



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

JOÃO EUDES LEMOS DE BARROS

PLANEJAMENTO *in silico* PARA A CONSTRUÇÃO DE NANOCORPOS (VHH)
MIMÉTICOS ANTI-INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) HUMANA

FORTALEZA

2025

JOÃO EUDES LEMOS DE BARROS

PLANEJAMENTO *in silico* PARA A CONSTRUÇÃO DE NANOCORPOS (VHH)
MIMÉTICOS ANTI-INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Na Área de concentração em Aplicação Biotecnológica de Moléculas Biologicamente Ativas, na Subárea de Bioinformática Estrutural e Engenharia de Anticorpos

Orientador: Dr. João Hermínio Martins da Silva

FORTALEZA

2025

JOÃO EUDES LEMOS DE BARROS

PLANEJAMENTO *in silico* PARA A CONSTRUÇÃO DE NANOCORPOS (VHH)
MIMÉTICOS ANTI-INTEGRINA $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Na Área de concentração em Aplicação Biotecnológica de Moléculas Biologicamente Ativas, na Subárea de Bioinformática Estrutural e Engenharia de Anticorpos

Aprovado em: 24 / 02 / 2025

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Andréa Queiroz Maranhão (Externo)
Universidade Federal de Brasília (UnB)

Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes (Suplente)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - CE)

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro que tornou possível essa etapa da minha formação.

À minha mãe, a mulher que ama incondicionalmente os filhos e a que mais se dedicou ao trabalho, e que, mesmo aposentada, ainda trabalha quatro dias por semana para garantir uma vida digna e confortável aos seus dois filhos, João Eudes e Pedro Henrique. Sua força e sacrifício são a base de tudo o que conquistei.

Ao meu namorado, João Paulo Rangel, que, durante esses dois anos de mestrado, esteve ao meu lado nos momentos mais dolorosos e difíceis. Seu apoio incondicional e constante conforto, especialmente a sua versão, divertida, vulgo “palhaça” foram fundamentais para que eu tivesse forças para concluir este trabalho.

Aos meus amigos de graduação – Ângela Eduarda, Alane Gonçalves, Bruno Lira, Antonio Henrique, Suieny Rodrigues, Josivânia Teixeira, Gabriely Lima, Tayna Clementino, Thialida Sabrina, Natália Aguiar, Shaskya Vitória, Iago Muniz, Thiago Andrade, Thaís Silva, Ednalva Santos, Hiasmim Chaves e Levy Adriano –, sou imensamente grato pelo apoio inestimável ao longo da minha jornada acadêmica. A presença e incentivo de cada um de vocês foram fundamentais para superar os desafios dessa trajetória desafiadora. Obrigado por caminharem ao meu lado.

Agradeço profundamente aos meus amigos de infância, que acompanharam de perto meu crescimento e dedicação nos estudos ao longo dos anos. Meu muito obrigado a Kairon Suelber, João Victor, Wanderson Lucas, Adriano Eduardo e Raul Dalisom, que sempre compartilharam apoio comigo. Estendo minha gratidão aos amigos de longa data, Antônio Vinicius, Bill Clinton, Emanuel Ewerton, Camila Ramos, Lucas Rangel, Samara Rangel, Guilherme Honorato e Nayane Ingrid, por compartilharem momentos valiosos e contribuírem para tantas memórias.

Não poderia deixar de mencionar meus amigos do ensino médio, que, mesmo após quase uma década desde a nossa despedida, continuam a compartilhar confiança e apoio, mesmo que o contato seja menos frequente. Agradeço especialmente a Cícera Vanessa, Ramires Moreira, Simone Gomes, Deriane Araújo, Daíres Fernandes, Jucilene Gomes, Ana Beatriz, Mirian Silva, Jaqueline Bezerra, Lucas Xavier, Luzilânia Santos, Ariel Jairo, Ailton Silva e Geyse Santos. Obrigado por mantermos nossa amizade e união vivas ao longo dos anos.

Aos colegas e amigos do PPG Biotec e da UFC, Ellen Malveira, Ariel Mesquita, José Samuel, Liandra Elen, João Matheus, Ana Braid e Isadora Gomes, minha gratidão pelo

suporte ao longo desta desafiadora jornada acadêmica. Um agradecimento especial a Juliana Sena, Daniel Almeida e Alana Lígia – vocês foram verdadeiros pilares durante esses dois anos intensos, tornando cada desafio mais leve e cada conquista mais significativa.

Ao Dr. João Hermínio Martins da Silva, minha gratidão pelas oportunidades concedidas a mim ao longo desses dois anos. Agradeço também por sua disponibilidade de tempo nas nossas reuniões, essenciais para o avanço do projeto. Também expresso meu reconhecimento ao Dr. Geraldo Rodrigues Sartori, peça-chave no meu crescimento acadêmico, cujas contribuições precisas e valiosas foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Andréa Queiroz Maranhão (UnB) e Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (UFC), membros da minha banca de defesa, e à Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes (Fiocruz - CE), suplente que gentilmente aceitou participar, minha profunda gratidão. Suas valiosas contribuições foram essenciais para o meu crescimento acadêmico.

Ao grupo de Biologia Estrutural e Funcional em Biofármacos da Fiocruz Ceará e aos colegas que o compõem; Andrielly Henriques, Aline Albuquerque, Matheus do Vale, Júlia Souza, Lília Oliveria, Gisele Silvestre, Luca Milério, Jean Sampaio, Eduardo Menezes e Diego Almeida, minha profunda gratidão pelo apoio e colaboração ao longo desta jornada. Agradeço também a todos os integrantes da Fiocruz Ceará e do Instituto Pasteur, cuja convivência e parceria foram fontes constantes de inspiração.

Aos meus professores da graduação, os quais hoje também tenho a honra de considerar como amigos: ao Prof. Dr. Waltécio de Almeida, pelas valiosas contribuições ministradas nas aulas de Evolução Biológica; ao Prof. Dr. Alysson Pontes, pelas relevantes orientações na disciplina de Ecologia de Ecossistemas e pelo constante empenho dedicado ao meu desenvolvimento acadêmico e pessoal; e ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar, pelas oportunidades concedidas e pela confiança depositada em minha atuação como bolsista de Iniciação Científica em seu laboratório.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pela comunicação sempre eficiente, e a todos os professores vinculados ao programa, que, direta ou indiretamente, contribuíram para essa jornada. Estendo também meu agradecimento ao núcleo gestor e aos discentes da UFC.

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória e neurodegenerativa, sendo a principal causa de incapacidade neurológica não traumática em jovens adultos. Sua incidência varia de mais de 100 casos por 100.000 habitantes na América do Norte e Europa Ocidental para menos de 30 por 100.000 em regiões equatoriais, com cerca de 40.000 casos estimados no Brasil. A EM envolve leucócitos, quimiocinas e citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-17, além da integrina $\alpha 4\beta 1$, que facilita a migração linfocitária para o sistema nervoso central (SNC) via receptor VCAM-1. O Natalizumabe (NTZ) inibe essa interação, sendo uma imunoterapia eficaz, mas seu uso prolongado compromete a vigilância imunológica, favorecendo infecções oportunistas e a reativação do poliomavírus John Cunningham (JC), levando à Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP). Além disso, apresenta efeitos colaterais como sangramentos, tontura, náusea e rigidez muscular, alto custo e falta de seletividade exclusiva para a EM, interagindo também com a integrina $\alpha 4\beta 7$, associada à Doença de Crohn. Para superar essas limitações, nanocorpos (VHHs) surgem como alternativa propícia, impulsionados por ferramentas *in silico* e algoritmos de *deep learning*, que viabilizam produção rápida e de menor custo. Este estudo desenvolveu uma estratégia inicial para criar VHHs que mimetizam o NTZ, preservando suas propriedades e especificidade. Inicialmente, cálculos de SASA (via *FreeSASA*) caracterizaram a interface VH/NTZ- $\alpha 4$. Em seguida, VHHs nativos (VHH-IN) foram selecionados do banco SAbDab, priorizando aqueles com CDR3 estruturalmente semelhante ao VH/NTZ. Três estratégias de enxerto (*grafting*) foram empregadas para transferir as CDRs do VH/NTZ para os VHHs: ENXSEQ, ENXSDR e ENXEST. O ENXSEQ unificou as CDRs do VH/NTZ nos *frameworks* (FR) dos VHHs via modelagem no *NanobodyBuilder2*. Os complexos VHH/NTZ- $\alpha 4$ foram gerados via docking molecular no HADDOCK 2.4, e os melhores selecionados com base na pontuação DockQ. Enquanto o ENXSDR preservou melhor as propriedades dos VHH-IN, mas teve menor especificidade para $\alpha 4$, e o ENXEST expos conservação intermediária e maior formação de complexo VHH/NTZ- $\alpha 4$. Já o ENXSEQ foi o menos conservador, mas com especificidade intermediária ao antígeno. Os resultados indicam que os VHHs híbridos mantêm especificidade à subunidade $\alpha 4$, variando conforme a estratégia de enxerto, sendo o ENXSDR os mais oportunos, necessitando otimização para aprimorar sua especificidade.

Palavras-chave: bioinformática; nanocorpos; natalizumabe; neurodegeneração; miméticos.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, and neurodegenerative disease and the leading cause of non-traumatic neurological disability in young adults. Its incidence ranges from over 100 cases per 100,000 inhabitants in North America and Western Europe to less than 30 cases per 100,000 inhabitants in equatorial regions, with an estimated 40,000 cases in Brazil. MS involves leukocytes, chemokines, and cytokines such as TNF- α , IFN- γ , and IL-17, as well as $\alpha 4\beta 1$ integrin, which facilitates lymphocyte migration into the central nervous system (CNS) via the VCAM-1 receptor. Natalizumab (NTZ) inhibits this interaction and serves as an effective immunotherapy; however, its prolonged use compromises immune surveillance, increasing susceptibility to opportunistic infections and reactivation of the John Cunningham (JC) polyomavirus, leading to Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML). Additionally, NTZ has side effects such as bleeding, dizziness, nausea, and muscle stiffness, along with high costs and a lack of exclusive selectivity for MS, as it also interacts with $\alpha 4\beta 7$ integrin, which is associated with Crohn's disease. To overcome these limitations, nanobodies (VHHs) have emerged as a promising alternative driven by *in silico* tools and deep learning algorithms that enable faster and more cost-effective production. In this study, we developed an initial strategy to create VHHs that mimic NTZ while preserving its properties and specificity. Initially, SASA calculations (via FreeSASA) were used to characterize the VH/NTZ- $\alpha 4$ interface. Native VHHs (VHH-IN) were selected from the SAbDab database, prioritizing those with structurally similar CDR3 regions to VH/NTZ. Three grafting strategies were employed to transfer CDRs from VH/NTZ to VHHs: ENXSEQ, ENXSDR, and ENXEST. ENXSEQ unified the VH/NTZ CDRs into the frameworks (FR) of the VHHs by modeling in NanobodyBuilder2. The VHH/NTZ- $\alpha 4$ complexes were generated via molecular docking using HADDOCK 2.4, and the best complexes were selected based on the DockQ score. Although ENXSDR better preserved the properties of VHH-IN but had lower specificity for $\alpha 4$, ENXEST exhibited intermediate conservation and greater VHH/NTZ- $\alpha 4$ complex formation. In contrast, ENXSEQ was the least conservative, but showed intermediate specificity for the antigen. These results indicate that hybrid VHHs maintain specificity for the $\alpha 4$ subunit, varying according to the grafting strategy, with ENXSDR being the most promising. However, further optimization is required to enhance specificity.

Keywords: bioinformatics; nanobodies; natalizumab; neurodegeneration; mimetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Dados Epidemiológicos da Esclerose Múltipla.....	16
Figura 2	-	Ação dos Linfócitos T e B na Fisiopatologia da Esclerose Múltipla.....	18
Figura 3	-	Íons nas Subunidades α e β das Integrinas.....	19
Figura 4	-	Classificação das Integrinas com Base em Receptores.....	20
Figura 5	-	Estados Conformacionais das Integrinas e seus Íons Metálicos.....	21
Figura 6	-	Os Estados – <i>inside-out</i> e <i>outside-in</i> – de Ativação das Integrinas.....	22
Figura 7	-	A integrina $\alpha 4 \beta 1$ e as Suas Subunidades α e β	25
Figura 8	-	Modelo de Interação de VCAM-1 ao Complexo Fab/ $\alpha 4 \beta 1$	27
Figura 9	-	Regiões Estruturais Constituintes dos Anticorpos.....	29
Figura 10	-	Isoformas e Subisoformas dos Anticorpos de <i>Homo sapiens</i>	30
Figura 11	-	Faixa de Imunogenicidade dos Anticorpos.....	31
Figura 12	-	Variedade de Fragmentos de Anticorpos Engenheirados.....	33
Figura 13	-	Anticorpos Humanos, Camelídeos e Elasmobrânquios, com Ênfase no Domínio VHH.....	35
Figura 14	-	Ilustração do Processo de Triagem dos VHHs.....	44
Figura 15	-	Esquema para Ilustrar a Estratégia do Enxerto de Sequência (ENXSEQ).....	47
Figura 16	-	Esquema para Ilustrar a Estratégia do Enxerto das SDRs (ENXSDR).....	50
Figura 17	-	Esquema para Ilustrar a Estratégia do Enxerto de Estrutura (ENXEST)..	52
Figura 18	-	Complexo VHH/NTZ- $\alpha 4$ de Alta e Baixa Qualidade Segundo DockQ...	65
Figura 19	-	Interações Entre VH/NTZ- $\alpha 4$ Obtidos Através do Software RING e RINmaker.....	67
Figura 20	-	Posição dos Aminoácidos nas Regiões FR e CDRs do Domínio VH/NTZ.....	69
Figura 21	-	Análise de ASA do Domínio VH/NTZ e da Subunidade $\alpha 4$	71
Figura 22	-	Distribuição Química e Quantitativo de Contatos das CDRs VH/NTZ...	72
Figura 23	-	Resíduos do VH/NTZ Interagindo com a Subunidade $\alpha 4$ da Integrina $\alpha 4 \beta 1$	74
Figura 24	-	Comparativo das CDRs dos VHH-IN com a CDRH3 do NTZ.....	78
Figura 25	-	Qualidade do Modelo por Resíduos dos ENXSEQ (QMENDisCO).....	80
Figura 26	-	Qualidade Global dos Modelos Obtidos pelos Software QMENDisCO, PROQ3, VOROMQA e MODFOLD.....	82
Figura 27	-	RMSPE das CDRs dos Nanocorpos ENXSEQ.....	83

Figura 28	-	Score do VOROMQA em Comparativo Antes e Depois do Refinamento.....	84
Figura 29	-	Representação Tridimensional das CDRs do ENXSEQ.....	87
Figura 30	-	RMSD dos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR Antes e Após o Enxerto.....	89
Figura 31	-	Avaliação das Posições dos Resíduos Entre os NATIVOS, ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR.....	91
Figura 32	-	Natividade dos VHH-IN e dos VHH/NTZ.....	94
Figura 33	-	Flutuação por Resíduos dos VHH-IN e dos VHH/NTZ em Ralação as RIDs.....	98
Figura 34	-	Comparação de Agregação Entre os VHH-IN e o VHH/NTZ.....	102
Figura 35	-	Flutuação de Resíduos dos VHHs Mediante a pH fisiológico (7.4) para Quantificar a Solubilidade.....	105
Figura 36	-	Variação da Estabilidade dos VHHs em Função da Temperatura.....	108
Figura 37	-	Identidade Humana Obtidas Pelo Biophi para o VHH-IN e os VHH/NTZ.....	115
Figura 38	-	Interface dos Melhores Complexos VHH-NTZ/ α 4 Segundo DockQ.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Sucesso Clínico de Inibidores de Integrinas Aprovados.....	23
Tabela 2	-	Resíduos Ativos do VH/NTZ e da Subunidade $\alpha 4$ e Resíduos Passivos da Subunidade $\alpha 4$	62
Tabela 3	-	Conservação da Estrutura Secundaria das CDRs VH/NTZ Após as Estratégias de Enxertos.....	96
Tabela 4	-	Identificação da Estabilidade Estrutural Baseado em Descritores.....	111
Tabela 5	-	Complexos VHH-NTZ/ $\alpha 4$ Selecionados Através do DockQ.....	118
Tabela 6	-	Métricas Físico-Químicas, Biofísicas e DockQ dos ENXEST.....	122
Tabela 7	-	Métricas Físico-Químicas, Biofísicas e DockQ dos ENXSEQ.....	122
Tabela 8	-	Métricas Físico-Químicas, Biofísicas e DockQ dos ENXSDR.....	123
Tabela 9	-	Métricas Físico-Químicas e Biofísicas dos NATIVOS.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ADC	Conjugados Anticorpo-Fármaco
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
ADCP	Fagocitose Mediadas por Células Dependente de Anticorpos
ADMIDAS	Sítios Adjacentes ao MIDAS
ANARCI	<i>Antigen Receptor Numbering And Receptor Classification</i>
APRs	Áreas Propensas a Agregação
ASA	Área de Superfície Acessível
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Área de Superfície Enterrada
CAMEO	<i>Continuous Automated Model EvaluatiOn</i>
CAPRI	<i>Critical Assessment of PRedicted Interactions</i>
CDC	Citotoxicidade Dependente de Complemento
CDR	Região Determinante de Complementaridade
CH	Região Constante da Cadeia Pesada
CL	Região Constante da Cadeia Leve
EM	Esclerose Múltipla
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
ENXEST	Enxerto de Estrutura
ENXSDR	Enxerto de Resíduos Determinantes de Especificidade
ENXSEQ	Enxerto de Sequência
ESAM	Molécula de Adesão Seletiva de Células Endoteliais
Fab	Fragmento de Ligação ao Antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FcRs	Receptores Fc
Fnat	Fração de Contatos Nativos
Fnonnat	Fração de Contatos Não Nativos
Fr	<i>Framework</i>
HACA	Anticorpos Humanos Contra Anticorpos Quiméricos
HADDOCK	<i>High Ambiguity Driven Biomolecular Docking</i>
HAHA	Anticorpos Humanos Contra Anticorpos Humanos

HAMA	Anticorpo Humano Anti-Camundongo
HCAbs	Anticorpos de Cadeia Pesada
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IDR	Regiões Intrinsecamente Desordenada
IgNAR	Imunoglobulina de Novo Receptor Antigênico
IMGT	<i>International ImMunoGeneTics Information System</i>
iRMS	Raiz do Valor Quadrático Médio da Interface
JAM	Moléculas de Adesão Juncional
JVC	Vírus John Cunningham
LMP	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva
LRMS	Raiz do Valor Quadrático Médio do Ligante
mAb	Anticorpo Monoclonal
MAdCAM	Molécula de Adesão às Células Maduras das Mucosas
MEC	Matriz Extracelular
MIDAS	Sítio de Adesão Dependente de Íons Metálicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PECAM	Molécula de Adesão de Células Endoteliais Plaquetárias
PPI	Interação Proteína-Proteína
RMSD	Raiz do Desvio Quadrático Médio
RMSPE	Erro Médio Quadrático Previsto
SAbDab	<i>Structural Antibody Database</i>
SASA	Área Superficial Acessível ao Solvente
SDR	Resíduos Determinantes de Especificidade
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
SYMBS	Sítio de Ligação de Íons Metálicos Sinérgicos
VCAM	Molécula de Adesão de Células Vasculares
VH	Região Variável da Cadeia Pesada
VHH	Fragmento de Cadeia Pesada e Domínio Único
VL	Região Variável da Cadeia Leve
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VNAR	Domínio Variável do Novo Receptor Antigênico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
<	Menor
=	Igual
>	Maior
°	Grau
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
Å	Angstrom
Σ	Sigma Maiúsculo
α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
Δ / δ	Delta
ε	Épsilon
κ	Kappa
λ	Lambda
μ	Mi
φ	Phi
ψ	Psi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Epidemiologia e Fisiopatologia da Esclerose Múltipla.....	16
1.2	Família das Integrinas: Estrutura e Função.....	18
1.2.1	<i>Integrina $\alpha4\beta1$ e Receptores.....</i>	23
1.3	Natalizumabe como Antagonista de $\alpha4\beta1$.....	26
1.4	Visão Geral dos Anticorpos e Aplicações Terapêuticas.....	28
1.5	Anticorpos de Cadeia Pesada e Domínio Único (VHH)	33
1.6	Problematização.....	38
2	OJETIVOS.....	40
2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos Específicos.....	40
3	MATERIAL E MÉTODO.....	41
3.1	Obtenção da Estrutura Tridimensional do Natalizumabe.....	41
3.2	Obtenção da Estrutura Tridimensional dos Nanocorpos.....	41
3.3	Caracterização das Interações Moleculares do Complexo NTZ/$\alpha4$.....	41
3.3.1	<i>Áreas de Superfícies Acessíveis a Solventes (SASA).....</i>	42
3.4	Triagem de Nanocorpos com CDR3 Estruturalmente Similar à CDRH3 VH/NTZ.....	43
3.5	Numeração dos Nanocorpos e Identificação das CDRs.....	45
3.6	<i>Grafting</i> de CDR do domínio VH/NTZ para os Nanocorpos.....	46
3.6.1	<i>Enxerto de Sequência (ENXSEQ).....</i>	46
3.6.1.1	Modelagem Molecular dos Nanocorpos.....	47
3.6.1.2	Validação dos Modelos Gerados.....	48
3.6.1.3	Refinamento dos Modelos Gerados.....	49
3.6.2	<i>Enxerto de Resíduos Determinante de Especificidade (ENXSDR).....</i>	50
3.6.3	<i>Enxerto de Estrutura (ENXEST).....</i>	51
3.7	Avaliação dos Enxertos.....	53
3.8	Predição das Propriedades dos Nanocorpos.....	53
3.8.1	<i>Predição da Natividade.....</i>	53
3.8.2	<i>Populações de Estrutura Secundária.....</i>	53
3.8.3	<i>Regiões Intrinsecamente Desordenadas (IDRs)</i>	54
3.8.4	<i>Potencial de Agregação.....</i>	55
3.8.5	<i>Potencial de Solubilidade.....</i>	55
3.8.6	<i>Termoestabilidade.....</i>	56
3.8.7	<i>Estabilidade de Pontos Fortes e Fracos.....</i>	56
3.8.8	<i>Avaliação de Humanidade.....</i>	57
3.9	Docking Molecular dos VHH/NTZ com a Subunidade $\alpha4$.....	57

3.9.1	<i>Validação dos complexos VHH/NTZ-α4</i>	63
3.9.2	<i>Escolha dos Melhores Complexos</i>	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	Caracterização da interface Natalizumabe/α4	65
4.2	Similaridade Estrutural das CDR3 VHH à CDRH3 VH/NTZ	76
4.3	Modelagem e validação dos Nanocorpos ENXSEQ	79
4.4	Validação e Avaliação dos Enxertos	85
4.5	Avaliação das Propriedades dos Nanocorpos	92
4.5.1	<i>Avaliação da Natividade</i>	92
4.5.2	<i>Avaliação da Estrutura Secundária</i>	94
4.5.3	<i>Avaliação das IDRs</i>	96
4.5.4	<i>Avaliação da Agregação</i>	99
4.5.5	<i>Avaliação da Solubilidade</i>	104
4.5.6	<i>Avaliação de Termoequilíbrio</i>	106
4.5.7	<i>Avaliação de Pontos Fortes e Fracos</i>	110
4.5.8	<i>Avaliação de Humanidade</i>	113
4.6	Seleção dos Complexos VHH/NTZ-α4	117
4.7	Construções dos VHH/NTZ para Seleção	121
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
6	PERSPECTIVAS E PROJEÇÕES	125
	REFERÊNCIAS	126
	ANEXO A - STATUS CLÍNICO DOS NANOCORPOS	143
	ANEXO B - LISTA DE CARACTERÍSTICAS EXPERIMENTAIS DO CRISTAL 4IRZ CONTENDO DO DOMÍNIO FAB E A SUBUNIDADE α4 DA INTEGRINA α4β1	144
	ANEXO C - LISTA DE DISTÂNCIAS DE INTERAÇÕES DADA PELO RING NO ESTADO RELAXADO	145
	ANEXO D - LINHAGEM GERMINATIVA DOS NANOCORPOS (NATIVOS)	145
	ANEXO E - MÉTODOS NUMÉRICOS DO HADDOCK 2.4: ESTÁGIOS, ALGORITMOS E FUNÇÕES DE ENERGIA	145
	APÊNDICE A - GRÁFICO DE RAMACHANDRAN GERADOS PARA OS VHH QUE RECEBERAM O ENXERTO DE SEQUÊNCIA	146
	APÊNDICE B - MATRIZ DE CONTATO REPRESENTANDO ENTRE O DOMÍNIO VH/NTZ E A SUBUNIDADE α4 DA INTEGRINA α4β1	147
	APÊNDICE C - COMPRIMENTO DE SEQUÊNCIA DOS VHH-IN E VHH/SDR	148
	Apêndice D - FREQUÊNCIAS DE MUTAÇÕES DOS VHH-IN E DOS VHH/NTZ	148

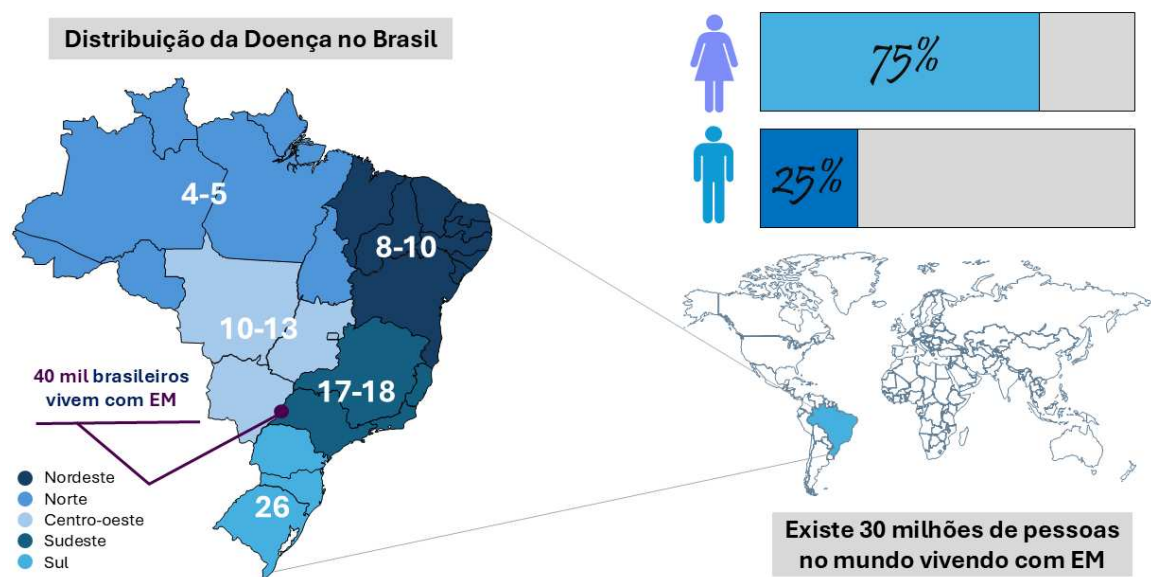
APÊNDICE E - COMPREENSÃO DA SIMILIARIDADE DOS NANOCORPOS MODELADOS PARA RAIOS X E ESPECTROSCOPIA DE RMN	149
APÊNDICE F - FLUTUAÇÃO DE RESÍDUOS PARA O POTENCIAL DE AGREGAÇÃO DOS VHH-IN E DOS ENXSDR, ENXEST E ENXSEQ.....	150
APÊNDICE G - PROBABILIDADE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA PARA O DOMÍNIO VH/NTZ.....	151
APÊNDICE H - COMPARAÇÃO DA SOLUBILIDADE ENTRE OS VHH-IN E O VHH/NTZ.....	151
APÊNDICE I - IMPACTO GLOBAL DAS IDR_s DOS VHH-IN COMPARADO COM OS VHH/NTZ.....	152
APÊNDICE J - ENERGIA DE ENOVELAMENTO POR RESÍDUO PARA OS DESCRITORES ASA, TOR E DIS	153
APÊNDICE K - QUALIDADE DO MODELO POR RESÍDUOS OBTIDOS PELO QMENDisCO PARA OS VHH-IN (INICIAIS/NATIVOS).....	157
APÊNDICE L - ESTRUTURAS 3D DOS 11 VHH-IN (INICIAIS/NATIVOS) OBTIDOS MEDIANTE AO PROCESSO DE TRIAGEM.....	159

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Fisiopatologia da Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença globalmente prevalente, com as maiores taxas de incidência na América do norte, Europa ocidental e Australásia, superando 100 casos por 100.000 habitantes. Em contraste, regiões próximas à linha do equador apresentam prevalências menores, abaixo de 30 casos por 100.000 habitantes (Haki *et al.*, 2024). No Brasil, o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (Abem) indicam uma prevalência de 15 casos por 100.000 habitantes, estimando cerca de 40.000 brasileiros vivendo com a EM, conforme mostrado na figura 1. A doença ainda é considerada rara. Na forma recorrente-remitente (RREM), as mulheres são quase três vezes mais afetadas que os homens, com idade média de início aos 30 anos. Na forma progressiva primária (PPMS), a incidência entre homens e mulheres é semelhante, com início médio aos 40 anos.

Figura 1 – Dados Epidemiológicos da Esclerose Múltipla



Fonte: Elaborada pelo Autor (2025) com base no relatório *Atlas of MS 3rd Edition – Part 1: Mapping Multiple Sclerosis Around the World – Key Epidemiology Findings* (Multiple Sclerosis International Federation, 2020), esta representação exibe dados epidemiológicos da EM. No canto inferior direito, destaca-se a prevalência global da doença. A distribuição por gênero é apresentada no canto superior direito, enquanto a distribuição no Brasil é ilustrada no lado esquerdo, com ênfase na prevalência nas cinco regiões do país.

Embora a EM continue sendo estudada, a causa exata do ataque imunológico à mielina ainda não é totalmente compreendida. Fatores genéticos (30%) e ambientais (70%) segundo Hecker *et al.* (2021), preenche papel importante na resposta inflamatória, o que está de acordo com as discussões de Haki *et al.* (2024). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a EM como uma doença autoimune inflamatória, desmielinizante, neurodegenerativa e

progressiva, sem cura, sendo a principal causa de incapacidade neurológica não traumática em adultos jovens.

Os sintomas neurológicos agudos, como déficits visuais, sensoriais e motores, comprometem a qualidade de vida e impõem alto custo social. Conforme Lassmann *et al.* (2018), a EM é caracterizada por inflamação associada à desmielinização e gliose, levando a dano neuroaxonal restrito ao sistema nervoso central (SNC). As placas no SNC, presentes em todas as fases da doença, causam inflamação, desmielinização e perda axonal, afetando o cérebro, medula espinhal e, especialmente, os nervos ópticos, tratos, corpo caloso, pedúnculos cerebelares, tronco cerebral e substância branca periventricular.

A infiltração de células imunes autorreativas pela barreira hematoencefálica (BHE) promove inflamação e desmielinização. Normalmente, células B e T autorreativas são eliminadas por mecanismos de tolerância central no timo (células T) e na medula óssea (células B), sendo controladas por mecanismos periféricos (Ochi, 2021). Entretanto, falhas nesse processo, associadas à disfunção das células T reguladoras e à resistência das células T autorreativas à supressão, comprometem essa tolerância, favorecendo a progressão da doença.

As células B exerce, como revisado por Ward e Goldman (2022), uma ação basilar na EM, não apenas pela produção intratecal excessiva de imunoglobulinas, resultante da expansão de células secretoras de anticorpos no SNC, mas também por servirem como reservatórios do vírus Epstein-Barr (EBV). Estudos como o de Bjornevik *et al.* (2023) ressaltam ainda que a infecção latente pelo EBV em células B pode estimular a ativação do sistema imunológico e favorecer a progressão da EM. De forma complementar, Aloisi, Giovannoni e Salvetti (2023) apontam que essa infecção intensifica a inflamação e potencializa o dano neuronal no SNC.

No líquido cefalorraquidiano (LCR) e no parênquima cerebral, predominam células de memória CD27+, cuja ativação é modulada por fatores genéticos e ambientais, discutido por Huang; Chen; Zhang (2017) e corroborado por Dighriri *et al.* (2023). Células T, como Th17, Th1 CD4+ e CD8+, têm influência central na EM (Ward; Goldman, 2022). As células T autorreativas, como ilustrado na figura 2, produzem altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias; TNF- α , IFN- γ , IL-17 e fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos, que contribuem para a fisiopatologia da doença. As citocinas liberadas por células Th17 aumentam a permeabilidade da BHE, facilitando a infiltração linfocitária no SNC. Embora menos abundantes que em outros tecidos, os infiltrados inflamatórios no SNC contêm linfócitos T, sobretudo CD8+ restritos ao MHC classe I além de células B e plasmócitos.

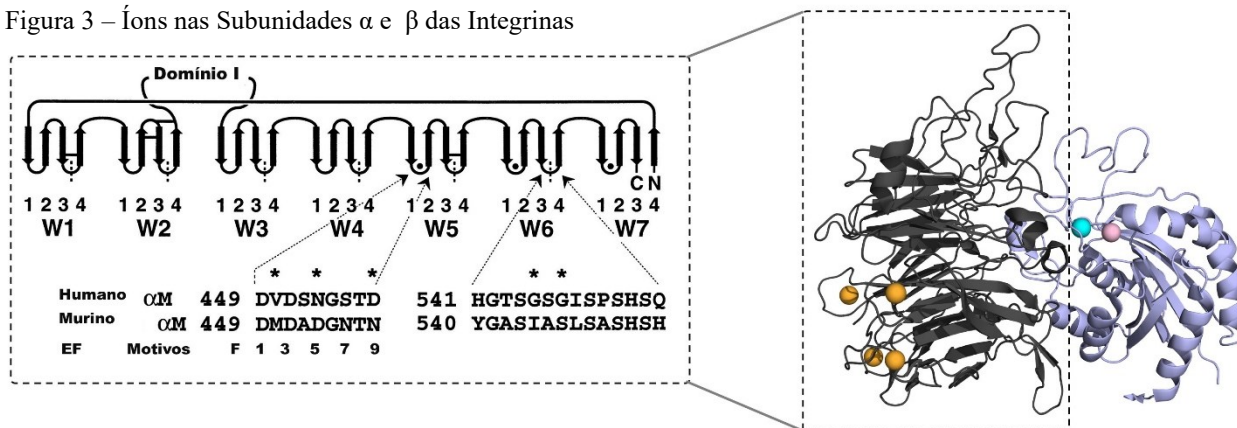
O tratamento farmacológico da EM visa reduzir a inflamação e a frequência dos surtos, retardando a progressão da incapacidade. Entre os principais fármacos, destacam-se os

Em humanos, foram identificadas 24 combinações de subunidades de integrinas, classificadas conforme suas propriedades de reconhecimento aos ligantes (Pang *et al.*, 2022). Das 18 subunidades α , nove ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αD , αL , αM , αX , αE) possuem o domínio αI , composto por aproximadamente 200 aminoácidos essenciais para essa interação. Esse domínio, localizado entre as voltas W2 e W3 do β -propeller, abriga o Sítio de Adesão Dependente de Íons Metálicos (MIDAS), que interage com cátions divalentes como Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} , conferindo especificidade funcional (Luo; Carman; Springer, 2007).

O β -propeller, também chamado de "cabeça", conecta-se ao domínio *Thigh*, a dois domínios Calf e, nas integrinas com αI , ao próprio domínio αI , formando o ectodomínio extracelular da subunidade α . Como ilustrado na figura 3, a superfície dessa subunidade exibe o β -propeller e o domínio βI , que contém três a quatro sítios de interação para Ca^{2+} , situados entre as voltas W4 e W7. Além disso, as voltas W1 a W4 na superfície superior do β -propeller frequentemente atuam como alvos para moléculas específicas anti-integrinas.

Já o ectodomínio da subunidade β compreende oito domínios, incluindo o βI , que interage com o β -propeller das subunidades α sem αI ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, αv e αIIb). Também abriga os domínios híbrido, PSI, β -cauda e quatro domínios I-EGF. A interação entre βI , β -propeller e MIDAS é fundamental para o reconhecimento ao ligante, operando papel central na funcionalidade das integrinas (Kadry; Calderwood, 2020).

Figura 3 – Íons nas Subunidades α e β das Integrinas



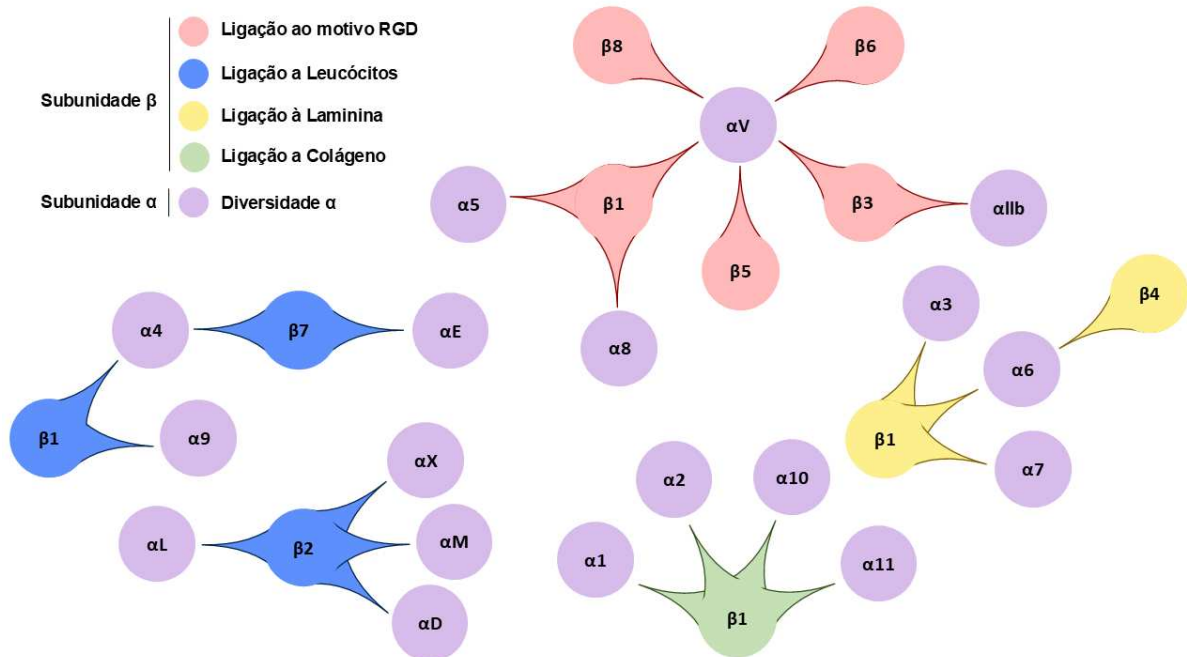
Fonte: Ilustração criada pelo Autor (2024) da integrina $\alpha 5\beta 1$ (PDB ID: 3VI4), com destaque na sua estrutura 3D (à direita) e para o domínio β -propeller em vista 2D (à esquerda; Oxvig e Springer (1998)). À esquerda, observam-se as sete voltas W típicas do β -propeller, cada uma composta por quatro fitas β . À direita, a subunidade α é destacada em cinza-claro, contendo quatro íons Ca^{2+} (em laranja), enquanto a subunidade β (domínio βI) aparece em azul acinzentado, com um íon Ca^{2+} (azul-claro) e um íon Mg^{2+} (rosa) localizados na região MIDAS.

Em *Mammalia*, os heterodímeros de integrinas mais comuns apresentam a subunidade $\beta 1$, que se associa a 12 subunidades α distintas. Outras subunidades β , como $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 8$, formam complexos com apenas uma subunidade α . Algumas subunidades α , como $\alpha 4$ e αv ,

participam de múltiplos heterodímeros, incluindo $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ e $\alpha v\beta 8$. As integrinas são classificadas como visto na figura 4 conforme seus padrões de contato. As de adesão leucocitária incluem oito membros, como $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha D\beta 2$, $\alpha 4\beta 7$ e $\alpha E\beta 7$. Destas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha E\beta 7$ reconhecem o motivo LDV, presente na fibronectina.

As integrinas que contêm a subunidade $\beta 2$, conhecidas como integrinas leucocitárias, interagem com subunidades α específicas, como αL , αM , αX e αD (Kadry; Calderwood, 2020). As integrinas que reconhecem colágeno incluem $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ e $\alpha 11\beta 1$, por sua afinidade com o motivo GFOGER (Zeltz; Gullberg, 2016). Já aquelas que interagem com o motivo RGD incluem $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, reconhecendo esse motivo na interface dos domínios β -propeller e βI . A laminina, principal glicoproteína da membrana basal, é reconhecida por integrinas como $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ (Yurchenco; Kulczyk, 2024). A diversidade dessas combinações segundo Pang *et al.* (2023), permite que as integrinas regulem adesão, migração e interações celulares em diferentes contextos celulares e teciduais.

Figura 4 – Classificação das Integrinas com Base em Receptores



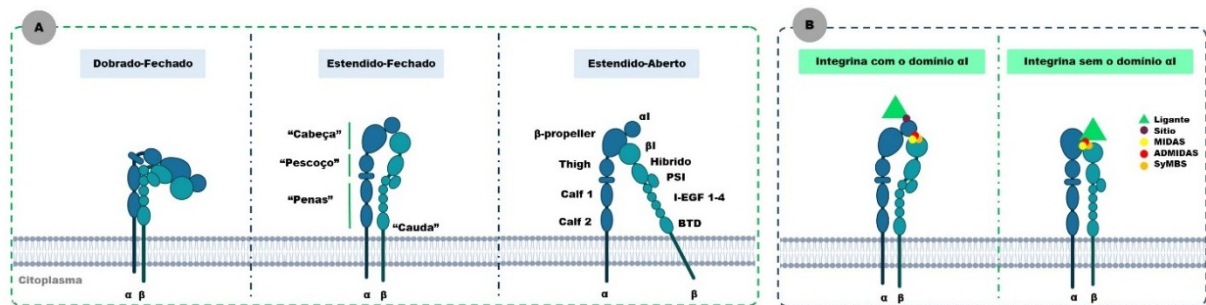
Fonte: Desenvolvida por Pang *et al.* (2023) e adaptada pelo Autor (2025), esta representação classifica e distribui as famílias de integrinas de acordo com seus ligantes. Os receptores de contato ao motivo RGD são destacados em rosa; as integrinas que interagem com receptores específicos de leucócitos, em azul; as que se ligam a laminina (com $\alpha 6$ como único subdomínio de interação a β), em amarelo; e os ligantes de colágeno, em verde.

Além dos receptores que modulam a variabilidade funcional das integrinas, sua diversidade estrutural também é influenciada por modificações pós-traducionais, como a adição de N-glicanos. Essas modificações são essenciais para a estabilidade das integrinas e sua interação com ligantes. Por exemplo, as integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ possuem, respectivamente, 14

e 12 sítios de N-glicosilação, procedendo papéis primordiais na adesão celular e migração. Embora menos estudados, os O-glicanos também contribuem para a adesão, especialmente em células tumorais.

As inúmeras combinações entre subunidades conferem às integrinas segundo Pang *et al.* (2023), participação em diversos processos biológicos, como sobrevivência celular, inflamação, imunidade, apoptose, proliferação, diferenciação, migração, infecção, trombose, angiogênese e neoplasias. Para cumprir esse papel biológico, as integrinas adotam três estados conformacionais distintos em condições fisiológicas, tal como exibido na figura 5; o estado dobrado-fechado, caracterizado por baixa ou nenhuma afinidade pelos ligantes; o estado estendido-fechado, que exibe uma interação fraca; e o estado estendido-aberto, que possui elevada afinidade por seus alvos.

Figura 5 – Estados Conformacionais das Integrinas e seus Íons Metálicos



Fonte: Representação dos estados conformacionais das integrinas e dos íons metálicos. Elaborado por Pang *et al.*, (2023) e adaptado pelo Autor (2024). A subunidade α (azul escuro) e a subunidade β (azul marinho) representam os dois heterodímeros ligados de forma não covalente. Ambas as subunidades contêm regiões intramembrana, transmembrana e extramembrana, localizadas abaixo, entre e acima da bicamada lipídica, representada em azul. (A) Exibe os três estados conformacionais conhecidos das integrinas. (B) Mostra, à esquerda, as integrinas que possuem o domínio αI e, à direita, aquelas que não contêm o domínio αI . Também são visualizados o ligante em verde e a localização dos íons metálicos, com cores diferenciadas: vermelho para MIDAS, amarelo para ADMIDAS e laranja para SyMBS.

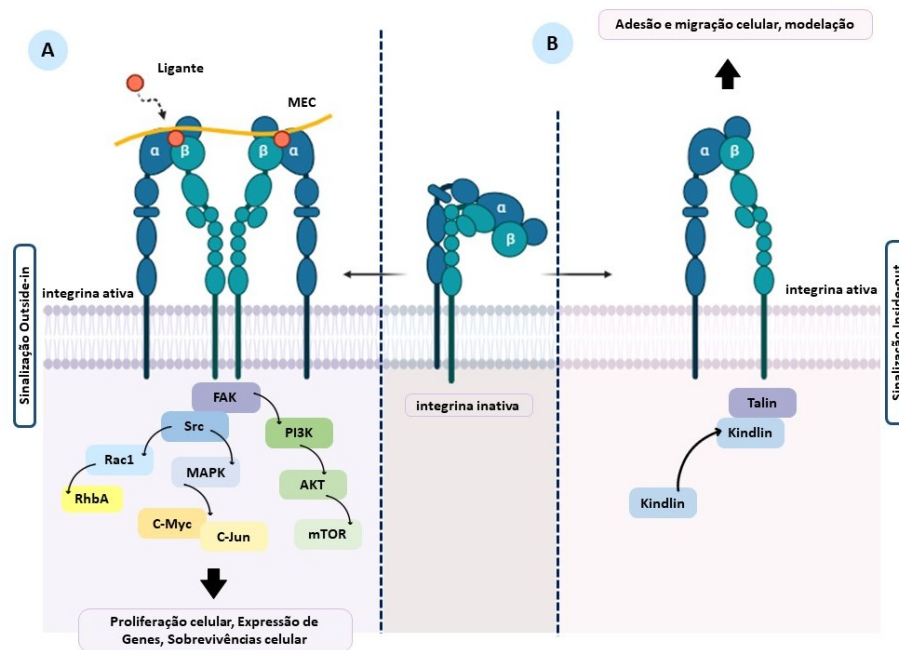
As integrinas modulam suas funções por meio de dois mecanismos clássicos de sinalização (figura 6): *outside-in* e *inside-out*. Na sinalização *inside-out*, estímulos intracelulares (como citocinas ou ativação de receptores acoplados à proteína G) induzem a ativação de GTPases da família Ras (K-Ras, H-Ras) e Rho (RhoA, Rac1, Cdc42).

Especificamente, Rap1 (mediado pelos efetores talina e kindlina) e R-Ras promovem a fosforilação de resíduos Ser/Thr no domínio citoplasmático da subunidade β ($\beta 1$, $\beta 3$), desestabilizando a conformação inativa $\alpha\beta$ e expondo sítios de interação para proteínas da MEC (fibronectina, laminina) e moléculas de adesão (ICAMs, VCAMs) (Durrant *et al.*, 2017). Esse processo eleva a afinidade das integrinas por seus ligantes e, associado ao seu agrupamento

na membrana, aumenta a *avidez*¹, promovendo a reorganização do citoesqueleto de actina via vinculina e α -actinina, o que favorece a adesão e migração celular.

Por outro lado, a sinalização *outside-in* é desencadeada quando ligantes extracelulares (como fibrina ou colágeno) se ligam às subunidades α das integrinas. Essa interação induz uma mudança conformacional, separando os domínios transmembrana e expondo o domínio híbrido na subunidade β . Alteração na qual recruta e ativa as quinases FAK (fosforilada em Tyr397) e Src (Tyr416), formando um complexo que fosforila proteínas adaptadoras como paxilina (Tyr31/118) e p130Cas. Essas, por sua vez, recrutam Crk e DOCK180, ativando as GTPases Rac1 e RhoA. O processo culmina na formação de podossomos (via Arp2/3 e WASP) e adesões focais maduras (contendo tensina e zixina), estruturas críticas para ancoragem celular à MEC, migração e diferenciação (Shen, Delaney; Du, 2012; Pang *et al.*, 2023).

Figura 6 – Os Estados – *inside-out* e *outside-in* – de Ativação das Integrinas



Fonte: Ativação dos dois tipos de sinalização das integrinas. Elaborado por Gao; Sun; Fang (2023), e adaptado por Autor (2024). (A) Sinalização *inside-out*: as integrinas, quando ligadas às proteínas da matriz extracelular (MEC), são mostradas em estado ativado e agrupado, disparando sinais a jusante, com destaque para a via de sinalização FAK e ativação subsequente de Src. B) Representação da sinalização *outside-in*: a imagem mostra a integrina em estado ativo, com interação de talinas à cauda da subunidade β , indicando a mudança conformacional para o estado aberto e o recrutamento de proteínas como kindlins, associadas a funções como adesão celular, migração e

¹ Fenômeno físico-químico que descreve a força total de interação resultante da interação simultânea de múltiplos sítios entre duas entidades moleculares multivalentes. Representa a soma cooperativa das afinidades individuais, sendo influenciada pela afinidade intrínseca dos sítios de ligação, pela valência das moléculas envolvidas (como no caso da IgM pentamérica) e pelo arranjo espacial dos epítomos ou ligantes. Diferentemente da afinidade que mede a força de uma única interação entre um parátipo e um epítipo, a *avidez* considera o contexto multivalente e o ganho funcional decorrente das interações paralelas.

remodelação da MEC. Elementos destacados: AKT (Proteína quinase B), MEC (Matriz extracelular), FAK (Cinase de adesão focal), MAPK (Cinase de proteína ativada por mitógeno), mTOR (Alvo mamífero da rapamicina), PI3K (Cinase de fosfoinosídeo 3), RhoA (Membro da família do gene homólogo RasA).

As integrinas consomem papel precípua em doenças autoimunes, como doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase e esclerose múltipla (Chastney *et al.*, 2025). Na inflamação intestinal, a superexpressão da integrina $\alpha 4\beta 7$ em células T de memória CD4⁺ facilita sua interação com a Molécula de Adesão às Células Maduras das Mucosas-1 (MAdCAM-1), em áreas inflamadas, enquanto a integrina $\alpha 4\beta 1$, presente em tecidos linfoides, se liga à Molécula de Adesão Celular Vascular-1 (VCAM-1) no endotélio, promovendo a migração de células T ativadas para o SNC.

Makker e Hommes (2016) demonstraram que o bloqueio da integrina $\alpha 4$ diminui a infiltração de células T, atenuando inflamações intestinais. Enquanto isso, a integrina $\alpha E\beta 7$, expressa em células TCD8⁺, Treg e TH9, liga-se à E-caderina, estabilizando o epitélio intestinal (Zundler *et al.*, 2019). Na esclerose múltipla, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha E\beta 7$ e $\alpha 4\beta 1$ regulam respostas imunes e influenciam a progressão da doença, com $\alpha 4\beta 1$ sendo um alvo terapêutico promissor. Apesar do envolvimento dessas integrinas em múltiplas patologias, poucos antagonistas foram aprovados (ver Tabela 1)

Tabela 1 – Sucesso Clínico de Inibidores de Integrinas Aprovados

Antagonistas de Integrinas				
Nome	Quimiotipo	Alvo	Indicação	Aprovado
Abciximab	Fragmento mAb	Pan- $\beta 3$ ($\alpha v\beta 3/\alpha IIb\beta 3$)	Síndrome Coronária Aguda	Dezembro, 1994
Efalizumabe	mAb humanizado	$\alpha L\beta 2$	Psoríase Plaquetária	Outubro, 2003
Eptifibatide	Pequena molécula	$\alpha IIb\beta 3$	Síndrome Coronária Aguda	Maio, 1998
Lifitegrast	Pequena molécula	$\alpha L\beta 2$	Doença do Olho Seco	Julho, 2016
Natalizumabe	mAb humanizado	Pan- $\alpha 4$ ($\beta 7/\beta 1$)	Esclerose Múltipla	Novembro, 2004
Tirofiban	Pequena molécula	$\alpha IIb\beta 3$	Síndrome Coronária Aguda	Agosto, 1998
Vedolizumabe	mAb humanizado	$\alpha 4\beta 7$	Colite Ulcerativa e Doença de Crohn	Maio, 2014

Fonte: Elaborado por Slack *et al.* (2022) e adaptado por Autor (2024).

1.2.1 Integrina $\alpha 4\beta 1$ e Receptores

A proteína transmembrana $\alpha 4$, codificada pelo gene *ITGA4*, forma o heterodímero $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 ou CD49d(α)/CD29(β)). A figura 7 representa essa estrutura. Expressa em linfócitos, eosinófilos e monócitos, sua afinidade é modulada por mecanismos *inside-out* em resposta a quimiocinas, facilitando adesão e mobilidade celular. A $\alpha 4\beta 1$ também influencia o desenvolvimento e a diferenciação celular (Ferreira *et al.*, 2021). A integrina $\alpha 4\beta 1$ interage com

a molécula de adesão VCAM-1, promovendo a formação de miotúbulos e o alinhamento de mioblastos secundários. Sua expressão em células epiteliais tímica e células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ da medula óssea está associada à mobilização celular e inibição do *homing*² de progenitores hematopoéticos (Prosper *et al.*, 1998).

Merle *et al.* (2021), bem como Rutledge e Muller (2022), destacam que a $\alpha 4\beta 1$ influencia a resposta imune inata, incluindo respostas independentes de anticorpos. No sistema adaptativo, participa da ativação de antígenos por células B e da transmigração leucocitária para tecidos lesionados via VCAM-1. Esse processo ocorre em etapas coordenadas: captura de leucócitos pelo endotélio ativado, rolamento mediado por selectinas (E e P) e glicoproteínas de superfície, seguido da interação de quimiocinas inflamatórias, como CCL2 (MCP-1) e CXCL12 (SDF-1), com receptores específicos nos leucócitos (CCR2 e CXCR4). Isso ativa integrinas como VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) e LFA-1 ($\alpha L\beta 2$), aumentando sua afinidade por VCAM-1 e ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular-1) e promovendo a adesão firme ao endotélio.

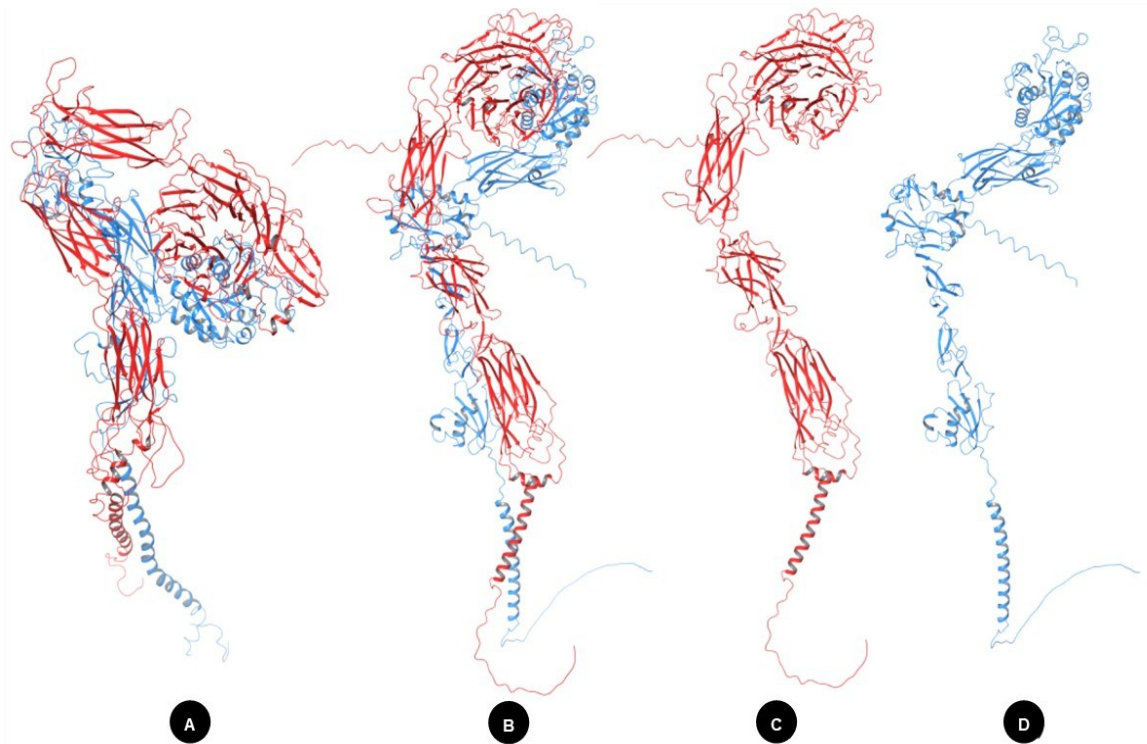
A adesão firme é essencial para o extravasamento leucocitário, que ocorre por duas vias: (1) paracelular, através das junções endoteliais, mediada por PECAM-1, JAMs, CD99 e ESAM; (2) transcelular, com o leucócito atravessando diretamente o citoplasma endotelial, facilitado por Rho GTPases e caveolinas. No espaço extravascular, leucócitos migram ao tecido lesionado guiados por gradientes de quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL12), interagindo com fibronectina e Metaloproteínases de Matriz (MMPs), que remodelam o ambiente tecidual. No foco inflamatório, desempenham funções como fagocitose, liberação de citocinas e reparo tecidual.

A $\alpha 4\beta 1$ participa da adesão endotelial de alta afinidade e do rolamento de baixa afinidade, devido à estrutura da subunidade $\alpha 4$ (Calf2, Calf1, Thigh, β -propeller e domínio αI). A ausência do domínio αI é compensada pelo domínio βI da subunidade β , que, junto ao β -propeller, forma o sítio de reconhecimento ao ligante. O segmento CS-1 da fibronectina, contendo o motivo LDV, é essencial para essa interação. A VLA-4 se liga ao VCAM-1 por domínios Ig, incluindo o motivo IDS. Membros da Superfamília das Imunoglobulinas (IgSF), como JAM-B (JAM-2) e JAM-C (JAM-3), regulam a interação leucócito-endotélio e a adesão celular, embora sua associação direta com a VLA-4 ainda não esteja totalmente esclarecida (Kummer; Ebnet, 2018). Os principais ligantes da $\alpha 4\beta 1$ são a fibronectina e a VCAM-1, cuja expressão é regulada pelo Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) em resposta a estímulos pró-

² Processo de migração seletiva dos leucócitos e outras células imunes para tecidos específicos, incluindo locais de infecção ou lesão, garantindo a vigilância e a resposta imune. Pode ser do tipo constitutivo, como no tráfego de linfócitos virgens para linfonodos via vênulas de endotélio alto (HEVs), ou do tipo induzido, em resposta a inflamações e infecções. Esse mecanismo direciona linfócitos T e B ativados aos locais de infecção, favorecendo a eliminação do patógeno.

inflamatórios. Outros ligantes, como osteopontina e possivelmente JAM-B, também interagem com $\alpha 4 \beta 1$, mas as evidências sobre a emilina permanecem limitadas (Tissino *et al.*, 2024).

Figura 7 – A integrina $\alpha 4 \beta 1$ e as Suas Subunidades α e β



Fonte: Modelo gerado pelo AlphaFold, conforme descrito por Tvaroška, Kozmon e Kóňa (2023). Na imagem A, observa-se a integrina $\alpha 4 \beta 1$ em um de seus estados conformacionais, conhecido como dobrado-fechado. Na imagem B, o heterodímero $\alpha 4 \beta 1$ encontra-se em seu estado estendido-fechado. Por fim, nas imagens C e D, são apresentadas separadamente as subunidades que compõem a integrina: a subunidade α (imagem C) e a subunidade β (imagem D).

A interação $\alpha 4 \beta 1$ /VCAM-1 é regulada por Rap-1, talina e paxilina. Rap-1, uma GTPase, ativa integrinas via sinalização *inside-out* em resposta ao TCR e CD31, estabilizando a interação com a cauda citoplasmática da integrina. A subunidade $\alpha 4$ interage com a paxilina de maneira dependente de fosforilação, regulando a migração linfocitária. A fosforilação da Ser988 por PKA inibe essa interação, promovendo adesão dinâmica essencial para a motilidade celular e o direcionamento de linfócitos T para tecidos inflamados, como o SNC na esclerose múltipla (Gilon *et al.*, 2021). A integrina $\alpha 4 \beta 1$ está envolvida em doenças autoimunes e inflamações crônicas, como esclerose múltipla, doença de Crohn, asma, acidente vascular cerebral (AVC) e artrite reumatoide, sendo um alvo terapêutico promissor. Estratégias incluem anticorpos bloqueadores e moléculas miméticas para modular sua atividade. Na esclerose múltipla, a VLA-4 facilita a migração de células T CD4⁺ (Th1 e Th17) através da barreira hematoencefálica, exacerbando a inflamação no SNC.

1.3 Natalizumabe como Antagonista de $\alpha 4\beta 1$

Os anticorpos contra a subunidade $\alpha 4$ da integrina foram classificados por Pulido *et al.* (1991) com base em seu efeito funcional e na competição cruzada em epítomos A, B e C. Os anticorpos do epítomo B bloqueiam a interação ao VCAM-1 e à fibronectina, enquanto os do epítomo A inibem parcialmente apenas a interação com a fibronectina. Em contraste, os anticorpos do epítomo C não apresentam efeito inibitório significativo.

Em 2004, o primeiro antagonista direcionado ao epítomo B da subunidade $\alpha 4$ das integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$ foi aprovado para uso clínico nos Estados Unidos e na Europa, destinado ao tratamento da esclerose múltipla recorrente-remitente (EMRR). No Brasil, o NTZ está disponível tanto pelo Sistema Único de Saúde (SUS) quanto na rede privada de saúde. Este, foi o primeiro biofármaco desenvolvido notadamente para tratar a EM, sendo indicado para casos graves, de rápida progressão ou refratários a outros tratamentos. Sua atuação reduz a atividade inflamatória, minimizando surtos e incapacidades associadas à doença.

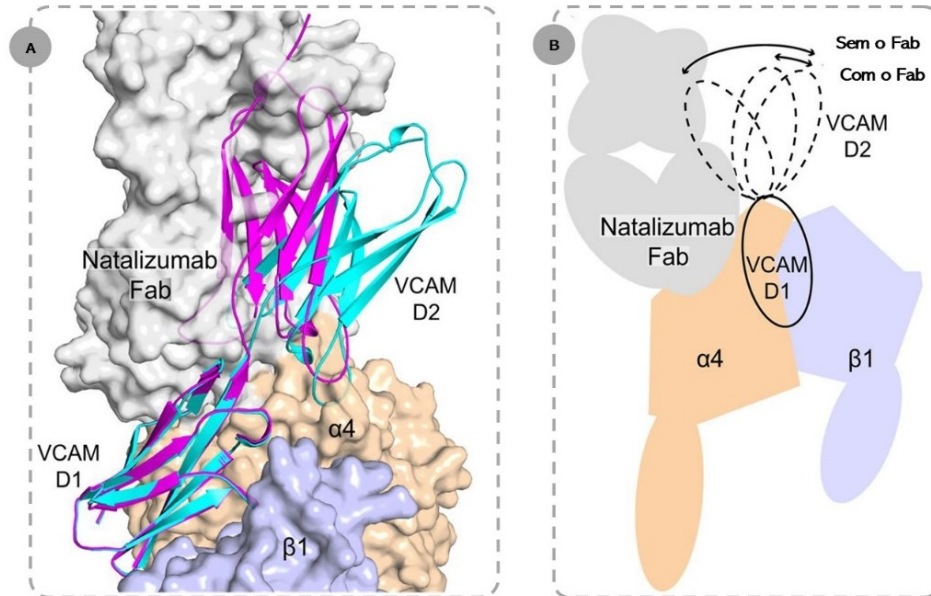
O NTZ (**Tysabri®**, **Biogen**) é um anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG4, que não ativa o complemento. Ele bloqueia a migração de células imunológicas para o SNC por meio de um mecanismo de antagonismo não competitivo, ligando-se seletivamente à subunidade $\alpha 4$ das integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, presentes na superfície segundo Morrow *et al.* (2022), de linfócitos T, B, monócitos e eosinófilos, exceto neutrófilos.

O sítio de interação do VCAM-1 na integrina $\alpha 4\beta 1$, localiza-se na interface entre os domínios β -*propeller* e β I. A chamada "face de ligação" corresponde à região do β -*propeller* conectada ao domínio β I, composta pelas folhas $\beta 4$ - $\beta 1$ e $\beta 2$ - $\beta 3$. Já a "face oposta", onde o NTZ se liga, é formada pelas folhas $\beta 1$ - $\beta 2$ e $\beta 3$ - $\beta 4$. A "pegada" do Natalizumabe cobre parte da face $\beta 3$ - $\beta 4$, mas não se estende à região conectada ao domínio β I, mantendo uma distância de 15 a 20 Å (Yu; Schürpf; Springer, 2013).

O epítomo de interação do NTZ inclui as folhas $\beta 4$ - $\beta 1$ anteriores à região W3, a folha $\beta 4$ da W2 e as folhas $\beta 3$ - $\beta 4$ das regiões W3 e W4. Sua área de contato se estende às extremidades das folhas $\beta 3$ - $\beta 4$ de W3 e W4 na "face de ligação" de cátions divalentes, mas abrange apenas as porções mais distantes das folhas $\beta 4$ - $\beta 1$ de W3 na "face de ligação" do ligante (Yu; Schürpf; Springer, 2013). Ao se ligar às voltas W2, W3 e W4 do β -*propeller* da integrina, o NTZ bloqueia a interação da $\alpha 4\beta 1$ com seu receptor cognato, o VCAM-1, presente na superfície do endotélio vascular. Além disso, impede a interação a outros ligantes, como fibronectina e osteopontina (Leodori *et al.*, 2024). Embora o domínio D1 do VCAM-1 não colida com o Fab do Natalizumabe como mostrado na figura 8, o domínio D2 pode colidir em algumas orientações,

reduzindo a afinidade entre $\alpha 4\beta 1$ e VCAM-1. Dessa forma, o Natalizumabe restringe as conformações disponíveis para a interação, contribuindo para sua eficácia clínica.

Figura 8 – Modelo de Interação de VCAM-1 ao Complexo Fab/ $\alpha 4\beta 1$



Fonte: O modelo do complexo ternário entre o NTZ, $\alpha 4\beta 1$ e VCAM, desenvolvido por Yu, Schürpf e Springer (2013), apresenta as superfícies acessíveis ao solvente dos domínios $\alpha 4$ β -propeller (em bege), $\beta 1$ (em lilás claro) e Fab (em cinza). Na representação 3D (A), observa-se a interação entre as três proteínas; Fab, VCAM e $\alpha 4\beta 1$, com destaque para variações nas orientações dos domínios D1-D2 da VCAM, conforme descritas nas estruturas cristalinas de VCAM D1D2 por Yu *et al.* (2012), representadas em formato de fita. Já na ilustração 2D (B), evidenciam-se as limitações conformacionais da VCAM impostas pela interação do NTZ com o β -propeller.

O NTZ demonstra eficácia na redução da frequência de exacerbações clínicas, da migração de leucócitos para o SNC e do número e volume de lesões cerebrais ativas, além de retardar a progressão da deficiência física (Chataway; Miller, 2013). Sua aprovação foi baseada em estudos clínicos de fase III, que evidenciaram diminuição na taxa anualizada de recaídas, no risco de progressão da incapacidade ao longo de dois anos e na formação de novas lesões detectadas por ressonância magnética (Chappell *et al.*, 2024).

Além disso, o tratamento melhora a integridade tecidual, conforme demonstrado por imagens de tensor de difusão, e reduz a perda de volume cerebral, reforçando sua eficácia na EMRR. Pacientes tratados apresentam segundo Lereim *et al.* (2024), menor incidência de lesões realçadas por gadolínio e hipointensas em T1, enquanto estudos controlados por placebo confirmam que o biofármaco suprime a formação de novas lesões (Nakamura *et al.*, 2024).

Em pacientes não tratados, o LCR frequentemente exhibe níveis elevados de linfócitos e bandas oligoclonais (BOCs) de IgG e IgM, marcadores relacionados à degeneração axonal e à maior atividade da doença (Kuhle *et al.*, 2015). Dado à baixa quantidade de células T e B no

LCR, o índice de IgG e a razão CD4⁺/CD8⁺ é diminuída, além de suprimir a resposta inflamatória. Há uma redução acentuada no número de células T auxiliares (CD4⁺), células T citotóxicas (CD8⁺), células B (CD19⁺) e células plasmáticas (CD138⁺), bem como nos níveis de quimiocinas inflamatórias (CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CCL2) e interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8). Esses efeitos, discutidos por Warnke *et al.* (2015) tornam-se evidentes após um ano de tratamento, situação constatada por Liampas *et al.* (2024).

O mecanismo de ação do Natalizumabe envolve o bloqueio da integrina $\alpha 4\beta 1$, impedindo sua interação com proteínas como VCAM-1, osteopontina e fibronectina, que estão superexpressas em lesões da EM. Isso reduz a infiltração leucocitária e a inflamação intratecal, além de promover como mencionam Sellebjerg *et al.* (2016), o reparo endógeno, preservação tecidual e melhora do metabolismo axonal. Apesar de sua eficácia, o uso prolongado ou a exposição prévia a terapias imunossupressoras aumentam o risco de reativação do vírus John Cunningham (JC), presente em 50-70% da população, e do desenvolvimento da Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP).

Esse risco decorre da saturação da integrina $\alpha 4$ e das altas concentrações séricas do medicamento, comprometendo a vigilância imunológica no SNC e favorecendo a persistência viral, além de aumentar a suscetibilidade a outras infecções oportunistas (Muralidharan *et al.*, 2017). Além da LMP, o Natalizumabe pode causar efeitos adversos, incluindo faringite, sangramento, trombocitopenia, infecções urinárias, urticária, cefaleia, tontura, náusea, artralgia, febre e rigidez (Serra López-Matencio *et al.*, 2021).

1.4 Visão Geral dos Anticorpos e Aplicações Terapêuticas

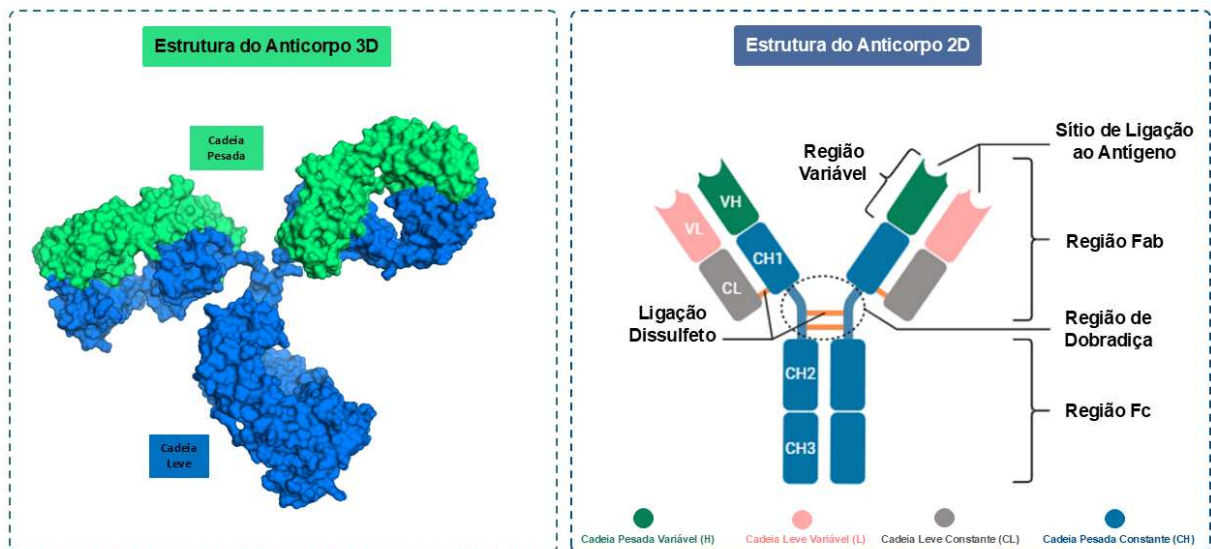
Os linfócitos B são fundamentais para a resposta humoral adaptativa no subfilo dos vertebratas, diferenciando-se em plasmócitos, células B efetoras e células de memória quando ativados por antígenos reconhecidos pelos BCRs. Essa ativação estimula a produção e liberação de anticorpos na corrente sanguínea (Malone *et al.*, 2023). Os anticorpos, membros da superfamília das imunoglobulinas, existem como moléculas livres ou associados à membrana dos linfócitos B. Como revisado por Daëron (2024), eles operam funções não apenas, mas incluindo, a neutralização de microrganismos, ativação do complemento, opsonização, citotoxicidade mediada por células e ativação de mastócitos em resposta a parasitas.

Esses anticorpos dispõem uma estrutura semelhante a letra “Y” do alfabeto romano, composta por duas cadeias pesadas (IgH) e duas cadeias leves (IgL), codificadas pelos genes localizados nos cromossomos 14, 2 (κ , Kappa) e 22 (λ , Lambda), respectivamente. As cadeias pesadas contêm um domínio variável (VH) e três constantes (CH1, CH2 e CH3), enquanto as

leves retratam um domínio variável (VL) e um constante (CL). As regiões Fab (observadas na figura 9), responsáveis por conter os domínios de contato ao antígeno, são formadas pela combinação dos domínios VH/VL e CH1/CL. (Mikocziova; Greiff; Sollid, 2021)

As ligações dissulfeto garantem a estrutura e integridade dos heterodímeros. Já os domínios VH e VL formam compartimentos distintos, cada um contendo três regiões altamente variáveis, chamados Regiões Determinante de Complementaridade (CDRs). O parátopo, que concentra cerca de 80% dos resíduos críticos para a interação com o antígeno, é formado por essas CDRs. Embora CDR1, CDR2 e CDR3 contribuam de maneira diferente para o reconhecimento antigênico. No entanto, cerca de 20% de acordo com Sela-Culang, Kunik e Ofran (2013), os resíduos de interação estão em regiões fora das CDRs. A versatilidade dos anticorpos no reconhecimento de antígenos decorre da evolução de suas CDRs ao longo de milhões de anos, permitindo a identificação eficaz de diversas superfícies antigênicas (Oreste; Ametrano; Coscia, 2021). Essa diversidade é possível graças à recombinação somática aleatória nas regiões hipervariáveis, formando parátomos únicos que interagem com epítomos específicos.

Figura 9 – Regiões Estruturais Constituintes dos Anticorpos



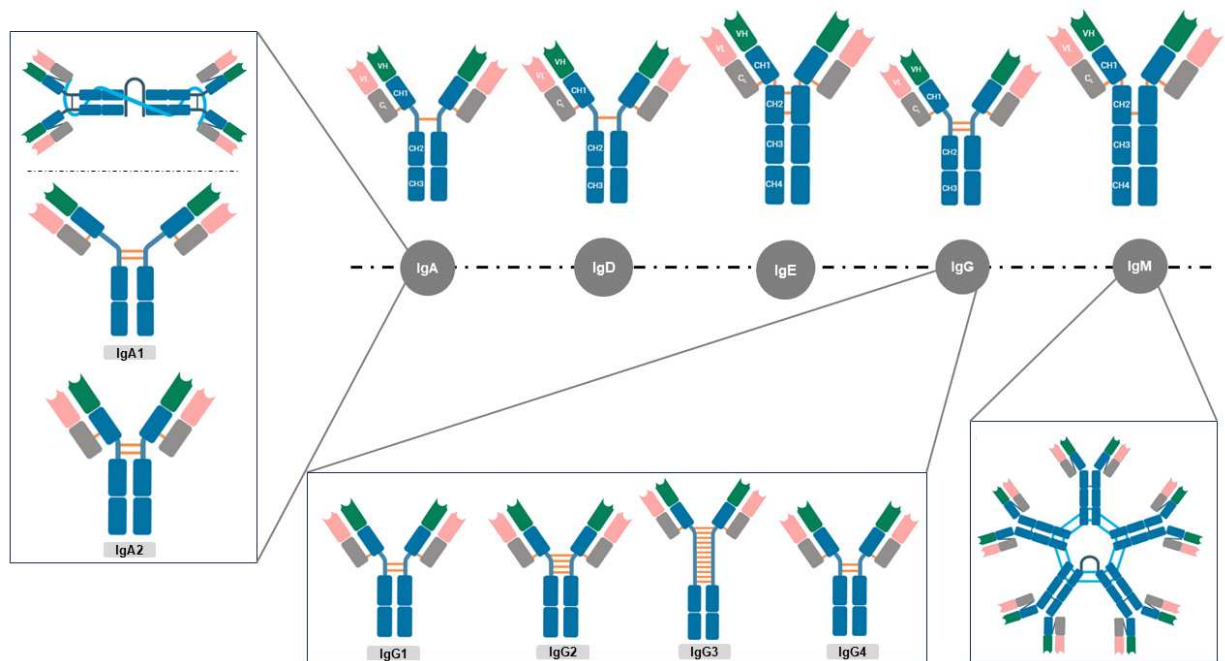
Fonte: A representação tridimensional (3D) e bidimensional (2D) de uma imunoglobulina G (IgG) foram elaboradas pelo autor (2024). À esquerda, a estrutura 3D da IgG (PDB ID: 1IGT) é exibida em formato de superfície, gerada no *PyMOL*, com os domínios CH e VH destacados em azul, e os domínios VL e CL em verde claro. À direita, a ilustração 2D evidencia as principais regiões estruturais da IgG.

Durante o desenvolvimento dos linfócitos B, ocorre a recombinação V(D)J, onde a região variável (V) das cadeias pesadas (IgH) é codificada pelos genes V, D e J, enquanto nas cadeias leves (IgL), apenas pelos genes V e J. As regiões constantes (C) das cinco isoformas de anticorpos vistas na figura 10 – IgM, IgD, IgG, IgE e IgA – são codificadas por diferentes exons como discutem Chi Li e Qiu (2020). O processo inicia-se com quebras de fita dupla (DSB)

catalisadas pelas recombinases RAG1 e RAG2 em sequências de sinal de recombinação (RSS). Genes órfãos de Ig, em outros cromossomos, podem contribuir para a formação de BCRs.

Os receptores FcRs, presentes em células imunes, reconhecem algumas classes de anticorpos de forma específica: os FcγRs interagem com a IgG, o FcαR com a IgA, o FcεR com a IgE e o FcμR com a IgM. Além disso, há indícios da existência de um receptor para IgD, denominado FcδR, ainda pouco explorado (Gogesch *et al.*, 2021). As cadeias pesadas das imunoglobulinas IgA, IgD e IgG possuem três domínios constantes, enquanto as de IgE e IgM apresentam quatro. Notadamente, tanto a IgA quanto a IgM apresentam a capacidade de formar estruturas multiméricas, sendo a IgA predominantemente dimérica e a IgM, pentamérica.

Figura 10 – Isoformas e Subisoformas dos Anticorpos de *Homo sapiens*



Fonte: Representação 2D da distribuição dos anticorpos humanos, elaborada pelo Autor (2024). A figura destaca que apenas as isoformas IgA e IgM formam multímeros, sendo a IgA preeminentemente dimérica e a IgM pentamérica. Também são evidenciadas as duas subisoformas de IgA, as quatro de IgG, além das IgD e IgE, que possuem quatro domínios CH, assim como a IgM, em contraste com os demais anticorpos, que apresentam três.

A eficácia dos anticorpos decorre conforme mencionam Kandari e Bhatnagar (2023), de sua capacidade de interação aos antígenos e de integração biológica, sendo essencial para aplicações diagnósticas, acadêmicas e terapêuticas. No contexto terapêutico, a IgG é a isoforma mais utilizada devido à sua longa meia-vida, que varia entre 21 e 28 dias dependendo do subtipo, e sua capacidade única de atravessar a barreira placentária, sendo que os subtipos IgG1 e IgG4 apresentam maior eficiência nesse processo. Fora que, a IgG interage com receptores FcγR em células imunes, como células NK, neutrófilos e monócitos, mediando, como

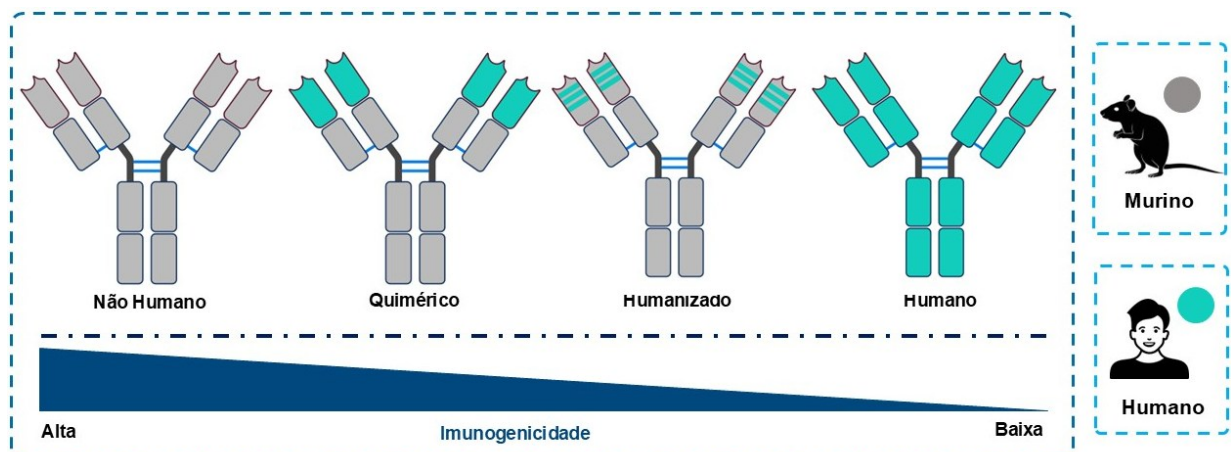
mencionam De Taeye, Rispen e Vidarsson (2019), funções essenciais como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) e citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Kandari e Bhatnagar (2023), em sua revisão, mencionam que a IgG possui quatro subtipos (IgG1-IgG4), cada um com características funcionais distintas, enquanto a IgA, menos explorada, apresenta dois subtipos (IgA1 e IgA2).

A produção de mAbs, desenvolvida por Köhler e Milstein (1975), combina linfócitos B de murinos imunizados com células de mieloma, originando hibridomas capazes de gerar anticorpos em larga escala, com alta especificidade e sensibilidade. Entretanto, a imunogenicidade dos mAbs não humanos motivou estratégias para humanizá-los sem comprometer sua funcionalidade (Figura 11). O **Muromonab-CD3 (OKT3)**, primeiro mAb aprovado, exemplifica esse desafio: seu caráter murino induzia forte resposta imunogênica, com produção de anticorpos anti-murinos (HAMA), o que limitava seu uso prolongado (Sgro, 1995).

Para mitigar a imunogenicidade associada aos Ab murinos, foram desenvolvidos anticorpos quiméricos, como Abciximabe, Infliximabe e Rituximabe, nos quais os domínios CH foram substituídos por sequências humanas, mantendo-se os domínios VH/VL murinos. Levando a redução da resposta HAMA em 50% a 75%. No entanto, as regiões variáveis murinas ainda podem induzir imunogenicidade residual, com a formação de anticorpos anti-quiméricos (HACA) em até 30% dos pacientes conforme mencionado por Hwang e Foote (2005).

Para reduzir a resposta imunológica a anticorpos murinos, foram desenvolvidos anticorpos humanizados, como Daclizumabe, Trastuzumabe e Pembrolizumabe. Nesses anticorpos, os domínios CH e os FR das regiões variáveis foram substituídos por sequências humanas, preservando-se as CDRs murinas. Embora essa abordagem reduza substancialmente a resposta imune, pode comprometer a afinidade, e em até 9% dos casos, induzir a produção de anticorpos anti-humano (HAHA) (Hwang; Foote, 2005; Mirick, 2004).

Figura 11 – Faixa de Imunogenicidade dos Anticorpos



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2024), com base nas discussões de Mosch e Guchelaar (2022), representa a relação entre a imunogenicidade dos mAbs e sua identidade com a sequência humana. O processo de humanização, que substitui segmentos não humanos, é ilustrado com anticorpos murinos em cinza e humanos em turquesa vibrante. A escala de imunogenicidade, em tons de verde, mostra que anticorpos murinos têm 0% de identidade humana, quiméricos 65%, humanizados acima de 90% e totalmente humanos, 100%, refletindo uma redução progressiva na imunogenicidade.

Por fim, os anticorpos totalmente humanos, como Adalimumabe, Panitumumabe e Ofatumumabe, foram gerados por exibição em fagos, reduzindo ainda mais a imunogenicidade. No entanto, respostas anti-idiotipo, ou seja, anticorpos direcionados contra a região variável de outro anticorpo, ainda podem ocorrer (Kohler; Pashov; Kieber-Emmons, 2019). Ainda assim, esses biofármacos expõem alta seletividade, precisão em alvos específicos e maior tolerância em comparação a pequenas moléculas terapêuticas (Castelli; McGonigle; Hornby, 2019).

Apesar dos avanços na tecnologia de hibridoma e na redução da imunogenicidade, os mAbs ainda enfrentam desafios. Embora suas propriedades; como alta especificidade, segurança ajustável e mecanismos de ação diversificados, os destaquem em relação a outras terapias, além de sua ampla aplicabilidade em oncologia, infecções, neurologia, distúrbios metabólicos e imunológicos, persistem obstáculos. Inovações em construções como conjugados, biespecíficos e teranósticas não eliminam completamente questões como a depuração glomerular lenta, que prolonga sua permanência no organismo e pode estimular a produção de anticorpos anti-fármacos (ADA), levando a efeitos adversos.

Outras limitações incluem dificuldades em terapias de longo prazo, penetração tecidual limitada, barreiras fisiológicas, acúmulo em órgãos não-alvo, *downregulation*³ de antígenos-alvo, toxicidade *off-target*⁴ e processos complexos de fabricação. Diante disso, a engenharia de anticorpos *in silico* busca otimizar essas macromoléculas biofarmacêuticas, aprimorando afinidade, estabilidade e especificidade, além de minimizar a imunogenicidade para expandir suas aplicações terapêuticas, diagnósticas e em imagem.

Como destacado por Kandari e Bhatnagar (2023), a redução da massa molecular dos mAbs melhora a penetração tecidual e acelera sua depuração, reduzindo a meia-vida. Essa ação

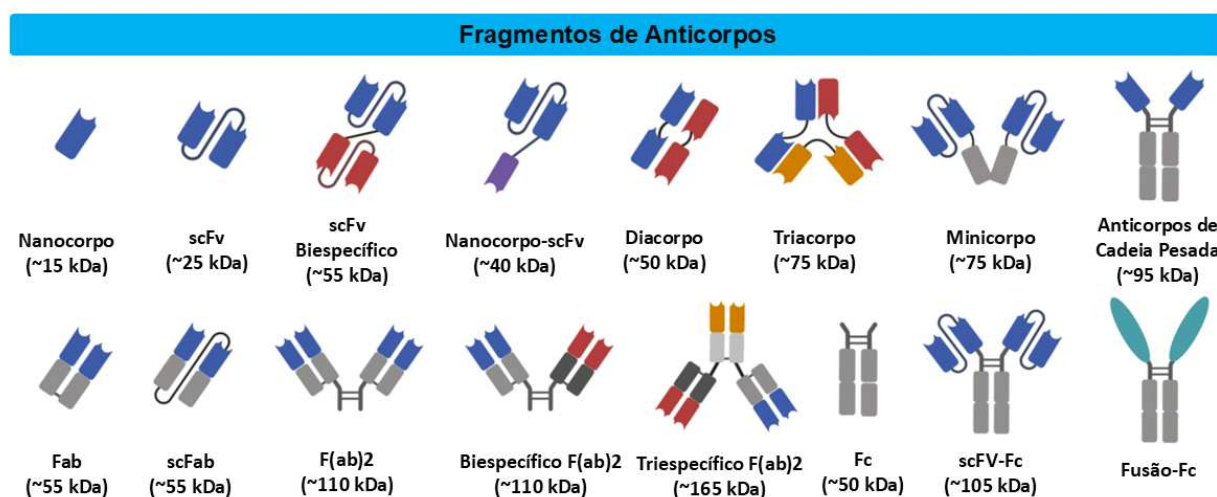
³ Processo regulatório no qual a expressão ou disponibilidade superficial de um antígeno é reduzida em resposta a estímulos externos, como a interação prolongada de mAbs ou ligantes biológicos. Esse fenômeno ocorre preeminentemente por três mecanismos inter-relacionados: (1) **internalização mediada por receptor**, seguida de degradação lisossomal ou reciclagem alterada; (2) **supressão transcricional**, via modulação de vias de sinalização (ex.: feedback negativo de MAPK/ERK ou PI3K/AKT); e (3) **redistribuição subcelular**, com sequestro do antígeno em compartimentos intracelulares.

⁴ É a ocorrência de efeitos adversos decorrentes da interação não intencional de uma molécula terapêutica com alvos distintos do seu alvo específico, comprometendo vias fisiológicas e causando danos colaterais aos tecidos.

impulsionou o uso de fragmentos de anticorpos (Figura 12), que mantêm a especificidade antigênica e são aplicados em terapias direcionadas, diagnóstico molecular e modulação imunológica. Atualmente, mAbs, anticorpos biespecíficos (BsAbs), fragmentos (VHH, scFv) e conjugados (ADCs) configuram ferramentas terapêuticas chave no tratamento de câncer, doenças autoimunes, infecciosas e inflamatórias (Lu *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2023).

Paralelamente, a maturação de afinidade *in silico* evoluiu consideravelmente, integrando: (1) análise estrutural e sequencial de anticorpos, (2) algoritmos de inteligência artificial aprimorados e (3) maior poder computacional. Técnicas como modelagem por homologia, dinâmica molecular, docking, engenharia de sítios críticos e análise de interfaces têm sido refinadas para o progresso de fragmentos personalizados segundo Li *et al.* (2023).

Figura 12 – Variedade de Fragmentos de Anticorpos Engenheirados



Fonte: Adaptada pelo Autor (2025) com base em RapidNovor (2022) – *The Hunt for Novel Therapeutics Through Antibody Engineering* –, esta representação destaca fragmentos de anticorpos guiados por engenharia proteica, evidenciando sua versatilidade e o desenvolvimento por meio de técnicas avançadas de manipulação molecular.

1.5 Anticorpos de Cadeia Pesada e Domínio Único (VHH)

Além dos anticorpos clássicos presente no subfilo vertebrata, um grupo distinto foi identificado no sistema imune de espécies da infraordem *Tylopoda* (família *Camelidae*), incluindo *Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Camelus ferus*, *Lama glama*, *Vicugna pacos*, *Lama guanicoe* e *Lama vicugna*. Esses anticorpos, descritos pela primeira vez por Hamers-Casterman na década de 1990, se destacam por não possuírem os domínios CH1, CL e VL. Apesar dessa ausência, como revisado por Vishwakarma *et al.* (2022), esses anticorpos mantêm alta especificidade e capacidade de neutralização antigênica, funcionando de maneira análoga aos domínios VH/VL clássicos. As variantes IgG2 e IgG3 encontradas em camélídeos são conhecidas como Anticorpos de Cadeia Pesada (HCAbs).

Estruturas funcionalmente similares, descritas por Nguyen *et al.* (2002), surgiram independentemente por convergência evolutiva. Anticorpos com características equivalentes não se restringem ao grupo dos *Tylopodas*, já que também são encontrados na subclasse *Elasmobranchii* e outros peixes cartilaginosos, como *Ginglymostoma cirratum*, *Orectolobus maculatus*, *Squalus acanthias* e *Mustelus canis*. Nesses organismos, o anticorpo descrito por Greenberg *et al.* (1995), é nomeado de Imunoglobulina de Novo Receptor Antigênico (IgNAR), ao qual possui o VNAR (Domínio Variável do Novo Receptor Antigênico) como único domínio de interação antigênica. Para mais detalhes sobre esse domínio, consulte Juma *et al.* (2021) e Khalid *et al.* (2022).

Os HCAs dispõem cerca de 90 kDa, aproximadamente metade da massa dos anticorpos convencionais, que está entorno de 150 kDa. Seu domínio variável único (VHH ou nanocorpo) é altamente compacto, com dimensões de $2,5 \times 4,0$ nm e massa entorno de 15 kDa. Como visto na figura 13, a estrutura dos HCAs inclui dois domínios constantes (CH2 e CH3), conectados por uma dobradiça flexível. Diferente dos anticorpos clássicos, que requerem dois domínios para interação antigênica, os HCAs atingem alta afinidade (nano/picomolar) utilizando um único domínio monomérico (VHH). Embora naturalmente sem Fc, podem ser projetados para fusão com essas regiões, ampliando suas respostas efectoras (Muyldermans, 2021).

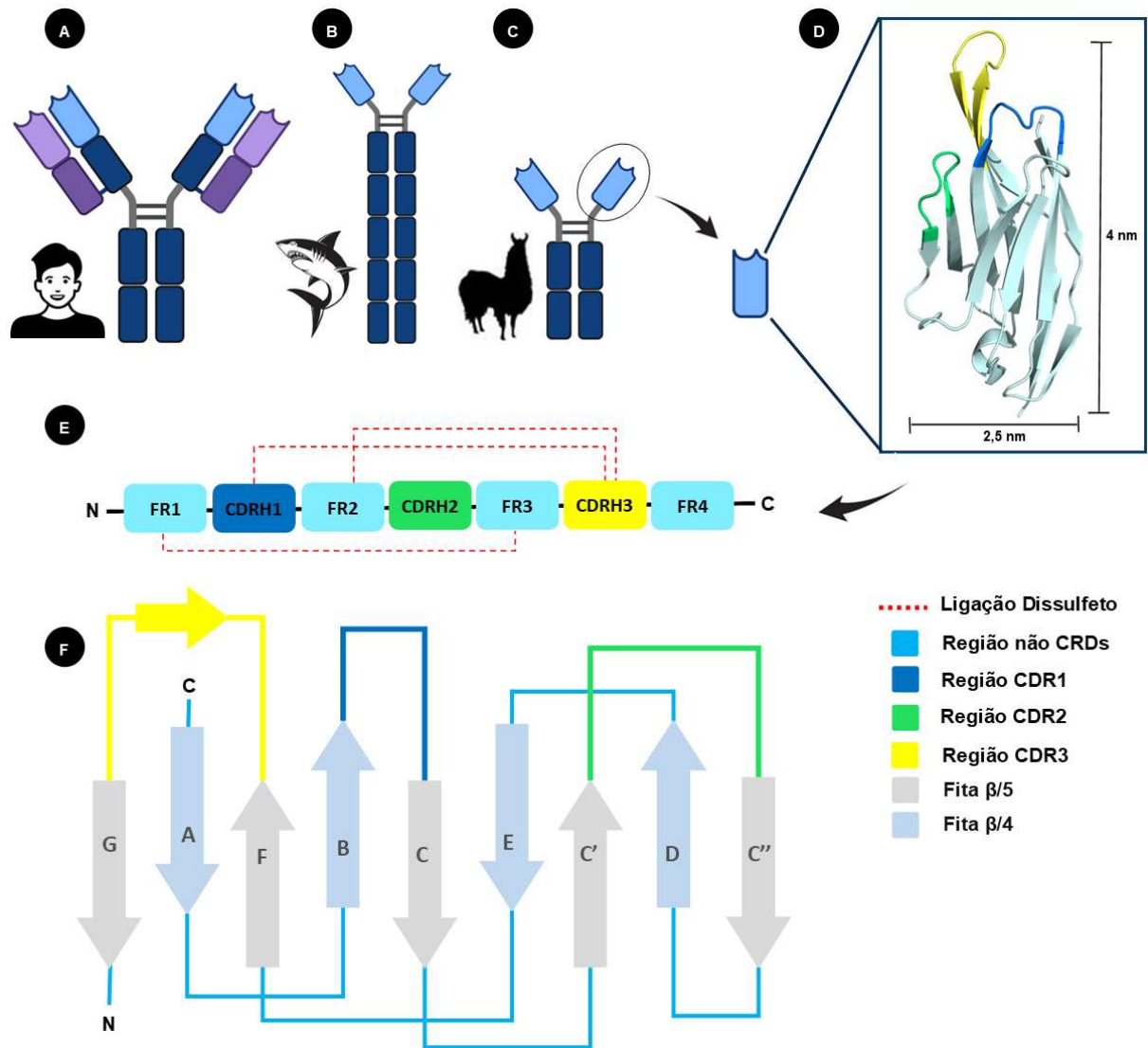
Estruturalmente, os VHHs conservam um arranjo "sanduíche" de nove fitas β organizadas em duas folhas β antiparalelas; uma com quatro fitas e outra com cinco, formando o esqueleto estrutural do *framework*⁵ (FR). Essas fitas β são interligadas também por as três regiões responsáveis pelo reconhecimento antigênico (CDRs). Segundo Tang, Gao e Han (2023), a CDR1 conecta as fitas B e C, a CDR2 liga C' e C'', e a CDR3 une F e G. Já as fitas A, D e E compõem a estrutura de suporte, contribuindo para a estabilidade global do domínio.

Os domínios VHHs, denotam um arranjo único de regiões hipervariáveis (CDRs) que confere especificidade antigênica mesmo na ausência da cadeia leve. Enquanto as CDRs H1, H2 e H3 são suficientes para a maioria das interações, a ocasional presença da CDR4 (H4) – ainda pouco caracterizada – expande o repertório de reconhecimento molecular (Muyldermans, 2021). Dentre essas regiões, a CDR3 emerge como a mais crítica: sua extensão variável (5–30 resíduos) e plasticidade conformacional como descritos por Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.* (2013), torna a CDR3 responsável por contribuir com 60–80% da interface de contato ao

⁵ Refere-se às regiões conservadas dos domínios variáveis VH e VL dos anticorpos, que funcionam como arcabouço estrutural para as regiões hipervariáveis. Compostos por quatro segmentos (FR1 a FR4), eles intercalam e delimitam as três CDRs de cada domínio. Os FRs asseguram a estabilidade estrutural, o enovelamento adequado e a orientação espacial correta das CDRs. Embora as CDRs predominem na interação antígeno-anticorpo, alguns resíduos dos FRs também podem participar diretamente do contato com o antígeno.

antígeno. Essa característica é particularmente vantajosa para atingir epítomos côncavos ou sítios enzimáticos inacessíveis a anticorpos convencionais, graças à sua topologia convexa (Arbabi-Ghahroudi, 2017; Vishwakarma *et al.*, 2022). A compactação estrutural dos VHHs, associada ao seu reduzido diâmetro hidrodinâmico, viabiliza uma penetração tecidual superior e uma depuração renal acelerada (Erreni *et al.*, 2020). Esses atributos são explorados em conjugados anticorpo-fármaco (ADCs) e imageamento tumoral, onde a rápida distribuição e a minimização de acúmulo sistêmico são essenciais na restrição de efeitos adversos.

Figura 13 – Anticorpos Humanos, Camelídeos e Elasmobrânquios, com Ênfase no Domínio VHH



Fonte: A representação desenvolvida por Chen *et al.* (2023) e adaptada por Autor (2025) compara estruturalmente os anticorpos IgG humanos (A), o IgNAR de elasmobrânquios (B) e os HCABs de camelídeos (C), destacando em azul claro o domínio variável da cadeia pesada (VH) e em roxo claro o da cadeia leve (VL), enquanto as regiões constantes (CH e CL) aparecem em tons escuros correspondentes. Embora tanto o VHH (de camelídeos) quanto o VNAR (do IgNAR) sejam derivados de cadeias pesadas, o VNAR exibe maior similaridade estrutural com o domínio VL humano, enquanto o VHH mantém a arquitetura de um VH modificado. A estrutura 3D do VHH (PDB

ID 4IDL, em D) revela sua compactação, com as CDRs formando o sítio de reconhecimento antigênico, enquanto as ligações dissulfeto (E) incluem a ligação canônica entre FR1 (Cys22) e FR3 (Cys92, numeração IMGT) – comum a todos os VHHs – e ligações não canônicas, como as entre CDR3 e FR2 em camélídeos (ex.: Cys54-Cys78) ou entre CDR1 e CDR2 no IgNAR, adaptações que conferem estabilidade única a cada classe. O FR exibe duas folhas β antiparalelas (quatro e cinco fitas, respectivamente), sustentando as alças das CDRs, com a folha menor contendo as fitas β A, β B, β D e β E (convenção IMGT) e a maior incluindo as regiões hipervariáveis CDR1 e CDR2, uma organização conservada que garante integridade estrutural mesmo na ausência da cadeia leve.

A estabilidade intrínseca dessas biomoléculas – que resistem a temperaturas extremas (-20°C a 90°C), variações de pH e proteólise (Dolk *et al.*, 2005) – decorre de um equilíbrio entre fatores estruturais: (i) a substituição de resíduos hidrofóbicos no FR2 (Val37, Gly44, Leu45, Trp47) por análogos mais hidrofílicos (Tyr/Phe37, Glu44, Arg45), que previnem agregação (Muyldermans, 2021); (ii) a ligação dissulfeto canônica (Cys23-Cys94, numeração Kabat) entre FR1 e FR3; e (iii) ligações dissulfeto adicionais, como a Cys54-Cys78 em alguns VHHs, que conferem rigidez entropicamente favorável (Harmsen *et al.*, 2007).

A ausência da cadeia leve é compensada pela diversidade estrutural, especialmente pelas CDRs alongadas (H3), que proporcionam uma superfície de contato de 600–800 Å para um reconhecimento eficiente (De Meyer; Muyldermans; Depicker, 2014). Fora que, os FRs também têm papéis essenciais: FR1 assegura a correta dobra do domínio, FR2 (com resíduos hidrofílicos) evita agregação e melhora solubilidade, e FR3 pode conter ligações dissulfeto adicionais (como Cys54-Cys78 em alguns VHH), aumentando estabilidade térmica e resistência proteolítica. Já o FR4 mantém a integridade do C-terminal.

Além da sua marcante estabilidade, os VHHs, conforme revisado por Kunz *et al.* (2023), atestam expressão eficiente em sistemas bacterianos e modularidade para engenharia *in silico*. A capacidade de transpor a BHE amplia sua aptidão no tratamento de doenças neurológicas, enquanto a facilidade de conjugação a radioisótopos ou toxinas os torna ferramentas versáteis em diagnóstico e terapia. Apesar de sua origem não humana, possuem baixa imunogenicidade resultante da homologia com a família III de genes VH humanos, o que reduz o reconhecimento pelo sistema imunológico.

Outros fatores também contribuem para essa característica como: (i) a ausência da cadeia leve (VL), eliminando epítomos adicionais; (ii) a presença de resíduos hidrofílicos no FR2, que minimizam a exposição de epítomos imunogênicos; (iii) sua estrutura compacta e estável, que reduz a área imunogênica e a tendência à agregação; (iv) a ausência da região Fc, impedindo interações com receptores de células imunes; (v) a menor propensão à glicosilação, reduzindo a formação de novos epítomos; e (vi) a baixa interação com componentes do sistema imunológico, evitando a ativação da resposta imune.

Com base nessas propriedades, os VHHs estão entre os *scaffolds*⁶ mais utilizados no cenário biomédico, especialmente na engenharia de miméticos terapêuticos. Esses fragmentos de anticorpos, descritos como "balas mágicas" por Mir *et al.* (2020), são ideais para o tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias, autoimunes, neurológicas e neoplásicas. Além disso, são estudados também como antitoxinas, antivenenos, agentes antipeçonha, engenheirados como imunotoxinas e com aplicações bem-sucedidas nos campos de imagens e diagnósticos.

Nos últimos anos, avanços terapêuticos levaram à aprovação de nanocorpos como o **Caplacizumabe (Cablivi®)**, um VHH bivalente humanizado contra o fator de von Willebrand, indicado para púrpura trombocitopênica trombótica adquirida (aTTP) (Duggan, 2018). Aprovado pela EMA (2018), foi seguido pelo **Ozoralizumabe (Nanozora®)**, aprovado em (2022), é um VHH trivalente anti-TNF- α para doenças autoimunes (Chekol Abebe *et al.*, 2022). O **Ciltacabtagene autoleucel "cilta-cel" (Carvykti®)**, um CAR-T de VHH, direciona células T modificadas contra o antígeno BCMA, altamente expresso no mieloma múltiplo. Safarzadeh Kozani *et al.* (2022) destacaram que os CAR-Ts baseados em VHH superam limitações dos scFvs, enquanto Bathula *et al.* (2021), evidenciam o potencial diagnóstico e terapêutico desses fragmentos em câncer, doenças infecciosas, desordens neurológicas e inflamações. Já o **KN-035 (Envafolimabe)**, um inibidor de PD-L1, está em crivo para tumores sólidos avançados. Além da afinidade, estabilidade, agregação e meia-vida são fatores cruciais no desenvolvimento de anticorpos, mas otimizá-los pode gerar conflitos entre as propriedades.

Segundo Ikeuchi *et al.* (2021), os VHHs destacam-se pela alta estabilidade, permitindo modificações estruturais sem perda funcional. A customização de VHHs para múltiplos antígenos tem avançado com ferramentas *in silico* e algoritmos de *deep learning*, que, segundo Li *et al.* (2023) e El Salamouni *et al.* (2024), reduzem custos e aumentam eficácia. No entanto, poucos VHHs chegam à aprovação clínica, o que, segundo Mitchell e Colwell (2018), deve-se à escassez de dados estruturais e sequenciais em comparação aos domínios VH/VL tradicionais, além dos desafios logísticos na imunização e manutenção de camelídeos, mais complexos que em modelos murinos. Apesar disso, a pesquisa com VHHs cresce, impulsionando aplicações diagnósticas, terapêuticas e biotecnológicas, com perspectivas promissoras no campo biomédico.

⁶ Estrutura molecular central (proteica, nucleotídica, sintética ou híbrida) que fornece suporte organizacional e estrutural para a montagem, posicionamento e integração funcional de componentes biológicos. Atua como um arcabouço tridimensional estável, modulando interações biomoleculares ao influenciar a estabilidade, especificidade e funcionalidade de sistemas biológicos ou sintéticos. Sua arquitetura determina a orientação espacial de domínios funcionais, otimizando processos como reconhecimento molecular, sinalização e catálise enzimática.

1.6 Problematização

Embora os mAbs comerciais salientam eficácia terapêutica, seu uso enfrenta desafios como reações imunes citotóxicas e depuração glomerular lenta, prolongando sua permanência no organismo (Goswami *et al.*, 2013). Perto de 150 kDa, sua elevada massa molecular limita a atuação a alvos extracelulares, reduzindo a eficácia contra alvos intracelulares e dificultando a distribuição tecidual. Mesmo com mAbs de segunda geração (Fab, 50 kDa; scFv, 30 kDa), persistem problemas como imunogenicidade elevada e agregação.

O NTZ (149 kDa) apresenta meia-vida de até 16 dias, garantindo eficácia clínica na EM (Chappell *et al.*, 2024). No entanto, seu uso está associado a efeitos adversos como fadiga, artralgia, trombocitopenia e infecções oportunistas (ex.: Varicela-Zóster, tuberculose, candidíase, pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, infecções micobacterianas atípicas, criptococose, herpesvírus (associados a Necrose Aguda da Retina (NAR) uma complicação rara e potencialmente fulminante) e meningoencefalite).

A LMP, causada pela reativação do poliomavírus JC (presente em 50–70% da população adulta), representa o um dos efeitos adverso mais grave associado ao NTZ. Este risco é potencializado pelo mecanismo de ação do fármaco, que compromete a vigilância imunológica no SNC (Puthenpurail *et al.*, 2021; Van Kempen *et al.*, 2022). O mesmo vírus pode ainda desencadear Neuropatia de Células Granulares (NGC) em alguns pacientes.

Adicionalmente, o NTZ reduz a resposta vacinal e seu uso prolongado pode levar a hepatotoxicidade e hipersensibilidade, bem com a Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imunológica (IRIS) pós-suspensão (Baldo *et al.*, 2022). Em um estudo com 5.384 participantes, apresentou redução da progressão e incapacidade na EM em apenas 24% (Wiendl *et al.*, 2021). Além disso, 4-14% dos pacientes como mencionam Mosch e Guchelaar (2022), desenvolvem anticorpos anti-NTZ, comprometendo a eficácia e aumentando o risco de reações à infusão.

Pacientes previamente tratados com imunossupressores ou em terapia prolongada (>2 anos) com altos títulos de anticorpos anti-JCV apresentam maior risco de LMP. A suspensão do NTZ pode agravar a disfunção neurológica por IRIS, enquanto sua interrupção abrupta aumenta o risco de rebote. O período *washout*⁷ entre NTZ e terapias exigem semanas para eficácia plena, cria uma janela de vulnerabilidade (Morrow *et al.*, 2022). O NTZ é contraindicado com betainterferonas, acetato de glatirâmer, câncer ativo ou imunossupressão grave. Sua ação

⁷ É o intervalo necessário para a depuração sistêmica de um fármaco antes de iniciar uma nova terapia, evitando interações farmacológicas. Sua duração é definida pela meia-vida de eliminação, redistribuição tecidual e reversão dos efeitos biológicos. Em imunomoduladores e imunossupressores, esse período é crítico para evitar imunossupressão residual, rebote da doença ou aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas.

envolve as integrina $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, apoiando seu uso na doença de Crohn. Apesar da eficácia inicial, seu perfil de segurança a longo prazo impõe um dilema terapêutico.

Os VHHs destacam-se como opção propícia, com ~12 a 15 kDa, oferecem maior penetração tecidual e menor imunogenicidade, dispondo-se entre os *scaffolds* mais relevantes para essa aplicação. Embora possam induzir efeitos adversos, como epistaxe e cefaleia, esses são menos severos que os associados a mAbs clássicos (Baldo *et al.*, 2022).

A modulação da subunidade $\alpha 4$, permanece ainda pouco explorada para formatos de anticorpos como VHH/VNAR humanizados, multivalentes, biespecíficos ou miméticos direcionados a $\alpha 4\beta 1$. A miniaturização de mAbs sem perda de eficácia, conforme Martins *et al.* (2024), tem sido estratégia-chave para reduzir custos e agilizar o desenvolvimento de biofármacos, melhorando permeabilidade tecidual, acelerando depuração sanguínea, diminuindo retenção em tecidos não-alvo e mitigando imunogenicidade (Chaves *et al.*, 2024).

O *grafting* de CDRs é uma técnica consolidada para reduzir imunogenicidade de mAbs não humanos, aplicável independentemente de avanço como o *de novo design*. Martins *et al.* (2022) expõem sua versatilidade ao criar miméticos e peptídeos otimizados. Zhang, Wu e Dang (2024) classificam os miméticos como a quarta geração de engenharia de anticorpos, devido à maior afinidade, estabilidade, penetração e custo-efetividade. Ex.: incluem o VHH anti-CD20 (Poustforoosh *et al.*, 2023), derivado do rituximabe, e os VHHs anti-PD-1 de Mirzaei *et al.* (2024), baseados no tislelizumab, além dos miméticos anti-SARS-CoV-2 construído por Ferraz *et al.*, (2024). Estratégias alternativas transferem a CDR3 para proteínas não imunoglobulinas, ex.: ubiquitina de Inoue *et al.* (2011) e neocarzinostatina de Nicaise *et al.* (2004), mantendo o reconhecimento antigênico. *Scaffolds* também preservam funcionalidade pós-enxerto, como evidenciado por Pacheco *et al.* (2014) ao inserir CDRs de um mAb em uma proteína termofílica.

A engenharia de VHHs miméticos pode replicar as interações do NTZ com a $\alpha 4\beta 1$, auxiliada por dados cristalográficos (PDB ID 4IRZ). Contudo, a escassez de estudos estruturais robustos pode prejudicar a transferência precisa de resíduos chaves que conferem a especificidade e afinidade, como observado por Albuquerque *et al.* (2022) ao identificarem a DLL1 como alvo real do pidilizumabe. Considerando a relevância clínica do NTZ e a capacidade dos VHH de transpor a BHE, recomenda-se a construção de VHHs via CDR *grafting* que mimetizem a interação do NTZ com epítipo B do domínio β -*propeller* da subunidade $\alpha 4$, preservando propriedades intrínsecas dos VHHs e a especificidade do NTZ. Essa conduta pode proporcionar terapia eficaz, com custo reduzido e menor risco de efeitos adversos associados ao uso prolongado do NTZ.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver anticorpos de cadeia pesada e domínio único (VHH) otimizados que mimetizem as interações moleculares do anticorpo monoclonal comercial Natalizumabe com a subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$.

2.2 Objetivos Específicos

- Definir estruturas de referência de nanocorpos que possuam CDR3 com conformação semelhante a CDRH3 do domínio VH do Natalizumabe.
- Descrever os tipos de interações entre o Natalizumabe e a subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$.
- Gerar sequências de novos nanocorpos combinando o *framework* de nanocorpos de referência e os CDRs do domínio VH do Natalizumabe.
- Obter a estrutura tridimensional validada dos nanocorpos propostos.
- Predizer as propriedades biofísicas e físico-químicas dos nanocorpos antes e depois dos enxertos.
- Gerar complexos entre os nanocorpos construídos com a subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$ posicionados no sítio de interação do VH/NTZ.
- Selecionar complexos VHH/NTZ- $\alpha 4$ com maior sobreposição ao sítio de interação VH/NTZ e com propriedades físico-químicas e biofísicas desejáveis.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Obtenção da Estrutura Tridimensional do Natalizumabe

O *Protein Data Bank* (PDB), fundado em 1971, é um repositório global de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas, obtidas experimentalmente. Primeiro recurso digital aberto nas ciências biológicas, armazena dados experimentais, metadados e modelos estruturais detalhados. A maioria das estruturas depositadas é determinada por cristalografia de raios X, mas também são usadas técnicas como RMN, cristalografia eletrônica, microdifração de elétrons e criomicroscopia eletrônica (Hashizume *et al.*, 2020). Usando esse banco de dados, inicialmente, foi selecionada a estrutura tridimensional do complexo Fab-Natalizumabe/ $\alpha 4$ (PDB ID 4IRZ), única cristalização disponível desse complexo, apesar da resolução mediana de 2,84 Å (Yu, Schürpf, Springer, 2013). Em seguida as proteínas do 4IRZ (Fab/NTZ e subunidade $\alpha 4$ – domínio β -Propeller e Thigh – da integrina), foram preparadas, removendo-se também água e ligantes (NAG, NDS, PEG, CA, NA). No arquivo *.pdb*, mantiveram-se apenas ATOM, TER e END. Os domínios constantes CL e CH1 do Fab foram excluídos, resultando em três construções: (1) $\alpha 4$ com VH/VL, (2) VH com $\alpha 4$ e (3) VH isolado. Essa organização otimiza a manipulação e análise estrutural.

3.2 Obtenção da Estrutura Tridimensional dos Nanocorpos

Em 2014, foi lançado o *Structural Antibody Database* (SAbDab), um repositório especializado na coleta automatizada de dados estruturais de anticorpos, incluindo variantes sintéticas e de diferentes espécies da subclasse *Mammalia*. O SAbDab permite a filtragem avançada de estruturas por critérios; (1) tamanho das CDRs, (2) espécie de origem e (3) fragmentos específicos, como VHHs (Dunbar *et al.*, 2014). As estruturas dos VHHs podem ser analisadas individualmente ou baixadas em massa no formato *.pdb* em numeração contínua ou anotadas pelos esquemas Chothia e IMGT (*International ImmunoGeneTics Information System*). Diferente do PDB, o SAbDab oferece a opção "*Get all nanobody structures*", viabilizando o download de todos os VHHs em um único arquivo compactado (*all_nano_structures.zip*). Em 8 de dezembro de 2023, 1.286 VHHs com numeração contínua foram baixados e padronizados (seção 3.5) segundo a numeração de Martin (Patel *et al.*, 2023).

3.3 Caracterização das Interações Moleculares do Complexo NTZ/ $\alpha 4$

Os resíduos de interação entre o domínio VH/NTZ e a subunidade $\alpha 4$ são considerados resíduos de interface proteína-anticorpo, um tipo específico de interação proteína-proteína (PPI). A análise dessas interações pode ser realizada por meio de abordagens como as Redes de

Interação de Resíduos (RINs) ou Redes de Estrutura de Proteínas (PSNs), que auxiliam na investigação das propriedades estruturais e funcionais dessas interfaces. Essas redes representam aminoácidos como nós e suas conexões como arestas (Del Sol; Carbonell, 2007). Para caracterizar a interface, foi usado o RING4.0 (Del Conte *et al.*, 2024) e RINmaker (Spanó *et al.*, 2023), mantendo apenas o domínio VH/NTZ e a subunidade $\alpha 4$. O uso de múltiplos programas aumenta a confiabilidade dos resultados, permitindo uma análise mais precisa dos resíduos de interação e dos tipos de contatos moleculares envolvidos.

O RING calcula interações moleculares não covalentes com base em parâmetros geométricos. Suas aplicações incluem análise de estabilidade proteica (Ramakrishnan *et al.*, 2023), caracterização de interfaces (Del Conte *et al.*, 2024) e interpretação de simulações de dinâmica molecular (MD) via redes probabilísticas (Sakai *et al.*, 2023). Os parâmetros de entrada; *Closest* e *Multiple* para *Nodes* e *Edges*, respectivamente foram mantidos. O parâmetro *Closest* considera todos os átomos de um aminoácido ao calcular distâncias, garantindo uma análise detalhada, enquanto *Multiple* identifica múltiplas interações por par residual, mas reporta apenas uma por tipo específico. Além disso, os resíduos foram marcados como relaxados, e água e hidrogênios foram adicionados. O RINmaker é um *software* de código aberto para cálculo, determinação e visualização de RINs, abrangendo interações não covalentes usuais. Funciona via linha de comando ou interface web, desde que a estrutura tridimensional do complexo esteja disponível. O parâmetro *illformed* foi configurado como *keep residue*, garantindo o tratamento adequado de anéis malformados ou grupos iônicos. Além disso, o RINmaker adicionou moléculas de água e incluiu todas as interações na análise.

3.3.1 Áreas de Superfícies Acessíveis a Solventes (SASA)

No estudo das interações entre proteínas e anticorpos, é essencial identificar as regiões da superfície enterradas na formação do complexo, pois são determinantes para a estabilidade da interação. A área de superfície acessível ao solvente (SASA) quantifica a porção da proteína exposta ao solvente, sendo calculada com base na simulação de uma sonda esférica (geralmente representando uma molécula de água) que rola sobre a superfície do modelo molecular. Aqui, a SASA foi empregada para estimar a área de interface entre os parceiros, a fração de superfície oculta após a interação e o índice de complementaridade de forma (Mitternacht, 2016). Embora Yu, Schürpf e Springer (2013) tenham apresentado dados experimentais sobre alguns desses parâmetros no arquivo 4IRZ, a quantificação teórica se faz necessária, uma vez que o foco recai sobre o domínio VH do NTZ, sendo o domínio VL de menor relevância neste contexto. Para esses cálculos, utilizou-se o software FreeSASA, desconsiderando o domínio VL. A interface

antígeno-anticorpo, conforme descrito por Reis *et al.* (2022), corresponde às regiões da Superfície Excluída de Solvente (SES) do antígeno e do anticorpo que permanecem enterradas após a interação. Átomos ocultos na formação do complexo podem ser classificados como interfaciais, e um resíduo é considerado interfacial se pelo menos um de seus átomos interagir com a outra molécula. Xin *et al.* (2018), analisaram distâncias entre 4 Å e 6 Å, adotando 5 Å como critério para classificar resíduos interfaciais. A distância euclidiana entre resíduos do domínio VH/NTZ e da subunidade $\alpha 4$, menor ou igual a 5 Å, foi utilizada para medir a interação na interface do complexo VH/NTZ- $\alpha 4$, seguindo Ramaraj *et al.* (2012). Os cálculos foram realizados com o *FreeSASA* (versão 2.0.3), avaliando superfícies acessíveis e enterradas (Mitternacht, 2016). O algoritmo de Lee e Richards foi aplicado com raio de sonda de 1,40 Å (Lee; Richards, 1971), mantendo os demais parâmetros padrão. O *FreeSASA* foi utilizado para analisar o domínio VH/NTZ, a subunidade $\alpha 4$ e o complexo VH/NTZ- $\alpha 4$, sem o domínio VL.

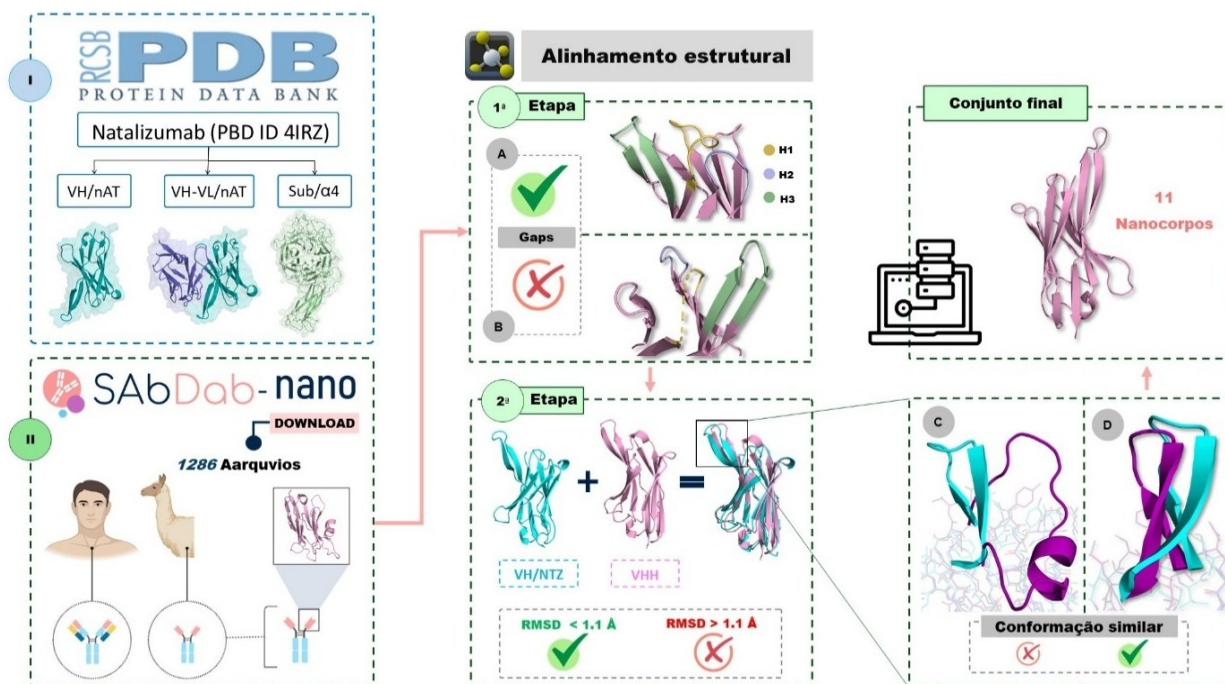
3.4 Triagem de Nanocorpos com CDR3 Estruturalmente Similar à CDRH3 VH/NTZ

Embora envolvam etapas distintas, a triagem de macromoléculas e pequenos ligantes compartilha o objetivo de reduzir os candidatos a um conjunto gerenciável para análises mais detalhadas. Essa filtragem exige a aplicação de critérios específicos à estrutura em estudo, auxiliando o avanço apenas dos candidatos mais adequados (Lin; Li; Lin, 2020). Com base nesse princípio, visto na figura 14, uma triagem para identificar, entre os VHHs do SAbDab, aqueles com similaridade estrutural na região CDR3 em relação à CDRH3 do VH/NTZ foi feita.

Inicialmente, foram excluídos da análise os VHHs que apresentavam lacunas (*gaps*⁸) nas CDRs ou na região estruturalmente conservada (FR), uma vez que, para a predição precisa das propriedades biofísicas e físico-químicas das proteínas – especialmente quando se exige a estrutura 3D – é essencial a ausência de *gaps*. Resíduos ausentes nessas regiões compromete a acurácia do RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*), parâmetro dependente da equivalência atômica entre as estruturas comparadas. Para que o RMSD atinja valores próximos de zero (indicativo de elevada similaridade estrutural), é necessário que as macromoléculas comparadas possuam o mesmo número de átomos e que esses átomos correspondam a posições equivalentes na estrutura. Além disso, o alinhamento prévio das moléculas é crítico para evitar artefatos no cálculo (Maiorov; Crippen, 1994).

⁸ Em estruturas 3D, especialmente de proteínas, *gaps* correspondem à ausência de coordenadas atômicas em trechos específicos da cadeia polipeptídica, como indicado em arquivos PDB por falhas na numeração de resíduos e ausência de registros ATOM. Resultam, geralmente, de desordem conformacional, baixa resolução, ruído experimental ou escolhas no processamento estrutural. Esses vazios podem comprometer a funcionalidade da proteína em estudos *in silico*, sobretudo em sítios ativos, interfaces de interação ou regiões de reconhecimento molecular, além de afetar análises de simulações estruturais.

Figura 14 – Ilustração do Processo de Triagem dos VHHs



Fonte: O esquema de triagem dos arquivos elaborado pelo Autor (2024), seguiu um processo em duas etapas principais. Inicialmente, em (I), foi realizado o download do Natalizumabe com a subunidade $\alpha 4$ (PDB: 4IRZ), enquanto em (II) foram obtidos os nanocorpos do banco de dados SAbDab-nano. Na primeira etapa, foram excluídas estruturas de baixa qualidade cristalográfica ou com *gaps*. Em seguida, classificaram-se os nanocorpos em dois grupos: (A) aqueles sem *gaps* nas regiões FR (*framework*) e CDRs (*complementarity-determining regions*), que foram mantidos, e (B) aqueles com *gaps* nessas regiões, que foram descartados. Na segunda etapa, focou-se na seleção de nanocorpos com RMSD inferior a 1,1 Å, obtido pela sobreposição entre as regiões VH/NTZ e VHH. Nanocorpos com CDRs do tipo "kinked", identificados em (C), foram excluídos, limitando a análise àqueles cuja CDR3 apresentava a conformação "stretch-twist-turn", como observado em (D). Ao final do processo, obteve-se um conjunto de 11 nanocorpos com alta similaridade estrutural à região CDRH3 do VH/NTZ.

Neste estudo, o RMSD foi calculado utilizando o comando padrão de sobreposição do *PyMOL*, que considera todos os átomos correspondentes entre as estruturas, incluindo *backbone*⁹ e as cadeias laterais (Grupo R)). Adotou-se como premissa a equivalência estrutural geral entre os modelos VHH e VH/NTZ, justificada pela alta conservação do *fold* da família VH3. Na etapa subsequente, o domínio VH/NTZ foi sobreposto individualmente às 1.286 estruturas de VHH extraídas do SAbDab, também com o auxílio do *PyMOL*. Para cada sobreposição, os arquivos *.pdb* contendo as estruturas dos VHHs foram carregados no *PyMOL*

⁹ É a estrutura principal de uma proteína, composta por uma sequência repetitiva de átomos N (nitrogênio do grupo amino), C α (carbono alfa) e C (carbono do grupo carboxila), unidos por ligações peptídicas (entre o C de um resíduo e o N do próximo), excluindo as cadeias laterais (grupo R) dos aminoácidos. Sua conformação tridimensional é determinada por três ângulos torsionais: ϕ (phi): rotação em torno da ligação N–C α , ψ (psi): rotação em torno da ligação C α –C e ω (ômega): rotação em torno da ligação C–N (geralmente 180°, trans). As combinações de ϕ e ψ definem os elementos de estrutura secundária, sendo restritas por fatores estéricos.

juntamente com a estrutura do domínio VH/NTZ. Quando o arquivo *.pdb* incluía múltiplas cadeias de VHH, o próprio *PyMOL* selecionava automaticamente a cadeia com maior equivalência estrutural ao VH/NTZ para realizar a justaposição. Já nos casos em que o *.pdb* continha apenas um único VHH, não havia comparação entre diferentes cadeias, e a sobreposição era feita diretamente com a cadeia disponível. Observou-se que VHHs com a CDR3 estruturalmente semelhante à CDRH3 do NTZ exteriorizam valores reduzidos de RMSD, enquanto conformações divergentes resultaram em valores superiores a 1,1 Å. Assim, foi adotado um valor de corte de $\text{RMSD} < 1,1 \text{ Å}$ para a seleção de VHH com alta similaridade estrutural na região CDR3, sendo descartadas as estruturas que excederam esse limiar.

O RMSD, conforme apresentado na Equação 1, quantifica a diferença espacial média entre átomos equivalentes (ex.: alfa-carbonos de resíduos alinhados) em duas estruturas tridimensionais previamente sobrepostas. Calculado pela raiz quadrada da média das distâncias euclidianas ao quadrado, esse valor é amplamente utilizado em bioinformática e dinâmica molecular para comparar conformações de proteínas, complexos ou modelos preditos. Ressalta-se, porém, que o RMSD é sensível a movimentos rígidos e não discrimina variações conformacionais locais versus globais. Todas as estruturas analisadas tiveram seus valores calculados, e apenas aquelas com $\text{RMSD} < 1,1 \text{ Å}$ avançaram para a próxima etapa, representando as candidatas mais promissoras.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - y_i)^2} \quad (1)$$

Onde N é o número total de átomos correspondentes as duas estruturas e x_i é a coordenada atômica da estrutura hipotética A enquanto y_i são os valores das coordenadas atômica da estrutura hipotética B

3.5 Numeração dos Nanocorpos e Identificação das CDRs

A padronização da numeração em anticorpos e nanocorpos é essencial para a identificação precisa das CDRs, delimitando seus contornos e garantindo a correspondência correta entre resíduos homólogos. Devido à considerável variabilidade no comprimento dessas regiões, a comparação direta entre posições equivalentes é comprometida. Assim, a adoção de esquemas de numeração padronizados torna-se imprescindível, uma vez que a numeração contínua dos arquivos PDB não representa adequadamente tais regiões estruturais. Nesse contexto, o *software* ANARCI (*Antigen Receptor Numbering And Receptor Classification*) aplica esquemas padronizados de numeração a anticorpos e receptores de antígenos, por meio

do alinhamento de sequências a modelos previamente anotados com base em Modelos Ocultos de Markov (HMMs), permitindo a atribuição precisa das posições correspondentes (Dunbar; Deane, 2016). Para os VHHs, um script python automatizado foi desenvolvido, o qual extrai as sequências dos arquivos *.pdb*, convertendo-as para o formato *.fasta* com a *flag pdb_tofasta* do pacote *pdb-tools* (Jiménez-García *et al.*, 2021). As sequências são então processadas pelo ANARCI, utilizando o esquema de Martin sob os parâmetros padrão (Patel *et al.*, 2023). Por fim, a numeração gerada foi incorporada aos arquivos estruturais, assegurando a padronização das regiões variáveis dos nanocorpos.

3.6 Grafting de CDR do domínio VH/NTZ para os Nanocorpos

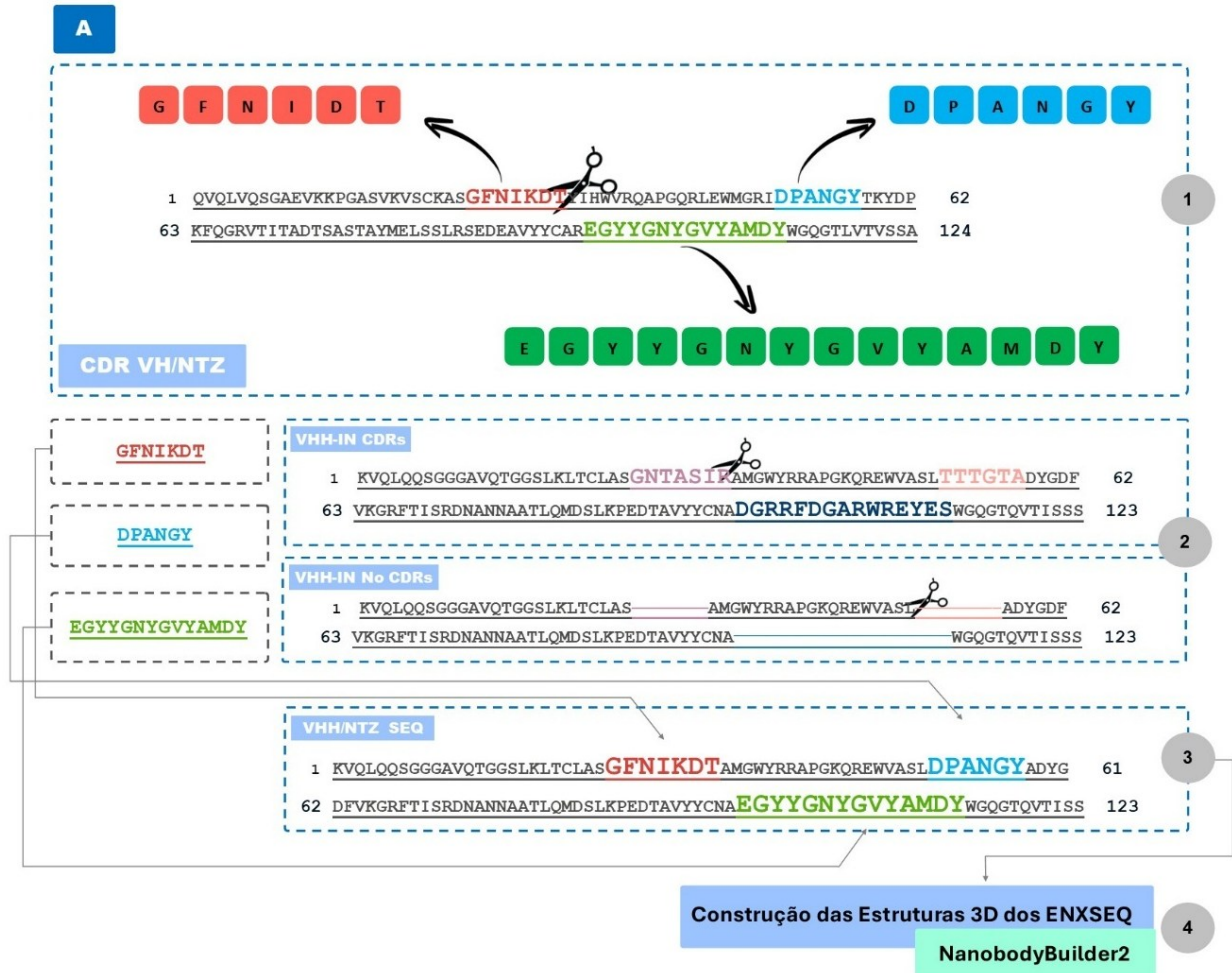
Ferramentas computacionais têm se consolidado como estratégias robustas no design de nanocorpos funcionais por meio do enxerto de CDRs (Heidari *et al.*, 2024). A eficácia dessa abordagem foi exemplificada por Ferraz *et al.* (2024) ao projetar VHHs miméticos direcionados às proteínas CD20 e spike do SARS-CoV-2. A incorporação da assinatura molecular do epítipo no processo de modelagem tem se mostrado determinante para o aumento das taxas de sucesso. O CDR *grafting* é um procedimento eficaz para transferir especificidade e afinidade a *scaffolds* com propriedades estruturais desejáveis. A técnica viabiliza o desenvolvimento de VHHs direcionados a epítopos conhecidos, com diferentes perfis de afinidade, minimizando etapas de seleção e redução de custos posto que comumente o doador é um mAb comercial. (Reddy, Guntuku; Palla, 2024). A escolha do *scaffold* é uma condição determinante, exigindo a otimização de interface e topologia para assegurar, respectivamente, a afinidade funcional e a estabilidade conformacional da proteína. Neste estudo, a abordagem de *grafting* é representada pelas siglas ENXSEQ, ENXSDR e ENXEST, correspondendo, respectivamente, ao enxerto de sequência, de resíduos determinantes de especificidade e de estrutura. Cada nanocorpo triado foi submetido às três estratégias, gerando três variantes por modelo. As CDRs do VH/NTZ foram transferidas para os *scaffolds* utilizando abordagens distintas de enxerto.

3.6.1 Enxerto de Sequência (ENXSEQ)

Na abordagem de Enxerto de Sequência (ENXSEQ), ilustrada na figura 15, realiza-se a transferência direta das sequências das CDRs do domínio VH do Natalizumabe (VH/NTZ) para as regiões correspondentes nos nanocorpos. O processo ocorre em três etapas principais: (1) as sequências aminoacídicas das três CDRs do VH/NTZ são isoladas e armazenadas; (2) as regiões equivalentes (CDRs) nos nanocorpos são removidas e descartadas, preservando apenas o arcabouço estrutural das regiões framework (FRs); (3) por fim, as CDRs do VH/NTZ previamente armazenadas são inseridas nas posições correspondentes dos VHHs, resultando

em sequências híbridas compostas por FRs derivadas dos VHHs e CDRs oriundas do domínio VH/NTZ, (4) com suas respectivas estruturas 3D construídas.

Figura 15 – Esquema para Ilustrar a Estratégia do Enxerto de Sequência (ENXSEQ)



Fonte: O esquema apresentado por Autor (2024) ilustra as etapas do processo de enxerto de sequências. Em A1, observa-se a sequência do domínio VH do Natalizumabe, onde os resíduos das CDRs estão destacados: CDR H1 em vermelho, CDR H2 em azul escuro e CDR H3 em verde, indicando as regiões que foram extraídas. Já em A2, é mostrada a sequência do VHH, com as regiões das CDRs H1, H2 e H3 destacadas em roxo, lilás e azul, respectivamente. Essas regiões CDRs foram também extraídas de suas posições originais. Em A3, as CDRs do domínio VH do Natalizumabe são enxertadas nas posições correspondentes onde antes estavam os resíduos CDRs do VHH. Por fim, em A4 é feita a construção 3D dos VHH/NTZ usando o *NanobodyBuilder2*.

3.6.1.1 Modelagem Molecular dos Nanocorpos

A modelagem molecular foi a estratégia adotada para a conclusão da etapa ENXSEQ, a qual teve como objetivo combinar as sequências das CDRs do VH/NTZ com as regiões correspondentes dos VHH-IN (nanocorpos iniciais/nativos). Essa etapa foi conduzida por meio do *software ImmuneBuilder2*, utilizando sua funcionalidade específica para VHH, o

NanobodyBuilder2 (Abanades *et al.*, 2023). Os parâmetros padrão do *NanobodyBuilder2* foram mantidos durante o processo, gerando internamente quatro modelos para cada VHH. O *software* selecionou, como resultado, o modelo com o menor RMSPE (do inglês - *Root Mean Square Positional Error*). Essa métrica quantifica o erro médio quadrático das posições atômicas previstas em um modelo estrutural, representando a incerteza associada à predição da posição dos átomos. Em ferramentas como o *NanobodyBuilder2*, esse valor é utilizado como critério de seleção do modelo mais confiável, especialmente na ausência de uma estrutura de referência experimental. Diferentemente do RMSD, que exige geralmente uma comparação com um modelo previamente conhecido, o RMSPE pode ser estimado diretamente a partir do modelo gerado pelo *NanobodyBuilder2*. Todos os VHH/ENXSEQ foram construídas suas versões 3D incorporando a numeração de Martin, com auxílio de um script em Python.

3.6.1.2 Validação dos Modelos Gerados

Em virtude da possibilidade de ocorrência de choques estereoquímicos ou distorções nos ângulos diedros, é parcimonioso a validação das estruturas modeladas. Para tal, foram empregados os *softwares* do CAMEO¹⁰ (*Continuous Automated Model EvaluatiOn*) mais bem avaliados conforme a versão mais recente (Robin *et al.*, 2021). O **ModFOLD9** é um dos principais programas para detecção de erros locais em modelos estruturais, fornecendo predições integradas de qualidade global e regional com pontuações baseadas em *deep learning* (McGuffin; Alharbi, 2024). Nesta análise, cada modelo em formato *.pdb* foi processado individualmente, adotando-se a opção *Balanced*. Além de corresponder à configuração padrão, essa opção é recomendada para análises isoladas, garantindo boas correlações e uma classificação eficiente dos modelos. Outro programa utilizado foi o **QMEANDisCo**, no qual o arquivo *.pdb* foi submetido para avaliação. Este emprega uma função de pontuação composta para descrever aspectos geométricos fundamentais de estruturas proteicas, utilizando múltiplos descritores estruturais (Benkert, Tosatto; Schomburg *et al.*, 2008). O terceiro *software* empregado, o **VoroMQA**, foi configurado com a seleção da opção *Input biological assemblies*, seguida do carregamento do modelo em formato *.pdb*. Este método avalia a qualidade das estruturas proteicas mediante um potencial estatístico baseado em conhecimento, com foco em todos os átomos do núcleo proteico. Diferentemente de abordagens tradicionais, que se fundamentam em distâncias interatômicas (Olechnovič; Venclovas *et al.*, 2019). Por fim, o

¹⁰ CAMEO (*Continuous Automated Model EvaluatiOn*): Plataforma de avaliação contínua e automatizada de métodos de predição estrutural, que compara semanalmente modelos computacionais com estruturas experimentais recém-depositadas no PDB, mas ainda não divulgadas publicamente.

modelo em formato *.pdb* foi analisado pelo **PROQ3D**, selecionando-se a opção *Using deep learning* e adotando o método *score* para medição de qualidade. Esse *software* integra informações da sequência de aminoácidos e da estrutura 3D predita, utilizando algoritmos de *deep learning* para prever a qualidade estrutural (Uziela *et al.*, 2017). Adicionalmente, o gráfico de Ramachandran segundo Chen *et al.* (2010), pode e foi gerado pelo **MolProbity**, com o objetivo de realizar análise estereoquímica da cadeia principal de proteínas, com base nas combinações dos ângulos diédricos ϕ (phi) e ψ (psi) dos resíduos de aminoácidos. Essa análise permite identificar regiões com possíveis tensões angulares ou torcionais, cujos desvios podem indicar a presença de *outliers* ou erros estruturais no modelo proteico. Para avaliar a qualidade estrutural dos VHHs modelados, foi analisado o *Z-score*¹¹ gerado pelo **ProSA-web**, que permite comparar a energia total da estrutura com as faixas esperadas para estruturas experimentais determinadas por cristalografia de raios-X ou RMN. Os arquivos *.pdb* foram submetidos ao servidor sem modificações adicionais nos parâmetros de entrada ou nas configurações do *software* (Wiederstein; Sippl, 2007).

3.6.1.3 Refinamento dos Modelos Gerados

Embora o *NanobodyBuilder2* seja uma ferramenta avançada para modelagem de VHHs, Valdés-Tresanco *et al.* (2023) ressaltam a importância do refinamento para aproximar os modelos teóricos de suas estruturas nativas. Antes dessa etapa, os arquivos *.pdb* foram preparados mantendo apenas as linhas ATOM, TER e END, assegurando a compatibilidade com o *software*. Além disso, o algoritmo não aceita arquivos *.pdb* com inserções nas CDRs (identificadas por resíduos com letras, como 100A, 100B etc.), comuns em anticorpos para preservar a numeração contínua dos FRs (Seção 3.5). Para contornar essa limitação, foi utilizado a *flag pdb_reres* do pacote *pdb-tools*, que renumera os resíduos sequencialmente, removendo as inserções e alinhando o arquivo ao padrão de numeração inteira exigido pelo algoritmo. O refinamento foi realizado com o ReFOLD3, que utiliza restrições graduais baseadas em estimativas de qualidade local e previsões de contato para guiar as estruturas tridimensionais em direção às formas nativas (Adiyaman; McGuffin, 2021). Após essa etapa, as estruturas foram validadas com o VoromQA, que compara as modificações nos modelos iniciais e avalia se o refinamento melhorou ou comprometeu a qualidade estrutural. Essa

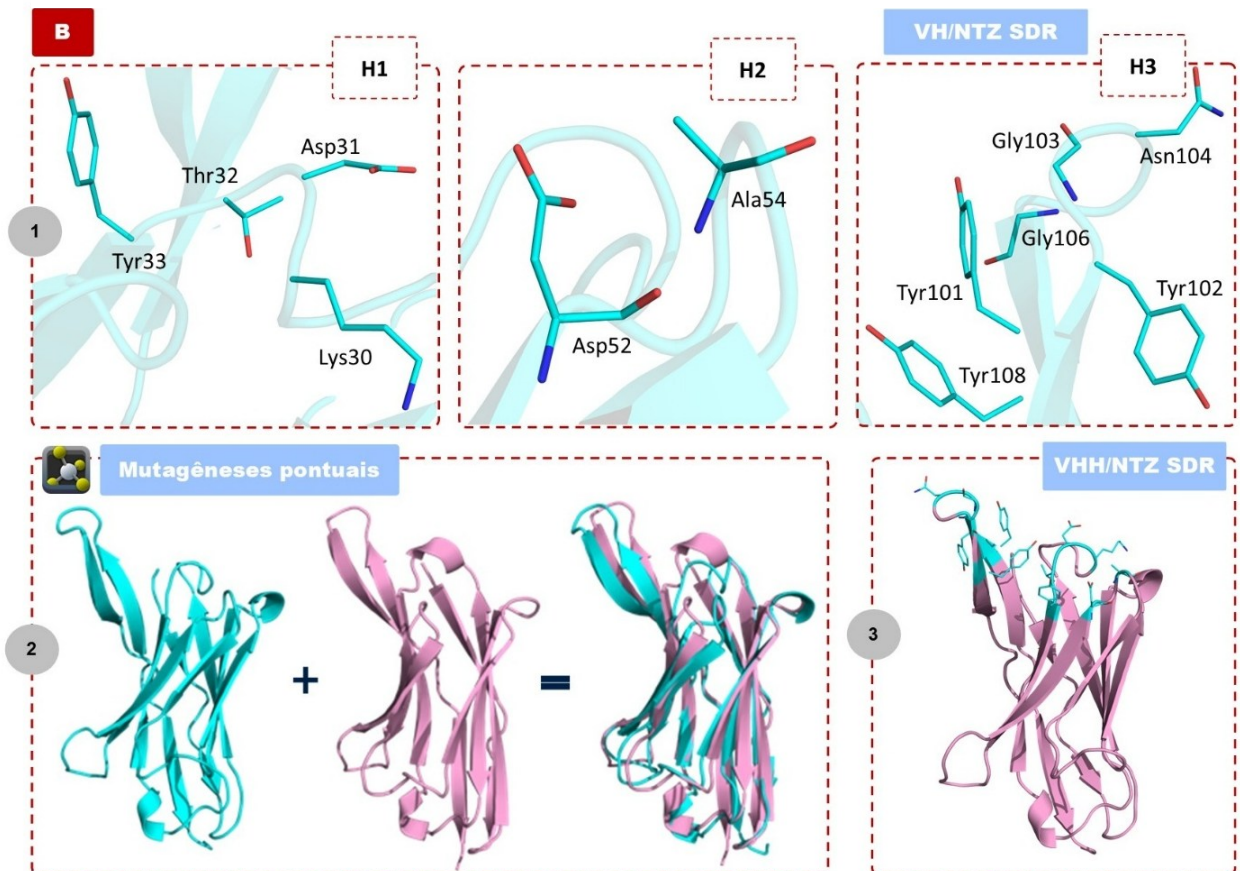
¹¹ Métrica estatística que quantifica o desvio da energia total de uma estrutura proteica modelada em relação à média de estruturas experimentais, normalizado pelo desvio padrão. Indica a compatibilidade com conformações naturais. Para proteínas com ~130 resíduos (como os VHHs), o *Z-score* do ProSA-web entre -5.0 e -7.5 indicam boa qualidade. Valores acima de -4.5 ou abaixo de -8.0 são suspeitos, e extremos como > -3.0 ou < -8.5 sugerem falhas graves, como enovelamento incorreto ou colisões estéricas.

abordagem permitiu quantificar as diferenças entre os modelos gerados pelo *NanobodyBuilder2* e os refinados pelo ReFOLD3, garantindo uma análise precisa da eficácia do refinamento.

3.6.2 Enxerto de Resíduos Determinante de Especificidade (ENXSDR)

No segundo procedimento, visto na figura 16, foram utilizados enxertos de SDRs (*Resíduos Determinantes de Especificidade*). Os SDRs correspondem aos resíduos localizados nas CDRs dos anticorpos, sendo responsáveis pela especificidade da interação com o antígeno cognato. Embora nem todos os resíduos das CDRs contribuam diretamente para essa interação, como discutido por Peng *et al.* (2022) e Madsen *et al.* (2024), aqueles que não participam diretamente continuam sendo cruciais para a estabilidade estrutural e a funcionalidade. Os enxertos de SDRs são relevantes em diversos processos, incluindo a transferência de afinidade segundo Kashmiri *et al.* (2005), bem como aumento da afinidade e a humanização de anticorpos de acordo com Chouhan *et al.* (2022). Tais aplicações destacam a relevância funcional e terapêutica das SDRs na engenharia e otimização de anticorpos. As substituições pontuais de resíduos das CDRs dos VHH para as SDRs VH/NTZ foram realizadas no *PyMOL*.

Figura 16 – Esquema para Ilustrar a Estratégia do Enxerto das SDRs (ENXSDR)



Fonte: O esquema apresentado pelo Autor (2024) descreve o processo de enxerto das Resíduos Determinantes de Especificidade (SDRs) do domínio VH do Natalizumabe para os VHH. Em B1, os resíduos SDR do VH/NTZ,

identificados pelo RING 4.0, estão destacados em ciano. Em B2, com o auxílio do *PyMOL*, é realizada uma sobreposição estrutural para reduzir as distâncias atômicas entre o VH/NTZ e o VHH, o que facilita as substituições dos resíduos no VHH nas mesmas direções dos resíduos do VH/NTZ. Após essas mutações, obtém-se, em B3, o VHH/NTZ SDR.

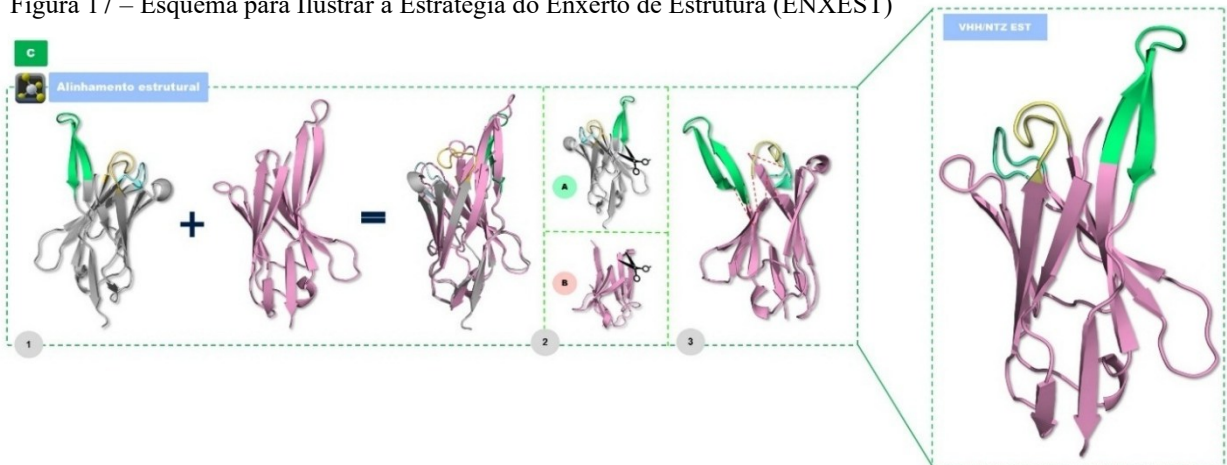
A estratégia de enxerto seguiu as etapas a seguir: (1) os resíduos das CDRs do domínio VH do Natalizumabe envolvidos na interação com a integrina $\alpha 4 \beta 1$ foram identificados pelas ferramentas RING (Del Conte *et al.*, 2024) e RINmaker (Spanò *et al.*, 2023), cuja seleção baseou-se na capacidade dessas ferramentas de representar flexibilidade conformacional, superando as limitações da estrutura cristalográfica estática (PDB: 4IRZ) e permitindo a identificação de resíduos SDRs de interface não evidentes na estrutura original; (2) cada VHH foi carregado individualmente no *PyMOL*, que possibilita a substituição de aminoácidos por qualquer um dos 20 naturais e o ajuste de suas conformações; (3) os VHHs foram sobrepostos ao domínio VH/NTZ para minimizar distâncias atômicas e visualizar as orientações dos grupos laterais (R) dos SDRs, essenciais para orientar a transferência conformacional; (4) os SDRs das CDRs H1, H2 e H3 do VH/NTZ foram inseridos nas respectivas CDRs (1, 2 e 3) dos VHHs, com base em duas premissas: (i) preservar a conformação do SDR original e (ii) em casos de conflitos estéricos, reposicionar o SDR na CDR do VHH em uma localização mais próxima da original e livre de sobreposições conflitantes com resíduos adjacentes. A substituição envolveu exclusivamente as cadeias laterais dos resíduos em contato com o antígeno, mantendo o esqueleto principal conservado. Assim, todos os VHHs passaram a incorporar, em suas CDRs, os novos SDRs derivados do domínio VH do Natalizumabe.

3.6.3 Enxerto de Estrutura (ENXEST)

A terceira estratégia, Enxerto de Estrutura (ENXEST), baseia-se no princípio de que a conformação tridimensional de anticorpos determina sua função e interação com antígenos, influenciando diretamente suas propriedades de ligação (Hirata *et al.*, 2018). Esse método tender a apresentar maior formação de complexos VHH-NTZ/ $\alpha 4$ em comparação aos enfoques ENXSEQ e ENXSDR, sendo sua eficácia dependente de fatores como geometria, carga e distribuição de aminoácidos no parátipo. Uma estrutura 3D adequada permite o reconhecimento específico de antígenos, evitando interações inespecíficas e assegurando uma resposta imunológica precisa. A transferência das CDRs mantém a afinidade e especificidade do anticorpo original, além de possibilitar sua adaptação a novos contextos moleculares, como anticorpos de diferentes espécies ou com distintas conformações CDRs (Nicaise *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2014). Conforme destacado por Chaves *et al.* (2024), enxertos baseados na

substituição conformacional de cadeias laterais e principais emergem como uma tática próspera no design de anticorpos e seus fragmentos. Os autores ainda ressaltam que proteínas como VHHs, selectinas e proteínas de repetição de anquirina, são as mais frequentemente empregadas nessa metodologia. O procedimento de ENXEST, detalhado na figura 17, foi executado via *software PyMOL*. Inicialmente, a estrutura do VHH e domínio VH/NTZ foram carregados. Nessa **primeira** etapa, é apresentada a estrutura do VH/NTZ, com as regiões CDRs (H1, H2 e H3) destacadas em amarelo, azul e verde, respectivamente, justaposta a um VHH. A sobreposição é fundamental para reduzir a distância entre as biomoléculas e assegurar o alinhamento atômico preciso entre a estrutura receptora e os fragmentos a serem enxertados. Na **segunda** etapa, a figura C2A exibe as CDRs do domínio VH/NTZ isoladas, enquanto a figura C2B apresenta apenas os esqueletos estruturais (FR) do VHH, após a remoção e exclusão das suas CDRs. A exclusão das CDRs dos VHHs e do FR do VH/NTZ foi e deve ser realizada com base nas estruturas previamente sobrepostas, a fim de preservar o alinhamento espacial entre os domínios. Já na **terceira** etapa, as CDRs do VH/NTZ são posicionadas nos locais correspondentes às CDRs removidas do VHH, porém ainda *sem integração estrutural completa*, conforme indicado pelas linhas tracejadas.

Figura 17 – Esquema para Ilustrar a Estratégia do Enxerto de Estrutura (ENXEST)



Fonte: O esquema ilustrado pelo Autor (2024) detalha as etapas do enxerto de estrutura realizadas no estudo. Em C1, a sobreposição estrutural, também realizado com o *PyMOL*, é utilizado para reduzir as distâncias atômicas entre os dois modelos. Em seguida, em C2A, as CDRs do VH/NTZ são removidas, enquanto, em C2B, as CDRs dos VHHs nas posições equivalentes também são excluídas. Em C3, ocorre a unificação das duas estruturas — as CDRs do VH/NTZ e o framework do VHH — resultando, em C4, no VHH/NTZ, que mantém as conformações originais das CDRs do VH/NTZ.

Antes da obtenção do VHH/EST, o arquivo *.pdb* deve ser exportado como uma nova estrutura. Em seguida, na **quarta** etapa realiza-se a manipulação do arquivo *.pdb*, contendo as CDRs do VH/NTZ e o FR do VHH, para: (1) Ajustar as CDRs nas posições corretas; (2)

Estabelecer a conexão adequada dos *backbones*, e (3) Unificar a estrutura em uma única cadeia proteica. Para essa finalidade, utilizou-se um script em Python com as *flags* do *pdftools* (*pdb_reatom*, *pdb_reres*, *pdb_chainbows*), para unificar as estruturas (Jiménez-García et al., 2021). Esse processamento assegura: (1) a numeração sequencial correta de átomos e resíduos; e (2) a substituição adequada das cadeias. Na estrutura final, denominada VHH/NTZ, as CDRs do VH/NTZ são incorporadas ao FR do VHH, resultando em uma molécula unificada.

3.7 Avaliação dos Enxertos

Os enxertos foram avaliados pela diferença nas posições atômicas dos nanocorpos antes e após o procedimento, utilizando sobreposição estrutural no *PyMOL* com o VH/NTZ. O RMSD foi calculado para o VH/NTZ sobreposto aos nanocorpos pré e pós-enxerto. Valores próximos de zero indicam alinhamento adequado das CDRs enxertadas com as do VH/NTZ, confirmando a eficácia do método. Complementarmente, o Abalign foi empregado para alinhamento de sequência múltipla (MSA), permitindo análise de frequência de resíduos, perfis de mutação e diversidade das CDRs (Zong et al., 2023)

3.8 Predição das Propriedades dos Nanocorpos

3.8.1 Predição da Natividade

Sequências com alta natividade são aquelas que apresentam características *in vivo* semelhantes às de anticorpos produzidos naturalmente pelo sistema imunológico, sugerindo que houve poucas modificações em suas estruturas. Para avaliar a natividade dos nanocorpos antes dos enxertos, utilizou-se o **AbNatiV** (Ramon et al., 2024), uma ferramenta baseada em aprendizado profundo desenvolvida para estimar o grau de "natividade" de macromoléculas. Essa abordagem quantifica com precisão a probabilidade de uma sequência pertencer à distribuição de domínios variáveis nativos, abrangendo anticorpos e nanocorpos. O AbNatiV conta com quatro modelos distintos, treinados em diferentes tipos de sequências: (1) cadeias pesadas humanas (VH), (2) cadeias leves kappa ($V\kappa$), (3) cadeias leves lambda ($V\lambda$) e (4) domínios únicos de cadeias pesadas de camelídeos (VHH). Para esta análise, a sequência foi submetida ao modelo VHH, mantendo-se os parâmetros padrão do *software*, sem modificações adicionais.

3.8.2 Populações de Estrutura Secundária

Compreender a estrutura secundária é essencial para otimizar o design de paratopos e regiões de interação com antígenos, uma vez que essas estruturas influenciam diretamente a estabilidade, flexibilidade e função dos anticorpos (Zhao et al., 2024). Anticorpos e outras

proteínas geralmente adotam, em maior ou menor grau, um dos oito tipos de estrutura secundária, que determinam a conformação terciária final, especialmente nas CDRs. Cada um desses estados encenar papel específico na organização geral das proteínas, refletindo a diversidade estrutural que elas, e particularmente as CDRs dos anticorpos, podem apresentar. Essa variedade de oito estados não representa incertezas nas previsões, mas sim as múltiplas conformações que essas regiões podem assumir. As folhas β , por exemplo, são predominantes nas regiões FR, proporcionando estabilidade estrutural, enquanto as CDRs apresentam alta frequência de alças, que são muito flexíveis e essenciais para se ajustarem a epítomos específicos (Micsonai *et al.*, 2022). Embora raro, já foram observadas CDRs contendo α -hélices. Compreender os estados secundários dos nanocorpos após os enxertos é essencial para verificar se a introdução das CDRs causou alguma alteração nas estruturas secundárias dos nanocorpos enxertados em relação à sua versão nativa. O método s2D (Sormanni *et al.*, 2015), utiliza dados de RMN baseados em solução para prever populações de estruturas secundárias. E por isso, foi usado para identificar as estruturas secundárias dos nanocorpos. Esse método permite caracterizar a estrutura secundária de maneira integrada e unificada, exigindo apenas a sequência como entrada. Além disso, foram mantidas as configurações padrão do s2D, sem alterações de parâmetros.

3.8.3 Regiões Intrinsecamente Desordenadas (IDRs)

A presença de regiões desordenadas em anticorpos pode comprometer sua estabilidade estrutural, reduzir a especificidade no reconhecimento de antígenos e prejudicar a eficácia imunológica. Desordens excessivas ou em locais inadequados favorecem interações inespecíficas, podendo resultar em autoimunidade ou baixa afinidade com os alvos. O software RaptorX-Property (Wang *et al.*, 2016), validado por iniciativas como CASP¹² (*Critical Assessment of Structure Prediction*) e CAMEO, foi utilizado para prever regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs) nos nanocorpos. Este método emprega o modelo DeepCNF (*Deep Convolutional Neural Fields*), baseado em aprendizado de máquina, para identificar proteínas e regiões desordenadas (IDPs/IDRs) a partir do perfil de sequência, mantendo os parâmetros padrão. As CDRs, oriundas do rearranjo V(D)J, tendem a retratar maior propensão à desordem comparadas às regiões FR. Apesar de sua flexibilidade e variabilidade conformacional, não são necessariamente desordenadas, sendo majoritariamente

¹² CASP (*Critical Assessment of Structure Prediction*): Um experimento internacional bienal que avalia, de forma cega, a precisão de métodos de predição estrutural (partir de sequências) ao comparar modelos computacionais com estruturas de proteínas ainda não publicadas, servindo como referência para avanços na modelagem 3D.

constituídas por *loops*. Como o enxerto de CDRs pode alterar regiões previamente estáveis, é essencial avaliar os níveis de desordem estrutural nos nanocorpos pós-modificação.

3.8.4 Potencial de Agregação

Agregados formados por mAbs e proteínas terapêuticas, como mencionam Lundahl *et al.* (2021), podem provocar uma resposta imune indesejada, comprometendo sua estabilidade e funcionalidade. Além disso, a tendência à agregação impacta diretamente a produção, purificação e armazenamento dos nanocorpos, influenciando o custo e a viabilidade de desenvolvimento em larga escala (Perchiacca; Tessier, 2012). Assim, compreender o potencial de agregação dos nanocorpos é fundamental, pois a agregação pode reduzir a eficácia terapêutica e aumentar o risco de reações imunológicas adversas em pacientes. Ao entender e prever esse potencial, é possível modificar as estruturas dos nanocorpos para reduzir a agregação, melhorar a solubilidade e, conseqüentemente, aumentar a segurança e a eficiência dos tratamentos. As possíveis Regiões Propensas à Agregação (APRs, do inglês *Aggregation-Prone Regions*) dos nanocorpos foram analisadas utilizando o *software* AggreProt que exige a sequência de aminoácidos para fazer as previsões. O AggreProt é uma ferramenta que utiliza cinco redes neurais profundas (DNNs) para analisar e prever automaticamente regiões propensas à agregação em proteínas. A previsão é realizada em nível de resíduo, utilizando apenas a sequência da proteína como entrada. Todas as previsões foram feitas com os parâmetros padrão, sem modificações nos ajustes (Planas-Iglesias *et al.*, 2024).

3.8.5 Potencial de Solubilidade

A solubilidade de anticorpos é um parâmetro crítico para evitar agregação, que pode desencadear respostas imunológicas indesejadas e comprometer a eficácia terapêutica. Anticorpos solúveis também apresentam maior facilidade de purificação e formulação, reduzindo custos e viabilizando a produção em larga escala (Perchiacca; Tessier, 2012). A predição computacional da solubilidade permite a detecção precoce de problemas estruturais, possibilitando intervenções racionais para aumentar a estabilidade e o desempenho clínico. A transferência de CDRs entre espécies pode impactar negativamente a solubilidade dos nanocorpos, sendo, portanto, fundamental avaliar eventuais alterações em relação aos modelos nativos que possam comprometer essa propriedade nos VHH/NTZ. Métodos de avaliação da solubilidade podem ser classificados, conforme Grossmann e McClements (2023), em relativa, máxima e preditiva. Neste estudo, utilizou-se a função CamSolpH, do *software* *Chemistry of Health*, desenvolvido por Oeller *et al.* (2023), para prever a solubilidade intrínseca dos VHHs com base em sua estrutura 3D no estado desenovelado, em pH fisiológico (7,4). Apenas as

coordenadas estruturais foram fornecidas, mantendo-se todos os demais parâmetros padrão. Essa abordagem é relevante, pois regiões hidrofóbicas internas, presentes em proteínas enoveladas, podem apresentar baixa solubilidade intrínseca. Métodos baseados unicamente na acessibilidade superficial não capturam essas regiões com precisão (Oeller *et al.*, 2023). O CamSolpH atribui pontuações de solubilidade a cada resíduo da sequência: valores >1 indicam alta solubilidade, enquanto valores <-1 indicam baixa solubilidade. Também é gerada uma pontuação global da proteína. Para ajuste de pKa, o software permite a integração com o PROPKA, que estima os valores com base na estrutura tridimensional (Rostkowski *et al.*, 2011).

3.8.6 Termoestabilidade

Nanocorpos ostentam elevada termoestabilidade, mantendo sua estrutura e funcionalidade mesmo sob altas temperaturas; uma característica intrínseca que os distingue dos anticorpos convencionais, sendo particularmente valiosa em aplicações terapêuticas e diagnósticas (Kim *et al.*, 2023). No entanto, substituições aminoácidas em regiões específicas podem comprometer essa propriedade. Para avaliar eventuais perdas de termoestabilidade após o enxerto, foi determinada a curva completa de estabilidade térmica dos nanocorpos utilizando o SCooP, um *software* que emprega potenciais estatísticos para prever transições de enovelamento em dois estados, com base unicamente na estrutura tridimensional e no organismo de origem (Gonnelli; Rooman; Dehouck, 2012). O SCooP opera com modelos padrão, sem necessidade de ajuste de parâmetros, e realiza os cálculos em 20–30 segundos. As predições incluem tanto a temperatura de fusão (indicador de estabilidade térmica) quanto a energia livre de enovelamento à temperatura ambiente (indicador de estabilidade termodinâmica) (Pucci; Kwasigroch; Rooman, 2017).

3.8.7 Estabilidade de Pontos Fortes e Fracos

A energia livre de enovelamento global dos nanocorpos foi avaliada utilizando o *software* SWOTein, que emprega potenciais estatísticos derivados de bancos de dados para determinar a contribuição de cada resíduo na estabilidade global da estrutura proteica. O *software* requer apenas a estrutura tridimensional e a identificação da cadeia, sem alterações nas configurações, mantendo as características padrão do SWOTein. O *software* analisa três tipos de descritores estruturais: (1) distâncias entre resíduos, que refletem interações locais ao longo da cadeia (Pucci *et al.*, 2014); (2) ângulos de torção da estrutura principal, englobando forças hidrofóbicas (Rooman; Kocher; Wodak, 1991); e (3) acessibilidade ao solvente, responsável por descrever interações terciárias (Pucci *et al.*, 2014). Os descritores conformacionais permitem que o SWOTein calcule a energia livre de enovelamento por resíduo

(ΔG), classificando os resíduos em categorias de força e fraqueza. Esses resíduos são atribuídos a uma escala de calor, variando de *Hard strength* (força forte) a *Hard weakness* (fraqueza extrema). A escala inclui os seguintes parâmetros: *Strength* (força), *Moderate strength* (força moderada), *Mild strength* (força leve), *Neutral* (neutro), *Mild weakness* (fraqueza leve), *Moderate weakness* (fraqueza moderada), *Weakness* (fraqueza) e *Hard weakness* (fraqueza extrema). Quanto mais forte for o resíduo, mais azul ele será colorido, e quanto mais próximo de uma fraqueza extrema, mais vermelho ele ficará. Com base nesses parâmetros, é possível avaliar se as CDRs VH/NTZ afetam a estabilidade global do nanocorpo. Resíduos mais azuis indicam maior estabilidade conformacional, enquanto resíduos mais vermelhos são considerados desestabilizadores, apontando para regiões menos estáveis (Hou *et al.*, 2021).

3.8.8 Avaliação de Humanidade

A plataforma BioPhi é especializada no design, humanização e avaliação de humanidade de anticorpos a partir de repertórios naturais. Esse *software* exige apenas as sequências dos anticorpos. Sendo assim, as sequências dos nanocorpos antes e após os enxertos foram aplicadas para verificar o nível de humanidade deles. Para os nanocorpos, foi adotado o critério rigoroso de $\geq 90\%$ dos indivíduos, ou seja, cada peptídeo é classificado como humano se for detectado em 90% da população humana. A numeração utilizada foi o esquema de Chothia, pois é a numeração menos desatualizada que o BioPhi disponibiliza. Esses parâmetros padrão do BioPhi mantidos inalterados. O BioPhi utiliza três métodos distintos para essa análise, incluindo a função *Identity OASis*, que avalia a humanidade de uma sequência de anticorpos ao dividi-la em fragmentos de nove aminoácidos sobrepostos, os quais são comparados com o banco de dados *Observed Antibody Space* (OAS) para determinar sua prevalência na população humana. A pontuação de *Identity OASis* de um anticorpo é dada pela fração de seus peptídeos que atendem a um critério de prevalência estabelecido. Outra métrica do BioPhi é a função *Percentil OASis*, que calcula uma pontuação ao comparar o anticorpo modelo com todos os mAbs disponíveis. A pontuação indica a proximidade do anticorpo com mAbs terapêuticos, onde 0% significa nenhuma semelhança e 100% indicam aminoácidos idêntica à de mAbs terapêuticos, incluindo mAbs murinos, humanizados e humanos em estágio clínico. A métrica *Germline Content* avalia a identidade da sequência do modelo em relação à linha germinativa (Prihoda *et al.*, 2022).

3.9 Docking Molecular dos VHH/NTZ com a Subunidade $\alpha 4$

O HADDOCK 2.4 é uma ferramenta amplamente utilizada para o acoplamento de estruturas na formação de complexos biomoleculares, com aplicações em interações proteína-

proteína, proteína-ligante, proteína-oligossacarídeo e proteína-ácido nucleico. Reconhecido pelo CASP-CAPRI¹³ (*Critical Assessment of Structure Prediction – Critical Assessment of PRedicted Interactions*) como um dos métodos mais eficazes na área (Vangone *et al.*, 2017), o HADDOCK adota uma abordagem de modelagem integrativa baseada nas estruturas individuais dos componentes. Ele incorpora dados experimentais, como mutagênese, RMN, espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) e crio-EM, para definir restrições de interação ambíguas que orientam e refinam a predição do acoplamento estrutural (Honorato *et al.*, 2024). O protocolo de acoplamento no Haddock 2.4 consiste em três etapas sucessivas, empregando o pacote *Crystallography and NMR System*¹⁴ (CNS) como base *in silico*:

1. **Docking de corpo rígido:** Na primeira etapa (it0), ilustrado no item A (função de energia, Equação 2), as moléculas são tratadas como corpos rígidos, posicionadas a uma distância inicial de ~25 Å e submetidas a rotações e translações aleatórias. A energia é minimizada via CNS, empregando parâmetros padrão de campos de força (ex.: (ϵ_{ij}), (k_b) e (k_θ)). Apenas interações intermoleculares são consideradas, incluindo: Van der Waals (VDW), interações eletrostáticas, e restrições experimentais (NMR/mutagênese). As poses energeticamente favoráveis (menores energias de interação) são selecionadas para etapas subsequentes de refinamento (Van Dijk; Bonvin, 2006).

A. Função de energia:

$$E_{ridid} = E_{vdW} + E_{elec} + E_{restraints} \quad (2)$$

Onde:

Van der Waals (Lennard-Jones):

$$E_{vdW} = \sum_{i < j} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{min, ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{min, ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

Eletrostática (Coulomb):

¹³ CAPRI (*Critical Assessment of PRedicted Interactions*): Uma iniciativa colaborativa que avalia métodos de predição de interações proteína-proteína, com foco na modelagem de complexos moleculares, interfaces e contatos residuais, com base em estruturas experimentais não divulgadas.

¹⁴ CNS (*Crystallography and NMR System*): sistema computacional avançado para determinação e refinamento de estruturas macromoleculares, originalmente desenvolvido para aplicações em cristalografia de raios-X e RMN. No contexto do HADDOCK 2.4, o CNS é empregado como motor de *back-end* para a execução das etapas de dinâmica molecular, minimização de energia e refinamento em solvente explícito, contribuindo para a geração de modelos estruturais energeticamente favoráveis e conformacionalmente realistas de complexos biomoleculares.

$$E_{elec} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon (r_{ij})r_{ij}}$$

Restrições experimentais (harmônicas):

$$E_{restraints} = \omega_{dist} \sum_k \max(0, (r_k - r_{k,0})^2 - \delta_k^2) - \omega_{sym} E_{sym} + \omega_{dani} E_{dani}$$

- 2. Refinamento Semi-flexível:** Na segunda etapa (it1), visto em B (função de energia, equação 3). As estruturas selecionadas são submetidas a uma etapa de refinamento semi-flexível composta por: (1) minimização rígida, (2) flexibilização progressiva dos resíduos da interface, incluindo cadeias laterais e *backbone*, e (3) minimização em solvente implícito. Essa fase utiliza algoritmos de *simulated annealing*¹⁵ em espaço de torção para escapar de mínimos locais e otimizar o acoplamento, balanceando acurácia e custo computacional.

B. Função de energia:

$$E_{semi-flex} = E_{rigid} + E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedral} \quad (3)$$

Onde:

Ligações covalentes (harmônicas):

$$E_{bond} = \sum_{bonds} \kappa_b (r - r_0)^2$$

Ângulos (harmônicos):

$$E_{angle} = \sum_{angles} \kappa_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

Diedros (periódicos):

$$E_{dihedral} = \sum_{dihedrals} \kappa_\phi [1 + \cos(\eta\phi - \delta)]$$

E o algoritmo do *Simulated Annealing* que usa perfil de temperatura exponencial:

$$T(t) = T_{inicial} \cdot e^{-\lambda t}$$

¹⁵ É um protocolo de otimização termicamente controlada aplicado durante o refinamento semi-flexível. Utiliza um perfil exponencial de temperatura combinado com MD e critérios de aceitação baseados em energia, visando escapar de mínimos locais e gerar estruturas de complexos biologicamente plausíveis, respeitando restrições experimentais. O processo é finalizado com uma minimização em baixa temperatura.

- 3. Refinamento em Solvente Explícito:** Na etapa final (*water*), as estruturas são imersas em água explícita (modelo TIP3P) e submetidas a uma curta simulação de dinâmica molecular (5–10 ps) para alcançar o equilíbrio termodinâmico, seguida de uma minimização final. Esta fase utiliza a função de energia descrita na equação 4 (ver item C) e visa refinar as interações intermoleculares sob condições próximas às fisiológicas, promovendo maior estabilidade e realismo estrutural ao complexo.

C. Função de energia:

$$E_{MD} = E_{bonded} + E_{non-bonded} + E_{restraints} \quad (4)$$

Onde:

Solvatação (modelo explícito)

$$E_{non-bonded} = \sum_{protein-water} (E_{vdw} + E_{elec}) + \sum_{water-water} (E_{vdw} + E_{elec})$$

MD - Equações de Verlet e força derivada da energia

(Faz a atualização das posições atômicas)

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{F(t)}{m} \Delta t^2$$

$$F(t) = -\nabla E_{MD}$$

MD - Termostato de Berendsen

(Ajusta a temperatura do sistema suavemente ao longo do tempo)

$$V_i^{new} = V_i \cdot \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau T} \left(\frac{T_{alvo}}{T(t)} - 1 \right)}$$

MD - Gradiente conjugado de Polak-Ribière

(Minimização final; remove tensões e relaxa geometrias residuais)

$$d_k = -\nabla E_{MD}(x_k) + \beta_k d_{k-1}$$

$$\beta_k = \frac{\nabla E_{MD}(x_k)^T (\nabla E_{MD}(x_k) - \nabla E_{MD}(x_{k-1}))}{\nabla E_{MD}(x_{k-1})^T \nabla E_{MD}(x_{k-1})}$$

Antes da etapa de docking molecular, tanto os VHH/NTZ quanto a subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$ (antígeno) foram preparados conforme o protocolo do HADDOCK 2.4. Essa preparação incluiu a manutenção dos arquivos *.pdb*, a correta identificação das cadeias, a

identificação do estado de protonação das histidinas (*MolProbity*) e a aplicação de restrições do tipo *ambig.tbl*, que definem os resíduos ativos e passivos, conforme apresentado na Tabela 2. Ressalta-se que restrições do tipo *unambig.tbl* não foram utilizadas, pois são recomendadas apenas para proteínas com múltiplas cadeias.

As abordagens empregadas foram o docking cego e o docking dirigido. No docking cego, toda a superfície da proteína foi explorada para o reconhecimento do sítio de interação, sem definição prévia da região de acoplamento. Essa estratégia é particularmente útil quando há pouca informação sobre os locais ativos e, neste estudo, foi aplicada para verificar se os complexos VHH/NTZ mantêm a especificidade pelo sítio-alvo (Yan *et al.*, 2020). Já o docking dirigido concentra-se em regiões previamente caracterizadas ou hipotetizadas como sítios de interação, baseando-se em *pockets*¹⁶ ativos identificados por análises teóricas ou experimentais. Essa abordagem restringe o espaço de busca e tende a gerar um número maior de complexos em comparação ao docking cego (Van Dijk; Boelens; Bonvin, 2005). Ambas as estratégias foram aplicadas aos três tipos de enxertos avaliados. Os resíduos ativos do NTZ foram definidos como aqueles presentes nas três regiões CDRs do domínio VH. Já os resíduos ativos da subunidade $\alpha 4$ foram obtidos a partir do arquivo 4IRZ, correspondendo aos resíduos do antígeno que interagem com os domínios VH/VL do NTZ. Os resíduos passivos da subunidade $\alpha 4$ foram considerados como todos os resíduos do domínio *β -propeller* dessa subunidade. Embora seja comum definir resíduos passivos como aqueles situados a até 5 Å dos resíduos ativos (o que foi feito apenas para o docking dirigido), optou-se por incluir todo o domínio *β -propeller* da subunidade $\alpha 4$. Essa estratégia ampliou o espaço de busca dos VHH/NTZ, permitindo uma identificação imparcial do sítio de interação correspondente ao VH/NTZ e garantindo que as CDRs do VHH/NTZ mantivessem sua especificidade pelo sítio-alvo. Os cálculos de docking dos VHH/NTZ foram realizados em duas abordagens distintas, ambas utilizando água como solvente explícito. As etapas de acoplamento envolveram a geração de 1000 complexos no acoplamento de corpo rígido (configuração padrão), seguidos por 250 complexos para refinamento semiflexível e refinamento explícito com solvente. Foi desenvolvido um script em Python que automatiza desde a preparação das estruturas até a análise dos resultados, otimizando o processo e assegurando eficiência e reprodutibilidade.

¹⁶ São depressões topográficas localizadas na superfície de macromoléculas, especialmente proteínas, que apresentam propriedades estereoquímicas e físico-químicas favoráveis à interação com ligantes. Caracterizam-se por geometria complementar, potencial eletrostático apropriado e presença de resíduos propensos a interações não covalentes. Esses sítios funcionais podem ser identificados por métodos experimentais ou computacionais e, quando previamente validados, constituem alvos preferenciais em abordagens de *docking* dirigido, uma vez que restringem o espaço de busca e aumentam a relevância estrutural das predições.

Tabela 2 – Resíduos Ativos do VH/NTZ e da Subunidade $\alpha 4$ e Resíduos Passivos da Subunidade $\alpha 4$

Proteínas	Resíduos ativos	Resíduos passivos	
		<i>Docking cego</i>	<i>Docking dirigido</i>
Natalizumabe (VH)	25 26 27 28 29 30 31 32		
	33 52 53 54 55 56 97 98	---	---
	99 100 101 102 103 104		
	105 106 107 108 109 110		
Subunidade $\alpha 4$		1 4 6 7 8 9 12 13 14 15 16	
		20 22 24 29 30 31 37 40	
		42 43 44 45 47 48 49 50	
		51 53 56 57 60 61 62 64	
		65 66 67 68 69 70 71 74	
		75 76 77 78 79 80 81 82	
		83 84 86 87 89 91 95 97	
		98 99 100 102 103 104	
		105 106 112 114 119 121	
		122 123 124 125 126 130	26 27 28 55 71 73 84 88
		131 133 134 138 140 142	100 101 102 105 106 107
		143 144 145 146 149 151	108 109 110 111 112 113
		152 154 156 157 158 159	115 117 118 119 120 122
		160 161 162 166 168 170	125 126 127 129 130 132
		172 173 174 175 176 177	133 136 138 139 140 141
	121 123 124 131 134 135	181 184 186 187 188 190	144 145 146 148 149 150
	137 147 152 155 162 175	195 198 199 200 201 202	151 152 153 154 156 157
	201 206 208 230 256	203 204 205 206 207 208	158 159 169 161 163 164
		209 210 211 212 213 214	165 167 168 173 174 176
		215 219 223 225 226 229	177 178 180 185 186 191
		230 231 232 237 238 240	193 194 195 196 197 199
		243 244 246 252 253 254	200 202 203 204 205 207
		255 256 259 260 261 262	209 210 226 228 229 231
		263 265 266 267 268 269	232 233 254 255 257 258
		270 274 276 278 280 284	259 286 287
		285 286 293 297 298 299	
		300 301 304 309 313 314	
		315 317 319 320 322 323	
		326 327 328 329 331 336	
		338 340 343 344 347 348	
		349 351 356 361 362 363	
		364 365 372 373 374 375	
		376 379 380 382 387 388	
		389 390 392 393 398 400	

403 404 408 409 410 411
413 418 421 429 431 432

Fonte: A tabela elaborada por Autor (2024) apresenta a posição exata dos resíduos ativos e passivos, conforme a numeração padrão do PDB, no antígeno (subunidade $\alpha 4$) e os resíduos ativos do domínio VH/NTZ para ambos os tipos de docking: cego e dirigido.

3.9.1 Validação dos complexos VHH/NTZ- $\alpha 4$

Para validar o HADDOCK 2.4, foi utilizada a estratégia de re-docking, que serve para verificar a confiabilidade do *software* empregado na geração dos complexos. O método de re-docking envolve etapas cruciais, começando pela utilização obrigatória da estrutura cristalográfica de referência. Seu principal objetivo é a recriação da posição original do alvo em relação ao seu receptor. Dessa forma, os complexos gerados são comparados com a estrutura resolvida experimentalmente, permitindo avaliar se o programa consegue identificar uma conformação que se aproxime ao máximo da estrutura experimental (Mateev *et al.*, 2022). O PDBID 4IRZ foi utilizado, contendo a subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$ associada ao Natalizumabe. Em seguida, a estrutura foi dissociada e dividida em três arquivos: um com os domínios VH/VL, outro contendo apenas o VH e um terceiro com a subunidade $\alpha 4$. A partir disso, foram realizados dois re-dockings: o primeiro focado exclusivamente no domínio VH e o segundo considerando os domínios VH/VL do Natalizumabe, ambos utilizando abordagens de acoplamento cego e dirigido.

3.9.2 Escolha dos Melhores Complexos

Os melhores complexos foram aqueles em que os VHH/NTZ se posicionaram no sítio de interação do VH/NTZ. A seleção desses complexos foi realizada com o *software* DockQ, desenvolvido por Basu e Wallner (2016), que utiliza uma métrica contínua combinando os parâmetros Fnat, LRMS, iRMS, Fnonnat, F1 e Clashes em uma única pontuação. Essa pontuação permite avaliar a qualidade dos modelos de encaixe proteína-proteína (Lensink; Wodak, 2013).

- Fnat (*Fraction of Native Contacts*): mede a fração de contatos nativos mantidos após o docking, avaliando a similaridade estrutural.
- LRMS (*Ligand Root Mean Square Deviation*): calcula o desvio médio quadrático (RMSD) do ligante em relação à estrutura de referência, avaliando a precisão global do acoplamento.

- **iRMS** (*Interface Root Mean Square Deviation*): mede o RMSD considerando apenas os resíduos na interface de interação, avaliando a precisão local.
- **Fnonnat** (*Fraction of Non-Native Contacts*): quantifica a fração de contatos não nativos presentes no modelo previsto, indicando a presença de interações incorretas.
- **F1**: combina precisão (PPV - *Positive Predictive Value*) e sensibilidade (TPR - *True Positive Rate*) para fornecer uma medida equilibrada de desempenho do modelo de docking no acerto tanto os contatos específicos quanto a cobertura da interface de interação.
- **Clashes** (Colisões): identifica colisões atômicas dentro do modelo, ajudando a detectar conformações estereoquimicamente inviáveis.

Quando os valores de **LRMS** e **iRMS** se aproximam de 0 e **Fnat** se aproxima de 1, a tendência é que a pontuação **DockQ** esteja mais próxima de 1,0. Assim, a classificação dos modelos atribuídos pelo DockQ segue a seguinte escala:

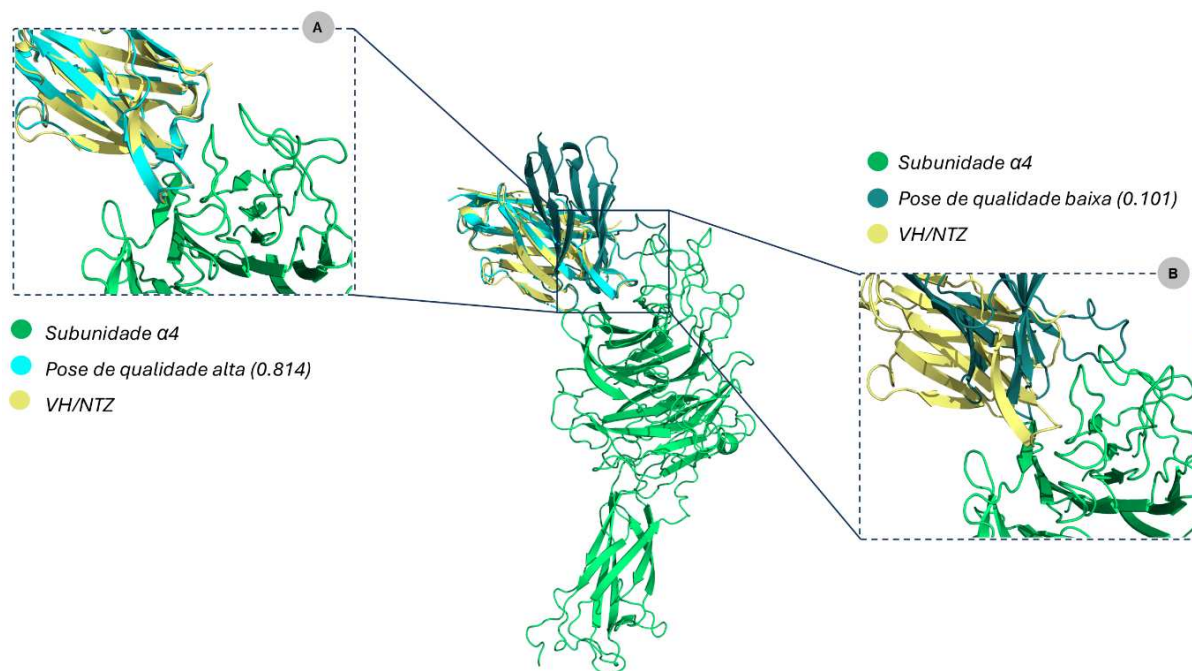
- **$0.00 \leq \text{DockQ} < 0.23$** : Incorreto
- **$0.23 \leq \text{DockQ} < 0.49$** : Qualidade aceitável
- **$0.49 \leq \text{DockQ} < 0.80$** : Qualidade média
- **$\text{DockQ} \geq 0.80$** : Alta qualidade

Essa escala facilita a análise comparativa entre diferentes predições. A figura 18 ilustra melhor essa seleção. Para avaliar a eficácia dos métodos computacionais de docking, é fundamental verificar a qualidade dos modelos gerados, comparando-os com estruturas nativas experimentais. No entanto, como os VHH/NTZ não possuem estruturas cristalográficas, o uso direto do DockQ não foi viável. Para contornar essa limitação, foi aplicada a estratégia do "complexo fake", uma estrutura biomolecular artificial criada para facilitar análises comparativas. Nesse contexto, o "complexo fake" foi gerado combinando partes de dois complexos distintos: o antígeno derivado do docking e o anticorpo (VH/NTZ) da estrutura cristalográfica. Essa abordagem permite avaliar interações e a distribuição espacial de forma mais realista na ausência de dados cristalográficos.

O complexo foi construído removendo o domínio VL e mantendo apenas o domínio VH e o antígeno. Posteriormente, esse complexo VH/ $\alpha 4$ foi sobreposto com um modelo gerado de VHH/ $\alpha 4$, sendo o VHH-NTZ (docking) e o antígeno (cristal) removidos. Assim, resultando em um complexo VH/NZT (cristal) e $\alpha 4$ (oriundo do docking). Curiosamente, apenas remover o domínio VL e manter o VH/NTZ- $\alpha 4$ não foi suficiente para gerar um "complexo fake" que o

DockQ pudesse interpretar corretamente. Por isso, a estratégia bem-sucedida consistiu em manter o antígeno do docking e o VH do cristal para formar o “complexo fake”. Esse procedimento garante que o antígeno e o domínio VH estejam posicionados no local desejado, permitindo ao DockQ comparar a sobreposição dos modelos gerados com o “complexo fake”. Quanto maior a sobreposição, mais fiéis são as interações preditas. A estratégia foi aplicada aos três tipos de enxertos, e um script em Python foi desenvolvido para automatizar todas as análises, agilizando o processo de filtragem com base nas pontuações do DockQ.

Figura 18 – Complexo VHH/NTZ- $\alpha 4$ de Alta e Baixa Qualidade Segundo DockQ



Fonte: Esquema elaborado pelo Autor (2025) para ilustrar a qualidade das poses de acordo com a pontuação do DockQ. Em (A), observa-se um complexo contendo seu VHH/NTZ na cor ciano, indicando alta qualidade (DockQ > 0.80), sobreposto ao domínio VHH/NTZ, representado em amarelo escuro. Em (B), é apresentado um complexo com seu VHH/NTZ na cor azul escuro, caracterizando uma pose de baixa qualidade (DockQ < 0.23, considerada incorreta), quando sobreposto ao domínio VHH/NTZ.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da interface Natalizumabe/ $\alpha 4$

A interface entre anticorpo (Ab) e antígeno (Ag), conforme discutido por Reis *et al.* (2022), é descrita como uma região específica da Superfície Excluída de Solvente (SES) no complexo antígeno-anticorpo. Durante a formação desse complexo, os resíduos envolvidos na interação tendem a ficar ocultos na interface, especialmente aqueles com alta especificidade.

No entanto, a simples ocultação ao solvente não é um indicativo direto de especificidade, pois nem todos os resíduos enterrados participam ativamente do

reconhecimento molecular. Compreender essas interações, especialmente em mAbs comerciais, como o Natalizumabe e seu antígeno $\alpha 4$, é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias (Marchand; Van Hall-Beauvais; Correia, 2022). Essa análise inicial oferece uma base estratégica para projetar moléculas capazes de mimetizar ou aprimorar essas interações.

Para garantir a confiabilidade dos dados da nova interface entre NTZ e a subunidade $\alpha 4$, foram utilizadas análises moleculares com dois preditores de interações proteína-proteína (PPIs), RING e RINmaker, permitindo a comparação dos resultados. A Figura 19 apresenta as informações geradas por ambos os *softwares*. As subfiguras 19A e 19D mostram os diferentes tipos de interações na interface VH/NTZ- $\alpha 4$, incluindo ligações de hidrogênio, interações entre grupos carregados e iônicas, como pontes salinas.

Estas últimas são altamente estáveis devido à atração eletrostática entre cargas opostas (Novotny; Sharp, 1992). Também ocorrem interações entre grupos apolares, que minimizam a exposição ao meio aquoso. Essas interações, conhecidas como forças de VDW, predominam entre cadeias laterais apolares, como grupos hidrocarbonetos (Sundberg; Mariuzza, 2002; Kusova *et al.*, 2022).

Na interface VH/NTZ- $\alpha 4$, as interações mais frequentes são as de VDW, com 45 ocorrências identificadas pelo RING e 72 pelo RINmaker. As interações de hidrogênio (HBOND) aparecem em menor número, totalizando 13 no RING e 9 no RINmaker, sendo VDW e HBOND o primeiro e o segundo tipo de interação mais prevalente, respectivamente. O RING considera moléculas de água nos cálculos, o que amplia a detecção de HBOND, uma vez que, segundo Raymer *et al.* (1997), essas moléculas frequentemente mediam interações de hidrogênio entre Ab-Ag. As distâncias médias das interações de hidrogênio no complexo antígeno-anticorpo variam entre 2,7 Å e 3,5 Å, valores compatíveis com os observados na interface VH/NTZ- $\alpha 4$. As Figuras 19C e 19F indicam distâncias de 3,2 Å, dentro do esperado para esse tipo de interação.

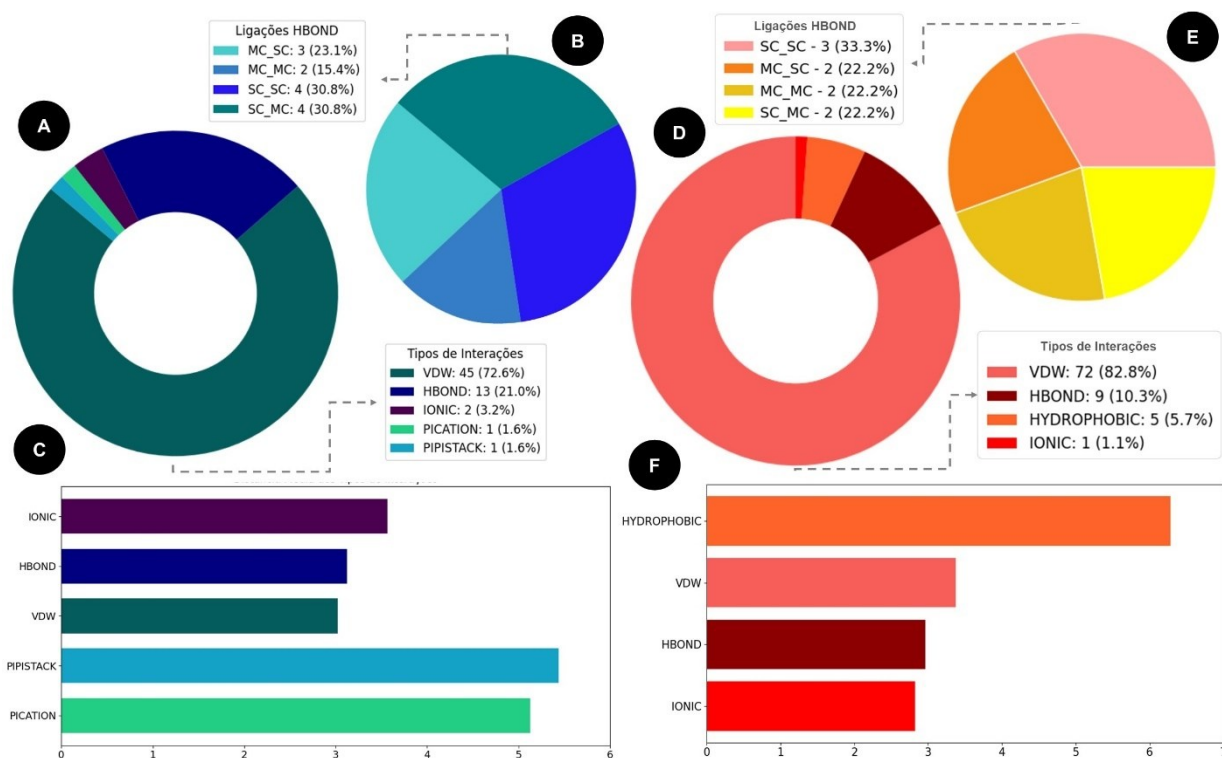
Também são observadas interações entre anéis aromáticos, como nos resíduos de Phe, Tyr e Trp, além de interações com grupos carregados positivamente, como Arg e Lys. Essas interações incluem π - π (entre nuvens de elétrons π), π -cátion (entre um anel aromático e um cátion) e π - π stacking, fundamentais para a complementariedade hidrofóbica, estabilidade estrutural, especificidade antigênica e resistência a variações dinâmicas na interface. O RINmaker classifica todas as interações π como hidrofóbicas, diferente do RING.

No contexto das interações moleculares na interface VH/NTZ- $\alpha 4$, Tyr33 e Thr32 destacam-se como os principais Resíduos Determinantes de Especificidade (SDRs) da CDR H1. Tyr33 estabelece uma interação π -cátion importante com o átomo NZ da Lys201 (5,27 Å,

28,11°) e participa de interações de VDW, que contribuem para a estabilização do complexo (Osajima *et al.*, 2014). Thr32, além das interações VDW, forma uma HBOND entre seu átomo O e o NZ da Lys201 (3,67 Å, 113,40°).

Em comparação, os demais SDRs da CDR H1 apresentam interações menos expressivas, como as HBONDS entre Lys30-Lys201 e Asp31-Asn200. Na CDR H2, Asp52 sobressai como o SDR mais relevante, sendo o único resíduo a formar interações iônicas diretas, a mais forte na interface Ab-Ab VH/NTZ- α 4 (15–40 kJ/mol). Asp52 estabelece duas pontes salinas essenciais para a estabilidade estrutural e reconhecimento molecular (Reis *et al.*, 2022): uma entre seus átomos OD1/OD2 e o NZ da Lys201 (2,5 Å e 3,2 Å) e outra ligação iônica com o H da Lys201 (3,45 Å, 151,23°). Além disso, forma HBONDS com Lys201 e Thr199, complementadas por interações VDW. Embora individualmente fracas (0,4–4 kJ/mol), essas interações, em conjunto, refinam o ajuste molecular e reforçam o contato estrutural.

Figura 19 – Interações Entre VH/NTZ- α 4 Obtidos Através do *Software* RING e RINmaker



Fonte: Os gráficos elaborados por Autor (2024) apresentam uma análise das interações na interface de Ab-Ag. No gráfico na esquerda em A, observa-se tanto a porcentagem quanto a quantidade total de interações presentes. Já o gráfico B ainda na esquerda revela a distribuição das ligações de hidrogênio (HBOND) entre as porções lateral e central dos aminoácidos, destacando se ocorrem na cadeia principal (MC, *Main Chain*) ou na cadeia lateral (SC, *Side Chain*). Já em C na esquerda mostra a distância média das interações em angstroms Å. Já no gráfico a direita em D, observa-se tanto a porcentagem quanto a quantidade total de interações presentes. Em E revela a distribuição das ligações de hidrogênio (HBOND) entre as porções lateral e central dos aminoácidos, destacando se ocorrem na cadeia principal (MC, *Main Chain*) ou na cadeia lateral (SC, *Side Chain*). Já em F mostra a distância média das

interações em angstroms (Å) curiosamente todas as interações de caráter hidrofóbico na interface é representada pelo *software* como um único grupo.

A H3 do VH/NTZ, a maior entre as CDRs, concentra a maioria dos resíduos cruciais para o reconhecimento e estabilização do complexo (figura 20). Destaca-se Tyr101, um dos principais SDRs, por sua interação π - π stacking com Tyr202 da subunidade α 4 (distância de 4,82 Å, ângulo de 14,42° e orientações de 48,14γ e 14,42δ). Além disso, Tyr101 estabelece HBOND e interações VDW, reforçando sua importância na interface molecular. Outros SDRs da CDRH3, como Gly103 e Asn104, apresentam os maiores quantitativos de HBOND e VDW. Asn104 se destaca pelo maior aumento na área de superfície enterrada acessível (Δ BSA) após a formação do complexo, seguido por Gly103 (figura 21). Tyr108 também é crítico, formando uma interação π - π stacking com Tyr202 da α 4, com características geométricas idênticas às de Tyr101. As Tyr101 e Tyr108 atuam como resíduos-âncora na interface VH/NTZ, sendo essenciais para a estabilidade e especificidade do complexo (Yu; Schürpf; Springer, 2013).

A alta abundância de Tyr na interface VH/NTZ reforça os achados de Ramaraj *et al.* (2012), que identificaram Tyr como um dos resíduos mais frequentes em interfaces Ab-Ag. Embora o complexo seja estabilizado por diversas interações, como ligações cátion- π e π - π , as HBOND desempenham um papel central, sendo a principal contribuição das interações hidrofílicas não covalentes.

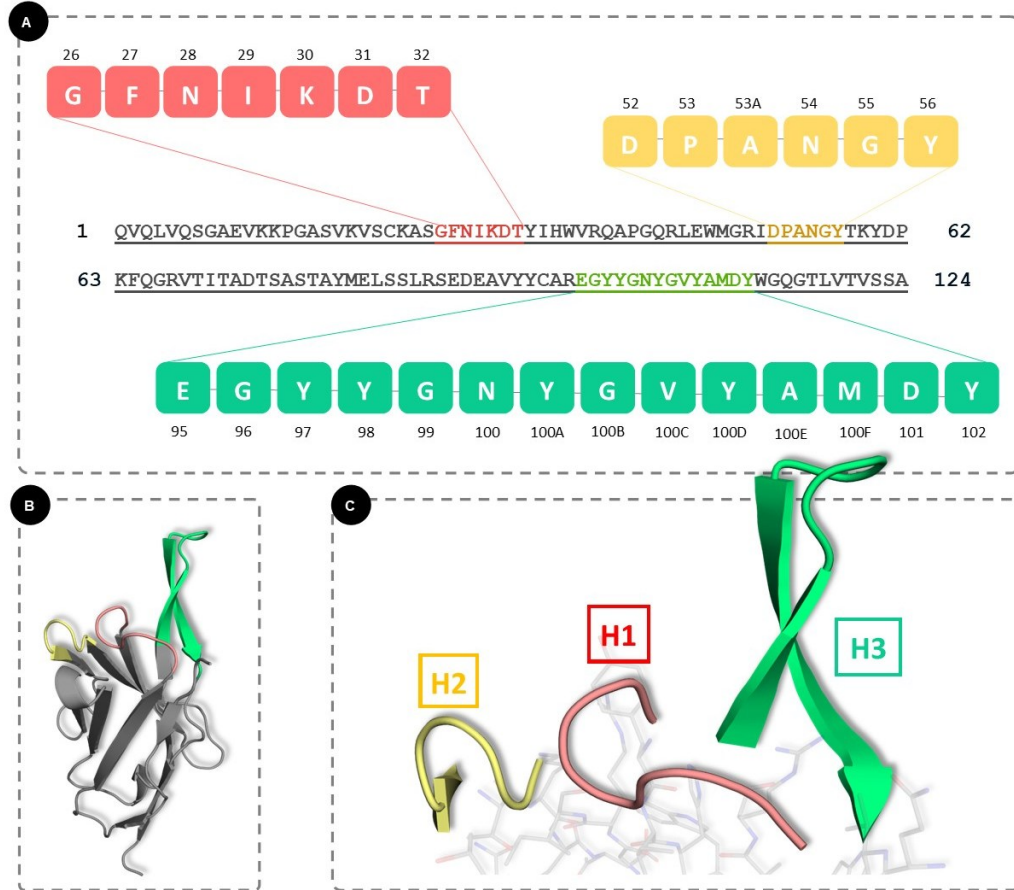
A CDRH3 do NTZ apresenta maior quantidade de HBOND e interações de VDW em comparação com as regiões H1 e H2, corroborando a relevância funcional da H3 no contato com o antígeno. Esse papel predominante é confirmado pelo estudo de Qu *et al.* (2021), que demonstrou ser possível prever quais das CDRs têm maior influência na captura do antígeno com base no número de HBOND. A segmentação das interfaces Ab-Ag em unidades independentes (CDR-Ag) emerge como uma abordagem promissora para entender melhor as contribuições de cada CDR no reconhecimento antigênico, com implicações para a otimização de mAbs comerciais e o desenvolvimento de mAbs miméticos (Liu *et al.*, 2022).

O *alanine scanning*¹⁷ surge como uma conduta eficiente e de baixo custo computacional para investigar esses impactos, de acordo com Moreira, Fernandes e Ramos (2007). Assim, é oportuno sugerir que substituições nos aminoácidos SDRs do VH/NTZ podem comprometer a

¹⁷ Método computacional de mutagênese virtual que avalia a contribuição funcional ou energética ($\Delta\Delta$ G) de resíduos individuais em proteínas. Consiste na substituição sistemática de aminoácidos não alanina por alanina (mutação pontual) em um modelo estrutural, com o objetivo de identificar *hotspots* críticos para interações moleculares ou estabilidade. A alanina é escolhida por ostentar uma cadeia lateral simples (grupo metil, -CH₃), que reduz interações específicas do resíduo original sem comprometer significativamente a integridade estrutural da proteína.

afinidade e especificidade do complexo NTZ/ α 4, destacando a necessidade de análises detalhadas para avaliar possíveis modificações.

Figura 20 – Posição dos Aminoácidos nas Regiões FR e CDRs do Domínio VH/NTZ



Fonte: A ilustração desenvolvida por Autor (2024), utilizando o *software* PyMOL, apresenta em A, as sequências de aminoácidos do domínio VH/NTZ, com destaque para as CDRs. As regiões H1, H2 e H3 são realçadas em cores rosácea, ouro e verde claro, respectivamente. As CDRs também são ampliadas, evidenciando suas posições de acordo com o esquema de Chothia. Na Figura B, é exibida a estrutura tridimensional completa do domínio VH, com a região FR representada em cinza. Já na Figura C, são destacados exclusivamente a regiões das CDRs H1, H2 e H3, nas mesmas cores usadas anteriormente.

Os resultados do RING e RINmaker indicam que a interface VH/NTZ- α 4 é composta por interações π -stacking, π - π stacking, VDW e hidrofóbicas, em concordância com os achados de Dalkas *et al.* (2014) e Reis *et al.* (2022) sobre interfaces Ag-Ab. Isso destaca a eficácia desses *softwares* na identificação de interações moleculares. No entanto, sua abordagem estática pode limitar a análise da interface. Simulações dinâmicas, ao considerarem movimentos moleculares em condições mais realistas oferecem uma visão mais detalhada e devem ser utilizadas como complemento, apesar do maior custo computacional (Barraza *et al.*, 2024). A Área de Superfície Enterrada (BSA) (Figura 21) é amplamente utilizada para caracterizar interfaces biomoleculares, refletindo o grau de contato entre moléculas. Em interações Ag-Ab, valores de

1.500 a 2.500 Å² indicam interfaces estáveis, podendo chegar a 4.000 Å² em casos expandidos segundo Chen, Sawyer e Regan (2013). Já a Área de Superfície Acessível ao Solvente (ASA) quantifica a fração exposta da superfície molecular, sendo essencial para avaliar solubilidade, acessibilidade e funcionalidade.

No complexo VH/NTZ- α 4 existe: (1) Resíduos Críticos – Thr198, Lys256, Glu255 e Asp161 (antígeno) estão mais enterrados, evidenciando sua relevância na complementaridade entre as moléculas (Burgoyne; Jackson, 2009; Greenspan, 2023). A presença de cargas opostas, como Lys256 e Glu255/Asp161, sugere interações eletrostáticas estabilizadoras, enquanto Thr198 pode formar ligações de hidrogênio, contribuindo para a especificidade da interação.

(2) Distribuição dos Resíduos Interfaciais – A diferença no número de resíduos interfaciais, com 21 no VH/NTZ e 27 na α 4, indica uma interação assimétrica e sugere uma adaptação conformacional do antígeno. O parátipo do NTZ, composto por 27 resíduos, estabelece um contato extenso com o epítipo da α 4, fator determinante para sua especificidade.

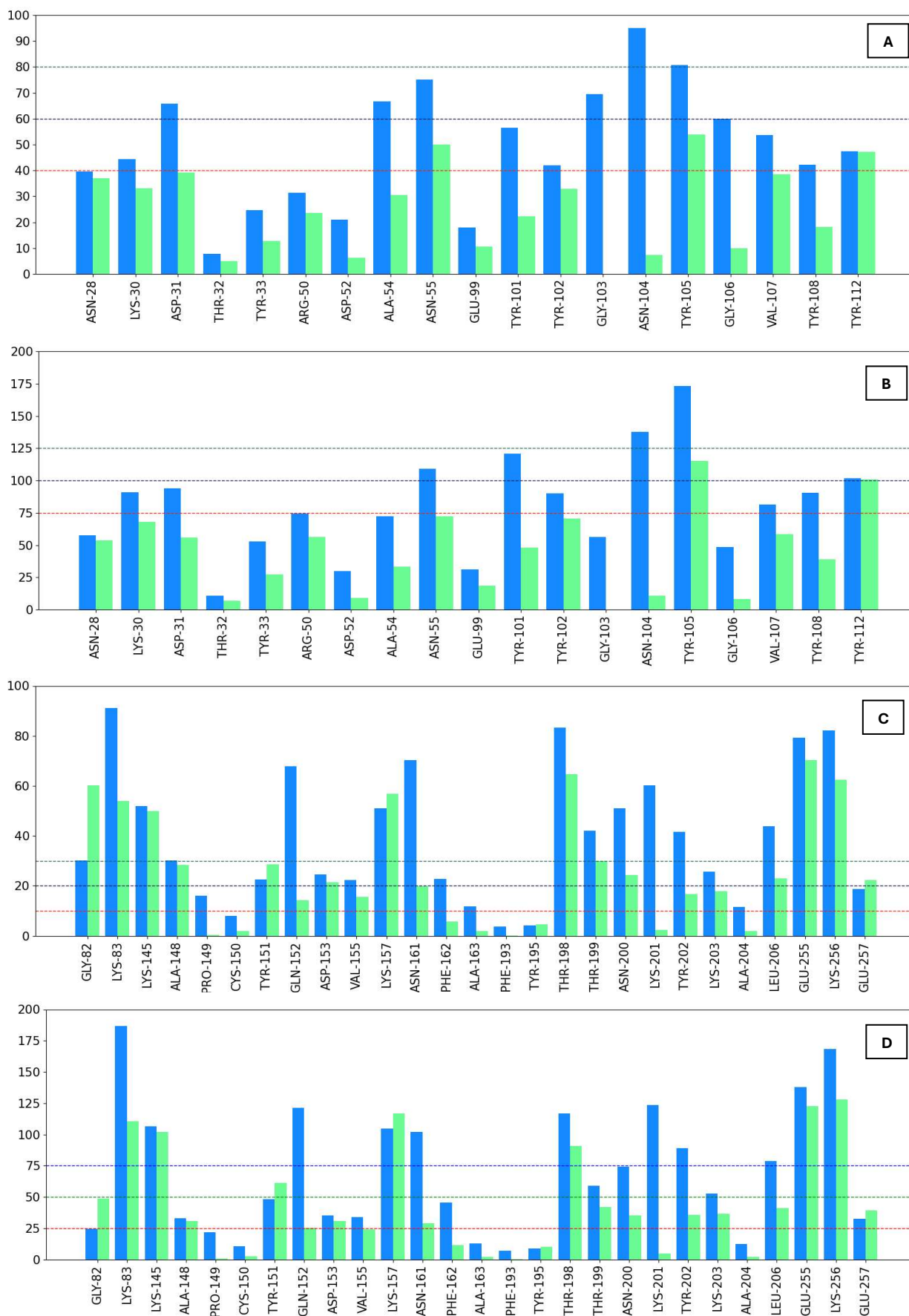
(3) Superfície Enterrada e Contribuição das Cadeias – A BSA maior da cadeia pesada (75%) em relação à leve (25%) segue o padrão observado para anticorpos, onde VH domina a interação (Sela-Culang; Kunik; Ofra, 2013). A fração de superfície enterrada, de 11,5% para o complexo VH/NTZ e 3,52% para α 4, está dentro do esperado para interações Ag-Ab, sendo que a menor participação da α 4 na interface se justifica por seu maior tamanho estrutural.

(4) Volume da Interface e Compacidade – O volume da interface, de 2284,5 Å³, indica uma estrutura menos compacta, pois valores acima de 2000 Å³ sugerem maior espaçamento entre as moléculas. Essa característica pode conferir flexibilidade conformacional, permitindo ajustes na interação e facilitando uma adaptação mais eficiente do par antígeno-anticorpo.

(5) ASA Enterrada – A redução da ASA enterrada de 2060 Å² (anticorpo completo) para 1708,9 Å² (VH no complexo) evidencia a contribuição do domínio VL. A diferença de 351,1 Å² sugere que VL amplia a interface de contato, estabilizando a interação com α 4. (6) ASA Enterrada e Afinidade – Interfaces maiores tendem a favorecer interações mais estáveis (Vimer *et al.*, 2021), e, embora essa interface seja menos compacta, a ASA enterrada do VH pode compensar essa característica, o que pode garantir, em menor grau, uma afinidade ao antígeno.

A interação VH/NTZ- α 4 apresentam indícios de estabilidade, porém relativamente espaçada. O equilíbrio entre BSA e volume da interface influencia sua estabilidade, com a maior contribuição do VH destacando o papel crítico da cadeia pesada no reconhecimento do antígeno. Otimizar a compactação da interface pode aumentar a afinidade do NTZ por α 4, aspecto relevante para o desenvolvimento de miméticos terapêuticos.

Figura 21 – Análise de ASA do Domínio VH/NTZ e da Subunidade $\alpha 4$

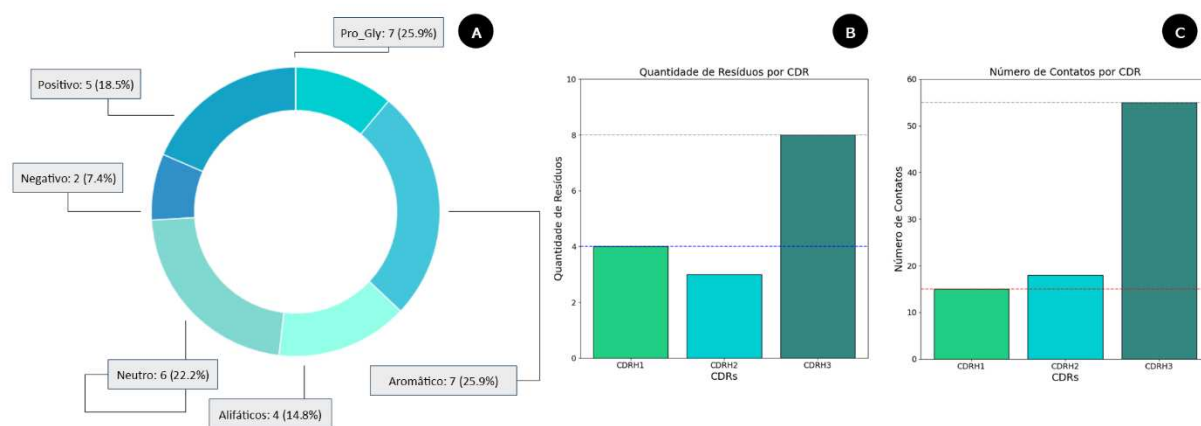


Fonte: Os gráficos apresentados pelo Autor (2024) ilustram, em A, os valores de BSA do VH/NTZ, enquanto, em

B, são exibidos os valores de ASA do VH/NTZ. Já os gráficos C e D mostram, respectivamente, os valores de BSA e ASA do antígeno. As cores utilizadas representam o estado antes e após a formação do complexo: azul para o estado inicial e verde para o estado após o complexo, tanto para o VH/NTZ quanto para a subunidade $\alpha 4$.

A análise química dos resíduos na interface e a quantificação das interações nos CDRs, além do número de contatos por resíduo, foram conduzidas com base nos dados gerados pelo RING e pelo RINmaker. Essas informações, complementadas pelas características específicas da interface Ab-Ag destacadas por Madsen *et al.* (2024), oferecem importantes subsídios para o design racional de anticorpos. Entre os aspectos relevantes estão a predominância de resíduos polares como pode ser visto na figura 22 e o agrupamento estratégico de resíduos nas regiões CDRs e o papel central da CDRH3 na interação com pontos críticos do antígeno. As interações polares agem de forma crucial na especificidade dos anticorpos. Reis *et al.* (2022), demonstraram que uma parcela significativa dos resíduos na interface contribui para a formação dessas ligações, reforçando a importância dessas interações. Os resíduos polares das CDRs apresentam propensões de interface ligeiramente superiores ou equivalentes conforme Wang *et al.* (2018), às das superfícies proteicas expostas ao solvente, destacando sua relevância.

Figura 22 – Distribuição Química e Quantitativo de Contatos das CDRs VH/NTZ



Fonte: Os gráficos elaborados por Autor (2024) não apenas mostram a classificação química A dos resíduos das CDRs H1, H2 e H3 do domínio VH do Natalizumabe, mas também exibem a quantidade de contatos que cada resíduo estabelece com o antígeno B, além de indicar o número de resíduos constituinte de cada CDRs C.

No domínio VH/NTZ (Figura 22A), há uma alta concentração de aminoácidos polares, incluindo um negativo, três positivos e sete neutros. Esses dados corroboram Madsen *et al.* (2024), que relataram cerca de 50% de resíduos polares (Ser, Thr, Arg, Asn, Gln). Os aminoácidos aromáticos são o segundo grupo mais abundante, com seis resíduos, logo após os neutros (sete). A especificidade Ab-Ag é majoritariamente influenciada pelas cadeias laterais aromáticas das CDRs dos anticorpos, conforme Peng *et al.* (2022). Essas cadeias aumentam os contatos com o antígeno, sendo particularmente abundantes nas CDRH do Natalizumabe, com

destaque para o resíduo Tyr, presente na CDRH2 e em maior quantidade na CDRH3 (figura 23). Esses dados ressaltam a importância das propriedades químicas e estruturais na compreensão das interações anticorpo-antígeno (Ab-Ag) e no aprimoramento do design de anticorpos. Interfaces Ab-Ag diferem das interações proteína-proteína por veicularem menor complementaridade geométrica. Enquanto essas interações possuem superfícies bem definidas, as interfaces Ab-Ag são mais adaptáveis e dinâmicas, permitindo o reconhecimento de diversos epítomos, inclusive regiões flexíveis ou desordenadas (Peng *et al.*, 2022).

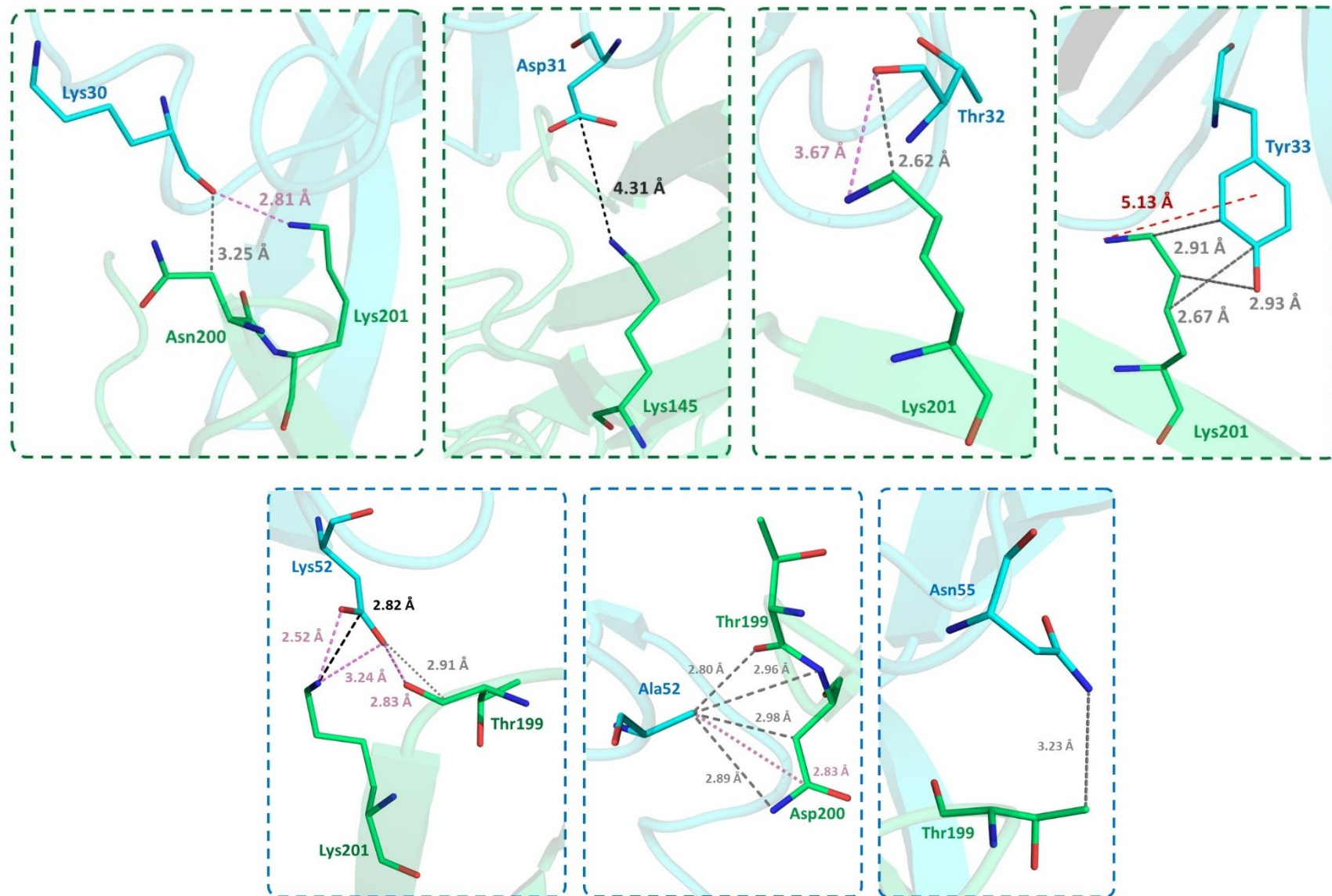
Resíduos aromáticos (Tyr, Phe, Trp) são comuns devido à sua função estabilizadora, enquanto His (polar) é menos frequente. Distribuídos nas CDRs, esses resíduos participam de interações hidrofóbicas e π - π , enquanto resíduos polares preenche funções essenciais na complementaridade (Kringelum *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2014).

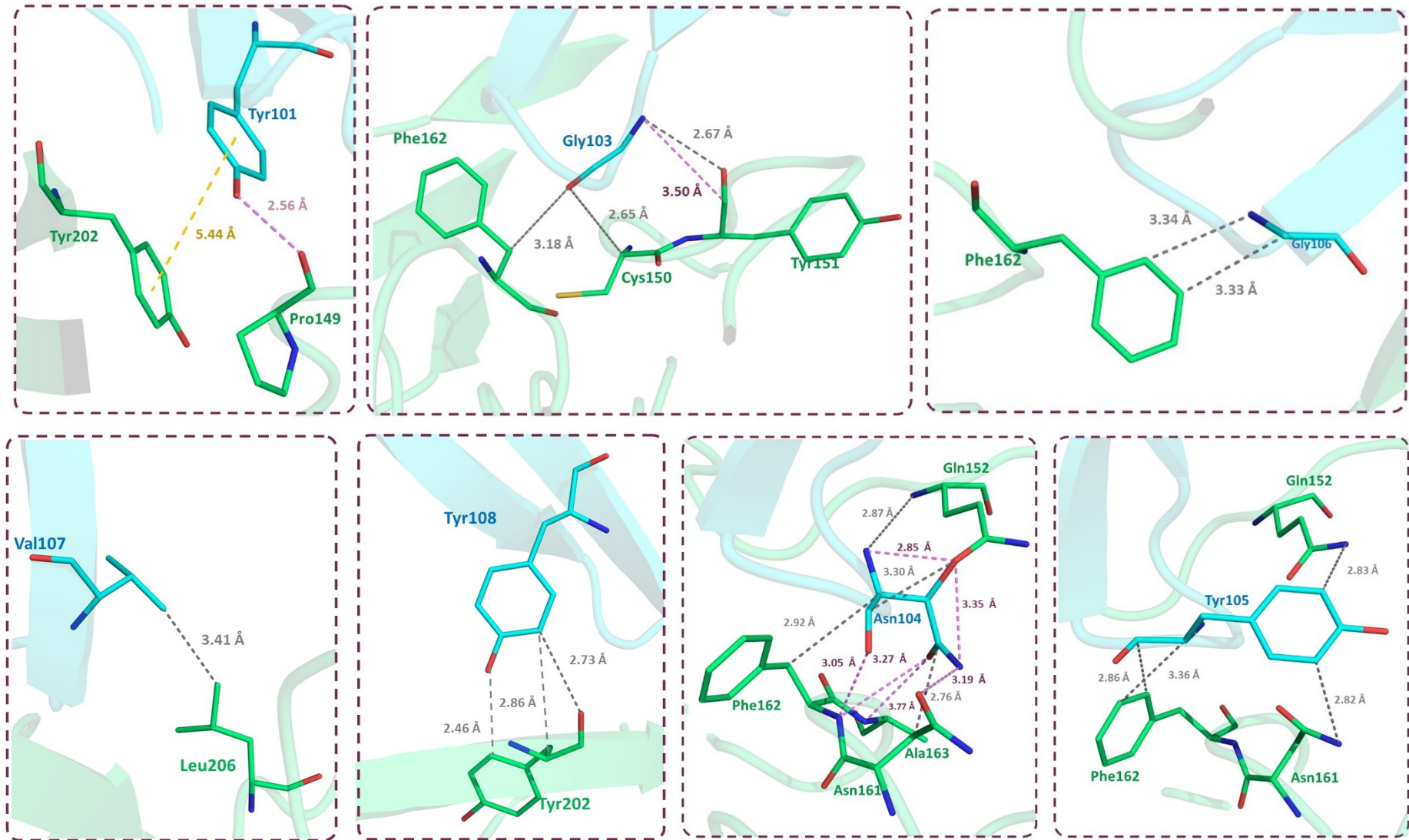
Resíduos menores (Gly, Thr, Asn) são frequentes nos parátomos, interagindo com resíduos apolares e polares para estabilizar a interface e contribuir para a especificidade das interações (Reis *et al.*, 2022). A compatibilidade entre Ag e Ab pode ser quantificada pelo Índice de Complementaridade de Forma (SCI), que avalia o grau de ajuste entre suas superfícies. Um SCI próximo de 0 indica baixa complementaridade, enquanto valores próximos de 1 sugerem interações fortes e específicas, refletindo maior afinidade entre antígeno e anticorpo (Li, Zhang e Cao, 2013; Greenspan, 2023).

Na interação VH/NTZ- α 4, o SCI teórico foi 0,2435 ($\geq 0,5$ aceitável), indicando interação moderada com baixa complementaridade devido ao ajuste subótimo das superfícies moleculares. Essa limitação decorre da exclusão do domínio VL/NTZ, resultando em lacunas e desalinhamentos que comprometem a avaliação global da interface. Essa limitação era esperada devido à estratégia adotada nesta pesquisa, que envolveu: (1) a seleção de VHHs na triagem com base na forma da CDR H3 do VH/NTZ, (2) a consideração exclusiva das CDRs mais relevantes para a interação e (3) a ênfase na CDRH3 do NTZ, por ser crítica para o reconhecimento.

Além disso, os VHHs apresentam limitações inerentes, como: (1) a impossibilidade de acomodar as seis CDRs do NTZ devido ao espaço restrito, (2) maior semelhança com o domínio VH humano do que com VL, como a CDR3 do VH e VHH mais longas e variáveis, além de preferirem epítomos conformacionais e ocultos. Os VH podem, em alguns casos, reconhecer antígenos sem necessidade do VL, característica já presente nos VHHs. Fora que, o VL/NTZ possui apenas cinco SDRs em suas três CDRs que interagem com a subunidade α 4, resultando em menos resíduos envolvidos e menos pontos de contato em comparação ao VH/NTZ.

Figura 23 – Resíduos do VH/NTZ Interagindo com a Subunidade $\alpha 4$ da Integrina $\alpha 4\beta 1$





Fonte: Ilustração elaborada pelo Autor (2024) utilizando o *software PyMOL* das interações entre os resíduos SDRs do domínio VH/NTZ e a subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$. As interações estão representadas em caixas pontilhadas de diferentes cores, correspondendo às regiões CDRH1 (verde), CDRH2 (azul) e CDRH3 (roxo). Além disso, os tipos de interações moleculares são ilustrados com cores específicas: violeta para ligações de hidrogênio (HBOND), cinza para interações de Van der Waals (VDW), amarelo para interações π - π stacking, vermelho para interações π -cátions e preto para pontes salinas.

4.2 Similaridade Estrutural das CDR3 VHH à CDRH3 VH/NTZ

Segundo Yu, Schürpf e Springer (2013), o parátipo do NTZ é majoritariamente determinado pela CDRH3, a qual se insere em uma cavidade do domínio *β -propeller* da integrina, entre as voltas W2 e W3, interagindo com as fitas $\beta 4$ - $\beta 1$. Por sua relevância funcional, essa CDR foi o principal critério para a seleção dos VHH, priorizando VHHs com similaridade conformacional à CDRH3 do domínio VH do NTZ. A triagem foi conduzida em duas etapas.

Na primeira, foram excluídas estruturas com *gaps* nas regiões de CDRs ou FR, por comprometerem os cálculos de RMSD e inferências estruturais, resultando na eliminação de 22,4% (288) dos arquivos. Na segunda etapa, considerando a conservação estrutural conferida pela família VH3 (Bahrami Dizicheh, Chen e Koenig, 2023), os 998 VHH restantes foram individualmente sobrepostos ao domínio VH do NTZ (VH/NTZ) no *PyMOL*, utilizando o comando padrão de sobreposição. Esse método considera átomos do *backbone* e, quando compatíveis, átomos das cadeias laterais (grupos R), permitindo que resíduos com conformações semelhantes também influenciem o cálculo do RMSD.

Os VHH com RMSD inferior a 1,1 Å foram selecionados, sendo o menor valor escolhido para as etapas seguintes. Apesar de sobreposições inferiores a 4 Å serem geralmente aceitas como indicativas de equivalência estrutural como aponta Lupyan *et al.*, (2005), adotou-se aqui um limite mais restritivo (<1,1 Å) devido à necessidade de maior sensibilidade na comparação entre VH/NTZ e VHH. Nenhum nanocorpo apresentou RMSD superior a 2 Å, sendo o maior valor registrado 1,6 Å (PDB ID: 7DSS).

Os valores de RMSD são parâmetros sensíveis para a análise de sobreposição estrutural. No entanto, CDRs longas e curvadas em VHHs podem aumentar os desvios, mesmo quando há alta similaridade nos FRs (Vishwakarma *et al.*, 2022). Neste estudo, VHHs cujas CDR3 apresentavam curvatura distinta da CDRH3 do NTZ exibiram RMSD superiores a 1,1 Å, enquanto aqueles com CDRs estruturalmente semelhantes ao domínio VH do NTZ mostraram valores inferiores a esse limite. A presença predominante de CDR3 longas e curvadas está associada à conformação do tipo *kinked*, favorecida por uma composição específica de aminoácidos (Chothia *et al.*, 1989; Wong, Leem e Deane, 2019). Resíduos aromáticos, por

exemplo, promovem interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio internas e restrições conformacionais oriundas do domínio de ligação (Bahrami Dizicheh, Chen e Koenig, 2023). Frequentemente, essa curvatura está relacionada a interações com o FR2, ampliando a interface de interação com o antígeno.

As CDR3 do tipo *kinked* também expõem maior propensão à formação de elementos estruturais secundários, como hélices; H (hélice alfa), G (hélice 3-10), I (hélice pi) e L (Loop). Conformações que tendem a cobrir eficientemente a interface de interação, de forma análoga à observada em anticorpos convencionais VH/VL (Sircar *et al.*, 2011), favorecendo o reconhecimento de epítomos com características lineares. Dos nanocorpos analisados, 59,3% (763) apresentaram a conformação *kinked*, definida por RMSD superior a 1,1 Å, refletindo maior divergência em relação à CDRH3 do VH/NTZ. Embora CDR3s alongadas e curvadas sejam comuns em VHHs, algumas adotam segundo Bahrami Dizicheh, Chen e Koenig (2023), a conformação *stretch–twist–turn*, caracterizada por uma extensão linear (*stretch*), torções estruturais (*twist*) e mudanças angulares repentinas (*turn*), resultando em uma arquitetura flexível e projetada externamente, com menor interação com o FR2.

Essa conformação exhibe particularidades na composição de aminoácidos, especialmente na base da CDR3. Resíduos como tirosina (Tyr) e ácido aspártico (Asp), frequentemente conservados na conformação *kinked*, podem estar ausentes em variantes alongadas, impactando a estabilidade e o padrão de interação. Além disso, embora mantenham contato com elementos β do domínio VHH, as CDR3s *stretch–twist–turn* não apresentam predominância de folhas β , sendo os loops sua característica estrutural predominante. A baixa ocorrência de hélices α nessa conformação é considerada vantajosa, dado que a CDRH3 cristalizada do VH/NTZ apontam diversidade estrutural, com baixa frequência de hélices, moderada ocorrência de β -turns e predominância de β -strands.

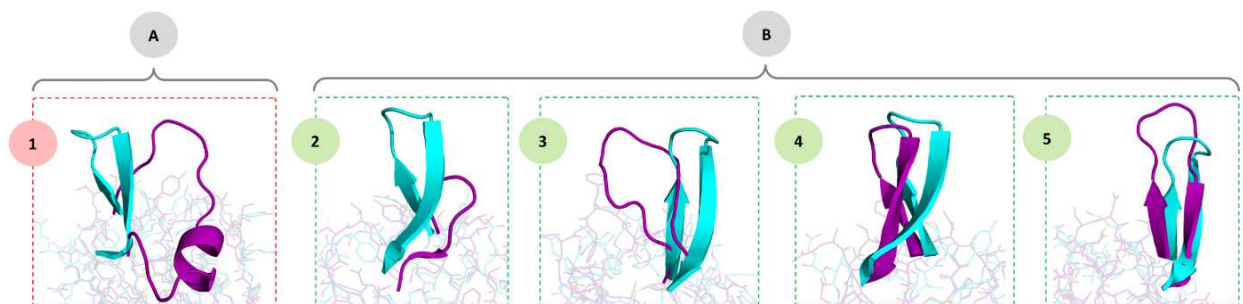
As regiões CDR3 dos VHHs foram classificadas em três subtipos, conforme ilustrado na Figura 24, com base no comprimento da CDRH3 do VH/NTZ: (1) longas (>16 resíduos), (2) medianas (12–16 resíduos) e (3) curtas (<12 resíduos). Tais conformações; longas, curtas e curvas, já foram descritas em nanocorpos anti-GPCR (Schlimgen *et al.*, 2024). As CDR3s medianas denotam comprimento comparável ao da CDRH3 do VH/NTZ (14 resíduos) e exibem conformação estendida, o que favorece maior exposição ao solvente e amplia o alcance ao antígeno (Kuroda; Tsumoto, 2022). No entanto, embora essa extensão proporcione acesso a epítomos ocultos, ela também confere maior flexibilidade, o que pode ser entropicamente desfavorável à ligação (Henry; Mackenzie, 2018). Adicionalmente, conforme discutido por

Mendoza *et al.* (2020), maior mobilidade estrutural pode comprometer a estabilidade da interação antígeno-anticorpo.

No contexto evolutivo, os camelídeos desenvolveram ligações dissulfeto adicionais para estabilizar a flexível região CDR3. Em espécies do gênero *Camelus*, essas ligações conectam a CDR3 à CDR1; em *Lama*, à CDR2 (Govaert *et al.*, 2012). Essa restrição conformacional aumenta a estabilidade estrutural e favorece a interação com o antígeno (Mendoza *et al.*, 2020), ampliando o potencial terapêutico dos nanocorpos, especialmente para alvos inacessíveis a anticorpos convencionais ou nanocorpos com conformação *kinked* (Schlimgen *et al.*, 2024).

No total, 17.4% (235) das estruturas apresentaram RMSD < 1.1 Å (*stretch-twist-turn*) e foram selecionadas. Dentre estas, nanocorpos com CDR3 estendidos medianos (comprimento 12 a 16 resíduos) e maior similaridade estrutural, em termos de tamanho e forma, à CDRH3 do VH/NTZ foram priorizados, resultando na seleção final de 11 (0,9%) estruturas ("3EZJ", "4IDL", "4M3J", "5MWN", "6GJU", "6RTY", "7KGJ", "7KLW", "8BZY", "7N0G", "8CY6"). Identificar VHHs estruturalmente semelhantes ao CDRH3 do VH/NTZ continua sendo uma tarefa árdua, porém essencial, para a proposição de novos miméticos NTZ. Para enfrentar esse desafio, 11 *templates* foram selecionados para as próximas etapas de engenharia de proteínas, com o objetivo de gerar o VHH de interesse. A escolha de levar adiante esses 11 *templates* é fundamental, pois cada um apresenta características únicas distintas de conformação e estabilização da alça, que podem ser sensíveis aos CDRs do NTZ.

Figura 24 – Comparativo das CDRs dos VHH-IN com a CDRH3 do NTZ



Fonte: Ilustração elaborada pelo Autor (2025) na qual destaca as variações estruturais e conformacionais entre os diferentes CDR3s dos VHH-IN e o CDRH3 do NTZ, enfatizando as diferenças estruturais entre eles. Os CDR3s são representados em roxo, enquanto o CDRH3 do NTZ é mostrado em ciano. Na figura A1, observam-se os CDR3s com uma conformação *"kinked"*, uma característica comum nos VHHs. Na figura B, os CDR3s com a conformação *"stretch-twist-turn"* são apresentados, classificados com base no seu comprimento e na similaridade estrutural com o CDRH3 do NTZ. Na B2, são mostrados os CDR3s de comprimento curto. Na B3, os CDR3s de comprimento intermediário são exibidos, mas com uma conformação distinta do CDRH3 do NTZ. Na B4, CDR3s de comprimento intermediário são mostrados, mas com uma conformação semelhante ao CDRH3 do NTZ.

Finalmente, na B5, CDR3s de comprimento longo são representados, exibindo uma conformação semelhante ao CDRH3 do NTZ.

4.3 Modelagem e validação dos Nanocorpos ENXSEQ

Para unificar as sequências das CDRs do domínio VH/NTZ nas posições equivalentes das CDRs dos VHHs e concluir o ENXSEQ nos 11 *templates*, foi realizada a modelagem molecular. Essa etapa consistiu na integração das CDRs VH/NTZ aos VHHs, resultando na geração de uma estrutura 3D individual para cada VHH-NTZ. A modelagem foi conduzida com o uso do *NanoBodyBuilder2*, um algoritmo especializado que, segundo Reddy, Guntuku e Palla (2024), representa o estado da arte no design tridimensional de VHHs. Embora tenha sido treinado especificamente para VHH, o *NanoBodyBuilder2* mostrou desempenho eficaz na predição das FR, alcançando pontuações superiores a 0,8 no QMEANDisCo.

A escolha do QMEANDisCo mostrou-se especialmente adequada, sendo o único entre os quatro avaliadores utilizados neste estudo a fornecer tanto uma pontuação global quanto avaliações por resíduo. Essa capacidade permite identificar com precisão regiões críticas ou instáveis da estrutura. Segundo esse critério, modelos com pontuação acima de 0,8 são considerados bons; entre 0,7 e 0,8, intermediários; e abaixo de 0,7, ruins (ver Figura 25).

A observação de pontuações inferiores a 0,7 nas regiões CDR levanta a hipótese de que essa baixa predição possa estar relacionada à origem não camelídea dessas regiões. Para investigar essa possibilidade, os VHH-IN (iniciais/nativos) cristalizados foram analisados com o QMEANDisCo. Caso as regiões CDR apresentem pontuações semelhantes às obtidas pelos modelos ENXSEQ, entende-se que a limitação na predição não estaria exclusivamente associada à origem camelídea das CDRs, mas sim a um conjunto mais amplo de fatores.

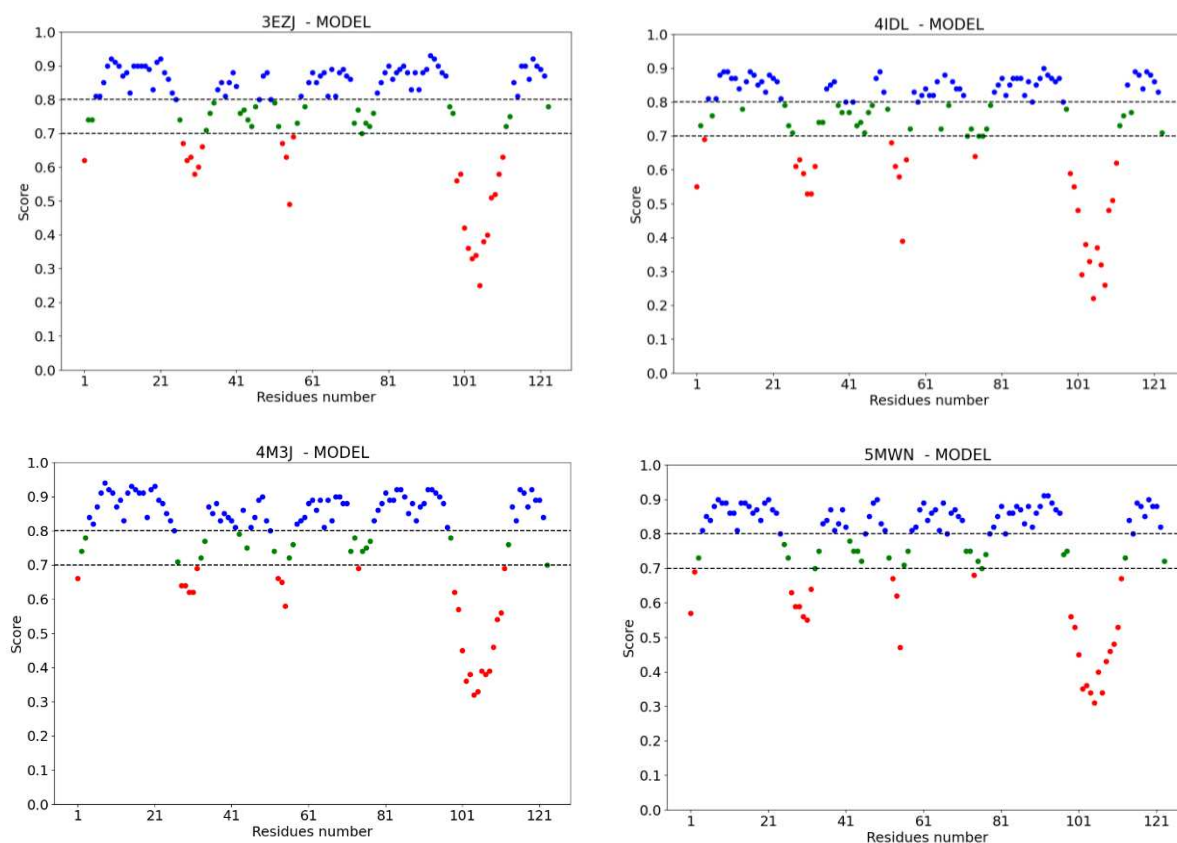
Uma possível explicação é; (1) a limitação do *NanoBodyBuilder2* em predizer com precisão regiões CDR que diferem daquelas observadas em camelídeos, grupo para o qual o *software* foi originalmente treinado. Essa limitação se torna evidente, por exemplo, na modelagem das CDRs VH/NTZ. Fora que, diferenças na composição de aminoácidos entre os domínios VH e VHH, como ressaltado por Mitchell e Colwell (2018) e Kuroda e Tsumoto (2022), impactam diretamente as conformações das CDRs, evidenciando o vínculo intrínseco entre sequência e estrutura, conforme descrito por Morea *et al.* (1998).

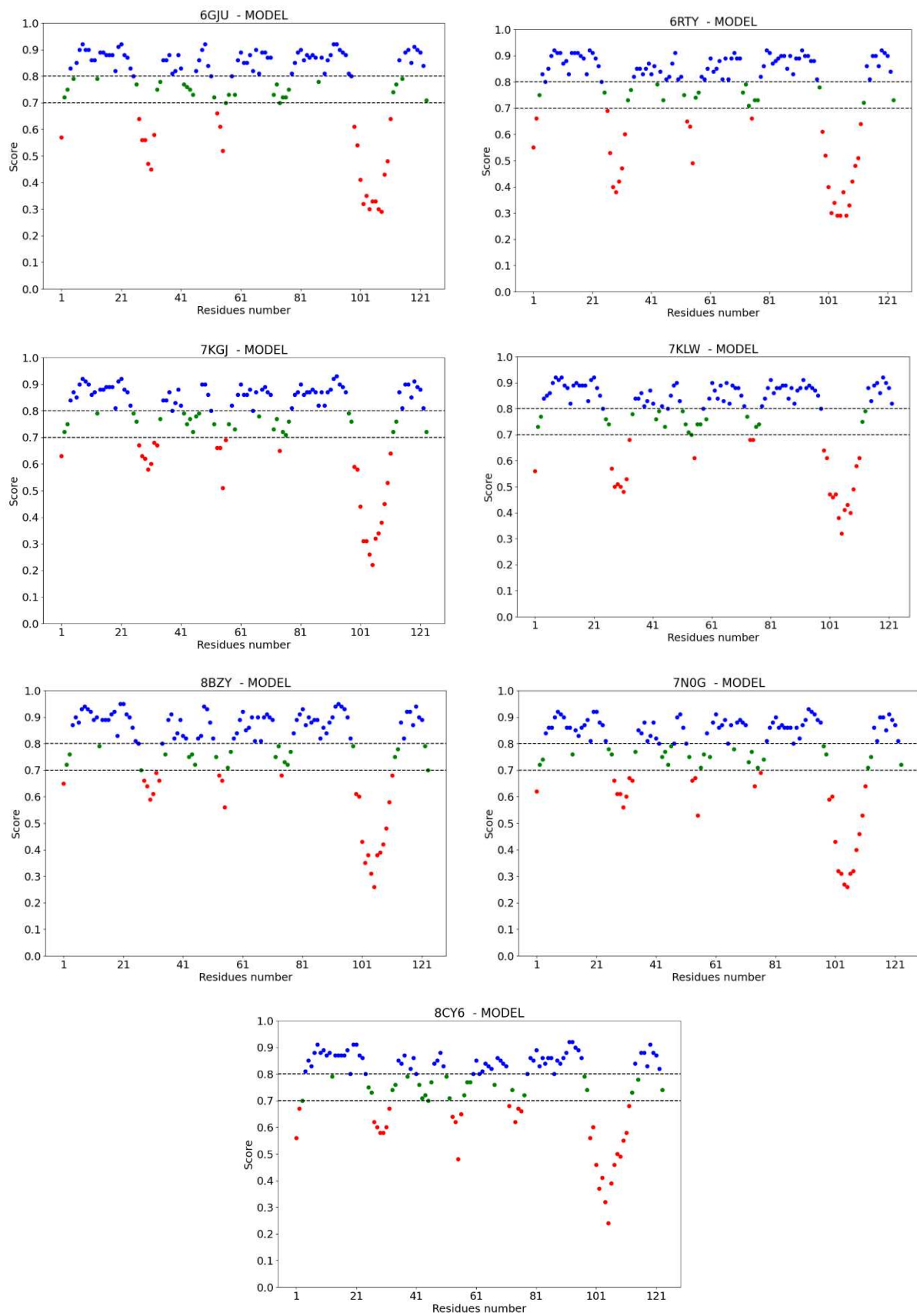
Outro fator a ser considerado é; (2) a alta variabilidade estrutural das CDRs, regiões críticas para a especificidade e afinidade dos anticorpos. Enquanto as regiões H1 e H2 tendem a adotar conformações mais conservadas como revisado por Fernández-Quintero *et al.* (2019),

a região H3 se destaca por sua elevada flexibilidade, tornando particularmente difícil a modelagem de um estado energeticamente favorável.

Além disso, é importante (3), considerar as limitações do próprio QMEANDisCo. Apesar de seu bom desempenho em *benchmarks* como o CAMEO, essa ferramenta ainda enfrenta desafios na avaliação de regiões altamente flexíveis como as CDRs, tanto em modelos preditos quanto em estruturas cristalográficas. Assim, pontuações mais baixas nessas regiões não indicam necessariamente falhas na modelagem ou comprometimento da validade dos resultados gerados pelo *NanoBodyBuilder2*. Essa conclusão é reforçada pela análise de estruturas cristalizadas de VHH avaliadas pelo QMEANDisCo (Apêndice K), que também denotam scores semelhantes aos dos modelos ENXSEQ, salientando a acurácia do *software* na predição de VHH/SEQ. A análise dos modelos gerados pelo *NanoBodyBuilder2* revelou que 21,16% das CDRs foram classificados como regiões de baixa confiabilidade, atribuída à alta flexibilidade estrutural; 18,77% das regiões adjacentes apresentaram confiabilidade média, refletindo um consenso conformacional intermediário; e 60,07% dos FRs demonstraram alta confiabilidade, associada à baixa flexibilidade e ao alto grau de conservação conformacional. Esses dados indicam que quase 80% dos resíduos foram modelados com boa confiabilidade.

Figura 25 – Qualidade do Modelo por Resíduos dos ENXSEQ (QMENDisCO)



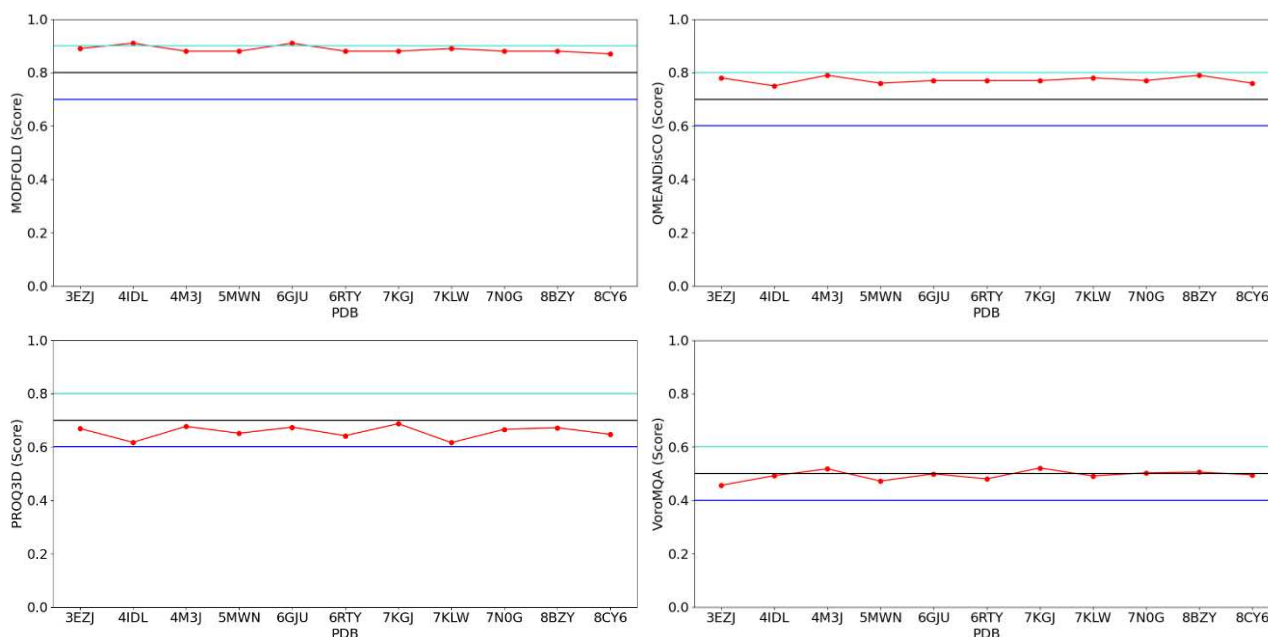


Fonte: Os gráficos apresentados pelo Autor (2024) ilustram as flutuações dos scores atribuídos a cada resíduo de aminoácido que compõe os VHH/SEQ após o processo de modelagem. As regiões destacadas em azul, verde e

vermelho indicam respectivamente, contribuições de alta predição ($>0,8$), predição intermediária ($>0,7$ e $\leq 0,8$) e baixa predição ($\leq 0,7$), refletindo a qualidade de cada resíduo em relação ao modelo. O eixo Y exibe os scores atribuídos pelo QMEANDisCo, variando de 0,0 a 1,0, enquanto o eixo X representa a posição dos aminoácidos.

Como validação adicional, foi realizada uma análise complementar para confirmar a qualidade dos VHH/SEQ modelados. Além dos scores de flutuação por resíduo fornecidos pelo QMEANDisCo, também foram considerados os scores globais de cada modelo, que oferecem uma avaliação da estrutura como um todo, refletindo sua estabilidade, plausibilidade e coerência global do modelo. Os resultados, incluindo as avaliações do QMEANDisCo, PROQ2, VOROMQA e MODFOLD9, são apresentados na Figura 26. Observa-se que os quatro métodos atribuíram classificações semelhantes (bom, intermediário e ruim), caracterizando os modelos como sendo de qualidade intermediária. Essa classificação pode estar relacionada às baixas predições nas regiões CDR, uma vez que até mesmo os modelos cristalográficos (VHH iniciais) situam-se nessa mesma faixa de qualidade.

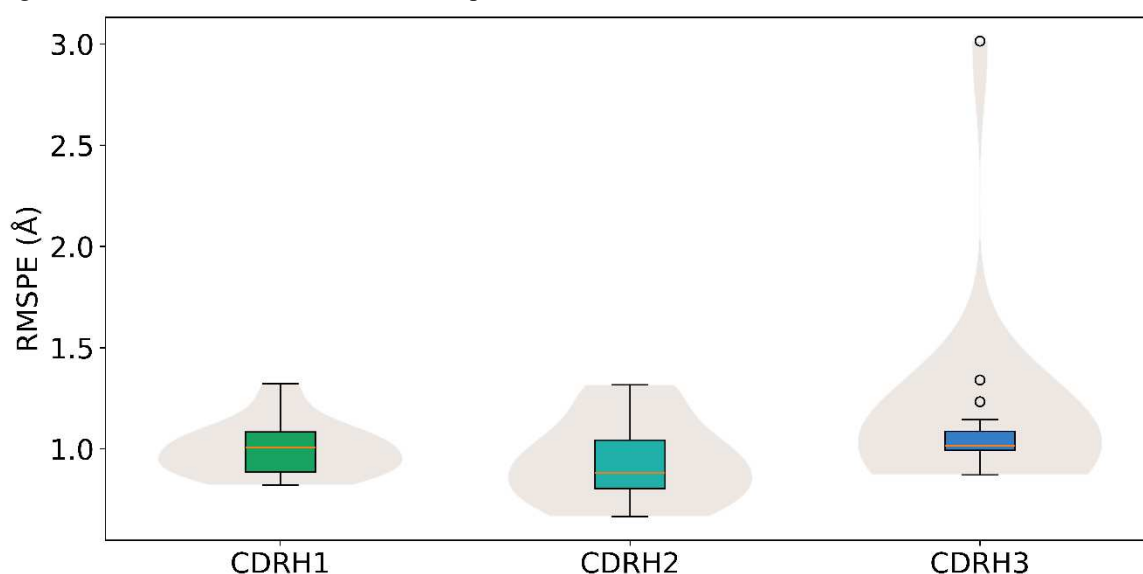
Figura 26 – Qualidade Global dos Modelos Obtidos pelos Software QMENDisCO, PROQ3, VOROMQA e MODFOLD



Fonte: A confiabilidade das predições estruturais geradas pelo *NanobodyBuilder2* é representada por linhas coloridas, que indicam a qualidade do modelo: ciano para bom, preto para mediano e azul para ruim. No canto superior esquerdo, os scores do MODFOLD9 são apresentados, com valores abaixo de 0.7 classificados como ruins, entre 0.8 e 0.9 como medianos, e acima de 0.9 como bons. No canto superior direito, os resultados do QMEANDisCo são exibidos, onde valores inferiores a 0.6 indicam baixa qualidade, entre 0.7 e 0.8 são considerados medianos, e valores iguais ou superiores a 0.8 são avaliados como bons. No canto inferior esquerdo, os scores do PROQ3D destacam valores abaixo de 0.6 como ruins, entre 0.7 e 0.79 como medianos, e superiores ou iguais a 0.8 como bons. Por fim, no canto inferior direito, os scores do VoroMQA classificam modelos com valores abaixo de 0.4 como ruins, entre 0.5 e 0.59 como medianos, e iguais ou superiores a 0.6 como bons.

Outra métrica de validação é a pontuação RMSPE utilizada pelo *Immunebuilder2* que pode ser aproveitada para avaliar a concordância nas posições dos resíduos CDRs, por exemplo como pode ser visto na figura 27. Embora um baixo erro previsto (RMSPE) não garanta necessariamente que a estrutura seja precisa, ele é eficaz para discriminar estruturas cujas regiões apresentam altos valores de RMSPE. Isso evidencia que o RMSPE (Å) possui uma relação com o RMSD (Å), pois ambos refletem a precisão e a confiabilidade das predições. O RMSPE é calculado com base na diversidade entre os quatro modelos gerados internamente pelo *NanobodyBuilder2*, comparando as posições médias dos resíduos equivalentes em cada um dos quatro modelos gerado por *software*. Um alto RMSPE para um resíduo indica uma falta de concordância entre os modelos sobre a posição desse resíduo, sugerindo uma maior incerteza e baixa confiabilidade na previsão para essa região. Por outro lado, regiões com baixo RMSPE segundo Abanades *et al.* (2023), tendem a ser mais consistentes entre os modelos, embora isso não garanta necessariamente uma estrutura precisa (RMSD baixo).

Figura 27 – RMSPE das CDRs dos Nanocorpos ENXSEQ

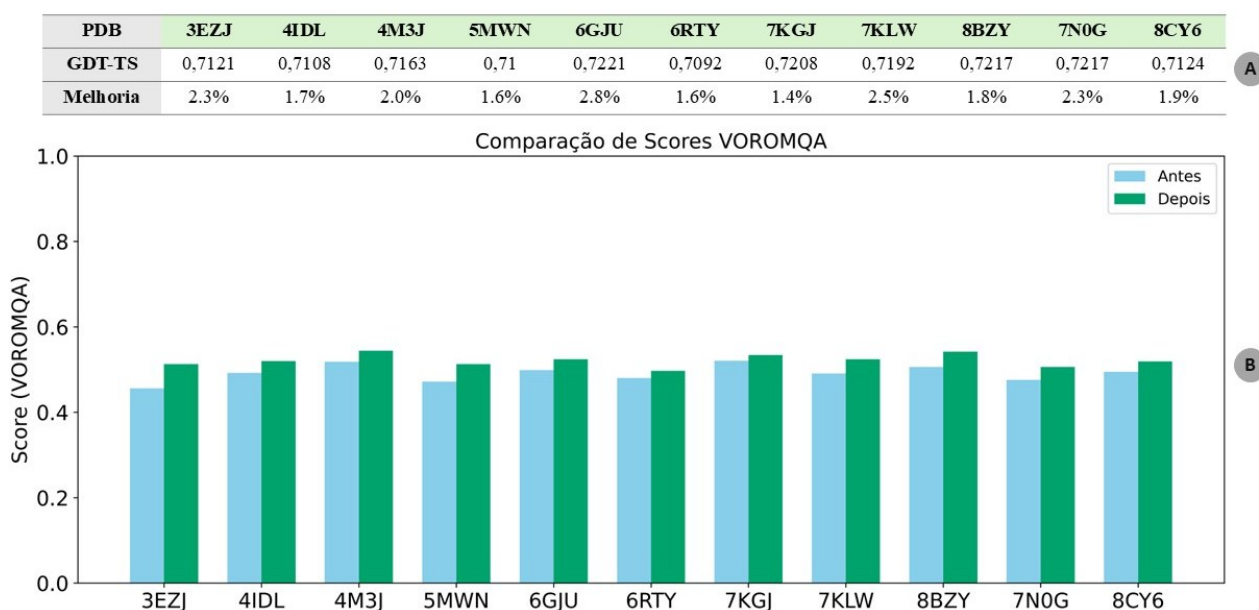


Fonte: O gráfico elaborado pelo Autor (2024) apresenta os valores de RMSPE dos ENXSEQ para as três CDRs, evidenciando que a região H3 possui um valor médio de RMSPE superior às demais. No eixo X, são representadas as três CDRs, enquanto no eixo Y estão os valores de RMSPE atribuídos pelo *NanobodyBuilder2*. Essa métrica reflete a variabilidade entre os modelos gerados, indicando que a CDR H3 apresenta maior incerteza estrutural, o que pode sugerir menor confiabilidade na previsão dessa região.

Nesse contexto, embora seja desafiador alcançar um refinamento completo de uma estrutura modelada, conforme descrito por Shuid; Kempster; McGuffin (2017), mesmo refinamentos mínimos são valiosos. Eles têm como objetivo reduzir erros em regiões mal modeladas, como os resíduos que compõem as CDRs dos ENXSEQ. Esse processo envolve etapas como a correção da geometria das ligações químicas e o ajuste de distâncias e ângulos,

resultando em conformações mais próximas das estruturas nativas. Fora que, o refinamento minimiza conflitos estéricos, o que contribui para a elevação dos scores globais de qualidade estrutural de cada ENXSEQ. Os resultados do REFOLD3 apontam que o refinamento melhora sutilmente (ver figura 28) as regiões dos modelos, com foco nas CDRs, especialmente na CDRH3, devido às baixas pontuações ($<0,7$) na predição. Para avaliar seus efeitos, os modelos ajustados foram reanalisados pelo VoromQA, escolhido por sua rapidez em comparação a ModFOLD9, ProQ3D e QMEAN, que, apesar de bem avaliados no CAMEO, demandam mais tempo computacional para o *output*.

Figura 28 – Score do VOROMQA em Comparativo Antes e Depois do Refinamento



Fonte: Gráfico elaborado por Autor (2024) apresenta, em A, os scores de cada modelo gerado pelo REFOLD3, além da melhoria percentual em relação ao modelo inicial. Já em B, os scores do VOROMQA são exibidos em azul claro (pré-refinamento) e verde jade (pós-refinamento), destacando as diferenças entre os estágios.

Embora o refinamento estrutural tenha promovido aumento no GDT-TS¹⁸ dos modelos VHH/SEQ, os ganhos observados foram modestos (máximo de 3% e média de 1,2%; ver Figura 28), condizentes com o propósito do processo: melhorar a proximidade com a estrutura nativa sem comprometer a topologia geral. Essas pequenas melhorias sugerem ajustes locais, como em alças ou interações específicas. Segundo Adiyaman e McGuffin (2021), modelos com GDT-TS entre 60-80 já são considerados de qualidade boa. Como demonstrado na Figura 28A, todos

¹⁸ Métrica quantitativa “GDT-TS (*Global Distance Test – Total Score*)” utilizada para avaliar a similaridade global entre um modelo computacional de uma proteína e sua estrutura experimental de referência. No contexto do refinamento, o GDT-TS quantifica a qualidade estrutural calculando a média percentual de resíduos cujos átomos Ca podem ser superpostos dentro de quatro limiares de distância (1Å, 2Å, 4Å e 8Å) após um alinhamento estrutural ótimo (A avaliação é realizada após uma superposição rígida ótima entre as estruturas, com o objetivo de maximizar o número de resíduos alinhados dentro de cada limiar).

os VHH/SEQ alcançaram GDT-TS acima de 70, o que indica um refinamento bem-sucedido. Em proteínas de pequeno porte, como os VHHs (~15 kDa), esse patamar de GDT-TS reflete boa similaridade com a conformação nativa.

4.4 Validação e Avaliação dos Enxertos

Uma das abordagens empregadas para validar os três tipos de enxertos consistiu na análise da redução do RMSD, por meio da comparação entre as estruturas nativas e enxertadas. Essa avaliação consentiu estimar a conformação mais provável dos VHHs modificados, bem como quantificar a magnitude das alterações estruturais decorrentes do processo de enxertia. Os valores de RMSD indicaram que os modelos VHH/NTZ foram gerados de forma adequada. Os VHH/SEQ expuseram variações heterogêneas nos valores de RMSD, resultado da modificação conformacional nas CDRs do domínio VH/NTZ após a modelagem (Figura 28). Tais variações podem ocasionar tanto o aumento quanto a redução do RMSD dos VHH/SEQ em relação aos VHH-IN. Uma possível justificativa para esse comportamento pode residir nas limitações do *software Nanobodybuilder2*.

Este *software*, treinado especificamente para a modelagem de estruturas 3D de domínios VHHs, apresenta dificuldades em reconstruir conformações adequadas para CDRs que não derivam de camelídeos. Como consequência, as CDRs geradas pelo *software* não reproduzem fielmente o estado conformacional observado nos domínios VH/NTZ. Essa limitação é corroborada pelos resultados obtidos na modelagem dos VHH-IN, cuja conformação das CDRs foi preservada em relação aos dados cristalográficos, indicando que o *Nanobodybuilder2* é eficaz na reconstrução de CDRs de nanocorpos, mas apresenta desempenho reduzido frente a sequências oriundas de anticorpos não camelídeos. Embora não seja comum modelar uma estrutura cristalográfica, essa abordagem é utilizada apenas em casos especiais, principalmente quando a estrutura apresenta baixa resolução. No entanto, esse não é o caso dos 11 VHHs, que possuem boa resolução e nenhuma região com *gaps*. Assim, a modelagem dos cristais foi realizada exclusivamente para avaliar se o *Nanobodybuilder2* apresenta dificuldades em reconstruir adequadamente as CDRs, modificando suas conformações mais prováveis, ou se sua limitação reside na incapacidade de modelar CDRs de anticorpos que não são camelídeos.

Uma hipótese alternativa é que as regiões CDRs do ENXSEQ tenham adotado a conformação predita pelo *Nanobodybuilder2* por esta representar uma das conformações acessíveis às CDRs do VH/NTZ quando associadas a uma região framework (FR) de camelídeos. Essa possibilidade pode ser explicada pela flexibilidade da CDRH3, que favorece a adoção de múltiplas conformações estruturais. Para investigar essa hipótese, simulações por

dinâmica molecular podem ser empregadas a fim de verificar se, em algum momento da trajetória, as CDRs do ENXSEQ adotam a conformação sugerida pelo *Nanobodybuilder2* (Chen *et al.*, 2024). Caso isso ocorra, é plausível sugerir que as CDRs do VH/NTZ são capazes de explorar diferentes estados conformacionais, indicando que a predição do *Nanobodybuilder2* reflete uma conformação viável, e não uma limitação do método.

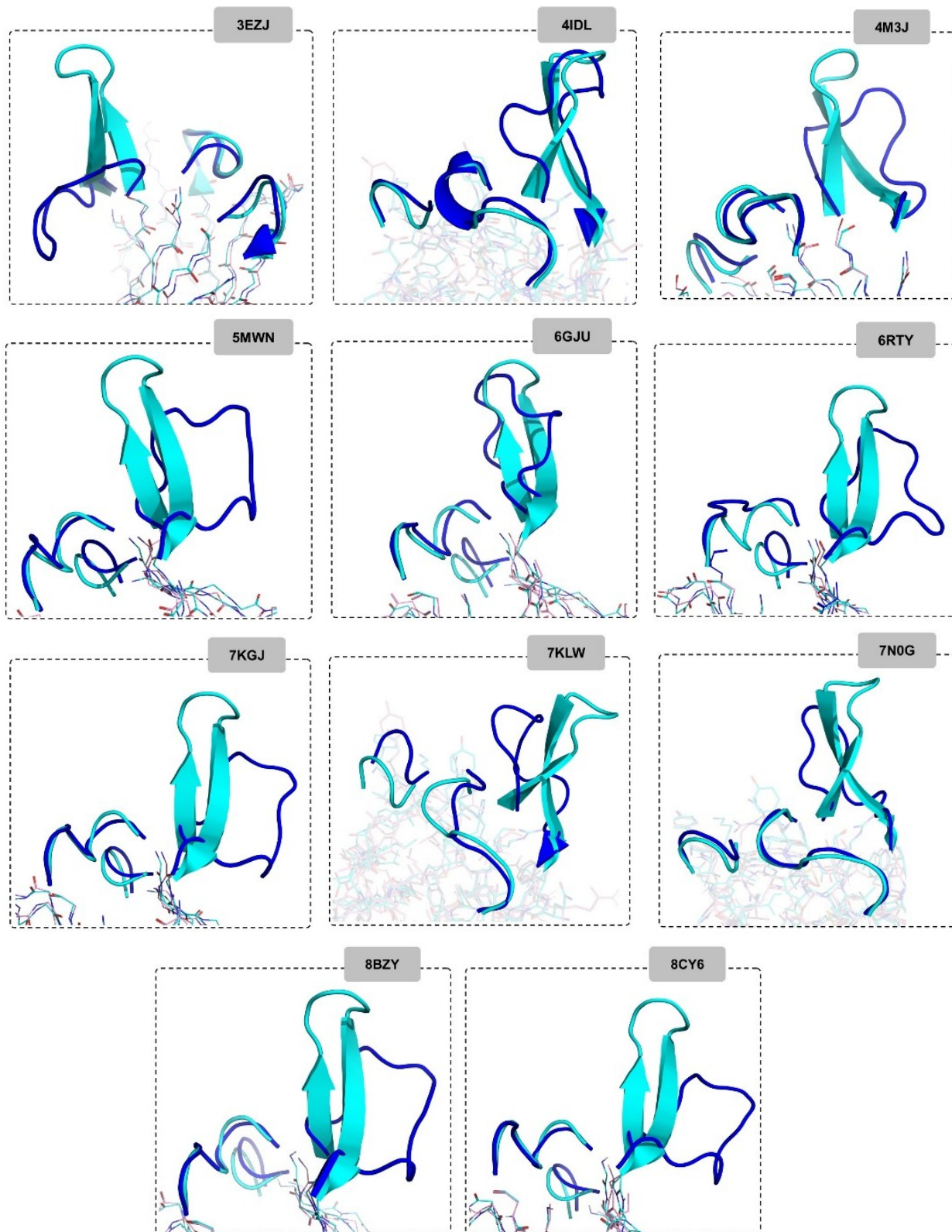
Além disso, é relevante simular dinamicamente tanto o domínio VH isolado do Natalizumabe (VH/NTZ) quanto o domínio VH-VL completo (VH-VL/NTZ), a fim de obter informações detalhadas sobre o comportamento conformacional das regiões CDRs. Essas simulações podem revelar como as CDRs se comportam quando associadas apenas ao domínio VH ou quando em conjunto com o domínio VL, permitindo comparações com a conformação predita pelos modelos gerados via *NanobodyBuilder2*. Caso as CDRs adotem, em qualquer um desses contextos, conformações similares às previstas nos modelos camelídicos (ENXSEQ), isso fortaleceria a hipótese de que a conformação da CDR3 do Natalizumabe pode ser acessível em estados dinâmicos, tanto no VH isolado quanto no complexo VH/VL.

Por outro lado, se essas conformações não forem observadas, pode-se sugerir que as CDRs do NTZ adotam conformações únicas ao interagir com os FR camelídicos, diferentes daquelas observadas em seu contexto germline humano original. Ademais, espera-se que, ao longo da simulação, os modelos ENXSEQ consigam acessar, ao menos transitoriamente, a conformação da CDRs observada na estrutura cristalográfica do VH/NTZ. Caso isso não ocorra, as conformações adotadas pelas CDRs nos modelos camelídicos; especialmente na região da CDR-H3, poderão divergir substancialmente da conformação nativa, o que pode representar um fator limitante na interação com o sítio de ligação no domínio β -propeller.

Conforme demonstrado por Guest *et al.* (2021), a conformação das CDRs é essencial para o reconhecimento do antígeno, e desvios que impeçam o acesso ao estado desejado (CDRs-VH/NTZ) podem comprometer a função dos ENXSEQ. Como discutido na Seção 4.1, o sítio de interação do NTZ no domínio β -propeller possui uma concavidade de 571,66 Å², acessada principalmente pela CDRH3 devido à sua conformação estendida e maior exposição ao solvente (Myung, Pires, Ascher, 2023). No VH/NTZ, essa conformação favorece a complementaridade com o epítipo B da subunidade $\alpha 4$, estabilizando a interação com a integrina $\alpha 4\beta 1$ —um aspecto crítico para a CDR3 dos ENXSEQ. Embora VHHs alcancem regiões mais profundas que VH/VL convencionais (Muyldermans, 2021), sua eficiência depende de uma CDR3 suficientemente estendida. Apenas o 6GJU (Figura 29) exibiu essa conformação, ainda distante da configuração cristalizável "ideal" do VH/NTZ. As CDRs H1 e H2, menores (7 e 6 resíduos), mantiveram conformações semelhantes às do VH/NTZ, enquanto a H3 (14 resíduos) apresentou

maior flexibilidade. A menor dimensão de H1 e H2 limita sua diversidade conformacional, resultando em menor variabilidade comparada à H3.

Figura 29 – Representação Tridimensional das CDRs do ENXSEQ



Fonte: A representação tridimensional dos nanocorpos que receberam os enxertos de sequência foi elaborada por Autor (2024) utilizando o *software* PyMOL. Nessa visualização, o foco é nas CDR3 dos VHH/SEQ são destacadas

em azul escuro, enquanto as CDRH3 do domínio VH/NTZ são representadas na cor ciano, as demais CDR1 e CDR2 dos VHH/NTZ matem conformações após moldagem similar ao do VH/NTZ.

Nos modelos VHH/ENXEST, observa-se uma redução nos valores de RMSD em relação aos VHH-IN. Isso ocorre porque o formato das CDRs no domínio VH/NTZ é idêntico ao dos VHH/EST. A queda no RMSD global após o enxerto indica maior sobreposição estrutural entre os VHH-IN e o domínio de referência (VH/NTZ), como ilustrado na figura 29. Esse resultado reforça a conservação da arquitetura conformacional nos VHHs modificados, demonstrando a eficácia do protocolo de enxerto. Essa preservação estrutural é relevante, pois, entre as múltiplas conformações acessíveis ao domínio VH/NTZ, os modelos ENXEST mostram capacidade (ainda que induzida) de adotar preferencialmente a conformação mais estável observada no cristal do complexo NTZ/ α 4. Isso evidencia a habilidade dos VHH/NTZ em reproduzir particularidades estruturais cruciais do domínio funcional. Tal efeito é marcante nos ENXEST, onde as CDRs foram incorporadas aos FRs em um estado conformacional fixo, reforçando a viabilidade de manter a arquitetura necessária à funcionalidade.

Embora o RMSD seja útil como métrica inicial, por sua rapidez e baixo custo, possui limitações importantes, pois considera apenas distâncias entre átomos em estruturas estáticas, ignorando a flexibilidade inerente às macromoléculas. Como a funcionalidade das CDRs depende de sua dinâmica, é fundamental adotar abordagens que avaliem o comportamento conformacional ao longo do tempo. Para isso, análises mais avançadas, como a Análise de Componentes Principais (PCA), são recomendadas (Kitao, 2022). O PCA é um método estatístico de redução de dimensionalidade que diagonaliza a matriz de covariância dos dados, identificando um conjunto de vetores ortogonais (componentes principais) ordenados pela variância explicada. Esses componentes capturam as direções de maior flutuação conformacional no espaço de configurações atômicas. Em MD, o PCA é aplicado a trajetórias de simulação para extrair modos coletivos de movimento dominantes, os quais frequentemente correspondem a transições conformacionais biologicamente relevantes.

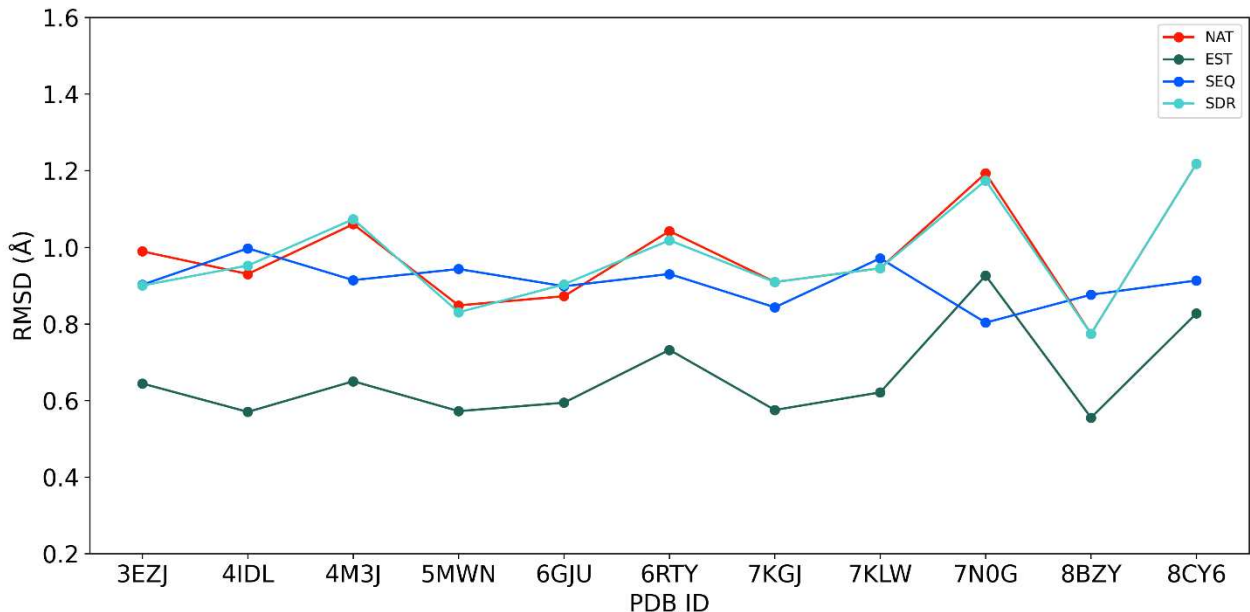
Quando aplicado às CDRs (ex.: ENXEST), o PCA permite; (1) *Identificar eixos de flexibilidade*: a projeção das flutuações atômicas nos primeiros componentes principais revela as direções de maior mobilidade ou estabilidade, auxiliando na caracterização da dinâmica estrutural associada ao reconhecimento antigênico. (2) *Validar conformações biologicamente relevantes*: a ocupação preferencial de estados próximos àqueles observados em estruturas cristalográficas (ex.: NTZ/ α 4) sugere que os modelos enxertados reproduzem dinamicamente conformações funcionais. Em particular, a CDR3 demonstra uma tendência a adotar arranjos compatíveis com a interação antigênica em condições fisiológicas simuladas e (3) *Mapear*

estados conformacionais termodinamicamente favorecidos: a densidade de pontos no espaço do PCA reflete a população relativa de diferentes conformações, fornecendo *insights* sobre estabilidade e comportamento (Palma; Pierdominici-Sottile, 2023).

Embora demande mais recursos computacionais que o RMSD, o PCA oferece uma visão mais abrangente da flexibilidade conformacional e da viabilidade funcional dos VHHs. A capacidade das CDRs enxertadas de acessar conformações semelhantes às do complexo cristalográfico constitui forte evidência de que os modelos ENXEST são aptos a reproduzir, em condições fisiológicas, interações específicas com o epítipo da subunidade $\alpha 4$.

Esse comportamento é crucial para o design de VHHs antagonistas da integrina $\alpha 4\beta 1$. Ao adotarem conformações adequadas para interagir com o epítipo B, podem tornar-se miméticos propício. Como mostra a figura 30, os ENXEST exibiram RMSD consistentemente menor que os VHH-IN, pois as CDRs foram enxertadas em seu estado conformacional original. O 4M3J, no entanto, apresentou a maior redução no RMSD (−0,410), provavelmente devido aos seus resíduos de FR adotarem conformações mais próximas às do VH/NTZ em comparação aos demais.

Figura 30 – RMSD dos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR Antes e Após o Enxerto



Fonte: O gráfico apresentado por Autor (2024) utiliza as cores verde escuro, azul e ciano para destacar as variações nos valores de RMSD dos grupos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR, respectivamente, após os enxertos. Essas variações são comparadas aos valores da estrutura nativa, representados pela cor vermelha, que correspondem aos valores anteriores aos enxertos.

Os modelos do grupo ENXSDR apresentaram baixa variação nos valores de RMSD, similares aos observados nos VHH-IN, indicando estabilidade estrutural conferida por

modificações pontuais restritas às regiões CDRs. No entanto, a inserção de resíduos SDR nas CDRs dos VHH pode não reproduzir com fidelidade a conformação cristalográfica, em razão de possíveis impedimentos estéricos, conforme identificado no *PyMOL*.

Ainda que características estruturais desejáveis tenham sido preservadas, observa-se uma limitação relevante: a dificuldade em manter todos os resíduos das CDRs do VH/NTZ, o que pode comprometer a especificidade pelo sítio de ligação localizado no domínio β -*propeller*. Embora os SDRs sejam determinantes na interação com a subunidade $\alpha 4$, resíduos adjacentes também desempenham papel fundamental na estabilização do complexo VH/NTZ- $\alpha 4$ (Gordon *et al.*, 2024), e sua ausência pode prejudicar a eficácia funcional dos modelos do tipo ENXSDR.

Por outro lado, destaca-se a conservação da conformação da CDR3, que se mantém semelhante à região H3 do NTZ. Tal conformação permite o acesso a resíduos profundos no sítio de interação e conserva resíduos-chave envolvidos na ligação direta com a subunidade $\alpha 4$. Assim como proposto para os modelos ENXSEQ e ENXEST, recomenda-se a aplicação de simulações de dinâmica molecular com o objetivo de verificar se as CDRs do ENXSDR adotam conformações dinâmicas compatíveis com aquelas observadas em nanocorpos cristalizados, bem como identificar estados energeticamente favoráveis (El Salamouni *et al.*, 2024).

As variações de RMSD entre os modelos do grupo ENXSDR foram discretas, com incrementos pontuais observados em 4IDL (+0,022), 4M3J (+0,013) e 6GJU (+0,031), atribuídos a incompatibilidades conformacionais entre os resíduos SDR do VH/NTZ e os VHHs, resultando em impedimentos estéricos. Nesses casos, o *PyMOL* sugeriu conformações alternativas mais adequadas, evidenciando as limitações na integração dos SDRs e os impactos estruturais nas CDRs.

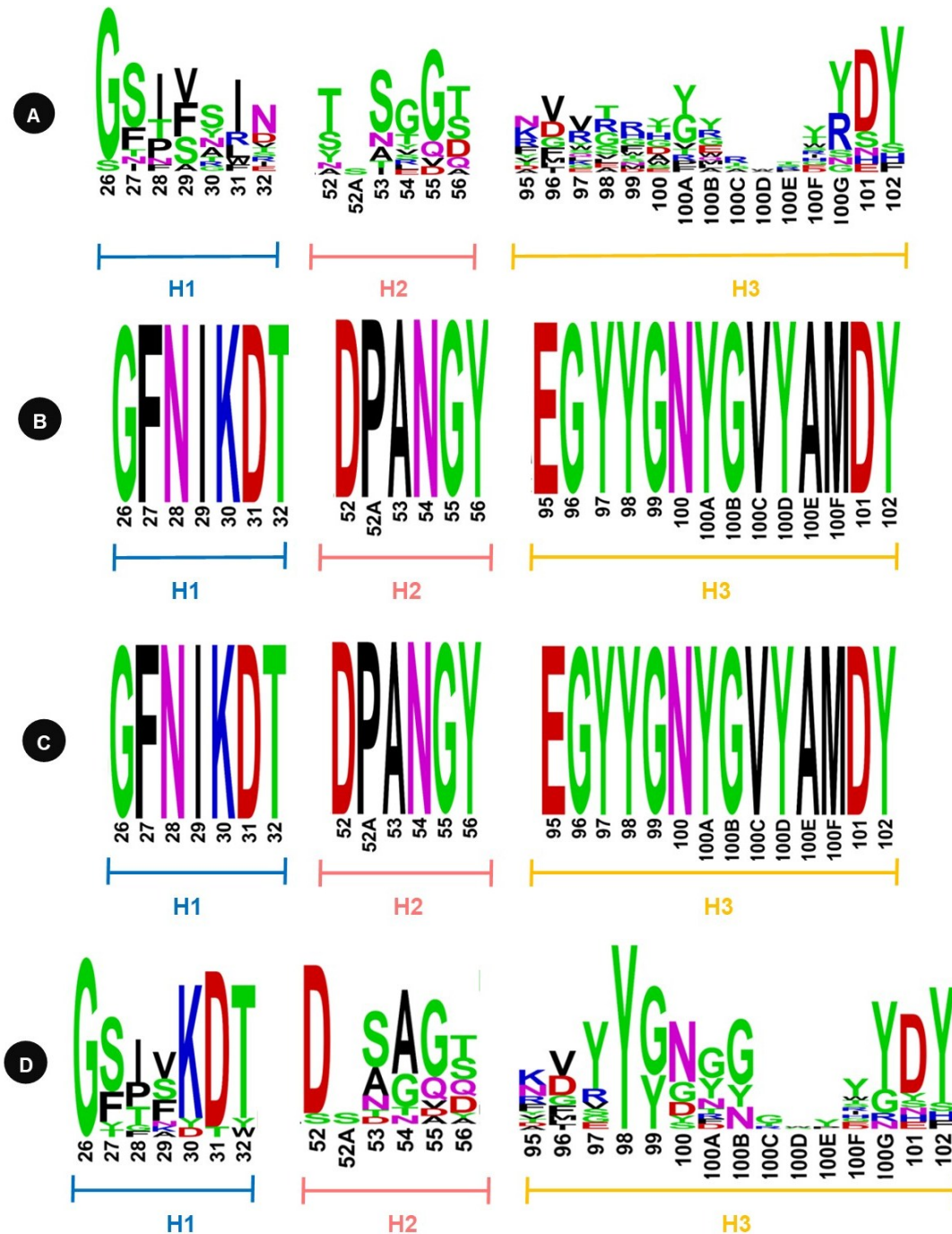
Para validar a integridade das CDRs enxertadas, foi realizada análise via AbAlin, a qual confirmou o alinhamento preciso dos resíduos ao domínio VH/NTZ. Variadamente do RMSD, que avalia desvios estruturais, esse alinhamento destaca a conservação da identidade de resíduos, atestando que os VHHs modificados mantiveram suas posições correspondentes (Figura 31), com identidade entre as CDRs do VH/NTZ e os modelos enxertados.

A sobreposição dos VHH-IN revelou alta heterogeneidade nas CDRs, conforme descrito por Kuroda e Tsumoto (2022), refletindo sua adaptabilidade ao reconhecimento antigênico. Embora alguns resíduos se repitam, suas posições variáveis resultam em baixo consenso e menor identidade de sequência com o VH/NTZ, evidenciando sua diversificação evolutiva.

As Figuras 31B e 31C mostram que os modelos ENXSEQ e ENXEST receberam enxertos nas mesmas posições das CDRs do VH/NTZ, com 100% de identidade. Já a Figura 31D aponta divergências nos modelos ENXSDR, apesar da presença de todos os SDRs.

Algumas posições coincidiram integralmente, enquanto outras, classificadas como desfavoráveis pelo PyMOL, foram reposicionadas em regiões adjacentes. Diferenças no comprimento das CDRs, conforme discutido por El Salamouni *et al.* (2024), dificultaram a alocação direta dos SDRs/NTZ, exigindo o deslocamento de cerca de uma posição para acomodação estrutural. Apesar do ajuste, manteve-se a proximidade conformacional com o NTZ original, preservando a funcionalidade dos SDRs.

Figura 31 – Avaliação das Posições dos Resíduos Entre os NATIVOS, ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR



Fonte: Alinhamento das regiões CDRs elaborado pelo Autor (2024) com a utilização do esquema de numeração de Martin. Em A, são apresentados os resíduos CDRs de todos os nanocorpos nativos. Em B e C, são exibidos os

resíduos CDRs para o ENXSEQ e ENXEST, respectivamente. Por fim, em D, é possível visualizar os resíduos CDRs do ENXSDR.

4.5 Avaliação das Propriedades dos Nanocorpos

A caracterização das propriedades dos nanocorpos é fundamental para avaliar o impacto dos três tipos de enxertos em suas características estruturais e funcionais. Para isso, essa análise foi conduzida tanto nos VHH-IN quanto nos VHH/NTZ. Embora os enxertos ENXSEQ e ENXEST compartilhem os mesmos resíduos, sua avaliação individual é necessária. A suposição de que os resultados de um enxerto podem ser extrapolados para outro é inadequada, pois a modelagem molecular, conforme revisado por Tvaroška, Kozmon e Kóna (2023), pode gerar geometrias irreais, alterar conformações secundárias críticas, causar colisões atômicas, criar regiões de alta incerteza ou deslocar cadeias laterais. Esses fatores podem comprometer as propriedades preditas dos nanocorpos, especialmente quando o *software* exige uma estrutura 3D como ponto de partida.

Além disso, o impacto do enxerto de CDR já foi documentado em um VHH humanizado de interesse terapêutico, que apresentou variações na afinidade por antígenos e na estabilidade térmica (Kinoshita *et al.*, 2022). Assim, a triagem de mudanças nas propriedades biofísicas e físico-químicas deve ser realizada nas fases iniciais do desenvolvimento de VHH miméticos. Notavelmente, estudos recentes, como os de Poustforoosh *et al.* (2023), Ferraz *et al.* (2024), e Mirzaei *et al.* (2024) que construíram VHH miméticos *in silico*, não consideraram o impacto das CDRs dos mAbs modelo nas propriedades intrínsecas dos VHH receptores. Portanto, essa análise é imprescindível para preservar as vantagens dos nanocorpo, enquanto visa manter, nesse caso, a especificidade dos VHH/NTZ com a integrina $\alpha 4\beta 1$, garantindo uma interação semelhante com mencionam Zhang; Wu; Dang (2024) à do anticorpo monoclonal modelo, ou seja, posicionando-se os VHH/NTZ no epítipo B da subunidade $\alpha 4$.

4.5.1 Avaliação da Natividade

A natividade dos nanocorpos refere-se à conformidade de sua estrutura com o estado natural (Ramon *et al.*, 2024). Embora não sejam produzidos isoladamente pelo sistema imunológico dos camélídeos, sua avaliação baseia-se nos anticorpos de domínio único característicos desses organismos. A estrutura nativa é inferida a partir de fragmentos de reconhecimento ao antígeno, permitindo identificar desvios do estado natural. Essa análise é essencial para garantir funcionalidade, estabilidade e prever propriedades farmacológicas, como maior meia-vida e menor reatividade com autoantígenos, apesar das limitações dos métodos computacionais disponíveis (Wolf Pérez *et al.*, 2022; Svilenov *et al.*, 2023; Reddy *et*

al., 2024). VHHs engenheirados com alta natividade geralmente exibem maior estabilidade estrutural e eficiência na produção (Ramon *et al.*, 2024). Além disso, denotam atributos *in vivo* semelhantes aos HCABs, como alta solubilidade, resistência à degradação e penetração eficiente em tecidos. Contudo, regiões com baixa natividade podem comprometer essas qualidades.

Este estudo comparou três tipos de enxertos – ENXEST, ENXSDR e ENXSEQ – a 11 VHH-IN (iniciais/nativos), avaliando alterações estruturais que afetam a natividade. Conforme ilustrado na figura 31, valores próximos de 1.0 indicam alta conformidade estrutural, associada a maior estabilidade, meia-vida prolongada e menor interação com autoantígenos (Ramon *et al.*, 2024). No entanto, a introdução de CDRs VH/NTZ pode reduzir a natividade de VHHs, comprometendo suas vantagens. VHHs com maior natividade seguem como uma escolha promissora para aplicações terapêuticas e biotecnológicas devido à sua superioridade funcional e farmacológica.

O ENXEST apresentou aumentos pontuais na natividade em relação aos VHH-IN. Isso foi observado em 7KLW, cujo score nativo aumentou de 0.796 para 0.801. Entretanto, em outros casos, como o 6RTY (score nativo 0.806; score ENXEST 0.766), o 3EZJ (0.894 para 0.792) e o 5MWN (0.890 para 0.794), ocorreram reduções significativas no score de natividade. Esses resultados indicam que o enxerto ENXEST não consegue a depender do Framework preservar a conformidade natural de maneira consistente.

Por outro lado, o ENXSDR demonstrou maior eficácia em conservar ou até melhorar a natividade dos nanocorpos em comparação aos VHH-IN. Por exemplo, o 7KLW apresentou um aumento no score, de 0.796 no VHH-IN para 0.839 com o ENXSDR. No caso do 6GJU, houve uma leve redução, de 0.889 no VHH-IN para 0.867 com o ENXSDR, representando uma diminuição de apenas 0.022. Alterações menos expressivas também foram registradas em outros nanocorpos, como no 3EZJ, que reduziu de 0.894 para 0.853, e no 7KGJ, que aumentou de 0.780 para 0.831. Esses resultados indicam que, embora o ENXSDR ainda registre algumas reduções, as variações são menos intensas em comparação ao ENXEST.

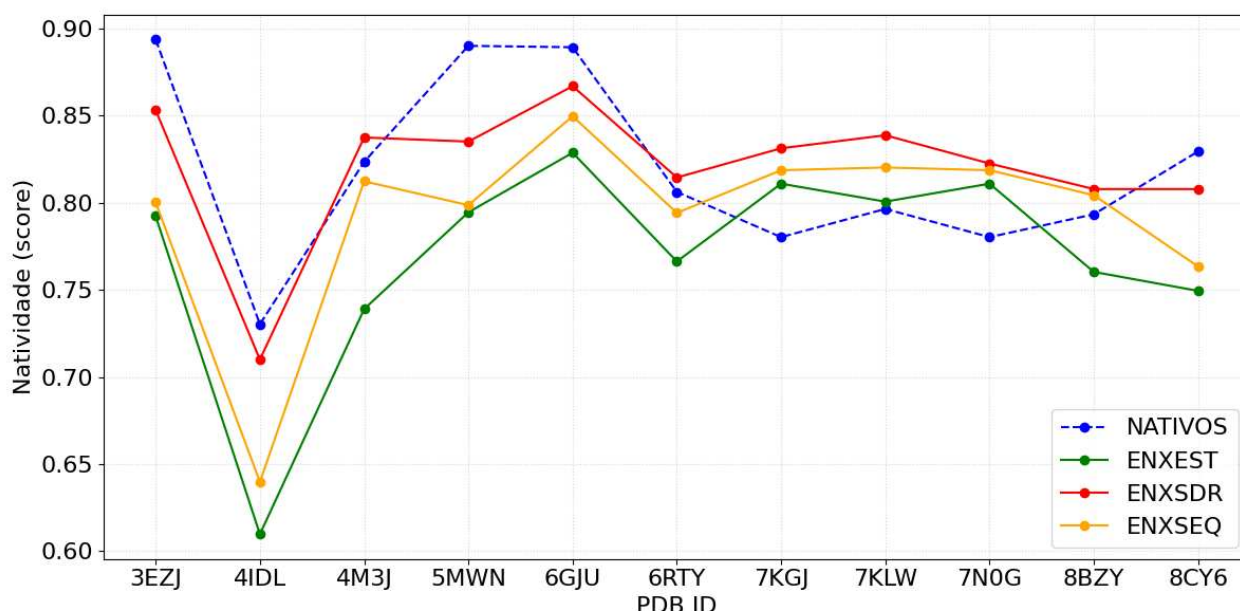
Em compensação, o ENXSEQ apresentou desempenho intermediário e inconsistências. Alguns nanocorpos, como 6GJU (0.889 → 0.850) e 8CY6 (0.829 → 0.763), mantiveram a natividade do fragmento nativo, enquanto outros, como 3EZJ (0.894 → 0.800) e 4IDL (0.730 → 0.640), sofreram reduções, indicando menor eficiência em comparação ao ENXSDR. Casos atípicos, como VHH-IN 7N0G, mostraram aumento do score em todas as tentativas de enxerto (nativo: 0.780; ENXEST: 0.810; ENXSEQ: 0.818), com o maior ganho no ENXSDR (0.822).

Análises complementares revelaram que as regiões estruturais conservadas (FRs) apresentam maior natividade (35%), enquanto as CDRs, responsáveis pelo reconhecimento de

antígenos, possuem escores mais baixos: CDR1 (22,2%), CDR2 (27,1%) e CDR3 (15,6%) (Valdés-Tresanco *et al.*, 2022). Essa discrepância reforça a necessidade de otimizar as CDRs para aprimorar as propriedades biofísicas e físico-químicas dos nanocorpos.

Os resultados indicam que o tipo de FR influencia a natividade dos enxertos, mesmo em abordagens semelhantes, como enxertos de sequência e estrutura. O ENXSDR superou a natividade dos VHH-IN em alguns casos, destacando sua relevância. Assim, o ENXSDR se mostra a melhor estratégia para preservar ou melhorar a natividade, minimizando perdas estruturais e otimizando propriedades terapêuticas. Já o desempenho inconsistente do ENXEST e do ENXSEQ ressalta a importância de uma seleção criteriosa do tipo de enxerto para garantir estabilidade estrutural e funcional.

Figura 32 – Natividade dos VHH-IN e dos VHH/NTZ



Fonte: Gráfico elaborado pelo Autor (2024), comparando a natividade global dos VHH iniciais (em azul) com os VHH/NTZ, representados em verde, vermelho e amarelo para os enxertos dos tipos ENXEST, EXNSDR e ENXSEQ, respectivamente. No eixo y, são apresentados os scores de natividade de todos os VHHs, enquanto o eixo x exibe seus respectivos IDs. Valores próximos de 1,00 indicam maior natividade do VHH/NTZ em relação ao VHH inicial (VHH-IN), enquanto valores próximos de 0,00 indicam menor natividade.

4.5.2 Avaliação da Estrutura Secundária

Já é consenso que as proteínas encenam funções distintas devido às variações em suas estruturas, especialmente nas regiões que compõem suas estruturas terciárias. Essas, por sua vez, são influenciadas pelas estruturas secundárias, cuja estabilidade é condicionada por todos os níveis estruturais das proteínas e anticorpos. A estrutura primária pode indicar a propensão à agregação, sobretudo em regiões ricas em resíduos hidrofóbicos ou carregados.

Especificamente, um ponto isoelétrico (pI) baixo nas CDRs pode favorecer interações eletrostáticas entre moléculas, contribuindo para a formação de agregados, ainda que potencialmente solúveis. Em contrapartida, um pI elevado tende a intensificar interações com superfícies de carga negativa, promovendo a formação de agregados insolúveis (Fukuda *et al.*, 2015). Pequenas variações na sequência e estrutura de mAbs também podem impactar sua estabilidade, especialmente sob condições de estresse.

Na predição da estrutura secundária de proteínas (PSSP) de três estados, os elementos estruturais básicos são: α -helix (H), β -strand (E) e loops (L). As hélices e folhas betas são conformações fundamentais propostas por Pauling, Corey e Branson (1951) para a estruturação proteica. Essa classificação de três estados representa uma abordagem mais ampla, enquanto os PSSP de oito estados oferecem uma descrição mais detalhada dos elementos estruturais, incluindo conformações como H (*Alpha helix*), G (*3-10 helix*), I (*Pi helix*), E (*Extended beta strand*), B (*Beta bridge*), T (*Turn*), L (*Loop*), e S (*Bend*) (Xie; Schowen, 1999).

Compreender essas características estruturais auxilia na predição do enovelamento e comportamento das proteínas, algo essencial para regiões como as CDRs, que dependem criticamente da organização secundária para interagir de forma precisa com os epítomos. A avaliação das estruturas secundárias dos VHH/NTZ é essencial para verificar se a transferência de resíduos nas CDRs resultou em alterações nas regiões FR ou divergências estruturais nas próprias CDRs. Modificações em qualquer região dos anticorpos podem impactar sua estabilidade em diferentes graus (Le Basle *et al.*, 2020).

Os dados indicam que as estruturas secundárias das CDRs dos VHH permaneceram inalteradas em relação ao VH/NTZ. As CDRs H1, H2 e H3 do NTZ apresentam maior propensão a adotar estados secundários do tipo coil/loop ('L' no DSSP) e turn (T), especialmente H1 (26-32) e H2 (52-56). Já H3 (99-112), por ser mais longa, exibe maior diversidade estrutural, com menor probabilidade para coil, intermediária para turn e predominância do tipo beta sheet (E) (Chothia *et al.*, 1989).

A análise da Tabela 3, que compara os modelos iniciais com os enxertados, revela que as probabilidades de formação de estruturas do tipo coil, turn e beta sheet nas CDRs permanecem consistentes entre as diferentes variantes enxertadas. No entanto, no domínio H2 da estratégia ENXSDR, observou-se uma variação estrutural em relação ao H2 dos VHH-IN, ENXEST e ENXSEQ, com a adoção de conformações loop, beta sheet e turn. Por outro lado, a maioria dos VHH-IN apresenta o H2 predominantemente do tipo turn, o que é característico do H2/NTZ. Esses resultados indicam que a estrutura secundária do VHH/NTZ foi preservada tanto nas regiões FR quanto nas CDRs após os enxertos, com exceção da alteração observada

no H2/ENXSDR — uma modificação que pode ser crítica para determinados VHHs no que se refere à especificidade antigênica nessa estratégia.

Tabela 3 – Conservação da Estrutura Secundária das CDRs VH/NTZ Após as Estratégias de Enxertos

Probabilidade de estrutura secundária para as regiões dos VHH																
PDB	NATIVOS				ENXSDR				ENXSEQ				ENXEST			
	H1	H2	H3	FR	H1	H2	H3	FR	H1	H2	H3	FR	H1	H2	H3	FR
3EZJ	L	E	E	E	L	L	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
4IDL	L	E	E	E	L	E	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
4M3J	L	E	E	E	L	L	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
5MWN	L	E	E	E	L	E	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
6GJU	L	E	E	E	L	L	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
6RTY	E	E	E	E	L	E	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
7KGJ	L	E	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
7KLW	L	E	E	E	L	L	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
7N0G	L	E	E	E	L	L	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
8BZY	L	E	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E
8CY6	L	E	E	E	L	E	E	E	L	T	E	E	L	T	E	E

Fonte: Tabela elaborada pelo Autor (2025), retrata a probabilidade de estrutura secundária em todas as regiões (H1, H2, H3 e FR) das estruturas receptoras de enxerto. Cada região exibe, em sequência, a probabilidade de estrutura secundária dos VHH-IN (nativos/iniciais), seguida pelas probabilidades correspondentes dos enxertos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR.

4.5.3 Avaliação das IDRs

IDRs, segundo Van Der Lee *et al.* (2014), são regiões incapazes de formar estruturas terciárias estáveis e estão presentes em todos os reinos da vida. Elas variam em tamanho e localização, de segmentos curtos a longos loops ou caudas (Holehouse; Kragelund, 2024). Para identificar quais apresentam menor desordem, foram comparados VHHs NATIVOS e modificados por engenharia (ENXEST, ENXSDR e ENXSEQ).

O score IDR (0 a 1) indica o grau de desordem estrutural, sendo valores próximos de zero ideais por refletirem maior organização. Em anticorpos e fragmentos, as IDRs concentram-se nas extremidades terminais e CDRs, enquanto as regiões FR raramente as apresentam. Apesar de naturalmente flexíveis, as CDRs podem comprometer a estabilidade proteica, afetar interações com epítopos e inviabilizar aplicações terapêuticas em casos extremos. No entanto, podem adotar estruturas secundárias específicas, como loops, fitas- β e α -hélices. A CDRH3 do

VH/NTZ, por exemplo, exibe conformações L e E, enquanto as CDRH1 e CDRH2 são exclusivamente do tipo L, diferenciando-se de regiões totalmente desordenadas. O NTZ, um mAb estável e eficaz, apresenta baixos níveis de IDRs em suas CDRs, favorecendo o reconhecimento antigênico.

Em contraste, VHHs podem conter CDRs minimamente desordenadas, dado que 30-40% dos resíduos em proteomas eucarióticos estão em regiões desordenadas. Cerca de 70% das proteínas da subclasse *Mammalia* possuem ao menos uma IDR com mais de 30 resíduos (Wright; Dyson, 1999). Nos VHHs analisados, as CDRs do VH/NTZ reduziram as IDRs, sugerindo um efeito estabilizador. Uma redução geral dos IDRs após os enxertos pode indicar impacto positivo na estabilidade estrutural dos VHHs. Entre os métodos avaliados, o ENXEST destacou-se como o mais eficaz, promovendo a diminuição das IDRs nas extremidades e regiões de CDRs, sugerindo maior organização conformacional. Nove das onze estruturas enxertadas apresentaram IDRs inferiores aos dos NATIVOS, com destaque para 3EZJ, 4M3J, 5MWN, 6GJU, 7KGJ, 7KLW, 7N0G, 8BZY e 8CY6, reforçando a eficácia do método baseado em otimizações estruturais.

O ENXSEQ também demonstrou bom desempenho, reduzindo os IDRs em oito VHHs (4M3J, 5MWN, 6GJU, 6RTY, 7KGJ, 7KLW, 7N0G, 8BZY). Isso evidencia que o alinhamento sequencial, mesmo sem considerar aspectos estruturais, pode contribuir para a redução da desordem. Já o ENXSDR apresentou desempenho intermediário, diminuindo os IDRs em sete VHHs (3EZJ, 4M3J, 6GJU, 7KGJ, 7KLW, 7N0G e 8BZY), sugerindo que alterações pontuais nos SDRs também favorecem a estabilidade.

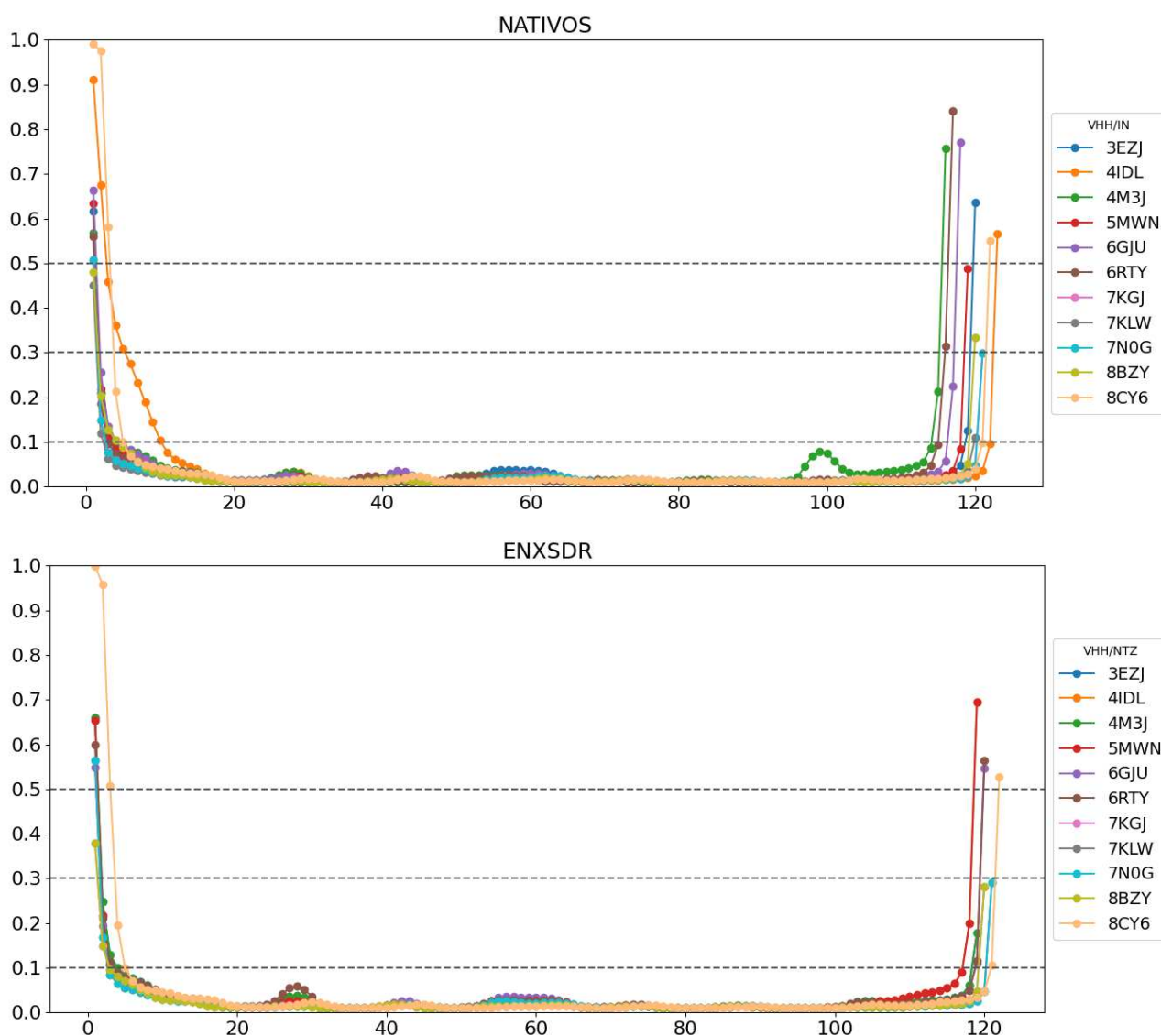
A análise das CDRs indicou que, especificamente na CDRH3/NTZ, tanto nas estruturas cristalizadas quanto nos SDRs, houve redução das IDRs. Notavelmente, os VHHs/SEQ, apesar de apresentarem conformações distintas de H3 (cristal), mantiveram IDRs semelhantes aos do ENXEST. Esse comportamento pode ser atribuído, em parte, aos softwares de predição e refinamento estrutural, que, segundo Huang *et al.* (2023), tendem a otimizar as conformações para estados energeticamente favoráveis, minimizando artificialmente regiões desordenadas.

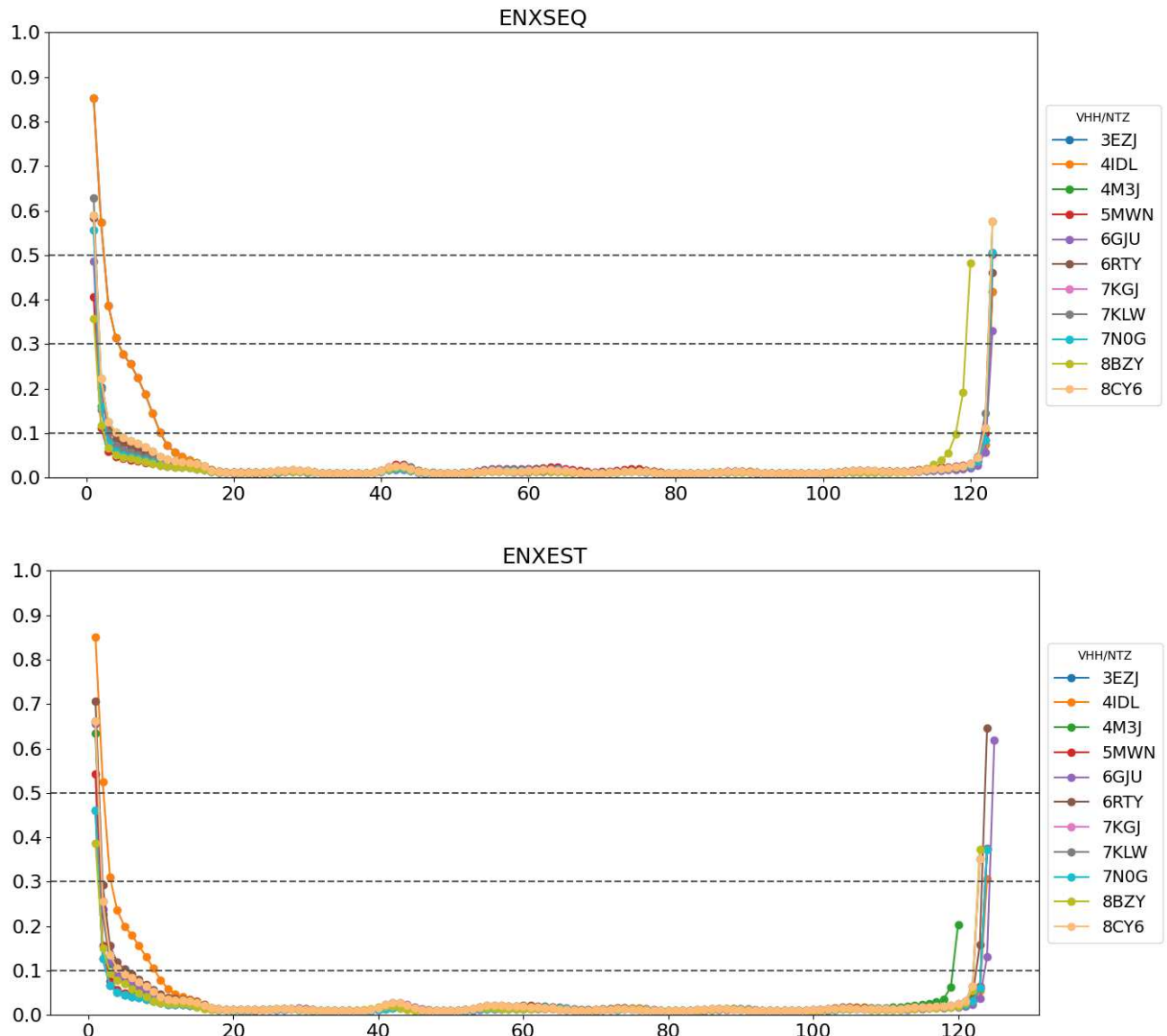
Embora valores de IDR acima de 0,5 indiquem desordem, nenhum VHH excedeu esse limite, exceto nas regiões N- e C-terminais, onde essa característica é esperada (figura 33). Ainda assim, observou-se redução nas regiões funcionais. Por exemplo, no VHH 4M3J, houve diminuição dos IDRs na CDR3. Nas CDR1 e CDR2 dos modelos ENXSDR, os scores mantiveram-se próximos a 0,1, enquanto nos ENXSEQ e ENXEST aproximaram-se de 0,0, evidenciando ausência de desordem, conforme Wang *et al.* (2016). Na comparação geral, o ENXEST apresentou o melhor desempenho, reduzindo os IDRs em nove dos onze VHHs; o

ENXSEQ foi eficaz em oito, e o ENXSDR em sete estruturas. Esses resultados sugerem que a inserção de CDRs, mesmo em conformações distintas do estado cristalizado, favorece a diminuição da desordem, efeito potencializado pelo refinamento estrutural. Casos específicos reforçam essa tendência. No VHH 3EZJ, o ENXEST apresentou o menor score (0,02993), seguido por ENXSDR (0,03108) e ENXSEQ (0,04503), todos inferiores ao nativo (0,03298). No 6GJU, o ENXSEQ obteve o menor score (0,02527), enquanto o ENXEST (0,03064) manteve-se abaixo do nativo (0,03736). Já no 8CY6, o ENXEST foi novamente superior (0,02993), superando o nativo (0,04481) e os demais enxertos.

Em síntese, os três métodos de enxerto foram eficazes na redução da desordem estrutural dos VHHs, com clara superioridade do ENXEST, seguido por ENXSEQ e ENXSDR. Esses achados ressaltam a importância de considerar fatores estruturais no planejamento racional de enxertos, visando otimizar a estabilidade e a organização conformacional dos VHHs.

Figura 33 – Flutuação por Resíduos dos VHH-IN e dos VHH/NTZ em Ralação as RIDs





Fonte: Os gráficos apresentados por Autor (2024) ilustram as regiões desordenadas dos nanocorpos. O primeiro gráfico refere-se ao VHH-IN, enquanto os gráficos 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, aos modelos ENXSDR, ENXSEQ e ENXEST. No eixo Y, são exibidos os valores de desordem por resíduo, sendo que escores superiores a 0,5 indicam regiões completamente desordenadas. Já no eixo X, são apresentadas as posições dos resíduos de aminoácidos dos nanocorpos. À direita de cada gráfico, observa-se que cada VHH é representado por uma cor distinta.

4.5.4 Avaliação da Agregação

Os nanocorpos têm menor propensão à agregação do que os domínios VH/VL, principal instabilidade física das proteínas terapêuticas (Dolk *et al.*, 2005). Isso ocorre devido à substituição de resíduos hidrofílicos no domínio VH e à formação de um pequeno núcleo hidrofóbico pelo CDR3 sob as extremidades N e C-terminais (Zhong *et al.*, 2021). A diversidade artificial nas CDRs pode levar a um enovelamento incorreto das proteínas, conforme destacado por Sidhu e Fellouse (2006) e Roberts (2014), resultando em um aumento da agregação

molecular. Além disso, essa diversidade pode elevar o risco de respostas imunológicas adversas, particularmente em construções híbridas, como as proteínas VHH/NTZ com enxertos ENXSEQ. A agregação compromete a função biológica e pode induzir imunogenicidade, tornando essencial sua análise no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos (Jefferis, 2011). Fatores estruturais e ambientais influenciam esse processo, podendo formar partículas insolúveis que prejudicam a estabilidade e eficácia do produto. Entre os VHH analisados, 3EZJ (18,86%) e 6GJU (22,28%) apresentaram níveis moderados e elevados de agregação, respectivamente, enquanto 4IDL (13,68%) exibiu menor propensão à agregação.

Os enxertos, em geral, reduziram o potencial de agregação, como bem ilustrado na figura 34. VHH como 3EZJ, 4M3J, 5MWN, 6GJU, 6RTY, 7KLW, 8BZY e 7N0G tiveram redução para ao menos um tipo de enxerto. No entanto, o VHH/NTZ 8CY6 apresentou aumento com todos os enxertos (ENXSEQ, ENXEST e ENXSDR). Já o VHH 4IDL teve aumento com ENXSEQ e ENXEST, mas redução com ENXSDR, enquanto o 7KGJ mostrou leve aumento com ENXSEQ. Os três tipos de enxertos avaliados influenciaram diretamente o potencial de agregação, promovendo aumentos ou reduções dependendo da influência do framework, composição química das CDRs e a conformação da CDR3.

A CDRH2, por exemplo, possui resíduos hidrofóbicos como Ala, Pro, Gly e Tyr, sugerindo caráter levemente hidrofóbico. A CDRH3, apesar de conter resíduos hidrofílicos como Glu, Asn e Asp, é dominada por resíduos hidrofóbicos (Tyr, Met, Gly, Ala e Val). Em contraste, a CDRH1 é predominantemente hidrofílica, composta por resíduos como Asn, Ile, Asp e Thr. No entanto, a hidrofobicidade das CDRH2 e CDRH3 não foi suficiente para aumentar o potencial de agregação da maioria dos VHH/NTZ.

Em alguns ENXSDR, a substituição de resíduos hidrofóbicos por hidrofílicos, como Lys30 e Asp31 (H1), Lys52 (H2) e Asn104 (H3), pode ter contribuído para a redução do potencial de agregação. Estudos, como os de Perchiacca; Bhattacharya (2011), mostram que mutações envolvendo resíduos hidrofílicos, como Asp ou Arg, podem inibir a agregação. Estratégias adicionais incluem a introdução de cisteínas nas posições 54 e 78, a adição de aminoácidos carregados negativamente nas bordas do CDR3 e a inserção de arginina na posição 29, segundo por Zhong *et al.* (2021).

O enxerto ENXSDR apresentou comportamento variável. Em 6GJU, houve aumento de agregação de 22,28% para 20,39%, enquanto 8CY6 registrou aumento de 1,00%. Em contrapartida, 4IDL teve redução de 13,68% para 13,39%, e 5MWN apresentou a maior redução (-4,54%) dentre os ENXSDR. Os ENXEST destacaram-se pela maior redução no potencial de

agregação, sugerindo que a conformação cristalizada das CDRs do VH/NTZ, em específico H3, contribui para esse efeito.

Não é compreendido se essa conformação parece ter sido adotada, entre outros fatores, para reduzir a agregação no NTZ, mas em alguns VHH ela reduz. Em 6RTY, a agregação caiu de 19,07% para 14,31%, representando redução potencial. Reduções semelhantes foram observadas em 4IDL (de 13,68% para 13,51%) e 8BZY (-4,83%). Esses resultados indicam que o ENXEST promove maior estabilidade nos nanocorpos, reduzindo a propensão à agregação. Por outro lado, os ENXSEQ apresentaram os maiores valores de propensão à agregação em alguns casos, como nos VHHs 4IDL e 8CY6. Contudo, para a maioria dos nanocorpos analisados, seus valores foram inferiores aos do VHH-IN.

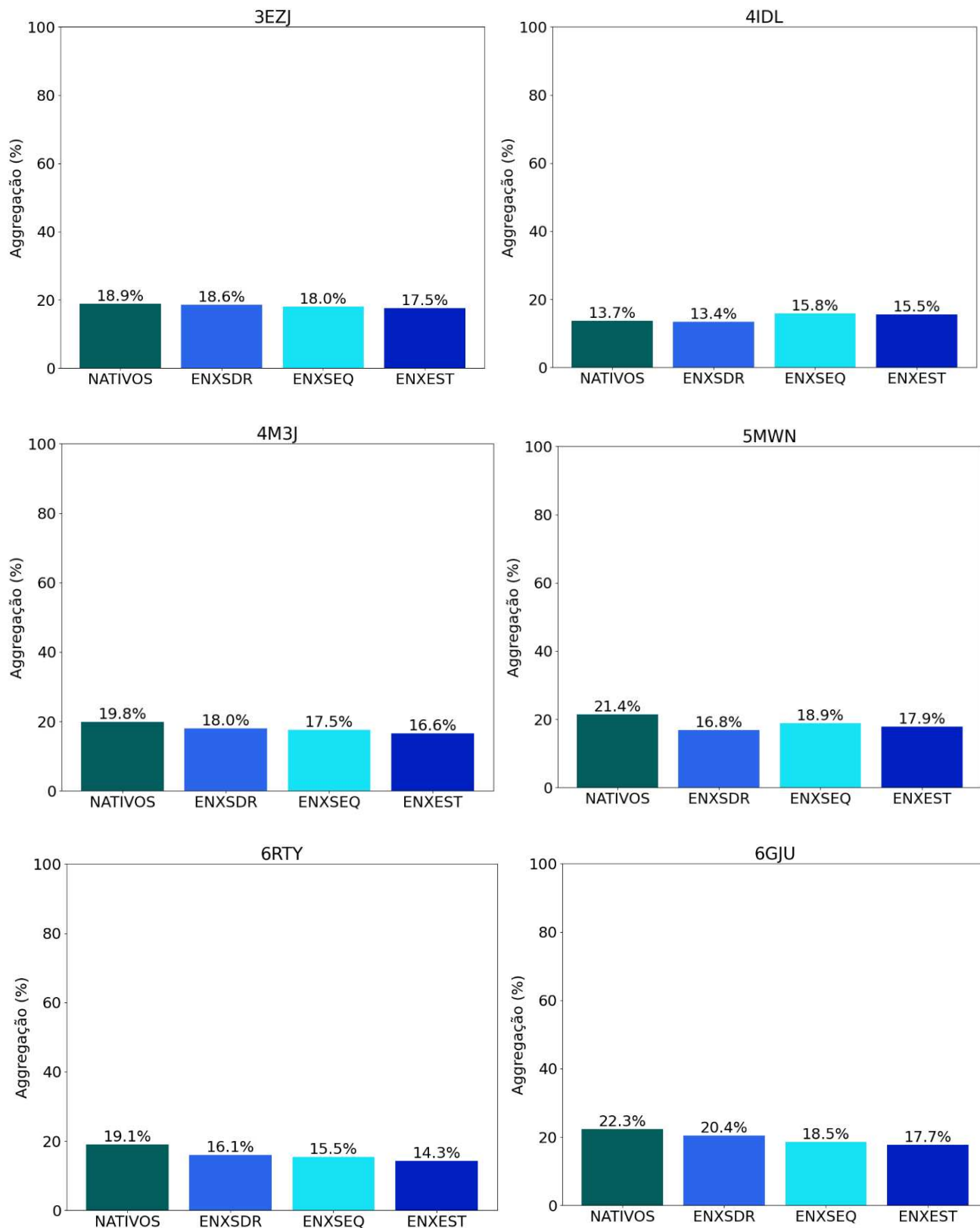
De maneira geral, o enxerto ENXSEQ mostrou valores de agregação próximos aos dos nanocorpos nativos, com algumas variações. Por exemplo, 6GJU teve uma redução discreta de 22,28% para 18,52%, enquanto 7N0G manteve valores semelhantes (21,11% nos nativos e 20,95% no ENXSEQ), e o 6RTY apresentou uma redução de -3,59%. Esses resultados sugerem que o ENXSEQ preserva em grande parte o comportamento de agregação natural dos VHHs, sendo uma opção relevante para manter níveis de agregação semelhantes aos nativos. Essas diferenças podem ser explicadas pelas conformações distintas das CDRs nos ENXEST e ENXSDR, dado o papel crucial das CDRs na agregação de anticorpos (Sheehan *et al.*, 2024).

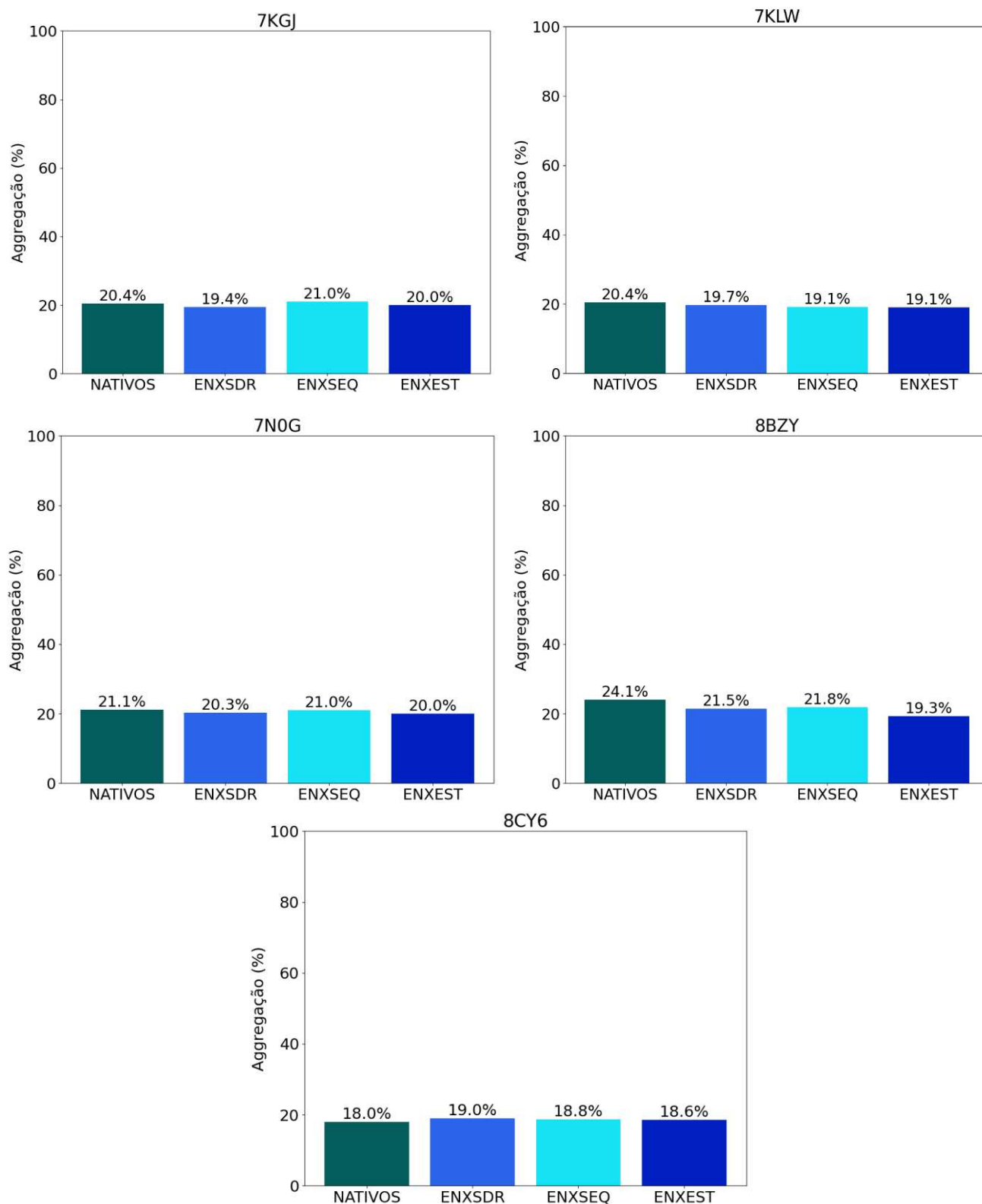
As conformações da CDR3 nos ENXSEQ, caracterizadas pela presença ou ausência de curvaturas, podem expor resíduos específicos e favorecer a agregação devido a interações intracadeia mais fracas com as regiões FRs. Essas interações envolvem forças de VDW, HBOND, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Wang, 2005). As CDRs dos VH/NTZ apresentam diversos resíduos hidrofóbicos, incluindo Gly26, Phe27 e Ile29 na H1; Gly55 e Tyr56 na H2; e, predominantemente na H3, Gly96, Tyr97, Tyr98, Gly99, Tyr100, Gly101, Val102, Tyr103, Ala104, Met105 e Tyr107. Essa composição favorece interações intracadeia com os FRs, contribuindo para a maior propensão à agregação nos ENXSEQ.

A curvatura da H3 no ENXSEQ, aliada às características hidrofóbicas dos resíduos, tende a manter os valores de agregação próximos aos nativos. Observamos que a conformação da H3 no NTZ influencia mais a agregação nos ENXSEQ do que nos ENXEST, apesar da mesma composição de aminoácidos. Isso sugere que a estrutura dos ENXSEQ favorece interações intracadeia, resultando em maior agregação. Esses dados indicam que os VHH/NTZ geralmente apresentam menor propensão à agregação em comparação aos VHH-IN, especialmente quando enxertos como os ENXEST são utilizados. Esses resultados ressaltam a

importância de uma seleção criteriosa do tipo de enxerto para otimizar os VHH/NTZ como candidatos terapêuticos viáveis.

Figura 34 – Comparação de Agregação Entre os VHH-IN e o VHH/NTZ





Fonte: Os gráficos elaborados pelo autor (2024) comparam o potencial de agregação de cada nanocorpo antes (VHH-IN) e após os enxertos (VHH/NTZ). No eixo x, estão representados quatro grupos — NATIVOS, ENXSDR, ENXSEQ e ENXEST — identificados pelas cores verde-azulado escuro, azul-real médio, ciano brilhante e azul profundo, respectivamente. Já no eixo y, a escala percentual (%) indica o potencial de agregação de cada VHH, variando de 0% a 100%.

4.5.5 Avaliação da Solubilidade

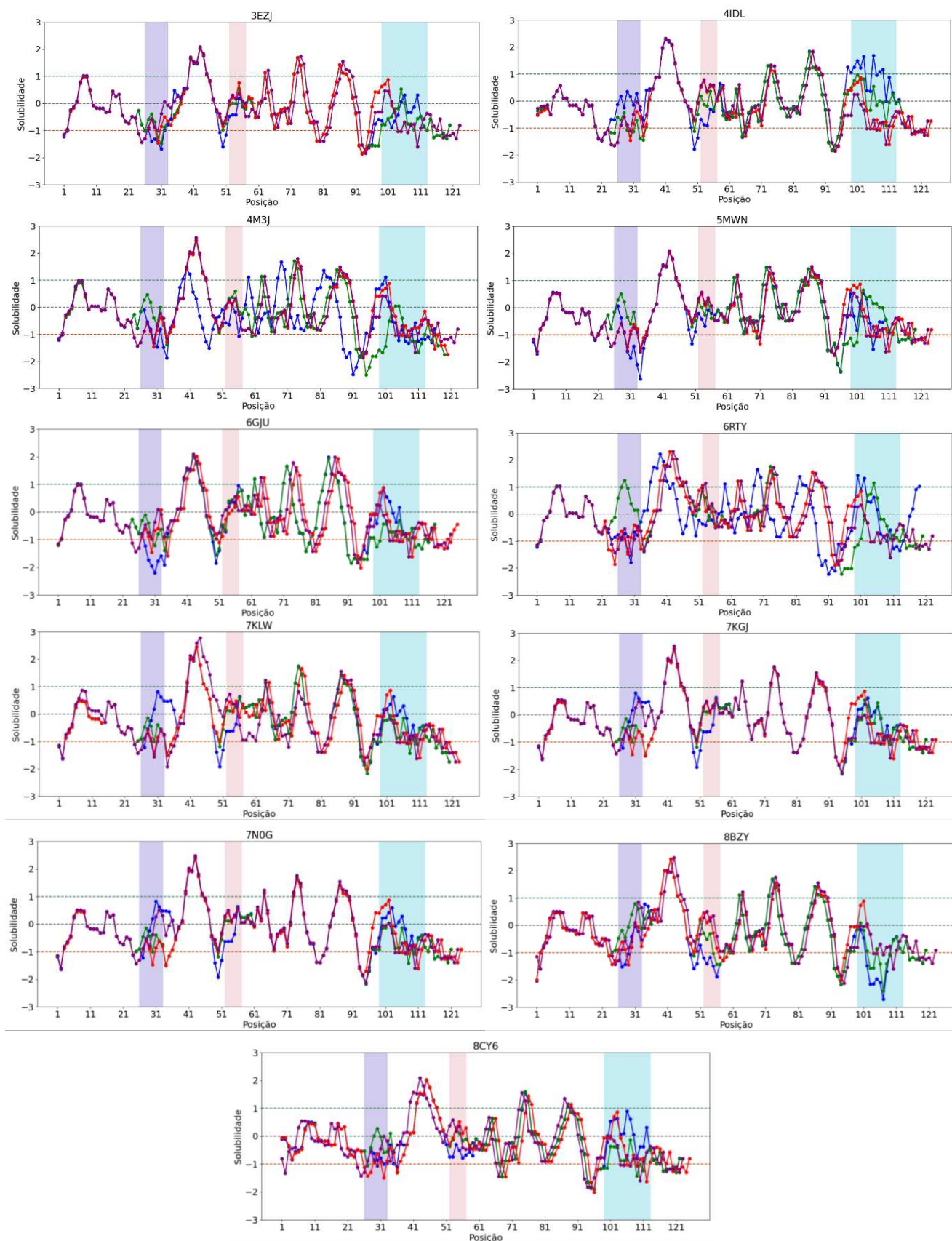
Os nanocorpos possuem alta solubilidade em comparação aos anticorpos clássicos e terapêuticos, especialmente os multidiomênicos, como os scFv. Nestes, a dissociação dos domínios pode expor resíduos hidrofóbicos ao solvente, favorecendo interações com superfícies hidrofóbicas e aumentando o risco de agregação e imunogenicidade (Woern; Plückthun, 2001). A estabilidade solúvel dos VHH resulta de mais de 50 milhões de anos de evolução, adaptando-se à ausência do parceiro VL (Arbabi-Ghahroudi, 2017). Apesar da flexibilidade estrutural, a introdução de resíduos hidrofóbicos em regiões críticas pode comprometer a solubilidade, especialmente na interface correspondente ao VL (Bannas; Hambach; Koch-Nolte, 2017). Assim, avaliar o impacto do enxerto na solubilidade dos nanocorpos é essencial para otimizar suas propriedades, como ilustrado na figura 35.

A análise de solubilidade pode ser realizada por resíduo usando o *software* CamSolpH, conforme descrito por Oller *et al.* (2023). Pontuações acima de 1 indicam alta solubilidade, enquanto valores abaixo de -1 refletem baixa solubilidade. Em 5MWN, por exemplo, os enxertos ENXSDR, ENXEST e ENXSEQ aumentaram a solubilidade nas regiões H1 (26-32) e H2 (52-56), mas reduziram-na em alguns resíduos da H3 (99-112), sem afetar significativamente a solubilidade global. O 5MWN nativo apresentou solubilidade de 0,50, enquanto os enxertos alcançaram 0,98 (ENXSDR), 0,91 (ENXEST) e 0,93 (ENXSEQ).

Padrões semelhantes foram observados em 6GJU, 6RTY, 8BZY e 8CY6, com aumento da solubilidade na CDRH1, provavelmente devido à introdução de resíduos hidrofílicos como Lys30 e Asp31, além de intermediários polares como Asn28 e Thr32. A CDRH2 também mostrou melhoria, possivelmente pela menor presença de resíduos hidrofóbicos, como Asp52 e Asn54. Já a CDRH3 apresentou variações conforme o enxerto, com aumento da solubilidade em 3EZJ e 8BZY, mas redução em estruturas como 4IDL e 8CY6.

No 4IDL, a solubilidade caiu de 1,40 para 1,13 (ENXSDR), 0,94 (ENXEST) e 1,04 (ENXSEQ), enquanto em 8CY6 reduziu de 1,16 para 1,08 (ENXSDR) e 1,01 (ENXEST/ENXSEQ), sem comprometer a solubilidade geral. A conformação das CDRs e a estrutura do FR influenciam essas variações. Comparando VHH-IN e VHH/NTZ, os enxertos elevaram a solubilidade em 3EZJ, 4M3J, 6RTY e 6GJU. No 5MWN, o valor inicial de 0,582 aumentou para 0,911 (ENXEST), 0,961 (ENXSDR) e 0,932 (ENXSEQ), sem ultrapassar 1, padrão semelhante ao de 8BZY. Em contrapartida, VHH/NTZ mostraram redução em 4IDL, 7KLW e 8CY6, onde todos os enxertos permaneceram abaixo de 1,1, indicando um leve declínio.

Figura 35 – Flutuação de Resíduos dos VHHs Mediante a pH fisiológico (7.4) para Quantificar a Solubilidade



Fonte: Gráficos elaborados pelo Autor (2024) ilustram o score de solubilidade por resíduo nos nanocorpos antes e após os enxertos. As cores representam os diferentes grupos: azul para os NATIVOS, verde para ENXSDR, laranja

para ENXEST e roxo para ENXSEQ. O eixo x corresponde à posição dos aminoácidos nos nanocorpos, enquanto o eixo y indica o score de solubilidade. Linhas tracejadas marcam o ponto de corte de solubilidade por resíduo: scores positivos indicam maior solubilidade, enquanto scores negativos apontam para menor solubilidade. Áreas destacadas em azul-púrpura, rosa suave e azul claro representam, respectivamente, as regiões CDRs H1, H2 e H3.

4.5.6 Avaliação de Termoestabilidade

A estabilidade térmica dos VHH é uma característica promissora e desejável em mAbs e proteínas terapêuticas (Kunz *et al.*, 2018), por possuir amplo potencial em aplicações biotecnológicas. Essa termoestabilidade resulta de milhões de anos de evolução, refletindo a adaptação dos organismos produtores a ambientes extremos. Lhamas e alpacas, por exemplo, habitam altitudes elevadas nas montanhas da América do Sul, enquanto camelos e dromedários enfrentam altas temperaturas e condições áridas em desertos e regiões semiáridas. Essa capacidade permite que anticorpos de cadeia pesada resistam a variações de temperatura, tornando-os adequados para diversas aplicações em que a termoestabilidade está associada a maior sobrevivência sérica.

Embora o NTZ apresente estabilidade térmica para uso terapêutico, não atinge os níveis dos nanocorpos, alguns dos quais resistem a até 100 °C antes da desnaturação (Gómez-Mulas *et al.*, 2024). A combinação da especificidade do Natalizumabe pela subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$ com a termoestabilidade dos nanocorpos é uma estratégia promissora para desenvolver macromoléculas mais resistentes a variações extremas de temperatura e pH, viabilizando seu uso onde mAbs tradicionais seriam limitados. Além disso, integrar a alta afinidade do NTZ pela $\alpha 4\beta 1$ às propriedades termoestáveis dos nanocorpos pode tornar as terapias mais eficazes, robustas e acessíveis, especialmente em regiões com infraestrutura limitada para refrigeração.

Estudos desenvolvidos por Turner *et al.* (2014) e Liu *et al.* (2015) sugerem que a termoestabilidade dos VHHs pode ser aprimorada por mutações específicas em resíduos críticos. Assim, avaliamos o impacto das CDRs do VH/NTZ na estabilidade térmica dos VHH utilizando o *software* SCooP. A variação na temperatura de fusão (T_m) dos nanocorpos antes e após os enxertos evidencia que as mutações realizadas impactaram diretamente sua estabilidade térmica (figura 35). Os VHH/NTZ apresentaram diferenças na T_m em relação aos VHH-IN, com variações distintas entre os três tipos de enxertos. Ao comparar os VHHs nativos com aqueles contendo enxertos ENXSEQ, ENXEST e ENXSDR, identificamos tanto aumentos quanto reduções no T_m . Os enxertos ENXSDR demonstraram um equilíbrio no aumento e na conservação do T_m . Em três nanocorpos (3EZJ, 4IDL e 7N0G), o ENXSDR aumentou o T_m em até +3,3 °C, destacando-se como uma modificação eficiente. No caso do 6GJU, houve um leve incremento de +0,8 °C, enquanto os VHH/NTZ 4M3J, 7KGJ, 7KLW, 8BZY e 8CY6

apresentaram variações inferiores a 0,5 °C, sendo considerados estáveis em relação ao T_m. Embora algumas reduções tenham sido observadas, como em 6RTY (-3,8 °C) e 5MWN (-0,9 °C), esses casos representaram exceções dentro do panorama geral de conservação.

Os enxertos ENXSEQ, por outro lado, mostraram impactos mais redutor. Em dois VHHs (4IDL e 7KLW), o T_m aumentou entre +0,8 °C e +3,7 °C. No entanto, em seis nanocorpos (3EZJ, 6GJU, 7KGJ, 7N0G, 8BZY e 8CY6), foram registradas reduções de até -2,7 °C. Isso sugere que o ENXSEQ teve um impacto predominante de redução da termoestabilidade, afetando de maneira desigual os VHHs analisados. Já 5MWN e 6RTY apresentaram baixas variações de T_m, mas, ainda assim, sofreram reduções.

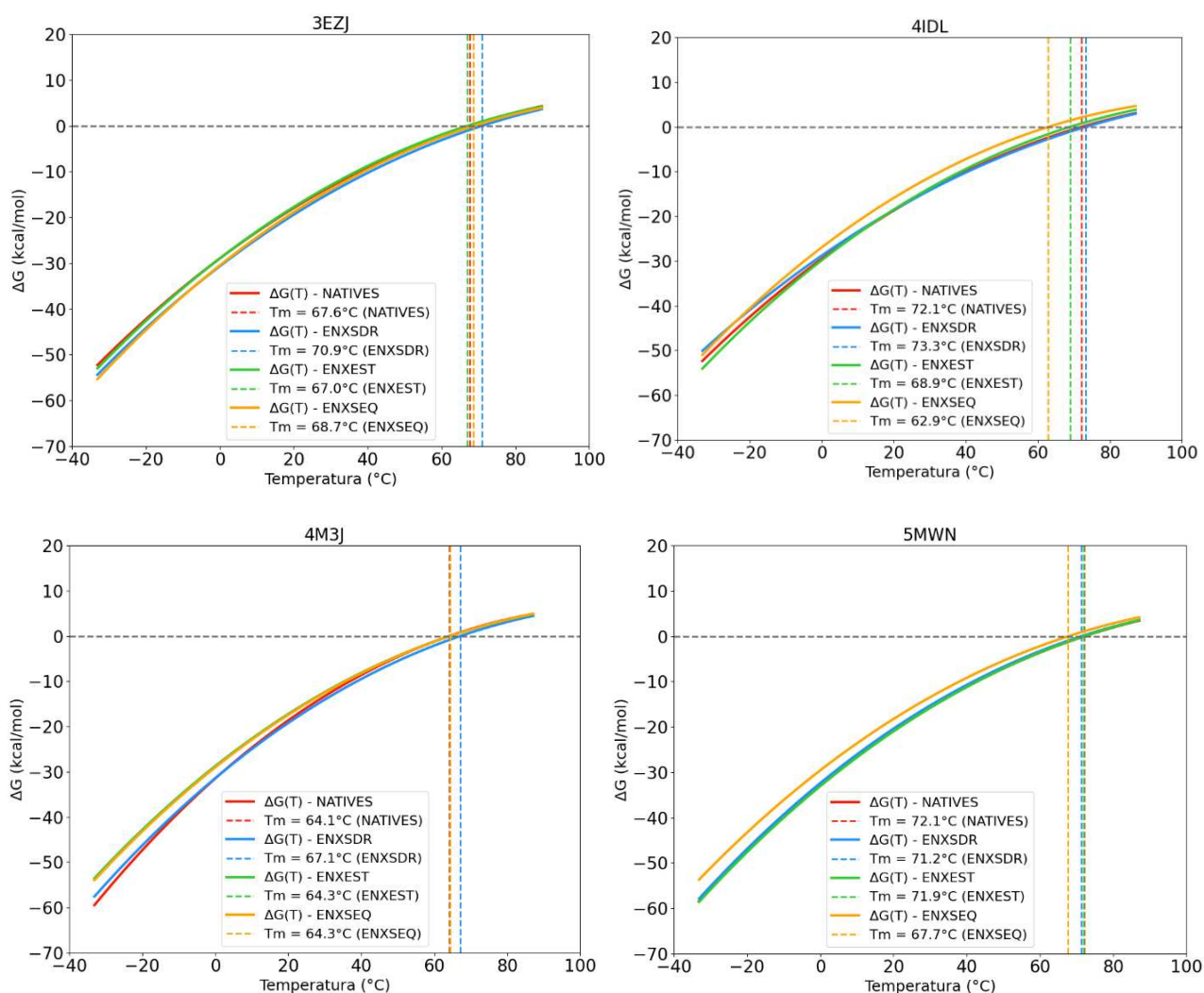
O ENXSEQ promoveu aumento do T_m em apenas dois VHH/NTZ, enquanto reduziu a termoestabilidade em seis dos onze analisados. Essa redução pode estar associada às conformações não canônicas da CDRH3. Conforme destacado por Wijma, Floor; Janssen (2013), a estabilidade térmica é influenciada por fatores como a rigidez de regiões flexíveis, incluindo as CDRs. Adicionalmente, uma segunda ligação dissulfeto, que estabiliza a CDRH3, especialmente as de maior comprimento, é essencial para a termoestabilidade (Muyldermans, 2013; Govaert *et al.*, 2012). Entretanto, fatores estruturais além do enrijecimento promovido por essa ligação também desempenham um papel importante na estabilidade térmica (Kunz *et al.*, 2018). Proteínas termoestáveis, como os VHHs, apresentam maior tolerância a mutações em comparação com proteínas mesoestáveis (Tokuriki; Tawfik, 2009). No entanto, a transferência de peptídeos das CDRs do VH/NTZ pode ser crítica para a redução da estabilidade térmica, como observado para o ENXSEQ, especialmente na região H3, sobretudo se sua conformação for distinta daquela do mAb modelo.

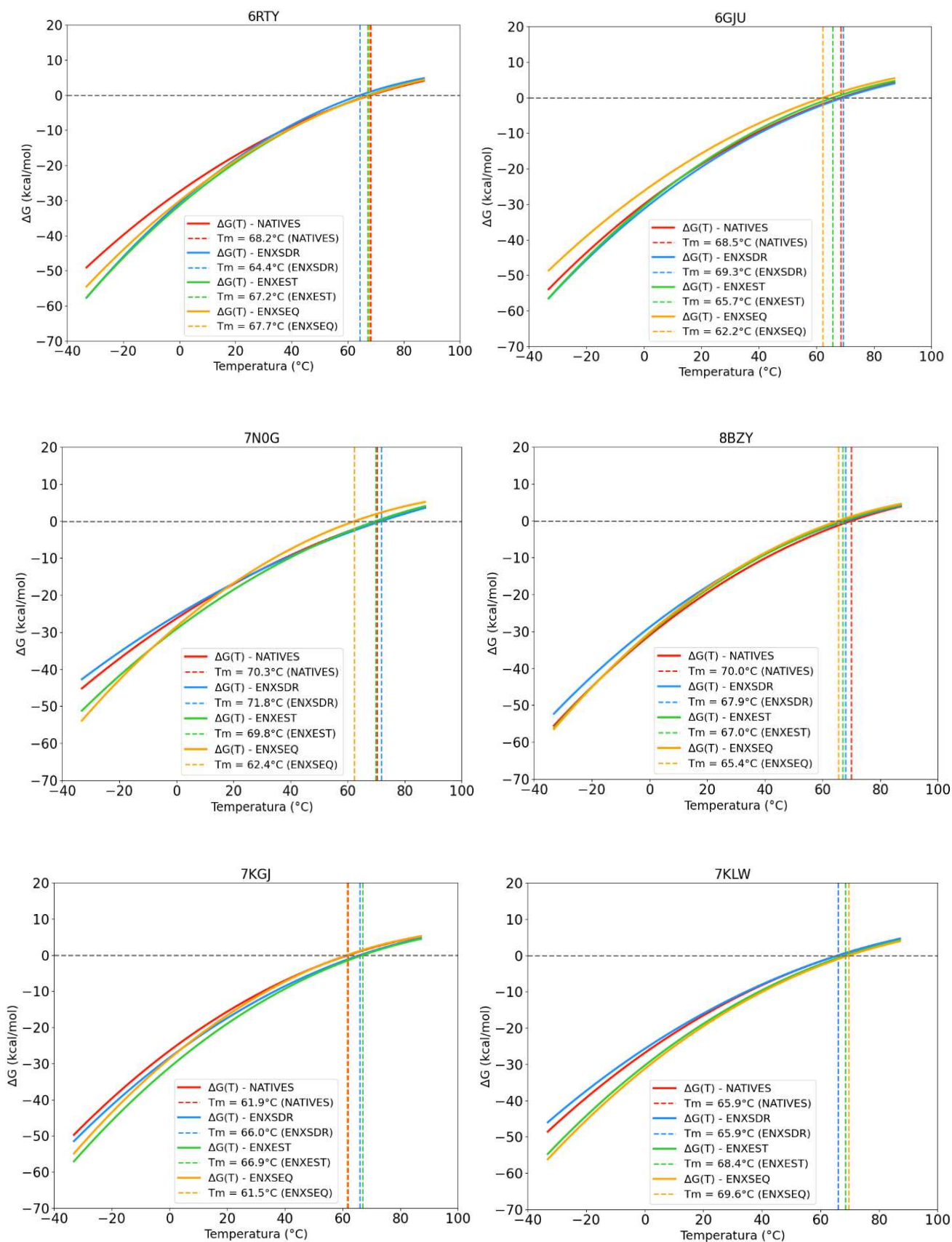
Os VHHs modificados com ENXEST demonstraram desempenho superior em comparação ao ENXSEQ e ENXSDR. Em cinco dos 11 nanocorpos analisados (4IDL, 5MWN, 6GJU, 7N0G e 8BZY), o T_m aumentou até +2,8 °C, tornando-se o enxerto com maior impacto positivo na estabilidade térmica. Nenhum VHH/EST apresentou redução de T_m superior a 1 °C, sendo as maiores quedas observadas em 3EZJ (-0,6 °C) e 8CY6 (-0,5 °C). Os demais (4M3J, 6RTY, 7KLW e 7KGJ) mantiveram o T_m estável em relação aos VHH-IN. Esses resultados indicam que o ENXEST é promissor, embora seu desempenho possa variar dependendo do scaffold. O aumento do T_m nos ENXEST pode estar relacionado à conformação estendida de comprimento intermediário da CDRH3 dos VHH/NTZ. Essa hipótese é reforçada pela comparação com o ENXSEQ, já que ambos possuem constituição química semelhante, mas a conformação distinta da H3 nos VHH/NTZ, o que parece contribuir para a redução observada no ENXSEQ. As três estratégias de enxerto impactaram o T_m de forma variável, dependendo

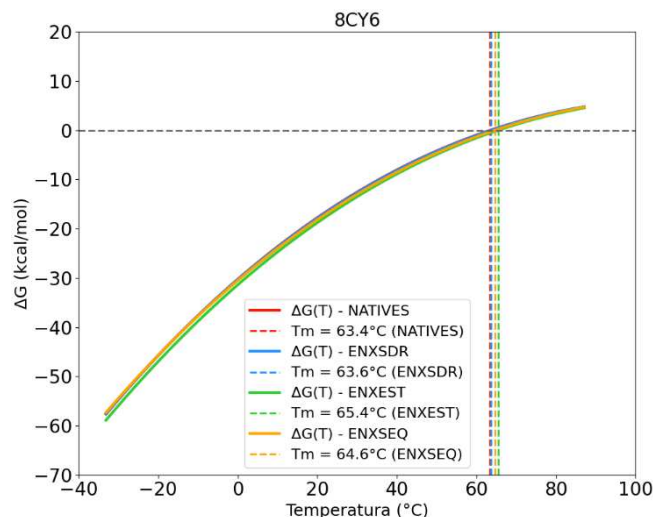
do tipo de enxerto e do framework do VHH receptor. Foi observado que a conformação da H3 tem um papel mais crítico para a estabilidade térmica do que a sinergia entre os aminoácidos das CDRs. O ENXSDR e o ENXEST apresentaram impactos positivos na maioria dos VHH/NTZ, destacando-se como abordagens promissoras para aumentar a estabilidade térmica.

Conforme apontado por Eijsink *et al.* (2004), mutações que aumentam a termoestabilidade frequentemente se concentram em regiões específicas. No caso dos VHHs analisados, a inserção de resíduos estratégicos na CDRH3, especialmente em conformações estendidas de tamanho intermediário, mostrou-se eficaz para melhorar a estabilidade térmica com o ENXSDR. Enquanto o maior destaque da transferência peptídeos CDR do NTZ cai sobre o ENXEST. Por outro lado, o ENXSEQ, associado à conformação H3 curvada, mostrou-se menos eficaz e deve ser utilizado com cautela em situações em que a estabilização térmica é uma prioridade.

Figura 36 – Variação da Estabilidade dos VHHs em Função da Temperatura







Fonte: Os gráficos, criado por Autor (2024), apresenta os valores de T_m dos nanocorpos nativos e dos enxertos, com as CDRs do domínio VH/NTZ. Vermelho representa os nanocorpos nativos, enquanto as cores azul, verde e laranja correspondem aos enxertos ENXSDR, ENXEST e ENXSEQ, respectivamente. No eixo Y, são exibidos os valores de ΔG (kcal/mol), e no eixo X, as temperaturas são apresentadas em graus Celsius.

4.5.7 Avaliação de Pontos Fortes e Fracos

Os VHHs possuem uma estrutura enovelada estável que permite interação eficiente ao antígeno, alcançando rapidamente seu estado funcional. O enovelamento dessas proteínas discutido por Nassar *et al.*, (2021), reflete uma transição suave de energia livre, evitando a formação de estados mal enovelados. Entretanto, enxertos de CDRs como as dos VH/NTZ nos VHH podem induzir instabilidade estrutural, resultando em estados frustrados. O conceito de frustração mínima está associado como revisado por Chen *et al.*, (2019), à otimização de restrições cinéticas e termodinâmicas necessárias para o enovelamento correto dessas proteínas. Áreas de baixa frustração estão associadas a maior estabilidade, como observado nos NTZ e outros mAbs terapêuticos, enquanto regiões frustradas refletem menor otimização estrutural.

É essencial avaliar se as CDRs do VH/NTZ impactam a estabilidade dos VHH/NTZ. A estabilidade de proteínas modificadas por engenharia pode ser analisada por mutações que substituem resíduos nativos, como discutem Dehouck *et al.* (2003), resultando em estabilização ou desestabilização significativa. Resíduos com energias muito positivas indicam menor estabilidade, enquanto valores negativos destacam regiões mais estáveis (De Laet *et al.*, 2016). A análise da energia livre de enovelamento global (ΔG) foi realizada via SWOtein, com base em descritores estruturais como distâncias entre resíduos (DIS), acessibilidade ao solvente (ASA) e ângulos de torção (TOR) dos VHH-IN e VHH/NTZ. Esses parâmetros são essenciais para compreender as variações na estabilidade estrutural entre VHH-IN (nativos) e os três tipos de enxertos (ENXSDR, ENXEST e ENXSEQ).

Os resultados indicam que valores negativos dos descritores promovem maior estabilidade e menor ΔG , enquanto valores positivos sugerem instabilidade (De Laet *et al.*, 2016). As oito categorias energéticas variam de *hard strength* (força extrema) a *hard weakness* (fraqueza extrema) (Tabela 4), permitindo identificar pontos fortes e fracos na estrutura e compreender os impactos dos enxertos na estabilidade estrutural e energética.

Tabela 4 – Identificação da Estabilidade Estrutural Baseado em Descritores

PDB	NATIVOS			ENXSDR			ENXEST			ENXSEQ		
	DIS	ASA	TOR	DIS	ASA	TOR	DIS	ASA	TOR	DIS	ASA	TOR
3EZJ	-0,25	-0,55	-0,87	-0,19	-0,45	-1,52	-0,13	-0,22	-0,83	-0,19	-0,22	-0,52
4IDL	-0,19	-0,31	-0,21	-0,19	-0,17	-0,21	-0,16	-0,17	-0,61	-0,16	-0,22	-0,09
4M3J	-0,34	-0,47	-1,76	-0,29	-0,55	-1,57	-0,2	-0,14	-1,27	-0,28	-0,31	-0,99
5MWN	-0,32	-0,51	-1,2	-0,23	-0,45	-1,27	-0,17	-0,2	-1,24	-0,2	-0,2	-0,65
6GJU	-0,36	-0,41	-0,52	-0,27	-0,35	-1,04	-0,24	-0,35	-1,2	-0,21	-0,44	-1,45
6RTY	-0,25	-0,64	-0,76	-0,2	-0,54	-1,79	-0,13	-0,04	-1,6	-0,21	-0,43	-1,12
7KGJ	-0,2	-0,54	-1,02	-0,22	-0,63	-1,76	-0,18	-0,38	-1,57	-0,26	-0,38	-0,75
7KLW	-0,24	-0,39	-0,43	-0,23	-0,46	-0,79	-0,21	-0,35	-0,83	-0,28	-0,42	-1,18
7N0G	-0,14	-0,37	-0,93	-0,15	-0,42	-1,3	-0,16	-0,3	-1,3	-0,25	-0,36	-0,98
8BZY	-0,23	0,09	-0,51	-0,24	-0,22	-0,61	-0,21	-0,27	-0,9	-0,21	-0,19	-0,89
8CY6	-0,15	-0,12	-0,12	-0,15	-0,06	-1,18	-0,14	0,19	-0,66	-0,21	-0,18	-0,55

Fonte: A tabela elaborada pelo Autor (2025), ressaltando os intervalos de cores utilizados os quais refletem a estabilidade estrutural dos VHH/NTZ com base em três descritores estruturais: DIS (Distância), ASA (Área Acessível ao Solvente) e TOR (Ângulos de Torção). Uma escala de cores é atribuída para evidenciar alterações estabilizadoras e desestabilizadoras, representadas, respectivamente, pelas cores azul e vermelho.

A comparação entre o ΔG global obtido para os VHH-IN e os três tipos de enxerto VHH/NTZ aponta para variações na estabilidade estrutural. Em geral, os valores de DIS, ASA e TOR dos VHH-IN são consistentemente mais negativos em relação aos valores dos enxertos, o que indica uma conformação bem enovelada e energeticamente favorável consistente com proteínas em condições naturais as quais tendem a buscar, termodinamicamente, o seu estado de enovelamento de menor energia (Finkelstein *et al.*, 2022; Seelig; Seelig, 2023). Essa tendência sugere que a introdução de enxertos gera desestabilizações variáveis, dependendo do tipo de enxerto, do descritor analisado e do tipo de *framework*.

O ENXSDR apresentou uma redução moderada na estabilidade estrutural em comparação com os VHH-IN, com aumentos nos valores de DIS e ASA, indicando uma leve perda de estabilidade. Por exemplo, para o 3EZJ, o DIS variou de -0.25 (nativo) para -0.19, o ASA de -0.55 para -0.45, e o TOR de -0.87 para -1.52, este último indicando uma melhoria nas interações hidrofóbicas. No entanto, o comportamento do ENXSDR é heterogêneo: em 4IDL, os valores de DIS e ASA permaneceram próximos aos nativos, sugerindo um impacto mínimo nesse modelo. Por outro lado, no 8CY6 (VHH/NTZ), o impacto foi mais pronunciado, com o

ΔG de ASA variando de -0.12 (nativo) para -0.06 (ENXSDR), indicando menor estabilidade, enquanto o ΔG de TOR mudou de -0.12 para -1.18, o que sugere um aumento na estabilidade hidrofóbica. Adicionalmente, nos casos de 6RTY e 7KGJ, o ΔG de TOR mostrou desestabilizações notáveis, indicando que esse tipo de enxerto pode afetar mais drasticamente as forças hidrofóbicas, dependendo da estrutura específica do VHH.

O ENXEST resultou em maior desestabilização em relação aos nativos, especialmente nos ΔG de ASA e ΔG de TOR. Para o PDB 3EZJ, o ASA variou de -0.55 (nativo) para -0.22 (ENXEST), sugerindo um impacto nas interações hidrofóbicas. Já o ΔG TOR variou de -0.87 (nativo) para -0.83 (ENXEST), indicando que a estabilidade conformacional não foi drasticamente alterada. O ΔG DIS apresentou uma variação de -0.25 (nativo) para -0.13 (ENXEST), sugerindo que as interações locais foram menos afetadas. Em outras estruturas, como 6GJU e 7KLW, o ENXEST mostrou-se consistentemente menos estável em todos os descritores. Por exemplo, em 6GJU, o DIS passou de -0.36 para -0.24, o ASA de -0.41 para -0.35, e o TOR de -0.52 para -1.2, indicando maior desestabilização estrutural geral.

Entre os três tipos de enxerto, o ENXSEQ apresentou os maiores desvios em relação aos VHH-IN nos descritores ASA e TOR, o que pode estar relacionado às conformações adotadas pela CDRH3, que se curva em relação ao VH/NTZ, reduzindo os valores de ASA e influenciando os ângulos de torção do *backbone*. Para 7KGJ, por exemplo, o ASA passou de -0.54 (nativo) para -0.38, e o TOR de -1.02 para -0.75, indicando que o ENXSEQ compromete a acessibilidade ao solvente e as interações hidrofóbicas. Em alguns casos, como 6RTY, o ΔG de TOR foi dramaticamente impactado (-0.76 para -1.12), enquanto os valores de DIS e ASA apresentaram menores desvios. Esse padrão sugere que o ENXSEQ afeta primariamente os ângulos de torção, o que, a depender do framework, pode causar maior ou menor instabilidade, enquanto as interações locais e terciárias permanecem preservadas.

Curiosamente, os VHH/NTZ de 8BZY apresentaram estabilização não apenas no descritor ASA, que originalmente era positivo para os VHH-IN, mas também reduções consistentes em comparação aos nativos nos valores de DIS (-0.24) e TOR (-0.61) para ENXSDR; DIS (-0.21) e TOR (-0.90) para ENXEST; e DIS (-0.21) e TOR (-0.89) para ENXSEQ, sugerindo que, em determinados contextos, as CDRs do VH/NTZ podem contribuir para a estabilidade estrutural.

Ao comparar os enxertos com os VHH-IN, foram observadas diferenças na estabilidade estrutural, avaliadas pela energia livre de enovelamento global (ΔG) e pelos descritores conformacionais (DIS, ASA, TOR). O ENXSDR apresentou o menor impacto na ΔG , sugerindo que a inserção dos resíduos SDR do VH/NTZ preserva componentes críticos para a estabilidade

estrutural (detalhamento no material suplementar H: ΔG por resíduo). Os valores de DIS, ASA e TOR do ENXSDR foram próximos aos dos VHH-IN em todas as estruturas analisadas, confirmando sua baixa desestabilização e a manutenção da conformação nativa. Os resíduos SDR/NTZ integram-se ao VHH/NTZ de maneira funcional, desde que as mutações preservem a estrutura dos estados fundamentais, a estabilidade termodinâmica e a acessibilidade cinética (Bastolla; Roman; Vendruscolo, 1999).

Por outro lado, o ENXSEQ foi a abordagem mais desestabilizadora, apresentando alterações nos valores de TOR e ASA, resultando em ΔG menos negativos e maior instabilidade estrutural, especialmente na CDRH3. Entre as estruturas analisadas, as mais afetadas foram 3EZJ, 4M3J, 5MWN, 6GJU, 6RTY, 7KGJ, 7KLW e 8BZY, que exibiram diferenças acentuadas em TOR e ASA em relação ao estado nativo. Esse comportamento sugere que conflitos energéticos entre resíduos não foram minimizados de forma eficaz, contrariando o Princípio da Frustração Mínima, segundo o qual proteínas evoluem para reduzir instabilidades energéticas nos seus estados nativos (Ferreiro; Komives; Wolynes, 2014).

O ENXEST demonstrou maior estabilidade do que o ENXSEQ na maioria dos VHHs, mas ainda apresentou desestabilização em algumas estruturas, como 3EZJ e 6GJU, onde os valores de ASA e TOR foram alterados. Isso confirma que a curvatura da H3 do NTZ nos VHHs está associada a frustração energética local, refletindo a complexidade estrutural da região.

4.5.8 Avaliação de Humanidade

Qualquer proteína terapêutica desenvolvida para uso em humanos precisa levar em consideração uma condição importante: o grau de humanização desses biofármacos. Embora existam alguns mAbs comerciais que não são de origem humana, como os murinos (-omab), incluindo o blinatumomabe, capromabe e moxetumomabe, a maioria dos mAbs que possuem peptídeos não-humanos pode desencadear reações alérgicas e a produção de anticorpos antifármacos (Bayer, 2019). Além disso, mAbs não humanos tendem a apresentar meia-vida curta e uma ligação fraca ao FcRn humano (Buss *et al.*, 2012).

Os mAbs humanizados são desenvolvidos ao inserir as regiões hipervariáveis murinas nas cadeias leves e pesadas de uma estrutura de anticorpo humano, garantindo maior compatibilidade com o organismo humano (Nelson; Dhimolea; Reichert, 2010). Essa abordagem de humanização é exemplificada no Natalizumabe. Por outro lado, os nanocorpos híbridos investigados neste trabalho apresentam uma combinação de FR camelídeos e as CDRs murinas. Dessa forma, os VHH/NTZ tendem a apresentar um número maior de resíduos

divergentes em relação à versão humanizada do fragmento VH/NTZ, o que pode aumentar o risco de reações imunogênicas em contextos terapêuticos.

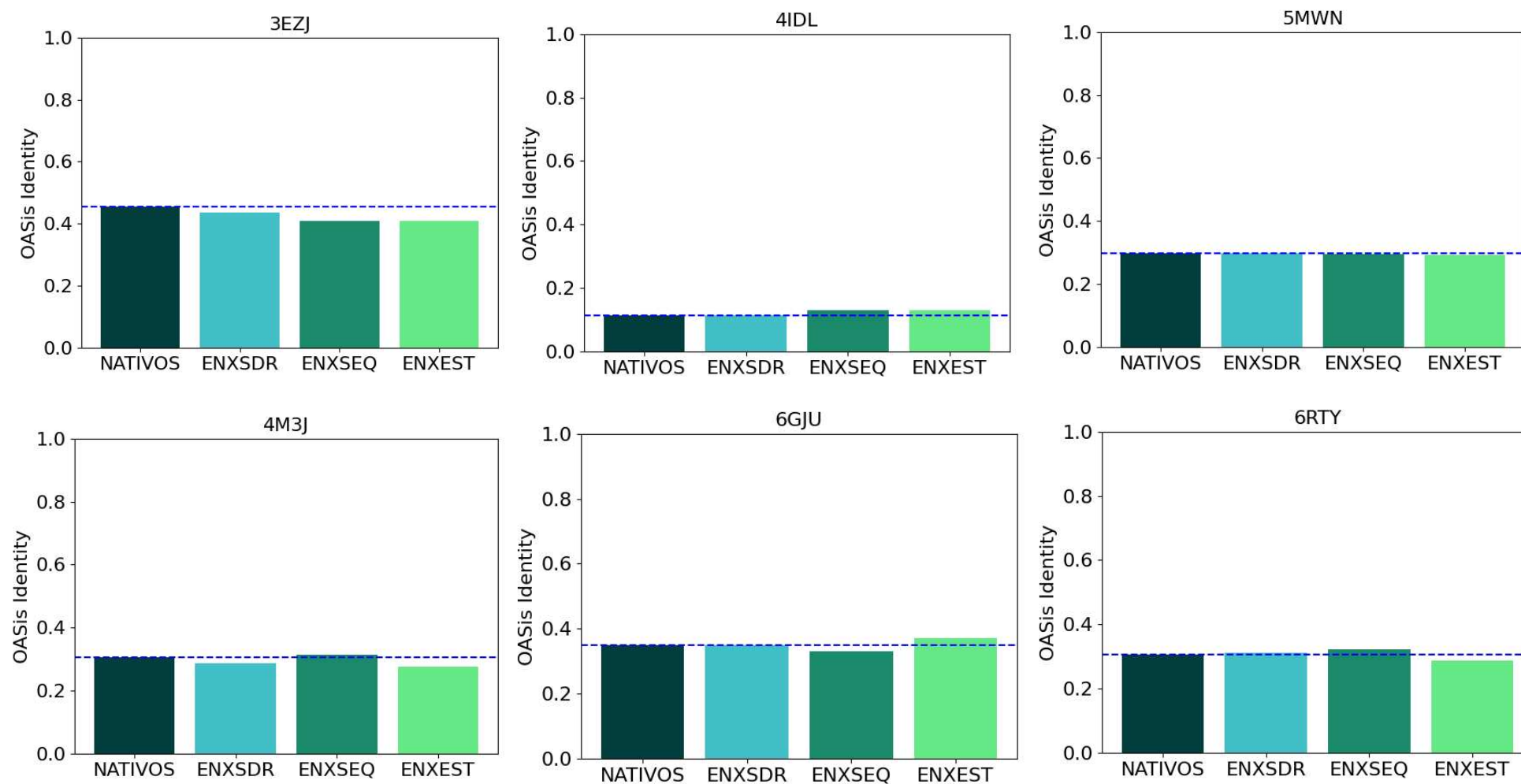
Entretanto, apesar de originários de camelídeos, os VHHs demonstram baixa imunogenicidade em humanos, característica que está diretamente relacionada à sua elevada homologia com a família III do gene VH humano (Mitchell; Colwell, 2018; Rossotti *et al.*, 2022), bem como outros fatores mencionados no **item 1.5**. Esta similaridade molecular intrínseca confere aos VHHs um perfil de compatibilidade imunológica superior aos mAbs clássicos, tornando processos adicionais de humanização frequentemente dispensáveis para seu uso clínico. Um exemplo é o **Ciltacabtagene**, terapia CAR-T não humanizada baseada em VHH aprovada para o tratamento do mieloma múltiplo (Chekol Abebe *et al.*, 2022). Casos como esse destacam a aptidão terapêutica para diversas aplicações biomédicas.

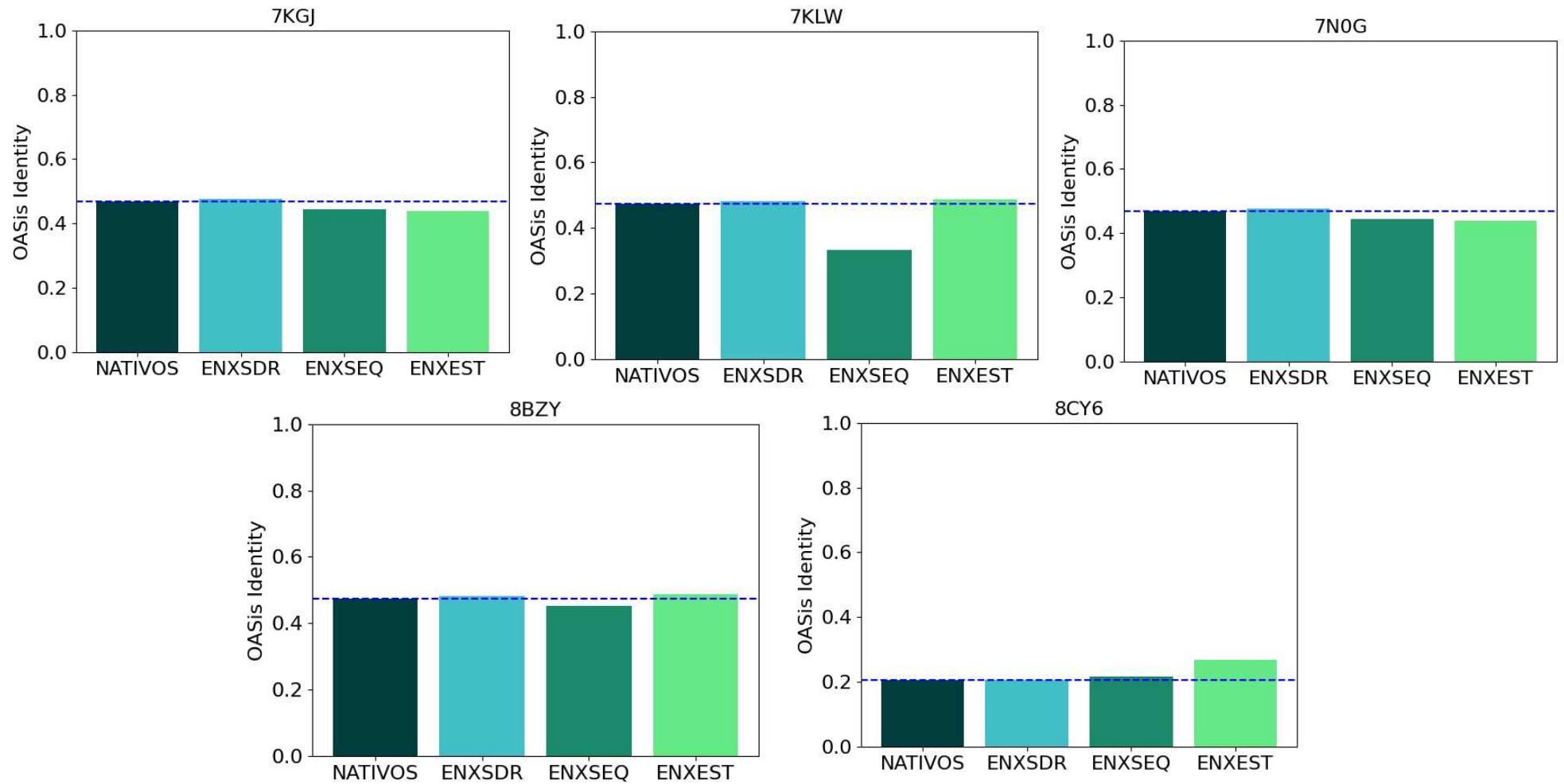
Para avaliar se os nanocorpos híbridos apresentaram uma redução nos níveis de "humanidade", foi utilizada a métrica *OASis Identity* do Biophi (detalhada na figura 37), que analisa a proporção de peptídeos do anticorpo que estão presentes em anticorpos humanos. As variações nas métricas de identidade humana entre as VHH/NTZ avaliadas ocorreram de forma heterogênea. Entre os ENXSDR, que preservaram as identidades humanas dos nativos, as estruturas com os maiores valores de *OASis Identity* foram o 3EZJ e o 8BZY, ambos com 62%, e o 6GJU com 61%, enquanto o 4IDL apresentou a menor identidade, com 55%.

Apesar das altas identidades, os valores de *OASis Percentil* para esses nanocorpos foram baixos, variando de 9% a 10%, indicando limitada representatividade clínica. Os ENXEST mostraram maior equilíbrio entre identidade e representatividade. As estruturas 7KLW e 8BZY apresentaram as maiores métricas de *OASis Identity*, ambas com 49%, seguidas pelo 7KGJ e pelo 7N0G, ambas com 44%. Os percentis para essas estruturas variaram de 14% a 17%, aproximando-se dos valores do FabH do Natalizumabe (17% de Percentil e 48% de Identity).

No grupo dos ENXSEQ, as estruturas 8BZY, 7N0G, 7KGJ e 3EZJ destacaram-se com as maiores métricas de *OASis Identity*, apresentando 45%, 44%, 44% e 41%, respectivamente. Os valores de *OASis Percentil* para essas estruturas variaram de 13% a 15%, novamente próximos aos valores do FabH do Natalizumabe. Portanto, esses resultados demonstram que os VHH/NTZ apresentam um equilíbrio variável entre identidade humana e representatividade clínica. Enquanto os ENXSDR mantêm as maiores identidades, os ENXEST e os ENXSEQ alcançam valores de *OASis Percentil* mais próximos aos padrões terapêuticos (VH/NTZ), reforçando seu potencial aplicabilidade clínica.

Figura 37 – Identidade Humana Obtidas Pelo Biophi para o VHH-IN e os VHH/NTZ





Fonte: Elaborado pelo Autor (2024), os gráficos expõem o *OASis Identity* do Biophi para VHH-IN e VHH/NTZ. No eixo X, estão representados os VHH-IN e os diferentes tipos de enxertos, enquanto no eixo Y, a métrica obtida pelo Biophi varia de 0 a 1, podendo ser interpretada como uma escala de 0% a 100%. Quanto mais próximo de 1, mais humano é o perfil dos peptídeos dos VHHs; quanto mais distante, menos humano. As cores utilizadas nos gráficos são verde petróleo escuro, azul turquesa claro, verde esmeralda escuro e verde primavera claro, correspondendo, respectivamente, aos dados dos VHHs NATIVOS, ENXSDR, ENXSEQ e ENXEST.

4.6 Seleção dos Complexos VHH/NTZ- α 4

A seleção dos melhores complexos foi realizada com base na pontuação DockQ para três tipos de enxertos. Utilizando o HADDOCK 2.4, foram gerados 12.000 complexos em docking cego e 12.000 em docking dirigido, empregando a estratégia semiflexível descrita por Harrison *et al.* (2002). Essa abordagem, que considera a flexibilidade das cadeias laterais, oferece maior precisão ao modelar interações moleculares em comparação a métodos baseados em corpo rígido (Harmalkar; Gray, 2021).

Embora 24.000 complexos VHH-NTZ/ α 4 tenham passados por refinamento explícito com solvente, não é garantia de posiciona-se nos epítomos esperados. Assim, para validar a estratégia e minimizar a seleção de *decoys*¹⁹, o re-docking cego e dirigido do domínio VH e domínios VH/VL foram realizados, avaliando a capacidade do HADDOCK 2.4 de reproduzir poses cristalográficas. Enquanto o re-docking cego gerou quatro complexos VH-VL/ α 4 e oito VH/ α 4, o docking dirigido produziu 30 e 34 complexos, respectivamente.

O docking dirigido gerou mais complexos devido às restrições impostas (Raval; Ganatra, 2022), concentrando a busca em resíduos específicos da subunidade α 4 que constitui o sítio de reconhecimento do NTZ. Em contraste, o docking cego, apesar de produzir menos complexos, explorou todo o domínio β -propeller da subunidade α 4, aumentando a probabilidade de localização espontânea no sítio de interação (Sunny; Jayaraj, 2022).

Assim, é possível traçar um paralelo com os dados apresentados por Schmitz *et al.* (2013), que indicam que a maior superfície de interação ao antígeno de um Fab clínico apresenta dificuldades em acessar epítomos côncavos, como o epítomo B da α 4 β 1. Essa limitação ocorre, em parte, devido ao choque estérico do domínio VL. Por outro lado, os VHH, com suas CDR3 estendidas de comprimento intermediário a longo, têm maior probabilidade de acessar esses epítomos côncavos. Um dos fatores que contribuem para essa vantagem é justamente a ausência do domínio VL (Zavrtanik *et al.*, 2018).

Logo, é válido sugerir que esse comportamento também se aplique ao domínio VH/NTZ, situação que explicaria a formação de um número maior de complexos com a subunidade α 4 em comparação ao domínio VH/VL. As pontuações atribuídas pelo DockQ aos complexos VH/ α 4, superiores a 0,70, indicam alta qualidade e posicionamento adequado no epítomo cristalográficos. Devido à ausência de estruturas resolvidas para os complexos VHH-

¹⁹ Estruturas biomoleculares computacionais que, embora satisfaçam critérios termodinâmicos e geométricos (ex.: baixa energia livre de interação e complementaridade conformacional), simbolizam falsos positivos que falham em constituir o estado biológico genuíno posto que podem não condizer às interações biologicamente funcionais.

NTZ/ α 4, foi utilizado o complexo artificial (fake) para avaliar as interações e a distribuição espacial. A seleção dos melhores complexos foi baseada na métrica DockQ, que combina Fnat, LRMS e iRMS em uma escala contínua, na qual valores próximos a 1.0 indicam alta qualidade (Basu; Wallner, 2016; Lensink; Wodak, 2013). A tabela 5 ilustra os complexos VHH/NTZ- α 4 que tiveram valores mais próximo de 1,0 Q.

Tabela 5 – Complexos VHH-NTZ/ α 4 Selecionados Através do DockQ

PDB	ENXEST			ENXSEQ			ENXSDR		
	NUM	DCQ	SCH	NUM	DCQ	SCH	NUM	DCQ	SCH
3EZJ	224	0.812	-772.51	64	0.406	-390.81	210	0.253	-0.253
4IDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4M3J	-	-	-	98	0.469	-358.02	-	-	-
5MWN	193	0.498	-272.30	-	-	-	249	0.246	-0.246
6GJU	9	0.351	-550.01	172	0.424	-261.50	-	-	-
7KGJ	81	0.498	-502.85	-	-	-	115	0.282	-0.282
7KLW	-	-	-	88	0.235	-312.56	-	-	-
7N0G	8	0.490	-519.87	-	-	-	-	-	-
8BZY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8CY6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Os complexos VHH/NTZ- α 4 foram selecionados com base na pontuação DockQ (DCQ), conforme análise realizada pelo Autor (2025). A nomenclatura adotada inclui: ENXEST (enxerto de estrutura), ENXSEQ (enxerto de sequência) e ENXSDR (enxerto de resíduos determinantes de especificidade), representando as diferentes estratégias de modelagem molecular empregadas. Cada complexo é identificado pelo código PDB correspondente ao nanocorpo no Protein Data Bank, seguido pelo número da pose (NUM) gerada pelo software HADDOCK. O critério de seleção principal foi a pontuação DCQ (DockQ), complementada pelo HADDOCK Score (SCH) para avaliação complementar da qualidade dos modelos.

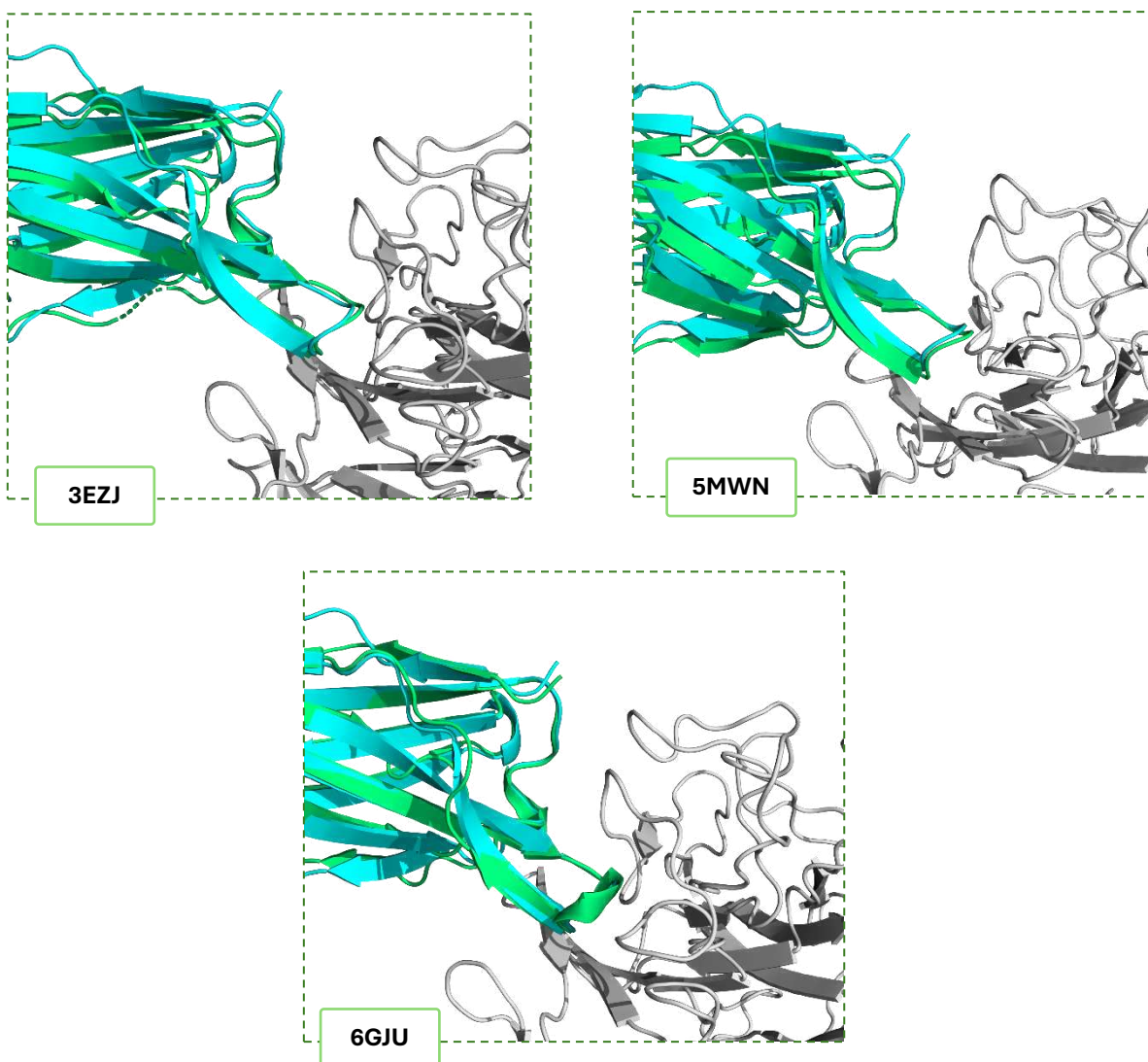
Entre os tipos de enxertos, considerando os critérios de qualidade pelo DockQ, aproximadamente 350 complexos guiados foram classificados como ENXEST, seguidos por ENXSEQ (98 complexos) e ENXSDR (82 complexos). O ENXEST também apresentou a maior proporção de complexos em docking cego (4.5%) em comparação com o ENXSEQ (4.2%) e o ENXSDR (1.6%).

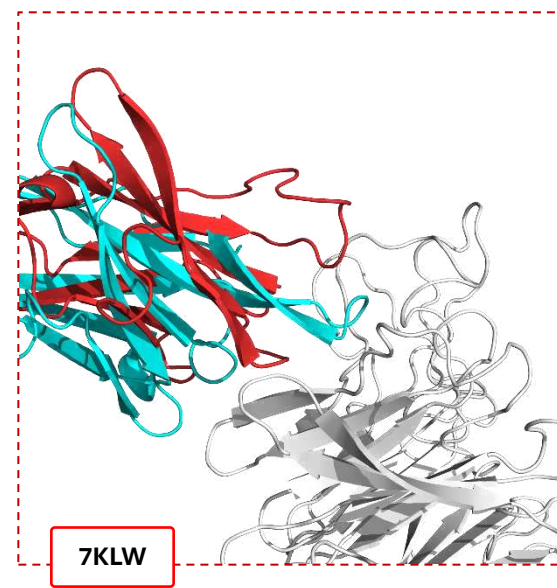
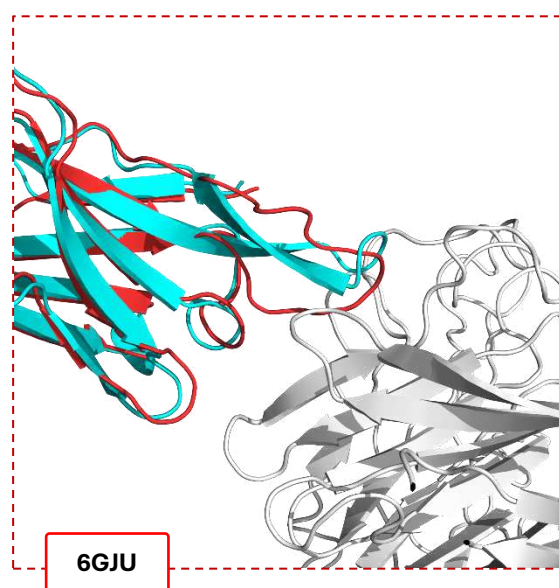
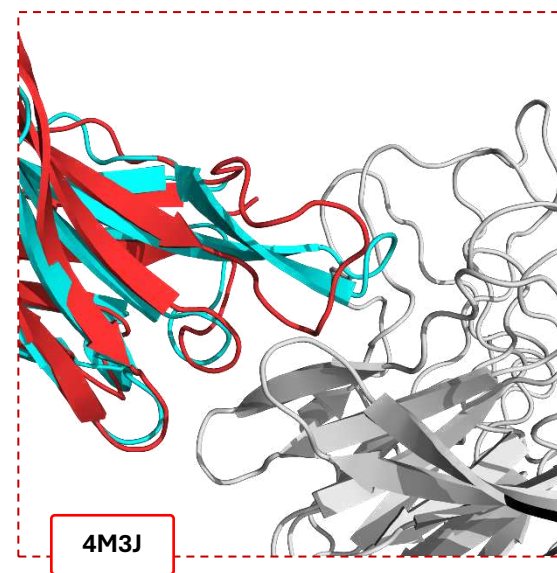
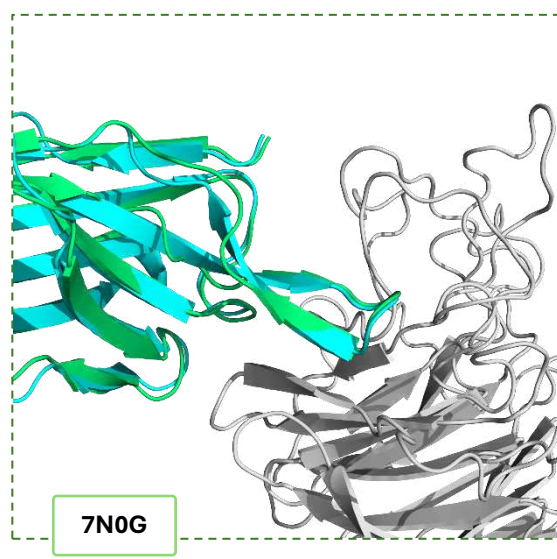
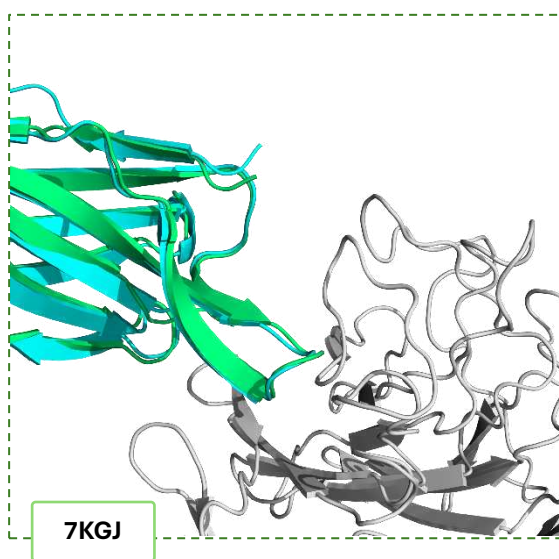
Essa superioridade é atribuída à preservação da conformação cristalizada das CDRs, que mantém 100% do formato estrutural, que segundo Yu; Schürpf; Springer, 2013 é essencial para a interação NTZ- α 4, como pode ser visto na figura 38. Por outro lado, embora os ENXSEQ compartilhem os mesmos resíduos CDRs e posições dos ENXEST, apresentam divergências conformacionais, especialmente na região H3, em relação ao domínio VH/NTZ. Essa diferença pode ter reduzido a quantidade de complexos formados. Enquanto as regiões CDRs H1 e H2 do ENXSEQ mantêm conformações semelhantes às do VH/NTZ, sua complementaridade estrutural é inferior à dos ENXEST.

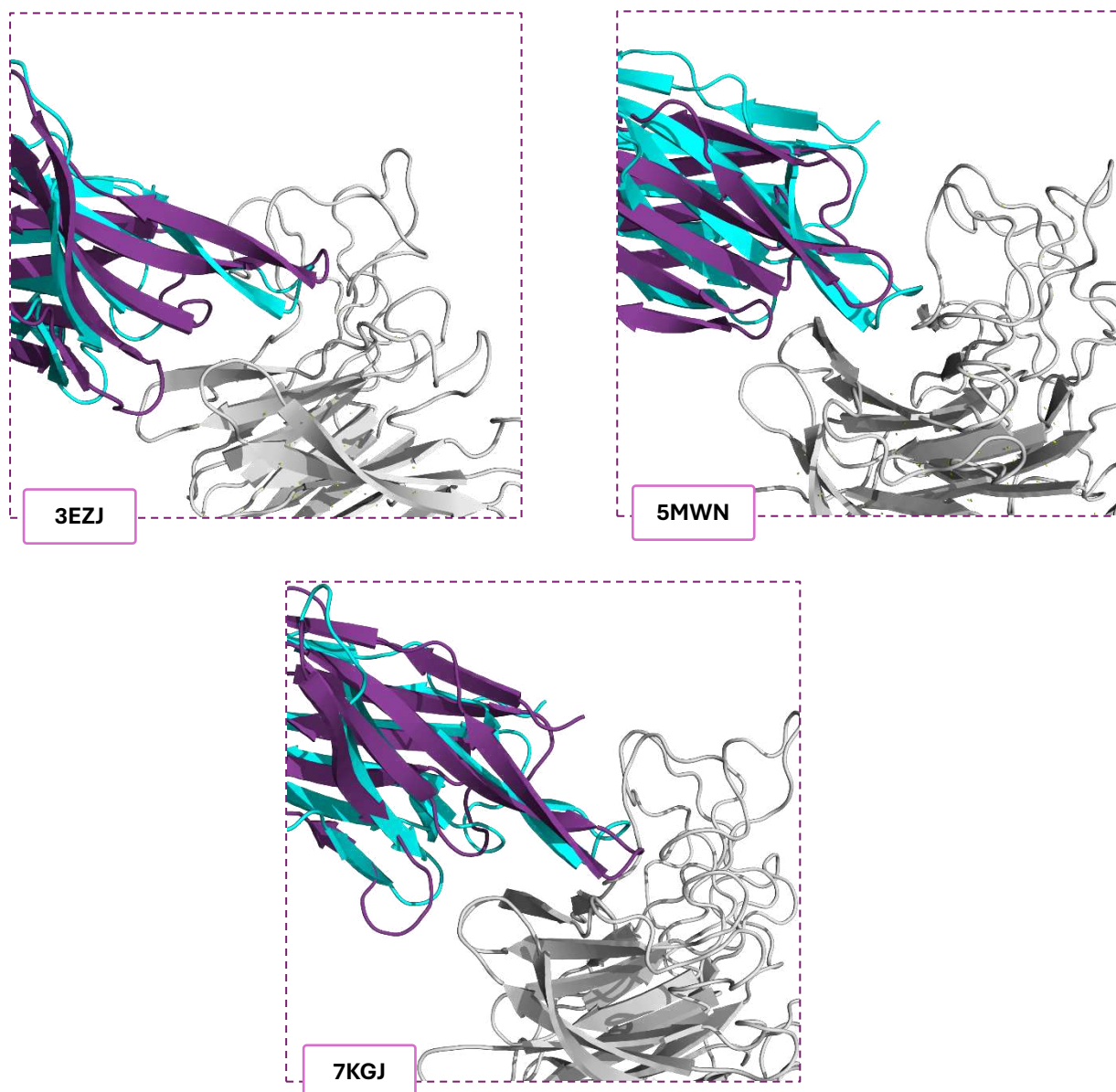
Os ENXSDR, embora apresentem estrutura semelhante à CDR3 VH/NTZ, mostraram eficiência limitada na formação de complexos devido dentre outros fatores a diferenças nos resíduos das CDRs em comparação com o VH/NTZ, o que comprometeu sua especificidade para a subunidade $\alpha 4$. Conforme discutido por Hirata *et al.* (2018), a tridimensionalidade da H3 é fundamental na interação com antígenos, e os resultados aqui encontrados estão de acordo com essa afirmação, pois observou-se que a H3-NTZ é crucial para o reconhecimento da subunidade $\alpha 4$, regulando diretamente sua funcionalidade estrutural e energética.

Além disso, notou-se que, no caso do VHH/NTZ, a conformação das CDRs exerce maior influência do que as populações de aminoácidos presentes nelas. Contudo, é importante ressaltar que, para um mimético “ideal” VHH/NTZ, o equilíbrio entre conformação e composição dos aminoácidos deve ser cuidadosamente considerado para otimizar sua interação com o antígeno.

Figura 38 – Interface dos Melhores Complexos VHH-NTZ/ $\alpha 4$ Segundo DockQ







Fonte: A ilustração gerada no *PyMOL* pelo Autor (2025) apresenta os complexos VHH-NTZ/ $\alpha 4$ com três tipos de enxertos sobrepostos ao domínio VH/NTZ de referência, onde um valor de DockQ de 0.23 indica a manutenção da especificidade antigênica, confirmando que as características essenciais dos VHH originais foram preservadas mesmo após a incorporação das CDRs do NTZ. Na representação, as interfaces dos enxertos estruturais aparecem em verde-cana, contrastando com os enxertos de sequência em vermelho e os resíduos determinantes de especificidade em roxo, enquanto o antígeno (subunidade $\alpha 4$ do domínio β -propeller) é exibido em cinza-claro e o domínio VH/NTZ em sua conformação cristalizada destaca-se em ciano, proporcionando uma visualização clara das interações moleculares e da integridade estrutural dos complexos.

4.7 Construções dos VHH/NTZ para Seleção

Esta seção descreve os parâmetros físico-químicos e biofísicos dos VHH antes e após o enxerto, destacando os modelos com melhor desempenho segundo as pontuações DockQ. Os complexos corretamente posicionados no sítio de interação da subunidade $\alpha 4$ —reconhecido

pelo VH/NTZ—fornecem bases para etapas futuras. Embora nem todos os VHH/NTZ tenham formado complexos aceitáveis, os melhores resultados são detalhados na Seção 4.6. A integração desses parâmetros estabelece fundamentos para o desenvolvimento de um VHH/NTZ anti- $\alpha 4$ e a otimização de estruturas iniciais.

Os complexos obtidos podem ser refinados *in silico* para aplicação *in vitro*, visando etapas pré-clínicas e clínicas na mitigação dos efeitos adversos do natalizumabe. As Tabelas 6, 7 e 8 compilam os resultados dos grupos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR, respectivamente, enquanto a Tabela 9 apresenta os valores dos VHH-IN. A Tabela 5 lista os melhores complexos VHH-NTZ/ $\alpha 4$ por tipo de enxerto, com destaque para modelos promissores (DockQ > 0,230). Todos os enxertos formaram complexos, mas apenas o ENXEST gerou modelos para todos os 11 nanocorpos, alguns com DockQ > 0,800. Os grupos ENXSEQ e ENXSDR também atingiram valores acima do corte, porém não para todos os nanocorpos.

Tabela 6 – Métricas Físico-Químicas, Biofísicas e DockQ dos ENXEST

ENXERTO DE ESTRUTURA (ENXEST)													
PDB	Propriedades										DockQ		
	HMD			STR			NTV	SLD	AGO	TRM	RID		
	PCT	IDD	FR	H1	H2	H3						ID	DCQ
3EZJ	0,125	0,408	E	L	T	E	0,792	1,022	0,174	67.0 °C	0,029	224.pdb	0.812
4IDL	0,007	0,129	E	L	T	E	0,609	0,943	0,155	68.9 °C	0,038	91.pdb	0.496
4M3J	0,072	0,276	E	L	T	E	0,738	1,085	0,166	64.3 °C	0,027	65.pdb	0.289
5MWN	0,077	0,293	E	L	T	E	0,794	0,911	0,178	71.9 °C	0,024	193.pdb	0.482
6GJU	0,106	0,370	E	L	T	E	0,828	1,047	0,176	65.7 °C	0,030	9.pdb	0.351
6RTY	0,075	0,286	E	L	T	E	0,766	1,148	0,143	67.2 °C	0,034	143.pdb	0.655
7KGJ	0,139	0,439	E	L	T	E	0,810	0,866	0,200	66.9 °C	0,023	60.pdb	0.497
7KLW	0,174	0,486	E	L	T	E	0,800	0,876	0,190	68.4 °C	0,023	68.pdb	0.598
7N0G	0,139	0,439	E	L	T	E	0,810	0,830	0,200	69.8 °C	0,023	8.pdb	0.490
8BZY	0,174	0,486	E	L	T	E	0,760	0,823	0,192	67.0 °C	0,023	132.pdb	0.685
8CY6	0,070	0,269	E	L	T	E	0,749	1,007	0,185	65.4 °C	0,029	118.pdb	0.269

Fonte: As tabelas elaboradas pelo Autor (2024) apresentam as propriedades físico-químicas e biofísicas de todos os nanocorpos, tanto antes quanto após a estratégia de enxerto. As siglas utilizadas incluem: TRM (termoestabilidade), HMD (humanidade), IDD (*OASis Identity*), PTC (*OASis Percentil*), SLD (solubilidade), AGO (agregação), NTV (natividade), STR (estrutura secundária), H1, H2 e H3 (correspondendo a CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente) e FR (*Framework*). Os estados de estrutura secundária são representados por H (hélice alfa), G (hélice 3-10), I (hélice pi), E (cadeia beta estendida), B (ponte beta), T (dobra), L (Loop), S (curvatura). Além disso, RID refere-se à região intrinsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Region*). Os termos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR correspondem, respectivamente, ao Enxerto Estrutural, Enxerto de Sequência e Enxerto de Resíduos Determinantes de Especificidade. As siglas ID e DCQ representam, respectivamente, a identidade do complexo gerado para cada tipo de enxerto e o valor de DockQ.

Tabela 7 – Métricas Físico-Químicas, Biofísicas e DockQ dos ENXSEQ

ENXERTO DE SEQUÊNCIA (ENXSEQ)													
PDB	Propriedades										DockQ		
	HMD			STR			NTV	SLD	AGO	TRM	RID		
	PCT	IDD	FR	H1	H2	H3						ID	DCQ
3EZJ	0,125	0,408	E	L	T	E	0,800	1,123	0,179	68.7 °C	0,045	64.pdb	0.406
4IDL	0,007	0,130	E	L	T	E	0,639	1,044	0,157	62.9 °C	0,045	104.pdb	0.330
4M3J	0,087	0,313	E	L	T	E	0,812	1,121	0,175	64.3 °C	0,031	98.pdb	0.469

5MWN	0,078	0,295	E	L	T	E	0,798	0,932	0,188	67.7 °C	0,025	249.pdb	0.259
6GJU	0,092	0,330	E	L	T	E	0,849	1,151	0,185	62.2 °C	0,025	172.pdb	0.424
6RTY	0,090	0,321	E	L	T	E	0,794	1,163	0,154	67.7 °C	0,028	177.pdb	0.478
7KGJ	0,143	0,443	E	L	T	E	0,818	0,988	0,209	61.5 °C	0,026	-	-
7KLW	0,093	0,333	E	L	T	E	0,820	0,746	0,191	69.6 °C	0,025	85.pdb	0.237
8BZY	0,149	0,452	E	L	T	E	0,804	0,913	0,218	65.4 °C	0,025	-	-
8CY6	0,045	0,217	E	L	T	E	0,763	1,006	0,187	64.6 °C	0,031	-	-

Fonte: As tabelas elaboradas pelo Autor (2024) apresentam as propriedades físico-químicas e biofísicas de todos os nanocorpos, tanto antes quanto após a estratégia de enxerto. As siglas utilizadas incluem: TRM (termoestabilidade), HMD (humanidade), IDD (*OASis Identity*), PTC (*OASis Percentil*), SLD (solubilidade), AGO (agregação), NTV (natividade), STR (estrutura secundária), H1, H2 e H3 (correspondendo a CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente) e FR (*Framework*). Os estados de estrutura secundária são representados por H (hélice alfa), G (hélice 3-10), I (hélice pi), E (cadeia beta estendida), B (ponte beta), T (dobra), L (Loop), S (curvatura). Além disso, RID refere-se à região intrinsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Region*). Os termos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR correspondem, respectivamente, ao Enxerto Estrutural, Enxerto de Sequência e Enxerto de Resíduos Determinantes de Especificidade. As siglas ID e DCQ representam, respectivamente, a identidade do complexo gerado para cada tipo de enxerto e o valor de DockQ.

Tabela 8 – Métricas Físico-Químicas, Biofísicas e DockQ dos ENXSDR

ENXERTO DE RESÍDUOS DETERMINANTE DE ESPECIFICIDADE (ENXSDR)													
PDB	Propriedades										DockQ		
	HMD			STR			NTV	SLD	AGO	TRM	RID	ID	
	PCT	IDD	FR	H1	H2	H3							
3EZJ	0,137	0,437	E	L	L	E	0,853	0,991	0,185	70.9 °C	0,031	210.pdb	0.253
4IDL	0,075	0,288	E	L	E	E	0,709	1,133	0,133	73.3 °C	0,036	63.pdb	0.339
4M3J	0,106	0,375	E	L	L	E	0,837	0,723	0,179	67.1 °C	0,031	-	-
5MWN	0,078	0,297	E	L	E	E	0,834	0,961	0,168	71.2 °C	0,036	249.pdb	0.246
6GJU	0,087	0,312	E	L	L	E	0,866	0,889	0,203	69.3 °C	0,031	-	-
6RTY	0,100	0,348	E	L	E	E	0,814	1,181	0,160	64.4 °C	0,034	-	-
7KGJ	0,172	0,482	E	L	T	E	0,831	0,969	0,194	66.0 °C	0,023	115.pdb	0.282
7KLW	0,169	0,477	E	L	L	E	0,838	0,865	0,196	65.9 °C	0,025	151.pdb	0.232
7N0G	0,087	0,313	E	L	L	E	0,822	0,883	0,203	71.8 °C	0,025	-	-
8BZY	0,172	0,482	E	L	T	E	0,807	0,581	0,215	67.9 °C	0,023	-	-
8CY6	0,038	0,205	E	L	E	E	0,807	1,081	0,190	63.6 °C	0,031	-	-

Fonte: As tabelas elaboradas pelo Autor (2024) apresentam as propriedades físico-químicas e biofísicas de todos os nanocorpos, tanto antes quanto após a estratégia de enxerto. As siglas utilizadas incluem: TRM (termoestabilidade), HMD (humanidade), IDD (*OASis Identity*), PTC (*OASis Percentil*), SLD (solubilidade), AGO (agregação), NTV (natividade), STR (estrutura secundária), H1, H2 e H3 (correspondendo a CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente) e FR (*Framework*). Os estados de estrutura secundária são representados por H (hélice alfa), G (hélice 3-10), I (hélice pi), E (cadeia beta estendida), B (ponte beta), T (dobra), L (Loop), S (curvatura). Além disso, RID refere-se à região intrinsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Region*). Os termos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR correspondem, respectivamente, ao Enxerto Estrutural, Enxerto de Sequência e Enxerto de Resíduos Determinantes de Especificidade. As siglas ID e DCQ representam, respectivamente, a identidade do complexo gerado para cada tipo de enxerto e o valor de DockQ.

Tabela 9 – Métricas Físico-Químicas e Biofísicas dos NATIVOS

NATIVOS											
PDB	Propriedades										
	HMD			STR			NTV	SLD	AGO	TRM	RID
	PCT	IDD	FR	H1	H2	H3					
3EZJ	0,150	0,455	E	L	E	E	0,893	0,899	0,188	67.6 °C	0,032
4IDL	0,004	0,113	E	L	E	E	0,730	1,395	0,136	72.1 °C	0,050
4M3J	0,083	0,305	E	L	E	E	0,823	0,583	0,198	64.1 °C	0,040

5MWN	0,0789	0,297	E	L	E	E	0,889	0,581	0,213	72.1 °C	0,030
6GJU	0,100	0,348	E	L	E	E	0,889	0,679	0,222	68.5 °C	0,037
6RTY	0,083	0,305	E	E	E	E	0,806	1,072	0,190	68.2 °C	0,035
7KGJ	0,160	0,469	E	L	E	E	0,780	0,959	0,204	61.9 °C	0,024
7KLW	0,164	0,473	E	L	E	E	0,796	0,924	0,204	65.9 °C	0,021
7N0G	0,160	0,469	E	L	E	E	0,780	0,937	0,211	70.3 °C	0,024
8BZY	0,164	0,473	E	L	E	E	0,793	-0,025	0,240	70.0 °C	0,025
8CY6	0,038	0,205	E	L	E	E	0,829	1,159	0,180	63.4 °C	0,044

Fonte: A tabela elaborada pelo Autor (2024) apresenta as propriedades físico-químicas e biofísicas de todos os nanocorpos, tanto antes quanto após a estratégia de enxerto. As siglas utilizadas incluem: TRM (termoestabilidade), HMD (humanidade), IDD (*OASis Identity*), PTC (*OASis Percentil*), SLD (solubilidade), AGO (agregação), NTV (natividade), STR (estrutura secundária), H1, H2 e H3 (correspondendo a CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente) e FR (*Framework*). Os estados de estrutura secundária são representados por H (hélice alfa), G (hélice 3-10), I (hélice pi), E (cadeia beta estendida), B (ponte beta), T (dobra), L (Loop), S (curvatura). Além disso, RID refere-se à região intrinsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Region*). Os termos ENXEST, ENXSEQ e ENXSDR correspondem, respectivamente, ao Enxerto Estrutural, Enxerto de Sequência e Enxerto de Resíduos Determinantes de Especificidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora ainda sejam necessários avanços para desenvolver um VHH mimético com alta afinidade e especificidade pela subunidade $\alpha 4$ da integrina $\alpha 4\beta 1$, capaz de antagonizá-la como o NTZ, os resultados atuais oferecem uma base sólida para essa construção. As variantes VHH/NTZ obtidas pelas estratégias ENXSEQ, ENXEST e ENXSDR, apesar de não serem miméticos completos do VH/NTZ, revelam-se híbridos promissores. Entre os principais achados, destacam-se sete aspectos relevantes. O primeiro (1) refere-se ao uso da natividade como critério de filtragem, o que se mostrou uma tática eficaz para a seleção de VHH/NTZ com menores variações em suas propriedades. Esse critério permitiu reduzir a amostra para cinco candidatos no caso do ENXEST, quatro no ENXSEQ e três no ENXSDR, tornando as etapas subsequentes mais gerenciáveis. O segundo ponto (2) envolve a pontuação DockQ, em que os 12 modelos selecionados (com menor variação da natividade) manifestaram escores mais próximos de 1.0, indicando melhor desempenho na formação dos complexos VHH/NTZ- $\alpha 4$.

Já o terceiro achado (3) diz respeito ao impacto das CDRs do VH/NTZ nas propriedades biofísicas e físico-químicas dos VHHs. Essas regiões influenciam de forma distinta o comportamento das variantes, dependendo de múltiplos fatores, entre eles: (i) as propriedades intrínsecas específicas, (ii) o tipo de enxerto utilizado, (iii) o *framework* adotado e (iv) as características individuais de cada uma das CDRs do VH/NTZ.

O quarto aspecto (4) destaca o desempenho da estratégia ENXEST, que apresentou maior especificidade ao antígeno, além de ganhos sutis em solubilidade, termoestabilidade e redução na agregação. Em quinto lugar (5), a estratégia ENXSEQ mostrou avanços expressivos em solubilidade e especificidade intermediária, mas com prejuízos relevantes, como

desestabilização estrutural (sobretudo na região crítica da CDRH3) e menor estabilidade térmica. Ambos os enxertos oferecem benefícios distintos, mas ainda requerem ajustes para superarem suas limitações.

O sexto ponto (6) refere-se à estratégia ENXSDR, que se mostrou mais consistente, promovendo melhorias integradas em natividade, termoestabilidade, estabilidade estrutural e humanidade. Apesar da solubilidade inferior às estratégias SEQ e EST, ainda alguns modelos superou os VHH-IN. Esses avanços reforçam seu potencial na criação de VHHs miméticos estáveis para o tratamento da EM. No entanto, a baixa formação de complexos com a subunidade $\alpha 4$ indica a necessidade de ajustes para aprimorar a especificidade.

Por fim, o sétimo achado (7) aponta que a transferência direta das CDRs VH/NTZ para um *scaffold* VHH, especialmente quando sua conformação é alterada para o tipo *kinked*, pode comprometer algumas das propriedades intrínsecas dos VHHs, mesmo quando a especificidade é preservada. Em contrapartida, a substituição pontual por resíduos-chave (SDRs) mostrou-se mais conservadora quanto à manutenção das características originais dos VHHs, ainda que isso venha acompanhado de uma redução na especificidade.

6 PERSPECTIVAS E PROJEÇÕES

As perspectivas deste trabalho ainda estão centradas no âmbito *in silico*, com foco em diversas direções importantes. Uma delas é a caracterização das interações moleculares entre os resíduos de interface dos complexos VHH-NTZ/ $\alpha 4$, avaliando se os VHH/NTZ selecionados conseguem reproduzir as interações observadas no complexo VH-NTZ/ $\alpha 4$. Além disso, será essencial investigar o comportamento dinâmico das CDRs em diferentes contextos estruturais, incluindo o VH/NTZ, VH-VL/NTZ, bem como as CDRs dos enxertos ENXSEQ, ENXEST e ENXSDR, para verificar se alcançam a conformação desejada, especialmente da H3/NTZ, e analisar se o comportamento das CDRs difere na ausência do domínio VH ou em outros contextos de FR. Por fim, deve-se incluir também a análise da estabilidade dos complexos por meio de simulações de dinâmica molecular e a realização de mutações pontuais nas CDRs dos VHH/NTZ selecionados nos resíduos não-*hotspots*²⁰, com o objetivo de otimizar a estabilidade e a especificidade em relação à subunidade $\alpha 4$.

²⁰ Resíduos *hotspots* são aminoácidos em interfaces de interação molecular que contribuem desproporcionalmente para a estabilidade termodinâmica do complexo (ΔG), sendo essenciais para tal. Em anticorpos, concentram-se comumente nas CDRs, onde estabelecem interações críticas com o antígeno. Sua mutação, mesmo conservadora, pode usualmente reduzir de forma drástica a afinidade, especificidade e estabilidade, definindo-os como núcleos funcionais. Em contraste, resíduos não-*hotspots* têm contribuição energética marginal, atuando em interações periféricas ou estruturais, sem impactos expressivos na função. Essa distinção é crucial para engenharia de proteínas, direcionando otimizações como maturação de afinidade, estabilidade ou humanização de anticorpos.

REFERÊNCIAS

- ABANADES, Brennan *et al.* ImmuneBuilder: deep-learning models for predicting the structures of immune proteins. **Communications Biology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 575, 2023.
- ADIYAMAN, Recep; MCGUFFIN, Liam J. ReFOLD3: refinement of 3D protein models with gradual restraints based on predicted local quality and residue contacts. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 49, n. W1, p. W589–W596, 2021.
- ALBUQUERQUE, Aline de Oliveira *et al.* Computationally-obtained structural insights into the molecular interactions between Pidilizumab and binding partners DLL1 and PD-1. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s.l.], v. 40, n. 14, p. 6450–6462, 2022.
- ALOISI, Francesca; GIOVANNONI, Gavin; SALVETTI, Marco. Epstein-Barr virus as a cause of multiple sclerosis: opportunities for prevention and therapy. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 338–349, 2023.
- ARBABI-GHAHROUDI, Mehdi. Camelid single-domain antibodies: historical perspective and future outlook. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 8, p. 1589, 2017.
- BAHRAMI DIZICHEH, Zahra; CHEN, I.-Ling; KOENIG, Patrick. VHH CDR-H3 conformation is determined by VH germline usage. **Communications Biology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 864, 2023.
- BALDO, Brian A. Immune- and non-immune-mediated adverse effects of monoclonal antibody therapy: a survey of 110 approved antibodies. **Antibodies**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 17, 2022.
- BANNAS, Peter; HAMBACH, Julia; KOCH-NOLTE, Friedrich. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 8, p. 1603, 2017.
- BARRAZA, Jorge Iñaki Gamero *et al.* Applications of molecular dynamics simulation: a review. **Electrical Resistance-Based Measurements as Fatigue Damage Indicators in Metals**, [s.l.], p. 1, 2024.
- BASTOLLA, Ugo; ROMAN, H. Eduardo; VENDRUSCOLO, Michele. Neutral evolution of model proteins: diffusion in sequence space and overdispersion. **Journal of Theoretical Biology**, [s.l.], v. 200, n. 1, p. 49–64, 1999.
- BASU, Sankar; WALLNER, Björn. DockQ: a quality measure for protein-protein docking models. **PLoS One**, [s.l.], v. 11, n. 8, p. e0161879, 2016.
- BATHULA, Nuthan V.; BOMMADEVARA, Hemashree; HAYES, Jerrard M. Nanobodies: the future of antibody-based immune therapeutics. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 109–122, 2021.
- BAYER, Virginia. An overview of monoclonal antibodies. **Seminars in Oncology Nursing**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 150927, out. 2019.

BENKERT, Pascal; TOSATTO, Silvio C. E.; SCHOMBURG, Dietmar. QMEAN: a comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 71, n. 1, p. 261–277, 2008.

BJORNEVIK, Kjetil *et al.* Epstein–Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 160–171, 2023.

BURGOYNE, Nicholas J.; JACKSON, Richard M. Predicting protein function from surface properties. In: From protein structure to function with bioinformatics. Dordrecht: **Springer Netherlands**, 2009. p. 167–186.

BUSS, Nicholas APS *et al.* Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current Opinion in Pharmacology**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 615–622, 2012.

CASTELLI, María Sofía; MCGONIGLE, Paul; HORNBY, Pamela J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacology Research & Perspectives**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. e00535, 2019.

CHAPPELL, Mary *et al.* Literature review and meta-analysis of natalizumab therapy for the treatment of highly active relapsing remitting multiple sclerosis in the ‘suboptimal therapy’ patient population. **Journal of the Neurological Sciences**, [s.l.], p. 123172, 2024.

CHASTNEY, Megan R. *et al.* The role and regulation of integrins in cell migration and invasion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 147–167, 2025.

CHATAWAY, Jeremy; MILLER, David H. Natalizumab therapy for multiple sclerosis. **Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 19–28, 2013.

CHAVES, Elton JF *et al.* Structure-based computational design of antibody mimetics: challenges and perspectives. **FEBS Open Bio**, [s.l.], 2024.

CHEKOL ABEBE, Endeshaw *et al.* Ciltacabtagene autoleucel: The second anti-BCMA CAR T-cell therapeutic armamentarium of relapsed or refractory multiple myeloma. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 13, p. 991092, 2022.

CHEN, Hedi *et al.* Accurate prediction of CDR-H3 loop structures of antibodies with deep learning. **Elife**, [s.l.], v. 12, p. RP91512, 2024.

CHEN, Jieming; SAWYER, Nicholas; REGAN, Lynne. Protein–protein interactions: General trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. **Protein Science**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 510–515, 2013.

CHEN, Justin *et al.* Localizing frustration in proteins using all-atom energy functions. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 123, n. 21, p. 4497–4504, 2019.

CHEN, Vincent B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s.l.], v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.

CHEN, Yu-Lei *et al.* Research progresses and applications of fluorescent protein antibodies: a review focusing on nanobodies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 5, p. 4307, 2023.

CHI, Xiying; LI, Yue; QIU, Xiaoyan. V (D) J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. **Immunology**, [s.l.], v. 160, n. 3, p. 233–247, 2020.

CHOTHIA, Cyrus *et al.* Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. **Nature**, v. 342, n. 6252, p. 877–883, 1989.

CHOUHAN, Priya *et al.* Anti-IL-10 antibody humanization by SDR grafting with enhanced affinity to neutralize the adverse response of interleukin-10. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 5, p. 148, 2022.

DAËRON, Marc. The function of antibodies. **Immunological Reviews**, [s.l.], 2024.

DALKAS, Georgios A. *et al.* Cation– π , amino– π , π – π , and H-bond interactions stabilize antigen–antibody interfaces. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 82, n. 9, p. 1734–1746, 2014.

DE LAET, Marie; GILIS, Dimitri; ROOMAN, Marianne. Stability strengths and weaknesses in protein structures detected by statistical potentials: Application to bovine seminal ribonuclease. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 84, n. 1, p. 143–158, 2016.

DE MEYER, Thomas; MUYLDERMANS, Serge; DEPICKER, Ann. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 263–270, 2014.

DE TAEYE, Steven W.; RISPENS, Theo; VIDARSSON, Gestur. The ligands for human IgG and their effector functions. **Antibodies**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 30, 2019.

DEHOUCK, Yves *et al.* Sequence-structure signals of 3D domain swapping in proteins. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 330, n. 5, p. 1215–1225, 2003.

DEL CONTE, Alessio *et al.* RING 4.0: faster residue interaction networks with novel interaction types across over 35,000 different chemical structures. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 52, n. W1, p. W306–W312, 2024.

DEL SOL, Antonio; CARBONELL, Pablo. The modular organization of domain structures: insights into protein–protein binding. **PLoS Computational Biology**, [s.l.], v. 3, n. 12, p. e239, 2007.

DIGHIRI, Ibrahim M. *et al.* An overview of the history, pathophysiology, and pharmacological interventions of multiple sclerosis. **Cureus**, [s.l.], v. 15, n. 1, 2023.

DOLK, Edward *et al.* Induced refolding of a temperature denatured llama heavy-chain antibody fragment by its antigen. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 59, n. 3, p. 555–564, 2005.

DUGGAN, Sean. Caplacizumab: first global approval. **Drugs**, [s.l.], v. 78, p. 1639–1642, 2018.

- DUNBAR, James *et al.* SAbDab: the structural antibody database. **Nucleic Acids Research**, [s.I], v. 42, n. D1, p. D1140-D1146, 2014.
- DUNBAR, James; DEANE, Charlotte M. ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification. **Bioinformatics**, [s.I], v. 32, n. 2, p. 298-300, 2016.
- DURRANT, Tom N.; VAN DEN BOSCH, Marion T.; HERS, Ingeborg. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ outside-in signaling. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, [s.I], v. 130, n. 14, p. 1607-1619, 2017.
- EIJSINK, Vincent G. H. *et al.* Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, [s.I], v. 113, n. 1-3, p. 105–120, 2004.
- EL SALAMOUNI, Nehad S. *et al.* Nanobody engineering: computational modelling and design for biomedical and therapeutic applications. **FEBS Open Bio**, [s.I], 2024.
- ERRENI, Marco *et al.* Nanobodies as versatile tool for multiscale imaging modalities. **Biomolecules**, [s.I], v. 10, n. 12, p. 1695, 2020.
- FERNÁNDEZ-QUINTERO, Monica L. *et al.* Characterizing the diversity of the CDR-H3 loop conformational ensembles in relationship to antibody binding properties. **Frontiers in Immunology**, [s.I], v. 9, p. 3065, 2019.
- FERRAZ, Matheus V. F. *et al.* Design of nanobody targeting SARS-CoV-2 spike glycoprotein using CDR-grafting assisted by molecular simulation and machine learning. **bioRxiv**, [s.I], p. 2024.09.30.615772, 2024.
- FERREIRA, Elenilze F. B. *et al.* An overview of the $\alpha 4\beta 1$ integrin and the potential therapeutic role of its antagonists. **Current Medicinal Chemistry**, [s.I], v. 28, n. 29, p. 5884–5895, 2021.
- FERREIRO, Diego U.; KOMIVES, Elizabeth A.; WOLYNES, Peter G. Frustration in biomolecules. **Quarterly Reviews of Biophysics**, [s.I], v. 47, n. 4, p. 285–363, 2014.
- FINKELSTEIN, Alexei V. *et al.* Protein folding problem: enigma, paradox, solution. **Biophysical Reviews**, [s.I], v. 14, n. 6, p. 1255–1272, 2022.
- FUKUDA, Jun *et al.* Factors to govern soluble and insoluble aggregate-formation in monoclonal antibodies. **Analytical Sciences**, [s.I], v. 31, n. 12, p. 1233–1240, 2015.
- GAO, Qiong; SUN, Zhaolin; FANG, Deyu. Integrins in human hepatocellular carcinoma tumorigenesis and therapy. **Chinese Medical Journal**, [s.I], v. 136, n. 3, p. 253–268, 2023.
- GILON, Chaim *et al.* Synthesis and pharmacological characterization of Visabron, a backbone cyclic peptide dual antagonist of $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)/ $\alpha 9\beta 1$ integrin for therapy of multiple sclerosis. **JACS Au**, [s.I], v. 1, n. 12, p. 2361–2376, 2021.
- GOGESCH, Patricia *et al.* The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.I], v. 22, n. 16, p. 8947, 2021.

- GÓMEZ-MULAS, Atanasio *et al.* Thermodynamic versus kinetic basis for the high conformational stability of nanobodies for therapeutic applications. **FEBS Letters**, [s.I], 2024.
- GONNELLI, Giulia; ROOMAN, Marianne; DEHOUCK, Yves. Structure-based mutant stability predictions on proteins of unknown structure. **Journal of Biotechnology**, [s.I], v. 161, n. 3, p. 287–293, 2012.
- GORDON, Gemma L. *et al.* Prospects for the computational humanization of antibodies and nanobodies. **Frontiers in Immunology**, [s.I], v. 15, p. 1399438, 2024.
- GOSWAMI, Sumit *et al.* Developments and challenges for mAb-based therapeutics. **Antibodies**, [s.I], v. 2, n. 3, p. 452–500, 2013.
- GOVAERT, Jochen *et al.* Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. **Journal of Biological Chemistry**, [s.I], v. 287, n. 3, p. 1970–1979, 2012.
- GREENBERG, Andrew S. *et al.* A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. **Nature**, [s.I], v. 374, n. 6518, p. 168–173, 1995.
- GREENSPAN, Neil S. Epitopes, paratopes, and other topes 30 years on: understanding what we are talking about. **Human Immunology**, [s.I], 2023.
- GROSSMANN, Lutz; MCCLEMENTS, David Julian. Current insights into protein solubility: A review of its importance for alternative proteins. **Food Hydrocolloids**, [s.I], v. 137, p. 108416, 2023.
- GUEST, Johnathan D. *et al.* An expanded benchmark for antibody-antigen docking and affinity prediction reveals insights into antibody recognition determinants. **Structure**, [s.I], v. 29, n. 6, p. 606–621.e5, 2021.
- HAKI, Maha *et al.* Review of multiple sclerosis: Epidemiology, etiology, pathophysiology, and treatment. **Medicine**, [s.I], v. 103, n. 8, p. e37297, 2024.
- HAMERS-CASTERMAN, C. T. S. G. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, [s.I], v. 363, n. 6428, p. 446–448, 1993.
- HARMALKAR, Ameya; GRAY, Jeffrey J. Advances to tackle backbone flexibility in protein docking. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.I], v. 67, p. 178–186, 2021.
- HARMSSEN, Michiel M.; DE HAARD, Hans J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.I], v. 77, p. 13–22, 2007.
- HARRISON, Sharon J. *et al.* Efficient generation of α (1,3) galactosyltransferase knockout porcine fetal fibroblasts for nuclear transfer. **Transgenic Research**, [s.I], v. 11, p. 143–150, 2002.
- HASHIZUME, Yoshinobu *et al.* Methods for obtaining better diffractive protein crystals: from sample evaluation to space crystallization. **Crystals**, [s.I], v. 10, n. 2, p. 78, 2020.

HASSANZADEH-GHASSABEH, Gholamreza *et al.* Nanobodies and their potential applications. **Nanomedicine**, [s.I], v. 8, n. 6, p. 1013–1026, 2013.

HECKER, Michael *et al.* Genetic, environmental and lifestyle determinants of accelerated telomere attrition as contributors to risk and severity of multiple sclerosis. **Biomolecules**, [s.I], v. 11, n. 10, p. 1510, 2021.

HEIDARI, Mohammad Mehdi *et al.* CDR grafting and site-directed mutagenesis approach for the generation and affinity maturation of Anti-CD20 nanobody. **Molecular Biology Reports**, [s.I], v. 51, n. 1, p. 751, 2024.

HENRY, Kevin A.; MACKENZIE, C. Roger. Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints. In: **MAbs**. Taylor & Francis, 2018. p. 815–826.

HIRATA, Fumio *et al.* Perspective: Structural fluctuation of protein and Anfinsen's thermodynamic hypothesis. **The Journal of Chemical Physics**, [s.I], v. 148, n. 2, 2018.

HOLEHOUSE, Alex S.; KRAGELUND, Birthe B. The molecular basis for cellular function of intrinsically disordered protein regions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.I], v. 25, n. 3, p. 187–211, 2024.

HONORATO, Rodrigo V. *et al.* The HADDOCK2.4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes. **Nature Protocols**, [s.I], p. 1–23, 2024.

HOU, Qingzhen *et al.* SWOTein: a structure-based approach to predict stability strengths and weaknesses of proteins. **Bioinformatics**, [s.I], v. 37, n. 14, p. 1963–1971, 2021.

HUANG, Bin *et al.* Protein structure prediction: challenges, advances, and the shift of research paradigms. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [s.I], v. 21, n. 5, p. 913–925, 2023.

HUANG, Wen-Juan; CHEN, Wei-Wei; ZHANG, Xia. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s.I], v. 13, n. 6, p. 3163–3166, 2017.

HWANG, William Ying Khee; FOOTE, Jefferson. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**, [s.I], v. 36, n. 1, p. 3–10, 2005.

IKEUCHI, Emina *et al.* Delicate balance among thermal stability, binding affinity, and conformational space explored by single-domain VHH antibodies. **Scientific Reports**, [s.I], v. 11, n. 1, p. 20624, 2021.

INOUE, Hidetoshi *et al.* Affinity transfer to a human protein by CDR3 grafting of camelid VHH. **Protein Science**, [s.I], v. 20, n. 12, p. 1971–1981, 2011.

JIMÉNEZ-GARCÍA, Brian *et al.* PDB-tools Web: A user-friendly interface for the manipulation of PDB files. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.I], v. 89, n. 3, p. 330–335, 2021.

JUMA, Salma Nassor *et al.* Shark new antigen receptor (IgNAR): Structure, characteristics and potential biomedical applications. **Cells**, [s.I], v. 10, n. 5, p. 1140, 2021.

KADRY, Yasmin A.; CALDERWOOD, David A. Structural and signaling functions of integrins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, [s.l.], v. 1862, n. 5, p. 183206, 2020.

KANCHANAWONG, Pakorn; CALDERWOOD, David A. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 142-161, 2023.

KANDARI, Divya; BHATNAGAR, Rakesh. Antibody engineering and its therapeutic applications. **International Reviews of Immunology**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 156-183, 2023.

KASHMIRI, Syed VS *et al.* SDR grafting—a new approach to antibody humanization. **Methods**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 25-34, 2005.

KHALID, Zunera *et al.* IgNAR antibody: Structural features, diversity and applications. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 121, p. 467-477, 2022.

KIM, Jeffrey Yong Joon *et al.* Nanobodies: robust miniprotein binders in biomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 195, p. 114726, 2023.

KINOSHITA, Seisho *et al.* Molecular basis for thermal stability and affinity in a VHH: Contribution of the framework region and its influence in the conformation of the CDR3. **Protein Science**, [s.l.], v. 31, n. 11, p. e4450, 2022.

KITAO, Akio. Principal component analysis and related methods for investigating the dynamics of biological macromolecules. **J - Multidisciplinary Scientific Journal**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 298-317, 2022.

KÖHLER, Georges; MILSTEIN, Cesar. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, [s.l.], v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KOHLER, Heinz; PASHOV, Anastas; KIEBER-EMMONS, Thomas. The promise of anti-idiotypic revisited. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 10, p. 808, 2019.

KRINGELUM, Jens Vindahl *et al.* Structural analysis of B-cell epitopes in antibody: protein complexes. **Molecular Immunology**, [s.l.], v. 53, n. 1-2, p. 24-34, 2013.

KUHLE, Jens *et al.* Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: a large multicentre study. **Multiple Sclerosis Journal**, [s.l.], v. 21, n. 8, p. 1013-1024, 2015.

KUMMER, Daniel; EBNET, Klaus. Moléculas de adesão juncional (JAMs): a conexão JAM-integrina. **Células**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 25, 2018.

KUNZ, Patrick *et al.* The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 7934, 2018.

KUNZ, Sarah *et al.* NANOBODY® Molecule, a Giga Medical Tool in Nanodimensions. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 17, p. 13229, 2023.

KURODA, Daisuke *et al.* Structural classification of CDR-H3 revisited: a lesson in antibody modeling. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 73, n. 3, p. 608-620, 2008.

KUSOVA, Aleksandra M. *et al.* Effect of protein–protein interactions on translational diffusion of spheroidal proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.I/], v. 23, n. 16, p. 9240, 2022.

LASSMANN, Hans. Multiple sclerosis pathology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s.I/], v. 8, n. 3, p. a028936, 2018.

LASSMANN, Hans. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, [s.I/], v. 333, n. 1-2, p. 1-4, 2013.

LE BASLE, Yoann *et al.* Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.I/], v. 109, n. 1, p. 169-190, 2020.

LEE, Byungkook; RICHARDS, Frederic M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. **Journal of Molecular Biology**, [s.I/], v. 55, n. 3, p. 379-IN4, 1971.

LENSINK, Marc F.; WODAK, Shoshana J. Docking, scoring, and affinity prediction in CAPRI. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.I/], v. 81, n. 12, p. 2082-2095, 2013.

LEODORI, Giorgio *et al.* Insight into motor fatigue mechanisms in natalizumab treated multiple sclerosis patients with wearing off. **Scientific Reports**, [s.I/], v. 14, n. 1, p. 17654, 2024.

LEREIM, Ragnhild Reehorst *et al.* Natalizumab promotes anti-inflammatory and repair effects in multiple sclerosis. **PLOS ONE**, [s.I/], v. 19, n. 3, p. e0300914, 2024.

LI, Jiaqi *et al.* Affinity maturation of antibody fragments: A review encompassing the development from random approaches to computational rational optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.I/], v. 247, p. 125733, 2023.

LI, Ye; ZHANG, Xianren; CAO, Dapeng. The role of shape complementarity in the protein-protein interactions. **Scientific Reports**, [s.I/], v. 3, n. 1, p. 3271, 2013.

LIAMPAS, Andreas *et al.* Effects of natalizumab on oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **Neurological Sciences**, [s.I/], p. 1-13, 2024.

LIN, Xiaoqian; LI, Xiu; LIN, Xubo. A review on applications of computational methods in drug screening and design. **Molecules**, [s.I/], v. 25, n. 6, p. 1375, 2020.

LIU, Jinny L. *et al.* Enhanced production of a single domain antibody with an engineered stabilizing extra disulfide bond. **Microbial Cell Factories**, [s.I/], v. 14, p. 1-8, 2015.

LIU, Yafei *et al.* Affinity transfer of nanobodies to a CDR3 only single-domain antibody fragment NBL42. **International Journal of Biomedical Engineering**, [s.I/], p. 200-206, 219, 2022.

LOWELL, Clifford A.; MAYADAS, Tanya N. Overview: studying integrins in vivo. **Integrin and Cell Adhesion Molecules: Methods and Protocols**, [s.I/], p. 369-397, 2012.

LU, Ruei-Min *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, [s.l.], v. 27, p. 1-30, 2020.

LUNDAHL, Mimmi LE *et al.* Aggregation of protein therapeutics enhances their immunogenicity: causes and mitigation strategies. **RSC Chemical Biology**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 1004-1020, 2021.

LUO, Bing-Hao; CARMAN, Christopher V.; SPRINGER, Timothy A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annual Review of Immunology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 619-647, 2007.

LUPYAN, Dmitry; LEO-MACIAS, Alejandra; ORTIZ, Angel R. A new progressive-iterative algorithm for multiple structure alignment. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 21, n. 15, p. 3255-3263, 2005.

MADSEN, Andreas V. *et al.* Structural trends in antibody-antigen binding interfaces: a computational analysis of 1833 experimentally determined 3D structures. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 23, p. 199-211, 2024.

MAIOROV, Vladimir N.; CRIPPEN, Gordon M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 235, n. 2, p. 625-634, 1994.

MAKKER, Jitin; HOMMES, Daniel W. Etrolizumab for ulcerative colitis: the new kid on the block?. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 567-572, 2016.

MALONE, Mary K. *et al.* The immunopathology of B lymphocytes during stroke-induced injury and repair. In: **Seminars in Immunopathology**, Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2023. p. 315-327.

MARCHAND, Anthony; VAN HALL-BEAUVAIS, Alexandra K.; CORREIA, Bruno E. Computational design of novel protein–protein interactions—An overview on methodological approaches and applications. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l.], v. 74, p. 102370, 2022.

MARTINS, Alexander C. *et al.* Food and Drug Administration (FDA) Approvals of Biological Drugs in 2023. **Biomedicines**, [s.l.], v. 12, n. 9, p. 1992, 2024.

MARTINS, José C. *et al.* Downsizing antibodies: Towards complementarity-determining region (CDR)-based peptide mimetics. **Bioorganic Chemistry**, [s.l.], v. 119, p. 105563, 2022.

MATEEV, Emilio *et al.* Validation through re-docking, cross-docking and ligand enrichment in various well-resolved MAO-B receptors. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (Int J Pharm Sci Res)**, [s.l.], v. 13, p. 1000-1007, 2022.

MCGUFFIN, Liam J.; ALHARBI, Shuaa MA. ModFOLD9: a web server for independent estimates of 3D protein model quality. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], p. 168531, 2024.

MENDOZA, Matthew N. *et al.* Role of a noncanonical disulfide bond in the stability, affinity, and flexibility of a VHH specific for the *Listeria* virulence factor InlB. **Protein Science**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 990-1003, 2020.

- MERLE, Nicolas S. *et al.* Integrins meet complement: The evolutionary tip of an iceberg orchestrating metabolism and immunity. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 178, n. 14, p. 2754-2770, 2021.
- MICSONAI, András *et al.* BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 50, n. W1, p. W90-W98, 2022.
- MIKOCZIOVA, Ivana; GREIFF, Victor; SOLLID, Ludvig M. Immunoglobulin germline gene variation and its impact on human disease. **Genes & Immunity**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 205-217, 2021.
- MIR, Manzoor A. *et al.* Nanobodies: The “magic bullets” in therapeutics, drug delivery and diagnostics. **Human Antibodies**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 29-51, 2020.
- MIRICK, G. R. *et al.* A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HABA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 251, 2004.
- MIRZAEI, Mahsa *et al.* Design and Production of a Novel Anti-PD-1 Nanobody by CDR Grafting and Site-Directed Mutagenesis Approach. **Molecular Biotechnology**, [s.l.], p. 1-9, 2024.
- MITCHELL, Laura S.; COLWELL, Lucy J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 86, n. 7, p. 697-706, 2018.
- MITTERNACHT, Simon. FreeSASA: An open source C library for solvent accessible surface area calculations. **F1000Research**, [s.l.], v. 5, 2016.
- MOREA, Veronica *et al.* Conformations of the third hypervariable region in the VH domain of immunoglobulins. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 275, n. 2, p. 269-294, 1998.
- MOREIRA, Irina S.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. Computational determination of the relative free energy of binding—application to alanine scanning mutagenesis. **Molecular Materials with Specific Interactions—Modeling and Design**, [s.l.], p. 305-339, 2007.
- MORROW, Sarah A. *et al.* Use of natalizumab in persons with multiple sclerosis: 2022 update. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s.l.], v. 65, p. 103995, 2022.
- MOSCH, Romy; GUCHELAAR, Henk-Jan. Immunogenicity of monoclonal antibodies and the potential use of HLA haplotypes to predict vulnerable patients. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 13, p. 885672, 2022.
- MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. Atlas of MS 3rd Edition – Part 1: Mapping Multiple Sclerosis Around the World – Key Epidemiology Findings. Londres: MSIF, 2020. Disponível em: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms#about>. Acesso em: 10 jan. 2025.
- MURALIDHARAN, Kumar Kandadi *et al.* Population pharmacokinetics and target engagement of natalizumab in patients with multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 57, n. 8, p. 1017-1030, 2017.

MUYLDERMANS, Serge. Applications of nanobodies. **Annual Review of Animal Biosciences**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 401-421, 2021.

MYUNG, Yoochan; PIRES, Douglas EV; ASCHER, David B. Understanding the complementarity and plasticity of antibody–antigen interfaces. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 39, n. 7, p. btad392, 2023.

NAKAMURA, Kunio *et al.* Natalizumab reduces loss of gray matter and thalamic volume in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A post hoc analysis from the randomized, placebo-controlled AFFIRM trial. **Multiple Sclerosis Journal**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 687-695, 2024.

NASSAR, Roy *et al.* The protein folding problem: the role of theory. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 433, n. 20, p. 167126, 2021.

NELSON, Aaron L.; DHIMOLEA, Eugen; REICHERT, Janice M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 767-774, 2010.

NGUYEN, Viet *et al.* Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. **Immunogenetics**, [s.l.], v. 54, p. 39-47, 2002.

NICAISE, Magali *et al.* Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. **Protein Science**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 1882-1891, 2004.

NOVOTNY, Jiri; SHARP, Kim. Electrostatic fields in antibodies and antibody/antigen complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s.l.], v. 58, n. 3, p. 203-224, 1992.

OCHI, Hirofumi. Role of B cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 220-227, 2021.

OELLER, Marc *et al.* Sequence-based prediction of pH-dependent protein solubility using CamSol. **Briefings in Bioinformatics**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. bbad004, 2023.

OLECHNOVIČ, Kliment; VENCLOVAS, Česlovas. VoroMQA web server for assessing three-dimensional structures of proteins and protein complexes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 47, n. W1, p. W437-W442, 2019.

ORESTE, Umberto; AMETRANO, Alessia; COSCIA, Maria Rosaria. On origin and evolution of the antibody molecule. **Biology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 140, 2021.

OSAJIMA, Tomonori *et al.* Computational and statistical study on the molecular interaction between antigen and antibody. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s.l.], v. 53, p. 128-139, 2014.

OXVIG, Claus; SPRINGER, Timothy A. Experimental support for a β -propeller domain in integrin α -subunits and a calcium binding site on its lower surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 95, n. 9, p. 4870-4875, 1998.

PACHECO, Sabino *et al.* Affinity transfer to the archaeal extremophilic Sac7d protein by insertion of a CDR. **Protein Engineering, Design & Selection**, [s.l.], v. 27, n. 10, p. 431-438, 2014.

PALMA, Juliana; PIERDOMINICI-SOTTILE, Gustavo. On the uses of PCA to characterise molecular dynamics simulations of biological macromolecules: basics and tips for an effective use. **ChemPhysChem**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. e202200491, 2023.

PANG, Xiaocong *et al.* Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1, 2023.

PATEL, Riya *et al.* Significance of antibody numbering systems in the development of antibody engineering. **Hum Antibodies**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 71-80, 2023.

PAULING, Linus; COREY, Robert B.; BRANSON, Herman R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 205-211, 1951.

PENG, Hung-Pin *et al.* Antibody CDR amino acids underlying the functionality of antibody repertoires in recognizing diverse protein antigens. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 12555, 2022.

PENG, Hung-Pin *et al.* Origins of specificity and affinity in antibody–protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 111, n. 26, p. E2656-E2665, 2014.

PERCHIACCA, Joseph M.; BHATTACHARYA, Moumita; TESSIER, Peter M. Mutational analysis of domain antibodies reveals aggregation hotspots within and near the complementarity determining regions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 79, n. 9, p. 2637-2647, 2011.

PERCHIACCA, Joseph M.; TESSIER, Peter M. Engineering aggregation-resistant antibodies. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 263-286, 2012.

PLANAS-IGLESIAS, Joan *et al.* AggreProt: a web server for predicting and engineering aggregation prone regions in proteins. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], p. gkae420, 2024.

POUSTFOROOSH, Alireza *et al.* Modeling and affinity maturation of an anti-CD20 nanobody: a comprehensive in-silico investigation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 582, 2023.

PRIHODA, David *et al.* BioPhi: A platform for antibody design, humanization, and humanness evaluation based on natural antibody repertoires and deep learning. In: **MAbs**, [s.l.]: Taylor & Francis, 2022. p. 2020203.

PROSPER, Felipe *et al.* Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. **The Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 101, n. 11, p. 2456-2467, 1998.

PUCCI, Fabrizio *et al.* Protein thermostability prediction within homologous families using temperature-dependent statistical potentials. **PloS One**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. e91659, 2014.

PUCCI, Fabrizio; KWASIGROCH, Jean Marc; ROOMAN, Marianne. SCooP: an accurate and fast predictor of protein stability curves as a function of temperature. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 33, n. 21, p. 3415-3422, 2017.

PULIDO, Rafael *et al.* Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. Correlation with distinct alpha 4 epitopes. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 266, n. 16, p. 10241-10245, 1991.

PUTHENPURAIL, Aselin *et al.* A brief synopsis of monoclonal antibody for the treatment of various groups of diseases. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. 14, 2021.

QU, Liang *et al.* Analysis of binding modes of antigen–antibody complexes by molecular mechanics calculation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s.l.], v. 61, n. 5, p. 2396-2406, 2021.

RAMAKRISHNAN, Krithika *et al.* Glycosylation increases active site rigidity leading to improved enzyme stability and turnover. **The FEBS Journal**, [s.l.], v. 290, n. 15, p. 3812-3827, 2023.

RAMARAJ, Thiruvarangan *et al.* Antigen–antibody interface properties: Composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s.l.], v. 1824, n. 3, p. 520-532, 2012.

RAMON, Aubin *et al.* Assessing antibody and nanobody nativeness for hit selection and humanization with AbNatiV. **Nature Machine Intelligence**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 74-91, 2024.

RAPIDNOVOR. The Hunt for Novel Therapeutics Through Antibody Engineering. Published: November 1, 2022. Disponível em: <https://www.rapidnovor.com/novel-therapeutics-antibody-engineering/>. Acesso em: 19 ago. 2024.

RAVAL, Keval; GANATRA, Tejas. Basics, types and applications of molecular docking: A review. **IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 12-16, 2022.

RAYMER, Michael L. *et al.* Predicting conserved water-mediated and polar ligand interactions in proteins using a K-nearest-neighbors genetic algorithm. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 265, n. 4, p. 445-464, 1997.

REDDY, D. Jagadeeswara; GUNTUKU, Girijasankar; PALLA, Mary Sulakshana. Advancements in nanobody generation: Integrating conventional, in silico, and machine learning approaches. **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], 2024.

REIS, Pedro BPS *et al.* Antibody-antigen binding interface analysis in the big data era. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s.l.], v. 9, p. 945808, 2022.

ROBERTS, Christopher J. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 7, p. 372-380, 2014.

ROOMAN, Marianne J.; KOCHER, Jean-Pierre A.; WODAK, Shoshana J. Prediction of protein backbone conformation based on seven structure assignments: influence of local interactions. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 221, n. 3, p. 961-979, 1991.

ROSSOTTI, Martin A. *et al.* Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. **The FEBS Journal**, [s.l.], v. 289, n. 14, p. 4304-4327, 2022.

ROSTKOWSKI, Michał *et al.* Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. **BMC Structural Biology**, [s.I/], v. 11, p. 1-6, 2011.

RUTLEDGE, Nakisha S.; MULLER, William A. Understanding molecules that mediate leukocyte extravasation. **Current Pathobiology Reports**, [s.I/], v. 8, p. 25-35, 2020.

SAFARZADEH KOZANI, Pouya *et al.* Nanobody-based CAR-T cells for cancer immunotherapy. **Biomarker Research**, [s.I/], v. 10, n. 1, p. 24, 2022.

SAKAI, Takahiro *et al.* Structural and thermodynamic insights into antibody light chain tetramer formation through 3D domain swapping. **Nature Communications**, [s.I/], v. 14, n. 1, p. 7807, 2023.

SCHLIMGEN, Roman R. *et al.* Structural basis for selectivity and antagonism in extracellular GPCR-nanobodies. **Nature Communications**, [s.I/], v. 15, n. 1, p. 4611, 2024.

SCHMITZ, Karl R. *et al.* Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. **Structure**, [s.I/], v. 21, n. 7, p. 1214-1224, 2013.

SEELIG, Joachim; SEELIG, Anna. Protein Unfolding—Thermodynamic Perspectives and Unfolding Models. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.I/], v. 24, n. 6, p. 5457, 2023.

SELA-CULANG, Inbal; KUNIK, Vered; OFRAN, Yanay. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, [s.I/], v. 4, p. 302, 2013.

SELLEBJERG, Finn *et al.* Exploring potential mechanisms of action of natalizumab in secondary progressive multiple sclerosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, [s.I/], v. 9, n. 1, p. 31-43, 2016.

SERRA LÓPEZ-MATENCIO, Jose M. *et al.* Evaluation of natalizumab pharmacokinetics and pharmacodynamics: toward individualized doses. **Frontiers in Neurology**, [s.I/], v. 12, p. 716548, 2021.

SGRO, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. **Toxicology**, [s.I/], v. 105, n. 1, p. 23-29, 1995.

SHEEHAN, Kate *et al.* Antibody Aggregation: A Problem Within the Biopharmaceutical Industry and Its Role in AL Amyloidosis Disease. **The Protein Journal**, [s.I/], p. 1-20, 2024.

SHEN, Bo; DELANEY, M. Keegan; DU, Xiaoping. Inside-out, outside-in, and inside–outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. **Current Opinion in Cell Biology**, [s.I/], v. 24, n. 5, p. 600-606, 2012.

SHUID, Ahmad N.; KEMPSTER, Robert; MCGUFFIN, Liam J. ReFOLD: a server for the refinement of 3D protein models guided by accurate quality estimates. **Nucleic Acids Research**, [s.I/], v. 45, n. W1, p. W422-W428, 2017.

SIDHU, Sachdev S.; FELLOUSE, Frederic A. Synthetic therapeutic antibodies. **Nature Chemical Biology**, [s.I/], v. 2, n. 12, p. 682-688, 2006.

SIRCAR, Aroop *et al.* Analysis and modeling of the variable region of camelid single-domain antibodies. **The Journal of Immunology**, [s.I/], v. 186, n. 11, p. 6357-6367, 2011.

SLACK, R. J.; *et al.* Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l], v. 21, n. 1, p. 60-78, 2022.

SORMANNI, Pietro; *et al.* The s2D method: simultaneous sequence-based prediction of the statistical populations of ordered and disordered regions in proteins. **Journal of Molecular Biology**, [s.l], v. 427, n. 4, p. 982-996, 2015.

SPANÒ, Alvisè; *et al.* Rin maker: a fast, versatile and reliable tool to determine residue interaction networks in proteins. **BMC Bioinformatics**, [s.l], v. 24, n. 1, p. 336, 2023.

SUNDBERG, Eric J.; MARIUZZA, Roy A. Molecular recognition in antibody-antigen complexes. **Advances in Protein Chemistry**, [s.l], v. 61, p. 119-160, 2002.

SUNNY, Sharon; JAYARAJ, P. B. Protein–protein docking: Past, present, and future. **The Protein Journal**, [s.l], v. 41, n. 1, p. 1-26, 2022.

SVILENOV, Hristo L.; *et al.* Approaches to expand the conventional toolbox for discovery and selection of antibodies with drug-like physicochemical properties. In: **MAbs**, [s.l]: Taylor & Francis, 2023. p. 2164459.

TANG, Huaping; GAO, Yuan; HAN, Jiangyuan. Application progress of the single domain antibody in medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l], v. 24, n. 4, p. 4176, 2023.

TISSINO, Erika; *et al.* The VLA-4 integrin is constitutively active in circulating chronic lymphocytic leukemia cells via BCR autonomous signaling: a novel anchor-independent mechanism exploiting soluble blood-borne ligands. **Leukemia**, [s.l], p. 1-14, 2024.

TOKURIKI, Nobuhiko; TAWFIK, Dan S. Stability effects of mutations and protein evolvability. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l], v. 19, n. 5, p. 596-604, 2009.

TURNER, Kendrick B.; *et al.* Enhanced stabilization of a stable single domain antibody for SEB toxin by random mutagenesis and stringent selection. **Protein Engineering, Design & Selection**, [s.l], v. 27, n. 3, p. 89-95, 2014.

TVAROŠKA, Igor; KOZMON, Stanislav; KÓŇA, Juraj. Molecular modeling insights into the structure and behavior of integrins: A review. **Cells**, [s.l], v. 12, n. 2, p. 324, 2023.

UZIELA, Karolis; *et al.* ProQ3D: improved model quality assessments using deep learning. **Bioinformatics**, [s.l], v. 33, n. 10, p. 1578-1580, 2017.

VALDÉS-TRESANCO, Mario S.; *et al.* Structural insights into the design of synthetic nanobody libraries. **Molecules**, [s.l], v. 27, n. 7, p. 2198, 2022.

VALDÉS-TRESANCO, Mario S.; *et al.* Structural modeling of nanobodies: a benchmark of state-of-the-art artificial intelligence programs. **Molecules**, [s.l], v. 28, n. 10, p. 3991, 2023.

VAN DER LEE, Robin; *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. **Chemical Reviews**, [s.l], v. 114, n. 13, p. 6589-6631, 2014.

VAN DIJK, Aalt DJ; BOELEN, Rolf; BONVIN, Alexandre MJJ. Data-driven docking for the study of biomolecular complexes. **The FEBS Journal**, [s.l], v. 272, n. 2, p. 293-312, 2005.

- VAN DIJK, Aalt DJ; BONVIN, Alexandre MJJ. Solvated docking: introducing water into the modelling of biomolecular complexes. **Bioinformatics**, [s.l/], v. 22, n. 19, p. 2340-2347, 2006.
- VAN KEMPEN, Zoé LE; *et al.* Varicella zoster-associated acute retinal necrosis and central nervous system complications in natalizumab treated MS patients. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s.l/], v. 50, p. 102838, 2021.
- VANGONE, A.; *et al.* Sense and simplicity in HADDOCK scoring: Lessons from CASP-CAPRI round 1. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l/], v. 85, n. 3, p. 417-423, 2017.
- VASILEIOU, Eleni S.; FITZGERALD, Kathryn C. Multiple sclerosis pathogenesis and updates in targeted therapeutic approaches. **Current Allergy and Asthma Reports**, [s.l/], v. 23, n. 9, p. 481-496, 2023.
- VIMER, Shay; *et al.* Direct-MS analysis of antibody-antigen complexes. **Proteomics**, [s.l/], v. 21, n. 21-22, p. 2000300, 2021.
- VISHWAKARMA, Poonam; *et al.* VHH structural modelling approaches: A critical review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l/], v. 23, n. 7, p. 3721, 2022.
- WANG, Meryl; *et al.* Local and global anatomy of antibody-protein antigen recognition. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l/], v. 31, n. 5, p. e2693, 2018.
- WANG, Sheng; *et al.* RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. **Nucleic Acids Research**, [s.l/], v. 44, n. W1, p. W430-W435, 2016.
- WARD, Melanie; GOLDMAN, Myla D. Epidemiology and pathophysiology of multiple sclerosis. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, [s.l/], v. 28, n. 4, p. 988-1005, 2022.
- WARNKE, Clemens; *et al.* Natalizumab exerts a suppressive effect on surrogates of B cell function in blood and CSF. **Multiple Sclerosis Journal**, [s.l/], v. 21, n. 8, p. 1036-1044, 2015.
- WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, [s.l/], v. 35, n. suppl_2, p. W407-W410, 2007.
- WIENDL, Heinz; *et al.* Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG): position statement on disease-modifying therapies for multiple sclerosis (white paper). **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, [s.l/], v. 14, p. 17562864211039648, 2021.
- WIJMA, Hein J.; FLOOR, Robert J.; JANSSEN, Dick B. Structure-and sequence-analysis inspired engineering of proteins for enhanced thermostability. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l/], v. 23, n. 4, p. 588-594, 2013.
- WOLF PÉREZ, Adriana-Michelle; *et al.* Assessment of therapeutic antibody developability by combinations of in vitro and in silico methods. **Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols**, [s.l/], p. 57-113, 2022.
- WONG, Wing Ki; LEEM, Jinwoo; DEANE, Charlotte M. Comparative analysis of the CDR loops of antigen receptors. **Frontiers in Immunology**, [s.l/], v. 10, p. 2454, 2019.

WRIGHT, Peter E.; DYSON, H. Jane. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 293, n. 2, p. 321-331, 1999.

XIE, Minli; SCHOWEN, Richard L. Secondary structure and protein deamidation. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 8-13, 1999.

YU, Yamei *et al.* Structural specializations of $\alpha 4\beta 7$, an integrin that mediates rolling adhesion. **Journal of Cell Biology**, [s.l.], v. 196, n. 1, p. 131-146, 2012.

YU, Yamei; SCHÜRPF, Thomas; SPRINGER, Timothy A. How natalizumab binds and antagonizes $\alpha 4$ integrins. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 288, n. 45, p. 32314-32325, 2013.

YURCHENCO, Peter D.; KULCZYK, Arkadiusz W. Polymerizing Laminins in Development, Health and Disease. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], p. 107429, 2024.

ZAVRTANIK, Uroš *et al.* Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 430, n. 21, p. 4369-4386, 2018.

ZELTZ, Cédric; GULLBERG, Donald. The integrin–collagen connection—a glue for tissue repair?. **Journal of cell science**, [s.l.], v. 129, n. 4, p. 653-664, 2016.

ZHANG, Siran; WU, Longjiang; DANG, Mei. Antibody mimetics: the next generation antibody engineering, a retrospective and prospective analysis. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 2300532, 2024.

ZHAO, Lufei *et al.* Prediction of protein secondary structure by the improved TCN-BiLSTM-MHA model with knowledge distillation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 16488, 2024.

ZONG, Fanjie *et al.* Abalign: a comprehensive multiple sequence alignment platform for B-cell receptor immune repertoires. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 51, n. W1, p. W17-W24, 2023.

ZUNDLER, Sebastian *et al.* Hobit-and Blimp-1-driven CD4⁺ tissue-resident memory T cells control chronic intestinal inflammation. **Nature immunology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 288-300, 2019.

ANEXO A – STATUS CLÍNICO DOS NANOCORPOS

Nanocorpos como terapêuticos				
<i>Nome</i>	<i>Doença</i>	<i>Antígeno Alvo</i>	<i>Status clínico</i>	<i>Empresa</i>
131I-GMIB-Anti-HER2-VHH1	Carcinoma de Mama	HER2	Fase I	Precirix, Brussels, Belgium
68-GaNOTA-Anti-HER2 VHH1	Carcinoma de Mama	HER2	Fase II	Universitair Ziekenhuis Brussel, Brussels, Belgium
AD-214	Fibrose Idiopática Pulmonar	CXCR4	Pré-clínica	AdAlta Ltd. Biotechnology Research, Australia
ALX-0171	Infecção do Trato Respiratório Inferior	Vírus Sincicial Respiratório	Fase II	Ablynx, Ghent, Belgium
ALX0651	Mieloma Múltiplo e Linfoma não Hodgkins	CXCR4	Fase I	Ablynx, Ghent, Belgium
ALX-0761	Psoríase	IL17A, IL17F	Fase II	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
aPD1-MSLN-CAR T	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células	PD-1	Fase I	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
ARP1, VHH batch 203027	Diarreia	Rotavírus	Fase II	International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Dhaka, Bangladesh
BCMA CAR-T	Mieloma Recidivamente Refratário	CD8/4-1BB	Fase I	Henan Cancer Hospital, China
BI 655088	Doenças Renais	CX3CR1	Fase I	Ablynx, Ghent, Belgium
BI 836880	Tumores Sólidos	VEGF, Ang2	Fase I	Ablynx, Ghent, Belgium
Calplacizumab	Púrpura Trombocitopênica Trombótica Adquirida	Fator Von Willebrand	Aprovado	Ablynx, Ghent, Belgium
CD19/CD20 CAR-T	Linfoma de Células B	CD19/CD20	Fase I	Henan Cancer Hospital, China
CD22 CAR-T	Linfoma de Células B	CD22	Fase I	Henan Cancer Hospital, China
CD7 CAR-T	Linfoma T Linfoblástico	CD7	Fase I	Henan Cancer Hospital, China
Ciltacabtagene	Mieloma Múltiplo Refratário	Antígeno de maturação de células B	Aprovado	Janssen Research & Development, LLC, Raritan, United States
Envafolimab	Tumores Sólidos Avançados MSI-H ou dMMR	PD-L1	Aprovado	Alphamab Oncology
Gefurulimab (ALXN1720)	Miasentia Grave	Autoanticorpos Contra Receptores de Acetilcolina	Fase III	Alexion Pharmaceuticals, Boston, United States
KN035	Carcinoma Hepatocelular	PD-L1	Fase I	Alphamab Biopharmaceuticalsm China
KN046	Câncer de pulmão escamoso de células não pequenas	PD-L1/TLA4	Fase III	Alpha,ab Biopharmaceuticalsm China

KN046	CHC Avançado	PD-L1/CTLA-4	Fase I	Alphamab Biopharmaceuticals, China
LCAR-B28M	Mieloma Múltiplo	BCMA	Fase II	Janssen Research & Development, LLC, Raritan, United States
LCAR-B38M	Mieloma Múltiplo Refratário/Recidivante	Antígeno de Maturação de Células B	Fase II	Janssen Research & Development, LLC, Raritan, United States
LMN-101	Campilobacteriose	<i>Campylobacter jejuni</i>	Fase II	Lumen Bioscience, Inc., Seattle, United States
Lulizumab, BMS931699	Lúpus Eritematoso Sistêmico	CD28-B7	Fase II	Bristol-Myers Squibb
M6495	Osteoartrite	Desintegrina e metaloproteinase com Motivos de Trombospondina-5	Fase I	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
M6495	Osteoartrite	ADAMTS5	Fase I	Ablynx, Ghent, Belgium
Nb V565	Doença de Crohn	TNF- α	Fase II	VHsquared Ltd., Copenhagen, Denmark
NbBI.1031020	Alzheimer	A- β	Fase I	Boehringer Ingelheim, Alemanha
Ozoralizumab	Artrite Reumatoide	TNF α -HSA-TNF α	Aprovado	Taisho Pharmaceuticals, Tokyo, Japan
PF-05230905	Doenças inflamatórias	TNF- α	Fase I	Ablynx, Ghent, Belgium
Sonelokimab (M1095)	Psoríase	IL-17A, IL-17F	Fase II	Bond Avillion 2 Development LP, London, England
TAS266	Tumores Sólidos Avançados	DR5	Fase I	Novartis Pharmaceuticals, Suíça
TXBA	Linfoma Primário do SNC	TfR1	Pré-clínica	Ossianix, Reino Unido
V565	Colite Ulcerativa	TNF- α	Fase II	VHsquared Ltd, Reino Unido
Vobarilizumab (ALX-0061)	Artrite Reumatoide, Lúpus Sistêmicos	Receptor de Interleucina 6	Fase II	Ablynx, Ghent, Belgium

Fonte: Elaborado por Jin *et al.*, (2023) e adaptado por Autor (2024).

ANEXO B – LISTA DE CARACTERÍSTICAS EXPERIMENTAIS DO CRISTAL 4IRZ CONTENDO DO DOMÍNIO FAB E A SUBUNIDADE A4 DA INTEGRINA A4B1

Dados Experimentais					
Dados da cristalização	Método	Resolução	R-Value Free	R-Value work	R-Value Observed
	X-Ray Diffraction	2.84 Å	0.287	0.287	0.239
Conteúdo de macromolécula	Peso total da estrutura	Contagem de átomos	Contagem de resíduos modelado	Contagem de resíduos depositados	Cadeias proteicas
	114.85 kDa	8.011	1.017	1.029	3

Fonte: Elaborado por Autor (2024)

ANEXO C – LISTA DE DISTÂNCIAS DE INTERAÇÕES DADA PELO RING NO ESTADO RELAXADO

Interação	Distância
Doador-aceitador da ligação de hidrogênio	5.3 Å
Aceitador-H da ligação de hidrogênio	3.3 Å
Ligação iônica	4.5 Å
Ligações dissulfetos	3 Å
Centro de doador π -hidrogênio	5 Å
Ligação π - π stacking	7.3 Å
Ligação de Van Der Waals	0.03 Å
Ligação π -cátion	6.7 Å
Coordenação de ion metal	4 Å

Fonte: Elaborado por Autor (2024)

ANEXO D – LINHAGEM GERMINATIVA DOS NANOCORPOS (NATIVOS)

PDB ID	Espécie	V/gene	V/identidade	J/gene	J/identidade
3EZJ	Humano	IGHV3-66*01	0.76	IGHJ4*01	0.86
4IDL	Humano	IGHV3-23*02	0.61	IGHJ5*01	0.71
4M3J	Mouse	IGHV5-6-3*01	0.69	IGHJ4*01	0.71
5MWN	Humano	IGHV3-66*01	0.70	IGHJ4*01	0.86
6GJU	Humano	IGHV3-23*03	0.74	IGHJ4*01	0.79
6RTY	Humano	IGHV3-66*01	0.70	IGHJ4*01	0.79
7KGJ	Humano	IGHV3-66*01	0.76	IGHJ4*01	0.79
7KLW	Humano	IGHV3-66*01	0.76	IGHJ4*01	0.79
7N0G	Humano	IGHV3-66*01	0.76	IGHJ4*01	0.79
8BZY	Humano	IGHV3-66*01	0.77	IGHJ4*01	0.79
8CY6	Humano	IGHV3-23*04	0.68	IGHJ4*01	0.86

Fonte: Elaborado por Autor (2024)

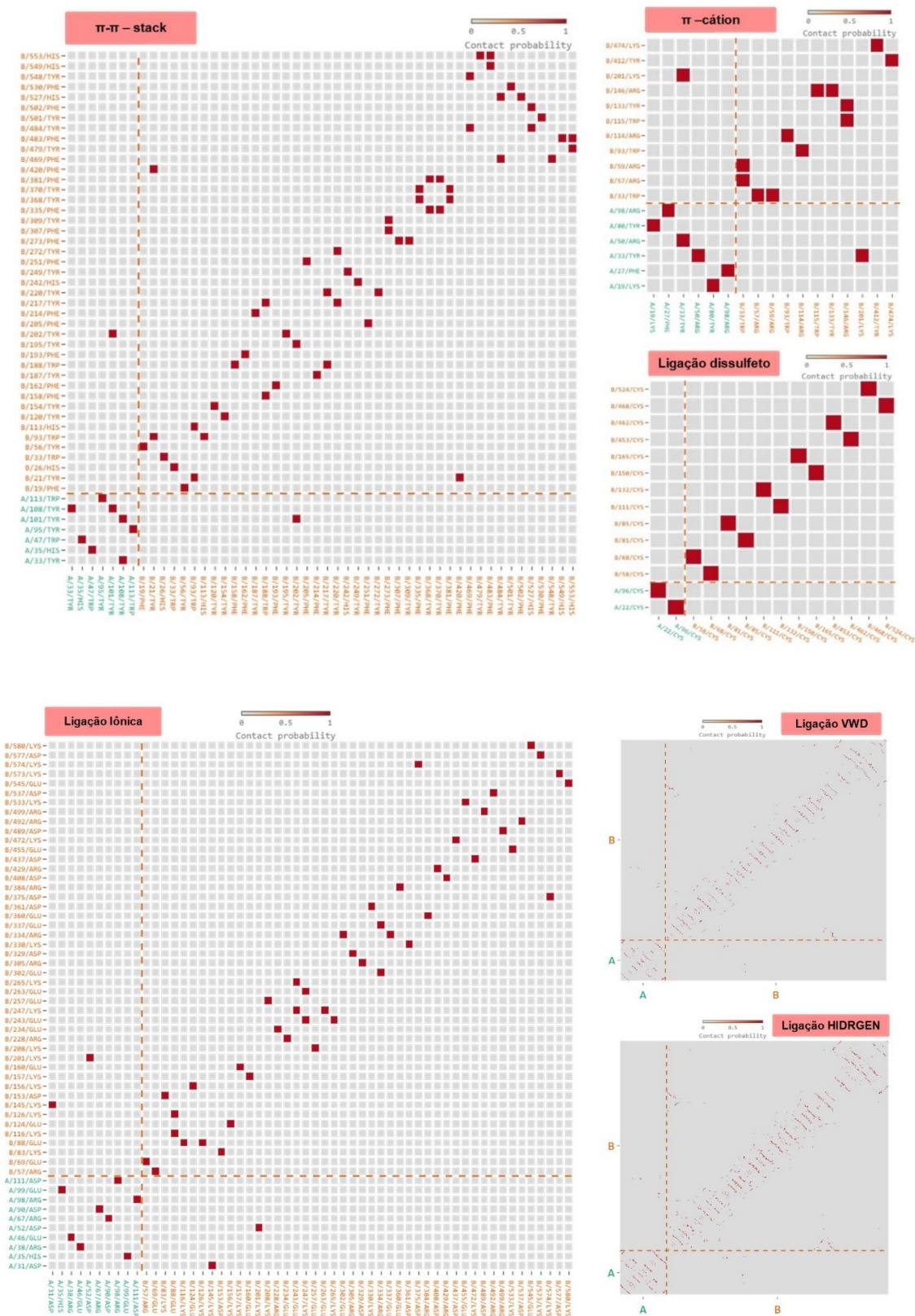
ANEXO E – MÉTODOS NUMÉRICOS DO HADDOCK 2.4: ESTÁGIOS, ALGORITMOS E FUNÇÕES DE ENERGIA

Estágio	Equação de Energia	Flexibilidade	Componentes Chave
Corpo rígido (it0)	$E_{rigid} = E_{vdW} + E_{elec} + E_{restraints}$	Corpos rígidos (sem flexibilidade)	Apenas termos não-ligados (vdW + eletrostática) e restrições (AIRs).
Semi-flexível (it1)	$E_{semi-flex} = E_{rigid} + E_{bond} + E_{angle} + E_{dihe} + E_{semi-flex}$	Flexibilidade Torcional ; ângulos diédricos	Adiciona termos ligados (ligações, ângulos, diédricos), mas mantém comprimentos/ângulos fixos.
Solvente explícito (water)	$EMD = E_{bonded} + E_{non-bonded} + E_{restraints}$	Flexibilidade total ; em espaço cartesiano	Inclui todos os termos ligados + não-ligados + restrições , agora com água explícita (TIP3P) .

Fonte: Elaborado pelo Autor (2025), com base no algoritmo do HADDOCK 2.4

APÊNDICE A – GRÁFICO DE RAMACHANDRAN GERADOS PARA OS VHH QUE RECEBERAM O ENXERTO DE SEQUÊNCIA

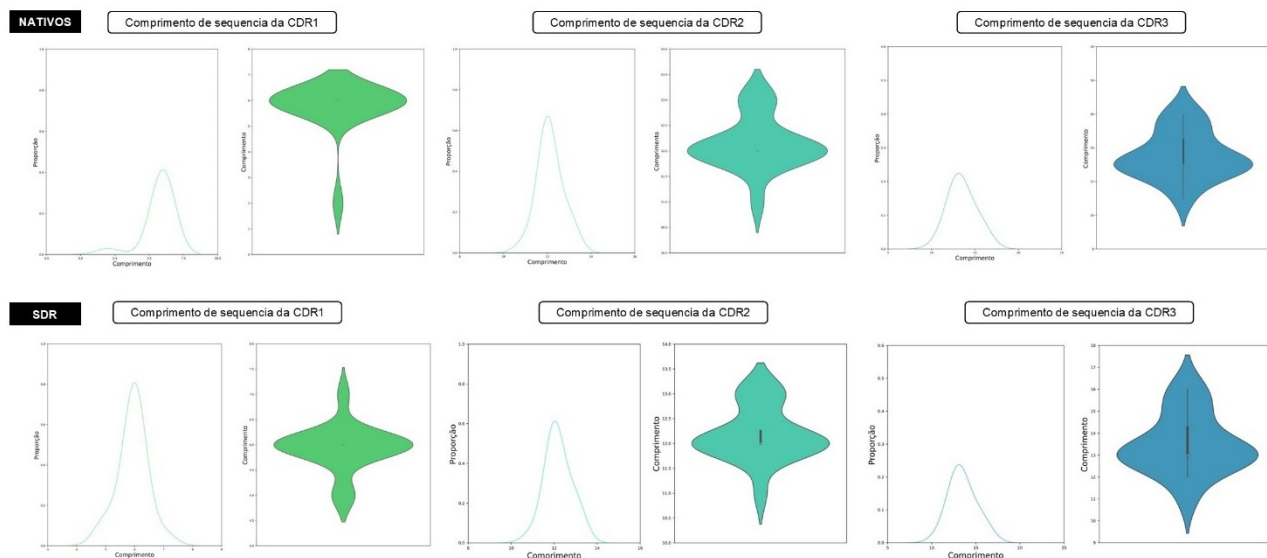
APÊNDICE B – MATRIZ DE CONTATO ENTRE O DOMÍNIO VH/NTZ E A SUBUNIDADE A4 DA INTEGRINA A4B1



Fonte: Gráficos elaborados pelo Autor (2024), com o auxílio do *software* RING 4.0 (Del Conte *et al.*, 2024), que apresentam a matriz de contato entre os resíduos da interface do complexo VH/NTZ e a subunidade $\alpha 4$. O gráfico

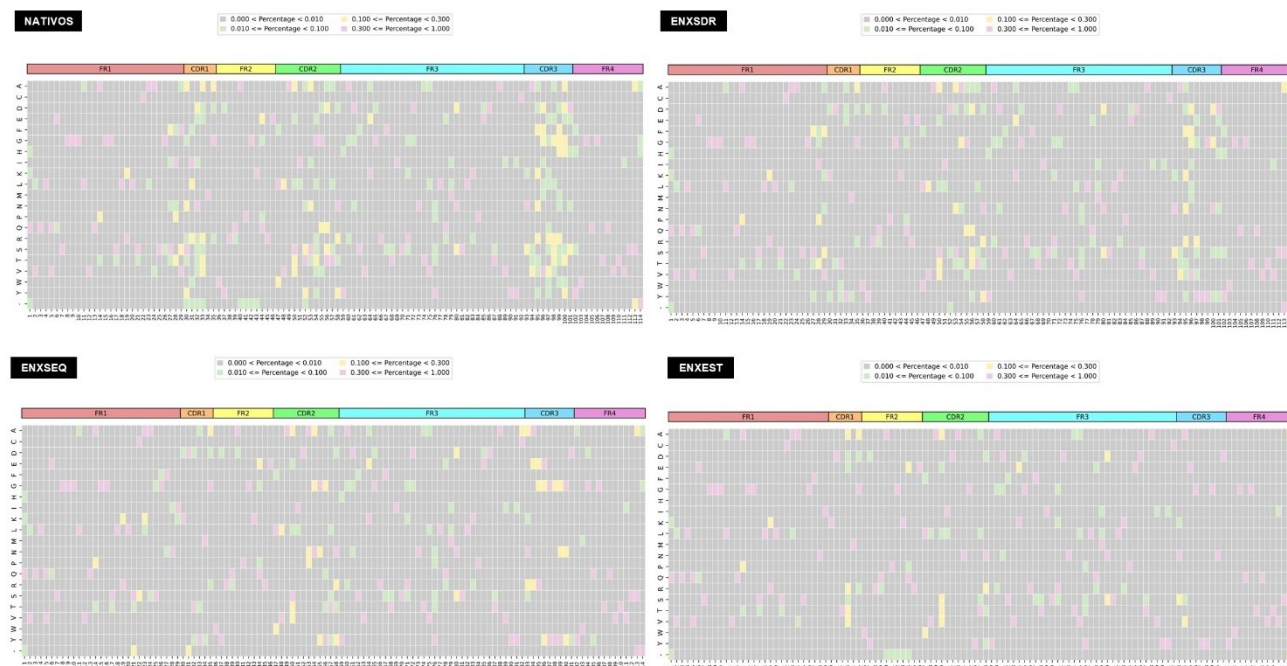
destaca todas as interações presentes no complexo, incluindo ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, ligações iônicas, ligações dissulfeto, além de interações π -cátion e π - π -Stack.

APÊNDICE C – COMPRIMENTO DE SEQUÊNCIA DOS VHH-IN E VHH/SDR



Fonte: Gráficos elaborados pelo Autor (2024), com o auxílio do *software* Abalign (Zong *et al.*, 2023), apresentam o comprimento das CDRs de todos os nanocorpos nativos, bem como dos nanocorpos que receberam o enxerto de SDR.

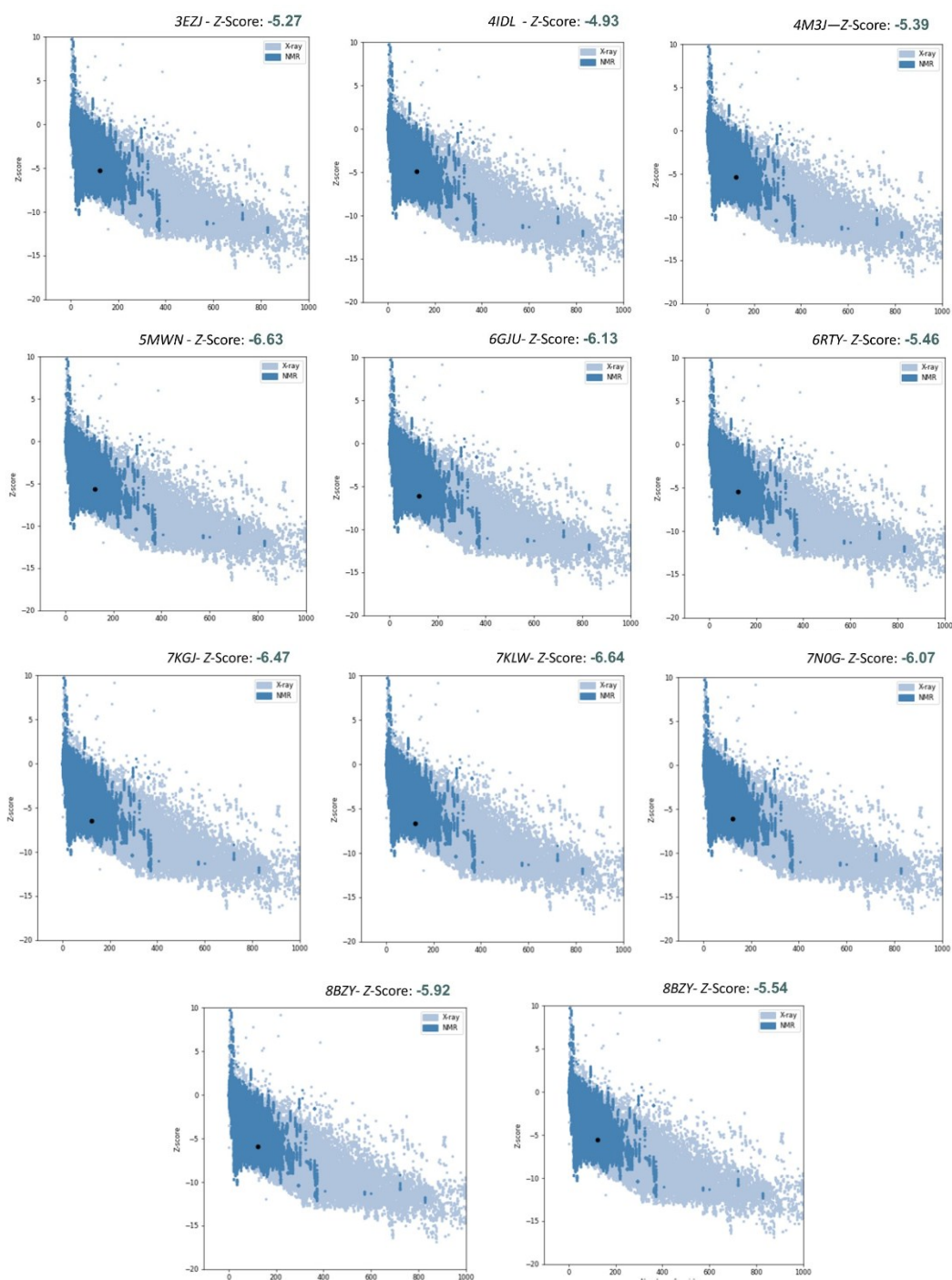
APÊNDICE D – FREQUÊNCIAS DE MUTAÇÕES DOS VHH-IN E DOS VHH/NTZ



Fonte: Gráficos elaborados pelo Autor (2024), com o auxílio do *software* Abalign (Zong *et al.*, 2023), apresentam a taxa de mutação nas regiões CDR1, CDR2, CDR3 e FR. Esses gráficos comparam os grupos NATIVOS,

ENXSDR, ENXSEQ e ENXEST. No eixo Y, estão representados os 20 aminoácidos, enquanto o eixo X indica as posições específicas dos aminoácidos nas sequências analisadas.

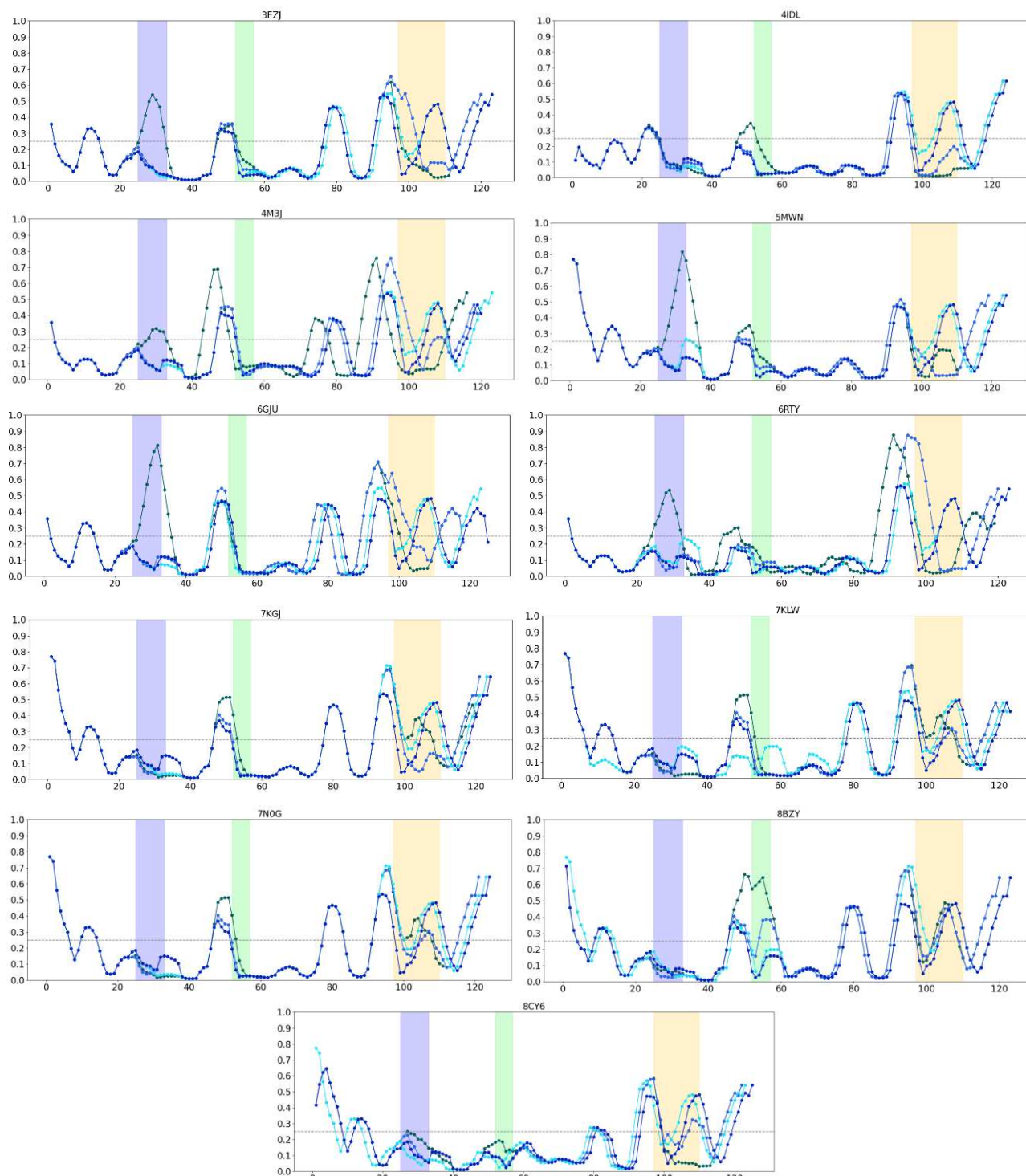
APÊNDICE E – COMPREENSÃO DA SIMILIARIDADE DOS ENXSEQ PARA RAIOS X E ESPECTROSCOPIA DE RMN



Fonte: Gráficos elaborados pelo Autor (2024), com auxílio do ProSA3 (Wiederstein; Sippl, 2007), permitem comparar a estrutura teórica predita com um banco de dados de proteínas validadas experimentalmente, avaliando

a proximidade do modelo teórico em relação aos dados experimentais. A cor azul claro representa os dados comparativos de raio-X, enquanto o azul escuro corresponde aos dados comparativos de RMN.

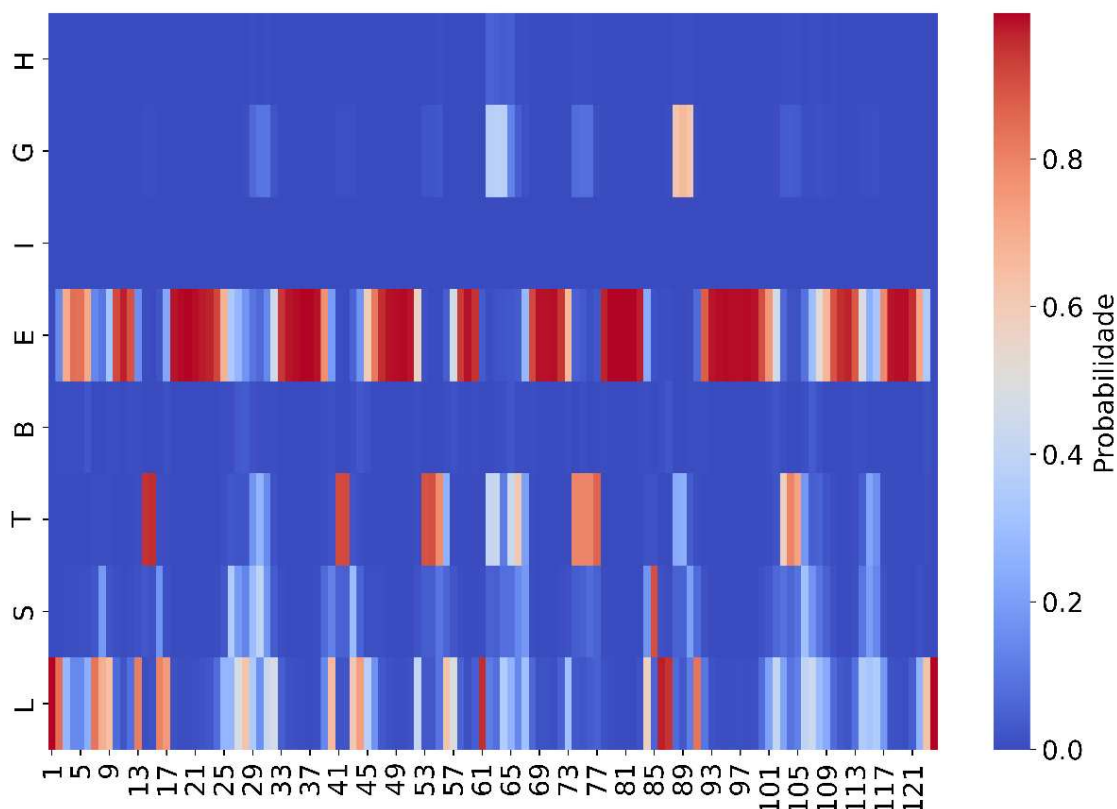
APÊNDICE F – FLUTUAÇÃO DE RESÍDUOS PARA O POTENCIAL DE AGREGAÇÃO DOS VHH-IN E DOS ENXNTZ



Fonte: O gráfico apresentado por Aulic (2027) ilustra a flutuação dos resíduos em relação ao potencial de agregação, comparando os resíduos nativos, representados em verde-azulado escuro, com os resíduos enxertados, indicados pelas cores azul real (ENXSDR), azul ciano fluorescente (ENSEQ) e azul médio escuro (ENXEST). A

análise foi realizada com a ferramenta AggreProt (Planas-Iglesias *et al.*, 2024), que classifica resíduos com valores superiores a 0,25 como indicativos de potencial de agregação, evidenciando regiões críticas para investigações estruturais e funcionais. As regiões correspondentes às CDRs estão destacadas em azul elétrico intenso (H1), verde fluorescente brilhante (H2) e laranja dourado (H3). O eixo y representa o score calculado pelo AggreProt, enquanto o eixo x indica a posição dos resíduos.

APÊNDICE G – PROBABILIDADE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA PARA O DOMÍNIO VH/NTZ



Fonte: Gráfico que apresenta as populações de estruturas secundárias de uma proteína e destaca a probabilidade de ocorrência dessas estruturas em diferentes regiões do domínio VH/NTZ. No eixo Y (lado esquerdo), são exibidos os oito tipos de estrutura secundária classificados, enquanto no eixo X estão as posições dos resíduos de aminoácidos que compõem o domínio VH/NTZ. Já no eixo Z (lado direito), é representada uma escala de calor indicando a probabilidade de 0% a 100% para cada tipo de estrutura secundária. Regiões em vermelho refletem maior probabilidade (próximo a 100%) de adotar uma estrutura específica, enquanto áreas em azul indicam baixa probabilidade de formação dessa estrutura.

APÊNDICE H – COMPARAÇÃO DA SOLUBILIDADE ENTRE OS VHH-IN E O VHH/NTZ

PDB	NATIVOS	ENXESDR	ENXEST	ENXSEQ
3EZJ	0,90	0,99	1,04	1,14
4IDL	1,40	1,13	0,94	1,06
4M3J	0,58	0,72	1,11	1,14

5MWN	0,58	0,96	0,91	0,95
6GJU	0,68	0,89	1,07	1,17
6RTY	1,07	1,18	1,15	1,18
7KGJ	0,96	0,97	0,87	0,99
7KLW	0,92	0,87	0,88	0,75
7N0G	0,94	0,88	0,83	0,99
8BZY	0,64	0,57	1,06	0,98
8CY6	-0,03	0,58	0,82	0,91

Fonte: A tabela de cor elaborada pelo autor (2025), representa a solubilidade geral dos VHHs. A escala de cores indica que, quanto mais vermelho o score, mais negativa é a pontuação, o que sugere uma menor solubilidade dos VHHs. Em contraste, scores mais positivos, destacados em verde, indicam maior solubilidade.

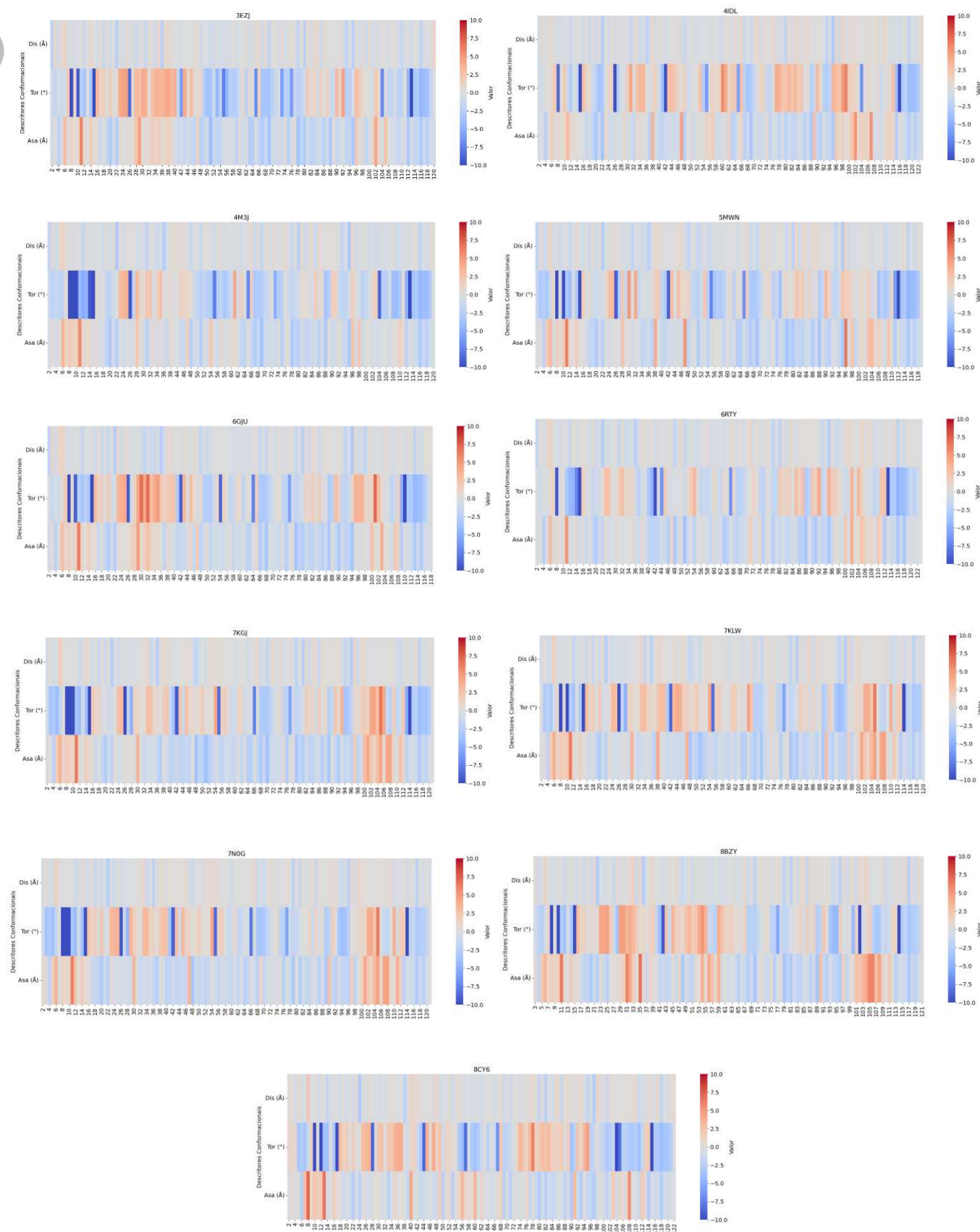
APÊNDICE I – IMPACTO GLOBAL DAS IDRS DOS VHH-IN COMPARADO COM OS VHH/NTZ

PDB	TIPO	Score Nativo	Score Enxerto	Delta (Δ)	Impacto
3EZJ	ENXEST	0,03298	0,02993	-0,00305	Reduziu
3EZJ	ENXSDR		0,03108	-0,00190	Reduziu
3EZJ	ENXSEQ		0,04503	+0,01205	Aumentou
4IDL	ENXEST	0,05040	0,03895	-0,01145	Reduziu
4IDL	ENXSDR		0,03610	-0,01429	Reduziu
4IDL	ENXSEQ		0,04503	-0,00537	Reduziu
4M3J	ENXEST	0,04681	0,03266	-0,01415	Reduziu
4M3J	ENXSDR		0,03979	-0,00702	Reduziu
4M3J	ENXSEQ		0,03415	-0,01266	Reduziu
5MWN	ENXEST	0,04269	0,03276	-0,00993	Reduziu
5MWN	ENXSDR		0,04577	+0,00308	Aumentou
5MWN	ENXSEQ		0,03485	-0,00784	Reduziu
6GJU	ENXEST	0,03736	0,03064	-0,00672	Reduziu
6GJU	ENXSDR		0,03264	-0,00472	Reduziu
6GJU	ENXSEQ		0,02527	-0,01209	Reduziu
6RTY	ENXEST	0,03072	0,03349	+0,00277	Aumentou
6RTY	ENXSDR		0,03320	+0,00248	Aumentou
6RTY	ENXSEQ		0,02688	-0,00384	Reduziu
7KGJ	ENXEST	0,03549	0,02939	-0,00610	Reduziu
7KGJ	ENXSDR		0,03319	-0,00230	Reduziu
7KGJ	ENXSEQ		0,03461	-0,00088	Reduziu
7KLW	ENXEST	0,04536	0,02948	-0,01588	Reduziu
7KLW	ENXSDR		0,03313	-0,01223	Reduziu
7KLW	ENXSEQ		0,03242	-0,01294	Reduziu
7N0G	ENXEST	0,04292	0,03429	-0,00863	Reduziu
7N0G	ENXSDR		0,03557	-0,00735	Reduziu
7N0G	ENXSEQ		0,04012	-0,00280	Reduziu
8BZY	ENXEST	0,03080	0,03003	-0,00077	Reduziu
8BZY	ENXSDR		0,02730	-0,00350	Reduziu
8BZY	ENXSEQ		0,02755	-0,00325	Reduziu
8CY6	ENXEST	0,04481	0,02993	-0,01488	Reduziu
8CY6	ENXSDR		0,04013	-0,00468	Reduziu
8CY6	ENXSEQ		0,03156	-0,01325	Reduziu

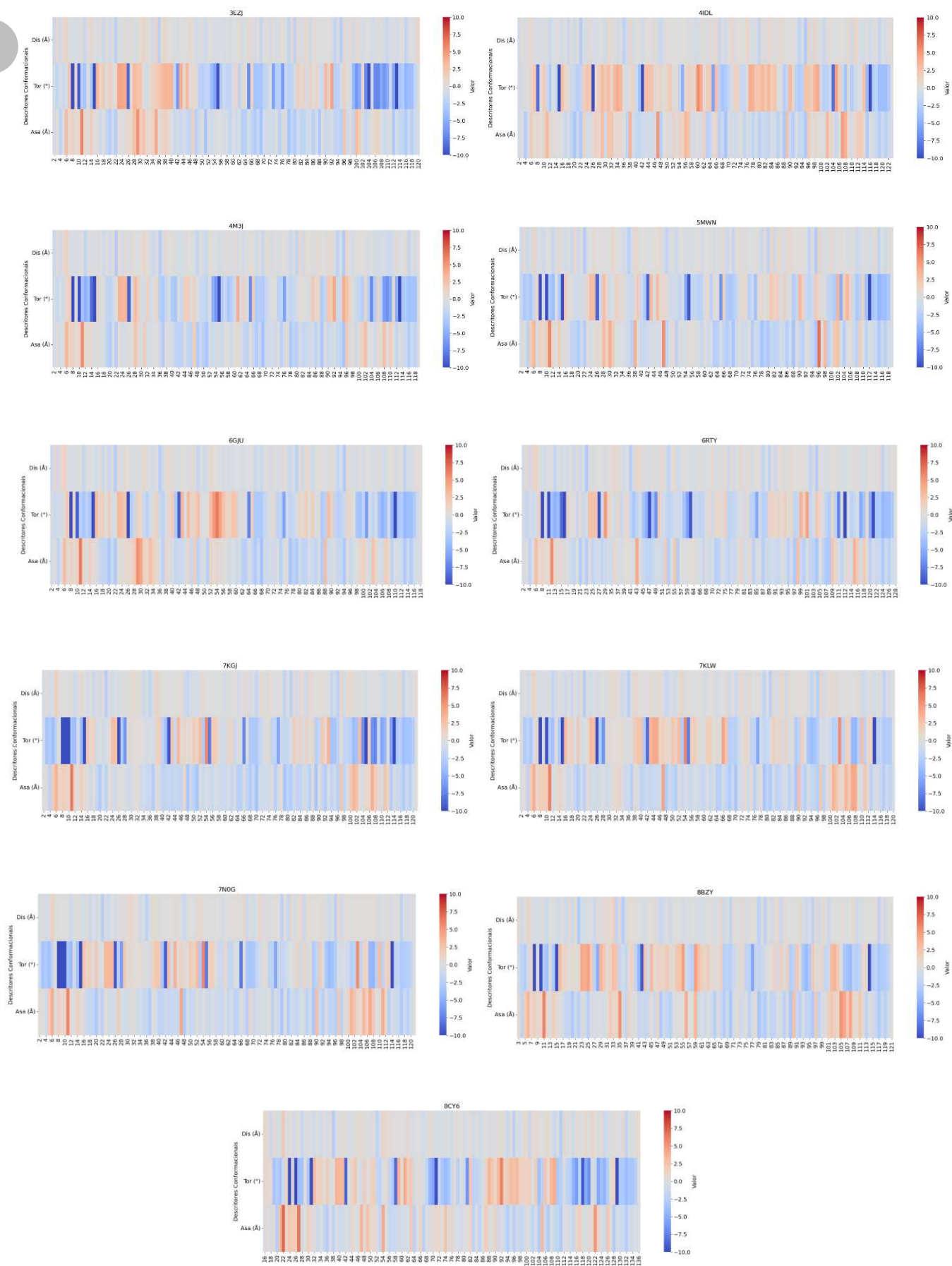
Fonte: Elaborado pelo Autor (2025)

APÊNDICE J – ENERGIA DE ENOVELAMENTO POR RESÍDUO PARA OS DESCRITORES ASA, TOR E DIS

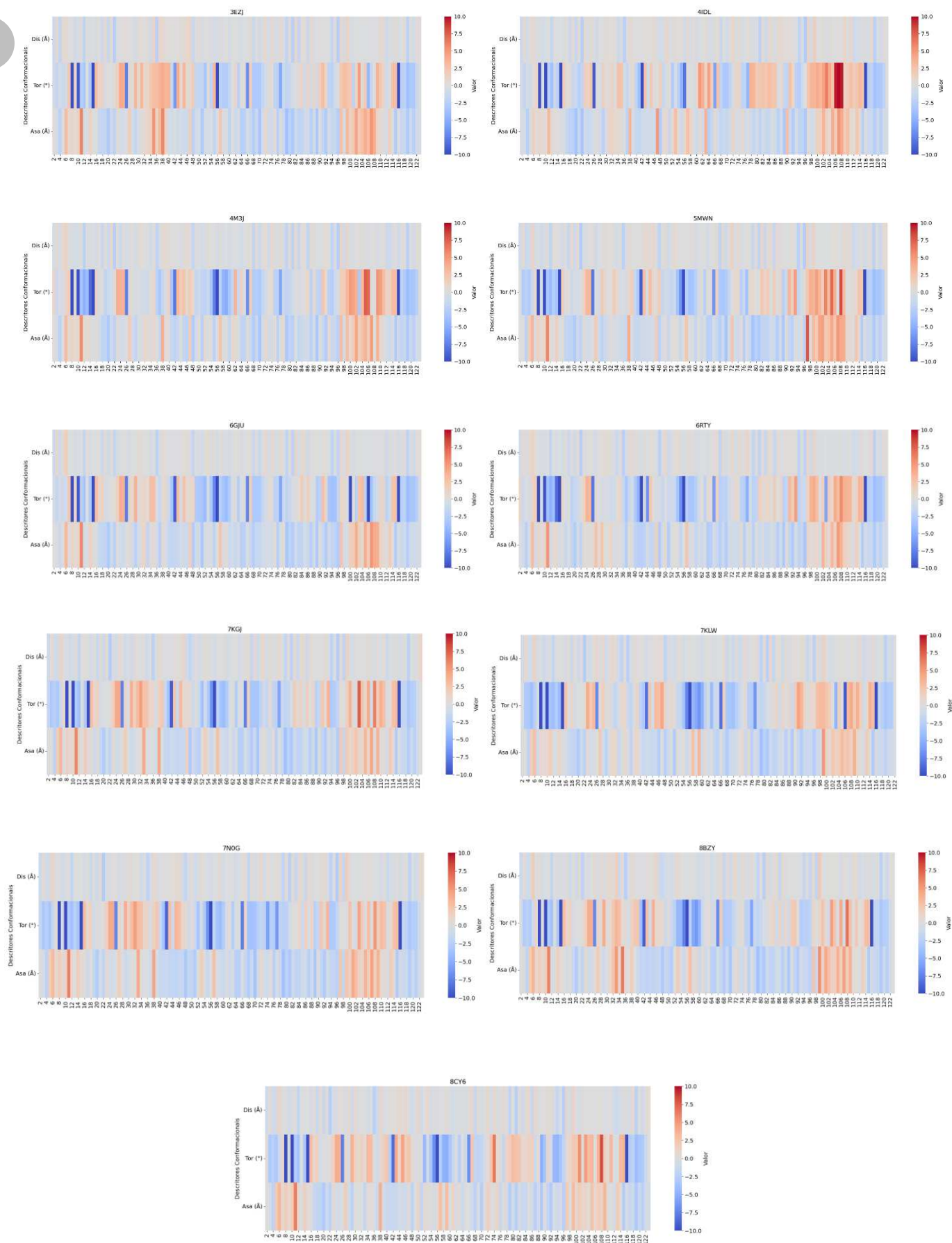
A

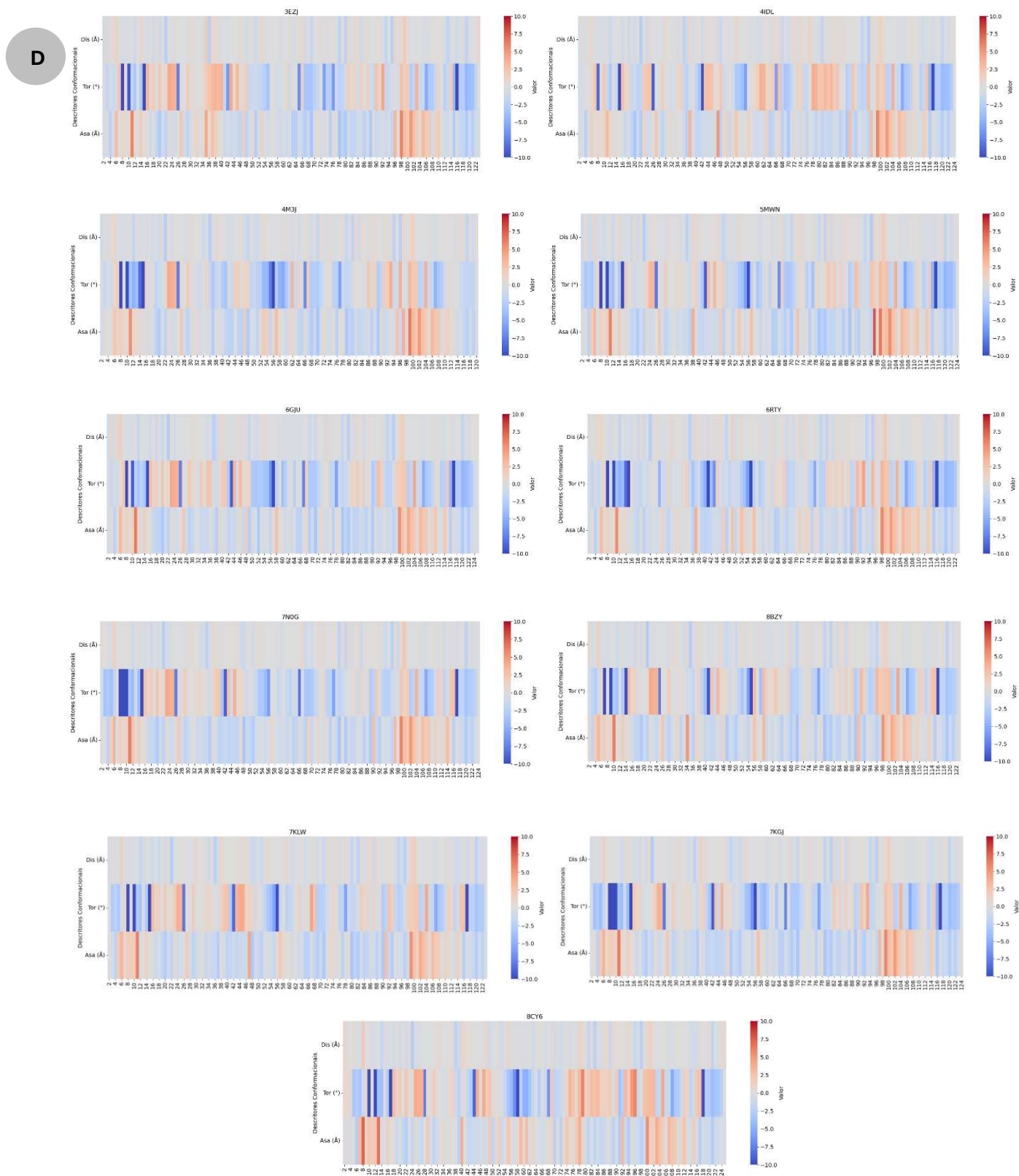


B



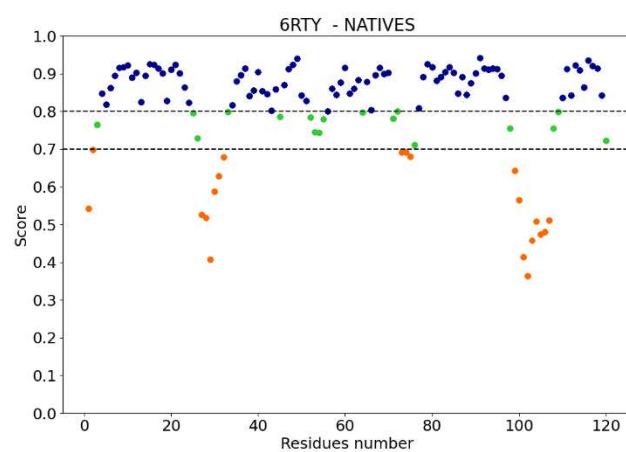
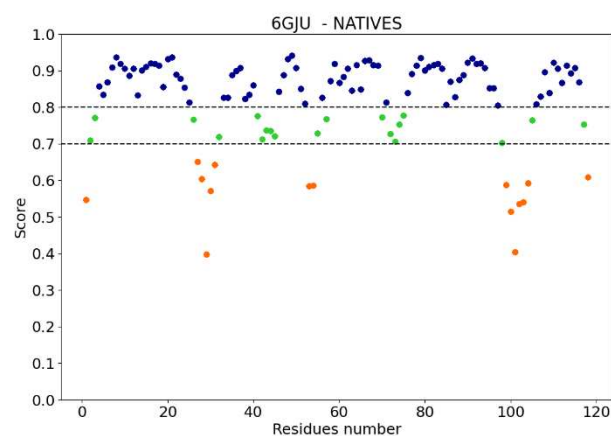
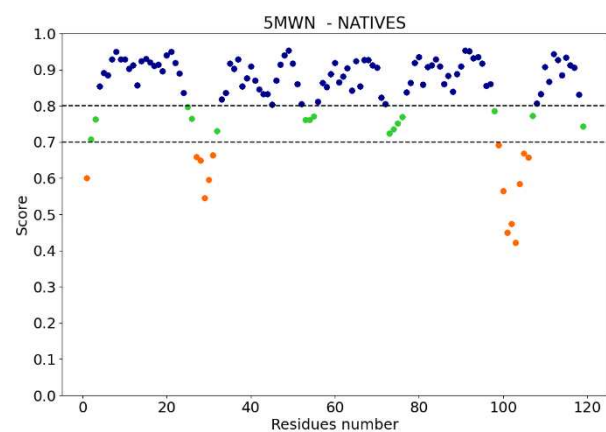
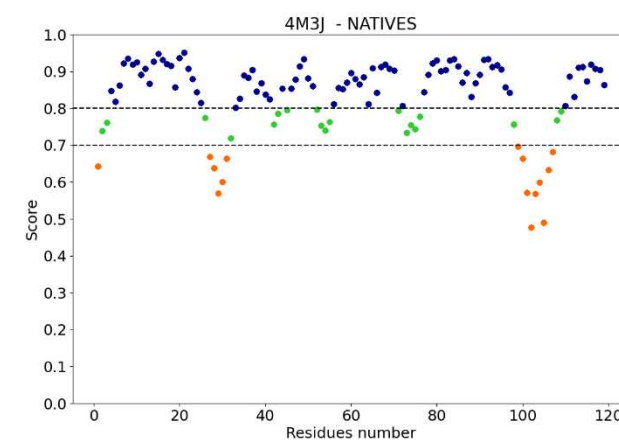
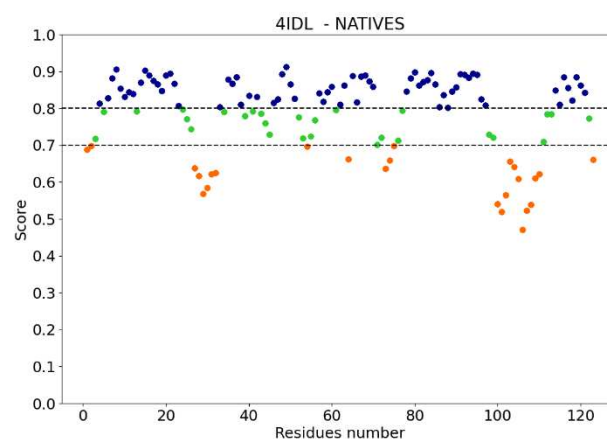
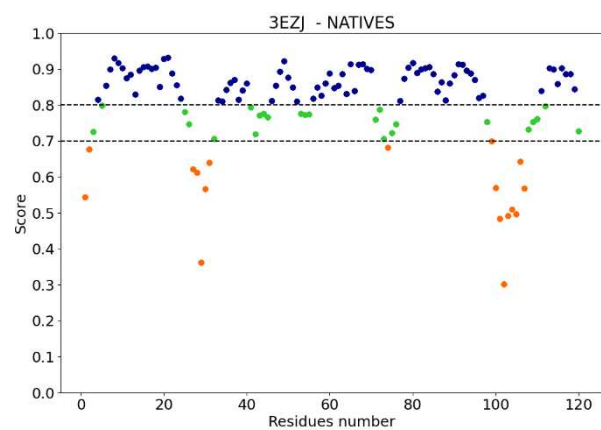
C

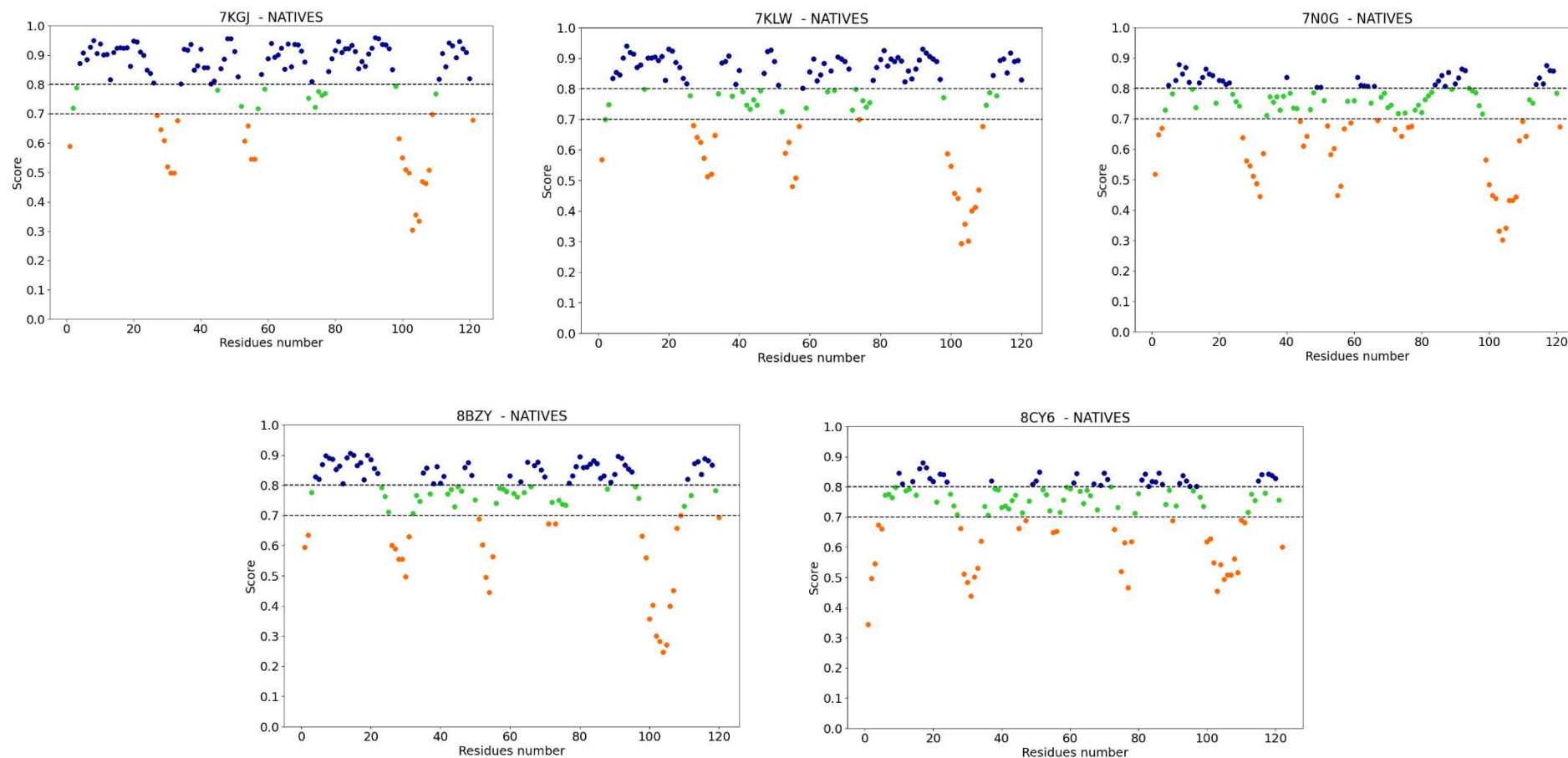




Fonte: Gráficos elaborados pelo Autor (2024) apresentando as energias de enovelamento por resíduo (ΔG), calculadas pelo SWOTein com base nos descritores ASA, TOR e DIS. Em A, são exibidos os resultados para os nanocorpos iniciais (VHH-IN), enquanto B, C e D mostram, respectivamente, os valores para os nanocorpos modificados ENXSDR, ENXSEQ e ENXEST (VHH/NTZ).

APÊNDICE K – QUALIDADE DO MODELO POR RESÍDUOS OBTIDOS PELO QMENDISCO PARA OS VHH-IN





Fonte: Os gráficos apresentados por Autor (2024) mostram as flutuações dos scores atribuídos a cada resíduo de aminoácido nos VHH-IN. As regiões destacadas em azul escuro, verde claro e laranja indicam, respectivamente, contribuições de alta predição ($>0,8$), predição intermediária ($>0,7$ e $\leq 0,8$) e baixa predição ($\leq 0,7$), refletindo a qualidade de cada resíduo em relação ao modelo. O eixo Y exibe os scores atribuídos pelo QMEANDisCo, variando de 0,0 a 1,0, enquanto o eixo X representa a posição dos aminoácidos.

**APÊNDICE L – ESTRUTURAS 3D DOS 11 VHH-IN (INICIAIS/NATIVOS) OBTIDOS
MEDIANTE AO PROCESSO DE TRIAGEM**

