



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Mapeamento de epítomos baseado em peptídeos na caracterização do anticorpo FabC4

Aluno: Douglas Alexsander Alves

Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**UBERLÂNDIA - MG
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Mapeamento de epítomos baseado em peptídeos na caracterização do anticorpo FabC4

Aluno: Douglas Alexsander Alves

Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética).**

**UBERLÂNDIA - MG
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A474m Alves, Douglas Alexsander, 1994
2018 Mapeamento de epítomos baseado em peptídeos na caracterização do anticorpo FabC4 [recurso eletrônico] / Douglas Alexsander Alves. - 2018.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.

Coorientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.811>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Peptídeos. 3. Mamas - Câncer. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, (Orient.). II. Goulart Filho, Luiz Ricardo, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Mapeamento de epítomos baseado em peptídeos na caracterização do anticorpo FabC4

ALUNO: DOUGLAS ALEXSANDER ALVES

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo (Orientadora)

Examinadores:

Dra. Luciana Rodrigues Carvalho Barros
Instituto Nacional de Câncer- INCA
Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart
Universidade Federal de Uberlândia
Profa. Juliana Franco Almeida (suplente)
Universidade Federal da Paraíba
Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia (suplente)
Universidade Federal de Uberlândia

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

“Achar que o mundo não tem um criador é o mesmo que afirmar que um dicionário é o resultado de uma explosão numa tipografia”

(Benjamin Franklin).

DEDICATÓRIA:

*Dedico essa conquista, primeiramente a Deus, por
não me deixar perder as esperanças em
meio às dificuldades. Aos meus pais,
Darc e Leicimar: Amo vocês!!
Família e amigos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, minha mentora e orientadora desde o início da graduação, por quem manifesto grande admiração pessoal e profissional. Obrigado pelas valiosas contribuições acadêmicas, pelas oportunidades, pela confiança, pela amizade. Serei eternamente grato!!!

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, meu co-orientador, por confiar no meu trabalho e abrir as portas do Laboratório de Nanobiotecnologia. Obrigado pela grande oportunidade de crescimento pessoal e científico.

À minha família e amigos que me ampararam e suportaram nos momentos mais difíceis da minha vida acadêmica.

À Emília Resende Vaz, Lara Vecchi e Sara Teixeira Soares Mota, pelas valiosas contribuições e aprendizados que tive no dia-a-dia laboratorial desde as iniciações científicas.

À Natássia Corrêa (“Um dia, e pode ser que esse dia nunca chegue...” kkk), pelas valiosas contribuições e favores, pelo meu amadurecimento crítico, socorros e conselhos. Obrigado por quebrar a cabeça comigo!

À Antonielle (Toninha), uma amizade que se fortaleceu bastante e pretendo levar para a vida, pelas longas conversas sobre os perrengues da vida, e por trazer alegria nos “dias de luta”.

Ao Matheus Ribeiro, um agradecimento especial pelo esforço desempenhado em me ajudar, mesmo em momentos bastante difíceis. Obrigado pela amizade sólida construída e saiba que pode contar comigo sempre!

À Emília Resende, Sara Teixeira, Lara Vecchi e Galber Araújo pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

À Angela Rausis, com quem tenho a felicidade de partilhar meus sonhos e faz os meus dias serem melhores, pela paciência, carinho e conforto. Obrigado por não me deixar desanimar!

Aos meus primos Capitão, Recruta e Rico (Sorriam e acenem rapazes).

*À equipe médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
Às pacientes, que apesar de toda a dor e sofrimento contribuíram diretamente para a realização desse estudo.*

À Capes, financiadora do meu trabalho.
Ao Laboratório de Nanobiotecnologia, que foi a minha segunda casa e grande responsável pela minha formação profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 A COMPLEXIDADE DO CÂNCER DE MAMA E SEU DESAFIO CLÍNICO	13
1.2 A IMPORTÂNCIA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS NA TERAPIA DE TUMORES	16
1.3 PHAGE DISPLAY.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral:	22
2.2 Objetivos específicos:.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE	23
3.1.1 Expressão em sobrenadante de cultura.....	23
3.1.2 Purificação e concentração	23
3.1.3 Dot-blotting para detecção das moléculas de Fabs	24
3.2 BIOSSELEÇÃO	24
3.2.1 Extração de proteínas totais de pacientes	24
3.2.2 Mapeamento dos epítomos por Phage Display.....	25
3.2.3 Amplificação e purificação dos fagos recombinantes.....	27
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FAGOS SELECIONADOS	27
3.3.1 Reatividade ao FabC4.....	28
3.3.2 Purificação de fagos promissores	28
3.3.3 Amostras sorológicas	29
3.3.4 <i>Phage</i> -ELISA em soro de pacientes	30
3.3.5 Análises estatísticas.....	31

3.3.6	Extração de DNA e sequenciamento	31
3.4	PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COMO EPÍTOPOS DO FABC4	32
3.5	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	33
3.5.1	Sequenciamento do anticorpo FabC4	33
3.5.2	Modelagem molecular e docking.....	33
3.6	ENSAIOS CELULARES	34
3.6.1	Linhagens.....	34
3.6.2	Imunofluorescência	34
4	RESULTADOS	35
4.1	SELEÇÃO DE MIMOTopos por phage display.....	35
4.2	PERFIL DIAGNÓSTICO DOS FAGOS SELECIONADOS	36
4.3	ESPECIFICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	40
4.4	COMPORTAMENTO PROTEICO EM CELULAS DE CÂNCER DE MAMA.....	42
4.5	DOCKING MOLECULAR	44
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÃO.....	53
7	REFERENCIAS	54
	Anexo I (Material Suplementar)	68

RESUMO

Phage Display é uma técnica molecular pela qual proteínas exógenas são expressas na superfície de partículas virais. Esta é uma ferramenta extremamente poderosa para selecionar peptídeos ligantes específicos dentre um vasto número de variantes. Considerando tumores, é uma tecnologia promissora na seleção de alvos com relevância clínica, capaz de reconhecer sua diversidade molecular. Nós caracterizamos, por *Phage Display*, um novo anticorpo FabC4 com relevância clínica no diagnóstico e prognóstico do Câncer de Mama (CM). Neste estudo, foi realizado um ensaio de bioprospecção contra o FabC4 para mapear seus epítomos, após seleção subtrativa contra um Fab irrelevante e eluição em duas etapas: contra proteínas não malignas, que foram descartadas, e contra proteínas de CM, as quais foram amplificadas. Quatro dos clones selecionados diferenciaram, por *Phage-ELISA*, amostras de soros de pacientes com CM, de doença benigna da mama (DBM) e de mulheres saudáveis. Os peptídeos correspondentes quimicamente sintetizados (pA5, pA7, pC4 e pD6) se ligaram ao FabC4. O que apresentou maior afinidade ao FabC4 foi o pC4 ($p < 0,05$ quando comparada às demais). Contudo, apenas o pD6 diferenciou as amostras neoplásicas. Demonstramos ainda, pela primeira vez, por imunofluorescência, a co-localização citoplasmática da Anexina A2 (ANXA2) e Citoqueratina 10 (CK10) na linhagem celular MDA-MB-231, sugerindo um novo comportamento molecular dessas proteínas em CM-triplo negativo (CMTN). Análises de *docking* molecular confirmaram a interação entre o FabC4 e os peptídeos, com melhor cobertura e identidade para pC4. Este peptídeo também mimetizou as regiões das proteínas ANXA2 e CK10 responsáveis por se ligarem ao FabC4. Portanto, nossa estratégia resultou na descrição de biomoléculas com potencial uso diagnóstico do CMTN e no mapeamento bem-sucedido dos epítomos do FabC4, abrindo novos caminhos na compreensão e no tratamento do CMTN.

Palavras-chave: Peptídeo mimético, Câncer de Mama, Anticorpo recombinante, *Phage Display*

ABSTRACT

Phage Display is a molecular technique by which exogenous proteins are expressed on the virus surface. It is an extremely powerful tool to select peptides with specific binding properties from a wide number of variants. Regarding tumors, Phage Display is a promising technology for the selection of targets with clinical relevance, being capable of recognize cancer molecular diversity. Here we describe the characterization of a new FabC4 antibody, made with Phage Display technique, clinically relevant for breast cancer (BC) diagnosis and prognostic purposes. In this study, a bioprospecting assay was done against FabC4 in order to map its epitopes, after using a subtractive selection against an irrelevant Fab, and elution in two steps: with non-malignant proteins, which were discarded, and against BC proteins, which were amplified. By using Phage-ELISA, four of selected clones were able to differentiate serum samples of patients with BC, from serum of patients with benign disease and healthy women. The peptides were chemically synthesized (pA5, pA7, pC4 e pD6) and bound to FabC4. The pC4 demonstrated higher specificity when compared to the others peptides ($p < 0.05$). However, only pD6 peptide was able to differentiate neoplastic samples. Also, we showed for the first time, by immunofluorescence, the cytoplasmic co-localization of annexin A2 (ANXA2) and cytokeratin 10 (CK10) in MDA-MB-231 cell line, suggesting a new molecular behavior of these proteins on triple-negative BC (TNBC). Molecular docking analysis confirmed interactions between FabC4 and the peptides, with better coverage and identity for pC4. This peptide also mimicked ANXA2 and CK10 protein regions that bind to FabC4. Therefore, we described new molecules for the diagnosis of TNBC and our strategy resulted on a successful mapping of FabC4 epitopes, opening new perspectives to better understand and treat TNBC.

Key words: Mimotope peptide, Breast Cancer, Recombinant antibody, Phage Display

1 INTRODUÇÃO

1.1 A COMPLEXIDADE DO CÂNCER DE MAMA E SEU DESAFIO CLÍNICO

O câncer é uma doença altamente prevalente nos dias atuais, sendo a segunda maior causa de morte no mundo e responsável por 8,8 milhões de óbitos em 2015. Globalmente, cerca de uma a cada seis mortes é decorrente de neoplasias, destas 70% ocorrem em países de baixa e média renda (WHO, 2018). Os gastos, diante de índices tão alarmantes, impactam economicamente os sistemas de saúde. Em 2010 o custo estimado anual foi de aproximadamente 1,16 trilhão de dólares (STEWART & WILD, 2014).

Segundo a última estimativa, o Câncer de Mama (CM) é considerado o tipo de tumor mais comum em mulheres, com cerca de 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012. Representa 25% de todos os cânceres que acometem o sexo feminino e a quinta maior causa de morte pela doença, mundialmente (WCRF, 2018).

No Brasil, o CM também é o mais incidente entre as mulheres, excluindo o de pele não melanoma, correspondendo a 28% das novas lesões identificadas anualmente. São esperados para o biênio 2018-2019 cerca de 59.700 novos casos. Estima-se que no Brasil houve 15.403 óbitos por esta neoplasia em 2015 (BRASIL, 2018b).

Diversos fatores têm sido descritos como responsáveis pelo surgimento dessa doença como: predisposição genética relacionada à presença de mutações nos genes BRCA1 (*Breast Cancer 1*) e BRCA2 (*Breast Cancer 2*); a idade; características endócrinas/história reprodutiva da mulher, incluindo estímulo hormonal, menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade; e fatores ambientais/comportamentais como a ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso e exposição à radiação ionizante (BRASIL, 2018; ANDERSON et al., 2014).

O câncer, inclusive o de mama, é uma doença predominantemente genética, em que modificações genômicas herdadas ou oriundas de mutações ao longo da vida conduzem à transformação maligna. Molecularmente, são identificadas deleções, inserções, recombinações e alterações na expressão de oncogenes e genes supressores de tumor e em vias diretamente relacionadas à regulação do

funcionamento celular (SUGIMURA & USHIJIMA, 2000). A epigenética também está associada à tumorigênese, como a metilação e remodelagem de cromatina (MEHTA *et al.*, 2015). Esses eventos conduzem a alterações na fisiologia das células que propiciam o crescimento da lesão, incluindo: a insensibilidade aos sinais de inibição clonal, a autossuficiência proliferativa, evasão à apoptose, angiogênese sustentada e capacidade metastática (LUND *et al.*, 2006; PRADO-GARCÍA & SÁNCHEZ-GARCÍA, 2017).

Tumores mamários são classificados quanto ao componente epitelial comprometido, definidos como carcinomas *in situ* (Ductal e Lobular) ou invasivos. Dentre estes, os ductais são caracterizados pela proliferação maligna das células dos ductos mamários juntamente com a invasão estromal. São subclassificados em: tubular, cribriforme, mucinoso, medular, papilar, micropapilar, apócrino, neuroendócrino, metaplastico, rico em lipídios, secretor, adenoide cístico, oncocítico e de célula acínica. Os lobulares, por sua vez, originam-se nos lóbulos secretórios e se subdividem em: clássico, pleomórfico, histiocitóide, e tubulolobular (MAKKI, 2015).

Após o diagnóstico, são classificados e estadiados. Desde a sua criação, em 1977, o padrão de estadiamento proposto pela *International Union Against Cancer* (IUAC) ainda permanece amplamente empregado. O sistema TNM baseia-se em achados anatômicos e analisa três aspectos principais: o tamanho do tumor (T), o comprometimento dos linfonodos (N) e a ocorrência ou não de metástases (M) (GIULIANO *et al.*, 2018).

Contudo, são tumores altamente heterogêneos do ponto de vista clínico, biológico e morfológico. São descritos, também, três subtipos moleculares principais, com diferentes perfis prognósticos e estratégias terapêuticas (DENKERT *et al.*, 2017; MILLS & ETHIER, 2017; CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Ensaios de expressão gênica em microarranjos e experimentos de imunohistoquímica os subclassificaram em: luminal (A e B); os que superexpressam o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) e os triplo-negativos. Além disso, também são descritos os “*claudin-low*” e o molecular apócrino (CIRQUEIRA *et al.*, 2011; BARROS & LEITE, 2015; CAREY *et al.*, 2006).

O subtipo luminal A se caracteriza, principalmente, pela presença de receptores de estrógeno e de progesterona (RE e RPg), além de não expressar

(HER-2). Origina-se em células epiteliais dos lúmens ducto-lobulares e corresponde a cerca de 30 a 40% dos casos (PRAT & PEROU, 2011; BARROS & LEITE, 2015). O luminal B também é reconhecido por possuir RE, contudo, pode ou não expressar HER-2. Seu elevado índice mitótico ($ki67 > 14$) o define como um tumor de pior prognóstico (TRAN; BEDARD, 2011).

Os que superexpressam HER-2 não apresenta os receptores hormonais e, em geral, apresentam um pior prognóstico em relação aos luminais. O HER-2, primeiramente descrito na mama em 1987 por Slamon et al., (1987), está relacionado ao aumento da agressividade do tumor, das taxas de recorrência, da mortalidade e da resistência a terapias endócrinas (BORG et al., 1990; (CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004; WOLFF et al., 2007). Contudo, é passível de terapia alvo baseada em anticorpos monoclonais anti-HER2 como o Trastuzumab. Após mais de uma década de sua aprovação, este é responsável por melhorar a sobrevida das pacientes que expressam o receptor (WEINER et al., 2010; SWAIN et al., 2015; CAMERON et al., 2017; NORTON et al., 2018).

O tumor triplo-negativo carece de RE, RPg e HER-2 (BARROS & LEITE, 2015). Dentre estes, o grupo basalóide é definido pelo padrão de expressão semelhante ao das células basais/mioepiteliais da mama com perfil molecular associado à mutação germinativa em BRCA1. Essas lesões expressam HER-1 e citoqueratinas de alto peso molecular/basais e originam-se de células tronco luminais indiferenciadas (PRAT & PEROU, 2009).

Os *claudin-low* foram reconhecidos em 2007 e são caracterizados pela baixa expressão de proteínas de junções e adesões célula-célula como claudinas 3,4 e 7, E-caderina e Ocludina (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Esse subtipo exhibe marcadores de transição epitélio-mesenquima, de resposta imune e assemelha-se às células tronco. São, em sua maioria, tumores ductais invasivos metaplásicos e triplo-negativos (PRAT et al., 2010).

O molecular apócrino, como o nome descreve, possui morfologia apócrina característica, são descritos imunohistoquimicamente como triplo-negativos, expressando receptores androgênicos, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e, em alguns casos, HER-2. Essas proteínas são associadas ao seu pior prognóstico (LIU et al., 2018; LIU, XIAOZHEN et al., 2018).

Portanto, é evidente a dificuldade em se classificar sistematicamente os tumores triplo-negativos. Em geral são agressivos, de pior prognóstico e correspondem a cerca de 15% dos diagnósticos (PALA *et al.*, 2015). Divergem morfológicamente, geneticamente, imunofenotipicamente e clinicamente, além de não possuírem uma estratégia terapêutica específica já definida (RAKHA *et al.*, 2008; CAREY *et al.*, 2007; COUCH *et al.*, 2015). Há diferentes perfis de expressão proteica e de mRNA, impossibilitando a definição de um único modelo de CM triplo-negativo (CMTN) (DENKERT *et al.*, 2017; GLUZ *et al.*, 2009).

Nesse contexto, inúmeros esforços estão voltados na busca de novas e promissoras abordagens terapêuticas, além de estratégias que possam melhor elucidar esse subtipo tumoral (DENKERT *et al.*, 2017; LEHMANN *et al.*, 2011). Uma abordagem que se destaca nesse cenário é o uso de anticorpos monoclonais com o intuito de identificar moléculas biológicas que possam servir como biomarcadores e/ou mediadores terapêuticos (TOMAO *et al.*, 2015; SPECHT *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017).

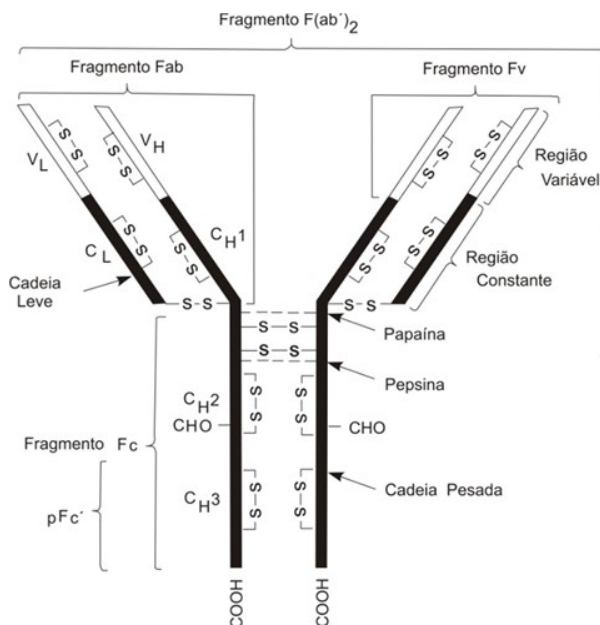
1.2 A IMPORTÂNCIA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS NA TERAPIA DE TUMORES

Os anticorpos, também chamados de Imunoglobulinas (Ig) são moléculas glicoproteicas circulantes com tamanho aproximado de 160 quilodaltons (KDa). São responsáveis por detectar e se ligarem especificamente a um antígeno (SILVERTON *et al.*, 1977). Em humanos existem cinco classes: IgA, IgG, IgE, IgM e IgD, as quais são altamente reativas a epítomos específicos e responsáveis pela imunidade humoral, neutralizando patógenos, toxinas e materiais estranhos ao nosso organismo (GREENSPAN & CAVACINI, 2019; FILPULA, 2007; ROMER *et al.*, 2011).

Do ponto de vista estrutural as Igs são compostas por duas, em alguns casos mais, cadeias pesadas (H) idênticas e número igual de cadeias leves (L) que ocorrem nas formas *kappa* (κ) e *lambda* (λ). Cada cadeia pesada possui três ou quatro domínios constantes (C) chamados CH1, CH2, CH3 e CH4 e apresenta, na porção amino-terminal, um domínio variável de cadeia pesada (VH). Cada cadeia leve possui um domínio constante e um variável de cadeia leve (VL). Estas

subunidades polipeptídicas e as duas cadeias pesadas são unidas por pontes dissulfeto (GREENSPAN & CAVACINI, 2019) (Figura 1).

Figura 1: Representação estrutural de uma IgG. Pontes dissulfeto (S-S) ligam as duas cadeias H e também as cadeias L e H. Os fragmentos gerados por clivagem proteolítica estão representados pelas setas. H: cadeia pesada; L: cadeia leve.



Adaptado de (BARBAS, 2001a).

Nas porções VL e VH encontram-se as regiões hipervariáveis, cuja variabilidade é resultante de rearranjos gênicos durante recombinação e hipermutação somática. A junção das regiões VH e VL formam o fragmento variável (Fv) e as constantes CH2 e CH3 (e CH4 quando houver) formam o fragmento cristalizável (Fc). O sítio de ligação ao antígeno é composto por seis regiões determinantes de complementariedade (CDR), três em cada VL e VH (BUJOTZEK *et al.*, 2015; GACIARZ; RUDDOCK, 2017).

Os domínios estruturais e funcionais das imunoglobulinas são passíveis de separação por meio de digestão proteolítica. O fragmento de ligação ao antígeno (Fab) é composto pelas porções VH/CH1 e VL/CL, liberadas após clivagem enzimática da papaína, gerando dois Fab e um Fc. Quando clivado por pepsina,

produz a forma dimérica (Fab)₂ (BERELI *et al.*, 2015; KOMATSU *et al.*, 2014; TAHERIAN *et al.*, 2018).

Essa particularidade é importante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que fragmentos de anticorpos possuem a vantagem de maior penetrabilidade nos tecidos, serem eficazes e não induzirem a resposta efetora (BARBAS, 2001; MORAIS *et al.*, 2014; HOLLIGER & HUDSON, 2005). O fragmento Fab, em seu formato monomérico, permite maior estabilidade, capacidade de reconhecimento com alta afinidade ao seu alvo, sem problemas quanto à avidéz (ZHANG, QING *et al.*, 2007; KOERBER *et al.*, 2015).

Anticorpos monoclonais são moléculas proteicas utilizadas, rotineiramente, para fins terapêuticos e diagnósticos. Além disso, devido à sua excelente capacidade de reconhecer seletivamente o alvo (NILVEBRANT & ROCKBERG, 2018) têm sido empregadas na identificação de antígenos tumorais, por ensaios tradicionais ou por métodos de varredura como o *Phage Display* (WEINER *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2003). Nesse contexto, fragmentos de anticorpos expressos em bacteriófagos vem sendo desenvolvidos em plataformas de alto rendimento (KOERBER *et al.*, 2015) principalmente nos formatos Fab e scfv (RIZK *et al.*, 2017; RAHBARNIA *et al.*, 2017; LEDSGAARD *et al.*, 2018).

A região específica do antígeno reconhecida pelo anticorpo é denominada epítopo. Estes podem ser lineares ou descontínuos, dependendo da disposição de seus resíduos e de sua estrutura tridimensional na interação com a imunoglobulina (NILVEBRANT & ROCKBERG, 2018). Com o advento da engenharia de anticorpos, seleção *in vitro* e tecnologia do DNA recombinante (NILVEBRANT & ROCKBERG, 2018) moléculas promissoras vem sendo construídas (BROOKS *et al.*, 2014) e caracteriza-las se torna crucial para a medicina translacional (BALLEW; REIFERT; DAUGHERTY, 2018).

Na oncologia clínica, nos últimos 40 anos, 21 anticorpos foram aprovados para imunoterapia contra o câncer pela *Food and Drug Administration* (FDA) (ALMAGRO *et al.*, 2018). De fato, o mapeamento de epítopos vem se destacando na última década, ao fornecer dados importantes para a caracterização de anticorpos de interesse clínico, estratificando pacientes, desenvolvendo modelos vacinais (VOLK *et al.*, 2016) e novos direcionadores de drogas (LIU, BIN *et al.*, 2004; TRAIL *et al.*, 2018). Além disso, a elucidação precisa de alterações

estruturais tridimensionais ou moleculares podem auxiliar na compreensão da tumorigênese e malignidade (STEPHEN & LANE, 1992).

Um dos grandes desafios no CM consiste no desenvolvimento de terapias específicas para o subtipo triplo-negativo (COLLIGNON *et al.*, 2016). Tomao *et al.* (2015) descreveu a existência de características moleculares inerentes a esse tumor passíveis de abordagem terapêutica. O *Phage Display*, descrito pela primeira vez na década de 1985, consiste na busca de peptídeos ligantes a alvos específicos por meio da utilização de vetores virais (SCOTT & SMITH, 1990). Essa técnica tem se mostrado promissora no mapeamento de epítomos-chave para desvendar os mecanismos inerentes ao surgimento e progressão de diversas doenças, uma vez que não exige conhecimento prévio de seus alvos (ARAP *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2018).

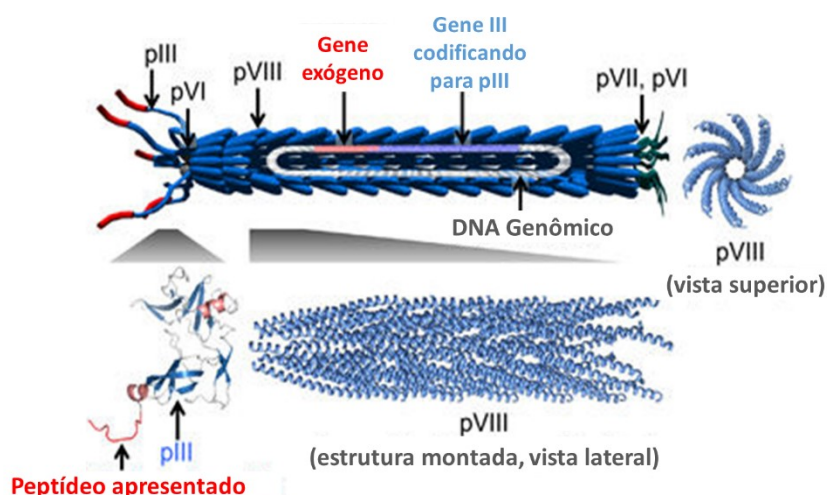
1.3 PHAGE DISPLAY

O *Phage Display* consiste em uma técnica baseada na apresentação de peptídeos ou proteínas expressos na superfície de bacteriófagos (BARBAS, 2001b). Revolucionou a biologia ao permitir a identificação de ligantes para fins de compreensão e diagnóstico de diferentes doenças (SMITH, 1985; SMITH & PETRENKO, 1997; AZZAZY & HIGHSMITH, 2002; KEHOE & KAY, 2005; GAGIC *et al.*, 2016) ou para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas envolvendo o mapeamento de epítomos, o bloqueio de receptores e o direcionamento de drogas (XING *et al.*, 2018), o que evidencia sua importância nos dias atuais (SHAVE *et al.*, 2018).

No *Phage Display* são utilizados bacteriófagos que infectam bactérias gram-negativas portadoras de *pilus* sexual (PENNAZIO, 2006; STRAUS; BO, 2018). Não induzem o ciclo lítico, o que possibilita a amplificação procariótica e obtenção de altos títulos virais (ARAP, 2005). A partir da clonagem na região gênica correspondente, peptídeo exógenos são expressos nas porções N-terminais da proteína pIII ou pVIII o (SMITH; SCOTT, 1993; ZHANG, SHUAI *et al.*, 2015). Sidhu (2001) destaca a maleabilidade do revestimento deste fago frente às intervenções genéticas, permitindo a expressão de curtas sequências de aminoácidos, mas também fragmentos de anticorpos com potencial biotecnológico (SIDHU, 2001).

O bacteriófago filamentosso mais amplamente utilizado é o M13, composto por um DNA circular fita simples fita envolto por um capsídeo proteico, sendo este constituído por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 2) (SAWADA, 2017). Apesar da proteína pVIII ser a mais abundantemente expressa (cerca de 2700 cópias) e também passiva de fusão com peptídeos exógenos, o sistema baseado em pIII é mais amplamente utilizado. Esta proteína está presente em 3 a 5 cópias conferindo maior especificidade durante o processo de obtenção dos ligantes (PASCHKE, 2006; ZHANG, SHUAI *et al.*, 2015).

Figura 2: Imagem representativa de um fago filamentosso M13. Um gene exógeno é incorporado ao DNA do bacteriófago e o fenótipo representado pela sequência peptídica é expresso fusionado à pIII do vírus.



Fonte: Sawada, 2017 (Adaptada).

Uma vez exposto, esse peptídeo ou proteína pode ser selecionado em um processo conhecido como Biosseleção ou *Biopanning* (BARBAS, 2001). Para isto, é necessária que uma biblioteca combinatorial variável de peptídeos (ou fragmentos de anticorpos) seja expressa na superfície dos bacteriófagos, favorecendo sua ligação à molécula de interesse. Esse procedimento consiste em 4 etapas. O primeiro passo é a incubação da biblioteca com o substrato, a segunda é a remoção dos fagos não ligantes ou inespecíficos por sucessivas lavagens e a terceira é a eluição e amplificação dos ligantes ao infectar cepas de *E. coli* (GÜNAY; KLOK, 2015). A cada ciclo, a biblioteca de fagos é gradualmente enriquecida de

ligantes de alta afinidade, que posteriormente são isolados, sequenciados e caracterizados (T HOEN *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa caracterizou em estudo anterior, por *Phage Display*, um novo anticorpo FabC4 com relevância clínica no diagnóstico do CM e no prognóstico do CMTN (ARAÚJO *et al.*, 2014). O anticorpo recombinante foi associado com idade mais jovem, ausência do receptor de progesterona, maiores graus histológicos e fenótipo não-luminal. Além disso, identificou um subgrupo de CM triplo-negativos de bom prognóstico. No entanto, a caracterização adicional de seu alvo é essencial para o manejo clínico dessa neoplasia.

Dada a natureza heterogênea, multifatorial e multifocal do CM, a busca por potenciais biomarcadores e suas associações moleculares envolvidas na ocorrência e desenvolvimento dessa doença é fundamental para um diagnóstico mais preciso e para esclarecer o fenótipo neoplásico (MITTAL *et al.*, 2017). Recentemente vários estudos vem sendo realizados voltados para a identificação e validação de antígenos para detecção de tumor (ZHOU, JUAN *et al.*, 2017), sobretudo na busca de biomarcadores séricos (GERASIMOV *et al.*, 2017).

Neste estudo, realizamos um ensaio de bioprospecção contra o FabC4 utilizando uma biblioteca PH.D-12 a fim de mapear seu epítopo. Nossos resultados abrem novas perspectivas no diagnóstico de CM e no desenvolvimento de novas terapias, além de demonstrar a seletividade do procedimento utilizado. Selecionamos clones de fagos que mimetizam epítomos (mimotopos) correspondentes às proteínas Anexina A2 e Citoqueratina 10 (CK10) e descrevemos, pela primeira vez, a co-localização dessas duas moléculas no CMTN.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Mapear, por meio da tecnologia de *Phage Display*, os epítomos ligantes ao fragmento de anticorpo FabC4.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Utilizar a tecnologia de *Phage Display* na seleção de peptídeos que possuam afinidade ao fragmento de anticorpo FabC4;
- ✓ Caracterizar por meio de sequenciamento e ferramentas de bioinformática os peptídeos expressos na superfície dos fagos selecionados;
- ✓ Avaliar o potencial diagnóstico dos fagos por ensaios imunoenzimáticos *Phage-ELISA* frente a anticorpos IgG presentes no soro de pacientes com CM, Doença Benigna da Mama (DBM) e controles saudáveis;
- ✓ Proceder a síntese química dos peptídeos expressos na superfície dos clones mais reativos para o FabC4 e avaliá-los como ferramenta diagnóstica;
- ✓ Avaliar a imunorreatividade dos peptídeos sintéticos frente ao FabC4;
- ✓ Predizer as estruturas tridimensionais e as interações inter-estruturais entre os peptídeos selecionados pelo *Phage Display* e o FabC4 por meio de modelagem e *Docking Molecular*;
- ✓ Validar a expressão dos alvos do FabC4 (Anexina A2 e Citoqueratina 10) em linhagens celulares;
- ✓ Predizer os epítomos correspondentes aos alvos protéticos por modelagem e *Docking Molecular*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE

3.1.1 Expressão em sobrenadante de cultura

Bactérias da linhagem não supressora TOP10 foram transformadas com fagomídeos portando a sequência do clone FabC4. Para sua expressão, 5 mL de meio SB (peptona de caseína 3%, extrato de levedura 2% e MOPS 1%) contendo 2% de glicose (2M) e 50µg/mL de carbenicilina foram inoculados com 20µL dos transformantes e crescidos por 16 horas sob agitação (260 rpm) a 37°C. No dia seguinte 2mL da cultura foram transferidos para um novo meio (200mL) suplementado como descrito acima, porém com 100µg/mL de antibiótico e mantidos sob agitação a 37°C até atingirem a densidade ótica de 600nm (OD_{600nm}) próxima de 1.

Após esse período a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 10 min e o sedimento foi ressuspensionado em 1L de SB, nessa etapa suplementado com IPTG (isopropil-β-D- thiogalactopiranosídeo - 2mM) e carbenicilina (100µg/mL). Para expressão do FabC4 em sobrenadante de cultura, esse meio foi incubado sob agitação a 30°C por 18 horas, seguida de centrifugação por 40 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um novo recipiente estéril para posterior purificação.

Os passos acima descritos também foram realizados para a expressão de um Fab irrelevante (FabIR). Este foi utilizado como controle nos demais experimentos.

3.1.2 Purificação e concentração

O anticorpo recombinante FabC4 e o irrelevante foram purificados em cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) utilizando o *kit HisTrap* (GE Healthcare), conforme as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Em resumo, aos sobrenadantes de cultura foram adicionados 10mM de imidazol, o pH foi ajustado para 7,4 e as soluções filtradas em filtro Milipore de

0,22µm. Foram injetados 30mL das amostras e os Fabs foram eluídos com tampão Imidazol (Fosfato 20mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500mM, ph 7,4). Foram coletadas frações de 500µl para análises por *dot blotting* e as correspondentes aos picos de eluição foram reunidas em um único tubo (um para cada um dos anticorpos).

Para a concentração dos purificados foram utilizadas as colunas Amicon 3kda (Millipore) e o tampão de eluição com imidazol foi substituído por tampão fosfato salino 1X (PBS1X) em sucessivas centrifugações de 30 min a 7500 rpm a 4°C. As amostras foram quantificadas utilizando o *kit Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo) segundo as especificações do fabricante.

3.1.3 *Dot-blotting* para detecção das moléculas de Fabs

Para a confirmação da presença dos Fabs nos purificados concentrados foi realizado o ensaio de *dot-blotting*. Para tal, foram pipetados 5µl das soluções coletadas após centrifugação em coluna Amicon (Millipore) em uma membrana de nitrocelulose *Amersham Protran Premium 0,2µm NC (GE Healthcare)*, mantida por 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Posteriormente, esta foi bloqueada com PBS1X-BSA3% durante 1 hora a T.A.

Após lavagem com PBS1X, a membrana foi incubada com anticorpo anti-HA (anti-hemaglutinina) conjugado com peroxidase (*Roche Applied Science*) (diluído 1:5.000 em PBS1X-BSA3%) e novamente mantida por 2 horas à T.A., sob agitação. Procedeu-se a lavagem com PBS1X-Tween 20 0,05% (PBST) e o ensaio foi revelado utilizando o substrato 3,3-Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Fast®*). A reação foi paralisada com água destilada.

3.2 BIOSSELEÇÃO

3.2.1 Extração de proteínas totais de pacientes

Este projeto foi realizado em conjunto com o Serviço Obstétrico do Hospital Universitário da UFU. O protocolo do estudo foi aprovado sob o número 176/2008 pelo Comitê de Ética em Pesquisa local, de acordo com a Declaração de Helsinki

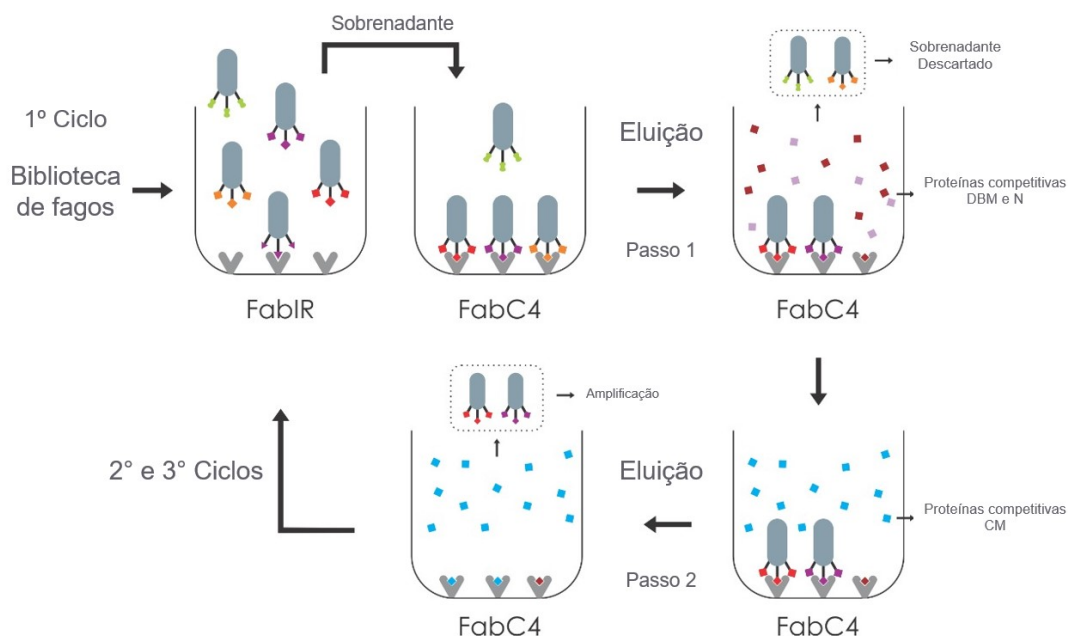
de 1975, revisada em 2008, e um termo e consentimento livre esclarecido foi obtido de todos os participantes.

Os fragmentos de tecidos das pacientes foram macroscopicamente dissecados e macerados em nitrogênio líquido utilizando cadinho com bastão de porcelana em tampão de extração (Tris-HCL 20mM pH7,2, EDTA 10mM, EGTA 2mM, sacarose 250mM, DTT 1mM, Benzamidina 1mM). O material resultante foi transferido para um microtubo e centrifugado a 20.000 x *g* durante 30 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a preservação de sua integridade foram adicionados os inibidores de protease benzamidina (100mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (150 mM). Foram extraídas proteínas de tecidos de pacientes (cinco para cada grupo) diagnosticadas com CM ductal invasivo, Doença Benigna da Mama (DBM) e amostras provenientes de mamoplastia, consideradas normais (CO).

3.2.2 Mapeamento dos epítomos por *Phage Display*

Foi utilizada uma biblioteca de peptídeos aleatórios de 12 aminoácidos fusionados à proteína de revestimento menor (pIII) dos bacteriófagos M13 - PhD-12 (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). Nesta abordagem de bioprospecção foram utilizadas $1,5 \times 10^{11}$ partículas virais em três ciclos de seleção contra o anticorpo FabC4, amplificadas como descrito anteriormente (BARBAS, 2001), com modificações. O desenho experimental encontra-se demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Imagem ilustrativa da estratégia utilizada no processo de biosseleção. Destaca-se a eluição em duas etapas, visando identificar proteínas referentes ao processo tumoral. O ciclo apresentado foi repetido três vezes.



Para a seleção foram utilizados 10µg do FabC4 e do FabIR imobilizados em uma placa de 96 poços por 24h a 4°C. O bloqueio foi realizado por 1h a 37°C com PBS1X-BSA3%, seguido de duas lavagens com 300µL de TBS-T0,1% (solução salina tamponada com Tris e 0,1% de Tween 20). Em uma estratégia de seleção subtrativa, o FabIR foi incubado com $1,5 \times 10^{11}$ partículas de fago da biblioteca de PhD-12 em 200µL de solução de TBS à T.A. durante 30 min. Posteriormente, o sobrenadante contendo os fagos não ligantes foram expostos ao FabC4 por 1 hora a T.A.

Após esse período, o poço contendo o FabC4 foi lavado dez vezes com TBS-T0,1% e as partículas que não se ligaram foram descartadas. Em seguida os fagos que reconheceram o FabC4 foram desligados do alvo por meio de uma eluição em duas etapas objetivando selecionar peptídeos relacionados e específicos ao CM. Em um primeiro momento, o complexo FabC4-Fago foi incubado com proteínas extraídas de tecidos benignos e normais (30 min a T.A.) eluindo-se competitivamente, os peptídeos miméticos a proteínas não-tumorais. Estas foram

descartadas. Os vírus que permaneceram ligados ao FabC4 foram submetidos a uma segunda eluição competitiva com proteínas extraída de tecidos com CM (30 min a T.A.) desligando, assim, os peptídeos miméticos a proteínas tumorais. Estes foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738 (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), purificados com PEG-NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) e utilizados em um novo ciclo de seleção. A partir do segundo aumentou-se a estringência do tampão de lavagem de 0,1% para 0,5%, de Tween 20. Após o terceiro *round*, colônias bacterianas individuais contendo clones de fagos amplificados foram cultivadas em uma placa *deep well* para validação do *biopanning* e seleção de clones promissores.

3.2.3 Amplificação e purificação dos fagos recombinantes

Os fagos foram amplificados utilizando uma colônia de *E. coli* da linhagem ER2738 previamente inoculada em 20mL de meio Luria-Bertani (LB) estéril contendo tetraciclina (20 µg/mL); mantido sob agitação a 37°C até OD_{600nm} = 0.3. Esta cultura foi diluída em novo meio LB contendo tetraciclina (1mL de cultura/120mL de meio) sendo esta distribuída em uma placa *deep well* (1mL/poço).

Usando palitos esterilizados, colônias azuis (bactérias infectadas com fagos) foram retiradas da placa de petri (referente ao terceiro *round* não-amplificado) e transferidas para um poço da placa *deep well* contendo a cultura previamente diluída. Esta foi vedada com um adesivo e incubada, por 5 horas, sob forte agitação a 37°C. Para segurança, 100µL de cada poço foram estocados em uma placa de microtitulação (*Falcon® -Thermo Fisher*) acrescidos de 100µL de glicerol 50%. Após a incubação, a placa *deep well* foi centrifugada por 20 minutos a 3700 rpm e os sobrenadantes transferidos para outra placa estéril. A esta foi adicionado 1/6 do volume em PEG/NaCl com incubação por 14 horas a 4°C. Transcorrido esse período, a placa foi centrifugada por 1 hora a 3700 rpm e todo o sobrenadante dispensado. O precipitado foi ressuscitado em 200µL de PBS1X.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FAGOS SELECIONADOS

3.3.1 Reatividade ao FabC4

Para confirmar o reconhecimento dos peptídeos selecionados pela molécula alvo foram realizados ensaios de *Phage-Elisa* em duplicata. Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc MaxiSorp-Sigma®) foram revestidas com 1 µg/poço de FabIR e FabC4 diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (50mM pH 9,6); mantidas por 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados com PBS-T0,1% e bloqueados durante 1h a 37°C com PBS-BSA3%.

Posteriormente, a placa foi lavada duas vezes com PBS-T0,1% e o sobrenadante de cultura contendo partículas virais amplificadas ($\sim 10^{10}$ pfu/mL) foi adicionado, com posterior incubação por 1h a 37°C. Foram realizadas quatro lavagens com PBS-T0,1% para então ser pipetado o anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase (*Roche Applied Science*) diluído 1:5000 em PBS1X-BSA3%. A placa foi mantida por 1h a 37°C seguida de quatro lavagens com PBS-T0,1%.

A reação com o substrato OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) SigmaFast® (*Sigma-Aldrich*), interrompida com H₂SO₄ (2N), foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de 492 nm (*TP-Reader ThermoPlate*). O fago M13 sem exibir qualquer peptídeo (selvagem) foi utilizado como controle negativo e normalizador dos valores obtidos. Para os ensaios posteriores foram escolhidos os fagos cuja reatividade ao irrelevante foi inferior a 0,1 e ao FaC4 foi superior a 0,2.

3.3.2 Purificação de fagos promissores

Os clones que obedeceram aos critérios de absorbância descritos anteriormente foram utilizados em testes mais específicos. Para cada fago, 40mL de LB contendo tetraciclina (20µg/mL) foram inoculados com bactéria *E. coli* e a cultura mantida sob agitação a 37°C até OD_{600nm}=0,3. Um volume de 10µL de cada fago foi então adicionado, com posterior incubação sob agitação vigorosa durante 12 horas a 37°C.

Após esse período, o meio de cultivo foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl, mantido por 16 horas a 4°C. Posteriormente, procedeu-

se uma centrifugação de 10000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi diluído em 1 mL de PBS1X e centrifugado a 14000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi, então, transferido para outro tubo onde novamente acrescentou-se 1/6 do volume de PEG/NaCl, mantido durante 1 hora no gelo. Após centrifugação a 14000 rpm por 10 min o novo sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os fagos foi ressuspensionado em 200µL de PBS1X.

3.3.3 Amostras sorológicas

Foram coletadas amostras de soros de 150 pacientes categorizadas em três grupos: CM, DBM e controles saudáveis (CO), baseado em parâmetros clínico-patológicos (Tabela 1). As pacientes com CM foram classificadas de acordo com o critério TNM, e os tumores foram definidos como T1, T2, T3 ou T4. O grupo CM ainda foi classificado segundo o grau de Nottingham, como sendo grau I (GI), grau II (GII) ou grau III (GIII) e quanto à presença dos receptores hormonais RE, RPg e HER2. O status de HER2 foi considerado positivo quando score 3+ e negativo para score 0-1+; as pontuações 2+ foram excluídas das análises.

Tabela 1: Variáveis clínico-patológicas

Amostras sorológicas		
Grupo	N	Idade média (anos)
CM	50	46,2 (intervalo 30-80)
DBM	50	46,8 (intervalo 18-58)
CO	50	47,6 (intervalo 20-73)
Total	150	
Parâmetros clínico-patológicos para os pacientes com CM		
TNM	N	%
T1	19	37,5
T2	22	45
T3	4	7,5
T4	5	10
Grau de Nottingham		
	N	%
GI	5	10%
GII	28	55%
GIII	17	35%
Expressão de RPg		
	N	%
Positivo	29	57,5
Negativo	15	30

Não definido	6	12,5
Expressão de RE		
	N	%
Positivo	36	72,5
Negativo	8	15
Não definido	6	12,5
Expressão de HER2		
	N	%
Positivo	11	22,5
Negativo	31	62,5
Não definido	8	15

N, número; % percentagem; TNM, Tumor-linfonodo-metástase; RPg, receptor de progesterona; RE receptor de estrógeno; HER2, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; CM, câncer de mama; DBM, doença benigna da mama; CO, controle saudável.

3.3.4 Phage-ELISA em soro de pacientes

Ensaio de ELISA foram realizados para identificar os antígenos como circulantes. Testes preliminares foram conduzidos para determinar as condições ótimas referentes ao título viral, diluição dos soros e dos conjugados e soluções de lavagem. Após esse experimentos iniciais, microplacas de poliestireno (*Nunc MaxiSorp-Sigma®*) foram revestidas com 10^{10} pfu de cada clone de fago diluído em tampão carbonato/bicarbonato (50mM pH 9,6), incubadas por 16 horas a 4°C. Após sensibilização, as microplacas foram lavadas uma vez com PBS-T0,05% e bloqueadas a 37°C por 1 hora com 300µL de PBS-T0,05%M5% (PBST0,05% acrescido de leite desnatado a 5% - PBSTM). Em seguida, amostras de soro diluídas 1:400 em PBSTM foram incubadas por 1 hora a 37°C. Foram utilizados três *pools* de soro correspondentes a cada um dos grupos: CM (10 pacientes com carcinoma ductal invasivo); DBM (10 pacientes) e CO (10 pacientes).

As placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T0,1% e foi adicionado o anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase (*Sigma*) diluído 1: 5000 em PBSTM. Após 1 hora de incubação a 37°C e lavagem com PBS-T0,1%, foi acrescido o substrato OPD e a reação interrompida com H₂SO₄ (2N). As densidades ópticas foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA (*TP-Reader ThermoPlate*) e os experimentos foram conduzidos em triplicata.

As absorbâncias foram normalizadas com os valores obtidos para o fago M13 selvagem, utilizado como controle. Quatro clones foram, em seguida, testados individualmente em triplicata contra um novo grupo de 150 pacientes (50 CM; 50

DBM; 50 CO). O ponto ótimo de reação (*cut-off*) foi determinado baseando-se nos dados da curva ROC.

3.3.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 7.0 (*GraphPad Software Inc. - La Jolla, CA, USA*) e valores de probabilidade (P) inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

O teste ANOVA foi realizado para comparar a absorbância entre os grupos e o pós-teste de Bonferroni foi utilizado em comparações múltiplas. A curva ROC foi construída para avaliar o poder diagnósticos dos fagos e a área sob curva (ASC) determinou a sensibilidade (Se), especificidade (Sp) e razão de verossimilhança (LR + e LR2) dos clones selecionados. O teste U de Mann-Whitney foi utilizado nas comparações entre grupos para os ensaios de ELISA com 150 pacientes.

Foram realizadas análises de correlação de Pearson entre os fagos no software R (2017, *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*). Para a significância destes dados foram calculados os valores de P a partir do teste t de Student.

3.3.6 Extração de DNA e sequenciamento

Para extração do DNA dos fagos 10µl de bactérias infectadas com cada clone foram inoculados em 1mL de meio LB em placas *Deep well*. Esta foi incubada por 16 horas a 37°C sob agitação e posteriormente centrifugada a 3700 rpm durante 50 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa e incorporado 1/6 do volume de PEG/NaCl mantido a 4°C por 10 min. Após nova centrifugação durante 1 hora a 3700 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e em cada *well* foram adicionados 100µl de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI). Após breve agitação foram adicionados 250µl de etanol absoluto e a solução permaneceu incubando durante 10 min T.A.. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 40 min a 3700 rpm a 20°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 150µl de etanol 70% com nova centrifugada por 10 min

a 3700 rpm. O sobrenadante foi dispensado e o DNA dos fagos ressuspendido em 15ul de água ultrapura.

As reações de sequenciamento foram conduzidas em sequenciador automático ABI3500 (*Applied Biosystem, California, USA*), seguindo-se as recomendações do fabricante e utilizando o primer -96M13 (5'-CCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG-3'). As sequências de aminoácidos foram deduzidas a partir das sequências nucleotídicas com o auxílio do software *ExPASy* (<http://www.expasy.org>). Foi feita ainda uma análise dos peptídeos utilizando o software *SAROTUP* (<http://immunet.cn/sarotup/index.html>) para validar os peptídeos como não ligantes à superfícies de adsorção. O alinhamento via *BLASTp* (*NCBI*) permitiu a análise de similaridade dos peptídeos selecionados.

3.4 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COMO EPÍTOPOS DO FABC4

Os clones A5, A7, C4 e D6, que foram capazes de discriminar o soro de indivíduos com CM de DBM e CO por *Phage-ELISA*, foram sintetizados quimicamente pela *GenScript USA Inc*. Para aumentar a imunogenicidade, os peptídeos foram acoplados ao BSA. Ensaios imunoenzimáticos foram conduzidos para avaliar a capacidade do anticorpo FabC4 em reconhecer esses peptídeos.

Uma placa de microtitulação foi sensibilizada com 2,5 µg/poço de cada um dos peptídeos diluídos em tampão de carbonato/bicarbonato (50mM pH 9,6) e mantida por 16 horas a 4°C. Após bloqueio com PBS1X-BSA3% (1 hora a 37°C) uma única lavagem com PBS1X precedeu à adição do FabC4 (1ug), incubado por 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS1X, foi adicionado o anticorpo anti-HA marcado com peroxidase (*Roche Applied Science*) diluído 1:5000 em PBS-BSA3% por 1h a 37°C. Após lavagem com PBS1X, a reação com o substrato OPD SigmaFast® (*Sigma-Aldrich*), interrompida com H₂SO₄ (2 N), foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de 492 nm (TP-Reader ThermoPlate).

As mesmas condições foram utilizadas para analisar a capacidade diagnóstica dos peptídeos frente ao soro dos 150 pacientes previamente descritos. Novamente o teste ANOVA e Mann Whitney foram utilizados para fins comparativos entre grupos com o auxílio do software GraphPad Prism 7.0 (*GraphPad Software Inc. - La Jolla, CA, USA*). Foram considerados significativos valres de P<0,05.

3.5 ANÁLISES *IN SILICO*

3.5.1 Sequenciamento do anticorpo FabC4

O DNA dos fagos contendo a sequência codificante para FabC4 foi isolado e purificado utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN®) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA de fita simples foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com *GelRed* (1:500 - Uniscience) e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Amersham Biosciences®).

A reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar em aparelho *ABI3730* (*Applied Biosystems*®), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. (*Myleus Biotechnology*®) e os primers mmb4 (5'-GCTTCGGGCTCGTATGTTGTGT-3') e mmb5 (5'-CGTTTGCCATCTTTTCATAATC-3'). Para análise das sequências utilizou-se o software *Sequence Scanner* (*Applied Biosystems*®).

3.5.2 Modelagem molecular e docking

Para determinar a estrutura tridimensional do FabC4, assim como as possíveis interações e ligações entre os peptídeos e o anticorpo recombinante foram realizados ensaios *in silico* de modelagem molecular e *docking*. A estrutura tridimensional do fragmento de anticorpo FabC4 foi modelada a partir da construção em FASTA das cadeias leves e pesadas das porções variáveis e constantes utilizando o software *RaptorX* (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>). Este, em seu script, inclui ferramentas de predição por homologia a proteínas conhecidas, com estruturas cristalográficas depositadas em bancos de dados para predizer o modelo 3D ótimo para uma sequência definida de aminoácidos. O modelo foi escolhido com base nos escores apresentados bem como com o auxílio do software *Verify 3D* (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>) e *RAMPAGE: Ramachandram Plot Assessment* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Os peptídeos foram modelados pelo método *de novo* utilizando o software PEPFOLD2.0 - RPBS (<http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>) e os filtros do programa. As interações (*docking* molecular) entre os peptídeos e o FabC4 foram preditas pelo software HPEPDOCK (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>). Já os arquivos de visualização tridimensionais dos alvos ANXA2 e Ck10 foram localizados em banco de dados de proteínas, mais especificamente o Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/pdb>).

Foram realizados, ainda, *dockings* moleculares, via *PATCHDOCK* (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), entre proteínas previamente descritas como alvos do FabC4 (ARAÚJO, 2014) e o anticorpo recombinante. Finalmente, a predição para avaliar se os epítomos selecionados correspondem a regiões específicas dessas proteínas, e todas as visualizações e análises foram realizadas no software *PyMol*.

3.6 ENSAIOS CELULARES

3.6.1 Linhagens

Foram utilizadas as linhagens celulares tumorais mamárias MCF-7 (fenótipo luminal) e MDA-MB-231 (fenótipo triplo-negativo) obtidas do ATCC. Seu cultivo foi conduzido em meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (100 mg/mL). As células foram mantidas em estufas a 37°C com taxa de CO₂ a 5%.

3.6.2 Imunofluorescência

Ensaio de imunofluorescência foram realizados para a visualização dos alvos do FabC4 em células tumorais mamárias. Após confluência, estas foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas a uma concentração de 1.10^5 células em lamínulas esterilizadas. Depois de aderidas, foram realizadas duas lavagens com PBS1X e as células foram fixadas e permeabilizadas adicionando o reagente *Cytofix Cytoperm* (BD Biosciences, San Diego, California, USA) seguido de incubação durante 20 min a 4°C. Adicionou-se a solução PBS1X-Glicina 0,1M,

mantida durante 10 min. Após três lavagens com PBS1X procedeu-se o bloqueio com PBS1X-BSA1% durante uma hora.

As células então foram incubadas durante 1 hora T.A. com os anticorpos primários anti-Anexina II (1:100, *Life Technologies*®) anti-CK10 (1:100, *Sigma-Aldrich*®) e FabC4 (1µg/µL) diluídos em PBS1X. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS1X, com posterior adição dos anticorpos secundários incubados por uma hora T.A: anti-HA marcado com FitC para o anticorpo FaC4; anti-IgG marcado com FitC e anti-IgG marcado com Ficoeritrina (PE) para a detecção de Anexina II, e marcado com Ficoeritrina para a visualização de CK10.

Após uma lavagem com PBS1X os núcleos foram contrastados com o reagente TO-PRO-3® Iodide (1:250, *Invitrogen*). As localizações do FabC4, Anexina II e CK10 foram avaliadas em microscopia confocal com sobreposição das imagens (*Zeiss LSM510*).

4 RESULTADOS

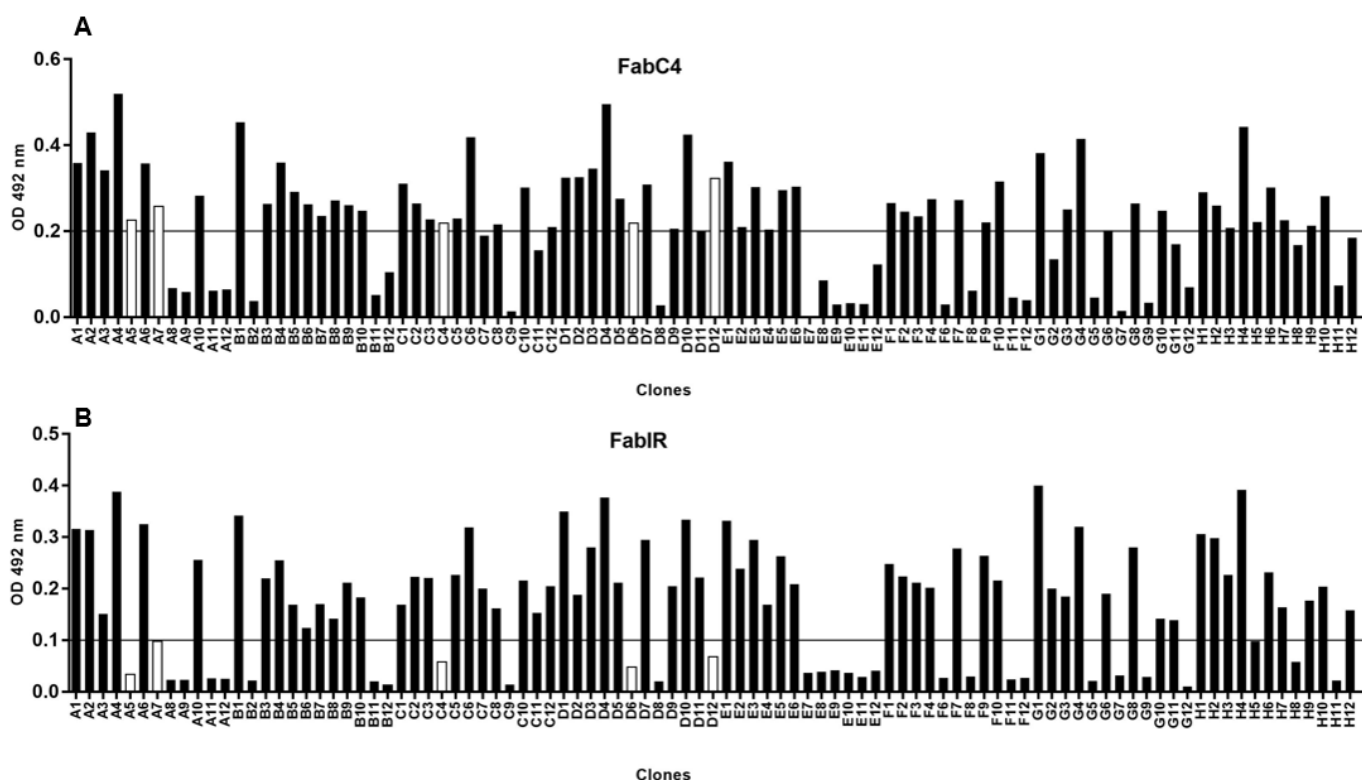
No presente estudo nós mapeamos os epítomos do anticorpo recombinante FabC4 (ARAÚJO et al., 2014) utilizando sucessivos ciclos de seleção de peptídeos apresentados na superfície de fagos filamentosos. Nós combinamos análises *in vitro* e *docking* molecular para validar os peptídeos enquanto ligantes ao FabC4 e, adicionalmente, como passíveis de se tornarem uma estratégia diagnóstica para o CM. A caracterização dos alvos do FabC4, Anexina A2 (ANXA2) e Citoqueratina 10 (CK10) (ARAÚJO et al., 2014), em células MCF7 e MDA-MB-231, aliada à capacidade dos peptídeos em mimetizar suas regiões, revelam nossas moléculas como promissoras em formulações. Estas podem auxiliar no tratamento da doença e, sobretudo, na caracterização de tumores triplo-negativos.

4.1 SELEÇÃO DE MIMOTOPOS POR *PHAGE DISPLAY*

Com o objetivo de identificar os peptídeos ligantes ao FabC4, uma biblioteca P.h.D.-12 foi utilizada em três ciclos de seleção. O FabC4 foi previamente definido como um marcador prognóstico em pacientes com CM triplo-negativo, inédito quanto ao seu comportamento nesse subtipo tumoral (ARAÚJO et al., 2014).

Para confirmar as especificidades dos fagos selecionados, 95 clones foram randomicamente escolhidos do terceiro ciclo e suas afinidades avaliadas por ensaios de *Phage*-ELISA. Um anticorpo recombinante irrelevante e o fago selvagem foram utilizados como controles experimentais. Apesar de vários clones apresentarem elevada reatividade ao FabC4 (absorbância acima do fago selvagem), apenas cinco foram selecionados, considerando o parâmetro baseado na absorbância acima de 0,2 para o FabC4 e inferior a 0,1 para o FabIR (Figura 4). Essa estratégia permitiu a identificação de fagos com elevada afinidade ao FabC4.

Figura 4: Triagem dos fagos selecionados por *Phage Display* e identificação dos reativos ao anticorpo recombinante FabC4. Em (A) são apresentadas as afinidades dos clones ao alvo FabC4 e em (B) ao Fab irrelevante (FabIR). As barras brancas representam os fagos que obedeceram ao parâmetro de absorbância acima de 0,2 para o FabC4 e inferior a 0,1 para o FabIR.

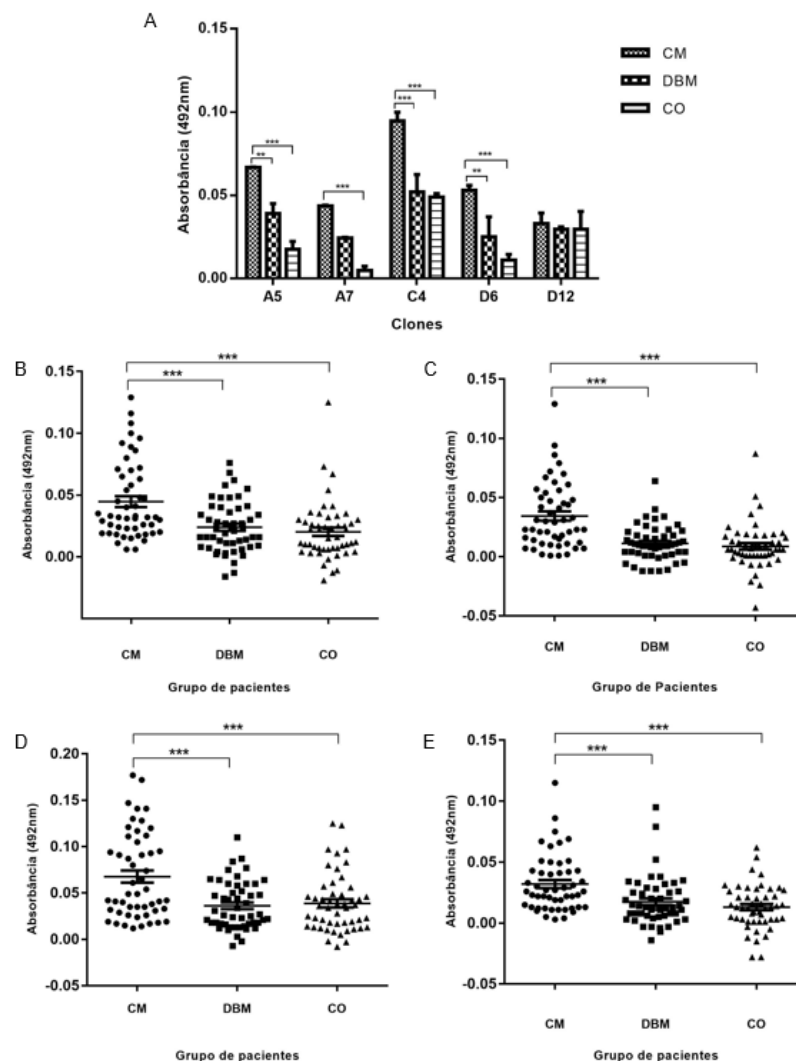


4.2 PERFIL DIAGNÓSTICO DOS FAGOS SELECIONADOS

Para investigar a sensibilidade desses fagos a IgGs circulantes de pacientes com CM, DBM e CO, testes imunoenzimáticos foram conduzidos em duas etapas

(Figura 5). Primeiramente, foi utilizado três *pools* de soros constituídos por 10 amostras de cada grupo para uma avaliação preliminar dos cinco clones escolhidos (Figura 5A). As reatividades dos fagotopos em soros agrupados diferenciaram significativamente o CM do grupo DBM em três dos cinco clones testados. O fago A7 foi mais reativo ao soro de CM apenas quando comparado ao das pacientes CO ($P < 0,001$).

Figura 5: Imunorreatividade dos fagos selecionados a imunoglobulina G de amostras de pacientes com câncer de mama (CM), doença benigna da mama (DBM) e mulheres saudáveis (CO). A triagem inicial contra o *pool* de soros foi realizada para selecionar fagos capazes de discriminar CM dos outros grupos (A). Em um segundo momento, soros de 50 mulheres de cada grupo foram avaliados individualmente. Os clones A5 (B), A7 (C), C4 (D) e D6 (E) diferenciaram CM e CO. As absorbâncias foram normalizadas com o fago M13 selvagem sem peptídeo exibido e o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre grupos. Os valores medianos de cada grupo são apresentados pelas linhas horizontais. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.



Em um segundo momento, os fagos A5, A7, C4 e D6 foram conduzidos a ensaios de ELISA com um número maior de pacientes (50 de cada grupo). Todos os valores foram normalizados com a absorbância obtida para o fago selvagem. Os resultados demonstraram uma seleção por afinidade bem-sucedida de quatro mimotopos capazes de reconhecer, significativamente, IgGs presentes no soro de pacientes com CM.

O clone A5 apresentou valores médios de absorbância relativa de 0,031 para amostras de tumor mamário, 0,020 para DBM e 0,023 para amostras CO (Figura 5B). Considerando o fago A7 (Figura 5C), para o CM a absorbância relativa média foi de 0,034. Além disso, sua reatividade foi menor a soro de pacientes com DBM (0,011) e CO (0,008). Observou-se que os valores de absorbância foram 3,10 e 4,25 vezes maiores no tumor, quando comparados às dos demais grupos (DBM e CO, respectivamente).

O clone C4 (Figura 5D) apresentou a maior média de absorbância relativa para as lesões malignas (CM=0,067, DBM=0,036 e CO=0,038). Finalmente, o fago D6 (Figura 5E) demonstrou o perfil de absorbância de 0,032, 0,017 e 0,013 para CM, DBM e CO, respectivamente. Para nenhum dos clones foi verificada diferenças estatisticamente significantes entre pacientes DBM e CO.

A curva ROC foi então construída para predizer o valor global de cada fago como ferramenta diagnóstica. A área sob a curva (AUC) foi calculada, assim como a sensibilidade, a especificidade e a razão de verossimilhança (Tabela 2). Como no ensaio de ELISA, os quatro clones apresentaram comportamento semelhante com AUC acima de 0,70, exceto o fago C4 quando seus dados para DBM foram comparados aos CO.

Tabela 2: Curva ROC para os fagos selecionados por *Phage Display* contra o FabC4 recombinante.

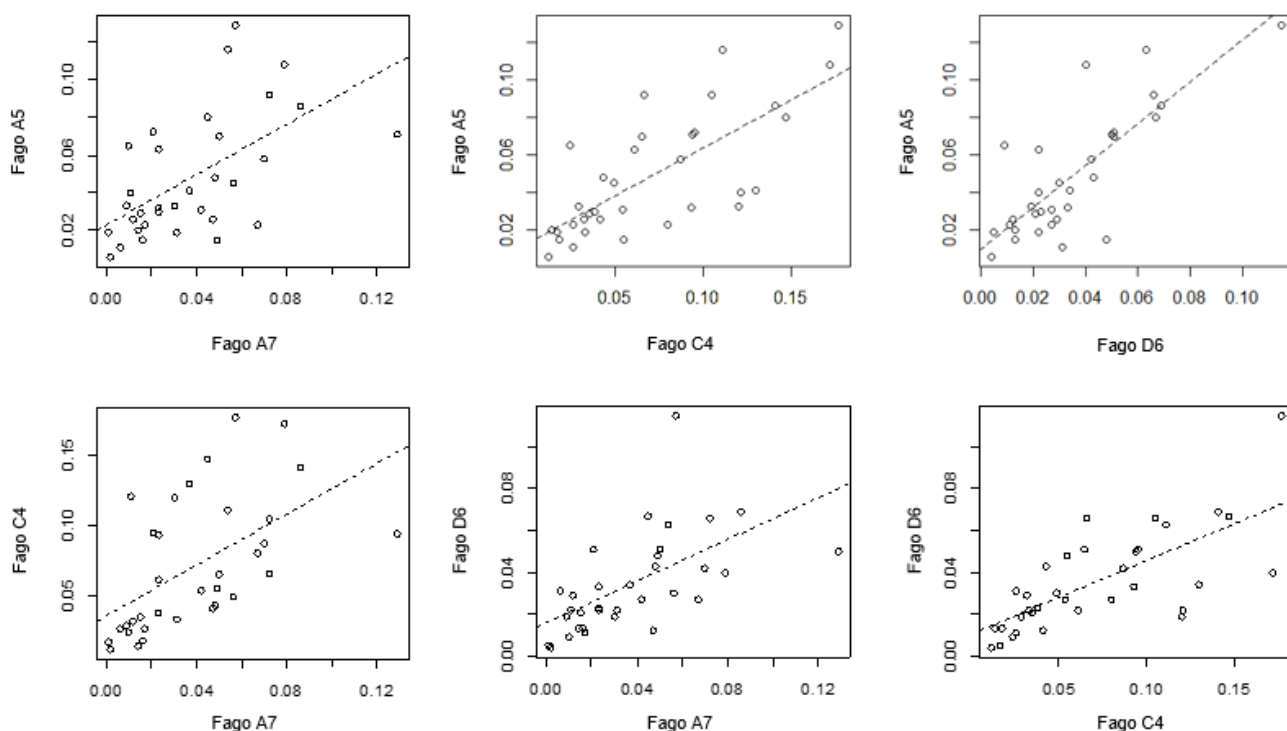
	Fago A5		Fago A7		Fago C4		Fago D6	
	CM x DBM	CM x CO	CM x DBM	CM x CO	CM x DBM	CM x CO	CM x DBM	CM x CO
AUC	0.702	0.756	0.767	0.805	0.706	0.683	0.71	0.74
Valor- p	0.00052	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0004	0.0016	0.00030	<0.0001
Cut-off	0.043	0.016	0.01	0.006	0.025	0.025	0.03	0.008
Sensibilidade	38%	40%	50%	52%	48%	44%	42%	40%
Especificidade	82%	90%	82%	90%	82%	82%	80%	94%
Verossimilhança	2.11	1.80	1.57	1.88	1.58	1.46	2.10	1.57

AUC: Área sob a curva; CM: Câncer de Mama; DBM: Doença benigna da mama; CO: mulheres saudáveis.

O clone A7 se destacou pelo conjunto de valores: AUC=0.767 ($P=0.01$), sensibilidade de 50% e especificidade de 82%, comparando CM com DBM e AUC=0.805 ($P=0.01$), sensibilidade de 52% e especificidade de 90%, comparando CM e CO. Já o clone A5 apresentou uma baixa sensibilidade ao se diferenciar pacientes malignos dos diagnosticados com doença benigna.

Portanto, os quatro fagos selecionados exibiram um perfil de reatividade semelhante. Avaliamos, então, a correlação entre as absorbâncias para o grupo CM, com o objetivo de demonstrar o sinergismo no comportamento desses clones. Análises de correlação linear corroboraram nossa hipótese (Figura 6). Verificamos uma correlação positiva significativa em todas as análises ($p<0,05$). Para cada uma das duplas de clones: A5xA7 ($R= 0,5917$, $p= 0.000228$), A5xC4 ($R= 0,734$, $p= 7,7e-07$), A5xD6 ($R= 0,806$, $p= 8,841e-09$), C4xA7 ($R= 0,554$, $p= 0,000127$), D6xA7 ($R= 0,61$, $p= 0,000127$) e D6xC4 ($R= 0,71$, $p= 2,62e-06$).

Figura 6: Análise das correlações entre os resultados de ELISAs para os clones A5, A7, D6 e C4 em amostras de pacientes com câncer de mama. Todos os fagos analisados apresentaram correlação positiva e foram validados pelo teste t com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

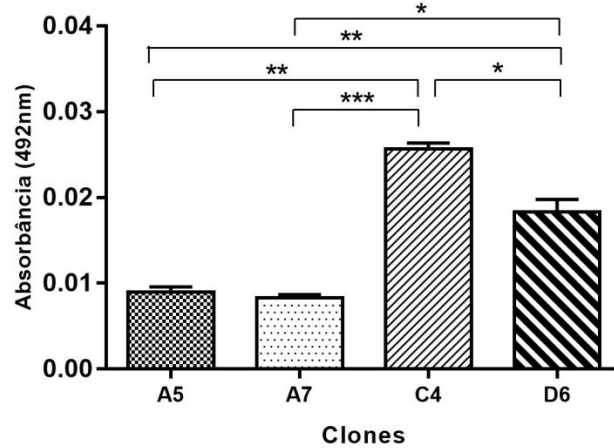


4.3 ESPECIFICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Fragmentos de ssDNA circular dos quatro clones validados foram extraídos, sequenciados e traduzidos pelo programa ExPASy. Foram obtidas sequências distintas: A5-LTPLTSPGTLLR, A7-RYLPTFDMVSRT, C4-VMPAAKYSRLRVL e D6-VTPCSSFSSFLP, indicando que esses motivos foram positivamente selecionados durante o processo de *biopanning*. As análises no banco de dados SAROTUP confirmou a não redundância dessas sequências.

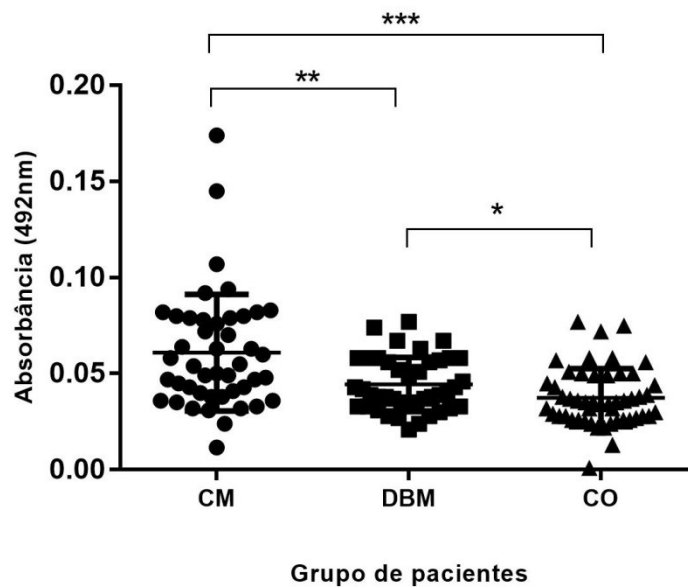
Uma vez que se objetivou mapear o epítipo do FabC4, os peptídeos foram então quimicamente sintetizados (GenScript) e avaliados quanto à sua capacidade de se ligarem ao fragmento de anticorpo por ELISA (Figura 7). Todos reagiram ao FabC4. O peptídeo pC4 apresentou a maior absorbância quando comparado aos demais ($p < 0,05$ para todas as comparações), seguido pelo pD6 (também $p < 0,05$ para todas as comparações).

Figura 7: Reatividade dos peptídeos sintéticos ao FabC4. Peptídeos C4 e D6 apresentaram maiores valores de absorbâncias, significantes em relação ao demais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.



Os quatro peptídeos foram então testados quanto à sua capacidade diagnóstica contra o soro de 150 pacientes (50 de cada grupo de estudo). Apenas o peptídeo pD6 apresentou reatividade diferencial entre as amostras (Figura 8).

Figura 8: Especificidade do peptídeo pD6 a soro de pacientes com câncer de mama (CM), doença benigna da mama (DBM) e mulheres saudáveis (CO). O peptídeo foi capaz de diferenciar os três grupos de estudo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.



A curva ROC foi significativa para CM x DBM (AUC= 0,68) e CM x CO (AUC = 0,78) com sensibilidades de 88,10% e 42,2% e especificidades de 86,0% e 51,1%, respectivamente.

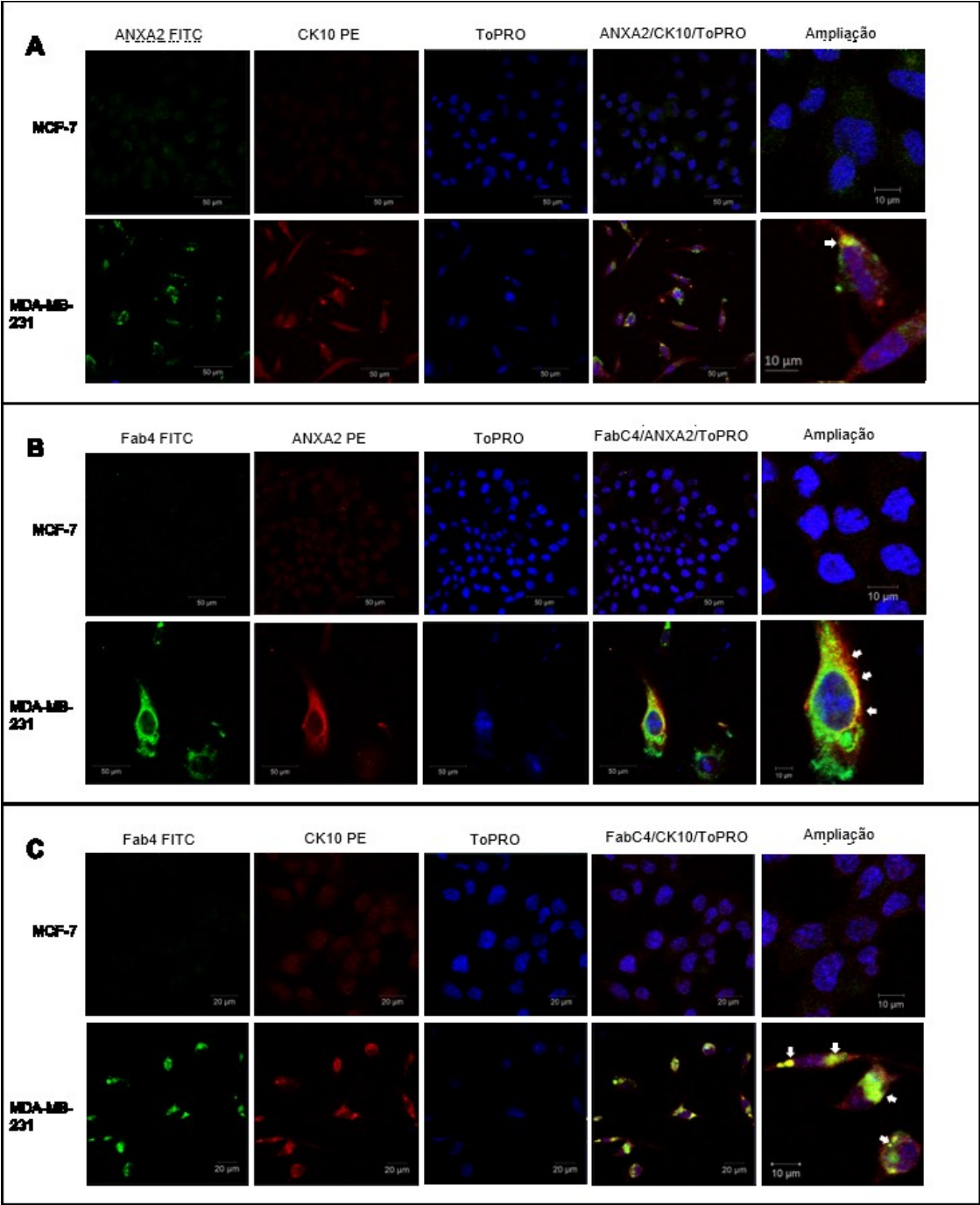
4.4 COMPORTAMENTO PROTEICO EM CELULAS DE CÂNCER DE MAMA

Ensaio celulares foram conduzidos a fim de avaliar a capacidade do anticorpo FabC4 de se ligar aos alvos ANXA2 e CK10, já previamente descritos (ARAUJO et al., 2014) (Figura 9). Em um primeiro momento, foi avaliado o comportamento dessas proteínas nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231 (Figura 9A-B). A ANXA2 foi encontrada, predominantemente, no citoplasma das células MCF7. Essa marcação se mostrou menos intensa do que em MDA-MB-231 (Figura 9A-B).

Identificada no citoplasma, a marcação para a CK10 também foi diferente entre as duas linhagens, mostrando-se mais intensa na MDA-MB-231. Nestas células, a proteína também foi visualizada no núcleo. Interessantemente, nesse modelo celular, as duas proteínas co-localizaram no citoplasma (Figura 9A-seta), comportamento ainda não descrito em tumores mamários.

A marcação para o FabC4 foi citoplasmática e também mais intensa na linhagem MDA-MB-231, seguindo o perfil de seus alvos (Figura 9B-C). A co-localização com a ANXA2 (Figura 9B-seta) e CK10 (Figura 9C-seta) confirmam a capacidade desse anticorpo recombinante em reconhecer essas proteínas.

Figura 9: Marcação da Anexina A2 (ANXA2), Citoqueratina 10 (CK10) e FabC4 nas linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-321. A localização imunofluorescente da ANXA2 nas células foi observada com o anticorpo anti-ANXA2 (marcado com FITC em A e PE em B); a citoqueratina 10 com o anti-CK10 (PE) e o FabC4 foi localizado com coloração por marcação com anti-HA (FITC). Os núcleos foram contra-corados com TO-PRO-3 (azul). As co-localizações das proteínas estão indicadas pelas setas. Imagens mescladas em roxo indicam a presença de CK10 no núcleo das células MDA-MB-231(A e C).



4.5 DOCKING MOLECULAR

O FabC4 foi modelado *in silico* de acordo com sequencia linear sequenciada apresentado na Tabela 3. Foi possível sequenciar com sucesso as três CDRs assim como as suas porções constantes para posterior modelagem molecular.

Tabela 3: Sequência do anticorpo FabC4

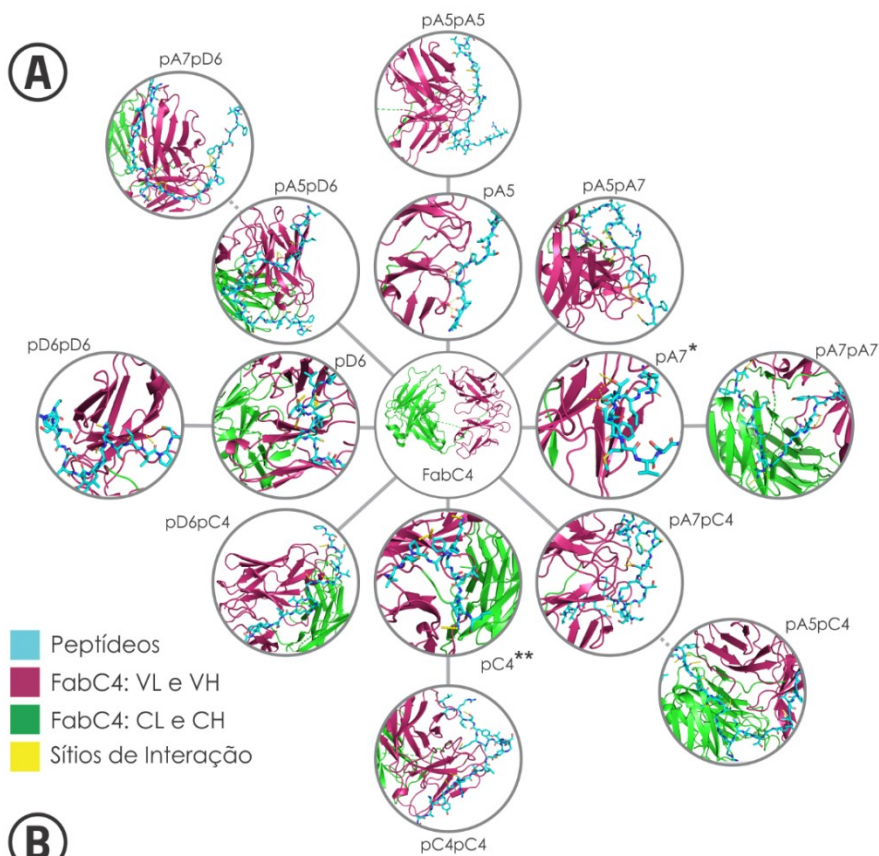
	Cadeia leve						
	Frame 1	CDR 1	Frame 2	CDR 2	Frame 3	CDR3	Frame 4
VL	ELVMTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	QSVSSY	LAWYQQKPGQAPRLIY	DAS	NRATGIPARFSGSGSTD FTLTSSLEPEDFAVYYC	QQRSNWPWT	FGQGTKVEIK
CL	EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC						
	Cadeia pesada						
	Frame 1	CDR 1	Frame 2	CDR 2	Frame 3	CDR3	Frame 4
VH	LSWQDPV	RRWLAGY	GCTSEAWAGSGLPSPM	MHQ	QGHWASQGFSAVGLGQ TSLSHQQLEPEDFAVYYC	QQRSNWPWT	FGQGTQGGNQ
CH	VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH						

Ensaio de *docking* foram conduzidos a fim de caracterizar, *in silico*, os epítomos do FabC4. Para melhor elucidar as interações e em função das correlações observadas nos ensaios de *Phage-ELISA*, os peptídeos (pA5, pA7, pC4 e pD6) foram modelados de maneira individual e em combinações.

Os peptídeos modelados pelo software *PEPFOLD 2.0*, bem como o FabC4, modelado pelo *RAPTORX*, apresentaram dados de estabilidade ranqueados conforme *Anexo I*. O primeiro programa forneceu 100 modelos mais prováveis para cada um dos quatro peptídeos e suas combinações. O melhor resultado individual foi submetido como *input* no formato .pdb, juntamente com a estrutura tridimensional modelada do FabC4, na ferramenta online *HPEPDOCK*. Este forneceu o *docking* entre o FabC4 e cada um dos peptídeos formulados. O software gerou outros 100 modelos de interações FabC4-Peptídeos e suas combinações, os quais foram ranqueados e avaliados individualmente pelo software *Fast Interaction Refinement in molecular DOCKing (FIREDOCK)*. Os melhores encontram-se representados na Figura 10. Nesta é possível visualizar a interação dos melhores modelos de dinâmica molecular entre o FabC4 e cada uma das estruturas peptídicas. Destacam-se aqueles que possuíram o melhor score e valor médio para o desvio dos átomos, ou seja, simulações *in silico* que obtiveram melhores condições de existência, coerência físico-espacial e maior estabilidade interativa.

Nesse sentido, os peptídeos pA7 e pC4 se mostraram preferencialmente mais prováveis a interagirem com o FabC4 e, portanto, elegíveis para as análises seguintes.

Figura 10: Imagem esquemática das interações entre o FabC4 com os peptídeos selecionados pA5, pA7, pC4 e pD6 individuais e combinados. Em (A) os modelos mais prováveis para o *docking* entre o FabC4 e os peptídeos individuais e combinados. Em (B) o ranking com as interações de maior score refinados pelo *FIREDOCK*.



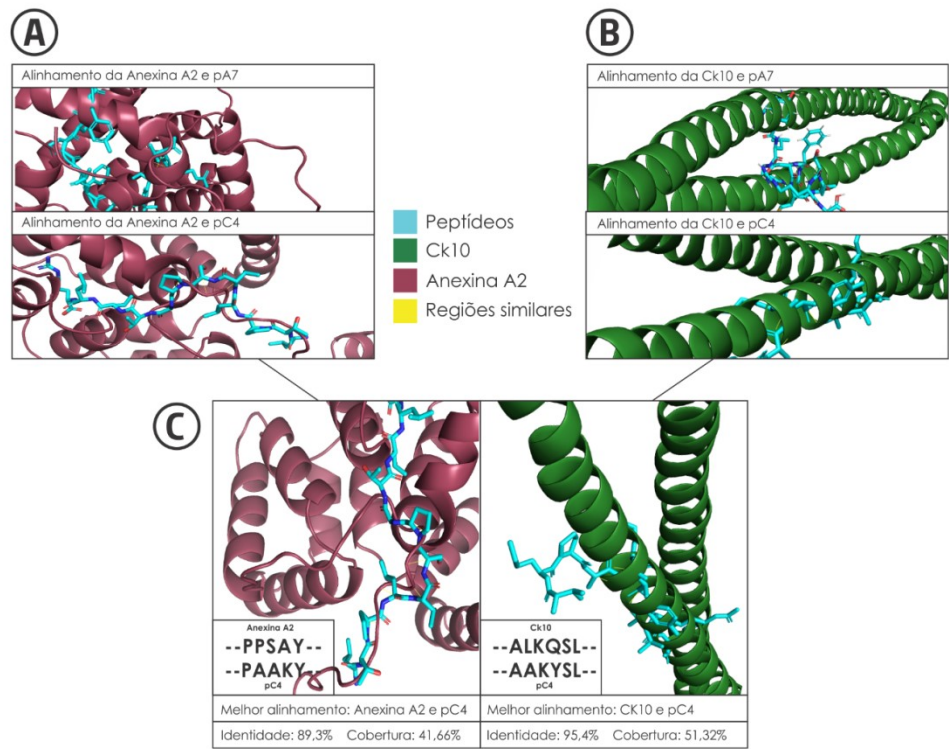
(B)

Peptídeos	Docking Score (-)	RMSD
pA5	191.276	56.840
pA7*	<u>217.961</u>	56.830
pC4**	<u>217.785</u>	56.820
pD6	191.480	28.920
pA5pA5	207.778	59.227
pA5pA7	230.428	35.762
pA5pC4	196.571	54.292
pA5pD6	209.915	38.405
pA7pA7	238.424	53.750
pA7pC4	241.548	59.948
pA7pD6	227.311	56.060
pC4pC4	210.316	52.713
pC4pD6	220.702	65.451
pD6pD6	201.789	52.375

Considerando a ANXA2 e CK10 como alvos do FabC4, fez-se necessária a obtenção de seus modelos tridimensionais (3D), objetivando validar, *in silico* a capacidade dos peptídeos selecionados em mimetiza-los. Os arquivos pdbs das proteínas e as sequências em formato FASTA de seus aminoácidos foram localizados no *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/pdb/protein>) sob o ID “Keratin, type I cytoskeletal 10 - P13645 (K1C10_HUMAN)” e “Annexin A2 - P07355 (ANXA2_HUMAN)” respectivamente.

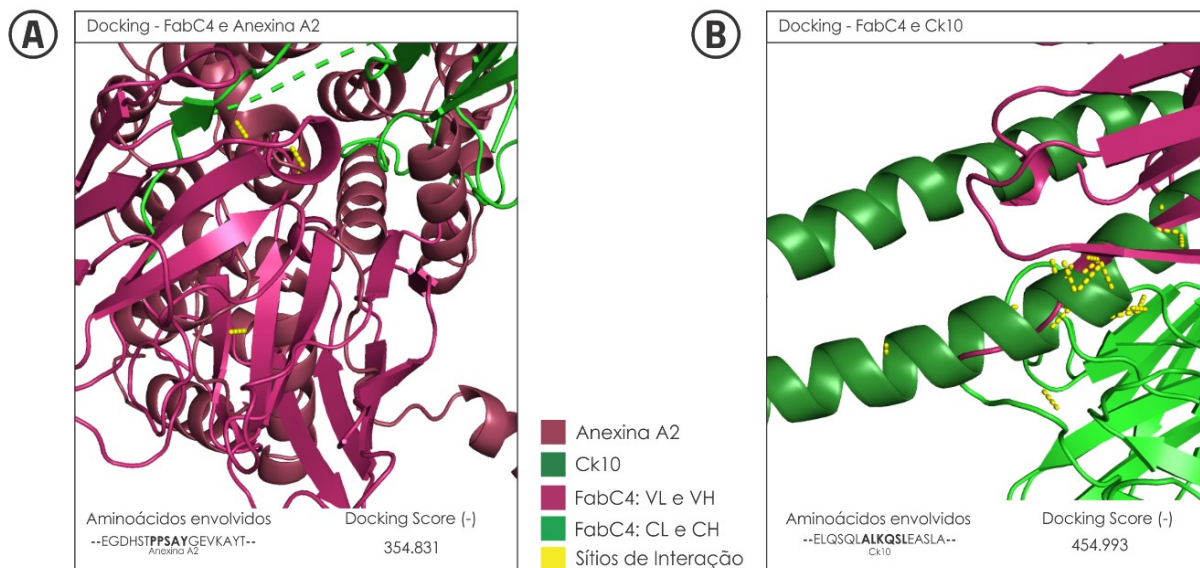
O alinhamento por sobreposição e comparação dos aminoácidos, foi realizado no programa *PyMOL*, o qual, pela ferramenta de alinhamento, localizou as regiões com maior identidade (> 30%) e cobertura. Após a análise os resultados demonstraram que o pC4 mimetizou a ANXA2 e a CK10 em duas posições diferentes (Figura 11). Para a primeira a região mimetizada foi PPSAY (Prolina-Prolina-Alanina-Serina-Tirosina) e, para a segunda ALKQSL (Alanina-Leucina-Lisina-Glutamina-Serina-Leucina)

Figura 11: Alinhamento tridimensional entre os peptídeos pA7 e pC4 e as proteínas Anexina A2(ANXA2) e Citoqueratina 10 (CK10). Em (A) o alinhamento entre os peptídeos e ANXA2. Em (B) a identidade tridimensional entre os peptídeos e a CK10. Em (C) os melhores alinhamentos para o pC4, e a descrição dos aminoácidos semelhantes entre as estruturas.



Finalmente, visando comprovar o sucesso dos peptídeos enquanto miméticos dos epítomos do FabC4, os alvos ANXA2 e CK10 foram modelados com o anticorpo FabC4 e as regiões de interação comparadas às do pC4 ligantes ao fragmento de anticorpo. Os *dockings* proteicos foram realizados no software *PATCHDOCK 1.3* sem sítio para direcioná-los, com o objetivo de fornecer uma dinâmica molecular da região mais favorável à ligação. O *output* forneceu dez modelos, os quais, também pelo *FIREDOCK*, foram classificados termodinamicamente pelo melhor escore. As estruturas se mostraram estáveis e os aminoácidos envolvidos com a interação FabC4-ANXA2 e FabC4-CK10 coincidiram com os aminoácidos envolvidos na interação FabC4-pC4 (Figura 12), confirmando a seleção bem-sucedida de peptídeos miméticos ao epítipo do fragmento de anticorpo de interesse.

Figura 12: *Docking* molecular entre FabC4 e as proteínas Anexina A2 (ANXA2) e Citoqueratina 10 (CK10). (A) representação das interações do FabC4 com a ANXA2 e em (B) com a CK10. O tracejado amarelo indica a interação não-covalente entre os aminoácidos.



5 DISCUSSÃO

A complexidade de tumores mamários é traduzida no acúmulo de inúmeras, e ainda desconhecidas, alterações moleculares responsáveis por conduzir ao fenótipo maligno progressivo e metastático (LLINÀS-ARIAS; ESTELLER, 2017; YAM; MANI; MOULDER, 2017). Nesse cenário, se aceita a hipótese que novas estratégias terapêuticas devem se basear na compreensão da atividade coordenada de múltiplos eventos para resultados promissores e efetivos (LLINÀS-ARIAS; ESTELLER, 2017).

Doenças humanas, incluindo o câncer, são causadas e/ou associadas a alterações na expressão proteica. A heterogeneidade individual no perfil dessas moléculas evidencia a necessidade de se monitorar esses padrões, sobretudo em casos de pior prognóstico e agressividade. Tumores de mama triplo-negativos se enquadram nessa realidade, pobremente compreendidos e que ainda carecem de terapias específicas (PATEL *et al.*, 2018).

O anticorpo FabC4 foi previamente descrito como um fragmento de anticorpo bioengenheirado capaz de diagnosticar e, sobretudo, prognosticar pacientes com CMTN (ARAÚJO *et al.*, 2014). Seus alvos foram sequenciados e a descrição de seus epítomos permite a descoberta de antígenos associados à doença e, portanto, meios valiosos para a compreensão desse subtipo e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O presente estudo apresenta um avanço significativo em tumores de mama triplo-negativos. A partir da tecnologia de *Phage Display* foram selecionados peptídeos ligantes ao FabC4. Os fagos recombinantes apresentaram potencial diagnóstico e os peptídeos sintéticos foram reconhecidos pelo alvo. Esses foram capazes de mimetizar regiões correspondentes às proteínas ANXA2 e CK10 que, de fato, se mostraram mais expressas no modelo celular triplo-negativo. Além disso, esse é o primeiro trabalho a descrever a co-localização dessas proteínas no citoplasma de células MDA-MB-231.

O conhecimento de epítomos é valioso para a evolução de um produto biológico, seja um anticorpo monoclonal terapêutico, uma vacina, um biomarcador, um ensaio diagnóstico ou mesmo a elucidação de resposta imune (MOREIRA; FÜHNER; HUST, 2018). Vários métodos podem ser usados para se realizar tal

caracterização, incluindo Espectroscopia de Ressonância magnética Nuclear (MONACO *et al.*, 2017), espectrometria de massas (OPUNI *et al.*, 2018) e *Phage Display* (MOREIRA; FÜHNER; HUST, 2018).

A tecnologia de *Phage Display*, por sua versatilidade, permanece sendo amplamente empregada na seleção de ligantes específicos às moléculas de interesse, especialmente no caso de mapeamento de epítomos de anticorpos e fragmentos de anticorpos (CHRISTIANSEN *et al.*, 2015; CIRIC *et al.*, 2018; MOREIRA; FÜHNER; HUST, 2018; STEINER *et al.*, 2007; SUPHIOGLU, 2016). De fato, no presente estudo, após o *biopanning*, foram selecionados cinco clones específicos ao FabC4, tanto em seu formato recombinante quanto após síntese química dos peptídeos.

Em ensaios de *Phage*-ELISA, quatro destes fagos foram diferencialmente reconhecidos por IgGs de pacientes com CM, DBM e CO. Trata-se de um método simples, específico, reproduzível e de baixo custo (FELICIANO *et al.*, 2014). Além disso, estudos anteriores também identificaram peptídeos expressos nas superfícies de bacteriófagos com potencial diagnóstico (NOBREGA *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2017). Dados da curva ROC validaram nossos achados, uma vez que a AUC sumariza a precisão do diagnóstico indicando a probabilidade do teste atribuir pontuação mais alta ao paciente com CM (OBUCHOWSKI; BULLEN, 2018). Nossos dados sugerem que os antígenos identificados estão presentes na circulação e podem contribuir para o diagnóstico da doença.

Apesar das ligações dos clones terem sido validadas com sucesso pelos ensaios ELISA, não foi possível estabelecer uma sequência consenso entre os peptídeos apresentados. Contudo, as correlações lineares entre as absorbâncias sugerem que estejam mimetizando regiões distintas da mesma proteína ou diferentes antígenos presentes em um complexo proteico.

Os resultados para os peptídeos diferiram dos obtidos para os fagos nos ensaios imunoenzimáticos. O peptídeo sintético D6 foi o único que discriminou o CM dos demais grupos, contudo com menor potencial diagnóstico quando comparado ao fago recombinante. Como o bacteriófago estabiliza a conformação do peptídeo fusionado otimizando sua ligação ao alvo, o sintético pode não adquirir a mesma estrutura secundária ou terciária, alterando seu comportamento. Entretanto, a sensibilidade e especificidade do D6 comprovam seu potencial em

triagens clínicas, como um método complementar aos já rotineiramente utilizados como a mamografia e ultrassonografia das mamas.

O método de varredura escolhido nesse estudo utiliza diferentes estratégias para o mapeamento de interações intracelulares entre diferentes domínios proteicos (WU *et al.*, 2016). Todos os peptídeos pA5, pA7 pC4 e pD6 se ligaram eficientemente ao FabC4. No ensaio de ELISA a maior absorbância foi observada para o pC4, sugerindo sua sequência como mimética ao epítopo do fragmento de anticorpo.

Os alvos do FabC4 foram previamente descritos (ARAÚJO *et al.*, 2014) e, nesse estudo, foram avaliados quanto à sua localização em duas linhagens de tumores de mama, MCF7 (ER+) e MDA-MB-231 (triplo-negativa). As marcações para as proteínas ANXA2 e CK10 se mostraram mais intensas no citoplasma do modelo triplo-negativo, onde co-localizaram com o FabC4. Além disso, pela primeira vez aqui descrito, ANXA2 e CK10 co-localizaram em MDA-MB231.

Citoqueratinas são constituintes do citoesqueleto, juntamente com microfilamentos de actina e microtúbulos, pertencentes à família dos filamentos intermediários. Sua distribuição é específica para cada subtipo de epitélio, sendo divididas em tipo I ácidas (CK9-CK20) e tipo II básicas (CK1-CK8) (KAROLINA ZUK *et al.*, 2017). Mudanças no padrão de expressão dessas proteínas durante a transformação e progressão neoplásica têm sido descritas no CM (CHEUNG *et al.*, 2016; DANZINGER *et al.*, 2017; MAEDA *et al.*, 2016).

Considerando a CK10, sua alta expressão tem sido utilizada como biomarcador em saliva para o diagnóstico de câncer oral escamoso (MU *et al.*, 2014). Além disso, associa-se com o potencial metastático em carcinoma Hepatocelular, sendo um preditor de mau prognóstico (PAN *et al.*, 2017; XIN-RONGYANG *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2017). Nossos dados sugerem esse comportamento no CM, em que sua maior expressão está relacionada ao subtipo triplo-negativo. Contudo, quando analisadas apenas as pacientes com CMTN, o FabC4 foi um marcador de melhor prognóstico (ARAÚJO *et al.*, 2014). Sugerimos que nesse grupo, a expressão de CK10 esteja associada a uma maior diferenciação, assim como já descrito por Carrilho e colaboradores (2004) em tumores de colo de útero.

Em MDA-MB-231, a CK10 também foi identificada no núcleo. Outra citoqueratina do tipo I, a CK17, já foi descrita nesta organela, regulando a proliferação celular e expressão de diferentes genes (HOBBS *et al.*, 2015; HOBBS; JACOB; COULOMBE, 2016; KUMETA *et al.*, 2013). Estudos adicionais são, portanto, necessários visando descrever o papel da CK10 no CM, especialmente relacionado à sua localização celular em subtipos tumorais.

Confirmamos a ANXA2 também como alvo do FabC4 no citoplasma das células. Trata-se de uma proteína de ligação a fosfolipídios dependente de cálcio que regula diferentes eventos como transdução de sinal, proliferação celular, diferenciação e apoptose, fusão de membrana, adesão celular, exocitose, endocitose e inflamação (LOKMAN *et al.*, 2011). Portanto sua expressão elevada já foi identificada em diversos tipos de neoplasias, incluindo aquelas que se originam na mama, fígado, próstata e pâncreas (LOKMAN *et al.*, 2011; MUSSUNOOR; MURRAY, 2008), correlacionando-se, inclusive com resistência ao tratamento, grau histológico, TNM e sobrevida global (CHRISTENSEN *et al.*, 2017). Além disso, encontra-se diretamente envolvida em eventos de metástase, proliferação celular, angiogênese e progressão tumoral (PEDROSA *et al.*, 2018).

Sua maior expressão já foi identificada em células MDA-MB-231 (FLODROVA *et al.*, 2016) e em pacientes triplo-negativos, com potencial prognóstico (GIBBS; VISHWANATHA, 2018), corroborando com nossos resultados. Sugere-se seu papel na transição epitélio-mesenquima via ativação de STAT3 e indução do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em modelos celulares de câncer de mama (WANG *et al.*, 2015).

Interessantemente, nossos resultados também demonstraram, pela primeira vez, a co-localização entre a ANXA2 e a CK10 no citoplasma das células MDA-MB-231. Diferentes proteínas já foram descritas associadas à ANXA2 como MIEN1 (Migration and invasion enhancer 1) (KPETEMEY *et al.*, 2015) e a Glicoproteína-P (ZHANG *et al.*, 2014), sinalizando para a agressividade de células tumorais. Em outros casos, com ligantes que modulam sua sinalização funcionando como supressores de tumor, como o Epb-1 (ZHANG, FEI *et al.*, 2014). Também já foi descrita sua interação com a CK17 mediada por EGFR (CHUNG *et al.*, 2012). Esse comportamento peculiar (ANXA2-CK10) necessita de estudos adicionais-chave no CMTN.

O FabC4, descrito anteriormente por Araújo e colaboradores (2014) como ligante de ANXA2 e CK10, reconheceu neste estudo ambas as proteínas no citoplasma. Sugerimos que, quando associadas, a ANXA2 tem sua atividade regulada pela CK10, a qual não transloca para o núcleo, onde coordena a expressão de genes relacionados à progressão metastática. Assim, o FabC4 identificaria tumores de mama triplo-negativos de melhor prognóstico. Contudo, nossa hipótese necessita ser posteriormente validada.

A estrutura do fragmento do anticorpo foi predita, assim como suas interações com os peptídeos selecionados. A capacidade de se prever epítomos *in silico* por meio de docking molecular é altamente desejada, uma vez que fornece informações relevantes sobre possíveis interações que favorecem a tomada de decisão experimental mais facilmente. O objetivo do docking é prever com precisão a estrutura tridimensional de ligantes em relação ao receptor, bem como identificar as regiões de interação, avaliando a probabilidade físico-espacial de o modelo predito estar correto e coeso ao cenário biológico por meio da análise de seus parâmetros e escores. Apesar de por vezes apresentar resultados controversos, fornece valiosas informações sobre a caracterização de sítios de ligação (YURIEV; HOLIEN; RAMSLAND, 2015; YURIEV; RAMSLAND, 2013).

O peptídeo pA7 e pC4 apresentaram os melhores modelos de dinâmica de interação com o FabC4. Para se determinar o melhor modelo tridimensional de interação proteína-peptídeo, a ancoragem (docking) é simulada por meio de amostragem de possíveis informações de ligação e da classificação dos complexos usando uma função de pontuação de energia (LONDON; RAVEH; SCHUELER-FURMAN, 2013). Sobre esse aspecto o software *Hpepdock* foi escolhido por seu sucesso e precisão na predição de ligação entre proteína-peptídeo e a fidelidade entre os resultados preditos e estruturas obtidas por cristalografia de raio X (ZHOU, PEI *et al.*, 2018).

O peptídeo pC4 pôde alinhar a regiões nas proteínas ANXA2 e CK10 que coincidiram com o sítio de ligação entre o peptídeo e o fragmento de anticorpo alvo. O fato de o pC4 ter mimetizado ambas as proteínas em epítomos diferentes, favorece a hipótese de que o FabC4 possa se ligar em ambas simultaneamente. Portanto, nossa estratégia resultou no mapeamento bem-sucedido dos epítomos do FabC4, abrindo novos caminhos na compreensão do CMTN.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo foi bem-sucedido em mapear os epítomos do fragmento de anticorpo FabC4. Foram selecionados peptídeos expressos na superfície de fagos filamentosos ligantes ao FabC4 e com potencial de serem reconhecidos diferencialmente por imunoglobulinas séricas de pacientes com CM. Os peptídeos quimicamente sintetizados também interagiram com o alvo, contudo apenas o pD6 apresentou potencial diagnóstico.

Demonstramos as primeiras evidências da co-localização citoplasmática da ANXA2 e CK10 e sua possível relação com CMTN, abrindo novos caminhos no estudo desse grupo heterogêneo de tumores. Análises de modelagem molecular validaram as interações entre os peptídeos selecionados e o FabC4. Além disso, os aminoácidos envolvidos na ligação ao anticorpo mimetizaram regiões da ANXA2 e CK10 também ligantes ao FabC4, corroborando nossa hipótese. Nossos resultados, portanto, são pioneiros na elucidação de mecanismos moleculares associados a tumores de mama triplo-negativos e oferece ferramentas para o desenvolvimento de novas terapias, além de fornecer ferramentas para o diagnóstico do CM.

7 REFERENCIAS

'T HOEN, Peter A C *et al.* Phage display screening without repetitious selection rounds. *Analytical Biochemistry*, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.11.005>

ALMAGRO, Juan C. *et al.* Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1751, 4 jan. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01751>

ANDERSON, Kristin N.; SCHWAB, Richard B.; MARTINEZ, Maria Elena. *Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: A review of the literature. Breast Cancer Research and Treatment*. [S.l: s.n.], 2014. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2852-7>

ARAÚJO, Thaise G. *et al.* A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. *Cancer Letters*, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.029>

AZZAZY, Hassan M E; HIGHSMITH, W. Edward. *Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry*. [S.l: s.n.], 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)

BALLEW, John T.; REIFERT, Jack R.; DAUGHERTY, Patrick S. Antibody biomarker discovery via in vitro evolution of peptides. *Methods in Molecular Biology*. [S.l: s.n.], 2018. v. 1785. p. 249–268. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7841-0_17

BARBAS, C. F. *et Al.* *Phage Display: a laboratory manual*. [S.l: s.n.], 2001a.

BARBAS, C. F. *et Al.* *Phage Display: a laboratory manual*. [S.l: s.n.], 2001b. Disponível em: <https://www.cshlpress.com/default.tpl?cart=1503342443522711645&fromlink=T&linkaction=full&linksortby=oop_title&--eqSKUdata=520>.

BARROS, Alfredo Carlos Simões Dornellas De; LEITE, Kátia Ramos Moreira. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Revista Brasileira de Mastologia*, v. 25, n. 4, p. 146–155, 2015. Disponível em: <http://www.rbmastologia.com.br/wp-content/uploads/2015/12/MAS-v25n4_146-155.pdf>.

BERELI, Nilay; YAVUZ, Handan; DENIZLI, Adil. Affinity Separation and Crystallization of Fc Fragments. *Encyclopedia of Membranes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 1–2. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4_690-1

BORG, A *et al.* HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer research*, 1990.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer-INCA. *CÂNCER. Tipo - Mama. Fatores de risco. Rio de Janeiro*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1>. Acesso em: 7 fev. 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer- INCA. *CÂNCER - Tipo - Mama. Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 14 jun. 2018b.

BROOKS, Benjamin D.; MILES, Adam R.; ABDICHE, Yasmina N. High-throughput epitope binning of therapeutic monoclonal antibodies: why you need to bin the fridge. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 8, p. 1040–1044, 1 ago. 2014. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.05.011>

BUJOTZEK, Alexander *et al.* Prediction of VH-VL domain orientation for antibody variable domain modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 83, n. 4, p. 681–695, abr. 2015. <https://doi.org/10.1002/prot.24756>

CAMERON, David *et al.* 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet*, v. 389, n. 10075, p. 1195–1205, 25 mar. 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32616-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32616-2)

CAREY, Lisa A. *et al.* Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, v. 295, n. 21, p. 2492, 7 jun. 2006. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>

CAREY, Lisa A. *et al.* The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research*, 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>

CARRILHO, Carla *et al.* Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Human Pathology*, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.01.021>

CHEUNG, Kevin J. *et al.* Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508541113>

CHRISTENSEN, Maria *et al.* Annexin A2 and cancer: A systematic review. *International Journal of Oncology*, v. 52, n. 1, p. 5–18, 8 nov. 2017. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4197>

CHRISTIANSEN, Anders *et al.* High-throughput sequencing enhanced phage display enables the identification of patient-specific epitope motifs in serum. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 12913, 6 out. 2015. <https://doi.org/10.1038/srep12913>

CHUNG, Byung Min *et al.* Identification of novel interaction between annexin A2 and keratin 17: Evidence for reciprocal regulation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 10, p. 7573–7581, 2 mar. 2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301549>

CIANFROCCA, Mary; GOLDSTEIN, Lori J LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist*, 2004. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-6-606>

CIRIC, Milica *et al.* Metasecretome Phage Display. [S.l.]: Humana Press, New York, NY, 2018. p. 519–534. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7447-4_29

CIRQUEIRA, Magno Belém *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*, 2011.

COLLIGNON, Joëlle *et al.* Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, v. 8, p. 93–107, 2016. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S69488>

COUCH, Fergus J. *et al.* Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.1414>

DANZINGER, S. *et al.* Intratumoral Cytokeratin 5 and Claudin 3 protein

expression predicts for the presence of a BRCA1 germline mutation in women with early breast cancer. *The Breast*, v. 32, p. S31, 1 mar. 2017. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(17\)30127-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(17)30127-3)

DENKERT, Carsten *et al.* Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*, v. 389, n. 10087, p. 2430–2442, 17 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616324540>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

FELICIANO, Nágilla Daliane *et al.* Bacteriophage-Fused Peptides for Serodiagnosis of Human Strongyloidiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 5, p. e2792, 29 maio 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002792>

FILPULA, David. *Antibody engineering and modification technologies. Biomolecular Engineering*. [S.l.: s.n.], 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.03.004>

FLODROVA, Dana *et al.* A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. *General Physiology and Biophysics*, v. 35, n. 3, p. 387–392, 2016. <https://doi.org/10.4149/gpb.2016009>

GACIARZ, Anna; RUDDOCK, Lloyd W. Complementarity determining regions and frameworks contribute to the disulfide bond independent folding of intrinsically stable scFv. *PLoS ONE*, v. 12, n. 12, p. e0189964–e0189964, 18 dez. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189964>

GAGIC, Dragana *et al.* Exploring the secretomes of microbes and microbial communities using filamentous phage display. *Frontiers in Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00429>

GERASIMOV, Ekaterina *et al.* Identification of cancer-specific motifs in mimotope profiles of serum antibody repertoire. *BMC Bioinformatics*, v. 18, n. S8, p. 244, 7 jun. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1661-5>

GIBBS, Lee D; VISHWANATHA, Jamboor K. Prognostic impact of AnxA1 and AnxA2 gene expression in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, v. 9, n. 2, p. 2697–2704, 5 jan. 2018.

GIULIANO, Armando E.; EDGE, Stephen B.; HORTOBAGYI, Gabriel N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, v. 25, n. 7, p. 1783–1785, 18 jul. 2018. Disponível em: [10.1245/s10434-018-6486-6](https://doi.org/10.1245/s10434-018-6486-6). Acesso em: 14 jun. 2018..

GLUZ, O *et al.* Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2009. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp492>

GREENSPAN, Neil S.; CAVACINI, Lisa A. 15 – Immunoglobulin Function. *Clinical Immunology*, p. 223–233.e1, 2019.

GÜNAY, Kemal Arda; KLOK, Harm-Anton. Identification of Soft Matter Binding Peptide Ligands Using Phage Display. *Bioconjugate Chemistry*, v. 26, n. 10, p. 2002–2015, 21 out. 2015. Disponível em: [10.1021/acs.bioconjchem.5b00377](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00377).

HERSCHKOWITZ, Jason I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*, 2007.

HOBBS, Ryan P. *et al.* Keratin-dependent regulation of Aire and gene expression in skin tumor keratinocytes. *Nature Genetics*, 2015. <https://doi.org/10.1038/ng.3355>

HOBBS, Ryan P.; JACOB, Justin T.; COULOMBE, Pierre A. *Keratins Are Going Nuclear. Developmental Cell*. [S.l: s.n.], 2016. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.022>

HOLLIGER, Philipp; HUDSON, Peter J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 1 set. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nbt1142>>. Acesso em: 14 jun. 2018. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>

KAROLINA ZUK, Anna *et al.* Modeling and validating three dimensional human normal cervix and cervical cancer tissues in vitro. *Journal of biomedical research*, 2017.

KEHOE, John W.; KAY, Brian K. *Filamentous phage display in the new millennium. Chemical Reviews*. [S.l: s.n.], 2005. <https://doi.org/10.1021/cr000261r>

KOERBER, James T.; HORNSBY, Michael J.; WELLS, James A. An Improved

Single-Chain Fab Platform for Efficient Display and Recombinant Expression. *Journal of Molecular Biology*, v. 427, n. 2, p. 576–586, 30 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.017>

KOMATSU, Misaki *et al.* Crystal Structure of Fab Fragment of an Anti-Osteocalcin C-Terminal Peptide Antibody KTM219. *Photon Factory Activity Report*, 2014.

KPETEMEY, Marilynne *et al.* MIEN1, a novel interactor of Annexin A2, promotes tumor cell migration by enhancing AnxA2 cell surface expression. *Molecular Cancer*, v. 14, n. 1, p. 156, 15 dez. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0428-8>

KUMAR, Varun *et al.* Androgen Receptor Immunohistochemistry as a Companion Diagnostic Approach to Predict Clinical Response to Enzalutamide in Triple-Negative Breast Cancer. *JCO Precision Oncology*, n. 1, p. 1–19, 10 out. 2017. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00075>

KUMETA, Masahiro *et al.* Antibody-based analysis reveals “filamentous vs. non-filamentous” and “cytoplasmic vs. nuclear” crosstalk of cytoskeletal proteins. *Experimental Cell Research*, v. 319, n. 20, p. 3226–3237, 10 dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.021>

LEDGAARD, Line *et al.* Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins*, v. 10, n. 6, 9 jun. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29890762>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

LEHMANN, Brian D Bd *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 2011. <https://doi.org/10.1172/JCI45014DS1>

LIU, Bin *et al.* Mapping Tumor Epitope Space by Direct Selection of Single-Chain Fv Antibody Libraries on Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 2004.

LIU, Xiaozhen; FENG, Changyun; LIU, Junjun; CAO, Lu; *et al.* Androgen receptor and heat shock protein 27 co-regulate the malignant potential of molecular apocrine breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 37, n. 1, p. 90, 27 dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0762-y>

LIU, Xiaozhen; FENG, Changyun; LIU, Junjun; LIU, Jian; *et al.* The importance of EGFR as a biomarker in molecular apocrine breast cancer. *Human Pathology*, v. 77,

p. 1–10, 1 jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.01.016>

LLINÀS-ARIAS, Pere; ESTELLER, Manel. Epigenetic inactivation of tumour suppressor coding and non-coding genes in human cancer: an update. *Open biology*, v. 7, n. 9, p. 170152, 1 set. 2017. <https://doi.org/10.1098/rsob.170152>

LOKMAN, Noor A. *et al.* The Role of Annexin A2 in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Cancer Microenvironment*, v. 4, n. 2, p. 199–208, 5 ago. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0064-9>

LONDON, Nir; RAVEH, Barak; SCHUELER-FURMAN, Ora. Peptide docking and structure-based characterization of peptide binding: from knowledge to know-how. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 23, n. 6, p. 894–902, 1 dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.07.006>

LUND, Eva L; KRISTJANSEN, Paul E G; LUND, Eva Løbner. The malignant phenotype. *Nor Tannlegeforen Tid*, v. 116, n. 116, p. 38–43, 2006.

MAEDA, Tetsuyo *et al.* Immunohistochemical co-expression status of cytokeratin 5/6, androgen receptor, and p53 as prognostic factors of adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer. *Medical Molecular Morphology*, v. 49, n. 1, p. 11–21, 26 mar. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00795-015-0109-0>

MAKKI, Jaafar. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 2015.

MEHTA, Aditi *et al.* Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9563-3>

MILLER, Jeremy C. *et al.* Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: Antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics*, 2003.

MILLS, Jamie N.; ETHIER, Stephen P. Abstract 2405: The 8p11 amplicon oncogenes ASH2L and NSD3 alter the epigenomic landscape and provide the foundation for novel application of epigenetic therapy in luminal B breast cancers. *Cancer Research*, v. 77, n. 13 Supplement, p. 2405–2405, 1 jul. 2017. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-2405>

MITTAL, Sunil *et al.* Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosensors and*

Bioelectronics, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.028>

MONACO, Serena *et al.* Differential Epitope Mapping by STD NMR Spectroscopy To Reveal the Nature of Protein-Ligand Contacts. *Angewandte Chemie*, v. 129, n. 48, p. 15491–15495, 27 nov. 2017. <https://doi.org/10.1002/ange.201707682>

MORAIS, M S S *et al.* Engenharia de anticorpos na busca por fragmentos funcionais para insumos de diagnóstico e aplicações terapêuticas. *Rev. ciênc. farm. básica apl*, 2014.

MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia; FÜHNER, Viola; HUST, Michael. Epitope Mapping by Phage Display. [S.l.]: Humana Press, New York, NY, 2018. p. 497–518. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7447-4_28

MUSSUNOOR, S; MURRAY, GI. The role of annexins in tumour development and progression. *The Journal of Pathology*, v. 216, n. 2, p. 131–140, out. 2008. <https://doi.org/10.1002/path.2400>

NILVEBRANT, Johan; ROCKBERG, Johan. An Introduction to Epitope Mapping. [S.l.: s.n.], 2018a. p. 1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7841-0_1

NILVEBRANT, Johan; ROCKBERG, Johan. An Introduction to Epitope Mapping. [S.l.]: Humana Press, New York, NY, 2018b. p. 1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7841-0_1

NOBREGA, Franklin L. *et al.* Screening and characterization of novel specific peptides targeting MDA-MB-231 claudin-low breast carcinoma by computer-aided phage display methodologies. *BMC Cancer*, v. 16, n. 1, p. 881, 14 dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2937-2>

NORTON, Nadine *et al.* Generation of HER2-specific antibody immunity during trastuzumab adjuvant therapy associates with reduced relapse in resected HER2 breast cancer. *Breast Cancer Research*, v. 20, n. 1, p. 52, 14 dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0989-8>

OBUCHOWSKI, Nancy A; BULLEN, Jennifer A. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine. *Physics in Medicine & Biology*, v. 63, n. 7, p. 07TR01, 29 mar. 2018. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0031-9155/63/i=7/a=07TR01?key=crossref.d19568af65ccd2c31adcaabab4e8050c>>.

OPUNI, Kwabena F.M. *et al.* Mass spectrometric epitope mapping. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 37, n. 2, p. 229–241, mar. 2018. <https://doi.org/10.1002/mas.21516>

PALA, Emel Ebru *et al.* Determination of HER2 and p53 Mutations by Sequence Analysis Method and EGFR/Chromosome 7 Gene Status by Fluorescence in Situ Hybridization for the Predilection of Targeted Therapy Modalities in Immunohistochemically Triple Negative Breast Carcinomas in T. *Pathology and Oncology Research*, v. 21, n. 4, p. 1223–1227, 10 set. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9956-1>

PAN, Qijin *et al.* Clinical biocharacterization of immunophenotype in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 10, n. 7, p. 7670–7673, 2017.

PASCHKE, Matthias. *Phage display systems and their applications. Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.: s.n.], 2006. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0270-9>

PATEL, Nirmesh *et al.* Integrated genomics and functional validation identifies malignant cell specific dependencies in triple negative breast cancer. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 1044, 13 dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03283-z>

PEDROSA, Rute M S M *et al.* Breast cancer brain metastasis: molecular mechanisms and directions for treatment. *Neuro-Oncology*, 16 mar. 2018.

PENNAZIO, Sergio. *The origin of phage virology. Rivista di Biologia - Biology Forum*. [S.l.: s.n.], 2006.

PRADO-GARCÍA, Heriberto; SÁNCHEZ-GARCÍA, Francisco Javier. Editorial: Immuno-Metabolism in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 374, 5 abr. 2017.

PRAT, Aleix *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, v. 12, n. 5, p. R68, 2 out. 2010. <https://doi.org/10.1186/bcr2635>

PRAT, Aleix; PEROU, Charles M. *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Molecular Oncology*. [S.l.]: Wiley-Blackwell., fev. 2011

PRAT, Aleix; PEROU, Charles M. *Mammary development meets cancer genomics. Nature Medicine*. [S.l: s.n.], 2009. <https://doi.org/10.1038/nm0809-842>

RAHBARNIA, Leila *et al.* Development of a novel human scFv against EGFR L2 domain by phage display technology. *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 13, 2017. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160928112208>

RAKHA, Emad a; REIS-FILHO, Jorge S; ELLIS, Ian O. Basal-like breast cancer: a critical review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2008.

RIZK, Shahir S. *et al.* Targeted rescue of cancer-associated IDH1 mutant activity using an engineered synthetic antibody. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 556, 3 dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00728-1>

ROMER, Tina; LEONHARDT, Heinrich; ROTHBAUER, Ulrich. *Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging. Current Opinion in Biotechnology*. [S.l: s.n.], 2011. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.007>

SAWADA, Toshiki. *Filamentous virus-based soft materials based on controlled assembly through liquid crystalline formation. Polymer Journal*. [S.l: s.n.], 2017. <https://doi.org/10.1038/pj.2017.35>

SCOTT, Jamie K.; SMITH, George P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990.

SHAVE, Steven *et al.* PuLSE: Quality control and quantification of peptide sequences explored by phage display libraries. *PLOS ONE*, v. 13, n. 2, p. e0193332, 23 fev. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193332>

SIDHU, Sachdev S. *Engineering M13 for phage display. Biomolecular Engineering*. [S.l: s.n.], 2001

SILVERTON, E W; NAVIA, M A; DAVIES, D R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5140>

SLAMON, D. J. *et al.* Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>

SMITH, George P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985.

SMITH, George P.; PETRENKO, Valery A. Phage display. *Chemical Reviews*, v. 97, n. 2, p. 391–410, 1997. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>

SMITH, George P.; SCOTT, Jamie K. [15] Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage. *Methods in Enzymology*, 1993.

SPECHT, JM et al. Abstract P4-22-11: Combined targeted therapies for advanced triple negative breast cancer: A phase II trial of nab-paclitaxel and bevacizumab followed by maintenance targeted therapy with bevacizumab and erlotinib. *Cancer Research*, v. 77, n. 4 Supplement, p. P4-22-11-P4-22-11, 15 fev. 2017. Disponível em: [10.1158/1538-7445.SABCS16-P4-22-11](https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS16-P4-22-11)>. Acesso em: 20 jun. 2018.

STEINER, D. et al. *Phage display using cotranslational translocation of fusion polypeptides*. . [S.l: s.n.]. , 26 ago. 2007

STEPHEN, Charles W.; LANE, David P. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *Journal of Molecular Biology*, 1992. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90386-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90386-X)

STEWART, B. AND WILD, C.P. (EDS.), INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WHO. World Cancer Report 2014. 2014. Disponível em: <<http://publichealthwell.ie/node/725845>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

STRAUS, Suzana K.; BO, Htet E. Filamentous Bacteriophage Proteins and Assembly. [S.l.]: Springer, Singapore, 2018. p. 261–279. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_12

SUGIMURA, T; USHIJIMA, T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutation research*, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00005-3)

SUPHIOGLU, Cenk. Mimtags: The use of phage display technology to produce novel protein-specific probes. *Immunome Res* Cenk Suphioglu *Immunome Res*, v. 12, n. 122, 2016. Disponível em: [10.4172/1745-7580.C1.005](https://doi.org/10.4172/1745-7580.C1.005)>. Acesso em: 18 jun. 2018.

SWAIN, Sandra M. et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-

Positive Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 8, p. 724–734, 19 fev. 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1413513>

TAHERIAN, Azadeh *et al.* Optimization of purification procedure for horse F(ab')₂ antivenom against androctonus crassicauda (scorpion) venom. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 3, p. 409–414, 2018. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i3.4>

TOMAO, Federica *et al.* Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OncoTargets and Therapy*, v. 8, p. 177–193, 2015. <https://doi.org/10.2147/OTT.S67673>

TRAN, Ben; BEDARD, Philippe L. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast cancer research: BCR*, 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr2904>

VOLK, Anna-Luisa *et al.* Stratification of responders towards eculizumab using a structural epitope mapping strategy. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 31365, 11 nov. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep31365>

WANG, Tong *et al.* Anxa2 binds to STAT3 and promotes epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Oncotarget*, v. 6, n. 31, p. 30975–92, 13 out. 2015.

WCRF. *Breast cancer statistics | World Cancer Research Fund International*. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>>. Acesso em: 18 maio 2018.

WEINER, Louis M.; SURANA, Rishi; WANG, Shangzi. *Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy*. *Nature Reviews Immunology*. [S.l: s.n.], 2010. <https://doi.org/10.1038/nri2744>

WHO. *World Health Organization. Cancer*. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

WOLFF, Antonio C *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2007.

WU, Chien Hsun *et al.* *Advancement and applications of peptide phage display*

technology in biomedical science. *Journal of Biomedical Science*. [S.l: s.n.], 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0223-x>

XIN-RONGYANG *et al.* Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: Predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Clinical Cancer Research*, 2008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4338>

XING, Lijun *et al.* Identification of a peptide for folate receptor alpha by phage display and its tumor targeting activity in ovary cancer xenograft. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 8426, 30 dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26683-z>

YAM, Clinton; MANI, Sendurai A; MOULDER, Stacy L. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *The Oncologist*, v. 22, n. 9, p. 1086–1093, 2017. Disponível em: [10.1634/theoncologist.2017-0095](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0095).

YU, Ching-Wen *et al.* Screening of peptide specific to cholangiocarcinoma cancer cells using an integrated microfluidic system and phage display technology. *Microfluidics and Nanofluidics*, v. 21, n. 9, p. 145, 17 set. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10404-017-1983-7>

YURIEV, Elizabeth; HOLIEN, Jessica; RAMSLAND, Paul A. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review. *Journal of Molecular Recognition*, v. 28, n. 10, p. 581–604, out. 2015. Disponível em: [10.1002/jmr.2471](https://doi.org/10.1002/jmr.2471). Acesso em: 19 jun. 2018.

YURIEV, Elizabeth; RAMSLAND, Paul A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*. [S.l.]: Wiley-Blackwell. Disponível em: [10.1002/jmr.2266](https://doi.org/10.1002/jmr.2266). Acesso em: 19 jun. 2018. , maio 2013

ZHANG, Fei *et al.* P-glycoprotein associates with Anxa2 and promotes invasion in multidrug resistant breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.003>

ZHANG, Qing *et al.* Guided selection of an anti-gamma-seminoprotein human Fab for antibody directed enzyme prodrug therapy of prostate cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3221-0>

ZHANG, Shuai *et al.* Synthesis of dispersive iron or iron–silver nanoparticles on engineered capsid pVIII of M13 virus with electronegative terminal peptides. *Journal of*

Nanoparticle Research, v. 17, n. 10, p. 417, 19 out. 2015.
<https://doi.org/10.1007/s11051-015-3221-0>

ZHOU, Juan *et al.* Identification and validation of FGFR2 peptide for detection of early Barrett's neoplasia. *Oncotarget*, v. 8, n. 50, p. 87095–87106, 20 out. 2017.

ZHOU, Pei *et al.* HPEPDOCK: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Research*, 9 maio 2018.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky357>

ZHU, Zhaoyu *et al.* Screening and identification of the tumor-associated antigen CK10, a novel potential liver cancer marker. *FEBS Open Bio*, v. 7, n. 5, p. 627–635, maio 2017. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12122>

Anexo I - Material suplementar: Ranking dos melhores modelos para cada peptídeo.

pA5

REMARK ITScore	: -142.328	REMARK RMSD	: 40.971	MODEL	100
REMARK ITScore	: -169.470	REMARK RMSD	: 45.434	MODEL	10
REMARK ITScore	: -169.060	REMARK RMSD	: 18.739	MODEL	11
REMARK ITScore	: -168.236	REMARK RMSD	: 55.612	MODEL	12
REMARK ITScore	: -166.839	REMARK RMSD	: 27.840	MODEL	13
REMARK ITScore	: -166.654	REMARK RMSD	: 58.805	MODEL	14
REMARK ITScore	: -166.559	REMARK RMSD	: 57.347	MODEL	15
REMARK ITScore	: -164.840	REMARK RMSD	: 52.973	MODEL	16
REMARK ITScore	: -163.596	REMARK RMSD	: 49.789	MODEL	17
REMARK ITScore	: -162.604	REMARK RMSD	: 47.014	MODEL	18
REMARK ITScore	: -161.752	REMARK RMSD	: 27.507	MODEL	19
REMARK ITScore	: -191.276	REMARK RMSD	: 56.840	MODEL	1
REMARK ITScore	: -161.667	REMARK RMSD	: 49.621	MODEL	20
REMARK ITScore	: -160.953	REMARK RMSD	: 43.899	MODEL	21
REMARK ITScore	: -160.531	REMARK RMSD	: 34.570	MODEL	22
REMARK ITScore	: -160.486	REMARK RMSD	: 59.051	MODEL	23
REMARK ITScore	: -159.920	REMARK RMSD	: 72.130	MODEL	24
REMARK ITScore	: -158.273	REMARK RMSD	: 24.487	MODEL	25
REMARK ITScore	: -158.122	REMARK RMSD	: 47.686	MODEL	26
REMARK ITScore	: -157.461	REMARK RMSD	: 53.205	MODEL	27
REMARK ITScore	: -157.333	REMARK RMSD	: 50.042	MODEL	28
REMARK ITScore	: -155.590	REMARK RMSD	: 32.799	MODEL	29
REMARK ITScore	: -180.977	REMARK RMSD	: 50.917	MODEL	2
REMARK ITScore	: -155.180	REMARK RMSD	: 34.389	MODEL	30
REMARK ITScore	: -155.121	REMARK RMSD	: 37.031	MODEL	31
REMARK ITScore	: -154.931	REMARK RMSD	: 53.974	MODEL	32
REMARK ITScore	: -154.842	REMARK RMSD	: 57.137	MODEL	33
REMARK ITScore	: -154.470	REMARK RMSD	: 41.541	MODEL	34
REMARK ITScore	: -154.422	REMARK RMSD	: 32.238	MODEL	35
REMARK ITScore	: -154.164	REMARK RMSD	: 44.764	MODEL	36
REMARK ITScore	: -154.085	REMARK RMSD	: 22.912	MODEL	37
REMARK ITScore	: -154.051	REMARK RMSD	: 32.507	MODEL	38
REMARK ITScore	: -153.712	REMARK RMSD	: 42.794	MODEL	39
REMARK ITScore	: -176.422	REMARK RMSD	: 31.778	MODEL	3
REMARK ITScore	: -153.625	REMARK RMSD	: 40.244	MODEL	40
REMARK ITScore	: -153.450	REMARK RMSD	: 44.310	MODEL	41
REMARK ITScore	: -153.395	REMARK RMSD	: 33.575	MODEL	42
REMARK ITScore	: -152.882	REMARK RMSD	: 41.900	MODEL	43
REMARK ITScore	: -152.408	REMARK RMSD	: 48.521	MODEL	44
REMARK ITScore	: -152.342	REMARK RMSD	: 44.285	MODEL	45
REMARK ITScore	: -152.075	REMARK RMSD	: 42.532	MODEL	46
REMARK ITScore	: -151.901	REMARK RMSD	: 40.644	MODEL	47
REMARK ITScore	: -151.889	REMARK RMSD	: 38.540	MODEL	48
REMARK ITScore	: -151.600	REMARK RMSD	: 23.281	MODEL	49
REMARK ITScore	: -176.188	REMARK RMSD	: 47.816	MODEL	4
REMARK ITScore	: -151.551	REMARK RMSD	: 51.018	MODEL	50
REMARK ITScore	: -151.385	REMARK RMSD	: 60.765	MODEL	51
REMARK ITScore	: -151.324	REMARK RMSD	: 57.413	MODEL	52
REMARK ITScore	: -151.204	REMARK RMSD	: 50.547	MODEL	53
REMARK ITScore	: -151.090	REMARK RMSD	: 43.599	MODEL	54
REMARK ITScore	: -150.851	REMARK RMSD	: 46.397	MODEL	55
REMARK ITScore	: -150.805	REMARK RMSD	: 51.793	MODEL	56
REMARK ITScore	: -150.782	REMARK RMSD	: 43.936	MODEL	57
REMARK ITScore	: -150.733	REMARK RMSD	: 31.585	MODEL	58
REMARK ITScore	: -150.596	REMARK RMSD	: 49.574	MODEL	59
REMARK ITScore	: -174.981	REMARK RMSD	: 40.465	MODEL	5
REMARK ITScore	: -150.591	REMARK RMSD	: 31.477	MODEL	60
REMARK ITScore	: -150.510	REMARK RMSD	: 56.913	MODEL	61
REMARK ITScore	: -149.245	REMARK RMSD	: 30.562	MODEL	62
REMARK ITScore	: -149.071	REMARK RMSD	: 49.364	MODEL	63
REMARK ITScore	: -148.711	REMARK RMSD	: 35.964	MODEL	64
REMARK ITScore	: -148.590	REMARK RMSD	: 45.201	MODEL	65
REMARK ITScore	: -148.375	REMARK RMSD	: 39.523	MODEL	66
REMARK ITScore	: -148.143	REMARK RMSD	: 27.305	MODEL	67
REMARK ITScore	: -148.093	REMARK RMSD	: 27.661	MODEL	68
REMARK ITScore	: -147.904	REMARK RMSD	: 44.856	MODEL	69
REMARK ITScore	: -174.216	REMARK RMSD	: 40.080	MODEL	6
REMARK ITScore	: -147.039	REMARK RMSD	: 37.020	MODEL	70
REMARK ITScore	: -146.741	REMARK RMSD	: 43.680	MODEL	71
REMARK ITScore	: -146.715	REMARK RMSD	: 51.386	MODEL	72
REMARK ITScore	: -146.639	REMARK RMSD	: 58.448	MODEL	73
REMARK ITScore	: -146.227	REMARK RMSD	: 38.360	MODEL	74
REMARK ITScore	: -146.096	REMARK RMSD	: 22.163	MODEL	75
REMARK ITScore	: -146.040	REMARK RMSD	: 32.922	MODEL	76
REMARK ITScore	: -145.893	REMARK RMSD	: 58.815	MODEL	77
REMARK ITScore	: -145.765	REMARK RMSD	: 37.329	MODEL	78
REMARK ITScore	: -145.594	REMARK RMSD	: 23.789	MODEL	79
REMARK ITScore	: -171.206	REMARK RMSD	: 28.664	MODEL	7
REMARK ITScore	: -145.501	REMARK RMSD	: 68.253	MODEL	80
REMARK ITScore	: -145.372	REMARK RMSD	: 36.236	MODEL	81
REMARK ITScore	: -145.370	REMARK RMSD	: 46.968	MODEL	82
REMARK ITScore	: -145.089	REMARK RMSD	: 36.782	MODEL	83
REMARK ITScore	: -144.973	REMARK RMSD	: 29.415	MODEL	84
REMARK ITScore	: -144.918	REMARK RMSD	: 35.146	MODEL	85
REMARK ITScore	: -144.890	REMARK RMSD	: 52.367	MODEL	86
REMARK ITScore	: -144.877	REMARK RMSD	: 45.132	MODEL	87
REMARK ITScore	: -144.614	REMARK RMSD	: 48.706	MODEL	88
REMARK ITScore	: -144.589	REMARK RMSD	: 37.297	MODEL	89
REMARK ITScore	: -170.812	REMARK RMSD	: 52.431	MODEL	8
REMARK ITScore	: -144.477	REMARK RMSD	: 29.241	MODEL	90
REMARK ITScore	: -144.473	REMARK RMSD	: 48.282	MODEL	91
REMARK ITScore	: -144.224	REMARK RMSD	: 37.400	MODEL	92
REMARK ITScore	: -144.074	REMARK RMSD	: 46.217	MODEL	93
REMARK ITScore	: -143.966	REMARK RMSD	: 60.320	MODEL	94
REMARK ITScore	: -143.947	REMARK RMSD	: 59.677	MODEL	95
REMARK ITScore	: -143.704	REMARK RMSD	: 52.079	MODEL	96
REMARK ITScore	: -143.653	REMARK RMSD	: 52.191	MODEL	97
REMARK ITScore	: -143.053	REMARK RMSD	: 48.352	MODEL	98
REMARK ITScore	: -142.679	REMARK RMSD	: 37.111	MODEL	99
REMARK ITScore	: -169.846	REMARK RMSD	: 54.863	MODEL	9

pA7

REMARK ITScore	: -156.819	REMARK RMSD	: 63.936	MODEL	94
REMARK ITScore	: -187.232	REMARK RMSD	: 63.162	MODEL	10
REMARK ITScore	: -186.312	REMARK RMSD	: 65.378	MODEL	11
REMARK ITScore	: -186.294	REMARK RMSD	: 32.686	MODEL	12
REMARK ITScore	: -184.075	REMARK RMSD	: 35.291	MODEL	13
REMARK ITScore	: -183.038	REMARK RMSD	: 58.890	MODEL	14
REMARK ITScore	: -182.060	REMARK RMSD	: 47.505	MODEL	15
REMARK ITScore	: -182.000	REMARK RMSD	: 21.493	MODEL	16
REMARK ITScore	: -181.713	REMARK RMSD	: 32.351	MODEL	17
REMARK ITScore	: -181.690	REMARK RMSD	: 35.001	MODEL	18
REMARK ITScore	: -181.679	REMARK RMSD	: 58.215	MODEL	19
REMARK ITScore	: -217.961	REMARK RMSD	: 56.830	MODEL	1
REMARK ITScore	: -177.351	REMARK RMSD	: 34.379	MODEL	20
REMARK ITScore	: -176.320	REMARK RMSD	: 42.838	MODEL	21
REMARK ITScore	: -175.879	REMARK RMSD	: 72.909	MODEL	22
REMARK ITScore	: -175.680	REMARK RMSD	: 61.604	MODEL	23
REMARK ITScore	: -174.669	REMARK RMSD	: 37.813	MODEL	24
REMARK ITScore	: -174.264	REMARK RMSD	: 61.201	MODEL	25
REMARK ITScore	: -173.817	REMARK RMSD	: 49.396	MODEL	26
REMARK ITScore	: -173.796	REMARK RMSD	: 46.051	MODEL	27
REMARK ITScore	: -173.265	REMARK RMSD	: 69.255	MODEL	28
REMARK ITScore	: -172.909	REMARK RMSD	: 26.557	MODEL	29
REMARK ITScore	: -198.913	REMARK RMSD	: 42.679	MODEL	2
REMARK ITScore	: -172.470	REMARK RMSD	: 47.937	MODEL	30
REMARK ITScore	: -171.940	REMARK RMSD	: 28.032	MODEL	31
REMARK ITScore	: -171.741	REMARK RMSD	: 48.787	MODEL	32
REMARK ITScore	: -171.570	REMARK RMSD	: 41.645	MODEL	33
REMARK ITScore	: -171.031	REMARK RMSD	: 53.894	MODEL	34
REMARK ITScore	: -170.952	REMARK RMSD	: 52.127	MODEL	35
REMARK ITScore	: -170.648	REMARK RMSD	: 34.266	MODEL	36
REMARK ITScore	: -170.565	REMARK RMSD	: 66.969	MODEL	37
REMARK ITScore	: -169.612	REMARK RMSD	: 28.462	MODEL	38
REMARK ITScore	: -169.466	REMARK RMSD	: 37.634	MODEL	39
REMARK ITScore	: -194.122	REMARK RMSD	: 55.910	MODEL	3
REMARK ITScore	: -169.357	REMARK RMSD	: 58.183	MODEL	40
REMARK ITScore	: -168.884	REMARK RMSD	: 49.911	MODEL	41
REMARK ITScore	: -168.846	REMARK RMSD	: 41.609	MODEL	42
REMARK ITScore	: -168.132	REMARK RMSD	: 44.790	MODEL	43
REMARK ITScore	: -167.673	REMARK RMSD	: 40.730	MODEL	44
REMARK ITScore	: -166.966	REMARK RMSD	: 56.895	MODEL	45
REMARK ITScore	: -166.835	REMARK RMSD	: 33.688	MODEL	46
REMARK ITScore	: -166.546	REMARK RMSD	: 36.064	MODEL	47
REMARK ITScore	: -166.498	REMARK RMSD	: 36.962	MODEL	48
REMARK ITScore	: -165.525	REMARK RMSD	: 32.551	MODEL	49
REMARK ITScore	: -192.143	REMARK RMSD	: 50.243	MODEL	4
REMARK ITScore	: -165.433	REMARK RMSD	: 53.332	MODEL	50
REMARK ITScore	: -165.167	REMARK RMSD	: 35.341	MODEL	51
REMARK ITScore	: -164.772	REMARK RMSD	: 69.459	MODEL	1
REMARK ITScore	: -164.492	REMARK RMSD	: 90.802	MODEL	2
REMARK ITScore	: -164.309	REMARK RMSD	: 61.293	MODEL	52
REMARK ITScore	: -164.265	REMARK RMSD	: 53.962	MODEL	53
REMARK ITScore	: -164.155	REMARK RMSD	: 40.276	MODEL	54
REMARK ITScore	: -163.949	REMARK RMSD	: 45.814	MODEL	55
REMARK ITScore	: -163.370	REMARK RMSD	: 39.212	MODEL	56
REMARK ITScore	: -163.290	REMARK RMSD	: 42.574	MODEL	57
REMARK ITScore	: -191.021	REMARK RMSD	: 48.795	MODEL	5
REMARK ITScore	: -163.268	REMARK RMSD	: 37.817	MODEL	58
REMARK ITScore	: -163.195	REMARK RMSD	: 52.524	MODEL	59
REMARK ITScore	: -162.635	REMARK RMSD	: 40.811	MODEL	60
REMARK ITScore	: -162.315	REMARK RMSD	: 70.854	MODEL	61
REMARK ITScore	: -162.165	REMARK RMSD	: 32.322	MODEL	62
REMARK ITScore	: -161.950	REMARK RMSD	: 56.595	MODEL	63
REMARK ITScore	: -161.931	REMARK RMSD	: 42.544	MODEL	64
REMARK ITScore	: -161.795	REMARK RMSD	: 66.576	MODEL	1
REMARK ITScore	: -161.460	REMARK RMSD	: 58.311	MODEL	65
REMARK ITScore	: -161.433	REMARK RMSD	: 38.760	MODEL	66
REMARK ITScore	: -189.132	REMARK RMSD	: 54.175	MODEL	6
REMARK ITScore	: -161.422	REMARK RMSD	: 57.057	MODEL	67
REMARK ITScore	: -161.328	REMARK RMSD	: 54.287	MODEL	68
REMARK ITScore	: -161.117	REMARK RMSD	: 88.171	MODEL	3
REMARK ITScore	: -161.097	REMARK RMSD	: 82.064	MODEL	69
REMARK ITScore	: -160.933	REMARK RMSD	: 45.847	MODEL	70
REMARK ITScore	: -160.809	REMARK RMSD	: 25.184	MODEL	71
REMARK ITScore	: -160.778	REMARK RMSD	: 45.089	MODEL	72
REMARK ITScore	: -160.076	REMARK RMSD	: 40.031	MODEL	73
REMARK ITScore	: -160.054	REMARK RMSD	: 46.591	MODEL	74
REMARK ITScore	: -160.021	REMARK RMSD	: 67.290	MODEL	75
REMARK ITScore	: -188.320	REMARK RMSD	: 56.264	MODEL	7
REMARK ITScore	: -159.848	REMARK RMSD	: 80.019	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.845	REMARK RMSD	: 63.260	MODEL	76
REMARK ITScore	: -159.762	REMARK RMSD	: 33.950	MODEL	77
REMARK ITScore	: -159.567	REMARK RMSD	: 34.182	MODEL	78
REMARK ITScore	: -159.534	REMARK RMSD	: 45.119	MODEL	79
REMARK ITScore	: -159.456	REMARK RMSD	: 82.659	MODEL	5
REMARK ITScore	: -159.123	REMARK RMSD	: 45.151	MODEL	80
REMARK ITScore	: -159.020	REMARK RMSD	: 33.274	MODEL	81
REMARK ITScore	: -158.992	REMARK RMSD	: 52.829	MODEL	82
REMARK ITScore	: -158.826	REMARK RMSD	: 55.555	MODEL	83
REMARK ITScore	: -188.110	REMARK RMSD	: 54.171	MODEL	8
REMARK ITScore	: -158.676	REMARK RMSD	: 49.712	MODEL	84
REMARK ITScore	: -158.162	REMARK RMSD	: 39.676	MODEL	85
REMARK ITScore	: -157.643	REMARK RMSD	: 52.620	MODEL	86
REMARK ITScore	: -157.554	REMARK RMSD	: 40.535	MODEL	87
REMARK ITScore	: -157.267	REMARK RMSD	: 45.475	MODEL	88
REMARK ITScore	: -157.172	REMARK RMSD	: 44.960	MODEL	89
REMARK ITScore	: -157.131	REMARK RMSD	: 45.733	MODEL	90
REMARK ITScore	: -157.071	REMARK RMSD	: 27.839	MODEL	91
REMARK ITScore	: -156.844	REMARK RMSD	: 44.281	MODEL	92
REMARK ITScore	: -156.834	REMARK RMSD	: 54.523	MODEL	93
REMARK ITScore	: -187.788	REMARK RMSD	: 26.495	MODEL	9

pC4

REMARK ITScore	: -152.035	REMARK RMSD	: 35.303	MODEL	98
REMARK ITScore	: -178.830	REMARK RMSD	: 30.161	MODEL	10
REMARK ITScore	: -177.907	REMARK RMSD	: 49.791	MODEL	11
REMARK ITScore	: -177.627	REMARK RMSD	: 23.224	MODEL	12
REMARK ITScore	: -177.351	REMARK RMSD	: 35.923	MODEL	13
REMARK ITScore	: -176.634	REMARK RMSD	: 23.496	MODEL	14
REMARK ITScore	: -172.043	REMARK RMSD	: 48.109	MODEL	15
REMARK ITScore	: -170.313	REMARK RMSD	: 40.445	MODEL	16
REMARK ITScore	: -169.235	REMARK RMSD	: 41.826	MODEL	17
REMARK ITScore	: -168.347	REMARK RMSD	: 38.258	MODEL	18
REMARK ITScore	: -168.127	REMARK RMSD	: 41.096	MODEL	19
REMARK ITScore	: -217.785	REMARK RMSD	: 56.820	MODEL	1
REMARK ITScore	: -167.612	REMARK RMSD	: 36.587	MODEL	20
REMARK ITScore	: -167.474	REMARK RMSD	: 44.102	MODEL	21
REMARK ITScore	: -167.159	REMARK RMSD	: 58.339	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.892	REMARK RMSD	: 54.588	MODEL	23
REMARK ITScore	: -166.540	REMARK RMSD	: 50.085	MODEL	24
REMARK ITScore	: -165.396	REMARK RMSD	: 40.630	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.257	REMARK RMSD	: 53.476	MODEL	26
REMARK ITScore	: -165.218	REMARK RMSD	: 44.066	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.781	REMARK RMSD	: 65.605	MODEL	28
REMARK ITScore	: -164.720	REMARK RMSD	: 53.424	MODEL	29
REMARK ITScore	: -193.080	REMARK RMSD	: 49.907	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.965	REMARK RMSD	: 35.006	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.569	REMARK RMSD	: 40.367	MODEL	31
REMARK ITScore	: -163.569	REMARK RMSD	: 28.945	MODEL	32
REMARK ITScore	: -163.225	REMARK RMSD	: 31.111	MODEL	33
REMARK ITScore	: -163.108	REMARK RMSD	: 64.262	MODEL	34
REMARK ITScore	: -163.079	REMARK RMSD	: 16.633	MODEL	35
REMARK ITScore	: -162.752	REMARK RMSD	: 39.662	MODEL	36
REMARK ITScore	: -162.532	REMARK RMSD	: 56.855	MODEL	37
REMARK ITScore	: -162.082	REMARK RMSD	: 52.906	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.959	REMARK RMSD	: 55.844	MODEL	39
REMARK ITScore	: -187.768	REMARK RMSD	: 25.894	MODEL	3
REMARK ITScore	: -161.552	REMARK RMSD	: 39.620	MODEL	40
REMARK ITScore	: -161.523	REMARK RMSD	: 32.396	MODEL	41
REMARK ITScore	: -161.096	REMARK RMSD	: 53.357	MODEL	42
REMARK ITScore	: -161.046	REMARK RMSD	: 56.682	MODEL	43
REMARK ITScore	: -160.996	REMARK RMSD	: 29.591	MODEL	44
REMARK ITScore	: -160.813	REMARK RMSD	: 27.037	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.729	REMARK RMSD	: 29.048	MODEL	46
REMARK ITScore	: -160.541	REMARK RMSD	: 55.766	MODEL	47
REMARK ITScore	: -160.301	REMARK RMSD	: 37.835	MODEL	48
REMARK ITScore	: -159.779	REMARK RMSD	: 60.528	MODEL	49
REMARK ITScore	: -183.407	REMARK RMSD	: 14.501	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.774	REMARK RMSD	: 45.482	MODEL	50
REMARK ITScore	: -159.759	REMARK RMSD	: 49.131	MODEL	51
REMARK ITScore	: -159.470	REMARK RMSD	: 20.946	MODEL	52
REMARK ITScore	: -159.301	REMARK RMSD	: 39.579	MODEL	53
REMARK ITScore	: -158.995	REMARK RMSD	: 26.039	MODEL	54
REMARK ITScore	: -158.566	REMARK RMSD	: 47.765	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.512	REMARK RMSD	: 25.078	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.403	REMARK RMSD	: 39.447	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.229	REMARK RMSD	: 36.410	MODEL	58
REMARK ITScore	: -158.038	REMARK RMSD	: 57.191	MODEL	59
REMARK ITScore	: -182.328	REMARK RMSD	: 32.812	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.793	REMARK RMSD	: 17.526	MODEL	60
REMARK ITScore	: -157.300	REMARK RMSD	: 50.073	MODEL	61
REMARK ITScore	: -157.217	REMARK RMSD	: 53.123	MODEL	62
REMARK ITScore	: -157.053	REMARK RMSD	: 30.023	MODEL	1
REMARK ITScore	: -156.946	REMARK RMSD	: 41.909	MODEL	63
REMARK ITScore	: -156.871	REMARK RMSD	: 37.003	MODEL	64
REMARK ITScore	: -156.853	REMARK RMSD	: 57.355	MODEL	65
REMARK ITScore	: -156.797	REMARK RMSD	: 45.604	MODEL	66
REMARK ITScore	: -156.778	REMARK RMSD	: 60.224	MODEL	67
REMARK ITScore	: -156.772	REMARK RMSD	: 35.898	MODEL	68
REMARK ITScore	: -180.656	REMARK RMSD	: 41.628	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.297	REMARK RMSD	: 54.548	MODEL	69
REMARK ITScore	: -156.101	REMARK RMSD	: 47.174	MODEL	70
REMARK ITScore	: -155.826	REMARK RMSD	: 59.847	MODEL	71
REMARK ITScore	: -155.514	REMARK RMSD	: 36.028	MODEL	72
REMARK ITScore	: -155.130	REMARK RMSD	: 21.256	MODEL	73
REMARK ITScore	: -154.784	REMARK RMSD	: 54.718	MODEL	74
REMARK ITScore	: -154.720	REMARK RMSD	: 43.718	MODEL	2
REMARK ITScore	: -154.586	REMARK RMSD	: 28.448	MODEL	75
REMARK ITScore	: -154.482	REMARK RMSD	: 30.723	MODEL	76
REMARK ITScore	: -154.176	REMARK RMSD	: 36.901	MODEL	77
REMARK ITScore	: -179.902	REMARK RMSD	: 35.352	MODEL	7
REMARK ITScore	: -154.113	REMARK RMSD	: 39.821	MODEL	78
REMARK ITScore	: -153.913	REMARK RMSD	: 24.640	MODEL	79
REMARK ITScore	: -153.586	REMARK RMSD	: 30.802	MODEL	80
REMARK ITScore	: -153.513	REMARK RMSD	: 27.426	MODEL	81
REMARK ITScore	: -153.477	REMARK RMSD	: 55.757	MODEL	82
REMARK ITScore	: -153.423	REMARK RMSD	: 26.925	MODEL	83
REMARK ITScore	: -153.417	REMARK RMSD	: 51.635	MODEL	84
REMARK ITScore	: -153.384	REMARK RMSD	: 52.282	MODEL	85
REMARK ITScore	: -153.317	REMARK RMSD	: 21.348	MODEL	86
REMARK ITScore	: -153.134	REMARK RMSD	: 37.904	MODEL	87
REMARK ITScore	: -179.376	REMARK RMSD	: 32.915	MODEL	8
REMARK ITScore	: -152.891	REMARK RMSD	: 30.131	MODEL	88
REMARK ITScore	: -152.882	REMARK RMSD	: 56.316	MODEL	89
REMARK ITScore	: -152.783	REMARK RMSD	: 34.701	MODEL	90
REMARK ITScore	: -152.772	REMARK RMSD	: 47.256	MODEL	91
REMARK ITScore	: -152.751	REMARK RMSD	: 53.462	MODEL	92
REMARK ITScore	: -152.371	REMARK RMSD	: 33.349	MODEL	93
REMARK ITScore	: -152.325	REMARK RMSD	: 47.382	MODEL	94
REMARK ITScore	: -152.199	REMARK RMSD	: 52.485	MODEL	95
REMARK ITScore	: -152.167	REMARK RMSD	: 57.501	MODEL	96
REMARK ITScore	: -152.061	REMARK RMSD	: 61.427	MODEL	97
REMARK ITScore	: -178.936	REMARK RMSD	: 43.189	MODEL	9

pD6

REMARK ITScore	: -152.353	REMARK RMSD	: 49.264	MODEL	96
REMARK ITScore	: -171.927	REMARK RMSD	: 36.907	MODEL	10
REMARK ITScore	: -171.539	REMARK RMSD	: 25.903	MODEL	11
REMARK ITScore	: -170.990	REMARK RMSD	: 33.339	MODEL	12
REMARK ITScore	: -170.528	REMARK RMSD	: 31.691	MODEL	13
REMARK ITScore	: -169.588	REMARK RMSD	: 31.107	MODEL	14
REMARK ITScore	: -169.542	REMARK RMSD	: 35.722	MODEL	15
REMARK ITScore	: -169.067	REMARK RMSD	: 37.574	MODEL	16
REMARK ITScore	: -168.749	REMARK RMSD	: 32.302	MODEL	17
REMARK ITScore	: -168.453	REMARK RMSD	: 38.349	MODEL	18
REMARK ITScore	: -167.782	REMARK RMSD	: 43.031	MODEL	19
REMARK ITScore	: -191.480	REMARK RMSD	: 28.920	MODEL	1
REMARK ITScore	: -167.023	REMARK RMSD	: 33.889	MODEL	20
REMARK ITScore	: -166.868	REMARK RMSD	: 53.644	MODEL	21
REMARK ITScore	: -166.746	REMARK RMSD	: 32.593	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.449	REMARK RMSD	: 45.236	MODEL	23
REMARK ITScore	: -165.659	REMARK RMSD	: 42.229	MODEL	24
REMARK ITScore	: -165.374	REMARK RMSD	: 43.773	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.366	REMARK RMSD	: 40.401	MODEL	26
REMARK ITScore	: -165.319	REMARK RMSD	: 16.645	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.914	REMARK RMSD	: 55.802	MODEL	28
REMARK ITScore	: -163.990	REMARK RMSD	: 26.322	MODEL	29
REMARK ITScore	: -189.626	REMARK RMSD	: 24.999	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.586	REMARK RMSD	: 43.449	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.322	REMARK RMSD	: 43.637	MODEL	31
REMARK ITScore	: -162.737	REMARK RMSD	: 29.909	MODEL	32
REMARK ITScore	: -162.124	REMARK RMSD	: 37.992	MODEL	33
REMARK ITScore	: -161.950	REMARK RMSD	: 46.763	MODEL	34
REMARK ITScore	: -161.906	REMARK RMSD	: 41.400	MODEL	35
REMARK ITScore	: -161.548	REMARK RMSD	: 39.627	MODEL	36
REMARK ITScore	: -161.405	REMARK RMSD	: 52.234	MODEL	37
REMARK ITScore	: -161.210	REMARK RMSD	: 23.619	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.101	REMARK RMSD	: 45.351	MODEL	39
REMARK ITScore	: -187.240	REMARK RMSD	: 40.379	MODEL	3
REMARK ITScore	: -160.638	REMARK RMSD	: 57.833	MODEL	40
REMARK ITScore	: -160.618	REMARK RMSD	: 26.416	MODEL	41
REMARK ITScore	: -160.417	REMARK RMSD	: 54.480	MODEL	42
REMARK ITScore	: -160.365	REMARK RMSD	: 50.772	MODEL	43
REMARK ITScore	: -160.292	REMARK RMSD	: 43.326	MODEL	44
REMARK ITScore	: -160.291	REMARK RMSD	: 42.866	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.284	REMARK RMSD	: 27.887	MODEL	46
REMARK ITScore	: -160.061	REMARK RMSD	: 26.494	MODEL	47
REMARK ITScore	: -160.025	REMARK RMSD	: 31.336	MODEL	48
REMARK ITScore	: -159.643	REMARK RMSD	: 30.598	MODEL	49
REMARK ITScore	: -184.737	REMARK RMSD	: 25.603	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.576	REMARK RMSD	: 35.317	MODEL	50
REMARK ITScore	: -159.427	REMARK RMSD	: 38.581	MODEL	51
REMARK ITScore	: -159.195	REMARK RMSD	: 33.551	MODEL	52
REMARK ITScore	: -158.984	REMARK RMSD	: 37.343	MODEL	53
REMARK ITScore	: -158.954	REMARK RMSD	: 48.491	MODEL	54
REMARK ITScore	: -158.809	REMARK RMSD	: 39.891	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.551	REMARK RMSD	: 44.154	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.323	REMARK RMSD	: 62.001	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.191	REMARK RMSD	: 52.079	MODEL	58
REMARK ITScore	: -157.906	REMARK RMSD	: 36.777	MODEL	59
REMARK ITScore	: -181.593	REMARK RMSD	: 37.751	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.835	REMARK RMSD	: 42.201	MODEL	60
REMARK ITScore	: -157.794	REMARK RMSD	: 75.467	MODEL	1
REMARK ITScore	: -157.596	REMARK RMSD	: 56.983	MODEL	61
REMARK ITScore	: -157.563	REMARK RMSD	: 60.381	MODEL	62
REMARK ITScore	: -157.435	REMARK RMSD	: 48.496	MODEL	63
REMARK ITScore	: -157.349	REMARK RMSD	: 59.081	MODEL	64
REMARK ITScore	: -157.280	REMARK RMSD	: 68.254	MODEL	2
REMARK ITScore	: -157.089	REMARK RMSD	: 39.303	MODEL	65
REMARK ITScore	: -156.776	REMARK RMSD	: 33.719	MODEL	66
REMARK ITScore	: -156.663	REMARK RMSD	: 44.453	MODEL	67
REMARK ITScore	: -180.633	REMARK RMSD	: 35.718	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.448	REMARK RMSD	: 47.218	MODEL	68
REMARK ITScore	: -156.087	REMARK RMSD	: 34.572	MODEL	69
REMARK ITScore	: -156.020	REMARK RMSD	: 44.941	MODEL	70
REMARK ITScore	: -155.928	REMARK RMSD	: 42.937	MODEL	71
REMARK ITScore	: -155.703	REMARK RMSD	: 35.094	MODEL	72
REMARK ITScore	: -155.490	REMARK RMSD	: 20.956	MODEL	73
REMARK ITScore	: -155.266	REMARK RMSD	: 54.341	MODEL	74
REMARK ITScore	: -155.089	REMARK RMSD	: 42.354	MODEL	75
REMARK ITScore	: -154.890	REMARK RMSD	: 50.352	MODEL	76
REMARK ITScore	: -154.817	REMARK RMSD	: 57.919	MODEL	77
REMARK ITScore	: -180.468	REMARK RMSD	: 41.473	MODEL	7
REMARK ITScore	: -154.658	REMARK RMSD	: 55.872	MODEL	1
REMARK ITScore	: -154.567	REMARK RMSD	: 38.488	MODEL	78
REMARK ITScore	: -154.159	REMARK RMSD	: 34.625	MODEL	79
REMARK ITScore	: -154.040	REMARK RMSD	: 41.491	MODEL	80
REMARK ITScore	: -153.932	REMARK RMSD	: 44.149	MODEL	81
REMARK ITScore	: -153.830	REMARK RMSD	: 26.249	MODEL	82
REMARK ITScore	: -153.738	REMARK RMSD	: 52.977	MODEL	83
REMARK ITScore	: -153.683	REMARK RMSD	: 39.773	MODEL	84
REMARK ITScore	: -153.541	REMARK RMSD	: 41.085	MODEL	85
REMARK ITScore	: -153.397	REMARK RMSD	: 57.124	MODEL	86
REMARK ITScore	: -180.030	REMARK RMSD	: 55.130	MODEL	8
REMARK ITScore	: -153.372	REMARK RMSD	: 57.593	MODEL	87
REMARK ITScore	: -153.247	REMARK RMSD	: 56.311	MODEL	88
REMARK ITScore	: -153.210	REMARK RMSD	: 54.326	MODEL	89
REMARK ITScore	: -153.185	REMARK RMSD	: 60.061	MODEL	90
REMARK ITScore	: -153.078	REMARK RMSD	: 30.175	MODEL	91
REMARK ITScore	: -152.937	REMARK RMSD	: 38.177	MODEL	2
REMARK ITScore	: -152.794	REMARK RMSD	: 44.026	MODEL	92
REMARK ITScore	: -152.784	REMARK RMSD	: 35.756	MODEL	93
REMARK ITScore	: -152.639	REMARK RMSD	: 45.499	MODEL	94
REMARK ITScore	: -152.438	REMARK RMSD	: 39.023	MODEL	95
REMARK ITScore	: -172.773	REMARK RMSD	: 41.935	MODEL	9

pA5A5

REMARK ITScore	: -150.049	REMARK RMSD	: 45.812	MODEL	82
REMARK ITScore	: -177.110	REMARK RMSD	: 39.697	MODEL	8
REMARK ITScore	: -176.871	REMARK RMSD	: 60.741	MODEL	9
REMARK ITScore	: -175.961	REMARK RMSD	: 30.278	MODEL	10
REMARK ITScore	: -174.470	REMARK RMSD	: 53.876	MODEL	11
REMARK ITScore	: -173.966	REMARK RMSD	: 41.303	MODEL	12
REMARK ITScore	: -173.057	REMARK RMSD	: 77.555	MODEL	13
REMARK ITScore	: -172.726	REMARK RMSD	: 39.829	MODEL	14
REMARK ITScore	: -172.023	REMARK RMSD	: 41.025	MODEL	15
REMARK ITScore	: -171.442	REMARK RMSD	: 57.210	MODEL	16
REMARK ITScore	: -171.130	REMARK RMSD	: 53.244	MODEL	17
REMARK ITScore	: -207.778	REMARK RMSD	: 59.227	MODEL	1
REMARK ITScore	: -171.052	REMARK RMSD	: 34.337	MODEL	18
REMARK ITScore	: -170.816	REMARK RMSD	: 52.623	MODEL	3
REMARK ITScore	: -169.105	REMARK RMSD	: 55.784	MODEL	19
REMARK ITScore	: -168.036	REMARK RMSD	: 70.190	MODEL	20
REMARK ITScore	: -167.271	REMARK RMSD	: 62.763	MODEL	21
REMARK ITScore	: -166.893	REMARK RMSD	: 55.436	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.735	REMARK RMSD	: 51.749	MODEL	23
REMARK ITScore	: -166.121	REMARK RMSD	: 61.567	MODEL	24
REMARK ITScore	: -166.041	REMARK RMSD	: 48.461	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.769	REMARK RMSD	: 56.171	MODEL	26
REMARK ITScore	: -206.568	REMARK RMSD	: 63.725	MODEL	2
REMARK ITScore	: -165.077	REMARK RMSD	: 32.484	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.693	REMARK RMSD	: 53.505	MODEL	4
REMARK ITScore	: -164.617	REMARK RMSD	: 49.476	MODEL	28
REMARK ITScore	: -163.625	REMARK RMSD	: 70.354	MODEL	29
REMARK ITScore	: -162.489	REMARK RMSD	: 71.281	MODEL	30
REMARK ITScore	: -162.042	REMARK RMSD	: 38.457	MODEL	31
REMARK ITScore	: -161.744	REMARK RMSD	: 54.788	MODEL	32
REMARK ITScore	: -161.599	REMARK RMSD	: 55.134	MODEL	33
REMARK ITScore	: -161.402	REMARK RMSD	: 42.083	MODEL	34
REMARK ITScore	: -160.477	REMARK RMSD	: 54.933	MODEL	35
REMARK ITScore	: -197.811	REMARK RMSD	: 66.510	MODEL	3
REMARK ITScore	: -160.228	REMARK RMSD	: 50.845	MODEL	36
REMARK ITScore	: -160.143	REMARK RMSD	: 63.200	MODEL	1
REMARK ITScore	: -159.797	REMARK RMSD	: 31.900	MODEL	37
REMARK ITScore	: -159.779	REMARK RMSD	: 33.506	MODEL	38
REMARK ITScore	: -159.705	REMARK RMSD	: 67.882	MODEL	39
REMARK ITScore	: -159.659	REMARK RMSD	: 58.199	MODEL	40
REMARK ITScore	: -159.500	REMARK RMSD	: 59.509	MODEL	41
REMARK ITScore	: -158.873	REMARK RMSD	: 30.025	MODEL	42
REMARK ITScore	: -158.707	REMARK RMSD	: 41.383	MODEL	43
REMARK ITScore	: -158.615	REMARK RMSD	: 47.184	MODEL	44
REMARK ITScore	: -194.735	REMARK RMSD	: 43.229	MODEL	1
REMARK ITScore	: -158.314	REMARK RMSD	: 59.545	MODEL	45
REMARK ITScore	: -157.827	REMARK RMSD	: 77.281	MODEL	46
REMARK ITScore	: -157.808	REMARK RMSD	: 46.512	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.575	REMARK RMSD	: 56.363	MODEL	6
REMARK ITScore	: -157.482	REMARK RMSD	: 59.029	MODEL	47
REMARK ITScore	: -157.206	REMARK RMSD	: 58.881	MODEL	48
REMARK ITScore	: -156.934	REMARK RMSD	: 79.656	MODEL	49
REMARK ITScore	: -156.520	REMARK RMSD	: 32.403	MODEL	50
REMARK ITScore	: -156.387	REMARK RMSD	: 48.512	MODEL	51
REMARK ITScore	: -156.375	REMARK RMSD	: 37.350	MODEL	52
REMARK ITScore	: -184.261	REMARK RMSD	: 46.643	MODEL	4
REMARK ITScore	: -156.317	REMARK RMSD	: 56.533	MODEL	53
REMARK ITScore	: -156.193	REMARK RMSD	: 52.585	MODEL	54
REMARK ITScore	: -155.931	REMARK RMSD	: 81.430	MODEL	55
REMARK ITScore	: -155.661	REMARK RMSD	: 41.103	MODEL	56
REMARK ITScore	: -155.395	REMARK RMSD	: 46.252	MODEL	57
REMARK ITScore	: -155.334	REMARK RMSD	: 60.363	MODEL	7
REMARK ITScore	: -155.225	REMARK RMSD	: 75.283	MODEL	58
REMARK ITScore	: -154.772	REMARK RMSD	: 57.908	MODEL	59
REMARK ITScore	: -154.454	REMARK RMSD	: 83.820	MODEL	60
REMARK ITScore	: -154.099	REMARK RMSD	: 97.052	MODEL	2
REMARK ITScore	: -183.960	REMARK RMSD	: 86.324	MODEL	5
REMARK ITScore	: -154.081	REMARK RMSD	: 42.205	MODEL	61
REMARK ITScore	: -154.059	REMARK RMSD	: 63.791	MODEL	8
REMARK ITScore	: -153.991	REMARK RMSD	: 66.291	MODEL	9
REMARK ITScore	: -153.600	REMARK RMSD	: 49.839	MODEL	62
REMARK ITScore	: -153.526	REMARK RMSD	: 51.173	MODEL	10
REMARK ITScore	: -153.393	REMARK RMSD	: 49.415	MODEL	63
REMARK ITScore	: -152.995	REMARK RMSD	: 66.379	MODEL	64
REMARK ITScore	: -152.877	REMARK RMSD	: 79.172	MODEL	3
REMARK ITScore	: -152.812	REMARK RMSD	: 42.630	MODEL	65
REMARK ITScore	: -152.758	REMARK RMSD	: 86.444	MODEL	4
REMARK ITScore	: -181.595	REMARK RMSD	: 44.245	MODEL	6
REMARK ITScore	: -152.628	REMARK RMSD	: 25.190	MODEL	66
REMARK ITScore	: -152.485	REMARK RMSD	: 44.230	MODEL	67
REMARK ITScore	: -152.347	REMARK RMSD	: 31.316	MODEL	68
REMARK ITScore	: -152.287	REMARK RMSD	: 43.123	MODEL	69
REMARK ITScore	: -152.161	REMARK RMSD	: 36.087	MODEL	70
REMARK ITScore	: -152.147	REMARK RMSD	: 50.749	MODEL	71
REMARK ITScore	: -152.143	REMARK RMSD	: 81.872	MODEL	72
REMARK ITScore	: -152.115	REMARK RMSD	: 60.245	MODEL	11
REMARK ITScore	: -151.912	REMARK RMSD	: 36.508	MODEL	73
REMARK ITScore	: -151.882	REMARK RMSD	: 68.745	MODEL	74
REMARK ITScore	: -180.348	REMARK RMSD	: 68.967	MODEL	7
REMARK ITScore	: -151.796	REMARK RMSD	: 65.500	MODEL	75
REMARK ITScore	: -151.580	REMARK RMSD	: 52.469	MODEL	12
REMARK ITScore	: -151.045	REMARK RMSD	: 34.246	MODEL	76
REMARK ITScore	: -150.974	REMARK RMSD	: 57.939	MODEL	77
REMARK ITScore	: -150.890	REMARK RMSD	: 63.409	MODEL	1
REMARK ITScore	: -150.632	REMARK RMSD	: 46.404	MODEL	78
REMARK ITScore	: -150.559	REMARK RMSD	: 38.381	MODEL	79
REMARK ITScore	: -150.394	REMARK RMSD	: 21.964	MODEL	80
REMARK ITScore	: -150.157	REMARK RMSD	: 57.267	MODEL	81
REMARK ITScore	: -150.126	REMARK RMSD	: 51.597	MODEL	13
REMARK ITScore	: -178.803	REMARK RMSD	: 58.950	MODEL	2

pA5A7

REMARK ITScore	: -154.311	REMARK RMSD	: 70.752	MODEL	8
REMARK ITScore	: -185.363	REMARK RMSD	: 51.785	MODEL	8
REMARK ITScore	: -183.084	REMARK RMSD	: 61.734	MODEL	9
REMARK ITScore	: -182.953	REMARK RMSD	: 51.047	MODEL	10
REMARK ITScore	: -182.473	REMARK RMSD	: 47.921	MODEL	11
REMARK ITScore	: -180.141	REMARK RMSD	: 25.061	MODEL	12
REMARK ITScore	: -179.901	REMARK RMSD	: 75.596	MODEL	13
REMARK ITScore	: -179.685	REMARK RMSD	: 59.292	MODEL	14
REMARK ITScore	: -179.194	REMARK RMSD	: 35.323	MODEL	15
REMARK ITScore	: -178.903	REMARK RMSD	: 59.799	MODEL	16
REMARK ITScore	: -178.456	REMARK RMSD	: 39.958	MODEL	17
REMARK ITScore	: -230.428	REMARK RMSD	: 35.762	MODEL	1
REMARK ITScore	: -178.257	REMARK RMSD	: 55.029	MODEL	18
REMARK ITScore	: -176.677	REMARK RMSD	: 49.648	MODEL	19
REMARK ITScore	: -176.651	REMARK RMSD	: 62.373	MODEL	20
REMARK ITScore	: -176.558	REMARK RMSD	: 30.016	MODEL	21
REMARK ITScore	: -175.842	REMARK RMSD	: 99.326	MODEL	1
REMARK ITScore	: -175.092	REMARK RMSD	: 47.951	MODEL	22
REMARK ITScore	: -174.980	REMARK RMSD	: 44.679	MODEL	23
REMARK ITScore	: -171.719	REMARK RMSD	: 65.757	MODEL	24
REMARK ITScore	: -171.521	REMARK RMSD	: 58.175	MODEL	25
REMARK ITScore	: -170.515	REMARK RMSD	: 42.024	MODEL	26
REMARK ITScore	: -217.970	REMARK RMSD	: 45.569	MODEL	2
REMARK ITScore	: -170.226	REMARK RMSD	: 55.291	MODEL	27
REMARK ITScore	: -169.986	REMARK RMSD	: 69.595	MODEL	28
REMARK ITScore	: -169.331	REMARK RMSD	: 45.601	MODEL	29
REMARK ITScore	: -169.307	REMARK RMSD	: 38.119	MODEL	30
REMARK ITScore	: -169.025	REMARK RMSD	: 52.254	MODEL	31
REMARK ITScore	: -168.293	REMARK RMSD	: 54.434	MODEL	32
REMARK ITScore	: -167.881	REMARK RMSD	: 54.427	MODEL	33
REMARK ITScore	: -167.203	REMARK RMSD	: 67.764	MODEL	34
REMARK ITScore	: -166.863	REMARK RMSD	: 32.773	MODEL	35
REMARK ITScore	: -166.775	REMARK RMSD	: 47.199	MODEL	36
REMARK ITScore	: -217.404	REMARK RMSD	: 41.438	MODEL	3
REMARK ITScore	: -166.374	REMARK RMSD	: 64.491	MODEL	3
REMARK ITScore	: -166.017	REMARK RMSD	: 62.926	MODEL	37
REMARK ITScore	: -165.988	REMARK RMSD	: 74.400	MODEL	38
REMARK ITScore	: -165.834	REMARK RMSD	: 106.535	MODEL	2
REMARK ITScore	: -165.829	REMARK RMSD	: 55.235	MODEL	39
REMARK ITScore	: -165.784	REMARK RMSD	: 45.564	MODEL	40
REMARK ITScore	: -165.433	REMARK RMSD	: 66.275	MODEL	4
REMARK ITScore	: -165.325	REMARK RMSD	: 44.724	MODEL	41
REMARK ITScore	: -164.956	REMARK RMSD	: 75.156	MODEL	3
REMARK ITScore	: -164.719	REMARK RMSD	: 83.329	MODEL	42
REMARK ITScore	: -202.678	REMARK RMSD	: 80.831	MODEL	4
REMARK ITScore	: -164.503	REMARK RMSD	: 105.837	MODEL	4
REMARK ITScore	: -164.122	REMARK RMSD	: 62.381	MODEL	5
REMARK ITScore	: -164.003	REMARK RMSD	: 39.720	MODEL	43
REMARK ITScore	: -163.962	REMARK RMSD	: 54.803	MODEL	6
REMARK ITScore	: -163.737	REMARK RMSD	: 77.589	MODEL	44
REMARK ITScore	: -162.973	REMARK RMSD	: 57.065	MODEL	45
REMARK ITScore	: -162.943	REMARK RMSD	: 59.123	MODEL	46
REMARK ITScore	: -162.804	REMARK RMSD	: 62.367	MODEL	7
REMARK ITScore	: -162.739	REMARK RMSD	: 73.539	MODEL	47
REMARK ITScore	: -162.018	REMARK RMSD	: 69.309	MODEL	48
REMARK ITScore	: -202.457	REMARK RMSD	: 89.988	MODEL	5
REMARK ITScore	: -161.799	REMARK RMSD	: 65.322	MODEL	8
REMARK ITScore	: -161.516	REMARK RMSD	: 92.319	MODEL	5
REMARK ITScore	: -161.133	REMARK RMSD	: 67.914	MODEL	9
REMARK ITScore	: -160.687	REMARK RMSD	: 70.304	MODEL	49
REMARK ITScore	: -160.687	REMARK RMSD	: 35.782	MODEL	50
REMARK ITScore	: -160.492	REMARK RMSD	: 82.827	MODEL	51
REMARK ITScore	: -160.386	REMARK RMSD	: 58.447	MODEL	10
REMARK ITScore	: -160.084	REMARK RMSD	: 54.710	MODEL	52
REMARK ITScore	: -159.537	REMARK RMSD	: 71.311	MODEL	53
REMARK ITScore	: -159.415	REMARK RMSD	: 53.425	MODEL	54
REMARK ITScore	: -200.639	REMARK RMSD	: 44.162	MODEL	1
REMARK ITScore	: -158.960	REMARK RMSD	: 26.958	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.936	REMARK RMSD	: 44.663	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.341	REMARK RMSD	: 46.449	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.334	REMARK RMSD	: 40.613	MODEL	11
REMARK ITScore	: -157.804	REMARK RMSD	: 27.255	MODEL	58
REMARK ITScore	: -156.911	REMARK RMSD	: 47.995	MODEL	12
REMARK ITScore	: -156.746	REMARK RMSD	: 60.148	MODEL	59
REMARK ITScore	: -156.536	REMARK RMSD	: 69.005	MODEL	60
REMARK ITScore	: -156.502	REMARK RMSD	: 40.833	MODEL	61
REMARK ITScore	: -156.407	REMARK RMSD	: 89.692	MODEL	62
REMARK ITScore	: -192.175	REMARK RMSD	: 73.767	MODEL	2
REMARK ITScore	: -156.105	REMARK RMSD	: 90.913	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.105	REMARK RMSD	: 48.898	MODEL	63
REMARK ITScore	: -155.994	REMARK RMSD	: 38.002	MODEL	64
REMARK ITScore	: -155.932	REMARK RMSD	: 61.940	MODEL	65
REMARK ITScore	: -155.891	REMARK RMSD	: 63.211	MODEL	13
REMARK ITScore	: -155.809	REMARK RMSD	: 66.597	MODEL	66
REMARK ITScore	: -155.779	REMARK RMSD	: 36.345	MODEL	14
REMARK ITScore	: -155.624	REMARK RMSD	: 43.302	MODEL	67
REMARK ITScore	: -155.347	REMARK RMSD	: 74.719	MODEL	15
REMARK ITScore	: -155.216	REMARK RMSD	: 60.253	MODEL	7
REMARK ITScore	: -190.790	REMARK RMSD	: 56.482	MODEL	6
REMARK ITScore	: -155.206	REMARK RMSD	: 67.710	MODEL	16
REMARK ITScore	: -155.179	REMARK RMSD	: 70.751	MODEL	17
REMARK ITScore	: -155.081	REMARK RMSD	: 35.057	MODEL	68
REMARK ITScore	: -155.033	REMARK RMSD	: 53.480	MODEL	69
REMARK ITScore	: -154.916	REMARK RMSD	: 57.660	MODEL	18
REMARK ITScore	: -154.791	REMARK RMSD	: 47.951	MODEL	70
REMARK ITScore	: -154.605	REMARK RMSD	: 61.341	MODEL	71
REMARK ITScore	: -154.546	REMARK RMSD	: 83.694	MODEL	19
REMARK ITScore	: -154.531	REMARK RMSD	: 73.100	MODEL	20
REMARK ITScore	: -154.412	REMARK RMSD	: 43.923	MODEL	72
REMARK ITScore	: -187.360	REMARK RMSD	: 35.768	MODEL	7

pA5C4

REMARK ITScore	: -151.337	REMARK RMSD	: 55.744	MODEL	85
REMARK ITScore	: -171.461	REMARK RMSD	: 64.268	MODEL	9
REMARK ITScore	: -171.447	REMARK RMSD	: 63.655	MODEL	10
REMARK ITScore	: -170.786	REMARK RMSD	: 50.157	MODEL	11
REMARK ITScore	: -168.686	REMARK RMSD	: 35.440	MODEL	12
REMARK ITScore	: -168.125	REMARK RMSD	: 63.214	MODEL	13
REMARK ITScore	: -167.884	REMARK RMSD	: 60.142	MODEL	14
REMARK ITScore	: -167.298	REMARK RMSD	: 38.140	MODEL	15
REMARK ITScore	: -167.059	REMARK RMSD	: 60.992	MODEL	16
REMARK ITScore	: -166.976	REMARK RMSD	: 73.910	MODEL	17
REMARK ITScore	: -166.745	REMARK RMSD	: 72.739	MODEL	18
REMARK ITScore	: -196.571	REMARK RMSD	: 54.292	MODEL	1
REMARK ITScore	: -166.642	REMARK RMSD	: 44.479	MODEL	19
REMARK ITScore	: -165.453	REMARK RMSD	: 47.683	MODEL	20
REMARK ITScore	: -165.388	REMARK RMSD	: 52.104	MODEL	2
REMARK ITScore	: -165.062	REMARK RMSD	: 52.121	MODEL	21
REMARK ITScore	: -165.034	REMARK RMSD	: 52.112	MODEL	22
REMARK ITScore	: -164.871	REMARK RMSD	: 82.202	MODEL	23
REMARK ITScore	: -164.773	REMARK RMSD	: 44.098	MODEL	24
REMARK ITScore	: -164.625	REMARK RMSD	: 33.287	MODEL	25
REMARK ITScore	: -164.243	REMARK RMSD	: 60.217	MODEL	26
REMARK ITScore	: -163.957	REMARK RMSD	: 45.404	MODEL	3
REMARK ITScore	: -184.588	REMARK RMSD	: 47.046	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.779	REMARK RMSD	: 67.805	MODEL	27
REMARK ITScore	: -163.446	REMARK RMSD	: 50.243	MODEL	28
REMARK ITScore	: -163.292	REMARK RMSD	: 53.207	MODEL	29
REMARK ITScore	: -163.144	REMARK RMSD	: 70.943	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.106	REMARK RMSD	: 48.588	MODEL	31
REMARK ITScore	: -163.050	REMARK RMSD	: 54.859	MODEL	4
REMARK ITScore	: -162.726	REMARK RMSD	: 55.836	MODEL	32
REMARK ITScore	: -162.462	REMARK RMSD	: 73.297	MODEL	33
REMARK ITScore	: -162.377	REMARK RMSD	: 72.769	MODEL	34
REMARK ITScore	: -161.990	REMARK RMSD	: 56.666	MODEL	35
REMARK ITScore	: -183.298	REMARK RMSD	: 70.826	MODEL	3
REMARK ITScore	: -161.773	REMARK RMSD	: 55.549	MODEL	36
REMARK ITScore	: -161.743	REMARK RMSD	: 69.494	MODEL	5
REMARK ITScore	: -161.529	REMARK RMSD	: 30.775	MODEL	37
REMARK ITScore	: -161.489	REMARK RMSD	: 51.223	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.484	REMARK RMSD	: 55.133	MODEL	39
REMARK ITScore	: -161.391	REMARK RMSD	: 57.132	MODEL	40
REMARK ITScore	: -161.178	REMARK RMSD	: 59.813	MODEL	41
REMARK ITScore	: -161.166	REMARK RMSD	: 34.014	MODEL	42
REMARK ITScore	: -160.467	REMARK RMSD	: 50.514	MODEL	43
REMARK ITScore	: -160.386	REMARK RMSD	: 67.470	MODEL	44
REMARK ITScore	: -178.737	REMARK RMSD	: 59.573	MODEL	4
REMARK ITScore	: -160.342	REMARK RMSD	: 36.722	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.240	REMARK RMSD	: 43.875	MODEL	6
REMARK ITScore	: -160.108	REMARK RMSD	: 30.126	MODEL	46
REMARK ITScore	: -159.239	REMARK RMSD	: 55.093	MODEL	7
REMARK ITScore	: -158.943	REMARK RMSD	: 68.903	MODEL	8
REMARK ITScore	: -158.767	REMARK RMSD	: 91.115	MODEL	47
REMARK ITScore	: -158.719	REMARK RMSD	: 56.520	MODEL	48
REMARK ITScore	: -158.469	REMARK RMSD	: 91.968	MODEL	9
REMARK ITScore	: -158.084	REMARK RMSD	: 56.530	MODEL	49
REMARK ITScore	: -157.792	REMARK RMSD	: 44.156	MODEL	50
REMARK ITScore	: -178.129	REMARK RMSD	: 57.299	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.577	REMARK RMSD	: 52.977	MODEL	51
REMARK ITScore	: -157.267	REMARK RMSD	: 35.107	MODEL	52
REMARK ITScore	: -157.187	REMARK RMSD	: 51.710	MODEL	10
REMARK ITScore	: -157.176	REMARK RMSD	: 58.362	MODEL	53
REMARK ITScore	: -156.398	REMARK RMSD	: 63.723	MODEL	54
REMARK ITScore	: -156.369	REMARK RMSD	: 59.749	MODEL	55
REMARK ITScore	: -156.242	REMARK RMSD	: 76.489	MODEL	11
REMARK ITScore	: -156.204	REMARK RMSD	: 67.517	MODEL	56
REMARK ITScore	: -156.022	REMARK RMSD	: 53.083	MODEL	57
REMARK ITScore	: -155.789	REMARK RMSD	: 66.392	MODEL	58
REMARK ITScore	: -176.342	REMARK RMSD	: 78.146	MODEL	6
REMARK ITScore	: -155.716	REMARK RMSD	: 80.801	MODEL	12
REMARK ITScore	: -154.994	REMARK RMSD	: 59.889	MODEL	59
REMARK ITScore	: -154.980	REMARK RMSD	: 75.142	MODEL	60
REMARK ITScore	: -154.767	REMARK RMSD	: 50.718	MODEL	61
REMARK ITScore	: -154.554	REMARK RMSD	: 71.530	MODEL	13
REMARK ITScore	: -154.481	REMARK RMSD	: 52.824	MODEL	62
REMARK ITScore	: -154.134	REMARK RMSD	: 72.466	MODEL	63
REMARK ITScore	: -153.589	REMARK RMSD	: 60.693	MODEL	64
REMARK ITScore	: -153.565	REMARK RMSD	: 33.417	MODEL	65
REMARK ITScore	: -153.506	REMARK RMSD	: 56.405	MODEL	66
REMARK ITScore	: -174.950	REMARK RMSD	: 55.659	MODEL	1
REMARK ITScore	: -153.362	REMARK RMSD	: 41.987	MODEL	67
REMARK ITScore	: -153.087	REMARK RMSD	: 65.779	MODEL	68
REMARK ITScore	: -152.910	REMARK RMSD	: 41.007	MODEL	69
REMARK ITScore	: -152.739	REMARK RMSD	: 60.381	MODEL	70
REMARK ITScore	: -152.627	REMARK RMSD	: 88.049	MODEL	71
REMARK ITScore	: -152.607	REMARK RMSD	: 80.372	MODEL	72
REMARK ITScore	: -152.498	REMARK RMSD	: 78.740	MODEL	73
REMARK ITScore	: -152.476	REMARK RMSD	: 29.094	MODEL	74
REMARK ITScore	: -152.465	REMARK RMSD	: 58.929	MODEL	75
REMARK ITScore	: -152.348	REMARK RMSD	: 80.547	MODEL	14
REMARK ITScore	: -174.929	REMARK RMSD	: 52.654	MODEL	7
REMARK ITScore	: -152.248	REMARK RMSD	: 60.616	MODEL	76
REMARK ITScore	: -152.191	REMARK RMSD	: 80.692	MODEL	1
REMARK ITScore	: -152.164	REMARK RMSD	: 57.055	MODEL	77
REMARK ITScore	: -152.145	REMARK RMSD	: 66.165	MODEL	78
REMARK ITScore	: -151.995	REMARK RMSD	: 43.544	MODEL	79
REMARK ITScore	: -151.711	REMARK RMSD	: 30.521	MODEL	80
REMARK ITScore	: -151.661	REMARK RMSD	: 82.219	MODEL	81
REMARK ITScore	: -151.474	REMARK RMSD	: 47.842	MODEL	82
REMARK ITScore	: -151.414	REMARK RMSD	: 63.275	MODEL	83
REMARK ITScore	: -151.352	REMARK RMSD	: 24.613	MODEL	84
REMARK ITScore	: -171.730	REMARK RMSD	: 53.846	MODEL	8

pA5D6

REMARK ITScore	: -155.237	REMARK RMSD	: 81.817	MODEL	10
REMARK ITScore	: -186.411	REMARK RMSD	: 79.268	MODEL	1
REMARK ITScore	: -185.790	REMARK RMSD	: 36.992	MODEL	10
REMARK ITScore	: -181.827	REMARK RMSD	: 51.797	MODEL	11
REMARK ITScore	: -181.044	REMARK RMSD	: 54.508	MODEL	12
REMARK ITScore	: -180.431	REMARK RMSD	: 64.717	MODEL	13
REMARK ITScore	: -178.069	REMARK RMSD	: 56.185	MODEL	14
REMARK ITScore	: -177.508	REMARK RMSD	: 47.019	MODEL	15
REMARK ITScore	: -177.228	REMARK RMSD	: 36.775	MODEL	16
REMARK ITScore	: -175.838	REMARK RMSD	: 44.301	MODEL	17
REMARK ITScore	: -175.413	REMARK RMSD	: 47.157	MODEL	18
REMARK ITScore	: -209.915	REMARK RMSD	: 38.405	MODEL	1
REMARK ITScore	: -175.083	REMARK RMSD	: 40.004	MODEL	19
REMARK ITScore	: -175.020	REMARK RMSD	: 59.644	MODEL	20
REMARK ITScore	: -174.092	REMARK RMSD	: 63.862	MODEL	21
REMARK ITScore	: -173.601	REMARK RMSD	: 68.297	MODEL	22
REMARK ITScore	: -172.839	REMARK RMSD	: 46.865	MODEL	23
REMARK ITScore	: -172.044	REMARK RMSD	: 60.386	MODEL	24
REMARK ITScore	: -171.357	REMARK RMSD	: 46.229	MODEL	25
REMARK ITScore	: -171.330	REMARK RMSD	: 49.345	MODEL	26
REMARK ITScore	: -170.702	REMARK RMSD	: 52.383	MODEL	27
REMARK ITScore	: -170.320	REMARK RMSD	: 60.561	MODEL	28
REMARK ITScore	: -205.742	REMARK RMSD	: 56.133	MODEL	2
REMARK ITScore	: -170.120	REMARK RMSD	: 52.647	MODEL	29
REMARK ITScore	: -170.040	REMARK RMSD	: 42.307	MODEL	30
REMARK ITScore	: -169.516	REMARK RMSD	: 50.597	MODEL	31
REMARK ITScore	: -169.284	REMARK RMSD	: 44.979	MODEL	32
REMARK ITScore	: -169.189	REMARK RMSD	: 34.509	MODEL	1
REMARK ITScore	: -167.956	REMARK RMSD	: 32.814	MODEL	33
REMARK ITScore	: -167.381	REMARK RMSD	: 61.796	MODEL	34
REMARK ITScore	: -167.302	REMARK RMSD	: 67.328	MODEL	35
REMARK ITScore	: -167.060	REMARK RMSD	: 63.470	MODEL	36
REMARK ITScore	: -166.974	REMARK RMSD	: 80.878	MODEL	37
REMARK ITScore	: -203.950	REMARK RMSD	: 31.162	MODEL	3
REMARK ITScore	: -166.569	REMARK RMSD	: 49.419	MODEL	38
REMARK ITScore	: -166.490	REMARK RMSD	: 24.799	MODEL	39
REMARK ITScore	: -166.056	REMARK RMSD	: 35.030	MODEL	40
REMARK ITScore	: -166.018	REMARK RMSD	: 27.777	MODEL	41
REMARK ITScore	: -166.005	REMARK RMSD	: 57.067	MODEL	2
REMARK ITScore	: -165.887	REMARK RMSD	: 42.900	MODEL	42
REMARK ITScore	: -165.013	REMARK RMSD	: 69.236	MODEL	3
REMARK ITScore	: -164.870	REMARK RMSD	: 44.265	MODEL	43
REMARK ITScore	: -164.164	REMARK RMSD	: 62.818	MODEL	44
REMARK ITScore	: -163.971	REMARK RMSD	: 47.678	MODEL	45
REMARK ITScore	: -194.039	REMARK RMSD	: 73.075	MODEL	4
REMARK ITScore	: -163.506	REMARK RMSD	: 51.785	MODEL	46
REMARK ITScore	: -163.395	REMARK RMSD	: 61.684	MODEL	47
REMARK ITScore	: -163.358	REMARK RMSD	: 59.186	MODEL	48
REMARK ITScore	: -163.207	REMARK RMSD	: 41.791	MODEL	49
REMARK ITScore	: -163.132	REMARK RMSD	: 43.495	MODEL	4
REMARK ITScore	: -163.054	REMARK RMSD	: 55.228	MODEL	50
REMARK ITScore	: -162.799	REMARK RMSD	: 62.785	MODEL	51
REMARK ITScore	: -162.475	REMARK RMSD	: 47.078	MODEL	52
REMARK ITScore	: -162.246	REMARK RMSD	: 65.529	MODEL	5
REMARK ITScore	: -162.155	REMARK RMSD	: 58.803	MODEL	53
REMARK ITScore	: -193.009	REMARK RMSD	: 31.753	MODEL	5
REMARK ITScore	: -161.953	REMARK RMSD	: 55.046	MODEL	54
REMARK ITScore	: -161.926	REMARK RMSD	: 69.312	MODEL	55
REMARK ITScore	: -161.727	REMARK RMSD	: 64.647	MODEL	56
REMARK ITScore	: -161.596	REMARK RMSD	: 54.125	MODEL	2
REMARK ITScore	: -161.414	REMARK RMSD	: 45.123	MODEL	57
REMARK ITScore	: -161.341	REMARK RMSD	: 83.571	MODEL	6
REMARK ITScore	: -161.203	REMARK RMSD	: 64.436	MODEL	58
REMARK ITScore	: -160.529	REMARK RMSD	: 67.196	MODEL	59
REMARK ITScore	: -160.450	REMARK RMSD	: 46.225	MODEL	60
REMARK ITScore	: -159.934	REMARK RMSD	: 42.457	MODEL	61
REMARK ITScore	: -190.818	REMARK RMSD	: 30.788	MODEL	6
REMARK ITScore	: -159.789	REMARK RMSD	: 74.928	MODEL	62
REMARK ITScore	: -159.597	REMARK RMSD	: 38.916	MODEL	63
REMARK ITScore	: -159.550	REMARK RMSD	: 49.154	MODEL	64
REMARK ITScore	: -159.499	REMARK RMSD	: 64.428	MODEL	65
REMARK ITScore	: -159.438	REMARK RMSD	: 57.340	MODEL	66
REMARK ITScore	: -159.272	REMARK RMSD	: 54.720	MODEL	7
REMARK ITScore	: -159.241	REMARK RMSD	: 65.052	MODEL	67
REMARK ITScore	: -159.163	REMARK RMSD	: 36.122	MODEL	68
REMARK ITScore	: -158.968	REMARK RMSD	: 93.165	MODEL	69
REMARK ITScore	: -158.841	REMARK RMSD	: 46.773	MODEL	70
REMARK ITScore	: -190.131	REMARK RMSD	: 73.927	MODEL	7
REMARK ITScore	: -158.674	REMARK RMSD	: 39.292	MODEL	71
REMARK ITScore	: -158.545	REMARK RMSD	: 50.515	MODEL	72
REMARK ITScore	: -158.327	REMARK RMSD	: 61.958	MODEL	8
REMARK ITScore	: -158.163	REMARK RMSD	: 46.593	MODEL	73
REMARK ITScore	: -158.035	REMARK RMSD	: 65.283	MODEL	74
REMARK ITScore	: -157.820	REMARK RMSD	: 34.260	MODEL	75
REMARK ITScore	: -157.617	REMARK RMSD	: 36.649	MODEL	76
REMARK ITScore	: -157.209	REMARK RMSD	: 39.960	MODEL	77
REMARK ITScore	: -157.113	REMARK RMSD	: 47.464	MODEL	78
REMARK ITScore	: -156.622	REMARK RMSD	: 31.008	MODEL	79
REMARK ITScore	: -188.426	REMARK RMSD	: 35.176	MODEL	8
REMARK ITScore	: -156.503	REMARK RMSD	: 60.770	MODEL	9
REMARK ITScore	: -156.459	REMARK RMSD	: 32.606	MODEL	80
REMARK ITScore	: -156.389	REMARK RMSD	: 29.330	MODEL	81
REMARK ITScore	: -156.363	REMARK RMSD	: 37.903	MODEL	82
REMARK ITScore	: -156.275	REMARK RMSD	: 48.894	MODEL	83
REMARK ITScore	: -156.103	REMARK RMSD	: 45.695	MODEL	84
REMARK ITScore	: -155.879	REMARK RMSD	: 36.863	MODEL	85
REMARK ITScore	: -155.470	REMARK RMSD	: 50.456	MODEL	86
REMARK ITScore	: -155.346	REMARK RMSD	: 88.705	MODEL	3
REMARK ITScore	: -155.263	REMARK RMSD	: 88.453	MODEL	87
REMARK ITScore	: -187.047	REMARK RMSD	: 56.576	MODEL	9

REMARK ITScore	: -161.811	REMARK RMSD	: 64.006	MODEL	73
REMARK ITScore	: -190.933	REMARK RMSD	: 84.274	MODEL	8
REMARK ITScore	: -190.563	REMARK RMSD	: 48.581	MODEL	9
REMARK ITScore	: -189.417	REMARK RMSD	: 66.379	MODEL	2
REMARK ITScore	: -189.173	REMARK RMSD	: 51.462	MODEL	10
REMARK ITScore	: -188.230	REMARK RMSD	: 67.290	MODEL	11
REMARK ITScore	: -187.457	REMARK RMSD	: 44.006	MODEL	12
REMARK ITScore	: -187.370	REMARK RMSD	: 65.400	MODEL	13
REMARK ITScore	: -187.065	REMARK RMSD	: 80.502	MODEL	14
REMARK ITScore	: -186.651	REMARK RMSD	: 48.069	MODEL	15
REMARK ITScore	: -185.884	REMARK RMSD	: 87.097	MODEL	16
REMARK ITScore	: -238.424	REMARK RMSD	: 53.750	MODEL	1
REMARK ITScore	: -185.607	REMARK RMSD	: 46.252	MODEL	17
REMARK ITScore	: -185.435	REMARK RMSD	: 42.445	MODEL	18
REMARK ITScore	: -184.418	REMARK RMSD	: 81.994	MODEL	19
REMARK ITScore	: -184.300	REMARK RMSD	: 47.594	MODEL	20
REMARK ITScore	: -184.227	REMARK RMSD	: 72.536	MODEL	21
REMARK ITScore	: -184.043	REMARK RMSD	: 26.496	MODEL	22
REMARK ITScore	: -181.801	REMARK RMSD	: 54.644	MODEL	3
REMARK ITScore	: -181.662	REMARK RMSD	: 66.631	MODEL	2
REMARK ITScore	: -180.476	REMARK RMSD	: 58.241	MODEL	23
REMARK ITScore	: -180.138	REMARK RMSD	: 75.240	MODEL	24
REMARK ITScore	: -226.684	REMARK RMSD	: 64.988	MODEL	2
REMARK ITScore	: -179.885	REMARK RMSD	: 56.939	MODEL	25
REMARK ITScore	: -179.594	REMARK RMSD	: 50.204	MODEL	4
REMARK ITScore	: -178.926	REMARK RMSD	: 36.466	MODEL	26
REMARK ITScore	: -178.716	REMARK RMSD	: 66.878	MODEL	27
REMARK ITScore	: -177.764	REMARK RMSD	: 65.363	MODEL	28
REMARK ITScore	: -177.593	REMARK RMSD	: 37.160	MODEL	29
REMARK ITScore	: -176.720	REMARK RMSD	: 95.852	MODEL	30
REMARK ITScore	: -176.686	REMARK RMSD	: 59.534	MODEL	31
REMARK ITScore	: -176.379	REMARK RMSD	: 72.564	MODEL	32
REMARK ITScore	: -176.296	REMARK RMSD	: 102.217	MODEL	33
REMARK ITScore	: -221.556	REMARK RMSD	: 42.616	MODEL	3
REMARK ITScore	: -174.857	REMARK RMSD	: 95.911	MODEL	34
REMARK ITScore	: -174.641	REMARK RMSD	: 73.943	MODEL	35
REMARK ITScore	: -174.449	REMARK RMSD	: 38.655	MODEL	36
REMARK ITScore	: -174.143	REMARK RMSD	: 62.189	MODEL	5
REMARK ITScore	: -173.770	REMARK RMSD	: 101.258	MODEL	37
REMARK ITScore	: -173.676	REMARK RMSD	: 53.031	MODEL	6
REMARK ITScore	: -173.264	REMARK RMSD	: 39.165	MODEL	7
REMARK ITScore	: -173.194	REMARK RMSD	: 62.942	MODEL	38
REMARK ITScore	: -173.048	REMARK RMSD	: 41.244	MODEL	39
REMARK ITScore	: -172.756	REMARK RMSD	: 69.042	MODEL	40
REMARK ITScore	: -200.060	REMARK RMSD	: 49.329	MODEL	4
REMARK ITScore	: -172.552	REMARK RMSD	: 56.642	MODEL	41
REMARK ITScore	: -172.501	REMARK RMSD	: 32.357	MODEL	42
REMARK ITScore	: -172.278	REMARK RMSD	: 57.425	MODEL	8
REMARK ITScore	: -172.180	REMARK RMSD	: 109.490	MODEL	43
REMARK ITScore	: -171.806	REMARK RMSD	: 50.070	MODEL	44
REMARK ITScore	: -171.683	REMARK RMSD	: 94.808	MODEL	9
REMARK ITScore	: -170.938	REMARK RMSD	: 52.594	MODEL	45
REMARK ITScore	: -170.430	REMARK RMSD	: 68.415	MODEL	10
REMARK ITScore	: -169.677	REMARK RMSD	: 57.774	MODEL	46
REMARK ITScore	: -169.410	REMARK RMSD	: 60.120	MODEL	47
REMARK ITScore	: -198.878	REMARK RMSD	: 49.929	MODEL	5
REMARK ITScore	: -168.777	REMARK RMSD	: 71.414	MODEL	11
REMARK ITScore	: -168.721	REMARK RMSD	: 73.973	MODEL	12
REMARK ITScore	: -168.654	REMARK RMSD	: 62.846	MODEL	48
REMARK ITScore	: -168.602	REMARK RMSD	: 69.386	MODEL	13
REMARK ITScore	: -168.179	REMARK RMSD	: 52.914	MODEL	49
REMARK ITScore	: -167.994	REMARK RMSD	: 78.249	MODEL	14
REMARK ITScore	: -167.431	REMARK RMSD	: 29.538	MODEL	50
REMARK ITScore	: -167.295	REMARK RMSD	: 104.518	MODEL	51
REMARK ITScore	: -167.133	REMARK RMSD	: 76.423	MODEL	52
REMARK ITScore	: -166.842	REMARK RMSD	: 84.987	MODEL	53
REMARK ITScore	: -198.790	REMARK RMSD	: 91.341	MODEL	1
REMARK ITScore	: -166.807	REMARK RMSD	: 71.751	MODEL	15
REMARK ITScore	: -166.659	REMARK RMSD	: 45.987	MODEL	54
REMARK ITScore	: -166.608	REMARK RMSD	: 75.633	MODEL	55
REMARK ITScore	: -166.512	REMARK RMSD	: 56.921	MODEL	56
REMARK ITScore	: -166.404	REMARK RMSD	: 43.001	MODEL	57
REMARK ITScore	: -166.084	REMARK RMSD	: 80.363	MODEL	58
REMARK ITScore	: -165.588	REMARK RMSD	: 34.595	MODEL	59
REMARK ITScore	: -165.420	REMARK RMSD	: 60.648	MODEL	16
REMARK ITScore	: -165.138	REMARK RMSD	: 60.401	MODEL	17
REMARK ITScore	: -165.105	REMARK RMSD	: 56.446	MODEL	18
REMARK ITScore	: -195.216	REMARK RMSD	: 31.586	MODEL	6
REMARK ITScore	: -164.769	REMARK RMSD	: 25.743	MODEL	60
REMARK ITScore	: -164.524	REMARK RMSD	: 41.322	MODEL	61
REMARK ITScore	: -164.226	REMARK RMSD	: 64.936	MODEL	62
REMARK ITScore	: -163.937	REMARK RMSD	: 65.595	MODEL	63
REMARK ITScore	: -163.901	REMARK RMSD	: 96.662	MODEL	64
REMARK ITScore	: -163.821	REMARK RMSD	: 75.182	MODEL	65
REMARK ITScore	: -163.699	REMARK RMSD	: 65.663	MODEL	66
REMARK ITScore	: -163.669	REMARK RMSD	: 48.324	MODEL	67
REMARK ITScore	: -163.631	REMARK RMSD	: 95.210	MODEL	19
REMARK ITScore	: -163.531	REMARK RMSD	: 72.217	MODEL	20
REMARK ITScore	: -194.624	REMARK RMSD	: 67.699	MODEL	1
REMARK ITScore	: -163.443	REMARK RMSD	: 49.768	MODEL	21
REMARK ITScore	: -162.968	REMARK RMSD	: 61.575	MODEL	68
REMARK ITScore	: -162.846	REMARK RMSD	: 55.181	MODEL	69
REMARK ITScore	: -162.819	REMARK RMSD	: 37.700	MODEL	70
REMARK ITScore	: -162.699	REMARK RMSD	: 45.491	MODEL	22
REMARK ITScore	: -162.554	REMARK RMSD	: 61.863	MODEL	23
REMARK ITScore	: -162.437	REMARK RMSD	: 44.499	MODEL	71
REMARK ITScore	: -161.996	REMARK RMSD	: 55.397	MODEL	24
REMARK ITScore	: -161.982	REMARK RMSD	: 52.547	MODEL	72
REMARK ITScore	: -161.913	REMARK RMSD	: 61.191	MODEL	25
REMARK ITScore	: -193.475	REMARK RMSD	: 63.759	MODEL	7

REMARK ITScore	: -159.561	REMARK RMSD	: 52.165	MODEL	79
REMARK ITScore	: -186.943	REMARK RMSD	: 75.188	MODEL	9
REMARK ITScore	: -186.768	REMARK RMSD	: 46.370	MODEL	10
REMARK ITScore	: -186.556	REMARK RMSD	: 35.964	MODEL	11
REMARK ITScore	: -186.186	REMARK RMSD	: 62.690	MODEL	12
REMARK ITScore	: -185.635	REMARK RMSD	: 53.688	MODEL	13
REMARK ITScore	: -185.179	REMARK RMSD	: 55.637	MODEL	2
REMARK ITScore	: -184.752	REMARK RMSD	: 81.159	MODEL	14
REMARK ITScore	: -180.369	REMARK RMSD	: 58.995	MODEL	15
REMARK ITScore	: -179.359	REMARK RMSD	: 63.335	MODEL	16
REMARK ITScore	: -179.044	REMARK RMSD	: 80.183	MODEL	17
REMARK ITScore	: -241.548	REMARK RMSD	: 59.948	MODEL	1
REMARK ITScore	: -178.704	REMARK RMSD	: 36.685	MODEL	18
REMARK ITScore	: -178.554	REMARK RMSD	: 38.850	MODEL	19
REMARK ITScore	: -178.288	REMARK RMSD	: 49.041	MODEL	20
REMARK ITScore	: -178.250	REMARK RMSD	: 55.187	MODEL	21
REMARK ITScore	: -176.950	REMARK RMSD	: 45.014	MODEL	22
REMARK ITScore	: -176.120	REMARK RMSD	: 57.927	MODEL	23
REMARK ITScore	: -175.888	REMARK RMSD	: 54.737	MODEL	24
REMARK ITScore	: -175.383	REMARK RMSD	: 59.235	MODEL	25
REMARK ITScore	: -175.153	REMARK RMSD	: 34.130	MODEL	26
REMARK ITScore	: -175.143	REMARK RMSD	: 52.230	MODEL	27
REMARK ITScore	: -217.898	REMARK RMSD	: 72.252	MODEL	2
REMARK ITScore	: -174.496	REMARK RMSD	: 69.978	MODEL	28
REMARK ITScore	: -173.692	REMARK RMSD	: 75.990	MODEL	29
REMARK ITScore	: -173.359	REMARK RMSD	: 39.029	MODEL	30
REMARK ITScore	: -173.092	REMARK RMSD	: 79.451	MODEL	1
REMARK ITScore	: -172.945	REMARK RMSD	: 110.506	MODEL	2
REMARK ITScore	: -172.161	REMARK RMSD	: 58.808	MODEL	31
REMARK ITScore	: -171.881	REMARK RMSD	: 58.791	MODEL	32
REMARK ITScore	: -171.828	REMARK RMSD	: 39.344	MODEL	33
REMARK ITScore	: -171.738	REMARK RMSD	: 34.919	MODEL	34
REMARK ITScore	: -171.559	REMARK RMSD	: 60.140	MODEL	35
REMARK ITScore	: -214.663	REMARK RMSD	: 62.008	MODEL	3
REMARK ITScore	: -171.483	REMARK RMSD	: 67.207	MODEL	3
REMARK ITScore	: -171.020	REMARK RMSD	: 61.957	MODEL	4
REMARK ITScore	: -170.767	REMARK RMSD	: 31.735	MODEL	36
REMARK ITScore	: -170.565	REMARK RMSD	: 76.617	MODEL	37
REMARK ITScore	: -170.510	REMARK RMSD	: 77.715	MODEL	38
REMARK ITScore	: -170.313	REMARK RMSD	: 81.759	MODEL	39
REMARK ITScore	: -169.654	REMARK RMSD	: 37.757	MODEL	40
REMARK ITScore	: -169.412	REMARK RMSD	: 65.710	MODEL	5
REMARK ITScore	: -169.382	REMARK RMSD	: 58.625	MODEL	41
REMARK ITScore	: -169.134	REMARK RMSD	: 71.519	MODEL	6
REMARK ITScore	: -204.828	REMARK RMSD	: 45.805	MODEL	4
REMARK ITScore	: -169.045	REMARK RMSD	: 70.896	MODEL	7
REMARK ITScore	: -168.472	REMARK RMSD	: 54.790	MODEL	42
REMARK ITScore	: -168.442	REMARK RMSD	: 66.720	MODEL	43
REMARK ITScore	: -168.227	REMARK RMSD	: 76.500	MODEL	8
REMARK ITScore	: -168.143	REMARK RMSD	: 55.442	MODEL	44
REMARK ITScore	: -168.116	REMARK RMSD	: 62.679	MODEL	45
REMARK ITScore	: -168.106	REMARK RMSD	: 61.181	MODEL	46
REMARK ITScore	: -168.070	REMARK RMSD	: 61.140	MODEL	47
REMARK ITScore	: -167.690	REMARK RMSD	: 53.407	MODEL	48
REMARK ITScore	: -167.271	REMARK RMSD	: 67.899	MODEL	49
REMARK ITScore	: -198.694	REMARK RMSD	: 66.061	MODEL	5
REMARK ITScore	: -167.127	REMARK RMSD	: 32.446	MODEL	50
REMARK ITScore	: -167.086	REMARK RMSD	: 49.411	MODEL	9
REMARK ITScore	: -167.065	REMARK RMSD	: 45.098	MODEL	10
REMARK ITScore	: -166.927	REMARK RMSD	: 52.736	MODEL	51
REMARK ITScore	: -166.793	REMARK RMSD	: 55.573	MODEL	52
REMARK ITScore	: -166.334	REMARK RMSD	: 59.107	MODEL	53
REMARK ITScore	: -166.130	REMARK RMSD	: 39.834	MODEL	54
REMARK ITScore	: -166.074	REMARK RMSD	: 70.047	MODEL	55
REMARK ITScore	: -165.866	REMARK RMSD	: 65.071	MODEL	11
REMARK ITScore	: -165.820	REMARK RMSD	: 55.338	MODEL	56
REMARK ITScore	: -192.006	REMARK RMSD	: 54.422	MODEL	1
REMARK ITScore	: -165.490	REMARK RMSD	: 39.920	MODEL	57
REMARK ITScore	: -165.174	REMARK RMSD	: 44.279	MODEL	58
REMARK ITScore	: -164.235	REMARK RMSD	: 70.529	MODEL	59
REMARK ITScore	: -164.036	REMARK RMSD	: 47.675	MODEL	60
REMARK ITScore	: -163.966	REMARK RMSD	: 31.658	MODEL	61
REMARK ITScore	: -163.939	REMARK RMSD	: 42.749	MODEL	62
REMARK ITScore	: -163.930	REMARK RMSD	: 73.074	MODEL	12
REMARK ITScore	: -163.389	REMARK RMSD	: 67.462	MODEL	13
REMARK ITScore	: -163.340	REMARK RMSD	: 56.195	MODEL	63
REMARK ITScore	: -163.129	REMARK RMSD	: 56.140	MODEL	64
REMARK ITScore	: -191.300	REMARK RMSD	: 49.636	MODEL	6
REMARK ITScore	: -162.877	REMARK RMSD	: 26.015	MODEL	65
REMARK ITScore	: -162.856	REMARK RMSD	: 83.921	MODEL	3
REMARK ITScore	: -162.089	REMARK RMSD	: 65.580	MODEL	14
REMARK ITScore	: -161.983	REMARK RMSD	: 63.797	MODEL	15
REMARK ITScore	: -161.867	REMARK RMSD	: 70.004	MODEL	66
REMARK ITScore	: -161.790	REMARK RMSD	: 64.754	MODEL	67
REMARK ITScore	: -161.418	REMARK RMSD	: 33.394	MODEL	68
REMARK ITScore	: -161.315	REMARK RMSD	: 44.211	MODEL	69
REMARK ITScore	: -161.184	REMARK RMSD	: 60.204	MODEL	70
REMARK ITScore	: -161.068	REMARK RMSD	: 78.739	MODEL	71
REMARK ITScore	: -190.176	REMARK RMSD	: 40.377	MODEL	7
REMARK ITScore	: -160.952	REMARK RMSD	: 60.371	MODEL	72
REMARK ITScore	: -160.755	REMARK RMSD	: 42.381	MODEL	73
REMARK ITScore	: -160.642	REMARK RMSD	: 50.129	MODEL	16
REMARK ITScore	: -160.563	REMARK RMSD	: 59.206	MODEL	74
REMARK ITScore	: -160.553	REMARK RMSD	: 68.636	MODEL	75
REMARK ITScore	: -160.537	REMARK RMSD	: 75.305	MODEL	76
REMARK ITScore	: -160.399	REMARK RMSD	: 67.571	MODEL	17
REMARK ITScore	: -160.319	REMARK RMSD	: 75.241	MODEL	77
REMARK ITScore	: -160.224	REMARK RMSD	: 48.003	MODEL	18
REMARK ITScore	: -159.680	REMARK RMSD	: 89.291	MODEL	78
REMARK ITScore	: -189.179	REMARK RMSD	: 68.851	MODEL	8

pA7D6

REMARK ITScore	: -166.540	REMARK RMSD	: 50.085	MODEL	24
REMARK ITScore	: -165.396	REMARK RMSD	: 40.630	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.257	REMARK RMSD	: 53.476	MODEL	26
REMARK ITScore	: -165.218	REMARK RMSD	: 44.066	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.781	REMARK RMSD	: 65.605	MODEL	28
REMARK ITScore	: -164.720	REMARK RMSD	: 53.424	MODEL	29
REMARK ITScore	: -193.080	REMARK RMSD	: 49.907	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.965	REMARK RMSD	: 35.006	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.569	REMARK RMSD	: 40.367	MODEL	31
REMARK ITScore	: -163.569	REMARK RMSD	: 28.945	MODEL	32
REMARK ITScore	: -163.225	REMARK RMSD	: 31.111	MODEL	33
REMARK ITScore	: -163.108	REMARK RMSD	: 64.262	MODEL	34
REMARK ITScore	: -163.079	REMARK RMSD	: 16.633	MODEL	35
REMARK ITScore	: -162.752	REMARK RMSD	: 39.662	MODEL	36
REMARK ITScore	: -162.532	REMARK RMSD	: 56.855	MODEL	37
REMARK ITScore	: -162.082	REMARK RMSD	: 52.906	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.959	REMARK RMSD	: 55.844	MODEL	39
REMARK ITScore	: -187.768	REMARK RMSD	: 25.894	MODEL	3
REMARK ITScore	: -161.552	REMARK RMSD	: 39.620	MODEL	40
REMARK ITScore	: -161.523	REMARK RMSD	: 32.376	MODEL	41
REMARK ITScore	: -161.096	REMARK RMSD	: 53.357	MODEL	42
REMARK ITScore	: -161.046	REMARK RMSD	: 56.682	MODEL	43
REMARK ITScore	: -160.996	REMARK RMSD	: 29.591	MODEL	44
REMARK ITScore	: -160.813	REMARK RMSD	: 27.037	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.729	REMARK RMSD	: 29.048	MODEL	46
REMARK ITScore	: -160.541	REMARK RMSD	: 55.766	MODEL	47
REMARK ITScore	: -160.301	REMARK RMSD	: 37.835	MODEL	48
REMARK ITScore	: -159.779	REMARK RMSD	: 60.528	MODEL	49
REMARK ITScore	: -183.407	REMARK RMSD	: 14.501	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.774	REMARK RMSD	: 45.482	MODEL	50
REMARK ITScore	: -159.759	REMARK RMSD	: 49.131	MODEL	51
REMARK ITScore	: -159.470	REMARK RMSD	: 20.946	MODEL	52
REMARK ITScore	: -159.301	REMARK RMSD	: 39.579	MODEL	53
REMARK ITScore	: -158.995	REMARK RMSD	: 26.039	MODEL	54
REMARK ITScore	: -158.566	REMARK RMSD	: 47.765	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.512	REMARK RMSD	: 25.078	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.403	REMARK RMSD	: 39.447	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.229	REMARK RMSD	: 36.410	MODEL	58
REMARK ITScore	: -158.038	REMARK RMSD	: 57.191	MODEL	59
REMARK ITScore	: -182.328	REMARK RMSD	: 32.812	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.793	REMARK RMSD	: 17.526	MODEL	60
REMARK ITScore	: -157.300	REMARK RMSD	: 50.073	MODEL	61
REMARK ITScore	: -157.217	REMARK RMSD	: 53.123	MODEL	62
REMARK ITScore	: -157.053	REMARK RMSD	: 30.023	MODEL	1
REMARK ITScore	: -156.946	REMARK RMSD	: 41.909	MODEL	63
REMARK ITScore	: -156.871	REMARK RMSD	: 37.003	MODEL	64
REMARK ITScore	: -156.853	REMARK RMSD	: 57.355	MODEL	65
REMARK ITScore	: -156.797	REMARK RMSD	: 45.604	MODEL	66
REMARK ITScore	: -156.778	REMARK RMSD	: 60.224	MODEL	67
REMARK ITScore	: -156.772	REMARK RMSD	: 35.898	MODEL	68
REMARK ITScore	: -180.656	REMARK RMSD	: 41.628	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.297	REMARK RMSD	: 54.548	MODEL	69
REMARK ITScore	: -156.101	REMARK RMSD	: 47.174	MODEL	70
REMARK ITScore	: -155.826	REMARK RMSD	: 59.847	MODEL	71
REMARK ITScore	: -155.514	REMARK RMSD	: 36.028	MODEL	72
REMARK ITScore	: -155.130	REMARK RMSD	: 21.256	MODEL	73
REMARK ITScore	: -154.784	REMARK RMSD	: 54.718	MODEL	74
REMARK ITScore	: -154.720	REMARK RMSD	: 43.718	MODEL	2
REMARK ITScore	: -154.586	REMARK RMSD	: 28.448	MODEL	75
REMARK ITScore	: -154.482	REMARK RMSD	: 30.723	MODEL	76
REMARK ITScore	: -154.176	REMARK RMSD	: 36.901	MODEL	77
REMARK ITScore	: -179.902	REMARK RMSD	: 35.352	MODEL	7
REMARK ITScore	: -154.113	REMARK RMSD	: 39.821	MODEL	78
REMARK ITScore	: -153.913	REMARK RMSD	: 24.640	MODEL	79
REMARK ITScore	: -153.586	REMARK RMSD	: 30.802	MODEL	80
REMARK ITScore	: -153.513	REMARK RMSD	: 27.426	MODEL	81
REMARK ITScore	: -153.477	REMARK RMSD	: 55.757	MODEL	82
REMARK ITScore	: -153.423	REMARK RMSD	: 26.925	MODEL	83
REMARK ITScore	: -153.417	REMARK RMSD	: 51.635	MODEL	84
REMARK ITScore	: -153.384	REMARK RMSD	: 52.282	MODEL	85
REMARK ITScore	: -153.317	REMARK RMSD	: 21.348	MODEL	86
REMARK ITScore	: -153.134	REMARK RMSD	: 37.904	MODEL	87
REMARK ITScore	: -179.376	REMARK RMSD	: 32.915	MODEL	8
REMARK ITScore	: -152.891	REMARK RMSD	: 30.131	MODEL	88
REMARK ITScore	: -152.882	REMARK RMSD	: 56.316	MODEL	89
REMARK ITScore	: -152.783	REMARK RMSD	: 34.701	MODEL	90
REMARK ITScore	: -152.772	REMARK RMSD	: 47.256	MODEL	91
REMARK ITScore	: -152.751	REMARK RMSD	: 53.462	MODEL	92
REMARK ITScore	: -152.371	REMARK RMSD	: 33.349	MODEL	93
REMARK ITScore	: -152.325	REMARK RMSD	: 47.382	MODEL	94
REMARK ITScore	: -152.199	REMARK RMSD	: 52.485	MODEL	95
REMARK ITScore	: -152.167	REMARK RMSD	: 57.501	MODEL	96
REMARK ITScore	: -152.061	REMARK RMSD	: 61.427	MODEL	97
REMARK ITScore	: -178.936	REMARK RMSD	: 43.189	MODEL	9
REMARK ITScore	: -152.035	REMARK RMSD	: 35.303	MODEL	98
REMARK ITScore	: -178.830	REMARK RMSD	: 30.161	MODEL	10
REMARK ITScore	: -177.907	REMARK RMSD	: 49.791	MODEL	11
REMARK ITScore	: -177.627	REMARK RMSD	: 23.224	MODEL	12
REMARK ITScore	: -177.351	REMARK RMSD	: 35.923	MODEL	13
REMARK ITScore	: -176.634	REMARK RMSD	: 23.496	MODEL	14
REMARK ITScore	: -172.043	REMARK RMSD	: 48.109	MODEL	15
REMARK ITScore	: -170.313	REMARK RMSD	: 40.445	MODEL	16
REMARK ITScore	: -169.235	REMARK RMSD	: 41.826	MODEL	17
REMARK ITScore	: -168.347	REMARK RMSD	: 38.258	MODEL	18
REMARK ITScore	: -168.127	REMARK RMSD	: 41.096	MODEL	19
REMARK ITScore	: -217.785	REMARK RMSD	: 56.820	MODEL	1
REMARK ITScore	: -167.612	REMARK RMSD	: 36.587	MODEL	20
REMARK ITScore	: -167.474	REMARK RMSD	: 44.102	MODEL	21
REMARK ITScore	: -167.159	REMARK RMSD	: 58.339	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.892	REMARK RMSD	: 54.588	MODEL	23

pC4C4

REMARK ITScore	: -160.638	REMARK RMSD	: 57.833	MODEL	40
REMARK ITScore	: -160.618	REMARK RMSD	: 26.416	MODEL	41
REMARK ITScore	: -160.417	REMARK RMSD	: 54.480	MODEL	42
REMARK ITScore	: -160.365	REMARK RMSD	: 50.772	MODEL	43
REMARK ITScore	: -152.353	REMARK RMSD	: 49.264	MODEL	96
REMARK ITScore	: -171.927	REMARK RMSD	: 36.907	MODEL	10
REMARK ITScore	: -171.539	REMARK RMSD	: 25.903	MODEL	11
REMARK ITScore	: -170.990	REMARK RMSD	: 33.339	MODEL	12
REMARK ITScore	: -170.528	REMARK RMSD	: 31.691	MODEL	13
REMARK ITScore	: -169.588	REMARK RMSD	: 31.107	MODEL	14
REMARK ITScore	: -169.542	REMARK RMSD	: 35.722	MODEL	15
REMARK ITScore	: -169.067	REMARK RMSD	: 37.574	MODEL	16
REMARK ITScore	: -168.749	REMARK RMSD	: 32.302	MODEL	17
REMARK ITScore	: -168.453	REMARK RMSD	: 38.349	MODEL	18
REMARK ITScore	: -167.782	REMARK RMSD	: 43.031	MODEL	19
REMARK ITScore	: -191.480	REMARK RMSD	: 28.920	MODEL	1
REMARK ITScore	: -167.023	REMARK RMSD	: 33.889	MODEL	20
REMARK ITScore	: -166.868	REMARK RMSD	: 53.444	MODEL	21
REMARK ITScore	: -166.746	REMARK RMSD	: 32.593	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.449	REMARK RMSD	: 45.236	MODEL	23
REMARK ITScore	: -165.659	REMARK RMSD	: 42.229	MODEL	24
REMARK ITScore	: -165.374	REMARK RMSD	: 43.773	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.366	REMARK RMSD	: 40.401	MODEL	26
REMARK ITScore	: -165.319	REMARK RMSD	: 16.645	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.914	REMARK RMSD	: 55.802	MODEL	28
REMARK ITScore	: -163.990	REMARK RMSD	: 26.322	MODEL	29
REMARK ITScore	: -189.626	REMARK RMSD	: 24.999	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.586	REMARK RMSD	: 43.449	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.322	REMARK RMSD	: 43.637	MODEL	31
REMARK ITScore	: -162.737	REMARK RMSD	: 29.909	MODEL	32
REMARK ITScore	: -162.124	REMARK RMSD	: 37.992	MODEL	33
REMARK ITScore	: -161.950	REMARK RMSD	: 46.763	MODEL	34
REMARK ITScore	: -161.906	REMARK RMSD	: 41.400	MODEL	35
REMARK ITScore	: -161.548	REMARK RMSD	: 39.627	MODEL	36
REMARK ITScore	: -161.405	REMARK RMSD	: 52.234	MODEL	37
REMARK ITScore	: -161.210	REMARK RMSD	: 23.619	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.101	REMARK RMSD	: 45.351	MODEL	39
REMARK ITScore	: -187.240	REMARK RMSD	: 40.379	MODEL	3
REMARK ITScore	: -160.292	REMARK RMSD	: 43.326	MODEL	44
REMARK ITScore	: -160.291	REMARK RMSD	: 42.866	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.284	REMARK RMSD	: 27.887	MODEL	46
REMARK ITScore	: -160.061	REMARK RMSD	: 26.494	MODEL	47
REMARK ITScore	: -160.025	REMARK RMSD	: 31.336	MODEL	48
REMARK ITScore	: -159.643	REMARK RMSD	: 30.598	MODEL	49
REMARK ITScore	: -184.737	REMARK RMSD	: 25.603	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.576	REMARK RMSD	: 35.317	MODEL	50
REMARK ITScore	: -159.427	REMARK RMSD	: 38.581	MODEL	51
REMARK ITScore	: -159.195	REMARK RMSD	: 33.551	MODEL	52
REMARK ITScore	: -158.984	REMARK RMSD	: 37.343	MODEL	53
REMARK ITScore	: -158.954	REMARK RMSD	: 48.491	MODEL	54
REMARK ITScore	: -158.809	REMARK RMSD	: 39.891	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.551	REMARK RMSD	: 44.154	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.323	REMARK RMSD	: 62.001	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.191	REMARK RMSD	: 52.079	MODEL	58
REMARK ITScore	: -157.906	REMARK RMSD	: 36.777	MODEL	59
REMARK ITScore	: -181.593	REMARK RMSD	: 37.751	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.835	REMARK RMSD	: 42.201	MODEL	60
REMARK ITScore	: -157.794	REMARK RMSD	: 75.467	MODEL	1
REMARK ITScore	: -157.596	REMARK RMSD	: 56.983	MODEL	61
REMARK ITScore	: -157.563	REMARK RMSD	: 60.381	MODEL	62
REMARK ITScore	: -157.435	REMARK RMSD	: 48.496	MODEL	63
REMARK ITScore	: -157.349	REMARK RMSD	: 59.081	MODEL	64
REMARK ITScore	: -157.280	REMARK RMSD	: 68.254	MODEL	2
REMARK ITScore	: -157.089	REMARK RMSD	: 39.303	MODEL	65
REMARK ITScore	: -156.776	REMARK RMSD	: 33.719	MODEL	66
REMARK ITScore	: -156.663	REMARK RMSD	: 44.453	MODEL	67
REMARK ITScore	: -180.633	REMARK RMSD	: 35.718	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.448	REMARK RMSD	: 47.218	MODEL	68
REMARK ITScore	: -156.087	REMARK RMSD	: 34.572	MODEL	69
REMARK ITScore	: -156.020	REMARK RMSD	: 44.941	MODEL	70
REMARK ITScore	: -155.928	REMARK RMSD	: 42.937	MODEL	71
REMARK ITScore	: -155.703	REMARK RMSD	: 35.094	MODEL	72
REMARK ITScore	: -155.490	REMARK RMSD	: 20.956	MODEL	73
REMARK ITScore	: -155.266	REMARK RMSD	: 54.341	MODEL	74
REMARK ITScore	: -155.089	REMARK RMSD	: 42.354	MODEL	75
REMARK ITScore	: -154.890	REMARK RMSD	: 50.352	MODEL	76
REMARK ITScore	: -154.817	REMARK RMSD	: 57.919	MODEL	77
REMARK ITScore	: -180.468	REMARK RMSD	: 41.473	MODEL	7
REMARK ITScore	: -154.658	REMARK RMSD	: 55.872	MODEL	1
REMARK ITScore	: -154.567	REMARK RMSD	: 38.488	MODEL	78
REMARK ITScore	: -154.159	REMARK RMSD	: 34.625	MODEL	79
REMARK ITScore	: -154.040	REMARK RMSD	: 41.491	MODEL	80
REMARK ITScore	: -153.932	REMARK RMSD	: 44.149	MODEL	81
REMARK ITScore	: -153.830	REMARK RMSD	: 26.249	MODEL	82
REMARK ITScore	: -153.738	REMARK RMSD	: 52.977	MODEL	83
REMARK ITScore	: -153.683	REMARK RMSD	: 39.773	MODEL	84
REMARK ITScore	: -153.541	REMARK RMSD	: 41.085	MODEL	85
REMARK ITScore	: -153.397	REMARK RMSD	: 57.124	MODEL	86
REMARK ITScore	: -180.030	REMARK RMSD	: 55.130	MODEL	8
REMARK ITScore	: -153.372	REMARK RMSD	: 57.593	MODEL	87
REMARK ITScore	: -153.247	REMARK RMSD	: 56.311	MODEL	88
REMARK ITScore	: -153.210	REMARK RMSD	: 54.326	MODEL	89
REMARK ITScore	: -153.185	REMARK RMSD	: 60.061	MODEL	90
REMARK ITScore	: -153.078	REMARK RMSD	: 30.175	MODEL	91
REMARK ITScore	: -152.937	REMARK RMSD	: 38.177	MODEL	2
REMARK ITScore	: -152.794	REMARK RMSD	: 44.026	MODEL	92
REMARK ITScore	: -172.773	REMARK RMSD	: 41.935	MODEL	9
REMARK ITScore	: -152.784	REMARK RMSD	: 35.756	MODEL	93
REMARK ITScore	: -152.639	REMARK RMSD	: 45.499	MODEL	94
REMARK ITScore	: -152.438	REMARK RMSD	: 39.023	MODEL	95

pC4D6

REMARK ITScore	: -163.569	REMARK RMSD	: 28.945	MODEL	32
REMARK ITScore	: -163.225	REMARK RMSD	: 31.111	MODEL	33
REMARK ITScore	: -163.108	REMARK RMSD	: 64.262	MODEL	34
REMARK ITScore	: -163.079	REMARK RMSD	: 16.633	MODEL	35
REMARK ITScore	: -162.752	REMARK RMSD	: 39.662	MODEL	36
REMARK ITScore	: -162.532	REMARK RMSD	: 56.855	MODEL	37
REMARK ITScore	: -162.082	REMARK RMSD	: 52.906	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.959	REMARK RMSD	: 55.844	MODEL	39
REMARK ITScore	: -187.768	REMARK RMSD	: 25.894	MODEL	3
REMARK ITScore	: -161.552	REMARK RMSD	: 39.620	MODEL	40
REMARK ITScore	: -161.523	REMARK RMSD	: 32.396	MODEL	41
REMARK ITScore	: -161.096	REMARK RMSD	: 53.357	MODEL	42
REMARK ITScore	: -161.046	REMARK RMSD	: 56.682	MODEL	43
REMARK ITScore	: -160.996	REMARK RMSD	: 29.591	MODEL	44
REMARK ITScore	: -160.813	REMARK RMSD	: 27.037	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.729	REMARK RMSD	: 29.048	MODEL	46
REMARK ITScore	: -160.541	REMARK RMSD	: 55.766	MODEL	47
REMARK ITScore	: -160.301	REMARK RMSD	: 37.835	MODEL	48
REMARK ITScore	: -159.779	REMARK RMSD	: 60.528	MODEL	49
REMARK ITScore	: -183.407	REMARK RMSD	: 14.501	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.774	REMARK RMSD	: 45.482	MODEL	50
REMARK ITScore	: -159.759	REMARK RMSD	: 49.131	MODEL	51
REMARK ITScore	: -159.470	REMARK RMSD	: 20.946	MODEL	52
REMARK ITScore	: -159.301	REMARK RMSD	: 39.579	MODEL	53
REMARK ITScore	: -158.995	REMARK RMSD	: 26.039	MODEL	54
REMARK ITScore	: -152.035	REMARK RMSD	: 35.303	MODEL	98
REMARK ITScore	: -178.830	REMARK RMSD	: 30.161	MODEL	10
REMARK ITScore	: -177.907	REMARK RMSD	: 49.791	MODEL	11
REMARK ITScore	: -177.627	REMARK RMSD	: 23.224	MODEL	12
REMARK ITScore	: -177.351	REMARK RMSD	: 35.923	MODEL	13
REMARK ITScore	: -176.634	REMARK RMSD	: 23.496	MODEL	14
REMARK ITScore	: -172.043	REMARK RMSD	: 48.109	MODEL	15
REMARK ITScore	: -170.313	REMARK RMSD	: 40.445	MODEL	16
REMARK ITScore	: -169.235	REMARK RMSD	: 41.826	MODEL	17
REMARK ITScore	: -168.347	REMARK RMSD	: 38.258	MODEL	18
REMARK ITScore	: -168.127	REMARK RMSD	: 41.096	MODEL	19
REMARK ITScore	: -217.785	REMARK RMSD	: 56.820	MODEL	1
REMARK ITScore	: -167.612	REMARK RMSD	: 36.587	MODEL	20
REMARK ITScore	: -167.474	REMARK RMSD	: 44.102	MODEL	21
REMARK ITScore	: -167.159	REMARK RMSD	: 58.339	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.892	REMARK RMSD	: 54.588	MODEL	23
REMARK ITScore	: -166.540	REMARK RMSD	: 50.085	MODEL	24
REMARK ITScore	: -165.396	REMARK RMSD	: 40.630	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.257	REMARK RMSD	: 53.476	MODEL	26
REMARK ITScore	: -165.218	REMARK RMSD	: 44.066	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.781	REMARK RMSD	: 65.605	MODEL	28
REMARK ITScore	: -164.720	REMARK RMSD	: 53.424	MODEL	29
REMARK ITScore	: -193.080	REMARK RMSD	: 49.907	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.965	REMARK RMSD	: 35.006	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.569	REMARK RMSD	: 40.367	MODEL	31
REMARK ITScore	: -158.566	REMARK RMSD	: 47.765	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.512	REMARK RMSD	: 25.078	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.403	REMARK RMSD	: 39.447	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.229	REMARK RMSD	: 36.410	MODEL	58
REMARK ITScore	: -158.038	REMARK RMSD	: 57.191	MODEL	59
REMARK ITScore	: -182.328	REMARK RMSD	: 32.812	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.793	REMARK RMSD	: 17.526	MODEL	60
REMARK ITScore	: -157.300	REMARK RMSD	: 50.073	MODEL	61
REMARK ITScore	: -157.217	REMARK RMSD	: 53.123	MODEL	62
REMARK ITScore	: -157.053	REMARK RMSD	: 30.023	MODEL	1
REMARK ITScore	: -156.946	REMARK RMSD	: 41.909	MODEL	63
REMARK ITScore	: -156.871	REMARK RMSD	: 37.003	MODEL	64
REMARK ITScore	: -156.853	REMARK RMSD	: 57.355	MODEL	65
REMARK ITScore	: -156.797	REMARK RMSD	: 45.604	MODEL	66
REMARK ITScore	: -156.778	REMARK RMSD	: 60.224	MODEL	67
REMARK ITScore	: -156.772	REMARK RMSD	: 35.898	MODEL	68
REMARK ITScore	: -180.656	REMARK RMSD	: 41.628	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.297	REMARK RMSD	: 54.548	MODEL	69
REMARK ITScore	: -156.101	REMARK RMSD	: 47.174	MODEL	70
REMARK ITScore	: -155.826	REMARK RMSD	: 59.847	MODEL	71
REMARK ITScore	: -155.514	REMARK RMSD	: 36.028	MODEL	72
REMARK ITScore	: -155.130	REMARK RMSD	: 21.256	MODEL	73
REMARK ITScore	: -154.784	REMARK RMSD	: 54.718	MODEL	74
REMARK ITScore	: -154.720	REMARK RMSD	: 43.718	MODEL	2
REMARK ITScore	: -154.586	REMARK RMSD	: 28.448	MODEL	75
REMARK ITScore	: -154.482	REMARK RMSD	: 30.723	MODEL	76
REMARK ITScore	: -154.176	REMARK RMSD	: 36.901	MODEL	77
REMARK ITScore	: -179.902	REMARK RMSD	: 35.352	MODEL	7
REMARK ITScore	: -154.113	REMARK RMSD	: 39.821	MODEL	78
REMARK ITScore	: -153.913	REMARK RMSD	: 24.640	MODEL	79
REMARK ITScore	: -153.586	REMARK RMSD	: 30.802	MODEL	80
REMARK ITScore	: -153.513	REMARK RMSD	: 27.426	MODEL	81
REMARK ITScore	: -153.477	REMARK RMSD	: 55.757	MODEL	82
REMARK ITScore	: -153.423	REMARK RMSD	: 26.925	MODEL	83
REMARK ITScore	: -153.417	REMARK RMSD	: 51.635	MODEL	84
REMARK ITScore	: -153.384	REMARK RMSD	: 52.282	MODEL	85
REMARK ITScore	: -153.317	REMARK RMSD	: 21.348	MODEL	86
REMARK ITScore	: -153.134	REMARK RMSD	: 37.904	MODEL	87
REMARK ITScore	: -179.376	REMARK RMSD	: 32.915	MODEL	8
REMARK ITScore	: -152.891	REMARK RMSD	: 30.131	MODEL	88
REMARK ITScore	: -152.882	REMARK RMSD	: 56.316	MODEL	89
REMARK ITScore	: -152.783	REMARK RMSD	: 34.701	MODEL	90
REMARK ITScore	: -152.199	REMARK RMSD	: 52.485	MODEL	95
REMARK ITScore	: -152.167	REMARK RMSD	: 57.501	MODEL	96
REMARK ITScore	: -152.061	REMARK RMSD	: 61.427	MODEL	97
REMARK ITScore	: -178.936	REMARK RMSD	: 43.189	MODEL	9
REMARK ITScore	: -152.772	REMARK RMSD	: 47.256	MODEL	91
REMARK ITScore	: -152.751	REMARK RMSD	: 53.462	MODEL	92
REMARK ITScore	: -152.371	REMARK RMSD	: 33.349	MODEL	93
REMARK ITScore	: -152.325	REMARK RMSD	: 47.382	MODEL	94

pD6D6

REMARK ITScore	: -171.927	REMARK RMSD	: 36.907	MODEL	10
REMARK ITScore	: -171.539	REMARK RMSD	: 25.903	MODEL	11
REMARK ITScore	: -170.990	REMARK RMSD	: 33.339	MODEL	12
REMARK ITScore	: -170.528	REMARK RMSD	: 31.691	MODEL	13
REMARK ITScore	: -169.588	REMARK RMSD	: 31.107	MODEL	14
REMARK ITScore	: -169.542	REMARK RMSD	: 35.722	MODEL	15
REMARK ITScore	: -169.067	REMARK RMSD	: 37.574	MODEL	16
REMARK ITScore	: -168.749	REMARK RMSD	: 32.302	MODEL	17
REMARK ITScore	: -168.453	REMARK RMSD	: 38.349	MODEL	18
REMARK ITScore	: -167.782	REMARK RMSD	: 43.031	MODEL	19
REMARK ITScore	: -191.480	REMARK RMSD	: 28.920	MODEL	1
REMARK ITScore	: -152.353	REMARK RMSD	: 49.264	MODEL	96
REMARK ITScore	: -167.023	REMARK RMSD	: 33.889	MODEL	20
REMARK ITScore	: -166.868	REMARK RMSD	: 53.644	MODEL	21
REMARK ITScore	: -166.746	REMARK RMSD	: 32.593	MODEL	22
REMARK ITScore	: -166.449	REMARK RMSD	: 45.236	MODEL	23
REMARK ITScore	: -165.659	REMARK RMSD	: 42.229	MODEL	24
REMARK ITScore	: -165.374	REMARK RMSD	: 43.773	MODEL	25
REMARK ITScore	: -165.366	REMARK RMSD	: 40.401	MODEL	26
REMARK ITScore	: -165.319	REMARK RMSD	: 16.645	MODEL	27
REMARK ITScore	: -164.914	REMARK RMSD	: 55.802	MODEL	28
REMARK ITScore	: -163.990	REMARK RMSD	: 26.322	MODEL	29
REMARK ITScore	: -189.626	REMARK RMSD	: 24.999	MODEL	2
REMARK ITScore	: -163.586	REMARK RMSD	: 43.449	MODEL	30
REMARK ITScore	: -163.322	REMARK RMSD	: 43.637	MODEL	31
REMARK ITScore	: -162.737	REMARK RMSD	: 29.909	MODEL	32
REMARK ITScore	: -162.124	REMARK RMSD	: 37.992	MODEL	33
REMARK ITScore	: -161.950	REMARK RMSD	: 46.763	MODEL	34
REMARK ITScore	: -161.906	REMARK RMSD	: 41.400	MODEL	35
REMARK ITScore	: -161.548	REMARK RMSD	: 39.627	MODEL	36
REMARK ITScore	: -161.405	REMARK RMSD	: 52.234	MODEL	37
REMARK ITScore	: -161.210	REMARK RMSD	: 23.619	MODEL	38
REMARK ITScore	: -161.101	REMARK RMSD	: 45.351	MODEL	39
REMARK ITScore	: -187.240	REMARK RMSD	: 40.379	MODEL	3
REMARK ITScore	: -160.638	REMARK RMSD	: 57.833	MODEL	40
REMARK ITScore	: -160.618	REMARK RMSD	: 26.416	MODEL	41
REMARK ITScore	: -160.417	REMARK RMSD	: 54.480	MODEL	42
REMARK ITScore	: -160.365	REMARK RMSD	: 50.772	MODEL	43
REMARK ITScore	: -160.292	REMARK RMSD	: 43.326	MODEL	44
REMARK ITScore	: -160.291	REMARK RMSD	: 42.866	MODEL	45
REMARK ITScore	: -160.284	REMARK RMSD	: 27.887	MODEL	46
REMARK ITScore	: -160.061	REMARK RMSD	: 26.494	MODEL	47
REMARK ITScore	: -160.025	REMARK RMSD	: 31.336	MODEL	48
REMARK ITScore	: -159.643	REMARK RMSD	: 30.598	MODEL	49
REMARK ITScore	: -184.737	REMARK RMSD	: 25.603	MODEL	4
REMARK ITScore	: -159.576	REMARK RMSD	: 35.317	MODEL	50
REMARK ITScore	: -159.427	REMARK RMSD	: 38.581	MODEL	51
REMARK ITScore	: -159.195	REMARK RMSD	: 33.551	MODEL	52
REMARK ITScore	: -158.984	REMARK RMSD	: 37.343	MODEL	53
REMARK ITScore	: -158.954	REMARK RMSD	: 48.491	MODEL	54
REMARK ITScore	: -158.809	REMARK RMSD	: 39.891	MODEL	55
REMARK ITScore	: -158.551	REMARK RMSD	: 44.154	MODEL	56
REMARK ITScore	: -158.323	REMARK RMSD	: 62.001	MODEL	57
REMARK ITScore	: -158.191	REMARK RMSD	: 52.079	MODEL	58
REMARK ITScore	: -157.906	REMARK RMSD	: 36.777	MODEL	59
REMARK ITScore	: -181.593	REMARK RMSD	: 37.751	MODEL	5
REMARK ITScore	: -157.835	REMARK RMSD	: 42.201	MODEL	60
REMARK ITScore	: -157.794	REMARK RMSD	: 75.467	MODEL	1
REMARK ITScore	: -157.596	REMARK RMSD	: 56.983	MODEL	61
REMARK ITScore	: -157.563	REMARK RMSD	: 60.381	MODEL	62
REMARK ITScore	: -157.435	REMARK RMSD	: 48.496	MODEL	63
REMARK ITScore	: -157.349	REMARK RMSD	: 59.081	MODEL	64
REMARK ITScore	: -157.280	REMARK RMSD	: 68.254	MODEL	2
REMARK ITScore	: -157.089	REMARK RMSD	: 39.303	MODEL	65
REMARK ITScore	: -156.776	REMARK RMSD	: 33.719	MODEL	66
REMARK ITScore	: -156.663	REMARK RMSD	: 44.453	MODEL	67
REMARK ITScore	: -180.633	REMARK RMSD	: 35.718	MODEL	6
REMARK ITScore	: -156.448	REMARK RMSD	: 47.218	MODEL	68
REMARK ITScore	: -156.087	REMARK RMSD	: 34.572	MODEL	69
REMARK ITScore	: -156.020	REMARK RMSD	: 44.941	MODEL	70
REMARK ITScore	: -155.928	REMARK RMSD	: 42.937	MODEL	71
REMARK ITScore	: -155.703	REMARK RMSD	: 35.094	MODEL	72
REMARK ITScore	: -155.490	REMARK RMSD	: 20.956	MODEL	73
REMARK ITScore	: -155.266	REMARK RMSD	: 54.341	MODEL	74
REMARK ITScore	: -155.089	REMARK RMSD	: 42.354	MODEL	75
REMARK ITScore	: -154.890	REMARK RMSD	: 50.352	MODEL	76
REMARK ITScore	: -154.817	REMARK RMSD	: 57.919	MODEL	77
REMARK ITScore	: -180.468	REMARK RMSD	: 41.473	MODEL	7
REMARK ITScore	: -154.658	REMARK RMSD	: 55.872	MODEL	1
REMARK ITScore	: -154.567	REMARK RMSD	: 38.488	MODEL	78
REMARK ITScore	: -154.159	REMARK RMSD	: 34.625	MODEL	79
REMARK ITScore	: -154.040	REMARK RMSD	: 41.491	MODEL	80
REMARK ITScore	: -153.932	REMARK RMSD	: 44.149	MODEL	81
REMARK ITScore	: -153.830	REMARK RMSD	: 26.249	MODEL	82
REMARK ITScore	: -153.738	REMARK RMSD	: 52.977	MODEL	83
REMARK ITScore	: -153.683	REMARK RMSD	: 39.773	MODEL	84
REMARK ITScore	: -153.541	REMARK RMSD	: 41.085	MODEL	85
REMARK ITScore	: -153.397	REMARK RMSD	: 57.124	MODEL	86
REMARK ITScore	: -180.030	REMARK RMSD	: 55.130	MODEL	8
REMARK ITScore	: -153.372	REMARK RMSD	: 57.593	MODEL	87
REMARK ITScore	: -153.247	REMARK RMSD	: 56.311	MODEL	88
REMARK ITScore	: -153.210	REMARK RMSD	: 54.326	MODEL	89
REMARK ITScore	: -153.185	REMARK RMSD	: 60.061	MODEL	90
REMARK ITScore	: -153.078	REMARK RMSD	: 30.175	MODEL	91
REMARK ITScore	: -152.937	REMARK RMSD	: 38.177	MODEL	2
REMARK ITScore	: -152.794	REMARK RMSD	: 44.026	MODEL	92
REMARK ITScore	: -152.784	REMARK RMSD	: 35.756	MODEL	93
REMARK ITScore	: -152.639	REMARK RMSD	: 45.499	MODEL	94
REMARK ITScore	: -152.438	REMARK RMSD	: 39.023	MODEL	95
REMARK ITScore	: -172.773	REMARK RMSD	: 41.935	MODEL	9