



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

NATÁLIA FERNANDES FROTA

**INTERAÇÃO DO SCFV DO ANTICORPO ALEMTUZUMAB COM O RECEPTOR
DE MEMBRANA CD52: UM ESTUDO VIA DINÂMICA MOLECULAR**

FORTALEZA

2017

NATÁLIA FERNANDES FROTA

INTERAÇÃO DO SCFV DO ANTICORPO ALEMTUZUMAB COM O RECEPTOR DE
MEMBRANA CD52: UM ESTUDO VIA DINÂMICA MOLECULAR

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Marcos Roberto Lourenzoni

FORTALEZA

2017

NATÁLIA FERNANDES FROTA

INTERAÇÃO DO SCFV DO ANTICORPO ALEMTUZUMAB COM O RECEPTOR DE
MEMBRANA CD52: UM ESTUDO VIA DINÂMICA MOLECULAR

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

A Deus.

À minha família, ao meu noivo e aos meus
amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus**, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho e dar-me forças para superar obstáculos diários.

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**, pela paciência, pelos inestimáveis ensinamentos e excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora **André Luis Coelho da Silva** e **Gilvan Pessoa Furtado** pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Dr. **Marcela Helena Gambim Fonseca**, pela prontidão em aceitar o convite para participar da banca examinadora na qualidade de suplente.

Aos meus queridos **professores do curso de Biotecnologia**, da Universidade Federal do Ceará, que tanto contribuíram para minha formação.

À Universidade Federal do Ceara, minha casa acadêmica, a qual sou grata por tudo.

Aos meus pais, **Denise e Ronaldo**, e a meu irmão **Rhonaldo** por todo o incentivo, apoio e por sempre acreditarem que eu era capaz.

Ao meu noivo, **Nilton**, pelo carinho, amor e apoio moral nas horas mais difíceis.

Aos colegas de trabalho **Alison Rebouças** e **Ana Virgínia** por deixarem o ambiente de trabalho mais descontraído e por sempre estarem dispostos a ajudar quando requisitados.

Ao **Gilmar Ferreira da Costa**, por ser sempre tão prestativo e por me ajudar a resolver os problemas que apareceram ao longo do caminho.

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

Aos meus **amigos do intercâmbio**, por fazerem eu me sentir em casa, mesmo estando em outro país, e por estarem ao meu lado, vivenciando as melhores experiências que já tive.

A todos os **meus familiares**, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos os **meus amigos irmãos**, por estarem presentes em muitos momentos da minha vida e por serem pessoas companheiras sempre que preciso.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”, Marthin Luther King.

RESUMO

O anticorpo Alemtuzumab reconhece a molécula CD52 superexpressa na membrana de células de linfomas e também em linfócitos B e T. O entendimento de como ocorre a ligação entre o CD52 e o Alemtuzumab é crucial para propor mutações e engendrar *biobetters* com maior afinidade e especificidade. Uma estratégia para engenharia de anticorpos é trabalhar com seus fragmentos, envolvendo os domínios variáveis do anticorpo (VH e VL) que reconhecem o CD52. Monitorando as interações entre resíduos das regiões determinantes de complementariedade (CDRs) do anticorpo e o CD52, pode-se propor mutações que resultam, por exemplo, em maior afinidade e especificidade ao CD52. Esse trabalho objetivou estudar, através de Dinâmica Molecular (DM), os determinantes estruturais e energéticos envolvidos na formação da interface entre um fragmento de anticorpo do tipo *single chain variable fragment* (scFv) do anticorpo Alemtuzumab e o CD52 em sistemas com modelos de membrana celular, bicamada de DMPC e modelo simplificado de *n*-hexano. O scFv foi submetido à simulação de DM em sistemas eletricamente neutros, com adição de íons Cl⁻, compostos por moléculas de água, modelo SPC (*single point charge*), uma molécula de CD52, formada por um peptídeo com 12 aminoácidos e uma âncora de GPI, inserida em uma bicamada de DMPC ou em *n*-hexano. A estabilidade estrutural das moléculas em estudo foi determinada através do desvio médio da raiz quadrada (RMSD). O potencial de interação intermolecular (PII) entre os resíduos do scFv e os do peptídeo do CD52 e entre o scFv e o GPI foram medidos ao longo das simulações, utilizando programa *in-house*. Observou-se uma mudança da posição relativa de VH-VL do scFv simulado em água, com manutenção de VH e VL. A estrutura do CD52 se estabilizou nas simulações de DM. Os resíduos do scFv que apresentaram PII mais atrativos aos resíduos do peptídeo foram os carregados positivamente, presentes nas CDR H2, L1 e L3 nos dois sistemas analisados. Os que interagiram atrativamente com o GPI foram da CDR H2, nos dois sistemas, e também da L1 no sistema com *n*-hexano. A interface *n*-hexano/água realçou a interação do scFv com o GPI. Isso possibilitou identificar resíduos da CDR L1, que interagem com o GPI, que não haviam sido observados no sistema com o DMPC. A análise da interação scFv-CD52 permitiu a sugestão de mutações sítio-dirigidas para realçar a afinidade e especificidade do anticorpo Alemtuzumab.

Palavras-chave: scFv, CD52, Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

The Alemtuzumab antibody recognizes the CD52 molecule overexpressed on lymphoma's and on B and T lymphocytes' cells membrane. The understanding of the interaction between the CD52 and Alemtuzumab is crucial to propose mutations and engineer biobetters with greater affinity and specificity. A strategy for antibody engineering is working with the antibody's fragments, involving the variable domains (VH and VL) that are responsible for antigen recognition. Mutations that result in greater affinity and specificity can be suggested by monitoring the interactions between residues of the Alemtuzumab's complementarity determining regions (CDRs) and CD52. This work aimed to study, through Molecular Dynamics (MD) simulation, the structural and energetic determinants involved in the formation of the interface between the Alemtuzumab's single chain variable fragment (scFv) and the CD52. Two systems with different cell membrane models, DMPC bilayer and n-hexane were analysed. The scFv was submitted to the DM in electrically neutral simulation systems, with addition of Cl⁻ ions. The systems were composed of water molecules (SPC model), CD52, scFv and DMPC or n-hexane. The CD52, comprised of a peptide with 12 amino acids and a GPI anchor, was inserted into a DMPC bilayer or into n-hexane. The molecules structural stability was determined by the root mean square deviation (RMSD). The intermolecular interaction potential (IIP) between scFv residues and the CD52's peptide and between the scFv and the GPI were measured along the simulation, using in-house program. There is a relative position change between the scFv VH-VL in water, with the VH and VL maintenance. The CD52 structure stabilizes in the DM simulations. The scFv residues that feature attractive IIP for the peptide residues are positively charged, located in the CDR H2, L1 and L3 in both systems. The ones interacting attractively with the GPI are from the CDR H2, in both systems, and also of L1 in the system with n-hexane. The n-hexane/water interface enhanced scFv interaction with the GPI. This made it possible to identify CDR L1 residues interacting with the GPI which had not been observed in the system with the DMPC. The analysis of scFv-CD52 interaction enabled the site-directed mutations suggestions to enhance Alemtuzumab's affinity and specificity.

Keywords: scFv, CD52, Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama representando o CD52, destacando seu epítipo reconhecido pelo anticorpo Alemtuzumab, a âncora de GPI e o glicano ligado ao resíduo Asn 3 de seu peptídeo.	21
Figura 2 - Representação da estrutura do CD52 não glicosilado.....	22
Figura 3 - Estrutura tridimensional do anticorpo, em formato de Y. Cada esfera representa um resíduo de aminoácido. Azul: cadeias leves e cinza: cadeias pesadas.	23
Figura 4 - A) Estrutura tridimensional de um anticorpo monoclonal. Em evidência fragmentos Fab e Fv. B) Representação esquemática de um anticorpo monoclonal, destacando as regiões CDRs e framework.	25
Figura 5- Representação da estrutura cristalográfica do Fab (PDB 1CE1) em cartoon do anticorpo Alemtuzumab cocrystalizado com um mimotopo em stick do peptídeo do CD52. Rosa: cadeia pesada, azul: cadeia leve e preto: mimotopo. Destaque para a região de interação entre as CDRs do Alemtuzumab e o mimotopo.	26
Figura 6 - Estrutura do scfv representada em cartoon, destacando as regiões CDRs. H1: verde; H2: rosa; H3: laranja; L1: azul; L2: marrom e L3: vermelho.	33
Figura 7 - Estrutura ampliada do CD52. Verde: peptídeo em stick, vermelho: domínio açúcar em esfera e fosfoetanolamina em stick e branco: cadeia lipídica do GPI.....	35
Figura 8 - Curvas de RMSD dos C_{α} das porções do scFv em água ao longo do tempo de simulação. Preto: RMSD do linker (sobreposição e RMSD do linker); vermelho: RMSD do VH-VL (sobreposição e RMSD de VH e VL sem o linker); verde: RMSD de VH (sobreposição e RMSD de VH) e azul: RMSD de VL (sobreposição e RMSD de VL).....	37
Figura 9 – Configurações das estruturas de VL representadas em <i>cartoon</i> em 12 (azul) e 100 (verde) ns de simulação. Em laranja estão os domínios VH das duas configurações sobrepostos.	38
Figura 10- Curvas de RMSD dos C_{α} do peptídeo (resíduos 1-12), do pept-8 (resíduos de 1 a 8) e do epítipo (resíduos 9-12) do CD52 pelo tempo de simulação. Preto: RMSD do peptídeo do CD52, verde: RMSD do pept-8 e vermelho: RMSD apenas do epítipo.	39
Figura 11 – A) Curvas de RMSD dos C_{α} do peptídeo com sobreposição apenas do epítipo	

(pept-8), do epítopo (sobreposição e RMSD do epítopo), do peptídeo (sobreposição e RMSD do peptídeo) e dos átomos do GPI (sobreposição e RMSD do GPI) do CD52. B) RMSD dos C_{α} do <i>linker</i> (sobreposição e RMSD do <i>linker</i>), do VH-VL (sobreposição e RMSD de VH e VL sem o <i>linker</i>), do VH (sobreposição e RMSD de VH) e do VL (sobreposição e RMSD de VL).....	41
Figura 12 – Representação em sticks das cadeias principais das configurações do peptídeo do CD52 em 133 (verde) e 134 ns (azul) de simulação. Dentro do quadro, em destaque os resíduos do epítopo. Os demais resíduos pertencentes ao pept-8, fora do quadro.	42
Figura 13 – Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e a membrana de DMPC. $r_{cut} = 1,3$ nm.	43
Figura 14 - Estrutura ampliada do scFv em cartoon interagindo com o CD52 inserido em DMPC. Cinza: DMPC; amarelo: scFv; verde: peptídeo em stick; vermelho: açúcar e fosfoetanolamina em esfera e branco: cadeia lipídica em esfera.....	43
Figura 15 - Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e os átomos dos componentes do CD52 em DMPC. $r_{cut} = 1,3$ nm.....	44
Figura 16 - A) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com o peptídeo do CD52 inserido em bicamada de DMPC com $r_{cut} = 0,5$ nm. B) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com a âncora de GPI. Os retângulos coloridos delimitam as regiões CDRs. Verde: H1; rosa: H2; laranja: H3; roxo: L1 e vermelho: L3.	46
Figura 17 – Representação em <i>cartoon</i> da interface de interação scFv-CD52, evidenciando a interação do resíduo Lys56 em <i>stick</i> da CDR H2 (rosa) do scFv com os resíduos Ser10 e Ser12 em <i>stick</i> do epítopo do CD52.	47
Figura 18 – Representação da interface de interação scFv-CD52, evidenciando em stick resíduos da CDR H2 que interagem com o GPI do CD52. Cinza: scFv; rosa: H2; vermelho: açúcar e fosfoetanolamina do GPI em dots e branco: cadeia lipídica do GPI em esfera.	47
Figura 19 - Potencial de interação de cada resíduo do peptídeo do CD52 com o scFv em DMPC, em um $r_{cut} = 0,5$ nm.	48
Figura 20 - A) Curvas de RMSD dos C_{α} do peptídeo com sobreposição apenas do epítopo (pept-8), do epítopo (sobreposição e RMSD do epítopo), do peptídeo (sobreposição e RMSD do peptídeo) e dos átomos do GPI (sobreposição e RMSD do GPI) do CD52. B) RMSD dos C_{α} do <i>linker</i> (sobreposição e RMSD do <i>linker</i>), do VH-VL (sobreposição e RMSD de VH e	

VL sem o <i>linker</i>), do VH (sobreposição e RMSD de VH) e do VL (sobreposição e RMSD de VL).....	49
Figura 21 – Representação em <i>sticks</i> das cadeias principais das configurações do peptídeo do CD52 em 38 (verde), 118 (azul claro), 198 (roxo) e 260 ns (amarelo) de simulação. Dentro do quadro, em destaque os resíduos do epítipo sobrepostos. Os demais resíduos pertencentes ao pept-8, fora do quadro.....	51
Figura 22 – Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e o <i>n</i> -hexano. <i>rcut</i> = 1,3 nm.....	52
Figura 23 - Estrutura ampliada do scFv em <i>cartoon</i> interagindo com CD52 em <i>n</i> -hexano. Cinza: <i>n</i> -hexano; amarelo: scFv; verde: peptídeo em <i>stick</i> ; vermelho: açúcar e fosfoetanolamina do GPI em esfera e branco: camada lipídica do GPI em esfera.....	52
Figura 24 - Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e os átomos dos componentes do CD52 em interface <i>n</i> -hexano/água. <i>rcut</i> = 1,3 nm.	53
Figura 25 - A) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com o peptídeo do CD52 inserido em <i>n</i> -hexano com <i>rcut</i> = 0,5 nm. B) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com a âncora de GPI. Os retângulos coloridos delimitam as regiões CDRs. Verde: H1; rosa: H2; laranja: H3; roxo: L1 e vermelho: L3.....	55
Figura 26 - Representação em <i>cartoon</i> da interface de interação scFv-CD52, evidenciando a interação dos resíduos Lys54 e Lys56 em <i>stick</i> da CDR H2 (rosa) do scFv com os resíduos Asp3, Asp4 e Thr5 e Ser12 em <i>stick</i> do peptídeo (bege) do CD52.	56
Figura 27 - Representação da interface de interação scFv-CD52, evidenciando resíduos das CDRs que interagem com o GPI do CD52. Cinza: scFv; rosa: H2; azul: L1; vermelho: açúcar do GPI e branco: cadeia lipídica do GPI.....	56
Figura 28 - Potencial de interação de cada resíduo do peptídeo do CD52 com o scFv em interface <i>n</i> -hexano/água, em um <i>rcut</i> = 0,5 nm.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequências de aminoácidos dos domínios variáveis do anticorpo Alemtuzumab e do linker que compõem o scFv e do peptídeo e epítipo do CD52 com a respectiva numeração dos resíduos e dos átomos de acordo com o arquivo do sistema em formato PDB submetido à simulação de DM. 32

Quadro 2 - Numeração dos resíduos e sequência de aminoácidos das CDRs do anticorpo Alemtuzumab de acordo com o arquivo PDB 1CE1 submetido à simulação de DM. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de média e desvio de RMSD para cada região do scFv, VH-VL, VH, VL e linker, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}).	38
Tabela 2 - Dados de média e desvio de RMSD para o peptídeo e o epítopo do CD52, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}).	39
Tabela 3 - Média e desvio de RMSD, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para o peptídeo, o epítopo e o GPI do CD52 e para VH-VL, VH, VL e o linker.	40
Tabela 4 – PII médios e desvios, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para a interação entre os componentes do CD52 (epítopo, pept-8, peptídeo e GPI) e o scFv.	45
Tabela 5 - Média e desvio de RMSD, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para o peptídeo, o epítopo e o GPI do CD52 e para VH-VL, VH, VL e o linker do scFv.....	50
Tabela 6 – PII médios e desvios, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para a interação entre os componentes do CD52 (epítopo, pept-8, peptídeo e GPI) e o scFv.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
CD52	<i>Cluster of Differentiation 52</i>
CDR	Regiões Determinantes de Complementariedade
CH	Domínio Constante da Cadeia Pesada
CL	Domínio Constante da Cadeia Leve
CLL	Leucemia Linfocítica Crônica
DQMD	Desvio Quadrático Médio
DM	Dinâmica Molecular
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
EM	Esclerose Múltipla
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
Fc	Fragmento cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz/CE	Fundação Oswaldo Cruz/Ceará
Fv	Fragmento variável
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulation</i>
Kcal	Quilocaloria
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
mAb	Anticorpo monoclonal
Nm	Nanômetro
NPT	Número de partículas, Pressão e Temperatura
Ns	Nanossegundo
NVT	Número de partículas, Volume e Temperatura
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PII	Potencial de Interação Intermolecular
Rcut	Raio de Corte
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única
SPC	<i>Single point charge</i>
SUS	Sistema Único de Saúde

VH	Domínio Variável da Cadeia Pesada
VL	Domínio Variável da Cadeia Leve

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
δ	Delta
ε	Épsilon
γ	Gama
κ	Capa
\pm	Mais-menos
μ	Mi
λ	Lambda
σ	Sigma
θ	Teta
%	Porcentagem
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Esclerose Múltipla	19
1.2 Receptor CD52	20
1.3 Anticorpos	22
1.3.1 Fragmentos	24
1.3.2 Alemtuzumab	25
1.4 Simulação de Dinâmica Molecular	27
1.5 Justificativa	28
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	30
3 METODOLOGIA	30
3.1 Modelagem e simulação de Dinâmica Molecular do scFv	31
3.2 Modelagem e DM do CD52 inserido em bicamada de DMPC	34
3.3 Simulação do sistema - scFv, CD52 e membrana de DMPC em água	35
3.4 Simulação do sistema scFv, CD52 inserido em um sistema misto de solventes que formam duas fases <i>n</i>-hexano/água	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Modelagem e simulação de Dinâmica Molecular do scFv	36
4.2 Modelagem e DM do CD52 inserido em bicamada de DMPC	39
4.3 Simulação do sistema - scFv, CD52 e membrana de DMPC em água	40
4.4 Simulação do sistema scFv, CD52 inserido em um sistema misto de solventes que formam duas fases <i>n</i>-hexano/água	48
5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune crônica e degenerativa que afeta o cérebro, nervos ópticos e a medula espinhal (sistema nervoso central - SNC). O sistema imune próprio destrói células saudáveis da bainha de mielina que recobre os nervos, resultando na neurodegeneração progressiva do sistema nervoso central em indivíduos geneticamente suscetíveis (NYLANDER; HAFLER, 2012). Os pacientes apresentam, muitas vezes, uma síndrome inicial clinicamente isolada, seguida por uma série de eventos clínicos subagudos que reduzem espontaneamente, o que caracteriza a esclerose múltipla reincidente-remitente (EMRR) (HAFLER, 2004). Os danos à mielina interrompem a comunicação entre o cérebro, medula espinhal e outras áreas do sistema nervoso central, o que pode resultar na deterioração dos próprios nervos, em um processo potencialmente irreversível. Ao longo do tempo, a degeneração da mielina vai causando lesões no cérebro, que podem levar à atrofia ou perda de massa cerebral. As lesões são provavelmente causadas pelo tráfego de células T mielina-reativa ativadas no SNC, causando inflamação aguda com edema associado (HAFLER, 2004).

Os sintomas da EM variam de acordo com o local da lesão neurológica, com a quantidade de danos e de nervos afetados. Geralmente, estão relacionados à invasão de células inflamatórias através da barreira de proteção do cérebro, resultando na desmielinização e edemas. Pessoas com casos graves de EM podem perder a capacidade de andar ou falar. A EM pode ser de difícil diagnóstico nos estágios iniciais, pois os sintomas aparecem com intervalos e o paciente pode ficar meses ou anos sem qualquer sinal da doença, apesar de sua intervenção em etapas iniciais tornar possível reduzir a progressão da doença (NYLANDER; HAFLER, 2012).

A EM atinge cerca de 2,3 milhões de pessoas no mundo (BROWNE *et al.*, 2014). É uma doença que não tem cura, mas existem tratamentos que ajudam a controlar os sintomas e a reduzir o progresso da doença. Atualmente, no Brasil, já existem diversas opções de tratamento fornecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como betainterferons, acetato de glatirâmer, fingolimode e o anticorpo monoclonal Natalizumab (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O anticorpo monoclonal Alemtuzumab (CAMPATH-1H®) foi utilizado como terapia de primeira linha para a leucemia linfocítica crônica (LLC) (FRAMPTON; WAGSTAFF, 2003) durante seis anos. A patente expirou em 2013, mas esse anticorpo foi relançado no

mercado com o nome de LEMTRADA[®] (WILLIAMS *et al.*, 2013; JONES; COLES, 2014), agora para tratamento da esclerose múltipla recorrente-remitente (EMRR), com preço sete vezes maior que para o tratamento de LLC. Apesar de aprovado pela ANVISA para uso no Brasil, ainda não está disponível pelo SUS.

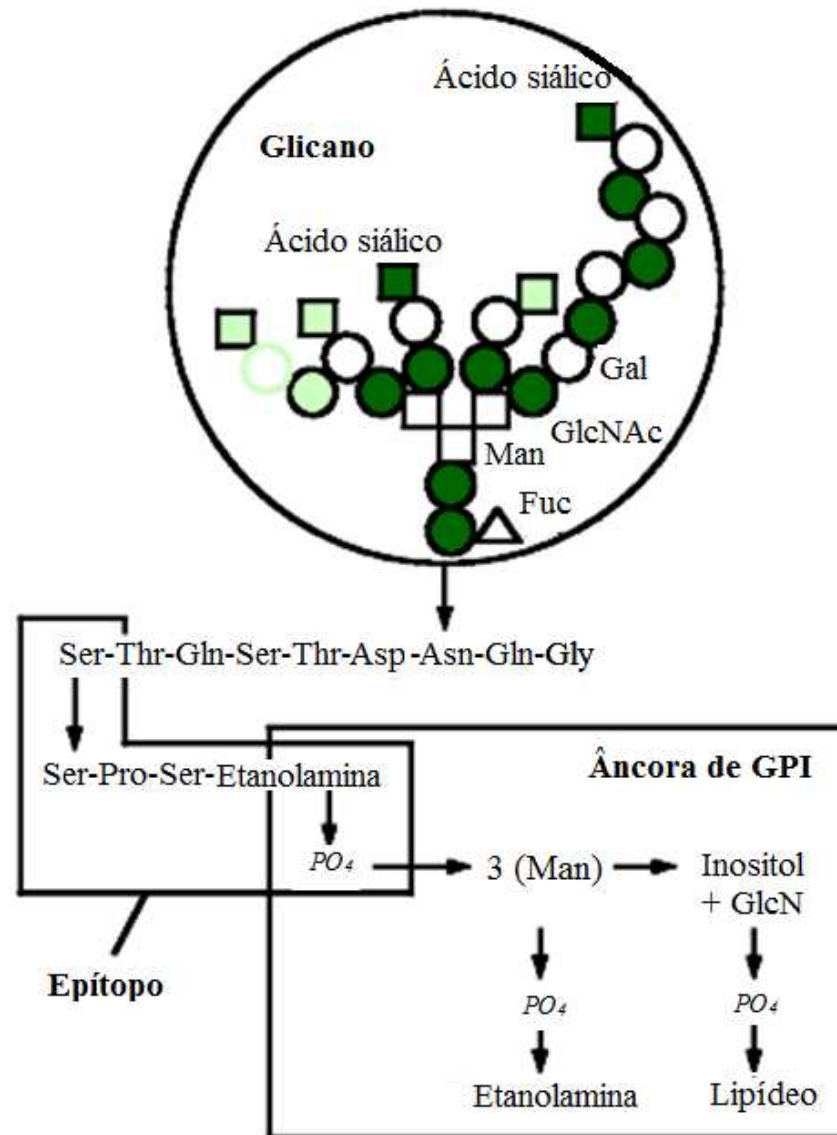
O anticorpo Alemtuzumab é uma molécula semelhante às nossas moléculas de defesa e reconhece alvos específicos presentes na membrana celular, podendo assim reconhecer linfócitos autorreativos que afetam o sistema nervoso central próprio de forma específica, o que o caracteriza como um terapêutico eficaz para EM (GARNOCK-JONES, 2014; MARTIN *et al.*, 2016). A ingestão desse anticorpo é feita via intravenosa, sendo cinco infusões em cinco dias consecutivos no primeiro ciclo e, no segundo ciclo, três infusões em três dias consecutivos após um ano do primeiro ciclo (HARTUNG *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do Alemtuzumab contra EM não está totalmente explicado. No entanto, são sugeridos efeitos imunomoduladores através da eliminação e repopulação de linfócitos, por meio de alterações no número, proporções e propriedades de alguns subconjuntos de linfócitos pós-tratamento e do aumento da quantidade de linfócitos de memória T e B (COHEN *et al.*, 2012). A redução no nível de células B e T em circulação pela ação do Alemtuzumab, e subsequente repopulação desses linfócitos pós-tratamento, pode reduzir a reincidência de sintomas e, conseqüentemente, reduzir a progressão da doença.

1.2 Receptor CD52

O CD52 é uma glicoproteína com 21 – 28 KDa (XIA, M. Q. *et al.*, 1993b) (figura 1) constituída de um peptídeo formado por 12 aminoácidos (GQNDTSQTSSPS), com um carboidrato ligado ao resíduo Asn3, ligados pelo resíduo Ser12 a uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (HALE, 1995; TREUMANN *et al.*, 1995). O CD52 é expresso em altas proporções em células de linfoma (HALE *et al.*, 1988), também é expresso na membrana de células do sistema imune humano (linfócitos B e T, monócitos e macrófagos) e do sistema reprodutor (células do epidídimo) (ERMINI *et al.*, 2005). A interação entre o CD52 e os anticorpos CAMPATH-1G e CAMPATH-1H provoca a morte celular por meio da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e da lise celular mediada pelo complemento (CDC) (HALE *et al.*, 1988; DYER *et al.*, 1989; XIA *et al.*, 1993; HU *et al.*, 2009).

Figura 1 - Diagrama representando o CD52, destacando seu epítipo reconhecido pelo anticorpo Alemtuzumab, a âncora de GPI e o glicano ligado ao resíduo Asn 3 de seu peptídeo.

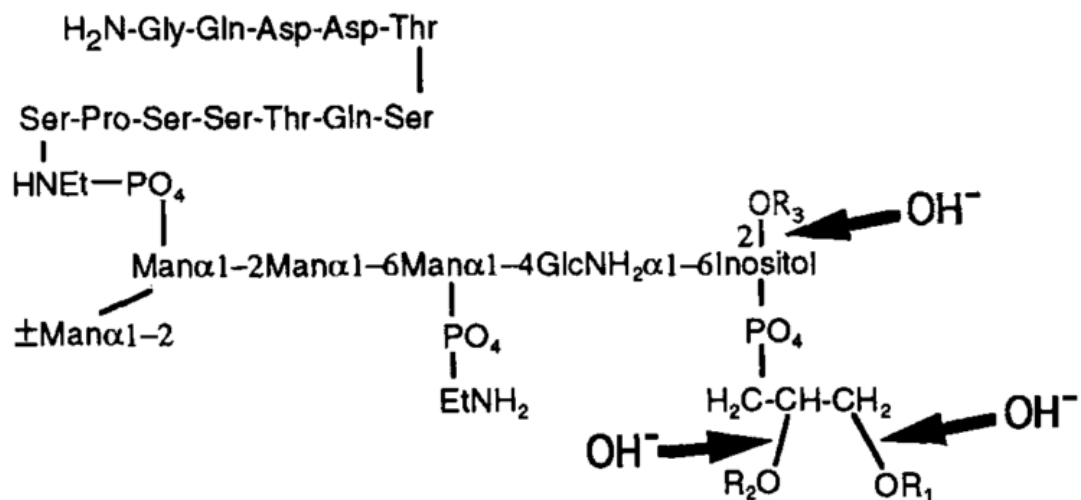


Fonte: adaptada de HALE, 2001.

O epítipo antigênico, localizado próximo à membrana celular, é encontrado na extremidade C-terminal do peptídeo que compõe o CD52 e é constituído pelos resíduos SSPS (HALE, 2001). A característica responsável pelo CD52 ser um bom alvo para lise celular mediada pelo complemento (CDC) não é a presença do açúcar N-ligado ao resíduo Asn3 ou dos nove primeiros aminoácidos do peptídeo, mas está relacionada à proximidade do epítipo (SSPS) à membrana celular (XIA *et al.*, 1993a; XIA *et al.*, 1993b). O CD52 não glicosilado (figura 2) com ~ 6 KDa foi obtido a partir da digestão com N-glicanase do carboidrato ligado ao resíduo Asn 3. A digestão resultou na mutação Asn-Asp na sequência do peptídeo, mas sem

a perda da antigenicidade (XIA *et al.*, 1991). O CD52 não glicosilado possui um menor custo de Simulação de Dinâmica Molecular (DM) que o N-glicosilado por ter um menor número de átomos e necessitar de um menor tempo de simulação.

Figura 2 - Representação da estrutura do CD52 não glicosilado.



Fonte: TREUMANN, 1995.

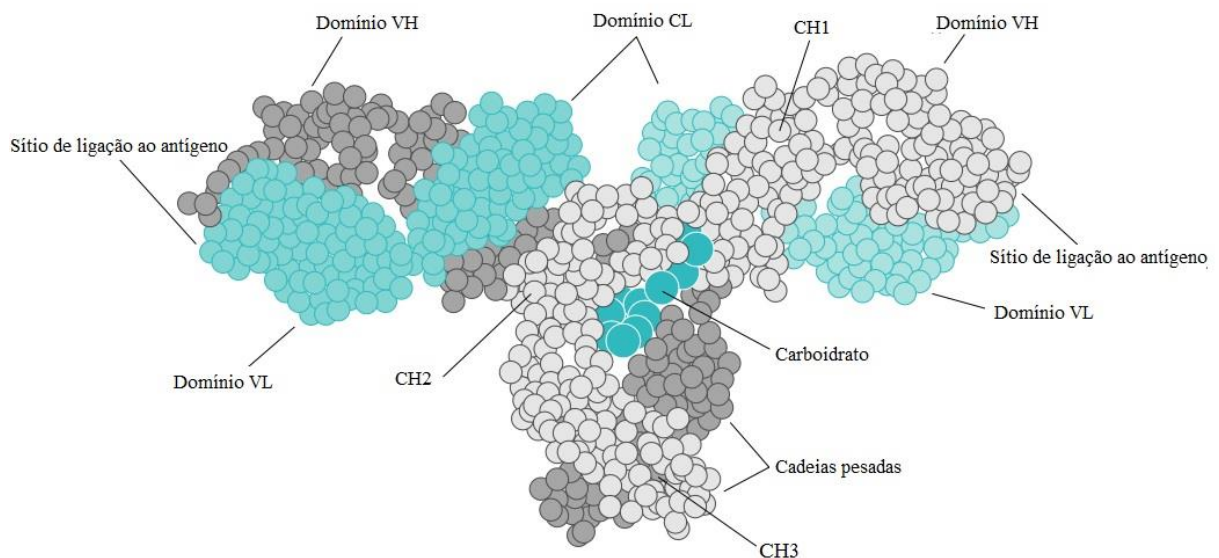
A função natural do CD52 em células do sistema imune não está completamente esclarecida; no entanto, tem sido observada sua relação com a ativação de células T humanas por indução de eventos similares à fosforilação intracelular do aminoácido tirosina como empregado na sinalização mediada por receptores de células T (HEDERER *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrado que o CD52 pode servir como um coestimulador envolvido na indução de células T CD4⁺ reguladoras (WATANABE *et al.*, 2006).

1.3 Anticorpos

Imunoglobulinas humanas (anticorpos) são um grupo de glicoproteínas estrutural e funcionalmente similares que conferem imunidade a seres humanos. A estrutura geral de um anticorpo consiste de uma molécula bifuncional (figura 3), que compreende, de um lado, dois sítios de ligação ao antígeno (*antigen binding fragment*, Fab), e um sítio efetor (*crystallized fragment*, Fc) do outro lado (ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILAI, 2012). Todas as moléculas de anticorpos possuem as mesmas características estruturais básicas, mas apresentam uma grande variedade nas regiões que se ligam aos antígenos. Essas moléculas são constituídas de quatro cadeias, sendo duas cadeias leves idênticas (isotipos κ ou λ) e duas

cadeias pesadas idênticas (isotipos γ , ϵ , δ , α , ou μ). Ambas as cadeias são compostas de múltiplas variantes que apresentam um domínio básico de cerca de 110 resíduos de aminoácidos. A cadeia leve é formada por dois destes domínios, chamados de domínio variável (V_L) e constante (C_L), devido à variabilidade da sequência de aminoácidos. As cadeias pesadas contêm um domínio variável (V_H) e três ou quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}), dependendo do isotipo da cadeia pesada (ALBERTS *et al.*, 1989). Cada domínio é formado pelo empacotamento, face a face, de duas folhas β , unidas por pontes dissulfeto conservadas e pela interação entre as fitas dos loops (CHOTHIA; LESK, 1987). Pontes dissulfeto intracadeias estabilizam domínios de ligações dissulfeto intercadeias dobráveis e estabilizam a interação entre as cadeias pesada e leve e entre as pesadas.

Figura 3 - Estrutura tridimensional do anticorpo, em formato de Y. Cada esfera representa um resíduo de aminoácido. Azul: cadeias leves e cinza: cadeias pesadas.



Fonte: adaptada pelo autor de (ELGERT, 1998).

Os sítios de ligação ao antígeno da maioria dos anticorpos são formados, primariamente, por seis loops ou regiões determinantes de complementariedade (CDRs), sendo três no domínio VL (CDR L1, L2 e L3) e três no domínio VH (CDR H1, H2 e H3), enquanto que as outras regiões dos domínios variáveis, que não compõem os loops, são ditas “*framework*” (HOLLIGER; HUDSON, 2005; NELSON; REICHERT, 2009). Essas regiões são altamente conservadas, tanto em sequência quanto na conformação da cadeia principal, podendo, desta forma, ser modeladas com técnicas padrão de modelagem por homologia (MOREA *et al.*, 1998).

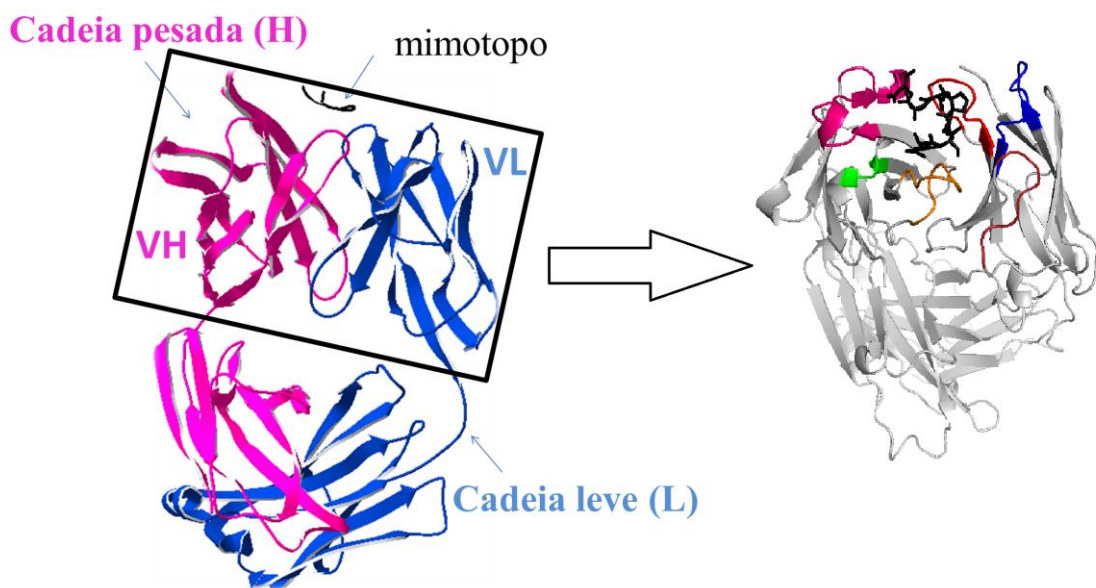
1.3.1 Fragmentos

Anticorpos apresentam uma limitada digestão proteolítica, o que permite obter fragmentos menores, contendo somente um subconjunto dos domínios do anticorpo, que mantêm a habilidade de ligação ao antígeno (Fab, F(ab')₂, Fv, scFv) ou funções efetoras (Fc, hinge).

Os fragmentos variáveis de cadeia única (*single chain fragmente variable*, scFv) são formados pelos domínios VH e VL (Fv) ligados por um polipeptídeo flexível (*linker*) (AHMAD *et al.*, 2012), que previne a dissociação (MOHAMMADI, M.; NEJATOLLAHI, 2014). Os fragmentos do tipo Fab e scFv (figura 4A) contêm ambos os domínios VH e VL e, geralmente, retêm a afinidade específica do IgG parental de forma monovalente. O scFv possui simultaneamente uma melhor capacidade farmacocinética de penetração em tecidos e demanda menor custo computacional durante a simulação de Dinâmica Molecular (DM) (KANDA; WATANABE, 1996; HOLLIGER; HUDSON, 2005; NELSON; REICHERT, 2009). Além disso, esse fragmento mantém a região de ligação do anticorpo ao antígeno e possui a mesma especificidade e afinidade do anticorpo monoclonal (WANG; DUAN, 2011). A figura 4B evidência a representação das regiões determinantes de complementariedade (CDRs), responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, e as regiões *framework* de um anticorpo monoclonal (SELA-CULANG *et al.*, 2013).

A estrutura cristalográfica do fragmento do tipo Fab do anticorpo Alemtuzumab cocristalizado com um composto análogo ao peptídeo do CD52 (mimotopo) já foi determinada (figura 5) (JAMES *et al.*, 1999). O que possibilitou determinar que, diferente da maioria dos anticorpos, a CDR L3 e a CDR H2 do Alemtuzumab possuem uma maior contribuição na ligação ao antígeno que a CDR H3 (JAMES *et al.*, 1999).

Figura 5- Representação da estrutura cristalográfica do Fab (PDB 1CE1) em *cartoon* do anticorpo Alemtuzumab cocristalizado com um mimotopo em *stick* do peptídeo do CD52. Rosa: cadeia pesada, azul: cadeia leve e preto: mimotopo. Destaque para a região de interação entre as CDRs do Alemtuzumab e o mimotopo.



Fonte: adaptada do RCSB PDB <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1ce1>>, 2016.

A simulação de dinâmica Molecular (DM) permite estudar a estabilidade de anticorpos ou fragmentos de anticorpos em solução ou analisar a interação dessas moléculas com antígenos, por exemplo. Essa técnica já foi utilizada para se entender a estabilidade térmica do scFv do anticorpo anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em detalhes atômicos, por meio da análise dos fatores estruturais que estão envolvidos na estabilidade desse fragmento (WANG; DUAN, 2011). A DM também já foi utilizada para analisar a integridade e a estabilidade de novos modelos de scFv, em que o *linker* polipeptídico (GGGG)_n foi substituído por *tags*, como *E-tag*, *His-Tag* e *C-myc*, eliminando a necessidade de se utilizar uma *tag* adicional para a purificação e detecção do scFv (MOHAMMADI *et al.*, 2016). A DM foi utilizada também para se conhecer como ocorre a interação anticorpo-antígeno e para projetar novas drogas semelhantes a anticorpos. Como no trabalho de Karim e colaboradores (KARIM *et al.*, 2015), em que foi possível realizar previsões teóricas do local

de interação mais favorável entre o scFv do anticorpo anti-p24 e uma variante do epítopo da proteína p-24 do capsídeo do HIV-1.

1.4 Simulação de Dinâmica Molecular

A simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma ferramenta essencial para o entendimento da relação entre a estrutura e a função de moléculas biológicas. Essa técnica considera uma molécula como um modelo dinâmico em que as movimentações internas e as mudanças conformacionais de um conjunto de átomos são essenciais para a determinação de sua função (KARPLUS; MCCAMMON, 2002). A partir dos detalhes atomísticos fornecidos pela simulação de DM, é possível acessar informações detalhadas sobre a estrutura tridimensional de uma proteína em equilíbrio com um solvente ou interagindo com um substrato, por exemplo (HANSSON *et al.*, 2002).

As simulações de DM podem facilitar a interpretação de dados experimentais, por meio do teste de modelos propostos para descrever fenômenos naturais, resultando em dados que são difíceis ou impossíveis de se obter experimentalmente (HOSPITAL *et al.*, 2015). Além disso, a DM acessa detalhes atomísticos e descreve movimentos moleculares que as técnicas de cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear, espalhamento de nêutrons e espectroscopia de fluorescência não alcançam (VAN GUNSTEREN *et al.*, 2008).

As interações entre átomos e moléculas são empiricamente descritas como uma função do potencial, da qual derivam as forças que atuam sobre cada partícula. Com o conhecimento dessas forças, é possível calcular a dinâmica dos átomos no sistema usando as equações de movimento de Newton. A função do potencial consiste de um conjunto de equações que descrevem empiricamente as interações entre átomos ligados e não ligados (ABRAHAM *et al.*, 2013). Esta função, juntamente com o conjunto de seus parâmetros empíricos, é referida como campo de força. Este possibilita o cálculo do potencial total, V , do sistema a partir de coordenadas atômicas espaciais e leva em consideração a interação entre átomos ligados, incluindo ângulos de ligação, torcionais e diedrais, e a interação entre átomos não ligados, como interações eletrostáticas, entre as cargas parciais de cada átomo, e interações de van der Waals, modeladas pela equação de Lennard-Jones (ALLEN; TILDESLEY, 1987)

As equações de Newton são resolvidas para cada um dos átomos. A força está relacionada com a posição do átomo em um determinado tempo. Através dessas equações, obtém-se a aceleração da partícula. Na DM, após determinada a aceleração, integra-se as equações de movimento de Newton por algoritmos como o de Verlet (VERLET, 1967), para

obter a nova posição do átomo. As posições atômicas são gravadas em arquivos de trajetória para posterior análise. As posições e a aceleração dos átomos no tempo t são utilizadas para calcular a posição no tempo anterior ($t - dt$) e a nova posição ($t + dt$). Portanto, conhecendo-se as posições iniciais para cada átomo, as novas posições podem ser calculadas após um intervalo t de tempo.

Portanto, aplicando a integração das equações de movimento sucessivamente às novas posições, obtidas em sucessivos intervalos de tempo t , é possível atingir o intervalo de tempo total e conseqüentemente obter a trajetória atômico-molecular, ao longo do tempo. A partir da trajetória obtida da simulação, podem ser realizadas análises que permitem o acesso a informações sobre a interação entre moléculas e as energias envolvidas nessa interação.

As etapas de simulação de DM são essenciais para se obter a trajetória das moléculas na caixa de simulação e realizar posteriores análises. Primeiramente, se obtém uma configuração inicial das moléculas que irão compor a caixa de simulação. Esta configuração pode ser obtida a partir de dados cristalográficos do *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000) ou a partir de programas que geram configurações iniciais para sistemas complexos como o *PACKMOL* (MARTÍNEZ *et al.*, 2009). Depois da obtenção da configuração inicial, é realizado o cálculo das forças exercidas sobre cada partícula do sistema por meio da determinação do campo de força devido às interações intermoleculares. Em seguida, é necessário realizar a minimização de energia da interação entre as moléculas do sistema para acomodá-las na caixa de simulação e evitar choques entre os átomos. Após se obter um mínimo de energia, a estrutura e a dinâmica do sistema precisam ser ajustadas para se obter o estado termodinâmico de interesse por meio da termalização ou equilíbrio do sistema. Essa etapa é controlada em *ensemble* canônico (NVT), representado por número de moléculas e volume fixos e temperatura controlada ou em *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT) (ALLEN; TILDESLEY, 1987), no qual o número de moléculas é fixo e a pressão e temperatura são controladas para convergir com os parâmetros de referência (BERENDSEN *et al.*, 1984, 1995; HUANG, 1987). Após a termalização, a caixa está pronta para ser simulada em NVT ou NPT. Por fim, são realizadas análises energéticas e estruturais das trajetórias obtidas.

1.5 Justificativa

A grande incidência de câncer e de doenças autoimunes em todo o mundo somados a falta de cura para tais enfermidades tornam o estudo de novas terapias para essas doenças de extrema importância. A obtenção de anticorpos monoclonais mais efetivos a partir do melhor

entendimento da interação entre esses anticorpos e seus alvos celulares (receptores), como receptores de membrana, é uma alternativa à terapia dessas doenças. Os anticorpos monoclonais vêm sendo cada vez mais utilizados no tratamento de doenças. O Ministério da Saúde possui grande interesse na produção desse tipo de anticorpo e de variantes com melhores características (*biobetters*) para o SUS. Portanto, a busca por uma maior compreensão dos mecanismos de reconhecimento, interação e recrutamento é cada vez mais necessária.

Além disso, o reconhecimento específico entre um receptor e um anticorpo possui um papel central na resposta imune. Portanto, o desenvolvimento de métodos confiáveis para a predição de mutações no anticorpo para realçar as interações envolvidas nos complexos receptor-anticorpo é de notória importância. Assim, estudos mais aprofundados da interação entre o scFv do anticorpo Alemtuzumab e o CD52 em modelos de membrana, promoverão uma maior compreensão das bases estruturais e energéticas, que podem ser traduzidas na ação biológica do anticorpo e na sua afinidade. Espera-se, com esses estudos, propor modificações que aumentem a afinidade e a eficácia de ligação Alemtuzumab-CD52.

Através da necessidade do conhecimento refinado da interação anticorpo-receptor em nível atômico-molecular, a simulação de DM é uma técnica robusta para prover informações estruturais e energéticas decorrentes desta interação e que possibilita propor modificações no scFv do anticorpo Alemtuzumab, a fim de melhorar, por exemplo, sua afinidade e especificidade pelo CD52. O uso desse fragmento de anticorpo possibilita propor mutações nas regiões CDRs do anticorpo, utilizando a DM com um menor custo computacional em comparação a um fragmento maior do tipo Fab ou ao anticorpo completo. A partir da validação das mutações no scFv que realçam a interação scFv-CD52, torna-se possível a reconstrução do anticorpo completo com essas mutações. Portanto, o entendimento da interação entre o CD52 e o scFv do anticorpo Alemtuzumab, por meio de DM, possibilitará a proposição de mutações no scFv que realcem a especificidade e a afinidade do anticorpo completo pelo CD52.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Construir o fragmento do tipo scFv do anticorpo Alemtuzumab e estudar a sua interação, de forma estrutural e energética via Dinâmica Molecular, com o CD52 modelado

em membrana de DMPC e em interface *n*-hexano/água, a fim de propor mutações que possam realçar a afinidade e a especificidade scFv-CD52.

2.2 Objetivos específicos

- a) Construir o scFv com base nas informações cristalográficas do fragmento Fab do Alemtuzumab (PDB 1CE1) e submeter o scFv obtido à Simulação de DM;
- b) Realizar análises estruturais e energéticas utilizando as trajetórias de DM, para verificar a estabilidade do modelo construído;
- c) Modelar o CD52 para posterior análise da sua interação com o fragmento obtido;
- d) Inserir o CD52 em membrana de DMPC e submetê-lo à Simulação de DM;
- e) Montar o sistema scFv-CD52 em bicamada de DMPC em água e em interface *n*-hexano/água e submetê-los à DM;
- f) Realizar análises estruturais e energéticas da interação scFv-CD52 a partir das trajetórias de DM obtidas.

3 METODOLOGIA

O pacote GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulation*), versão 5.1.3 (BERENDSEN *et al.*, 1995; LINDAHL; HESS, 2001; SPOEL, VAN DER *et al.*, 2005; HESS *et al.*, 2008; PRONK *et al.*, 2013; ABRAHAM *et al.*, 2015; PALL *et al.*, 2015), foi utilizado para as simulações de DM, uma vez que contém programas que preparam o sistema para submissão à simulação e programas de análises. As simulações de DM seguiram as etapas de minimização de energia, para obter a geometria otimizada; termalização e aquisição da trajetória.

Os parâmetros utilizados para termalização e simulação de todos os sistemas em estudo incluem controle de temperatura: V-rescale (BUSSI *et al.*, 2007) e pressão: Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984, 1995); integrador: md; temperatura: 310 K; raio de corte para as interações de van der Waals e coulômbicas de 1.3 nm. As correções para interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método PME (Darden *et al.* 1993). O campo de força escolhido foi o GROMOS53a6 (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). *Constraint algorithms* utilizado é o SHAKE (RYCKAERT *et al.*, 1977) que restabelece os comprimentos corretos das ligações entre átomos de moléculas após uma atualização sem restrições. Dois algoritmos

específicos, derivados do SHAKE, foram utilizados: LINCS (HESS *et al.*, 1997; HESS, 2008) para manutenção das distâncias de ligação entre átomos de proteínas e SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992), por ser mais otimizado, para modelo de água rígida, reduzindo o custo computacional.

A estabilidade das estruturas das biomoléculas em solução foi avaliada pelo programa *gmx rms*, que calcula o desvio quadrático médio (DQMD ou RMSD – *Root Mean Square Deviation*) dos átomos, após a sobreposição das estruturas, em configurações obtidas ao longo da simulação. O desvio entre as posições dos átomos dos carbonos alfa (C α) foi calculado, como mostrado na Equação 1, após a sobreposição dos C α de duas estruturas (N) com massas iguais (m), sendo t_1 a estrutura de referência e t_2 as coletadas ao longo da trajetória.

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

Onde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ e $\mathbf{r}_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t .

Os RMSD médios e os desvios são calculados a partir do momento em que se considera que a estrutura alcança o equilíbrio (t_{eq}). O programa *gmx energy* foi utilizado para obtenção dos perfis de energia configuracional, que incluem o potencial de longo alcance (eletrostático) e de curto alcance (Lennard-Jones). O potencial de interação intermolecular (PII) entre os resíduos do scFv e os do peptídeo do CD52 e entre o scFv e o GPI do CD52 também foi medido ao longo da simulação, com o objetivo de determinar quais resíduos do scFv mais contribuem para a interação com o CD52. O programa utilizado para essa análise foi desenvolvido no nosso grupo de pesquisa. A avaliação do PII de cada resíduo do scFv com o peptídeo e com o GPI do CD52 em cada sistema simulado e, vice versa, utilizou um raio de corte de 5 Å, ou seja, foram contabilizados somente os potenciais entre resíduos dentro desse raio.

O programa *Origin 6.0* foi utilizado para lançar em gráfico os dados obtidos das análises da trajetória. As figuras foram geradas utilizando o software *Pymol 1.7.4* (DeLano Scientific).

3.1 Modelagem e simulação de Dinâmica Molecular do scFv

A estrutura do scFv é constituída pelos domínios variáveis das cadeias pesada e leve (VH e VL, respectivamente) do anticorpo conectadas por uma cadeia polipeptídica (*linker*).

As sequências do VH e VL (quadro 1) foram obtidas a partir do Fab do Alemtuzumab, depositado com o código 1CE1 no *Protein Data Bank* (Figura 5). A estrutura do *linker*, constituída apenas de aminoácidos glicina e serina (GGGGS)₃ para manter sua flexibilidade (AHMAD *et al.*, 2012), foi construída no programa *SwissPDB Viewer* 4.1.0 (GUEX; PEITSCH, 1997), onde foi também conectada aos domínios variáveis. O *linker* iniciou no C-terminal do domínio VH e finalizou no N-terminal do VL. O *linker* foi modelado no pacote GROMACS, utilizando algoritmos de minimização *conjugate gradient* (cg) e *steep descent* e passos de DM com tempos de integração curtos. O protocolo de modelagem envolveu ciclos com e sem solvente com os domínios VH e VL congelados.

O Quadro 1 relaciona os nomes das regiões do CD52 e do scFv que foram utilizadas nas análises posteriores entre seus átomos, indicando a numeração dos resíduos e as sequências de aminoácidos dessas regiões.

Quadro 1 - Sequências de aminoácidos dos domínios variáveis do anticorpo Alemtuzumab e do *linker* que compõem o scFv e do peptídeo e epítipo do CD52 com a respectiva numeração dos resíduos e dos átomos de acordo com o arquivo do sistema em formato PDB submetido à simulação de DM.

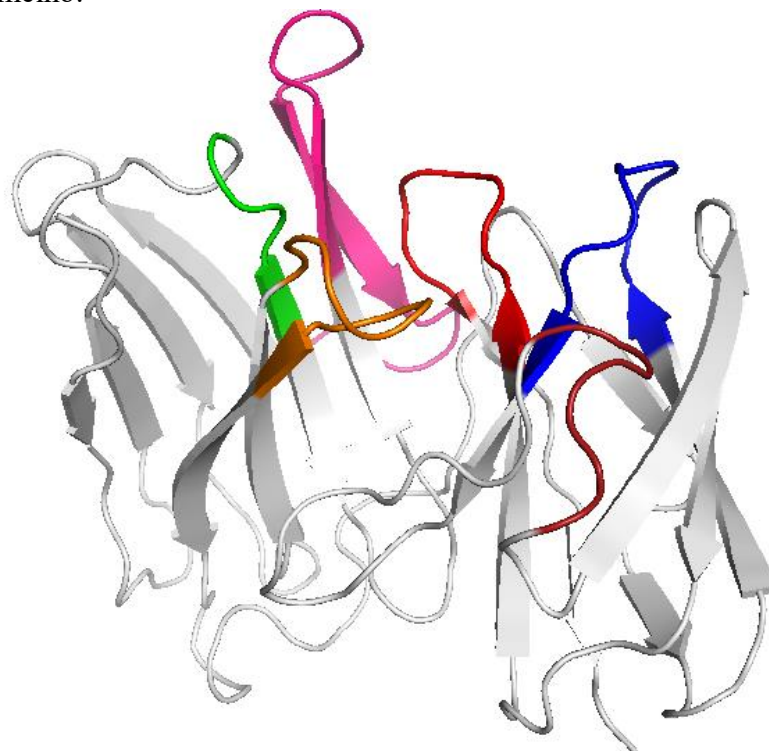
	Resíduos	Átomos	Sequência*
CD52 – peptídeo	1-12	2398-2503	GQDDTSQTSSPS
epítipo	9-12	2473-2503	SSPS
scFv	1-243	1-2397	
Domínio VH	1-121	1-1233	QVQLQESGPGGLVLRPSQTLTSLTCTV SGFTFTDFYMNWVRQPPGRGLEW IGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVT MLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA VYYCAREGHTAAPFDYWGQGS LVTSS
<i>linker</i>	122-136	1234-1317	GGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCK ASQNIKYLNWYQQKPKAPKLL
Domínio VL	137-243	1318-2397	IYNTNQLQTGVPSTRFSGSGTDF TFTISLQPEDATYYCLQHISRPT FGQGTKVEIK

*Sequências obtidas do *Protein Data Bank* (PDB).

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A figura 6 mostra as regiões determinantes de complementariedade (CDRs) do scFv do anticorpo Alemtuzumab, que serão foco das análises energéticas e estruturais posteriores da interação com o CD52. A sequência dos aminoácidos das regiões CDRs (CHOTHIA; LESK, 1987), está presente no quadro 2 com as cores relacionadas à figura 6.

Figura 6 - Estrutura do scfv representada em cartoon, destacando as regiões CDRs. H1: verde; H2: rosa; H3: laranja; L1: azul; L2: marrom e L3: vermelho.



Quadro 2 - Numeração dos resíduos e sequência de aminoácidos das CDRs do anticorpo Alemtuzumab de acordo com o arquivo PDB 1CE1 submetido à simulação de DM.

CDRs Alemtuzumab	Sequência	Resíduos
H1	DFYMN	31-35
H2	FIRDKAKGYTTEYNPSVKG	50-68
H3	EGHTAAPFDY	101-110
L1	KASQNIDKYLN	160-170
L2	NTNNLQT	186-192
L3	LQHISRPT	225-233

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

O sistema formado pelo scFv e 32060 moléculas de água explícitas no modelo SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981) foi termalizado, ou seja, foi obtida a estrutura de melhor energia através de DM. Seis íons Cl⁻ foram adicionados para neutralizar as cargas líquidas do sistema formado por uma caixa cúbica de 8.8 nm de aresta.

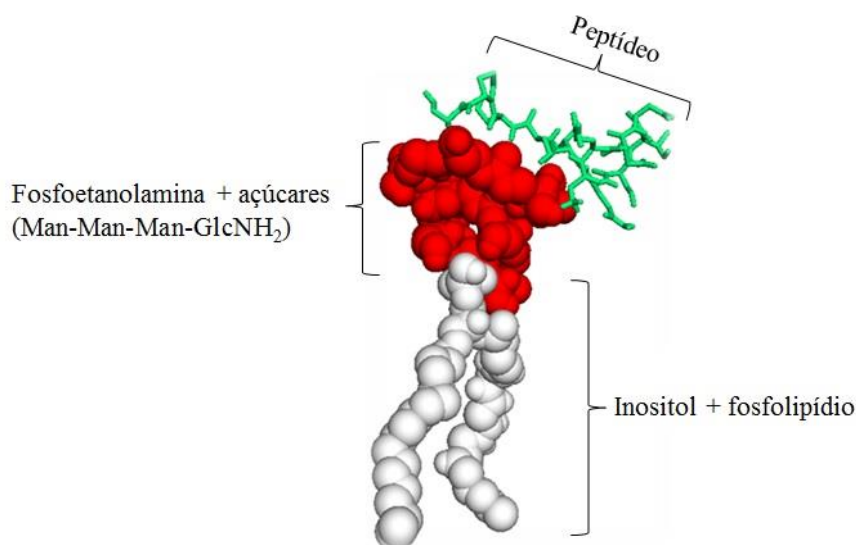
3.2 Modelagem e DM do CD52 inserido em bicamada de DMPC

Foram utilizadas coordenadas atômicas de uma membrana de DMPC e sua topologia, depositadas no *Lipidbook* por Kukol (KUKOL, 2009), um portal repositório de topologia e coordenadas atômicas (DOMAŃSKI *et al.*, 2010). O campo de força utilizado foi o GROMOS53a6. Programas do pacote GROMACS foram utilizados para criar o sistema com DMPC em água, com dimensionamento de uma caixa com tamanho suficiente 15, 10 e 16.7 nm (x y z) para abrigar 458 moléculas de DMPC e, posteriormente, o sistema completo com o scFv e o CD52.

A estrutura do GPI foi gerada no *Automated Topology Builder* (ATB) (MALDE *et al.*, 2011) que utiliza parâmetros do campo de força GROMOS53a6. A ordem dos átomos no arquivo de topologia foi modificada por programa confeccionado, garantindo que a porção peptídica ligada ao GPI iniciasse a molécula do CD52. Foi considerada também a inclusão dos parâmetros de topologia e campo de força para a conexão entre o peptídeo e o GPI. A estrutura do peptídeo de 12 aminoácidos do CD52 foi construída no programa *PyMOL* com estrutura secundária em *coil* linear. Em seguida, o peptídeo foi simulado por DM para garantir que os ângulos de Ramachandran estivessem em regiões permitidas e essa estrutura foi conectada a do GPI no *PyMOL*.

A estrutura do CD52 não glicosilado (figura 7) é composta por um pequeno peptídeo com 12 aminoácidos (GQDDTSQTSSPS) ligados pelo c-terminal do resíduo Ser12 à fosfoetanolamina de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (TREUMANN *et al.*, 1995). Para a discussão dos resultados, a região dos resíduos 1 a 8 (GQDDTSQT) foi denominada como **pept-8** e a região dos resíduos 9 a 12 (SSPS) como **epítipo**.

Figura 7 - Estrutura ampliada do CD52. Verde: peptídeo em *stick*, vermelho: domínio açúcar em esfera e fosfoetanolamina em *stick* e branco: cadeia lipídica do GPI.



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

O CD52 foi inserido na bicamada de DMPC. Esse sistema foi preenchido com 63516 moléculas de água explícitas no modelo SPC e dois íons Na^+ para neutralizar suas cargas líquidas, formando uma caixa cúbica com dimensões 15, 10 e 16.7 nm nos eixos x, y e z, respectivamente. Posteriormente, o sistema foi termalizado e simulado em NPT, a trajetória de DM coletada e a estabilidade da estrutura do peptídeo e do epítipo foi analisada.

3.3 Simulação do sistema - scFv, CD52 e membrana de DMPC em água

A caixa de simulação, com dimensões de 15, 10 e 16.7 nm (x y z), abrigou o sistema a ser simulado, composta pelo scFv, o CD52, a bicamada de DMPC com 458 moléculas, 62419 moléculas de água explícitas no modelo SPC e 5 íons Cl^- adicionados para manter a neutralidade de cargas. A simulação de DM foi executada em NPT com pressão (1 atm) e temperatura (310 K) controladas, durante 300 ns. A trajetória da simulação foi coletada a cada 1000 passos.

3.4 Simulação do sistema scFv, CD52 inserido em um sistema misto de solventes que formam duas fases n-hexano/água

As cabeças polares do modelo de membrana composto por fosfolipídios dificultam a

difusão lateral de moléculas, o que para o caso resulta em elevado tempo computacional. Portanto, foi considerado o uso de um modelo de membrana simplificado que considera somente o ambiente interno, hidrofóbico, e externo, hidrofílico, de uma membrana celular. Uma interface modelada por água e *n*-hexano representa bem uma interface hidrofílica/hidrofóbica e foi montada em uma caixa de simulação contendo, no centro, uma faixa de 4 nm composta por 2864 moléculas de *n*-hexano interfaceada por moléculas de água. A caixa teve dimensões de 12,34 nm, 12,34 nm e 10,8 nm para os eixos x, y e z, respectivamente e foi composta de 2864 moléculas de *n*-hexano e 31967 moléculas de água explícitas no modelo SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981). Esse modelo de membrana simplificado possibilita avaliar a interação entre o scFv e o CD52 sem a influência das cargas das cabeças polares dos fosfolipídios da membrana de DMPC.

A caixa de simulação, com dimensões de 15, 10 e 16.7 nm (x y z), abrigou o sistema a ser simulado composto pelo scFv, o CD52, 2864 moléculas de *n*-hexano, 58336 moléculas de água e 5 íons Cl⁻ são adicionados para manter a neutralidade de cargas. A simulação de DM foi executada em NPT com pressão (1 atm) e temperatura (310 K) controladas, durante 300 ns. A trajetória da simulação foi coletada a cada 1000 passos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem e simulação de Dinâmica Molecular do scFv

Os perfis de RMSD apresentados na figura 8 permitem analisar a manutenção da estrutura do scFv em água durante 100 ns de simulação. As estruturas dos domínios VH e VL analisados isoladamente alcançam um máximo em ~10 ns de simulação e permanecem estáveis ao longo do restante da simulação, apresentando um RMSD médio de $0,23 \pm 0,02$ nm e $0,24 \pm 0,01$ nm, respectivamente (tabela 1). Considerando a sobreposição de VH e VL sem o *linker* (VH-VL) e o posterior cálculo de RMSD de VH e VL sem o *linker*, a curva tem seu máximo após 60 ns, com um RMSD médio após esse tempo de $0,46 \pm 0,02$ nm (tabela 1). O desvio de 0,02 nm é pequeno, considerando que são dois domínios que estão em contato direto, além do *linker*. Uma vez que os RMSD médios de VH e VL separados são similares (~0.24 nm) e que para VH-VL o RMSD médio é quase o dobro, implica que ocorreu reorientação relativa do domínio VH em relação a VL, com a manutenção de VH e VL.

A posição do *linker* apresenta uma maior alteração ao longo da simulação, RMSD de

$0,39 \pm 0,07$ nm (tabela 1). Isso é explicado pela sua estrutura flexível formada por resíduos de Glicina e Serina (GGGGS)₃, que possuem cadeias laterais pequenas que facilitam a torção dos ângulos diedros vinculados a ligação peptídica, e por não estarem em contato direto com os domínios VH e VL através de longas cadeias laterais. As diferentes mudanças nas estruturas de VH, VL, VH-VL e *linker* permitem definir que ocorreu uma reorientação entre VH e VL que está dissociada da movimentação do *linker* e que essa reorientação não implica em mudança estrutural significativa nas estruturas de VH e VL.

Figura 8 - Curvas de RMSD dos C_α das porções do scFv em água ao longo do tempo de simulação. Preto: RMSD do *linker* (sobreposição e RMSD do *linker*); vermelho: RMSD do VH-VL (sobreposição e RMSD de VH e VL sem o *linker*); verde: RMSD de VH (sobreposição e RMSD de VH) e azul: RMSD de VL (sobreposição e RMSD de VL).

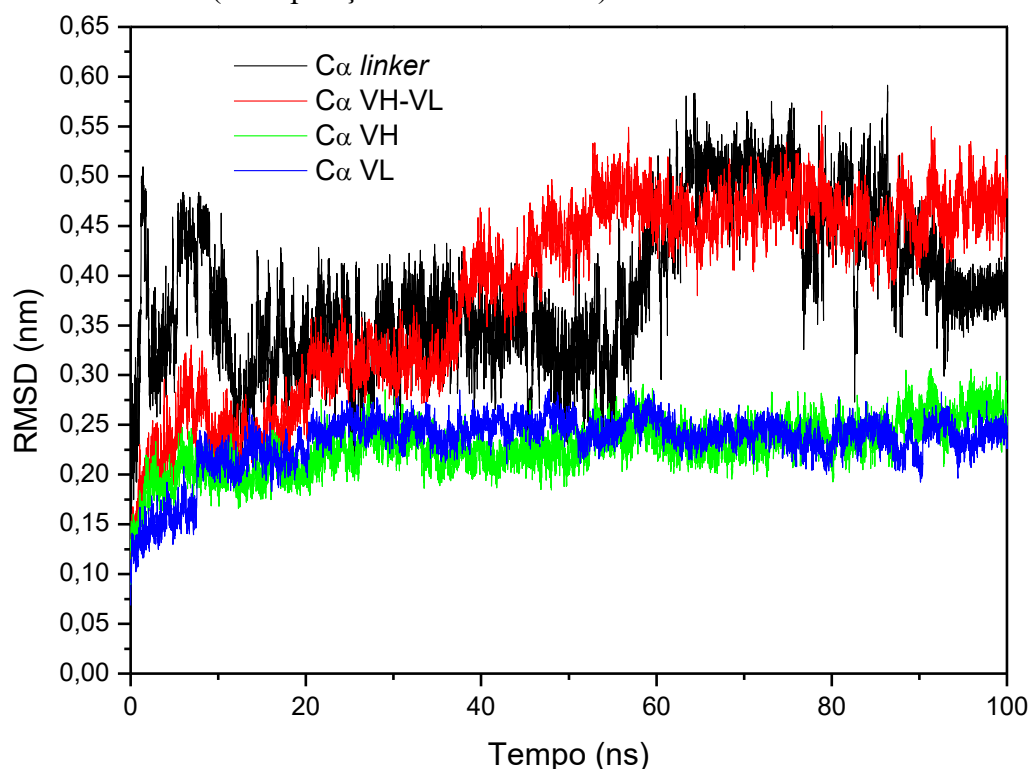


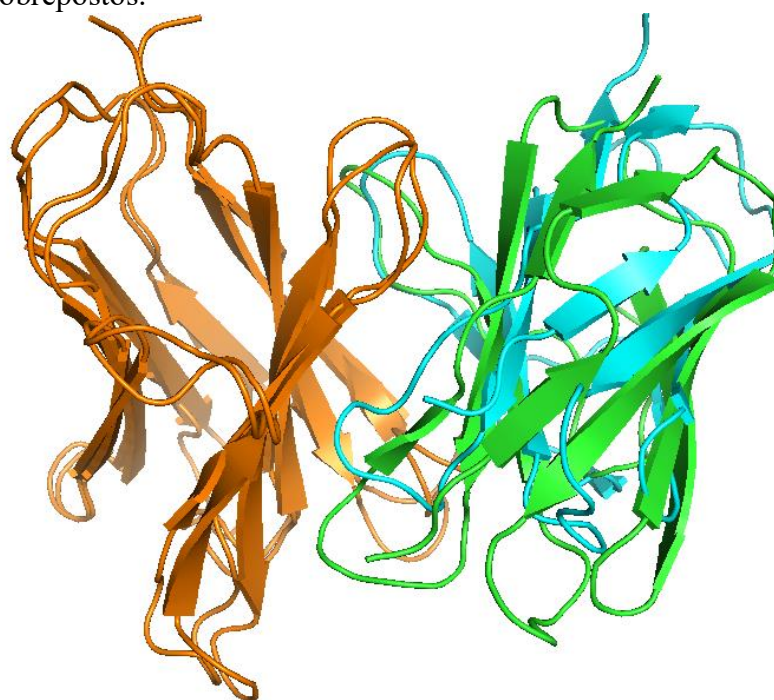
Tabela 1 - Dados de média e desvio de RMSD para cada região do scFv, VH-VL, VH, VL e *linker*, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}).

Estrutura	Média ± Desvio (nm)	t_{eq} (ns)
VH-VL	0,46 ± 0,02	60
VH	0,23 ± 0,02	10
VL	0,24 ± 0,01	10
<i>linker</i>	0,39 ± 0,07	0

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Na figura 9, estão representadas as estruturas VH-VL em 12 e 100 ns de simulação, obtidas através da sobreposição do domínio VH nas duas estruturas e mantendo o VL livre. As posições relativas entre VH e VL variam nesses dois momentos, havendo uma torsão entre esses domínios. As regiões CDR são mantidas nas duas configurações, embora variem de posição, como mostrado na figura 9.

Figura 9 – Configurações das estruturas de VL representadas em *cartoon* em 12 (azul) e 100 (verde) ns de simulação. Em laranja estão os domínios VH das duas configurações sobrepostos.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

4.2 Modelagem e DM do CD52 inserido em bicamada de DMPC

Na figura 10, são mostrados os perfis de RMSD do peptídeo do CD52, RMSD médio de $0,38 \pm 0,02$ nm (tabela 2), e do epítipo, RMSD médio de $0,156 \pm 0,004$ nm (tabela 2). Os perfis de RMSD mostram que tanto peptídeo quanto epítipo mantêm as estruturas estáveis após atingirem equilíbrio estrutural. No entanto, nos últimos 20 ns o perfil de RMSD mostrou maiores oscilações para o peptídeo e manutenção para o epítipo, o que infere que a estrutura dos 8 resíduos iniciais do peptídeo (pept-8) se tornou mais flexível em relação à região do epítipo.

Figura 10- Curvas de RMSD dos C_{α} do peptídeo (resíduos 1-12), do pept-8 (resíduos de 1 a 8) e do epítipo (resíduos 9-12) do CD52 pelo tempo de simulação. Preto: RMSD do peptídeo do CD52, verde: RMSD do pept-8 e vermelho: RMSD apenas do epítipo.

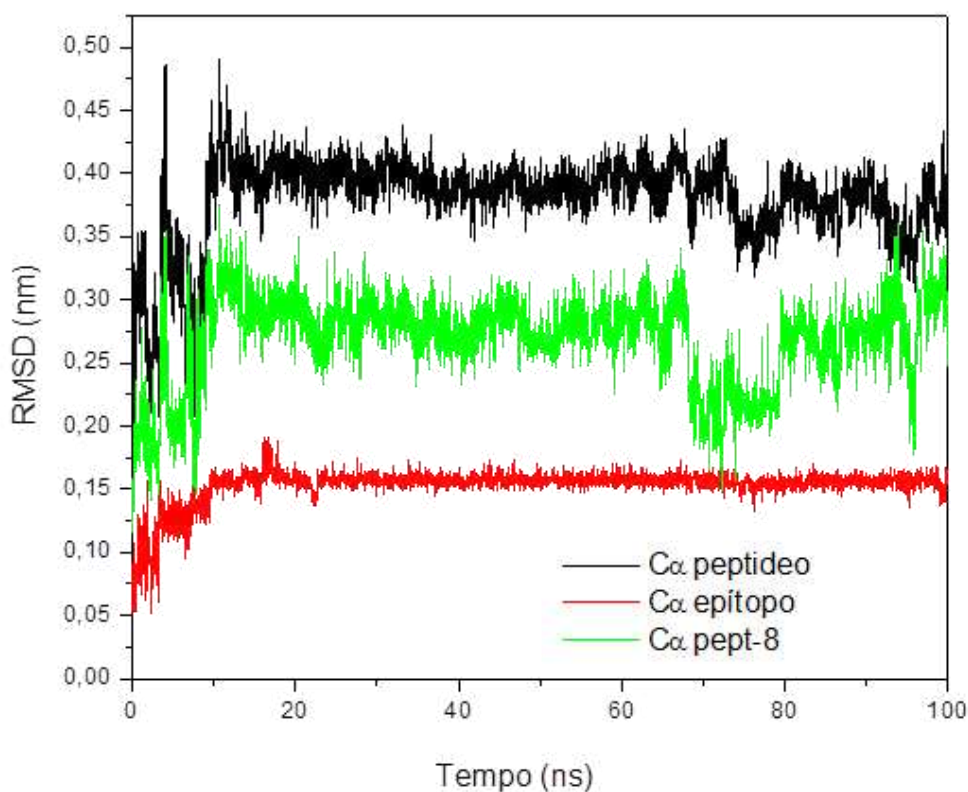


Tabela 2 - Dados de média e desvio de RMSD para o peptídeo e o epítipo do CD52, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}).

Estrutura	Média \pm Desvio (nm)	t_{eq} (ns)
peptídeo	$0,38 \pm 0,02$	10
epítipo	$0,156 \pm 0,004$	10

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

4.3 Simulação do sistema - scFv, CD52 e membrana de DMPC em água

Na figura 11A, a curva de RMSD referente à estrutura do epítopo atinge um máximo logo após o início da simulação (~25 ns), indicando o momento em que a estrutura atinge o equilíbrio, com RMSD médio, a partir desse momento, de $0,02 \pm 0,01$ nm (tabela 3). No caso da estrutura do peptídeo do CD52, o equilíbrio é atingido em momento similar ao do epítopo, mas em 133 ns o perfil de RMSD mostra uma descontinuidade e a média foi calculada a partir desse momento ($0,16 \pm 0,02$ nm), como visto na tabela 3. O baixo RMSD é explicado pelo peptídeo estar localizado entre a bicamada de DMPC e o scFv, o que impede maior flexibilidade estrutural. O perfil de RMSD para o GPI oscila bastante, com RMSD de 0,51 nm e um alto desvio de $\pm 0,08$ nm, o que é explicado pela grande liberdade da porção lipídica, formada por duas cadeias de ácidos graxos lineares, inseridas na bicamada de DMPC.

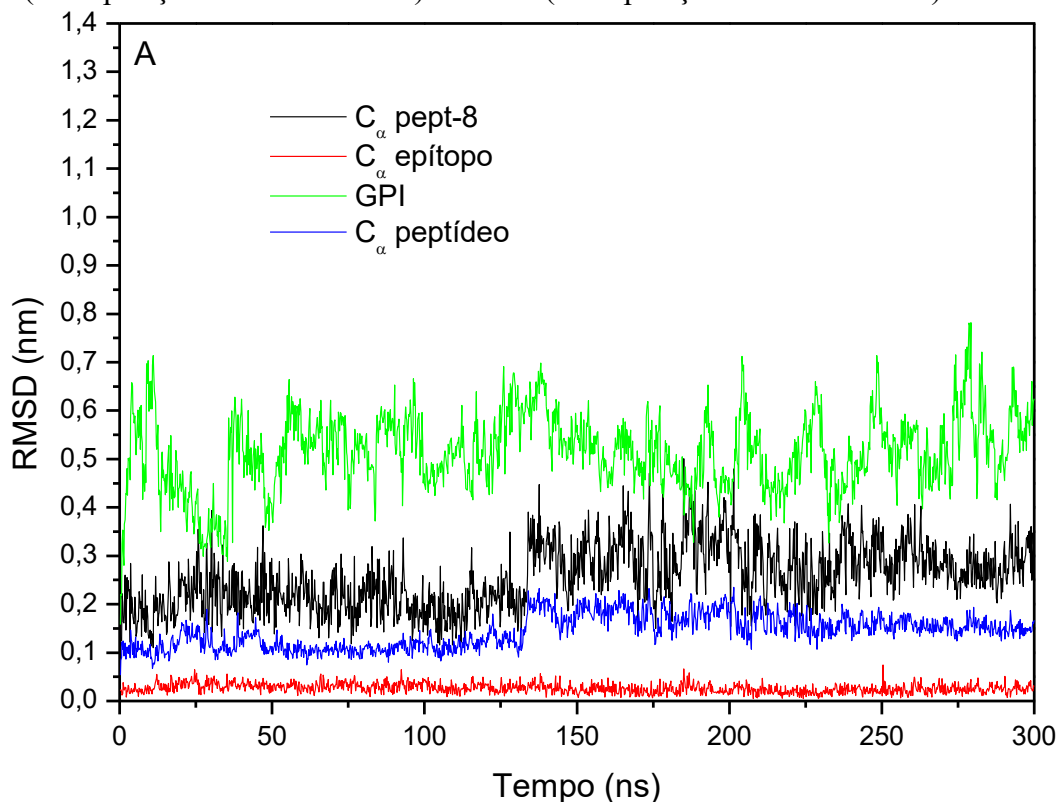
Tabela 3 - Média e desvio de RMSD, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para o peptídeo, o epítopo e o GPI do CD52 e para VH-VL, VH, VL e o *linker*.

Estrutura	Média \pm Desvio (nm)	t_{eq} (ns)
GPI	$0,51 \pm 0,08$	0
peptídeo	$0,16 \pm 0,02$	133
epítopo	$0,02 \pm 0,01$	25
pept-8	$0,27 \pm 0,06$	133
VH-VL	$0,21 \pm 0,01$	0
VH	$0,20 \pm 0,03$	150
VL	$0,18 \pm 0,01$	0
<i>linker</i>	$0,41 \pm 0,03$	75

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

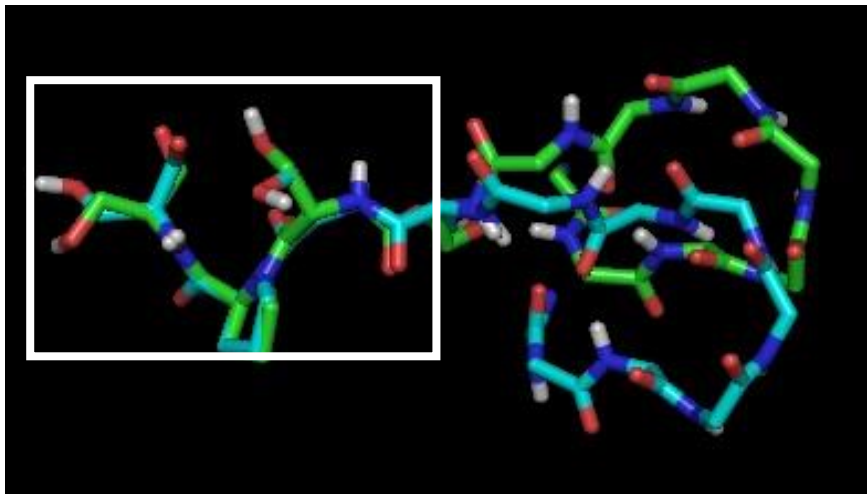
A curva de RMSD referente ao pept-8, após a sobreposição apenas dos resíduos do epítopo, mostra uma descontinuidade no mesmo local que para o peptídeo completo. Isso infere que pept-8 ganha flexibilidade a partir de 133 ns com RMSD médio de $0,27 \pm 0,06$ nm, enquanto o epítopo mantém sua estrutura durante toda a simulação (RMSD médio de $0,02 \pm 0,01$ nm). A figura 12 mostra duas configurações coletadas nos tempos 133 e 134 ns (antes e depois da descontinuidade) com diferentes conformações do peptídeo, evidenciando a diferença de orientação de pept-8 com a manutenção do epítopo.

Figura 11 – A) Curvas de RMSD dos C_{α} do peptídeo com sobreposição apenas do epítipo (pept-8), do epítipo (sobreposição e RMSD do epítipo), do peptídeo (sobreposição e RMSD do peptídeo) e dos átomos do GPI (sobreposição e RMSD do GPI) do CD52. B) RMSD dos C_{α} do *linker* (sobreposição e RMSD do *linker*), do VH-VL (sobreposição e RMSD de VH e VL sem o *linker*), do VH (sobreposição e RMSD de VH) e do VL (sobreposição e RMSD de VL).



Na figura 11B, a curva de RMSD referente às estruturas de VL e VH-VL atinge um máximo logo após o início da simulação. A estrutura VH-VL atinge o equilíbrio com RMSD médio de $0,21 \pm 0,01$ nm (tabela 3). O perfil de RMSD de VH mostra um discreto aumento de $\sim 0,15$ para $0,2$ nm até ~ 150 ns, o que define, após esse momento, RMSD médio de $0,20 \pm 0,03$ nm, ligeiramente mais alto que VL de $0,18 \pm 0,01$ nm. A estrutura do *linker* atinge um máximo a partir de 75 ns e permanece estável até o final da simulação, com um RMSD médio de $0,41 \pm 0,03$ nm.

Figura 12 – Representação em *sticks* das cadeias principais das configurações do peptídeo do CD52 em 133 ns (verde) e 134 ns (azul) de simulação. Dentro do quadro, em destaque os resíduos do epítipo. Os demais resíduos pertencentes ao pept-8, fora do quadro.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A estrutura do scFv encontra-se bem próxima à membrana (figura 14), devido a uma forte interação entre as cargas líquidas dos grupamento fosfato (-) e colina (+) da membrana de DMPC e os aminoácidos carregados do scFv. O PII entre o scfv e o DMPC decrescente (figura 13) comprova a forte interação atrativa entre o scFv e a extremidade polar da bicamada de DMPC, que atinge um PII médio de $-594.9 \pm 47,6$ entre 150 e 300 ns.

Figura 13 – Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e a membrana de DMPC. $r_{cut} = 1,3$ nm.

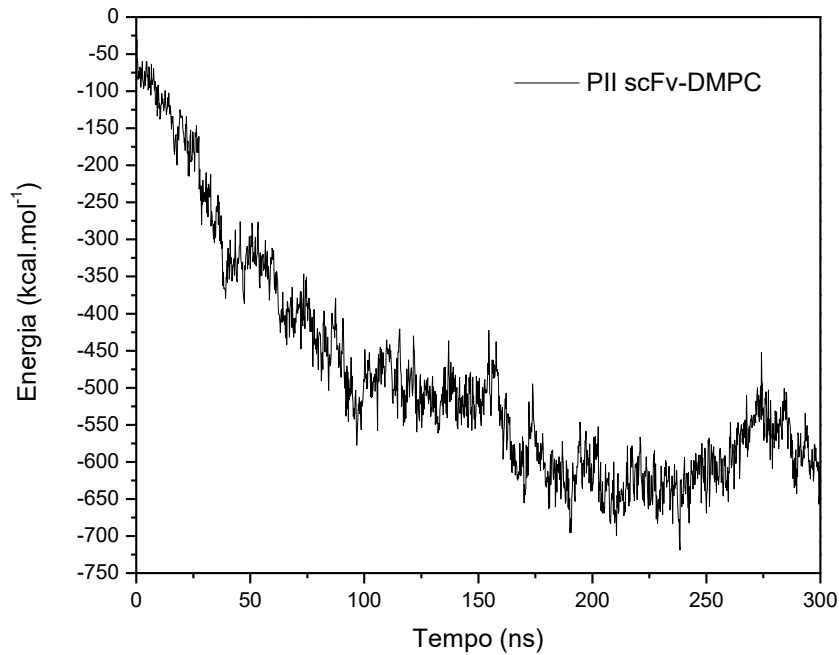
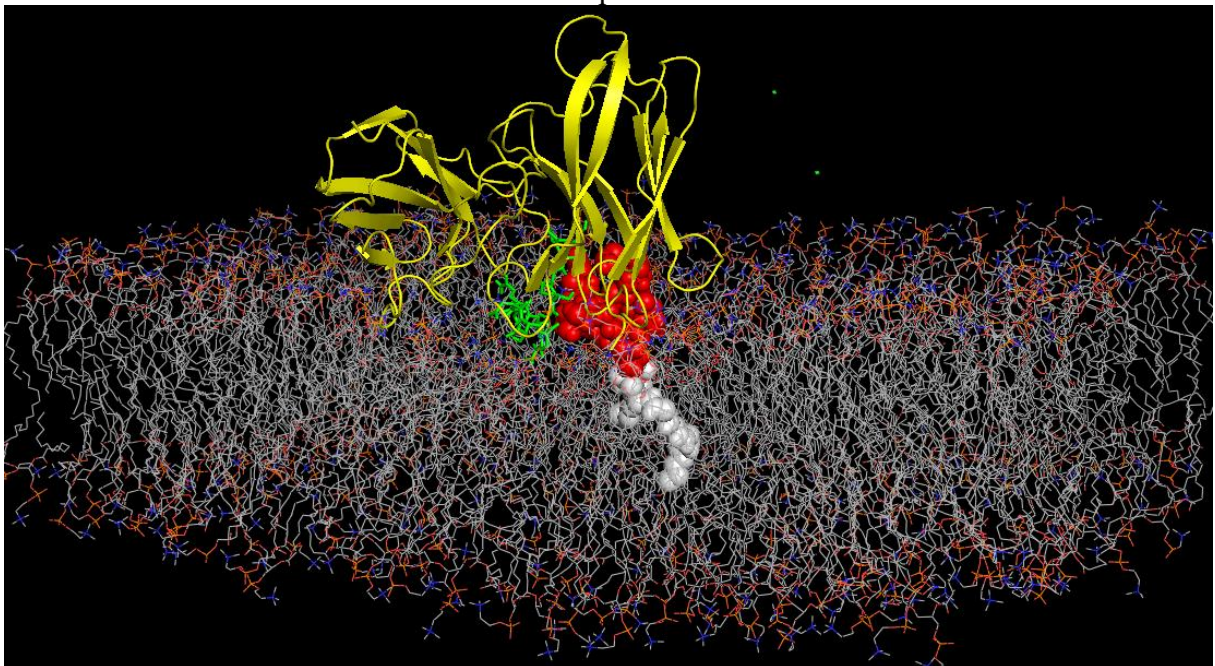


Figura 14 - Estrutura ampliada do scFv em *cartoon* interagindo com o CD52 inserido em DMPC. Cinza: DMPC; amarelo: scFv; verde: peptídeo em *stick*; vermelho: açúcar e fosfoetanolamina em esfera e branco: cadeia lipídica em esfera.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

O perfil do potencial de interação intermolecular (PII) entre os átomos do scFv e dos componentes do CD52 em DMPC está representado na figura 15. A interação entre o scFv e o peptídeo do CD52 é atrativa, uma vez que todos os potenciais dos componentes são menores que zero. A curva de PII entre scFv-peptídeo e scFv-pept-8 são muito similares, alcança

mínimo em ~ 50 ns e mantém forte oscilação durante a DM. Essa similaridade entre as curvas denota que a região pept-8 é a que mais interage atrativamente com o scFv e não a região do epítipo. Os perfis também apresentam a descontinuidade no mesmo período visto na curva de RMSD, entre 133 e 134 ns, nesse caso mais discreta. Os PII médios entre scFv-pept-8 e scfv-peptídeo, no período de 50 a 133 ns, são de $-80,0 \pm 8,5$ kcal.mol⁻¹ e $-86,4 \pm 10,3$, respectivamente (tabela 4). Após a mudança estrutural, os PII passam a ser de $-81,1 \pm 7,0$ kcal.mol⁻¹ e $-95,6 \pm 10,1$ kcal.mol⁻¹. O menor PII após 135 ns em conjunto com a mudança estrutural na região de pept-8 define que ocorreu uma mudança estrutural dessa região do peptídeo do CD52 para realçar a interação com o scFv.

O perfil de PII entre scFv-epítipo revela que até 25 ns de DM a interação scFv-epítipo era mais atrativa que entre scFv-pept-8. Após 25 ns, o PII médio de $-13,9 \pm 7,0$ kcal.mol⁻¹ (tabela 4) entre o epítipo e o scFv se mantém até o final da simulação e infere uma interação menos atrativa que a região pept-8. A interação entre o scFv e o GPI é também atrativa, com PII médio de $-27,6 \pm 9,3$ kcal.mol⁻¹ (tabela 4). O PII infere que a interação do scFv com o peptídeo do CD52 é mais atrativa que a interação de scFv com o GPI.

Figura 15 - Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e os átomos dos componentes do CD52 em DMPC. $r_{cut} = 1,3$ nm.

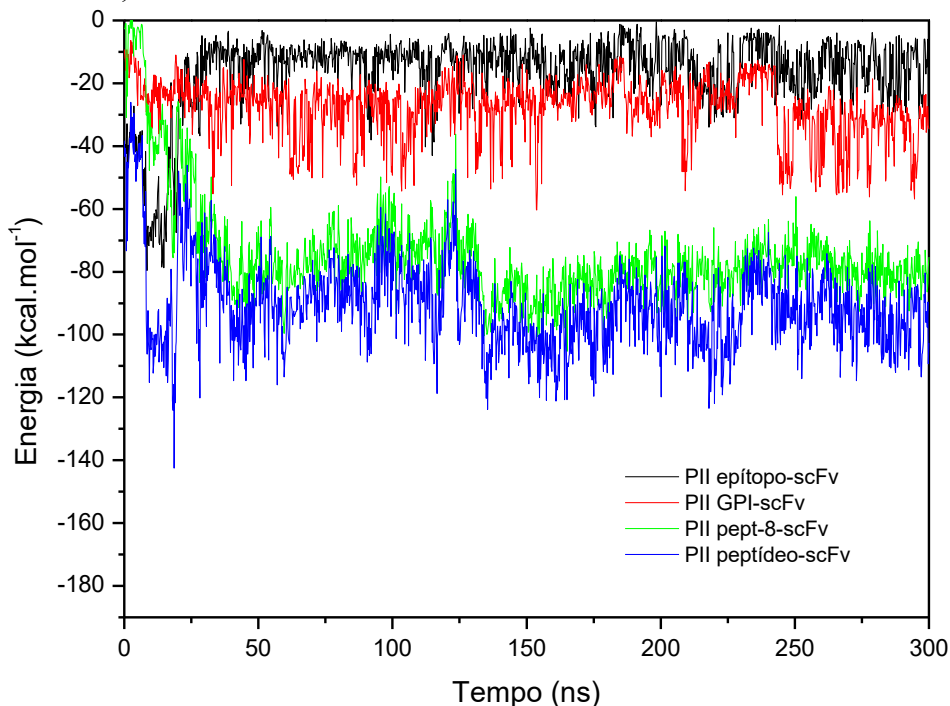


Tabela 4 – PII médios e desvios, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para a interação entre os componentes do CD52 (epítopo, pept-8, peptídeo e GPI) e o scFv.

Interação	PII médio \pm Desvio (kcal.mol⁻¹)	t_{eq} (ns)
epítopo-scFv	-13,9 \pm 7,0	25
pept-8-scFv	-80,0 \pm 8,5	50
peptídeo-scFv	-86,4 \pm 10,3	50
GPI-scFv	-27,6 \pm 9,3	0

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

As regiões do scFv que apresentam maior interação atrativa com o peptídeo do CD52 são as CDR H2, L1 e L3 (figura 16A). Isso ocorre devido à presença de resíduos carregados positivamente, Lys54, Lys56, Arg52, Lys167, Arg230 e Arg232, com potenciais de interação mais negativos e, portanto, de atração ao CD52, o que corrobora o já descrito por James *et al.*, 1999, que, de acordo com a estrutura cristalográfica, as regiões que desempenham um papel mais significativo na ligação ao CD52 são as CDR L3 e H2.

A CDR H2 possui grande contribuição na interação com o peptídeo, onde é observado vários resíduos com PII < 0, e também interage com a âncora de GPI (figuras 16A e 18). Esses resíduos em sua maioria são básicos Arg52, Lys54 e Lys56, mas há também o ácido Asp137 e apolar Ala55, como mostrado na figura 16B. As CDR H1 e H3 são as que possuem resíduos com PII mais repulsivos, resíduos carregados negativamente, Glu e Asp, pois sofrem repulsão com os resíduos Asp3 e 4 do peptídeo do CD52.

A Lys56 interage atrativamente com os resíduos Ser10 e Ser12 do epítopo (figura 17), o que torna esse resíduo crucial para a interação específica Alemtuzumab-CD52, uma vez que interage com a região do epítopo. Já se tem descrito na literatura por Somerfield e colaboradores (SOMERFIELD *et al.*, 2010) a proposição de um mutante (Lys56Asp) e por Gilliland e colaboradores (GILLILAND; *et al.*, 1998) mutantes dos resíduos Lys54 e Lys56, também por Asp, conferindo uma menor imunogenicidade para o anticorpo Alemtuzumab.

Figura 16 - A) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com o peptídeo do CD52 inserido em bicamada de DMPC com $r_{cut} = 0,5$ nm. B) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com a âncora de GPI. Os retângulos coloridos delimitam as regiões CDRs. Verde: H1; rosa: H2; laranja: H3; roxo: L1 e vermelho: L3.

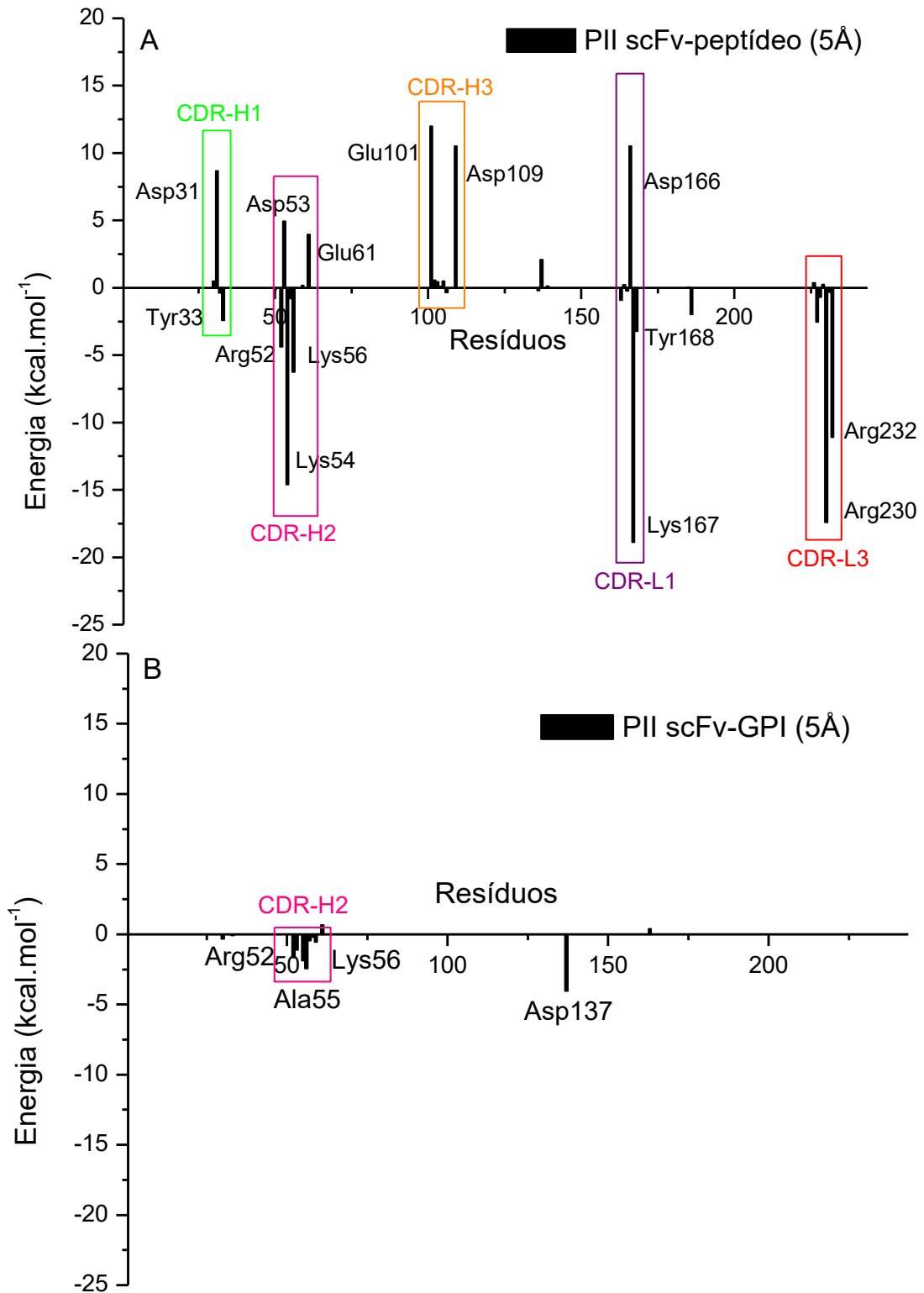
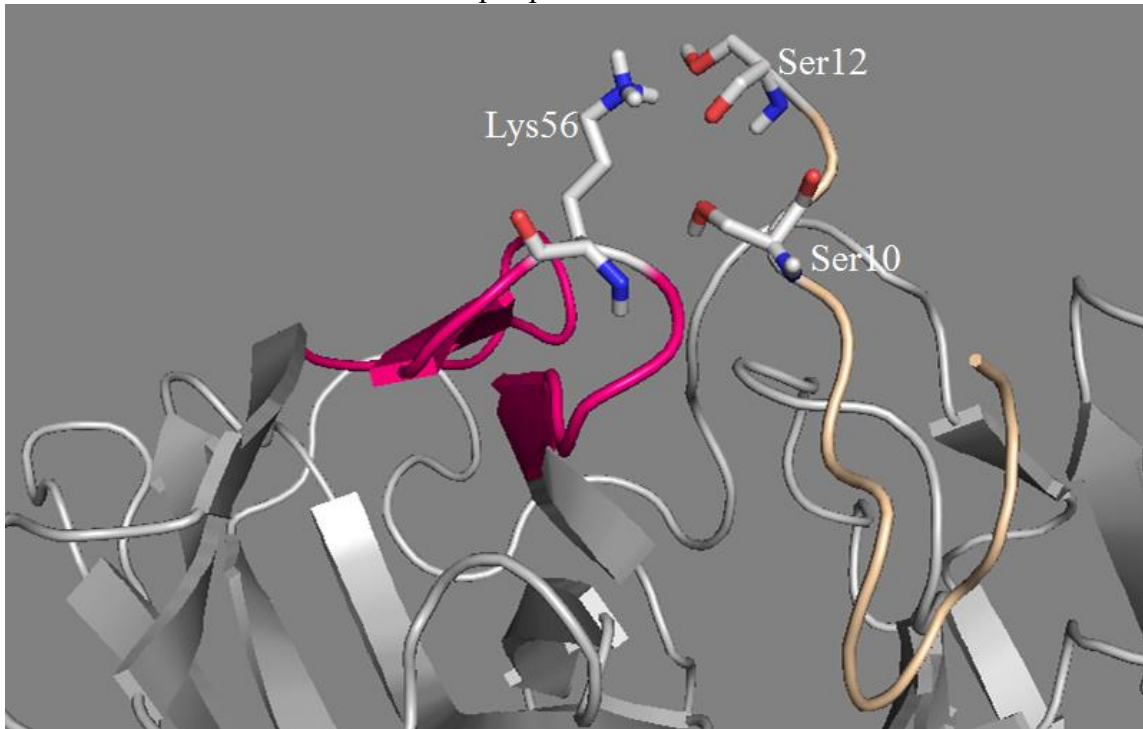
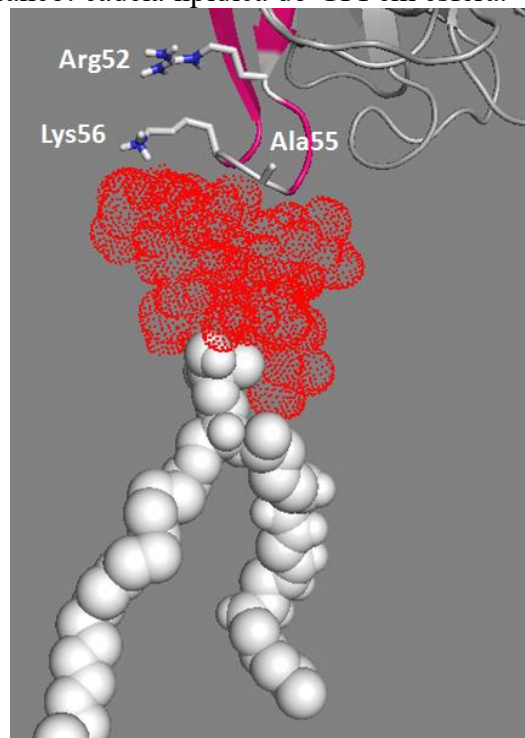


Figura 17 – Representação em *cartoon* da interface de interação scFv-CD52, evidenciando a interação do resíduo Lys56 em *stick* da CDR H2 (rosa) do scFv com os resíduos Ser10 e Ser12 em *stick* do epítipo do CD52.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

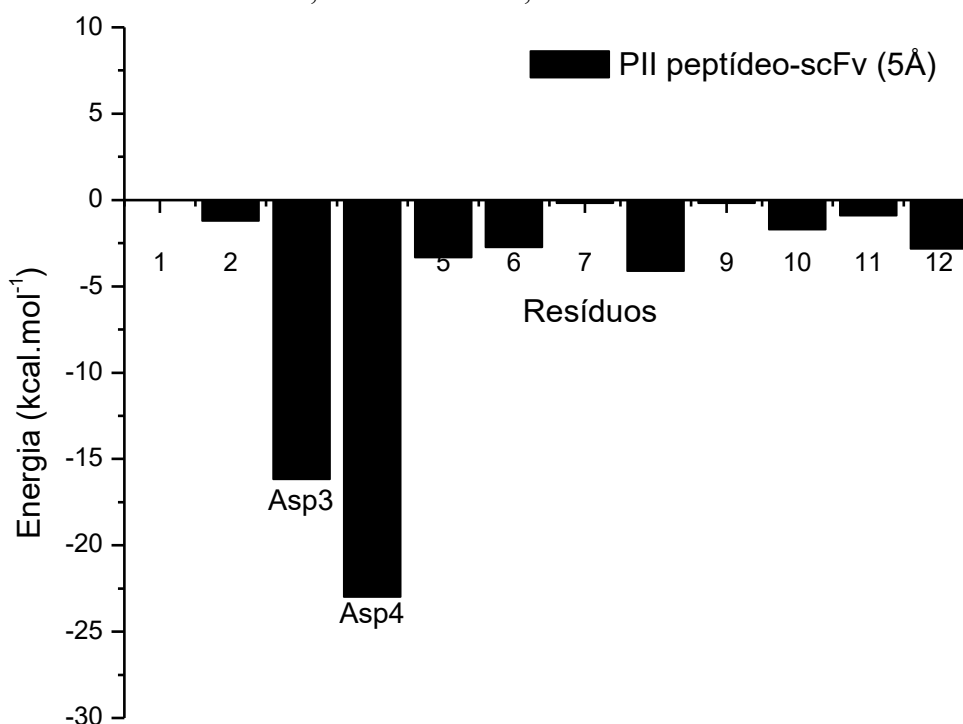
Figura 18 – Representação da interface de interação scFv-CD52, evidenciando em *stick* resíduos da CDR H2 que interagem com o GPI do CD52. Cinza: scFv; rosa: H2; vermelho: açúcar e fosfoetanolamina do GPI em *dots* e branco: cadeia lipídica do GPI em esfera.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A figura 19 mostra a distribuição de PII de cada resíduo do peptídeo interagindo com o scFv. Os resíduos do peptídeo, em geral, não apresentaram um potencial que representa uma interação muito atrativa. Os resíduos que apresentaram menor energia de interação foram Asp3 (-16,17 kcal.mol⁻¹) e Asp4 (-22,97 kcal.mol⁻¹), sendo os resíduos que mais interagem com o scFv.

Figura 19 - Potencial de interação de cada resíduo do peptídeo do CD52 com o scFv em DMPC, em um rcut = 0,5 nm.



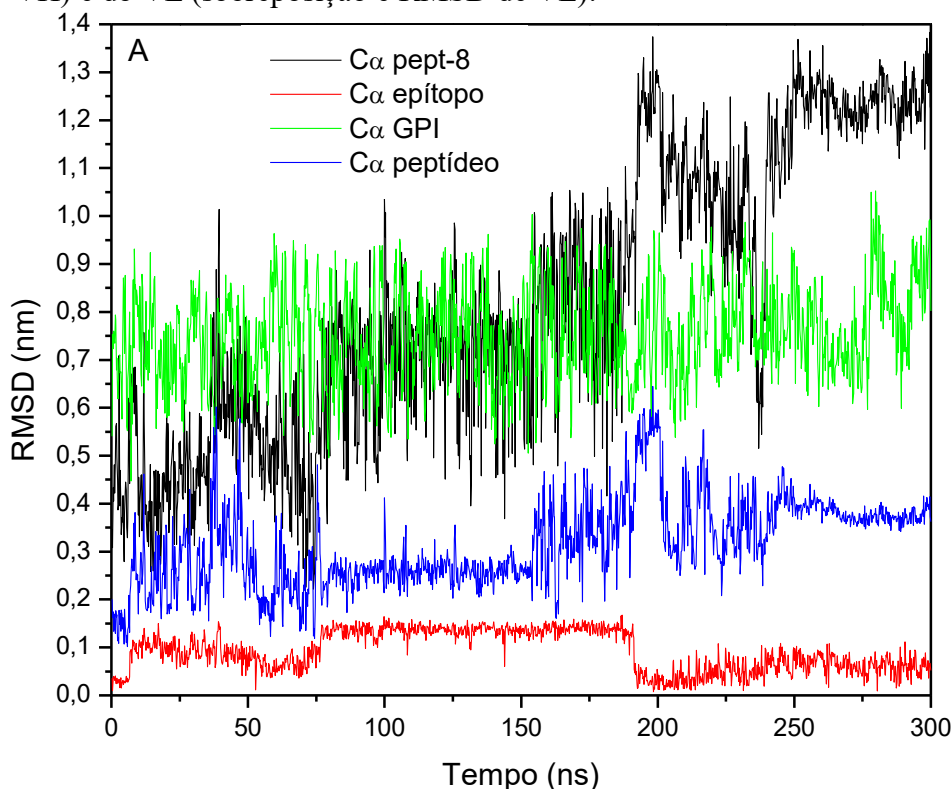
4.4 Simulação do sistema scFv, CD52 inserido em um sistema misto de solventes que formam duas fases *n*-hexano/água

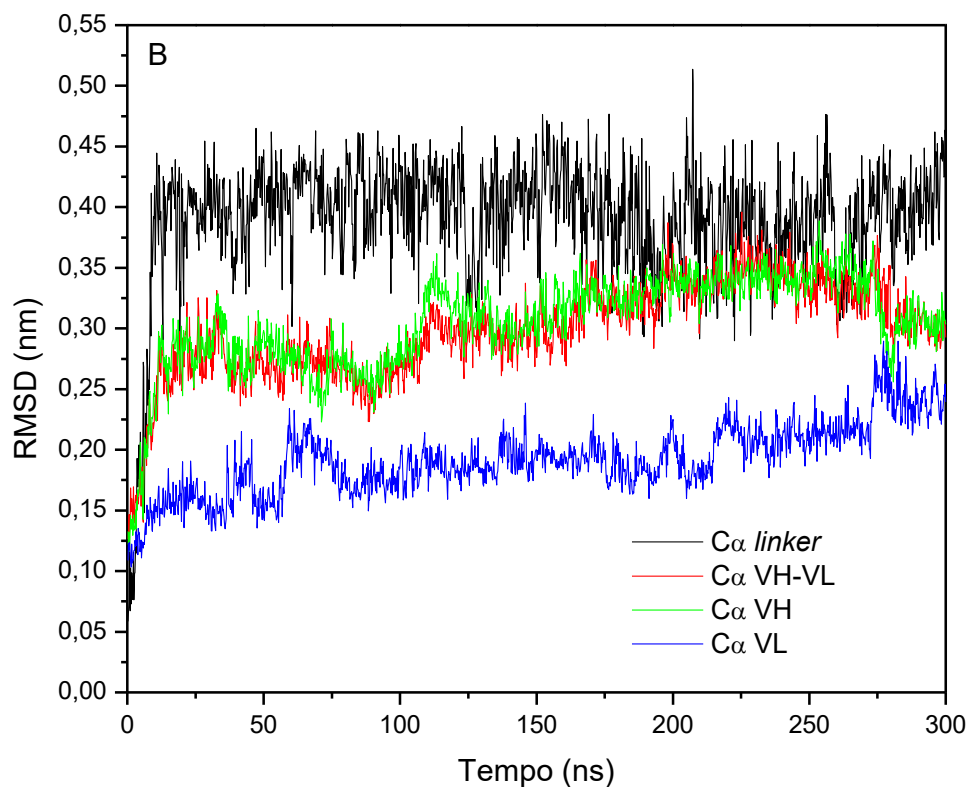
Na figura 20A, a curva de RMSD mostra que as regiões do epítipo e peptídeo atingem o equilíbrio estrutural em ~75 ns, com RMSD médios de $0,13 \pm 0,01$ nm até 190 ns e de $0,26 \pm 0,03$ nm até 155 ns (tabela 5), respectivamente. Posteriormente, são observadas oscilações no perfil de RMSD para o peptídeo em ~155 ns e em ~190 ns para o epítipo, indicando mudança estrutural de ambos, sendo maior para a região pept-8 e menor para região do epítipo, como observado na curva com maior RMSD. O perfil de RMSD para o pept-8 apresentou desvio bem maior, RMSD médio de $0,70 \pm 0,11$ nm (tabela 5), em relação ao perfil de RMSD do epítipo. Isso mostra que o epítipo não é o responsável pela variação de conformação da estrutura do peptídeo durante a simulação, mas sim os resíduos que não

pertencem ao epítopo. A figura 21 mostra quatro configurações do peptídeo coletadas nos tempos 38, 118, 198 e 260 ns, instantes em que ele apresenta diferentes conformações estruturais, evidenciando a diferença de orientação de pept-8 com a manutenção do epítopo.

O RMSD médio do peptídeo entre as simulações no sistema *n*-hexano e DMPC são distintos, como visto comparando os RMSD médios nas tabelas 3 e 5. O maior desvio para *n*-hexano é decorrente da maior liberdade conformacional da estrutura do peptídeo na interface *n*-hexano/água que em DMPC/água, em função da presença dos grupos carregados, fosfato e colina, na extremidade do DMPC. A diferença nos tempos de equilíbrio estrutural mostra o perfil para o GPI, que oscila mais em *n*-hexano que em DMPC, com RMSD de 0,75 nm e um alto desvio de $\pm 0,10$ nm, já que o *n*-hexano é hidrofóbico e toda a estrutura do GPI está livre para se movimentar.

Figura 20 - A) Curvas de RMSD dos C_{α} do peptídeo com sobreposição apenas do epítopo (pept-8), do epítopo (sobreposição e RMSD do epítopo), do peptídeo (sobreposição e RMSD do peptídeo) e dos átomos do GPI (sobreposição e RMSD do GPI) do CD52. B) RMSD dos C_{α} do *linker* (sobreposição e RMSD do *linker*), do VH-VL (sobreposição e RMSD de VH e VL sem o *linker*), do VH (sobreposição e RMSD de VH) e do VL (sobreposição e RMSD de VL).





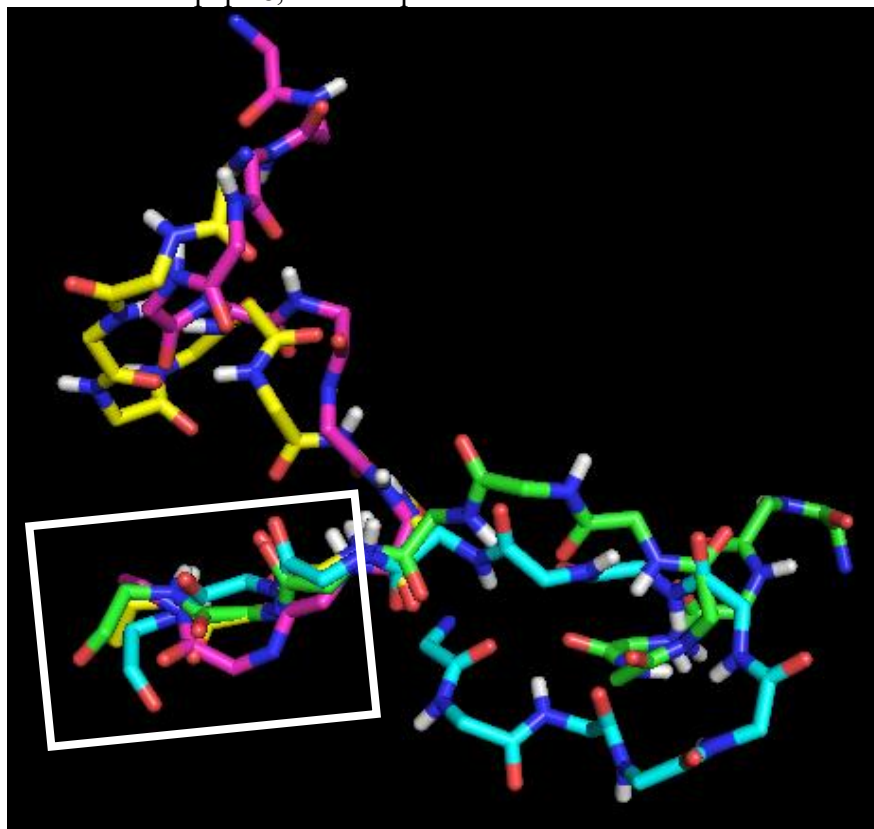
Na figura 20B, a curva de RMSD referente à VH-VL atinge um máximo após 110 ns de simulação. A estrutura atinge o equilíbrio com RMSD médio de $0,32 \pm 0,02$ nm (tabela 5). A estrutura do VH atinge um máximo após 110 ns com RMSD médio de $0,32 \pm 0,02$ nm e do VL, de 100 até 275 ns, com RMSD médio de $0,19 \pm 0,02$ nm. O perfil de RMSD do VH segue o mesmo perfil do VH-VL, o que permite inferir que a movimentação dos átomos de VH-VL está relacionada à movimentação dos átomos de VH. A estrutura do *linker* atinge um máximo logo após o início da simulação (~ 10 ns), com um RMSD médio de $0,39 \pm 0,03$ nm.

Tabela 5 - Média e desvio de RMSD, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para o peptídeo, o epítipo e o GPI do CD52 e para VH-VL, VH, VL e o *linker* do scFv.

Estrutura	Média \pm Desvio (nm)	(t_{eq})
GPI	$0,75 \pm 0,10$	0
peptídeo	$0,26 \pm 0,03$	75
epítipo	$0,13 \pm 0,01$	75
pept-8	$0,70 \pm 0,11$	75
VH-VL	$0,32 \pm 0,02$	110
VH	$0,32 \pm 0,02$	110
VL	$0,19 \pm 0,02$	100
<i>linker</i>	$0,39 \pm 0,03$	10

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura 21 – Representação em *sticks* das cadeias principais das configurações do peptídeo do CD52 em 38 (verde), 118 (azul claro), 198 (roxo) e 260 ns (amarelo) de simulação. Dentro do quadro, em destaque os resíduos do epítipo sobrepostos. Os demais resíduos pertencentes ao pept-8, fora do quadro.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

No sistema com interface *n*-hexano/água, o scFv encontra-se próximo ao *n*-hexano (figura 23), com menor interação atrativa com o *n*-hexano do que o observado para o DMPC. Essa informação é ratificada comparando-se os PII médios entre scFv-*n*-hexano, $-207,5 \pm 20,3$ kcal.mol⁻¹ após ~10 ns (figura 22), e scFv-DMPC (figura 13). A interação do scFv com o *n*-hexano é, aproximadamente, quatro vezes menos atrativa que com o DMPC (PII médio de $-594.9 \pm 47,6$ kcal.mol⁻¹).

Figura 22 – Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e o *n*-hexano. $r_{cut} = 1,3$ nm.

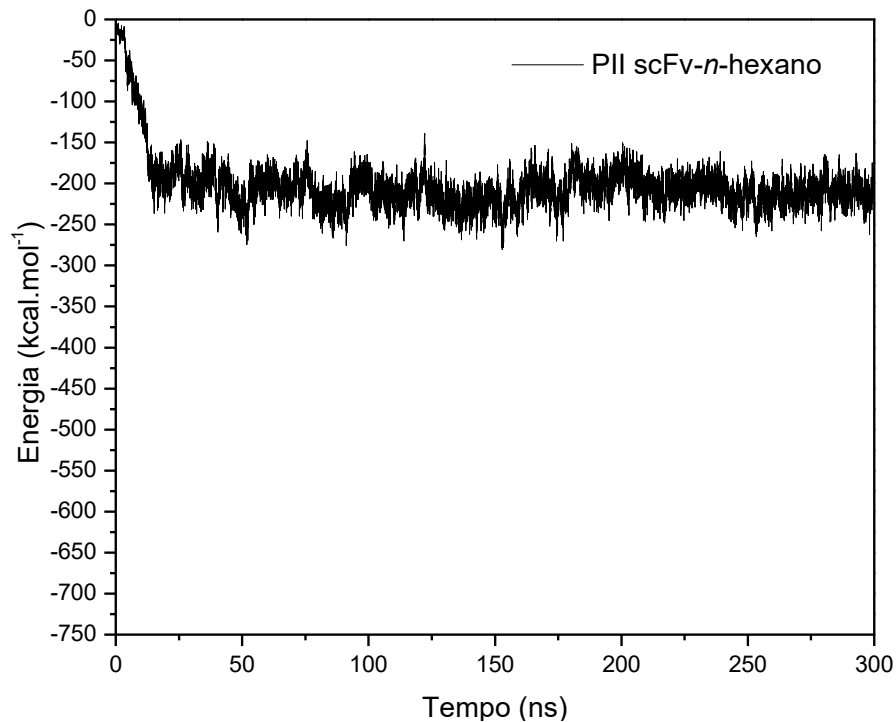
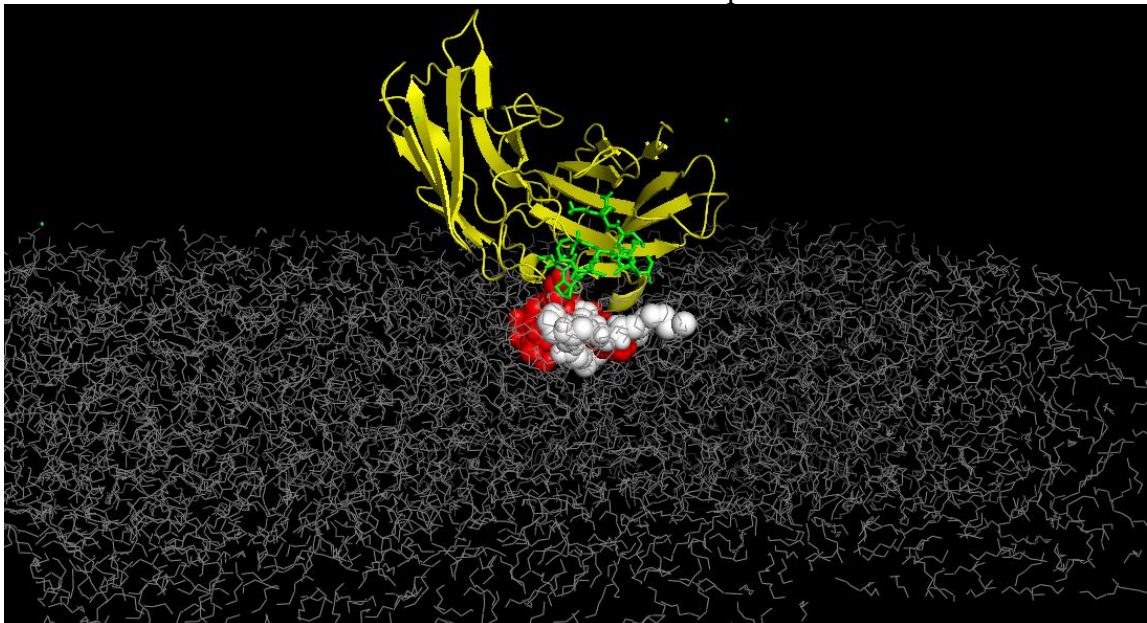


Figura 23 - Estrutura ampliada do scFv em *cartoon* interagindo com CD52 em *n*-hexano. Cinza: *n*-hexano; amarelo: scFv; verde: peptídeo em *stick*; vermelho: açúcar e fosfoetanolamina do GPI em esfera e branco: camada lipídica do GPI em esfera.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Os perfis do PII entre o scFv e os componentes do CD52 na interface *n*-hexano/água são mostrados na figura 24. A interação entre o scFv e os componentes do CD52 é atrativa, uma vez que todos os potenciais dos componentes são menor que zero. A curva de PII entre

peptídeo-scFv e pept-8-scFv são muito similares, alcança mínimo após 250 ns e mantém forte oscilação até próximo de 250 ns. Essa similaridade entre as curvas denota que a região pept-8 é a que mais interage atrativamente com o scFv e não a região do epítipo. Os perfis também apresentam uma descontinuidade no mesmo período visto na curva de RMSD, por volta de 250 ns, com aumento da interação atrativa do pept-8 pelo scFv. Os PII médios entre pept-8-scFv entre 50 ns e 245 ns é de $-23,5 \pm 15,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (tabela 6). Após 250 ns, o PI médio passa a ser de $-111,0 \pm 28,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$. O menor PII após 250 ns em conjunto com a mudança estrutural na região de pept-8 define que ocorreu uma mudança estrutural dessa região do peptídeo do CD52 para realçar a interação com o scFv.

O perfil do PII entre epítipo-scFv revela que a interação se mantém durante quase toda a simulação com PII médio de $-22,2 \pm 9,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (tabela 6), o que infere uma interação menos atrativa epítipo-scFv que pept-8-scFv. A interação entre o scFv e o GPI é também atrativa, com PII médio de $-96,6 \pm 10,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (tabela 6), após 50 ns. Esse PII infere que a interação do GPI com o scFv é mais atrativa que a interação do peptídeo com o scFv (PII médio de $-42,4 \pm 16,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) (tabela 6) até 250 ns de simulação. Após esse momento, o peptídeo passa a ter um PII mais atrativo pelo scFv ($-132,8 \pm 29,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) que o GPI.

Figura 24 - Curva do potencial de interação intermolecular entre os átomos do scFv e os átomos dos componentes do CD52 em interface *n*-hexano/água. $r_{cut} = 1,3 \text{ nm}$.

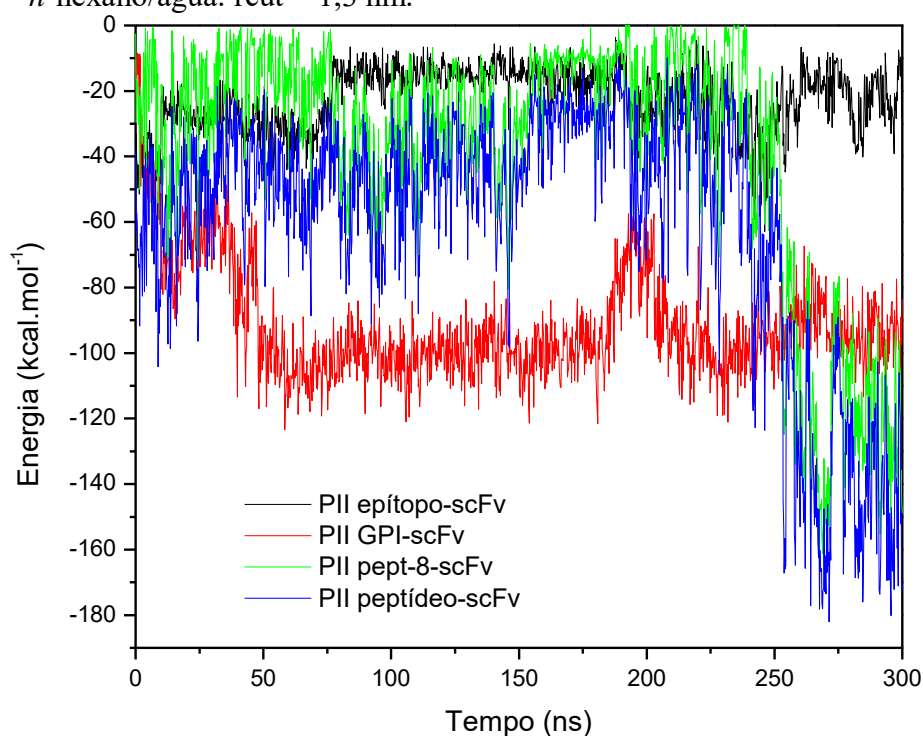


Tabela 6 – PII médios e desvios, calculados a partir do momento que se atinge o equilíbrio (t_{eq}), para a interação entre os componentes do CD52 (epítopo, pept-8, peptídeo e GPI) e o scFv.

Interação	PII médio \pm Desvio (kcal.mol⁻¹)	t_{eq} (ns)
epítopo-scFv	-22,2 \pm 9,6	0
pept-8-scFv	-23,5 \pm 15,5	50
peptídeo-scFv	-42,4 \pm 16,3	50
GPI-scFv	-96,6 \pm 10,6	50

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Nos sistemas com *n*-hexano e com DMPC, as regiões de maior importância para a interação anticorpo-antígeno são as regiões CDR H2, L1 e L3, com resíduos carregados positivamente possuindo energias potenciais mais atrativas, apesar de os resíduos das CDR L1 e L3 não apresentarem potencial de interação tão atrativos (figura 25A) quanto mostrado na figura 16A. Para esse sistema, apenas a CDR H1 apresentou grande potencial repulsivo (figura 25A), devido à presença do resíduo negativo Asp31.

Os resíduos carregados positivamente da CDR H2 (Arg52 e Lys67) e o Asp137 contribuem para uma interação atrativa do scFv com o GPI (figura 27), onde é observado resíduos com PII < 0 (figura 25B). Os PIIs entre esses resíduos e o GPI revelam uma maior atratividade em relação aos observados no sistema com DMPC (Arg52, Ala55, Lys56 e Asp137). Além disso, foram detectados os resíduos Gln163 e Asp166 (CDR L1) com PII atrativos, que não foram observados no sistema com o DMPC. Portanto, essa comparação entre os PII dos dois sistemas mostra que a interface *n*-hexano/água permite uma maior interação do scFv com o GPI, em relação ao DMPC.

A figura 26 mostra a representação da interface que inclui a interação entre os resíduos Lys54, interagindo com os resíduos Asp3, Asp4, Thr5; e Lys56 do scFv, interagindo com a Ser12 do peptídeo do CD52. A Lys 54, em interface *n*-hexano/água, não interage com resíduos do epítopo, mas sim com resíduos do pept-8. O que é explicado pela maior movimentação do peptídeo, permitindo que o scFv interaja com outras regiões do peptídeo além do epítopo.

Figura 25 - A) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com o peptídeo do CD52 inserido em *n*-hexano com $r_{cut} = 0,5$ nm. B) Distribuição de PII entre cada resíduo do scFv com a âncora de GPI. Os retângulos coloridos delimitam as regiões CDRs. Verde: H1; rosa: H2; laranja: H3; roxo: L1 e vermelho: L3.

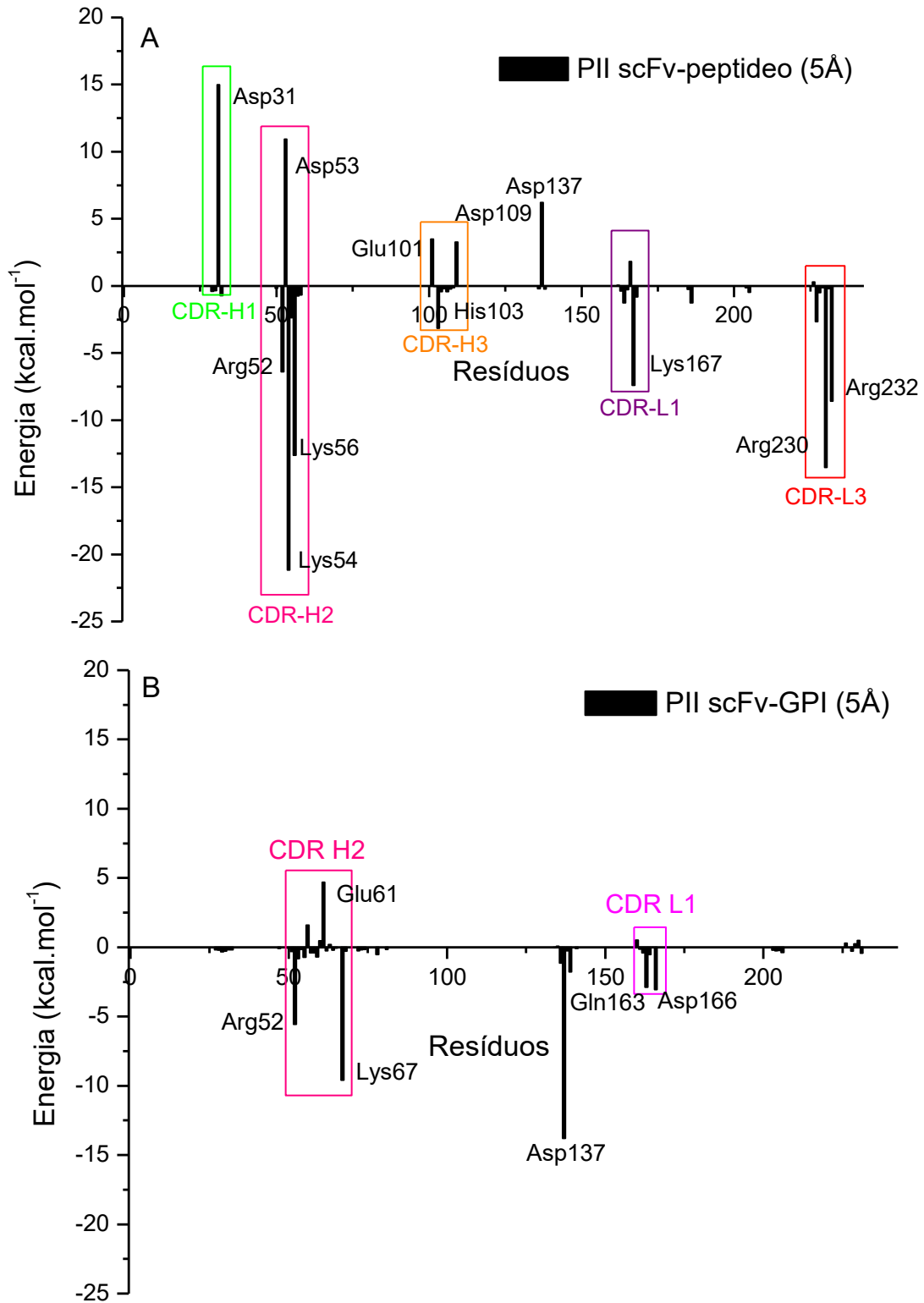
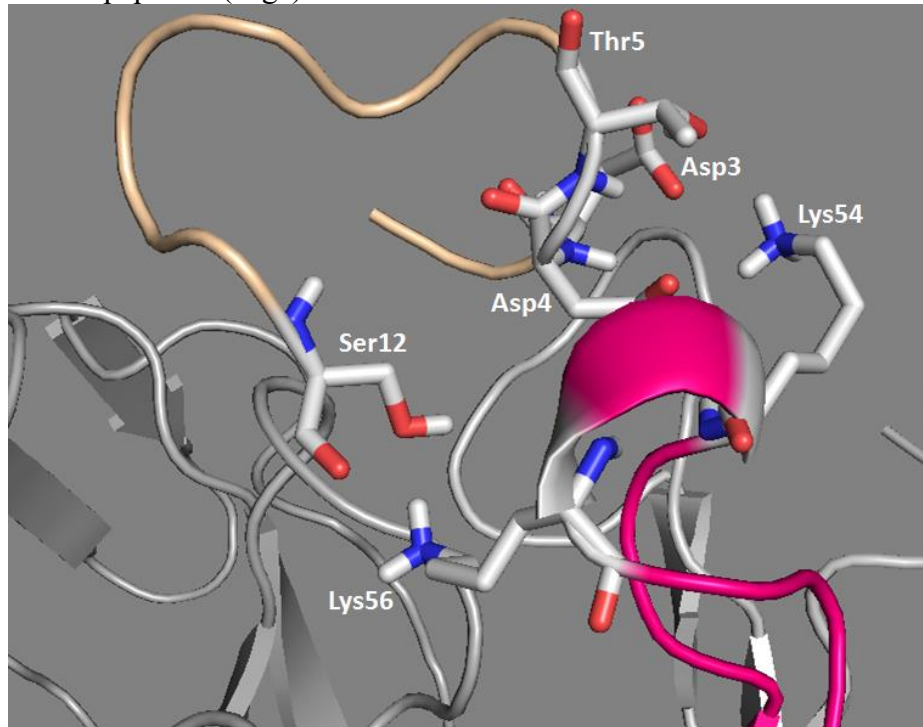
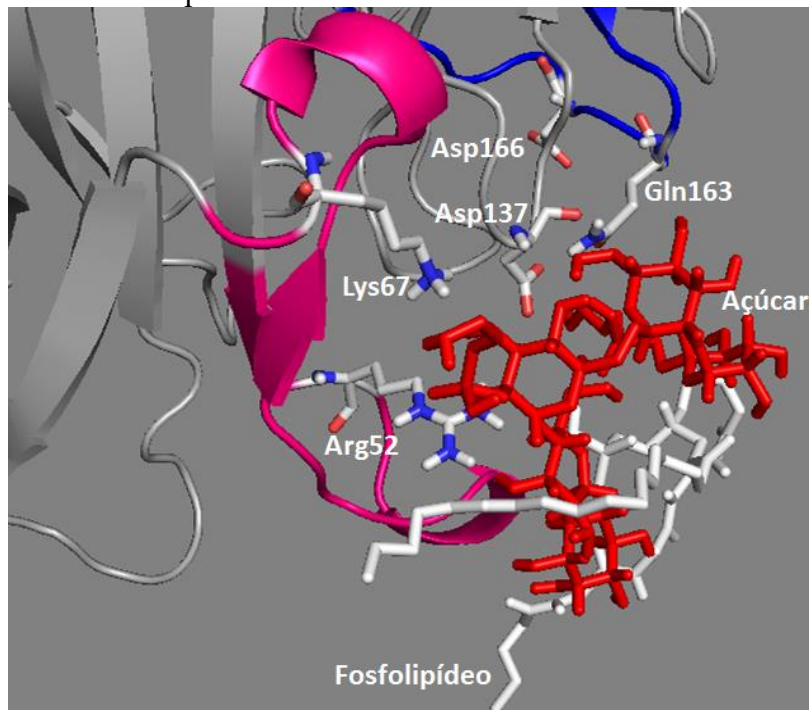


Figura 26 - Representação em *cartoon* da interface de interação scFv-CD52, evidenciando a interação dos resíduos Lys54 e Lys56 em *stick* da CDR H2 (rosa) do scFv com os resíduos Asp3, Asp4 e Thr5 e Ser12 em *stick* do peptídeo (bege) do CD52.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

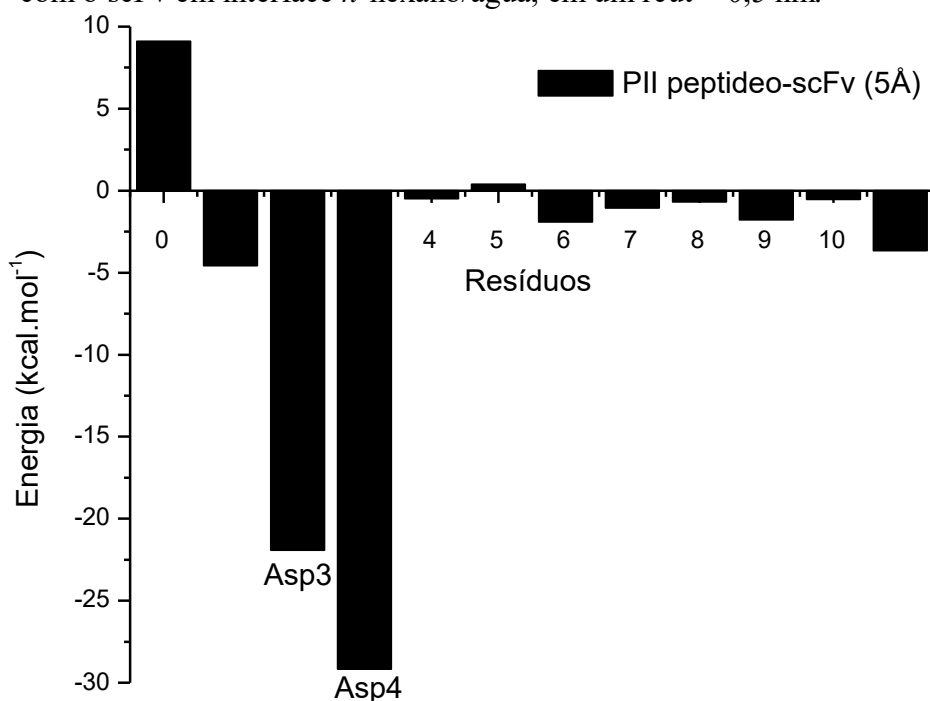
Figura 27 - Representação da interface de interação scFv-CD52, evidenciando resíduos das CDRs que interagem com o GPI do CD52. Cinza: scFv; rosa: H2; azul: L1; vermelho: açúcar do GPI e branco: cadeia lipídica do GPI.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A figura 28 mostra a distribuição de PII de cada resíduo do peptídeo interagindo com o scFv em interface *n*-hexano/água. Os resíduos do peptídeo, em geral, apresentam um potencial que representa uma interação mais atrativa em relação ao sistema com DMPC. Isso ocorre devido ao peptídeo estar mais livre em *n*-hexano, assim interage mais com o scFv. Os resíduos que apresentaram menor energia de interação também foram Asp3 (-21,91 kcal.mol⁻¹) e Asp4 (-29,16 kcal.mol⁻¹), sendo os resíduos que mais contribuem para a interação com o scFv.

Figura 28 - Potencial de interação de cada resíduo do peptídeo do CD52 com o scFv em interface *n*-hexano/água, em um $r_{cut} = 0,5$ nm.



5 CONCLUSÃO

O scFv do anticorpo Alemtuzumab, construído a partir dos dados cristalográficos do Fab (PDB 1CE1), se mostrou estável em água. Foi observada uma mudança da posição relativa entre VH-VL, com manutenção das estruturas de VH e VL. A estrutura e topologia do CD52 foram obtidas e ele se mostrou estável nas simulações de DM.

O modelo de membrana de DMPC em bicamada de fosfolípido é eletricamente neutro, uma vez que o DMPC é formado por cabeças polares compostas dos grupos colina (carregado positivamente) e fostato (negativamente). A estruturação característica da

bicamada de fosfolipídios do DMPC dificulta a movimentação do GPI, principalmente a difusão lateral, e dificulta, também, o maior contato entre o scFv e o GPI. Da mesma forma, esse modelo de membrana dificulta a aproximação dos resíduos do scFv e o CD52. A interface *n*-hexano/água realçou a interação do scFv com o CD52, permitindo uma maior aproximação scFv-GPI em relação ao modelo de DMPC. Isso possibilitou identificar resíduos da CDR L1, que interagem com o GPI, que não haviam sido observados no sistema com o DMPC. O *n*-hexano permitiu uma maior movimentação do GPI que o DMPC, o que realçou a interação atrativa entre o GPI e o scFv no sistema com interface *n*-hexano/água.

A partir das análises do Potencial de Interação Intermolecular (PII) e estruturais na formação do complexo scFv-CD52, foi possível determinar as regiões CDR do scFv que mais contribuem para a interação com o CD52 (CDR H2, L1 e L3) nos dois sistemas analisados. Além disso, foi possível também determinar os resíduos de maior interação entre o complexo scFv-CD52, os resíduos com carga positiva foram os que mais contribuíram para a atração scFv-CD52. Já os resíduos com carga negativa contribuíram para uma repulsão.

Portanto, a metodologia e abordagens utilizadas para se analisar a interação scFv-CD52 permitiram identificar resíduos-chave para realçar a afinidade do anticorpo Alemtuzumab pelo CD52. As sugestões de mutações de resíduos não foram apresentadas no seguinte trabalho em decorrência de necessidade de manutenção do sigilo para garantia da propriedade intelectual.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 2012.
- ABHINANDAN, K. R.; MARTIN, A. C. R. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 14, p. 3832–3839, 2008.
- ABRAHAM, M.; HESS, B.; SPOEL, D. VAN DER; LINDAHL, E. **GROMACS USER MANUAL**. 2013.
- ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; *et al.* scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–15, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/980250/>>. .
- ALASTAIR, D.; COMPSTON, S.; KINGDOM, U.; *et al.* Alemtuzumab vs. Interferon Beta-1a in Early Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 17, p. 1786–1801, 2008. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0802670>>. .
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. 1987.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JCPSA6/v81/i8/p3684/s1&Agg=doi%5Cnpapers2://publication/doi/10.1063/1.448118>>. .
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. **Intermolecular Forces**, p. 331, 1981.
- BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. VAN DER; DRUNEN, R. VAN. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; *et al.* The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BROWNE, P.; CHANDRARATNA, D.; ANGOOD, C.; *et al.* Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022–1024, 2014. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0000000000000768>>. .
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.
- CHEETHAM, G. M.; HALE, G.; WALDMANN, H.; BLOOMER, A. C. Crystal structures of a rat anti-CD52 (CAMPATH-1) therapeutic antibody Fab fragment and its humanized

counterpart. **Journal of molecular biology**, v. 284, n. 1, p. 85–99, 1998.

CHOTHIA, C. .; LESK, A. M. Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, p. 901–917, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283687904128?via%3Dihub>>. .

COHEN, J. A.; COLES, A. J.; ARNOLD, D. L.; *et al.* Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis : a randomised controlled phase 3 trial. , v. 6736, n. 12, p. 1–10, 2012.

DOMAŃSKI, J.; STANSFELD, P. J.; SANSOM, M. S. P.; BECKSTEIN, O. Lipidbook: A public repository for force-field parameters used in membrane simulations. **Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 3, p. 255–258, 2010.

DYER, M. J. S.; HALE, G. .; HAYHOE, F. G. J. .; WALDMANN, H. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. **Blood**, v. 73, n. 6, p. 1431–1439, 1989. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/73/6/1431>>. .

EPP, O.; LATTMAN, E. E.; SCHIFFER, M.; HUBER, R.; PALM W. The molecular structure of a dimer composed of the variable portions of the Bence-Jones protein REI refined at 2.0-Å resolution. **Biochemistry**. Nov, v. 414, n. 22, p. 4943–52, 1975.

ERMINI, L.; SECCIANI, F.; SALA, G. B. LA; *et al.* Different glycoforms of the human GPI-anchored antigen CD52 associate differently with lipid microdomains in leukocytes and sperm membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 2, p. 1275–1283, 2005.

GARNOCK-JONES, K. P. Alemtuzumab: A review of its use in patients with relapsing multiple sclerosis. **Drugs**, v. 74, n. 4, p. 489–504, 2014.

GILLILAND, L. K.; WALSH, L. A.; FREWING, M. R.; *et al.* Elimination of the Immunogenicity of Therapeutic Antibodies. **J Immunol**, v. 162, p. 3663–3671, 1998. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/162/6/3663>>. .

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714–2723, 1997.

GUNSTEREN, W. F. VAN; DOLENC, J.; MARK, A. E. Molecular simulation as an aid to experimentalists. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 2, p. 149–153, 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0959440X07002072/1-s2.0-S0959440X07002072-main.pdf?_tid=7673150c-f2d3-11e6-9580-00000aab0f6b&acdnat=1487090252_a4cf082069a37e7e80d59872fe31ab54>. .

HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 6, p. 788–794, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=362131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

HALE, G. Synthetic peptide mimotope of the CAMPATH-1 glycoprotein. **Peptides**, v. 1, p. 175–187, 1995.

HALE, G. The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies. **Cytotherapy**, v.

3, n. 3, p. 137–43, 2001.

HALE, G.; CLARK, M. R.; MARCUS, R.; *et al.* Remission Induction in Non-Hodgkin Lymphoma With Reshaped Human Monoclonal Antibody Campath-1H. **The Lancet**, v. 332, n. 8625, p. 1394–1399, 1988.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; GUNSTEREN, W. F. VAN. Molecular dynamics simulations. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 190, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959496>>. .

HARTUNG, H.-P.; AKTAS, O.; BOYKO, A. N. Alemtuzumab: A new therapy for active relapsing-remitting multiple sclerosis. **Multiple sclerosis Journal**, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344374>>. .

HEDERER, R.; GUNTERMANN, C.; MILLER, N.; *et al.* The CD45 tyrosine phosphatase regulates Campath-1H (CD52)-induced TCR-dependent signal transduction in human T cells. **International Immunology**, v. 12, n. 4, p. 505–516, 2000. Disponível em: <<http://intimm.oxfordjournals.org/content/12/4/505.short>>. .

HESS, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116–122, 2008.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H](http://doi.wiley.com/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H)>. .

HESS, B.; KUTZNER, C.; SPOEL, D. VAN DER; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.

HOSPITAL, A.; GOÑI, J. R.; OROZCO, M.; GELPÍ, J. L. Molecular dynamics simulations: advances and applications. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry : AABC**, v. 8, p. 37–47, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604800><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4655909>>. .

HU, Y.; TURNER, M. J.; SHIELDS, J.; *et al.* Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. **Immunology**, v. 128, n. 2, p. 260–270, 2009.

HUANG, K. **Statistical Mechanics, 2nd Edition**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 1987.

JAMES, L. C.; HALE, G.; WALDMANN, H.; BLOOMER, A. C. 1.9 A structure of the therapeutic antibody CAMPATH-1H fab in complex with a synthetic peptide antigen. **Journal of molecular biology**, v. 289, n. 2, p. 293–301, 1999.

JONES, J. L.; COLES, A. J. Mode of action and clinical studies with alemtuzumab. **Experimental Neurology**, v. 262, n. Part A, p. 37–43, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.018>>. .

KANDA, H.; WATANABE, T. Engineered antibodies. **Biotherapy**, v. 10, n. 2, p. 106–113, 1996.

KARIM, H. A. A.; TAYAPIWATANA, C.; NIMMANPIPUG, P.; *et al.* Molecular Dynamics Simulation on Designed Antibodies of HIV-1 Capsid Protein (p24). , p. 85–88, 2015.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nsb0902-646>>. .

KUKOL, A. Lipid models for united-atom molecular dynamics simulations of proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 5, n. 3, p. 615–626, 2009.

LINDAHL, E.; HESS, B. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **J Mol Model**, v. 7, n. 1, p. 306–317, 2001.

MALDE, A. K.; ZUO, L.; BREEZE, M.; *et al.* An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4026–4037, 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ct200196m>>. .

MARTIN, R.; SOSPEDRA, M.; ROSITO, M.; ENGELHARDT, B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. , p. 2078–2090, 2016.

MARTÍNEZ, L.; ANDRADE, R.; BIRGIN, E. G.; MARTÍNEZ, J. M. Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 13, p. 2157–2164, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DOENÇAS E AGRAVOS TRATADOS PELO COMPONENTE ESPECIALIZADO DA ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA. , 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/20/tabela-de-situa----es-cl--nicas-fevereiro2015.pdf>>. .

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.540130805/abstract>>. .

MOHAMMADI, M.; NEJATOLLAHI, F. . 3D STRUCTURAL MODELING OF NEUTRALIZING SCFV AGAINST GLYCOPROTEIN-D OF HSV-1 AND EVALUATION OF ANTIGEN-ANTIBODY INTERACTIONS BY BIOINFORMATIC METHODS. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, n. 4, p. 835–847, 2014. Disponível em: <www.ijpbs.net>. .

MOHAMMADI, M.; NEJATOLLAHI, F.; SAKHTEMAN, A.; ZAREI, N. Insilico analysis of three different tag polypeptides with dual roles in scFv antibodies. **Journal of Theoretical Biology**, v. 402, p. 100–106, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.04.016>>. .

MOREA, V.; TRAMONTANO, A.; RUSTICI, M.; CHOTHIA, C.; LESK, A. M. Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 269–294, 1998. Disponível em: <www.mrc-lmb.cam.ac.uk/tcb/pdf/chc/125_jmb_275_269_98.pdf>. .

NELSON, A. L.; REICHERT, J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 331–337, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt0409-331>>. .

NYLANDER, A.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1180–1188, 2012. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22466660&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1172/JCI58649>>. .

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; GUNSTEREN, W. F. VAN. 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**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

PALL, S.; ABRAHAM, M.; KUTZNER, C.; HESS, B.; LINDAHL, E. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. **LNCS**, v. 8759, p. 3–27, 2015.

PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; *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.

RIECHMANN, L.; CLARK, M.; WALDMANN, H.; WINTER, G. Reshaping human antibodies for therapy. **Nature**, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/332323a0>>. .

RYCKAERT, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977. Disponível em: <physics.ujep.cz/~mlisal/md/shake.pdf>. .

SAUL, F. A.; AMZEL, L. M.; POLJAK, R. J. Preliminary refinement and structural analysis of the Fab fragment from human immunoglobulin New at 2.0 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 2, p. 585–597, 1978.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. OCT, p. 1–13, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792396/>>. .

SOMERFIELD, J.; HILL-CAWTHORNE, G. A.; LIN, A.; *et al.* A Novel Strategy To Reduce the Immunogenicity of Biological Therapies. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 763–768, 2010. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000422>>. .

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

TREUMANN, A.; LIFELY, M. R.; SCHNEIDER, P.; FERGUSON, M. A J. Primary structure of CD52. **Journal of Biological Chemistry**, 1995.

VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physical Review**, v. 159, n. 1, p. 98–103, 1967.

WANG, T.; DUAN, Y. Probing the stability-limiting regions of an antibody single-chain variable fragment: A molecular dynamics simulation study. **Protein Engineering, Design and**

Selection, v. 24, n. 9, p. 649–657, 2011.

WATANABE, T.; MASUYAMA, J. ICHI; SOHMA, Y.; *et al.* CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4⁺ regulatory T cells. **Clinical Immunology**, v. 120, n. 3, p. 247–259, 2006.

WILLIAMS, T.; COLES, A.; AZZOPARDI, L. The outlook for alemtuzumab in multiple sclerosis. **BioDrugs**, v. 27, n. 3, p. 181–189, 2013.

XIA, M. Q.; TONE, M.; PACKMAN, L.; HALE, G.; WALDMANN, H. Characterization of the CAMPATH-1 (CDw52) antigen: biochemical analysis and cDNA cloning reveal an unusually small peptide backbone. **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 7, p. 1677–1684, 1991.

XIA, M. Q. .; HALE, G. .; WALDMANN, H. Efficient complement-mediated lysis of cells containing the CAMPATH-1 (CDw52) antigen. **Molecular Immunology**, v. 30, n. 12, p. 1089–1096, 1993a.

XIA, M. Q.; HALE, G.; LIFELY, M. R.; *et al.* Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. **The Biochemical journal**, v. 293, n.3, p. 633–640, 1993b.