



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

**ANA JÚLIA FERREIRA LIMA**

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DA INTERAÇÃO  
DO SCFV DO ANTICORPO FMC63 COM O RECEPTOR DE MEMBRANA CD19**

**FORTALEZA**

**2019**

ANA JÚLIA FERREIRA LIMA

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DA INTERAÇÃO DO  
SCFV DO ANTICORPO FMC63 COM O RECEPTOR DE MEMBRANA CD19

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 Técnico-Científico: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L696m Lima, Ana Julia Ferreira.

Modelagem e simulação de dinâmica molecular da interação do scFv do anticorpo FMC63 com o receptor de membrana CD19 / Ana Julia Ferreira Lima. – 2019.  
60 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.

1. scFv. 2. FMC63. 3. CD19. 4. CAR. 5. Dinâmica Molecular. I. Título.

CDD 661

---

ANA JÚLIA FERREIRA LIMA

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DA INTERAÇÃO DO  
SCFV DO ANTICORPO FMC63 COM O RECEPTOR DE MEMBRANA CD19

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**

---

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

---

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

---

Me. Ana Virgínia Frota Guimarães  
Fundação Oswaldo Cruz Ceará (Fiocruz/CE)

À Deus.

À minha família e aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pelo dom da vida e por cada novo dia me conceder uma nova oportunidade de ser uma pessoa melhor.

Aos meus amados pais, **Fernando** e **Antônia**, por serem os meus exemplos e maiores incentivadores, os quais desde cedo investiram na minha educação e que me ajudaram a ir além. Agradeço por todo amor e dedicação em todos os momentos. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu amado irmão, **Fernando**, por todo o companheirismo e apoio.

Aos meus queridos avós, **Manuel** e **Francisca**; **Mario** e **Fátima**, por serem meus segundos pais, aos quais eu tenho imenso amor e gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Marcos Roberto Lourenzoni**, por todos os ensinamentos, por ter instigado em mim o interesse nessa área, pela paciência e pela excelente orientação.

Ao Prof. Dr. **André Luis Coelho da Silva**, por contribuir com a minha formação no curso de Biotecnologia, por todos os ensinamentos e pelas importantes contribuições e sugestões ao trabalho.

A Me. **Ana Virgínia Frota**, por ter disponibilizado o seu tempo para participar da banca examinadora e por todo o auxílio e contribuição no trabalho.

Ao meu namorado, **Davi Gadelha**, por sempre me apoiar, compreender, incentivar e sonhar os meus sonhos junto comigo.

Aos amigos que fiz durante o curso, com os quais compartilhei tantos momentos e aprendi tantas coisas, especialmente ao **João Victor Alves**, pela sua valiosa amizade.

Aos colegas de trabalho, que sempre estão dispostos a ajudar, a compartilhar conhecimentos, a crescer juntos e a tornar o ambiente de trabalho mais leve e descontraído. Em especial à **Natália Fernandes**, por todos os ensinamentos, paciência e auxílio durante todo esse período de muitos aprendizados.

Aos **professores** do curso de Biotecnologia, por toda dedicação e por todo o conhecimento repassado, em especial ao Prof. Dr. **Márcio Viana Ramos**, com o qual aprendi muitas coisas.

A **Fundação Oswaldo Cruz-CE** pela oportunidade de estágio e pelos recursos cedidos.

A todos os meus **familiares** e **amigos**, por me acompanharem, incentivarem e compartilharem comigo a vida.

“Comece fazendo o que é necessário, então faça o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”, São Francisco de Assis.

## RESUMO

Uma nova classe de imunoterápicos para o tratamento de câncer (células CAR-T) se baseia na utilização de células T derivadas do paciente que são engenheiradas para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR). O CAR é responsável por redirecionar a ação das células T contra células malignas que expressem um antígeno específico que será reconhecido. O receptor de membrana CD19 é um dos principais alvos dos imuterápicos por ser uma molécula amplamente expressa em malignidades de células B. A estrutura do CAR responsável por reconhecer um antígeno, normalmente é composta por um fragmento variável de cadeia única (scFv). Para possibilitar a proposição de melhorias na ação de células T que expressam o CAR, é necessário compreender inicialmente como se dá a interação entre o scFv e o antígeno alvo, tendo em vista que se trata do mecanismo central que ativa a resposta citotóxica. O scFv deste estudo é composto pelos domínios variáveis da cadeia leve ( $V_L$ ) e pesada ( $V_H$ ) derivados de um anticorpo murino, o FMC63, os quais são conectados por um *linker*  $(G_4S)_3$ . A molécula de CD19 do estudo possui a estrutura depositada no PDB, código 6AL5. A estrutura do scFv e os *loops* faltantes na molécula 3D do CD19 foram modeladas através do programa *Modeller 9.20* para que posteriormente as estruturas fossem submetidas à simulação de Dinâmica Molecular (DM), ambas durante 300 ns. Posteriormente, o sistema de interação entre scFv e CD19 foi construído, por meio de um docking através do programa *Haddock 2.2*. O sistema scFv-CD19 foi então submetido à simulação de DM durante 1800 ns. O desvio médio da raiz quadrada (RMSD) das estruturas que compõem o sistema e o Potencial de Interação Intermolecular (PII) da interação scFv-CD19 foram avaliados durante a simulação. Observou-se uma mudança na conformação do  $V_L$  entre 550 ns e 1150 ns. A estrutura do CD19 apresentou a mesma média e desvio de RMSD quando simulado sozinho e quando simulado juntamente com o scFv, indicando que a presença do scFv não afeta de forma considerável o seu equilíbrio estrutural. A análise do PII evidenciou uma interação fortemente atrativa entre as estruturas, até aproximadamente 1100 ns, onde foi possível observar que as CDRs que interagem de forma mais atrativa são as CDRs H2 e H3. Por meio dessa pesquisa foi possível observar que o scFv derivado do anticorpo FMC63 perde a interação com o epítipo de reconhecimento do CD19 e que esse comportamento pode ser uma vantagem para a sua utilização na estrutura dos CARs que são utilizados comercialmente, uma vez que estes interagem com o CD19 presente na membrana das células cancerígenas, mas apenas temporariamente.

**Palavras-chave:** scFv. FMC63. CD19. CAR. Dinâmica Molecular.

## ABSTRACT

A new class of cancer treatment immunotherapy (CAR-T cells) is based on the use of patient-derived T cells that are genetically modified to express a chimeric antigen receptor (CAR). This CAR is responsible for redirect the T cells action against malignant cells that express a specific antigen. The CD19 receptor is a target for immunotherapies because it is a molecule widely expressed in B-cell malignancies. The CAR structure responsible for recognizing an antigen is usually composed of a single-chain variable fragment (scFv). To enable the improvement proposition in the action of CAR-expressing T cells, it is first necessary to understand how the interaction between scFv and the target antigen occurs, considering that it is the central mechanism that activates the cytotoxic response. The scFv of this study is composed of light ( $V_L$ ) and heavy ( $V_H$ ) chain variable domains derived from a murine antibody, FMC63, which are connected by a linker  $(G_4S)_3$ . The crystal structure of the CD19 extracellular domain used in this study has the structure deposited in the PDB, code 6AL5. The Modeller 9.20 program was used to model the scFv structure and the missing loops in the CD19 molecule. Both structures were submitted to molecular dynamics (MD) simulation for 300 ns. Subsequently, the interaction system between scFv and CD19 was constructed by molecular docking through Haddock 2.2 program. The scFv-CD19 system was obtained and simulated for 1800 ns. The molecules structural stability was determined by the root-mean-square deviation (RMSD). The Intermolecular Interaction Potential (IIP) between scFv and CD19 was measured along the simulation. There was a relative  $V_L$  conformation change observed between 550 ns and 1150 ns. The CD19 structure showed the same RMSD when simulated alone and when simulated together with scFv, indicating that the presence of scFv does not significantly affect its structural equilibrium. The IIP analysis showed a strong attractive interaction between the structures until approximately 1100 ns, where it was possible to observe that the most attractive interaction CDRs are H2 and H3 CDRs. Thus, it was possible to observe that scFv derived from antibody FMC63 lose the interaction with CD19 recognition epitope and that this behavior can be an advantage for its use in the structure of commercially used CARs since they interact with CD19 in the membrane of cancer cells, but only temporarily.

**Keywords:** scFv. FMC63. CAR. CD19. Molecular Dynamics.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação estrutural de um anticorpo da classe IgG. Verde: Cadeia Leve ( $V_L$ : Domínio variável da cadeia leve e  $C_L$ : Domínio constante da cadeia leve). Azul: Cadeia Pesada ( $V_H$ : Domínio variável da cadeia pesada e  $C_H$ : Domínio constante da cadeia pesada).....20
- Figura 2 - Representação estrutural de um scFv, identificando a união dos domínios  $V_L$  e  $V_H$  de um anticorpo por uma sequência polipeptídica denominada de *linker*.....21
- Figura 3 – Estrutura tridimensional do domínio extracelular do CD19 em cartoon (Código PDB 6AL5). A estrutura está colorida de acordo com as cores do arco-íris desde o azul (N-terminal) até o vermelho (C-terminal). As regiões em cinza representam os *loops* que não foram possíveis identificar na densidade eletrônica. As ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína estão representadas em sticks amarelos e as regiões identificadas por esferas representam os possíveis sítios de ligação à carboidratos N-ligados.....24
- Figura 4 - Representação estrutural dos domínios de um CAR de primeira (A), segunda (B) e terceira geração (C). Domínio de reconhecimento ao antígeno: scFv ( $V_L$ -*linker*- $V_H$ ); Espaçador; Domínio Transmembrana; Domínio de sinalização: CD3 $\zeta$ ; Domínio co-estimulatório: CD28/4-1BB.....26
- Figura 5 - Gráfico de Ramachandran obtido através do servidor online *Procheck* identificando a qualidade estereoquímica dos aminoácidos do modelo do scFv obtido através do *Modeller*.....38
- Figura 6 - Curva de RMSD dos  $C\alpha$  dos componentes do scFv em água durante os 300 ns de simulação. Laranja:  $V_L$ - $V_H$ . Magenta:  $V_L$ . Azul escuro:  $V_H$ .....39
- Figura 7 – Estrutura tridimensional do modelo de scFv construído representada em cartoon. (A) Identificação dos domínios  $V_L$  (em magenta),  $V_H$  (em azul) e do *linker* (em laranja). (B) Estrutura do scFv com as CDRs identificadas. Vermelho: CDR-L1; Verde: CDR-L2; Azul: CDR-L3; Roxo: CDR-H1; Amarelo: CDR-H2; Laranja: CDR-H3.....40

Figura 8 - Gráfico de Ramachandran obtido através do servidor online <i>Procheck</i> identificando a qualidade estereoquímica dos aminoácidos do modelo do CD19 obtido através do <i>Modeller</i> .....	41
Figura 9 – Estrutura tridimensional do modelo de CD19 completo obtido a partir de modelagem por homologia dos resíduos faltantes no programa <i>Modeller</i> . evidenciando em azul as sequências de resíduos modeladas.....	42
Figura 10 - Curva de RMSD dos C $\alpha$ das configurações estruturais do CD19 completo, da sua estrutura desconsiderando os <i>loops</i> (CD19- <i>loops</i> ) e desconsiderando os <i>loops</i> e a cauda de histidina (CD19- <i>loops</i> -histag), ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura inicial como referência.....	43
Figura 11 – Conformações do CD19 coletadas em 100 ns (azul) e em 200 ns (verde) de simulação, evidenciando a manutenção da estrutura do CD19 e as diferenças estruturais nos <i>loops</i> modelados.....	44
Figura 12 – Estruturas tridimensionais do complexo de interação entre scFv (branco), identificando as CDRs, e CD19 (cinza), identificando os <i>loops</i> correspondentes ao epítipo antigênico ( <i>Loop1</i> : azul claro; <i>Loop2</i> : marrom; <i>Loop3</i> : rosa), obtido através do docking no programa <i>Haddock</i> .....	45
Figura 13 - Curva de RMSD dos C $\alpha$ dos componentes do scFv, do complexo com o CD19, em água durante os 1800 ns de simulação. Laranja: V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> . Magenta: V <sub>L</sub> . Azul escuro: V <sub>H</sub> .....	46
Figura 14 - Conformações do scFv (V <sub>L</sub> +V <sub>H</sub> ) coletadas em 300 ns e em 1000 ns de simulação evidenciando as diferenças estruturais no domínio V <sub>L</sub> que foram observadas no gráfico do perfil de RMSD. Preto: domínio V <sub>H</sub> das duas estruturas sobrepostas. Azul: domínio V <sub>L</sub> em 300 ns. Roxo: domínio V <sub>L</sub> em 1000 ns.....	47
Figura 15 - Curva de RMSD dos C $\alpha$ dos componentes do CD19- <i>loops</i> -histag (molécula de CD19, desconsiderando os resíduos correspondentes aos <i>loops</i> modelados e à cauda de histidina) em água durante os 1800 ns de simulação.....	48

Figura 16 - Curva de RMSD dos C $\alpha$ , no qual foi sobreposto (fit) a estrutura do CD19 e calculado o RMSD para a estrutura do scFv, a fim de observar a movimentação do scFv em relação ao CD19.....	49
Figura 17 - Curva do Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos do scFv e do CD19. Raio de corte = 1,3 nm.....	50
Figura 18 – Estruturas tridimensionais das interações entre o scFv e o CD19 coletadas em 400 ns (na qual o scFv está representado em verde) e em 1500 ns (na qual o scFv está representado de laranja) obtidas sobrepondo-se somente a estrutura do CD19 (representado de cinza, com os <i>loops</i> que compreendem o epítipo antigênico identificados como: <i>Loop1</i> : azul claro; <i>Loop2</i> : marrom; <i>Loop3</i> : rosa).....	51
Figura 19 - Curva do Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos das CDRs do domínio V <sub>L</sub> com o receptor CD19. Raio de corte = 0,8 nm. Vermelho: CDR-L1-CD19; Verde: CDR-L2-CD19; Azul: CDR-L3-CD19.....	52
Figura 20 - Curva do Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos das CDRs do domínio V <sub>H</sub> com o receptor CD19. Raio de corte = 0,8 nm. Roxo: CDR-H1-CD19; Amarelo: CDR-H2-CD19; Laranja: CDR-H3-CD19.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação da sequência de aminoácidos e da numeração do epítipo antigênico do CD19 que é reconhecido pelo anticorpo FMC63.....	22
Tabela 2 - Sequências de aminoácidos utilizados na modelagem das estruturas do scFv. As sequências dos domínios variáveis ( $V_L$ e $V_H$ ) são derivadas do anticorpo murino FMC63.....	34
Tabela 3 - Identificação da sequência de aminoácidos e da numeração dos loops faltantes da estrutura cristalográfica do CD19 que foram modelados através do programa <i>Modeller 9.20</i> .....	36
Tabela 4 - Dados de média e desvio padrão dos valores de RMSD para cada componente do scFv a partir do momento em que atingem equilíbrio estrutural ( $t_{eq}$ ) durante os 300 ns de simulação.....	39
Tabela 5 - Identificação da sequência de aminoácidos e da numeração dos resíduos das CDRs do scFv modelado.....	40
Tabela 6 - Médias e desvios de RMSD calculados para a estrutura completa do CD19 e para as estruturas desconsiderando os loops (CD19-loops) e desconsiderando os loops e a cauda de histidina (CD19-loops-histag), calculados a partir de 200 ns de simulação.....	43
Tabela 7 - Dados de média e desvio padrão dos valores de RMSD para cada componente do scFv durante os 1800 ns de simulação calculadas no período de 10 até 550 ns.....	46
Tabela 8 - Médias e desvios de RMSD calculados para a estrutura do CD19 desconsiderando os loops e a cauda de histidina (CD19-loops-histag), calculados a partir de 200 ns de simulação.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
BCR	Receptor de antígenos de célula B
BLASTp	<i>Basic Local Alignment Search Tool protein</i>
C $\alpha$	Carbono alfa
CAR	Receptores de Antígeno Quiméricos
CD19	<i>Cluster of Differentiation 19</i>
CDR	Regiões Determinantes de Complementariedade
C <sub>H</sub>	Domínio Constante da Cadeia Pesada
C <sub>L</sub>	Domínio Constante da Cadeia Leve
DM	Dinâmica Molecular
DQMD	Desvio Quadrático Médio
Fab	Fragmento de Ligação ao Antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulation</i>
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
kcal	Quilocaloria
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B Refratária
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundo
NPT	Número de partículas, Pressão e Temperatura
NVT	Número de partículas, Volume e Temperatura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PII	Potencial de Interação Intermolecular
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única

$V_L$

Domínio Variável da Cadeia Leve

$V_H$

Domínio Variável da Cadeia Pesada

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alpha
$\delta$	Delta
$\varepsilon$	Épsilon
$\gamma$	Gama
$\kappa$	Kappa
$\lambda$	Lambda
$\pm$	Mais-menos
®	Marca Registrada
$\mu$	Mi
$\varphi$	Phi
$\psi$	Psi
%	Porcentagem
$\zeta$	Zeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Câncer</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 Anticorpos</b> .....	<b>19</b>
<i>1.2.1 Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv)</i> .....	<b>20</b>
<i>1.2.2 FMC63</i> .....	<b>22</b>
<b>1.3 Receptor CD19</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4 Receptores de antígenos quiméricos (CAR)</b> .....	<b>25</b>
<b>1.5 Simulação de Dinâmica Molecular</b> .....	<b>27</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivos gerais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Dinâmica Molecular</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Modelagem e simulação de DM do scFv</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3 Modelagem e simulação de DM do receptor CD19</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4 Montagem e simulação de DM do sistema scFv-CD19</b> .....	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1 Modelagem e Simulação de DM do scFv</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2 Modelagem e Simulação de DM do receptor CD19</b> .....	<b>40</b>
<b>5.3 Montagem e simulação de DM do sistema scFv-CD19</b> .....	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

Câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam uma série de características específicas em comum, as quais incluem a sustentação da sinalização proliferativa e resistência à morte celular programada pelas células. Além disso, essas células podem desenvolver a capacidade de invadir tecidos vizinhos de forma a amplificar a sua proliferação, por meio de um processo conhecido como metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011), o qual é reconhecido como a principal causa de morte nos pacientes com câncer. Sabe-se que há diversos tipos de cânceres, os quais podem ser subdivididos de acordo com o tipo celular onde se originam, em basicamente três classes principais, sendo elas os carcinomas, os quais são originados dos epitélios de revestimento interno e externo; os sarcomas, originados dos tecidos conjuntivos; e os hematopoiéticos e linfóides, nos quais não há, em geral, o surgimento de tumores sólidos, sendo caracterizados como neoplasias malignas que se espalham pela medula óssea, sistema linfático e sangue periférico (INCA, 2019).

Devido à alta incidência dessas malignidades na população mundial, tendo uma estimativa de 600 mil novos casos de câncer por ano em 2018 e em 2019, somente no Brasil (INCA, 2019), são crescentes os estudos que possuem o propósito de desenvolver terapias mais eficazes para tratar essas doenças, assim como para descobrir a cura das mesmas. As três principais terapias utilizadas são a radioterapia, a quimioterapia e até mesmo cirurgias para retirada do tumor (INCA, 2019). Porém, devido à agressividade que essas terapias normalmente apresentam, conferindo inúmeros efeitos colaterais aos pacientes, tem sido crescente o desenvolvimento de estudos que objetivam produzir imunoterapias para o tratamento de cânceres. Em geral, as imunoterapias possuem uma ação mais específica contra as células cancerígenas, diferente do que é observado no tratamento com quimioterápicos e outros agentes, nos quais, muitas vezes, células saudáveis também são afetadas, deixando o paciente imunodeprimido.

As imunoterapias representam uma nova classe de terapia contra o câncer que, além de tratar essas malignidades de forma eficiente, em alguns casos, é capaz, inclusive, de conferir a remissão completa de cânceres avançados (BATLEVI *et al.*, 2016). O modo de ação dos imunoterápicos baseia-se na ativação do sistema imunológico para eliminar as células malignas através dos mecanismos de defesa naturais do organismo (RILEY *et al.*, 2019). Há uma diversidade de classes de imunoterápicos que estão em fase de estudos clínicos e pré-clínicos e alguns já foram, inclusive, aprovados pelos US *Food and Drug Administration* (FDA) para serem utilizados no tratamento contra o câncer.

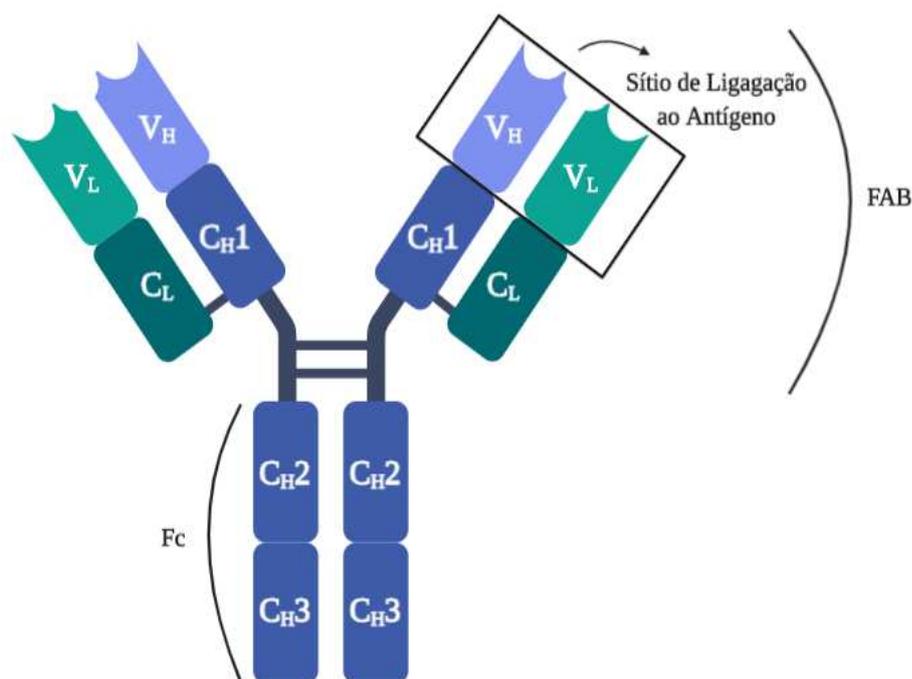
## 1.2 Anticorpos

Anticorpos, ou Imunoglobulinas (Ig), são moléculas de proteínas que desempenham um importante papel na defesa do organismo pelo sistema imune humoral. Essas moléculas são produzidas em resposta a uma estrutura considerada estranha ao organismo, denominada de antígeno, sendo capazes de se ligar especificamente aos antígenos a fim de neutralizá-los para que o hospedeiro possa ser protegido, além de serem capazes de desempenhar funções efetoras secundárias, como recrutar outras moléculas do sistema imune para que a ameaça possa ser efetivamente eliminada (SELA-CULANG *et al.*, 2013). Os anticorpos são expressos pelas células B, podendo estar ancorados na membrana plasmática dessas células, assim como podem ser encontrados solúveis no meio, quando são secretados pelos plasmócitos (células B secretoras de anticorpos) (MURPHY *et al.*, 2010).

Há diferentes classes e subclasses de anticorpos, porém, todos possuem uma estrutura básica em comum, a qual é composta por 4 cadeias que são unidas entre si por ligações dissulfeto e por ligações não covalentes (Figura 1). Essas cadeias são divididas em 2 cadeias leves idênticas entre si (isotipos  $\kappa$  e  $\lambda$ ) e 2 cadeias pesadas idênticas entre si (isotipos  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  e  $\mu$ ). As cadeias foram subdivididas de acordo com a variabilidade da sequência dos resíduos de aminoácidos, onde na cadeia leve, estão presentes o domínio variável da cadeia leve ( $V_L$ ) e o domínio constante da cadeia leve ( $C_L$ ), enquanto que a cadeia pesada é composta por um domínio variável da cadeia pesada ( $V_H$ ) e por três ou quatro domínios constantes da cadeia pesada ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  e  $C_{H4}$ ), dependendo do isotipo de anticorpo (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os domínios  $V_L$  e  $V_H$  correspondem ao sítio de reconhecimento ao antígeno, pois possuem as Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR), que são regiões hipervariáveis as quais interagem de forma específica com um determinado epítipo antigênico, sendo encontradas 3 no domínio  $V_L$  (CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3) e 3 no domínio  $V_H$  (CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3) (GABRIELLI *et al.*, 2009).

Figura 1 - Representação estrutural de um anticorpo da classe IgG. Verde: Cadeia Leve ( $V_L$ : Domínio variável da cadeia leve e  $C_L$ : Domínio constante da cadeia leve). Azul: Cadeia Pesada ( $V_H$ : Domínio variável da cadeia pesada e  $C_H$ : Domínio constante da cadeia pesada).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

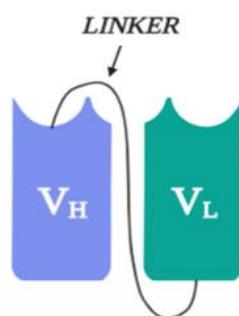
Sabe-se que o anticorpo é uma molécula bifuncional, que apresenta capacidade de se ligar especificamente a um determinado antígeno por meio do domínio de ligação ao antígeno (Fab), o qual é composto pelos domínios  $V_L$ ,  $C_L$ ,  $V_H$  e  $C_H1$ , que, mesmo separados do restante da estrutura, conservam a mesma capacidade de ligação ao antígeno desempenhada pela estrutura do anticorpo completa. Além de desempenhar funções efetoras através do Fragmento Cristalizable (Fc) o qual é formado pelos domínios  $C_H2$ ,  $C_H3$  e/ou  $C_H4$  (JANEWAY *et al.*, 2001). Os anticorpos apresentam uma limitada digestão proteolítica, sendo possível obter fragmentos menores, que contém determinados subconjuntos de domínios, a partir da digestão proteolítica dos anticorpos, os quais podem ter preservada a capacidade de ligação ao antígeno (Fab,  $F(ab')_2$ , Fv, scFv) ou que podem desempenhar as funções efetoras (Fc, hinge) (WINTER, MILSTEIN, 1991).

### 1.2.1 Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv)

Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) (Figura 2) são fragmentos de anticorpos que possuem os domínios  $V_L$  e  $V_H$  derivados de um anticorpo, os quais são conectados e

estabilizados por um polipeptídeo flexível (*linker*) (AHMAD *et al.*, 2012). Domínios  $V_L$  e  $V_H$  de anticorpos são os domínios responsáveis por reconhecer um epítipo expresso em um antígeno de forma bastante específica. Já o *linker* é a porção do scFv responsável por manter a integridade dos domínios  $V_L$  e  $V_H$  de forma a garantir que eles permaneçam ligados para que o reconhecimento do antígeno seja feito da mesma forma que no anticorpo. O *linker* pode variar no tamanho da sua sequência (entre 10-25 resíduos de aminoácidos), sendo normalmente composto por aminoácidos hidrofílicos, a fim de aumentar a solubilidade do scFv. O *linker* mais comumente utilizado é formado pelos aminoácidos glicina e serina  $(G_4S)_3$ , os quais também são responsáveis por garantir flexibilidade (MOHAMMADI *et al.*, 2016).

Figura 2 - Representação estrutural de um scFv, identificando a união dos domínios  $V_L$  e  $V_H$  de um anticorpo por uma sequência polipeptídica denominada de *linker*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

O scFv apresenta vantagens quando comparado à utilização de anticorpos, por serem moléculas menores que preservam a mesma capacidade de ligação ao antígeno, o que melhora o seu potencial de penetração em tumores que são pouco vascularizados (YOKOTA *et al.*, 1992), além de apresentarem um menor tempo de retenção em tecidos não-alvo e uma menor imunogenicidade (D. DAS *et al.*, 2005). Atualmente, estudos focam no desenvolvimento de scFvs humanizados ou até mesmo derivados de anticorpos humanos (SOMMERMEYER *et al.*, 2017), a fim de reduzir os efeitos negativos que podem surgir com a utilização de scFv murinos, como a imunogenicidade. Porém, scFvs derivados de anticorpos murinos, como o FMC63 (ZOLA *et al.*, 1991; NICHOLSON *et al.*, 1997), ainda são bastante utilizados e estudados pelo fato de apresentarem resultados positivos em estudos clínicos.

### 1.2.2 FMC63

O FMC63 é um anticorpo monoclonal murino da classe IgG2a, responsável por reconhecer de forma específica o antígeno CD19, o qual é expresso na membrana dos linfócitos B (ZOLA *et al.*, 1991). Esse anticorpo apresenta um elevado potencial de utilização em imunoterapias. Devido a isso, um scFv derivado do anticorpo FMC63 já está sendo amplamente utilizado como o domínio de reconhecimento ao antígeno na estrutura de CARs (VAN DER STEGEN *et al.*, 2015) para o tratamento de malignidades de células B refratária como LLA-B (TURTLE *et al.*, 2016), LDGCB (NEELAPU *et al.*, 2017) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (PORTER *et al.*, 2015). Apesar da ampla utilização do FMC63 em imunoterápicos, a sua estrutura tridimensional ainda não foi resolvida.

O mecanismo de ação do scFv derivado do FMC63 se baseia no reconhecimento de epítomos presentes na molécula de CD19. Estudos revelam que o epítomo antigênico do CD19 que é reconhecido pelo anticorpo FMC63 corresponde a resíduos de aminoácidos compreendidos em 3 *Loops* diferentes (*Loop 1*, *Loop 2* e *Loop 3*) na estrutura do CD19 (TEPLYAKOV *et al.*, 2018; GHORASHIAN *et al.*, 2019) (Tabela 1). Além disso, sabe-se que a região compreendida pelo exon 4 do receptor CD19, que codifica o *Loop 3*, corresponde ao elemento central de reconhecimento do anticorpo FMC63 (SOMMERMEYER *et al.*, 2017; ORLANDO *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Identificação da sequência de aminoácidos e da numeração do epítomo antigênico do CD19 que é reconhecido pelo anticorpo FMC63.

Epítomo Antigênico	Sequência	Resíduos
<i>Loop 1</i>	LCQPGPPSEKAW	96-107
<i>Loop 2</i>	KLYVWAKDRPEI	155-166
<i>Loop 3</i>	HVHPKGPKS	216-224

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Ambos os medicamentos aprovados pelo FDA baseados na utilização de CARs, Yescarta<sup>®</sup> e Kymriah<sup>®</sup>, para o tratamento de alguns tipos de cânceres, possuem um scFv derivado do anticorpo FMC63 como domínio de reconhecimento ao antígeno (VAIRY *et al.*, 2018; CHAVEZ *et al.*, 2019). Portanto, para obter um melhor entendimento sobre como o reconhecimento de um determinado antígeno por um scFv afeta a ação do CAR, é necessário

realizar estudos básicos para compreender inicialmente como se dá a interação entre o scFv e o CD19, a fim de propor melhorias que possam, inclusive, melhorar a ação dos medicamentos com o objetivo de baratear os custos da sua utilização e de melhorar a resposta do paciente ao tratamento. A técnica de Simulação de Dinâmica Molecular (DM) permite estudar as moléculas ao nível atômico-molecular, o que facilita o estudo da interação do anticorpo com o seu antígeno, por meio do acesso às informações estruturais e energéticas envolvidas nessa interação. Essa técnica já vem sendo amplamente utilizada com esse viés, em que é possível, por exemplo, propor mutações para melhorar a afinidade do anticorpo por seu antígeno (KARIM *et al.*, 2015).

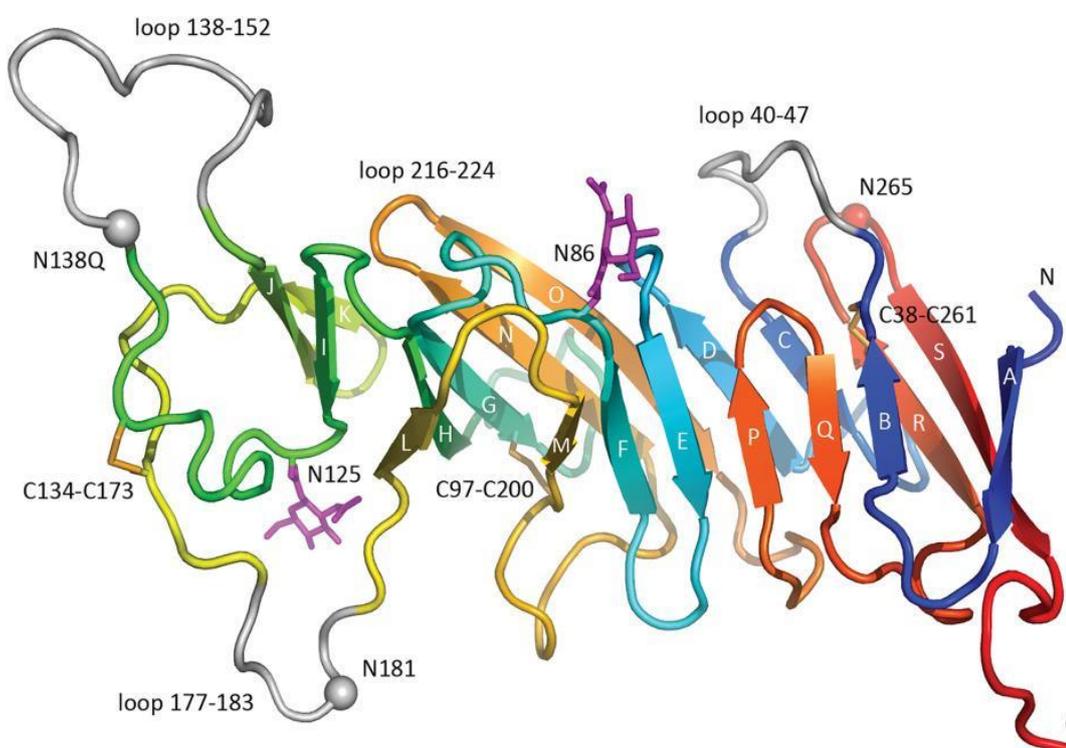
### 1.3 Receptor CD19

Há um sistema denominado de sistema de grupamentos de diferenciação (*cluster of differentiation* - CD), que foi desenvolvido para caracterizar moléculas de superfície celular que são exclusivas para determinada linhagem celular ou estágio de diferenciação celular (ABBAS *et al.*, 2011). O receptor CD19 é uma glicoproteína transmembranar com 95-kDa de massa molecular, composta por 556 resíduos de aminoácido, pertencente à superfamília de imunoglobulina (Ig) (SHINICHI SATO, 1999), que está presente exclusivamente nos linfócitos B, sendo expressa desde as células pré-B até a diferenciação em células plasmáticas, possuindo um importante papel durante o desenvolvimento das células B (FISCHER *et al.*, 2017). O CD19 é expresso tanto em células B normais quanto em leucemias e linfomas de células B, por exemplo. Porém, não está presente em células-tronco hematopoiéticas, células do plasma e outros tecidos saudáveis (OHAD HAMMER, 2012). Essa elevada expressão durante o desenvolvimento dos linfócitos B, faz com que o CD19 seja um alvo promissor para estratégias imunoterápicas contra malignidades presentes nessas células (TEPLYAKOV *et al.*, 2018), pois apresenta-se como um antígeno de fácil acesso para essas terapias. Além disso, algumas outras razões são consideradas para que o CD19 seja escolhido como antígeno alvo para as imunoterapias, como o fato de apresentar uma expressão frequente e de alto nível em linfomas e leucemias de células B em relação a outros alvos, como CD20 e CD22 (SUBKLEWE *et al.*, 2019).

A molécula de CD19 é codificada pelo gene *CD19* que está localizado no cromossomo 16, o qual contém em torno de 15 exons, dos quais, quatro codificam para o domínio extracelular dessa molécula (ZHOU *et al.*, 1992). O CD19 é composto de uma porção citoplasmática de um receptor do tipo Ig, ligado por um domínio transmembrana a dois domínios extracelulares do tipo Ig do tipo C2 (WANG *et al.*, 2012). O domínio extracelular do receptor CD19 possui sítios

de ligação para carboidratos N-ligados e corresponde à região que compreende o epítipo antigênico que é reconhecido por diferentes anticorpos, tendo cada um deles uma região específica de reconhecimento. A estrutura tridimensional (3D) do domínio extracelular do CD19 foi resolvida (Código PDB 6AL5) (Figura 3), onde é possível observar uma molécula composta por duas folhas betas antiparalelas, sendo uma delas de 6 folhas e a outra de 10 folhas.

Figura 3 – Estrutura tridimensional do domínio extracelular do CD19 em cartoon (Código PDB 6AL5). A estrutura está colorida de acordo com as cores do arco-íris desde o azul (N-terminal) até o vermelho (C-terminal). As regiões em cinza representam os *loops* que não foram possíveis identificar na densidade eletrônica. As ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína estão representadas em sticks amarelos e as regiões identificadas por esferas representam os possíveis sítios de ligação à carboidratos N-ligados.



Fonte: Teplyakov *et al.*, 2019

É possível observar que os resíduos de aminoácidos do CD19 com numerações correspondentes a 40-47 (*Loop A*), 138-152 (*Loop B*) e 177-183 (*Loop C*) representam estruturas desordenadas, as quais não foram possíveis identificar na densidade eletrônica, e que as ligações dissulfeto desempenham importante papel na união dos *loops* (TEPLYAKOV *et al.*, 2018).

A molécula de CD19 funciona como um co-receptor que é crítico para a transdução de sinal do receptor de antígenos de células B (BCR). Por meio da co-ligação entre CD19 e BCR,

a liberação de cálcio e a proliferação celular podem ser aumentadas, o que influencia no desenvolvimento e no desempenho da função das células B (LI *et al.*, 2017). Uma expressão anormal do CD19 pode levar a doenças relacionadas às células B. Há estudos que relacionam a resistência de alguns pacientes às imunoterapias específicas para o receptor CD19 com a existência de diferentes isoformas dessa proteína, o que pode acarretar na perda do epítipo que é reconhecido pelos anticorpos. Novos estudos sugerem que uma combinação de terapias que reconhecem diferentes epítipos pode ser uma boa abordagem para atingir a remissão completa em pacientes resistentes (SCHMIDTS; MAUS, 2018).

#### **1.4 Receptores de antígenos quiméricos (CAR)**

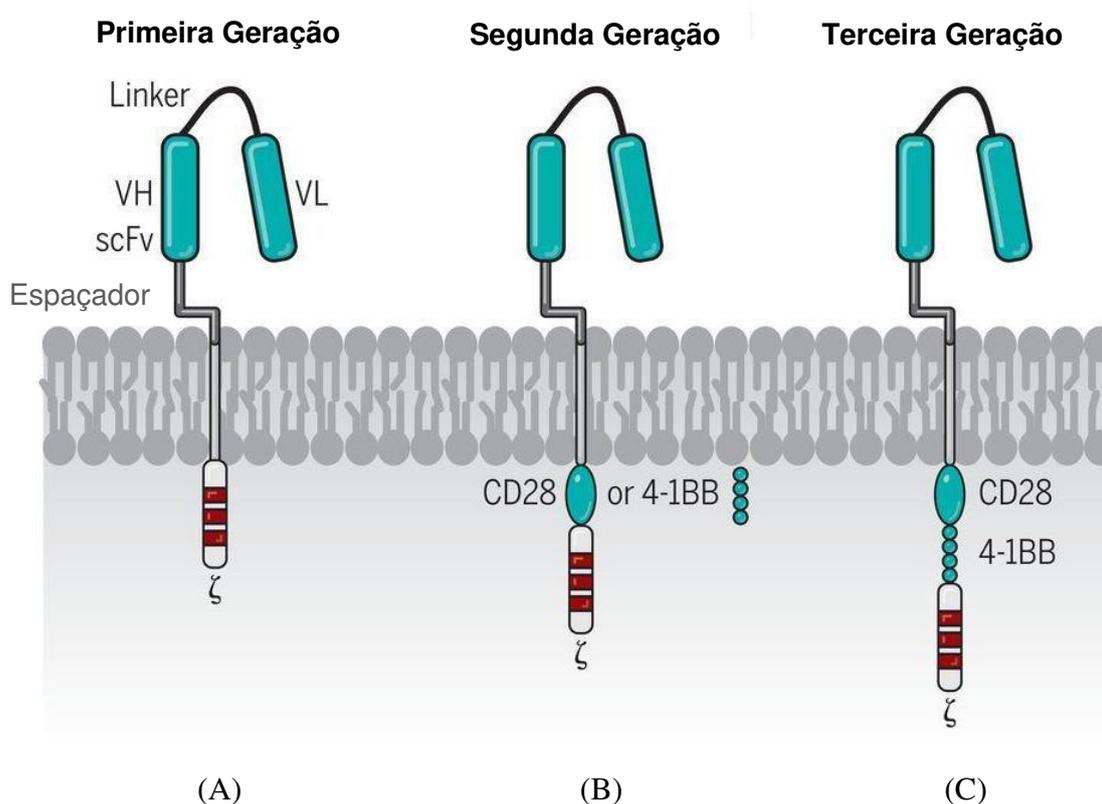
Receptores de antígenos quiméricos (CAR) são moléculas de proteína sintéticas que podem ser expressas, por meio de técnicas de engenharia genética, em células imunológicas, a fim de redirecionar a ação delas contra células alvo, como células cancerígenas, que expressem um determinado antígeno específico que será reconhecido (FEINS *et al.*, 2019), de forma a servir como uma imunoterapia para o tratamento de doenças. Esse redirecionamento se baseia no fato de que os componentes do CAR permitem à célula imunológica desempenhar o reconhecimento de um antígeno tumoral de forma mais específica, fator esse que demanda bastante estudo, a fim de evitar que o antígeno alvo seja compartilhado entre células tumorais e células normais. Por conta disso, terapias que utilizam os CARs, atualmente, são mais frequentemente desenvolvidas para o tratamento de cânceres hematológicos que expressam o antígeno CD19, pois esse antígeno está presente em maior quantidade nas células malignas em relação a células normais e não está presente em células-tronco hematopoiéticas, plasmócitos, células T ou outros tecidos (DAS *et al.*, 2005). A utilização dessa terapia em cânceres com tumores sólidos apresenta maiores dificuldades devido, principalmente, ao microambiente imunossupressivo do tumor e à expressão de diferentes antígenos em sua superfície (SILVA *et al.*, 2019).

O FDA aprovou, em 2017, o emprego de dois medicamentos baseados na utilização de CARs, tisagenlecleucel (Kymriah®) e axicabtagene ciloleucel (Yescarta®), que são expressos em células T derivadas dos pacientes (BAYBUTT *et al.*, 2019) para o tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B Refratária (LLA-B) e Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB), os quais são cânceres hematológicos que expressam, em geral, o antígeno de superfície CD19 nas células B malignas. Esses medicamentos representam um importante avanço no tratamento contra cânceres, pois vêm alcançando resultados promissores, como a

remissão completa do câncer nos pacientes que são submetidos a esse tratamento (SCHUSTER *et al.*, 2015; KOCHENDERFER *et al.*, 2017).

A estrutura do CAR de primeira geração (Figura 4A) é composta de uma porção extracelular que contém um domínio de reconhecimento ao antígeno ligado a um espaçador, seguido de uma sequência transmembrana e uma porção de sinalização intracelular (SALTER *et al.*, 2018), a qual vai ser responsável por ativar a ação citotóxica da célula T contra a célula alvo, a fim de resultar na destruição das células malignas.

Figura 4 - Representação estrutural dos domínios de um CAR de primeira (A), segunda (B) e terceira geração (C). Domínio de reconhecimento ao antígeno: scFv ( $V_L$ -linker- $V_H$ ); Espaçador; Domínio Transmembrana; Domínio de sinalização: CD3 $\zeta$ ; Domínio co-estimulatório: CD28/4-1BB.



Fonte: adaptado de June *et al.*, 2019.

Com o desenvolvimento dos estudos, percebeu-se que ao adicionar um domínio co-estimulatório à porção intracelular, a proliferação, a citotoxicidade e a persistência *in vivo* do CAR aumentavam, levando a uma melhor resposta antitumoral (ZHANG *et al.*, 2017), fazendo com que surgissem a segunda e terceira geração, onde são adicionados ao domínio de

sinalização intracelular, um e dois domínios co-estimulatórios, respectivamente (Figura 4B e 4C). Cada domínio que compõe um CAR influencia significativamente na eficácia e segurança da utilização e ação das células imunológicas que possuem esses receptores (LEE; KIM, 2019). A porção de reconhecimento ao antígeno normalmente é formada por um scFv, pois já estão bem caracterizados em modelos pré-clínicos e já estão sendo utilizados em modelos clínicos (KULEMZIN *et al.*, 2017).

Porém, a utilização de scFvs pode ser limitada, tendo em vista que a sua afinidade pelo antígeno é significativamente maior que a afinidade dos Receptores de Células T (TCR), o que pode interferir na correta sinalização intracelular das células T que ativa a sua ação citotóxica (SRIVASTAVA; RIDDELL, 2015). Por conta disso, para se obter uma ação eficiente do CAR, a afinidade do seu scFv com o antígeno tumoral nas células alvo não pode ser tão forte ao ponto de não ser possível desligar a interação em um dado momento, a fim de permitir que a mesma célula T possa atuar no reconhecimento e interação com diferentes células cancerígenas.

### **1.5 Simulação de Dinâmica Molecular (DM)**

Sabe-se que na interação entre anticorpo e antígeno, as mudanças conformacionais em ambas as estruturas no momento de formação da interface entre elas, são de extrema importância para garantir com que as moléculas desempenhem a sua correta função. Logo, obter informações sobre o que ocorre em termos estruturais e energéticos ao longo da interação entre essas estruturas é importante quando se objetiva compreender como ocorre esse contato. Algumas técnicas tradicionais são amplamente utilizadas para se obter informações estruturais das moléculas, como a cristalografia por raio-X, ressonância magnética nuclear, espalhamento de nêutrons e espectroscopia de fluorescência (VAN GUNSTEREN *et al.*, 2008).

A simulação de Dinâmica Molecular (DM) surge como um método alternativo às técnicas tradicionais, pois representa uma importante técnica computacional que permite realizar estudos sobre a estrutura e função biológica de macromoléculas, permitindo analisar o equilíbrio estrutural de moléculas em solução, bem como, sua interação com outras moléculas alvo, por exemplo (HANSSON *et al.*, 2002). Por ser uma ferramenta que considera as moléculas como um modelo dinâmico nos quais as movimentações dos seus átomos e as mudanças conformacionais resultantes são essenciais para garantir o desempenho da sua função corretamente (KARPLUS; MCCAMMON, 2002), a DM se torna uma técnica capaz de facilitar a interpretação de dados experimentais e de gerar dados que são difíceis ou impossíveis de se obter experimentalmente por meio de outras técnicas (MORI *et al.*, 2016).

Por meio dessa técnica, a trajetória de um conjunto de átomos em simulação é adquirida mediante a resolução das equações de movimento de Newton em um sistema no qual as partículas estão interagindo entre si (ADCOCK, MCCAMMON, 2006). Uma vez que o sistema é montado, tornando possível a obtenção das posições iniciais dos átomos nos eixos X, Y e Z, as forças exercidas sobre cada átomo podem ser calculadas. O cálculo dessa força é realizado por uma função matemática, denominada de campo de força. O campo de força consiste em um conjunto de equações que descrevem empiricamente as interações entre átomos ligados e não-ligados, sendo composto também por seus parâmetros empíricos (ABRAHAM *et al.*, 2016). A partir dos parâmetros considerados no campo de força, é possível realizar o cálculo do potencial total,  $V$  (Equação 1), do sistema, o qual é definido como a soma dos potenciais dos átomos ligados (ângulos de ligação, torcionais e diedrais) e dos átomos não-ligados (interações eletrostáticas e de *van der Waals*) (FORSTER, 2002).

$$V = \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} K_b (b_{eq} - b)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta_{eq} - \theta)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{torsões}} K_\varphi [1 + \cos(n\varphi)] + \sum V_{\text{não-ligados}} \quad (1)$$

Na equação 1,  $b$  corresponde ao comprimento de ligação em um instante qualquer (instantâneo) que representa o desvio em relação ao comprimento de equilíbrio  $b_{eq}$  da ligação;  $\theta$  representa o ângulo instantâneo entre duas ligações químicas consecutivas que descreve o desvio em relação ao  $\theta_{eq}$  entre duas ligações químicas;  $K_b$  representa a constante de Hooke que está associada à deformação da ligação química específica, e  $K_\theta$  corresponde à constante de Hooke para a restituição do ângulo em equilíbrio entre as duas ligações químicas;  $\varphi$  corresponde ângulo de torção, e  $n$  é a multiplicidade do ângulo quando este passa por  $360^\circ$  (FRENKEL; SMIT, 2002; ALLEN; TILDESLEY, 2017).

O potencial entre átomos não ligados ( $V_{\text{não-ligados}}$ ) (Equação 1) é representado pelo somatório do potencial de Lennard-Jones ( $V_{L-J}$ ) (Equação 2), o qual é utilizado para modelar as interações de *van der Waals* (*vdW*) (Equação 3), representando as interações de curto alcance, e o potencial de Coulomb, que é utilizado para modelar as interações eletrostáticas ( $V_{elet}$ ) (Equação 4), representando as interações de longo alcance.

$$V_{\text{não-ligados}} = V_{L-J} + V_{elet} \quad (2)$$

$$V_{L-J} = \sum 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3)$$

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

Na Equação 3,  $V_{L-J}$  é referente às interações de  $vdW$ , a qual varia com o inverso de dois termos, o termo repulsivo,  $r_{ij}^{12}$ , e o termo atrativo,  $r_{ij}^6$ . Além disso,  $\sigma_{ij}$  corresponde a distância finita na qual o potencial interatômico entre os átomos  $i$  e  $j$  é zero e  $\epsilon_{ij}$  representa a profundidade do potencial entre a barreira repulsiva e atrativa entre os átomos. A Equação 4,  $V_{elet}$ , é referente às interações eletrostáticas, onde  $r_{ij}$  corresponde à distância entre os átomos  $i$  e  $j$  com as cargas,  $q_i$  e  $q_j$  pontuais,  $\epsilon_r$  é a constante dielétrica relativa do meio e  $\epsilon_0$  a permissividade do espaço livre.

A força ( $F$ ) exercida sobre cada átomo do sistema ( $i$ ) pode então ser obtida através do cálculo da derivada primeira do potencial ( $V$ ) (Equação 1) em relação a posição ( $r$ ) de cada átomo (Equação 5).

$$\vec{F}_i = - \frac{dV(r_1, r_2, r_3, \dots, r_N)}{dr_i} \quad (5)$$

Conhecendo-se a força ( $F_i$ ) que atua sobre determinado átomo ( $i$ ) de massa conhecida ( $m_i$ ), se faz possível calcular a aceleração desse átomo ( $a_i$ ) no sistema através da equação de movimento de Newton (Equação 6) (HOSPITAL *et al.*, 2015). A partir das posições e da aceleração dos átomos no tempo  $t$ , pode-se calcular a posição no tempo anterior ( $t - dt$ ) e a nova posição ( $t + dt$ ).

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (6)$$

Com o valor da aceleração, a integração das equações de movimento através de algoritmos como o de Verlet (VERLET, 1967) permite obter a mudança da posição de cada átomo (Equação 7). Na Equação 7, as posições e acelerações dos átomos no tempo  $t$  são utilizadas para calcular  $r(t - dt)$ , posição no tempo anterior e  $(t + dt)$ , a nova posição, sendo  $dt$  o intervalo temporal para evoluir o sistema.

$$r(t + dt) = 2r(t) - r(t - dt) + a(t)dt^2 \quad (7)$$

Cada posição nova é então calculada após intervalos de tempo determinados para que posteriormente seja obtida a trajetória completa da molécula ao longo do tempo total de simulação. A aquisição da trajetória permite realizar análises para obter as informações estruturais e energéticas das moléculas em sistema.

Para se obter a trajetória de DM de uma molécula, é necessário seguir algumas etapas. A primeira etapa para simulação de DM refere-se à preparação do sistema, a fim de se obter a configuração inicial das moléculas que vão compor a caixa de simulação. A partir dessa etapa, escolhe-se o campo de força com os parâmetros mais adequados ao sistema de estudo, para que as forças atuantes sobre cada átomo possam ser calculadas. Em seguida, realiza-se uma minimização de energia da interação entre as moléculas que compõem o sistema a fim de otimizar a geometria da proteína para garantir que o sistema não apresente conflitos estereoquímicos. Posteriormente prossegue-se para etapa de termalização, onde a estrutura e a dinâmica do sistema precisam ser equilibradas para se obter um estado termodinâmico de interesse. Essa etapa pode ser controlada em *ensemble* canônico (NVT), representado por número de átomos, volume e temperatura controlados ou em *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT) (ALLEN; TILDESLEY, 1987), no qual o número de átomos, pressão e temperatura são controladas para convergir com os parâmetros de referência (BERENDSEN *et al.*, 1984; HUANG, 1987; BERENDSEN *et al.*, 1995). Após a etapa de termalização, o sistema pode seguir para a etapa de simulação. Por fim, com as trajetórias completas obtidas ao final da simulação, é possível realizar as análises de interesse sobre o sistema.

## 2 JUSTIFICATIVA

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), instituição filiada a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência de câncer em todo mundo em 2040 deve aumentar em aproximadamente 63% em comparação aos casos de câncer em 2018 (GLOBOCAN, 2019). Logo, sendo o câncer uma das principais causas de óbito no mundo, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares, considerando-se apenas as doenças e agravos não transmissíveis (INCA, 2019), faz-se importante o desenvolvimento de terapias que sejam mais eficazes para o tratamento dessas malignidades.

As imunoterapias representam uma nova classe de medicamentos antineoplásicos que apresentam a característica de especificidade e que vêm obtendo inúmeros resultados positivos na remissão de diversos cânceres, principalmente para aqueles que se encontram em estágios mais avançados (). A terapia na qual as células T dos pacientes são engenheiradas para expressar um receptor de antígenos quiméricos, o CAR (células CAR-T) representa um dos principais avanços, devido aos resultados promissores apresentados, nos quais foram alcançadas remissões completas em pacientes que apresentavam malignidade de células B (RAMOS; DOTTI, 2011; ANNESLEY *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2017). Além disso, essa terapia está sendo inclusive utilizada no Brasil, como caráter experimental, em um paciente que já apresentava um quadro de câncer terminal e o resultado apresentado até então, demonstra a remissão do câncer nesse paciente.

Com esse viés, estudar o mecanismo de ação dos imunoterápicos é uma área de grande importância, a fim de tornar as terapias cada vez mais aprimoradas para que a heterogeneidade apresentada pelos diferentes tipos de cânceres possa ser superada. Portanto, compreender molecularmente os processos de interação entre anticorpo e antígeno se faz necessário, pois é um dos mecanismos centrais na resposta imune. Assim, estudos mais aprofundados relacionados à interação de um scFv presente na estrutura de um CAR já utilizado comercialmente com o seu antígeno de reconhecimento CD19, podem levar a melhorias que aumentem a eficácia de ação do imunoterápico, visto que para ocorrer a sinalização de ativação das células T, para que a célula cancerosa seja eliminada, é necessário primeiramente haver a interação entre o domínio de reconhecimento ao antígeno e o antígeno.

Uma vez que a flexibilidade de uma estrutura é essencial para o correto desempenho da sua atividade, estudos que levam em conta a dinâmica das proteínas, dos seus movimentos internos, é de grande importância para se obter um conhecimento refinado acerca da interação entre as estruturas. A fim de estudar a interação entre anticorpo-antígeno a nível atomístico-molecular, uma das metodologias capazes de revelar informações estruturais e energéticas sobre o sistema é a simulação de DM, a qual, inclusive, apresenta um menor custo computacional quando comparado a outras técnicas. Por meio dessa técnica é possível prever o principal sítio de reconhecimento de um antígeno por um anticorpo, o que torna possível propor mutações para que a interação possa ser mais favorável, por exemplo. Portanto, o entendimento da interação entre scFv e CD19, por meio de DM, permitirá propor melhorias ao CAR anti-CD19 já disponível no mercado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

Estudar a interação entre o scFv derivado do anticorpo FMC63 e o receptor de membrana CD19 de forma estrutural e energética através de simulação Dinâmica Molecular.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1) Modelar o scFv com base na sequência do anticorpo FMC63 e submetê-lo à Simulação de DM;
- 2) Realizar análises estruturais do modelo do scFv a partir da trajetória proveniente da Simulação de DM;
- 3) Modelar os *loops* faltantes no modelo 3D da porção extracelular do receptor CD19 (código PDB 6AL5) e submetê-lo à simulação de DM;
- 4) Analisar o equilíbrio estrutural do modelo do CD19 completo a partir da trajetória proveniente da simulação de DM;
- 5) Identificar a posição de interação entre as estruturas do scFv e do CD19 através da técnica de docking molecular, para posteriormente montar o sistema scFv-CD19;
- 6) Submeter o complexo de interação scFv-CD19, obtido do docking, à Simulação de DM e posteriormente realizar análises estruturais e energéticas das moléculas do sistema, a partir das trajetórias obtidas, a fim de elucidar como se dá o mecanismo de atuação do scFv na interação com o antígeno CD19.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas no pacote GROMACS versão 5.1.3 (BERENDSEN *et al.*, 1995; LINDAHL; HESS, 2001; VAN DER SPOEL *et al.*, 2005; HESS *et al.*, 2008; PRONK *et al.*, 2013; ABRAHAM *et al.*, 2015; PALL *et al.*, 2015), pois ele possui as ferramentas necessárias para preparar as estruturas para simulação de DM e programas para realizar as análises estruturais e energéticas essenciais ao estudo. Antes de prosseguir para as etapas de simulação, as estruturas foram submetidas ao servidor online H++ (GORDON *et al.*, 2005; MYERS *et al.*, 2006; ANANDAKRISHNAN *et al.*, 2012) para verificar qual o estado de protonação das histidinas presentes na estrutura do scFv e do CD19 em um pH de 7,4 (pH fisiológico).

Posteriormente, as estruturas foram submetidas a etapas de minimização de energia, nas quais foi utilizado o algoritmo *steepest descent* (MORSE; FESHBACH, 1953; ARFKEN;

WEBER, 1985), a fim de obter uma geometria otimizada; etapas de termalização, para equilibrar os sistemas, e simulação de DM, para aquisição da trajetória, nas quais foram utilizados os seguintes parâmetros: controle de temperatura: V-rescale (BUSSI *et al.*, 2007); e pressão: Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984, 1995); integrador: leap-frog (HOCKNEY; GOEL, 1974); campo de força: CHARMM36 (HUANG; MACKERELL, 2013); modelo de água: TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983); Os comprimentos de ligação envolvendo os átomos de hidrogênio das proteínas foram controlados utilizando o algoritmo LINCS (HESS *et al.*, 1997; HESS, 2008) e os das águas, utilizando o algoritmo SHAKE (RYCKAERT *et al.*, 1977); pressão controlada a 1 atm, temperatura de 310 K e uma concentração de íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> de 0,15 M, a fim de simular as condições fisiológicas da célula e de neutralizar as cargas dos sistemas. As correções para interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método *Particle Mesh Ewald* (PME) (DARDEN *et al.*, 1993).

O equilíbrio estrutural das moléculas foi determinado através do programa *gmx rms* do pacote GROMACS, o qual calcula o Desvio Quadrático Médio (DQMD ou RMSD – *Root Mean Square Deviation*) (Equação 8) das posições dos átomos dos Carbonos alfa (C $\alpha$ ) das moléculas obtidas ao longo da trajetória (N) do sistema analisado, as quais possuem a mesma massa ( $m$ ), sobrepondo o C $\alpha$  das estruturas obtidas durante ao longo do tempo de simulação ( $t_2$ ) aos de uma estrutura de referência do tempo inicial ( $t_1$ ) para, posteriormente, calcular o desvio entre a posição dos C $\alpha$  dessas estruturas.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

Nessa equação,  $M$  corresponde ao somatório das massas dos C $\alpha$  de  $i$  até  $N$ , e  $r_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  no tempo  $t$ .

Os RMSD médios e os seus respectivos desvios foram calculados a partir do momento em que as moléculas atingiram equilíbrio estrutural ( $t_{eq}$ ). O perfil de RMSD do *linker* foi desconsiderado nas análises realizadas, devido às oscilações apresentadas, acarretando altos valores de média e desvio de RMSD, por conta da sua estrutura altamente flexível.

O programa *gmx energy* foi utilizado para obtenção dos potenciais de interação de longo alcance (eletrostático) e de curto alcance (Lennard-Jones), utilizando um raio de corte de 1.3 nm para analisar o Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre as estruturas do sistema (scFv e CD19) e de 0.8 nm para analisar o PII individualmente de cada CDR presente na estrutura do scFv com o CD19. A análise do PII objetivou determinar se a interação era, em

geral, atrativa ou repulsiva e quais as principais CDRs responsáveis por interagir efetivamente com o antígeno.

Os gráficos do perfil de RMSD e do PII foram visualizados através do programa Origin Pro 8.0. A representação das estruturas foram visualizadas através do software *PyMol 1.8*, sendo as imagens geradas através do mesmo.

#### 4.2 Modelagem e simulação de DM do scFv

A sequência do scFv deste estudo possui os domínios variáveis da cadeia leve ( $V_L$ , 107 resíduos) e pesada ( $V_H$ , 120 resíduos) derivados do anticorpo murino FMC63 (Tabela 2) conectados por um polipeptídeo flexível (*linker*) constituído pelos aminoácidos glicina e serina  $(G_4S)_3$ . Como não há estrutura 3D resolvida do FMC63, o modelo tridimensional da estrutura do scFv foi construído com base na modelagem por homologia utilizando, para isso, o pacote *Modeller 9.20* (SALI, BLUNDELL, 1993) com o script de alinhamento múltiplo. Deste modo, primeiramente foi realizada uma busca por proteínas homólogas com uma identidade  $> 25\%$  com a sequência de interesse do scFv, por meio da ferramenta BLASTp. 5 modelos de diferentes anticorpos (código do PDB 3ESU, 3ESV, 3ET9, 3AUV, 5OGI), todos apresentando uma identidade com a sequência de interesse acima de 59 %, foram selecionados para serem utilizados como templates de referência na modelagem do scFv. O *linker* iniciou-se no C-terminal do domínio  $V_L$  e finalizou no N-terminal do domínio  $V_H$ . Foram gerados 100 modelos para o scFv e o melhor deles foi escolhido inicialmente avaliando-se os valores da função objetiva MODELLER.

Tabela 2 - Sequências de aminoácidos utilizados na modelagem das estruturas do scFv. As sequências dos domínios variáveis ( $V_L$  e  $V_H$ ) são derivadas do anticorpo de murino FMC63.

<b>Domínio <math>V_L</math></b>	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG VPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT
<b>Linker</b>	GGGGSGGGSGGGGS
<b>Domínio <math>V_H</math></b>	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSET TYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

As proteínas podem assumir teoricamente diversas conformações estruturais por conta da capacidade que essas moléculas possuem de realizar rotações em sua estrutura, sem que haja a quebra das suas ligações covalentes, de acordo com a necessidade. Porém, somente algumas

dessas conformações são possíveis quando se considera as condições biológicas, visto que necessitam ter uma série de parâmetros adequados, como uma menor energia livre de Gibbs (G), para que possam desempenhar a sua correta função (NELSON *et al.*, 2015). O gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963) é comumente utilizado para verificar a qualidade da estrutura tridimensional das proteínas e é baseado na avaliação das combinações dos ângulos diedrais phi ( $\phi$ ) e psi ( $\psi$ ) das cadeias laterais dos aminoácidos de um polipeptídeo, a fim de classificar quais aminoácidos estão em conformações que são energeticamente favoráveis, nas quais não há impedimento estérico, sendo, dessa forma, mais prováveis de ocorrer. Essa classificação é visualizada na coloração das regiões no gráfico, nas quais as regiões em vermelho representam regiões muito favoráveis, em amarelo regiões favoráveis, em bege regiões pouco favoráveis e em branco, regiões desfavoráveis. A glicina representa um caso especial, tendo em vista que, por possuir apenas um hidrogênio como radical, lhe é permitido estar presente na região em branco sem que haja grandes prejuízos para a estrutura do polipeptídeo. O servidor online *Procheck* (LASKOWSKI *et al.*, 1993) foi utilizado para realizar a validação da estrutura terciária do scFv modelado.

As Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) do modelo 3D do scFv modelado foram determinadas (CHOTHIA e LESK, 1987), pois as CDRs são as regiões do anticorpo que reconhecem e interagem com um epítipo expresso por um antígeno de forma específica. Essas regiões serão posteriormente utilizadas para realizar análises estruturais e energéticas referentes à interação entre o scFv e o antígeno CD19.

Com o objetivo de estudar o equilíbrio estrutural do scFv em água, a estrutura foi inicialmente submetida a uma etapa de minimização na qual foi inserida em uma caixa cúbica com 9,1 nm de aresta com 23283 moléculas de água para solvatar o sistema e, durante a etapa de termalização, foram adicionadas 136 moléculas de íons (68 moléculas de  $\text{Na}^+$  e 68 moléculas de  $\text{Cl}^-$ ) para neutralizar as cargas líquidas do sistema. O seguinte protocolo foi utilizado para termalizar o sistema e prepará-lo para a fase de simulação de DM: 2000 passos de minimização de energia para otimização da geometria da proteína e redução de maus contatos. Em seguida, foi realizada a termalização do sistema para relaxar a estrutura do scFv e equilibrar as moléculas de água adicionadas ao sistema, consistindo em 12,5 ps com o scFv restrito em *ensemble* NVT, 5 ps com scFv livre em *ensemble* NVT e, por fim, 40 ps no *ensemble* NPT. O sistema foi posteriormente submetido a 300 ns de simulação de DM em *ensemble* NPT.

### 4.3 Modelagem e simulação de DM do receptor CD19

A estrutura cristalográfica do CD19 humano que foi utilizada no estudo (Código PDB 6AL5) não possui a estrutura de alguns *loops* que não foram definidos na densidade eletrônica. Portanto, primeiramente realizou-se uma modelagem por homologia dos resíduos de aminoácidos faltantes (Tabela 3) no programa *Modeller 9.20* através do protocolo de modelagem dos resíduos faltantes. A estrutura completa do CD19 foi validada através do programa *Procheck*. Com a estrutura do antígeno completa obtida, foi montado um sistema em caixa cúbica com 11,4 nm de aresta com 46702 moléculas de água. Esse sistema foi minimizado por 5000 passos e, em seguida, foi termalizado e simulado durante 100 ns com *annealing*, na qual a estrutura do CD19 sem os *loops* (CD19-*loops*) ficou restrita para se obter o estado de mínimo de energia dos *loops* modelados, deixando-os livre para se movimentar, e, em seguida, 200 ns sem *annealing*, totalizando 300 ns de simulação.

Tabela 3 - Identificação da sequência dos resíduos de aminoácido e da numeração dos *loops* faltantes da estrutura cristalográfica do CD19 que foram modelados através do programa *Modeller 9.20*.

Loops modelados	Sequência	Resíduos
<i>Loop A</i>	KGTS DGPT	40-47
<i>Loop B</i>	QRSSEGPSSPSGKLM	138-152
<i>Loop C</i>	RDSL NQS	177-183

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

O processo de *simulated annealing* é uma forma eficaz e geral de otimização a fim de obter o estado de energia mínima de um sistema. Esse método se baseia no aumento da temperatura de um material, seguindo-se da redução da temperatura de forma gradual com o objetivo de reduzir a energia do sistema. Nesse processo, o resfriamento lento é essencial para permitir que os átomos encontrem tempo suficiente para se reorganizarem em uma estrutura uniforme com energia mínima. Caso o material fosse resfriado bruscamente, seus átomos formariam uma estrutura irregular e fraca, com alta energia. Já em um estado de baixa energia, as partículas formam um arranjo bem estruturado conhecido como cristal onde a energia do sistema é mínima (ARAÚJO, 2001).

#### 4.5 Montagem e simulação de DM do sistema scFv-CD19

Para realizar a montagem do sistema de interação entre a estrutura do scFv modelado e da porção extracelular do antígeno CD19 completa, realizou-se um estudo de docking molecular a fim de identificar as possíveis conformações e orientações da posição de interação entre o scFv e o CD19. O docking foi realizado através do programa *HADDOCK* 2.2 (VAN ZUNDERT *et al.*, 2015), no qual definiram-se os resíduos ativos, ou seja, aqueles que participam diretamente da interação, os quais, para a estrutura do scFv foram escolhidos os resíduos das CDRs (Tabela 5) e para o CD19 foram escolhidos os resíduos dos *Loops* que compreendem o epítipo do anticorpo FMC63 (Tabela 1). Definiu-se a estrutura do CD19 para permanecer fixa durante o docking. Os resultados provenientes do docking foram agrupados em 11 clusters, dos quais se escolheu a estrutura que apresentou um balanço dos melhores parâmetros para prosseguir com os estudos, ou seja, a que apresentou um melhor haddock score, um menor RMSD, valores de energia de interação e de z-score mais negativos.

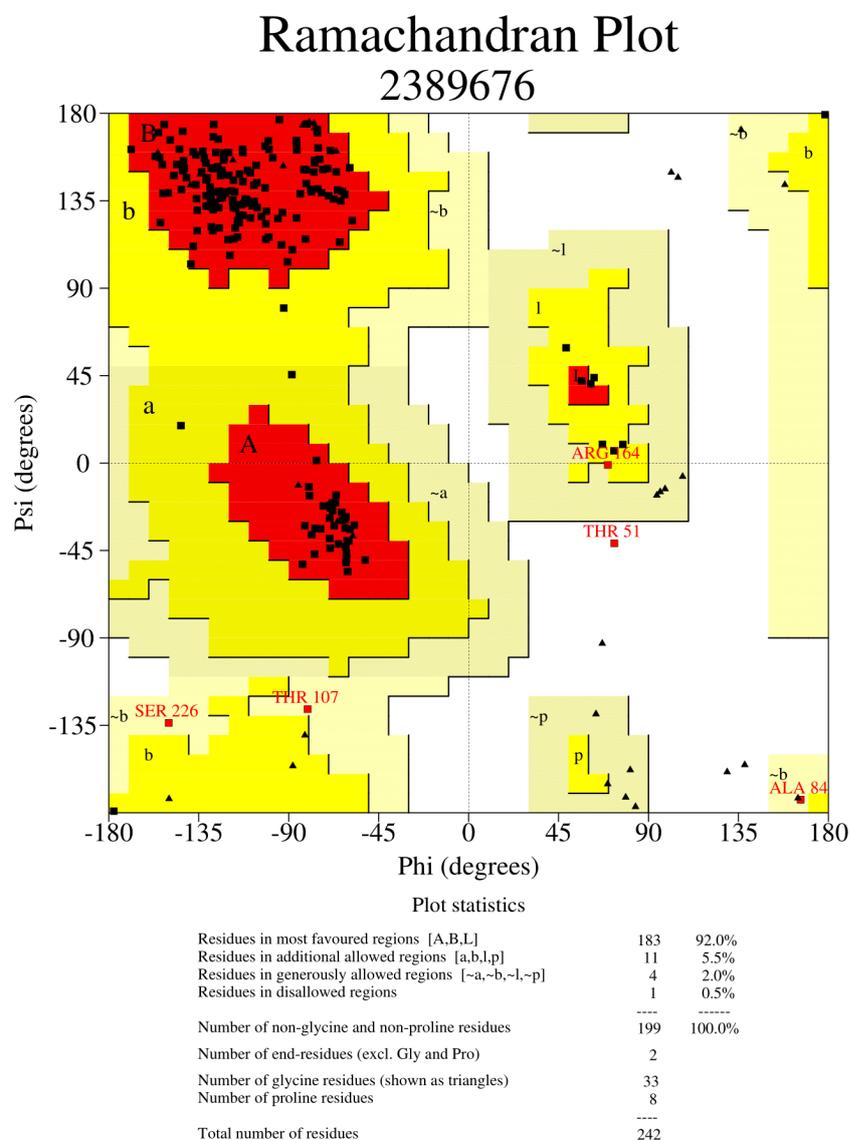
A partir do resultado de docking, a conformação de encaixe scFv-CD19 escolhida com base nos parâmetros citados acima foi utilizada para montar o sistema em uma caixa dodecaédrica com 1,8 nm de distância entre a extremidade da proteína e a aresta em todos os eixos, solvatada com 60524 moléculas de água. Em seguida, esse sistema foi minimizado a 5000 passos. Durante a etapa de termalização foram adicionadas 300 moléculas de íons (175 íons Na<sup>+</sup> e 175 íons Cl<sup>-</sup>) a fim de manter o sistema eletricamente neutro. O seguinte protocolo foi utilizado nas fases de termalização: 7,5 ps em *ensemble* NVT, mantendo scFv e CD19 fixos; 20 ps em *ensemble* NVT com as cadeias laterais do scFv e CD19 fixas; e finalmente 15 ps em *ensemble* NPT com o sistema livre de restrições de posição. A simulação de DM foi executada em *ensemble* NPT durante 1800 ns.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Modelagem e Simulação de DM do scFv

O gráfico de Ramachandran, obtido através do programa *Procheck*, para o modelo do scFv obtido através do *Modeller* (Figura 5), evidencia que 92% dos aminoácidos estão em regiões muito favoráveis, 5.5% em regiões favoráveis, 2.0% em regiões pouco favoráveis e apenas 0.5% em regiões desfavoráveis, representados pelo resíduo de Thr 51. Resultados esses que corroboram para a validação do modelo tridimensional do scFv, tendo em vista que 99,5% dos seus aminoácidos encontram-se em regiões favoráveis ou permitidas.

Figura 5 - Gráfico de Ramachandran obtido através do servidor online *Procheck* identificando a qualidade estereoquímica dos aminoácidos do modelo do scFv obtido através do *Modeller*.



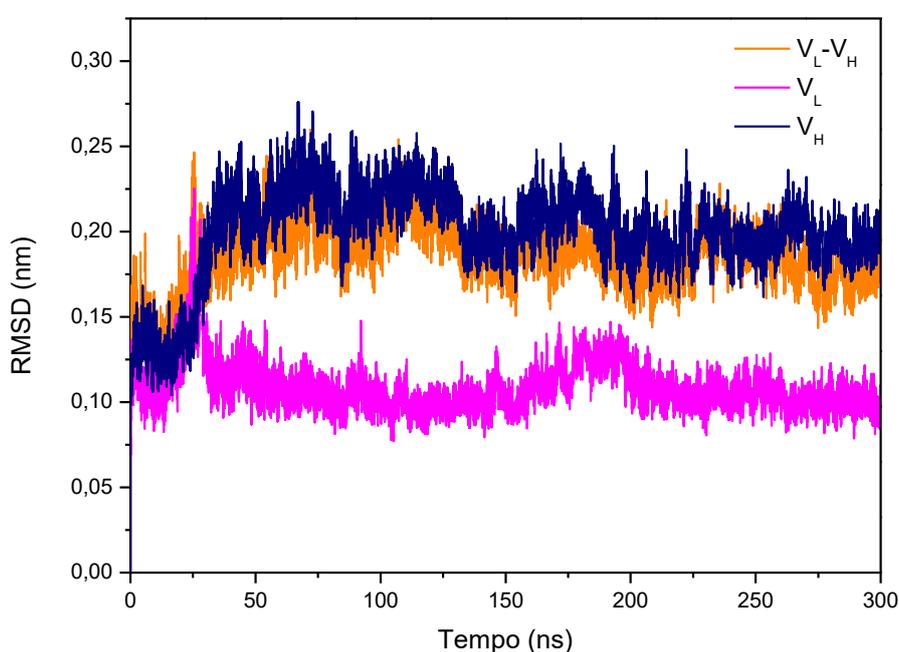
Fonte: *Procheck*.

O perfil de RMSD apresentado permite analisar o equilíbrio estrutural da molécula de scFv em água durante os 300 ns de simulação (Figura 6). Pode-se observar que a estrutura do scFv ( $V_L$ - $V_H$ ) e seus domínios variáveis isoladamente,  $V_L$  e  $V_H$ , alcançam o equilíbrio estrutural em ~35 ns de simulação (RMSDs médios de  $0,19 \pm 0,02$ ,  $0,11 \pm 0,01$  e  $0,20 \pm 0,02$  nm, respectivamente) (Tabela 4) e permanecem em equilíbrio ao longo do restante da simulação.

Observou-se que a estrutura do *linker* movimenta-se bastante durante toda a simulação, o que já era esperado, pelo fato de seus aminoácidos, glicina e serina, possuírem cadeias laterais

pequenas, as quais conseguem se movimentar bastante durante a simulação, sendo, por esse motivo, desconsiderado nos cálculos de RMSD. Por meio do gráfico de RMSD é possível inferir que mudanças observadas na estrutura do scFv ( $V_L$ - $V_H$ ) são ocasionadas, principalmente, à oscilação estrutural do domínio  $V_H$ , uma vez que os RMSD médios de  $V_L$ - $V_H$  e  $V_H$  são similares entre si e superiores aos do  $V_L$ .

Figura 6 - Curva de RMSD dos C $\alpha$  dos componentes do scFv em água durante os 300 ns de simulação. Laranja:  $V_L$ - $V_H$ . Magenta:  $V_L$ . Azul escuro:  $V_H$ .



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Tabela 4 - Dados de média e desvio padrão dos valores de RMSD para cada componente do scFv a partir do momento em que atingem equilíbrio estrutural ( $t_{eq}$ ) durante os 300 ns de simulação.

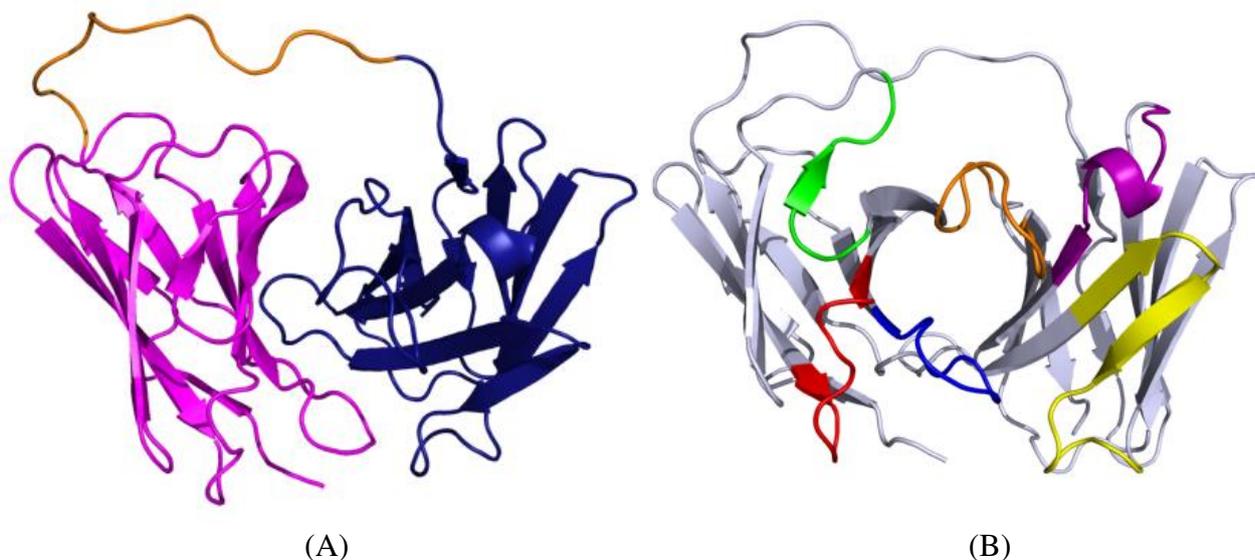
Estrutura	Média $\pm$ Desvio (nm)	$t_{eq}$ (ns)
$V_L$ - $V_H$	0,19 $\pm$ 0,02	35
$V_L$	0,11 $\pm$ 0,01	35
$V_H$	0,20 $\pm$ 0,02	35

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Na Figura 6 estão representadas a estrutura do scFv construída através da modelagem por homologia por meio do *Modeller*. A Figura 7A evidencia a estrutura tridimensional dos

componentes do scFv ( $V_L$ , *linker* e  $V_H$ ), derivado do anticorpo FMC63, e a Figura 7B corresponde ao scFv com as suas CDRs identificadas (Tabela 5).

Figura 7 – Estrutura tridimensional do modelo de scFv construído representada em cartoon. (A) Identificação dos domínios  $V_L$  (em magenta),  $V_H$  (em azul) e do *linker* (em laranja). (B) Estrutura do scFv com as CDRs identificadas. Vermelho: CDR-L1; Verde: CDR-L2; Azul: CDR-L3; Roxo: CDR-H1; Amarelo: CDR-H2; Laranja: CDR-H3.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 5 - Identificação da sequência de aminoácidos e da numeração dos resíduos das CDRs do scFv modelado.

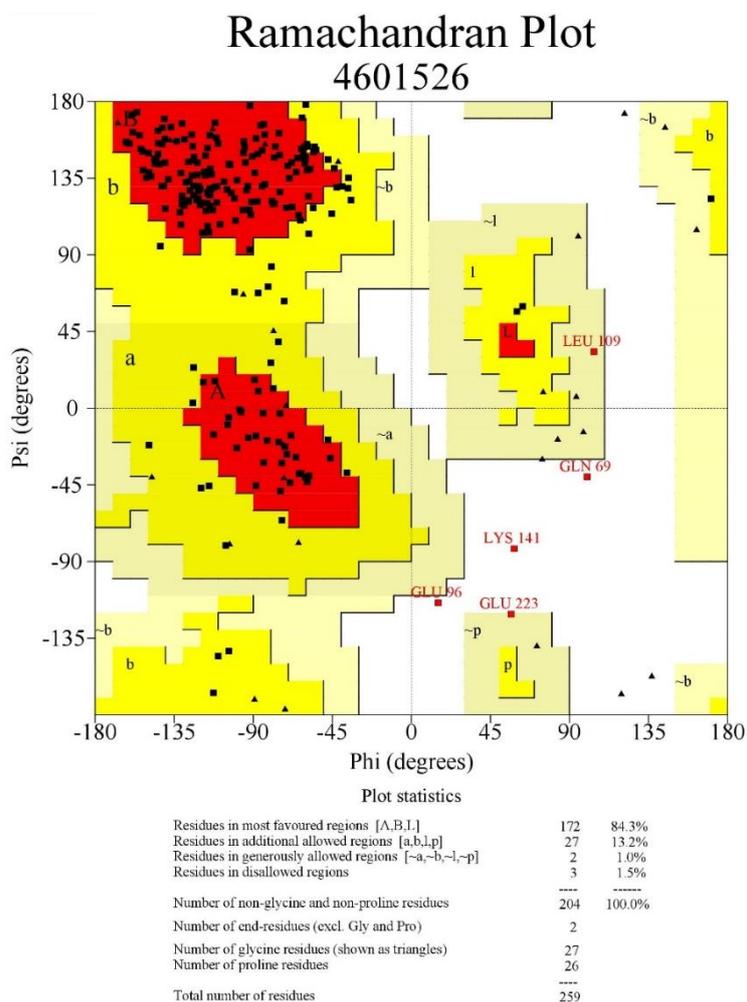
CDRs scFv	Sequência	Resíduos
<b>CDR-L1</b>	RASQDISKYLN	24-34
<b>CDR-L2</b>	HTSRLHS	50-56
<b>CDR-L3</b>	QQGNTLPYT	89-97
<b>CDR-H1</b>	GVSLPDYGVS	148-157
<b>CDR-H2</b>	VIWGSETTYNSALKS	172-187
<b>CDR-H3</b>	HYYYGGSYAMDY	220-231

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

## 5.2 Modelagem e Simulação de DM do receptor CD19

O resultado da validação da estrutura do CD19, com os *loops* faltantes modelados, foi obtido através do programa *Procheck*.

Figura 8 - Gráfico de Ramachandran obtido através do servidor online *Procheck* identificando a qualidade estereoquímica dos aminoácidos do modelo do CD19 obtido através do *Modeller*.

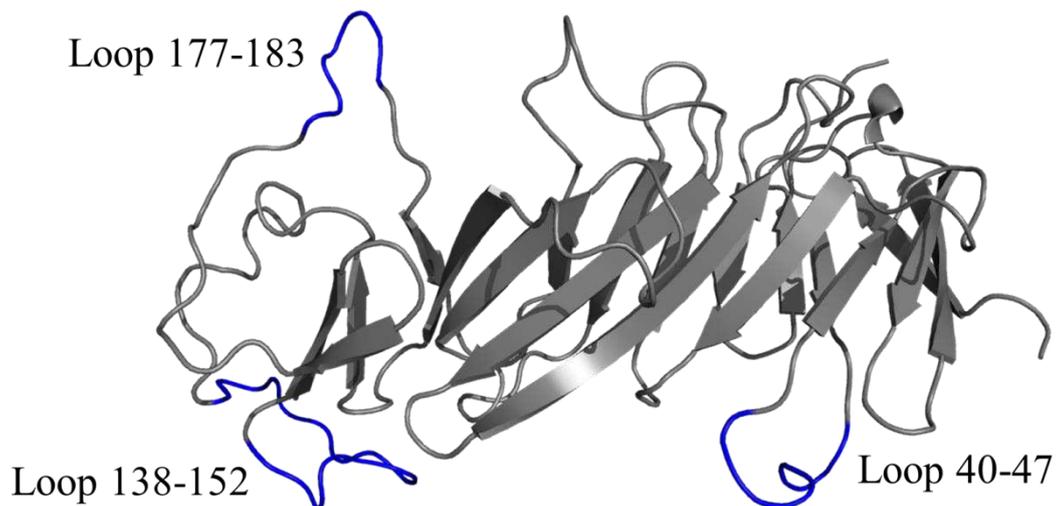


Fonte: *Procheck*.

O gráfico de Rammachandran (Figura 8) evidencia que a estrutura do CD19 apresentou 84,3% dos aminoácidos em regiões muito favoráveis, 13,2% em regiões favoráveis, 1,0% em regiões pouco favoráveis e apenas 1,5% em regiões não permitidas. Assim, o modelo do CD19 obtido mostra-se de boa qualidade por ter 98,5% dos seus aminoácidos em regiões favoráveis ou permitidas e apenas 1,5% dos aminoácidos em regiões não permitidas, sendo eles os resíduos Gln 69, Glu 96 e Lys 141.

O modelo do CD19 completo, no qual os *loops* faltantes foram modelados através do *Modeller*, está representado na Figura 9.

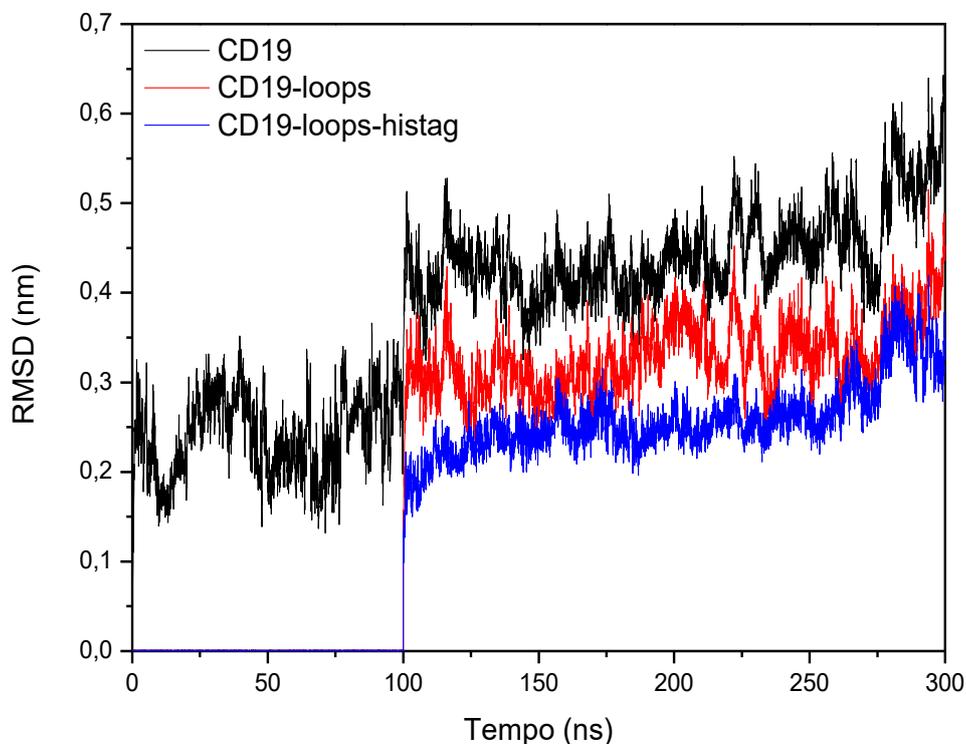
Figura 9 – Estrutura tridimensional do modelo de CD19 completo obtido a partir de modelagem por homologia dos resíduos faltantes no programa *Modeller*, evidenciando em azul as sequências de resíduos modeladas.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

O equilíbrio estrutural do modelo do CD19 completo foi avaliado através do cálculo de RMSD durante os 300 ns de simulação (Figura 10). É possível observar que ao desconsiderar os *Loops* modelados e a cauda de histidina (CD19-*loops*-histag), a estrutura do CD19 apresenta um valor de média e desvio de RMSD menor ( $0,28 \pm 0,03$  nm) quando comparado ao cálculo de RMSD considerando a estrutura completa do CD19 (com os *loops* e com a cauda de histidina) ( $0,47 \pm 0,04$  nm) (Tabela 6), o que pode ser explicado devido à grande movimentação que os *loops*, por conta dos seus resíduos flexíveis, e a cauda de histidina, por conta do seu domínio C-terminal permanecer livre, apresentam ao longo da simulação, fazendo com que a média de RMSD se eleve devido às variações estruturais desses componentes. As curvas de RMSD para o CD19-*loops* e CD19-*loops*-histag estão em zero nos primeiros 100 ns devido à estrutura do CD19-*loops* ter permanecido restrita durante a fase de *annealing*, momento no qual somente os *loops* estavam livres para se movimentar.

Figura 10 - Curva de RMSD dos Ca das configurações estruturais do CD19 completo, da sua estrutura desconsiderando os *loops* (CD19-*loops*) e desconsiderando os *loops* e a cauda de histidina (CD19-*loops*-histag), ao longo do tempo de simulação, comparadas com a estrutura inicial como referência



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Tabela 6 - Médias e desvios de RMSD calculados para a estrutura completa do CD19 e para as estruturas desconsiderando os *loops* (CD19-*loops*) e desconsiderando os *loops* e a cauda de histidina (CD19-*loops*-histag), calculados a partir de 200 ns de simulação.

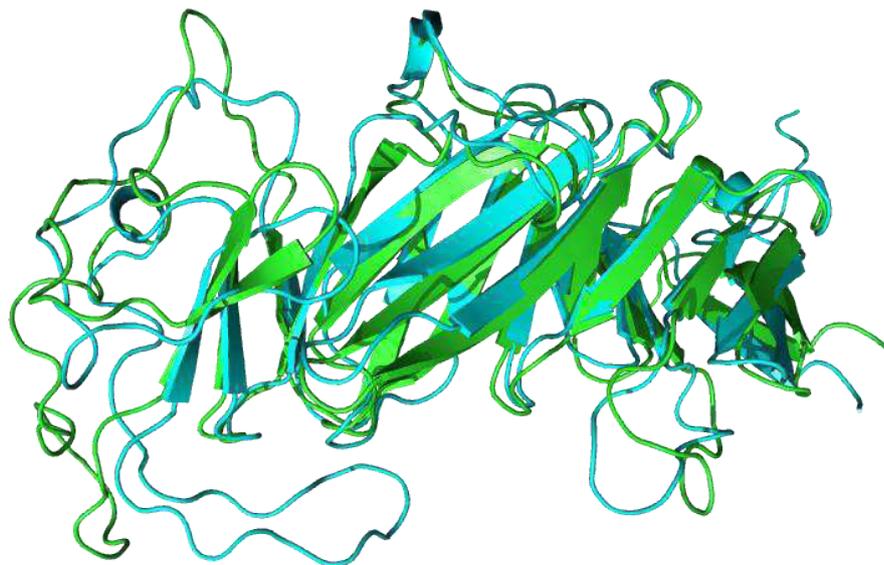
<b>Estrutura</b>	<b>RMSD (nm)</b>
<b>CD19</b>	0,47 ± 0,04
<b>CD19-<i>loops</i></b>	0,34 ± 0,03
<b>CD19-<i>loops</i>-histag</b>	0,28 ± 0,03

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

A Figura 11 representa duas estruturas do CD19 sobrepostas que foram coletadas em 100 ns (em azul) e em 200 ns (em verde), evidenciando que as diferenças estruturais observadas correspondem às regiões compreendidas pelos *loops* que foram modelados, validando que as oscilações da média de RMSD apresentadas, considerando-se a estrutura completa do CD19,

são decorrentes da grande oscilação que os *loops* e a cauda de histidina apresentam durante toda a simulação.

Figura 11 – Conformações do CD19 coletadas em 100 ns (azul) e em 200 ns (verde) de simulação, evidenciando a manutenção da estrutura do CD19 e as diferenças estruturais nos *loops* modelados.

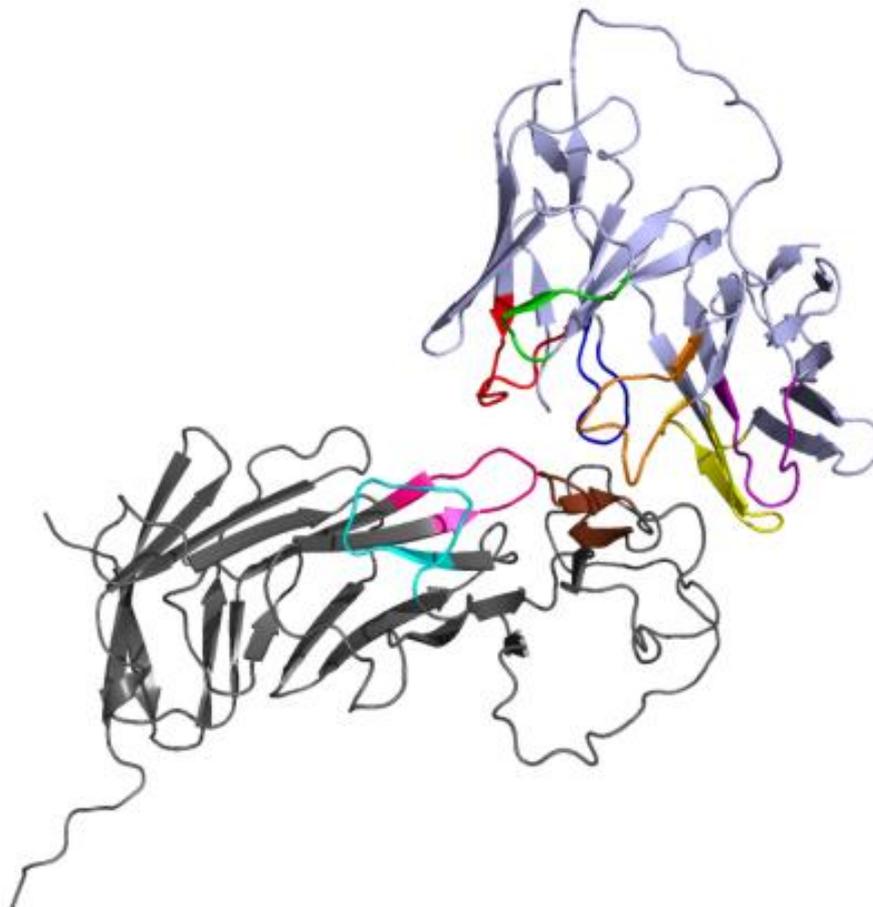


Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

### 5.3 Montagem e Simulação de DM do sistema scFv-CD19

A partir do docking realizado entre as estruturas do scFv e do CD19 através do programa *Haddock 2.2*, o cluster com os melhores parâmetros foi escolhido e o complexo scFv-CD19 foi construído (Figura 12), sendo possível visualizar como se dá a interação entre as CDRs do scFv e os *loops* correspondentes ao epítipo antigênico no CD19.

Figura 12 – Estruturas tridimensionais do complexo de interação entre scFv (branco), identificando as CDRs, e CD19 (cinza), identificando os *loops* correspondentes ao epítipo antigênico (*Loop1*: azul claro; *Loop2*: marrom; *Loop3*: rosa), obtido através do docking no programa *Haddock*.

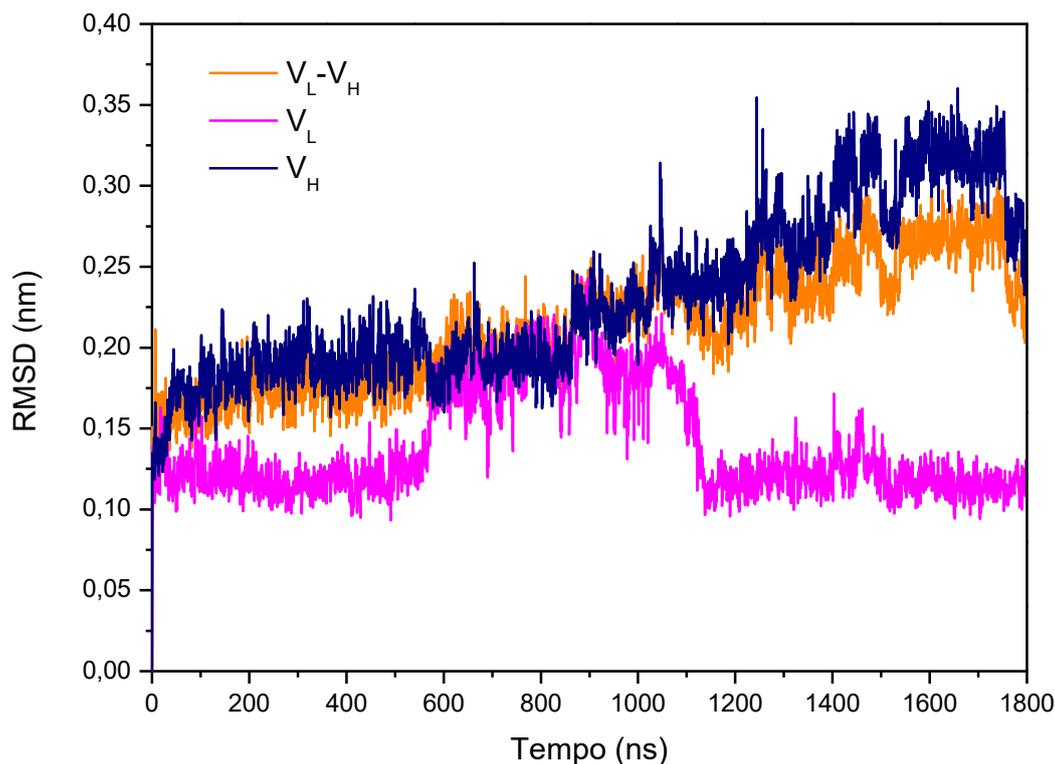


Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

As variações das estruturas tridimensionais do complexo scFv-CD19 foram avaliadas ao longo da simulação de 1800 ns. Por meio da curva de RMSD (Figura 13) é possível observar a influência da presença do receptor CD19 no equilíbrio estrutural do scFv. Observa-se que o scFv ( $V_L$ - $V_H$ ) e os domínios  $V_L$  e  $V_H$  entram em equilíbrio a partir do início da simulação e permanecem estáveis até aproximadamente 550 ns, apresentando, durante esse período, um RMSD médio de  $0,17 \pm 0,01$ ;  $0,11 \pm 0,01$  e  $0,18 \pm 0,01$  nm, respectivamente (Tabela 7). Por volta de 550 ns ocorre um aumento do RMSD médio do domínio  $V_L$ , indicando que houve alguma mudança conformacional desse domínio até aproximadamente 1150 ns, período no qual a média de RMSD para esse domínio foi de  $0,18 \pm 0,02$  nm. Posteriormente o domínio  $V_L$  volta a apresentar valores de média de RMSD ( $0,11 \pm 0,01$  nm) próximos ao apresentado inicialmente, até o final da simulação. Por meio dessa análise também é possível observar que o RMSD médio

das estruturas  $V_L$ - $V_H$  e  $V_H$  são próximos entre si e superiores aos de  $V_L$ , indicando que modificações na estrutura do scFv são decorrentes, principalmente, de modificações no domínio  $V_H$ .

Figura 13 - Curva de RMSD dos C $\alpha$  dos componentes do scFv, do complexo com o CD19, em água durante os 1800 ns de simulação. Laranja:  $V_L$ - $V_H$ . Magenta:  $V_L$ . Azul escuro:  $V_H$ .



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 7 - Dados de média e desvio padrão dos valores de RMSD para cada componente do scFv durante os 1800 ns de simulação calculadas no período de 10 até 550 ns.

<b>Estrutura</b>	<b>Média <math>\pm</math> Desvio (nm)</b>
$V_L$ - $V_H$	$0,17 \pm 0,01$
$V_L$	$0,11 \pm 0,01$
$V_H$	$0,18 \pm 0,01$

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Foram coletadas estruturas do scFv ( $V_L$ + $V_H$ ) em 300 ns e em 1000 ns, a fim de visualizar as mudanças estruturais responsáveis pela variação do perfil de RMSD observada no domínio  $V_L$ . A Figura 14 representa as duas estruturas tridimensionais do scFv coletadas em tempos diferentes, obtidas através da sobreposição do domínio  $V_H$ , deixando livre o domínio  $V_L$ . É

possível identificar que as posições relativas entre os domínios  $V_L$  e  $V_H$  variam nesses momentos, devido à reorientação do domínio  $V_L$ , acarretando na variação da posição das CDRs.

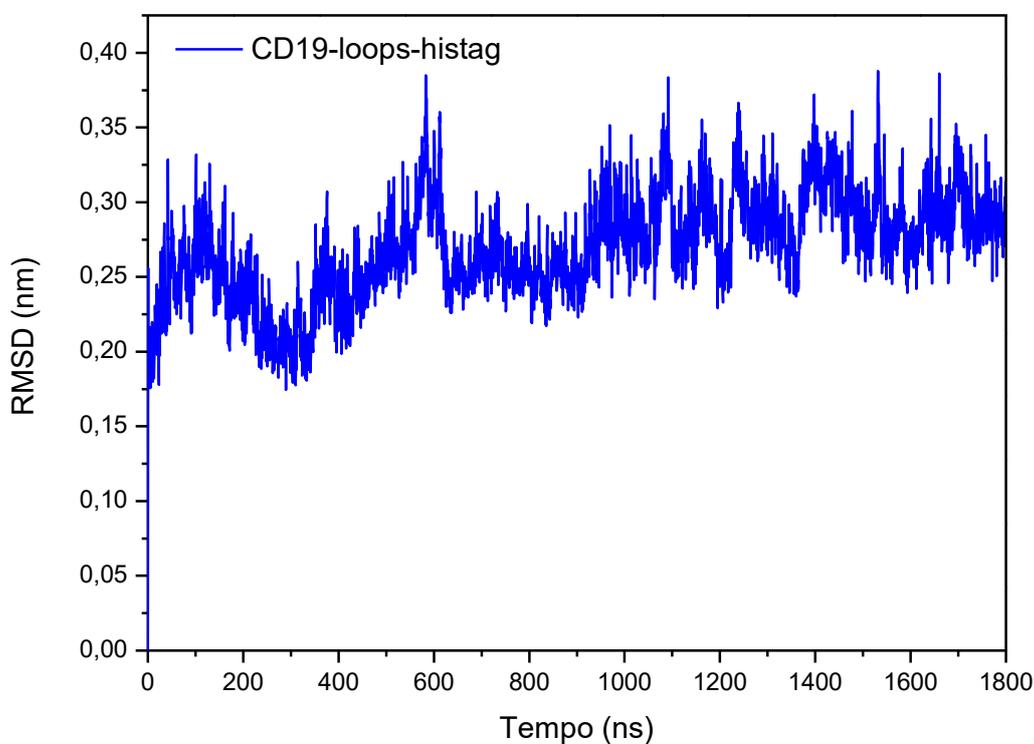
Figura 14 - Conformações do scFv ( $V_L+V_H$ ) coletadas em 300 ns e em 1000 ns de simulação evidenciando as diferenças estruturais no domínio  $V_L$  que foram observadas no gráfico do perfil de RMSD. Preto: domínio  $V_H$  das duas estruturas sobrepostas. Azul: domínio  $V_L$  em 300 ns. Roxo: domínio  $V_L$  em 1000 ns.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A partir da análise de RMSD para a estrutura do CD19-*loops*-histag (Figura 15), é possível observar que a presença do scFv não influencia de forma significativa no equilíbrio estrutural dessa molécula em água, tendo em vista que a média e desvio apresentados de  $0,27 \pm 0,03$  nm (Tabela 8) foram semelhantes à observada quando o CD19 foi simulado sozinho em água.

Figura 15 - Curva de RMSD dos Ca dos componentes do CD19-*loops*-histag (molécula de CD19, desconsiderando os resíduos correspondentes aos *loops* modelados e à cauda de histidina) em água durante os 1800 ns de simulação.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 8 - Médias e desvios de RMSD calculados para a estrutura do CD19 desconsiderando os *loops* e a cauda de histidina (CD19-*loops*-histag), calculados a partir de 200 ns de simulação.

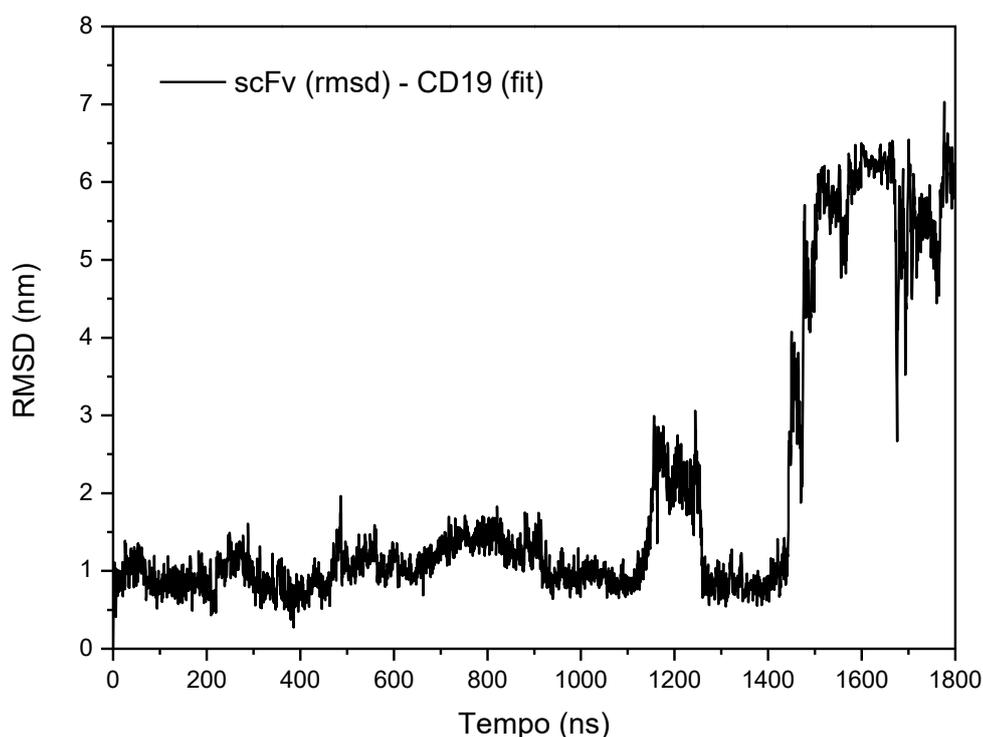
<b>Estrutura</b>	<b>RMSD (nm)</b>
<b>CD19-<i>loops</i>-histag</b>	<b>0,27 ± 0,03</b>

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Foi realizada uma análise da movimentação da estrutura do scFv em relação ao CD19 durante os 1800 ns de simulação, por meio da análise de RMSD (Figura 16) na qual a estrutura do CD19 foi sobreposta e o cálculo de RMSD foi realizado para o scFv. É possível observar que aproximadamente entre 1150 ns e 1250 ns houve uma alta variação da média de RMSD, indicando uma mudança brusca da posição de interação entre as estruturas. Posteriormente, em 1250 ns, o scFv retorna para valores de média de RMSD apresentados anteriormente, indicando que as estruturas retornaram sua interação, porém, logo em seguida, em 1470 ns, foi observada uma mudança ainda mais brusca da posição do scFv em relação ao CD19, indicando uma

provável perda de interação entre o scFv e o seu epítipo de reconhecimento na estrutura do CD19.

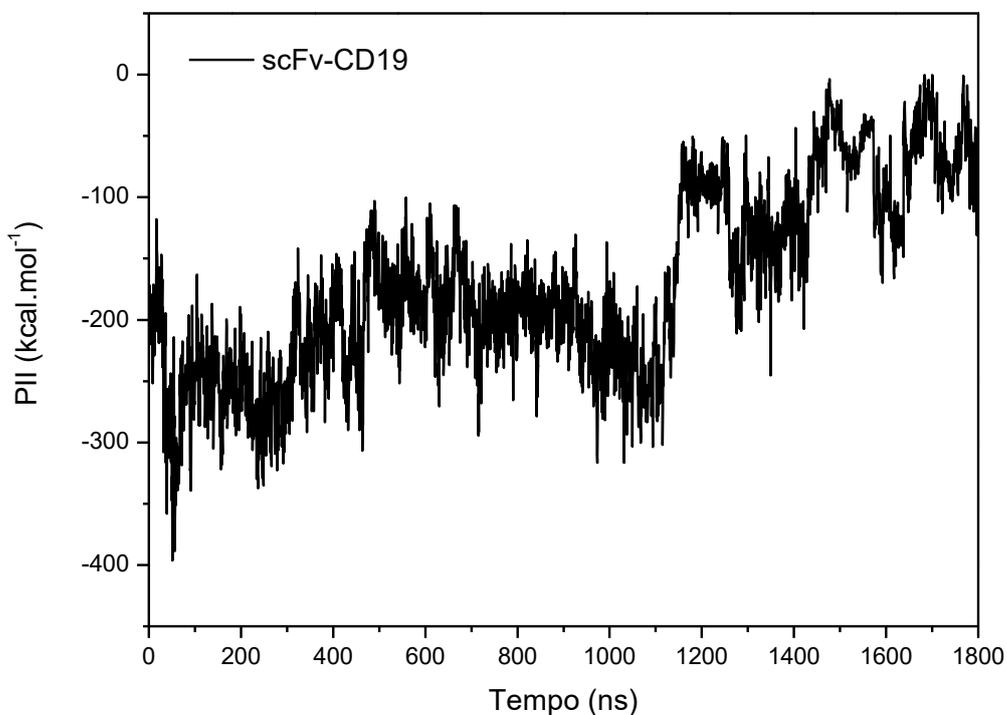
Figura 16 - Curva de RMSD dos C $\alpha$ , no qual foi sobreposto (fit) a estrutura do CD19 e calculado o RMSD para a estrutura do scFv, a fim de observar a movimentação do scFv em relação ao CD19.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Através da análise do Potencial de Interação Intermolecular (PII) evidenciado na Figura 17, a atratividade entre as estruturas do scFv e do CD19 foram avaliadas, sendo observada uma interação significativamente atrativa entre as estruturas, devido aos valores de energia bastante negativos que foram apresentados. Nota-se que foi atingido um estado de interação mais atrativo entre scFv-CD19 aproximadamente nos 75 ns de simulação, onde foram apresentados valores de energia de interação próximos à  $-400 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . O perfil do PII evidencia que de fato houve uma perda de interação entre o scFv e a região que compreende o epítipo antigênico de reconhecimento no CD19 em aproximadamente 1150 ns, pois é o período no qual a interação vai se tornando menos atrativa, ou seja, menos negativa, apresentando valores de energia mais próximos de  $0 \text{ kcal.mol}^{-1}$  ao decorrer do restante da simulação, validando os resultados obtidos através do gráfico de RMSD da movimentação do scFv em relação ao CD19 (Figura 16), onde, aproximadamente no mesmo período, houve uma mudança brusca nos valores de média e desvio do RMSD, indicando uma mudança na posição de interação entre as estruturas.

Figura 17 - Curva do Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos do scFv e do CD19. Raio de corte = 1,3 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Na figura 18 estão representadas as posições de interação entre scFv e CD19 coletadas nos períodos correspondentes a 400 ns (scFv representado em verde) e a 1500 ns (scFv representado em laranja), obtidas através da sobreposição do CD19 (em cinza), deixando livre a estrutura do scFv. É possível observar que a configuração que representa a interação entre as estruturas nos 400 ns evidencia a posição de interação do scFv com o epítipo de reconhecimento do CD19, compreendido por 3 *loops* que estão indicados em diferentes colorações (*Loop1*: azul claro; *Loop2*: marrom; *Loop3*: rosa). A configuração que representa a interação entre as estruturas nos 1500 ns demonstra que o scFv encontra-se em uma posição afastada do epítipo de reconhecimento, corroborando para os resultados obtidos no gráfico de RMSD e do PII, onde nos 1500 ns é observado uma energia de interação desfavorável entre as estruturas e valores de RMSD muito elevados.

Figura 18 – Estruturas tridimensionais das interações entre o scFv e o CD19 coletadas em 400 ns (na qual o scFv está representado em verde) e em 1500 ns (na qual o scFv está representado de laranja) obtidas sobrepondo-se somente a estrutura do CD19 (representado de cinza, com os *loops* que compreendem o epítipo antigênico identificados como: *Loop1*: azul claro; *Loop2*: marrom; *Loop3*: rosa).



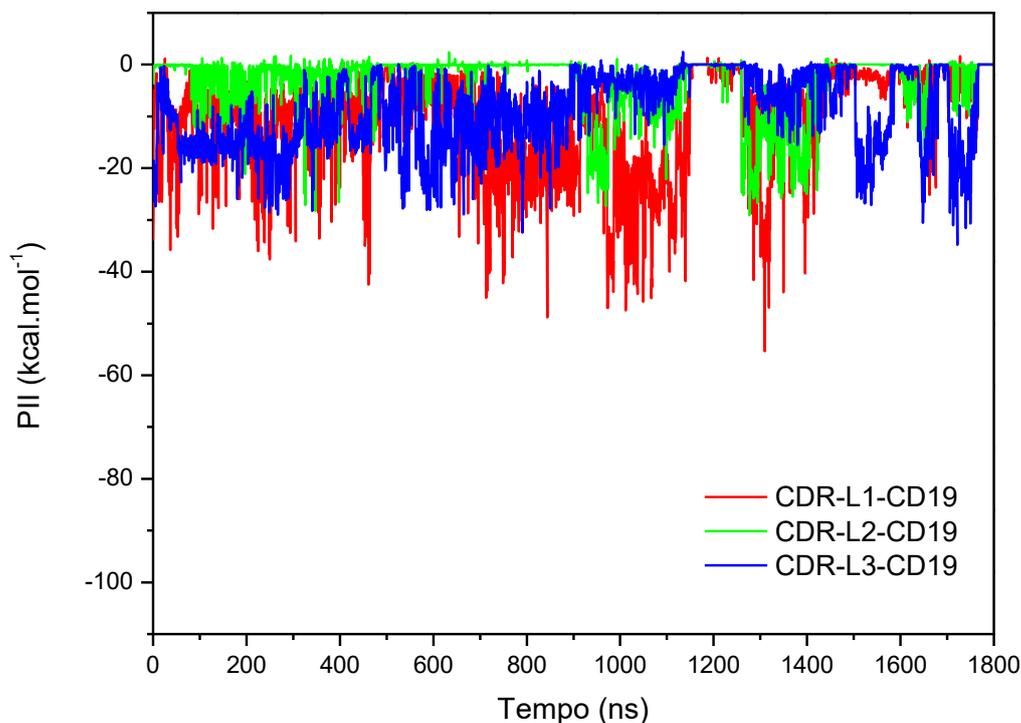
Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

A perda de interação entre scFv e CD19 é um ponto positivo para a utilização do scFv na estrutura de um CAR, tendo em vista que o objetivo da interação entre anticorpo-antígeno é de ativar as células T para que elas possam gerar os sinais necessários para que a célula tumoral possa ser efetivamente eliminada, não sendo necessário que as estruturas do scFv e do CD19 permaneçam com forte interação, tendo em vista que a mesma célula engenheirada com um CAR tem que ser capaz de interagir com diferentes células que expressem o antígeno de reconhecimento e não fique restrita a interagir somente com uma célula tumoral. Dessa forma, os scFv utilizados na estrutura de um CAR são escolhidos de acordo com a sua capacidade de induzir a ativação e proliferação das células T engenheiradas com esse receptor, e não apenas com a sua afinidade de ligação por determinado antígeno (KULEMZIN *et al.*, 2017).

Através das análises do PII mostradas nas figuras 19 e 20, a atratividade entre as CDRs do scFv e o CD19 foram monitoradas utilizando um raio de corte de 0,8 nm entre as estruturas,

sendo possível observar que as CDRs H2 e H3 apresentam um caráter de interação mais atrativo com o CD19, devido aos valores de PII mais negativos apresentados.

Figura 19 - Curva do Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos das CDRs do domínio  $V_L$  com o receptor CD19. Raio de corte = 0,8 nm. Vermelho: CDR-L1-CD19; Verde: CDR-L2-CD19; Azul: CDR-L3-CD19.



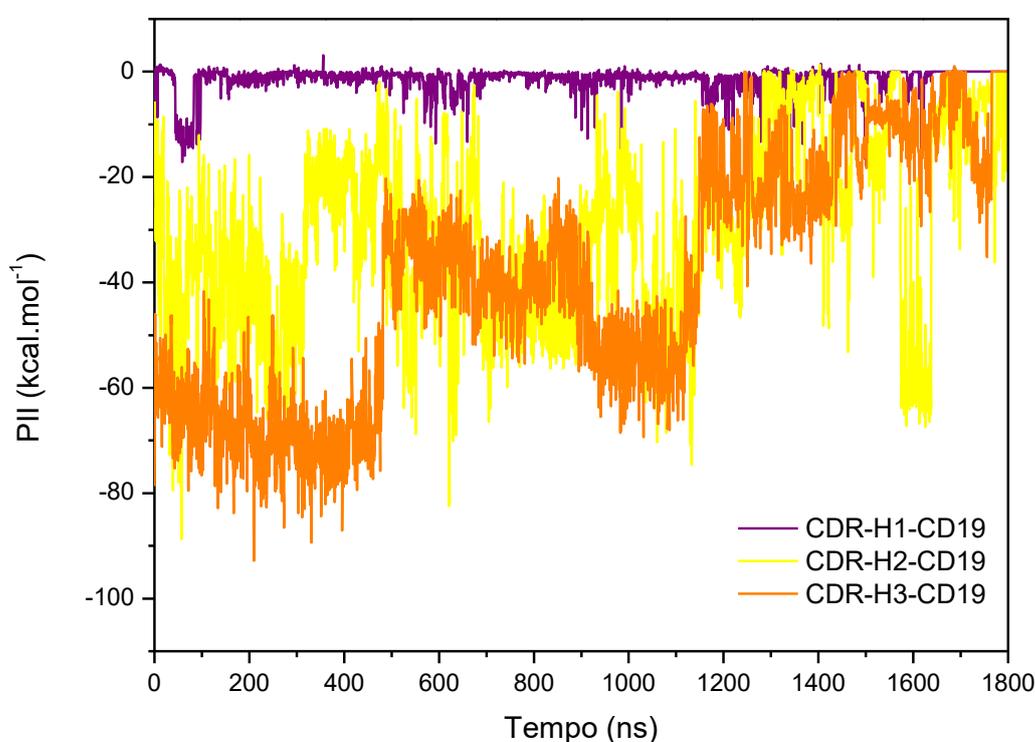
Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

É possível observar que as CDRs do domínio  $V_L$  (Figura 19) apresentam maiores oscilações no PII observado, além de apresentarem valores de PII menos negativos quando comparado às CDRs H2 e H3, demonstrando uma menor participação de forma efetiva na interação com o CD19. Além disso, é possível observar que durante o período no qual as estruturas do scFv e do CD19 se afastaram inicialmente, correspondido entre 1150 ns e 1250 ns, todas as CDRs do domínio  $V_L$  apresentaram valores de PII praticamente nulos, indicando que nesse momento não havia nenhuma interação atrativa significativa entre o domínio  $V_L$  do scFv e o receptor CD19.

Os resultados do PII entre as CDRs do domínio  $V_H$  do scFv com o receptor CD19 (Figura 20) indicam uma forte interação entre essas estruturas. É possível observar que tanto a CDR H2 quando a CDR H3 apresentam valores de PII mais negativos do que todas as outras CDRs, indicando que elas possuem grande importância na interação com o CD19. Por outro lado, a CDR-H1 representa a CDR que menos atua na interação, devido aos valores do PII próximos a 0 kcal.mol<sup>-1</sup>. Pode-se inferir que a principal CDR que atua no reconhecimento e na interação

com o epítipo é a CDR-H3, o que também é observado para outros anticorpos, tendo em vista que essa é a CDR mais variável entre os anticorpos e que conseqüentemente desempenha um importante papel em conferir a especificidade de reconhecimento dos diferentes antígenos por cada anticorpo, sendo críticas para as funções imunológicas adaptativas (WEITZNER *et al.*, 2015). Além disso, estudos que analisam complexos de interação entre anticorpo e antígeno observaram que, normalmente, a CDR-H3 é a responsável por um terço dos contatos e energia de interação com o antígeno (ALZARI *et al.*, 1998; KUNIK, OFRAN, 2013).

Figura 20 - Curva do Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos das CDRs do domínio  $V_H$  com o receptor CD19. Raio de corte = 0,8 nm. Roxo: CDR-H1-CD19; Amarelo: CDR-H2-CD19; Laranja: CDR-H3-CD19.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Os 500 ns de simulação iniciais representam o estado de interação mais atrativo entre as estruturas e é o momento no qual a CDR-H3 apresenta valores de PII mais negativos, de aproximadamente  $-70 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , corroborando para comprovar a sua importante atuação para conferir uma interação mais atrativa entre as estruturas. O período compreendido entre 550 ns e 1150 ns corresponde ao mesmo período no qual houve uma variação de RMSD do domínio  $V_L$ , o que indica que as mudanças no domínio  $V_L$  afetaram a posição de interação entre o domínio  $V_H$  e o epítipo de reconhecimento no CD19, ocasionando o aumento do PII entre as CDRs H2 e H3 com o CD19, indicando que de fato o domínio  $V_H$  possui maior contribuição

nessa interação. A partir dos 1150 ns, observa-se que todas as CDRs, em geral, apresentaram valores de PII menos negativos, evidenciando novamente a perda de interação entre o scFv e a sua região específica de reconhecimento no CD19.

## 6 CONCLUSÃO

Tanto a estrutura completa do scFv derivado do anticorpo FMC63, como a estrutura do CD19 com os loops faltantes que foram modelados através do *Modeller*, apresentaram bons resultados de validação estereoquímica por meio do programa *Procheck*, apresentando mais de 98% dos seus resíduos de aminoácidos em regiões permitidas ou favoráveis.

A partir da construção do complexo de interação entre scFv e CD19, foi possível avaliar por meio da análise de RMSD dos componentes do sistema, que o scFv apresentou-se estável durante a simulação, apresentando variações do domínio V<sub>L</sub> que afetaram a posição de interação entre as estruturas. Além disso, foi observado que o receptor CD19 apresentou o mesmo perfil de RMSD quando simulado sozinho em água e quando simulado em interação com o scFv, comprovando o seu equilíbrio estrutural. As oscilações apresentadas no perfil de RMSD da estrutura do CD19 foram devido à movimentação dos loops e da cauda de histidina, porém, vale ressaltar, que nenhum desses componentes estruturais afeta a interação do scFv com o CD19.

Durante a maior parte da simulação as estruturas apresentaram um PII bastante negativo, comprovando uma interação atrativa entre as estruturas. Foi possível determinar quais as principais CDRs atuantes na interação, sendo observado elevada importância das CDRs H2 e, principalmente, da CDR-H3, a qual apresentou o PII mais negativo durante o momento em que as estruturas estavam interagindo mais fortemente. Além disso, observou-se que, em um dado momento, o scFv não interage mais com o seu epítopo de reconhecimento na molécula de CD19, o que pode explicar o motivo da escolha desse scFv na estrutura dos CARs que são utilizados comercialmente, tendo em vista que o objetivo da estrutura do scFv é interagir com o antígeno para permitir a ativação da resposta pela célula T, não necessitando permanecer interagindo após a ativação da célula T.

## 7 PERSPECTIVAS

Portanto, a metodologia e abordagens utilizadas permitiram avaliar como ocorre a interação entre o scFv que compõe a estrutura de um CAR e o seu antígeno de reconhecimento CD19, permitindo identificar quais as principais CDRs atuantes na interação. Os resultados obtidos através dessa pesquisa possibilitam realizar posteriormente um estudo mais completo considerando-se toda a estrutura do CAR a fim de avaliar se haverá modificações na interação entre scFv e CD19 por conta da presença dos outros componentes desse receptor de antígenos quiméricos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular: Tradução** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- ABRAHAM, M. J.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B. **GROMACS User Manual version 5.1.3**, Disponível em: [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org), 2016.
- ABRAHAM, M. J.; MURTOLO, 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.
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. **Chem Rev**, v. 106, p. 1589–1615, 2006.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. *Biologia Molecular da Célula*. 5th ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.
- ALEXEY TEPLYAKOV *et al.* Crystal structure of B-cell co-receptor CD19 in complex with antibody B43 reveals an unexpected fold. **Proteins**, v. 86, p. 495–500, 2018.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. 1987.
- ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. 2 ed. ed. Oxford University Press, 2017.
- ALZARI, P. M., LASCOMBE, M. B., POLJAK, R. J. Three-dimensional structure of antibodies. **Annu Rev Immunol**. v. 6, p. 555–580, 1988.
- ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A.V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 537-541, 2012.
- ANNESLEY, C. E.; SUMMERS, C.; CEPPI, F.; GARDNER, R. A. The Evolution and Future of CAR T Cells for B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 2017.
- ARAÚJO, H. A. DE. **ALGORITMO SIMULATED ANNEALING : UMA NOVA ABORDAGEM**, 2001.
- ARFKEN, G. B.; WEBER, H. J. **Mathematical Methods for Physicists**. Orlando: FL.: Academic Pres, 1985.
- BATLEVI, C. N.; MATSUKI, E.; BRENTJENS, R. J.; YOUNES, A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 13, p. 25–40, 2016.
- BAYBUTT, T. R.; FLICKINGER, J.; CAPAROSA, E. M.; SNOOK, A. E. Advances in Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Solid Tumors. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 2019.

BERAHOVICH R, X. U. S.; ZHOU, H.; HARTO, H.; XU, Q.; GARCIA, A.; LIU, F.; GOLUBOVSKAYA, V.; WU, L. FLAG-tagged CD19-specific CAR-T cells eliminate CD19-bearing solid tumor cells in vitro and in vivo. **Frontiers In Bioscience**, v. 22, p. 1644-1654, 2017.

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, p. 3684–3690, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. VAN DER; DRUNEN, R. VAN. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 43–56, 1995.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, 2007.

CHAVEZ, J. C.; BACHMEIER, C.; KHARFAN-DABAJA, M. A. CAR T-cell therapy for B-cell lymphomas: clinical trial results of available products. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 10, p. 1-20, 2019.

CHOTHIA, C.; LESK, A. M. Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, p. 901–917, 1987.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089, 1993.

DONG, G. Q.; FAN, H.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; WEBB, B.; SALI, A. Optimized atomic statistical potentials: Assessment of protein interfaces and loops. **Bioinformatics**, v. 29, n. 24, p. 3158–3166, 2013.

FEINS, S.; KONG, W.; WILLIAMS, E. F.; MILONE, M. C.; FRAIETTA, J. A. An Introduction to Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell Immunotherapy for Human Cancer. **American Journal of Hematology**, 2019.

FISCHER, J. *et al.* CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. **J Immunother**, v. 40, p. 187-195, 2017.

FORSTER, M. J. Molecular modelling in structural biology. **Micron**; v. 33, p. 365– 84, 2002.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation - From Algorithms to Application**. 2 ed. ed. Academic Press, 2002.

GABRIELLI, E.; PERICOLINI, E.; CENCI, E., *et al.* Antibody Complementarity-Determining Regions (CDRs): A Bridge between Adaptive and Innate Immunity. **PLoS ONE**, v. 4, p. 1-12, 2009.

GLOBOCAN. Cancer Tomorrow. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>.

- GHORASHIAN *et al.* Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. **Nature Medicine**. v. 25, p. 1408-1414, 2019.
- GORDON, J. C. *et al.* H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**. v. 33, p. 368-71, 2005.
- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; GUNSTEREN, W. F. VAN. Molecular dynamics simulations. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 190, 2002.
- 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, p. 435–447, 2008.
- HOCKNEY, R. W. and GOEL, S. P. J. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**. v. 14, p. 148-158, 1974.
- 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.
- HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **J Comput Chem.**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013.
- HUANG, K. **Statistical Mechanics, 2nd Edition**. 2nd ed. John Wiley & Sons, 1987a.
- HUANG, K. **Statistical Mechanics 2Ed**. 1987b.
- INCA. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>> Acesso em: 14 de junho de 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. 5ª edição. INCA, 2019.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: **Garland Science**; 2001. The structure of a typical antibody molecule. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>.
- JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **J Chem Phys.**, v. 79, p. 926–35, 1983.
- KARIM, H. A. A.; TAYAPIWATANA, C.; NIMMANPIPUG, P.; *et al.* Molecular Dynamics Simulation on Designed Antibodies of HIV-1 Capsid Protein ( p24 ). **Atlantis Press**, p. 85–88, 2015.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, p. 646–652, 2002.

KOCHENDERFER, J. N.; SOMERVILLE, R. P. T.; LU, T. *et al.* Long-duration complete remissions of diffuse large B cell lymphoma after anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy. **Mol Ther**, v. 25, p. 2245–2253, 2017.

KULEMZIN, S. V.; KUZNETSOVA, V. V.; MAMONKIN, M.; TARANIN, A. V.; GORCHAKOV, A. A. Engineering Chimeric Antigen Receptors. **Acta naturae**, 9, 2017.

KUNIK, V., OFRAN, Y. The indistinguishability of epitopes from protein surface is explained by the distinct binding preferences of each of the six antigen-binding loops. **Protein Eng Des Sel**, 2013.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LI, X.; DING, Y.; ZI, M.; SUN, L.; ZHANG, W.; CHEN, S.; XU, Y. CD19, from Bench to Bedside. **Immunology Letters**, v. 183, p. 86-95, 2017.

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

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.

MORI, T.; MIYASHITA, N.; IM, W.; FEIG, M.; SUGITA, Y. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. **Biochim Biophys Acta - Biomembr.**; v. 7, p. 1635– 51, 2016.

MORSE, P. P.; FESHBACH, H. **Methods of Theoretical Physics**. New York: McGrawHill, 1953.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

MYERS, J. *et al.* A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules. **Proteins**, v. 63, p. 928-938, 2006.

NEELAPU, S. S.; LOCKE, F. L.; BARTLETT, N. L. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. **N Engl J Med.**, p. 2531–2544, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2011.

NICHOLSON, I. C.; LENTON, K. A.; LITTLE, D. J. *et al.* Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma. **Molecular Immunology**, v. 34, p. 1157-1165, 1997.

OHAD HAMMER. CD19 as an attractive target for antibody-based therapy. **mAbs**, v. 4, p. 571-577, 2012.

ORLANDO, E. J. *et al.* Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. **Nature Medicine**, v. 24, p. 1504–1506, 2018.

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.

PORTER, D. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. **Sci Transl Med**, v. 7, 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, p. 845–854, 2013.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1963.

RAMOS, C. A.; DOTTI, G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 7, p. 855–873, 2011.

RILEY, R. S.; JUNE, C. H.; LANGER, R.; MITCHELL, M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nature reviews|Drug Discovery**, v. 18, p. 175-196, 2019.

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.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779–815 (1993).

SALTER, A. L.; MARGOT, J. P.; STANLEY, R. R. Chimeric antigen receptor– modified T cells: CD19 and the road beyond. **Blood**, v. 131; p. 2621-2629, 2018.

SCHMIDTS, A.; MAUS, M. V. Making CAR T Cells a Solid Option for Solid Tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

SCHUSTER, S. J.; SVOBODA, J.; DWIVEDY NASTA, S., *et al.* Sustained remissions following chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. **Blood**, p. 126-183, 2015.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

SHEN, M.-Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, p. 2507–2524, 2006.

SHINICHI SATO. CD19 is a central response regulator of B lymphocyte signaling thresholds governing autoimmunity. **Journal of Dermatological Science**, v. 22, p. 1–10, 1999.

SILVA, J. L.; SANTOS, A. L. S.; NUNES, N. C. C.; SILVA, F. M. L.; FERREIRA, C. G. M.; MELO, A. C. Cancer immunotherapy: the art of targeting the tumor immune microenvironment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 84, p. 227–240, 2019.

SRIVASTAVA, S. AND RIDDELL, S. R. Engineering CAR-T Cells: Design Concepts. **Trends Immunol.** v. 36, p. 494–502, 2015.

SOMERMEYER, D.; HILL, T.; SHAMAH, S. M.; SALTER, A. I.; CHEN, Y.; MOHLER, K. M.; RIDDELL, S. R. Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. **Leukemia**, v. 10, p. 2191–2199, 2017.

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

SUBKLEWE, M.; VON BERGWELT-BAILDONA, M.; HUMPE, A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. **Transfus Med Hemother**, v. 46, p. 15–24, 2019.

TURTLE, C. J.; HANAFI, L. A.; BERGER, C. *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. **J Clin Invest.**, p. 2123–2138, 2016.

VAIRY, S.; GARCIA, J. L.; TEIRA, P.; BITTENCOURT, H. CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 3885-3898, 2018.

VAN DER STEGEN, S. J.; HAMIEH, M.; SADELAIN, M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 14, p. 499-509, 2015.

VAN GUNSTEREN, W. F.; DOLENC, J.; MARK, A. E. Molecular simulation as an aid to experimentalists. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, p. 149–153, 2008.

VAN ZUNDERT, G. C. P.; RODRIGUES, J. P. G. L. M.; TRELLET, M.; SCHMITZ, C.; KASTRITIS, P. L.; KARACA E., *et al.* The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. **J. Mol. Biol.**, v. 428, p. 720-725, 2015.

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

WANG, K.; WEI, G.; LIU, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. **Experimental Hematology & Oncology**, 2012.

WEI, G.; WANG, J.; HUANG, H.; ZHAO, Y. Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

WEITZNER, B. D., DUNBRACK JR, R. L., GRAY, J. J. The origin of CDR H3 structural diversity. **Structure**; v. 23, n. 2, p. 302–311, 2015.

WINTER, G.; MILSTEIN, C. Man-made antibodies. **Nature**, 1991.

YOKOTA, T.; MILENIC, D. E.; WHITLOW, M.; SCHLOM, J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. **Cancer Res.**, v. 52, p. 3402–3408, 1992.

YOUNG-HO LEE; CHAN HYUK KIM. Evolution of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy: current status and future perspectives. **Arch. Pharm. Res.**, v. 42, p. 607–616 (2019).

ZHANG, C.; LIU, J.; ZHONG, J. F.; ZHANG, X. Engineering CAR-T cells. **Biomarker Research**, 2017.

ZHOU, L. J.; ORD, D. C.; OMORI, S. A.; TEDDER, T. F. Structure of the genes encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. **Immunogenetics**, v. 35, p. 102–111, 1992.

ZOLA, H.; MACARDLE, P. J.; BRADFORD, T.; WEEDON, H.; YASUI, H.; KUROSAWA, Y. Preparation and characterization of a chimeric CD19 monoclonal antibody. **Immunol. Cell Biol.**, v. 69, p. 411-422, 1991.

ZUHaida ASRA AHMAD *et al.* scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.