



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

VIVIANE MACEDO SABOIA

**ESTUDO DA ESTABILIDADE ESTRUTURAL DO SCFV DO ANTICORPO
OBINUTUZUMAB E DA SUA INTERAÇÃO COM UM PEPTÍDEO CÍCLICO DE
CD20 VIA DINÂMICA MOLECULAR**

FORTALEZA

2018

VIVIANE MACEDO SABOIA

ESTUDO DA ESTABILIDADE ESTRUTURAL DO SCFV DO ANTICORPO
OBINUTUZUMAB E DA SUA INTERAÇÃO COM UM PEPTÍDEO CÍCLICO DE CD20 VIA
DINÂMICA MOLECULAR

Monografia apresentada ao Curso de Graduação
em Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do grau de bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Marcos Roberto Louren-
zoni

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

S122e Saboia, Viviane Macedo.

Estudo da estabilidade estrutural do scFv do anticorpo obinutuzumab e da sua interação com um peptídeo cíclico de CD20 via dinâmica molecular / Viviane Macedo Saboia. – 2018.
60 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.

1. Dinâmica molecular. 2. Anticorpos. 3. Biofísica. 4. Anti-CD20. I. Título.

CDD 661

VIVIANE MACEDO SABOIA

ESTUDO DA ESTABILIDADE ESTRUTURAL DO SCFV DO ANTICORPO
OBINUTUZUMAB E DA SUA INTERAÇÃO COM UM PEPTÍDEO CÍCLICO DE CD20 VIA
DINÂMICA MOLECULAR

Monografia apresentada ao Curso de Graduação
em Biotecnologia do Centro de Ciências da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do grau de bacharel em
Biotecnologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcos Roberto Lourenzoni (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz/CE)

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

Prof^a. Dr^a. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Cristine e Emerson.

AGRADECIMENTOS

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À **Fundação Oswaldo Cruz/CE** pelos recursos cedidos.

Ao Prof. Dr. **Marcos Roberto Lourenzoni**, pelos conselhos e ensinamentos, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário e pela orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof^a. Dr^a **Erika Freitas Mota** e Prof. Dr. **José Hélio Costa** pela prontidão em participar da banca examinadora e pelo tempo dedicado à leitura do meu trabalho.

Ao Dr. **Eduardo Henrique Salviano Bezerra**, pela prontidão em aceitar o convite para participar da banca examinadora na qualidade de suplente.

Ao **corpo docente do curso de Biotecnologia** da UFC, por todos os ensinamentos valiosos dentro e fora da sala de aula.

Ao **Gilmar Ferreira da Costa**, por seu esforço e prestatividade em me auxiliar em todas as questões burocráticas da graduação.

Aos funcionários da **Fundação Oswaldo Cruz/CE**, pelo suporte, pela simpatia e por terem ajudado em tudo que estivesse ao alcance.

Aos meus colegas de trabalho da Fiocruz/CE, **Ana Virgínia Frota**, **Alison Rebouças** e **Natália Fernandes** por me ajudarem sempre que era necessário e pelos bons momentos que passamos trabalhando juntos.

À minha mãe, **Cristine Macedo**, por me ensinar que o que determina quem você é não são suas conquistas acadêmicas ou profissionais e sim, seu caráter e amor ao próximo.

Ao meu pai, **Emerson Saboia**, por seu incentivo, paciência e por acreditar em mim.

Ao **Pedro Henrique Carvalho**, por enfrentar todos os desafios comigo e por ser uma das minhas pessoas favoritas nesse planetinha azul.

Ao Prof. Dr. **Amauri Jardim de Paula**, por todos os ensinamentos no período em que me orientou, por ser uma inspiração para mim como pessoa e como professor e por me mostrar que um grupo de pesquisa produtivo se constrói com uma fundação sólida de companheirismo e respeito e que não há espaço para o ego na ciência.

Aos meus amigos do Laboratório de Materiais Funcionais Avançados no Departamento de Física, **Romana**, **Victor** e **Naiara**, pelo período incrível em que trabalhamos e nos divertimos juntos.

Aos meus colegas do projeto musical, **Jefferson, Cristiane e Rodrigo**, por todos os fins de semana que passamos trancados no estúdio tocando juntos.

Aos meus grandes amigos **Victor Cerqueira, Larissa Correia e Luciano Barreira**, por me fazerem acreditar em mim e no meu potencial em todos os momentos em que duvidei da minha capacidade.

"Ludwig Boltzman, who spent much of his life studying statistical mechanics, died in 1906, by his own hand. Paul Ehrenfest, carrying on the work, died similarly in 1933. Now it is our turn to study statistical mechanics. Perhaps it will be wise to approach the subject cautiously."

(D.L. Goodstein)

RESUMO

Obinutuzumab (GA101) é um anticorpo anti-CD20 tipo II que vem mostrando-se promissor no tratamento de leucemia linfocítica crônica e linfomas não-Hodgkin. O Obinutuzumab foi co-cristalizado com um peptídeo cíclico (ligante) de CD20 em 2010 e foi detectada no cristal uma densidade eletrônica na interface de interação, interpretada como um íon cloreto (Código PDB: 3pp4). O objetivo deste trabalho foi elucidar os efeitos do íon cloreto na interação antígeno-anticorpo, via Dinâmica Molecular (DM), utilizando como modelo de anticorpo um fragmento do tipo scFv. Os dados cristalográficos do Fab foram usados para a construção do scFv. Três sistemas foram simulados por DM: scFv (SCFV); scFv e ligante (SCFV-L); scFv, ligante e íon cloreto proveniente do cristal (SCFV-L-CL). O sistema contendo apenas o scFv foi simulado por 200 ns, enquanto que os sistemas contendo o ligante foram simulados por 300 ns. Análises estruturais foram conduzidas por meio do cálculo do RMSD das estruturas proteicas. Posteriormente, foi calculado o Potencial de Interação Intermolecular (PII) pelo programa *gmx energy* do pacote GROMACS e por programas desenvolvidos pelo grupo. As análises de RMSD mostraram que o ligante passa por modificações estruturais distintas na presença e na ausência do íon cloreto. Por meio da análise de PII, foi possível observar que na ausência do íon, há interação do C-Terminal do ligante com o scFv e que isso não ocorre quando o cloreto está presente. O PII por resíduo permitiu identificar quais resíduos nas CDRs apresentam atração ou repulsão ao ligante, sendo a CDR H2 a mais influenciada pela presença do íon. A análise de Ligação de Hidrogênio permitiu, com mais detalhes, estabelecer quais e quantas conexões foram estabelecidas entre scFv e ligante, na presença ou ausência do íon. Além disso, houve mais ligações de hidrogênio entre scFv e ligante na presença do íon (5.70) do que na sua ausência (3.44). Independentemente da presença do íon, a maior parte das ligações de hidrogênio (LHs) entre scFv e ligante ocorre entre o *backbone* do ligante e as cadeias laterais dos resíduos do scFv. Em conclusão, a presença do íon realça a interação entre a CDR H2 e o epítopo e provoca maior número de LHs entre scFv e ligante, ressaltando a possibilidade de o íon ter papel central na afinidade e especificidade na interação do Obinutuzumab com o peptídeo cíclico.

Palavras-chave: Obinutuzumab. scFv. Dinâmica Molecular. Interação Anticorpo-Antígeno.

ABSTRACT

Obinutuzumab is a type II anti-CD20 antibody, which has been shown to be promising in the treatment of chronic lymphocytic leukemia and Non-Hodgkin lymphomas. Obinutuzumab was co-crystallized with a cyclic peptide (ligand) of CD20 in 2010 and an electron density was detected at the interface of interaction, which was interpreted as a chloride ion (PDB code: 3pp4). This work aimed to elucidate the effects of the chloride ion in the antibody-antigen interaction, through Molecular Dynamics (MD) simulations, using a scFv as antibody model. Three systems were simulated using MD: scFv (SCFV); scFv and ligand (SCFV-L); scFv, ligand and chloride ion (SCFV-L-CL). The SCFV system was simulated for 200 ns, whereas the systems containing the ligand were simulated for 300 ns. Structural analysis were conducted through RMSD calculations of the protein structures. After, the intermolecular interaction potential (IIP) was calculated using the *gmx energy* tool of the GROMACS package and softwares developed by the group. The RMSD analysis has shown distinct structural modifications in the presence or absence of the ion. From the IIP analysis, it was possible to observe that, in the absence of the chloride ion, there is interaction between the C-Terminal of the ligand and the scFv and this behaviour is not observed in the presence of the ion. The IIP of each residue revealed which CDR residues were attractive or repulsive towards the ligand, with the CDR H2 being the most affected by the ion presence. The hydrogen bond (HB) analysis enabled the observation of which and how many connections were established between the scFv and the ligand, in the presence or absence of the ion. Furthermore, a higher number of hydrogen bonds between the scFv and the ligand was observed in the presence of the ion (5.70) than in its absence (3.44). Regardless the presence of the ion, most hydrogen bonds occurred between the ligand backbone and the side chains of the scFv residues. In conclusion, the ion presence emphasized the interaction between the CDR H2 and the epitope and caused a higher number of hydrogen bonds between the scFv and the ligand, highlighting the possibility of the ion having a major role in the affinity and specificity of the Obinutuzumab-Ligand interaction.

Keywords: Obinutuzumab. scFv. Molecular Dynamics. Antibody-Antigen Interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de CD20 proposto por Ernst e colaboradores.	21
Figura 2 – Modelo de uma estrutura básica de anticorpo secretado.	22
Figura 3 – Representação de domínio V_H ou V_L descrevendo a organização das Regiões Determinantes de Complementariedade estabilizadas por folhas β	22
Figura 4 – Esquema de CD20 destacando as duas alças no lado externo da membrana e os epítopos dos anticorpos tipo I, Rituximab e Ofatumumab, e do anticorpo tipo II, Obinutuzumab.	25
Figura 5 – Esquema hipotético representando diferenças da interação entre CD20 e anticorpos anti-CD20 de tipo I ou II.	25
Figura 6 – Representação do anticorpo anti-CD20 Obinutuzumab interagindo com o CD20 e com células efetoras.	26
Figura 7 – <i>Fragment antigen-binding</i> (Fab) do anticorpo Obinutuzumab co-cristalizado com peptídeo cíclico da alça maior do CD20. Domínios da cadeia pesada em verde, domínios da cadeia leve em ciano, peptídeo cíclico em roxo e íon cloreto em amarelo.	28
Figura 8 – Representação esquemática de fragmento de anticorpo Fragmento Variável de Cadeia Única (scFv).	29
Figura 9 – Fab do Obinutuzumab co-cristalizado com peptídeo cíclico (ligante) da maior alça do CD20. Íon cloreto em amarelo na interface de interação. V_H em vermelho, V_L em azul. V_H e V_L são as partes do Fab que compõe o scFv. . .	34
Figura 10 – Representação da caixa dodecaédrica contendo o scFv do Obinutuzumab e o ligante envoltos por moléculas de água.	36
Figura 11 – Sistemas após minimização de energia e termalização, antes da simulação de DM: (A) sistema contendo scFv, (B) sistema contendo scFv e ligante e (C) sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto proveniente do cristal. V_H em vermelho, V_L em ciano, íon cloreto em amarelo e ligante em roxo.	37
Figura 12 – Representação das curvas de <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) das estruturas V_H , V_L , <i>linker</i> e de V_H - V_L sem o <i>linker</i> durante a simulação. Dados referentes ao sistema contendo scFv em solução aquosa.	41

Figura 13 – Representação das curvas de RMSD das estruturas V_H , V_L , <i>linker</i> e de V_H - V_L sem o <i>linker</i> durante a simulação. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^-	42
Figura 14 – Representação das curvas de RMSD das estruturas do ligante e de V_H - V_L durante a simulação. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^-	43
Figura 15 – <i>Snapshots</i> dos filmes das simulações no tempo 260 nanossegundos (ns). (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^- . V_H em vermelho, V_L em ciano, ligante em roxo e íon cloreto em amarelo.	44
Figura 16 – Potencial de Interação Intermolecular Total entre V_H - V_L e ligante completo (preto) e V_H - V_L e epítopo (vermelho) ao longo da simulação. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^-	45
Figura 17 – Potencial de interação intermolecular entre o C-Terminal (Gln24) do ligante e V_H - V_L em preto e entre C-terminal do ligante e resíduos específicos em vermelho. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.	46
Figura 18 – Potencial de interação entre scFv e íon cloreto (preto) e potencial de interação entre ligante e íon cloreto (vermelho) ao longo dos 300 ns de simulação.	47
Figura 19 – Resíduos de aminoácidos do scFv do Obinutuzumab interagindo com o íon cloreto. (A) Na estrutura cristalográfica (código 3pp4). (B) Depois de 300 ns de Dinâmica Molecular (DM). Nitrogênio em azul, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho e demais átomos em verde.	48
Figura 20 – Interação de cada um dos resíduos do ligante com o scFv calculados pelo programa <i>fitness</i> . (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.	49
Figura 21 – Região Determinante de Complementariedades (CDRs) do Obinutuzumab presentes no scFv antes da submissão da estrutura à simulação de DM.	50
Figura 22 – Resultados da contribuição de cada resíduo de aminoácido pertencente ao scFv para o PII entre scFv e ligante completo calculados pelo programa <i>fitness</i> . (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de resíduos de aminoácidos de V_H , V_L , <i>linker</i> e ligante. Os resíduos de V_H , V_L e do <i>linker</i> estão de acordo com a numeração da molécula de scFv. O ligante é numerado dos resíduos 1 a 24, com a região do epítopo do Obinutuzumab em azul.	35
Tabela 2 – Características dos sistemas submetidos à simulação de DM.	38
Tabela 3 – Resultados dos RMSDs médios (nm) de <i>linker</i> , V_H , V_L , e V_H - V_L em cada um dos sistemas estudados.	43
Tabela 4 – Resultados do PII Total entre scFv e ligante completo ou scFv epítopo na presença ou ausência do íon cloreto.	45
Tabela 5 – Tabela contendo as CDRs do Obinutuzumab e suas respectivas numerações de átomos e resíduos no scFv construído e a sequência do ligante e de seu epítopo. O mapeamento das CDRs do Obinutuzumab foi feito a partir de dados da patente do anticorpo (SAMPATH <i>et al.</i> , 2015).	51
Tabela 6 – Tabela contendo as ligações de hidrogênio entre resíduos do ligante e resíduos do scFv. Resíduos pertencentes ao epítopo estão destacados em vermelho. *Com base no perceptual de observação das ligações de hidrogênio entre esses resíduos durante a simulação. **Desconsiderando-se as ligações envolvendo o C-Terminal do ligante. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABF	<i>Adaptive Biasing Force</i>
ADCC	citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
ADCP	fagocitose celular dependente de anticorpos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
CD20	<i>Cluster of Differentiation 20</i>
CDC	citotoxicidade dependente do complemento
CDR	Região Determinante de Complementariedade
Clb	Clorambucil
CLL	leucemia linfocítica crônica
DM	Dinâmica Molecular
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-Clb	Obinutuzumab + Clorambucil
GA101	Obinutuzumab
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulation</i>
HL	linfoma Hodgkin
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kcal	quilocalorias
Kd	constante de dissociação
LHs	ligações de hidrogênio
mAb	anticorpo monoclonal
NHL	linfoma não-Hodgkin
nm	nanometros
NPT	<i>ensemble</i> isotérmico-isobárico
ns	nanossegundos
NVT	<i>ensemble</i> canônico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PII	Potencial de Interação Intermolecular
R-Clb	Rituximab + Clorambucil

rcut	raio de corte
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SCFV	sistema contendo scFv em solução aquosa
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única
SCFV-L	sistema contendo scFv e ligante
SCFV-L-CL	sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Aceleração
ϵ_r	Constante dielétrica relativa do meio
r	Distância entre átomos
σ	Distância finita na qual o potencial interpartícula é zero
G	Energia Livre
V_{ang}	Energia de deformação do ângulo de ligação
$V(r)$	Energia Potencial Total
V_{lig}	Energia de estiramento da ligação
V_{VdW}	Energia das interações de Van der Waals
V_{elec}	Energia das interações eletrostáticas
\mathbf{F}	Força que atua sobre cada partícula de um sistema
q	Magnitude das cargas pontuais de cada átomo
m	Massa
ϵ_0	Permissividade do espaço livre
\mathbf{r}	Posição de cada átomo
ϵ	Profundidade do potencial entre barreira atrativa e repulsiva
E_{MM}	Potencial Total no vácuo calculado por mecânica molecular
S	Entropia
T	Temperatura
t	Tempo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Leucemia Linfocítica Crônica e linfoma Não-Hodgkin	19
1.2	Caracterização do CD20	20
1.3	Anticorpos	21
1.4	Anticorpos Anti-CD20 de Tipo I e Tipo II	23
1.5	Caracterização do Obinutuzumab	25
1.6	Fragmento Variável de Cadeia Única	28
1.7	Simulação de Dinâmica Molecular	29
1.8	Justificativa	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos Gerais	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	Construção do scFv do Obinutuzumab	34
3.2	Parâmetros de Dinâmica Molecular	35
3.2.1	<i>Minimização de Energia e Termalização</i>	35
3.2.2	<i>Sistema contendo scFv em solução aquosa</i>	36
3.2.3	<i>Sistema contendo scFv e ligante em solução aquosa</i>	36
3.2.4	<i>Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto em solução aquosa</i>	37
3.2.5	<i>Dinâmica Molecular</i>	38
3.3	Avaliação Estrutural e Energética	38
3.3.1	<i>Root Mean Square Deviation</i>	38
3.3.2	<i>Potencial de Interação Intermolecular</i>	39
3.3.3	<i>Ligações de Hidrogênio</i>	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Avaliação Estrutural do scFv e do ligante	41
4.2	Potencial de Interação Intermolecular Total	44
4.2.1	<i>Interação entre scFv e ligante</i>	44
4.2.2	<i>Interação entre scFv/ligante e íon cloreto</i>	46
4.3	Potencial de Interação Intermolecular por Resíduo	48

4.3.1	<i>Potencial de Interação Intermolecular por Resíduo do Ligante</i>	48
4.3.2	<i>Potencial de Interação Intermolecular por Resíduo do scFv</i>	50
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfocítica Crônica e linfoma Não-Hodgkin

A palavra câncer é usada para caracterizar vários tipos de doenças que possuem como característica em comum a rápida multiplicação das células de maneira desordenada. A maioria dessas doenças está envolvida com a formação de um nódulo de células que cresce descontroladamente, comumente chamado de tumor. No entanto, existem alguns tipos de cânceres em que não há aparecimento de tumores, como a leucemia.

Leucemia é um tipo de câncer que começa em células da medula óssea. Quando uma célula da medula sofre uma alteração e passa a ser uma célula leucêmica, esta poderá gerar um novo pool de células igualmente leucêmicas que se multiplicam descontroladamente e podem sobreviver por períodos maiores do que as células normais. Com o avanço desse novo pool de células leucêmicas, elas podem suprimir o desenvolvimento das células normais, o que acarreta na perda de função das mesmas (LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY, 2018).

Leucemia linfocítica e linfoma são neoplasias malignas que comprometem o desenvolvimento normal e a função dos linfócitos. A leucemia linfocítica crônica (CLL) é caracterizada pelo acúmulo progressivo de linfócitos não-funcionais no sangue, medula óssea, linfonodos e baço. O tratamento mais adequado depende do avanço da doença e de condições específicas de cada paciente. A terapia padrão, para pacientes fisicamente aptos, consiste em uma combinação de fludarabina, ciclofosfamida e Rituximab (HALLEK *et al.*, 2010; HALLEK, 2017; THOMPSON *et al.*, 2017). Para pacientes não aptos a esse tratamento, há duas opções comuns: clorambucil combinado a um anticorpo anti-CD20 ou uma terapia contínua com ibrutinibe (HALLEK, 2017). Geralmente, os tratamentos mais bem sucedidos da LCC envolvem a combinação de diferentes agentes. Quando essa combinação envolve um anticorpo e um agente quimioterápico, o tratamento é chamado quimioimunoterápico.

O termo linfoma abrange um grupo maior de malignidades que surgem principalmente em linfócitos T maduros e células B. A maioria dos linfomas ocorre nos gânglios linfáticos. Eles podem ser caracterizados como linfoma não-Hodgkin (NHL) ou linfoma Hodgkin (HL), sendo o primeiro o tipo mais comum (LYMPHOMA RESEARCH FOUNDATION, 2018). Assim como na leucemia linfocítica crônica, o uso de anticorpos monoclonais sozinhos ou combinados a outros agentes também é comum nas terapias para linfoma não-Hodgkin (KARMALI *et al.*, 2018; OERS *et al.*, 2006). Uma combinação comum é o uso do anticorpo Rituximab associado a

ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona, constantemente chamado de R-CHOP (FEUGIER *et al.*, 2005; HABERMANN *et al.*, 2006). Estudos de LNH com marcadores celulares clássicos demonstraram que 80% desses tumores e mais de 95% das células de leucemia linfocítica crônica são da linhagem de célula B (MANN *et al.*, 1979).

1.2 Caracterização do CD20

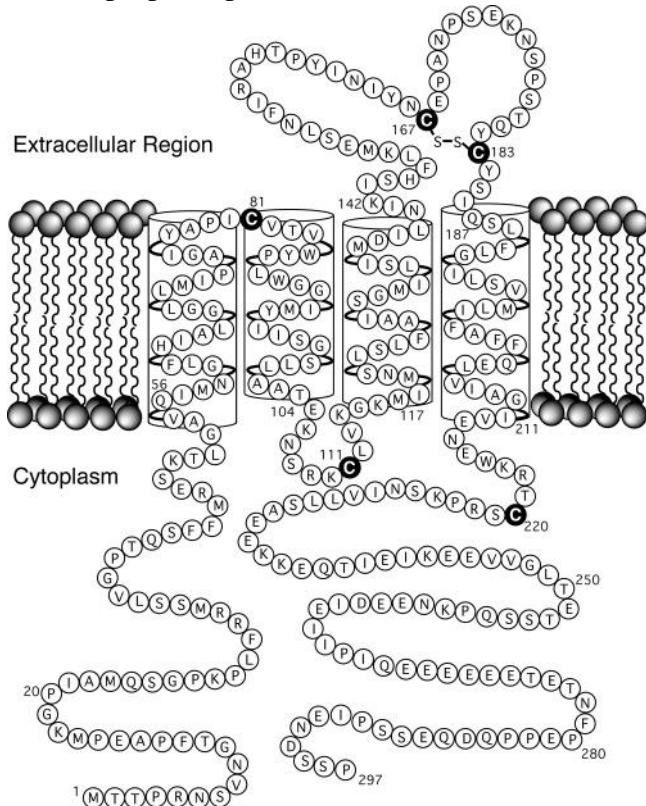
A proteína integral *Cluster of Differentiation 20* (CD20), identificada pela primeira vez em 1973 (STASHENKO *et al.*, 1973), possui quatro hélices transmembranares, dois loops extracelulares e terminações (carboxílica e amínica) citoplasmáticas (Figura 1). O primeiro loop se localiza entre as hélices 1 e 2 e é composto por uma sequência de resíduos de aminoácido relativamente curta, estando bem próximo da região da membrana. O segundo loop se localiza entre as hélices 3 e 4 e possui aproximadamente 46 resíduos de aminoácido de comprimento (resíduo 140 a 185) e apresenta uma ponte dissulfeto entre os resíduos Cys167 e Cys183 (ERNST *et al.*, 2005). Supõe-se que a ausência dessa ligação S-S seja capaz de desestabilizar completamente a estrutura do CD20 (KLEIN *et al.*, 2013). Ao ser expresso, acredita-se que as moléculas de CD20 humana e murina residam na membrana plasmática na forma de multímeros (CRAGG; GLENNIE, 2004).

O CD20 é expresso em células pré-B, permanecendo durante o desenvolvimento dessas células até a maturação, mas não é expresso na célula tronco hematopoiética, células pró-B ou células do plasma (STASHENKO *et al.*, 1973; TEDDER; ENGEL, 1994). O fato de ele não estar presente em células tronco hematopoiéticas é determinante, pois garante que essas células não sofram a ação de anticorpos anti-CD20, o que comprometeria o desenvolvimento de todas as linhagens derivadas dessas células. Já é estabelecido que o CD20 está presente na maioria das células B, sendo elas malignas ou não (STASHENKO *et al.*, 1973; NADLER *et al.*, 1981).

Nadler e colaboradores (NADLER *et al.*, 1981) conduziram pesquisas envolvendo um anticorpo monoclonal específico para o CD20, visando caracterizar células malignas provenientes de pacientes com linfomas ou leucemia linfocítica crônica. Todas as células tumorais dos pacientes expressavam o antígeno CD20. Por ser consideravelmente expresso em células B malignas, ele é um alvo ideal para estratégias imunoterápicas de tratamento de malignidades nessas células (BEERS *et al.*, 2010).

A função fisiológica do antígeno CD20 para célula não está bem estabelecida. No

Figura 1 – Modelo de CD20 proposto por Ernst e colaboradores.



Fonte: Ernst *et al.* (2005).

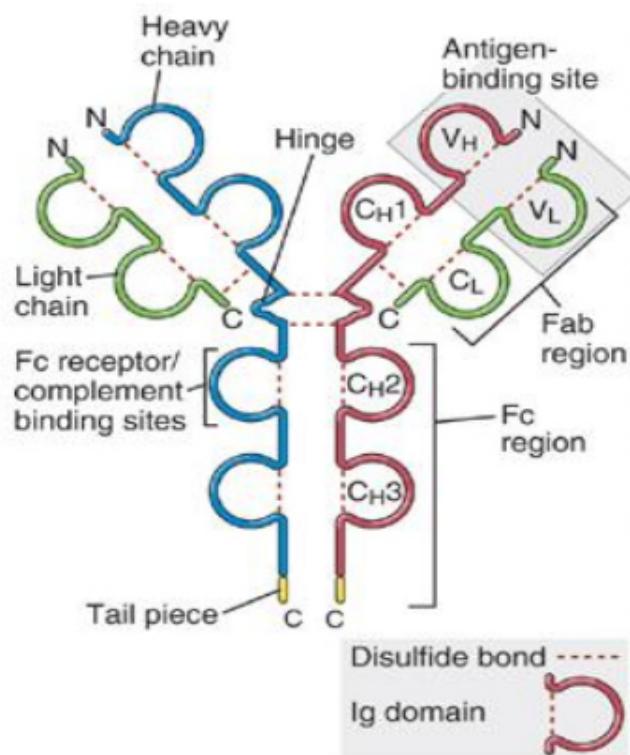
entanto, já foi proposto que ele atue como um canal de cálcio. Bubien e colaboradores mostraram um aumento nos níveis de cálcio no citosol após realizar a transfecção do CD20 para células (BUBIEN *et al.*, 1993).

1.3 Anticorpos

Anticorpos são moléculas de natureza proteica pertencentes à família das imunoglobulinas. São sintetizados exclusivamente por linfócitos B e possuem um importante papel na defesa do organismo, sendo os principais mediadores da imunidade humoral. Eles podem existir de duas formas: ligados à membrana dos linfócitos B, onde atuam como receptores de抗ígenos, ou secretados por células B presentes na circulação, tecidos e mucosas, onde podem neutralizar toxinas, ativar o sistema complemento e promover citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC).

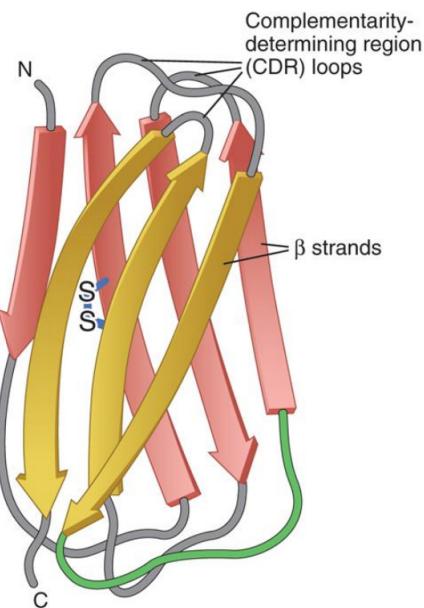
Todos os anticorpos se assemelham no que se refere às suas características estruturais básicas (Figura 2), mas são extremamente diferentes nas regiões de ligação ao antígeno, garantindo variabilidade de reconhecimento. Uma molécula de anticorpo apresenta uma estrutura simétrica, composta por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. As

Figura 2 – Modelo de uma estrutura básica de anticorpo secretado.



Fonte: Abbas *et al.* (2015).

Figura 3 – Representação de domínio V_H ou V_L descrevendo a organização das Regiões Determinantes de Complementariedade estabilizadas por folhas β .



Fonte: Abbas *et al.* (2015).

cadeias leves e pesadas são conectadas por pontes dissulfeto. Essas cadeias possuem regiões de aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos que se dobram de forma globular chamados domínios Ig. Cada domínio Ig apresenta duas camadas de lâminas β -pregueadas, sendo cada

uma delas composta por três a cinco fitas de cadeias polipeptídicas antiparalelas (Figura 3). As fitas de cada lâmina β são conectadas por alças curtas e as lâminas são conectadas por pontes dissulfeto.

Cada cadeia leve contém uma região aminoterminal que possui um domínio Ig variável (V_L) e uma região carboxiterminal que possui um domínio Ig constante (C_L). Cada cadeia pesada possui uma região aminoterminal com um domínio Ig variável (V_H) e 3 ou 4 regiões contendo domínios Ig constantes ($C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}$). As cadeias leves e pesadas são conectadas por pontes dissulfeto e possuem uma região flexível chamada de dobradiça, a qual está relacionada com a flexibilidade do anticorpo (ABBAS *et al.*, 2015).

Nas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas, existem regiões de maior diversidade chamadas de regiões hipervariáveis ou regiões de determinação de complementariedade (CDR). Os resíduos de aminoácidos dessas regiões se projetam em formato de alças que conectam as folhas β do domínio Ig. As três regiões hipervariáveis presentes em V_H (H1, H2 e H3) e as três presentes em V_L (L1, L2 e L3) formam uma superfície complementar à forma tridimensional do antígeno.

1.4 Anticorpos Anti-CD20 de Tipo I e Tipo II

Os anticorpos anti-CD20 podem ser classificados como de tipo I (ex. Rituximab, Ofatumumab) ou tipo II (ex. Obinutuzumab, Tositumomab) de acordo com seu modo de orientação ao interagir com o CD20 e com os mecanismos de morte celular desencadeados por essa interação (CRAGG; GLENNIE, 2004; CRAGG *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 2013).

O receptor $Fc\gamma RIIb$ está presente em células B e sua principal função nessa célula é inibir sinais de ativação. Esse processo de inibição é desencadeado pela interação de $Fc\gamma RIIb$ com ativadores de $Fc\gamma R$ s presentes na porção Fc de anticorpos ou pela ligação de imunocomplexos ao *B Cell Receptor* (BCR)), o que resulta na fosforilação dos domínios *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) presentes na porção citoplasmática de $Fc\gamma RIIb$ (SMITH; CLATWORTHY, 2014). Acredita-se que para que o processo de fosforilação ocorra, seja necessário o acesso de $Fc\gamma RIIb$ a balsas lipídicas (*rafts*), onde ocorrem a ativação dos $Fc\gamma R$ (AMAN *et al.*, 2001; GUPTA; DEFARANCO, 2007).

Lim e colaboradores (LIM *et al.*, 2011) demonstraram que a presença do receptor $Fc\gamma RIIb$ está fortemente relacionada com a internalização do complexo CD20:Rituximab, o qual é um anticorpo anti-CD20 tipo I. Nesse trabalho, demonstrou-se que a internalização resultava

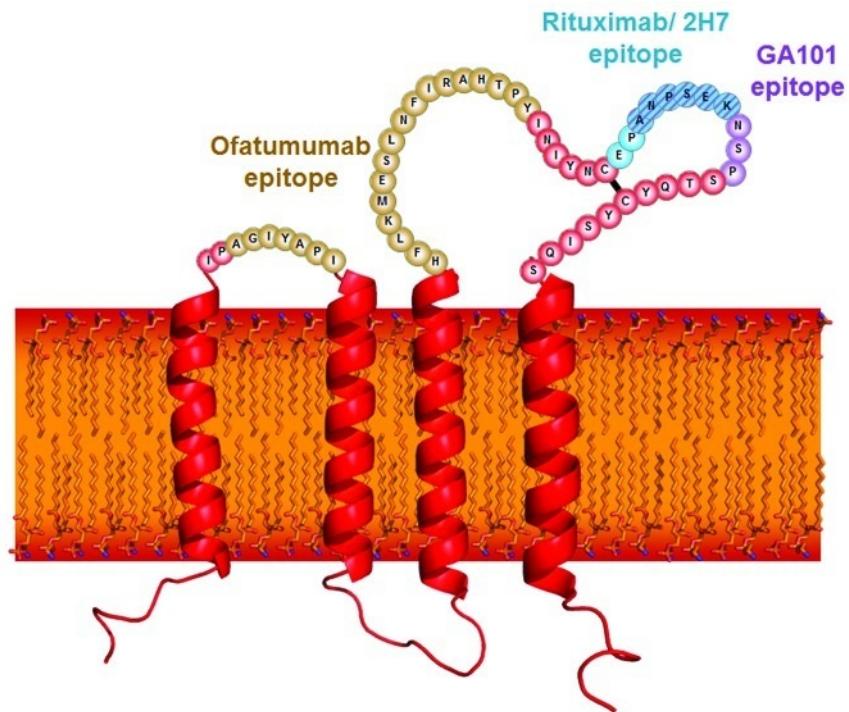
em uma menor taxa de fagocitose por macrófagos em células-alvo revestidas por anticorpos monoclonais em sua superfície. Além disso, foram feitos experimentos de transfecção do Fc γ RIIb para células de Ramos Fc γ RIIb-negativas e observou-se uma taxa de internalização crescente do Rituximab dependente da dose de Fc γ RIIb transfetado. Os autores hipotetizaram que a taxa de internalização desse complexo varia para cada tipo de tumor e doença devido aos diferentes padrões de expressão do receptor Fc γ RIIb em cada célula cancerosa.

No trabalho conduzido por Beers e colaboradores (BEERS *et al.*, 2010), injetou-se células B em camundongos deficientes de Fc γ R. A ausência desses receptores nos camundongos impedia a deleção das células B injetadas. Os animais foram submetidos a tratamentos com anticorpos anti-CD20 do tipo I (Rituximab) e II (Tositumomab) e, posteriormente, verificou-se a presença do CD20 na superfície dessas células por citometria de fluxo. O tratamento com mAbs do tipo I por 16h provocou uma redução de aproximadamente 80% a 90% nos níveis de CD20 presentes na superfície das células B. Contudo, no tratamento com Tositumomab, um anti-CD20 de tipo II, a detecção do CD20 foi inalterada comparada com o grupo controle. Os autores também demonstraram que essa modulação do CD20 causada pelos mAbs de tipo I prejudica o interação do anticorpo com células efetoras FcR-dependentes, reduzindo a eficácia do mAb em depletar as células B.

Acredita-se que um dos fatores que contribua para que os anticorpos de anti-CD20 tipo II sofram menos ou não sofram internalização seja a diferente orientação com a qual os anticorpos tipo II se ligam ao CD20. Os anticorpos Rituximab (tipo I) e o Obinutuzumab (tipo II) possuem epítopos que se sobrepõem, ou seja, seus epítopos compartilham resíduos na molécula de CD20 (Figura 4). No entanto, o Obinutuzumab interage com o CD20 num ângulo 30º mais amplo do que o Rituximab (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013). Dessa forma, o diferente arranjo espacial dos anticorpos tipo II na interação com o CD20 pode evitar a interação com Fc γ RIIb e impedir a internalização do antígeno e do mAb (Figura 5).

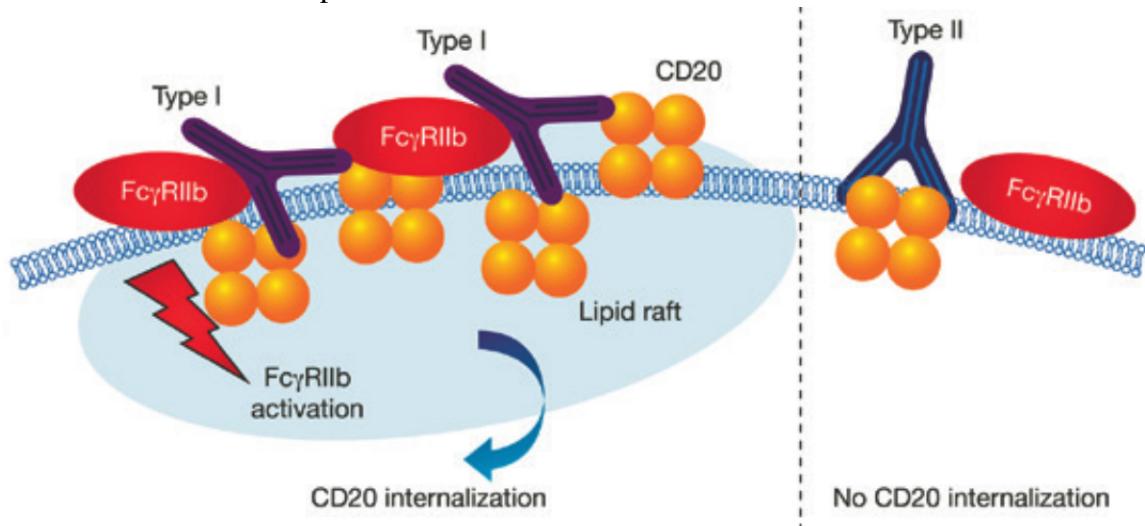
Sabe-se que os anticorpos anti-CD20 de tipo II são menos eficientes em provocar citotoxicidade dependente do complemento (CDC), no entanto, são mais eficientes na indução de ADCC e morte celular direta (CRAGG; GLENNIE, 2004; MÖSSNER *et al.*, 2010). Devido aos diferentes mecanismos de morte celular mediados por anticorpos anti-CD20 do tipo I e II e ao fato de que os anticorpos tipo I sofrem considerável internalização, os anticorpos tipo II são promissores para o tratamento de pacientes com malignidades de células B, principalmente aqueles refratários ao tratamento com Rituximab.

Figura 4 – Esquema de CD20 destacando as duas alças no lado externo da membrana e os epítópos dos anticorpos tipo I, Rituximab e Ofatumumab, e do anticorpo tipo II, Obinutuzumab.



Fonte: Adaptado de Klein *et al.* (2013)

Figura 5 – Esquema hipotético representando diferenças da interação entre CD20 e anticorpos anti-CD20 de tipo I ou II.



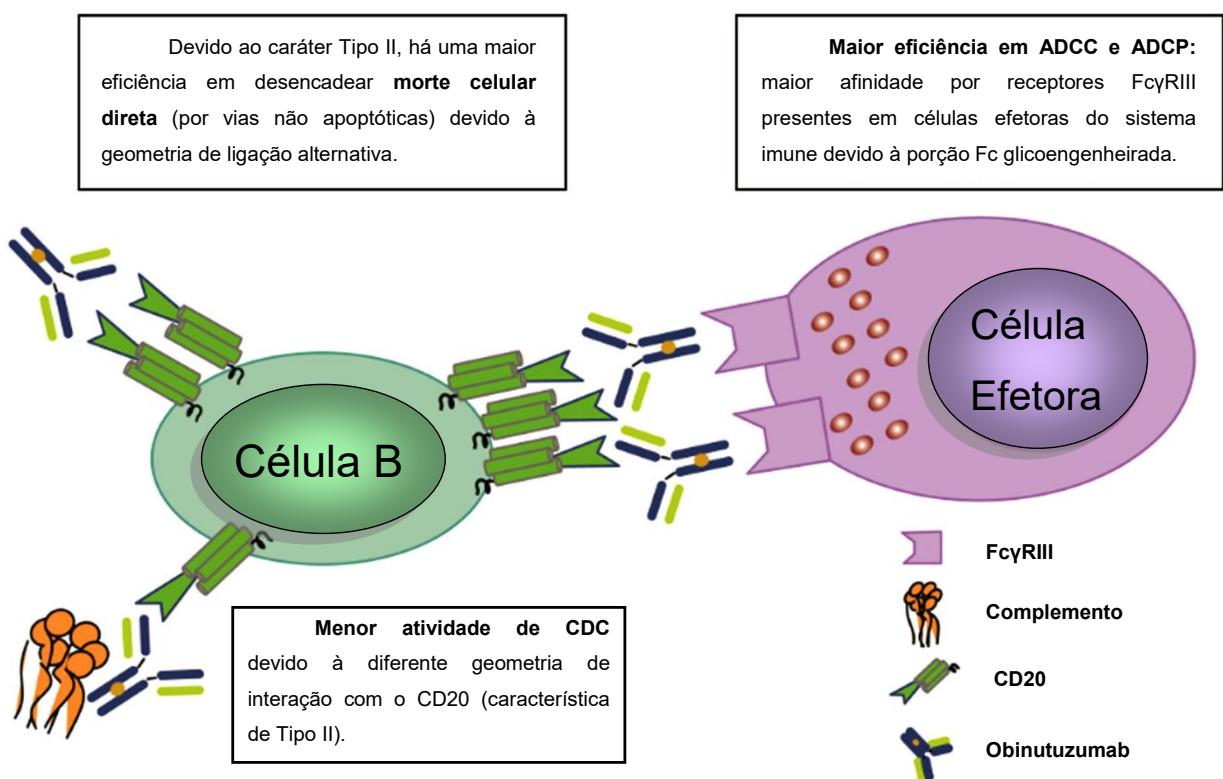
Fonte: Goede *et al.* (2015).

1.5 Caracterização do Obinutuzumab

GA101 é um mAb humanizado anti-CD20 de isótipo IgG1 de aproximadamente 146 kDa, desenvolvido visando prover tratamentos mais eficientes contra doenças envolvendo

malignidades de células B, como a leucemia linfocítica crônica e os linfomas não-Hodgkin (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013). O Obinutuzumab foi desenvolvido pela empresa GlycArt Biotechnology, que passou a se chamar Roche Glycart AG após ser adquirida pelo grupo Roche. O biofármaco foi patenteado com o nome comercial Gazyva® nos Estados Unidos e Gazyvaro® na Europa (CAMERON; MCCORMACK, 2014). É um anticorpo glicoengenheirado em sua porção Fc para otimizar sua ligação a variantes de baixa e alta afinidade ao receptor Fc γ IIIa e, consequentemente, melhorar a eficiência de ADCC e fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) (Figura 6) (GOEDE *et al.*, 2015; MÖSSNER *et al.*, 2010; GOLAY *et al.*, 2013).

Figura 6 – Representação do anticorpo anti-CD20 Obinutuzumab interagindo com o CD20 e com células efetoras.



Fonte: Adaptada de Tobinai *et al.* (2016).

A maior eficácia do GA101 em promover ADCC e morte celular direta foi comprovada em modelos *in vitro* e *in vivo* em diversos trabalhos (GOLAY *et al.*, 2013; AWASTHI *et*

al., 2015; TOBINAI *et al.*, 2016; HERTER *et al.*, 2013). O Obinutuzumab se mostrou superior ao Rituximab na indução de morte celular direta e ADCC em células de linfoma de Burkitt (um tipo de NHL) resistentes (Raji-4RH) e não resistentes (Raji) ao Rituximab (AWASTHI *et al.*, 2015). Além disso, células Raji-4RH e Raji foram xenoenxertadas em camundongos que foram posteriormente tratados com Rituximab ou Obinutuzumab, sendo o segundo mAb o mais eficiente em aumentar o tempo de sobrevida total dos camundongos. Além disso, ressalta-se que a morte celular direta provocada pelo GA101 ocorre por vias não apoptóticas (HONEYCHURCH *et al.*, 2011; IVANOV *et al.*, 2009).

Quando comparado aos anticorpos anti-CD20 de tipo I, o Obinutuzumab é menos eficiente em promover CDC (GOEDE *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2013). Isso ocorre pela geometria diferenciada de ligação ao CD20 e pela ausência da formação de balsas lipídicas, características dos anticorpos anti-CD20 de tipo II (WANG; WEINER, 2008; NIEDERFELLNER *et al.*, 2013).

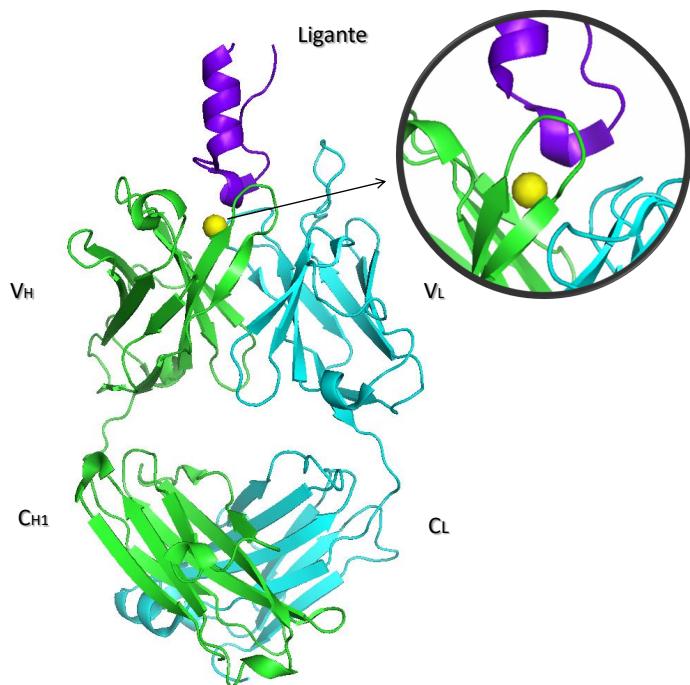
O Obinutuzumab foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento de leucemia linfocítica crônica devido aos resultados do estudo CLL 11, o qual avaliou a eficácia dos tratamentos quimioimunoterápicos Obinutuzumab + Clorambucil (G-Clb), Rituximab + Clorambucil (R-Clb) e Clorambucil (Clb) sem anticorpos. O tratamento G-Clb apresentou superioridade em relação ao R-Clb no que se refere ao tempo de sobrevida livre de progressão da doença. Além disso, o tratamento com G-Clb resultou em maior sobrevida global quando comparado ao tratamento com clorambucil sozinho (HOFFMAN-LA ROCHE, 2017).

O tratamento quimioimunoterápico Obinutuzumab + Clorambucil foi aprovado nos Estados Unidos em 2013 e na Europa em 2014 para pacientes adultos com CLL comórbidos e não tratados previamente, ou seja, pacientes não aptos a receber a dose completa do tratamento com fludarabina (GOEDE *et al.*, 2015). O Obinutuzumab foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de leucemia linfocítica crônica em 2013 (SACHDEVA; DHINGRA, 2015; LEE *et al.*, 2014) e linfoma folicular em 2016 (HOFFMAN-LA ROCHE, 2018a).

Até o presente momento, testes clínicos com o Obinutuzumab ainda estão sendo conduzidos. O estudo de fase III intitulado “A Safety And Efficacy Study of Obinutuzumab Alone or in Combination With Chemotherapy in Participant With Chronic Lymphocytic Leukemia”, conduzido pela empresa Hoffmann-La Roche, envolve 979 pacientes e tem previsão de término

para outubro de 2018 (HOFFMAN-LA ROCHE, 2018b). Atualmente, estima-se que há mais de trinta ensaios clínicos ativos envolvendo o Obinutuzumab (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018).

Figura 7 – Fab do anticorpo Obinutuzumab co-cristalizado com peptídeo cíclico da alça maior do CD20. Domínios da cadeia pesada em verde, domínios da cadeia leve em ciano, peptídeo cíclico em roxo e íon cloreto em amarelo.



Fonte: O autor.

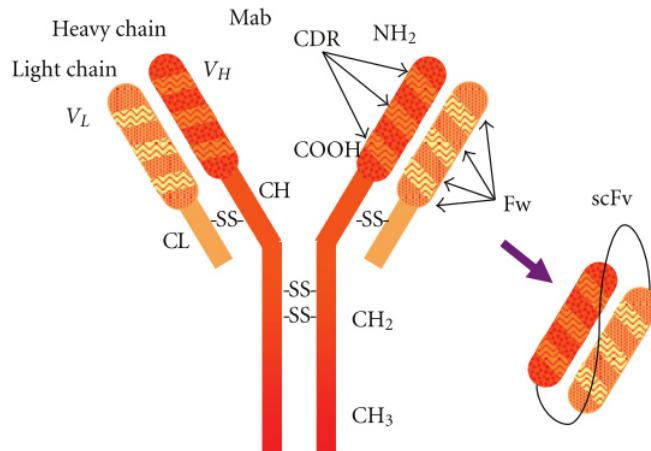
A estrutura do Fab do anticorpo Obinutuzumab foi co-cristalizada com um peptídeo cíclico (ligante) de CD20 (Figura 7) por cristalografia de raios X por Niederfellner e colaboradores (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013) (código PDB: 3pp4). Esse peptídeo é composto por resíduos da alça maior do CD20, incluindo a região do epítopo de GA101. Na interface de interação entre o Fab e o ligante, foi detectada uma densidade eletrônica, interpretada como um íon cloreto.

1.6 Fragmento Variável de Cadeia Única

O Fragmento Variável de Cadeia Única (scFv) é o menor fragmento de anticorpo que preserva as regiões hipervariáveis responsáveis pelo reconhecimento do antígeno. O scFv (Figura 8) consiste nas regiões variáveis da cadeia leve (V_L) e pesada (V_H), unidas por um *linker* polipeptídico flexível (AHMAD *et al.*, 2012). Duas características do *linker* são críticas para

que o dobramento da cadeia polipeptídica seja adequado e mantenha a afinidade e especificidade pelo antígeno: a quantidade de resíduos de aminoácidos e o tipo desses resíduos.

Figura 8 – Representação esquemática de fragmento de anticorpo scFv.



Fonte: Adaptada de Ahmad *et al.* (2012).

Previamente, foi estimado que o *linker* deve garantir uma distância de aproximadamente 3.5 nm entre a porção carboxiterminal de um domínio variável e a porção aminoterminal do outro domínio, sem afetar o *folding* dos domínios e permitindo a formação de um sítio intacto de ligação ao antígeno (HUSTON *et al.*, 1991). A sequência de resíduos de aminoácidos do *linker* deve conter resíduos hidrofílicos para evitar a interferência do peptídeo dentro ou entre os domínios variáveis durante o dobramento da proteína (ARGOS, 1990). Os *linkers* mais usados atualmente são compostos por glicinas e serinas, visando aumentar a flexibilidade. Alguns *linkers* também possuem resíduos carregados como glutamato e lisina, visando o aumento da solubilidade (WHITLOW *et al.*, 1993).

1.7 Simulação de Dinâmica Molecular

Simulação de Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica computacional que se baseia na integração das equações de Newton, ao longo do tempo, para descrever o movimento de átomos. A DM é uma ferramenta amplamente utilizada no estudo de interações entre biomoléculas, por exemplo, a interação antígeno-anticorpo. Essa técnica permite a observação das modificações estruturais e energéticas que ocorrem durante o processo de interação à nível atomístico-molecular e, consequentemente, permite o estudo dos movimentos moleculares em detalhes.

Na Dinâmica Molecular, as moléculas são abordadas como um conjunto de átomos que se mantêm unidos por forças elásticas ou harmônicas (ADCOCK; MCCAMMON, 2006). Para calcular a energia potencial total (V), ou seja, o conjunto dos potenciais de interação entre os átomos, a partir da estrutura tridimensional das moléculas, é utilizado um campo de força, que é uma função de energia potencial (Equação 1.1). O campo de força traz os parâmetros que modelam as moléculas, com base em informações de distância, ângulos, cargas e parâmetros de interações interatômicas de curto e longo alcance, respectivamente, interações de van der Waals e Coulomb (VANOMMELAEGHEN *et al.*, 2015).

$$V(\mathbf{r}) = \sum V_{lig} + \sum V_{ang} + \sum V_{VdW} + \sum V_{elec} \quad (1.1)$$

A equação 1.1 descreve a função de energia potencial. $V(\mathbf{r})$ representa a energia potencial total em função da posição (\mathbf{r}) dos átomos. V_{lig} é a energia de estiramento da ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_{ang} é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação ao seu valor de equilíbrio, V_{VdW} representa o potencial das interações de van der Waals e V_{elec} representa os potenciais eletrostáticos de atração ou repulsão entre duas cargas.

$$V_{VdW} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1.2)$$

$$V_{elec} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (1.3)$$

As interações de van der Waals, de curto alcance, são descritas pelo Potencial de Lennard-Jones (Equação 1.2). Nessa equação, i e j representam átomos para os quais as interações estão sendo calculadas, ϵ_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva, σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial interpartícula é zero e r é a distância entre as partículas. As interações eletrostáticas, de longo alcance, são descritas pelo Potencial de Coulomb (Equação 1.3), em que q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas pontuais de cada átomo, r_{ij} representa a distância entre as cargas, ϵ_0 é a permissividade do espaço livre e ϵ_r é a constante dielétrica relativa do meio (ABRAHAM *et al.*, 2011).

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (1.4)$$

$$\mathbf{F}_i(t) = m_i \cdot \mathbf{a}_i = m_i \cdot \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (1.5)$$

Obtendo-se o valor da energia potencial, é possível encontrar as forças que atuam sobre cada átomo i , calculando-se a derivada da energia potencial (V), em relação à posição (\mathbf{r}) de cada átomo (Equação 1.4). Ao obtermos essas forças que atuam sobre cada átomo, utiliza-se o princípio fundamental da dinâmica (Segunda Lei de Newton) para obter os valores de aceleração (Equação 1.5) (ABRAHAM *et al.*, 2011). Nessas equações, \mathbf{F}_i é a força que atua sobre cada átomo do sistema em um instante de tempo t , \mathbf{a}_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . Para integrar as equações de movimento, utiliza-se um algoritmo como o *Leap-Frog* (HOCKNEY *et al.*, 1974). Dessa forma, obtém-se as posições dos átomos ao longo do tempo e, consequentemente, as trajetórias desses átomos.

Por considerar detalhes atomísticos das estruturas das moléculas, a dinâmica molecular é uma técnica que considera a flexibilidade e os movimentos moleculares ao longo do tempo, sendo capaz de acessar características estruturais e funcionais que não poderiam ser observadas por técnicas tradicionais como cristalografia e ressonância magnética nuclear.

1.8 Justificativa

As maiores dificuldades no tratamento de leucemia linfocítica crônica e linfomas não-Hodgkin são que grande parte dos pacientes passam a ter recaídas na doença ou tornam-se refratários, ou seja, passam a não responder ao tratamento (CHAO, 2013). O uso do Rituximab revolucionou o tratamento dessas doenças. No entanto, a preocupação com a quantidade de pacientes que tornam-se não-responsivos ao tratamento com Rituximab é crescente.

Nesse contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de novos anticorpos que possuam alta afinidade e especificidade pelo CD20. O Obinutuzumab, por ser um anticorpo anti-CD20 de tipo II, é considerado muito promissor no tratamento de pacientes refratários ao Rituximab, pois os mesmos possuem diferentes mecanismos de ação e interagem de formas distintas com a molécula de CD20 (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013).

Niederfellner e colaboradores determinaram a constante de dissociação (K_d) dos anticorpos Obinutuzumab e Rituximab, com o peptídeo cíclico de CD20, utilizando calorimetria isotérmica (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013). Essas constantes foram calculadas em diferentes temperaturas para o Obinutuzumab e os valores de K_d obtidos foram 2 M à 15°C, 7 M à 25°C e

28 M à 37°C. Para o Rituximab, uma menor afinidade foi constatada, sendo possível calcular o Kd apenas à 15°C (27,7 M).

Pelo fato de o Obinutuzumab ter maior afinidade pelo peptídeo cíclico de CD20 e se demonstrar superior ao Rituximab em ensaios clínicos e análises *in vitro* e *in vivo*, ressalta-se a importância de estudar a interação Obinutuzumab-CD20. Entender os mecanismos envolvidos nessa interação pode auxiliar no *design* de novos anticorpos monoclonais anti-CD20.

Diferente do Obinutuzumab, o Rituximab não apresenta um íon cloreto na interface de interação ao ser co-cristalizado com um peptídeo cíclico de CD20 (DU *et al.*, 2007). Até o momento, não foi esclarecido se esse íon está relacionado com a afinidade e especificidade do Obinutuzumab ou se ele se trata somente de um artefato decorrente ao processo de cristalização. Logo, existe a necessidade de esclarecer o papel do íon na interação scFv-peptídeo cíclico.

A interação antígeno-anticorpo é um aspecto fundamental dos tratamentos imunoterápicos anti-CD20. Dessa forma, faz-se necessária uma compreensão detalhada, a nível atomístico-molecular, dessa interação. O estudo da influência do íon cloreto na interação entre Obinutuzumab e ligante pode fornecer informações valiosas para realçar a afinidade e especificidade da interação antígeno-anticorpo.

O grupo de pesquisa da Fiocruz-CE vêm analisando *in vitro* as proposições realizadas *in silico*. As técnicas *in silico* apresentam muitas vantagens no que se refere à economia de tempo e redução de custos, pois fornece informações de determinantes estruturais para realçar a afinidade e especificidade pelo antígeno. Entender os mecanismos que levam a essa maior afinidade e especificidade é importante para proposição de otimização de outros anticorpos ou mesmo do Obinutuzumab.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Construir fragmento scFv do anticorpo Obinutuzumab a partir de dados cristalográficos do fragmento Fab desse mesmo anticorpo. Posteriormente, estudar a interação do scFv com o peptídeo cíclico de CD20 na ausência e na presença de um íon cloreto observado no cristal.

2.2 Objetivos Específicos

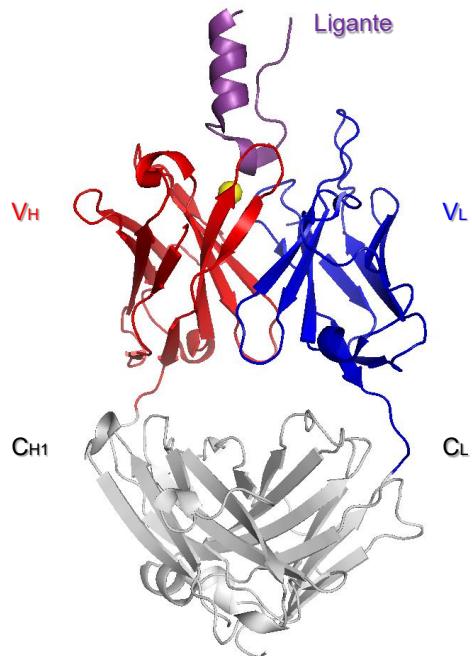
- I. Construir o scFv do Obinutuzumab a partir de dados cristalográficos do Fab (código PDB: 3pp4).
- II. Montar os sistemas contendo scFv em solução aquosa; scFv e ligante em solução aquosa e scFv, ligante e o íon cloreto proveniente do cristal e simular por DM.
- III. Realizar análises estruturais e energéticas a partir das trajetórias obtidas pelas simulações de DM de cada um dos sistemas.
- IV. Comparar os comportamentos estruturais e energéticos do scFv e do ligante na presença e na ausência do íon cloreto a fim de elucidar o papel do íon na interação.

3 METODOLOGIA

3.1 Construção do scFv do Obinutuzumab

A estrutura cristalográfica do Fab (Figura 9) do Obinutuzumab foi obtida no *Protein Data Bank* (PDB) (código PDB: 3pp4). Nessa estrutura, foram selecionados os domínios variáveis da cadeia pesada (V_H) e da cadeia leve (V_L) (Tabela 1). A manipulação das cadeias foi feita utilizando o programa *SwissPDB Viewer* (GUEX; PEITSCH, 1997). Utilizando o mesmo *software*, construiu-se o *linker* polipeptídico (GGGGS)₃ para unir o C-terminal de V_H até o N-terminal de V_L , dessa maneira, construindo-se a estrutura do scFv. Antes da submissão à simulação, os ângulos de Ramachandran foram analisados, utilizando-se também o *SwissPDB Viewer*, para garantir que os resíduos de aminoácidos do *linker* construído estavam em ângulos permitidos.

Figura 9 – Fab do Obinutuzumab co-cristalizado com peptídeo cíclico (ligante) da maior alça do CD20. Íon cloreto em amarelo na interface de interação. V_H em vermelho, V_L em azul. V_H e V_L são as partes do Fab que compõe o scFv.



Fonte: O autor.

Tabela 1 – Sequência de resíduos de aminoácidos de V_H , V_L , *linker* e ligante. Os resíduos de V_H , V_L e do *linker* estão de acordo com a numeração da molécula de scFv. O ligante é numerado dos resíduos 1 a 24, com a região do epítopo do Obinutuzumab em azul.

Estrutura	Sequência
V_H (Resíduos 1-119)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS YSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDY NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS
<i>Linker</i> (Resíduos 120-134)	GGGGSGGGGGSGGGGS
V_L (Resíduos 135-249)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLL HSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV
Ligante (Resíduos 1-24)	IYNCEP ANPSEKNSP STQYCYSIQ

Fonte: o autor.

3.2 Parâmetros de Dinâmica Molecular

3.2.1 Minimização de Energia e Termalização

Os processos de minimização de energia e termalização foram realizados no pacote *Groningen Machine for Chemical Simulation* (GROMACS) (BERENDSEN *et al.*, 1995; HESS *et al.*, 2008; ABRAHAM *et al.*, 2015; SPOEL *et al.*, 2005; LINDAHL *et al.*, 2001; PRONK *et al.*, 2013). Antes desses processos, todas as estruturas foram submetidas ao servidor H++ (ANANDAKRISHNAN *et al.*, 2012; GORDON *et al.*, 2005; MYERS *et al.*, 2006) para verificar a protonação das histidinas. Os terminais de todas as proteínas foram determinados como carregados.

Os sistemas foram submetidos a processos de minimização de energia para obtenção de geometria otimizada, ou seja, os átomos foram arranjados espacialmente de maneira que a energia potencial do sistema fosse a menor possível. O algoritmo utilizado na minimização foi o *steepest descent*.

Posteriormente, os sistemas foram submetidos a processos de termalização. Foram feitas três etapas de termalização em *ensemble* canônico (NVT), no qual o número de átomos é mantido constante e volume da caixa e temperatura são controlados e três etapas em *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT), no qual o número de átomos é mantido constante, a pressão e a temperatura são controladas. Para cada *ensemble*, o dt era 0,0005 ps na primeira termalização, 0,001 ps na segunda e 0,002 ps na terceira.

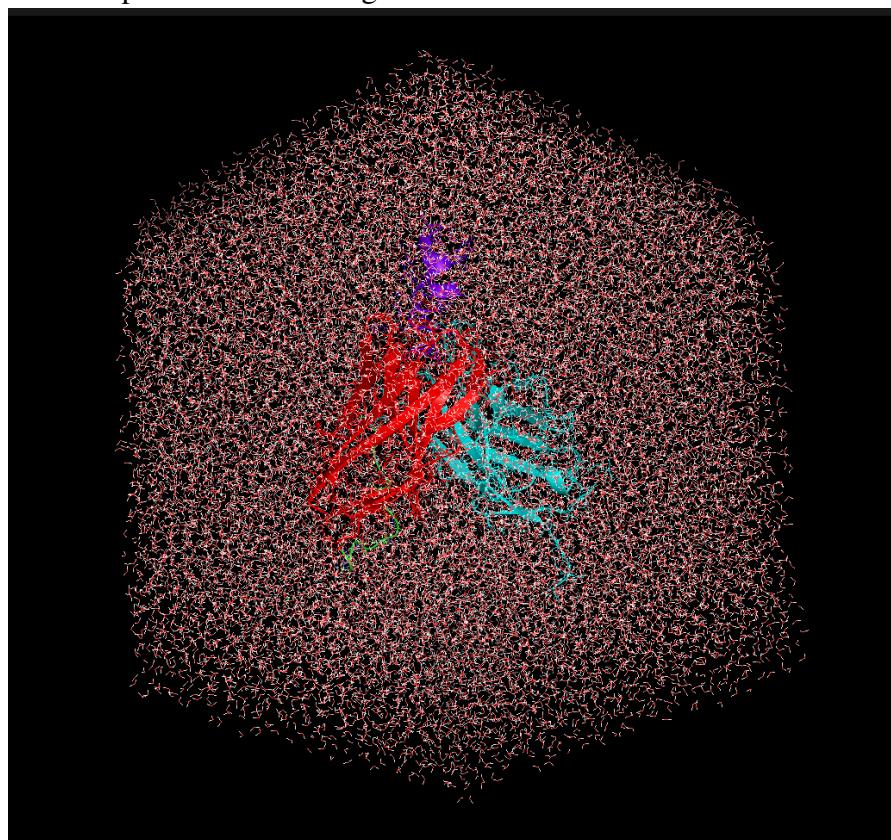
3.2.2 Sistema contendo scFv em solução aquosa

No sistema contendo apenas scFv em solução aquosa, a caixa de simulação utilizada foi cúbica com 9.1 nanometros (nm) de aresta. Foram adicionadas moléculas de água no modelo SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981) para solvatar o sistema e dois íons cloreto para manter o sistema eletricamente neutro (esses íons não são mencionados nas análises, apenas o íon cloreto que foi detectado no cristal). Cada etapa de termalização do sistema teve 10.000 passos. Após a minimização e termalização, o scFv foi submetido à 200 ns de simulação de DM.

3.2.3 Sistema contendo scFv e ligante em solução aquosa

Para montar o sistema contendo scFv e ligante em solução aquosa, coletou-se a estrutura do scFv já minimizada e termalizada, mas ainda sem ter sido submetida à simulação de DM, e essa estrutura foi sobreposta às cadeias V_H e V_L do Fab, para que a posição do scFv em relação ao ligante fosse mantida, montando assim, o sistema contendo scFv e ligante.

Figura 10 – Representação da caixa dodecaédrica contendo o scFv do Obinutuzumab e o ligante envoltos por moléculas de água.



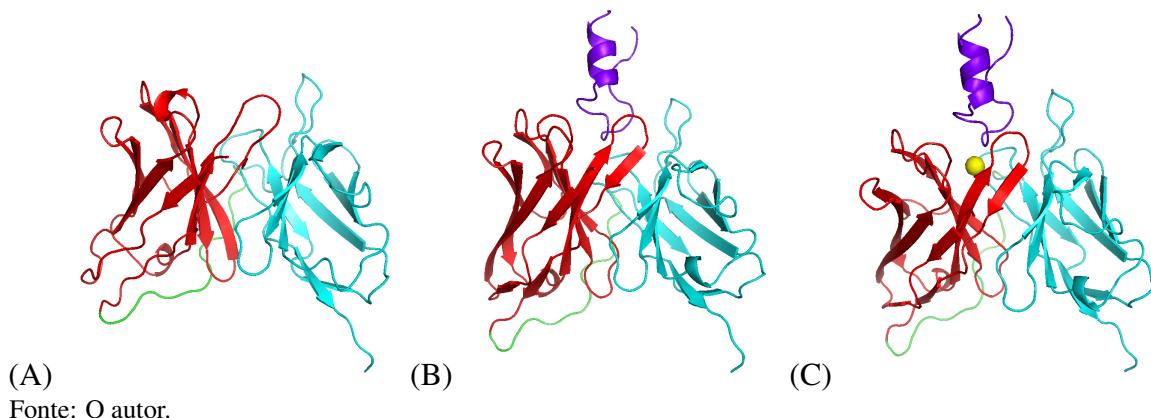
Fonte: O autor.

A caixa utilizada foi um dodecaedro de aresta 10.5 nm (Figura 10). Optou-se por utilizar a caixa nesse formato por este demandar menor número de moléculas de água para solvatar o sistema e, consequentemente, menor custo computacional. Foram utilizadas moléculas de água no modelo SPC para solvatar a caixa e um íon cloreto para manter o sistema eletricamente neutro (esse íon não é mencionado nas análises, apenas o íon cloreto que foi detectado no cristal). Depois disso, foram feitas etapas adicionais de termalização, para garantir que as moléculas de água adicionadas se ajustassem no sistema. Cada etapa teve 5.000 passos. Foram realizadas três etapas de termalização em NVT, em todas elas o scFv foi deixado congelado. Depois foram realizadas três etapas de termalização em NPT, em todas elas, aplicou-se *restraints* à estrutura do scFv.

3.2.4 Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto em solução aquosa

O sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto em solução aquosa foi montado da mesma forma que o sistema contendo scFv e ligante, acrescentando o íon cloreto nas coordenadas em que ele se encontrava na estrutura cristalográfica. Esse sistema também foi submetido às etapas de termalização para ajuste das moléculas de água, descritas no tópico 3.2.3. A representação de cada um dos sistemas pode ser observada na Figura 11.

Figura 11 – Sistemas após minimização de energia e termalização, antes da simulação de DM:
(A) sistema contendo scFv, **(B)** sistema contendo scFv e ligante e **(C)** sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto proveniente do cristal. V_H em vermelho, V_L em ciano, íon cloreto em amarelo e ligante em roxo.



Fonte: O autor.

3.2.5 Dinâmica Molecular

Os parâmetros utilizados na simulação foram os mesmos para todos os sistemas, controle de temperatura: V-rescale (BUSSI *et al.*, 2007), controle de pressão: Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984); integrador: md (*leap-frog*); raio de corte (rcut): 1,3 nm; campo de força: GROMOS53a6 (OOSTENBRINK *et al.*, 2004), *constraint algorithm*: LINCS (HESS *et al.*, 2008; HESS *et al.*, 1997). A simulação foi executada em NPT com pressão (1 atm) e temperatura (310 K) controladas. As correções para interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método PME (ESSMANN *et al.*, 1995). As trajetórias foram coletadas a cada 1000 passos.

Para o sistema contendo apenas o scFv em água, foram realizadas duas simulações totalizando 100 milhões de passos e dt de 0,002, totalizando 200 ns. Para os dois sistemas que continham o ligante, foram feitas três simulações com 150 milhões de passos e dt de 0,002 ps, totalizando 300 ns de simulação.

Tabela 2 – Características dos sistemas submetidos à simulação de DM.

Sistema	Componentes	Moléculas de Água	Caixa	Duração da Simulação
SCFV	scFv	23511	Cúbica	200 ns
SCFV-L	scFv e ligante	26102	Dodecaédrica	300 ns
SCFV-L-CL	scFv, ligante e íon cloreto	26103	Dodecaédrica	300 ns

Fonte: o autor.

3.3 Avaliação Estrutural e Energética

3.3.1 Root Mean Square Deviation

Antes de cada uma das análises, os arquivos de trajetória tiveram suas condições periódicas de contorno tratadas com o programa *gmx trjconv* utilizando-se a flag "pbc mol". Além disso, as proteínas presentes nas trajetórias também foram ajustadas sobre a estrutura de referência (estrutura inicial) para melhor avaliação estrutural, utilizando-se o mesmo programa e a flag "fit rot+trans".

Para realizar a avaliação estrutural, o programa *gmx rms* do pacote GROMACS foi utilizado. Esse programa calcula o RMSD ao longo do tempo, comparando as estruturas obtidas

em cada intervalo de tempo de simulação com uma estrutura de referência.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^n m_i \|\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

O cálculo de RMSD ocorre em duas etapas. Primeiro, ocorre a sobreposição par a par das estruturas e, posteriormente, é feito o cálculo de desvio (Equação 3.1), onde $M = \sum_{i=1}^n m_i$ e $\mathbf{r}_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t . O RMSD médio e o desvio padrão foram calculados a partir do momento em que as estruturas atingiram o equilíbrio estrutural. Para realização dos cálculos, considerou-se apenas o desvio de posição dos carbonos alfa das proteínas, o que simplifica o cálculo, pelo fato dos átomos possuírem a mesma massa. Em todos os dados de RMSD apresentados, a estrutura das proteínas minimizadas e termalizadas, antes da submissão à simulação de DM, foi utilizada como referência para o cálculo do RMSD.

3.3.2 *Potencial de Interação Intermolecular*

O programa do pacote GROMACS *gmx energy* foi utilizado para medir o Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os componentes do sistema ao longo do tempo de simulação. O PII total foi calculado somando-se o potencial de Coulomb e o potencial de Lennard-Jones. Para os dois sistemas contendo o ligante, foram calculados os potenciais de interação para o scFv com o ligante completo e para o scFv com apenas os resíduos do epítopo. O programa *fitness*, desenvolvido pelo grupo, foi utilizado para calcular a contribuição de cada resíduo de aminoácido para o PII total. O raio de corte usado para o cálculo das interações foi de 3.5 Å.

3.3.3 *Ligações de Hidrogênio*

Os programa *fitness-hb*, desenvolvido pelo grupo, foi utilizados para mapear as ligações de hidrogênio entre o scFv e o ligante. Uma ligação de hidrogênio típica pode ser descrita como X–H···Y–Z, em que X–H representa o doador da ligação de hidrogênio e X é um átomo mais eletronegativo que H. O acceptor pode ser um átomo ou ânion Y, o qual está ligado a um átomo Z (ARUNAN *et al.*, 2011b).

Os critérios geométricos para definição de uma ligação de hidrogênio foram determinados de acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (ARUNAN *et al.*, 2011a). Foram consideradas somente as ligações de hidrogênio cuja

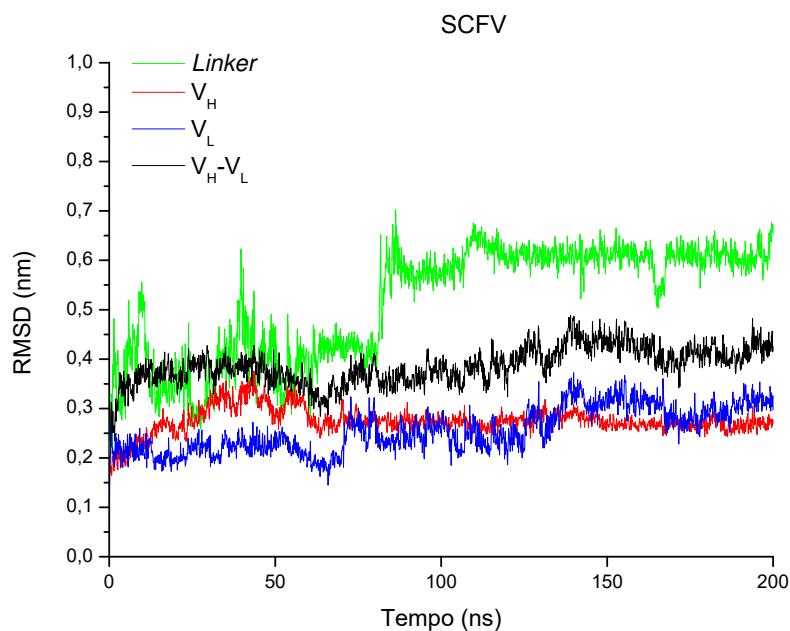
porcentagem de observação na simulação foi maior que 20%, ou seja, ligações que satisfazem as condições geométricas para existencia da ligação de hidrogênio por mais 20% do período de simulação analisado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação Estrutural do scFv e do ligante

Os dados contidos nesse tópico dizem respeito às análises de RMSD dos três sistemas estudados. Para facilitar a compreensão, o sistema contendo apenas o scFv será denominado "SCFV", o sistema contendo scFv e ligante será denominado "SCFV-L" e o sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto será denominado "SCFV-L-CL".

Figura 12 – Representação das curvas de RMSD das estruturas V_H , V_L , *linker* e de V_H-V_L sem o *linker* durante a simulação. Dados referentes ao sistema contendo scFv em solução aquosa.



Fonte: O autor.

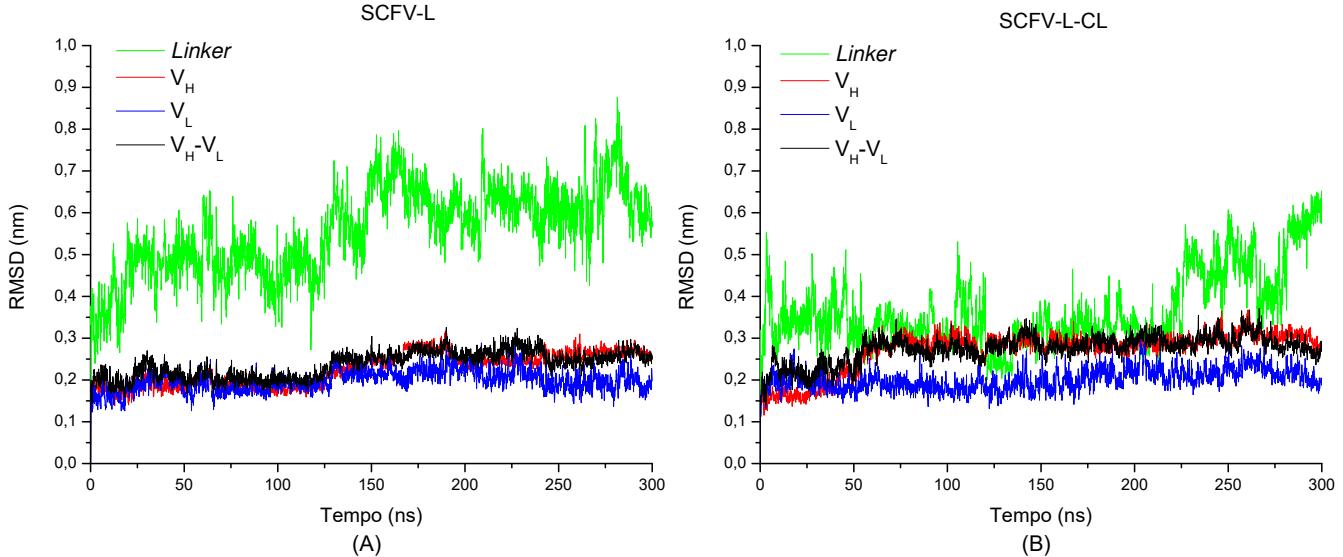
Os dados de RMSD para o sistema contendo o scFv do Obinutuzumab em água (Sistema scFv) estão representados na Figura 12. Para este sistema, todos os cálculos das médias e desvios de RMSD foram feitos a partir de 90 ns decorridos de simulação, quando os componentes do sistema apresentam-se estáveis estruturalmente.

O *linker* é a estrutura que apresenta maior RMSD médio ($0,60 \pm 0,03$ nm). É possível observar um aumento elevado no perfil de RMSD por volta de 80 e 90 ns de simulação, após esse momento, o *linker* passa a ter maior estabilidade estrutural.

O domínio V_H é o que apresenta maior estabilidade, apresentando baixo desvio ($0,27 \pm 0,01$ nm). O domínio V_L atinge o equilíbrio por volta de 90 ns de simulação, assim

como a estrutura de V_H - V_L , sem considerar o *linker*. É possível observar que as mudanças na estrutura de V_H - V_L são devidas principalmente à oscilação estrutural do domínio V_L .

Figura 13 – Representação das curvas de RMSD das estruturas V_H , V_L , *linker* e de V_H - V_L sem o *linker* durante a simulação. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^- .



Fonte: O autor.

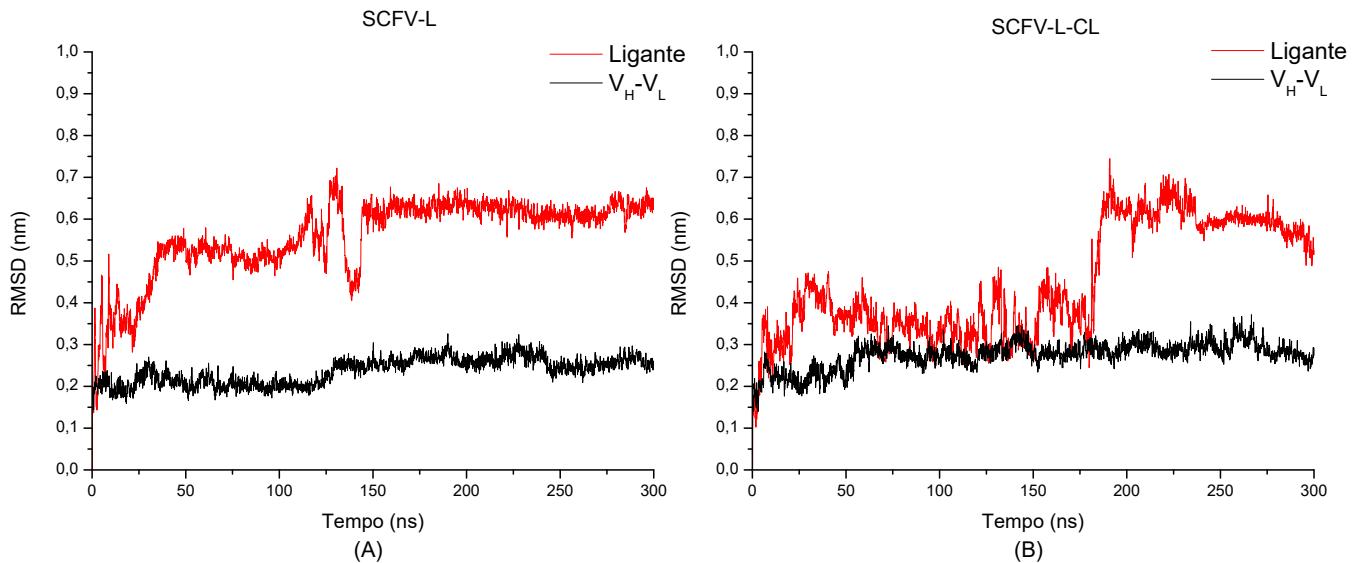
Nos dois sistemas contendo o ligante (Figura 13), é possível observar que o RMSD da estrutura de V_H - V_L apresenta uma tendência de acompanhar o perfil de RMSD do domínio V_H . Diferentemente do que ocorre na ausência do ligante, em que o V_H - V_L tende a acompanhar as oscilações em V_L .

Para o sistema SCFV-L, é possível observar que todas as estruturas apresentam um leve aumento no RMSD por volta de 120 ns de simulação. Em todos os sistemas, o *linker* é a estrutura com maior RMSD médio, sendo de $0,63 \pm 0,06$ nm na ausência do íon cloreto e $0,48 \pm 0,08$ nm na presença do íon, o valor mais baixo dos três sistemas.

Analizando-se o perfil de RMSD do ligante, na ausência do íon cloreto, (Figura 14A) ao longo do tempo, nota-se que por volta de 120 ns, o ligante passa por uma grande modificação em sua conformação. Após isso, ele passa a ter elevada estabilidade. O RMSD médio para o ligante é de $0,62 \pm 0,02$ nm. Comparando o perfil de RMSD do ligante com o da estrutura de V_H - V_L , vê-se a correlação entre a alteração estrutural do ligante com o aumento dos valores de RMSD dos domínios do scFv do Obinutuzumab.

Já no sistema SCFV-L-CL (Figura 14B), é possível observar uma mudança conformational no ligante por volta de 180 ns decorridos de simulação. O RMSD médio do ligante é

Figura 14 – Representação das curvas de RMSD das estruturas do ligante e de V_H - V_L durante a simulação. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^- .



Fonte: O autor.

menor do que na ausência do íon cloreto ($0,60 \pm 0,03$ nm).

Comparando os resultados de RMSDs médios e desvios para os sistemas estudados (Tabela 3), observa-se que os valores de RMSD médio de V_H - V_L na presença ligante são consideravelmente menores do que no sistema SCFV. No entanto, a presença do íon não provocou grandes mudanças no RMSD médio da maioria das estruturas, exceto para o *linker*, que teve o menor RMSD médio dos três sistemas.

Tabela 3 – Resultados dos RMSDs médios (nm) de *linker*, V_H , V_L , e V_H - V_L em cada um dos sistemas estudados.

RMSD (nm)	<i>Linker</i>	V_H	V_L	V_H - V_L	Ligante	Período analisado
SCFV	$0,60 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,03$	-	90-200 ns
SCFV-L	$0,63 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,02$	220-300 ns
SCFV-L-CL	$0,48 \pm 0,08$	$0,30 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,03$	220-300 ns

Fonte: o autor.

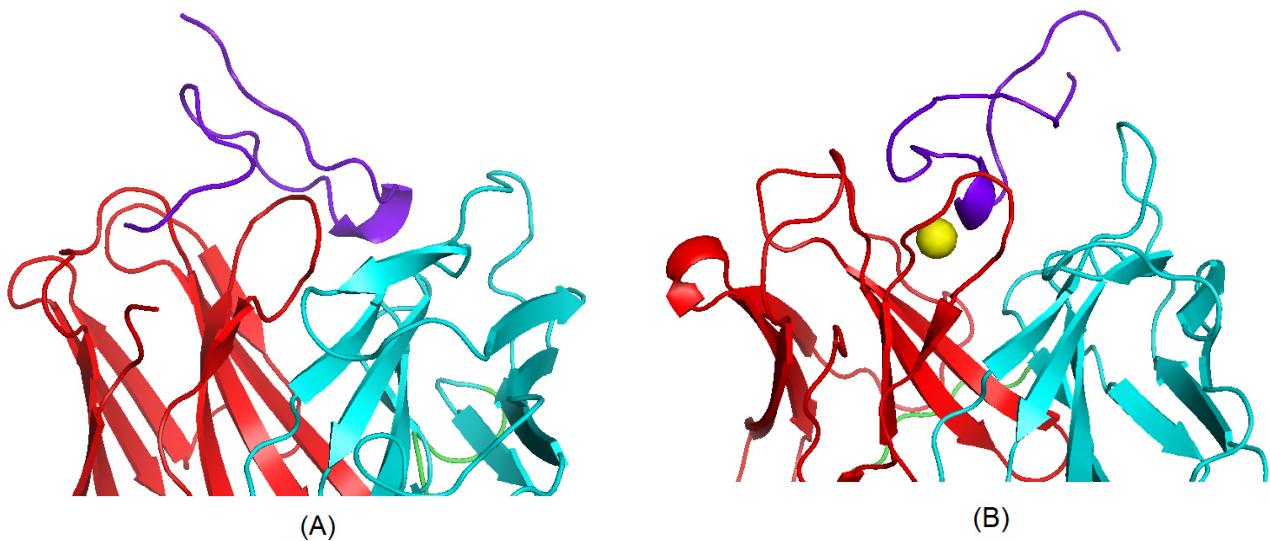
O fato de o *linker* ser a estrutura com maior RMSD médio em todos os sistemas já era esperado devido à sua composição rica em glicina e serina, aminoácidos com pequenas cadeias laterais, que possuem grande flexibilidade estrutural.

Para investigar o que estava causando as alterações no perfil de RMSD do ligante, foram feitos filmes das simulações. Dessa forma, foi possível observar que, no sistema SCFV-L, o ligante sofre uma rotação e suas regiões terminais passam a interagir com o scFv, especificamente

com o domínio V_H (Figura 15A), o que provoca a mudança conformacional no ligante e o leve aumento no perfil de RMSD dos domínios do scFv.

Observando o filme da simulação do sistema SCFV-L-CL, é possível detectar que a mudança conformacional no ligante, observada por volta de 180 ns, está relacionada com as movimentações das regiões terminais do ligante, assim como da região de contato com o scFv (Figura 15B).

Figura 15 – *Snapshots* dos filmes das simulações no tempo 260 ns. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^- . V_H em vermelho, V_L em ciano, ligante em roxo e íon cloreto em amarelo.



Fonte: O autor.

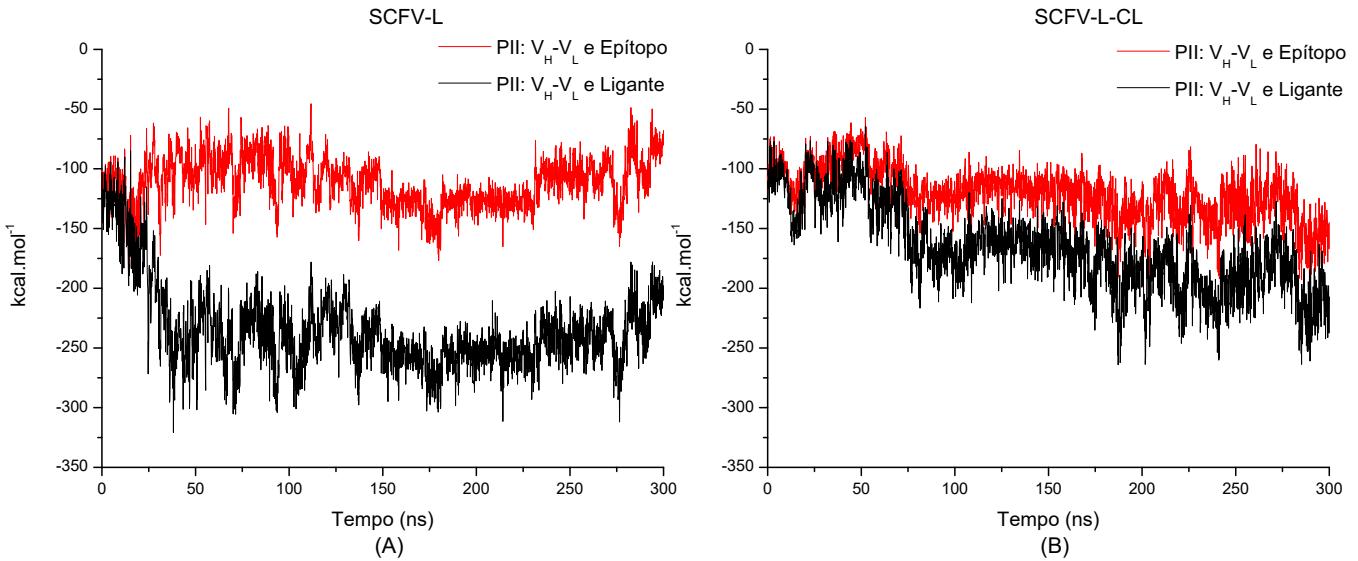
4.2 Potencial de Interação Intermolecular Total

4.2.1 Interação entre scFv e ligante

No sistema SCFV-L (Figura 16A), o perfil de PII ao longo do tempo é muito mais atrativo para o ligante completo ($-239,04 \pm 21,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Esse valor elevado está relacionado com a interação do C-terminal do ligante com resíduos de V_H . Para o mesmo sistema, nota-se que a interação de V_H - V_L com os resíduos do epítopo é bem menos atrativa ($-106,17 \pm 18,63 \text{ kcal.mol}^{-1}$), o que já era esperado, pois nesse caso as interações com os terminais não são levadas em consideração.

Para o sistema SCFV-L-CL (Figura 16B), os perfis de PII do scFv com o ligante e

Figura 16 – Potencial de Interação Intermolecular Total entre V_H - V_L e ligante completo (preto) e V_H - V_L e epítopo (vermelho) ao longo da simulação. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon Cl^- .



Fonte: O autor.

com os resíduos do epítopo mostram-se semelhantes. O PII médio de interação do scFv com o ligante completo é $-197,14 \pm 23,95$ kcal. mol^{-1} , enquanto que para interação do scFv com os resíduos do epítopo, o PII médio é de $-136,14 \pm 20,66$ kcal. mol^{-1} .

Na Tabela 4, é possível observar um resumo das interações entre V_H - V_L com epítopo/ligante completo para os sistemas SCFV-L e SCFV-L-CL. Nota-se que a interação com o epítopo é consideravelmente mais atrativa da presença do íon cloreto. O estudo da interação do scFv com os resíduos do epítopo é importante para que se possa desconsiderar as interações dos grupamentos C-terminal e N-terminal do ligante com o scFv, já que os terminais apresentam-se carregados e, portanto, propensos a elevadas interações eletrostáticas. Como o CD20 possui terminais citoplasmáticos, infere-se que, na interação propriamente dita do anticorpo com a molécula de CD20 completa, não há essa interferência da interação eletrostática com o C-terminal e N-terminal.

Tabela 4 – Resultados do PII Total entre scFv e ligante completo ou scFv epítopo na presença ou ausência do íon cloreto.

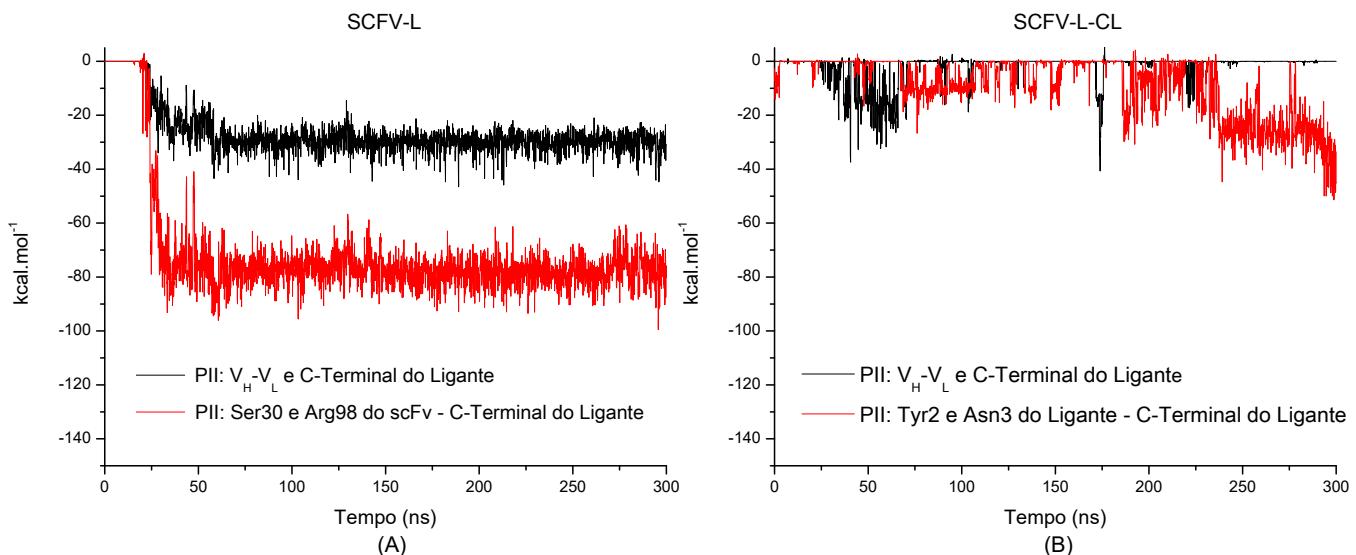
Sistema	V_H - V_L e Ligante	V_H - V_L e Epítopo	Período analisado
SCFV-L	$-239,04 \pm 21,32$	$-106,17 \pm 18,63$	220-300 ns
SCFV-L-CL	$-197,14 \pm 23,95$	$-136,14 \pm 20,66$	220-300 ns

Fonte: o autor.

Na figura 17, é possível observar em maiores detalhes a interação do C-Terminal do

ligante com V_H - V_L . De maneira geral, na ausência do íon cloreto, a interação entre o C-Terminal do ligante (Gln24) e o scFv é mais atrativa. Analisando as ligações de hidrogênio (Tabela 6) que ocorrem com o C-Terminal do ligante, constata-se que as principais interações se dão com a Ser30 e Arg98 do scFv e que esses resíduos de aminoácidos possuem um importante papel na mudança conformacional que ocorreu no ligante (Figura 15A). Ressalta-se que a Ser30 faz parte da CDR H1 e que a Arg98 está muito próxima da CDR H3 (Tabela 5) e que contatos do terminal com essas CDRs afetam regiões críticas para a interação antígeno-anticorpo.

Figura 17 – Potencial de interação intermolecular entre o C-Terminal (Gln24) do ligante e V_H - V_L em preto e entre C-terminal do ligante e resíduos específicos em vermelho. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.



Fonte: O autor.

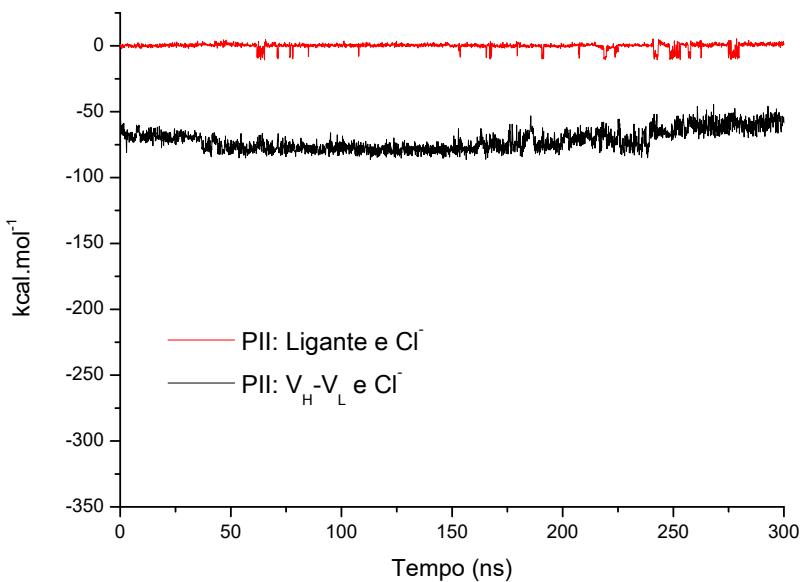
No sistema contendo o íon, a interação do C-terminal do ligante com V_H - V_L apresenta valores menos atrativos. Ao estudar as ligações de hidrogênio de Gln24 (ligante), não detecta-se interações com o scFv, apenas com resíduos do próprio ligante, como Tyr2 e Asn3. Dessa forma, a presença do íon é capaz de evitar contatos indesejados do C-terminal do ligante com resíduos de V_H .

4.2.2 *Interação entre scFv/ligante e íon cloreto*

Visando entender as interações que mantinham o íon cloreto na mesma posição na interface de interação, foram realizadas análises de potencial de interação total entre o íon e os componentes proteicos do sistema. As interações do scFv com o íon Cl^- (Figura 18) apresentam PII médio de $-63,76 \pm 7,65$ kcal.mol $^{-1}$. Já o PII médio do íon cloreto com o ligante mantém-se

em torno de zero ($-0,34 \pm 3,20 \text{ kcal.mol}^{-1}$). De acordo com os dados obtidos e sabendo-se que não foi utilizada nenhuma restrição de movimento ao longo da simulação, é possível inferir que o íon é mantido no mesmo local devido a sua interação com resíduos do scFv do Obinutuzumab.

Figura 18 – Potencial de interação entre scFv e íon cloreto (preto) e potencial de interação entre ligante e íon cloreto (vermelho) ao longo dos 300 ns de simulação.



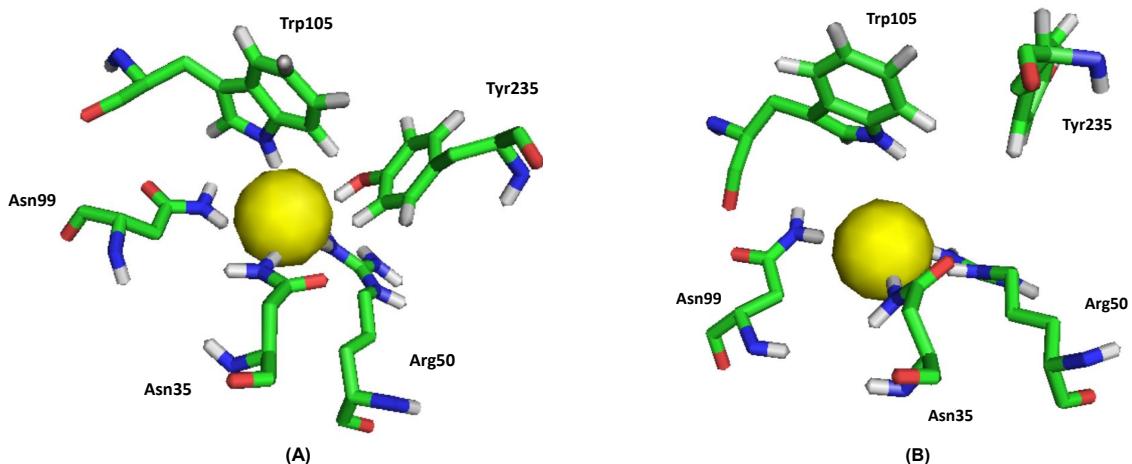
Fonte: O autor.

Curiosamente, uma simulação de 200 ns foi realizada com um sistema contendo scFv e íon cloreto, sem a presença do ligante, e nela constatou-se que o scFv sozinho não é capaz de manter o íon nas mesmas coordenadas, sendo necessária a interface de interação scFv-ligante para que o íon se mantenha na mesma posição.

Antes do sistema ser submetido à simulação de DM, é possível observar que os resíduos de aminoácidos que estão mais próximos do íon são pertencentes majoritariamente à V_H (Figura 19A). Os grupamentos $-NH_2$ das carboxaminas das asparaginas Asn99 e Asn35 interagem com o íon cloreto durante toda a simulação, assim como o grupo guanidino da Arg50 (Figura 19B). É importante ressaltar que esses resíduos estão em localizações estratégicas do scFv. O resíduo Asn35 está situado muito próximo à CDR H1, Arg50 à CDR H2 e o resíduo Asn99 faz parte da CDR H3 (Tabela 5).

Ao longo da simulação de DM, ocorre um afastamento dos resíduos Trp105 (pertencente à CDR H3) e Tyr235 (pertencente à CDR L3) do íon cloreto (Figura 19B). No caso da tirosina, esse distanciamento pode ser explicado pela repulsão entre o grupo hidroxila da cadeia lateral do resíduo de aminoácido e o íon cloreto, pois ambos apresentam cargas negativas.

Figura 19 – Resíduos de aminoácidos do scFv do Obinutuzumab interagindo com o íon cloreto. **(A)** Na estrutura cristalográfica (código 3pp4). **(B)** Depois de 300 ns de DM. Nitrogênio em azul, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho e demais átomos em verde.



Fonte: O autor.

No trabalho de Niederfellner e colaboradores (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013), propõe-se que a posição do íon cloreto seja coordenada pelas interações com Asn35, Arg50 e Tyr235. O sistema submetido à simulação de DM com o modelo de scFv construído é capaz de manter essa interação dos resíduos Asn35 e Arg50 com o íon observada previamente no cristal, mas não com o resíduo Tyr235. Contudo, a interação com Asn99 não é destacada por Niederfellner e colaboradores, mas apresenta-se constante durante todo o período de simulação.

4.3 Potencial de Interação Intermolecular por Resíduo

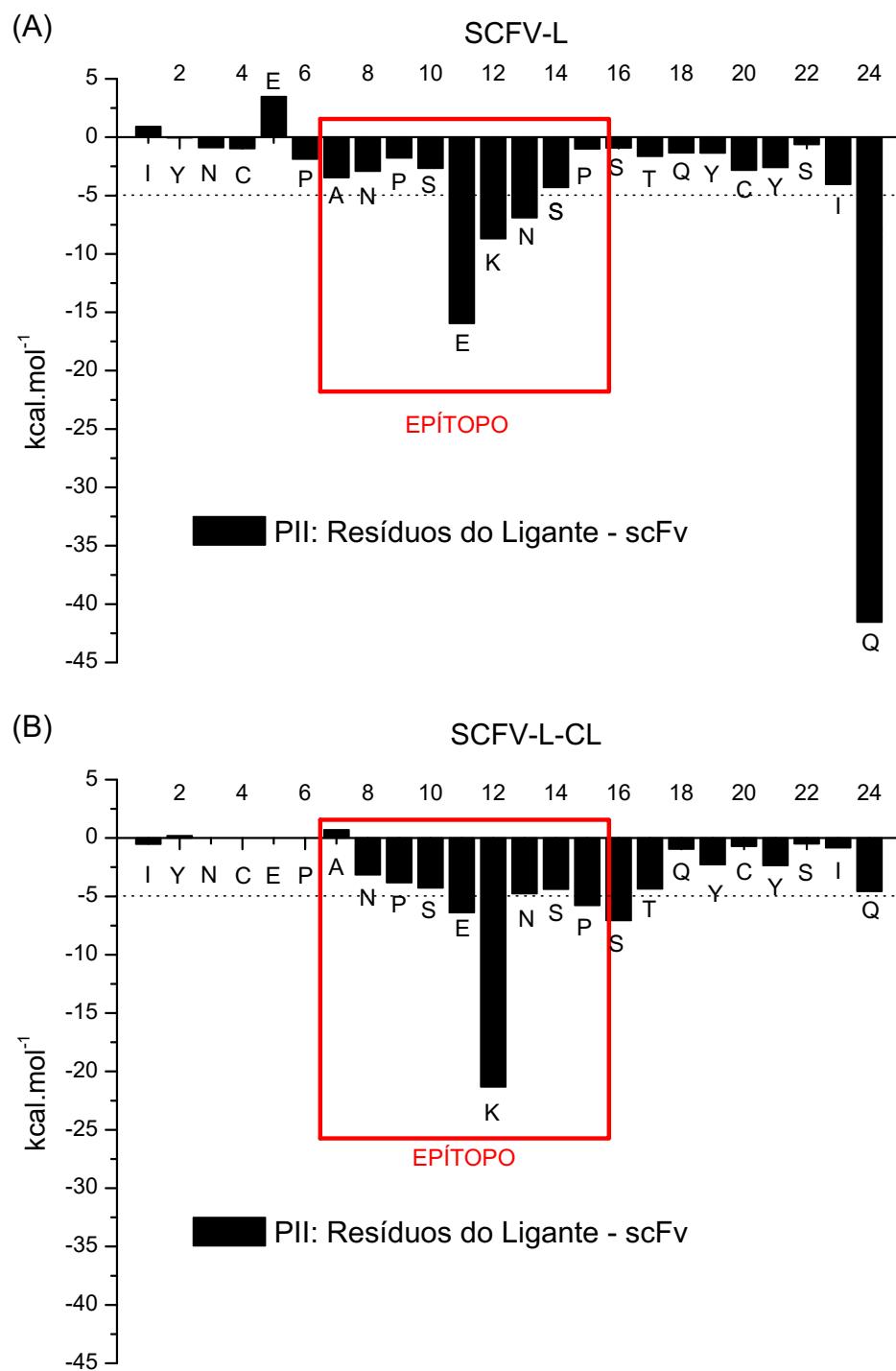
4.3.1 *Potencial de Interação Intermolecular por Resíduo do Ligante*

Pelo programa *fitness*, avaliou-se quais resíduos de aminoácidos do ligante interagem mais com o scFv do Obinutuzumab (Figura 20). No sistema SCFV-L há repulsão entre Glu5 do ligante e o scFv e as interações atrativas mais marcantes se dão com Glu11, Lys12 e Asn13. A interação de Gln24 com o scFv é a mais elevada, no entanto, isso é justificado pela interação do C-Terinal carregado do ligante com resíduos do domínio VH.

Já no sistema SCFV-L-CL, não ocorre repulsão com Glu5, mas leves repulsões com Tyr2 e Ala7. Assim como o esperado, a interação do scFv com o C-Terinal do ligante é bem menos acentuada. Na presença do íon, a interação mais atrativa se dá com Lys12.

No trabalho realizado por Niederfellner e colaboradores (NIEDERFELLNER *et al.*,

Figura 20 – Interação de cada um dos resíduos do ligante com o scFv calculados pelo programa *fitness*. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.



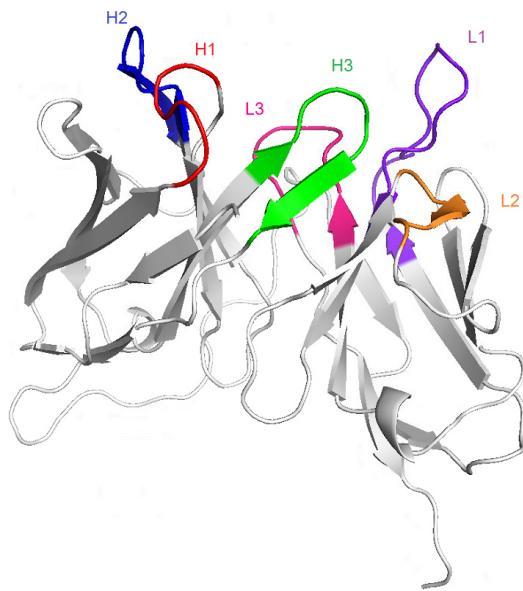
Fonte: O autor.

2013), constatou-se que os resíduos que compõe o epítopo central do Obinutuzumab (Pro9 a Pro15) diferem daqueles que compõe o epítopo central da maioria dos anticorpos anti-CD20 tipo I (Ala7 a Ser10). Ou seja, os resíduos do epítopo central do Obinutuzumab se localizam mais próximos ao C-Terminal do CD20. Isso está relacionado com o fato de que o Obintuzumab não tolera bem mutações em Asn13, Ser14 e Pro15.

4.3.2 *Potencial de Interação Intermolecular por Resíduo do scFv*

A figura 22 contém a contribuição de cada resíduo de aminoácido do scFv para o PII entre scFv e ligante. Em cada um dos gráficos apresentados nesta seção, a região das CDRs (Figura 21) foi destacada para evidenciar os pontos-chave de reconhecimento e interação com o antígeno. A composição e localização de cada CDR pode ser observada na Tabela 5.

Figura 21 – CDRs do Obinutuzumab presentes no scFv antes da submissão da estrutura à simulação de DM.



Fonte: O autor.

Analizando-se o PII do scFv com o ligante completo, pode-se perceber que o perfil de potencial de interação difere na presença ou ausência do íon cloreto. No sistema SCFV-L, há interação do N-terminal do scFv (Gln1) com o ligante, o que não ocorre na presença do íon. Além disso, na ausência do íon, a CDR H1 apresenta mais interações atrativas, envolvendo principalmente os resíduos Ser30, Tyr31 e Ser32.

Contudo, analisando-se as ligações de hidrogênio (Tabela 6) pelo programa *fitness*

Tabela 5 – Tabela contendo as CDRs do Obinutuzumab e suas respectivas numerações de átomos e resíduos no scFv construído e a sequência do ligante e de seu epítopo. O mapeamento das CDRs do Obinutuzumab foi feito a partir de dados da patente do anticorpo (SAMPATH *et al.*, 2015).

Estrutura	Sequência	Resíduos	Átomos
scFv	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAS GYAFS YSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTD YNGKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR NVFDGYWLVY WGQGTLVTVSS GGGGSGGGGGSGGGSDIVMTQTPLSLPVTP GEPASISC RSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPG QSPQLLIY QMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDGVVYYC AQNLELPYT FGGGT KVEIKRTV	1-249	1-2430
H1	GYAFSY	26-31	226-240
H2	FPGDGDTD	52-59	520-589
H3	NVFDGYWLVY	99-108	998-1104
L1	RSSKSLLHSNGITYLY	158-173	1495-1667
L2	QMSNLVS	189-195	1837-1901
L3	AQNLELPYT	228-236	2211-2301
Ligante	IYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ	1-24	1-247
Epítopo	ANPSEKNSP	7-15	65-145

Fonte: O autor.

hb, constatou-se que o *backbone* desses três resíduos formam ligações de hidrogênio com o *backbone* do C-terminal do ligante e não com o epítopo (Tabela 6A). Isso se confirma quando observa-se o gráfico da interação dos resíduos do scFv com os resíduos do epítopo (Figura 23A), em que essa interação com H1 ocorre em menor intensidade. Além disso, também há interação entre o C-terminal e Arg98 (próxima à H3), na ausência do íon cloreto, assim como foi demonstrado anteriormente na Figura 17A.

Na CDR H2, há interações repulsivas independentemente da presença do íon no sistema. No entanto, na ausência do íon, essa repulsão é bem mais intensa e ocorre com três resíduos de aminoácido do scFv, os aspartatos 55, 57 e 59. Os resíduos que mais se destacam na interação são Arg50 e Lys65. Já no sistema SCFV-L-CL, a repulsão se dá somente com Asp55 e, em relação ao epítopo (Figura 23B), Asp57 e Asp59 não representam pontos de repulsão, e sim de intensa atratividade. Ressalta-se que Arg50 é um dos resíduos de aminoácido que interage com o íon cloreto durante toda a simulação (Figura 19A) e que, por ser um resíduo muito próximo à CDR H2, essa interação com o íon cloreto possa orientar os aspartatos presentes

Tabela 6 – Tabela contendo as ligações de hidrogênio entre resíduos do ligante e resíduos do scFv. Resíduos pertencentes ao epítopo estão destacados em vermelho. *Com base no perceptual de observação das ligações de hidrogênio entre esses resíduos durante a simulação. **Desconsiderando-se as ligações envolvendo o C-Terminal do ligante. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.

(A) SCFV-L

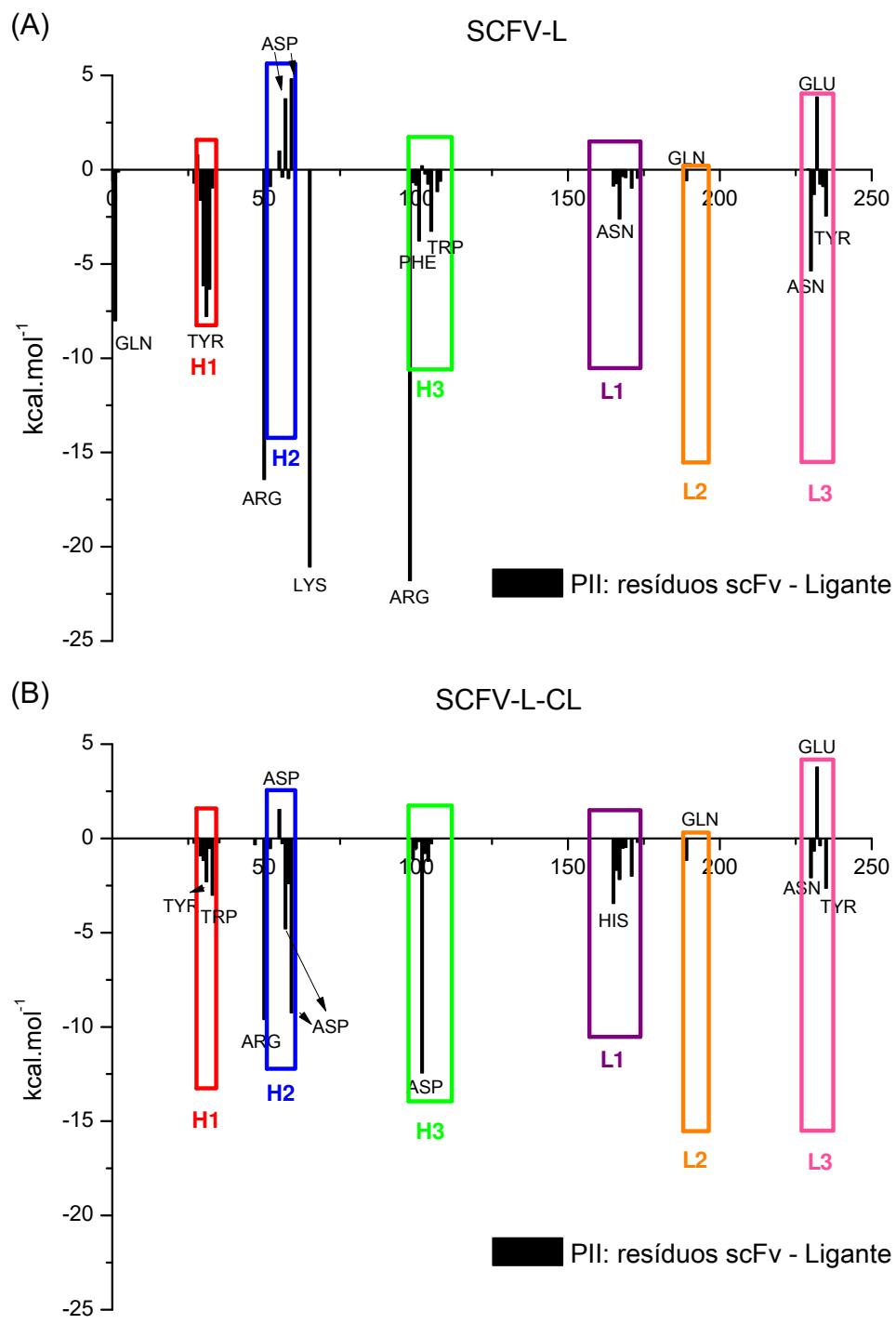
Resíduo do scFv	Resíduo do Ligante	Nº de Ligações de Hidrogênio*
Backbone	Backbone	
30 Ser (H1)	24 Gln	0.85
31 Tyr (H1)	24 Gln	0.27
101 Phe (H3)	20 Cys	0.40
102 Asp (H3)	20 Cys	0.37
Backbone	Cadeia Lateral	
102 Asp (H3)	11 Glu	0.24
231 Leu (L3)	10 Ser	0.31
Cadeia Lateral	Backbone	
57 Asp (H2)	14 Ser	0.21
98 Arg (próx. a H3)	24 Gln	0.51
102 Asp (H3)	7 Ala	0.64
102 Asp (H3)	8 Asn	0.20
230 Asn (L3)	8 Asn	0.48
Cadeia Lateral	Cadeia Lateral	
105 Trp (H3)	11 Glu	0.30
235 Tyr (L3)	11 Glu	0.29
		Subtotal**: 3,44

(B) SCFV-L-CL

Resíduo do scFv	Resíduo do Ligante	Nº de Ligações de Hidrogênio*
Backbone	Backbone	
31 Tyr (H1)	15 Pro	0.64
Backbone	Cadeia Lateral	
230 Asn (L3)	8 Asn	0.37
Cadeia Lateral	Backbone	
33 Trp (próx. à H1)	13 Asn	0.76
50 Arg (próx. à H2)	12 Lys	1.11
50 Arg (próx. à H2)	13 Asn	0.24
102 Asp (H3)	17 Thr	0.60
102 Asp (H3)	16 Ser	0.37
167 Asn (L1)	21 Tyr	0.21
230 Asn (L3)	10 Ser	0.25
235 Tyr (L3)	10 Ser	0.58
Cadeia Lateral	Cadeia Lateral	
59 Asp (H2)	12 Lys	0.26
235 Tyr (L3)	8 Asn	0.31
		Subtotal**: 5.70

Fonte: O autor.

Figura 22 – Resultados da contribuição de cada resíduo de aminoácido pertencente ao scFv para o PII entre scFv e ligante completo calculados pelo programa *fitness*. **(A)** Sistema contendo scFv e ligante. **(B)** Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.

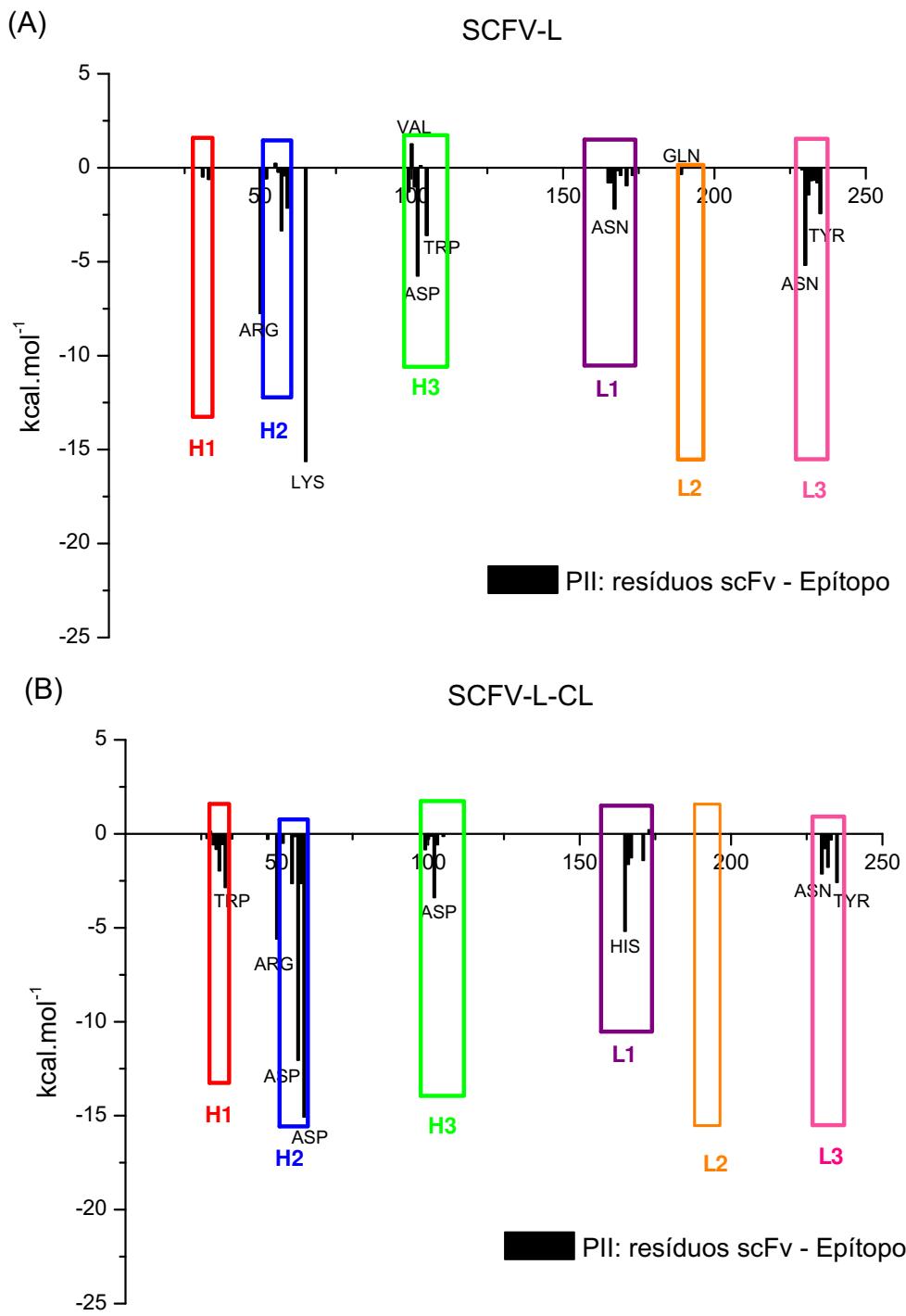


Fonte: O autor.

em H2 para que ocorra interação adequada com o epítopo.

Em relação ao epítopo, quando o íon não está presente, há interação repulsiva envolvendo Val100. Sabe-se que a CDR3 é a CDR que apresenta maior variabilidade de composição de aminoácidos (ABBAS *et al.*, 2015), sendo crucial na interação antígeno-anticorpo.

Figura 23 – Resultados da contribuição de cada resíduo de aminoácido pertencente ao scFv para o PII entre scFv e epítopo calculados pelo programa *fitness*. (A) Sistema contendo scFv e ligante. (B) Sistema contendo scFv, ligante e íon cloreto.



Fonte: O autor.

Dessa forma, repulsões nessa CDR são extremamente indesejadas. Na presença do íon, tanto para o epítopo quanto para o ligante completo, a interação com os resíduos de H3 foi mediada principalmente por Asp102. De acordo com as análises de ligações de hidrogênio, a cadeia

lateral de Asp102 do scFv interage principalmente com o *backbone* dos resíduos Ser16 e Thr17 do ligante (Tabela 6). Na ausência do íon, Asp102 interage com os resíduos 7Ala, 8Asn e Glu11, pertencentes ao epítopo.

As interações entre as CDRs L1 e L2 são pouco atrativas para ambos os sistemas, seja considerando o ligante completo ou apenas a região do epítopo. No entanto, para o sistema sem o íon, o resíduo que é mais atrativo em L1 foi Asn167, enquanto que na presença do íon, foi His165.

Nas ligações de L3 com o ligante, tanto na presença quanto na ausência do íon, destaca-se as repulsões que ocorrem com o resíduo de aminoácido Glu232. No mais, em ambos os sistemas, a interação atrativa ocorre principalmente com os resíduos Asp230 e Tyr235 pertencentes ao scFv. As interações envolvendo Asp230 ocorrem entre Asn8 e Ser10 do ligante na presença do íon e apenas com Asn8 na ausência. As interações de Asp230 com Asn8 e Ser10 do ligante já haviam sido mapeadas por Niederfellner e colaboradores (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013), o que mostra que os sistemas apresentaram-se condizentes com as observações experimentais. Já as interações de Tyr235 ocorrem entre a cadeia leteral desse resíduo e a cadeia lateral de Glu11 na ausência do íon e com a cadeia lateral de Asn8 na presença do íon.

Na maioria das CDRs estudadas, percebe-se que a presença do íon não muda apenas o potencial de interação, mas também quais são os resíduos do scFv mais atrativos ou repulsivos e os resíduos do ligante com os quais eles interagem.

Na tabela 6 pode-se observar as ligações de hidrogênio mapeadas entre o scFv e o ligante. Nos dois sistemas estudados, percebe-se que houve um predomínio de interações do tipo *backbone-cadeia lateral*. Ressalta-se que, somando-se todas as ligações de hidrogênio exceto as envolvendo os terminais do ligante, na ausência do íon observa-se um total de 3.44 ligações, enquanto que na presença do íon, esse número é de 5.7 ligações.

Quanto mais interna a interação, maior é a especificidade antígeno-anticorpo, em decorrência da complementação e interações de curto alcance. A interação mais interna entre duas proteínas é do tipo *backbone-backbone*. No sistema SCFV-L, as interações desse tipo se dão com o C-Terminal (Gln24) e com Cys20, resíduos não pertencentes ao epítopo (Tabela 6). O sistema SCFV-L-CL só mostrou uma ligação de hidrogênio do tipo *backbone-backbone*. No entanto, essa interação se deu com Pro15, um resíduo do epítopo central do Obinutuzumab.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A estabilidade estrutural do scFv é mantida ao longo da simulação e é possível observar diferentes mudanças conformacionais do peptídeo cíclico de CD20 na ausência e presença do íon cloreto proveniente do cristal. Na presença do íon cloreto, a interação do C-terminal do ligante com o scFv não foi observada.

Na presença do íon cloreto, os resíduos Asp57 e Asp59 do scFv foram muito mais atrativos ao epítopo, realçando a interação entre a CDR H2 e o epítopo quando comparada com essa interação na ausência do íon.

Com ou sem o íon cloreto, a maioria das ligações de hidrogênio observadas entre scFv e ligante ocorrem entre a cadeia lateral do scFv e o *backbone* do ligante. Na presença do íon, foi observado um maior número de contatos via caracterização por ligações de hidrogênio. Essas ligações estabilizam a interface de interação formada, com isso, realçando a afinidade. Por se tratarem de LHs mais internas, envolvendo *backbone* e cadeia lateral, isso implica que as interações ocorrem em um nível mais interno de interface formada, o que realça e complementariedade e portanto, a especificidade.

Em conclusão, a presença do íon realça a interação entre a CDR H2 e o epítopo e provoca maior número de LHs entre scFv e ligante, ressaltando a possibilidade de o íon ter papel central na afinidade e especificidade na interação do Obinutuzumab com o peptídeo cíclico.

No futuro, serão conduzidas análises de energia livre pelo método *Adaptive Biasing Force* (ABF), o qual possibilitará o cálculo de energia livre de ligação absoluta, considerando fatores entrópicos. O método será aplicado nas condições de presença e ausência do íon e possibilitará a comparação dos valores de energia livre de ligação obtidos com valores obtidos experimentalmente por Niederfellner e colaboradores (NIEDERFELLNER *et al.*, 2013).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. [S.l.]: Elsevier Brasil, 2015.
- ABRAHAM, M.; HESS, B.; SPOEL, D. van der; LINDAHL, E. **Manual GROMACS 5.0.7**. [S.l.]: SpringerReference28001, 2011.
- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1-2, p. 19 – 25, 2015.
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. **Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins**. 2006.
- AHMAD, Z. A. *et al.* ScFv antibody: Principles and clinical application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, n. March, 2012.
- AMAN, M.; TOSELLLO-TRAMPONT, A.-C.; RAVICHANDRAN, K. Fc γ RIIB1/SHIP-mediated Inhibitory Signaling in B Cells Involves Lipid Rafts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46371–46378, 2001.
- ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H $^{++}$ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic Acids Research**, 2012.
- ARGOS, P. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. **Journal of Molecular Biology**, v. 211, n. 4, p. 943 – 958, 1990.
- ARUNAN, E. *et al.* Defining the hydrogen bond : An account (IUPAC Technical Report)*. v. 83, n. 8, p. 1619–1636, 2011.
- ARUNAN, E. *et al.* Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 8, p. 1637–1641, 2011.
- AWASTHI, A. *et al.* Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20+ rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia (pre-B-ALL): Potential targeted therapy in patients with poor risk CD20+ BL and pre-B-ALL. **British Journal of Haematology**, v. 171, n. 5, p. 763–775, 2015.
- BEERS, S. A. *et al.* CD20 as a target for therapeutic type i and ii monoclonal antibodies. **Seminars in Hematology**, Elsevier Inc., v. 47, n. 2, p. 107–114, 2010.
- BERENDSEN, H. J.; POSTMA, J. P.; Van Gunsteren, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, 1984.
- BERENDSEN, H. J.; SPOEL, D. van der; DRUNEN, R. van. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, 1995.

- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. van; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: _____. **Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981. p. 331–342.
- BUBIEN, J. K. *et al.* Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. **The Journal of cell biology**, v. 121, n. 5, p. 1121–32, jun 1993.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, 2007.
- CAMERON, F.; MCCORMACK, P. L. Obinutuzumab: First global approval. **Drugs**, v. 74, n. 1, p. 147–154, Jan 2014.
- CHAO, M. P. Treatment challenges in the management of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma - Novel and emerging therapies. **Cancer Management and Research**, v. 5, n. 1, p. 251–269, 2013.
- CRAGG, M. S.; GLENNIE, M. J. The Biology of CD20 and Its Potential as a Target for mAb Therapy. **B Cell Trophic Factors and B Cell Antagonism in Autoimmune Disease**, p. 140–174, 2004.
- CRAGG, M. S. *et al.* Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 1045–1052, 2003.
- DU, J. *et al.* Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 15073–15080, 2007.
- ERNST, J. A. *et al.* Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. **Biochemistry**, v. 44, n. 46, p. 15150–15158, 2005.
- ESSMANN, U. *et al.* A smooth particle mesh ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995.
- FEUGIER, P. *et al.* Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 18, p. 4117–4126, 2005.
- GOEDE, V.; KLEIN, C.; STILGENBAUER, S. Obinutuzumab (GA101) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and other B-cell non-hodgkin's lymphomas: a glycoengineered type II CD20 antibody. **Oncology research and treatment**, v. 38, n. 4, p. 185–192, 2015.
- GOLAY, J. *et al.* Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3482–3491, 2013.
- GORDON, J. C. *et al.* H++: A server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, 2005.
- GUEX, N.; PEITSCH, M. C. Swiss-model and the swiss-pdb viewer: An environment for comparative protein modeling. **ELECTROPHORESIS**, v. 18, n. 15, p. 2714–2723, 1997.

- GUPTA, N.; DEFARANCO, A. L. Lipid rafts and B cell signaling. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 18, n. 5, p. 616–626, 2007.
- HABERMANN, T. M. *et al.* Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 19, p. 3121–3127, 2006.
- HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 9, p. 946–965, 2017.
- HALLEK, M. *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9747, p. 1164 – 1174, 2010.
- HERTER, S. *et al.* Preclinical Activity of the Type II CD20 Antibody GA101 (Obinutuzumab) Compared with Rituximab and Ofatumumab In Vitro and in Xenograft Models. **Molecular Cancer Therapeutics**, American Association for Cancer Research, v. 12, n. 10, p. 2031–2042, 2013.
- HESS, B. *et al.* LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, 1997.
- HESS, B. *et al.* GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2008.
- HOCKNEY, R.; GOEL, S.; EASTWOOD, J. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148 – 158, 1974.
- HOFFMAN-LA ROCHE. **CLL11: A Study of Obinutuzumab (RO5072759 [GA101]) With Chlorambucil in Patients With Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia (Stage 1a)**. 2017. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01010061>>. Acesso em: 18 fev. 2018.
- HOFFMAN-LA ROCHE. **FDA approves Roche's Gazyva for previously untreated advanced follicular lymphoma**. 2018. Disponível em: <<https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2017-11-17.htm>>. Acesso em: 02 jun. 2018.
- HOFFMAN-LA ROCHE. **A Safety And Efficacy Study of Obinutuzumab Alone or in Combination With Chemotherapy in Participant With Chronic Lymphocytic Leukemia**. 2018. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01905943>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- HONEYCHURCH, J. *et al.* Antibody-induced non-apoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Blood**, v. 118, n. 15, p. 3523–3534, 2011.
- HUSTON, J. S. *et al.* Protein engineering of single-chain fv analogs and fusion proteins. In: **Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs**. [S.l.]: Academic Press, 1991, (Methods in Enzymology, v. 203). p. 46 – 88.
- IVANOV, A. *et al.* Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2143–2159, 8 2009.

- KARMALI, R. *et al.* Rituximab: a benchmark in the development of chemotherapy-free treatment strategies for follicular lymphomas. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 2, p. 332–340, 2018.
- KLEIN, C. *et al.* Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. **mAbs**, v. 5, n. 1, p. 22–33, 2013.
- LEE, H.-Z. *et al.* U.S. Food and Drug Administration Approval: Obinutuzumab in Combination with Chlorambucil for the Treatment of Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia. **Clinical Cancer Research**, American Association for Cancer Research, v. 20, n. 15, p. 3902–3907, 2014.
- LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY. **Leukemia**. 2018. Disponível em: <<https://www.lls.org/leukemia>>. Acesso em: 18 fev. 2018.
- LIM, S. H. *et al.* Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. **Blood**, v. 118, n. 9, p. 2530–2540, 2011.
- LINDAHL, E.; HESS, B.; SPOEL, D. van der. **GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis**. 2001.
- LYMPHOMA RESEARCH FOUNDATION. **About lymphoma**. 2018. Disponível em: <<http://www.lymphoma.org/site/pp.asp?c=bkLTKaOQLmK8E&b=6299689>>. Acesso em: 12 fev. 2018.
- MANN, R. B.; JAFFE, E. S.; BERARD, C. W. Malignant lymphomas—a conceptual understanding of morphologic diversity. A review. **The American journal of pathology**, v. 94, n. 1, p. 105–92, 1979.
- MÖSSNER, E. *et al.* Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell - mediated B-cell cytotoxicity. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4393–4402, 2010.
- MYERS, J.; GROTHAUS, G.; NARAYANAN, S.; ONUFRIEV, A. A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2006.
- NADLER, L. M. *et al.* A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 67, n. 1, p. 134–40, 1981.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Clinical Trials Using Obinutuzumab**. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/intervention/obinutuzumab>>. Acesso em: 02 jun. 2018.
- NIEDERFELLNER, G. *et al.* Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. **Lymphoid Neoplasia**, v. 118, n. 2, p. 358–367, 2013.
- OERS, M. H. J. V. *et al.* Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed / resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction : results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3295–3301, 2006.

OOSTENBRINK, C. *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, 2004.

PRONK, S. *et al.* Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.

SACHDEVA, M.; DHINGRA, S. Obinutuzumab: A FDA approved monoclonal antibody in the treatment of untreated chronic lymphocytic leukemia. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 5, n. 1, p. 54–57, 2015.

SAMPATH, D.; KLEIN, C.; FAIRBROTHER, W. **Combination therapy of a type ii anti-cd20 antibody with a selective bcl-2 inhibitor**. Google Patents, 2015. EP Patent App. EP20,130,767,170. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/EP2892557A1?cl=es>>.

SMITH, K. G. C.; CLATWORTHY, M. R. Fc γ RIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. **Nat Rev Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 328–343, 2014.

SPOEL, D. V. D.; LINDAHL, E.; HESS, B. *et al.* Gromacs: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

STASHENKO, P. *et al.* Characterization of a Human B Lymphocyte Specific Antigen. **Nature New Biology**, v. 246, p. 116–119, 1973.

TEDDER, T. E.; ENGEL, P. Cd20 - a regulator of cell-cycle progression of b-lymphocytes . **Immunology Today**, v. 15, n. N9, p. 450–454, 1994.

THOMPSON, P. A. *et al.* Fludarabine , cyclophosphamide , and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV- mutated chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 127, n. 3, p. 303–310, 2017.

TOBINAI, K. *et al.* A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. **Advances in Therapy**, p. 324–356, 2016.

VANOMMESLAEGHEN, K.; GUVENCH, O.; MACKERELL, A. D. Molecular Mechanics. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 20, p. 3281–3292, 2015.

WANG, S.-Y.; WEINER, G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 6, p. 759–768, 2008.

WHITLOW, M. *et al.* An improved linker for single-chain fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 6, n. 8, p. 989–995, 1993.