



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

DANIEL LACERDA OLIVEIRA

**ESTUDO DOS DETERMINANTES ESTRUTURAIS E TERMODINÂMICOS NA
INTERAÇÃO DO *scFv* DE EPRATUZUMAB E UM RECEPTOR DE MEMBRANA
CD22**

**FORTALEZA
2023**

DANIEL LACERDA OLIVEIRA

ESTUDO DOS DETERMINANTES ESTRUTURAIS E TERMODINÂMICOS NA
INTERAÇÃO DO *scFv* DE EPRATUZUMAB E UM RECEPTOR DE MEMBRANA CD22

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da
Rocha.

Orientador Técnico-Científico: Prof. Dr.
Marcos Roberto Lourenzoni.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

O46e Oliveira, Daniel Lacerda.

Estudo dos determinantes estruturais e termodinâmicos na interação do scFv de Epratuzumab e um receptor de membrana CD22 / Daniel Lacerda Oliveira. – 2023.

58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.

1. Dinâmica molecular. 2. Epratuzumab. 3. CD22. 4. CAR-T. 5. scFv. I. Título.

CDD 661

DANIEL LACERDA OLIVEIRA

ESTUDO DOS DETERMINANTES ESTRUTURAIS E TERMODINÂMICOS NA
INTERAÇÃO DO *scFv* DE EPRATUZUMAB E UM RECEPTOR DE MEMBRANA CD22

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: 05/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima
UFC

Me. Ana Virgínia Frota Guimarães
Fiocruz Ceará

À Deus.

A todos que me acompanharam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter concedido um período de muito aprendizado durante a minha graduação e, principalmente, por ter me guiado nos momentos difíceis.

A minha família, em especial, meus pais, Francisco e Moema, por me apoiarem todos os dias, com amor e carinho, além de serem exemplos para minha dedicação aos estudos, e, meu irmão, Joel, por sempre ter sido um irmão de coração bondoso, que me inspira a seguir meus sonhos, e meu cachorro, Luke, por ser meu melhor amigo há mais de 15 anos.

A minha namorada, Duda, por ser minha companheira de todas as horas e aventuras, e me fazer sentir verdadeiramente amado.

Aos meus amigos da “call”, Tico, Pan, Flávio, Link, Trot, Porco, Abi e John, por serem amigos incríveis que sempre me fazem rir.

Ao meu grande amigo, Vitrola, que está presente na minha vida desde os meus primeiros anos de vida.

Aos meus amigos que fiz na faculdade, Feliphe, Lucas, Levi, Léo, JP e Victor, pelos almoços, aulas e tardes que compartilharam comigo.

Aos meus colegas de laboratório, em especial, Alison, Alice e Axel, por terem me ensinado não só sobre as atividades relacionadas ao projeto, mas como em outros aspectos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Lourenzoni, que sempre foi uma pessoa que me incentivou a dar o meu melhor no projeto e estimular minha proatividade.

Ao meu orientador pedagógico, Prof. Dr. Bruno Rocha, que me aceitou como seu orientando.

À Universidade Federal do Ceará e ao curso de Biotecnologia, que foram essenciais para a minha formação acadêmica.

À Fundação Oswaldo Cruz Ceará, por ter sido o local onde realizei todas as atividades do meu projeto e por ser um ambiente acolhedor a todos os que pretendem seguir a carreira de pesquisador.

À FUNCAP, por me permitir obter uma bolsa de iniciação científica.

“Tudo isso vai acabar e começar de novo.”,
Ween.

RESUMO

A leucemia, um tipo de câncer que afeta os glóbulos brancos na medula óssea, é uma das formas mais mortais de neoplasia. A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo mais comum de leucemia em crianças e é caracterizada pelo crescimento celular descontrolado de linfócitos B anormais. A terapia por *CAR-T* é um novo método de tratamento para a LLA-B, que utiliza receptores de antígenos quiméricos para reconhecer e destruir as células cancerígenas. Estudos têm mostrado taxas de sucesso cada vez maiores com essa terapia, chegando a remissões completas em 80% dos pacientes com leucemia ou linfoma no estágio terminal. Um dos alvos terapêuticos contra o LLA-B é a glicoproteína CD22, uma proteína de membrana marcadora de células B. O anticorpo hLL2/Epratuzumab é um anticorpo que se liga à proteína CD22 e é usado no tratamento de LLA-B. Sabe-se que a simulação de dinâmica molecular (DM) é uma técnica usada para estudar a interação entre moléculas a nível atômico. Essas simulações permitem compreender o comportamento das moléculas e podem ajudar no desenvolvimento de novos medicamentos. Em relação à Epratuzumab e CD22, a simulação de dinâmica molecular pode ajudar a entender como as interações entre essas moléculas ocorrem e como as modificações nas N-glicosilações de CD22 podem afetar essa interação, pois já foi comprovado que o tamanho e a composição das N-glicosilações podem alterar de forma significativa a afinidade de Epratuzumab com CD22. Assim, criaram-se diferentes formas estruturais de CD22 (CD22-1g e CD22-6g), abrangendo os domínios D1, D2 e D3 extracelulares, diferindo na presença ou não de N-glicosilações na estrutura de CD22, para simulação em interação com o *scFv* nativo de Epratuzumab. Este estudo analisou as interações entre *scFv*-Epratuzumab e os domínios CD22-6g e CD22-1g por meio de simulações de dinâmica molecular. Os resultados revelaram que os domínios de *scFv*-Epratuzumab e CD22-6g atingiram rapidamente o equilíbrio, enquanto o domínio D1 de CD22-1g apresentou maior variabilidade estrutural antes do tempo de equilíbrio. A análise de *clusters* identificou as configurações mais representativas das estruturas. Além disso, as glicosilações no domínio D2 de CD22-6g foram consideradas importantes para a atratividade geral entre o *scFv* e CD22. As *CDRs CDRH2* e *CDRL1* de *scFv*-Epratuzumab demonstraram maior atratividade com os domínios de CD22. Os resultados contribuem para o entendimento das interações entre *scFv*-Epratuzumab e CD22-6g/CD22-1g, ressaltando a importância das glicosilações e fornecendo novas informações para a proposição de novas mutações nesse *scFv*, de forma a melhorar a afinidade dessa molécula com o CD22.

Palavras-chave: CAR-T; Epratuzumab; Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Leukemia, a type of cancer that affects white blood cells in the bone marrow, is one of the deadliest forms of the disease. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common type of leukemia in children. Uncontrolled growth of abnormal B lymphocytes describe this disease. CAR-T therapy is a novel treatment approach for ALL-B, utilizing chimeric antigen receptors to recognize and destroy cancer cells. Studies have shown increasing success rates with this therapy, achieving complete remissions in 80% of patients with advanced-stage leukemia or lymphoma. One therapeutic target against ALL-B is the CD22 glycoprotein, a cell surface marker protein for B cells. The hLL2/Epratuzumab antibody is an antibody that binds to the CD22 protein and is utilized in the treatment of non-Hodgkin lymphoma and ALL-B. Molecular dynamics (MD) simulation is a technique used to study molecular interactions at the atomic level. These simulations allow for a better understanding of molecule behavior and can aid in the design of new drugs. In the case of Epratuzumab and CD22, MD simulation can help elucidate how the interactions between these molecules occur and how modifications in CD22's N-glycosylations can affect this interaction. Also, the size and composition of N-glycosylations can significantly alter the affinity of Epratuzumab for CD22. Thus, different structural forms of CD22 (CD22-1g and CD22-6g) were created, encompassing the extracellular D1, D2 and D3 domains, differing in the presence or absence of N-glycosylations in the CD22 structure, for simulation in interaction with the native scFv of Epratuzumab. This study analyzed the interactions between scFv-Epratuzumab and the domains of CD22-6g and CD22-1g through MD simulations. Results revealed that the domains of scFv-Epratuzumab and CD22-6g quickly reached equilibrium, while the D1 domain of CD22-1g exhibited larger structural variability before reaching equilibrium. Cluster analysis identified the most representative configurations of the structures. Additionally, glycosylations in the D2 domain of CD22-6g were considered significant for the overall attractiveness between the scFv and CD22. The CDRs CDRH2 and CDRL1 of scFv-Epratuzumab demonstrated a higher affinity for the domains of CD22. The findings contribute to understanding the interactions between scFv-Epratuzumab and CD22-6g/CD22-1g, highlighting the importance of glycosylations and providing new insights for proposing new mutations in this scFv to enhance its affinity with CD22.

Keywords: CAR-T; Epratuzumab; Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação ilustrada de moléculas de anticorpo da classe IgG. Azul e Vermelho: Cadeias pesadas (<i>CH</i> : Domínio constante da cadeia pesada; <i>VH</i> : Domínio variável da cadeia pesada). Verde: Cadeias leves (<i>CL</i> : Domínio constante da cadeia leve; <i>VL</i> : Domínio variável da cadeia leve). Cada região de semicírculo representa um domínio Ig. Cada reta pontilhada representa uma ligação dissulfeto.....	22
Figura 2 – Representação ilustrada de um anticorpo de forma a enaltecer as <i>CDRs</i> . Azul: região constante. Vermelho: região variável. Rosa: <i>CDRs</i> de <i>VL</i> . Azul: região constante.....	23
Figura 3 – Representação ilustrada de uma molécula de anticorpo da classe IgG e o seu scFv correspondente. Azul: <i>CH1</i> , <i>CH2</i> e <i>CH3</i> . Verde: <i>CL</i> . Laranja: <i>VH</i> . Vermelho: <i>VL</i>	24
Figura 4 – Representação ilustrada de CD22 em interação com Epratuzumab, evidenciando as N-glicosilações em azul.....	26
Figura 5 – Representação ilustrada das gerações de <i>CARs</i> e suas composições moleculares... Figura 6 – Representação de como o campo de força é construído para as interações de ligação covalente, ângulo, diedros, diedros impróprios, van der Waals e eletrostáticas. r é o comprimento de ligação; θ é o ângulo entre átomos; φ é o ângulo diedral; ω é o ângulo diedral impróprio; r_{ij} é a distância entre átomos i e j ; $k_r, k_\theta, k_\varphi, k_\omega$ são constantes de força; $r_{eq}, \theta_{eq}, \varphi_{eq}$ são posições de equilíbrio; ϵ_{ij} é relacionado ao cálculo do potencial de Lennard-Jones; r_m é a distância a qual o potencial atinge seu mínimo; q_i e q_j são as cargas dos seus respectivos átomos; e ϵ_0 é a constante dielétrica.....	29 31
Figura 7 – Esquema da árvore de glicosilação adicionada aos resíduos com N-glicosilação dos domínios D1,D2 e D3 de CD22. Vermelho: L-fucose, Azul : N-acetil-D-glucosamina, Verde: D-manose. Amarelo: D-galactose. Roxo: Ácido N-acetil-D-neuramínico. A: ligação do tipo alfa (α) glicosídica. B: ligação do tipo beta (β) glicosídica.....	36

Figura 8 – Curva de *RMSD* dos C α dos componentes de *VH* e *VL* em água ao longo dos 500 ns da simulação. Vermelho: *VH*. Verde: *VL*. Preto: *VH+VL*.....39

Figura 9 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional de *scFv-Epratuzumab* na orientação *VH-Linker-VL*. (A) Identificação do domínio *VH* (em verde), do domínio *VL* (em azul) e do *linker* (em amarelo). (B) Identificação das CDRs de Epratuzumab. Vermelho: *CDR-H1*; Azul: *CDR-H2*; Magenta: *CDR-H3*; Laranja: *CDR-L1*; Verde: *CDR-L2*; Ciano: *CDR-L3*.....40

Figura 10 – Curva de *RMSD* relativo dos C α entre as estruturas tridimensionais dos domínios *VH* e *VL* do *scFv-Epratuzumab* ao longo dos 500 ns de simulação. Verde: Cálculo do *RMSD* de *VH* tendo como referência o *VL*. Azul: Cálculo do *RMSD* de *VL* tendo como referência *VH*.
.....41

Figura 11 – *Clusters* de configurações da estrutura *VH+VL* do *scFv-Epratuzumab* ao longo dos 500 ns de simulação, utilizando um raio de corte de 0.17 nm (valor médio de *RMSD* a partir do teq).....42

Figura 12 – Curvas do *Rg* dos domínios *VH*, *VL* e *VH+VL* do *scFv-Epratuzumab* ao longo dos 500 ns de simulação. Preto: *VH+VL*. Vermelho: *VH*. Verde: *VL*.....43

Figura 13 – Curva de *RMSD* dos C α dos componentes do CD22-6g em água ao longo de 400 ns da simulação. Preto: CD22.....44

Figura 14 – Curva de *RMSD* dos C α dos componentes do CD22-6g em água ao longo de 400 ns de simulação. Vermelho: D1. Preto: D2. Verde: D3.....45

Figura 15 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional de CD22-6g. Vermelho: D1. Amarelo: D2. Laranja: D3. Azul: N-glicosilações. Magenta: Ponto de N-glicosilação. Verde: Região interdomínio.....45

Figura 16 – *Clusters* de configurações da estrutura CD22 de CD22-6g ao longo dos 400 ns de simulação, utilizando um raio de corte de 0.34 nm (valor médio de *RMSD* a partir do teq)....46

Figura 17 – Curva de <i>RMSD</i> dos C α dos componentes do CD22-1g em água ao longo de 400 ns da simulação. Preto: CD22.....	47
Figura 18 – Curva de <i>RMSD</i> dos C α dos componentes do CD22-1g em água ao longo de 400 ns de simulação. D1. Preto: D2. Verde: D3.....	47
Figura 19 – Curva de <i>RMSD</i> dos C α dos componentes de D1 de CD22-1g em água ao longo de 400 ns de simulação. Vermelho: D1. Preto: D1 sem considerar os resíduos de <i>loops</i> modelados. Verde: D1 sem considerar os resíduos de <i>loops</i> modelados e os resíduos 41-55.....	48
Figura 20 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional de CD22-6g. Vermelho: D1. Amarelo: D2. Laranja: D3. Azul: N-glicosilações. Magenta: Ponto de N-glicosilação. Verde: Região interdomínio.....	49
Figura 21 – <i>Clusters</i> de configurações da estrutura CD22 de CD22-1g ao longo dos 400 ns de simulação, utilizando um raio de corte de 0.36 nm (valor médio de <i>RMSD</i> a partir do teq)....	49
Figura 22 – (A): Sistema construído de <i>scFv</i> -Epratuzumab/CD22-1g. (B): Sistema construído de <i>scFv</i> -Epratuzumab/CD22-6g. Azul: N-glicosilação. Verde: CD22. Laranja: <i>scFv</i> -Epratuzumab.....	50
Figura 23 – Curva de PII entre os átomos de <i>VH</i> e <i>VL</i> de <i>scFv</i> -Epratuzumab com CD22, considerando as glicosilações. Preto: Sistema de CD22-1g. Vermelho: Sistema de CD22-6g.....	51
Figura 24 – Curva de PII entre os átomos de <i>VH</i> e <i>VL</i> de <i>scFv</i> -Epratuzumab e as N-glicosilações do domínio D2 de CD22-6g. Vermelho: N-glicosilação de N114. Preto: N-glicosilação de N143. Verde: N-glicosilação de N210.....	52
Figura 25 – Representação em <i>cartoon</i> da estrutura tridimensional do <i>scFv</i> -Epratuzumab em interação com a N-glicosilação em N210. Identificação do domínio <i>VH</i> (em verde), do domínio <i>VL</i> (em azul), do <i>linker</i> (em amarelo) e da N-glicosilação em N210 (em ciano).....	53

Figura 26 – Curva de PII entre os átomos das *CDRs* de *scFv-Epratuzumab* e os átomos de proteína de CD22. (A): PII das *CDRs* de *VH* de CD22-1g. (B): PII das *CDRs* de *VH* de CD22-6g. Vermelho: *CDRH1*. Preto: *CDRH2*. Verde: *CDRH3*. (C): PII das *CDRs* de *VL* de CD22-1g. (D): PII das *CDRs* de *VL* de CD22-6g. Vermelho: *CDRL1*. Preto: *CDRL2*. Verde: *CDRL3*.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>RMSD</i> médios calculados para <i>VH+VL</i> , <i>VH</i> e <i>VL</i> a partir do teq.....	40
Tabela 2 – <i>RMSDs</i> médios calculados para D1, D2 e D3 de CD22 a partir do teq.....	45
Tabela 3 – <i>RMSDs</i> médios calculados para D1, D2 e D3 de CD22 a partir do teq.....	48
Tabela 4 – Energias médias de interação para <i>VH+VL</i> e a N-glicosilação (Nglic) no resíduo N114; N143 e N210 do sistema <i>scFv-Epratuzumab/CD22-6g</i> calculadas por PII.....	52
Tabela 5 – Energias médias das interações entre <i>CDRs</i> e átomos de proteína de CD22-1g.....	55
Tabela 6 – Energias médias das interações entre <i>CDRs</i> e átomos de proteína de CD22-6g.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Identificação da sequência de resíduos e suas numerações das <i>CDRs</i> do scFv-Epratuzumab.....	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>NIH</i>	<i>National Institutes of Health</i>
<i>LLA</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>LLA-B</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
<i>Ig</i>	Imunoglobulina
<i>Fc</i>	Fragmento cristalizável
<i>Fab</i>	Fragmento de ligação ao antígeno
<i>V</i>	Variável
<i>C</i>	Constante
<i>VH</i>	Variável da cadeia pesada
<i>CH</i>	Constante da cadeia pesada
<i>VL</i>	Variável da cadeia leve
<i>CL</i>	Constante da cadeia leve
<i>3D</i>	Tridimensional
<i>CDR</i>	Região determinante de complementariedade
<i>Fv</i>	Fragmento variável
<i>scFv</i>	Fragmento variável de cadeia única
<i>IgG</i>	Imunoglobulina tipo G
<i>CD22</i>	Cluster of differentiation 22
<i>Siglec</i>	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
<i>BCR</i>	Receptor de células B
<i>ITIM</i>	Motivos de inibição baseados em imunorreceptores de tirosina
<i>D1</i>	Domínio extracelular 1 de CD22
<i>D2</i>	Domínio extracelular 2 de CD22
<i>D3</i>	Domínio extracelular 3 de CD22
<i>APC</i>	Células apresentadoras de antígeno
<i>TCR</i>	Receptor de células T
<i>TIL</i>	Linfócitos infiltradores de tumor
<i>CAR</i>	Receptor quimérico de antígeno
<i>CAR-T</i>	Linfócito T com Receptor quimérico de antígeno
<i>GEPeSS</i>	Grupo de engenharia de proteínas e soluções para a saúde
<i>CD3</i>	Cluster of differentiation 3

CD28	Cluster of differentiation 28
CD137	Cluster of differentiation 137
4-1BB	Cluster of differentiation 137
CD27	Cluster of differentiation 27
CD134	Cluster of differentiation 134
<i>TRUCK</i>	Células T redirecionadas para eliminação iniciada por citocinas irrestrita à antígeno
IL-2	Interleucina 2
Gly	Glicina
Ser	Serina
<i>ITAM</i>	Motivos de ativação baseados em imunorreceptores de tirosina
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
DM	Dinâmica Molecular
NVT	Número de partículas, volume e temperaturas controlados
NPT	Número de partículas, pressão e temperatura controlados
ns	Nanossegundo
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
CD19	Cluster of differentiation 19
<i>scFv</i> -Epratuzumab	scFv native de Epratuzumab
CD22-1g	CD22, de D1 até D3, contendo apenas uma glicosilação
CD22-6g	CD22, de D1 até D3, contendo seis glicosilações
<i>PDB</i>	Protein Data Bank
<i>GROMACS</i>	Groningen Machine for Chemical Simulations
<i>PME</i>	Particle Mesh Ewald
<i>LINCS</i>	Linear Constraint Solver
<i>RMSD</i>	Root Mean Squared Deviation
Rg	Raio de giro
PII	Potencial de interação intermolecular
teq	Tempo de equilíbrio
Ca	Carbonos alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
$\%$	Porcentagem
θ	Teta
Φ	Fi
ω	Ômega (forma minúscula)
ε	Épsilon

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Câncer e Leucemia Linfóide Aguda.....	20
1.2	Anticorpos.....	21
1.2.1	<i>Fragmentos variáveis de cadeia única (scFv)</i>	23
1.2.2	<i>Anticorpo hLL2/Epratuzumab</i>	24
1.3	Receptor CD22 de células B.....	25
1.4	Linfócitos T e Transferência Adotiva de Células.....	27
1.5	Receptor de Antígeno Quimérico (CAR).....	27
1.6	Simulação de Dinâmica Molecular (DM).....	30
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivos gerais.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Modelagem molecular de scFv-Epratuzumab, CD22-1g e CD22-6g.....	35
4.2	Simulação de DM de scFv-Epratuzumab, CD22-1g e CD22-6g.....	36
4.2.1	<i>Construção dos sistemas</i>	36
4.2.2	<i>Minimização</i>	37
4.2.3	<i>Termalização</i>	37
4.2.4	<i>Produção de trajetória</i>	37
4.3	Análises das trajetórias.....	37
4.4	Construção, simulação e análises dos complexos.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Simulação de DM do scFv-Epratuzumab.....	39
5.2	Simulação de DM do CD22-6g.....	43
5.3	Simulação de DM do CD22-1g.....	46
5.4	Simulação de DM dos complexos scFv-Epratuzumab/CD22-1g e scFv-Epratuzumab/CD22-6g.....	50
6	CONCLUSÃO.....	56
7	PERSPECTIVAS.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e Leucemia Linfóide Aguda

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças as quais tem como característica principal o crescimento celular descontrolado, com capacidade de invadir outros tecidos do organismo. Mais de 100 doenças pertencem a esse conjunto de enfermidades (INCA, 2018), corroborando a diversidade de efeitos danosos e, muitas vezes, letais que o câncer pode proporcionar ao indivíduo. Existem vários fatores de risco que podem aumentar a probabilidade de um indivíduo desenvolver um tipo de câncer. Entre esses fatores, os principais são a idade avançada; o tabagismo; a exposição a radiações, incluindo a ultravioleta; a obesidade; e a exposição a compostos químicos carcinogênicos (NIH, 2022). A ocorrência de câncer vem aumentando de forma preocupante não apenas em escala nacional, mas também global. Sabe-se que, na maioria dos países, esse conjunto de doenças representam a principal causa de mortalidade prematura, ou seja, abaixo dos 70 anos de vida (INCA, 2022). Estimam-se que, no triênio 2023-2025, mais de 700 mil novos casos de câncer sejam diagnosticados no Brasil, onde a maior parte dos casos de tumor maligno são os de pele tipo não melanoma, os de mama feminina e os de próstata (INCA, 2022). Para reafirmar como esse é um empecilho global, esse número quase se iguala a quantidade de óbitos por câncer projetadas para ocorrer nos Estados Unidos, no ano de 2023 (SIEGEL *et al.*, 2023).

Dentro da lista de tipos de câncer com maior taxa de mortalidade, pode-se destacar a leucemia. Essa doença maligna hematológica caracteriza-se por afetar os glóbulos brancos ou seus precursores, ocasionando o acúmulo de células defeituosas na medula óssea (INCA, 2022). No ano de 2020, no Brasil, foram registrados mais de 6.000 óbitos por leucemia e, no triênio, 2023-2025, estima-se o diagnóstico de mais de 30.000 casos (INCA, 2022). Entre os tipos de leucemia, a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de neoplasia maligna que mais acomete crianças (DIAS *et al.*, 2019). Essa doença é caracterizada pelo crescimento celular descontrolado de linfócitos T e B anormais (PUCKETT e CHAN, 2022). Dentro do subtipo LLA, existe a LLA de células B (LLA-B), cuja definição é o crescimento celular descontrolado de linfócitos B anormais. É um dos tipos mais comuns de LLA, correspondendo a aproximadamente 85% dos casos de LLA (DIAS *et al.*, 2019).

Existem diversos tipos de tratamento para LLA-B. Alguns são mais tradicionais, como a quimioterapia, a radioterapia e transplante de medula óssea, que, apesar de serem, muitas vezes, meios eficazes de tratamento do câncer, apresentam limitações e problemas envolvidos, como a diversidade de efeitos colaterais que podem ocorrer durante e após o tratamento. A partir disso, é importante que exista a adaptação e desenvolvimento de novos

métodos de terapia os quais possam contribuir para uma melhor qualidade de vida dos pacientes oncológicos. Entre esses novos métodos, pode-se destacar a imunoterapia, que utiliza do sistema imunológico do paciente para o reconhecimento e eliminação das células neoplásicas (WALDMAN, *et al.*; 2020). A imunoterapia pode ser utilizada de forma conjunta com os tratamentos tradicionais, de forma a potencializar a eliminação do câncer, além de possibilitar uma maior especificidade do tratamento direcionada a células cancerígenas, evitando efeitos colaterais mais graves (JUNIOR, *et al.*; 2020). No Brasil, o estudo da imunoterapia apresenta uma importante linha de pesquisa no Instituto Nacional do Câncer, liderada pelo pesquisador Dr. Martin Bonamino. Essa linha de pesquisa tem como foco a realização de cultivo e modificação genética de células do sistema imunológico, com o objetivo de induzir respostas antitumorais.

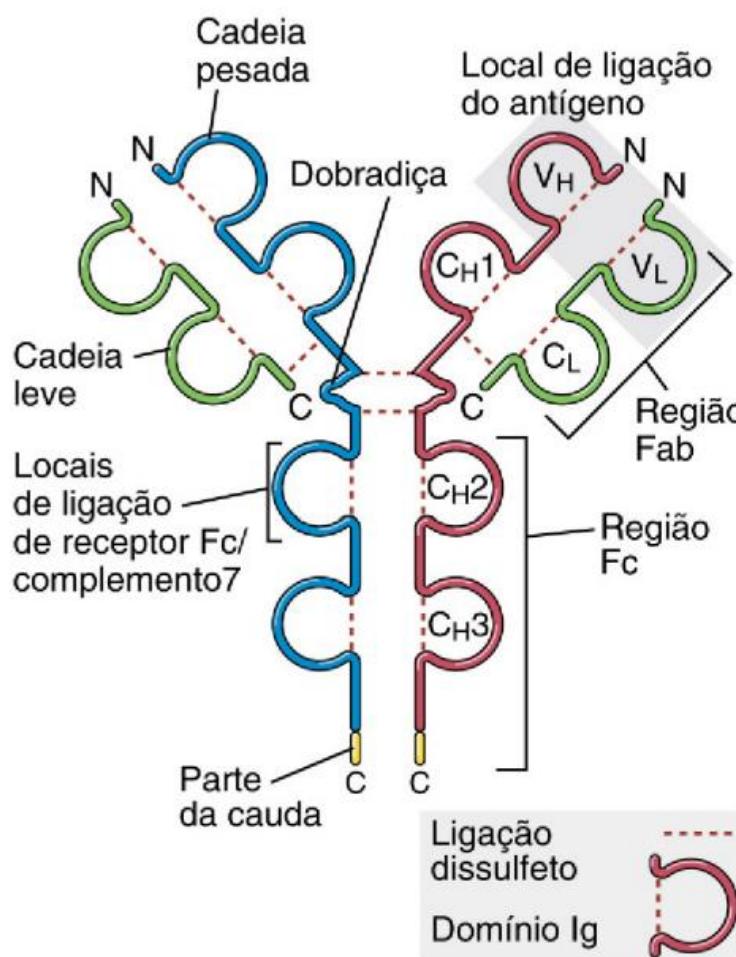
1.2 Anticorpos

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são moléculas proteicas circulantes produzidas por células B em resposta à exposição a estruturas estranhas ao corpo, conhecida como抗ígenos. Eles são moléculas diversas e específicas em suas habilidades de reconhecimento dos抗ígenos e constituem os mediadores da imunidade humorada contra todas as classes de microrganismos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015). Todos os anticorpos compartilham as mesmas características estruturais básicas, porém apresentam significativa variabilidade em regiões onde os抗ígenos se ligam. Essa variabilidade das regiões onde os抗ígenos se ligam é responsável pela capacidade de diferentes imunoglobulinas serem aptas de se ligarem, de forma específica, a muitos抗ígenos (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015).

Os anticorpos são compostos de duas regiões distintas: o fragmento cristalizável (*Fc*) e a região de ligação ao抗ígeno (*Fab*). O *Fc* é responsável por “engatilhar” as funções efetoras do sistema imune adaptativo e o *Fab* é onde ocorre a maior variabilidade de sequência responsável por garantir a especificidade de ligação dos anticorpos aos seus respectivos抗ígenos. Todos os anticorpos são feitos por duas cadeias polipeptídicas pesadas de mesma sequência e duas cadeias polipeptídicas leves de mesma sequência. Ambas as cadeias pesadas e leves são formadas por sequências que formam um motivo globular, denominado de domínio Ig com uma ligação dissulfeto intra-cadeia em cada domínio Ig. Além disso, dentro das cadeias pesadas e leves também existem diferenças em suas regiões, apresentando regiões variáveis (V) e regiões constantes (C) (JANEWAY *et al.*, 2016). As cadeias pesadas das imunoglobulinas são formadas por cinco ou quatro domínios Ig, sendo um desses domínios presente na região V, formando a região variável da cadeia pesada (*VH*) e o resto dos domínios presentes na região

C, formando as regiões constantes da cadeia pesada ($CH1$, $CH2$, $CH3$ e/ou $CH4$); já as cadeias leves são formadas por apenas dois domínios Ig, apresentando um domínio presente na região, formando a região variável da cadeia leve (VL) e um domínio presente na região C, formando a região constante da cadeia leve (CL) (JANEWAY *et al.*, 2016). As cadeias leves e pesadas são ligadas entre si mediante ligações dissulfeto entre CL e $CH1$, e as duas cadeias pesadas são ligadas entre si também por ligações dissulfeto entre os domínios $CH2$ das duas cadeias, no caso do anticorpo IgG.

Figura 1 – Representação ilustrada de moléculas de anticorpo da classe IgG. Azul e Vermelho: Cadeias pesadas (CH : Domínio constante da cadeia pesada; VH : Domínio variável da cadeia pesada). Verde: Cadeias leves (CL : Domínio constante da cadeia leve; VL : Domínio variável da cadeia leve). Cada região de semicírculo representa um domínio Ig. Cada reta pontilhada representa uma ligação dissulfeto.

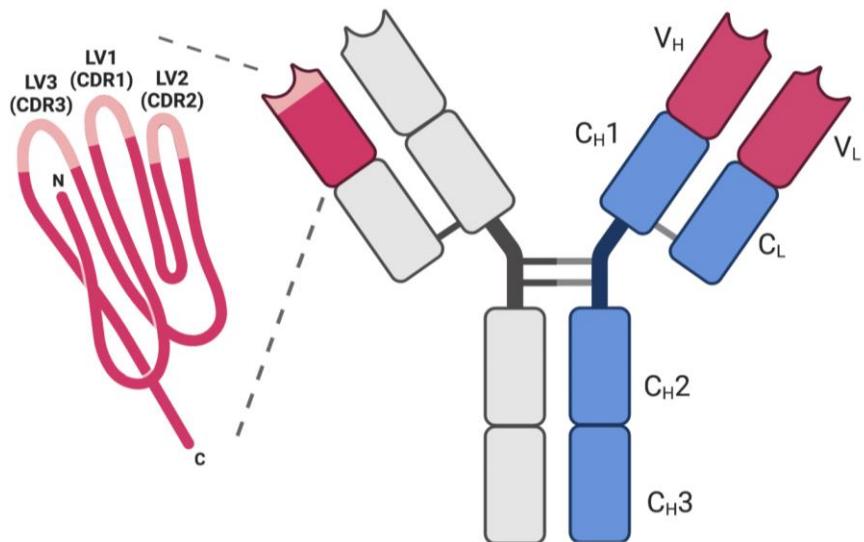


Fonte: Livro Imunologia Celular e Molecular por ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2016.

A maior parte das diferenças da sequência e da variabilidade entre os diversos

anticorpos encontra-se restrita a três regiões menores da região *VH* e três regiões menores da região *VL*. Essas três regiões menores, tanto de *VH* quanto de *VL*, são conhecidos como regiões hipervariáveis (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015). Essas regiões hipervariáveis formam uma superfície de ligação ao antígeno, gerando uma estrutura tridimensional (3D) que é complementar à forma 3D do antígeno e, por isso, as regiões hipervariáveis também são chamadas de Regiões de Determinação de Complementariedade (*CDRs*). As diferenças de sequência entre as *CDRs* dos anticorpos geram estruturas 3D complementares a抗ígenos diferentes, o que contribui para a especificidade de ligação dos anticorpos.

Figura 2 – Representação ilustrada de um anticorpo de forma a enaltecer as *CDRs*. Azul: região constante. Vermelho: região variável. Rosa: *CDRs* de *VL*. Azul: região constante.



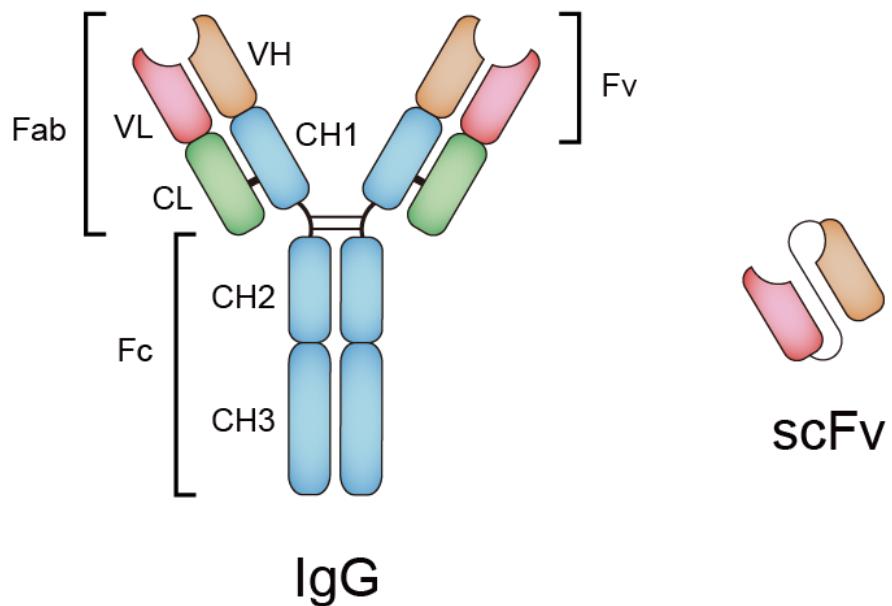
Fonte: Adaptado de Rapid Novor, 2022.

1.2.1 Fragmentos variáveis de cadeia única

A porção do anticorpo constituída apenas por *VH* e *VL* é chamada de fragmento variável (*Fv*). Essa é uma região importante, pois é a menor unidade da molécula de imunoglobulina com função nas atividades de ligação ao antígeno (AHMAD, *et al.*, 2012). Devido a avanços na tecnologia de geração de anticorpos recombinantes, foi possível gerar uma molécula formada pelo *Fv* unida por um *linker* peptídico flexível, chamada de fragmento variável de cadeia única (*scFv*). Atualmente, os *linkers* mais utilizados são aqueles contendo ou resíduos de Glicina e Serina, por serem resíduos que permitem maior flexibilidade à molécula, ou resíduos carregados, como Glutamina e Lisina, que aumentam a solubilidade do *scFv*.

Essas moléculas passaram a ser utilizadas em diversos campos de estudo, por reter a capacidade de ligação ao antígeno dos anticorpos e por apresentarem tamanho menor que o anticorpo inteiro. Isso facilita, por exemplo, a utilização de derivados de anticorpo no tratamento de tumores, pois existe uma melhoria da penetração da molécula no tumor (AHMAD, *et al.*, 2012). Além disso, moléculas de *scFv* podem ser facilmente produzidas em sistemas procarióticos, elevando o valor da relação de custo-benefício na produção em larga escala (YIN KHOR, *et al.*, 2017).

Figura 3 – Representação ilustrada de uma molécula de anticorpo da classe IgG e o seu scFv correspondente. Azul: *CH1*, *CH2* e *CH3*. Verde: *CL*. Laranja: *VH*. Vermelho: *VL*.



Fonte: Adaptado de Creative Biolabs, 2023.

1.2.2 Anticorpo hLL2/Epratuzumab

Epratuzumab ou hLL2 é o nome dado para um anticorpo IgG humanizado derivado do anticorpo murino LL2, que apresenta como ligante a proteína CD22, uma molécula transmembrana de expressão majoritária em células B. Epratuzumab é utilizado em testes clínicos de pacientes com linfoma não-Hodgkin, LLA-B, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjogren. A versão humanizada de LL2 foi desenvolvida com objetivos de minimizar as chances de imunogenicidade, incrementar as suas funções efetoras e prolongar a sua meia-vida, tanto nos objetivos de diagnóstico, como de imunoterapia (LEUNG *et al.*, 1995). Sabe-se que Epratuzumab é mundialmente patenteado por uma empresa da área farmacêutica e

está sendo avaliado em dois testes clínicos de fase três, além de estar em uma designação do *FDA* para revisão acelerada, o que facilita a disponibilização do medicamento de forma mais rápida, caso seja aprovado nos testes clínicos.

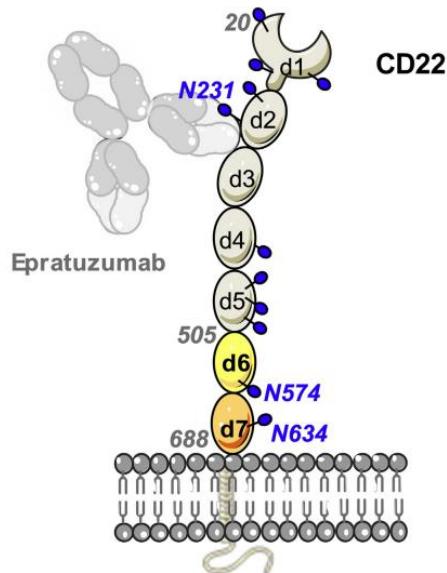
Sabe-se que um anticorpo humanizado é uma proteína recombinante feita a partir de um anticorpo originário de outra espécie, por exemplo, murinos. Isso é feito por meio da transferência das regiões *CDRs* desse anticorpo murino para os domínios *VH* e *VL* de um anticorpo humano com *CDRs* ausentes. A região dos domínios *VH* e *VL* de um anticorpo sem considerar as *CDRs* são chamadas de regiões “*framework*”. Dessa forma, o Epratuzumab foi construído utilizando as *CDRs* de LL2 e, tanto as regiões constantes quanto a região *framework* foram derivadas da subclasse de imunoglobulinas humana IgG1(LEUNG *et al.*, 1995).

1.3 Receptor CD22 de células B

CD22 é uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas e da família das "Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin" (*Siglecs*). É uma proteína marcadora de células B. Os ligantes dessa proteína são moléculas de carboidratos com ácido siálico, que são abundantes em glicosilações de glicoproteínas de membrana celular (JELLUSOVA e NITSCHKE, 2012). CD22 atua como correceptor inibitório para sinalização de receptor de célula B (*BCR*), e tem função importante no estabelecimento de um nível basal de inibição de célula B, garantindo a homeostase da imunidade humoral (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017).

Sua região extracelular é composta de 7 domínios Ig e 12 sítios de N-glicosilação, que é um tipo de glicosilação em proteínas na cadeia lateral de resíduos de asparagina. A região intracelular de CD22 contém três motivos de inibição baseados em imunorreceptores de tirosina (*ITIM*). Quando CD22 se liga ao ácido siálico, as tirosinas dos motivos *ITIM* são fosforiladas, de forma a proporcionar o recrutamento e ativação de enzimas que inibem as respostas de células B (EREÑO-ORBE *et al.*, 2021).

Figura 4 – Representação ilustrada de CD22 em interação com Epratuzumab, evidenciando as N-glicosilações em azul.



Fonte: Adaptado de EREÑO-ORBEA *et al.*, 2021.

Por ser uma proteína marcadora de células B, CD22 é visto como um alvo importante no tratamento de doenças que afetam esse tipo celular, como a LLA-B. Diversas abordagens terapêuticas para esse tipo de doença tem como meta atingir a inibição de células B por meio de CD22, seja por meio da indução de tolerância ou anergia, ou até por meio da depleção das células B, utilizando CD22 como alvo (POE e TEDDER, 2012).

Então, a utilização de anticorpos que tem como ligante a molécula de CD22, como o Epratuzumab, tem potencial função terapêutica, podendo servir para induzir a fosforilação dos motivos *ITIM* de CD22 e, por conseguinte, inibir a resposta imunológica humoral por células B e, também, para servir como molécula que irá “selecionar” células B, para posterior depleção desse tipo celular, garantindo um tratamento mais direcionado e eficaz contra doenças envolvendo esse tipo celular. Uma vantagem do uso do Epratuzumab vem do fato dessa molécula não competir pelo sítio de ligação com o ácido siálico, o ligante natural de CD22. Isso ocorre, pois, o epítopo de Epratuzumab está compreendido nos domínios D2 e D3 da região extracelular (Figura 4), enquanto a região de ligação a ácido siálico está presente no domínio D1 (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017). Porém, sabe-se que a interface de interação de Epratuzumab com CD22 também inclui uma N-glicosilação de CD22 no domínio D2 (Figura 4) e que a composição e tamanho dessa N-glicosilação impacta no acesso do Epratuzumab a seu epítopo e, com isso, influenciando na interação entre essas moléculas (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017).

A partir disso, é importante compreender, a nível molecular, como as N-glicosilações de CD22 podem impactar na formação dessa interface de interação.

1.4 Linfócitos T e Transferência Adotiva de Células

Os linfócitos B têm como função produzir anticorpos e desenvolver a imunidade humoral, enquanto as células T atuam como células efetoras e reguladoras da imunidade celular. A proteção contra agentes infecciosos e tumores depende da ativação das células T, um processo que envolve diversas etapas. Inicialmente, é necessário que haja o contato entre as células apresentadoras de抗ígenos (*APCs*) e os linfócitos T, por meio da interação dos receptores de linfócito T (*TCR*) e moléculas acessórias ou coestimuladoras, presentes na membrana das células T, com seus ligantes nas *APCs* (SOARES *et al.*, 2020). Esse processo desencadeia sinais intracelulares que são capazes de engatilhar a produção de mediadores proteicos que têm papel importante nas respostas imunológicas.

A partir de avanços científicos e por meio do aprimoramento de técnicas de biologia molecular, houve um aumento significativo no conhecimento acerca da caracterização molecular de tumores. Uma das áreas do tratamento de cânceres que se beneficiou desse fato foi a da imunoterapia. Por exemplo, a descoberta da existência de células T reativas a moléculas tumorais possibilitou que novas metodologias de imunoterapia surgissem, por exemplo, a utilização de linfócitos infiltrantes tumorais para realizar lise celular de tumores (ABDO, 2019).

A imunoterapia por transferência adotiva de células (*ACT*) é uma potente metodologia para tratamento do câncer. Essa metodologia compreende a utilização dos linfócitos do próprio sistema imunológico do paciente para eliminar o tumor. Iniciou-se com a expansão *in vitro* e a posterior infusão de linfócitos T infiltradores de tumor (*TILs*), isolados do tumor do próprio paciente (CHICAYBAM e BONAMINO, 2014). Atualmente, a *ACT* já apresenta diversos avanços, como o uso de engenharia genética nos linfócitos retirados do paciente, para aumentar a capacidade antitumoral.

1.4 Receptor de Antígeno Químérico

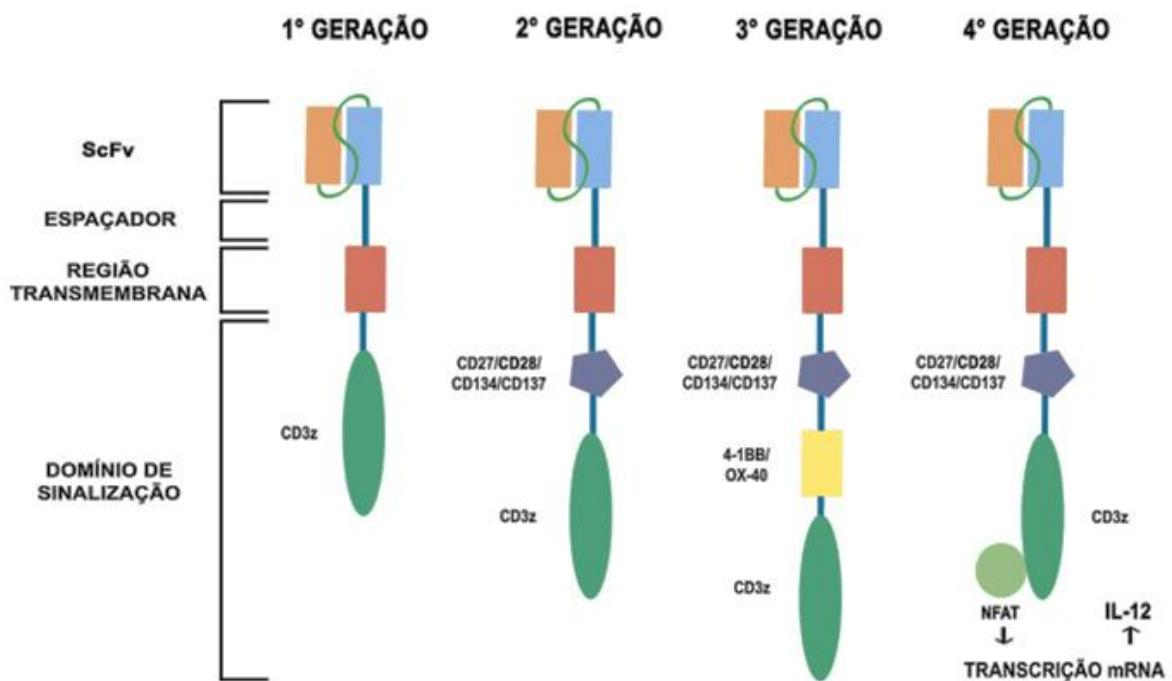
Receptores de Antígenos Químéricos (*CARs*) são moléculas recombinantes que carregam um domínio de reconhecimento de antígeno derivado de anticorpo e a região de sinalização de um *TCR* (CHICAYBAM e BONAMINO, 2014). A utilização de *CARs* é uma abordagem da *ACT* que permite a geração de células T com esses receptores artificiais, as células *CAR-T*, que têm como alvo as células cancerígenas. (ZHANG *et al.*, 2017). Graças aos avanços da biologia sintética, imunologia e engenharia genética, hoje é possível gerar células

T humanas que apresentam especificidades desejadas e funcionalidades aprimoradas. A recente entrada da indústria farmacêutica nessa área tem aumentado as perspectivas para a disponibilidade ampla de células T modificadas (SANTOS *et al.*, 2020).

A terapia celular *CAR-T* tem se mostrado uma importante ferramenta no combate a certos tipos de câncer de sangue, como leucemia e linfoma. Essa tecnologia consiste em reprogramar as células de defesa do próprio paciente para atacar as células cancerígenas. Desde os primeiros ensaios clínicos da *CAR-T* em 2010, nos Estados Unidos, mais de 10 mil pacientes terminais em todo o mundo já foram submetidos ao procedimento, com resultados positivos, incluindo a remissão da doença em muitos casos (Portal do Butantan, 2018). Médicos que atuam com a terapia por *CAR-T* há anos estimam que, nos primeiros anos, a taxa de sucesso para a remissão dos tumores ficava entre 30% e 40% dos pacientes; já, hoje, essa eficácia supera os 80% (Portal do Butantan, 2018). Ou seja, pode-se dizer que 8 em cada 10 pacientes com leucemia ou linfoma em estágio terminal que se submetem à terapia *CAR-T* apresentam remissão completa dos tumores.

A primeira geração de *CARs* consistia em um *scFv* construído a partir de sequências do *VH* e *VL* de anticorpo monoclonal e o domínio citoplasmático de sinalização de cadeia CD3 (SANTOS *et al.*, 2020). No entanto, esses *CARs* requerem sinais coestimulatórios adicionais para melhorar a proliferação das células T e evitar a detenção na fase G-G1 do ciclo celular. Com base em uma segunda modificação genética, os *CARs* de segunda e terceira geração foram desenvolvidos com a adição de domínios coestimuladores, como CD28, CD137 (4-1BB), CD27 e CD134 (SANTOS *et al.*, 2020). Também foi construída a quarta geração de *CARs*, também chamados de *TRUCKs* que, além de possuírem domínio coestimulatório, também apresentam domínio capaz de induzir a expressão de citocina transgênica, como a IL-2 (CHMIELEWSKI e ABKEN, 2015).

Figura 5 – Representação ilustrada das gerações de *CARs* e suas composições moleculares.



Fonte: SILVA e FERNANDES, 2021.

Como foi comentado anteriormente, o *scFv* é composto pelas regiões *VH* e *VL* de um anticorpo, conectadas por um *linker* peptídico flexível e o *linker* usado mais comum é o (Gly4-Ser)3, devido a sua alta flexibilidade, mas é possível incorporar aminoácidos carregados nesse *linker* para aumentar a solubilidade da proteína (CRIVIANU-GATA & THOMPSON, 2016). Entre a região de reconhecimento do antígeno e a região transmembrana há um espaçador que parece ser necessário para a função ideal de alguns *CARs*. A presença do espaçador pode fornecer mais flexibilidade à porção de reconhecimento, permitindo que ela se ligue a epítocos próximos à membrana plasmática. O *hinge-CH2-CH3*, derivado da IgG, é a região espaçadora mais utilizada (GUEDAN *et al.*, 2018). O domínio transmembrana é composto por uma alfa-hélice hidrofóbica e é responsável por ancorar o *CAR* na membrana da célula T modificada. Apesar de sua função principal ser a ancoragem, algumas evidências sugerem que esse domínio pode ser relevante para a função do *CAR-T* (SILVA & FERNANDES, 2021). O endodomínio de sinalização é responsável pela ativação das células *CAR-T* e é composto por domínios de ativação das células T geralmente derivados da molécula CD3 zeta, que contém sequências de aminoácidos específicas chamadas de *ITAMs*, importantes na sinalização celular (GOUVEIA, 2019). Dependendo da geração do *CAR*, o endodomínio de sinalização também pode conter domínios de coestimulação.

Atualmente, já existem 6 medicamentos baseados em *CAR* aprovado pelo *Food and Drug Administration (FDA)*, órgão de fiscalização de saúde dos Estados Unidos, porém, nenhum desses medicamentos apresenta CD22 como alvo. Então, pesquisas baseadas em *CARs* que têm como alvo a molécula de CD22 têm sido realizadas, principalmente, para geração de novas possibilidades de tratamento para pacientes oncológicos, principalmente, os que não obtiveram remissão total do câncer com o tratamento por *CAR-T* disponível. Dessa forma, é possível visualizar como a utilização de um *CAR* com *scFv* nativo de Epratuzumab pode ser utilizado na criação de uma novo produto *CAR-T*.

1.5 Simulação de Dinâmica Molecular (DM)

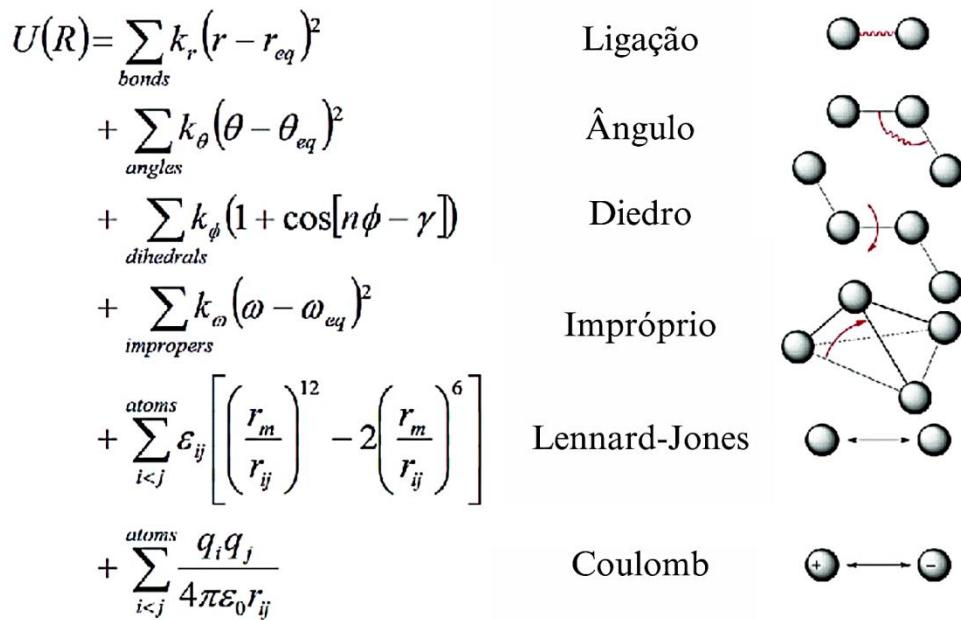
Reconhecimento molecular e propriedades mecânicas das proteínas são os principais fatores que controlam os processos celulares que podem causar doenças e, por consequência, podem ser utilizados como alvo no *design* de fármacos (ISRALEVITZ, 2001). Dessa forma, a obtenção de novos dados a respeito do reconhecimento e interação molecular entre um anticorpo e um alvo, por exemplo, pode gerar informações valiosas na proposição de modificações que otimizem a eficácia desse anticorpo. Logo, entender o comportamento das moléculas, a nível atomístico, é um passo que pode ser essencial no desenvolvimento de novos fármacos.

As simulações de Dinâmica Molecular (DM) são um termo usado para descrever a solução de equações de movimento clássicas, ou seja, equações de movimento de Newton, para um conjunto de partículas (ALLEN e TILDESLEY, 1989). Essa técnica foi criada oficialmente entre 1957 a 1959, pelos pesquisadores Alder e Wainwright, que tinham como intenção criar um método que servisse para calcular o comportamento de diversas partículas a partir das equações clássicas (ALDER e WAINWRIGHT, 1959). Atualmente, as aplicações mais comuns das simulações de DM são para predizer propriedades dos materiais envolvidos nessas simulações (FRENKEL e SMIT, 2001). Por exemplo, é possível fazer um estudo de como o epítopo de uma molécula pode influenciar na interface de interação com outra molécula (LIMA, 2022).

A técnica de simulação de DM funciona da seguinte maneira: para começar a simulação, deve-se atribuir posições e velocidades a todas as partículas do sistema construído. As posições das partículas devem ser compatíveis com a estrutura que se deseja simular (FRENKEL e SMIT, 2001). Após isso, existe o cálculo de cada força agindo em cada partícula, por meio da função do campo de força. O campo de força é um conjunto de equações matemáticas que descrevem a energia potencial de um sistema por meio das interações entre

partículas ligadas, mediante ligações covalentes, ângulos de ligação, diedros próprios e impróprios, e entre partículas não-ligadas, com interações de *van der Waals* e eletrostáticas (BERENDSEN *et al.*, 1995) (Figura 6). O potencial de interação entre partículas não-ligadas ($V_{não-ligados}$) é feito pela soma do potencial de Lennard-Jones (V_{LJ}), que é usado para modelar as interações de *van der Waals* (vdW) e o potencial de Coulomb, usado para modelar as interações eletrostáticas (V_{elet}) (Equação 1). V_{LJ} representa as interações de curto alcance e o potencial de Coulomb representa as interações de longo alcance.

Figura 6 – Representação de como o campo de força é construído para as interações de ligação covalente, ângulo, diedros, diedros impróprios, vdW e eletrostáticas. r é o comprimento de ligação; θ é o ângulo entre átomos; ϕ é o ângulo diedral; ω é o ângulo diedral impróprio; r_{ij} é a distância entre átomos i e j ; $k_r, k_\theta, k_\phi, k_\omega$, e ϵ_0 são constantes de força; $r_{eq}, \theta_{eq}, \omega_{eq}$ são posições de equilíbrio; ϵ_{ij} é relacionado ao cálculo do potencial de Lennard-Jones; r_m é a distância a qual o potencial atinge seu mínimo; q_i e q_j são as cargas dos seus respectivos átomos; e ϵ_0 é a constante dielétrica.



Fonte: Adaptado de CHANG *et al.*, 2016.

$$V_{não-ligados} = V_{LJ} + V_{elet} \quad (1)$$

A partir do potencial total do sistema calculado com utilização do campo de força, é possível obter a força que atua sobre cada partícula mediante o cálculo da derivada do

potencial com relação a posição de cada átomo. A partir da força calculada em cada átomo (\vec{F}_i) e da sua massa (m_i), é possível calcular sua aceleração vetorial (\vec{a}) por meio da equação de movimento Newtoniana (Equação 2). E, por meio da aceleração obtida, é possível obter tanto a posição anterior ($t - dt$) da partícula quanto a nova posição da partícula ($t + dt$), dado um intervalo de tempo.

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

Assim, é possível calcular novas posições para cada partícula de forma contínua, de maneira que é possível criar uma trajetória de posições de cada partícula do sistema. A partir dessa trajetória, que contém informações a respeito das novas posições, é possível realizar análises dos determinantes estruturais e energéticos de interesse.

Para iniciar uma simulação de DM, é necessária a execução, em ordem, das seguintes etapas:

1 – Construção do sistema. No sistema, serão inseridas as moléculas de interesse da pesquisa, tais como moléculas de água, proteína e íons. Para que essas moléculas sejam inseridas no sistema, cria-se uma “caixa” onde o sistema será simulado. Durante a simulação de DM, aplicam-se as condições periódicas de contorno, onde a caixa de simulação, no lugar de estar existindo ao redor de um vácuo, é rodeada por várias cópias de si mesma (BERENDSEN *et al.*, 1995; VAN DER SPOEL *et al.*, 2005). É necessária a escolha do campo de força com os parâmetros compatíveis com o sistema a ser simulado. Por exemplo, caso exista um carboidrato na proteína de interesse, é essencial que ele seja descrito no campo de força.

2 – Minimização dos maus contatos do sistema. É necessário que o sistema passe por etapas de minimização de energia, onde se deseja que o sistema atinja um mínimo global de energia, entretanto, os algoritmos de minimização de energia apenas permitem que o sistema atinja o mínimo local de energia potencial mais próximo, de forma a minimizar conflitos estereoquímicos.

3 – Termalização. A termalização serve para que a estrutura do sistema seja ajustada para um estado termodinâmico de interesse. Normalmente, essa etapa é feita por meio de *ensemble* canônico, onde o número de partículas, o volume e a temperatura são controlados (*NVT*) e por meio de *ensemble* isotérmico-isobárico, onde o número de partículas, a pressão e a temperatura são controlados (*NPT*) (ALLEN e TILDESLEY, 1989).

4 – Produção de trajetória. Com o fim da etapa de termalização, parte-se para a

etapa de produção de trajetória, que, é feita em *ensemble* isotérmico-isobárico, e, após, pode-se aplicar as análises estruturais e energéticas na trajetória obtida.

2 JUSTIFICATIVA

Existe a necessidade do desenvolvimento e adaptação de novos tipos de terapias contra o câncer, em prol de disponibilizar ao paciente um tratamento mais direcionado e eficaz. A imunoterapia apresenta o potencial para ser o tratamento mais específico que pode ser concebido contra tumores, devido à possibilidade de ativar respostas imunes específicas para alvos tumorais, minimizando os efeitos negativos em células saudáveis (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015).

Recentemente, o Brasil entrou para o mapa de países que produzem essa terapia em grande escala, com a inauguração do Programa de Terapia Celular do Instituto Butantan, Universidade de São Paulo e Hemocentro de Ribeirão Preto (Portal do Butantan, 2018). Entre os especialistas envolvidos na produção de pesquisa sobre *CAR-T* para terapia celular, no Brasil, é importante destacar o pesquisador Martin Bonamino do INCA-Fiocruz, colaborador de projetos do GEPeSS. Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no ano de 2023, selecionou dois projetos com os objetivos de aprovação de testes clínicos e produção nacional dos produtos da terapia. O Brasil tem sido destaque na América Latina, devido à estrutura científica e regulatória de qualidade para a realização de estratégias que têm como objetivo realizar a pesquisa e desenvolvimento de produtos terapêuticos de alta tecnologia (Ministério da Saúde, 2023).

Já no contexto internacional, existem seis terapias CAR-T aprovadas pelo *FDA* para utilização nos Estados Unidos. Entre essas seis terapias, quatro tem como doenças a serem tratadas linfomas de células B, como a LLA-B e Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB). Todas essas terapias por CAR-T que tratam linfomas de células B apresentam o mesmo alvo molecular: a molécula CD19, um marcador de células B (National Cancer Institute, 2022). Apesar da estratégia terapêutica por *CAR-T* anti-CD19 induzir a altas taxas de resposta antitumorais e a longas remissões, aproximadamente de 30% a 60% dos pacientes apresentam recidiva do câncer, e entre esses pacientes, cerca de 10% a 20% apresentam recidiva com perda de expressão de CD19 pelas células tumorais (XU *et al.*, 2019). Isso é um mecanismo de evasão do tumor, que permite com que as células tumorais não sejam reconhecidas pelo *CAR* anti-CD19 e, com isso, não sejam eliminadas.

Por isso, faz-se necessário que novos alvos moleculares de células B sejam explorados, visando a garantir uma alternativa viável de tratamento com *CAR-T* a pacientes

com perda de expressão de CD19. Como a molécula de CD22 também é uma marcadora de células B, sua utilização como alvo na terapia por *CAR-T* é vista como uma estratégia promissora no desenvolvimento de novas alternativas de alvo molecular. Já existem testes clínicos que utilizam a terapia por *CAR-T* anti-CD22 (National Cancer Institute, 2023) visando viabilizar o tratamento de pacientes com tumores de células B, como a LLA-B, refratários. Dessa forma, é possível visualizar como o Epratuzumab, um anticorpo utilizado em testes clínicos no tratamento, principalmente, de LLA-B e lúpus eritematoso sistêmico e também se encontra em processo de revisão acelerada pelo *FDA*, pode servir para a construção de um novo *CAR* anti-CD22.

Um fator crucial no desenvolvimento de novos *CARs* é saber como ocorre a interação com o alvo molecular, a nível atomístico. Um dos meios de se fazer esse estudo é por meio de simulações de DM, que permitem a investigação de estruturas de proteínas a nível atomístico, de forma a possibilitar a análise dos determinantes estruturais e termodinâmicos, que são fatores relacionados à estrutura tridimensional e a propriedades energéticas respectivamente, os quais influenciam o comportamento de um sistema molecular.

A partir do que foi dito, é possível visualizar como as simulações de DM podem ser utilizadas no estudo dos parâmetros estruturais e termodinâmicos da interação entre o *scFv* nativo do anticorpo Epratuzumab e a proteína de membrana CD22, de forma que contribua com a obtenção de novos dados pertinentes a respeito da interação entre essas proteínas. A presença de glicosilações em CD22 pode ser um fator determinante na interação desse alvo com diferentes anticorpos. Logo, entender o papel dessas glicosilações na interação *scFv*-CD22 pode fornecer informações importantes na proposição de novas mutações nesse *scFv*, de forma a melhorar a afinidade dessa molécula com o CD22.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudar os determinantes estruturais e termodinâmicos resultantes da interação entre o *scFv* nativo de Epratuzumab (*scFv*-Epratuzumab) e o CD22, do domínio extracelular D1 até D3, considerando duas formas estruturais diferenciadas pela presença de N-glicosilações.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Modelar o *scFv*-Epratuzumab com base na estrutura cristalográfica do *Fab* de Epratuzumab, disponível no sítio virtual do *Protein Data Bank (PDB)* pelo código 5VL3;
- 2) Submeter o sistema *scFv*-Epratuzumab à simulação de DM e realizar as análises

estruturais a partir da trajetória obtida.

3) Fazer a modelagem dos *loops* faltantes da estrutura cristalográfica de CD22 (PDB 5VL3), que abrange os domínios extracelulares D1, D2 e D3. Depois, fazer a inserção das N-glicosilações para construir os sistemas de CD22 apresentando apenas uma glicosilação N-ligada, que é essencial para o dobramento correto de CD22 (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017) (CD22-1g), e de CD22 com glicosilação em todos os pontos de glicosilação N-ligada (CD22-6g).

4) Submeter os sistemas CD22-1g e CD22-6g à simulação de DM e realizar as análises estruturais a partir das trajetórias obtidas.

5) Submeter os sistemas de CD22-1g em interação com *scFv*-Epratuzumab (*scFv*-Epratuzumab/CD22-1g) e de CD22-6g em interação com *scFv*-Epratuzumab (*scFv*-Epratuzumab/CD22-6g) e realizar as análises estruturais e energéticas a partir das trajetórias obtidas.

6) Comparar os resultados obtidos com as análises de *scFv*-Epratuzumab/CD22-1g e *scFv*-Epratuzumab/CD22-6g, para elucidar como as N-glicosilações de CD22 influenciam na interação com *scFv*-Epratuzumab.

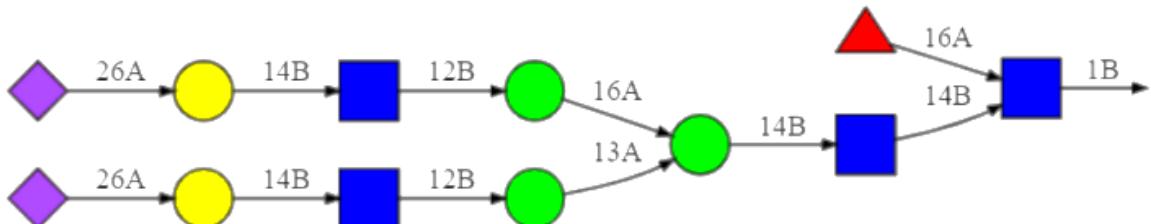
4 METODOLOGIA

4.1 Modelagem molecular de *scFv*-Epratuzumab, CD22-1g e CD22-6g

Os sistemas *scFv*-Epratuzumab, CD22-1g e CD22-6g foram modelados utilizando o *software* de modelagem comparativa MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993) na versão 9.20. Para a modelagem do *linker* (G4S)3do *scFv*-Epratuzumab, entre os domínios *VH* e *VL*, foi utilizada a estrutura cristalográfica do *Fab* de Epratuzumab disponível no PDB pelo código 5VL3 (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017) como estrutura tridimensional (3D) de referência. Em relação à modelagem dos sistemas CD22-1g e CD22-6g, também foi utilizado o software de modelagem comparativa MODELLER na versão 9.20. Foi utilizada a estrutura cristalográfica dos domínios D1, D2 e D3 disponível, também, no PDB pelo código 5VL3. Entretanto, na estrutura cristalográfica desses domínios, havia resíduos faltantes em regiões de *loops*, pois não foram definidos na densidade eletrônica, e quatro mutações pontuais em resíduos que são pontos de N-glicosilação. Então, os resíduos faltantes desses *loops* foram modelados usando o protocolo de modelagem de resíduos faltantes do MODELLER, de forma a realizar, também, a troca dos resíduos dos pontos de N-glicosilação que haviam sido mutados para o resíduo original. Esse protocolo utiliza apenas a estrutura 3D com os resíduos faltantes como referência para a modelagem completa.

Depois disso, foi feita a inserção das N-glicosilações para construção dos modelos CD22-1g e CD22-6g, por meio do servidor virtual CHARMM-GUI (JO *et al.*, 2008), um servidor utilizado para preparar estruturas de moléculas para simulações de DM. Todas as glicosilações em CD22-6g e a glicosilação em CD22-1g foram as mesmas (GlcNAc2FucMan3GlcNAc2Gal2Sia2) (Figura 7), por ser uma glicoforma comum que pode ser produzida em células humanas (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017).

Figura 7 – Esquema da árvore de glicosilação adicionada aos resíduos com N-glicosilação dos domínios D1,D2 e D3 de CD22. Vermelho: L-fucose, Azul : N-acetyl-D-glucosamina, Verde: D-manose. Amarelo: D-galactose. Roxo: Ácido N-acetyl-D-neuramínico. A: ligação do tipo alfa (α) glicosídica. B: ligação do tipo beta (β) glicosídica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4.2 Simulação de DM de *scFv*-Epratuzumab, CD22-1g e CD22-6g

4.2.1 Construção dos sistemas

Para realizar as simulações de DM, foi usado o *software* GROMACS na versão 2018.3 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005), por ser um pacote de programas que, além de realizar a simulação de DM, contêm as ferramentas que permitem preparar os sistemas para as simulações e permitem a realização de análises energéticas e estruturais dos sistemas simulados. Para a verificação do estado de protonação dos resíduos dos sistemas no pH 7,4, (pH fisiológico) foi utilizado o servidor virtual H++ (GORDON *et al.*, 2005).

Para preparar os sistemas para as etapas de minimização, termalização e produção de trajetória, é necessária a criação das caixas de simulação para cada um dos sistemas. Para o *scFv*-Epratuzumab, o tipo de caixa de simulação escolhido foi o do tipo cúbico. Já para os sistemas CD22-1g e CD22-6g o tipo de caixa de simulação escolhido foi o do tipo dodecaédrico. O tamanho das arestas da caixa de simulação cúbica de *scFv*-Epratuzumab foi de 9.0 nm, solvatada com 22631 moléculas de água. Já para a caixa de simulação dodecaédrica de CD22-1g, o tamanho das arestas foram de 16.070 nm, solvatada com 94033 moléculas de água, e, para a caixa de simulação dodecaédrica de CD22-6g, o tamanho das arestas foram de 16.071 nm,

solvatada com 93525 moléculas de água. Todas as moléculas de água foram de modelo TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983). Com isso, foi feita inserção de *scFv*-Epratuzumab, CD22-1g e CD22-6g no centro de suas respectivas caixas de simulação solvatadas.

Foi feita a inserção de íons Na⁺ e Cl⁻ na concentração de 0.15 M no sistema *scFv*-Epratuzumab e 0.10 M nos sistemas CD22-6g e CD22-1g. No sistema do *scFv*-Epratuzumab foram adicionados 66 Na⁺ e 69 Cl⁻, no CD22-6g foram adicionados 190 Na⁺ e 177 Cl⁻, no CD22-1g foram adicionados 180 Na⁺ e 177 Cl⁻.

4.2.2 Minimização

Foi feita a etapa de minimização de energia do sistema, utilizando o pacote GROMACS versão 2018.3 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005) e o algoritmo escolhido para realizar a minimização foi o *steepest descent* (MORSE; FESHBACH, 1953). Essa etapa é realizada visando diminuir a quantidade de impedimento estereoquímicos no sistema, otimizando suas geometrias e, com isso, diminuindo a energia potencial total do sistema. Após o fim da etapa de minimização, partiu-se para a termalização dos sistemas.

4.2.3 Termalização

Na termalização, o objetivo é atingir um estado termodinâmico de interesse para os sistemas. Isso é feito por meio de simulações em *ensembles* de número de partículas constante, volume constante e temperatura controlados (*NVT* ou *ensemble* canônico) (BERENDSEN *et al.*, 1984; BERENDSEN *et al.*, 1995) e em *ensembles* de número de partículas constante, pressão e temperatura controlados (*NPT* ou *ensemble* isotérmico-isobárico) (BERENDSEN *et al.*, 1984; HUANG, 1987; BERENDSEN *et al.*, 1995) na temperatura de 310 K.

4.2.4 Produção de trajetória

Para a etapa de produção de trajetória, foi utilizado *ensemble* isotérmico-isobárico a 310 K. Para as etapas de termalização e produção de trajetória, foi utilizado o campo de força CHARMM-36m (HUANG *et al.*, 2017) e, também, foram utilizados os seguintes parâmetros: para realizar as correções para interações eletrostáticas: *Particle Mesh Ewald* (PME) (DARDEN *et al.*, 1993); para realizar o controle de temperatura: V-rescale (BUSSI *et al.*, 2007); para o controle de pressão: Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984); para a integração das equações de movimento: *md/leap-frog* (HOCKNEY; GOEL, 1974); e para corrigir os comprimentos de ligação que envolvem os átomos de hidrogênio: algoritmo LINCS (HESS *et al.*, 1997).

4.3 Análise das trajetórias

Depois da etapa de produção de trajetória, foram feitas análises estruturais e energéticas das trajetórias dos sistemas por meio do pacote GROMACS. Foi realizada análise

de desvio quadrático médio (*RMSD*), Raio de giro (*Rg*), *cluster* e potencial de interação intermolecular (PII).

A análise de *RMSD* tem como objetivo avaliar as movimentações estruturais das moléculas de proteína dos sistemas ao longo do tempo de trajetória, por meio da resolução de uma equação que compara as posições de um átomo em relação à uma posição de referência que pode ser, por exemplo, a posição inicial desse átomo na trajetória, e, com isso calcular o desvio entre as posições desses átomos.

A análise de raio de giro permite verificar mudanças na conformação da molécula em relação a sua compacidade, por meio de um cálculo que analisa o centro de massa da proteína ao longo da trajetória.

A análise de *cluster* permite observar quais estruturas da trajetória foram mais visitadas. Baseia-se no agrupamento de estruturas de acordo com uma distância escolhida entre elas, chamada de raio de corte. O *RMSD* médio, por exemplo, pode servir como raio de corte para o agrupamento de estruturas no mesmo cluster (LIMA, 2022). Nessa análise, as estruturas que estão dentro do limite do raio de corte em relação a uma estrutura de referência são agrupadas dentro de um mesmo *cluster*. Dessa forma, o *cluster* com o maior número de vizinhos e os seus vizinhos estão presentes dentro do cluster mais representativo.

A análise de PII calcula os potenciais de interação de curto alcance (Lennard-Jones) e longo alcance (Coulomb) durante a trajetória, também por meio do estabelecimento de um raio de corte. Essa análise permite verificar se estruturas do sistema apresentam uma interação, no geral, repulsiva ou atrativa.

Para visualização da trajetória foram utilizados os programas PyMOL (SCHRODINGER & DELANO, 2020) e VMD (HUMPHREY & DALKE & SCHULTEN, 1996). Para visualização dos gráficos e dados gerados nas análises, foi utilizado o software OriginPro 8 (Origin 8. OriginLab Corp).

4.4 Construção, simulação e análises dos complexos

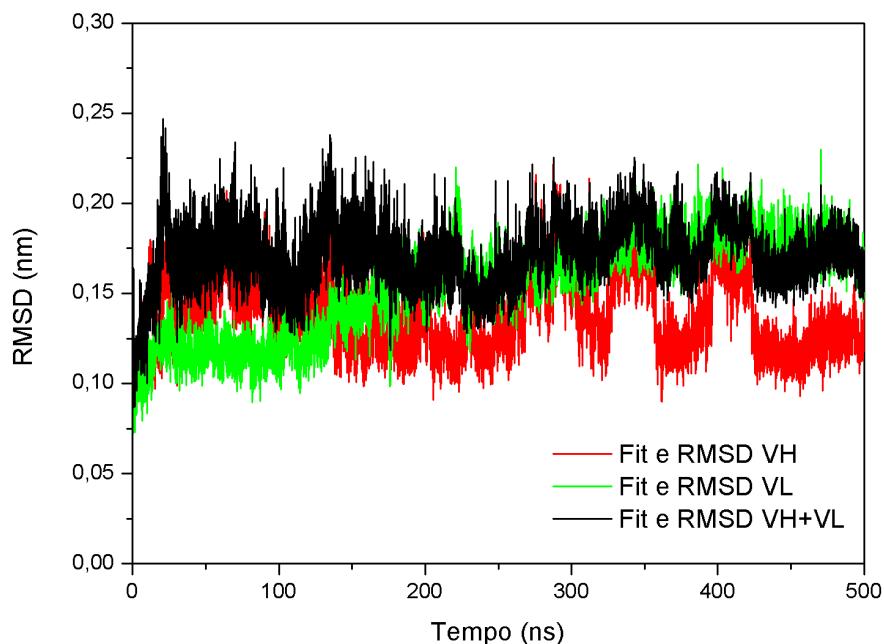
Foram construídos os sistemas em complexo de *scFv* /CD22-6g e *scFv*/CD22-1g, mediante a sobreposição de estruturas pertencentes ao cluster mais representativo de cada um dos sistemas com as estruturas cristalográficas do *Fab* de Epratuzumab em interação com CD22, do domínio D1 até D3 (PDB 5VL3). Depois dos complexos terem sido construídos, foram feitas as etapas de minimização, termalização, produção de trajetória com os mesmos parâmetros utilizados nos sistemas individuais, além de também terem sido realizadas as análises estruturais e energéticas dos complexos, como análise de *RMSD* e de PII.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Simulação de DM do scFv-Epratuzumab

Para avaliar as variações estruturais dos domínios de *scFv*-Epratuzumab, foram realizadas análises do perfil de *RMSD* gerado (Figura 8). Foi definido o tempo de equilíbrio (*teq*), isto é, o momento em que os domínios alcançaram o equilíbrio estrutural, de forma que, a partir desse momento, as curvas tornam-se mais estáveis, como 150 ns de simulação. Os valores de *RMSD* médios dos domínios *VH* e *VL* de *scFv*-Epratuzumab, a partir do *teq*, estão descritos na Tabela 1. O *linker* foi desconsiderado no cálculo do *RMSD*, devido à alta flexibilidade em meio aquoso dos seus resíduos de glicina e serina, o que contribui para que ele se movimente bastante durante a simulação. Isso gera diversas mudanças conformacionais, o que iria aumentar bastante os valores de *RMSD*. É possível observar que, rapidamente, os domínios *VH* e *VL* alcançam o equilíbrio estrutural e permanecem em equilíbrio, caracterizando o *scFv*-Epratuzumab como uma proteína estável no sistema utilizado para simulação de DM.

Figura 8 – Curva de *RMSD* dos $C\alpha$ dos componentes de *VH* e *VL* em água ao longo dos 500 ns da simulação. Vermelho: *VH*. Verde: *VL*. Preto: *VH+VL*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

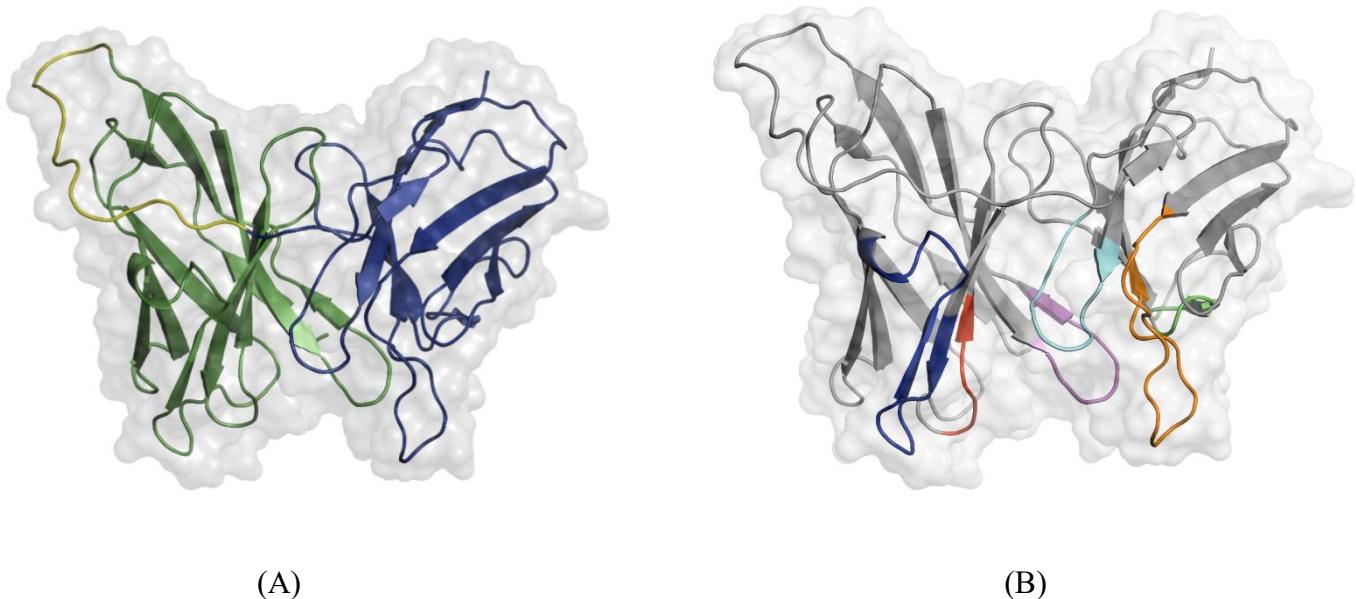
Tabela 1 – *RMSD* médios calculados para *VH+VL*, *VH* e *VL* a partir do teq.

Estrutura	Tempo de equilíbrio (ns)	<i>RMSD</i> médio (nm)
<i>VH+VL</i>	150	$0,17 \pm 0,01$
<i>VH</i>	150	$0,13 \pm 0,02$
<i>VL</i>	150	$0,16 \pm 0,01$

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Na figura 9A, está representada a imagem da estrutura tridimensional de *scFv*-Epratuzumab obtida aos 500 ns de simulação de DM. Essa estrutura evidencia os domínios *VH*, *VL* e *linker*. Já a figura 9B, corresponde à estrutura tridimensional de *scFv*-Epratuzumab obtida aos 500 ns de simulação evidenciando as *CDRs* de Epratuzumab.

Figura 9 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional de *scFv*-Epratuzumab na orientação *VH-Linker-VL*. (A) Identificação do domínio *VH* (em verde), do domínio *VL* (em azul) e do *linker* (em amarelo). (B) Identificação das *CDRs* de Epratuzumab. Vermelho: *CDR-H1*; Azul: *CDR-H2*; Magenta: *CDR-H3*; Laranja: *CDR-L1*; Verde: *CDR-L2*; Ciano: *CDR-L3*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

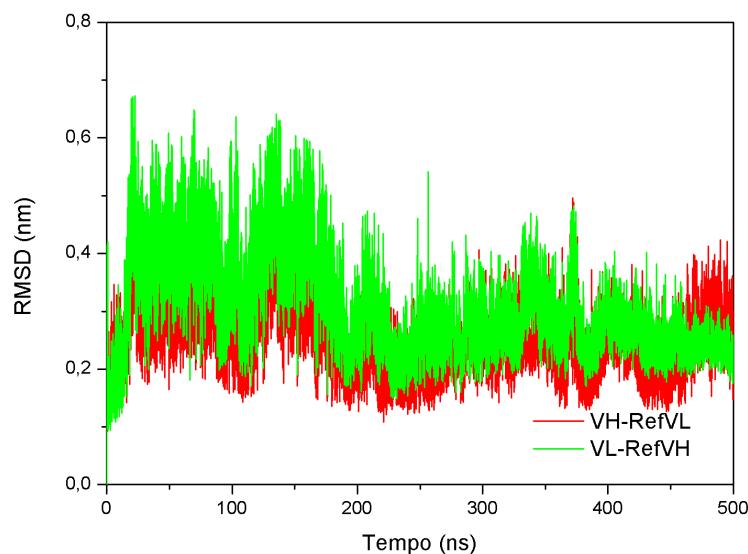
Quadro 1 – Identificação da sequência de resíduos e suas numerações das CDRs do scFv-Epratuzumab

CDRs de scFv-Epratuzumab	Sequência	Numeração dos resíduos
CDR-H1	SYWLH	31-35
CDR-H2	YINPRNDYTEYNQNFKD	50-66
CDR-H3	RDITTFY	99-105
CDR-L1	KSSQSVLYSANHKNYLA	155-171
CDR-L2	WASTRES	187-193
CDR-L3	HQYLSSWTF	226-234

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Além disso, também foi avaliada a movimentação relativa entre os domínios *VH* e *VL* (Figura 10). A partir do perfil de *RMSD*, é possível visualizar que existe uma maior movimentação do domínio *VH* tendo como referência o domínio *VL* no início da simulação. Porém, em, aproximadamente, 200 ns de simulação, essa movimentação se equilibra permanecendo estável até o fim da simulação.

Figura 10 – Curva de *RMSD* relativo dos C α entre as estruturas tridimensionais dos domínios *VH* e *VL* do *scFv*-Epratuzumab ao longo dos 500 ns de simulação. Verde: Cálculo do *RMSD* de *VH* tendo como referência o *VL*. Azul: Cálculo do *RMSD* de *VL* tendo como referência *VH*.

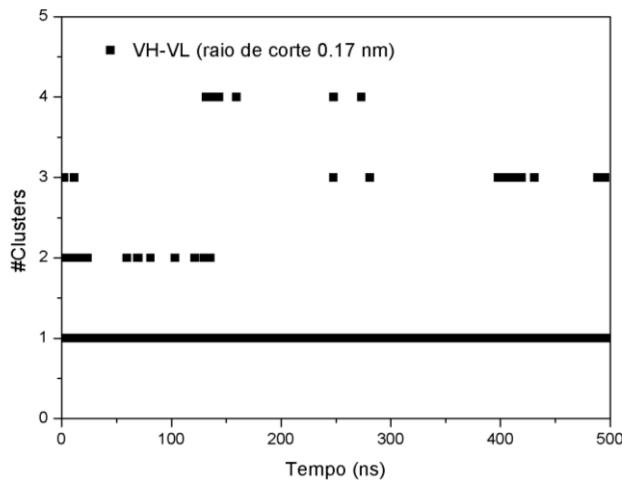


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Foi feita análise de *clusters* de estruturas utilizando um raio de corte 0.17 nm, que

foi o valor médio de *RMSD* de *VH+VL* a partir do teq (Figura 11). A partir desse gráfico, somam-se quatro *clusters*, onde o grupo # *Cluster* 1 é o mais representativo ao longo do tempo de simulação. Por meio dessa análise, deduz-se que a configuração final de *scFv*-Epratuzumab pode ser escolhida para formar, posteriormente, as interfaces *scFv*-Epratuzumab/CD22-1g e *scFv*-Epratuzumab/CD22-6g.

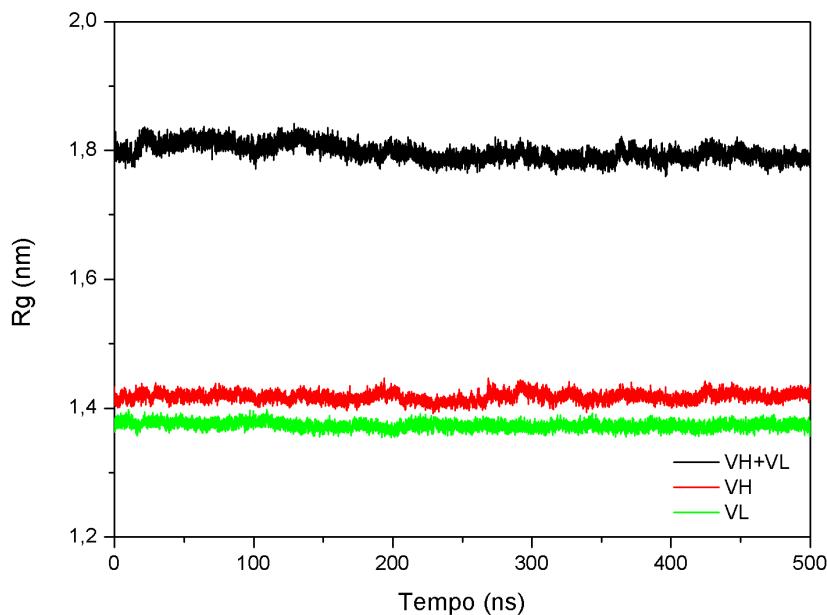
Figura 11 – *Clusters* de configurações da estrutura *VH+VL* do *scFv*-Epratuzumab ao longo dos 500 ns de simulação, utilizando um raio de corte de 0.17 nm (valor médio de *RMSD* a partir do teq).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Também foi realizada a análise de Raio de giro (*Rg*) do *scFv*-Epratuzumab (Figura 12). A partir do gráfico gerado, conclui-se que, tanto os domínios *VH* e *VL*, quanto *VH+VL* apresentam compacidade proteica estável.

Figura 12 – Curvas do R_g dos domínios *VH*, *VL* e *VH+VL* do *scFv*-Epratuzumab ao longo dos 500 ns de simulação. Preto: *VH+VL*. Vermelho: *VH*. Verde: *VL*.

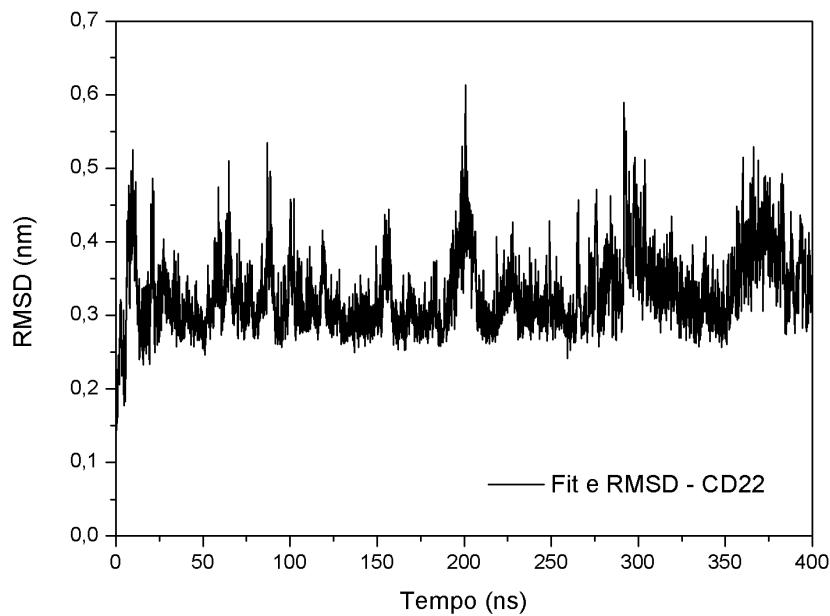


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.2 Simulação de DM do CD22-6g

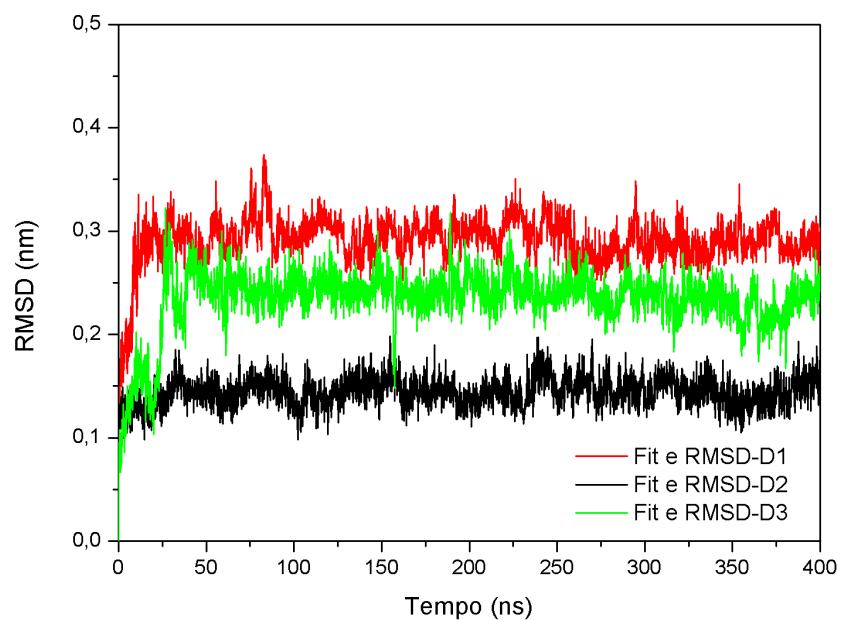
Para avaliar variações estruturais dos domínios de CD22-6g, também foram realizadas análises do perfil de *RMSD* gerado (Figura 13). As glicosilações de CD22-6g foram desconsideradas no cálculo de *RMSD*, devido à grande movimentação estrutural dos glicanos. Analisando de forma singular o *RMSD* de cada domínio, conforme a Figura 14, observa-se que os domínios D1, D2 e D3 de CD22-6g rapidamente alcançam o equilíbrio estrutural, sem muitas oscilações, a partir de 50 ns. Os valores de *RMSD* médios para cada domínio, a partir dos 50 ns, foram $D1 = 0,29 \pm 0,01$ nm; $D2 = 0,14 \pm 0,01$ nm; $D3 = 0,23 \pm 0,01$ nm (Tabela 2). Conforme o perfil de *RMSD* da Figura 13, que exibe que CD22 (CD22-6g sem considerar as glicosilações), é possível observar diversas oscilações no *RMSD*, o que pode ser derivado, além da maior movimentação de regiões de *loops*, da interação de resíduos da proteína com os glicanos da própria estrutura. O teq de CD22 foi definido como 225 ns de simulação.

Figura 13 – Curva de *RMSD* dos C α dos componentes do CD22-6g em água ao longo de 400 ns da simulação. Preto: CD22.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 14 – Curva de *RMSD* dos C α dos componentes do CD22-6g em água ao longo de 400 ns de simulação. Vermelho: D1. Preto: D2. Verde: D3.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

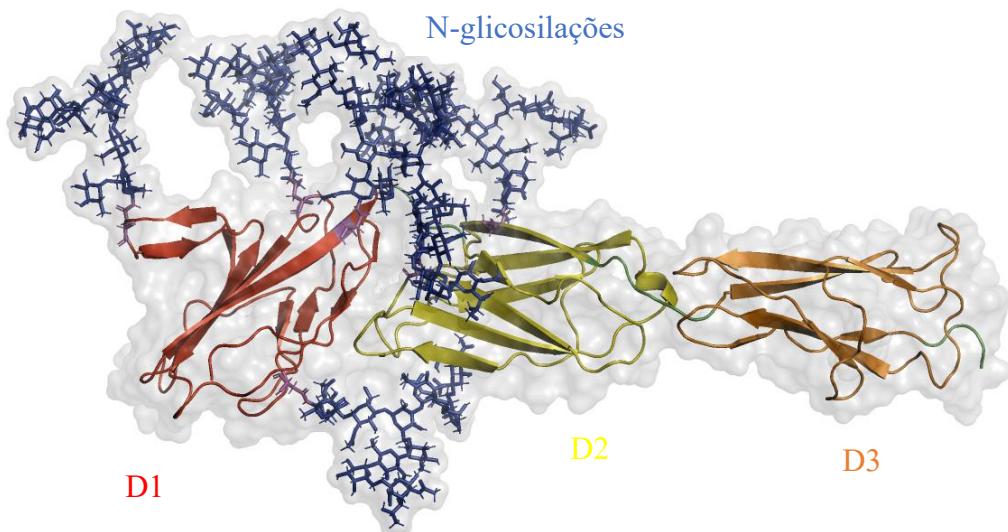
Tabela 2 – *RMSDs* médios calculados para D1, D2 e D3 de CD22 a partir do teq.

Estrutura	Tempo de equilíbrio (ns)	RMSD médio (nm)
D1	50	0,29 ± 0,01
D2	50	0,14 ± 0,01
D3	50	0,23 ± 0,01
CD22	225	0,34 ± 0,05

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Na figura 15, está representada a imagem da estrutura tridimensional de CD22-6g obtida aos 400 ns de simulação de DM, evidenciando os domínios e os pontos de N-glicosilação.

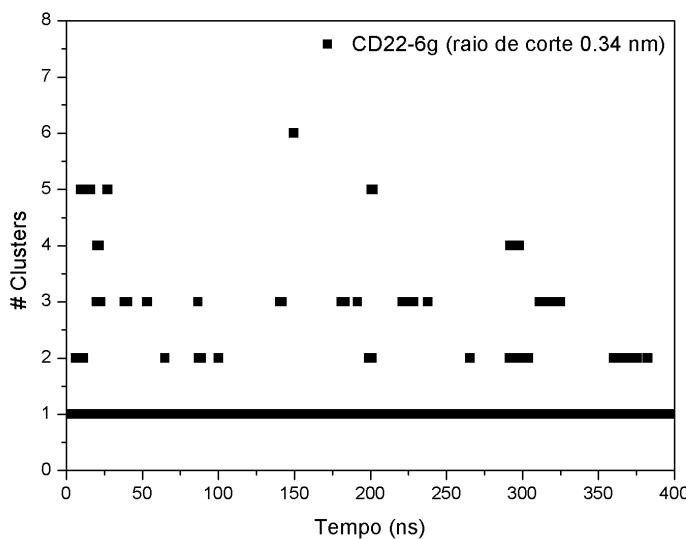
Figura 15 – Representação em cartoon da estrutura tridimensional de CD22-6g. Vermelho: D1. Amarelo: D2. Laranja: D3. Azul: N-glicosilações. Magenta: Ponto de N-glicosilação. Verde: Região interdomínio.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Utilizando o valor do *RMSD* médio de CD22, a partir do teq, como raio de corte (0,34 nm), foi feita a análise de *clusters* de estruturas (Figura 16). A partir desse gráfico, somam-se seis grupos de estruturas, onde o grupo # *Cluster* 1 é o mais representativo ao longo do tempo de simulação e, assim, deduz-se que a configuração final de CD22-6g pode ser escolhida para a posterior formação da interface *scFv-Epratuzumab/CD22-6g*.

Figura 16 – *Clusters* de configurações da estrutura CD22 de CD22-6g ao longo dos 400 ns de simulação, utilizando um raio de corte de 0.34 nm (valor médio de *RMSD* a partir do teq).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

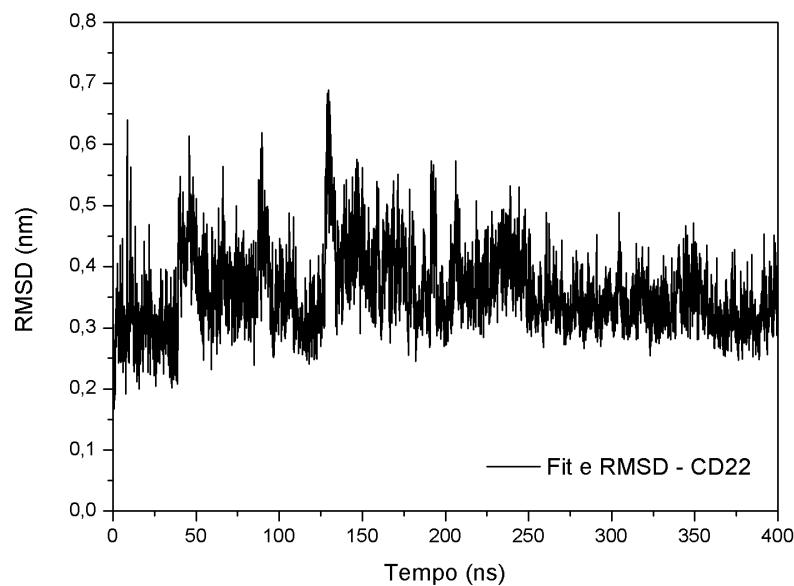
5.3 Simulação de DM do CD22-1g

Da mesma forma como foi feito para CD22-6g, foram realizadas análises do perfil de *RMSD* gerado para CD22-1g, de forma a desconsiderar a glicosilação (Figura 17). Já, analisando de forma singular o *RMSD* de cada domínio, conforme a Figura 18, observa-se que os domínios D2 e D3 de CD22-1g rapidamente alcançam o equilíbrio estrutural, sem muitas oscilações.

Entretanto, o domínio D1, passa por uma alta variação na estrutura tridimensional, em, aproximadamente, 50 ns. Foram feitas análises de sobreposição de estruturas e observou-se que a região que apresentava maior variação estrutural em 50 ns, em comparação à primeira estrutura da simulação, corresponde à região dos resíduos 41-55 (PEYNKNTSKFDGTR). Para confirmar que essa região foi a responsável pelo acréscimo abrupto de *RMSD* de D1 aos 50 ns, foi gerado um perfil de *RMSD* que compara os C α de D1; os C α de D1 sem considerar os resíduos de *loops* modelados; e os C α de D1 sem considerar os resíduos de *loops* modelados e os resíduos 41 até 55 (Figura 19). A partir da visualização desse perfil de *RMSD*, conclui-se que, de fato, a região PEYNKNTSKFDGTR de CD22-1g provoca o acréscimo elevado de *RMSD* aos 50 ns de simulação. Um dos motivos que pode ter levado essa região a apresentar uma alteração abrupta no *RMSD* é o fato dessa região, originalmente, ser glicosilada. Então, a glicosilação dessa região pode ser um fator determinante na estabilidade de D1. Em, aproximadamente, 200 ns, cada domínio de CD22 de CD22-1g (CD22-1g sem considerar as

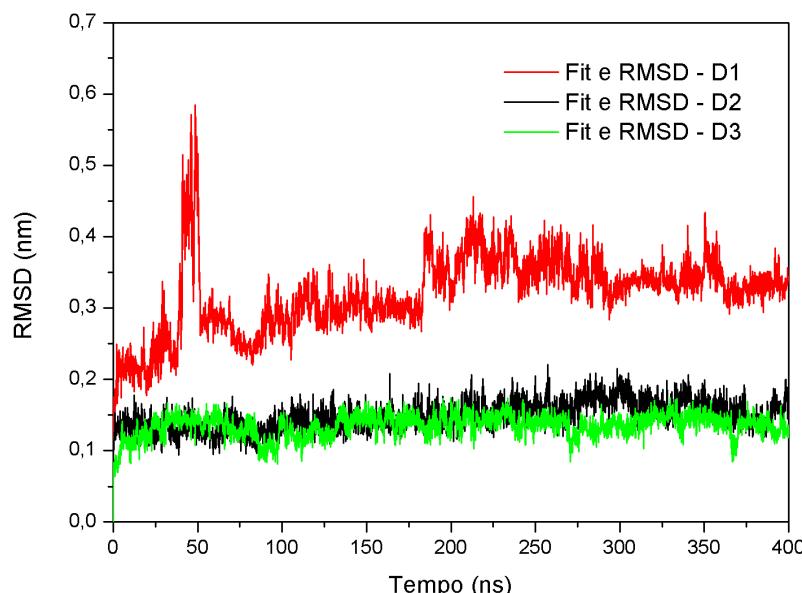
glicosilações) atingiram seu teq (Tabela 3).

Figura 17 – Curva de RMSD dos C α dos componentes do CD22-1g em água ao longo de 400 ns da simulação. Preto: CD22.



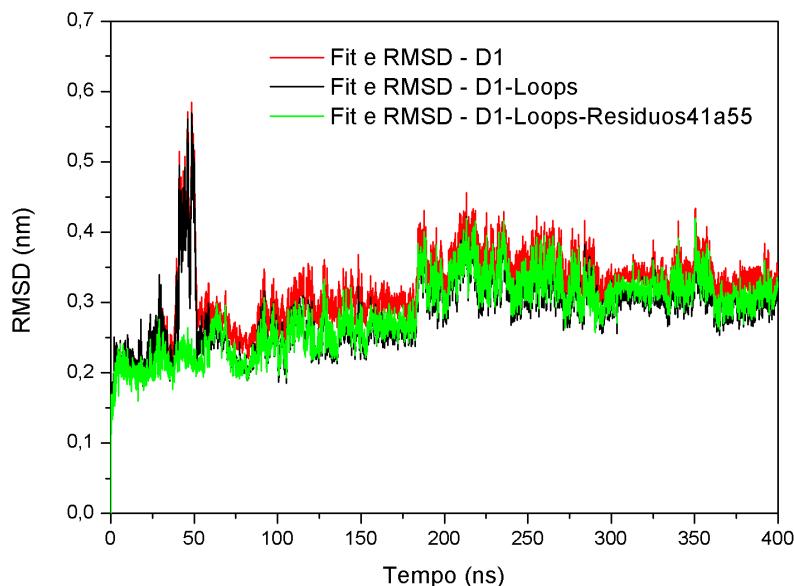
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 18 – Curva de RMSD dos C α dos componentes do CD22-1g em água ao longo de 400 ns de simulação. D1. Preto: D2. Verde: D3.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 19 – Curva de RMSD dos Ca dos componentes de D1 de CD22-1g em água ao longo de 400 ns de simulação. Vermelho: D1. Preto: D1 sem considerar os resíduos de *loops* modelados. Verde: D1 sem considerar os resíduos de *loops* modelados e os resíduos 41-55.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

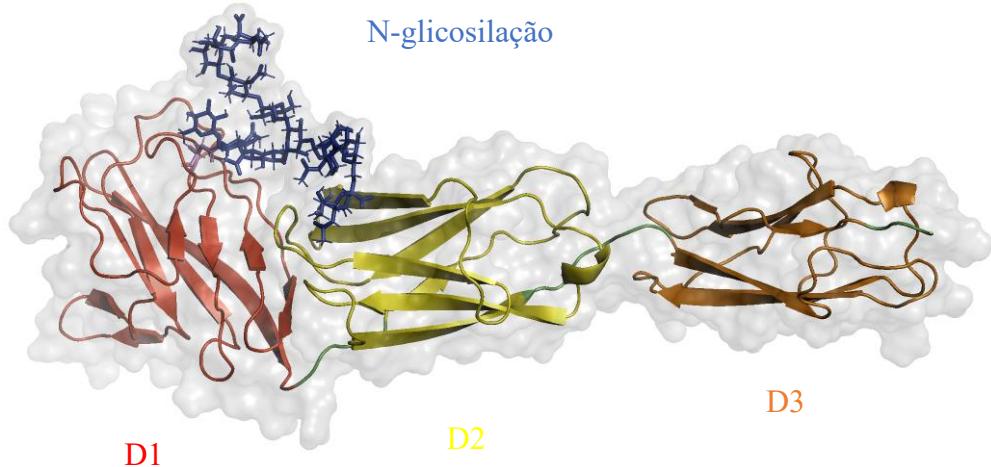
Tabela 3 – *RMSDs* médios calculados para D1, D2 e D3 de CD22 a partir do teq.

Estrutura	Tempo de equilíbrio (ns)	RMSD médio (nm)
D1	50	$0,35 \pm 0,02$
D2	50	$0,16 \pm 0,01$
D3	50	$0,14 \pm 0,01$
CD22	225	$0,34 \pm 0,04$

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Na figura 20, está representada a imagem da estrutura tridimensional de CD22-1g obtida aos 400 ns de simulação de DM, evidenciando os domínios e os pontos de N-glicosilação.

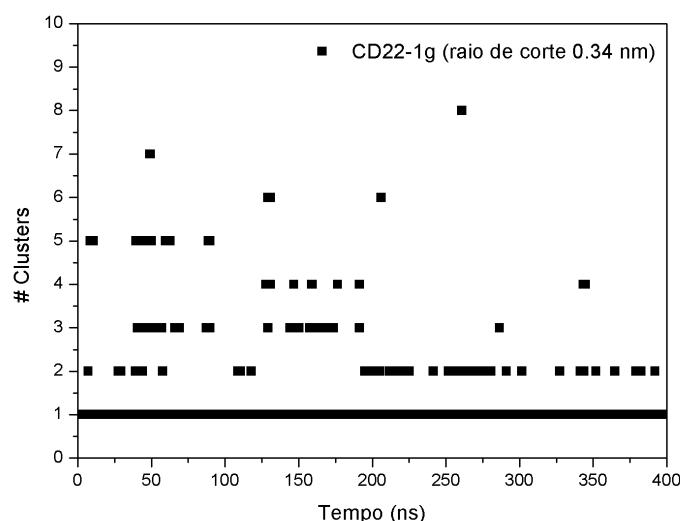
Figura 20 – Representação em *cartoon* da estrutura tridimensional de CD22-6g. Vermelho: D1. Amarelo: D2. Laranja: D3. Azul: N-glicosilações. Magenta: Ponto de N-glicosilação. Verde: Região interdomínio.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Utilizando o valor do *RMSD* médio de CD22, a partir do teq, como raio de corte (0,36 nm), também foi feita a análise de *clusters* de estruturas (Figura 21). A partir desse gráfico, soma-se seis grupos de estruturas, onde o grupo # *Cluster* 1 é o mais representativo ao longo do tempo de simulação. Com isso, a configuração final de CD22-6g pode ser escolhida para a posterior formação da interface *scFv-Epratuzumab/CD22-6g*.

Figura 21 – *Clusters* de configurações da estrutura CD22 de CD22-1g ao longo dos 400 ns de simulação, utilizando um raio de corte de 0.36 nm (valor médio de *RMSD* a partir do teq).

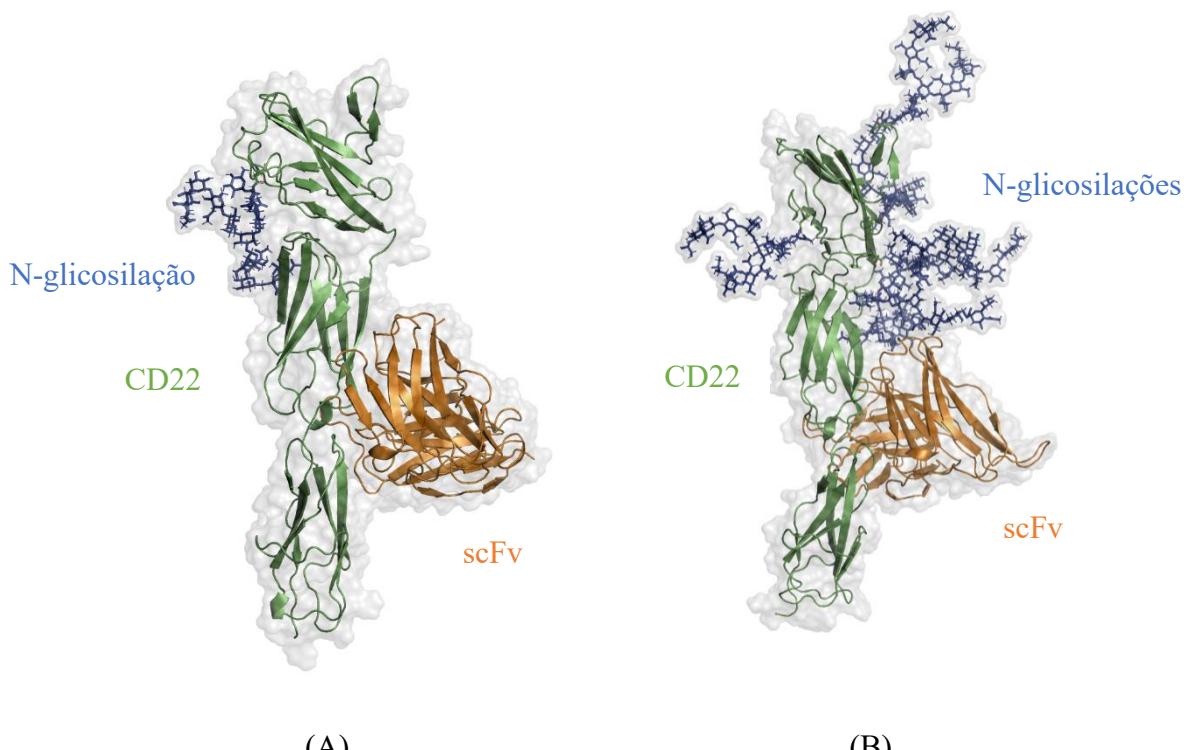


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.1 Simulação de DM dos complexos *scFv-Epratuzumab/CD22-1g* e *scFv-Epratuzumab/CD22-6g*

A partir das estruturas presentes dentro dos *clusters* mais representativos de simulação, foram construídos os complexos *scFv-Epratuzumab/CD22-1g* e *scFv-Epratuzumab/CD22-6g*, por meio da sobreposição com a estrutura cristalográfica do *Fab* de Epratuzumab em interação com os domínios D1, D2 e D3 de CD22 (PDB 5VL3) (Figura 22). Após as etapas de minimização de energia, termalização e obtenção de 300 ns de trajetória, foram feitas análises estruturais e energéticas dos sistemas. Em prol de avaliar como a presença das glicosilações pode influenciar na interação com *scFv-Epratuzumab*, foram feitas análises de PII em ambos os sistemas, de forma a comparar os resultados obtidos.

Figura 22 – (A): Sistema construído de *scFv-Epratuzumab/CD22-1g*. (B): Sistema construído de *scFv-Epratuzumab/CD22-6g*. Azul: N-glicosilação. Verde: CD22. Laranja: *scFv-Epratuzumab*

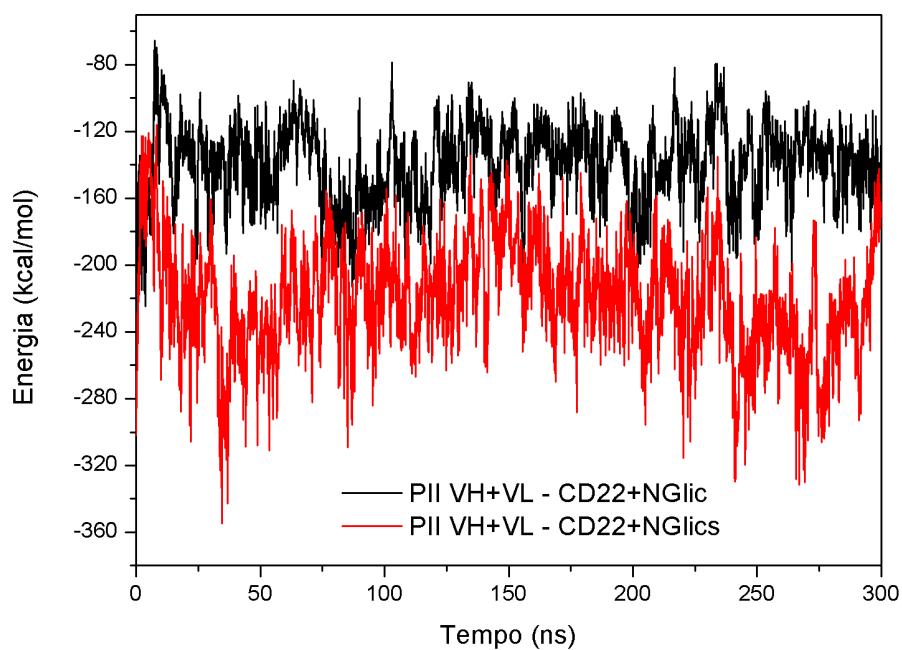


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Foi feita a comparação entre os sistemas da análise de PII entre o *VH+VL* de Epratuzumab e os átomos de proteína e de carboidrato de CD22 (Figura 23). Observa-se que a curva obtida no sistema *scFv-Epratuzumab/CD22-6g* apresentou valores mais negativos, com

uma média de -220 kcal/mol, enquanto o sistema *scFv*-Epratuzumab/CD22-1g apresentou uma média de -140 kcal/mol. Utilizando a média de energia do sistema *scFv*-Epratuzumab/CD22-1g como referência, calcula-se que a diferença entre os valores médios de energia desses sistemas corresponde a, aproximadamente, 57%, possibilitando concluir que as N-glicosilações de CD22 apresentam importante função em garantir uma maior atratividade com o *scFv*-Epratuzumab.

Figura 23 – Curva de PII entre os átomos de *VH* e *VL* de *scFv*-Epratuzumab com CD22, considerando as glicosilações. Preto: Sistema de CD22-1g. Vermelho: Sistema de CD22-6g.



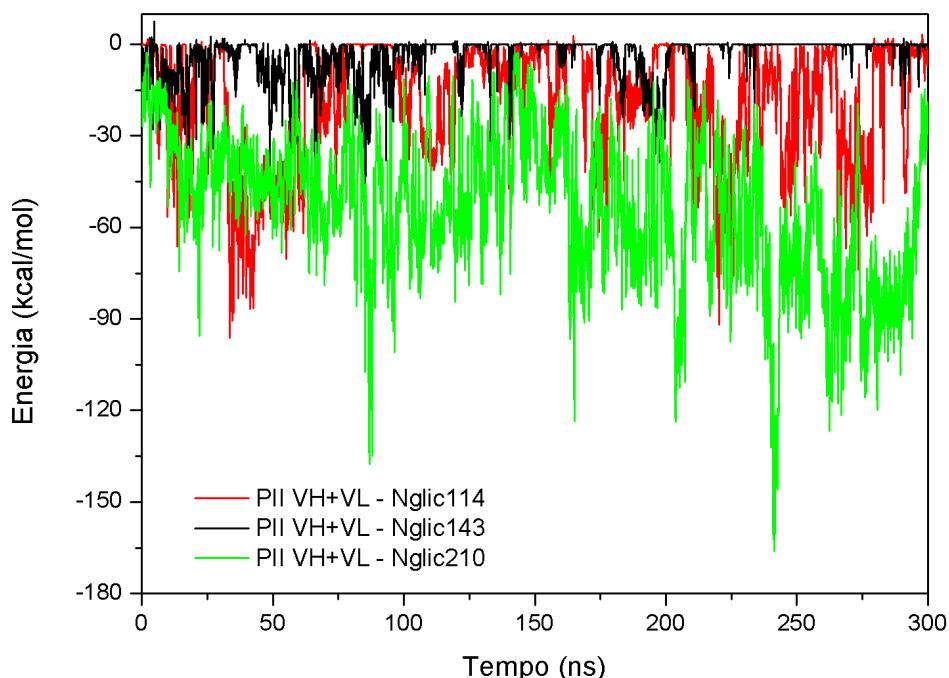
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Além disso, também foi feita a análise de PII entre os átomos de *VH+VL* de *scFv*-Epratuzumab com cada uma das glicosilações de CD22-6g e com a glicosilação de CD22-1g. A partir dos resultados obtidos para o sistema *scFv*-Epratuzumab/CD22-1g, é possível concluir que, ao longo dos 300 ns de trajetória, em nenhum momento a glicosilação do sistema apresentou interação atrativa ou repulsiva com os átomos de *VH+VL*. Isso ocorre, pois essa glicosilação está distante da região de interação entre *scFv*-Epratuzumab e CD22, de forma a não contribuir de forma significativa com interações atrativas com o *scFv*.

Já em relação ao sistema com CD22-6g, as N-glicosilações nos resíduos N46, N80 e N91, ou seja, as glicosilações do domínio D1, também não apresentaram valores que contribuem para a atratividade com o *scFv*-Epratuzumab. Isso também ocorre devido a uma

elevada distância dessas glicosilações com a região de interação, que se encontra, aproximadamente, entre os domínios D2 e D3 de CD22. Com essas informações, é possível deduzir que as glicosilações do domínio D2 exercem interação ou atrativa ou repulsiva com *scFv*-Epratuzumab. Isso foi confirmado, também, com análises de PII (Figura 24), sendo a N-glicosilação N210, a responsável pela maior atratividade com *VH+VL* (Tabela 4) (Figura 25). Essa maior atratividade da glicosilação de N210 e as regiões *VH* e *VL* de *scFv*-Epratuzumab ocorre devido ao fato dessa N-glicosilação fazer parte da interface de interação de Epratuzumab com CD22 (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017).

Figura 24 – Curva de PII entre os átomos de *VH* e *VL* de *scFv*-Epratuzumab e as N-glicosilações do domínio D2 de CD22-6g. Vermelho: N-glicosilação de N114. Preto: N-glicosilação de N143. Verde: N-glicosilação de N210.



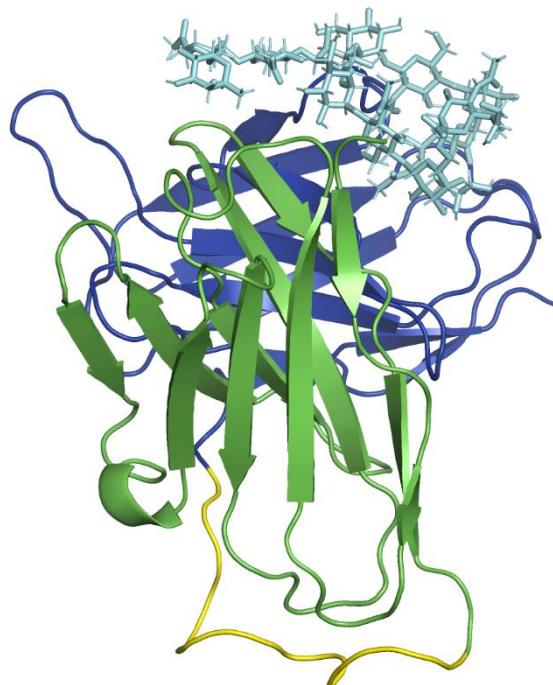
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 4 – Energias médias de interação para *VH+VL* e a N-glicosilação (Nglic) no resíduo N114; N143 e N210 do sistema *scFv*-Epratuzumab/CD22-6g calculadas por PII.

N-glicosilação	Valor médio de energia (kcal/mol)
N-glicosilação em N114	-18.43
N-glicosilação em N143	-4.20
N-glicosilação em N210	-53.50

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

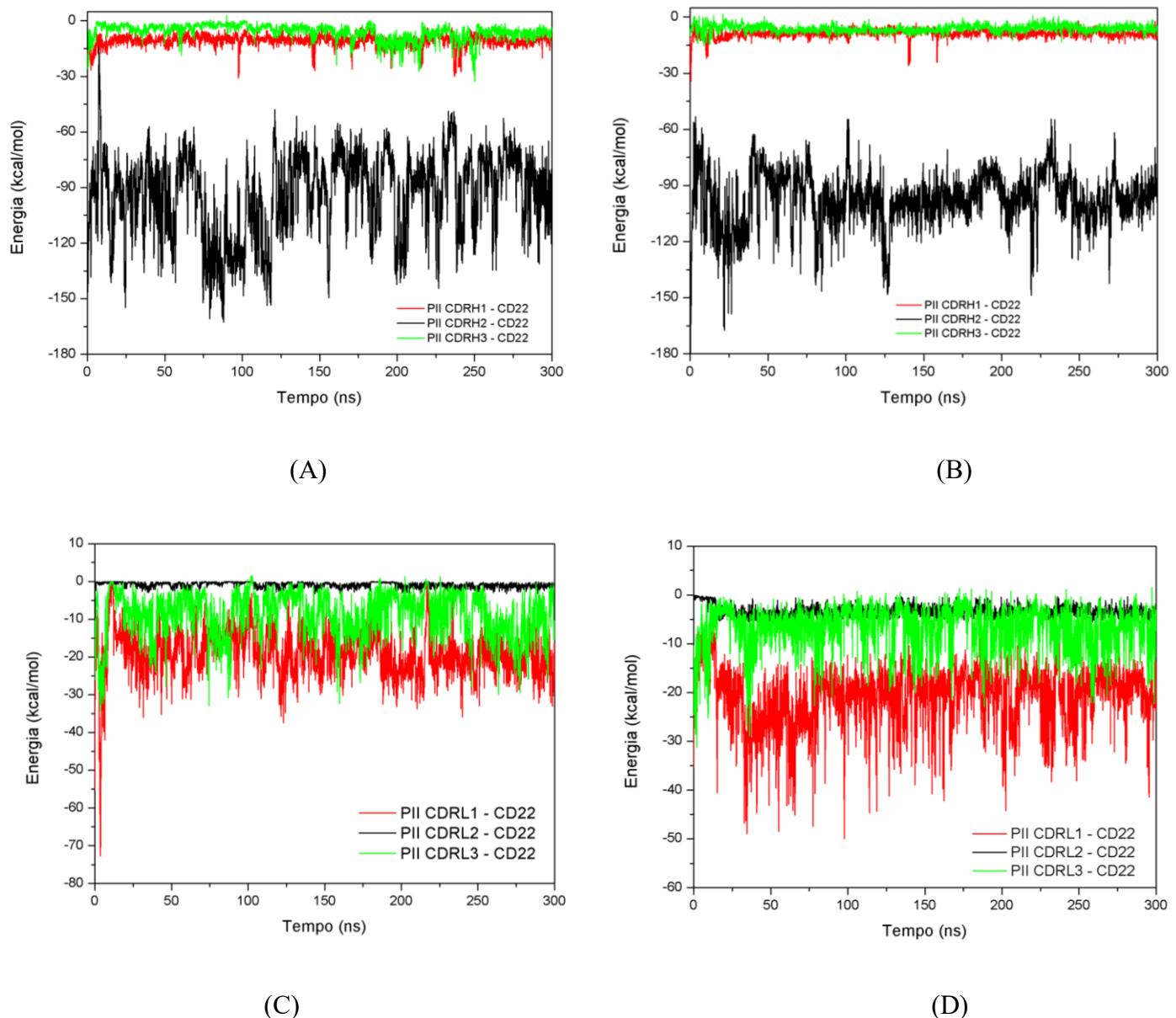
Figura 25 – Representação em *cartoon* da estrutura tridimensional do *scFv*-Epratuzumab em interação com a N-glicosilação em N210. Identificação do domínio *VH* (em verde), do domínio *VL* (em azul), do *linker* (em amarelo) e da N-glicosilação em N210 (em ciano).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Também foram feitos cálculos de PII das *CDRs* de *scFv*-Epratuzumab com os átomos de proteína de CD22 em ambos os sistemas (Figura 26). Pode-se observar que as *CDRs* que apresentam maior atratividade com os átomos de proteína de CD22, em ambos os sistemas, são as *CDRH2* e *CDRL1*, que medeiam contatos, tanto com o domínio D1, quanto com o domínio D2 (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017). Pode-se observar que a presença das glicosilações pouca afeta a atratividade geral entre as *CDRs* e os átomos da proteína de CD22. Apesar dos *loops* de *CDRH3* serem a região em anticorpos mais diversa e, por consequência, apresentam um papel principal no reconhecimento de alvos por anticorpos (WEITZNER *et al.*, 2015), não foi observada uma atratividade geral dessa *CDR* do *scFv*-Epratuzumab em interação com CD22, em ambos os sistemas.

Figura 26 – Curva de PII entre os átomos das *CDRs* de *scFv-Epratuzumab* e os átomos de proteína de CD22. (A): PII das *CDRs* de *VH* de CD22-1g. (B): PII das *CDRs* de *VH* de CD22-6g. Vermelho: *CDRH1*. Preto: *CDRH2*. Verde: *CDRH3*. (C): PII das *CDRs* de *VL* de CD22-1g. (D): PII das *CDRs* de *VL* de CD22-6g. Vermelho: *CDRL1*. Preto: *CDRL2*. Verde: *CDRL3*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 5 – Energias médias das interações entre *CDRs* e átomos de proteína de CD22-1g.

CDR para cálculo de PII	Valor médio de energia (kcal/mol)
CDRH1	-10.88
CDRH2	-93.98
CDRH3	-6.03
CDRL1	-19.02
CDRL2	-0.88
CDRL3	-8.86

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Tabela 6 – Energias médias das interações entre *CDRs* e átomos de proteína de CD22-6g.

CDR para cálculo de PII	Valor médio de energia (kcal/mol)
CDRH1	-8.76
CDRH2	-97.76
CDRH3	-6.15
CDRL1	-21.09
CDRL2	-3.34
CDRL3	-6.81

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

4 CONCLUSÃO

Foi possível avaliar como as glicosilações de CD22 influenciam na interação com *scFv*-Epratuzumab. Considerando apenas os três primeiros domínios de CD22, apenas as N-glicosilações do domínio D2 exerceram uma interação atrativa significativa com os domínios *VH* e *VL* de *scFv*-Epratuzumab, principalmente, a N-glicosilação na posição N210, que faz parte da interface de interação (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017). Foi possível observar uma maior atratividade entre *VH* e *VL* com os átomos da proteína de CD22 no sistema com todas as glicosilações, comprovando que a presença das glicosilações nessa proteína pode exercer uma função essencial em relação à atratividade com o *scFv*-Epratuzumab, apesar de que a presença das glicosilações pouco afeta a atratividade geral entre as *CDRs* e os átomos da proteína de CD22. Foi observado, também, que a *CDRH2* foi a *CDR* com maior interação atrativa com os átomos da proteína de CD22, destacando essa região como possível local para realização de mutações que incrementem ainda mais a atratividade com CD22.

4 PERSPECTIVAS

Pretende-se realizar, posteriormente, a análise de PII por resíduo, que permite a obtenção detalhada dos valores de energia de interação de cada resíduo com um conjunto de átomos, de forma a possibilitar, por exemplo, verificar quais resíduos da *CDRH2* são os mais importantes e propor mutações para realçar a interação, podendo levar a ganhos de afinidade.

Além disso, espera-se realizar análises de energia livre dos complexos, que permitam propor mudanças direcionadas no *scFv* nativo de Epratuzumab, de forma a melhorar parâmetros, como afinidade de ligação ao CD22.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. Tradução da 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABDO, L. M. Desenvolvimento de terapia CAR T para LLA-B usando a abordagem point of care. 2019. 129f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer, 2019.
- AHMAD, Z. S. *et al.* scFv Antibody: Principles and Clinical Application. Journal of Immunology Research, s.l., v. 2012. 2012.
- ALDER, B.J.; WAINWRIGHT, T.E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. Journal of Chemical Physics, s.l., v.31, p.459-466, 1959.
- ALLEN, M.P.; TILDESLEY, D.J. Computer simulation of liquids. New York: Oxford University Press, 1989.
- BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. VAN DER; DRUNEN, R. VAN. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. Computer Physic Communications, v. 91, p. 43 – 56, 1995.
- BERENDSEN, H.J.C. *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. Chemical Physics Letters, s.l., v. 103, n. 3, p. 386-392, 1984.
- BUSSI, G. *et al.* Canonical sampling through velocity rescaling. The Journal of Chemical Physics, s.l., v. 126, n. 1, p. 014101, 2007.
- CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M. H. Moving receptor redirected adoptive cell therapy toward fine tuning of antitumor responses. International Reviews of Immunology, s.l., p. 1-15, 2014.
- CHMIELEWSKI, M.; ABKEN, H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. Expert Opin Biol Ther. s.l., 2015;15(8):1145-54. Epub 2015 maio 18.
- DARDEN, T., YORK, D., & PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. The Journal of Chemical Physics, s.l., v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.
- DIAS, P. B.; LUIZ, A. P. L.; LICTHVAN, L. C. L.; *et al.* Apresentação Atípica de Leucemia Linfóide Aguda em Criança: Relato de Caso. Revista Brasileira de Cancerologia, s.l., v. 65, n. 4. 2019.
- EREÑO-ORBEA, J.; SICARD, T.; CUI, H.; *et al.* Molecular basis of human CD22 function and therapeutic targeting. s.l., Nat Commun 8, 764. 2017.

- EREÑO-ORBEA, J.; SICARD, T.; WASIM, L.; *et al.* N-Linked Glycosylation Regulates CD22 Organization and Function. *Sec. B Cell Biology Front. Immunol. s.l.*, Volume 10. 2019.
- EREÑO-ORBEA, J.; SICARD, T.; CUI, H.; *et al.* Structural details of monoclonal antibody m971 recognition of the membrane-proximal domain of CD22. *Journal of Biological Chemistry. s.l.*, v. 297, Issue 2. 2021.
- FRENKEL, D.; SMIT, B. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.
- GORDON, J. C. *et al.* H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research. s.l.*, v. 33, p. 368-71, 2005.
- GOUVEIA, J. F. S. Leucemia Linfoblástica Aguda: a aplicação da imunoterapia com células T CAR. 2019. 31 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Clínica Universitária de Hematologia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2019.
- GUEDAN, Sonia *et al.* Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. s.l.*, v. 12, p. 145-156, 2018.
- HESS, B.; BERENDSEN, H.J.C. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry. s.l.*, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.
- HOCKNEY, R. W. and GOEL, S. P. J. Quiet high-resolution computer models of a plasma. *Journal of Computational Physics. s.l.*, v. 14, p. 148-158, 1974.
- HUANG, J. *et al.* CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods. s.l.*, v. 14, n. 1, p. 71-73, 2017
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics. s.l.*, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
- ISRALEWITZ, B.; BAUDRY, J.; GULLINGSRUD, J. Steered molecular dynamics investigations of protein function. *Journal of Molecular Graphics and Modelling. s.l.*, Volume 19, Issue 1, 2001, Pages 13-25.
- JANEWAY, C.A. *et al.* Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 9th ed. New York: Garland Science, 2016.
- JELLUSOVA, J.; NITSCHKE, L. Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors Siglec-G and CD22. *Sec. B Cell Biology Front. Immunol. s.l.*, v. 2. 2011.
- JO, S. *et al.* CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry. s.l.*, v. 29, n. 11, p. 1859-1865, 2008

- JORGENSEN, W.L. *et al.* Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics*. s.l., v. 79, n. 2, p. 926-935, 1983
- JUNIOR, A. T. F.; SAVAZZINI-REIS, B.; ZORZANELLI, B. A. C.; *et al.* Imunoterapia - uma revisão sobre os novos horizontes no combate ao câncer / Immunotherapy - a review on the new horizons of cancer-fighting. *Rev Med (São Paulo)*. 2020 mar.-abr.;99(2):148-55.
- LEUNG, S. O.; GOLDENBERG, D. M.; DION, A.S., *et al.* Construction and characterization of a humanized, internalizing, B-cell (CD22)-specific, leukemia/lymphoma antibody, LL2. *Mol Immunol*. s.l., 32:1413 – 27. 1995.
- LIMA, L. M. Estudo da influência do epítopo c-myc na formação da interface entre o scFv e o CD19 para aplicação em CAR. 2022. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, 2022.
- Ministério da Saúde. Anvisa divulga resultado do edital de chamamento para desenvolvedores de produtos de terapia avançada para o SUS. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-divulga-resultado-do-edital-de-chamamento-para-desenvolvedores-de-produtos-de-terapia-avancada-para-o-sus>
- MORSE, P. P.; FESHBACH, H. *Methods of Theoretical Physics*. New York: McGrawHill, 1953.
- National Institute of Health – National Cancer Institute. Cancer-Causing Substances in the Environment. 2022. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/substances>
- National Institute of Health – National Cancer Institute. Clinical Trials Using Anti-CD22 CAR-expressing T Lymphocytes. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/intervention/anti-cd22-car-expressing-t-lymphocytes>
Acesso em junho de 2023.
- ORIGINLAB CORP. *Origin 8*. Northampton, MA: OriginLab Corp, 2003.
- POE, J. C.; TEDDER, T. F. CD22 and Siglec-G in B cell function and tolerance. *Trends Immunol*, s.l., v. 33. 2012.
- Portal do Butantan. A história da terapia CAR-T: 60 anos de evolução e pioneirismo em direção à cura do cancer. 2023. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/a-historia-da-terapia-car-t-60-anos-de-evolucao-e-pioneerismo-em-direcao-a-cura-do-cancer>
- PUCKETT, Y.; CHAN, O. Acute Lymphocytic Leukemia. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing, s.l., 2023.
- SANTOS, D. O. *et al.* A terapia celular adotiva (ACT) com células T modificadas geneticamente para o tratamento de câncer: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Health Review*, s.l., v. 3, n. 5, p. 10948-10961, 2020.
- SALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, s.l., v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; WAGLE, N. S.; *et al.* Cancer statistics, 2023. CA: A cancer journal for clinicians. *s.l.*, Volume 73, Issue 1, Pages 17-48, Janeiro/Fevereiro 2023.
- SOARES, F. H. M. *et al.* Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. *HU Revista, Juiz de Fora*, v. 46, n. 1, p. 27-33, 2020.
- SCHRÖDINGER LLC; DELANO SCIENTIFIC LLC. PyMOL. Versão 2.4.0. Schrödinger, LLC, 2020.
- SILVA, I. C. C.; FERNANDES, A. P. Terapia do receptor de antígeno quimérico de células T: funcionamento, progressos e perspectivas. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. *s.l.*, Vol. 01, pp. 59-87. Julho de 2021.
- VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, *s.l.*, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.
- WALDMAN, A. D.; FRITZ, J. M.; LENARDO, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, *s.l.*, volume 20, p651 – 668. 2020.
- WEITZNER, B. D.; DUNBRACK JR, R. L.; GRAY, J. J. The origin of CDR H3 structural diversity. *CELL* *s.l.*, v.23, issue 2, p302-311. 2015.
- XU, X.; SUN, Q.; LIANG, X.; Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies. *Front. Immunol. Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*, *s.l.*, Volume 10. 2019.
- YIN KHOR, B.; LIM, T. S.; NOORDIN, R.; *et al.* The design of target specific antibodies (scFv) by applying de novo workflow: Case study on BmR1 antigen from Brugia malayi. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *s.l.*, v. 76. 2017.
- ZHANG, C.; LIU, J.; ZHONG, J. F.; *et al.* Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research* *s.l.*, volume 5. 2017.