



UnB

**Departamento de Farmácia
Faculdade de Ciências da Saúde**

**Modelagem de Bioisómeros do Afatinibe para
Reposicionamento Focado na Leucemia Mielóide
Crônica**

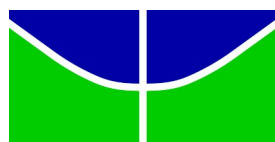
Aluno: Kelvyn Magalhães Lopes Rocha

Orientador: Prof. Dr. João Batista Lopes Martins

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Érica Cristina Moreno Nascimento

Brasília, DF

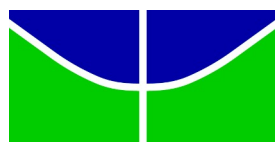
2022



UnB

Sumário

Lista de siglas e abreviações.....	03
Resumo.....	04
Introdução.....	05
Metodologia.....	11
Resultados e Discussão.....	14
Conclusão.....	30
Referências.....	31
Apêndice 1.....	38
Apêndice 2.....	39



UnB

Lista de siglas e abreviações

ADMET - Propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade;

DFG - Tríade catalítica Asp381, Phe382 e Gly383;

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*;

LMC - Leucemia Mielóide Crônica;

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*;

NCI - *Non-covalent Interactions*;

ROF - *Rule of Five*;

TKI - Inibidores de tirosinas-quínases.



Resumo

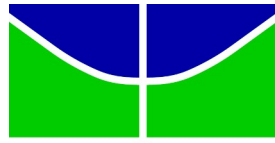
Foram desenhados e estudados por métodos computacionais quatro novas entidades moleculares derivadas do afatinibe com o intuito de avaliar, *in silico*, o seu potencial inibitório quando aplicado ao tratamento de leucemia mielóide crônica. Os estudos de estrutura eletrônica, ADMET, docking e ONIOM foram realizados para modelar o comportamento das novas entidades moleculares quando isoladas e quando complexadas à proteína BCR-ABL, enzima responsável pelo desenvolvimento leucêmico. Todas as moléculas propostas apresentaram um potencial inibitório maior que o afatinibe, com toxicidade prevista aceitável ou mesmo inexistente. Os estudos de docking forneceram informações sobre quais resíduos chaves que devem ser evitados na interação receptor-ligante (Arg386 e Gly383) bem como os resíduos que favorecem uma conformação de inibição efetiva (Glu386, Ile315, Met318 e Asp381). Estudos NCI foram realizados confirmando a relação de proporção inversa entre a intensidade da interação com os resíduos Arg386 e Gly383 e a eficácia da conformação de docagem. A nova estrutura de melhor desempenho, o bioisóstero AFA(IV), foi submetido a um estudo ONIOM, o qual é um método QM/MM que permite o estudo das propriedades eletrônicas do complexo formado.



Introdução

As leucemias mielóides se caracterizam por serem doenças neoplásicas que atingem as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea causando a proliferação excessiva de células polimorfonucleares (JABBOUR et al, 2018). Estas células tipicamente apresentam uma morfologia primitiva devido à sua liberação precoce na corrente sanguínea. Na sua fase crônica, a leucemia mielóide apresenta sintomas brandos, como esplenomegalia (SJOBERG et al., 2018) e um esfregaço sanguíneo alterado (FADERL et al., 2008). Isso pode levar a um diagnóstico tardio da leucemia mielóide crônica (LMC), o que favorece a evolução da doença para a sua fase blástica. A LMC em fase blástica (LMC-FB) é uma forma bem mais agressiva da doença, sendo capaz de causar danos severos à saúde do paciente. Aos sinais e sintomas típicos, são adicionados dor severa e sangramentos, tipicamente acompanhados de perda da função dos mielócitos, o que pode levar ao óbito do paciente (OCHI et al., 2021).

A LMC foi uma das primeiras doenças de mecanismo molecular a ser elucidada (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021), sendo uma doença modelo bem estabelecida. O advento das técnicas de biologia molecular permitiu o melhor entendimento da etiologia da doença, por meio da descoberta de sua relação com o cromossomo Philadelphia (Ph) (KANG et al., 2016). Este cromossomo é fruto da translocação entre os pares de cromossomos 9 e 22 (WATT; PAGE, 1978), o que resulta num arranjo híbrido que contém o

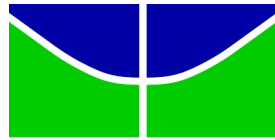


UnB

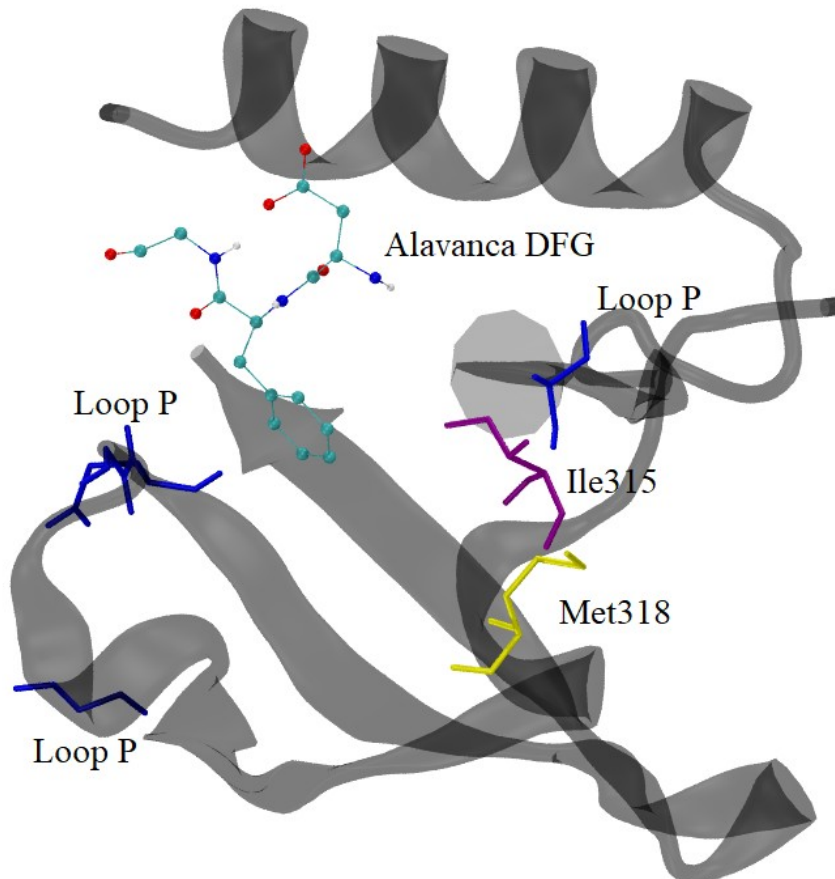
gene mutante BCR-ABL. Este gene é capaz de dar origem à enzima BCR-ABL (SOVERINI et al, 2019), uma tirosina quinase desregulada associada ao desenvolvimento da LMC.

A BCR-ABL é responsável pelo fornecimento de sinais constantes de proliferação(SOVERINI et al., 2018), aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (STEIN; BALDWIN, 2011) e inibição da autofagia (SHENG et al., 2011). Todos estes fenômenos estão associados ao desenvolvimento oncológico. Em termos estruturais (Figura 1), a enzima BCR-ABL tem diversos sítios de importância catalítica descritos, entre eles: o resíduo *gatekeeper* (Thr315/Ile315) (CHAN et al., 2011a; REDDY; AGGARWAL, 2012), a alavanca DFG (Glu381, Phe382, Gly383) (PEREIRA; NASCIMENTO; MARTINS, 2021), o loop-P de ligação ao ATP (Met344, GLy250, Tyr254, Glu255) (CANG; LIU, 2008) e o resíduo Met318 (PARK et al., 2013). A alavanca DFG determina o estado ativo da proteína, sendo a conformação DFG-out a mais ativa.

Figura 1. Representação tridimensional da enzima BCR-ABL humana destacando os resíduos chave Thr/Ile315 (roxo), Met318 (amarelo), loop P (azul) e alavanca DFG (bolas e varetas).



UnB



O tratamento de LMC provou ser um desafio desde sua descoberta. Inicialmente, foram aplicados quimioterápicos clássicos como o bussulfano sem sucesso significativo (FOA et al., 1996), rendendo à LMC um status de doença incurável. No entanto, devido ao conhecimento do mecanismo patológico, foi possível a descoberta e aplicação dos inibidores de tirosina quinase (TKI) no contexto desta patologia. A primeira molécula de sucesso usada no tratamento de LMC foi o mesilato de imatinibe (*Gleevec*®), conforme apresentado na Figura 2, um TKI competitivo que revolucionou o tratamento de LMC,



resultando em uma meia-vida de 10 anos para mais de 80% dos pacientes tratados com este fármaco (HOCHHAUS et al., 2017).

Embora tenha trazido muitos benefícios no contexto da LMC, o uso do imatinibe fez surgirem novas problemáticas por meio do desenvolvimento de resistência. Devido a mutações genéticas adicionais, a BCR-ABL pode substituir resíduos críticos na interação com o imatinibe, o que resulta numa perturbação da interação e consequente perda da atividade inibitória. A mutação mais notória neste fenômeno é a mutação do resíduo *gatekeeper*, uma mutação de ponto *missense* que substitui o resíduo Thr315 por um resíduo Ile315 (T315I) (REDDY; AGGARWAL, 2012), o que resulta na perda de função do imatinibe (LIU et al., 2021). Neste contexto, surgiu a necessidade do desenho de novos TKI.

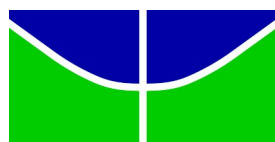
Uma das moléculas desenhadas para substituir o imatinibe foi o ponatinibe, representado na figura 2. Trata-se de uma molécula de mesmo mecanismo de ação, mas que foi especificamente desenhada para substituir o imatinibe e contornar a problemática do resíduo Ile315. O ponatinibe alcançou sucesso tanto em simulações (TANNEERU; GURUPRASAD, 2013) como em estudos experimentais (MASSARO; MOLICA; BRECCIA, 2018), mas apresentou risco relativamente elevado por seu uso estar associado a efeitos adversos sistêmicos como, por exemplo, dor de cabeça, trombocitopenia (CORTES et al., 2018) e isquemia (MARTO et al., 2021). Por preocupações com a segurança terapêutica, o ponatinibe chegou a ser suspenso temporariamente em 2013 (MASSARO; MOLICA; BRECCIA, 2018).



Devido à inadequação do ponatinibe a uma parcela significativa de pacientes devido aos seus efeitos adversos, a busca de novos inibidores continua ativa e outros TKI que inicialmente não foram pensados para o tratamento de LMC também foram estudados neste contexto, como é o caso do afatinibe (FREIWALD et al., 2014).

O afatinibe (Figura 2) é um TKI associado primariamente ao tratamento de cânceres de pulmão (LAI et al., 2019), mas provou ser uma molécula versátil, demonstrando potencial uso em cânceres de mama (HURVITZ; SHATSKY; HARBECK, 2014) e colo (H; CF, 2018; ROSKOSKI, 2021). Esta molécula também teve sua aplicação estudada na LMC, apresentando resultados discretos, quando aplicada sozinha (WATANABE et al., 2020), mas demonstrando um efeito sinérgico quando combinada a outras drogas (KAM et al., 2021). Estudos *in silico* de *docking* molecular auxiliaram a compreender melhor seu comportamento na interação com a enzima BCR-ABL (ROCHA; NASCIMENTO; MARTINS, 2021) indicando que a sua estrutura molecular pode ser tomada como base para que, com algumas modificações em grupos específicos por meio de bioisosterismo, venha favorecer a melhora da sua potencial atividade inibitória.

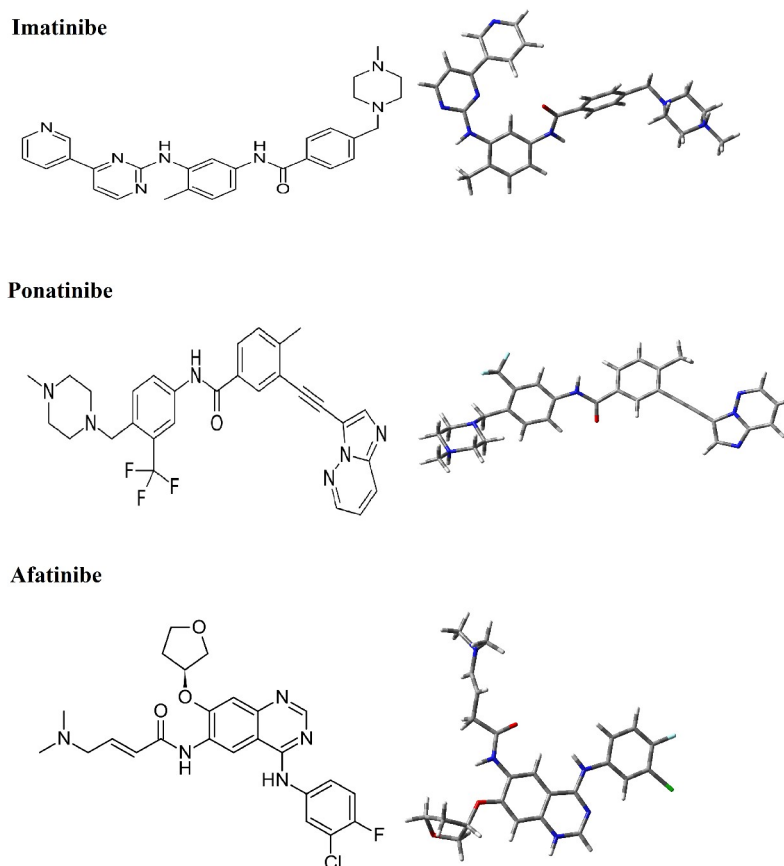
Neste trabalho, foram desenhadas quatro entidades moleculares derivadas do afatinibe que apresentaram melhor atividade inibitória no contexto da BCR-ABL na sua versão selvagem e BCR-ABL (mutada) resistente ao imatinibe quando comparadas à molécula original. Algumas das novas entidades aqui propostas também apresentaram em estudos *in silico* a redução da toxicidade prevista na molécula de afatinibe, incluindo as



UnB

propriedades irritantes. Os estudos aqui realizados evidenciaram informações relevantes no que tange à interação entre a BCR-ABL e seus inibidores clássicos, revelando interações cruciais que devem ser consideradas na inibição da enzima alvo.

Figura 2. Estruturas 2D e conformação de maior estabilidade energética dos TKI imatinibe, ponatinibe e ponatinibe, obtidas por meio de cálculos de otimização a nível DFT B3LYP/6-311+G(d,p).

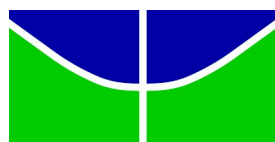




Metodologia

Quatro derivados do afatinibe foram desenhados usando técnicas de bioisosterismo (LIMA; BARREIRO, 2005) por meio do *software GaussView* (DENNINGTON, R., KEITH, T. AND MILLAM, 2007). Para os quatro derivados, diferentes modificações, de pequeno tamanho molecular, foram realizadas na estrutura do afatinibe. Estas modificações estão elencadas na Figura 3: AFA(I): substituição do átomo de flúor ligado a um anel aromático por um átomo de cloro; AFA(II): abertura do anel furano resultando num novo grupamento carbonila; AFA(III): substituição de um átomo central de oxigênio por um átomo de enxofre; e AFA(IV): adição de um anel metilpiperazina semelhante ao que está presente no imatinibe e no ponatinibe o grupo terminal da molécula.

As estruturas foram então otimizadas para encontrar a conformação relacionada ao mínimo global de energia por meio do pacote computacional Gaussian 16 (FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A. V.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERTS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCH, 2016). O método de estrutura eletrônica usado para a otimização foi a *Density Functional Theory* (DFT) (KIM; JORDAN, 2002) através do funcional híbrido B3LYP, com a função de base 6-311+G(d,p) (LU, 2015). As moléculas foram otimizadas considerando os meios vácuo e solvente implícito, tendo como solvente a água. A simulação da influência



UnB

do solvente foi realizada usando o método implícito *Solvation Model Based on Electron Density* (SMD) (MARENICH; CRAMER; TRUHLAR, 2009).

Para caracterizar propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção bem como a toxicidade (ADMET) e a *druglikeness* das moléculas, alguns descritores moleculares foram obtidos por meio do pacote Osiris e as ferramentas SwissADME e MolInspiration (CHEN et al., 2010; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; SANDER, T. (2001))

O estudo de *docking* das quatro novas moléculas no contexto da BCR-ABL foi realizado visando avaliar as interações entre os novos ligantes e seu alvo farmacológico. As estruturas geométricas tridimensionais da BCR-ABL foram obtidas por meio do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN et al., 2000), sendo oriundas de cristalografia de raios X. Uma das estruturas escolhidas carrega a mutação *gatekeeper* e está na conformação DFG-out (depositada no PDB sob o código 3QRJ) (CHAN et al., 2011), sendo oriunda da espécie *Homo sapiens*, enquanto a outra estrutura é a isoforma selvagem na conformação DFG-out, sendo oriunda da espécie *Mus musculus* (depositada no PDB sob o código 1OPJ) (NAGAR, 2003). O estudo de docking rígido-flexível foi realizado por meio do pacote AutoDock Tools (MORRISON et al., 2009) considerando tanto o algoritmo *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) (WILEY et al., 2011) quanto o algoritmo AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). O LGA foi aplicado buscando 150 soluções em uma

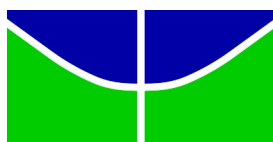


exaustividade de $2,5 \times 10^7$ no software AutoDock 4 enquanto AutoDock Vina foi aplicado buscando 1000 soluções com uma exaustividade de 32.

As interações não covalentes (NCI) observadas na formação dos complexos (entre os ligantes e as proteínas-alvos), advindos do estudo de *docking*, foram avaliadas por meio do *software* Multiwfn (LU; CHEN, 2012), para avaliar as interações de importância para o processo inibitório. As interações não covalentes foram visualizadas e compiladas usando o *software* VMD. A conformação do melhor inibidor proposto foi selecionada para estudos computacionais QM/MM, para maior detalhamento.

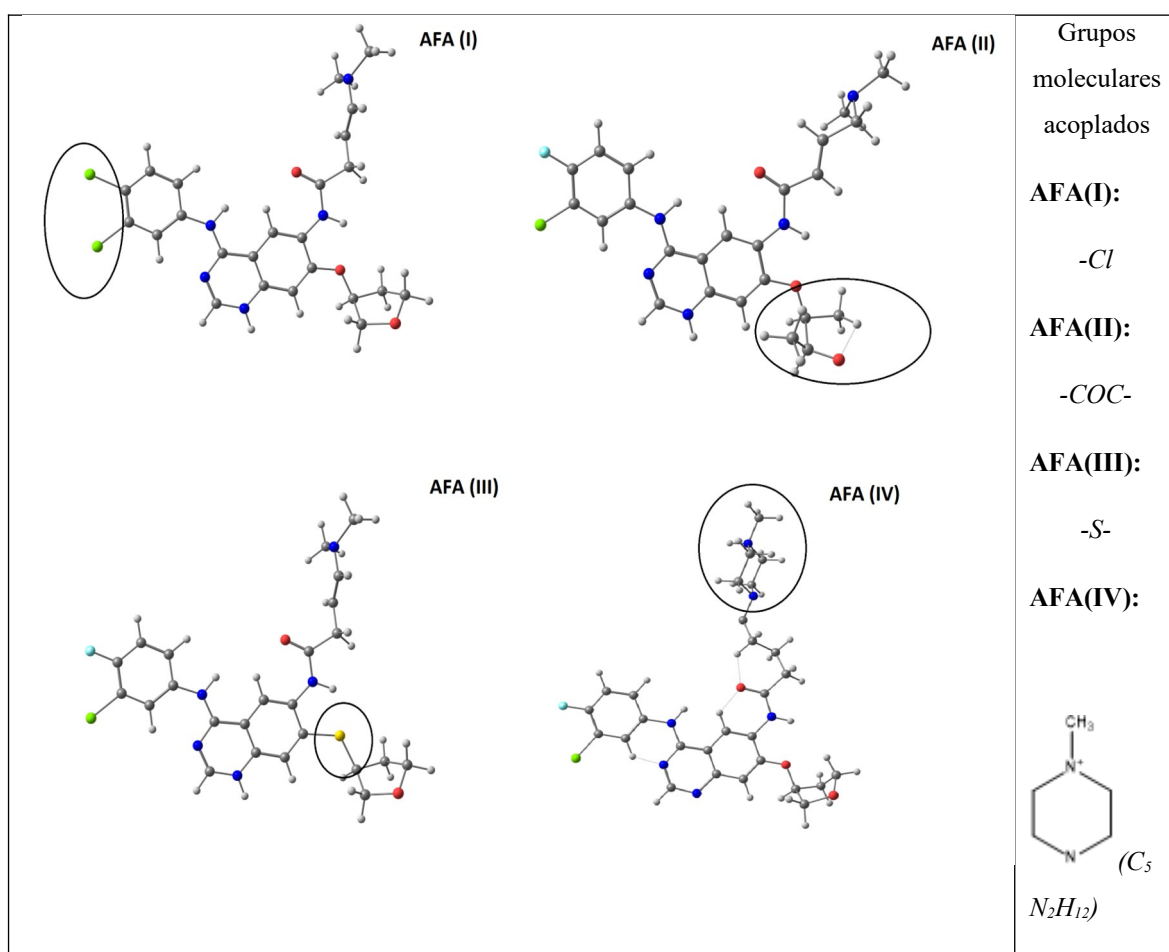
Considerando a elevada complexidade de sistemas biológicos, foi utilizado o método ONIOM em simulações de *single point* para maior eficiência e diminuição do custo computacional das simulações do complexo escolhido. A camada alta (contendo o ligante e o conjunto dos resíduos 286, 315, 318, 381, 382, 383 e seus respectivos vizinhos imediatos) do sistema ONIOM foi submetida ao método DFT em nível B3LYP/6-311+G(d,p) enquanto a camada baixa (restante do sistema) foi submetida ao campo de forças AMBER.

Figura 3. Novas entidades moleculares (protonadas em pH fisiológico) propostas por meio da modificação do afatinibe. As modificações realizadas foram: (I) substituição de um átomo de flúor por um átomo de cloro; (II) abertura do anel furano, resultando num grupo carbonila de maior flexibilidade; (III) substituição de um



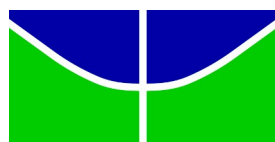
UnB

átomo de oxigênio por um átomo de enxofre; (IV) adição de um grupo metilpiperazina.



Resultados e Discussão

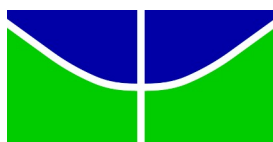
Em estudos iniciais, foram avaliados os orbitais de fronteira das novas moléculas geradas com relação aos orbitais de fronteira dos inibidores clássicos, conforme apresentados na Figura 4. Todas as moléculas propostas apresentaram distribuições



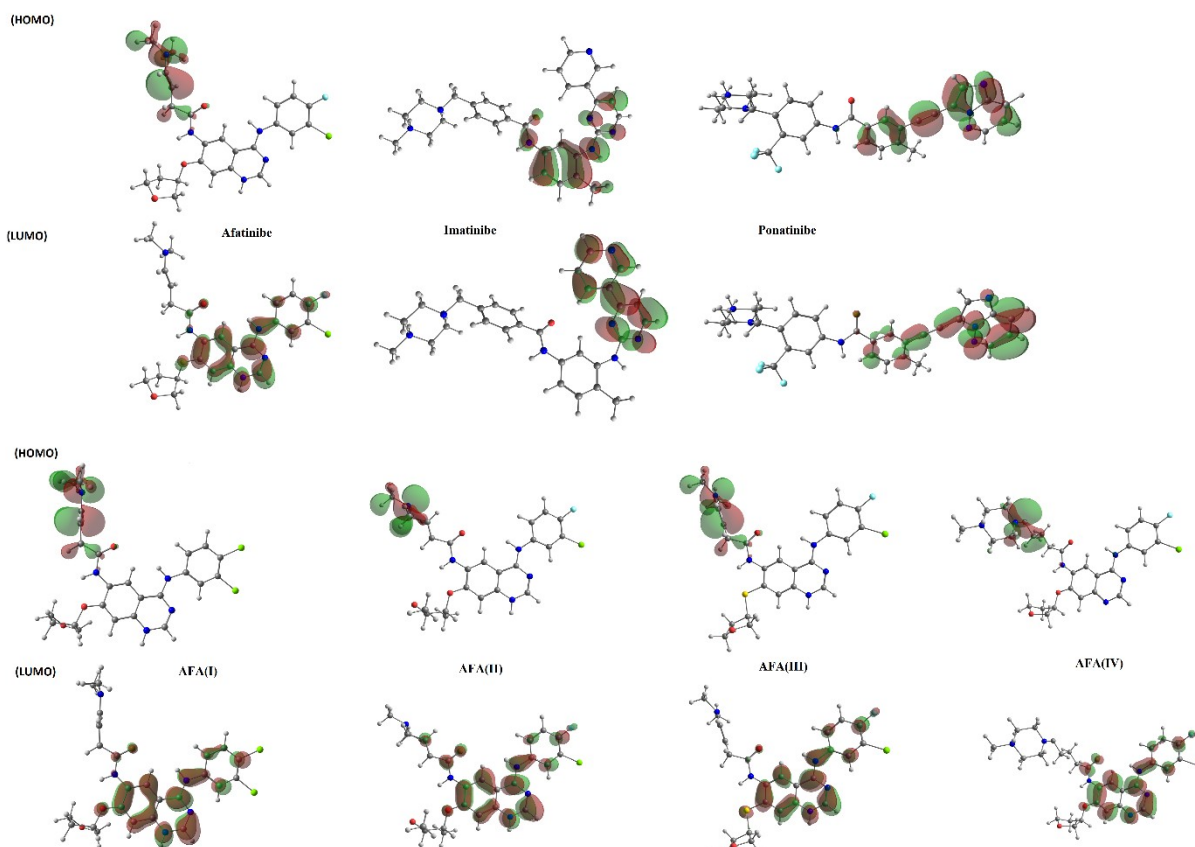
UnB

similares dos seus orbitais de fronteira, com HOMO que incluem o grupo amida central de maneira similar ao imatinibe. Vale notar que, as moléculas AFA(IV) e imatinibe não apresentaram distribuições HOMO similares quando se avalia a região do grupo metilpiperazina, enquanto o ponatinibe não concentra HOMO na metilpiperazina ou no grupo amida central. No entanto, todas as distribuições LUMO se concentraram em regiões de aromaticidade tanto nas novas moléculas quanto nos inibidores clássicos.

Figura 4. Orbitais de fronteira das novas entidades moleculares comparadas ao afatinibe, imatinibe e ponatinibe. Obtidos por B3LYP/6-311+g(d,p).



UnB



O estudo de estrutura eletrônica forneceu algumas informações iniciais sobre grupos de possível interação na estrutura dos inibidores. Entretanto, outras propriedades relevantes (não eletrônicas) foram necessárias e puderam ser obtidas (Apêndice 1), por meio da avaliação dos descritores moleculares das estruturas apresentadas. Estes descritores auxiliam na informação sobre a natureza das interações que os inibidores podem realizar, bem como seu potencial como drogas inéditas.



Um bom ponto de partida para a avaliação de novas moléculas para administração oral é o estudo de sua concordância com as Regras dos 5 de Lipinski (ROF, do inglês Rule of Five) (LIPINSKI, 2004). As ROF definem aspectos gerais que drogas de administração oral devem possuir, de maneira que a adequação de novas moléculas às regras deve ser levada em consideração, durante seu desenho racional. As regras definidas por Lipinski são: número máximo de 5 doadores de ligações de hidrogênio; número máximo de 10 aceptores de ligações de hidrogênio, massa molar máxima de $500\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e um logP que não exceda 5 (LIPINSKI et al., 2001). No planejamento de novos fármacos de administração oral, as moléculas podem violar apenas uma regra sem perda significativa de atividade.

Os dados trazidos na Apêndice 1 nos informam que todas as moléculas propostas seguem a ROF com no máximo uma violação. As moléculas AFA(I), AFA(III) e AFA(IV) apresentam pesos moleculares maiores que $500\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. No entanto, ao comparar estas violações com as de TKI clássicos, é possível perceber que a violação do peso máximo é a mesma apresentada pelo ponatinibe, a molécula mais eficaz na inibição da enzima BCR-ABL, com mutação T315I. Isso indica que o menor peso molecular pode não ser um fator crítico para a natureza da atividade destas moléculas.

Todas as moléculas apresentaram coeficientes de partição (cLogP) (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2014) menores que 5, o que é recomendado para moléculas aplicadas à BCR-ABL, uma vez que a maior parte dos valores descritos para drogas que tratam LMC se aproximam de 4 (ROSKOSKI, 2021), o que é corroborado pelos dados apresentados na



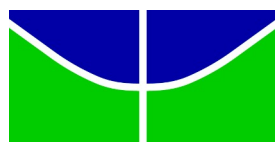
Apêndice 1. Isso indica que as modificações realizadas foram capazes de prover um coeficiente de partição adequado à BCR-ABL, especialmente a adição do grupamento metilpiperazina presente na molécula AFA(IV), como já conhecido na literatura (ROCHA; NASCIMENTO; MARTINS, 2021)

Além de descritores, também foi possível obter e compilar as propriedades ADMET dos inibidores propostos e compará-las às propriedades dos inibidores estabelecidos (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades de toxicidade previstas pelo software Osiris das moléculas inéditas comparadas aos inibidores estabelecidos.

Molécula	Mutagenicida de	Tumorigenicidade	Irritabilidade	Efeitos Reprodutivos
AFA(I)	Não	Não	Moderado	Não
AFA(II)	Não	Não	Não	Não
AFA(III)	Não	Não	Moderado	Não
AFA(IV)	Não	Não	Não	Não
Afatinibe	Não	Não	Moderado	Não
Imatinibe	Não	Não	Não	Não
Ponatinibe	Não	Não	Não	Não

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, todas as moléculas propostas apresentaram um nível satisfatório de segurança prevista. As moléculas AFA(II) e AFA(IV), em especial, não apresentaram nenhum risco previsto *in silico*, o que já é uma evolução significativa em relação ao afatinibe, que apresenta propriedades relacionadas a



UnB

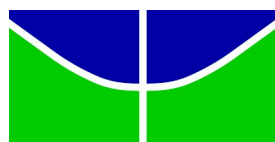
efeitos adversos dermatológicos e perioculares descritos na literatura (JOGANATHAN; NORRIS, 2019; ONDET et al., 2021). Em teoria, as modificações realizadas em AFA(II) e AFA(IV) seriam capazes de eliminar esses efeitos adversos.

Após conhecer os descritores e as propriedades ADMET dos novos inibidores propostos, os estudos de docking foram realizados para investigar o comportamento das novas entidades na inibição da BCR-ABL e, posteriormente compará-lo ao comportamento inibitório dos TKI clássicos. O primeiro resultado analisado foi o valor da energia de interação (*score*) entre os ligantes e as proteínas-alvos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da afinidade (kcal/mol) das interações das dos inibidores propostos, comparados aos dos inibidores estabelecidos em dockings LGA e Vina de sistema rígido-flexível.

Ligante	3QRJ-LGA	3QRJ-VINA	1OPJ-LGA	1OPJ-VINA
AFA(I)	-8,87	-7,80	-9,54	-8,10
AFA(II)	-8,04	-9,00	-10,36	-7,70
AFA(III)	-9,34	-8,90	-9,63	-8,60
AFA(IV)	-10,27	-9,00	-11,02	-8,50
Afatinibe	-7,68	-8,00	-9,10	-8,10
Imatinibe	-12,96	-9,30	-16,68	-10,30
Ponatinibe	-15,11	-11,80	-15,61	-10,20

De acordo com os valores de energia de interação obtidos, todas as novas moléculas mostraram melhor performance quanto a inibição da BCR-ABL em relação ao afatinibe. A modificação mais eficaz foi a adição do grupo metilpiperazina, presente na molécula



UnB

AFA(IV), que apresenta energia de interação inferior a $-10,00\text{kcal/mol}$ e $-11,00\text{kcal/mol}$ nas proteínas 3QRJ (resistente ao imatinibe) e 1OPJ (sensível ao imatinibe) respectivamente. A substituição pelo grupo de metilpiperazina potencializa a atividade inibitória do ligante. Embora todas as moléculas tenham fornecido melhora significativa em relação ao afatinibe, nenhuma das moléculas propostas foi capaz de superar o imatinibe ou o ponatinibe, sugerindo que outras modificações são necessárias. No entanto, as modificações propostas, especialmente a presente na molécula AFA(IV), são bons passos iniciais.

Em contraponto com os resultados obtidos pelo método LGA, a energia de ligação obtidas pelo Vina foram, em geral, menores. Isso pode estar associado à flexibilidade significativa das moléculas, conforme representado pelo número de ligações rotacionáveis no Apêndice 1, e pode indicar que o código do algoritmo LGA pode superestimar levemente a variação energética das interações entre ligantes flexíveis e suas respectivas proteínas-alvos. Esta hipótese deve ser considerada com cuidado, uma vez que a exaustividade usada pelo algoritmo Vina neste estudo é muito inferior à usada pelo algoritmo lamarckiano.

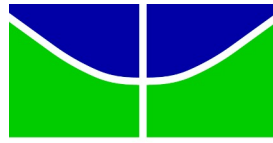
Isto posto, o algoritmo Vina computou melhores *scores* para as moléculas AFA(IV) e AFA(III) na proteína 3QRJ e AFA(IV) e AFA(II) na proteína 1OPJ. A permanência da molécula (IV) entre os melhores resultados fornece maior corroboração da importância do grupamento metilpiperazina, enquanto a boa performance de AFA(III) na proteína 3QRJ



sugere que a adição de um átomo de enxofre é favorável ao comportamento inibitório do ligante. Isso foi esperado, uma vez que é conhecida a importância do resíduo Met318, especialmente na enzima mutada. Embora esta influência fosse tida como meramente auxofórica, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a afinidade pelo resíduo Met318 é mais crítica para a inibição da enzima BCR-ABL resistente ao imatinibe do que se imaginava inicialmente.

As moléculas e a variação de seus scores foram avaliados através das distâncias entre os ligantes e os resíduos chave da proteína alvo em suas conformações de docagem, aliado a um estudo de interações não covalentes. Os resíduos chaves monitorados foram o Glu286, Thr/Ile315, Met318, Asp381, Phe382, Gly383 e Arg386 e as conformações escolhidas foram as obtidas pelo algoritmo Lamarckiano devido à maior exaustividade utilizada neste estudo (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Distâncias de interação média entre os ligantes e os resíduos chaves da enzima BCR-ABL selvagem (1OPJ)



UnB

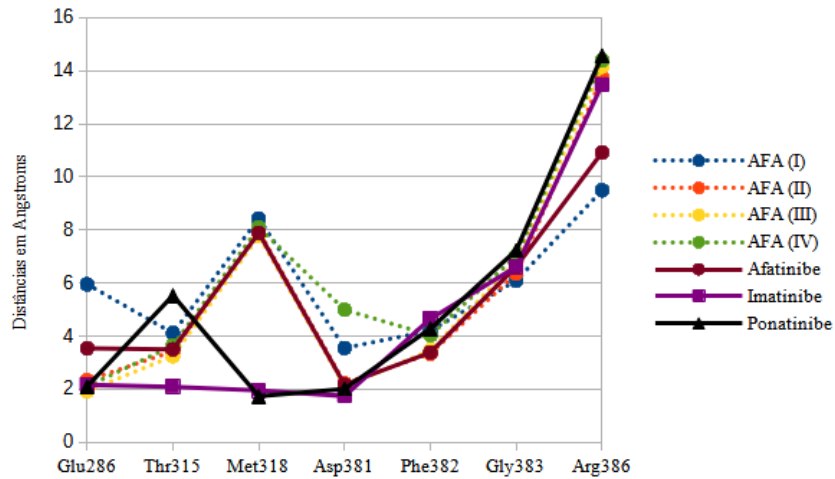
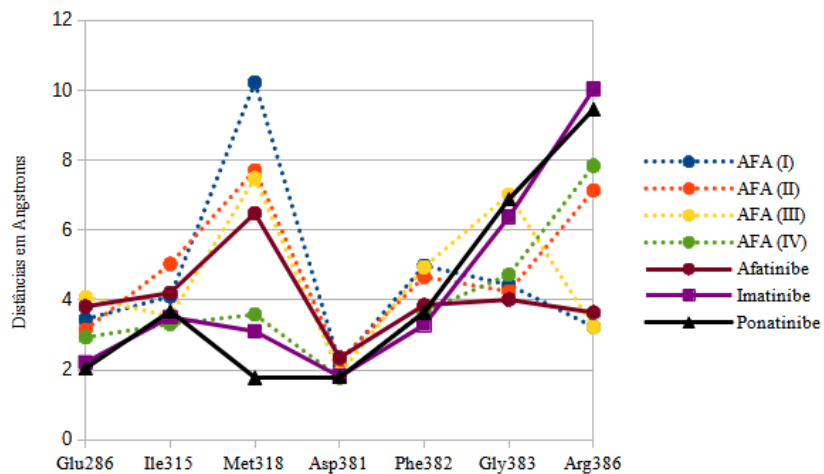


Figura 6. Distâncias de interação média entre os ligantes e os resíduos chave da enzima BCR-ABL mutada resistente ao imatinibe (3QRJ).



Para inibir a ação da proteína BCR-ABL com a mutação T315I, é sugerido que um inibidor ideal deva mimetizar as distâncias estabelecidas nas interações entre o ponatinibe



e os resíduos chaves da enzima. Enquanto que, para a proteína na forma selvagem, as distâncias mimetizadas devem ser as apresentadas pelo imatinibe. Essas distâncias devem ser respeitadas, dentro de um pequeno intervalo de variação, dentro dos valores apresentados pelo ponatinibe, i.e., cerca de 2Å do resíduo Met318 e 10Å do resíduo Arg386 na proteína 3QRJ, a fim de favorecer de forma satisfatória a inibição da atividade da enzima. É possível notar que, segundo as distâncias do ponatinibe e imatinibe ao resíduo Arg386, deve ser evitada a proximidade a este resíduo em ambas as isoformas da enzima, bem como deve ser evitada a interação com o resíduo Gly383 também. Isso pode indicar que a afinidade por estes resíduos é responsável por perturbar a conformação de docagem, diminuindo a eficácia da inibição.

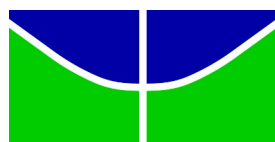
Para melhor entender os fenômenos descritos, realizou-se uma análise NCI complementar aos resultados anteriores a fim de obter maiores informações sobre o comportamento dos complexos resultantes das simulações. Assim como para os resíduos citados anteriormente, foi possível notar que a afinidade dos inibidores pelos resíduos Glu286, Thr/Ile315, Met318 e Glu381 é diretamente proporcional à eficiência da conformação de inibição. Como pode ser visto nas Figuras 5, 6 e no Apêndice 2, por meio das interações estabelecidas e distâncias médias dos inibidores clássicos, estes resíduos competem com os resíduos Arg386 e Gly383 pelas interações com o ligante. Pode-se afirmar que a interação dos TKI com os resíduos Arg386 e Gly383 desfavorece a interação efetiva com os resíduos de importância para a inibição.



Na isoforma selvagem da BCR-ABL (1OPJ), as interações dos ligantes de melhor score com o resíduo Thr315 é bastante evidente, como esperado. No entanto, chama a atenção a interação favorável entre o imatinibe e o resíduo Met318, que é discretamente mimetizada no ponatinibe. Como se trata das moléculas com maior poder inibitórios e não foi observada esta interação com outros ligantes, fica ainda mais evidente a importância pela a afinidade pelo resíduo da cadeia Met318.

O afatinibe forma uma interação do tipo van der Waals com o resíduo Thr315, mas não apresenta interações com o resíduo Met318, enquanto interage também com os resíduos Gly383 e Glu286, o que pode estar associado ao score menos favorável do afatinibe. O resíduo Glu286 parece não desempenhar papel na interrupção da inibição, uma vez que os melhores inibidores também interagem significativamente com este resíduo. Assim, pode-se associar a menor performance do afatinibe, justamente à sua falta de afinidade pelo resíduo Met318.

Ainda no contexto da isoforma selvagem, as moléculas AFA(I) e AFA(III) tiveram um desempenho menor quando comparadas às moléculas AFA(II) e AFA(IV). A diferença entre suas energias de ligação está relacionada às interações com o resíduo Gly383, o que justifica seus melhores desempenhos visto que as moléculas mais eficazes têm menos afinidade pelo resíduo Gly383

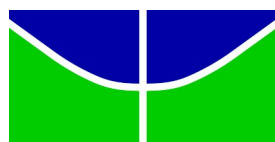


UnB

Considerando todos estes resultados é possível perceber que, para o design de novos inibidores deve ser levada em conta a afinidade pelo resíduo Met318, e, ao mesmo tempo, a repulsão entre os ligantes e os resíduos Arg386 e Gly383 para que se alcance a conformação mais eficaz à inibição enzima na forma selvagem.

Pela avaliação do Apêndice 2, confirma-se o que foi demonstrado pelos também na isoforma mutada da proteína-alvo. O ponatinibe, inibidor de melhor desempenho, apresentou interações significativas com os resíduos Ile315 e Met318 enquanto o afatinibe não apresentou afinidade pelo resíduo Met318 e teve as interações mais proeminentes com os resíduos Gly383 e Arg386. Este fenômeno, quando junto aos dados de score das conformações, sugere maior evidência de que a interação com os resíduos Gly383 e Arg386 é responsável pelo deslocamento do ligante, de uma conformação de maior eficácia na inibição da enzima BCR-ABL.

Ademais, pode-se notar que o imatinibe interage de forma favorável, por meio de interações de van der Waals com os resíduos Met318 e Ile315, mas apresenta maior proximidade (cerca de 6Å, com interação de van der Waals) ao resíduo Gly383 do que o ponatinibe. Embora a diferença seja discreta, este fato pode justificar a diferença de scores entre os dois TKI. A molécula proposta, AFA(IV), apresentou o melhor perfil de inibição e faz uma importante interação atrativa do tipo van der Waals com o resíduo Met318, envolvendo seu grupo metilpiperazina. Embora a interação com a metionina em questão seja favorável, isso indisponibilizou o anel metilpiperazina para interagir com outros

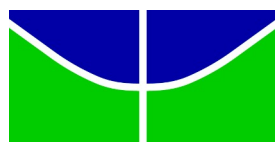


UnB

resíduos do sítio ativo, o que deveria estar localizado próximo à alavanca DFG para uma conformação ideal de inibição, como acontece com o ponatinibe. Isso sugere que novas modificações partindo da estrutura do AFA(IV) podem ser benéficas. Apesar disso, a adição de um grupamento metilpiperazina à molécula do afatinibe indicou um bom primeiro passo.

Concomitantemente, as modificações presentes nas estruturas AFA(II) e AFA(III), relacionadas às energias de ligação e as interações obtidas pelo estudo de *docking* usando o algoritmo AutoDock Vina, mostraram ser favoráveis para as duas isoformas da BCR-ABL. Com essa informação em mãos, é seguro afirmar que a combinação de modificações pontuais e racionais podem ser providenciais para a eficiência inibitória destes sistemas. Especialmente a incorporação de um grupo sulfurado à estrutura AFA(IV) para a inibição da isoforma mutada. Novos estudos poderão elucidar melhor este possível efeito sinérgico.

A molécula AFA(IV) foi submetida a um estudo ONIOM para melhor entender seu comportamento quando envolvida num complexo junto à proteína BCR-ABL. As cargas de átomos chave, identificados como átomos envolvidos nas interações proteína-ligante, foram avaliadas na proteína, no ligante e no complexo formado para a avaliação da estabilidade do mesmo. Os resíduos escolhidos para avaliação foram Ile315, Met318 e Asp381 conforme a Tabela 3.



UnB

Tabela 3. Cargas Chelpg (em u.a.), calculadas com o nível B3LYP/6-311+G(d,p) dos átomos envolvidos em interações intermoleculares na ausência e na presença de ligante.

Átomo	3QRJ	3QRJ + AFA(IV)	Átomo	AFA(IV)	AFA(IV) + 3QRJ
Ile315: CG1	0,14	0,32	C65	0,59	0,429
Ile315: CD1	-1,50	-1,50			
Met318: N	-0,93	-0,98	C69	0,20	-0,345
Met318: O	-0,55	-0,53			
Met318: H	0,10	0,10			
Asp381: N	-0,91	-0,91	O29	-0,568	-0,402
Asp381: OD2	-0,56	-0,53			

Conforme apresentado na Tabela 3, a presença do ligante altera as cargas de alguns átomos-chaves por meio da doação ou aceitação de densidade eletrônica. Segundo os valores fornecidos, o átomo CG1 do resíduo Ile315 é responsável pela doação de densidade eletrônica ao ligante que caracteriza a interação de van der Waals, conforme Apêndice 2, confirmando a atração do ligante por este resíduo. O nitrogênio do resíduo Met318, por sua vez, tem sua carga deslocada a um valor mais negativo, o que sugere que este resíduo tem afinidade neste sistema por grupos doadores de densidade eletrônica. Isso corrobora o que foi apresentado pelo Apêndice 2, uma vez que é possível perceber que um carbono é responsável pela efetivação da interação entre o ligante e o resíduo Met318.

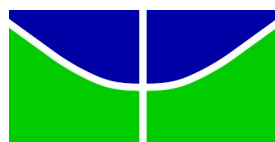


Além da avaliação de cargas em átomos-chaves, a diferença de energia e a distribuição dos orbitais de fronteira no complexo proteína-ligante também foram avaliadas para obter melhor entendimento sobre a estabilidade do sistema formado, conforme apresentado na Tabela 4 e Figura 7.

Tabela 4: Diferenças de energia (eV) entre orbitais de fronteira da proteína 3QRJ isolada e do complexo BCR-ABL mutada + AFA(IV) obtidas pelo estudo ONIOM.

Sistema	Gap (LUMO-HOMO)
3QRJ	0,62
3QRJ + AFA(IV)	0,30

Conforme apresentado na Tabela 4, o sistema complexado apresentou uma diferença de energia menor entre os valores de HOMO e LUMO. Essa informação confirma que a presença do ligante modificado é responsável pela estabilização do sistema proteico. Esta estabilização, por sua vez, diminui a tendência do sistema de realizar catálise enzimática, pois já se encontra num estado energeticamente favorável. A distribuição dos orbitais avaliados pode fornecer informações sobre resíduos de importância para a estabilização em questão.



UnB

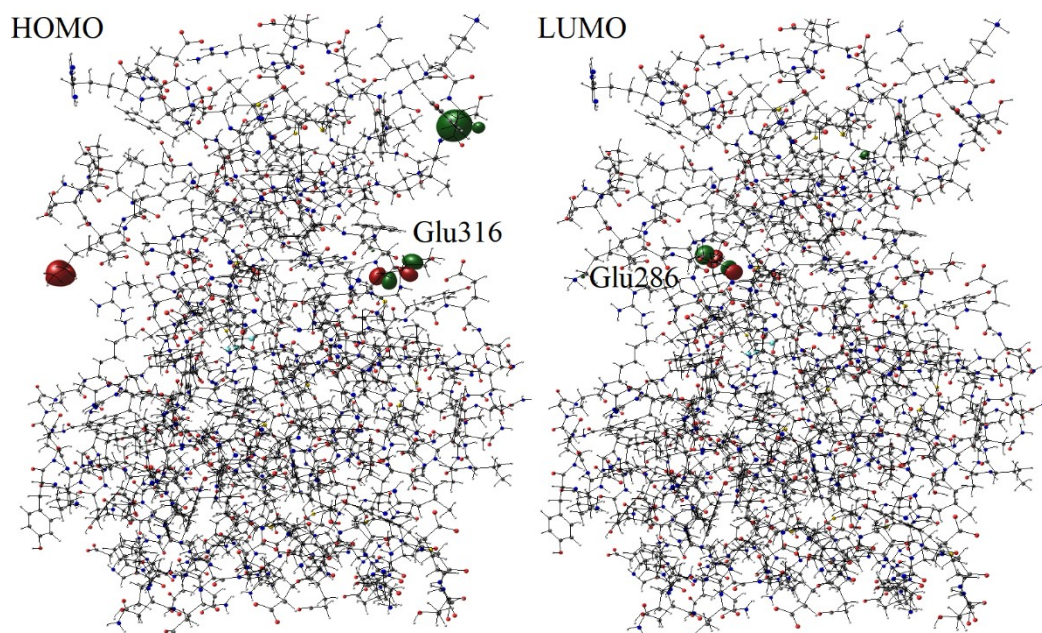


Figura 7. Distribuição dos orbitais de fronteira do complexo BCR-ABL mutada +AFA(IV) obtida pelo estudo ONIOM

Acerca da distribuição dos orbitais, a Figura 7 indica que os orbitais de fronteira ocupam, entre outros resíduos, as cadeias dos resíduos Glu316 e Glu286. A distribuição do orbital LUMO sobre o resíduo Glu286 justifica a relação de proporção inversa entre a distância do resíduo e a efetividade da inibição da enzima, vide Figura 6 e Tabela 3. O resíduo Glu286 está entre os resíduos que desempenham uma interação de van der Waals evidente com o ligante proposto, conforme apresentado no Apêndice 2, o que indica que a nova entidade molecular é capaz de interagir efetivamente com um resíduo crítico do sistema.



A distribuição do orbital HOMO sobre o resíduo Glu316 sugere que a vizinhança deste resíduo, incluindo também o resíduo Ile315, é crítica para a estabilidade do sistema, justificando a importância da interação efetiva nesta região para que o ligante assumira uma conformação efetiva na inibição da BCR-ABL. Conforme o Apêndice 2, o ligante AFA(IV) realiza uma interação de van der Waals com o resíduo Ile315, se aproximando também do resíduo Glu316, o que pode ser relacionado à estabilidade fornecida pela complexação do ligante à proteína. Futuros estudos poderão avaliar se uma maior afinidade pelo resíduo Glu316 favoreceria a inibição da enzima alvo.

Conclusão

As novas entidades moleculares propostas proporcionaram uma melhora significativa em relação ao afatinibe, tanto em termos de interação com a enzima alvo quanto em termos de toxicidade prevista. A molécula AFA(IV) se destacou por sua efetividade nos estudos de docking, sendo comparável ao imatinibe. Os derivados, associados aos dados obtidos pelo estudo dos inibidores já estabelecidos, demonstraram que os resíduos Arg386 e Gly383 devem ser evitados para que haja uma conformação eficaz na inibição da enzima. Enquanto que, os resíduos Glu286, Ile315, Met318 e Asp381 devem estar próximos dos ligantes para que a conformação de complexação seja favorável à inibição. O resíduo Glu286 demonstrou ser sítio de distribuição do orbital LUMO do complexo, indicando sua importância para a inibição da enzima. Isso foi confirmado pela análise das distâncias médias dos resíduos. Futuras modificações podem ser realizadas,



tendo essas informações em mãos, proporcionando uma melhor modelagem de um inibidor da enzima BCR-ABL derivado do afatinibe.

Referências

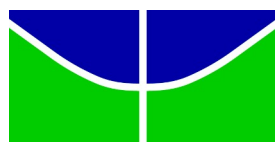
BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

CANG, S.; LIU, D. P-loop mutations and novel therapeutic approaches for imatinib failures in chronic myeloid leukemia. ***Journal of Hematology and Oncology***, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2008.

CHAN, W. et al. Conformational Control Inhibition of the BCR-ABL1 Tyrosine Kinase, Including the Gatekeeper T315I Mutant, by the Switch-Control Inhibitor DCC-2036. ***Cancer Cell***, v. 19, n. 4, p. 556–568, 2011a.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. ***Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography***, v. 66, n. Pt 1, p. 12, 2010.

CORTES, J. E. et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. ***Blood***, v. 132, n. 4, p. 393–404, 26 jul. 2018.



UnB

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/ Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports** 2017 **7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

DENNINGTON, R., KEITH, T. AND MILLAM, J. **Gauss View, Version 4.1.2.** , 2007.

FADERL, S. et al. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199907153410306>, v. 341, n. 3, p. 164–172, 21 out. 2008.

FOA, P. et al. Chronic myeloid leukemia treated with busulfan. **Oncology reports**, v. 3, n. 6, 1 nov. 1996.

FREIWALD, M. et al. Population pharmacokinetics of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in patients with various solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 759–770, 2014.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A. V.; BLOINO, J.; JANESKO,



B. G.; GOMPERTS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCH, D. J. **Gaussian 16, Revision C.01.** , 2016.

HURVITZ, S. A.; SHATSKY, R.; HARBECK, N. Afatinib in the treatment of breast cancer. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 23, n. 7, p. 1039–1047, 2014.

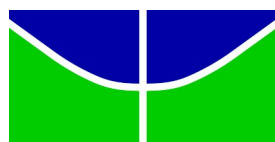
JABBOUR, E et al. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American journal of hematology**, v. 93, n. 3, p. 442–459, 1 mar. 2018.

JOGANATHAN, V.; NORRIS, J. H. Periocular Manifestations of Afatinib Therapy. **Ophthalmic plastic and reconstructive surgery**, v. 35, n. 1, p. E12–E13, 1 jan. 2019.

KAM, A. Y. F. et al. Selective ERBB2 and BCL2 Inhibition Is Synergistic for Mitochondrial-Mediated Apoptosis in MDS and AML Cells. **Molecular cancer research : MCR**, v. 19, n. 5, p. 886–899, 1 maio 2021.

KANG, Z. J. et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n. 1, p. 48, 27 maio 2016.

KIM, K.; JORDAN, K. D. Comparison of Density Functional and MP2 Calculations on the Water Monomer and Dimer. **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 40, p. 10089–10094, 2002.



UnB

LAI, W. V. et al. Afatinib in patients with metastatic or recurrent HER2-mutant lung cancers: a retrospective international multicentre study * HER2 mutation; Multicentre study. **European Journal of Cancer**, v. 109, p. 28–35, 2019.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23–49, 2005.

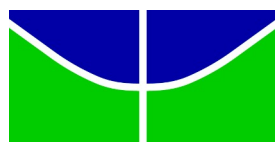
LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug discovery today. Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, dez. 2004.

LIU, J. et al. Recent advances in Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors for overriding T315I mutation. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 97, n. 3, p. 649–664, 1 mar. 2021.

LU, L. Can B3LYP be improved by optimization of the proportions of exchange and correlation functionals? **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 115, n. 8, p. 502–509, 2015.

LU, T.; CHEN, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 580–592, 15 fev. 2012.



UnB

MARENICH, A. V.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 18, p. 6378–6396, 7 maio 2009.

MARTO, J. P. et al. Drugs Associated With Ischemic Stroke: A Review for Clinicians. **Stroke**, v. 52, n. 10, p. E646–E659, 2021.

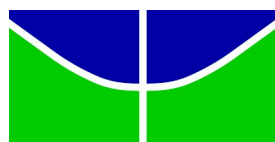
MASSARO, F.; MOLICA, M.; BRECCIA, M. Ponatinib: A Review of Efficacy and Safety. **Current cancer drug targets**, v. 18, n. 9, p. 847–856, 4 out. 2018.

MINCIACCHI, V. R.; KUMAR, R.; KRAUSE, D. S. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2021.

MORRISON, G et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

NAGAR, B. et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 859–871, 21 mar. 2003.

OCHI, Y. et al. Clonal evolution and clinical implications of genetic abnormalities in blastic transformation of chronic myeloid leukaemia. **Nature communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.



UnB

ONDET, T. et al. Unlocking the Mechanisms of Cutaneous Adverse Drug Reactions: Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway by EGFR Inhibitors Triggers Keratinocyte Differentiation and Polarization of Epidermal Immune Responses. **JID innovations : skin science from molecules to population health**, v. 1, n. 2, p. 100009, jun. 2021.

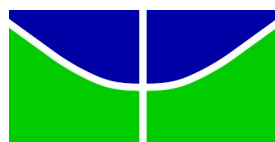
PARK, H. et al. Discovery of Picomolar ABL Kinase Inhibitors Equipotent for Wild Type and T315I Mutant via Structure-Based de Novo Design. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 22, p. 8227–8237, 5 jun. 2013.

PEREIRA, W. A.; NASCIMENTO, É. C. M.; MARTINS, J. B. L. Electronic and structural study of T315I mutated form in DFG-out conformation of BCR-ABL inhibitors. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1935320>, 2021.

REDDY, E. P.; AGGARWAL, A. K. The Ins and Outs of Bcr-Abl Inhibition. **Genes and Cancer**, v. 3, n. 5–6, p. 447–454, 2012.

ROCHA, K. M. L.; NASCIMENTO, É. C. M.; MARTINS, J. B. L. Investigation on the interaction behavior of afatinib, dasatinib, and imatinib docked to the BCR-ABL protein. **Journal of molecular modeling**, v. 27, n. 10, 1 out. 2021.

ROSKOSKI, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. **Pharmacological Research**, v. 165, n. January, p. 105463, 2021.



UnB

SANDERS, T. (2001) OSIRIS Property Explorer. **Organic Chemistry Portal. - References - Scientific Research Publishing.** Disponível em: <[https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqw2orz553k1w0r45\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2581078](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqw2orz553k1w0r45))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2581078)>. Acesso em: 10 abr. 2022.

SHENG, Z. et al. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2840–2848, 8 set. 2011.

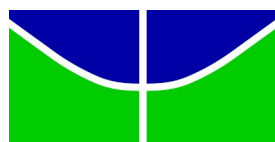
SJOBERG, B. P. et al. Splenomegaly: A Combined Clinical and Radiologic Approach to the Differential Diagnosis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 47, n. 3, p. 643–666, 1 set. 2018.

SOVERINI, S. et al. Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. **Molecular Cancer** 2018 **17:1**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 19 fev. 2018.

SOVERINI, S. et al. Treatment and monitoring of Philadelphia chromosome-positive leukemia patients: recent advances and remaining challenges. **Journal of hematology & oncology**, v. 12, n. 1, 23 abr. 2019.

STEIN, S. J.; BALDWIN, A. S. NF-B suppresses ROS levels in BCR-ABL+ cells to prevent activation of JNK and cell death. **Oncogene**, v. 30, n. 45, p. 4557–4566, 2011.

TANNEERU, K.; GURUPRASAD, L. Ponatinib Is a Pan-BCR-ABL Kinase Inhibitor: MD Simulations and SIE Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 13 nov. 2013.



UnB

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

WATANABE, K. et al. Dual EGFR and ABL Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in a Patient with Concomitant EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma and BCR-ABL1-Positive CML. **Case Reports in Oncological Medicine**, v. 2020, p. 1–6, 19 mar. 2020.

WATT, J. L.; PAGE, B. M. Reciprocal translocation and the Philadelphia chromosome. **Human genetics**, v. 42, n. 2, p. 163–170, jan. 1978.

WECKER, H. Afatinib. **Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer**, v. 211, p. 199–215, 2018.

WILEY, E. A. et al. LGA-Dock/EM-Dock Exploring Lamarckian genetic algorithms and energy-based local search for ligandreceptor docking. <https://doi.org/10.1139/v06-012>, v. 84, n. 3, p. 384–391, mar. 2011.

Apêndice 1. Tabela de descritores moleculares das novas entidades moleculares propostas comparadas aos inibidores estabelecidos.

	Massa Molecular (Da)	C LogP	#Ligações rotacionáveis	#Acceptores de H	#Doadores de H	PSA (A²)	Absorção Gastrointestinal	#Violações de Lipinski	Biodisponibilidade	Leadlikeness	Druglikeness
AFA(I)	503,4	2,92	9	4	3	87,22	Alta	1	0,56	2	1,77
AFA(II)	487,9	2,21	10	6	3	98,22	Alta	0	0,55	2	-0,53
AFA(III)	503,0	2,9	9	4	3	103,2	Alta	1	0,56	2	0,35
AFA(IV)	556,0	4,42	11	7	3	91,85	Alta	1	0,55	3	-0,91
Afatinibe	486,9	3,64	9	5	3	88,61	Alta	0	0,55	3	-3,64
Imatinibe	494,6	3,94	9	5	3	95,07	Alta	0	0,55	3	4,47
Ponatinibe	535,5	3,86	8	7	2	65,77	Alta	1	0,55	3	2,10

Apêndice 2. Estudo NCI das conformações de docagem dos inibidores às isoformas 1OPJ e 3QRJ da BCR-ABL.

1OPJ

3QRJ

Em azul, ligações de hidrogênio;
Em verde, interações de van der Waals;
Em amarelo, forças de repulsão.

