FERSHT, A. R. Energetics of protein-protein interactions: Analysis of the Barnase-Barstar interface by single mutations and double mutant cycles. **Journal of Molecular Biology**, v. 248, n. 2, p. 478–486, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(95\)80064-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(95)80064-6). Acesso em: 10 ago. 2021.

SCHREIBER, G.; FERSHT, A. R. Interaction of barnase with its polypeptide inhibitor barstar studied by protein engineering. **Biochemistry**, v. 32, n. 19, p. 5145–5150, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00070a025>. Acesso em: 21 jan. 2021.

SCHREIBER, G.; FERSHT, A. R. Rapid, electrostatically assisted association of proteins. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 5, p. 427–431, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsb0596-427>. Acesso em: 10 set. 2021.

SCHRÖDINGER, L. **The PyMOL molecular graphics system, version 1.8.** [S.l.: s.n.], 2015.

SCHWABER, J.; COHEN, E. P. Human × Mouse Somatic Cell Hybrid Clone secreting Immunoglobulins of both Parental Types. **Nature**, v. 244, n. 5416, p. 444–447, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/244444a0>. Acesso em: 1 out. 2021.

SCHWARZER, R.; BERND DÖRKEN; JUNDT, F. Notch is an essential upstream regulator of NF-κB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed–Sternberg cells. **Leukemia**, v. 26, n. 4, p. 806–813, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2011.265>. Acesso em: 8 ago. 2021.

SCHWEDE, T. Protein Modeling: What Happened to the “Protein Structure Gap”? **Structure**, v. 21, n. 9, p. 1531–1540, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.007>. Acesso em: 15 set. 2024.

SCHYMKOWITZ, J. *et al.* The FoldX web server: an online force field. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W382–W388, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>. Acesso em: 5 maio 2022.

SEDGWICK, P. Pearson's correlation coefficient. **BMJ**, v. 345, n. jul04 1, p. e4483–e4483, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.e4483>. Acesso em: 14 abr. 2023.

SHANEHSAZZADEH, A. *et al.* *In vitro* validated antibody design against multiple therapeutic antigens using generative inverse folding. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.12.08.570889>. Acesso em: 4 fev. 2024.

SHARMA, V. *et al.* In silico selection of therapeutic antibodies for development: Viscosity, clearance, and chemical stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 52, p. 18601–18606, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1421779112>. Acesso em: 10 set. 2023.

SHI, Q. *et al.* Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–37, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01828-x>. Acesso em: 1 dez. 2024.

SHIN, S.-U. Chimeric antibody: Potential applications for drug delivery and immunotherapy. **Biotherapy**, v. 3, n. 1, p. 43–53, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02175098>. Acesso em: 3 jan. 2021.

SHIRE, S. J.; SHAHROKH, Z.; LIU, J. Challenges in the Development of High Protein Concentration Formulations. **Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing**, p. 131–147, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-76643-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-76643-0_9). Acesso em: 17 nov. 2022.

SHIRTS, M.; CHODERA, J. Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. **The Journal of Chemical Physics**, v. 129, n. 12, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.2978177>. Acesso em: 6 jun. 2023.

SHIVAANI KUMMAR *et al.* Phase II trial of PF-03084014 in adults with desmoid tumors/aggressive fibromatosis. **Journal of Clinical Oncology**, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.10563](https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.10563). Acesso em: 12 set. 2021.

SHKURTI, A. *et al.* pyPcazip: A PCA-based toolkit for compression and analysis of molecular simulation data. **SoftwareX**, v. 5, p. 44–50, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2016.04.002>. Acesso em: 1 set. 2020.

SIEBENMORGEN, T.; ZACHARIAS, M. Computational prediction of protein–protein binding affinities. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 10, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wcms.1448>. Acesso em: 11 ago. 2023.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21708>. Acesso em: 21 jan. 2024.

SILKINA, M. V. *et al.* Optimization of Electrofusion Parameters for Producing Hybridomas Synthesizing Human Monoclonal Antibodies. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 984–991, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/s0003683822090095>. Acesso em: 31 maio 2024.

SILVA, C. R. da. **Biobetters Como Alternativas Aos Biossimilares Para Aumentar O Acesso A Produtos Biológicos No Brasil.** 2021. Dissertação–Universidade Federal Fluminense, 2021. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/handle/1/27419>. Acesso em: 6 set. 2024.

SKOPALÍK, J.; ANZENBACHER, P.; OTYEPKA, M. Flexibility of Human Cytochromes P450: Molecular Dynamics Reveals Differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which Correlate with Their Substrate Preferences. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 27, p. 8165–8173, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp800311c>. Acesso em: 17 jun. 2022.

SLANINOVA, V. *et al.* Notch stimulates growth by direct regulation of genes involved in the control of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. **Open Biology**, v. 6, n. 2, p. 150155–150155, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsob.150155>. Acesso em: 9 set. 2021.

SMITH, C. R. *et al.* An Automated Method for the Correction of Unsubstantiated Ramachandran Outliers in Protein Structures. **The FASEB Journal**, v. 31, n. S1, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.761.19](https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.761.19). Acesso em: 1 abr. 2021.

SMITH, D. *et al.* A phase 1 dose escalation and expansion study of Tarextumab (OMP-59R5) in patients with solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 4, p. 722–730, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0714-6>. Acesso em: 1 ago. 2024.

SMITH, D. C. *et al.* A Phase I Dose Escalation and Expansion Study of the Anticancer Stem Cell Agent Demcizumab (Anti-DLL4) in Patients with Previously Treated Solid Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 24, p. 6295–6303, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-1373>. Acesso em: 1 maio 2021.

SMITH, G. R.; STERNBERG, M. J. E. Prediction of protein–protein interactions by docking methods. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 1, p. 28–35, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00285-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00285-3). Acesso em: 12 fev. 2022.

SMITH, R. A. *et al.* ASN004, A 5T4-targeting scFv-Fc Antibody–Drug Conjugate with High Drug-to-Antibody Ratio, Induces Complete and Durable Tumor Regressions in Preclinical Models. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 20, n. 8, p. 1327–1337, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-20-0565>. Acesso em: 21 maio 2024.

SORMANNI, P. *et al.* Rapid and accurate in silico solubility screening of a monoclonal antibody library. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07800-w>. Acesso em: 1 set. 2022.

SPAAR, A.; HELMS, V. Free Energy Landscape of Protein–Protein Encounter Resulting from Brownian Dynamics Simulations of Barnase:Barstar. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 1, n. 4, p. 723–736, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct050036n>. Acesso em: 10 out. 2020.

SPRIANO, F. *et al.* In vitro anti-lymphoma activity of the first-in-class pan-NOTCH transcription inhibitor CB-103. **British Journal of Haematology**, v. 200, n. 5, p. 669–672, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bjh.18576>. Acesso em: 15 ago. 2024.

SOUSOUNIS, K. *et al.* Conservation of the three-dimensional structure in non-homologous or unrelated proteins. **Human Genomics**, v. 6, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1479-7364-6-10>. Acesso em: 20 nov. 2023.

SRINIVASAN, J. *et al.* Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 37, p. 9401–9409, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja981844+>. Acesso em: 2 dez. 2021.

SRIURANPONG, V. *et al.* Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 7, p. 3200–3205, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11306509/>. Acesso em: 1 nov. 2021.

STANFIELD, R. L.; WILSON, I. A. Antibody Structure. **ASM Press eBooks**, p. 49–62, 26 maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/9781555817411.ch3>. Acesso em: 30 jan. 2022.

STEIN, S. A. M. *et al.* Chapter 13 Principal Components Analysis: A Review of its Application on Molecular Dynamics Data. **Annual Reports in Computational Chemistry**, p. 233–261, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1574-1400\(06\)02013-5](https://doi.org/10.1016/s1574-1400(06)02013-5). Acesso em: 10 set. 2021.

STITES, W. E. Protein–Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 5, p. 1233–1250, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr960387h>. Acesso em: 1 ago. 2021.

STONE, C. A.; SPILLER, B. W.; SMITH, S. A. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.11.018>. Acesso em: 10 set. 2024.

STOYANOVA, T. *et al.* Activation of Notch1 synergizes with multiple pathways in promoting castration-resistant prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 42, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1614529113>. Acesso em: 1 out. 2021.

STRANGES, P. B.; KUHLMAN, B. A comparison of successful and failed protein interface designs highlights the challenges of designing buried hydrogen bonds. **Protein Science**, v. 22, n. 1, p. 74–82, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.2187>. Acesso em: 8 out. 2022.

STROSBERG, J. R. *et al.* A phase II study of RO4929097 in metastatic colorectal cancer. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 48, n. 7, p. 997–1003, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.056>. Acesso em: 10 maio 2021.

STUDER, G. *et al.* QMEANDisCo – Distance Constraints Applied on Model Quality

- Estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>. Acesso em: 11 maio 2023.
- SUBRAMANIAM, S. et al. Resolution advances in cryo-EM enable application to drug discovery. **Current Opinion in Structural Biology**, p. 194–202, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.009>. Acesso em: 10 set. 2021.
- SUN, H. et al. Revealing the favorable dissociation pathway of type II kinase inhibitors via enhanced sampling simulations and two-end-state calculations. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep08457>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 1 out. 2024.
- TAGAMI, S. et al. Regulation of Notch Signaling by Dynamic Changes in the Precision of S3 Cleavage of Notch-1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 1, p. 165–176, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.00863-07>. Acesso em: 1 maio 2021.
- TAMURA, K. et al. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-Jκ/Su(H). **Current Biology**, v. 5, n. 12, p. 1416–1423, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00279-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00279-x). Acesso em: 1 set. 2022.
- THEILLET, F.-X. et al. The alphabet of intrinsic disorder. **Intrinsically Disordered Proteins**, v. 1, n. 1, p. e24360, jan. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/idp.24360>. Acesso em: 30 jan. 2024.
- THOMPSON, B. J. et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1825–1835, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20070872>. Acesso em: 31 maio 2022.
- THURBER, A. E. et al. Inverse expression states of the BRN2 and MITF transcription factors in melanoma spheres and tumour xenografts regulate the NOTCH pathway. **Oncogene**, v. 30, n. 27, p. 3036–3048, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2011.33>. Acesso em: 1 set. 2023.
- TIBERTI, M. et al. MutateX: an automated pipeline for *in silico* saturation mutagenesis of protein structures and structural ensembles. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbac074>. Acesso em: 10 ago. 2024.
- TORRES, P. H. M. et al. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>. Acesso em: 1 fev. 2024.
- TORRES-OBREQUE, K. M. et al. Building better biobetters: From fundamentals to industrial application. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 65–81, 2022. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.08.009>. Acesso em: 1 out. 2024.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 2, p. 187–199, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90121-8](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90121-8). Acesso em: 22 out. 2022.

TREIMAN, M.; CASPERSEN, C.; CHRISTENSEN, S. B. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 131–135, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(98\)01184-5](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(98)01184-5). Acesso em: 10 jan. 2023.

TSUCHIYA, Y.; YAMAMORI, Y.; TOMII, K. Protein–protein interaction prediction methods: from docking-based to AI-based approaches. **Biophysical Reviews**, v. 14, n. 6, p. 1341–1348, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01032-7>. Acesso em: 1 dez. 2024.

TUCCINARDI, T. What is the current value of MM/PBSA and MM/GBSA methods in drug discovery? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 11, p. 1233–1237, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1942836>. Acesso em: 1 out. 2024.

TYAGI, A.; SHARMA, A. K.; DAMODARAN, C. A Review on Notch Signaling and Colorectal Cancer. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1549, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9061549>. Acesso em: 20 nov. 2022.

URAKUBO, Y.; IKURA, T.; ITO, N. Crystal structural analysis of protein-protein interactions drastically destabilized by a single mutation. **Protein Science**, v. 17, n. 6, p. 1055–1065, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1110/ps.073322508>. Acesso em: 1 mar. 2021.

VALVERDE , R. **Fiocruz sela parceria com Inca e divulga estudo sobre custos do câncer no SUS**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-sela-parceria-com-inca-e-divulga-estudo-sobre-custos-do-cancer-no-sus#:~:text=De%20acordo%20com%20Nina%2C%20houve>. Acesso em: 6 set. 2024.

VAN DURME, J. *et al.* A graphical interface for the FoldX forcefield. **Bioinformatics**, v. 27, n. 12, p. 1711–1712, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr254>. Acesso em: 12 jan. 2024.

VAN ZUNDERT, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 720–725, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>. Acesso em: 9 fev. 2021.

VANGONE, A. *et al.* Sense and simplicity in HADDOCK scoring: Lessons from CASP-CAPRI round 1. **Proteins**, v. 85, n. 3, p. 417–423, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.25198>. Acesso em: 1 jan. 2022.

VÁRADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n.

D1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>. Acesso em: 1 dez. 2024.

VENKATESH, H. S. *et al.* Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. **Nature**, v. 549, n. 7673, p. 533–537, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature24014>. Acesso em: 12 maio 2022.

VERKHIVKER, G. M. *et al.* Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 14, n. 8, p. 731–751, 1 nov. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/a:1008158231558>. Acesso em: 2 fev. 2021.

VERMA, S.; JAIN, P.; CHAUHAN, P. Biobetters: The Better Biologics And Their Regulatory Overview. **International Journal of Drug Regulatory Affairs**, v. 4, n. 1, p. 13–20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22270/ijdra.v4i1.177>. Acesso em: 1 out. 2024.

VIDAL, T. J.; FIGUEIREDO, T. A.; PEPE, V. L. E. O mercado brasileiro de anticorpos monoclonais utilizados para o tratamento de câncer. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311x00010918>. Acesso em: 1 dez. 2024.

VIGOLO, M. *et al.* The Efficacy of CB-103, a First-in-Class Transcriptional Notch Inhibitor, in Preclinical Models of Breast Cancer. **Cancers**, v. 15, n. 15, p. 3957–3957, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers15153957>. Acesso em: 12 out. 2024.

VILLALI, J.; KERN, D. Choreographing an enzyme's dance. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 5, p. 636–643, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.08.007>. Acesso em: 1 out. 2023.

WANG, E. *et al.* End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 16, p. 9478–9508, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>. Acesso em: 24 jun. 2023.

WANG, H. *et al.* AblImmPred: An immunogenicity prediction method for therapeutic antibodies using AntibERTy-based sequence features. **PLoS ONE**, v. 19, n. 2, p. e0296737–e0296737, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296737>. Acesso em: 1 dez. 2024.

WANG, L. *et al.* Downhill binding energy surface of the barnase–barstar complex. **Biopolymers**, v. 93, n. 11, p. 977–985, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bip.21507>. Acesso em: 21 maio 2022.

WANG, M. *et al.* A megadiverse naïve library derived from numerous camelids for efficient and rapid development of VHH antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 657, p. 114871–114871, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114871>. Acesso em: 30 out. 2024.

WANG, M. *et al.* Expression of Notch1, Jagged1 and β-catenin and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. **Neoplasma**, v. 56, n. 6,

p. 533–541, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.4149/neo\\_2009\\_06\\_533](https://doi.org/10.4149/neo_2009_06_533). Acesso em: 30 out. 2021.

WANG, N. J. *et al.* Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 43, p. 17761–17766, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1114669108>. Acesso em: 1 set. 2022.

WANG, T. *et al.* How Optimal Are the Binding Energetics of Barnase and Barstar? **Biophysical Journal**, v. 87, n. 3, p. 1618–1630, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040964>. Acesso em: 6 jun. 2021.

WANG, W.; KOLLMAN, P. A. Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model 1 Edited by B. Honig. **Journal of Molecular Biology**, v. 303, n. 4, p. 567–582, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4057>. Acesso em: 1 jul. 2023.

WANG, Y.; CHAMBERLIN, A. C.; NOSKOV, S. Yu. Molecular Strategies to Achieve Selective Conductance in NaK Channel Variants. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 8, p. 2041–2049, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp4107537>. Acesso em: 10 set. 2022.

WANG, Z. *et al.* Using apelin-based synthetic Notch receptors to detect angiogenesis and treat solid tumors. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15729-4>. Acesso em: 16 jul. 2024.

WARREN, M. S.; MAROLEWSKI, A. E.; BENKOVIC, S. J. A Rapid Screen of Active Site Mutants in Glycinamide Ribonucleotide Transformylase. **Biochemistry**, v. 35, n. 27, p. 8855–8862, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi9528715>. Acesso em: 1 dez. 2020.

WEINER, L. M. Fully Human Therapeutic Monoclonal Antibodies. **Journal of Immunotherapy**, v. 29, n. 1, p. 1–9, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000192105.24583.83>. Acesso em: 21 maio 2023.

WEISER, J.; SHENKIN, P. S.; STILL, W. C. Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). **Journal of Computational Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 217–230, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19990130\)20:2%3C217::aid-jcc4%3E3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19990130)20:2%3C217::aid-jcc4%3E3.0.co;2-a). Acesso em: 21 jan. 2024.

WEISSMANN, S. *et al.* Prognostic impact and landscape of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a study on 852 patients. **Leukemia**, v. 27, n. 12, p. 2393–2396, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.218>. Acesso em: 1 out. 2023.

WENG, A. P. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Science**, v. 306, n. 5694, p. 269–271, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1102160>. Acesso em: 25 jan. 2024.

WESTIN, J. R. *et al.* Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 1, p. 69–77, 2014.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70551-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70551-5). Acesso em: 1 out. 2022.

WHARTON, K. A. *et al.* Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. **Cell**, v. 43, n. 3, p. 567–581, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90229-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90229-6). Acesso em: 1 ago. 2021.

WIELAND, E. *et al.* Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis. **Cancer Cell**, v. 31, n. 3, p. 355–367, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.01.007>. Acesso em: 1 jul. 2024.

WILLIAMS, C. J. *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293–315, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3330>. Acesso em: 5 out. 2020.

WINTER, G.; HARRIS, W. J. Humanized antibodies. **Immunology Today**, v. 14, n. 6, p. 243–246, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90039-n](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90039-n). Acesso em: 1 out. 2021.

WOO, H.-N. *et al.* Alzheimer's disease and Notch signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 4, p. 1093–1097, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.093>. Acesso em: 10 maio 2023.

WORD, J. M. *et al.* Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 4, p. 1711–1733, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2400>. Acesso em: 21 jan. 2022.

WU, H. *et al.* Multiensemble Markov models of molecular thermodynamics and kinetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1525092113>. Acesso em: 1 dez. 2023.

WU, K.; HU, L.; HOU, J. Selective suppression of Notch1 inhibits proliferation of renal cell carcinoma cells through JNK/p38 pathway. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 2795–2800, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2016.4687>. Acesso em: 1 out. 2023.

WU, Y. *et al.* Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1052–1057, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature08878>. Acesso em: 5 jan. 2024.

XENAKI, K. T.; OLIVEIRA, S.; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M. P. Antibody or Antibody Fragments: Implications for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Solid Tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01287>. Acesso em: 22 jan. 2024.

XIAO, Y.-S. *et al.* Major vault protein is a direct target of Notch1 signaling and contributes to chemoresistance in triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 440-441, p. 156–167, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.031>. Acesso em: 21 nov. 2021.

XIE, J. *et al.* The NOTCH1-HEY1 pathway regulates self-renewal and epithelial-mesenchymal transition of salivary adenoid cystic carcinoma cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 4, p. 598–610, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.36407>. Acesso em: 1 dez. 2024.

XIE, M. *et al.* Alterations of Notch pathway in patients with adenoid cystic carcinoma of the trachea and its impact on survival. **Lung Cancer**, v. 121, p. 41–47, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.04.020>. Acesso em: 10 set. 2020.

XIE, Q. *et al.* Tspan5 promotes epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis of hepatocellular carcinoma by activating Notch signalling. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 11, p. 3184–3202, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12980>. Acesso em: 10 maio 2024.

XIN, L. *et al.* Identification of Strategic Residues at the Interface of Antigen–Antibody Interactions by In Silico Mutagenesis. **Interdisciplinary Sciences Computational Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 438–448, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12539-017-0242-7>. Acesso em: 1 dez. 2022.

XU, D. *et al.* Mimicking Native Interactions for Small-Molecule Inhibitors of Tight Protein-Protein Interactions. **Journal of chemical information and modeling**, v. 57, n. 9, p. 2250–2272, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00181>. Acesso em: 25 set. 2022.

XU, R. *et al.* Molecular and Clinical Effects of Notch Inhibition in Glioma Patients: A Phase 0/I Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 19, p. 4786–4796, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-0048>. Acesso em: 1 jan. 2024.

XUE, L. C. *et al.* Computational prediction of protein interfaces: A review of data driven methods. **FEBS Letters**, v. 589, n. 23, p. 3516–3526, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.003>. Acesso em: 30 nov. 2022.

YANG, P. *et al.* *In silicoprediction of drug therapy in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 3, p. 567–593, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jp271282>. Acesso em: 1 out. 2023.

YANG, X. *et al.* Broad Sarbecovirus Neutralizing Antibodies Obtained by Computational Design and Synthetic Library Screening. **Journal of Virology**, v. 97, n. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.00610-23>. Acesso em: 1 dez. 2024.

YOSHIDA, R. *et al.* The pathological significance of Notch1 in oral squamous cell carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 93, n. 10, p. 1068–1081, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.95>. Acesso em: 5 out. 2022.

YOUSIF, N. G. *et al.* Notch1 ligand signalling pathway activated in cervical cancer: poor prognosis with high-level JAG1/Notch1. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 292, n. 4, p. 899–904, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3694-1>. Acesso em: 10 jan. 2024.

YU, X.-M. *et al.* Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. **Cancer**, v. 119, n. 4, p. 774–781, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.27742>. Acesso em: 12 out. 2022.

ZAHAVI, D.; WEINER, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. **Antibodies**, v. 9, n. 3, p. 34, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antib9030034>. Acesso em: 5 jul. 2024.

ZALEWSKI, M. *et al.* Aggrescan4D: A comprehensive tool for pH-dependent analysis and engineering of protein aggregation propensity. **Protein Science**, v. 33, n. 10, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.5180>. Acesso em: 1 dez. 2024.

ZENDER, S. *et al.* A Critical Role for Notch Signaling in the Formation of Cholangiocellular Carcinomas. **Cancer Cell**, v. 23, n. 6, p. 784–795, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.019>. Acesso em: 1 out. 2021.

ZHANG, I. *et al.* Identifying and Overcoming the Sampling Challenges in Relative Binding Free Energy Calculations of a Model Protein:Protein Complex. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 19, n. 15, p. 4863–4882, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00333>. Acesso em: 1 out. 2024.

ZHANG, K. *et al.* A Notch1-neuregulin1 autocrine signaling loop contributes to melanoma growth. **Oncogene**, v. 31, n. 43, p. 4609–4618, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2011.606>. Acesso em: 31 maio 2022.

ZHANG, L. *et al.* Analysis of Monoclonal Antibody Sequence and Post-translational Modifications by Time-controlled Proteolysis and Tandem Mass Spectrometry. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 15, n. 4, p. 1479–1488, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.o115.056721>. Acesso em: 1 out. 2023.

ZHANG, Y. *et al.* Progressive and Prognosis Value of Notch Receptors and Ligands in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14897-6>. Acesso em: 1 out. 2024.

ZHENG, H. *et al.* Therapeutic Antibody Targeting Tumor- and Osteoblastic Niche-Derived Jagged1 Sensitizes Bone Metastasis to Chemotherapy. **Cancer Cell**, v. 32, n. 6, p. 731-747.e6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.002>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ZHENG, Y. *et al.* A Rare Population of CD24+ITGB4+Notchhi Cells Drives Tumor Propagation in NSCLC and Requires Notch3 for Self-Renewal. **Cancer Cell**, v. 24, n. 1, p. 59–74, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.021>. Acesso em: 10 jan. 2024.

ZHOU, B. *et al.* Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>. Acesso em: 1 dez. 2024.

ZOETE, V.; IRVING, M.; MICHELIN, O. MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. **Journal of Molecular Recognition**, v. 23, n. 2, p. 142–152, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmr.1005>.

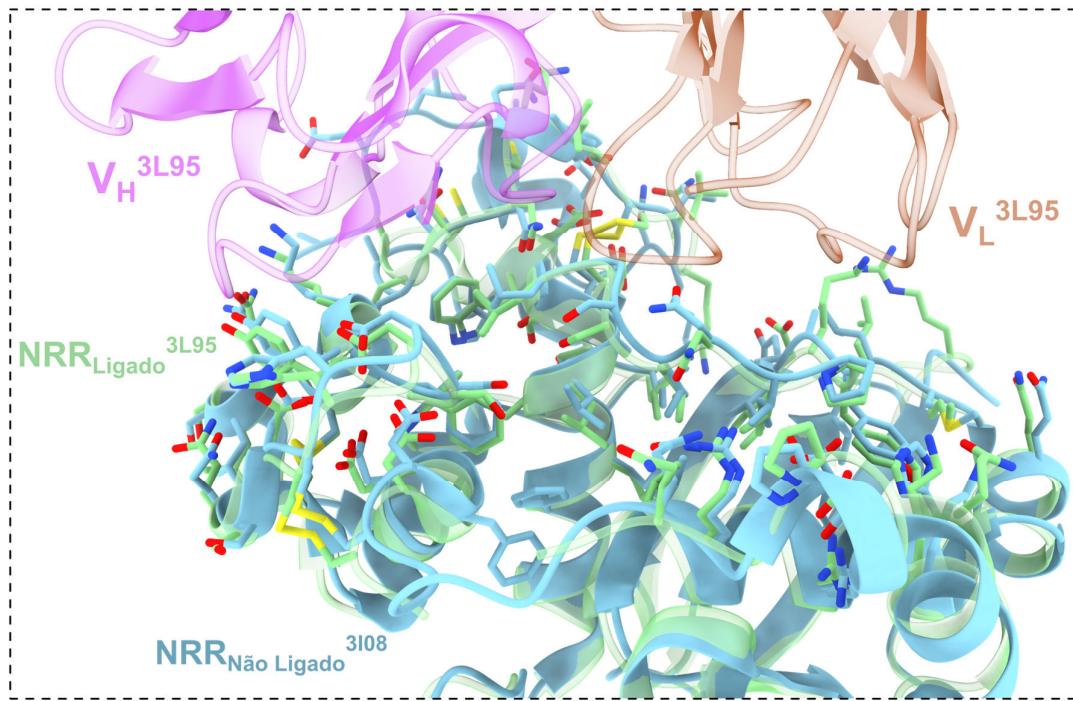
Acesso em: 10 mar. 2020.

ZOETE, V.; MICHELIN, O. Comparison between computational alanine scanning and per-residue binding free energy decomposition for protein-protein association using MM-GBSA: Application to the TCR-p-MHC complex. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 67, n. 4, p. 1026–1047, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.21395>. Acesso em: 21 mar. 2022.

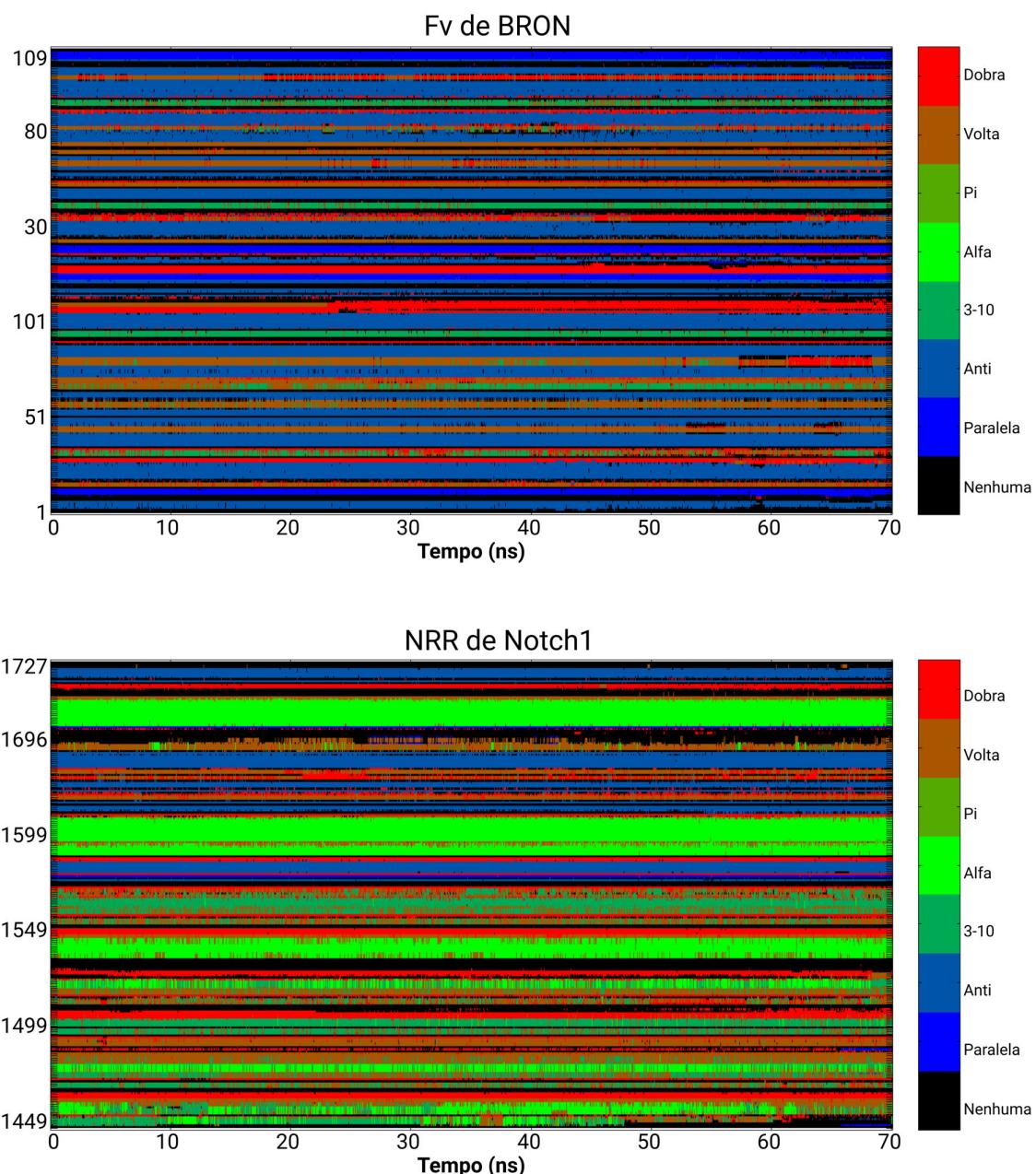
ZONG, F. *et al.* Abalign: a comprehensive multiple sequence alignment platform for B-cell receptor immune repertoires. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W17–W24, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad400>. Acesso em: 21 dez. 2024.

ZWEIDLER-MCKAY, P. A. *et al.* Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3898–3906, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0355>. Acesso em: 1 jun. 2021.

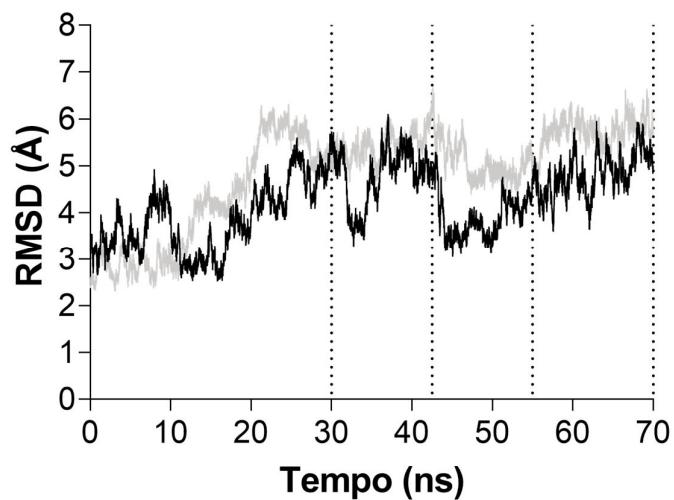
APÊNDICE A – COMPARAÇÃO DOS RESÍDUOS DE NRR NAS  
CONFORMAÇÕES LIGADA E NÃO-LIGADA



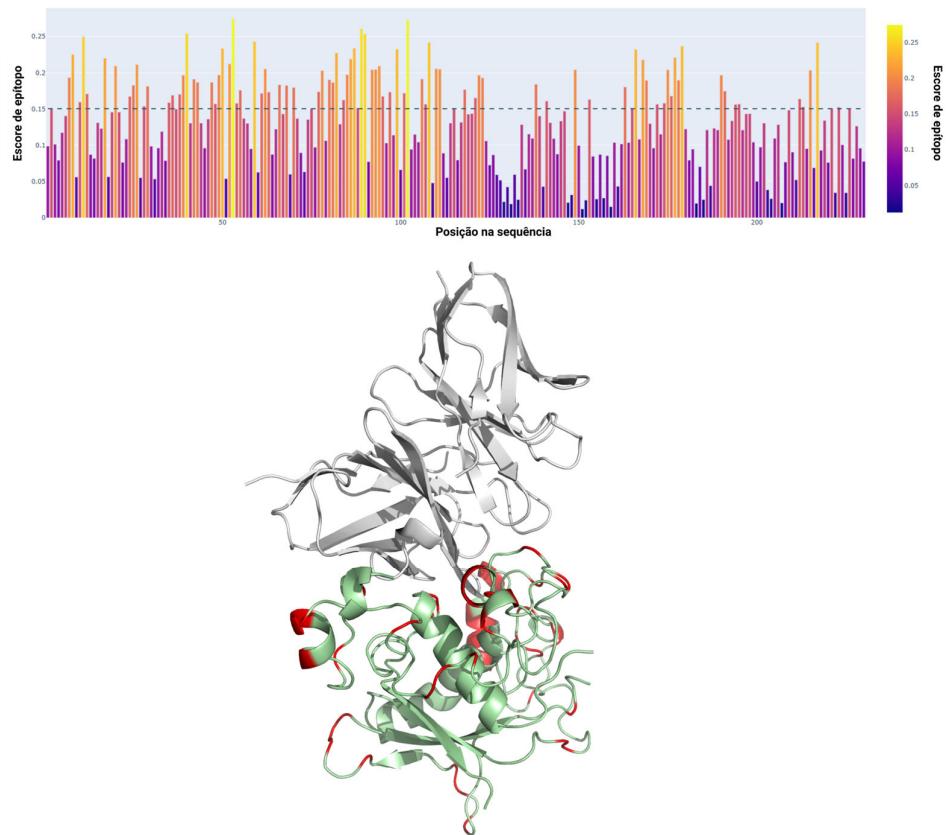
**APÊNDICE B – PREDIÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO COMPLEXO  
BRON-NRR AO LONGO DA DINÂMICA MOLECULAR AQUECIDA**



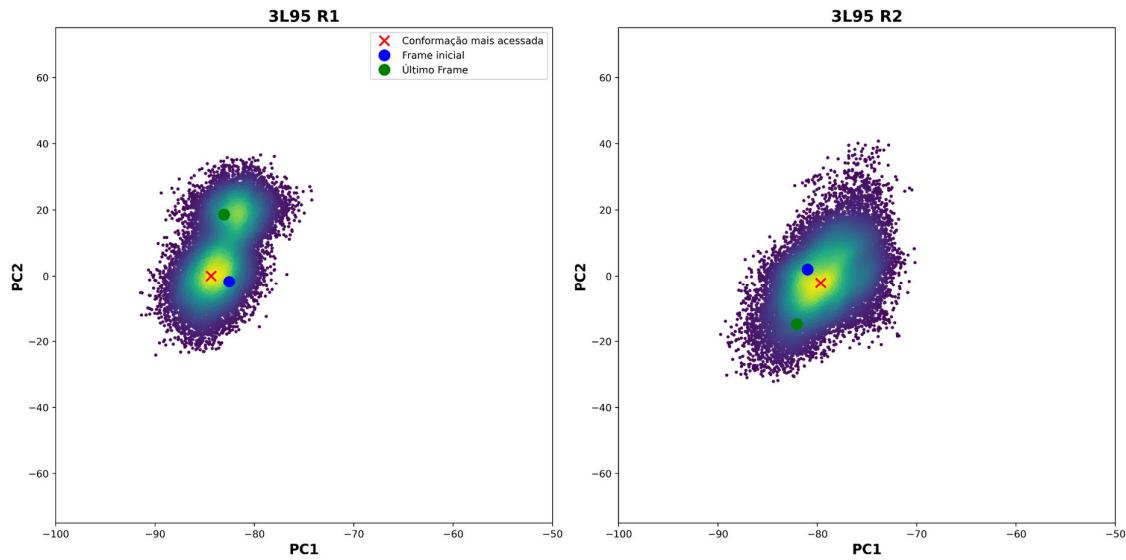
**APÊNDICE C – DINÂMICA MOLECULAR AQUECIDA DO COMPLEXO BRON-  
NRR GERADO NO MODO ANTICORPO**

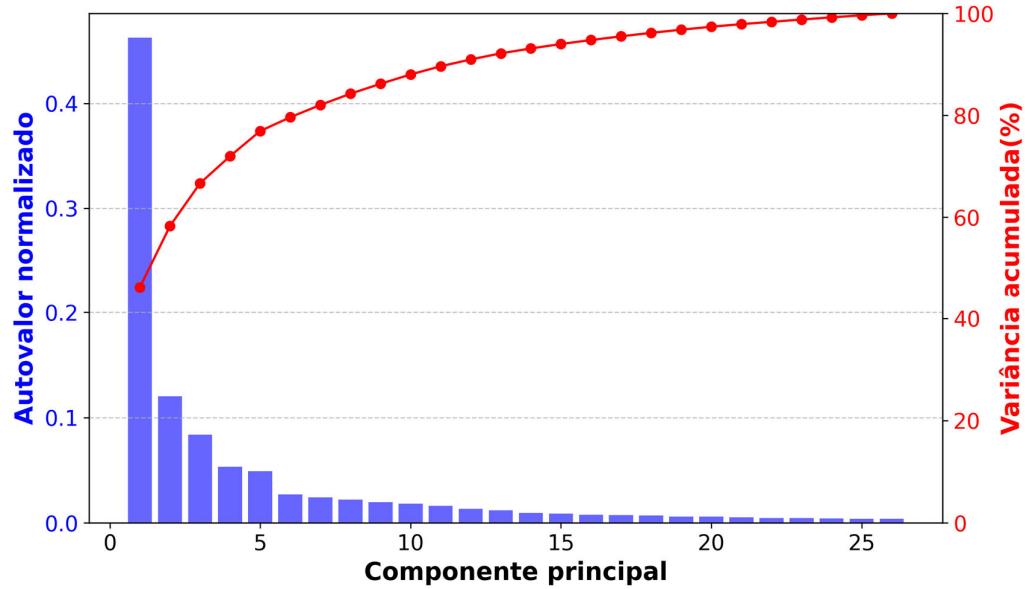


## APÊNDICE D – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS EM NRR

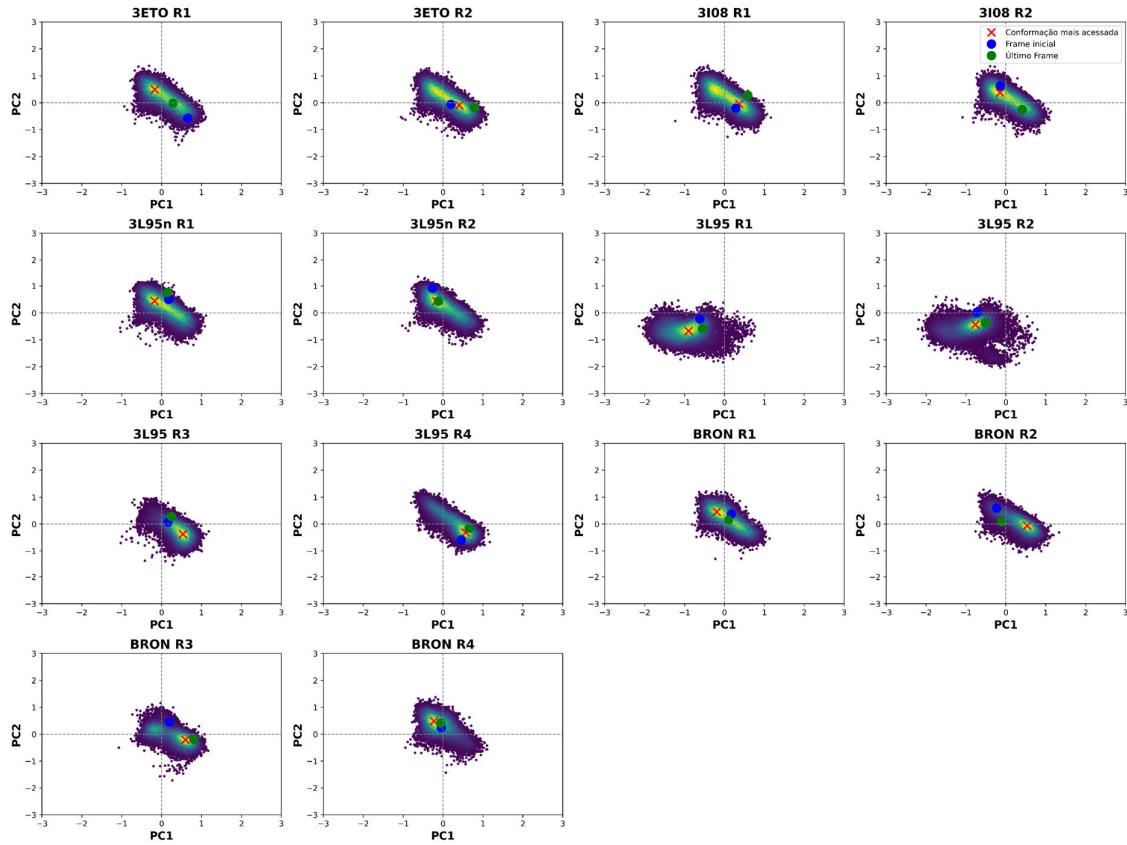


**APÊNDICE E – PCA DE NRR NAS DUAS PRIMEIRAS REPLICATAS DE  
SIMULAÇÃO COM 3L95**



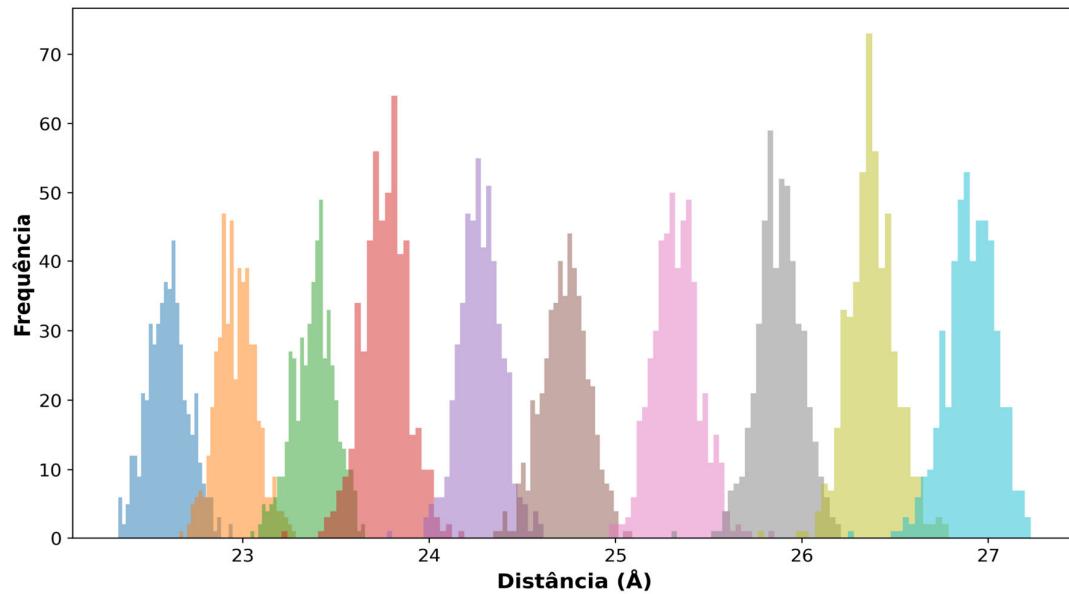
**APÊNDICE F – AUTOVALORES E VARIÂNCIA CUMULATIVA DA PCA DE NRR**

## APÊNDICE G – PCA DE S2 EM SIMULAÇÕES COM NRR LIGADO E NÃO-LIGADO

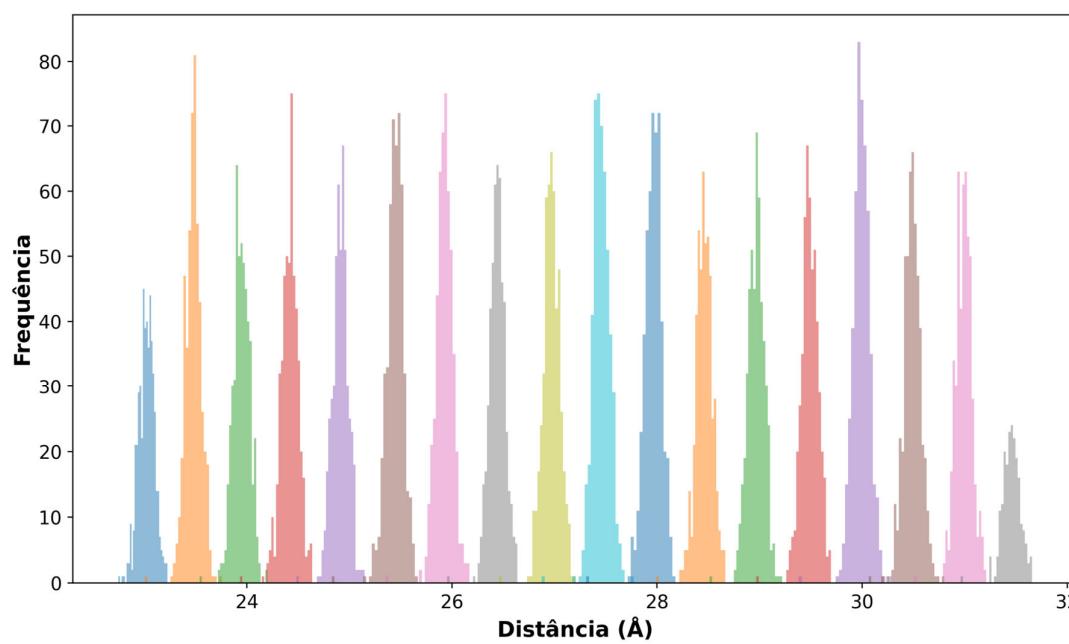


**APÊNDICE H – AMOSTRAGEM DAS JANELAS DE DM-US PARA BARNASE-BARSTAR COM JANELAS DE 0,5 Å**

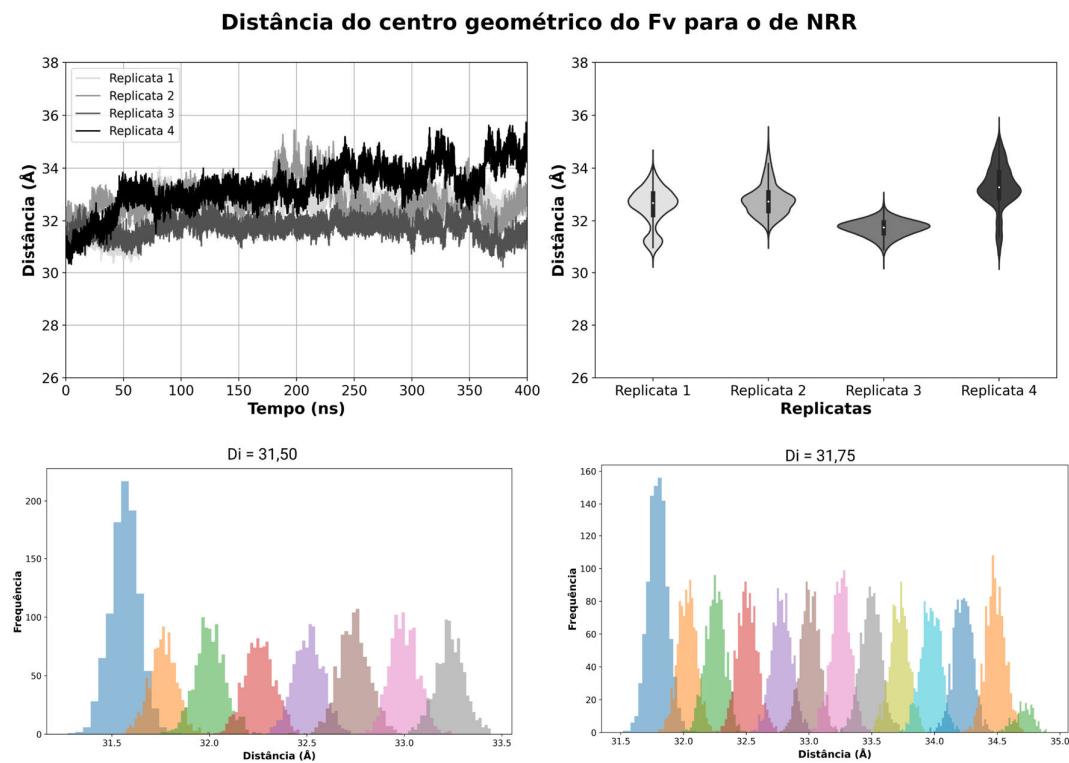
Constante de força = 40 kcal/mol.Å<sup>2</sup>



Constante de força = 50 kcal/mol.Å<sup>2</sup>

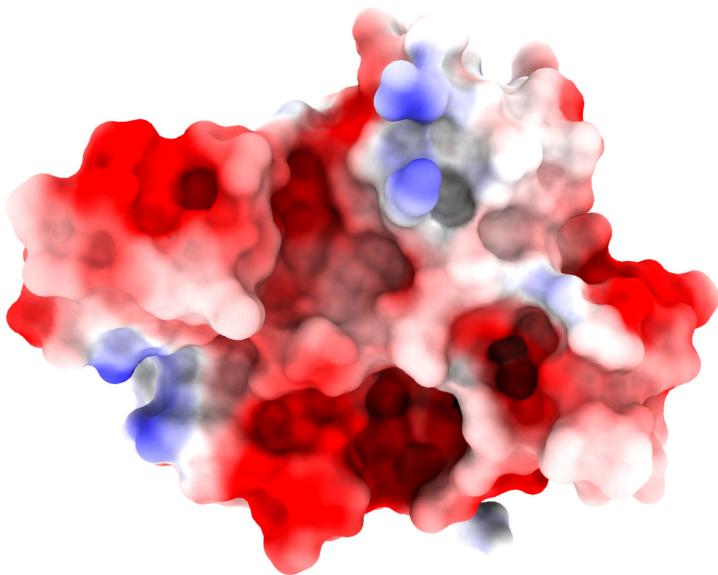
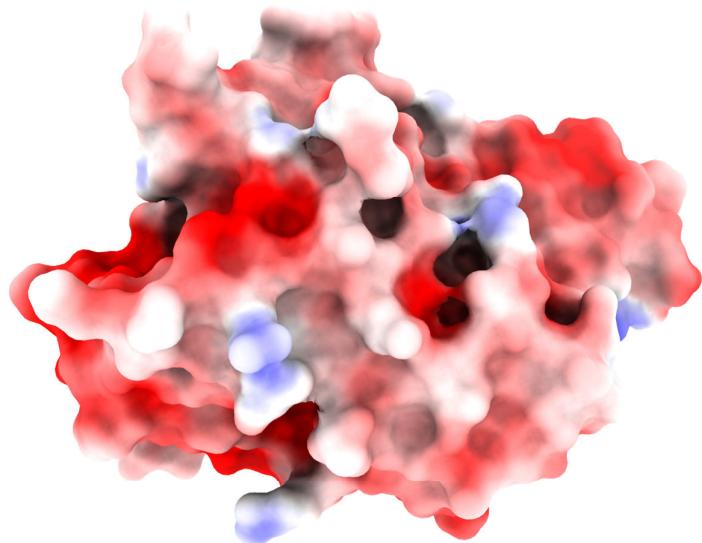


**APÊNDICE I – DISTÂNCIA INICIAL ENTRE OS CENTROS DE MASSA DE BRON  
E NRR PARA DM-US**

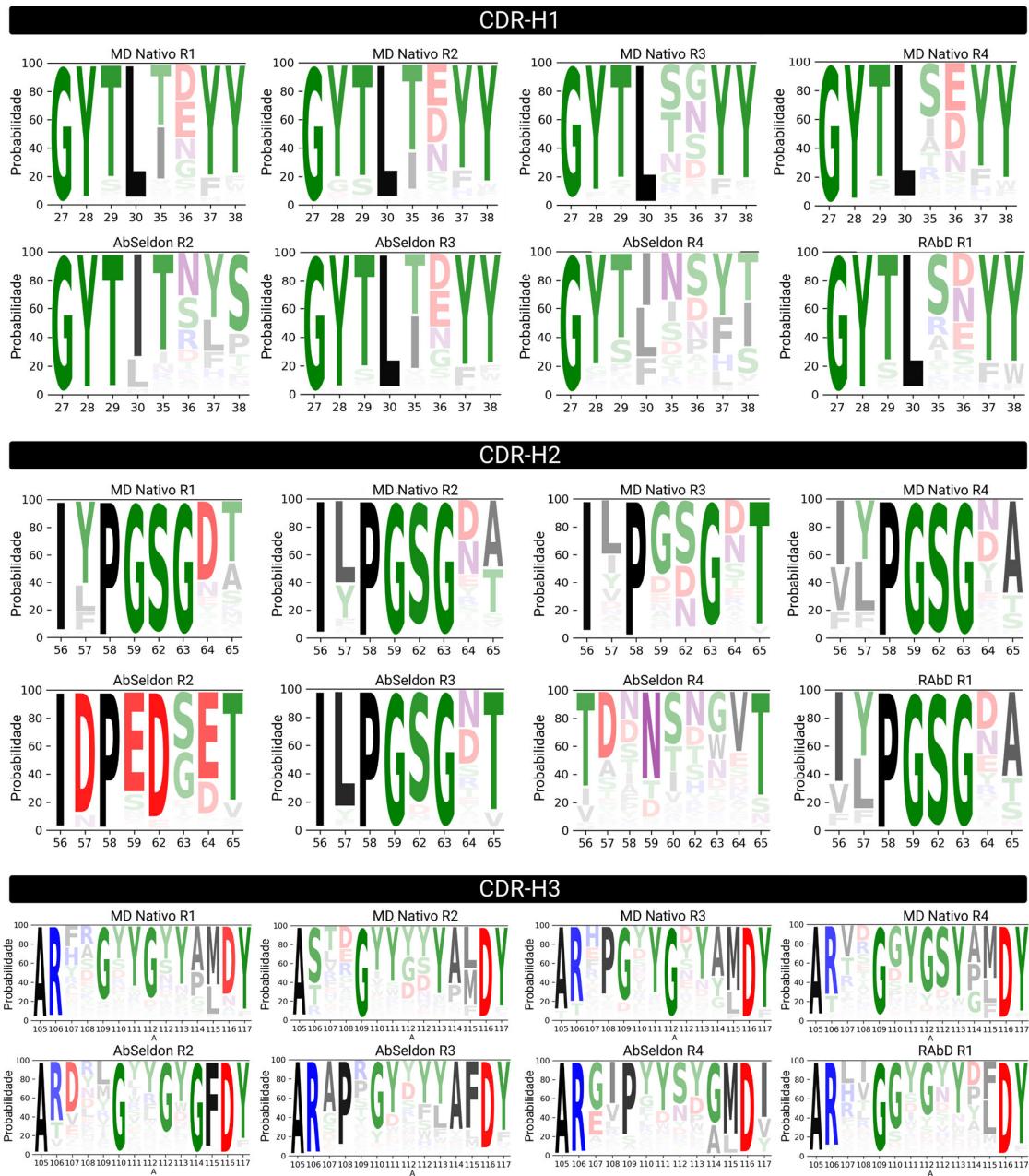


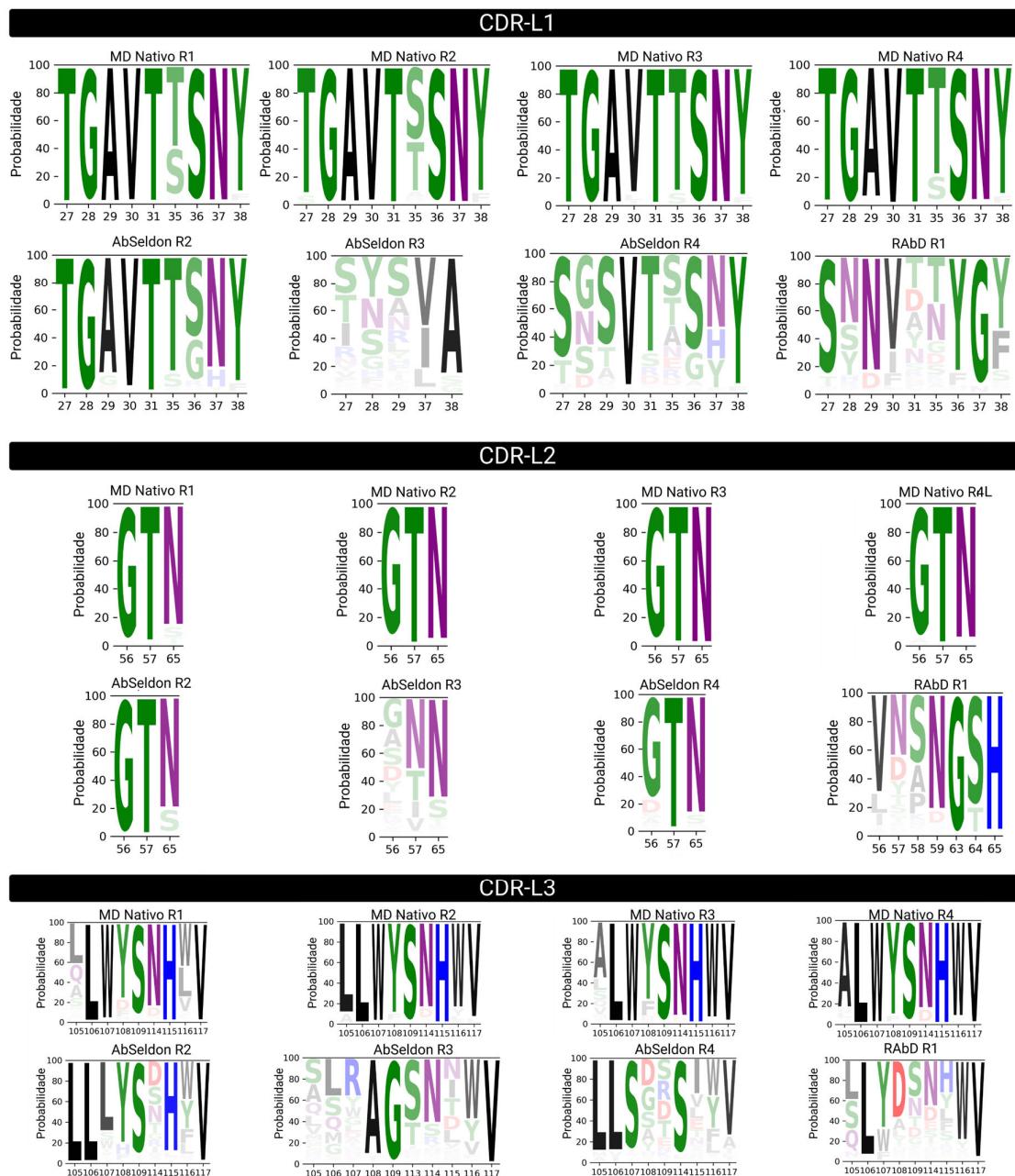
**APÊNDICE J – MUTAÇÕES QUE GERARAM GANHO DE  $\Delta G_{bind}$  DE PELO  
MENOS 0,5 kcal/mol**

Resíduo	Nº mutantes positivos	Melhor substituição	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Resíduo	Nº mutantes positivos	Melhor substituição	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)
<b>Replicata 1</b>				<b>Replicata 3</b>			
H 28	7	PHE	1,61	H 35	11	ARG	1,12
H 50	8	LYS	1,55	H 47	17	LYS	2,68
H 55	16	TYR	2,09	H 50	13	ARG	3,81
H 57	4	TRP	1,21	H 51	8	LYS	1,06
H 65	4	TRP	0,71	H 52	4	ASN	1,71
H 66	15	ASN	1,20	H 53	5	ASP	1,39
H 69	10	LEU	0,68	H 54	3	LEU	0,50
H 71	5	ARG	0,96	H 55	6	TRP	1,24
H 74	16	TYR	0,78	H 57	3	TYR	1,91
H 82	7	TRP	0,97	H 65	4	PHE	0,83
H 84	17	TRP	1,61	H 66	3	LEU	0,89
H 104	6	ARG	1,50	H 69	13	LEU	1,98
L 32	18	ARG	1,28	H 74	11	TRP	1,55
L 95	15	ASN	2,63	H 82	18	TRP	1,96
<b>Replicata 2</b>				H 84	9	GLN	1,65
H 28	1	TRP	0,63	H 85	17	ARG	1,04
H 31	4	TYR	1,36	H 99	11	ARG	0,86
H 33	6	PRO	0,53	H 101	12	ILE	0,52
H 35	19	ALA	0,56	H 103	4	ARG	1,80
H 50	12	LYS	1,40	H 104	11	GLN	0,83
H 51	1	LYS	0,63	H 105	7	ARG	2,06
H 52	1	TYR	0,64	L 32	3	TRP	0,64
H 53	2	THR	0,70	L 52	5	TRP	0,75
H 55	12	ARG	1,89	<b>Replicata 4</b>			
H 59	10	HIS	2,58	H 28	8	MET	0,67
H 60	1	TRP	0,53	H 50	13	THR	2,20
H 65	2	TYR	2,77	H 51	3	ARG	0,85
H 66	2	SER	0,66	H 52	18	TYR	3,52
H 67	10	TRP	1,76	H 53	12	CYS	0,56
H 69	16	CYS	1,01	H 55	5	TRP	3,33
H 72	1	GLU	0,69	H 56	5	SER	1,40
H 84	16	LYS	1,18	H 59	12	TRP	3,34
H 85	8	PHE	1,89	H 60	2	TRP	0,73
H 102	10	PHE	1,65	H 62	8	TRP	2,18
H 104	19	MET	1,58	H 65	5	ARG	2,99
L 52	6	GLN	1,12	H 66	7	SER	1,02
L 93	16	TYR	1,28	H 69	15	TYR	0,97
L 95	15	ARG	1,46	H 71	6	GLN	0,60
L 96	6	ARG	3,50	H 82	9	TRP	0,70
				H 84	18	TYR	1,79
				H 85	4	TYR	1,35
				H 103	7	TRP	1,87
				H 104	7	CYS	1,89
				H 106	1	TRP	0,80
				L 32	5	ASP	0,67
				L 34	1	TRP	0,65
				L 95	16	ARG	2,76
				L 96	4	TYR	1,24

**APÊNDICE K – SUPERFÍCIE ELETROSTRÁTICA DE NRR**

**APÊNDICE L – PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS NA CDR  
QUE CONSERVEM O MESMO DOBRAMENTO, CALCULADO PELO ANTIFOLD  
COM NUMERAÇÃO IMGT**

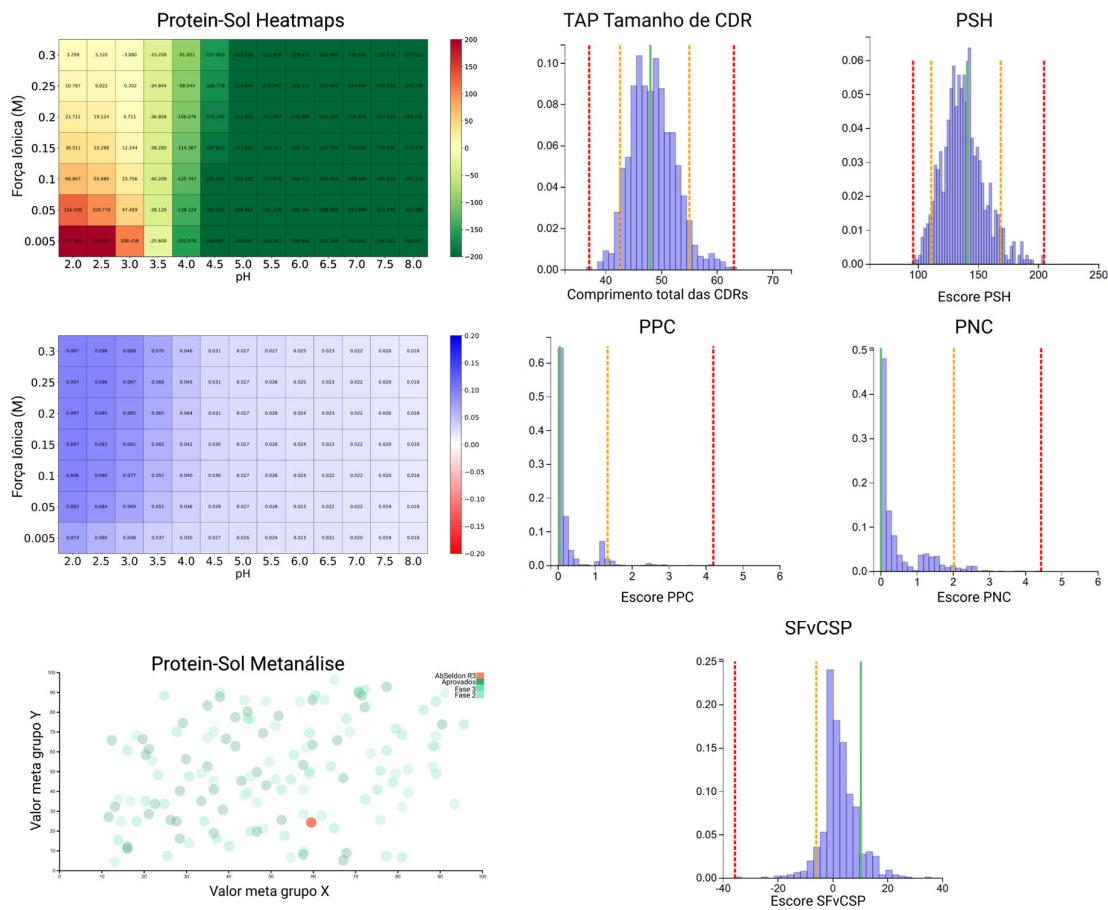




**APÊNDICE M – MODIFICAÇÕES EM BRON PROPOSTAS ATRAVÉS DE  
MODELOS DE LINGUAGEM**

Cadeia	Mutação	Nº de modelos de linguagem recomendando a alteração
VH	E35H	5
VH	D77S	5
VH	R30T	2
VH	L52Y	2
VH	M108Y	1
VH	R30S	1
VH	L52N	1
VH	V24G	1
VH	E35G	1
VH	V24A	1
VL	G51Y	6
VL	L69S	6
VL	G71N	3
VL	L77I	3
VL	E87D	3
VL	T11S	3
VL	P58S	2
VL	K72T	2
VL	R23T	1
VL	S24L	1
VL	H97T	1
VL	T48L	1
VL	L68G	1
VL	K72D	1

## APÊNDICE N – AVALIAÇÃO DO ABSELDON R3 COM O PROTEIN-SOL E THERAPEUTIC ANTIBODY PROFILER



**APÊNDICE O - DOCKING COM O CLUSPRO DOS SCFVS COM BRON NO MODO ANTICORPO**

scFv com linker de 9AA			
Cluster	Nº de estruturas	Escore	
1	63	Centro do cluster	-405,2
		Menor energia	-405,2
2	44	Centro do cluster	-294.3
		Menor energia	-359.1
6	33	Centro do cluster	-286.7
		Menor energia	-313.4
7	24	Centro do cluster	-266.5
		Menor energia	-316.8
14	20	Centro do cluster	-272.0
		Menor energia	-321.1
scFv com linker de 12AA			
1	68	Centro do cluster	-291.3
		Menor energia	-366.5
2	56	Centro do cluster	-289.7
		Menor energia	-358.2
5	40	Centro do cluster	-362.9
		Menor energia	-362.9
16	18	Centro do cluster	-351.9
		Menor energia	-351.9
26	10	Centro do cluster	-302.3
		Menor energia	-302.3
scFv com linker de 15AA			
2	65	Centro do cluster	-351.2
		Menor energia	-354.6
3	62	Centro do cluster	-396.9
		Menor energia	-397.8
6	36	Centro do cluster	-378.1
		Menor energia	-378.1
17	14	Centro do cluster	-338.5
		Menor energia	-338.5
23	12	Centro do cluster	-293.5
		Menor energia	-293.5

## APÊNDICE P – ANÁLISE DAS INTERFACES SCFV-BRON COM PDBSUM

