

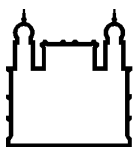
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Biologia Computacional e Sistemas

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO SCFV DO ANTICORPO RITUXIMAB
COM A ALÇA DO RECEPTOR CD20: AVALIAÇÃO DA ENERGIA
LIVRE DE LIGAÇÃO PELO MÉTODO ABF PARA PROPOSIÇÃO DE
BIOBETTERS

ALISON DE SOUSA REBOUÇAS

Rio de Janeiro
Março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

ALISON DE SOUSA REBOUÇAS

Estudo da interação do scFv do anticorpo Rituximab com a alça do receptor CD20:
Avaliação da energia livre de ligação pelo método ABF para proposição de *biobetters*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. João Hermínio Martins da Silva

RIO DE JANEIRO

Março de 2018

Rebouças, Alison de Sousa .

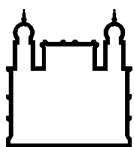
Estudo da interação do scFv do anticorpo Rituximab com a alça do receptor CD20: avaliação da energia livre de ligação pelo método ABF para proposição de biobetters / Alison de Sousa Rebouças. - Rio de Janeiro, 2018. 83 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2018.

Orientador: João Hermínio Martins Silva.

Bibliografia: f. 79-84

1. scFv de Rituximab. 2. receptor CD20. 3. energia livre. 4. ABF. 5. biobetters. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: ALISON DE SOUSA REBOUÇAS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DO SCFV DO ANTICORPO RITUXIMAB COM A ALÇA
DO RECEPTOR CD20: AVALIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO PELO
MÉTODO ABF PARA PROPOSIÇÃO DE *BIOBETTERS***

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOÃO HERMÍNIO MARTINS DA SILVA

Aprovada em: 16 / 03 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ana Carolina Ramos Guimarães – Presidente – IOC/FIOCRUZ/RJ

Prof. Dr. Geancarlo Zanatta – UFC/CE

Prof. Dr. Norberto de Kássio Vieira Monteiro – UFC/CE

Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena – PROCC/FIOCRUZ/RJ

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha – UFC/CE

Rio de Janeiro, 16 de março de 2018.

Dedico este trabalho aos meus avós, “In Memoriam”, aos meus pais, Helena e César, e à minha tia Elisabete, sem os quais eu nada realizaria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Helena Rebouças** e **César Rebouças**, pelo total apoio em todas as minhas decisões, por acreditarem que eu era capaz, mesmo quando eu duvidava. Agradeço pelo amor incondicional, por estarem presentes, vibrando comigo a cada vitória e consolando a cada derrota. Sem eles, eu nada seria.

Aos meus avós, **Francisco Rodrigues** (*in memoriam*) e **Sebastiana Rodrigues** (*in memoriam*), por todos os momentos divididos, pelo modelo excepcional de conduta ao qual sempre busco me espelhar, tanto na minha formação pessoal como profissional.

À minha tia **Elisabete Rodrigues**, por ser a minha terceira mãe, por ter sempre uma palavra de ajuda e conforto nos momentos difíceis e por sempre enxergar em mim qualidades escondidas. Dedico meu mais forte sentimento à pessoa que sempre me tratou como filho e que contribuiu imensamente a chegar onde cheguei.

À minha namorada **Katharine Gurgel**, meu presente mais belo de vida, com quem dividi absolutamente tudo e que nunca me desapontou. Por ser minha companheira de aventuras, minha melhor amiga, meu porto seguro e por compartilhar comigo o amor pela ciência. E o que a ciência une, ninguém separa.

Ao professor **Marcos Lourenzoni**, por sempre me instigar a pensar de modo crítico e analítico, por potencializar minhas habilidades de aprendizagem e por ser o responsável pela minha escolha de seguir nessa área que passei a admirar mais intensamente.

Ao orientador **João Hermínio**, pelas contribuições feitas nesta caminhada de Mestrado e por tornar o ambiente de trabalho mais leve.

Às minhas colegas de trabalho **Natália Frota** e **Virgínia Guimarães**, por terem se tornado minhas amigas, por deixarem o ambiente de trabalho mais descontraído e por sempre estarem dispostas a ajudar quando precisei.

A todos os integrantes da **Fundação Oswaldo Cruz - Ceará**, por terem verdadeiramente me acolhido, aconselhado e dado todo o suporte necessário para o pleno desenvolvimento das minhas atividades, ajudando em tudo que estivesse ao alcance.

À família que fiz no Rio de Janeiro, principalmente à **Aline Beatriz** e ao **Lucas Machado**, pelas risadas, pelas conversas sérias sobre nossas vidas na “Célula” e pelo apoio mútuo nos momentos difíceis; ao **Ernesto Caffarena**, pelos conselhos sábios,

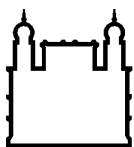
pelo acolhimento no seu laboratório e por me apoiar nos momentos que eu queria desistir; e ao **Valdemir Vargas, Rafael Ferreira, Vanessa Silva, Gisele Vieira, Carine Beatrici, Deborah Antunes** e todos do PROCC, pela ajuda e risadas diárias.

A todos os meus familiares e amigos, que contribuíram para a realização deste trabalho de alguma forma e por serem parte responsáveis por eu estar concluindo meu Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão, sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor, sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

(Roberto Shinyashiki)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

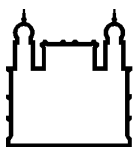
ESTUDO DA INTERAÇÃO DO SCFV DO ANTICORPO RITUXIMAB COM A ALÇA DO RECEPTOR CD20: AVALIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO PELO MÉTODO ABF PARA PROPOSIÇÃO DE *BIOBETTERS*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

Alison de Sousa Rebouças

Diante da relevância dos casos de câncer no mundo, o estudo de alternativas para o tratamento é de extrema importância, e uma delas é a obtenção de anticorpos monoclonais (mAbs) que interagem com maior eficiência com seus antígenos. Os fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), formados pelos domínios V_H e V_L de um anticorpo ligados por um polipeptídeo flexível (*linker*), retêm a afinidade do anticorpo dos quais foram originados e possuem um menor custo computacional para simulação de Dinâmica Molecular (DM), sendo uma estratégia para buscar a otimização da interação anticorpo-antígeno. O receptor CD20, inserido na membrana de linfócitos B, é o antígeno reconhecido pelo mAb Rituximab. As coordenadas do complexo fragmento F_{ab} de Rituximab-alça de CD20 estão depositadas no PDB, código 2OSL. Este estudo propõe, através de simulação de DM acoplada ao método de Força Adaptativa (ABF), investigar a interação da alça de CD20 com o scFv de Rituximab pelo cálculo de energia livre, a fim de comparar os resultados com os obtidos experimentalmente por Li *et al.* (2009). O modelo do scFv foi obtido e simulado por 200 ns em meio aquoso em triplicata (S1, S2 e S3), partindo de velocidades iniciais diferentes. A partir das estruturas estáveis de scFv, os complexos scFv-alça de S1, S2 e S3 foram construídos e simulados por 100 ns em meio aquoso. Outros dois sistemas foram construídos: Cristal, estrutura do complexo não submetida à etapa de produção da DM, somente à termalização; e duplo mutante D57E/Y102K, obtido a partir da estrutura equilibrada do complexo S1. Os sistemas submetidos ao método ABF mostraram que os valores de ΔG obtidos para S1 e S2 foram mais próximos dos experimentais do que os do Cristal, sugerindo a importância de se previamente obter uma estrutura estável em meio aquoso por DM para então submetê-la ao ABF. Diferenças foram encontradas entre os resultados obtidos por ABF da interação do complexo scFv-alça e os resultados experimentais do complexo fragmento F_{ab} -células Daudi, as quais contêm o CD20 completo, porém seguiram a mesma tendência de interação. Isso sugere que a estrutura do receptor inteiro na célula condiciona o posicionamento do epítipo, influenciando diretamente na interação com o anticorpo. Assim, o gene do scFv foi clonado e expresso em *E. coli*, e pretende-se sintetizar a alça de CD20 para obter os valores de ΔG por radioimunoensaios, a fim de validar os resultados obtidos por ABF. O prosseguimento dos estudos da interação scFv-alça possibilitará obter variantes do scFv com ganhos de afinidade na interação, os chamados *biobetters*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTERACTION STUDY OF RITUXIMAB'S SCFV ANTIBODY WITH THE LOOP OF CD20 RECEPTOR: BINDING FREE ENERGY EVALUATION BY ABF METHOD TO PROPOSE *BIOBETTERS*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN COMPUTATIONAL SYSTEMS BIOLOGY

Alison de Sousa Rebouças

Given the relevance of cancer in the world, the study of alternatives to its treatment is extremely important, and one of them is to obtain monoclonal antibodies (mAbs) that interact more efficiently with their antigens. Single chain fragment variable (scFv), formed by V_H and V_L domains of an antibody bound by a flexible peptide (linker), retain the antibodies affinity from which they were originated and have a lower computational cost to Molecular Dynamics (MD) simulation. Then, it is a strategy to seek the optimization of the antibody-antigen interaction. The CD20 receptor, inserted into B lymphocyte membrane, is the antigen recognized by Rituximab mAb. The coordinates of the Rituximab F_{ab} fragment-CD20 loop complex are deposited in PDB, code 2OSL. This study proposes, through MD simulation coupled to Adaptive Biasing Force (ABF) method, to investigate the interaction of the CD20 loop with Rituximab scFv by free energy calculation, in order to compare the results with those obtained experimentally by Li *et al.* (2009). The scFv model was obtained and simulated for 200 ns in aqueous medium in triplicate (S1, S2 and S3), starting at different initial velocities. From stable scFv structures, the scFv-loop complexes of S1, S2 and S3 were constructed and simulated for 100 ns in aqueous medium. Two other systems were constructed: Crystal, structure of the complex not submitted to the DM production stage, only to thermalization; and double mutant D57E/Y102K, obtained from the stable structure of S1 complex. The systems submitted to ABF method showed that the values of ΔG obtained for S1 and S2 were closer to the experimental ones than those for Crystal, suggesting the importance of previously obtaining a stable structure in aqueous medium by DM and then subjecting it to ABF. Differences were found between ABF results of the interaction of scFv-loop complex and the experimental results of F_{ab} fragment-Daudi cells complex, which contain the complete CD20, but followed the same interaction trend. This suggests that the structure of the entire receptor in cell determines the positioning of the epitope, directly influencing the interaction with the antibody. Thus, the Rituximab scFv gene was cloned and expressed in *E. coli*, and the CD20 loop will be synthesized to obtain the ΔG values by radioimmunoassays in order to validate the results obtained by ABF. Further studies of the scFv-loop interaction will enable the development of scFv variants with enhanced interaction affinity, called biobetters.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Caracterização do Problema	18
1.2 Antígeno CD20: definição e estrutura	19
1.3 Anticorpos: definição e estrutura	20
1.3.1 Anticorpos Monoclonais (mAbs).....	22
1.3.2 Fragmentos de anticorpos ou minianticorpos.....	24
1.3.3 Caracterização do anticorpo anti-CD20: Rituximab	26
1.4 Simulação de Dinâmica Molecular (DM)	27
1.5 Energia livre de ligação	31
1.5.1 Método da Força Adaptativa	33
1.5.2 Método de MM/PBSA.....	35
1.6 Justificativa	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 METODOLOGIA	40
3.1 Modelagem do scFv de Rituximab	40
3.2 Simulação de DM do scFv de Rituximab em água	41
3.3 Simulação de DM do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20	42
3.4 Análises estruturais	43
3.5 Cálculo do ΔG de ligação	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Estrutura do scFv de Rituximab construído	49
4.2 Estruturas de equilíbrio do scFv em solução aquosa	50
4.3 Estruturas de equilíbrio do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 em solução aquosa	55
4.4 ΔG de ligação pelo método de ABF	62

5	CONCLUSÕES	76
6	PERSPECTIVAS	77
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do receptor CD20.....	19
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura molecular de anticorpos	21
Figura 3 - Representação esquemática das porções que são componentes de um anticorpo e de um fragmento variável de cadeia única (scFv).....	24
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura de um anticorpo genérico, detalhando a origem dos domínios constituintes do mAb quimérico Rituximab	26
Figura 5 - Quadro de definição das CDRs do Rituximab em função da sequência de resíduos das cadeias V_H (H1, H2 e H3) e V_L (L1, L2 e L3).....	42
Figura 6 - Representação esquemática do sistema do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 em solução aquosa, destacando a coordenada de reação ξ definida ao longo do eixo X.....	45
Figura 7 – Representação esquemática em <i>cartoon</i> do modelo de scFv construído a partir das coordenadas cristalográficas dos domínios V_H (em vermelho) e V_L (em azul) do fragmento Fab de Rituximab (PDB: 2OSL) com adição do linker (GGGS) ₃ (em verde)	49
Figura 8 - Curvas de RMSD das estruturas tridimensionais de scFv referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa	50
Figura 9 - Gráfico de média e desvio de RMSD para o scFv (V_H+V_L) e para cada domínio separadamente de S1 (azul), S2 (verde) e S3 (laranja), calculados após o equilíbrio em 100 ns de simulação	51
Figura 10 - Curvas de RMSD relativo entre as estruturas tridimensionais dos domínios V_H e V_L referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa	52
Figura 11 - Curvas de R_g do scFv e dos domínios V_H e V_L de S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa ao longo do tempo de simulação	53
Figura 12 - Análises de clusterização das simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) para identificação da estrutura de scFv de Rituximab que melhor representa cada simulação	54
Figura 13 - Representação esquemática em <i>cartoon</i> das estruturas sobrepostas de scFv do #Cluster 1 de S1 (verde), S2 (ciano) e S3 (rosa), evidenciando a diferença estrutural da CDR H3 nos três sistemas.....	55

Figura 14 - Representação esquemática em <i>cartoon</i> do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 construído, destacando as porções V _H (vermelho), V _L (azul) e <i>linker</i> (verde) do scFv, além do epítopo ANPS (representado em <i>stick</i>) contido na alça de CD20 (amarelo)	56
Figura 15 - Curvas de RMSD das estruturas tridimensionais do complexo scFv-alça referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa.....	57
Figura 16 - Gráfico de média e desvio de RMSD para o scFv (V _H +V _L), para cada domínio separadamente e para a alça de CD20 de S1 (azul), S2 (verde) e S3 (laranja), calculados após o equilíbrio de cada simulação	58
Figura 17 - Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos da cadeia principal+hidrogênios do scFv de Rituximab e da alça de CD20, referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa	59
Figura 18 - Representações esquemáticas dos complexos scFv de Rituximab-alça de CD20 de S1 (A), S2 (B) e S3 (C), evidenciando os contatos polares (linhas tracejadas amarelas) entre os resíduos da alça e das CDRs do scFv envolvidas na interação (H1 em vermelho, H2 em verde, H3 em amarelo e L3 em roxo)....	61
Figura 19 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema Cristal para a simulação de 20-25 ns, obtidas antes (preto) e após (vermelho) a etapa de refinamento.....	62
Figura 20 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema Cristal após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns.....	63
Figura 21 - Representação esquemática de contatos polares (linhas amarelas tracejadas) entre resíduos do scFv (em verde) e da alça (em ciano) do sistema Cristal para o ponto de 27 Å da coordenada de reação	64
Figura 22 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema S1 para a simulação de 20-25 ns, obtidas antes (preto) e após (vermelho) a etapa de refinamento	65
Figura 23 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema S1 após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns.....	66
Figura 24 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema S2 para a simulação de 10-15 ns, obtidas antes (preto) e após (vermelho) a etapa de refinamento	67

Figura 25 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema S2 após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns.....	68
Figura 26 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema duplo mutante D57E/Y102K para a simulação de 25-30 ns, obtidas antes (preto) e após as etapas de refinamento (vermelho e verde).....	69
Figura 27 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema duplo mutante D57E/Y102K após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns	70
Figura 28 - Representações esquemáticas de contatos polares (linhas amarelas tracejadas) entre resíduos do scFv (em verde) e da alça (em ciano) do sistema duplo mutante D57E/Y102K para os pontos de 23,5 Å (A) e de 26,5 Å (B) da coordenada de reação.....	71
Figura 29 - Purificação do scFv de Rituximab no vetor pET22 em <i>E. coli</i> Rosetta	77
Figura 30 - Teste de Elisa para detecção de ligação do scFv de Rituximab com células Raji, que contém o CD20 completo.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de resíduos de aminoácidos componentes do scFv de Rituximab	40
Tabela 2 - Resumo das coordenadas de reação delimitadas, tempos de simulação de convergência, janelas e refinamentos necessários para cada sistema submetido	47
Tabela 3 - Descrição dos contatos polares entre scFv de Rituximab e alça de CD20 do sistema duplo mutante D57E/Y102K para os pontos 23,5 Å e 26,5 Å da coordenada de reação.....	72
Tabela 4 - Constantes de dissociação (K_d) em nM obtidas experimentalmente para o Rituximab e seus mutantes em interação com receptor CD20 de células Daudi.....	73
Tabela 5 - Valores de ΔG em kcal.mol ⁻¹ , constante de afinidade (K_a) em M e constante de dissociação (K_d) em nM calculados por ABF para os 4 sistemas simulados, e valores experimentais obtidos por Li <i>et al.</i> (2009) para o Rituximab (nativo) e duplo mutante D57E/Y102K	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ab	Anticorpo
ABF	Método da Força Adaptativa
Ag	Antígeno
C α	Carbono alfa
CDR	Região Determinante de Complementaridade
CG	Gradiente Conjugado
DM	Dinâmica Molecular
F _{ab}	Fragmento de ligação ao antígeno
F _c	Fragmento cristalizável
fs	femtosegundo
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
K _a	Constante de afinidade
kcal	Quilocaloria
K _d	Constante de dissociação
LNH	Linfoma não-Hodgkin
mAbs	Anticorpo monoclonal
MM/PBSA	Mecânica Molecular de Poisson-Boltzmann com Solvatação da Área de Superfície
NAMD	<i>Nanoscale Molecular Dynamics</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NPT	<i>Ensemble</i> isotérmico-isobárico
ns	Nanossegundo
NVT	<i>Ensemble</i> canônico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PII	Potencial de Interação Intermolecular
ps	Picossegundo
R _g	Raio de giro
RMSD	Desvio Quadrático Médio
scFv	Fragmento variável de cadeia única
SUS	Sistema Único de Saúde
V _H	Domínio variável pesado
V _L	Domínio variável leve

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do Problema

A palavra câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de cem doenças, que têm em comum a rápida e anormal multiplicação de células. Essas células que se multiplicam além dos limites habituais podem invadir regiões adjacentes no corpo e se espalhar para outros órgãos, num processo denominado metástase, a principal causa de morte por câncer (1).

Os tipos de câncer podem ser divididos em algumas categorias, dependendo do tipo celular onde se originam. As principais categorias são: o carcinoma, que contém os tipos de câncer mais comuns, sendo originados por células epiteliais; o sarcoma, que contém os tipos originados em tecidos ósseos, musculares, adiposo, de vasos sanguíneos e linfáticos, além de tecidos fibrosos, como tendões e ligamentos; a leucemia, que contém os tipos originados nas células da medula óssea; o mieloma múltiplo, que contém os tipos originados nas células do plasma; o melanoma, originado nos melanócitos; e o linfoma, originado nos linfócitos (2).

A categoria de linfoma é dividida em dois tipos de câncer. O linfoma de Hodgkin é constituído por células anormalmente grandes e multinucleadas, chamadas de células de Reed-Sternberg, localizadas nos linfonodos. O segundo tipo é o linfoma não-Hodgkin (LNH), que se forma principalmente a partir de linfócitos B, podendo ser pouco ativo (de crescimento lento) ou agressivo (de crescimento rápido) (2).

Mais de 95% dos linfócitos B apresentam o receptor CD20 no decorrer do desenvolvimento, desde pré-células B até células B adultas e, conseqüentemente, as células de LNH também apresentam este receptor (3). Estudos mostram que a drástica redução de linfócitos B, quando da interação com mAbs anti-CD20 e ativação destas vias efetoras, pode aliviar os sintomas de LNH, apesar de deixar o paciente temporariamente imunodeprimido. No entanto, o CD20 não é encontrado nas células-tronco da medula óssea e células pró-B, que dão origem aos linfócitos B. Assim, a reposição de linfócitos B ocorre por novas gerações saudáveis produzidas por células-tronco hematopoiéticas. As características de superexpressão e reposição no organismo tornam o CD20 um importante biomarcador para imunoterapias contra enfermidades derivadas de linfócitos B, o que o credencia a ser um bom alvo para o

tratamento de LNH (4–6).

1.2 Antígeno CD20: definição e estrutura

O receptor CD20 é uma proteína transmembranar de 35 kDa de massa molecular, composta por 297 aminoácidos e codificada pelo gene *MS4A1*. A predição de estrutura secundária dos domínios proteicos de CD20, isolados de células, tem sido confirmada por estudos proteolíticos, como digestão por tripsina e proteinase K (7), seguidos por dicroísmo circular para estimar o conteúdo de hélices e alças (8). A Figura 1 mostra uma representação esquemática do CD20. Quatro domínios transmembranares foram definidos, compreendendo os resíduos Ile-Ala (57-78); Trp-Glu (85-105); Ser-Ile (121-141); e Leu-Ala (189-209). Duas alças extracelulares conectam dois pares desses domínios mais extremos, sendo que a menor é composta pelos resíduos Pro-Val (79-84); e a maior é composta pelos resíduos Lys-Ser (142-188). No citoplasma, uma alça composta pelos resíduos Lys-Asn (106-120) conecta um par de domínios centrais; a terminação N-citoplasmática é composta pelos resíduos Met-Gln (1-56); e a terminação C-citoplasmática é composta pelos resíduos Gly-Pro (210-297) (3).

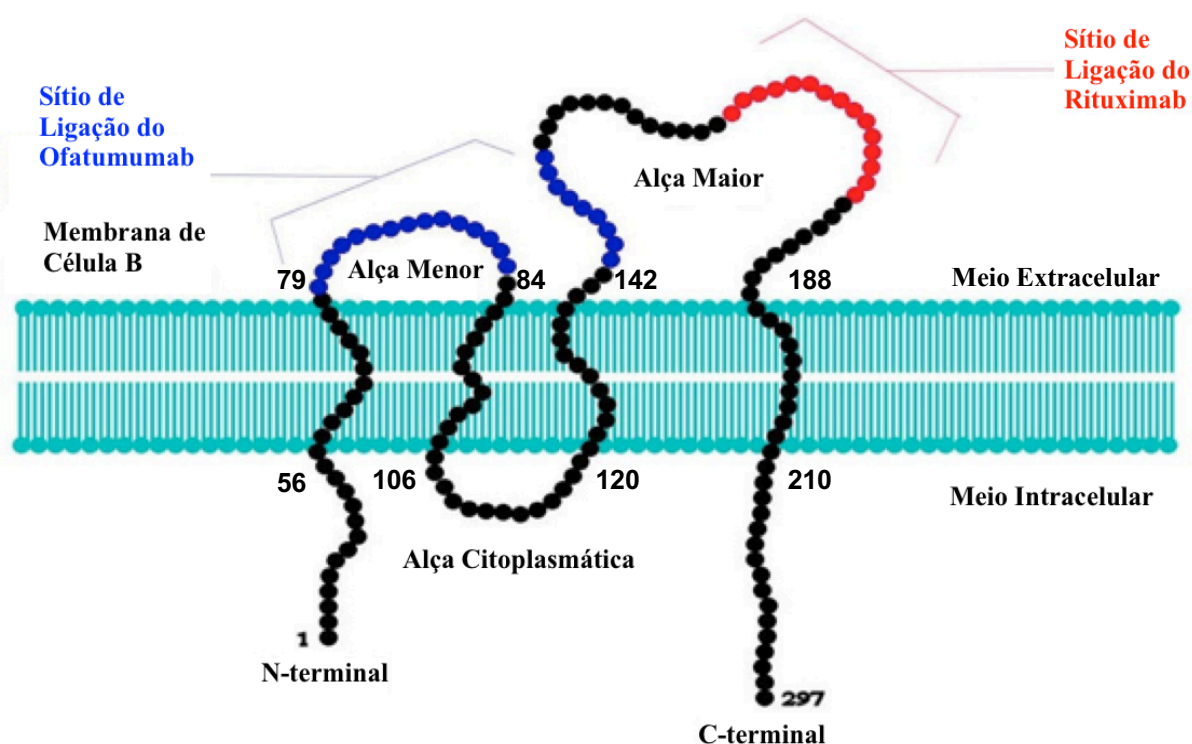


Figura 1 - Representação esquemática do receptor CD20

Evidenciando suas porções terminais, transmembranares e de alça, além do sítio de ligação do Rituximab em vermelho (resíduos 165-182) e dos sítios de ligação do Ofatumumab em azul (resíduos 74-80 e 145-161), outro anticorpo monoclonal que reconhece o antígeno CD20 em linfócitos B. Fonte: adaptado de Cang *et al.* (2012).

Por ser uma proteína de membrana e com estrutura terciária ainda não definida, são grandes os desafios para obtenção do CD20 ou partes dele para condução de experimentos biofísicos (9). No caso da obtenção do CD20 por expressão heteróloga, o enovelamento correto da proteína é dificultado, pois há formação de corpos de inclusão e situações de hiperimunogenicidade (3). A única porção de CD20 com estrutura resolvida é a alça que contém o epítipo do anticorpo monoclonal Rituximab, a qual foi co-cristalizada com o fragmento F_{ab} deste anticorpo, e suas coordenadas cristalográficas estão depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (10), código 2OSL (11).

1.3 Anticorpos: definição e estrutura

Os anticorpos (imunoglobulinas) são proteínas circulantes produzidas nos vertebrados em resposta à exposição a estruturas estranhas ao organismo, denominadas de antígenos, tais como vírus, bactérias, etc. Os anticorpos estão distribuídos pelos fluidos biológicos do corpo, sendo encontrados nas superfícies de um número limitado de tipos celulares (12) e são constituídos de quatro cadeias, sendo duas cadeias leves idênticas (isotipos κ ou λ) e duas cadeias pesadas idênticas (isotipos γ , ϵ , δ , α ou μ). As cadeias são compostas de múltiplas variantes que apresentam um domínio básico composto por 110 resíduos de aminoácidos em média. Como representado na Figura 2, a cadeia leve é formada por dois destes domínios, chamados de domínio variável (V_L) e constante (C_L), diferenciados pelo critério de variabilidade da sequência de aminoácidos, enquanto que as cadeias pesadas contêm um domínio variável (V_H) e três ou quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}), dependendo do isotipo da cadeia pesada (13).

O anticorpo apresenta função de ligação ao antígeno, através do domínio de ligação ao antígeno (F_{ab} – *antigen binding fragment*). Os domínios F_{ab} apresentam função de reconhecimento de antígeno e são constituídos por pares de segmentos variáveis, V_H e V_L , e de segmentos constantes, C_H e C_L , como descritos na Figura 2. Cada cadeia variável pesada ou leve possui regiões denominadas hipervariáveis que

são regiões determinantes de complementaridade (CDR), específicas para determinado antígeno. O domínio cristalizável (F_c – *cristalizable fragment*), por sua vez, possui funções efetoras citotóxicas. No entanto, existe uma série de aplicações em que este domínio efetor pode ser indesejável, promovendo efeitos citotóxicos adversos. Logo, o anticorpo é uma molécula bifuncional (14).

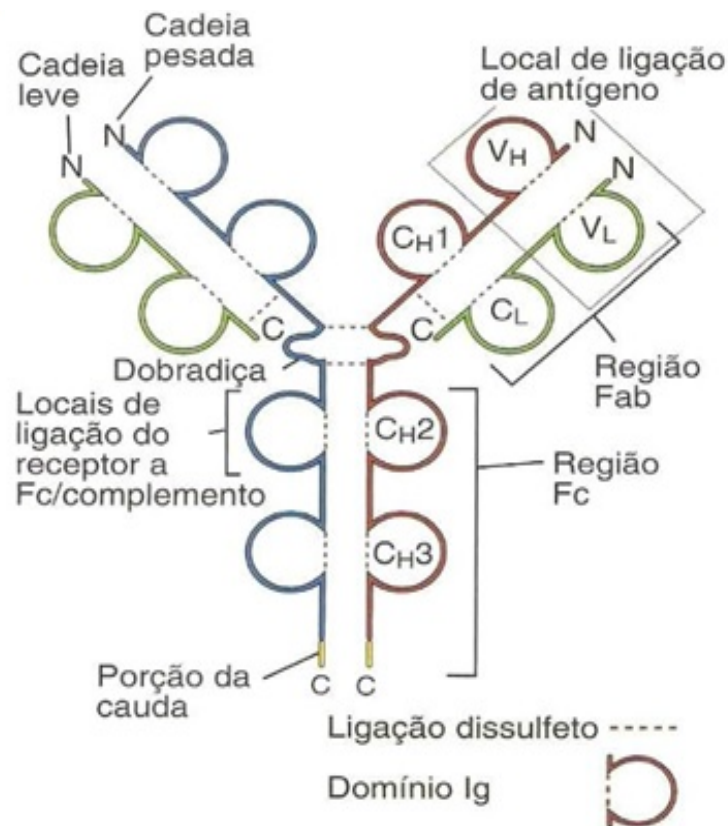


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura molecular de anticorpos

Exemplificando a estrutura de uma imunoglobulina, considerando a parte proteica. Ligações dissulfeto representadas por linhas pontilhadas. Fonte: Abbas (2008).

As ligações dissulfeto presentes na imunoglobulina estabilizam não somente a estrutura de cada domínio, como também a estrutura do anticorpo completo através da promoção das interações entre as cadeias leve e pesada, assim como entre cadeias pesadas (15).

Vários tipos de interações podem contribuir para a ligação do anticorpo ao antígeno, incluindo as de longo alcance, como a eletrostática; as de curto alcance, como a de van der Waals; e as resultantes das de curto e longo alcance, como as

ligações hidrogênio, que consideram o solvente biológico (água) na interação proteína-ligante, e as interações do tipo hidrofóbica (16). Antígenos têm regiões específicas reconhecidas por um determinado anticorpo, denominadas de epítipo. O somatório das interações entre epítipo e uma região do anticorpo pode ser relacionado com a avidéz. A avidéz do anticorpo é definida por dois fatores principais: a afinidade e a complementaridade entre as estruturas tridimensionais de antígeno e anticorpo, determinando a interação entre ambos. Os anticorpos podem apresentar uma especificidade bastante elevada para um antígeno, distinguindo pequenas diferenças na estrutura química do antígeno (17).

A partir dos parâmetros de especificidade e afinidade, o reconhecimento correto de antígenos pelos anticorpos é um fator crucial para a defesa do organismo contra patógenos. Assim, os anticorpos apresentam funções importantes em diagnóstico, terapia e aplicações biotecnológicas, que estão diretamente ligadas à sua estrutura tridimensional.

1.3.1 Anticorpos Monoclonais (mAbs)

A resposta do sistema imunológico, de maneira geral, é policlonal a antígenos, ou seja, os anticorpos são derivados de diferentes linhagens de linfócitos B, secretados contra um antígeno específico, cada um reconhecendo um epítipo diferente. Enquanto que mAbs surgem a partir de um único linfócito B parental, clonado e capaz de proliferar indefinidamente em cultura, apresentando propriedades físico-químicas idênticas. Os mAbs podem ser produzidos em laboratório através da estimulação de linfócitos B em camundongos, pela inserção de antígenos (15).

A obtenção de mAbs terapêuticos implica num extenso período de desenvolvimento e custos associados até a comercialização, passando pela descoberta e otimização até as fases de testes pré-clínicos e clínicos. O surgimento da engenharia de proteínas recombinantes na década de 1980 e da tecnologia de hibridoma – célula híbrida capaz de sintetizar um único tipo de anticorpo, mAb, e de se multiplicar indefinidamente *in vitro* – permitiu a redução destes custos e trouxe vantagens para as aplicações de proteínas terapêuticas, como a melhora do potencial clínico, da segurança e da eficácia no tratamento (18).

O primeiro passo para a produção de mAbs é sensibilizar os animais de laboratório (camundongos, por exemplo), injetando o antígeno e, assim, induzir uma

resposta imune. Esta resposta envolve a produção de anticorpos contra o antígeno pelos linfócitos B. Nessa etapa de produção, pode-se inserir genes de interesse ao gene do anticorpo para obtenção de anticorpos recombinantes. Após alguns dias, retira-se o baço do animal e fusionam-se os linfócitos B com células cancerosas de mieloma, formando os hibridomas. Os hibridomas são separados, cultivados e testados para identificar os que produzem anticorpos contra o antígeno de interesse (19).

Os anticorpos recombinantes podem conter produtos de genes de origem humana, assim como de outras espécies. Tais produtos exógenos podem ser reconhecidos como estranhos pelo sistema imunológico do paciente em tratamento, lesionando gravemente seus rins. A fim de reduzir ou evitar essas reações imunes, uma estratégia utilizada foi a de estruturar mAbs quiméricos (66% de proteína humana) e humanizados (90% de proteína humana). Anticorpos quiméricos e humanizados conservam regiões das sequências de aminoácidos do animal de laboratório imunizado, principalmente as que reconhecem o antígeno, sendo o restante da molécula substituído por sequências de proteínas humanas (20).

Devido à alta especificidade pelo antígeno e por apresentarem poucos efeitos colaterais, os mAbs quiméricos têm sido extensivamente desenvolvidos e utilizados para o tratamento de doenças, tais como câncer, doenças infecciosas e inflamatórias. A obtenção de mAbs, entretanto, apresenta algumas dificuldades, como por exemplo: por serem originados principalmente em camundongos, podem sensibilizar o sistema fisiológico humano a produzir anticorpos humanos anti-murino (HAMA), limitando suas aplicações terapêuticas; além de ser um processo laborioso e demorado. Portanto, estratégias vêm sendo usadas buscando um melhor entendimento sobre a interação destes anticorpos ou de regiões mais específicas dos mAbs com seus alvos moleculares, os antígenos. A engenharia de minianticorpos, fragmentos de anticorpos desenvolvidos para exercer uma determinada função (efetora e/ou de reconhecimento), surge então como uma estratégia para atenuar a reação imunológica do paciente e ampliar suas aplicações terapêuticas, como o desenvolvimento de *kits* de diagnóstico baseados na interação com o antígeno (21). Após a introdução de melhorias ao fragmento, este pode ser utilizado para reconstituir o anticorpo completo e, possivelmente, aplicado clinicamente. Este anticorpo melhorado, chamado de *biobetter*, é obtido principalmente através de técnicas como mutação sítio dirigida e desenho de anticorpos assistido computacionalmente; além de técnicas alternativas

como de *phage display*, na qual os genes codificadores das porções de cada cadeia do anticorpo são fusionadas, inseridas em locais específicos do vetor fagomídeo e, em condições apropriadas, a proteína completa é expressa na superfície dos fagos (22).

1.3.2 Fragmentos de anticorpos ou minianticorpos

A digestão proteolítica de anticorpos permite obter fragmentos menores, contendo somente um subconjunto dos domínios, mantendo a habilidade de ligação ao antígeno (F_{ab} , ~55 kDa; F_v , ~15 kDa; scFv, ~28 kDa; scFv biespecífico, ~55 kDa) ou de função efetora (F_c , ~50 kDa) (23) (Figura 3).

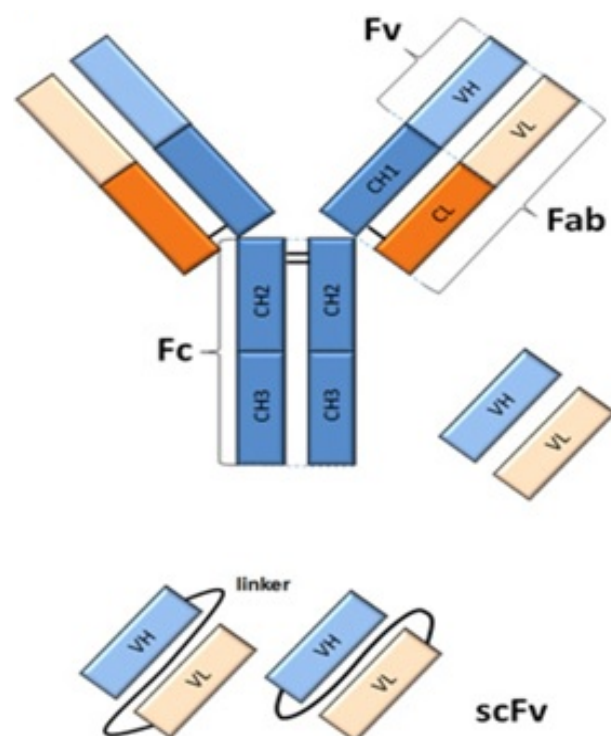


Figura 3 - Representação esquemática das porções que são componentes de um anticorpo e de um fragmento variável de cadeia única (scFv)

Representação de um fragmento variável de cadeia única (scFv) a partir do anticorpo, evidenciando as porções V_H (azul claro) e V_L (bege) ligados por um polipeptídeo flexível (*linker*). Porções constantes pesadas (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) em azul escuro; e porções constantes leves (C_L) em laranja. Fonte: www.abdesignlabs.com/technical-resources/scfv-cloning/.

Inicialmente, antes do desenvolvimento e da aplicação de engenharia de proteínas, o domínio F_c era removido dos anticorpos por clivagem com proteases (tripsina e pepsina, por exemplo). Posteriormente, domínios específicos passaram a ser obtidos por engenharia genética e expressão heteróloga, gerando diversos tipos de fragmentos de anticorpos, os chamados minianticorpos. Vários destes fragmentos já foram bem sucedidos em testes pré-clínicos e clínicos para aplicação em terapia molecular, como: aplicação em técnicas de monitoramento de múltiplas reações (Immuno-MRM) (24), estudo imunoterápico da doença de Alzheimer (25) e capacidade de prevenção da infecção causada pelo vírus da dengue (26). Dentre as desvantagens de utilização de um fragmento de anticorpo, tem-se: perda da função efetora no caso do scFv, constituído a partir do fragmento F_{ab} ; tempo de meia vida menor em relação ao anticorpo completo; e limitação da produção de fragmentos funcionais, dependendo do *design* do vetor e do sistema de expressão usado. Apesar disso, o domínio da tecnologia de engenharia de proteínas permite a obtenção de *biobetters*, melhorando a interação, especificidade e afinidade do fragmento, além de permitir a reconstituição do anticorpo completo posteriormente (14).

1.3.2.1 Fragmento variável de cadeia única (scFv)

Os scFv são formados pelos domínios V_H e V_L ligados por um polipeptídeo flexível (*linker*), que previne a dissociação dos domínios, como representado na Figura 3. O tamanho dos *linkers* varia de 10 a 25 resíduos de aminoácidos e são tipicamente compostos por aminoácidos hidrofílicos, como glicina (G) e serina (S). A escolha de aminoácidos hidrofílicos é uma estratégia para aumentar a solubilidade na expressão heteróloga dos scFv. Dessa forma, o peptídeo $(GGGS)_3$ é o *linker* mais utilizado na construção de scFv (27).

Os scFv retêm a afinidade específica do anticorpo do qual foi originado, possuindo uma melhor capacidade farmacocinética de penetração em tecidos. Esses fragmentos de anticorpos podem ser aplicados em *kits* de diagnóstico, em estudos de interação com o respectivo antígeno, ou na proposição de mutantes de melhor afinidade, podendo o anticorpo completo de origem ser reconstituído com as devidas alterações encontradas (14).

1.3.3 Caracterização do anticorpo anti-CD20: Rituximab

O Rituximab (MabThera®; Rituxan®, Roche/Genentech/Biogen IDEC) foi o primeiro mAb aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de recidiva de linfomas em 1997 (28). Em 2002, tornou-se a principal droga antineoplásica do mundo. Por reconhecer o antígeno CD20 em linfócitos B, o Rituximab resultou em um aumento significativo da taxa de sobrevivência de pacientes acometidos de doenças, como LNH e Leucemia Linfocítica Crônica, quando comparado ao tratamento somente com quimioterapia (combinação de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona – CHOP). Mais recentemente, o uso do Rituximab em terapia de manutenção tem mostrado também melhora em pacientes com Linfoma Folicular (29).

A Figura 4 mostra a representação esquemática da estrutura de um anticorpo genérico com a origem dos domínios constituintes de Rituximab em detalhe, que é um anticorpo monoclonal quimérico murino/humano IgG1- κ , ou seja, contém as CDRs do anticorpo murino anti-CD20 2B8 em conjunto com o domínio de isotipo kappa (κ) e a região constante da cadeia pesada do anticorpo humano IgG1 (30).

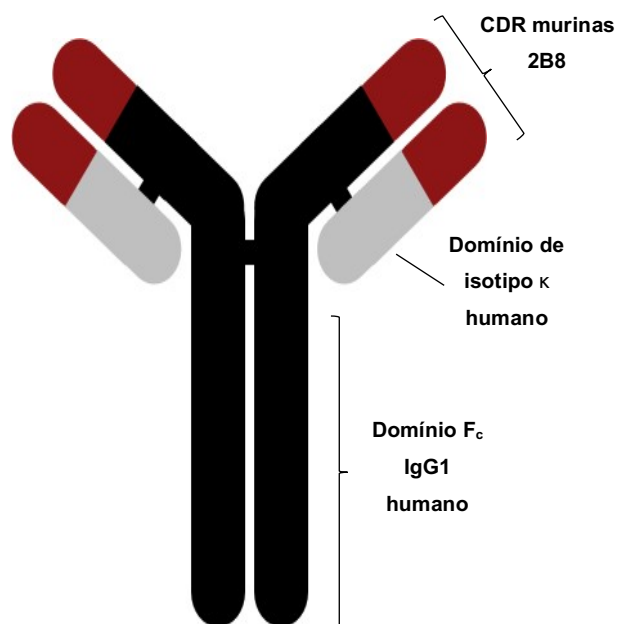


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura de um anticorpo genérico, detalhando a origem dos domínios constituintes do mAb quimérico Rituximab

Porções V_H e V_L em vermelho; porções constantes pesadas (C_H) em preto; e porções constantes leves (C_L) em cinza. Fonte: elaborada pelo autor.

O mecanismo de ação do Rituximab envolve o reconhecimento do receptor CD20, sendo o epítopo composto pelos resíduos de aminoácidos ANPS (resíduos 170 a 173). Após a interação com o antígeno, o anticorpo aciona três diferentes funções efetoras: morte programada da célula ou apoptose; citotoxicidade dependente do complemento (CDC), na qual a proteína C1q se liga ao complexo mAb-antígeno e ativa a via clássica do sistema complemento; e citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (CCDA), na qual células efetoras, como *natural killers* (NK), macrófagos e neutrófilos, ligam-se ao complexo antígeno-anticorpo através do receptor F_c (F_cR) e promovem a liberação de granzimas, perforinas e granulisina para lise da célula (31).

O desenvolvimento de biosimilares ou *biobetters* derivados de Rituximab, a fim de baratear custos de produção e de melhorar a resposta do paciente ao tratamento, necessita de um conhecimento refinado, em nível atomístico-molecular, da interação do anticorpo com o seu antígeno. A técnica de simulação de Dinâmica Molecular (DM) e outras associadas podem acessar informações estruturais e energéticas na interação anticorpo e antígeno, que possibilita o desenho de anticorpos assistido computacionalmente, com funcionalidades mais adequadas e num período menor de desenvolvimento, com menor custo associado.

1.4 Simulação de Dinâmica Molecular (DM)

É importante entender como ocorre a interação entre o anticorpo (Ab) e o respectivo antígeno (Ag). Na aproximação do Ab ao Ag, mudanças conformacionais estão envolvidas antes da formação do complexo Ab-Ag. Porém, a obtenção de informações estruturais da formação da interface entre Ab-Ag não é trivial. Uma série de experimentos podem ser realizados para a obtenção das informações, que podem incluir as ferramentas clássicas de estudos biofísicos, tais como: técnicas de cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear, espalhamento de nêutrons ou espectroscopia de fluorescência (32). A simulação molecular, principalmente a DM, surge como método alternativo para obtenção de detalhes atomísticos-moleculares da

interação entre Ab-Ag, sendo capaz de gerar informações algumas vezes inacessíveis experimentalmente (33).

A DM simula o movimento de átomos e moléculas em solução, permitindo o estudo da dinâmica numa determinada janela temporal, limitada a alguns microssegundos (μs). Podendo ir além de μs , dependendo da técnica utilizada e da necessidade de detalhes (34).

As interações descritas entre cada átomo com outros do sistema em simulação de DM podem ser divididas entre curto e longo alcance (como van der Waals e coulômbicas). Informações detalhadas sobre a estrutura tridimensional de uma proteína em equilíbrio com o solvente, ou no caso de uma enzima interagindo com um substrato, podem ser acessadas a partir dos detalhes atômicos fornecidos pela simulação de DM, facilitando o entendimento das interações (35).

A trajetória de um átomo e de um conjunto de átomos em simulação de DM é adquirida através da resolução das equações de movimento de Newton. A partir de uma configuração inicial do sistema, com as posições atômicas determinadas nos eixos x , y e z , as forças exercidas para cada átomo podem ser obtidas através da Equação 1:

$$\mathbf{F}_i = m_i \cdot \mathbf{a}_i = \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \cdot m_i \quad (1)$$

Onde \mathbf{F}_i representa a força exercida em cada átomo i pelo sistema; \mathbf{a}_i é a aceleração para o átomo i que possui massa m_i ; \mathbf{r}_i é a posição do átomo i ; e t é o intervalo de tempo de simulação.

Em DM, as moléculas são tratadas como um conjunto de partículas que se mantêm ligadas por forças harmônicas; e os potenciais de interação entre partículas ligadas e não ligadas são chamados coletivamente de campo de força. As forças exercidas para cada átomo também podem ser obtidas através da derivada primeira da Equação 2 em relação às posições dos átomos do sistema:

$$\mathbf{F}_i = - \frac{\partial V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (2)$$

V é o potencial de interação total do sistema, calculado a partir dos parâmetros considerados para o campo de força utilizado na simulação, sendo definido como a soma dos potenciais de átomos ligados (diedrais, comprimentos e ângulos de ligação) e de átomos não ligados (interações de Coulomb e de van der Waals) (36,37), como mostrado na Equação 3:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} K_b (b_{eq} - b)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta_{eq} - \theta)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{torções}} K_\phi [(1 + \cos(n\phi))] + \sum_{\text{pares não-ligados } i-j} \left[\frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} + \frac{q_i \cdot q_j}{Dr_{ij}} \right] \quad (3)$$

Sendo b o comprimento de ligação em um instante qualquer (instantâneo) que representa o desvio em relação ao comprimento de equilíbrio b_{eq} da ligação, assim como θ é o ângulo instantâneo entre duas ligações químicas consecutivas que descreve o desvio em relação ao ângulo de equilíbrio θ_{eq} entre as duas ligações químicas. As distâncias de ligações e as amplitudes dos ângulos podem oscilar, considerando um modelo de oscilador harmônico, entre as posições de deformação máxima e a posição de equilíbrio. Assim, K_b é a constante de Hooke associada à deformação da ligação química específica, e K_θ é a constante de Hooke para a restituição do ângulo de equilíbrio (θ_{eq}) entre as duas ligações químicas. ϕ representa o ângulo de torção, e n é a multiplicidade do ângulo quando este passa por 360° . A e B representam os parâmetros de van der Waals, q representa os valores das cargas parciais; r_{ij} é a distância entre os átomos i e j (38).

O potencial de Lennard-Jones, usado para modelar as interações de van der Waals, é representado pela Equação 4 e considerado de curto alcance, pois varia com o inverso de dois termos: o termo repulsivo r_{ij}^{12} , de maneira que a energia potencial aumenta rapidamente com a aproximação entre os núcleos atômicos devido a não interpenetração dos átomos não ligados covalentemente e ao fato do diâmetro atômico ser finito e quase invariável; e o termo atrativo r_{ij}^6 , atribuído a pequenas flutuações na distribuição de cargas de um átomo na presença de outro átomo, induzindo simultaneamente dipolos elétricos em sentidos opostos, uma interação atrativa dipolo-dipolo. O potencial de Coulomb, usado para modelar as interações eletrostáticas, é representado pela Equação 5 e varia com o inverso da distância entre dois átomos (r_{ij}), sendo, portanto, de longo alcance. Os dois potenciais compõem a interação entre átomos não ligados covalentemente:

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

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}} \quad (5)$$

Na Equação 4, σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial interatômico entre os átomos i e j é zero; e ε_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira repulsiva e a atrativa. Esses são parâmetros ajustados por cálculos teóricos ou experimentalmente. Na Equação 5, r_{ij} corresponde à distância entre as cargas (q); q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas pontuais de cada átomo i e j ; ε_r é a constante dielétrica relativa do meio líquido; e ε_0 é a permissividade do espaço livre.

Relacionando a Equação 1 com a Equação 2, a força exercida (\mathbf{F}_i) para cada átomo do sistema é adquirida a partir do cálculo da derivada do potencial V , obtendo-se, assim, o valor de aceleração (\mathbf{a}) de cada átomo i .

Com o valor de aceleração, a integração das equações de movimento através de algoritmos como o de Verlet (39) fornece a mudança de posição \mathbf{r} de cada átomo i . Dado um conjunto de posições atômicas num instante t , as posições no passo seguinte são obtidas pela expansão de Taylor de $\mathbf{r}_i(t)$:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 + \dots \quad (6)$$

Do mesmo modo, obtém-se as posições no passo anterior a $\mathbf{r}_i(t)$:

$$\mathbf{r}_i(t - \delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \mathbf{v}(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}(t)\delta t^2 - \dots \quad (7)$$

em que δt é o passo de tempo. O somatório das Equações 6 e 7 descreve o algoritmo de Verlet para a propagação das posições:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + a(t)\delta t^2 \quad (8)$$

desprezando-se os termos de ordens superiores.

Dessa forma, conhecendo-se as posições iniciais para cada átomo, as novas posições são continuamente calculadas após intervalos t de tempo, até que a trajetória da molécula ao longo do tempo total de simulação seja obtida.

Como visto nas equações, as velocidades não são utilizadas para a determinação das trajetórias neste algoritmo, porém são necessárias para o cálculo da energia cinética do sistema, a qual é somada à energia potencial para obter a energia total do sistema. A subtração das Equações 6 e 7 descreve o algoritmo de Verlet para a propagação das velocidades:

$$\mathbf{v}(t) = [\mathbf{r}_i(t + \delta t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t)]/2\delta t \quad (9)$$

Os dados obtidos pela DM incluem um conjunto de configurações e propriedades mantidas constantes durante a integração das equações de Newton, que representam o estado do sistema. Esse conjunto é chamado de *ensemble*, e os dados analisados podem ser extrapolados para propriedades experimentalmente mensuráveis com o uso de mecânica estatística, tais como pressão, volume, temperatura, entropia, energia interna e energia livre. Duas opções de *ensemble* são o canônico ou NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes) e o isotérmico-isobárico ou NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) (36).

Após o término da simulação, informações como a interação entre duas moléculas, assim como as energias intra e intermoleculares, podem ser extraídas (32,40).

1.5 Energia livre de ligação

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) é uma grandeza termodinâmica definida como a diferença entre variação de entalpia (ΔH – função de estado da variação de energia em pressão constante) e o termo composto pela temperatura (T)

vezes a variação de entropia (ΔS – função de estado da variação de energia em função da liberdade de partículas) em uma reação. Assim, ΔG representa a medição do trabalho máximo realizado durante um processo (Equação 10).

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (10)$$

Para um *ensemble* NPT, em que o número de partículas, pressão e temperatura do sistema são mantidos constantes, o cálculo de energia livre é capaz de prever a espontaneidade da ocorrência de uma reação (ΔG negativo). Sendo espontânea uma reação exotérmica de alto valor negativo de entalpia, o termo $-T \cdot \Delta S$, também negativo, pouco influencia sobre o valor de ΔG , conseqüentemente a entalpia é decisiva na determinação da energia livre. Se $\Delta G = 0$, o sistema atingiu o equilíbrio dinâmico, tendência de toda reação química ao consumir os reagentes para formação dos produtos (41).

Quanto à energia livre de ligação, é uma grandeza termodinâmica que busca medir a energia atrelada à interação entre duas moléculas, como a interação entre Ab-Ag, por exemplo. Leva-se em consideração a energia referente à formação do complexo e a contribuição energética de cada molécula que reage para formá-lo (Equação 11).

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}}) \quad (11)$$

Para um sistema em equilíbrio dinâmico, a diferença energética entre o estado final e inicial representa a variação da energia livre de ligação (ΔG^0), podendo ser correlacionada com a afinidade do anticorpo pelo antígeno através da Equação 12 mostrada abaixo, sendo uma de suas importantes aplicações.

$$\Delta G^0 = -\kappa_B T \ln K, \text{ onde:}$$

$$G_{\text{reag}}^0 - G_{\text{prod}}^0 = -\kappa_B T \ln K_a \quad \text{ou} \quad G_{\text{prod}}^0 - G_{\text{reag}}^0 = -\kappa_B T \ln K_d \quad (12)$$

Onde κ_B é a constante de Boltzmann que relaciona temperatura e energia molar de moléculas; T é a temperatura em Kelvin (K); K_a é a constante de afinidade e K_d é a

constante de dissociação, de acordo como a ordem dos fatores de energia dos reagentes (G^0_{reag}) e dos produtos (G^0_{prod}) são usados para cálculo do ΔG^0 , como mostrado na Equação 12 (42).

1.5.1 Método da Força Adaptativa

O método da Força Adaptativa (ABF, *Adaptive Biasing Force*) (43–45) é descrito como uma abordagem que permite que o sistema, tal como íon-canal iônico ou proteína-ligante, escape de mínimos locais de energia para ampliar a amostragem de conformações e estimar o ΔG entre os estados de complexo formado (estado “ligado”) e o estado “não ligado”. Para o caso de proteína-ligante, o método consiste em aplicar uma força sobre o ligante equivalente à força média que o ambiente exerce sobre ele para mantê-lo em determinado ponto da superfície de energia potencial, sendo o ligante afastado ao longo de um eixo cartesiano até que não haja mais interações entre ele e a proteína. O eixo pelo qual o ligante se difunde de um estado a outro é chamado de coordenada de reação ou de transição (ξ). ξ é determinada pela variável coletiva escolhida, um passo crítico para o cálculo de energia livre. Variável coletiva é o parâmetro utilizado para descrever a transição ao longo de ξ , como, por exemplo, a posição do íon ao longo do canal iônico para o estudo de sua permeação. Para o estudo da interação anticorpo-antígeno, uma escolha indicada de variável coletiva é a distância entre os centros de massa do anticorpo para o respectivo antígeno, sendo este afastado ao longo de um eixo definido e a posição do anticorpo mantida fixa (44,46,47).

A transição entre estados do ligante ao longo de um intervalo de tempo de simulação não se dá de maneira contínua, a coordenada de reação é dividida em janelas de amplitude definida para que a transição seja gradual, otimizando a coleta de dados da simulação para estimar o ΔG (48).

Para esclarecer os cálculos envolvidos no método ABF, tem-se como exemplo, para um sistema de N átomos, a coordenada de reação sendo a coordenada cartesiana de um átomo x_1 . Assim, o sistema terá como energia livre:

$$G(x_1 \pm dx_1) = -\kappa_B T \ln P(x_1) \quad (13)$$

Onde a probabilidade de encontrar o sistema nas proximidades de x_1 é dada por $P(x_1)$, e equivale a:

$$P(x_1) \propto \int \exp\left\{\frac{-U(x_1, \dots, x_{3N})}{\kappa_B T}\right\} dx_2, \dots, dx_{3N} \quad (14)$$

Em que a energia potencial do sistema atômico é dada por U .

Dessa forma, o ΔG é calculado como:

$$G(x_1) = -\kappa_B T \ln \int e^{-\left(\frac{U}{\kappa_B T}\right)} dx_2, \dots, dx_{3N} \quad (15)$$

A derivada da energia livre em relação a x_1 é:

$$\frac{dG(x_1)}{dx_1} = \left\langle \frac{\int e^{-\left(\frac{U}{\kappa_B T}\right)} \frac{\partial U}{\partial x_1} dx_2, \dots, dx_{3N}}{\int e^{-\left(\frac{U}{\kappa_B T}\right)} dx_2, \dots, dx_{3N}} \right\rangle x_1 = \left\langle \frac{\partial U}{\partial x_1} \right\rangle x_1 = -\langle F_{x_1} \rangle x_1 \quad (16)$$

Sendo F_{x_1} a força que atua em direção a coordenada de reação. O valor médio da força aplicada é calculado para um valor específico de x_1 (48). A força é obtida por simulação de DM e sua média é calculada.

Outro conceito que deve ser levado em conta em simulação com aplicação do método ABF é o de amostragem. Representa o número de vezes computadas que um determinado valor de força média foi aplicado em um ponto da coordenada de reação. Devido às grandes flutuações da força exercida ao longo do caminho de reação, faz-se necessário um número representativo de amostras. Dessa forma, uma amostragem suficiente permite obter uma estimativa razoável da distribuição de força e, assim, da força média, a partir da qual o ΔG é calculado. Caso em determinados pontos da coordenada de reação a amostragem seja baixa, faz-se necessário a etapa de refinamento para aumentar o número de amostras desses pontos. Esta etapa consiste em manipular parâmetros associados à coordenada de reação, como reduzir a amplitude de uma janela de transição do ligante e/ou aumentar a constante de força aplicada nos limites da janela para evitar que o ligante transite em pontos de coordenada de outras janelas (49).

1.5.2 Método de MM/PBSA

O método de mecânica molecular de Poisson-Boltzmann com solvatação da área de superfície (MM/PBSA) permite calcular uma aproximação para a diferença entre a energia livre do complexo proteína-ligante e a energia de cada macromolécula a partir da Equação 11. Para resolver esta equação, o método de MM/PBSA leva em consideração os seguintes termos:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (17)$$

$$\Delta H = \Delta G_{MM} + \Delta G_{\text{solv}} \quad (18)$$

$$\Delta G_{MM} = \Delta E_{vdW} + \Delta E_{ele} \quad (19)$$

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{não polar}} \quad (20)$$

$$\Delta G_{\text{não polar}} = \gamma \cdot ASAS + \beta \quad (21)$$

A energia livre de ligação ($\Delta G_{\text{ligação}}$) na Equação 17 contém as contribuições da entalpia (ΔH) e da entropia ($-T \cdot \Delta S$). A componente entálpica na Equação 18 é composta pela energia potencial obtida da mecânica molecular no vácuo (ΔG_{MM}) e pela energia livre de solvatação (ΔG_{solv}). A ΔG_{MM} na Equação 19 é composta pela energia do potencial de interações não-covalentes de van der Waals (ΔE_{vdW}) e pela energia do potencial de interações eletrostáticas (ΔE_{ele}); enquanto a ΔG_{solv} na Equação 20 é composta por um componente polar (ΔG_{polar}) e por um componente não polar ($\Delta G_{\text{não polar}}$). O ΔG_{polar} será calculado resolvendo a equação de Poisson-Boltzmann; enquanto o $\Delta G_{\text{não polar}}$ é determinado pela Equação 21, onde ASAS é a área de superfície acessível ao solvente, e os termos γ e β são constantes empíricas de valores $0,00542 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ e $0,92 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente (50).

O trabalho de Li *et al.* (2009) (51) discute sobre como, a partir das coordenadas cristalográficas (11) do complexo formado pelo fragmento F_{ab} de Rituximab e pela alça de CD20 que contém o epítipo, propuseram mutantes do anticorpo através desta metodologia de MM/PBSA. Este método permitiu calcular uma aproximação para a diferença entre a energia livre do complexo F_{ab} -alça e a energia de cada macromolécula, obtendo-se a Equação 22 a partir da Equação 11:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{F_{ab} \text{ de Rituximab}} + G_{\text{alça de CD20}}) \quad (22)$$

O método de MM/PBSA permite a decomposição da energia livre de ligação por resíduo, estimando a contribuição da cadeia lateral, e, assim, permite a proposição de mutações. Porém, não consegue estimar a ordem de magnitude do $\Delta G_{\text{ligação}}$ absoluto sem o valor da entropia (ΔS), somente o relativo ($\Delta\Delta G_{\text{ligação}}$). Enquanto que o método ABF, apesar de não estimar o $\Delta G_{\text{ligação}}$ por resíduo, não depende do valor de ΔS para o cálculo do $\Delta G_{\text{ligação}}$ absoluto, o que permite estimar diretamente a afinidade do complexo proteína-ligante.

A técnica de ABF surge então como uma alternativa ao MM/PBSA para calcular os valores de energia de ligação entre o scFv de Rituximab e a alça de CD20, a fim de comparar com os resultados experimentais obtidos por Li e colaboradores, e, assim, buscar validar sua utilização para proposição de mutações que melhorem a afinidade. Pode-se determinar as diferenças encontradas entre os resultados de energia livre de ligação por ABF da interação do complexo scFv+alça e os resultados experimentais de interação do complexo fragmento F_{ab} +células Daudi, que contêm o CD20 completo.

1.6 Justificativa

A Organização Mundial da Saúde (OMS), através da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), projeta 17,1 milhões de novos casos de câncer e 10 milhões de mortes para o ano de 2020, sendo o câncer a principal causa de mortalidade em todo o mundo, segundo o Projeto GLOBOCAN (estudo de Incidência, Mortalidade e Prevalência Mundial do Câncer). A OMS estima que o número de casos aumente em 70% nas próximas duas décadas; e mais de 60% dos novos casos são registrados na África, Ásia e América do Sul e Central, onde 70% das mortes por câncer no mundo são reportadas. Especificamente para o LNH, principal tipo de câncer que acomete os linfócitos B, onde o receptor CD20 está inserido, a OMS estima 463 mil novos casos e 241 mil óbitos no mundo para o ano de 2020 (52).

Diante do quadro projetado pela OMS para o câncer nas próximas décadas, o estudo de alternativas para o tratamento é de extrema importância, como a obtenção de mAbs mais efetivos, buscando o melhor entendimento sobre a interação destes anticorpos com seus alvos moleculares, os antígenos. O investimento de recursos para a criação desses anticorpos melhorados, os chamados *biobetters*, é

fundamental. Além disso, é necessário considerar que, com a finalização do tempo de exploração de patente de alguns anticorpos, outra alternativa é o investimento na produção de biossimilares. A pesquisa de anticorpos para câncer é multidisciplinar e, embora no Brasil o corpo de pesquisadores em áreas afins para desenvolvimento de anticorpos seja muito qualificado, o país mostrou alguns resultados somente nos últimos três anos. O país apresenta, então, um atraso tecnológico bastante significativo nessa área.

Com o impacto da ordem de 51% dos biofármacos no orçamento anual do Ministério da Saúde e com intuito de reduzir o atraso tecnológico na área, o governo brasileiro implantou um programa de parcerias entre laboratórios nacionais e estrangeiros para absorção de conhecimento e transferência de tecnologia para a produção local. Esse programa, chamado de Parceria de Desenvolvimento Produtivo (PDP), tem o objetivo de inserir o Brasil no seleto grupo de países que investem em pesquisa e inovação da rota biotecnológica, direcionada para o desenvolvimento de medicamentos destinados principalmente ao tratamento de doenças típicas da terceira idade. Com as novas parcerias entre laboratórios públicos e privados, o país amplia a produção de medicamentos biológicos, passando a fabricar 25 produtos com tecnologia de última geração, dentre eles o Rituximab. Este mAb está entre os dez medicamentos mais solicitados na justiça brasileira por usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), somando um custo anual de aproximadamente trinta milhões de reais aos cofres públicos. Assim, o Rituximab é definido como produto estratégico para o SUS, e a portaria nº 542 de 17 de fevereiro de 2017, a qual entrou em vigor na data de sua publicação, define a distribuição de investimento para este anticorpo entre os parceiros públicos: 50% para Biomanguinhos, 30% para o Instituto Butantan e 20 % para o Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR; e entre os parceiros privados: 50% para a Bionovis, 30% para a Libbs e 20% para a Orygen.

O mecanismo de ação do Rituximab envolve o reconhecimento da sequência CEPANPSEKNSPSTQYC (resíduos 167 a 183) de CD20 (31). A estrutura deste loop de CD20 que contém o epítipo ANPS (resíduos 170 a 173) apresenta uma ligação dissulfeto, estabilizando uma alça de 17 resíduos de aminoácidos. Assim, o entendimento da interação destes resíduos de CD20 com o scFv de Rituximab deve gerar informações complementares que possibilitarão propor mutações ao anticorpo e realçar a interação anticorpo-antígeno, beneficiando a afinidade. Um aumento de afinidade do scFv pela alça de CD20 pode aumentar o tempo de meia vida e viabilizar

a obtenção de um *biobetter*, através da reconstrução do anticorpo completo com as mutações sugeridas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a interação do fragmento de scFv derivado do anticorpo Rituximab com a alça de CD20, a fim de validar a metodologia computacional ABF para este sistema.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter a estrutura tridimensional do scFv de Rituximab a partir das coordenadas cristalográficas do fragmento F_{ab} deste anticorpo;
- Verificar a estabilidade em meio aquoso do modelo construído de scFv submetido à simulação de DM, através de análises estruturais e energéticas;
- Determinar diferenças encontradas entre os resultados por ABF da interação do complexo scFv+alça e os resultados experimentais de interação do complexo fragmento F_{ab} +células Daudi, que contêm o CD20 completo, obtidos por Li *et al.* (2009).

3 METODOLOGIA

3.1 Modelagem do scFv de Rituximab

As coordenadas atômicas do fragmento F_{ab} do Rituximab foram obtidas de dados cristalográficos depositados no PDB, código 2OSL (11). A partir destas coordenadas, obteve-se as estruturas dos domínios variáveis leve (V_L , 106 resíduos) e pesado (V_H , 121 resíduos) para montagem do fragmento scFv, cujas sequências estão descritas na Tabela 1. A estrutura do *linker* (GGGS)₃ foi construída no programa Swiss-PDBViewer (53) por adição de resíduos de aminoácidos à porção C-terminal do domínio V_H e conectada ao domínio V_L pela porção N-terminal. Essa sequência de resíduos de glicina e serina foi escolhida para conferir flexibilidade e por ser a mais utilizada na construção de scFv (27), sendo a expressão heteróloga deste fragmento scFv de Rituximab realizada com sucesso por um grupo colaborador para posteriores testes experimentais de validação dos resultados computacionais.

Tabela 1 - Sequência de resíduos de aminoácidos componentes do scFv de Rituximab

Domínio V_H	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPG NGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYF NWWGAGTTVTVSA
Linker	GGGSGGGSGGGGS
Domínio V_L	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASG VPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

V_H : domínio variável da cadeia pesada; *linker*: ligante utilizado para unir os dois domínios; V_L : domínio variável da cadeia leve.

O scFv de Rituximab foi submetido ao servidor H++ (54–56) para estimar os estados de protonação dos resíduos a um pH de 7,4 (pH fisiológico).

3.2 Simulação de DM do scFv de Rituximab em água

O pacote NAMD 2.12 (57) foi utilizado para as simulações de DM, pois contém as ferramentas necessárias para preparação dos sistemas submetidos à DM, programas de análises estruturais e energéticas, além de protocolo definido e adaptado para cálculo de energia livre de ligação pelo método ABF.

O sistema scFv em solução aquosa foi constituído em uma caixa cúbica de dimensões de 90 Å, onde o scFv foi solvatado por uma camada de moléculas de água do modelo TIP3P (58) de ~20 Å a partir da superfície da proteína. Seis íons Cl⁻ foram adicionados para eletroneutralizar o sistema. Os átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína através do programa *psfgen* do pacote NAMD2.12, e o campo de força CHARMM27 (59) foi utilizado para modelar as interações entre átomos ligados e não ligados, assim obtendo-se a topologia para submissão à simulação de DM. A temperatura foi de 310 K, mantida utilizando o termostato de Langevin. O sistema completo resultou em 49155 átomos.

O seguinte protocolo foi utilizado para termalizar o sistema e prepará-lo para a fase de produção da simulação de DM: 5000 passos de minimização de energia para otimização da geometria da proteína e maus contatos, utilizando o algoritmo de gradiente conjugado (CG); seguindo-se de período de termalização para relaxar a estrutura do scFv e equilibrar as moléculas de água adicionadas, consistindo em 100 ps de *ensemble* canônico (NVT), representado por número de partículas e volume fixos e temperatura controlada, e 500 ps em *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT), no qual o número de partículas é constante e a pressão e temperatura são controladas. A etapa de aquisição da trajetória seguiu por 200 ns em *ensemble* NPT e foi realizada em triplicata (chamadas de S1, S2 e S3), partindo de velocidades iniciais diferentes.

Os potenciais de interação de longo alcance e de curto alcance foram calculados até um raio *cutoff* de 12 Å. O algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME) (60) foi utilizado para tratar a descontinuidade ao se usar este raio de corte. O algoritmo de restrições utilizado foi o SHAKE (61), e um *timestep* de 2 fs foi utilizado para a integração das equações de movimento. Para as etapas de *ensemble* NPT, a pressão foi mantida em 1 atm, utilizando o barostato de Langevin/Nosé-Hoover. A trajetória da etapa de produção foi coletada a cada 2000 passos.

3.3 Simulação de DM do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20

A partir das estruturas do scFv equilibradas em água da triplicata S1, S2 e S3, avaliou-se a interação com a alça de CD20, cujas coordenadas cristalográficas estão depositadas juntamente com o fragmento F_{ab} de Rituximab no PDB, código 2OSL.

As estruturas finais de scFv de S1, S2 e S3 foram sobrepostas com a estrutura cristalográfica dos domínios V_H e V_L para o melhor posicionamento com a alça de CD20, respeitando a conformação do sítio de interação e das regiões de CDR (descritas na Figura 5). Os sistemas em solução aquosa foram constituídos por uma caixa cúbica de dimensões 110x100x80 Å. Foram adicionadas moléculas de água do modelo TIP3P e cinco íons Cl⁻ para eletroneutralização do sistema. Os átomos de hidrogênio foram adicionados e assim obteve-se três sistemas do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 para submissão à simulação de DM. Ao final da preparação, os sistemas continham 83506 átomos cada.

CDRs Rituximab	# Resíduo	Sequência
H1	27,28,29,30,31,32,33,34,35	YTFTSYNMH
H2	47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60	WIGAIYPGNGDTSY
H3	98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110	RSTYYGGDWYFNV
L1	163, 164, 165, 166, 167, 168, 169	SSVSYIH
L2	181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191	PWIYATSNLAS
L3	224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231	QQWTSNPP

Figura 5 - Quadro de definição das CDRs do Rituximab em função da sequência de resíduos das cadeias V_H (H1, H2 e H3) e V_L (L1, L2 e L3)

O seguinte protocolo foi utilizado para termalizar e preparar os três sistemas para a fase de produção das simulações de DM: 5000 passos de minimização de energia para otimização da geometria do complexo scFv-alça e seus contatos, utilizando CG; seguindo-se de 500 ps NVT, mantendo scFv e alça de CD20 fixos; 600 ps NPT com imposição de restrição de posição de 3 kcal.mol⁻¹.Å⁻² do scFv e da alça de CD20, sendo a força de imposição gradualmente reduzida em 0,5 kcal mol⁻¹.Å⁻² a cada 100 ps até sua anulação; e finalmente 2 ns NPT com o sistema livre de restrições de posição. A etapa de aquisição da trajetória seguiu por 100 ns em *ensemble* NPT. Os parâmetros utilizados foram os mesmos da simulação do scFv em água.

3.4 Análises estruturais

As estruturas coletadas das simulações foram monitoradas para definir o momento de alcance do equilíbrio estrutural em solução aquosa. O Desvio Quadrático Médio (DQMD ou RMSD – *Root Mean Square Deviation*) dos átomos de carbono- α (C α), após sobreposição par a par dos mesmos e tendo como referências as estruturas inicial e final de cada simulação de DM, foi calculado segundo a Equação 23:

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (23)$$

Onde M é o somatório das massas dos átomos de C α de i até N ; e $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t . O *linker* foi desconsiderado para os cálculos de RMSD, pois flutuações consideráveis já são esperadas devido à sua característica flexível. A influência da oscilação na estrutura de cada domínio (V_H e V_L) foi avaliada por cálculos de RMSD após a sobreposição individual desses domínios. Dessa forma, é possível estabelecer se as flutuações estruturais do scFv são decorrentes de flutuações em um dos domínios ou se há orientação estrutural entre eles. Para este último caso, foi avaliado o desvio de V_H tendo como sobreposição o domínio V_L , e vice-versa, ou seja, a sobreposição de um domínio e o cálculo do desvio do outro, para estimar se há movimentação de um em relação ao outro.

O raio de giro (R_g) foi calculado pelo programa *gmx gyrate* do pacote GROMACS 5.1.3 (34) para medir possíveis alterações estruturais na modelagem do

scFv, visto que o mesmo é derivado da estrutura cristalográfica do fragmento F_{ab} , com adição de um *linker* flexível. Foram calculados os R_g de scFv e dos domínios separadamente. A curva de R_g estável revela o alto grau de compacidade proteica, reflexo do enovelamento estável da proteína.

Análise de cluster (62), calculada pelo programa *gmx cluster* do pacote GROMACS, foi realizada com o objetivo de avaliar a homogeneidade de estruturas visitadas na DM e qual delas melhor representa as estruturas de cada um dos três sistemas do scFv de Rituximab em água, agrupando estruturas similares em até 1,94 Å de RMSD.

Os potenciais eletrostáticos e de Lennard-Jones foram monitorados visando o momento de alcance da estabilidade estrutural do complexo scFv-alça, através do somatório destes potenciais de interação intermolecular (PII). O PII ao longo do tempo de simulação foi avaliado pelo programa *gmx energy* do pacote GROMACS. Os contatos polares entre scFv e alça foram determinados pelo programa PyMOL 1.7 (63).

3.5 Cálculo do ΔG de ligação

Após as análises estruturais, o sistema S3 foi descartado, pois houve perda de interação da alça de CD20 pelo scFv. Dois outros sistemas foram montados para esta etapa de cálculo do ΔG de ligação do complexo scFv-alça, além de S1 e S2. Um dos dois sistemas, denominado de Cristal, consiste em um modelo do complexo scFv-alça a partir das coordenadas cristalográficas de 2OSL do PDB, não submetido às etapas de 100 ns de DM de S1 e S2, somente à fase de termalização. O segundo sistema é o duplo mutante D57E/Y102K, modelado a partir da estrutura final da DM de 100 ns do complexo scFv-alça de S1 com as duas mutações nas regiões de CDR do domínio V_H do scFv. O sistema Cristal foi incluído para determinar se a hidratação da proteína com equilíbrio da estrutura em água influencia no cálculo de ABF em relação à estrutura cristalográfica não equilibrada e, conseqüentemente, nos valores encontrados para o ΔG de ligação. O sistema do duplo mutante D57E/Y102K foi incluído para comparação dos resultados obtidos por ABF com o resultado experimental deste mutante relatado por Li *et al.* (2009) (51), a fim de validar o método de ABF de estimativa do ΔG de ligação para o complexo em estudo.

A coordenada de reação ξ escolhida foi a distância entre os centros de massa do scFv e da alça de CD20, sendo um tipo de variável coletiva indicada para o método ABF aplicado a complexos anticorpo-ligante (Figura 6). Sendo assim, o primeiro passo foi calcular essa distância para as estruturas finais dos sistemas Cristal, S1, S2 e duplo mutante D57E/Y102K, sendo considerada a distância do “estado ligado”. Posteriormente, a alça de CD20 de cada sistema foi transladada ao longo do eixo X, através do programa *gmx editconf* do pacote GROMACS, até que estivesse distante o suficiente do scFv para que os potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb (potenciais de átomos não ligados) fossem equivalentes a zero, sendo anotada a distância entre os centros de massa para o estado “não ligado”. Dessa forma, a coordenada de reação de cada sistema foi delimitada.

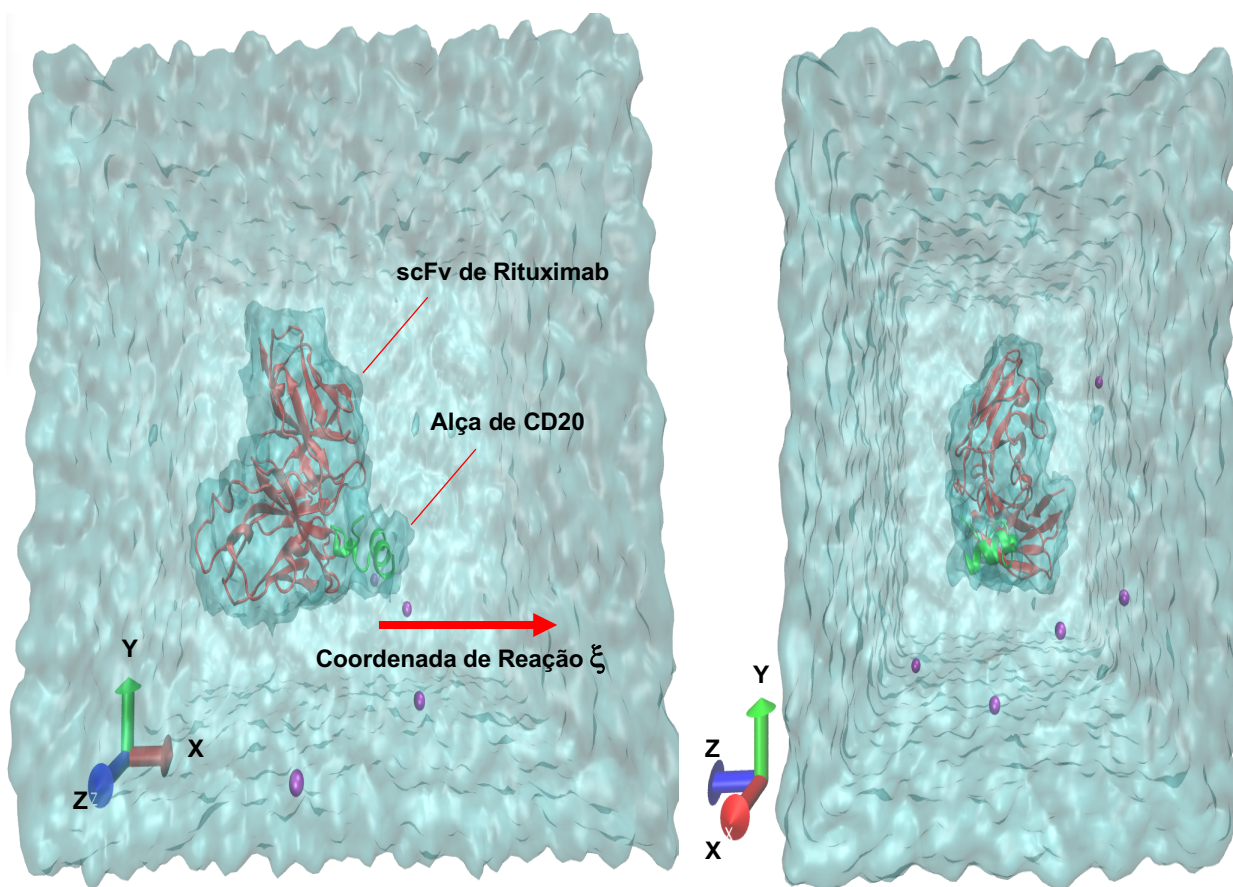


Figura 6 - Representação esquemática do sistema do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 em solução aquosa, destacando a coordenada de reação ξ definida ao longo do eixo X

scFv de Rituximab (em vermelho) e alça de CD20 (em verde) representados em *cartoon*; íons Cl⁻ (em roxo) representados por esferas; moléculas de água (em ciano) representadas em *quicksurf*; e coordenada de reação ξ definida ao longo do eixo X (sentido de afastamento da alça de CD20 representado pela seta vermelha). Fonte: elaborada pelo autor.

Para partir da distância do estado “ligado” até a distância do estado “não ligado” desejada, o método ABF aplica uma força, obtida por simulação de DM, sobre a alça de CD20 em direção a coordenada de reação para permitir tal afastamento ao longo do eixo X, mantendo-se a posição do scFv de Rituximab fixa. O valor médio da força aplicada é calculado para cada ponto da trajetória, e a integração desses valores, segundo a Equação 16 (seção 1.5.1), fornece o valor de ΔG de ligação, sendo utilizado o valor de $0,001987 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ para a constante de Boltzmann (k_B) e temperatura de 310 K.

Com a coordenada de reação definida, o primeiro passo foi simular cada sistema por 5 ns para obter as configurações iniciais de cada janela de simulação de ABF, sendo os valores de força média computados a cada 1 Å (amplitude). As janelas foram definidas tomando a coordenada de reação e delimitando-a a cada 2 Å, como mostrado na Tabela 2. A partir dessas configurações, cada janela foi simulada de 5 em 5 ns, amplitude refinada para 0,1 Å, até que a curva de energia livre de ligação convergisse, ou seja, quando a curva obtida de uma janela de tempo de simulação segue o mesmo perfil da curva da janela imediatamente anterior, diz-se que o sistema convergiu quanto aos valores de energia ao longo da coordenada de reação e não é necessário prosseguir para mais uma janela de simulação de 5ns. Todas as janelas com constante de força padrão de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ como potencial de fronteira, ou seja, uma força constante aplicada para evitar que as conformações visitadas durante a simulação apresentem valores de variável coletiva distintos da janela considerada, fora dos seus limites. O refinamento e consequente melhora da amostragem foi obtido reduzindo o tamanho da janela de simulação quanto à coordenada de reação (Tabela 2).

Quanto ao sistema duplo mutante D57E/Y102K, foi utilizada uma abordagem diferente para atingir a convergência dos perfis das curvas de energia de ligação, uma vez que algumas regiões da coordenada de reação ξ retornavam valores nulos ou baixos de amostragem. Um número de amostras insuficientes influencia diretamente na convergência das curvas, pois os valores obtidos de força média não são factíveis

para estimar a energia de ligação ao longo de ξ e, conseqüentemente, a convergência não é obtida. Mesmo após a etapa de refinamento das janelas de 21,5-22,5 Å, 23,5-24,5 Å, 25,4-26,4 Å, 26,4-27,4 Å, 27,4-28,4 Å e 29,3-30,3 Å, ainda assim a melhora na amostragem foi insuficiente para obtenção de perfis similares de curvas de energia de ligação. Ao reduzir o tamanho das janelas submetidas ao refinamento de 1 Å para 0,5 Å cada, a melhora também não foi significativa para atingir a convergência. Ao observar o arquivo de saída das trajetórias ao longo do tempo de simulação e estimando as distâncias entre os centros de massa de scFv e alça, percebeu-se que as conformações visitadas apresentavam valores desta variável coletiva distintos da janela em questão, fora dos seus limites. Assim, a constante de força padrão de 10 kcal.mol⁻¹.Å⁻² como potencial de fronteira, a barreira energética para evitar conformações visitadas fora dos limites da janela, era insuficiente para este sistema. Então, a constante de força utilizada para este sistema foi de 20 kcal.mol⁻¹.Å⁻².

A Tabela 2 resume e delimita todas as simulações realizadas até o tempo de convergência, evidenciando todas as janelas e refinamentos necessários para estimativa factível do ΔG de ligação do complexo scFv-alça.

Tabela 2 - Resumo das coordenadas de reação delimitadas, tempos de simulação de convergência, janelas e refinamentos necessários para cada sistema submetido

	Cristal	S1	S2	D57E/Y102K
Coordenada de Reação (Å)	23 a 43	21 a 41	23 a 41	21 a 41
Tempo de Simulação (ns)	0-25	0-25	0-15	0-30
Janelas (Å)	23-25	21-23	23-25	21-23
	25-27	23-25	25-27	23-25
	27-29	25-27	27-29	25-27
	29-31	27-29	29-31	27-29
	31-33	29-31	31-33	29-31
	33-35	31-33	33-35	31-33
	35-37	33-35	35-37	33-35
	37-39	35-37	37-39	35-37
	39-41	37-39	39-41	37-39
	41-43	39-41		39-41
	25-26	21,8-22,8	27-28	21,5-22,5
	27-28	25,8-26,8		23,5-24

Refinamentos (Å)	28-29	26,8-27,8		24-24,5
				26,4-26,9
				26,9-27,4
				27,4-28,1
				29,3-30,3

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estrutura do scFv de Rituximab construído

A estrutura do scFv de Rituximab, construída pela modelagem do *linker* (GGGGS)₃ e sua conexão com C-terminal do domínio V_H e N-terminal do domínio V_L do fragmento Fab de Rituximab (PDB: 2OSL), está representada na Figura 7.

O scFv de Rituximab submetido ao servidor H++ apresenta o estado das histidinas HIS35 e HIS169 alterado para o tipo HSE.

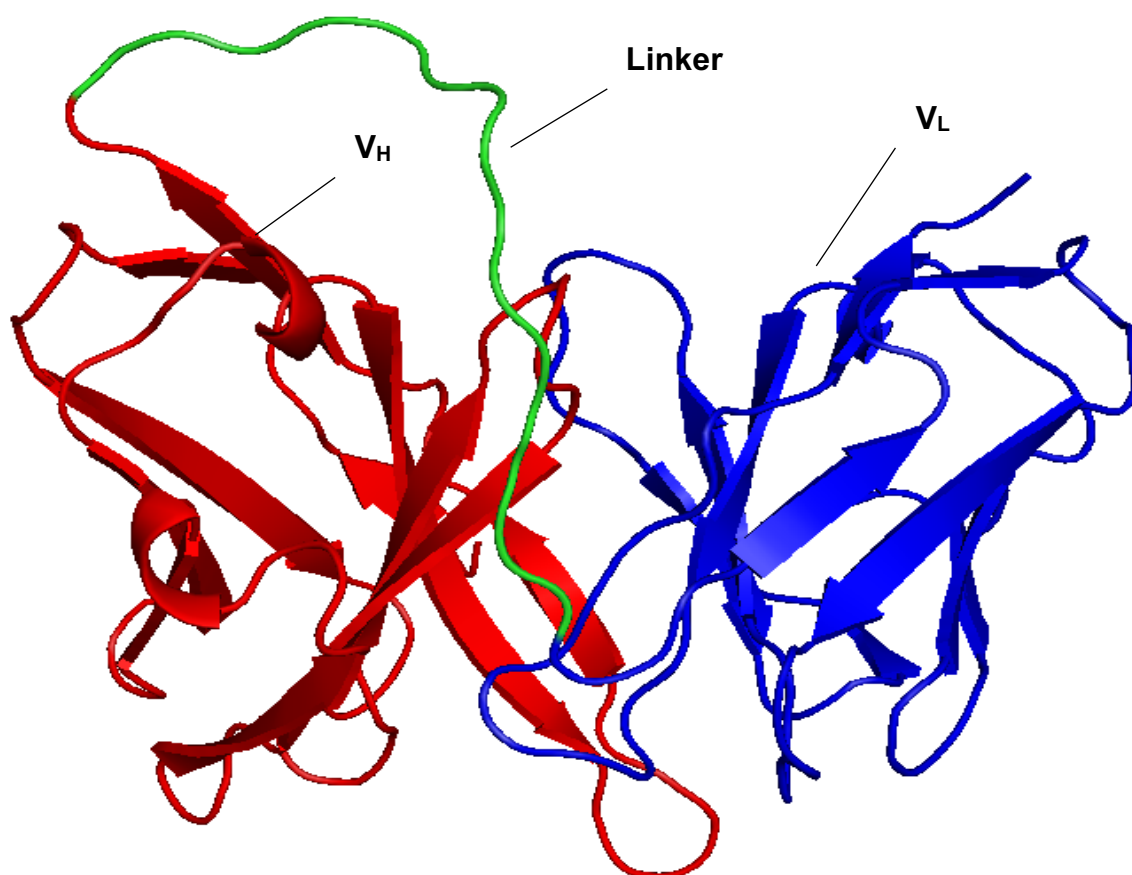


Figura 7 – Representação esquemática em *cartoon* do modelo de scFv construído a partir das coordenadas cristalográficas dos domínios V_H (em vermelho) e V_L (em azul) do fragmento Fab de Rituximab (PDB: 2OSL) com adição do linker (GGGGS)₃ (em verde)

4.2 Estruturas de equilíbrio do scFv em solução aquosa

As variações estruturais dos scFv foram avaliadas ao longo das três simulações (S1, S2 e S3) de 200 ns. Em cada simulação são geradas curvas de RMSD entre as estruturas coletadas durante a trajetória em comparação com a inicial, considerando sempre a máxima sobreposição entre os átomos de $C\alpha$. As curvas indicam o alcance do equilíbrio estrutural em ~ 100 ns para as três (Figura 8), com RMSD médio de 1,94 Å (Figura 9).

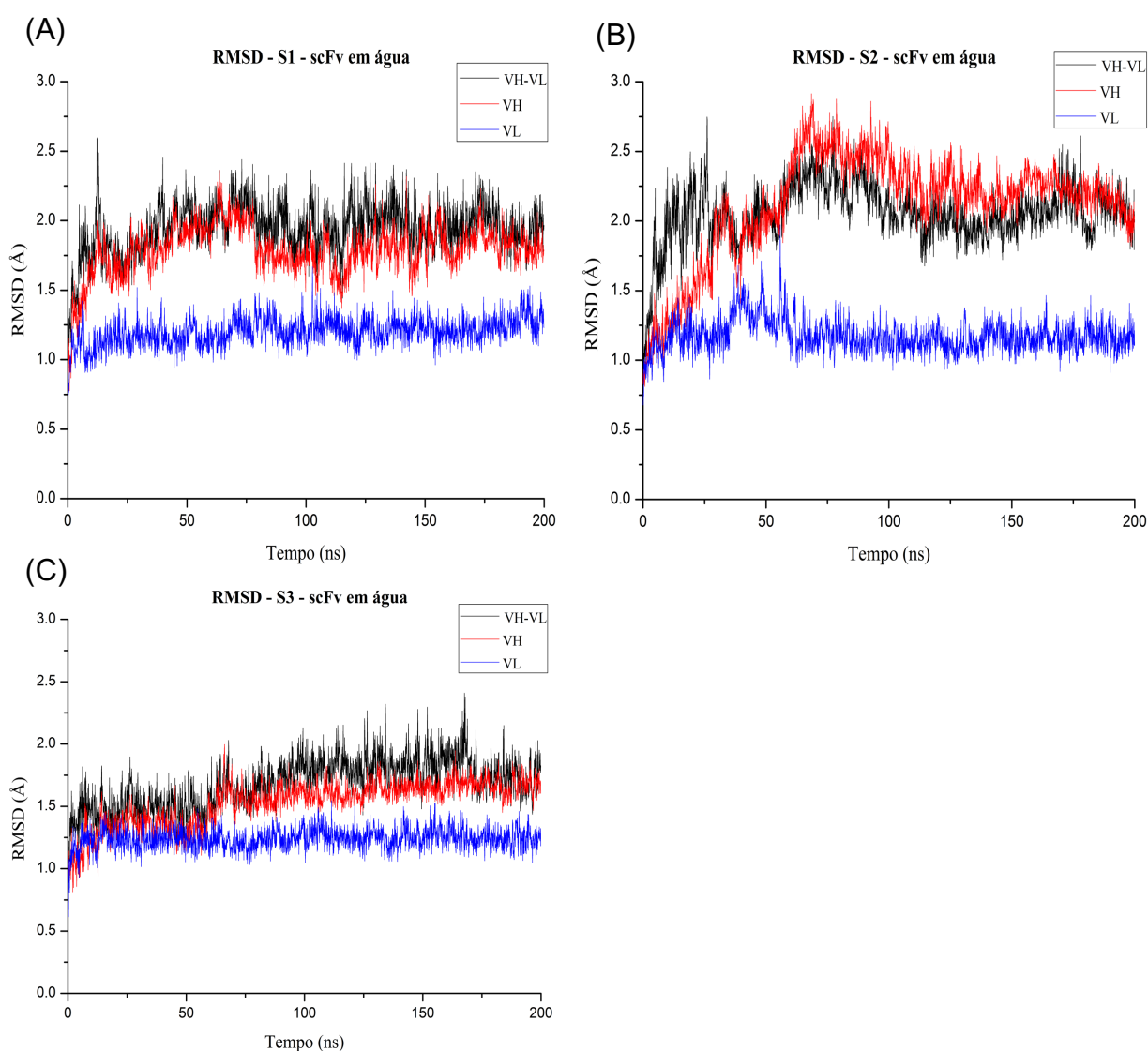


Figura 8 - Curvas de RMSD das estruturas tridimensionais de scFv referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa

Sobreposição e cálculo de RMSD dos $C\alpha$ de V_H+V_L em preto; de V_H em vermelho; e de V_L em azul.

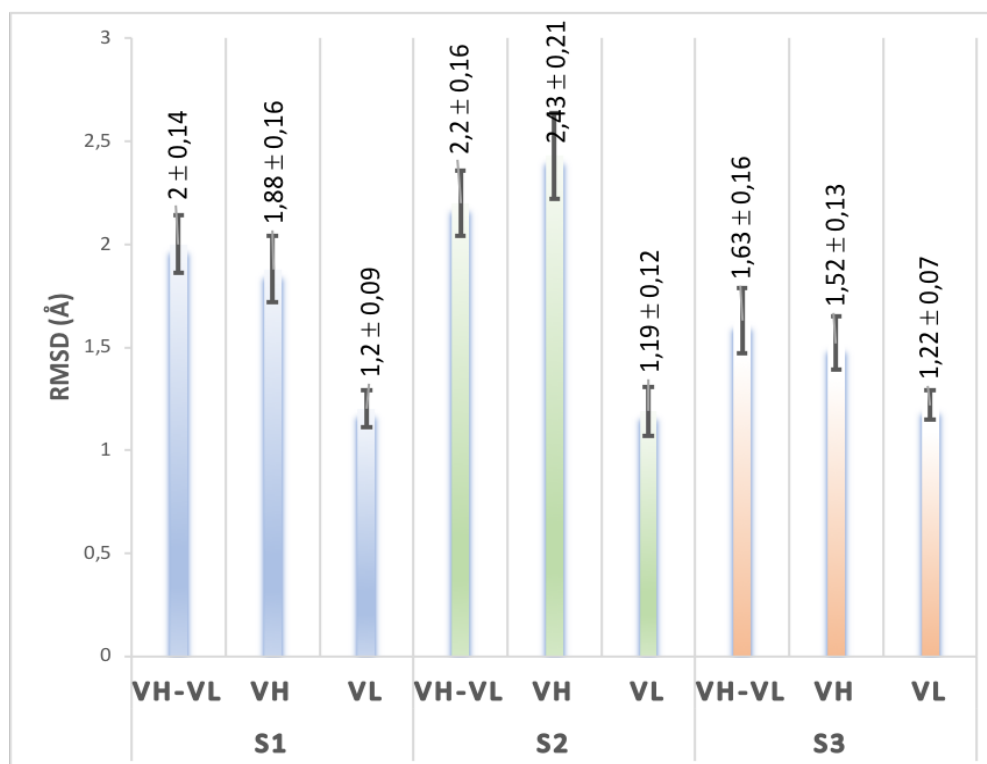


Figura 9 - Gráfico de média e desvio de RMSD para o scFv (VH+VL) e para cada domínio separadamente de S1 (azul), S2 (verde) e S3 (laranja), calculados após o equilíbrio em 100 ns de simulação

As curvas de RMSD na Figura 8 e os resultados na Figura 9 mostram que o RMSD médio das estruturas de equilíbrio do scFv (V_H+V_L) e de V_H são próximos entre si e superiores aos de V_L para as três simulações, indicando que a diferenciação na estrutura inicial do scFv é decorrente de uma modificação de V_H. O RMSD da estrutura do domínio V_L permanece em torno de 1,21 Å ao longo do tempo de simulação para S1, S2 e S3, o que está dentro do esperado para movimentação de proteína sob efeito térmico da água, como discutido por Kufareva e Abagyan (2012) (64). O *linker* não foi considerado para o cálculo do RMSD, pois já se espera evidente movimentação inicial devido à composição rica em resíduos de glicina e serina, conferindo-lhe grande liberdade conformacional.

Na Figura 10, as curvas de RMSD de V_H tendo como sobreposição o domínio V_L e de V_L tendo como sobreposição o domínio V_H apresentam perfis semelhantes, evidenciando que não há orientação entre os domínios, ou seja, não há movimentação de um em relação ao outro.

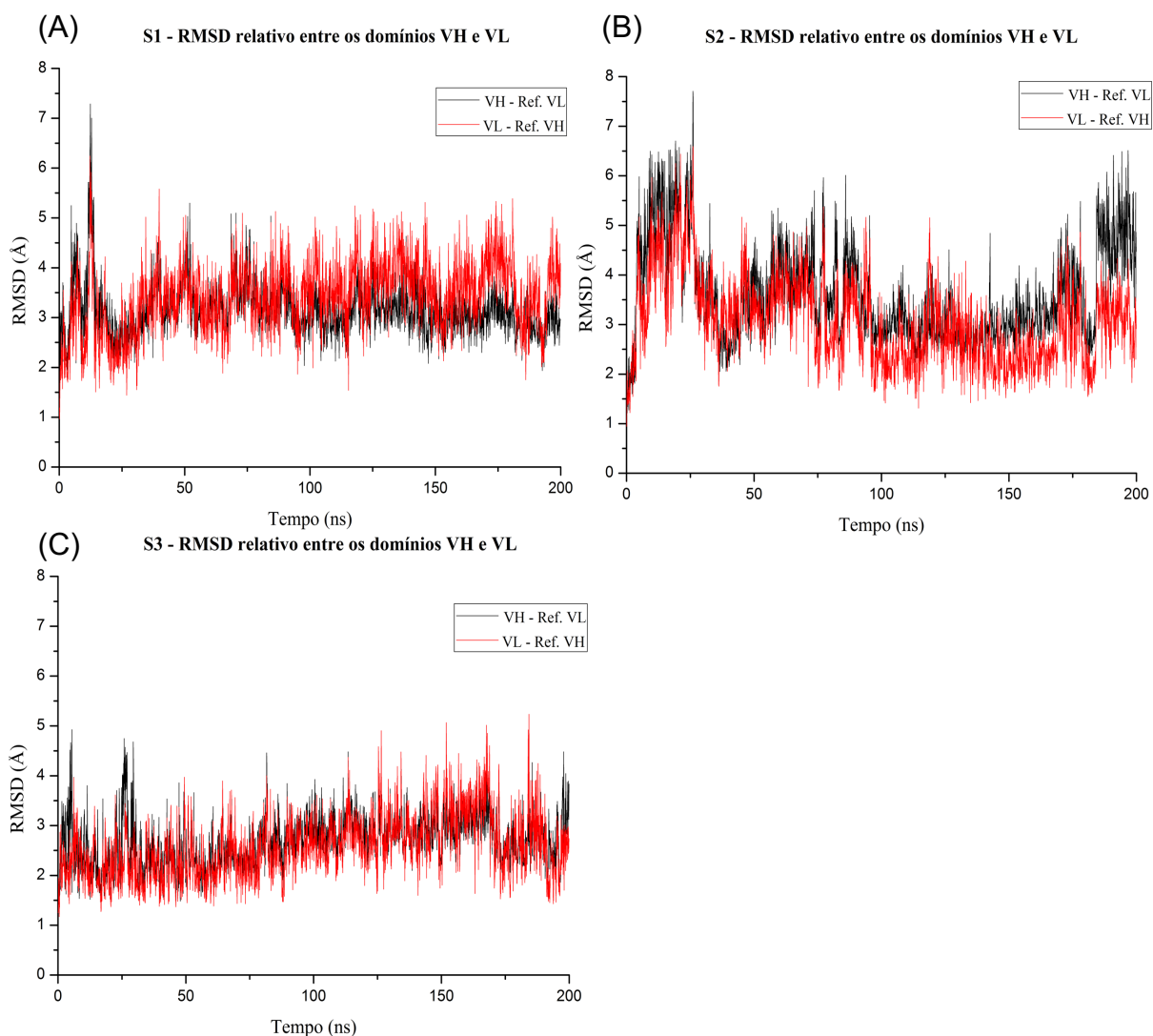


Figura 10 - Curvas de RMSD relativo entre as estruturas tridimensionais dos domínios V_H e V_L referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa

Sobreposição dos $C\alpha$ de V_L e cálculo de RMSD dos $C\alpha$ de V_H em preto; e sobreposição dos $C\alpha$ de V_H e cálculo de RMSD dos $C\alpha$ de V_L em vermelho.

Na Figura 11, os resultados das análises de R_g do scFv e de cada domínio separadamente mostram que o enovelamento proteico se mantém estável para as três simulações, revelando o alto grau de compacidade proteica.

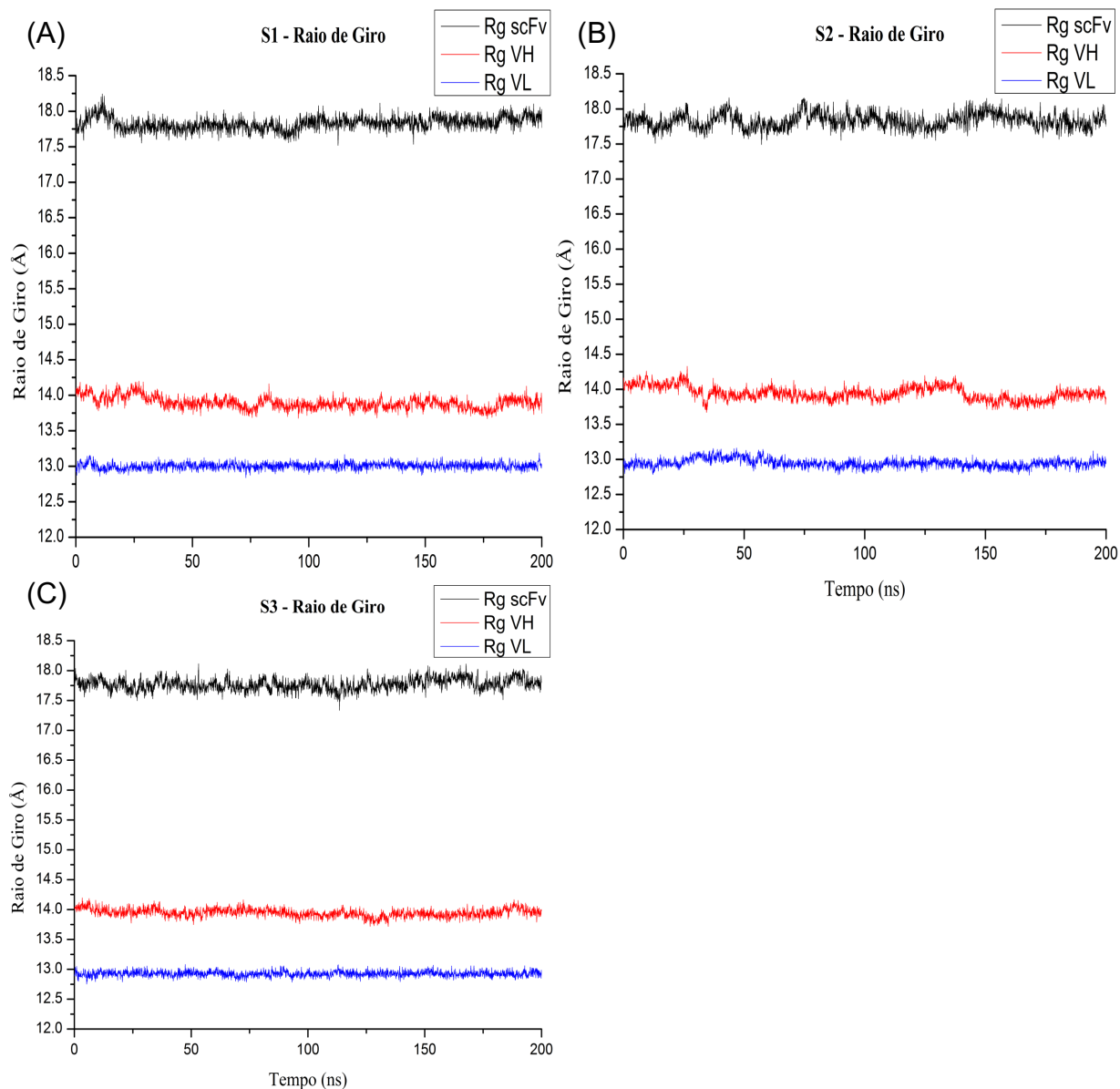


Figura 11 - Curvas de R_g do scFv e dos domínios V_H e V_L de S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa ao longo do tempo de simulação

R_g total do scFv de Rituximab em preto, do domínio V_H em vermelho e do domínio V_L em azul ao longo do tempo de simulação.

Os dados de clusterização descritos na Figura 12 mostram que ocorrem 2 grupos de estruturas em S1, três grupos em S2 e um grupo em S3 após 200 ns, sendo o grupo de estruturas do #Cluster 1 o mais representativo nas três simulações, preponderante por pelo menos 150 ns em cada. A Figura 13 representa a sobreposição dos scFv's deste grupo das três simulações para estimar o RMSD entre eles. O RMSD de S1 em relação a S2 é de 1 Å, de S1 em relação a S3 é de 0,62 Å e de S2 em relação a S3 é de 0,58 Å, indicando que os scFv's são estruturalmente

próximos. Como o *linker* não foi considerado para o cálculo do RMSD, as diferenças estruturais se devem principalmente a CDR H3, indicada na Figura 13.

Assim, a estrutura de scFv correspondente ao grupo de estruturas do #Cluster 1 de cada simulação foi utilizada para a próxima etapa de simulação de DM do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20.

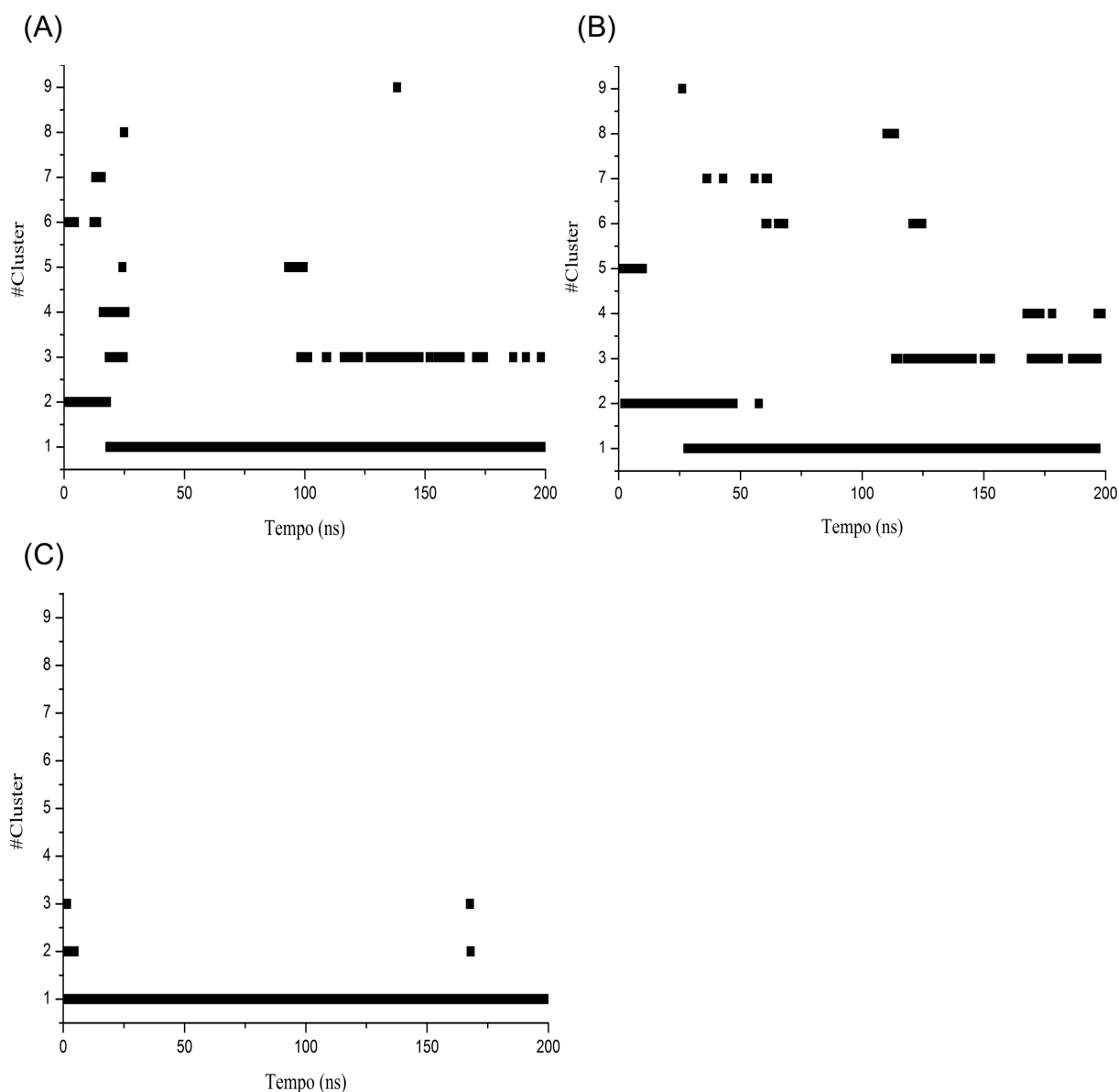


Figura 12 - Análises de clusterização das simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) para identificação da estrutura de scFv de Rituximab que melhor representa cada simulação



Figura 13 - Representação esquemática em *cartoon* das estruturas sobrepostas de scFv do #Cluster 1 de S1 (verde), S2 (ciano) e S3 (rosa), evidenciando a diferença estrutural da CDR H3 nos três sistemas

4.3 Estruturas de equilíbrio do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 em solução aquosa

A partir das estruturas equilibradas de scFv das três simulações, o complexo scFv-alça foi construído e está representado na Figura 14.

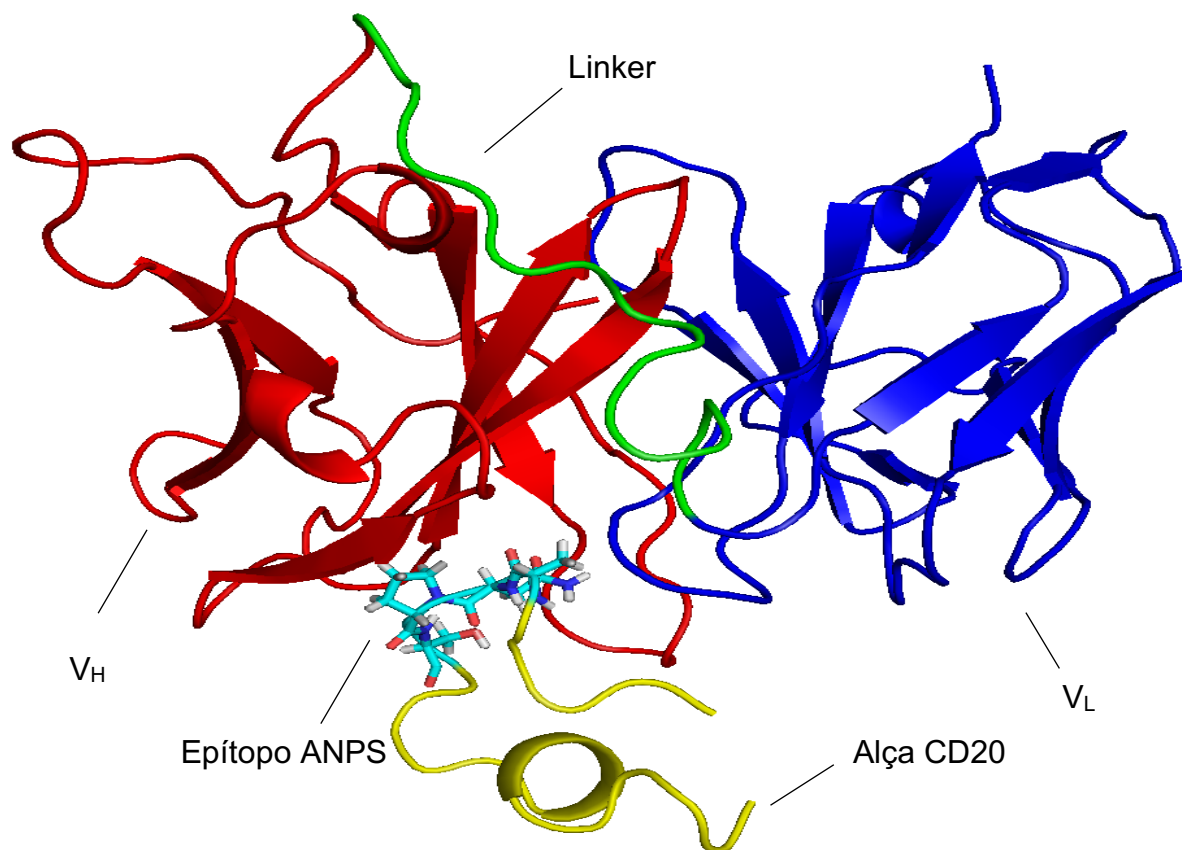


Figura 14 - Representação esquemática em *cartoon* do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 construído, destacando as porções V_H (vermelho), V_L (azul) e *linker* (verde) do scFv, além do epítipo ANPS (representado em *stick*) contido na alça de CD20 (amarelo)

As variações das estruturas tridimensionais dos complexos scFv-alça foram avaliadas ao longo das três simulações (S1, S2 e S3) de 100ns. Em cada simulação são geradas curvas de RMSD entre as estruturas coletadas durante a trajetória em comparação com a inicial, considerando sempre a máxima sobreposição entre os átomos de C α . As curvas indicam o alcance do equilíbrio estrutural em ~15 ns para S1; para S2, alcance do equilíbrio em ~30 ns; e para S3, em ~20 ns (Figura 15). O RMSD médio entre as três simulações é de 1,28 Å (Figura 16).

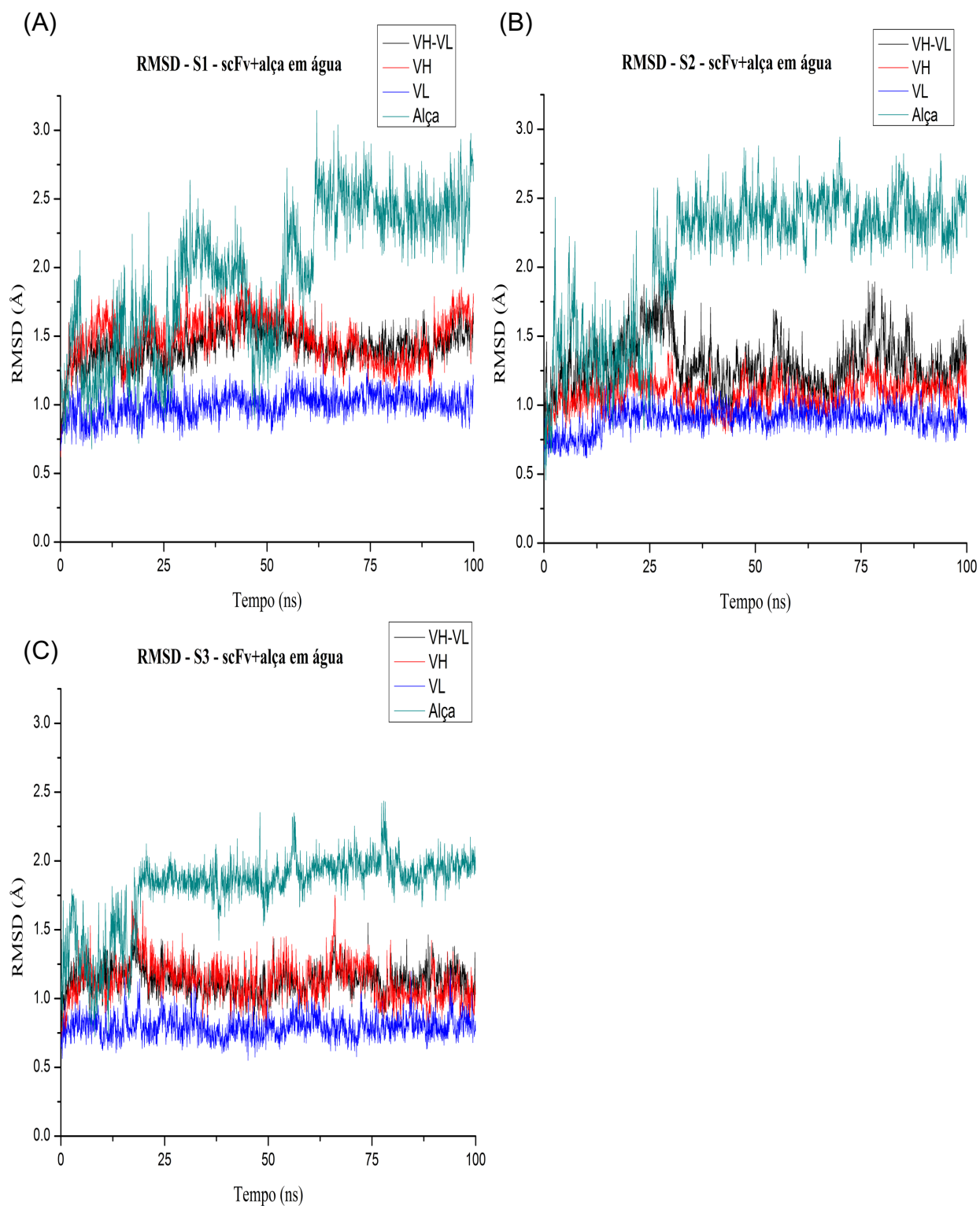


Figura 15 - Curvas de RMSD das estruturas tridimensionais do complexo scFv-alça referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa

Sobreposição e cálculo de RMSD dos C α de V_H+V_L em preto; de V_H em vermelho; de V_L em azul; e da alça de CD20 em verde.

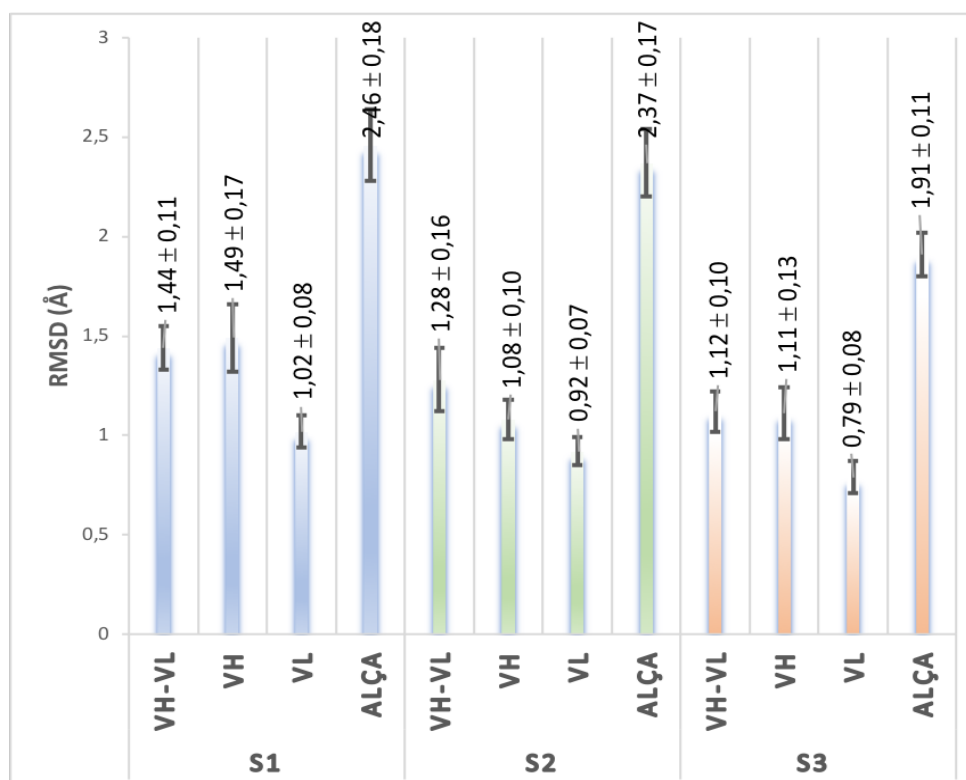


Figura 16 - Gráfico de média e desvio de RMSD para o scFv (V_H+V_L), para cada domínio separadamente e para a alça de CD20 de S1 (azul), S2 (verde) e S3 (laranja), calculados após o equilíbrio de cada simulação

Assim como para as simulações de scFv em solução aquosa, as curvas de RMSD na Figura 15 e os resultados na Figura 16 também indicam que a diferenciação na estrutura inicial do scFv foi decorrente de uma modificação de V_H , sendo o RMSD médio das estruturas de equilíbrio do scFv (V_H+V_L) e de V_H próximos entre si e superiores aos de V_L para as três simulações. O RMSD da estrutura do domínio V_L é de $1,02 \pm 0,08$ Å em S1, de $0,92 \pm 0,07$ Å em S2 e de $0,79 \pm 0,08$ Å em S3, dentro do esperado para movimentação de proteína sob efeito térmico da água. A alça apresenta RMSD de $2,46 \pm 0,18$ Å em S1, de $2,37 \pm 0,17$ Å em S2 e de $1,91 \pm 0,11$ Å em S3, sendo já esperada maior liberdade conformacional por ser um peptídeo cíclico de apenas 22 resíduos. A presença de uma ligação dissulfeto entre os resíduos CYS3 e CYS19 mantém sua estrutura cíclica e permite a interação do epítipo com as CDRs do scFv. O equilíbrio estrutural da alça é alcançado em ~ 62 ns em S1 após uma modificação conformacional, ~ 30 ns em S2 e ~ 20 ns em S3.

Através das análises de PII mostradas na Figura 17, a atratividade entre as cadeias principais de scFv e alça foram monitoradas, mostrando caráter atrativo significativo em S1 e S2, com variações de até -250 kcal.mol⁻¹. Nota-se em S1 uma

oscilação do PII até atingir o estado mais atrativo entre scFv e alça aos 60 ns e, ao final da simulação, retorna a um valor de PII próximo ao inicial, de $\sim -225 \text{ kcal.mol}^{-1}$, sugerindo a modificação conformacional da alça mostrada pela análise de RMSD (Figura 15-A). Em S2, o estado mais atrativo é atingido em $\sim 20 \text{ ns}$, sendo mantido até o fim da simulação mesmo com algumas oscilações significativas, e valor médio de PII de $\sim -250 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Por outro lado, observou-se em S3 a perda da interação da alça pelo scFv, apresentando valor de PII próximo de zero ao final da simulação. Por esse motivo, a simulação S3 foi descartada para as próximas etapas.

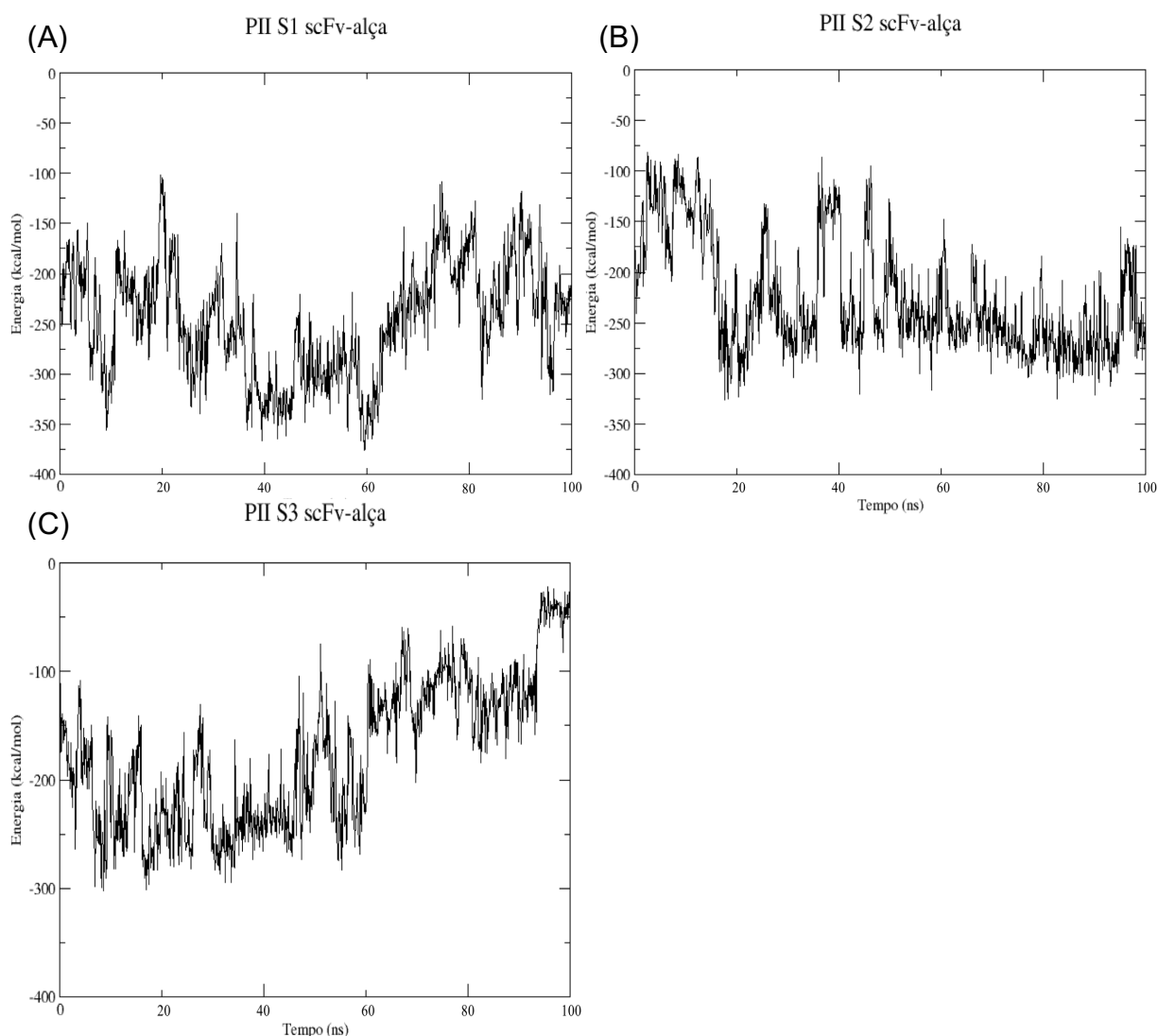
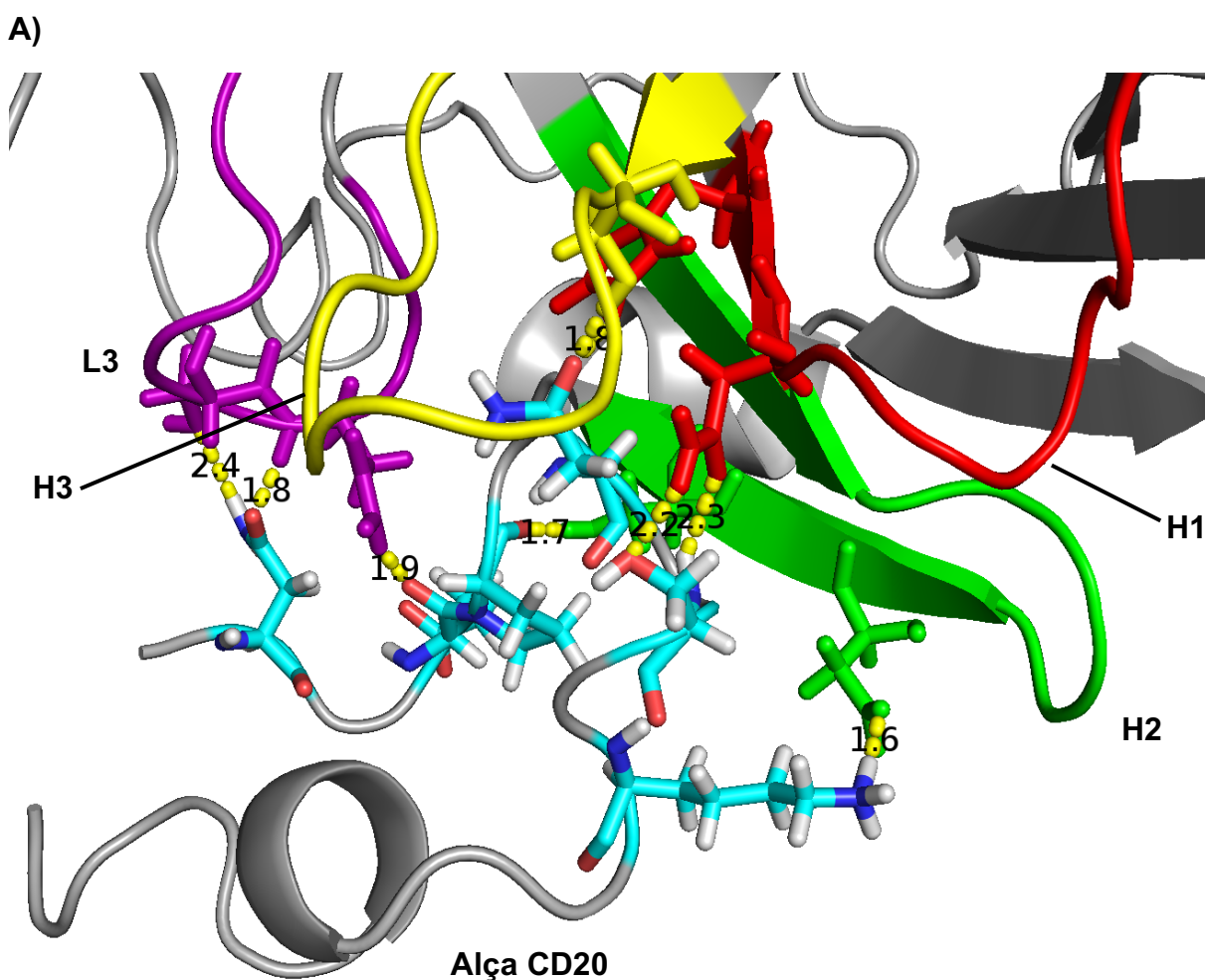


Figura 17 - Potencial de Interação Intermolecular (PII) entre os átomos da cadeia principal+hidrogênios do scFv de Rituximab e da alça de CD20, referentes às simulações S1 (A), S2 (B) e S3 (C) em solução aquosa

A Figura 18 mostra as interações por resíduo entre a alça de CD20 e as CDRs do scFv de Rituximab para as três simulações. Para S1 e S2, os contatos polares envolvem principalmente as CDRs H1, H2, H3 e L3. Esta observação está de acordo com os resultados experimentais obtidos por Du *et al.* (2007) (11), os quais descrevem que estas CDRs são os principais locais de interação com o CD20. Os resíduos N7 e S9 do epítipo em CD20 são responsáveis por formar ligações de hidrogênio com o arcabouço que contém as CDRs de Rituximab, e o resíduo P8 é importante na manutenção da estabilidade do complexo. Enquanto que, para S3, somente dois contatos polares são observados: um com o resíduo Y102 da CDR H3 e outro com o resíduo Q82, não pertencente à CDR; o que confirma o resultado obtido por PII da perda da interação entre scFv e alça em S3, e justifica o descarte dessa simulação.



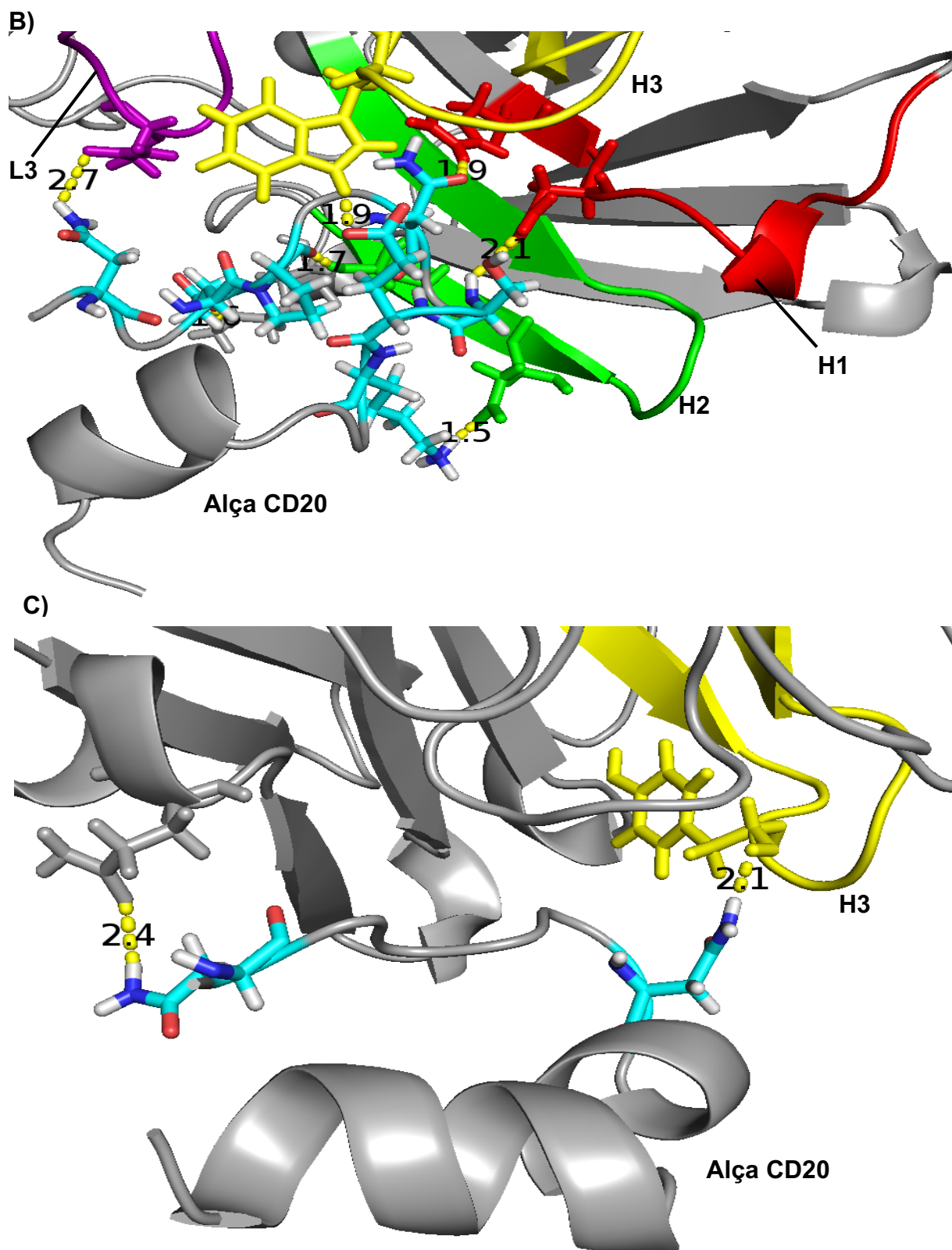


Figura 18 - Representações esquemáticas dos complexos scFv de Rituximab-alça de CD20 de S1 (A), S2 (B) e S3 (C), evidenciando os contatos polares (linhas tracejadas amarelas) entre os resíduos da alça e das CDRs do scFv envolvidas na interação (H1 em vermelho, H2 em verde, H3 em amarelo e L3 em roxo)

Distância entre átomos envolvidos nos contatos polares mostrada em Å. Fonte: elaborada pelo autor.

4.4 ΔG de ligação pelo método de ABF

Os resultados para o ΔG de ligação são apresentados na seguinte ordem dos sistemas: Cristal, S1, S2 e duplo mutante D57E/Y102K. Posteriormente, os dados coletados são comparados e discutidos entre si e com os resultados experimentais obtidos por Li *et al.* (2009) (51).

Para o sistema Cristal, as curvas de energia de ligação referentes aos tempos de simulação de 15-20 ns e de 20-25 ns apresentaram perfil similar, considerando-se assim que este sistema convergiu quanto aos valores de energia ao longo da coordenada de reação ξ , e a simulação de 20-25 ns foi então avaliada quanto à amostragem.

Na Figura 19, o resultado da amostragem indica que as janelas de coordenada de reação de 25-26 Å, de 27-28 Å e de 28-29 Å melhoraram o número de amostras após a etapa de refinamento, permitindo, assim, uma estimativa factível da distribuição da força média e consequentemente da curva de energia de ligação scFv de Rituximab-alça de CD20, mostrada na Figura 20.

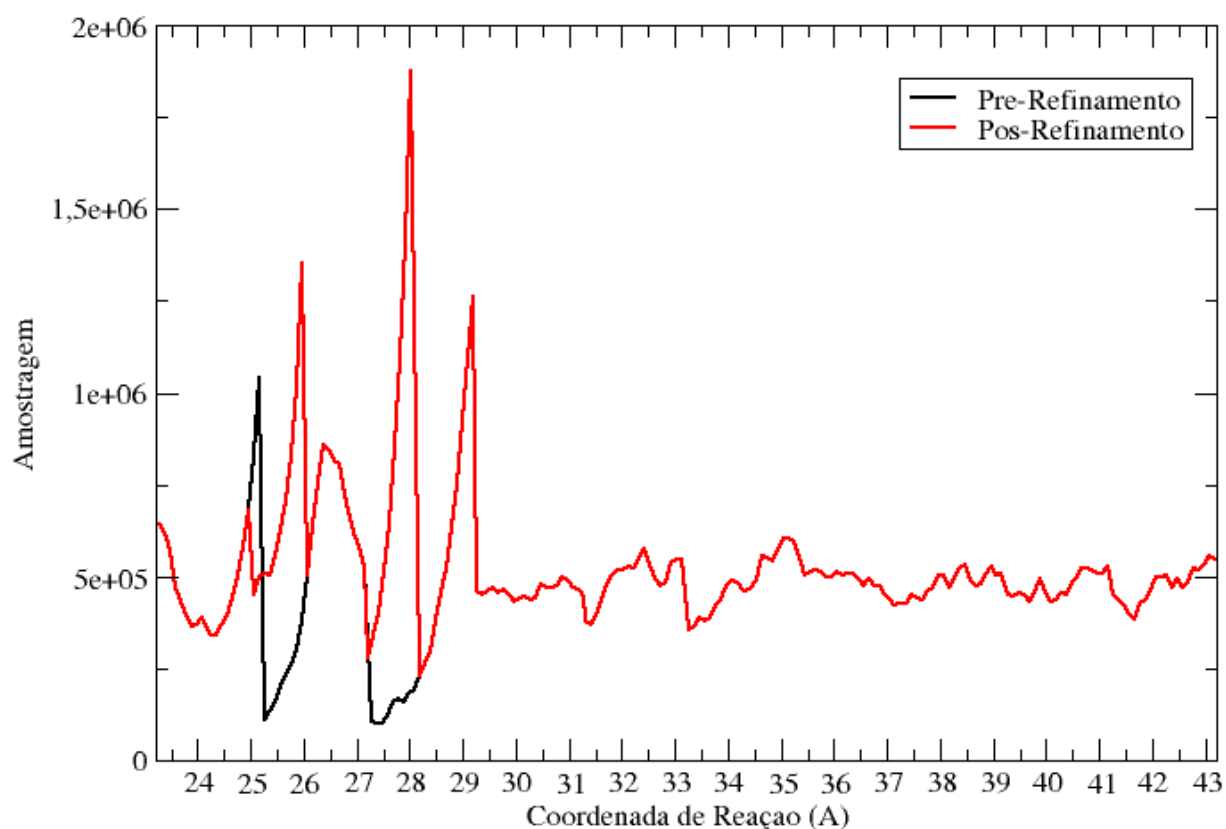


Figura 19 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema Cristal para a simulação de 20-25 ns, obtidas antes (preto) e após (vermelho) a etapa de refinamento

Após a etapa de refinamento e consequente melhora na amostragem, as curvas de energia de ligação foram avaliadas (Figura 20). Percebe-se pontos de inflexão na curva de 20-25 ns para as coordenadas de reação de ~ 27 Å e de ~ 29 Å, como indicado na Figura 20. Tais pontos representam barreiras energéticas relacionadas a forças de interação intermoleculares entre o scFv e a alça que precisam ser superadas para o escape de mínimos locais de energia e, assim, prosseguir o afastamento entre os centros de massa.

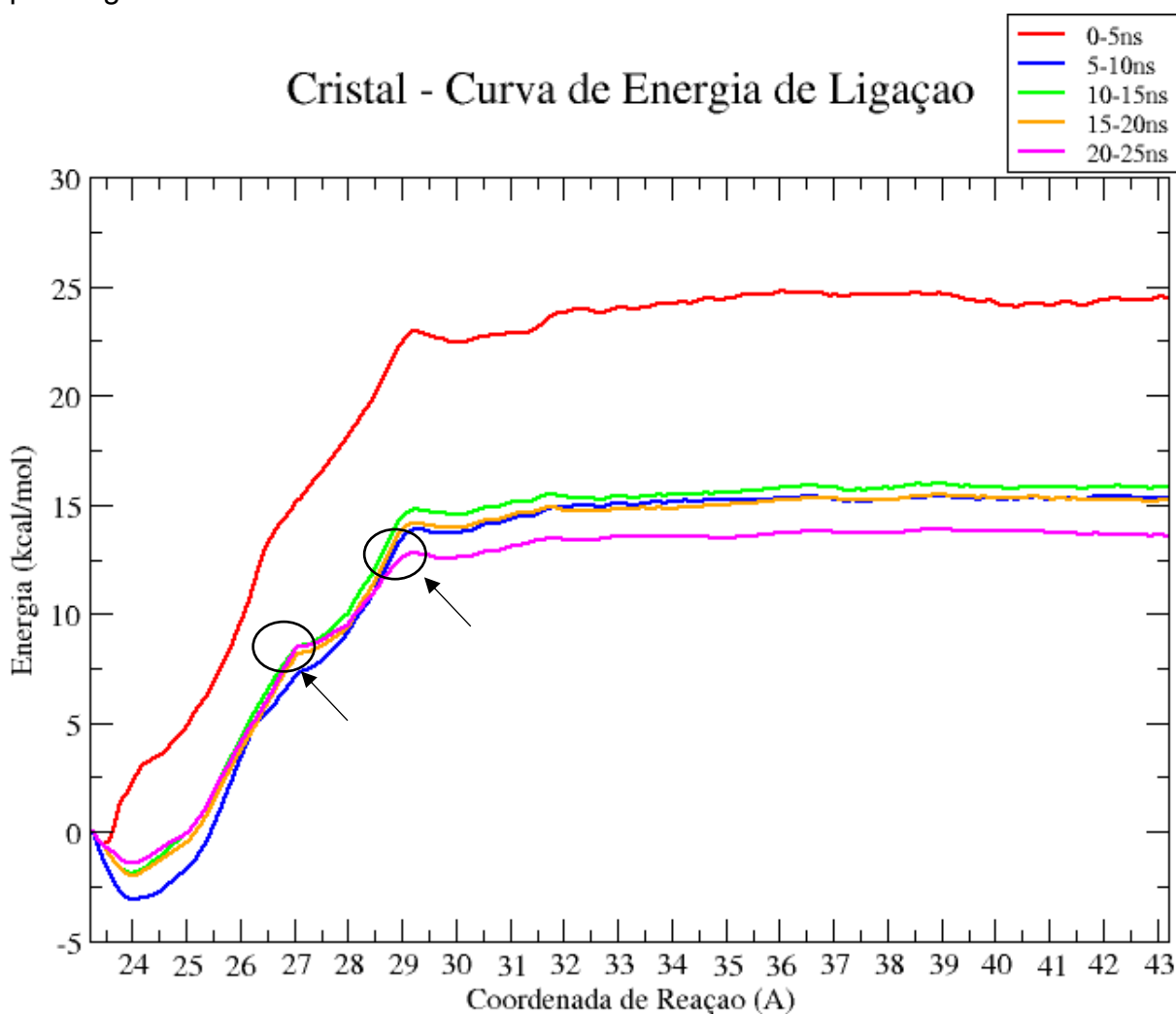


Figura 20 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema Cristal após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns

Curva 0-5 ns (vermelho); 5-10 ns (azul); 10-15 ns (verde); 15-20 ns (laranja) e 20-25 ns (rosa). Pontos de inflexão em ~ 27 Å e em ~ 29 Å destacados e apontados em preto.

Para ilustrar a discussão sobre os pontos de inflexão, tomou-se as coordenadas da configuração referente ao ponto de 27 Å da coordenada de reação.

Os contatos polares entre scFv e alça estão representados na Figura 21 por linhas amarelas tracejadas. Estes contatos representam a barreira energética a ser superada para o prosseguimento do afastamento entre os centros de massa. Em alguns casos, a energia a ser superada interfere na amostragem, retornando número de amostras nulo ou baixo para o ponto da coordenada em questão e exigindo uma etapa de refinamento.

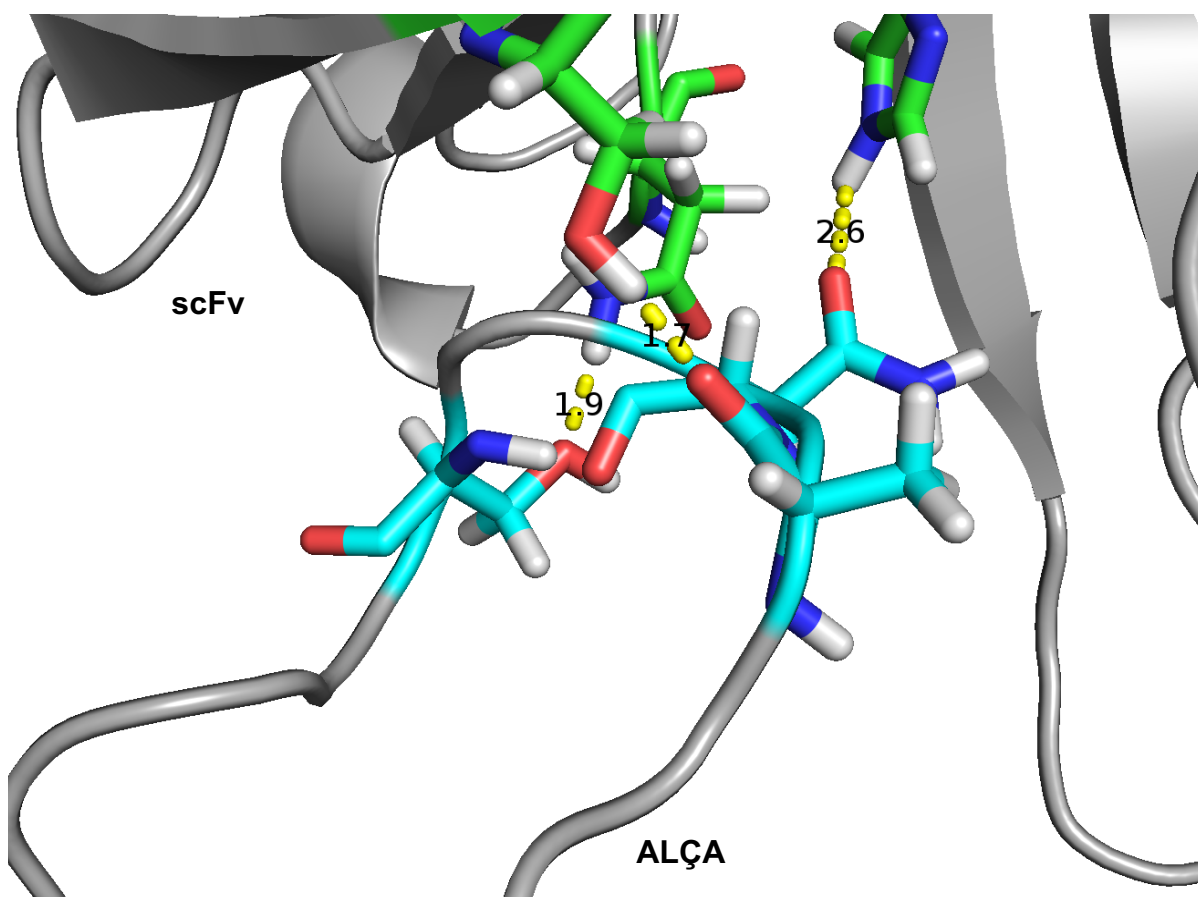


Figura 21 - Representação esquemática de contatos polares (linhas amarelas tracejadas) entre resíduos do scFv (em verde) e da alça (em ciano) do sistema Cristal para o ponto de 27 Å da coordenada de reação

Distância entre átomos envolvidos nos contatos polares mostrada em Å. Fonte: elaborada pelo autor.

Após todas essas considerações e a partir da curva de energia de ligação de 20-25 ns representada na Figura 20, o ΔG de afinidade foi calculado para o sistema Cristal como sendo a diferença entre a energia de ligação inicial (estado “ligado”, ponto mínimo da curva de 20-25 ns) de $-1,43 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e a energia de ligação final (estado “não ligado”, ponto máximo da curva no maior afastamento) de $13,59 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Portanto, o ΔG de afinidade é de $-15,02 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o sistema. Alternativamente, o ΔG de dissociação é de $+15,02 \text{ kcal.mol}^{-1}$, pois inverte a ordem dos fatores como representado pela Equação 12 (seção 1.5).

Quanto ao sistema S1, as curvas de energia de ligação referentes aos tempos de simulação de 15-20 ns e de 20-25 ns apresentaram perfil similar, considerando-se assim que este sistema convergiu quanto aos valores de energia ao longo da coordenada de reação ξ .

A amostragem da simulação de 20-25 ns foi então avaliada, como mostrado na Figura 22. As janelas de coordenada de reação de 21,8-22,8 Å, de 25,8-26,8 Å e de 26,8-27,8 Å melhoraram o número de amostras após a etapa de refinamento.

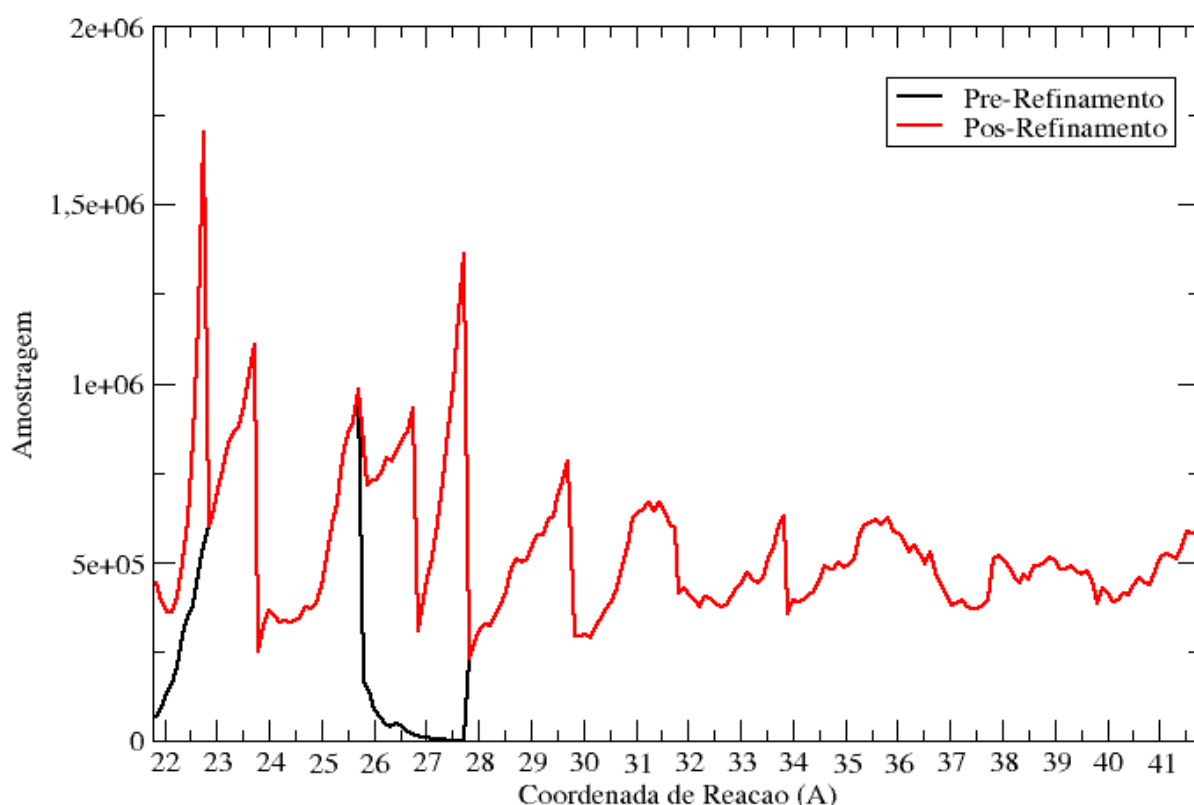


Figura 22 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema S1 para a simulação de 20-25 ns, obtidas antes (preto) e após (vermelho) a etapa de refinamento

Com a etapa de refinamento e consequente melhora na amostragem, a curva de energia de ligação foi avaliada. Percebe-se pontos de inflexão pronunciados na curva de 20-25 ns para as coordenadas de reação de $\sim 24 \text{ Å}$ e de $\sim 26 \text{ Å}$, evidenciando interações intermoleculares importantes entre scFv e alça neste sistema (Figura 23).

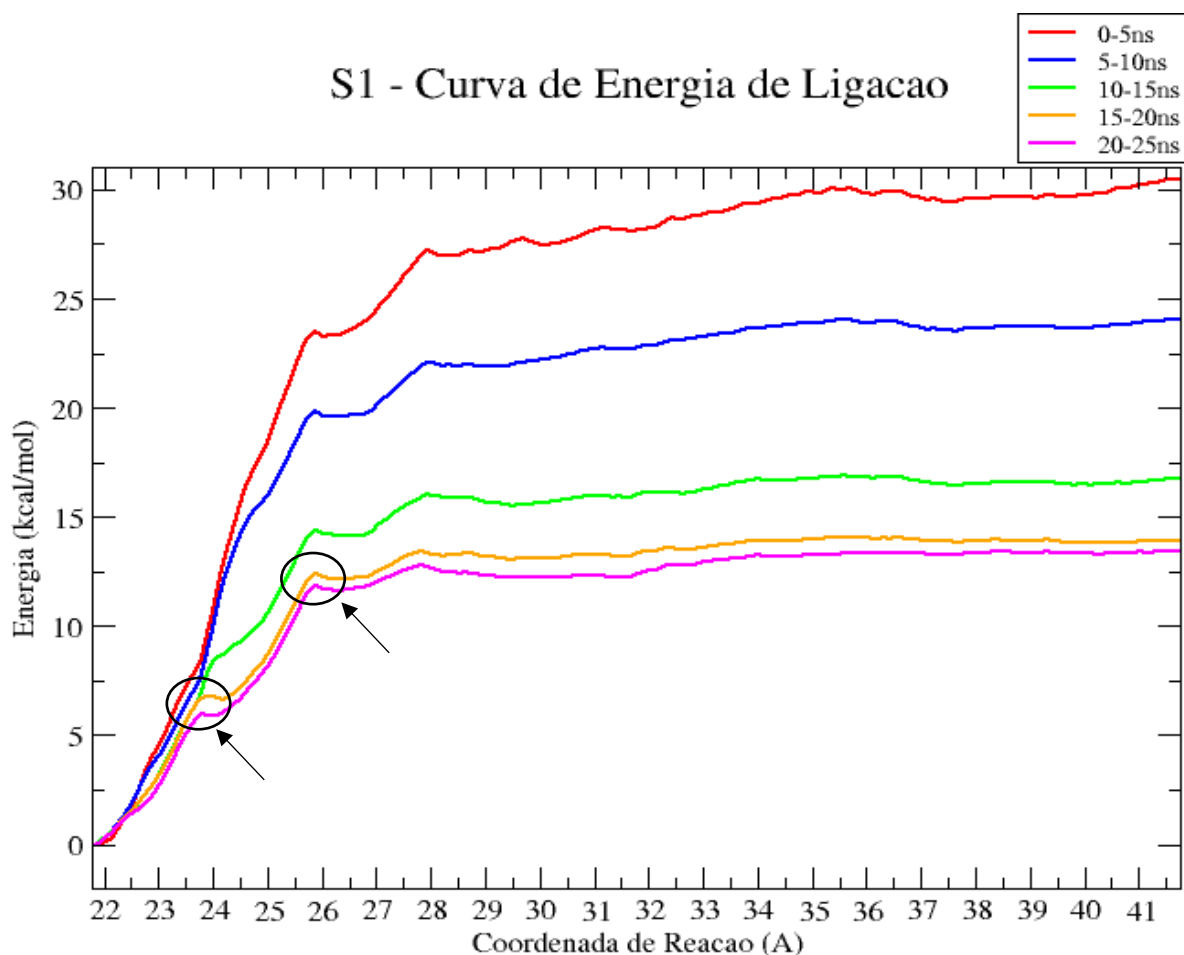


Figura 23 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema S1 após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns

Curva 0-5 ns (vermelho); 5-10 ns (azul); 10-15 ns (verde); 15-20 ns (laranja) e 20-25 ns (rosa). Pontos de inflexão em ~ 24 Å e em ~ 26 Å destacados e apontados em preto.

Após todas essas considerações e a partir da curva de energia de ligação de 20-25 ns representada na Figura 23, o ΔG de afinidade foi calculado para o sistema S1 como sendo a diferença entre a energia de ligação inicial (estado “ligado”) de 0 kcal.mol⁻¹ e a energia de ligação final (estado “não ligado”) de 13,45 kcal.mol⁻¹. Portanto, o ΔG de afinidade é de -13,45 kcal.mol⁻¹ para o sistema S1. Alternativamente, o ΔG de dissociação é +13,45 kcal.mol⁻¹.

Para o sistema S2, os perfis das três curvas de energia de ligação consideradas, tempos de simulação de 0-5 ns, 5-10 ns e 10-15 ns, foram similares,

indicando que o sistema rapidamente atinge a convergência quanto aos valores de energia ao longo da coordenada de reação ξ .

A amostragem da janela de simulação de 10-15 ns se manteve ao longo de toda a coordenada de reação e a janela de 27-28 Å melhorou o número de amostras após a etapa de refinamento (Figura 24).

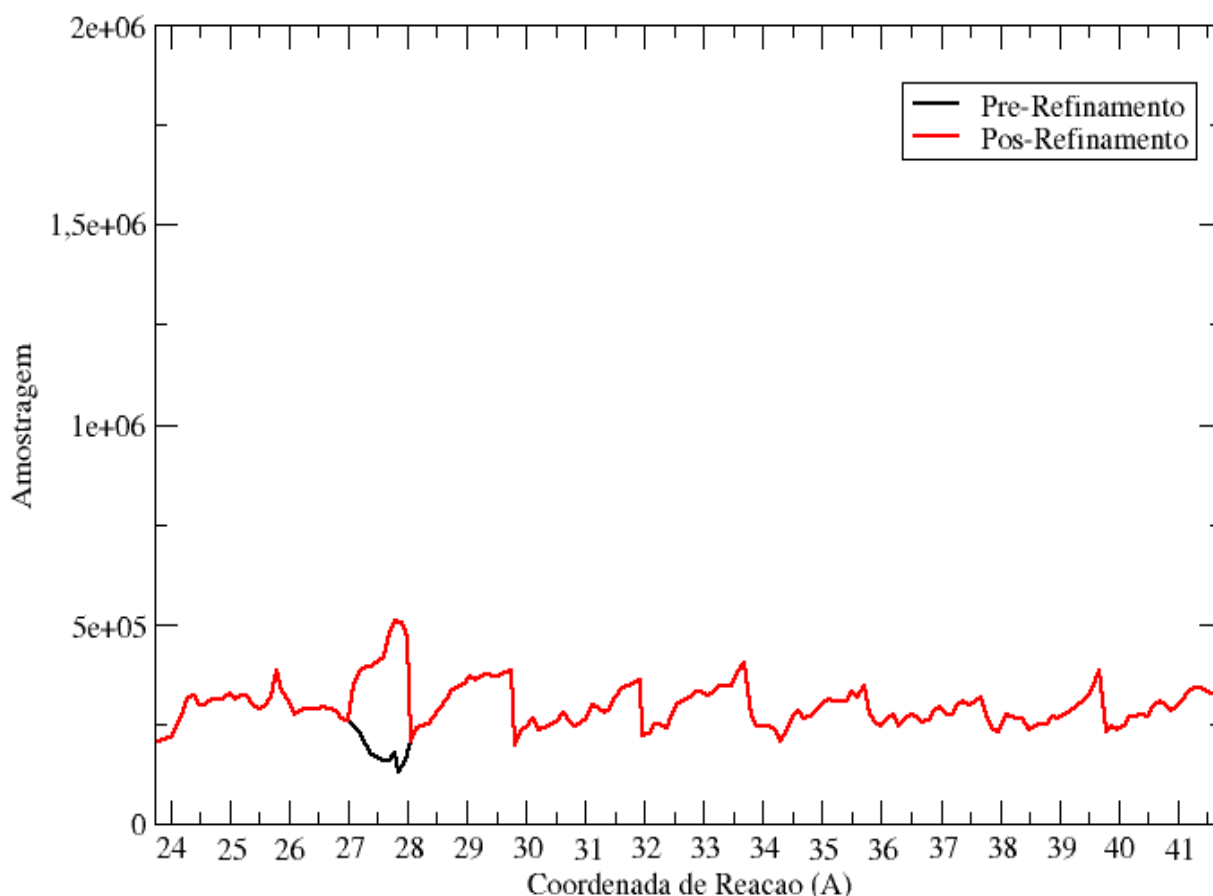


Figura 24 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema S2 para a simulação de 10-15 ns, obtidas antes (preto) e após (vermelho) a etapa de refinamento

Após a etapa de refinamento e consequente melhora na amostragem da janela refinada, a homogeneidade entre as curvas de energia de ligação se manteve, como representado na Figura 25. Os pontos de inflexão na curva de 10-15 ns são suaves, o que implica que as barreiras energéticas inerentes aos mínimos locais de energia foram facilmente transponíveis desde a janela de simulação de 0-5 ns, evidenciando fracas interações intermoleculares entre scFv e alça neste sistema.

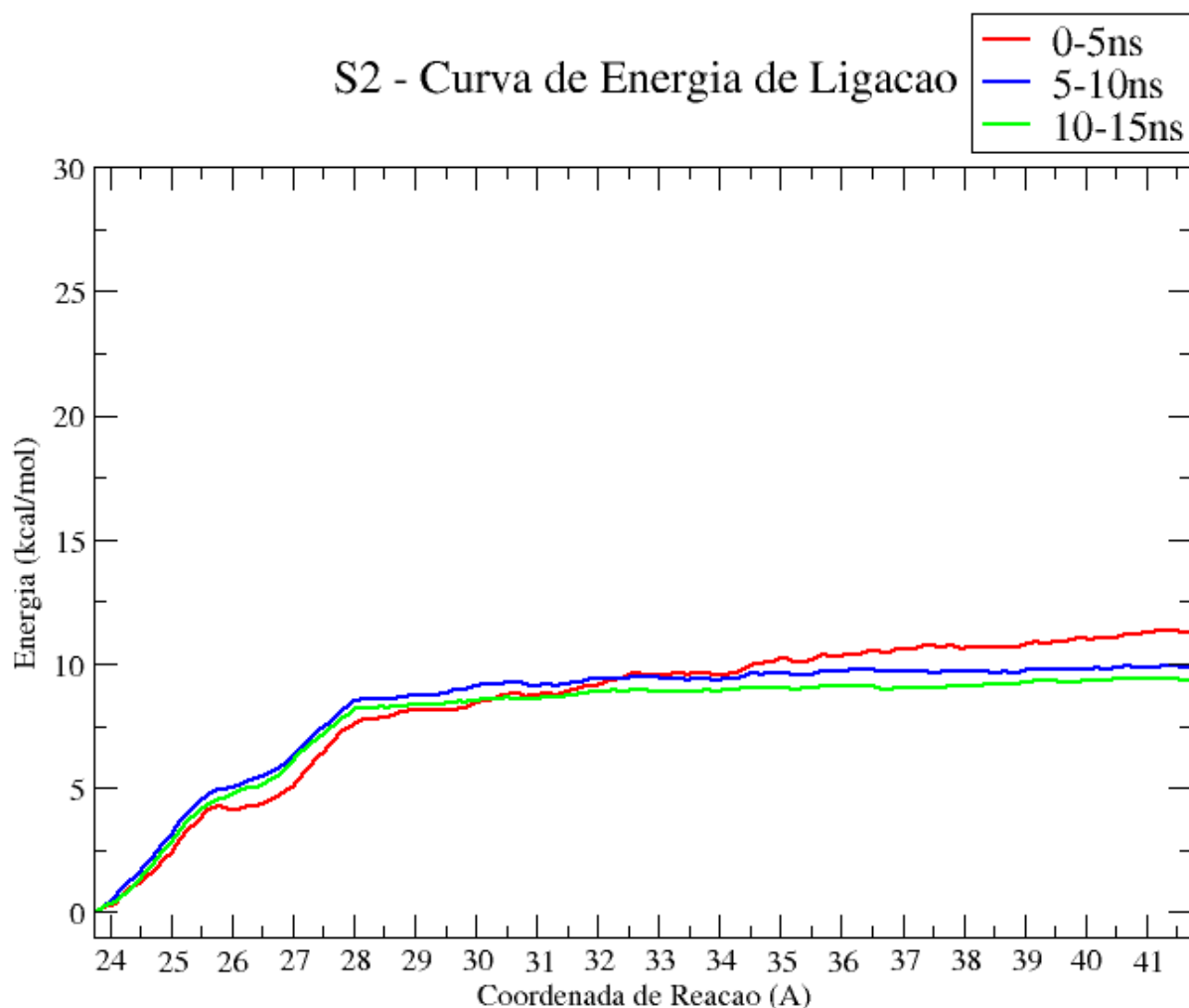


Figura 25 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema S2 após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns

Curva 0-5 ns (vermelho); 5-10 ns (azul); e 10-15 ns (verde).

Assim, a partir da curva de energia de ligação de 10-15 ns representada na Figura 25, o ΔG de afinidade foi calculado para o sistema S2. Sendo a energia de ligação inicial (estado “ligado”) de 0 kcal.mol⁻¹ e a energia de ligação final (estado “não ligado”) de 9,34 kcal.mol⁻¹, o ΔG de afinidade é de -9,34 kcal.mol⁻¹ e o ΔG de dissociação é de +9,34 kcal/mol⁻¹.

Finalmente, quanto ao sistema duplo mutante D57E/Y102K, o número de amostras obtidas antes da etapa de refinamento foi insuficiente para a convergência quanto aos valores de energia ao longo da coordenada de reação ξ . A etapa de refinamento para as janelas 21,5-22,5 Å, 23,5-24,5 Å, 25,4-26,4 Å, 26,4-27,4 Å, 27,4-28,4 Å e 29,3-30,3 Å também se mostrou insuficiente para obter perfis de curvas de

energia de ligação similares, mesmo fracionando as janelas para tamanhos de 0,5 Å e utilizando constante de força padrão de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ como potencial de fronteira. Somente obteve-se perfis similares para os tempos de simulação de 20-25 ns e de 25-30 ns após a utilização de potencial de fronteira de $20 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$, retornando amostragem representativa para valores factíveis de energia de ligação entre o scFv duplo-mutante e a alça de CD20 (Figura 26).

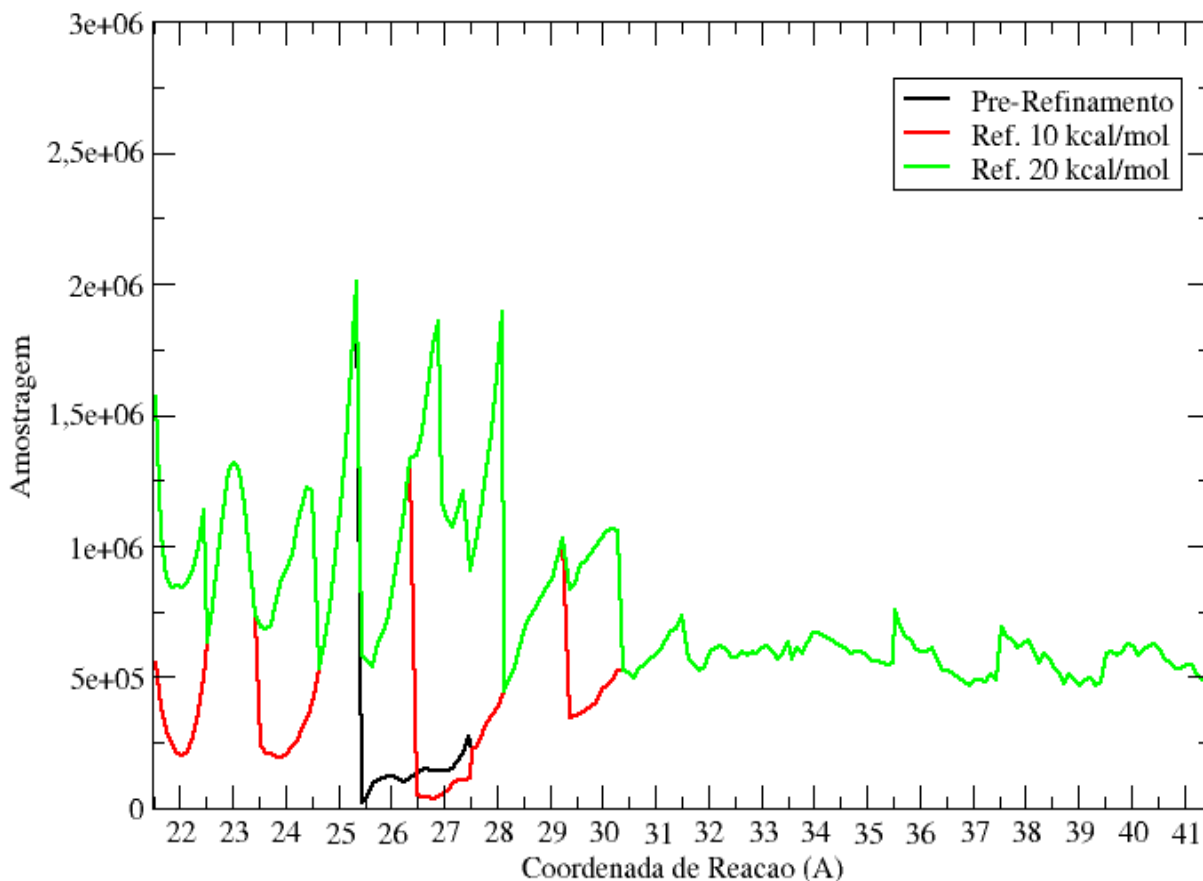


Figura 26 - Curvas de amostragem por coordenada de reação ξ do sistema duplo mutante D57E/Y102K para a simulação de 25-30 ns, obtidas antes (preto) e após as etapas de refinamento (vermelho e verde)

Curva obtida antes da etapa de refinamento em preto; após a etapa de refinamento com potencial de fronteira de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ em vermelho; e após a etapa de refinamento com potencial de fronteira de $20 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ em verde.

Após a etapa de refinamento e consequente melhora na amostragem da janela refinada, a homogeneidade entre as curvas de energia de ligação se manteve (Figura 27).

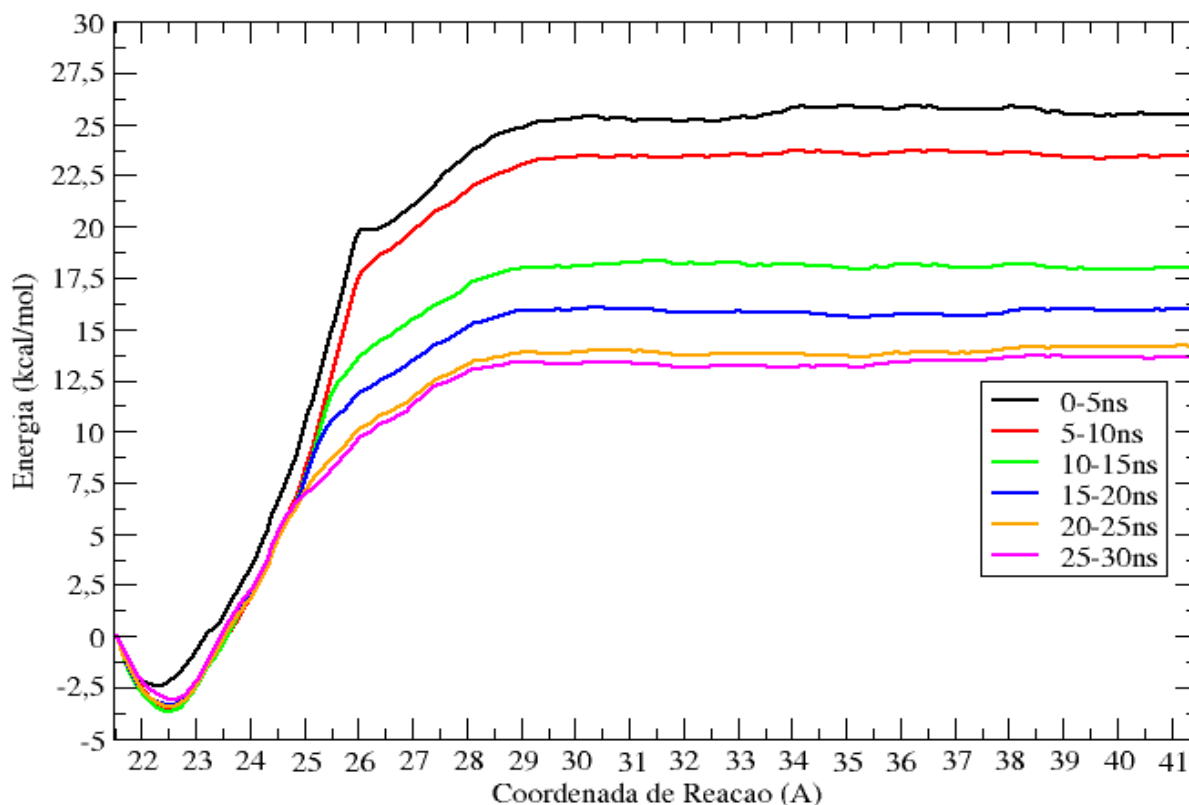


Figura 27 - Curvas de energia de ligação por coordenada de reação ξ para o sistema duplo mutante D57E/Y102K após a etapa de refinamento, cada curva representando uma janela de simulação de 5 ns

Curva 0-5 ns (preto); 5-10 ns (vermelho); 10-15 ns (verde); 15-20 ns (azul); 20-25 ns (laranja); e 25-30 ns (rosa).

A fim de discutir a dificuldade de convergência e de melhoria da amostragem, as configurações referentes a dois pontos de coordenada de reação mais problemáticos quanto ao número de amostras, 23,5 Å e 26,5 Å de distância entre os centros de massa de scFv e alça, foram avaliadas quanto aos contatos polares. Ao substituir o resíduo de ácido aspártico (D57) por um resíduo de ácido glutâmico (E) no domínio V_H , observou-se uma mudança conformacional nas cadeias laterais dos resíduos próximos à mutação ao longo do tempo de simulação, permitindo a formação de uma ponte salina ou interação iônica entre o resíduo E57 inserido e o resíduo de lisina (K11) da alça de CD20. Este tipo de interação é caracterizado pelo contato entre cadeias laterais de cargas opostas, sendo o ácido glutâmico de carga negativa e a lisina de carga positiva em meio aquoso. Como mostrado na Figura 28, o contato polar entre os átomos envolvidos se mantém nas duas configurações avaliadas, o que mostra que esta interação é uma significativa barreira energética a ser superada para que se possa prosseguir no afastamento entre os centros de massa.

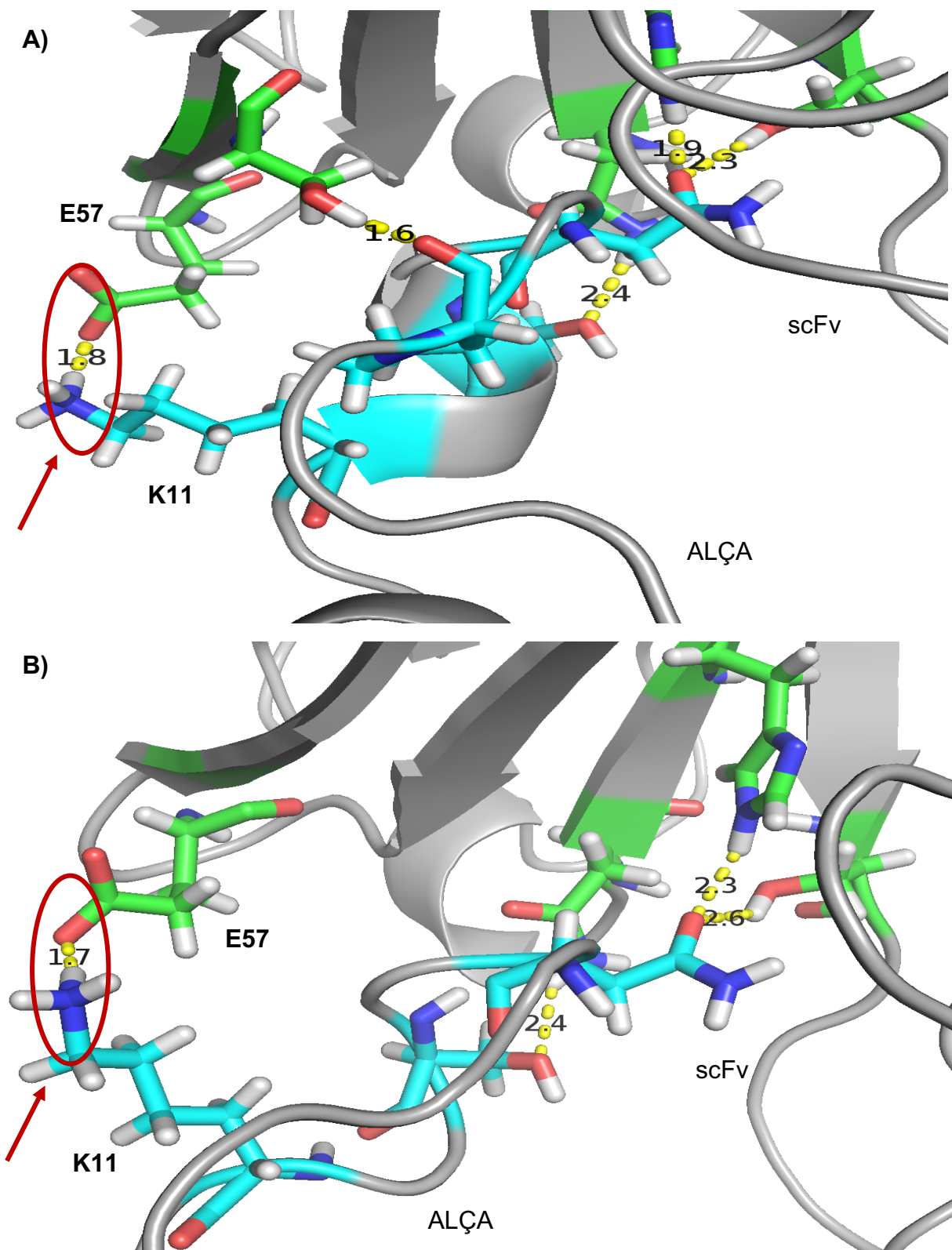


Figura 28 - Representações esquemáticas de contatos polares (linhas amarelas tracejadas) entre resíduos do scFv (em verde) e da alça (em ciano) do sistema duplo mutante D57E/Y102K para os pontos de 23,5 Å (A) e de 26,5 Å (B) da coordenada de reação

Distância entre átomos envolvidos nos contatos polares mostrada em Å. Ponte salina entre os resíduos E57 do scFv e K11 da alça destacada e apontada em vermelho. Fonte: elaborada pelo autor.

A Tabela 3 resume todos os contatos polares mostrados na Figura 28, evidenciando os resíduos em interação entre scFv e alça, assim como as distâncias em Å entre os átomos diretamente envolvidos no contato. Tal resultado mostra que das 5 interações observadas na configuração do ponto de 23,5 Å, 4 se mantêm na configuração do ponto de 26,5 Å, dentre elas a ponte salina. Isso confirma a significativa barreira energética inerente a este sistema e explica a dificuldade em atingir a convergência das curvas de energia de ligação e de melhorar a amostragem, sendo por isso necessário o aumento do potencial de fronteira para 20 kcal.mol⁻¹.Å⁻² para superação dos mínimos locais de energia e obtenção de conformações com valores de variável coletiva dentro dos limites da janela considerada.

Tabela 3 - Descrição dos contatos polares entre scFv de Rituximab e alça de CD20 do sistema duplo mutante D57E/Y102K para os pontos 23,5 Å e 26,5 Å da coordenada de reação

Coordenada de reação (Å)	Resíduo do scFv	Resíduo da Alça	Distância (Å)
23,5 Å	N33	S9	2,4
	H35	N7	1,9
	E57	K11	1,8
	S59	P5	1,6
	S99	N7	2,3
26,5 Å	N33	S9	2,4
	H35	N7	2,3
	E57	K11	1,7
	S99	N7	2,6

Resíduos do scFv e da alça envolvidos na ponte salina (E57 e K11, respectivamente), assim como a distância em Å, destacados em vermelho.

Diante disso, a partir da curva de energia de ligação de 25-30 ns representada na Figura 27, o ΔG de afinidade foi calculado para o sistema. Sendo a energia de ligação inicial (estado “ligado”) de -3,06 kcal.mol⁻¹ e a energia de ligação final (estado

“não ligado”) de 13,66 kcal.mol⁻¹, o ΔG de afinidade é de -16,72 kcal.mol⁻¹ e o ΔG de dissociação é de +16,72 kcal.mol⁻¹.

Após o cálculo do ΔG de ligação para o complexo scFv de Rituximab-alça de CD20 para os quatro sistemas (Cristal, S1, S2 e D57E/Y102K), os valores obtidos pelo método ABF foram relacionados com os valores experimentais obtidos por Li *et al.* (2009) (51), assim como os resultados dos complexos estáveis em água (S1 e S2) com os do sistema não submetido à etapa de produção da simulação de DM (Cristal) foram comparados (Tabela 4 e Tabela 5).

Li e colaboradores conseguiram identificar alguns dos resíduos de aminoácidos do fragmento F_{ab} de Rituximab mais importantes para a interação com a alça de CD20 a partir dos resultados de $\Delta G_{\text{ligação}}$ por resíduo obtidos por MM/PBSA, os quais não foram mostrados no artigo ou publicados posteriormente, propondo mutantes que possivelmente apresentariam melhor afinidade pela alça que o anticorpo nativo. Para encontrar os valores experimentais de afinidade e na tentativa de comparar a variação nas afinidades obtidas com as variações obtidas por MM/PBSA, radioimunoensaios foram realizados entre os mutantes e células Daudi, as quais contêm o CD20 completo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4:

Tabela 4 - Constantes de dissociação (K_d) em nM obtidas experimentalmente para o Rituximab e seus mutantes em interação com receptor CD20 de células Daudi

Mutante de Rituximab	K_d, nM
Nativo	4,96 ± 0,21
D57E	1,13 ± 0,07
Y102T	1,81 ± 0,09
D57E/Y102T/N93R	0,27 ± 0,02
N93R	4,48 ± 0,18
N93K	10,36 ± 0,45
D57E/Y102K	0,31 ± 0,03

Valores médios com desvio padrão obtidos a partir de triplicata. Fonte: adaptada de Li *et al.* (2009).

Tabela 5 - Valores de ΔG em kcal.mol⁻¹, constante de afinidade (K_a) em M e constante de dissociação (K_d) em nM calculados por ABF para os 4 sistemas simulados, e valores experimentais obtidos por Li *et al.* (2009) para o Rituximab (nativo) e duplo mutante D57E/Y102K

ABF	ΔG (kcal.mol⁻¹)	K_a (M)	K_d (nM)
Cristal	$\pm 15,02$	$3,89.10^{10}$	$2,6.10^{-2}$
S1	$\pm 13,45$	$3,03.10^9$	$3,3.10^{-1}$
S2	$\pm 9,34$	$3,85.10^6$	$2,6.10^2$
D57E/Y102K	$\pm 16,72$	$6,13.10^{11}$	$1,63.10^{-3}$

Experimental	ΔG (kcal.mol⁻¹)	K_a (M)	K_d (nM)
Nativo	$\pm 11,77 \pm 0,02$	$(2,01 \pm 0,08).10^8$	$4,96 \pm 0,21$
D57E/Y102K	$\pm 13,49 \pm 0,06$	$(3,26 \pm 0,32).10^9$	$0,31 \pm 0,03$

A constante de dissociação (K_d) calculada para o sistema S2 é bastante significativa quando comparada com a dos outros sistemas, sendo até quatro ordens de grandeza maior em relação às constantes de Cristal, S1 e anticorpo nativo. Logo, scFv e alça estão interagindo mais fracamente neste sistema, e o complexo é mais facilmente desfeito em meio aquoso.

Os resultados obtidos dos complexos estáveis em água (S1 e S2) estão mais próximos do resultado experimental quando comparados com o do sistema Cristal, mas ainda assim diferem em pelo menos uma ordem de grandeza quanto às constantes de afinidade e dissociação. Isso implica que, apesar das diferenças encontradas, recomenda-se submeter o sistema de estudo à etapa de produção de simulação até a estabilidade estrutural antes de submetê-lo ao método ABF, a fim de obter valores de ΔG de ligação mais próximos do experimental com o método. Quanto ao sistema duplo mutante D57E/Y102K, a diferença encontrada também foi significativa em relação ao resultado experimental, em duas ordens de grandeza.

Apesar das diferenças encontradas, os resultados seguem a mesma tendência que os experimentais, sendo a afinidade do duplo mutante D57E/Y102K pela alça de CD20 também maior pelo método ABF em relação ao Rituximab nativo.

Vale ressaltar que os resultados experimentais foram obtidos utilizando o fragmento F_{ab} de Rituximab interagindo com o CD20 completo de células Daudi através de radioimunoensaios, enquanto que os resultados de ABF foram obtidos utilizando somente o scFv de Rituximab e a alça de CD20 envolvida diretamente na interação, o que pode explicar as diferenças encontradas. Niederfellner *et al.* (2011) (65) demonstraram essa diferença também em algumas ordens de grandeza entre a utilização do CD20 completo e de somente a alça que contém o epítopo, ambos interagindo com o fragmento F_{ab} de Obinutuzumab (GA101), outro anticorpo monoclonal que tem CD20 como alvo. Os autores fundamentam que tais diferenças podem se dever aos efeitos de avidéz e à pré-orientação própria do epítopo no CD20 celular, ou seja, a estrutura do CD20 inteiro na célula condiciona o posicionamento do epítopo, influenciando diretamente na interação com o anticorpo. Logo, faz-se necessária a determinação experimental por radioimunoensaios da interação entre scFv de Rituximab e alça de CD20 para comparar com os resultados obtidos por ABF neste trabalho, a fim de possivelmente encontrar resultados de maior similaridade e validar o método para este sistema.

5 CONCLUSÕES

O scFv de Rituximab foi modelado a partir das coordenadas cristalográficas do fragmento F_{ab} deste anticorpo, e estruturas estáveis de scFv de Rituximab em meio aquoso obtidas das simulações de S1, S2 e S3 mantiveram o enovelamento proteico, diferindo entre si principalmente pelo posicionamento da CDR H3.

Após a construção do complexo scFv de Rituximab-alça de CD20, estruturas estáveis deste complexo em meio aquoso obtidas das simulações de S1 e S2 mantiveram a atratividade entre as cadeias principais de scFv e alça ao longo do tempo de simulação, enquanto que o sistema S3 foi descartado devido à perda de atratividade entre scFv e alça.

Os valores de energia livre de ligação obtidos por ABF para os sistemas Cristal, S1, S2 e duplo mutante D57E/Y102K evidenciaram que, para S1 e S2, os resultados foram mais próximos dos valores experimentais obtidos por Li *et al.* (2009) do que para o sistema Cristal, mostrando a importância de obter previamente uma estrutura estável em meio aquoso por simulação de DM para então submetê-la ao método ABF. Diferenças encontradas entre os resultados obtidos por ABF da interação do complexo scFv+alça e os resultados experimentais do complexo fragmento F_{ab} +células Daudi, que contêm o CD20 completo, sugerem que a estrutura do CD20 inteiro na célula condiciona o posicionamento do epítipo, influenciando diretamente na interação com o anticorpo.

6 PERSPECTIVAS

A perspectiva inicial é validar experimentalmente os resultados obtidos neste trabalho pela metodologia de ABF para a interação scFv de Rituximab e alça de CD20. Para isso, um grupo de pesquisa colaborador de engenharia de proteínas já sintetizou o gene do scFv, e as fases de clonagem e expressão em *E. coli* foram conduzidas com sucesso. Nas Figura 29 e Figura 30, pode-se observar a banda de expressão em gel e o experimento colorimétrico para se detectar a ligação com o anticorpo completo Rituximab e com seu fragmento scFv. A próxima etapa é sintetizar a alça de CD20 para realização de radioimunoensaios, a fim de obter os valores de constante de afinidade para o scFv nativo e para o scFv duplo mutante D57E/Y102K e compará-los com os valores obtidos por ABF para validação do método.

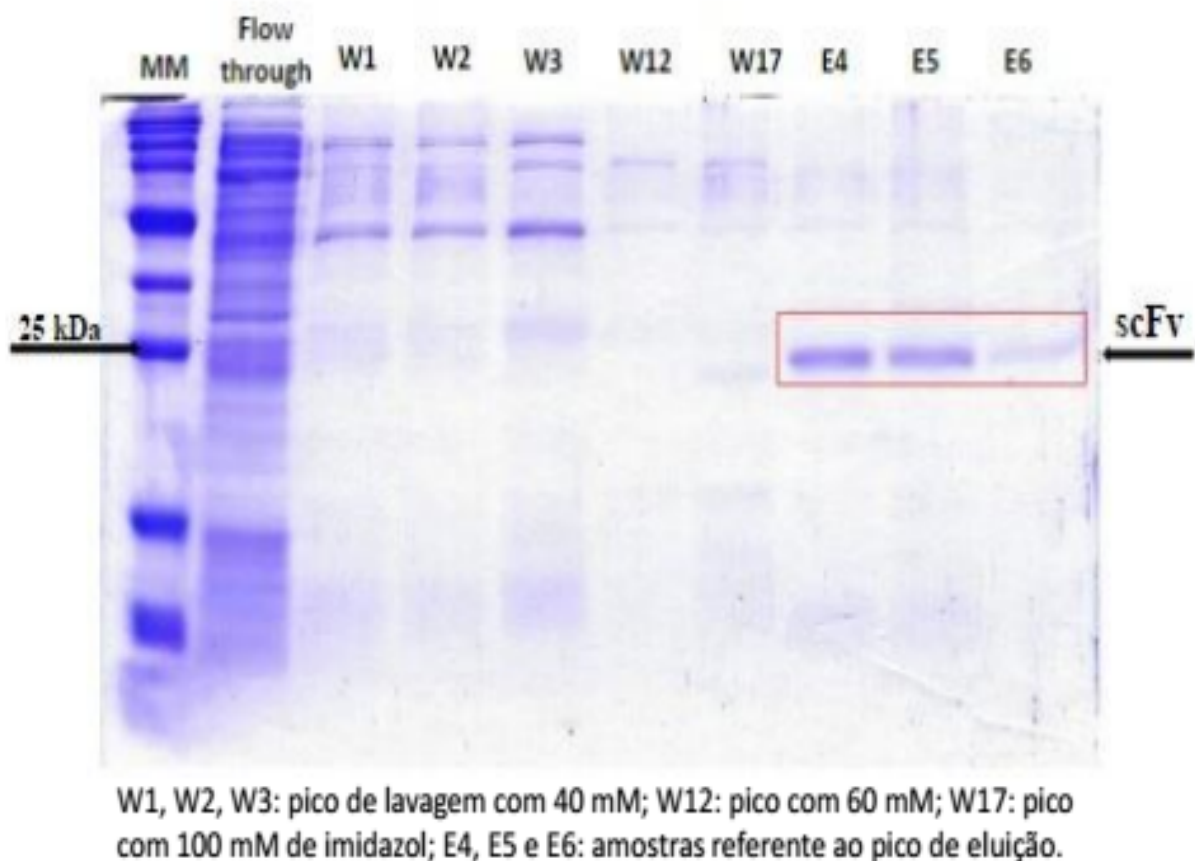


Figura 29 - Purificação do scFv de Rituximab no vetor pET22 em *E. coli* Rosetta

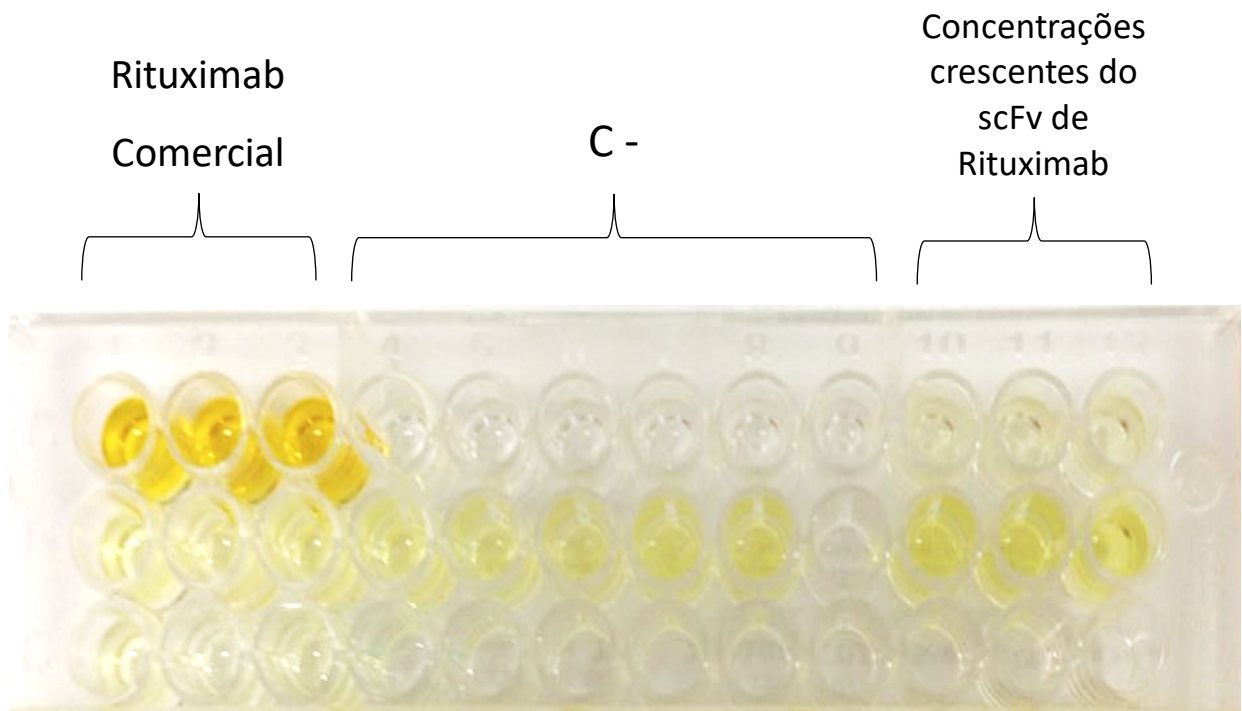


Figura 30 - Teste de Elisa para detecção de ligação do scFv de Rituximab com células Raji, que contêm o CD20 completo

Controle positivo: Rituximab comercial; controle negativo (C-): ausência do anticorpo.

Posteriormente, pretende-se prosseguir os estudos *in vitro* de análise da interação scFv-alça em maiores detalhes e, através de técnicas como mutação sítio dirigida e desenho de anticorpos assistido computacionalmente, obter variantes do scFv, a fim de testá-las em relação a ganhos de afinidade na interação. Dependendo dos resultados, há possibilidade de se encontrar *biobetters*, e, nesse caso, há a necessidade de se requerer uma patente de invenção, uma vez que se tem novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. A partir desses *biobetters* de scFv, o anticorpo completo pode ser reconstituído, contendo as mutações sugeridas, para aplicação clínica no tratamento de enfermidades relacionadas a linfócitos B.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional do Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. INCA. 2012.
2. National Institutes of Health. National Cancer Institute. 2015.
3. Habibi Anbouhi M, Feiz Barazandeh A, Bouzari S, Abolhassani M, Khanahmad H, Golkar M, et al. Functional recombinant extra membrane loop of human CD20, an alternative of the full length CD20 antigen. *Iran Biomed J.* 2012;16 (3): 121–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023212>.
4. Edwards JCW. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology.* 2001;40 (2): 205–11. Disponível em: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/40.2.205>.
5. Leandro MJ, Edwards JCW, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis.* 2002;61: 883–8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1753912/pdf/v061p00883.pdf>.
6. Okroj M, Österborg A, Blom AM. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treat Rev.* 2013;39 (6): 632–9. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737212002204>.
7. Polyak MJ, Tailor SH, Deans JP. Identification of a Cytoplasmic Region of CD20 Required for Its Redistribution to a Detergent-Insoluble Membrane Compartment. *J Immunol Ref.* 1998;161: 3242–8. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/161/7/3242>.
8. Ernst JA, Li H, Kim HS, Nakamura GR, Yansura DG, Vandlen RL. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20. *Biochemistry.* 2005;44 (46): 1550–8.
9. Fernandes CFC, Pereira S dos S, Luiz MB, Zuliani JP, Furtado GP, Stabeli RG. Camelid single-domain antibodies as an alternative to overcome challenges related to the prevention, detection, and control of neglected tropical diseases. *Front Immunol.* 2017;8: 1–8.
10. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235–42.
11. Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, et al. Structural basis for

- recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J Biol Chem*. 2007;282 (20): 1573–80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395584>.
12. Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2012;5 (1): 64.
 13. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Biologia Molecular da Célula*. Artmed; 2009.
 14. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*. 2005;23 (9): 1126–36.
 15. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6th ed. Elsevier; 2008.
 16. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7th ed. Artmed; 2010.
 17. Kindt T, Osborn B, Goldsby R. *Imunologia de Kuby*. 6th ed. Artmed; 2008.
 18. Carter PJ. Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Exp Cell Res*. 2011;317 (9): 1261–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.013>.
 19. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256 (5517): 495–7.
 20. Lindl T. Development of human monoclonal antibodies: A review. *Cytotechnology*. 1996;21 (3): 183–93.
 21. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. *ScFv antibody: Principles and clinical application*. Clin Dev Immunol. 2012.
 22. Fernandes CC. Produção de fragmentos de anticorpos monoclonais (scFv) contra isolados de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas utilizando phage display. 2010.
 23. Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature*. 1991;349: 293–9.
 24. Whiteaker JR, Zhao L, Frisch C, Ylera F, Harth S, Knappik A, et al. High-affinity recombinant antibody fragments (Fabs) can be applied in peptide enrichment immuno-MRM assays. *J Proteome Res*. 2014;13 (4): 2187–96.
 25. Crespi GAN, Ascher DB, Parker MW, Miles LA. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the Fab portion of the Alzheimer's disease immunotherapy candidate bapineuzumab complexed with amyloid- β . *Acta Crystallogr Sect FStructural Biol Commun*. 2014;70 (3): 374–7.
 26. Fibriansah G, Tan JL, Smith SA, de Alwis AR, Ng TS, Kostyuchenko VA, et al. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation

- of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol Med.* 2014;6 (3): 358–71.
27. Shen Z, Yan H, Zhang Y, Mernaugh RL, Zeng X. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. *Anal Chem.* 2008;80 (6): 1910–7.
 28. Grillo-Lopez AJ, White CA. Chimeric anti-CD20 antibody, rituxan, for use in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. 2010;1: 1–7.
 29. Klein C, Lammens A, Schafer W, Georges G, Schwaiger M, Mossner E, et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs.* 2013;5 (1): 22–33. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211638>.
 30. Pescovitz MD. The use of rituximab, anti-CD20 monoclonal antibody, in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant.* 2004;8 (1): 9–21.
 31. Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Futur Oncol.* 2015;11 (9): 1327–42.
 32. Van Gunsteren WF, Dolenc J, Mark AE. Molecular simulation as an aid to experimentalists. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18 (2): 149–53. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0959440X07002072/1-s2.0-S0959440X07002072-main.pdf?_tid=7673150c-f2d3-11e6-958000000aab0f6b&acdnat=1487090252_a4cf082069a37e7e80d59872fe31ab54.
 33. Mori T, Miyashita N, Im W, Feig M, Sugita Y. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016;1858 (7): 1635–51. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273615004381>.
 34. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005;26 (16): 1701–18.
 35. Stavrakoudis A. Computational modelling and molecular dynamics simulations of a cyclic peptide mimotope of the CD52 antigen complexed with CAMPATH-1H antibody. *Mol Simul.* 2010;36 (2): 127–37.
 36. Van Gunsteren WF, Berendsen HJC. *Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry.* Angew Chemie Int Ed English. 1990;29 (9): 992–1023. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.199009921>.

37. Forster MJ. Molecular modelling in structural biology. *Micron*. 2002;33 (4): 365–84. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814876>.
38. Van Gunsteren WF, Berendsen HJC. Thermodynamic cycle integration by computer simulation as a tool for obtaining free energy differences in molecular chemistry. *J Comput Aided Mol Des*. 1987;1 (2): 171–6.
39. Verlet L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. 1967;159: 98–103.
40. Burkert U, Allinger NL. *Molecular Mechanics*. American Chemical Society; 1982.
41. Atkins P. *Physical Chemistry*. Oxford University Press; 2006.
42. Gapsys V, Michielssens S, Peters J, Groot B, Leonov H. Calculation of Binding Free Energies. In: Kukol A, editor. *Molecular Modeling of Proteins*. 2nd ed. Springer Protocols; 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-177-2>.
43. Faller CE, Reilly KA, Hills RD, Guvench O. Peptide backbone sampling convergence with the adaptive biasing force algorithm. *J Phys Chem B*. 2013;117 (2): 518–26. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp309741j>.
44. Hénin J, Fiorin G, Chipot C, Klein ML. Exploring multidimensional free energy landscapes using time-dependent biases on collective variables. *J Chem Theory Comput*. 2010;6 (1): 35–47. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ct9004432>.
45. Darve E, Rodríguez-Gómez D, Pohorille A. Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *J Chem Phys*. 2008;128 (14).
46. Mottin M. *Dinâmica molecular do receptor ativador da proliferação de peroxissomos y: Associação com ligantes e proteínas corregulatórias*. 2015.
47. Comer J, Gumbart JC, Hénin J, Lelievre T, Pohorille A, Chipot C. The Adaptive Biasing Force Method: Everything You Always Wanted To Know but Were Afraid To Ask. *J Phys Chem B*. 2015;119 (3): 1129–51. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp506633n>.
48. Domene C, Furini S. Adaptive Biasing Force. *Methods in Enzymology - Biothermodynamics Part B*. Elsevier; 2009: 164–7.
49. Hénin J, Gumbart J, Harrison C, Chipot C. Free energy calculations along a reaction coordinate: A tutorial for adaptive biasing force simulations. *Recherche*. 2010; 1–31. Disponível em: <http://cvs.ks.uiuc.edu/Training/TutorialsOverview/>

- namd/ABF/tutorial-abf.pdf.
50. Kumari R, Kumar R, Lynn A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J Chem Inf Model*. 2014;54 (7): 1951–62.
 51. Li B, Zhao L, Guo H, Wang C, Zhang X, Wu L, et al. Characterization of a rituximab variant with potent antitumor activity against rituximab-resistant B-cell lymphoma. *Blood*. 2009;114 (24): 5007–5015.
 52. WORLD HEALTH ORGANIZATION. GLOBOCAN 2012: cancer incidence and mortality worldwide. Int Agency Res Cancer. 2012. Disponível em: www.globocan.iarc.fr.
 53. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997;18 (15): 2714–23.
 54. Gordon JC, Myers JB, Folta T, Shoja V, Heath LS, Onufriev A. H++: A server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res*. 2005;33 (2): 368–71.
 55. Myers J, Grothaus G, Narayanan S, Onufriev A. A Simple Clustering Algorithm Can Be Accurate Enough for Use in Calculations of pKs in Macromolecules. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2006;63: 928–38.
 56. Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev A V. H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res*. 2012;40 (1): 537–41.
 57. Philips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. 2005;26: 1781–802.
 58. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983;79 (2): 926–35.
 59. MacKerell AD, Banavali N, Foloppe N. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*. 2000;56 (4): 257–65.
 60. Leach AR. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Brief Bioinform. 2001;2 (2): 199–208. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ccm&AN=106052147&site=ehost-live>.
 61. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys*. 1977;23 (3): 327–41.

62. Daura X, Gademann K, Jaun B, Seebach D, van Gunsteren WF, Mark AE. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew Chemie Int Ed.* 1999;38 (1–2): 236–40. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291521-3773%2819990115%2938%3A1%2F%3C236%3A%3AAIDANIE236%3E3.0.CO%3B2-M>.
63. The PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.7 Schrödinger, LLC.
64. Kufareva I, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. 2012;857: 231–57. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-588-6>.
65. Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, et al. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood.* 2011;118 (2): 358–67.