

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caseína quinase 1 como alvo para o planejamento de fármacos em  
mal de Alzheimer**

Ricardo Pereira Rodrigues

Ribeirão Preto  
2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Caseína quinase 1 como alvo para o planejamento de fármacos em mal de Alzheimer**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

**Orientado(a):** Ricardo Pereira Rodrigues

**Orientador(a):** Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/05/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodrigues, Ricardo Pereira

Caseína quinase 1 como alvo para o planejamento de fármacos em mal de Alzheimer. Ribeirão Preto, 2014.  
98 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: da Silva, Carlos Henrique Tomich de Paula

1. Caseína cinase 1. 2. Triagem virtual. 3. Alzheimer.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ricardo Pereira Rodrigues

Caseína quinase 1 como alvo para o planejamento de fármacos em mal de Alzheimer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Tomich, pelo suporte, orientação e incentivo para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Martínez Gil pela colaboração.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica que possibilitaram o desenvolvimento pleno deste projeto.

À minha família, por sempre me apoiar e me impulsionar nos estudos.

À minha namorada, Lorena, por todo amor e apoio.

Aos amigos Susi, Daniel, Vinícius, Xita, Jonathan, João Gabriel e Leonardo, pela amizade e por toda colaboração que este convívio trouxe.

Aos amigos dos Laboratórios de Química Farmacêutica por toda amizade ao longo destes anos.

A toda equipe da secretaria de Pós-graduação da FCFRP.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela infra-estrutura oferecida, seus docentes e funcionários.

## RESUMO

RODRIGUES, R. P. **Caseína quinase 1 como alvo para o planejamento de fármacos em mal de Alzheimer**. 2014. 98f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela perda de neurônios corticais e subcorticais. Padrões patológicos da doença de Alzheimer incluem a presença de lesões neurofibrilares que consistem no acúmulo da proteína  $\beta$ -amilóide e dos emaranhados neurofibrilares, decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau. Apenas dois grupos principais de fármacos são utilizados para o tratamento da DA, os inibidores colinesterásicos e antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato. Entretanto, a fosforilação de proteínas pelas proteínas cinases constituem um dos principais mecanismos pelos quais as células se utilizam para regular seu metabolismo e demais funções e desequilíbrios nestas atividades estão relacionados a uma infinidade de doenças. O número elevado de isoformas de proteínas cinases 1 (CK1) encontradas na DA e sua associação em marcadores de lesões neurodegenerativas indicam sua participação nas etapas finais da degeneração, comum tanto à DA quanto a outras desordens neurodegenerativas. A abordagem da proteína CK1 como alvo terapêutico para a DA é promissora uma vez que os compostos usuais utilizados para diminuir a produção de  $\beta$ -amilóide também bloqueiam a quebra de outras proteínas, causando graves efeitos colaterais. Cada vez mais as ferramentas de bioinformática vêm sendo utilizadas como auxílio na redução de custos e tempo para as pesquisas. Dentre estas técnicas destaca-se a triagem virtual, que reúne um conjunto de técnicas utilizadas de forma sequencial com o objetivo de selecionar compostos protótipos para os alvos desejados. Neste trabalho, foram utilizadas técnicas de triagem virtual baseada em ligantes e estrutura, a partir de uma base de 500 mil compostos, selecionando 35 compostos com perfil de atividade inibitória para a enzima CK1. Destes, os compostos **24, 25, 36, 39 41 e 42** apresentaram resultados significativos com relação ao potencial de inibição da enzima CK1 $\delta$ . Entre aqueles que já foram submetidos a ensaios de inibição enzimática, **25** apresentou seletividade para CK1 $\delta$ , com 40% de inibição. Para aqueles compostos com melhor potencial de inibição à concentração de 10  $\mu$ M será determinado o IC<sub>50</sub> e uma extensa análise dos resultados será realizada futuramente.

Palavras-chave: Caseína cinase 1, triagem virtual, Alzheimer

## ABSTRACT

RODRIGUES, R. P. **Casein kinase 1 as a target for drug design in Alzheimer's disease.** 2014. 98f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by loss of cortical and subcortical neurons. Pathological patterns of Alzheimer's disease include the presence of neurofibrillary lesions consisting of the accumulation of amyloid- $\beta$  protein and the neurofibrillary tangles, resulting of hyperphosphorylated Tau protein. Only two major groups of drugs are used for treatment of AD, cholinesterase inhibitors and antagonists of N-methyl- D-aspartate receptor. The phosphorylation of proteins by protein kinases constitute one of the major mechanisms which cells use to regulate their metabolism and imbalances in these activities are related to a series of diseases. The high number of isoforms of protein kinase 1 (CK1) found in AD and its association with neurodegenerative markers of indicate their participation in the final stages of degeneration, common to both AD and other neurodegenerative disorders. The approach of CK1 protein as a therapeutic target for AD is promising as the usual compounds used to reduce the production of amyloid- $\beta$  also block the breakdown of other proteins, causing severe side effects. Increasingly, bioinformatics tools have been used as an aid in reducing costs and time to research. Among these techniques highlights the virtual screening, which includes a set of techniques used sequentially with the aim of select compounds prototypes for the desired target. Ligand and structure-based virtual screening techniques from a 500 thousand database resulted in 35 selected with inhibitory profile for CK1 enzyme were used in this study. The compounds **24**, **25**, **36**, **39** **41** and **42** had significant potential for CK1 $\delta$  enzyme inhibition. Among those submitted to enzyme inhibition assays, compound **25** showed selectivity for CK1 $\delta$  , with 40 % inhibition. For those compounds with the best inhibitory concentration at 10 mM and the IC50 will be given an extensive analysis of the results will be held in the future .

Keywords: Casein kinase, virtual screening, Alzheimer.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Patogênese da DA. Esquema demonstrando o acúmulo de  $\beta$ -amilóide, levando à formação das placas amilóides e a formação dos emaranhados neurofibrilares, decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau. Adaptado com a permissão de ©Macmillan Publishers Ltd: (MUCKE, 2009). Copyright © 2009.....1
- Figura 2: Fármacos utilizados em tratamentos paliativos para a Doença de Alzheimer.....3
- Figura 3: (A) Diagrama ribbons da estrutura tridimensional de CK1 complexada com substrato (Mg/ATP) (código PDB: 1CSN). (B) Ampliação dos resíduos que interagem com ATP. Os átomos de carbono dos aminoácidos do sítio ligante da proteína estão indicados em verde e os da sequência nucleotídica em cinza. Imagem criada utilizando os programas PyMOL (SCHRÖDINGER, LLC, 2010) ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) e Inkscape (ALBERT et al., 2014) ([www.inkscape.org](http://www.inkscape.org)).....6
- Figura 4: Bolsão hidrofóbico do sítio ativo de CK1. Átomos de carbono em azul da proteína correspondem aos aminoácidos hidrofóbicos (Código PDB: 3UZP). Figura criada usando os programas Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/>) e Inkscape.....7
- Figura 5: O pós processamento da PPA pode ocorrer por duas vias distintas: a via amiloidogênica, na qual  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase atuam em conjunto formando duas espécies secretadas, os fragmentos N-terminais sAPP $\beta$  e o peptídeo neurotóxico  $\beta$ -amilóide. Já na via não-amiloidogênica, a ação da enzima  $\alpha$ -secretase atuando no resíduo 16 da PPA impede a formação de  $\beta$ -amilóide, formando então, os fragmentos N-terminais sAPP $\alpha$  e p3. Adaptado com permissão de ©Wiley-Liss, Inc., sob a licença creative commons <<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>>:(SAVAGE; GINGRICH, 2009). Copyright © 2009.....10
- Figura 6. Avanços na descoberta de novos alvos terapêuticos, destacando o grande número de publicações de cinases como alvos para doenças do sistema nervoso central (barra em cor de laranja). Adaptado com a permissão de ©Macmillan Publishers Ltd: (CHICO; VAN ELDIK; WATTERSON, 2009). Copyright © 2009.....11
- Figura 7: Inibidores seletivos para CK1: IC261 e CKI-7 (ANTES, 2010; KORB et al., 2012).  
.....12
- Figura 8. Inibidores selecionados da literatura para CK1, obtido dos bancos de dados do PDB (01 – 05) e do BindingDB (06 – 10).  
.....28
- Figura 9. Modelo farmacofórico selecionado para a triagem virtual. Esfera azul, grupo hidrofóbico; em rosa, grupo doador de ligação de hidrogênio e em verde, acceptor de ligação de hidrogênio.  
.....29
- Figura 10. A) Hipótese farmacofórica testada com superposição de compostos ativos

diferentes daqueles usados para a geração do modelo farmacofórico. B) Hipótese farmacofórica sobreposta no sítio ativo de CK1: os 3 grupos farmacofóricos estão em regiões de interação com aminoácidos do sítio ativo de CK1: LEU85, SER17 e LYS38.....30

Figura 11. Protocolo de triagem virtual baseada em ligante.....32

Figura 12. Compostos selecionados pela triagem virtual baseada em ligantes após geração de confôrmeros com o programa OMEGA para a base de 1.000 moléculas a qual foi submetida novamente à triagem virtual por farmacóforo.....34

Figura 13. Compostos obtidos pela busca por similaridade 2D, usando índice de Tanimoto. Valores entre parênteses.....36

Figura 14. Proposição de modos de ligação por meio de “docking” em sobreposição com campos de interação molecular (MIFs), para os compostos 11 e 12. Carbono aromático (contorno em cinza, (energia = -3,8 kcal.mol<sup>-1</sup>); hidroxila (contorno em vermelho, energia = -7,18 kcal.mol<sup>-1</sup>).....48

Figura 15. Proposição dos modos de ligação de 20, por meio de “docking” em sobreposição com campos de interação molecular (MIFs), evidenciando poucos pontos de interação de 20 com o sítio de CK1, refletindo diretamente em sua atividade (2,26%). Carbono aromático (contorno em cinza, (energia = -3,8 kcal.mol<sup>-1</sup>); hidroxila (contorno em vermelho, energia = -7,18 kcal.mol<sup>-1</sup>).....49

Figura 16. Propostas de modo de ligação de 24 e 25 em sobreposição com campos de interação molecular (MIFs), indicando uma melhor acomodação de 25 no sítio de CK1δ, por realizar mais interações se comparado ao composto 24. Carbono aromático (contorno em cinza, (energia = -3,8 kcal.mol<sup>-1</sup>), hidroxila (contorno em vermelho, energia = -7,18 kcal.mol<sup>-1</sup>).....49

Figura 17. Estrutura química dos 10 compostos selecionados por meio de triagem virtual baseada em ligantes para ensaios de inibição.....50

Figura 18: Diagrama em ribbons da proteína CK1 complexada com ATP no sítio ativo (complexo de código PDB: 1CSN) destacando as cinco principais regiões de ligação do ATP, como proposto por Traxler e colaboradores (BUIJSMAN, 2005; TRAXLER; FURET, 1999). Em verde, estão representados os átomos de carbono da proteína e do ATP além dos bolsões hidrofóbicos 1 e 2 (também denominados como Região de ligação 1 e 2, respectivamente). Em azul, região de ligação da adenina; em rosa, região de ligação da ribose; em laranja região de ligação do grupo fosfato. Imagem criada utilizando os programas PyMOL (SCHRÖDINGER, LLC, 2010) (www.pymol.org) e Inkscape (ALBERT et al., 2014) (www.inkscape.org).....55

Figura 19: Modo de ligação ATP no sítio: Principais interações: Bolsão da Adenina: LEU88 com N do anel indólico; ASP86 com NH2 da cadeia lateral; Região Fosfato: LYS41, SER22, ASP154, ASP135; Bolsão da Ribose: ASP136 com hidroxila da ribose.....57

Figura 20: Modo de ligação de IC261 (PDB ID: 1EH4). Principais interações: ASP86 com

- átomo de nitrogênio do anel; LYS41 com metoxila da cadeia lateral.....57
- Figura 21: Modos de ligação do ATP (1) e do inibidor PF670462 (2) no sítio ativo de CK1 $\delta$ , evidenciando a acomodação de (2) pelo bolsão hidrofóbico, devido à livre rotação do resíduo-guardião, MET82 possibilitada pela pequena cadeia lateral de PRO66. Em amarelo, círculo destacando a flexibilidade da alça, evidenciando o impedimento estérico de ligantes maiores, como o próprio ATP, para o complexo de código 3UZP.....58
- Figura 22: Sobreposição dos complexos 1CSN (cinza), 3UZP (rosa) e 4HNF (verde), evidenciando a rotação de MET82 além da movimentação da alça, localizada na entrada do sítio ativo.....59
- Figura 23: Esquema das técnicas de seleção utilizadas no processo de triagem virtual baseada em estrutura para a seleção de 10 compostos com potencial atividade inibitória da enzima CK1.....62
- Figura 24: 10 compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura, com respeito à afinidade com a CK1 $\delta$ .....63
- Figura 25: Compostos obtidos pela triagem virtual baseada em estrutura (átomos de carbono em cinza) que apresentaram modos de ligação semelhantes a inibidores que exploram o bolsão hidrofóbico (átomos de carbono em laranja). A, C e E (primeira coluna) evidencia a exploração do bolsão hidrofóbico pelos compostos 36, 39 e 42, respectivamente, enquanto que em B, D e F (segunda coluna) é possível observar que estes compostos (36, 39 e 42) sobrepõem-se com o inibidor reportado na literatura PF670462, indicando modo de ligação semelhante.....69
- Figura 26: A) Modos de ligação propostos por “docking” para o composto 41. B) Sobreposição do composto 42 (átomos de carbono em cinza) com inibidor PF670462 (átomos de carbono em laranja) indicando que o composto 41, apesar de possuir modo de ligação semelhante à este inibidor, não é capaz de explorar o bolsão hidrofóbico.....70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bases de dados utilizadas na triagem virtual.....	21
Tabela 2. Compostos de referência (01 a 10) que foram submetidos à predição do espectro de atividade (PASS). Pa/Pi indica potencial de atividade para Doença de Alzheimer.....	37
Tabela 3. Compostos selecionados por meio da triagem virtual, como potenciais protótipos para inibidores de CK1, que possuam Pa>Pi (compostos 11 – 20).....	38
Tabela 4. Compostos selecionados pela busca por similaridade 2D como potenciais protótipos para inibidores de CK1, que possuam Pa>Pi (compostos 21 – 35).....	39
Tabela 5. Compostos de Referência preditos no Qikprop (01 - 10).....	41
Tabela 6. Predições de atividade para os 10 compostos selecionados pela triagem virtual (11 a 20 ).....	42
Tabela 7. Predições de atividade com QikProp para os 15 compostos selecionados pela similaridade 2D (21 a 35).....	43
Tabela 8. Predição de toxicidade com o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos nos compostos de referência (compostos 01 a 10).....	44
Tabela 9. Predição de toxicidade com o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos selecionados pela triagem virtual (compostos 11 a 20).....	45
Tabela 10. Predição de toxicidade utilizando o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos nos compostos selecionados pela similaridade 2D (compostos 21 a 35). 46	46
Tabela 11: 10 compostos selecionados da etapa de triagem virtual baseada em ligantes submetidos ao teste de inibição enzimática.....	51
Tabela 12. Isoformas de CK1 disponíveis no PDB.....	53
Tabela 13: Cálculo do RMSD para cada pose de docking do inibidor PF670462 no sítio ativo de CK1 $\delta$ , utilizando o ligante cristalográfico ((7)_3uzp_docking) como referência.....	59
Tabela 14: Descrição das moléculas de água envolvidas em interações no sítio ativo de CK1 para os complexos 3UZP e 4HGT.....	61
Tabela 15: Compostos selecionados ao final do processo de triagem virtual baseada em estrutura (36 – 45) submetidos à predição do espectro de atividade, com Pa>Pi demonstrando	

potencial de atividade para Doença de Alzheimer.....	64
Tabela 16: Predições de atividade para os 10 compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura (36 a 45).....	65
Tabela 17: Predição de toxicidade com o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura (compostos 36 a 45).....	66
Tabela 18: Compostos selecionados ao final do processo de triagem virtual baseada em estrutura. Com base no “docking” sequencial, foi possível selecionar o melhor valor de escore em relação aos 3 complexos cristalográficos utilizados: 1CSN, 3UZP e 4HGT.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	“Acetylcholinesterase”
ADME/Tox	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AMPK	“Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase”
APP	“Amyloid Precursor Protein”
A $\beta$	“Amyloid $\beta$ ”
CDKs	“Cyclin-dependent kinase”
cDNA	“complementary DNA”
CK	“Casein Kinase”
CK1	“Casein Kinase 1”
CK2	“Casein Kinase 2”
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GSK-3	“Glycogen synthase kinase 3”
MAPKs	“Mitogen-activated protein kinase”
NFT	“Neurofibrillary Tangles”
NMDA	“N-metil-D-aspartato”
USP	Universidade de São Paulo
QSAR	“Quantitative structure activity relationship”

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Caseínas Cinases.....	4
1.2 Caseína Cinase 1 (CK1).....	5
1.5 Caseína cinase 1 em DA.....	9
1.7 Potencial de inibidores para CK1.....	11
1.8 Bioinformática aplicada ao planejamento de fármacos.....	13
1.8.1 Triagem virtual baseada em ligantes.....	14
1.8.1.1 Busca por similaridade 2D.....	14
1.8.1.2 Modelo farmacofórico.....	15
1.8.2 Triagem virtual baseada em estrutura.....	15
1.8.2.1 Docking.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Busca por inibidores de CK1 em banco de dados.....	20
3.2 Busca por complexos cristalográficos de CK1 em banco de dados.....	20
3.3 Preparo dos complexos cristalográficos.....	20
3.4 Modelo Farmacofórico.....	21
3.5 Base de dados utilizada na triagem virtual.....	21
3.6 Triagem virtual baseada em ligantes.....	22
3.6.1 Geração de confôrmeros.....	22
3.6.2 Busca por similaridade 2D.....	22
3.6.3 Cálculos de Docking.....	22
3.7 Triagem Virtual Baseada em Estrutura.....	23
3.7.1 Redocking.....	24
3.7.2 Análise dos campos de interação molecular.....	24
3.7.3 Predições de atividade e toxicidade.....	25
3.7.4 Ensaios de inibição enzimática com a proteína humana CK1δ.....	25

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Triagem virtual.....	26
4.1.1 Triagem virtual baseada em ligantes.....	27
4.1.2 Construção do modelo farmacofórico.....	27
4.1.3 Validação do Modelo Farmacofórico.....	29
4.1.4 Refinamento do processo de triagem virtual baseado em ligantes.....	33
4.1.5 Geração de confôrmeros com o OMEGA.....	33
4.1.6 Busca por similaridade 2D.....	35
4.1.7 Predições de atividade biológica.....	36
4.1.8 Predições de toxicidade.....	43
4.1.9 “Docking” e propostas de modos de ligação das estruturas químicas selecionadas por triagem virtual baseada em ligantes.....	47
4.1.10 Ensaio de inibição enzimática.....	50
4.2 Triagem Virtual Baseada em Estrutura.....	52
4.2.1 Busca por complexos cristalográficos da CK1.....	52
4.2.2 Modos de ligação do ATP no sítio ativo.....	56
4.2.3 Docking.....	58
4.2.4 Análise da conservação da flexibilidade de CK1 $\delta$ .....	59
4.2.5 Redocking.....	59
4.2.6 Análise das moléculas de água envolvidas em interações no sítio ativo de CK1.....	60
4.2.7 Predições de atividade biológica.....	63
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72



## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela acentuada atrofia do córtex cerebral e perda de neurônios corticais e subcorticais. Padrões patológicos da DA incluem a presença de lesões neurofibrilares, cuja evolução está diretamente relacionada à severidade da doença (BRAAK; BRAAK; MANDELKOW, 1994; KURET et al., 1997). As características patológicas da DA consistem no acúmulo de dois agregados proteínicos insolúveis: as placas senis, que são acúmulos da proteína  $\beta$ -amilóide acompanhados por processos neuronais degenerativos e os emaranhados neurofibrilares, compostos por filamentos helicoidais finamente emparelhados formados predominantemente por formas altamente fosforiladas da proteína Tau, que encontra-se associada aos microtúbulos (IQBAL et al., 2005; KURET et al., 1997; PARKER; GOODMAN; GILMANS, 2006) (Figura 1).

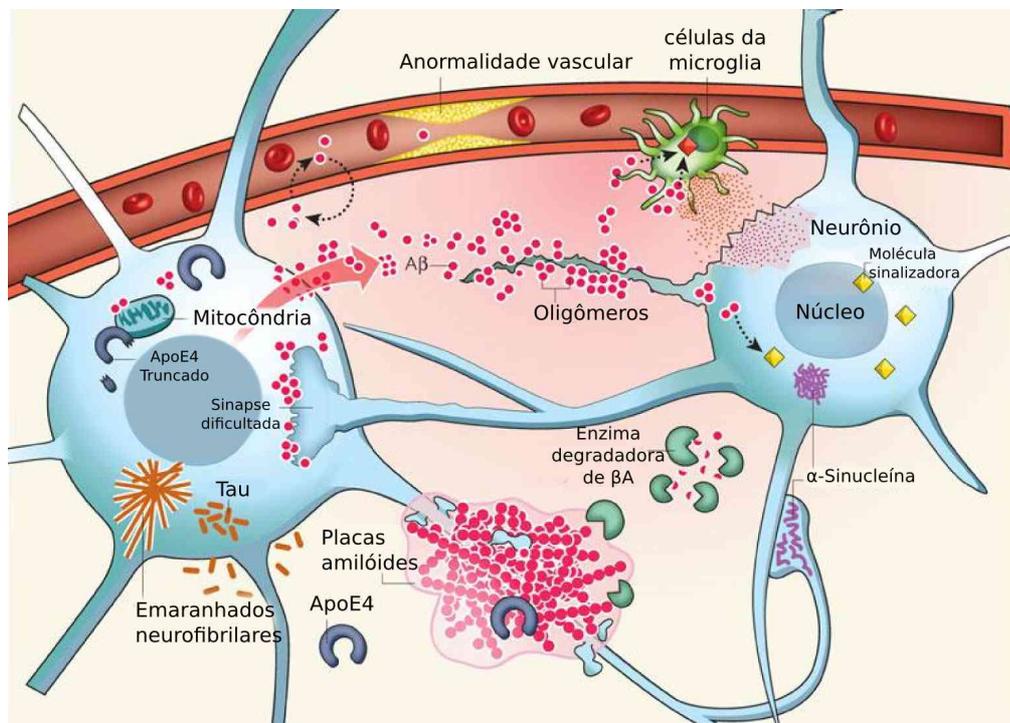


Figura 1: Patogênese da DA. Esquema demonstrando o acúmulo de  $\beta$ -amilóide, levando à formação das placas amilóides e a formação dos emaranhados neurofibrilares, decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau. Adaptado com a permissão de ©Macmillan Publishers Ltd:(MUCKE, 2009). Copyright © 2009.

As placas amilóides (ou placas senis), são formadas principalmente por depósitos extraneuronais de oligômeros da proteína  $\beta$ -amilóide (do inglês, “Amyloid  $\beta$ ” – A $\beta$ ) a qual é quebrada pela proteína precursora de amilóide (do inglês, “amyloid precursor protein” – APP) por meio de duas proteases intracelulares,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase (KOSIK; JOACHIM; SELKOE, 1986; SAVAGE; GINGRICH, 2009).

Entretanto, quando a quebra ocorre na região central da  $\beta$ -amilóide, mais precisamente após o resíduo de LIS16 desencadeada pela  $\alpha$ -secretase estes agregados proteináceos não ocorrem (padrão não-amiloidogênico). Já os emaranhados neurofibrilares (do inglês, “neurofibrillary tangles” – NFT) são formados principalmente por depósitos intraneuronais de formas hiperfosforiladas da proteína Tau, cuja progressão do quadro está associada à hiperfosforilação de resíduos de SER/THR próximos aos domínios ligantes dos microtúbulos, que acabam por enfraquecer a ligação da proteína Tau aos microtúbulos. Durante o processo de proteólise da Tau propaga-se a formação de pequenos agregados, os quais progredem para fibrilas levando à formação dos emaranhados neurofibrilares (NFTs), decorrente de um desequilíbrio na atividade das cinases e fosfatases.

O grande número de filamentos da proteína Tau encontrados em cérebros de pacientes com Alzheimer e sua ocorrência em outras doenças degenerativas, tornou evidente que além da  $\beta$ -amilóide, anormalidades na proteína Tau, tais como sua hiperfosforilação também contribuem na progressão da doença. Entretanto, a forma como estas proteínas insolúveis contribuem para a inflamação, perda neuronal e declínio comportamental devido à perda sináptica, ainda não é compreendida em sua totalidade (PEREZ; GIL; MARTINEZ, 2011; SAVAGE; GINGRICH, 2009).

Embora existam indícios destes alvos para o tratamento da doença, apenas dois grupos principais de fármacos são utilizados para o tratamento da DA: os inibidores colinesterásicos e antagonistas do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA), responsável por controlar a plasticidade sináptica e a função de memória. Dentre o grupo dos inibidores colinesterásicos destacam-se a Tacrina (Cognex®), o Donepezil (Aricept®), a Rivastigmina (Exelon®), derivado carbamato cuja estrutura química é baseada no alcalóide natural fisostigmina, e a Galantamina (Reminyl®), alcalóide isolado inicialmente da planta *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae). Para antagonismo do receptor NMDA destaca-se a

Memantina (Ebixa®), o primeiro de uma nova classe de fármacos para DA que atuam sobre o sistema glutamatérgico pelo bloqueio dos receptores NMDA, mantendo assim os potenciais de longa duração, conferindo uma melhoria duradoura na transmissão de sinais entre dois neurônios estimulados em sincronia (CAMPS; MUÑOZ-TORRERO, 2002; GIORDANI et al., 2008; LARSON, 2013; LIEW; TAN; PEH, 2014; SUMMERS, 1989)

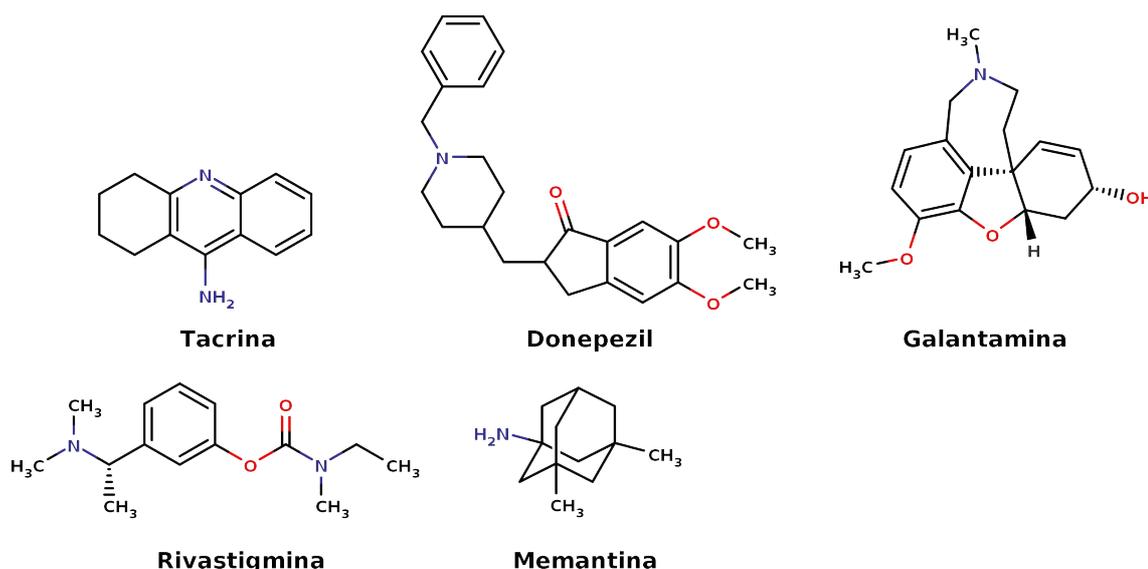


Figura 2: Fármacos utilizados em tratamentos paliativos para a Doença de Alzheimer

A evolução dos sintomas da doença está associada a modificações estruturais nas sinapses colinérgicas em determinadas regiões cerebrais e, conseqüentemente, à diminuição do potencial de neurotransmissão colinérgica. O aumento da capacidade de neurotransmissão colinérgica constitui o mecanismo fundamental dos fármacos utilizados para o tratamento da DA. Isto é possível através da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual atua nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico, sendo responsável pela interrupção da transmissão do impulso nervoso colinérgico através da hidrólise da acetilcolina (DVIR et al., 2002). Os agentes anticolinesterásicos, portanto, representam atualmente os fármacos de escolha para o tratamento da DA (GIACOBINI, 1998).

A fosforilação de proteínas em resíduos de serina, treonina e tirosina pelas cerca de 520 cinases do genoma humano constituem um dos principais mecanismos pelos quais as células se utilizam para regular seu metabolismo e demais funções (GOMPEL et al., 2004).

Dessa forma, vários esforços foram direcionados para a identificação de cinases e fosfatases que participam em alguma das vias da DA. Uma destas abordagens consistiu na identificação de enzimas capazes de modificarem a proteína Tau *in vitro*, correlacionando diversas famílias de proteínas cinases, tais como as proteínas GSK3 (Glicogênio sintase cinase 3), CDKs (Cinases dependentes de ciclina), CK1 (Caseína cinase 1) e MAPKs (Proteínas cinases ativadas por mitógenos) à progressão da DA (KURET et al., 1997; SINGH; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 1995).

O número elevado de isoformas de proteínas cinases 1 (CK1) encontradas na DA e sua associação em marcadores de lesões neurodegenerativas sugerem sua participação nas etapas finais da degeneração, comum tanto à DA quanto a outras desordens neurodegenerativas como Paralisia Supranuclear Progressiva e Esclerose Lateral Amiotrófica (SCHWAB et al., 2000). Além disso, isoformas de CK1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) foram encontradas em filamentos e em lesões granulo-vacuolares em cérebros de pacientes com DA (KURET et al., 1997; VIELHABER; VIRSHUP, 2001), destacando o importante papel da proteína CK1 nesta doença.

## 1.1 Caseínas Cinases

As Caseínas Cinases (do inglês, Casein Kinase – CK) autênticas são responsáveis pela fosforilação de caseínas recentemente produzidas (sintetizadas) *in vivo* e ocorrem especificamente nas glândulas mamárias de lactantes. Entretanto, por fatores históricos, existem dois outros tipos de caseínas cinases onde a caseína representa apenas um substrato artificial. Estas duas proteínas ocorrem em diversas regiões do organismo e fosforilam uma quantidade incontável de proteínas envolvidas nas mais variadas funções celulares (LASABENITO et al., 1996).

A existência destes dois outros tipos de CKs começou a ser identificada em meados de 1954, quando Burnett e Kennedy (BURNETT; KENNEDY, 1954) em seus estudos detectaram a habilidade de fígado homogenizado de catalisar a transferência de grupos fosforila do ATP para a caseína. Esta atividade foi depois compreendida como sendo diferente de outros tipos já conhecidos de cinases como a fosforilase cinase ou o AMP-cíclico

dependente de cinase. Além disso, o comportamento distinto durante a eluição em colunas de troca iônica, com a formação de dois picos distintos era indicativo de que poderiam ser na verdade, uma mistura de duas ou mais proteínas. De acordo com a ordem cronológica desta eluição, as proteínas foram denominadas CK1 e CK2 (PINNA, 1994; PYERIN; ACKERMANN; LORENZ, 2007).

Apesar de possuírem nomes semelhantes, estas duas cinases diferem consideravelmente em estrutura, especificidade e reações a moléculas efetoras. Devido ao fato de que nenhuma das duas cinases eram capazes de fosforilar caseínas *in vivo*, elas são, em contraste ao seu nome original, definidas como “não-caseína cinases”. Para corrigir esta classificação errônea, em 1994, em Heidelberg, Alemanha, uma reunião internacional de peritos sugeriu substituir os nomes históricos pelos termos “proteína cinase CK1” e “proteína cinase CK2”, respectivamente. Portanto, embora possuam nomes semelhantes, hoje se sabe que CK1 e CK2 são distintas entre si e nada tem a ver com a Caseína Cinase autêntica (LASABENITO et al., 1996; PYERIN; ACKERMANN; LORENZ, 2007).

## 1.2 Caseína Cinase 1 (CK1)

A natureza da estrutura que forma a enzima permaneceu elusiva por anos. De fato, muitos pesquisadores desenvolveram seus trabalhos relacionados às CKs por muitos anos sem ter nenhum conhecimento da estrutura proteica da enzima, indisponível à época. Posteriormente, em 1983, Cochet e Chambaz realizaram estudos demonstrando que CK2 era uma enzima tetramérica, compreendida por 2 subunidades catalíticas e 2 subunidades regulatórias (PYERIN; ACKERMANN; LORENZ, 2007). Em 1995, Xu e colaboradores publicaram o primeiro artigo sobre a estrutura cristalográfica de CK1, demonstrando que esta possuía estrutura monomérica, majoritariamente formada por resíduos de SER/THR. CK1 é uma proteína pleiotrópica<sup>1</sup> onipresente nas células eucarióticas e independe de mensageiros secundários clássicos como nucleotídeos cíclicos e Ca<sup>2+</sup> (XU et al., 1995). Em contraste à CK2, CK1 utiliza apenas ATP como co-substrato (PYERIN; ACKERMANN; LORENZ,

---

<sup>1</sup> – Quando a mutação em um único gene responsável por codificar uma enzima resulta em múltiplos efeitos.

2007). Além disso, apresenta forma bilobal característica de cinases derivadas de SER/THR. Possui nove  $\alpha$ -hélices e nove folhas  $\beta$ , designando as hélices por letras (A – I) e as folhas por números (1 – 9), como proposto por Xu e colaboradores (XU et al., 1995). A região amino-terminal (aminoácidos 6 a 86) é compreendida por cinco folhas  $\beta$ , uma  $\alpha$ -hélice e uma sequência de ácido 2-aminoacético (Glicina), GLY19-GLU-GLY-SER-PHE-GLY-VAL25, além de conter o domínio ligante de nucleotídeo. A região carboxi-terminal (aminoácidos 92 a 298) é composta por quatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ C,  $\alpha$ E,  $\alpha$ H e  $\alpha$ I) dispostas de forma antiparalela, além de uma quinta hélice ( $\alpha$ F) quase perpendicular às demais, formando assim a estrutura característica do lóbulo  $\alpha$  (GROSS; ANDERSON, 1998; XU et al., 1995) (Figura 3).

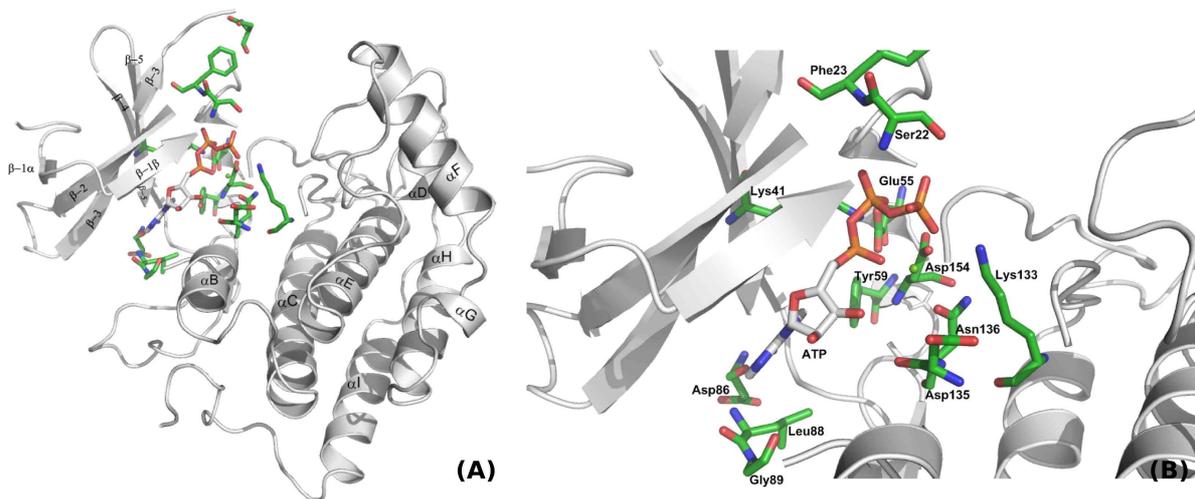


Figura 3: (A) Diagrama ribbons da estrutura tridimensional de CK1 complexada com substrato (Mg/ATP) (código PDB: 1CSN). (B) Ampliação dos resíduos que interagem com ATP. Os átomos de carbono dos aminoácidos do sítio ligante da proteína estão indicados em verde e os da sequência nucleotídica em cinza. Imagem criada utilizando os programas PyMOL (SCHRÖDINGER, LLC, 2010) ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) e Inkscape (ALBERT et al., 2014) ([www.inkscape.org](http://www.inkscape.org)).

Quanto ao sítio ligante de nucleotídeo, o ATP liga-se no espaço localizado entre as regiões de folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices (Figura 3A). Embora os anéis de adenina e ribose estejam ordenados na estrutura, os fosfatos  $\beta$  e  $\gamma$  apresentam-se mais flexíveis, o que pode estar relacionado a uma hidrólise parcial do ATP durante o processo de co-cristalização. A adenina e a ribose estão estabilizadas dentro de um bolsão hidrofóbico, formada por três leucinas (LEU87, LEU88 e LEU138), três isoleucinas (ILE18, ILE26 e ILE85), duas valinas (VAL38 e VAL153) e uma alanina (ALA39). Somando-se a estas interações hidrofóbicas, temos os átomos “N1” e “N6” da porção da adenina ligada à cadeia principal de nitrogênio do ASP86 e

da LEU88, respectivamente, onde “N7” participa em uma cascata de ligações de hidrogênio, formada por duas moléculas de água, com cadeias laterais de GLU55 e TYR59. Entretanto, estas interações diferem daquelas observadas em PKAc (proteína cinase dependente de AMP cíclico), onde “N7” entra em contato diretamente com THR183, evidenciando que os inibidores competitivos com substratos de nucleotídeos, tais como CK1, são tão específicos (BOSSEMEYER, 1995; XU et al., 1995) (Figura 4).

Os sítios reconhecidos pela CK1 foram caracterizados pela presença de aminoácidos acídicos N-terminal à SER ou THR modificada; um grupo de quatro resíduos de ASP espaçados por dois resíduos do sítio fosforilado é o mais efetivo. Alternativamente, em vez de resíduos acídicos, os sítios reconhecidos podem conter fosfo-SER ou fosfo-THR, chegando ao motivo característico “-S(P)/T(P)-X-X-S/T” (PYERIN; ACKERMANN; LORENZ, 2007; VIELHABER; VIRSHUP, 2001). Devido ao fato deste motivo ser criado por uma fosforilação anterior, CK1 também pode atuar como uma proteína cinase secundária.

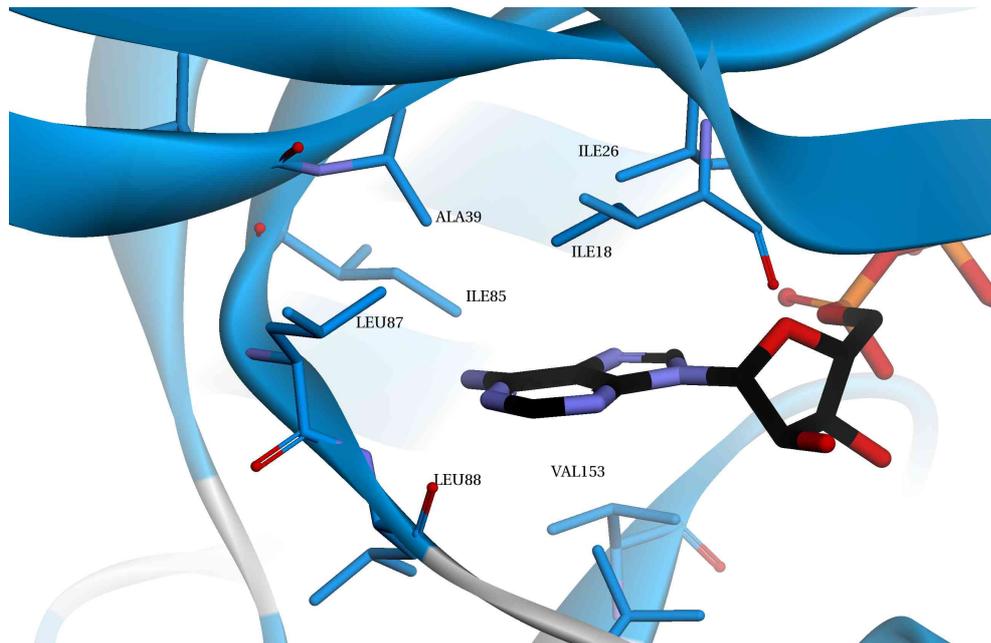


Figura 4: Bolsão hidrofóbico do sítio ativo de CK1. Átomos de carbono em azul da proteína correspondem aos aminoácidos hidrofóbicos (Código PDB: 3UZP). Figura criada usando os programas Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/>) e Inkscape.

A caseína cinase 1 (CK1), pertence a uma grande família de proteínas monoméricas de SER/THR, elas transferem um grupo fosfato de um ATP doador para um acceptor de hidrogênio em um substrato proteico (CHEONG; VIRSHUP, 2011). Até agora,

foram caracterizadas sete isoformas diferentes de CK1 em mamíferos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ), decorrentes do processo de “splicing” alternativo, responsável por gerar variantes de seus genes codificantes resultando nas isoformas mencionadas (VENERANDO, 2010) sendo que duas destas, CK1 $\delta$  e CK1 $\epsilon$  são expressas no cérebro. Em cérebros de pacientes com DA os níveis de CK1 são trinta vezes maiores se comparado a um indivíduo normal (SAVAGE; GINGRICH, 2009). Cada isoforma é formada por um domínio catalítico, o qual apresenta alta homologia entre as proteínas cinases e uma sequência única, cuja função é regular a atividade catalítica e modular a distribuição subcelular.

A descoberta de diversas isoformas foi obtida utilizando-se técnicas como uso de clones cDNA para CK1, métodos imuno-histoquímicos, uso de anticorpos monoclonais anti-CK permitindo que fossem isolados e sequenciados, revelando múltiplas isoformas. Sendo assim, a atividade de CK1 em tecidos pode ser composta de múltiplas proteínas cinases relacionadas, porém distintas. Todas elas consistem em um domínio catalítico N-terminal altamente conservado e uma região C-terminal que é variável em comprimento e pouco conservada entre membros desta família (PYERIN; ACKERMANN; LORENZ, 2007; VIELHABER; VIRSHUP, 2001).

Embora as isoformas de CK1 se encontrem distribuídas em diversas regiões do organismo e também em diversas partes da célula, incluindo núcleo, citoplasma, citoesqueleto, vesículas e membrana plasmática (VIELHABER; VIRSHUP, 2001) é importante destacar que a sua localização subcelular e consequente compartimentalização desempenham um importante papel na regulação das interações cinase-substrato. A localização da cinase e a proximidade ao seu substrato demonstrou ser crucial para a regulação (KNIPPSCHILD et al., 2005).

Apesar de já ser estabelecido que as isoformas de CK1 são estreitamente relacionadas entre si em toda sua extensão mais do que a qualquer outra proteína cinase conhecida, até mesmo quando as comparações são restritas para os domínios cinase da proteína. Entretanto, em algumas situações as isoformas apresentam pequenas distinções. Por exemplo, a CK1 $\alpha$  possui menos de 24% de identidade sequencial com outras proteínas cinases, como a CK2 ou o AMP dependente de proteína cinase (AMPK). Já as sequências dentro da família CK1 compartilham entre 48 a 94% de identidade sequencial (PYERIN;

ACKERMANN; LORENZ, 2007). Essas informações são importantes porque evidenciam que as chances de ocorrerem interações com outras proteínas pelos inibidores selecionados por CK1 seja reduzida devido a esta característica ímpar aos demais membros da família das Cinasas. Existem evidências de que CK1 possua também a característica de dupla especificidade, isto é, pode fosforilar grupos de SER/THR mas também pode fosforilar TYR, em menor grau e também em condições específicas (PYERIN; ACKERMANN; LORENZ, 2007).

## 1.5 Caseína cinase 1 em DA

CK1 desempenha um importante papel na hiperfosforilação da proteína Tau, cuja inibição contribui para diminuir a formação dos emaranhados neurofibrilares, característicos da DA, diminuindo também a formação das placas senis, consequência da redução dos monômeros do peptídeo  $\beta$ -amilóide (HANKS; HUNTER, 1995; LONGENECKER; ROACH; HURLEY, 1996). De acordo com Singh e colaboradores, (SINGH et al., 1995) várias cinases, incluindo as isoformas CK1 $\delta$  e CK1 $\epsilon$ , demonstraram fosforilar Tau contribuindo para a dissociação dos microtúbulos (KANNANAYAKAL et al., 2004; KURET et al., 1997). Cerca de 26 % dos aminoácidos da Tau são fosforilados pela CK1 (MASHHOON et al., 2000a; STOTER et al., 2005). Tanto os níveis de RNAm de CK1 $\delta$  quanto da própria proteína encontram-se aumentados em até 30 vezes em cérebros de pacientes com DA (YASOJIMA et al., 2000). Além disso, os peptídeos  $\beta$ -amilóide ativam a CK1, acionando o mecanismo de hiperfosforilação da Tau, e consequentemente, aumentando os níveis de  $\beta$ -amilóide. Existem evidências de que a isoforma CK1 $\delta$  tem importância no processamento da proteína precursora de amilóide (PPA) ao regular a atividade da enzima  $\gamma$ -secretase, responsável pela formação dos peptídeos tóxicos de  $\beta$ -amilóide (Figura 5). CK1 é uma proteína cinase do tipo “prime” para GSK3 $\beta$  (também envolvida em eventos de fosforilação relacionados à DA), isto é, para que GSK3 $\beta$  seja ativa, esta deve ser fosforilada primeiramente por CK1.

A abordagem da proteína CK1 como alvo terapêutico para a DA frente as demais cinases é promissora uma vez que os compostos usuais utilizados para diminuir a produção de  $\beta$ -amilóide também bloqueiam a quebra de outras proteínas, causando graves efeitos

colaterais, como disfunções no trato gastrointestinal, baço e timo, causados principalmente pela quebra da enzima Notch, proteína transmembrana que atua como substrato da  $\gamma$ -secretase. As enzimas-chave envolvidas na produção de  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase) (Figura 5) são também alvos de CK1, e seu bloqueio diminui a produção de  $\beta$ -amilóide sem interferir nos demais processos enzimáticos. Durante ensaios experimentais, foi verificado que inibidores reportados para CK1, como IC261 e CKI-7 (Figura 7) não atuam na quebra desta enzima (FLAJOLET et al., 2007; SINGH; GRUNDKEIQBAL; IQBAL, 1995).

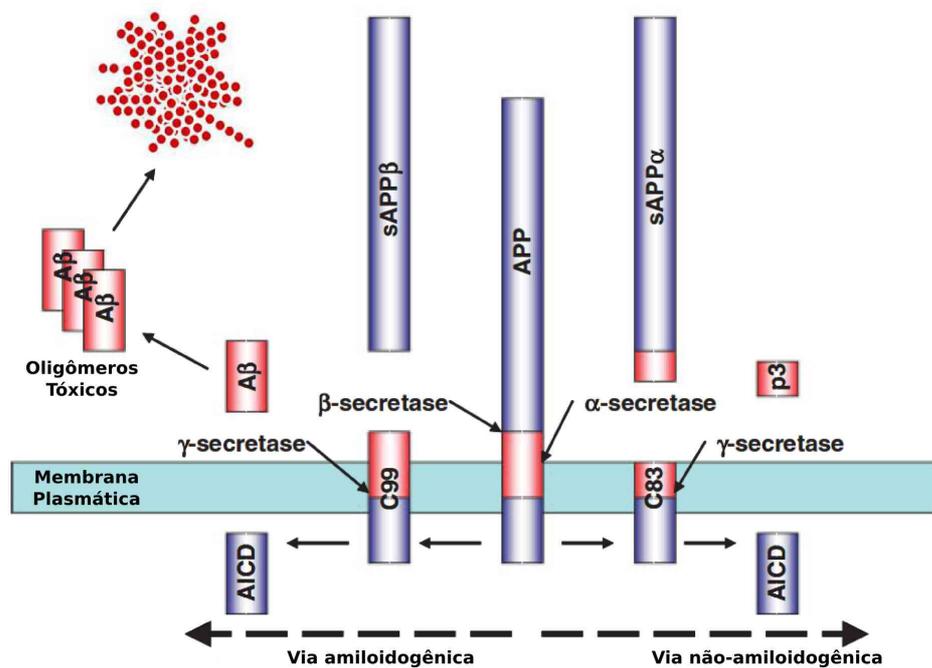


Figura 5: O pós processamento da PPA pode ocorrer por duas vias distintas: a via amiloidogênica, na qual  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase atuam em conjunto formando duas espécies secretadas, os fragmentos N-terminais sAPP $\beta$  e o peptídeo neurotóxico  $\beta$ -amilóide. Já na via não-amiloidogênica, a ação da enzima  $\alpha$ -secretase atuando no resíduo 16 da PPA impede a formação de  $\beta$ -amilóide, formando então, os fragmentos N-terminais sAPP $\alpha$  e p3. Adaptado com permissão de ©Wiley-Liss, Inc., sob a licença creative commons <<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>>:(SAVAGE; GINGRICH, 2009). Copyright © 2009.

Além da DA, desordens na atividade das cinases vêm sendo atribuídas a uma série de doenças, desde doenças vasculares e inflamatórias até câncer e outras doenças neuronais (FLAJOLET et al., 2007). O grande número de publicações sobre novos alvos terapêuticos para doenças do sistema nervoso central nos últimos anos ilustra a importância desta nova

abordagem no estudo de novos alvos terapêuticos (CHICO; VAN ELDIK; WATTERSON, 2009) (Figura 6).

### Publicações relacionadas à Proteínas Cinases (1990 – 2010)



Figura 6. Avanços na descoberta de novos alvos terapêuticos, destacando o grande número de publicações de cinases como alvos para doenças do sistema nervoso central (barra em cor de laranja). Adaptado com a permissão de ©Macmillan Publishers Ltd: (CHICO; VAN ELDIK; WATTERSON, 2009). Copyright © 2009.

## 1.7 Potencial de inibidores para CK1

Alguns inibidores específicos para CK1 já foram descritos, dentre eles destacam-se CK1-7 e IC261. CK1-7 (*N*-(2-aminoetil)-5-cloroisoquinolina-8-sulfonamida) foi o primeiro inibidor competitivo descrito para CK1 numa faixa micromolar, porém não apresenta nenhuma especificidade para isoformas de CK1 (CHICO; VAN ELDIK; WATTERSON, 2009). Além disso, a sua capacidade de penetração através das membranas celulares é fraca, devido à sua carga em condições fisiológicas. Em contrapartida, IC261 (3-[2,4,6-(trimetoxifenil)-metilidenil]-indolin-2-ona), apresenta seletividade para as isoformas de mamíferos CK1 $\delta$  e CK1 $\epsilon$  na faixa micromolar, e como não possui carga em condições



compostos sintetizados ou provenientes de produtos naturais, proporcionando uma busca mais extensiva em seu espectro de atividade (ENGEL, 2005; MARSHALL, 2004). Além de otimizar a descoberta de substâncias ativas, esta abordagem ainda proporciona a diminuição dos custos em pesquisas, resultado da racionalização de procedimentos experimentais tais como redução no uso de solventes orgânicos, drogas e reagentes, empregados no isolamento, síntese, purificação de substâncias e realização de bioensaios. Trata-se, portanto, da total integração entre métodos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* no âmbito da moderna química medicinal. Sendo assim, dentro da abordagem *in silico*, o uso de técnicas de modelagem bem como o uso de descritores calculados para estruturas químicas, possibilita previsões do espectro de atividade para a estrutura química pesquisada, proporcionando investigar as afinidades que determinado ligante teria frente a um alvo biológico específico, utilizando-se de ferramentas de análise de modos de ligação e interações no sítio receptor (LARSSON; BACKLUND; BOHLIN, 2008).

## **1.8 Bioinformática aplicada ao planejamento de fármacos**

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos fármacos tornou-se cada vez mais difícil, dispendioso e demorado. Estima-se que mais de 800 milhões de dólares e uma média de 14,2 anos são necessários para aprovação de um novo fármaco. Devido à complexidade do processo como um todo, estes custos aumentam rapidamente com o tempo, e em contrapartida a produção de fármacos recém-lançados diminui (GU et al., 2013; NEWMAN; CRAGG, 2012). Sendo assim, cada vez mais as ferramentas de bioinformática vêm sendo utilizadas como auxílio na redução de custos e tempo para as pesquisas. Dentre estas técnicas se destaca a triagem virtual, que reúne um conjunto de técnicas utilizadas de forma sequencial com o objetivo de selecionar compostos protótipos para os alvos desejados. Estes métodos compreendem a triagem virtual baseada em ligantes e a triagem virtual baseada em estrutura.

### **1.8.1 Triagem virtual baseada em ligantes**

As estratégias de triagem baseadas em ligantes, utilizam moléculas orgânicas com atividade biológica conhecida para o alvo pretendido, funcionando como moldes para a triagem em bases de dados na busca por novas entidades químicas que possuam algum nível de similaridade com estas moléculas. Dessa forma, compostos são selecionados de acordo com os mais variados métodos de similaridade molecular, direcionados por relações entre propriedades estruturais e atividade biológica (BUTLER, 2004; HU; LILL, 2013; MADHAVI SASTRY et al., 2013; YULIANA et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

A partir da conformação bioativa de uma molécula orgânica, seja proveniente de métodos estruturais (raios-X ou RMN) ou computacionais (modelagem molecular), a triagem virtual baseada em ligantes pode classificar novos compostos por meio de buscas por similaridade estrutural ou por correspondência com padrões farmacofóricos. O processo como um todo, envolve uma grande variedade de fases computacionais, que pode incluir desde a criação de um banco de dados de compostos químicos (bases de dados) até a criação de uma biblioteca virtual, de forma a elencar aqueles compostos que seriam mais promissores para serem testados. Os métodos computacionais ou teóricos podem ser empregados para prever prováveis afinidades de ligação entre pequenas moléculas e receptores biológicos de interesse farmacêutico. A busca por similaridade estrutural pode ser realizada a partir de informações bidimensionais, como a busca por similaridade 2D ou esta pode ser baseada na busca a partir de fatores estereo-eletrônicos em comum a partir de um conjunto de moléculas com atividade conhecida para um mesmo alvo, como a busca a partir de um modelo farmacofórico (KRÜGER; EVERS, 2010).

#### **1.8.1.1 Busca por similaridade 2D**

A busca por similaridade é uma ferramenta útil para a triagem virtual baseada em ligantes e pode ser executada a partir de um grupo de moléculas com atividade conhecida (HORVATH, 1997). Este tipo de técnica tem como base o princípio de que moléculas estruturalmente semelhantes tendem a possuir propriedades similares (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008). A semelhança entre estas estruturas químicas é baseada na

comparação de pontos-chave (do inglês, “key features”) os quais, em sua maioria, são derivados da estrutura molecular e são traduzidos em descritores, tornando-se um conjunto de números e vetores. Em alguns casos, os descritores podem ser derivados de propriedades experimentais, como  $IC_{50}$  (KOEPPEN et al., 2011). Apesar de utilizar-se de descritores bidimensionais, este método tem sua importância devido à sua praticidade e baixo poder de processamento, desejáveis à triagem virtual. Dentre as diferentes técnicas de similaridade discutidas na literatura (WILLET; BARNARD; DOWNS, 1998), o Índice de Tanimoto é o mais empregado, utilizando-se de uma representação 2D do fragmento por meio de um conjunto de valores binários, denominado bits (do inglês, “bit-string”). Este tipo de abordagem pode ser otimizado com o uso de um grupo de estruturas de referência, como proposto por Hert e colaboradores denominado “group fusion” (HERT et al., 2006).

### **1.8.1.2 Modelo farmacofórico**

Um modelo farmacofórico reúne um conjunto de características eletrostáticas e de complementaridade estérica que são necessárias para uma interação favorável entre um ligante e seu alvo, seja ele uma enzima ou receptor que tenha por finalidade ativar ou inibir o alvo proteico (KRÜGER; EVERS, 2010; MUEGGE; OLOFF, 2006; RODRIGUES et al., 2012; SHOICHET, 2004). Ele deve ser capaz de representar as características químicas do grupo de moléculas analisado por meio de um arranjo tridimensional destas características, tais como grupos hidrofóbicos, aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, anéis aromáticos, grupos ionizáveis e até mesmo, derivados metálicos. Estas características podem ser responsáveis por bloquear ou estimular o alvo em questão (VUORINEN; ODERMATT; SCHUSTER, 2013; WERMUTH et al., 1998).

### **1.8.2 Triagem virtual baseada em estrutura**

As técnicas baseadas na estrutura utilizam-se das informações tridimensionais do alvo terapêutico, utilizando em grande parte, os cálculos de “docking” para a seleção de potenciais ligantes que apresentem características químicas, eletrônicas e estruturais que

favoreçam a realização de interações com o sítio ativo da proteína. Estas informações podem ser obtidas a partir de dados experimentais (raios-X ou ressonância magnética nuclear) ou computacionais (modelagem por homologia), depositados no PDB. Ao selecionar o complexo do PDB referente a proteína a ser utilizada, uma inspeção cuidadosa das propriedades físico-químicas do sítio é recomendada. O tamanho e a forma do sítio devem ser adequados para o encaixe, e ele deve consistir de grupos químicos capazes de interagir fortemente com o ligante (geralmente grupos carregados, aceptores e doadores de ligação de hidrogênio). Se ligantes já são conhecidos para este alvo, uma comparação entre as poses e suas afinidades obtidas por dados experimentais, por exemplo  $IC_{50}$ , é altamente recomendável. Para alvos em que o sítio ativo é desconhecido, proteínas homólogas podem ser utilizadas a fim de prever o sítio ativo, seja por modelagem por homologia ou utilizando ferramentas de alinhamento e sequenciamento estrutural de proteínas ou ainda, ferramentas como AnnoLyze (MARTIRENOM et al., 2007), que faz uma análise aprofundada das interações e comportamentos das proteínas homólogas anotando estas informações (BIELSKA et al., 2011; KIRCHMAIR et al., 2008).

### **1.8.2.1 Docking**

Os cálculos de “docking” resultam em um modelo teórico de predição de poses dos ligantes calculados em relação ao sítio ativo da proteína. Para chegar a uma solução final, os programas de “docking” utilizam-se de diversas técnicas que possuem em comum a presença de uma função de escore e um algoritmo de busca. A este último, é atribuída a tarefa de gerar diversas poses para o ligante avaliado e a função de escore tem como finalidade filtrar as melhores soluções, descartando situações impossíveis para o cálculo desejado. Geralmente, utiliza-se um algoritmo de busca pouco refinado, isto é, que recupere o maior número de poses, sem se preocupar com a viabilidade destes conformeros, enquanto que a função de escore é mais sofisticada, com o objetivo de descartar as situações que forem impossíveis, classificando os melhores resultados por meio de um valor de escore (DROR et al., 2009; ZHAO et al., 2010). O valor de escore está sujeito a resultados falsos positivos e falsos negativos. Sendo assim, a correta predição da pose de determinado ligante tem se tornado uma tarefa desafiadora. Para isso, além do usual valor de escore, são adotados métodos complementares, como a inspeção visual no sítio ativo, separando estas soluções por

famílias de poses e, se possível, utilizar-se de mais de um complexo cristalográfico a fim de obter mais informações sobre a estrutura da proteína (ARMSTRONG, [s.d.]; BREDA et al., 2008; LYNE, 2002).

A performance de um programa de “docking” é geralmente medida por sua habilidade em reproduzir os modos de ligação de uma estrutura química (ligante) proveniente de um grupo de testes (“test set”) de complexos proteína-ligante, os quais muitas vezes são obtidos a partir de bancos de dados de proteínas. Estes bancos de dados armazenam estas informações na forma de complexos cristalográficos que contém informações das coordenadas espaciais da proteína e do ligante, dentre outras informações. Nos protocolos de validação da docagem proteína-ligante a medida de desempenho é realizada contra conformações nativas da proteína, isto é, o ligante é docado na pose correspondente da proteína (complexo cristalográfico) de onde o mesmo fora retirado. A pose na qual este complexo se encontra é entendido como um estado ótimo de interação proteína-ligante, onde ocorrem pequenas acomodações conformacionais entre a proteína e o ligante. Dessa forma, um cálculo de “docking” do ligante com esta mesma pose da proteína enfatizaria uma situação muito ideal, fato este pouco provável de ocorrer nos procedimentos do dia a dia (HUANG; ZOU, 2010; KORB et al., 2012; KRÜGER; EVERS, 2010).

Nos processos usuais de triagem virtual, os ligantes são docados contra conformações não-nativas da proteína<sup>2</sup>, isto é, a forma Apo da proteína ou outro complexo cristalográfico desta mesma proteína (MASHHOON et al., 2000b). Dependendo do programa de “docking” utilizado, a fim de obter-se um custo computacional reduzido, a proteína é tratada como rígida, salvo a especificação de alguns resíduos de aminoácidos escolhidos manualmente para a livre rotação (VERDONK et al., 2008).

Dependendo da característica de flexibilidade da proteína o rearranjo de algumas cadeias laterais no sítio ativo pode ser suficiente para simular a flexibilidade da proteína, isto é, durante o cálculo de “docking” deve-se deixar livre a rotação na cadeia lateral de determinados aminoácidos ou especificar ângulos de rotação adequados para o aminoácido em questão (LYNE, 2002). Entretanto, em alguns casos a flexibilidade da proteína chega a ponto de produzir modificações em seu esqueleto (“protein backbone”). Neste caso, é

---

2 A conformação nativa de uma proteína representa o estado de menor energia livre do sistema. A energia que estabiliza a estrutura 3D de uma proteína vem do aumento da entropia do solvente em questão.

necessário considerar a flexibilidade entre o receptor e o ligante (LEACH, 1994). Dessa forma, o uso de múltiplas conformações da mesma proteína para os cálculos de “docking” enriquece a predição da pose, principalmente nos cálculos de triagem virtual, onde possibilita explorar melhor o espaço conformacional (VERDONK et al., 2008).

Na triagem virtual baseada em estrutura, a técnica onde utiliza-se mais de uma conformação da proteína durante um processo de triagem virtual é conhecida como “docking” sequencial (do inglês, “ensemble docking”), onde diferente de um cálculo de “docking” de um único complexo, ao utilizar-se de mais de uma conformação da proteína, é reaproveitado parte deste cálculo, principalmente no que diz respeito ao algoritmo de busca, responsável por trazer diferentes conformações para as moléculas contidas na base de dados. Dessa forma, toda a parte relacionada às conformações dos ligantes é reaproveitada, tornando o processo de “docking” sequencial mais rápido do que se fosse realizado separadamente para cada conformação da proteína. Assim, evita-se que moléculas com potencial de encaixe no sítio sejam perdidas durante as etapas iniciais, pois esta será sequencialmente analisada em outros complexos da proteína, de forma que se existisse algum potencial de interação este seria devidamente explorado, de acordo com o espaço conformacional utilizado (KORB et al., 2012; REDDY et al., 2007).

Uma das grandes preocupações em protocolos de triagem virtual é a perda de compostos com potencial de atividade para o alvo desejado (“lead compounds”). Sendo assim, esta questão deve ser levada em conta durante a elaboração de um protocolo de triagem virtual. Para que os resultados de um “docking” sequencial sejam significativos deve-se evitar utilizar-se de complexos cristalográficos muito semelhantes. O ideal é que os complexos apresentem equilíbrio em sua diversidade, isto é, selecionar o mesmo número de complexos para cada característica de flexibilidade que se quer simular da proteína. Dessa forma, os cálculos de “docking” serão mais precisos ao se utilizarem de um volume de informações na mesma proporção (KORB et al., 2012), garantindo que ao final do processo de triagem virtual seja possível reunir um grupo de moléculas com potencial de interação para o alvo desejado.

Para o desenvolvimento de um novo protótipo também já é possível estimar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, bem como propriedades “drug-like” ou “lead-like” de diferentes compostos durante as etapas de modelagem, antes mesmo de

otimizações por síntese ou testes *in vivo* (LAGORCE et al., 2011). Assim, propriedades tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/Tox) podem ser preditas a partir da triagem em bancos de dados contendo essas informações, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos. Entre os softwares mais utilizados para esses fins, destacam-se o ADME/Tox Predictor (LEESON, 2012), QikProp (predições de ADME) (SCHRÖDINGER, 2013; XIA et al., 2013), Meteor (SCHRÖDINGER® DRUG DISCOVERY SUITE, 2013) (predições de metabolismo) e DEREK (predições de toxicidade) (T'JOLLYN et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

Para esse projeto teórico-experimental, inicialmente serão utilizadas diferentes técnicas de modelagem molecular e planejamento racional baseado em estrutura e ligantes, além de estratégias de modificação molecular de Química Medicinal, tendo como base os inibidores de CK1 $\delta$  descritos na literatura, além daqueles que possuem estruturas depositadas no PDB. O objetivo é planejar e testar potenciais inibidores desse alvo terapêutico, na tentativa de obter novos protótipos e posteriormente otimizar suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos futuros candidatos a fármacos em doença de Alzheimer. Em seguida os compostos selecionados através e diferentes técnicas de modelagem molecular serão adquiridos comercialmente e submetidos a ensaios de atividade com enzima CK1. Esses resultados poderão ser utilizados para posteriores estudos de QSAR.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Busca por inibidores de CK1 em banco de dados**

Um levantamento dos inibidores reportados para CK1 foi realizado utilizando o banco de dados do BindingDB (GREENE et al., 1999) além de artigos da literatura, de forma a classificá-los por informações de atividade, tais como  $IC_{50}$ .

### **3.2 Busca por complexos cristalográficos de CK1 em banco de dados**

A busca por complexos cristalográficos da proteína CK1 foi realizada no banco de dados de proteínas PDB (do inglês, “Protein Data Bank”) (LIU et al., 2007) inicialmente selecionando os arquivos no formato “.pdb”, relativo aos complexos 2CMW, 2C47, 2IZR, 2CHL, 2IZS, 2IZT, 2IZU, 1CKJ, 1CKI, 1CSN, 1EH4, 2CSN, 3UZP e 4HNF. E posteriormente, foram utilizados para a triagem virtual baseada em estrutura, os complexos de código PDB 1CSN, 3UZP e 4HGT, os quais possuíam informações importantes com relação aos modos de ligação, como a presença de inibidor explorando o bolsão seletivo de ligação 1 (PDB: 3UZP), abertura e fechamento da alça (complexos de código 1CSN e 3UZP, respectivamente) e presença de inibidor mais volumoso explorando o bolsão de ligação 1 (PDB: 4HNF).

### **3.3 Preparo dos complexos cristalográficos**

Os arquivos “.pdb” correspondentes aos complexos cristalográficos da proteína CK1 foram preparados com auxílio dos programas PyMOL, Discovery Studio Visualizer e a suíte de Docking do GOLD.

### 3.4 Modelo Farmacofórico

Um grupo de inibidores de CK1 $\delta$ , provenientes dos bancos de dados BindingDB e PDB foi utilizado para a construção do modelo farmacofórico. Foi utilizado o protocolo “Common Feature Pharmacophore Generation” do programa Discovery Studio (RODRIGUES; SILVA, 2013). Para a validação do modelo farmacofórico, a solução farmacofórica final foi testada com um grupo de compostos ativos distinto daqueles utilizados inicialmente para o cálculo do modelo farmacofórico a fim de verificar a capacidade do modelo em prever outro grupo de ativos.

### 3.5 Base de dados utilizada na triagem virtual

As bases de dados selecionadas para o processo de triagem virtual foram aquelas provenientes de banco de dados com ênfase em atividade no sistema nervoso central (subcoleções CNS da ZINC e ChemBridge), inibidores de cinases (KinaSet e KinaCore, da ChemBridge) e subcoleções de screening (MayBridge e Diverset). Sendo assim, as seguintes bases de dados foram utilizadas para a triagem virtual:

Tabela 1: Bases de dados utilizadas na triagem virtual

Base de dados	Número de estruturas químicas
MayBridge	58,271
ZINC, subcoleção CNS	377,655
ChemBridge, subcoleção CNS	63,005
ChemBridge, subcoleção Diverset	50,000
ChemBridge, subcoleção KINASet	11,000
ChemBridge, subcoleção KINACore	8,209

### 3.6 Triagem virtual baseada em ligantes

O modelo farmacofórico selecionado na etapa anterior foi usado como padrão farmacofórico para a triagem virtual, selecionando o módulo “Screen Library” do programa Discovery Studio com variação no parâmetro designado à geração de populações de confôrmeros (padrões “FAST” e “BEST”) com limite de até 255 conformações para cada estrutura química.

#### 3.6.1 Geração de confôrmeros

Na etapa subsequente, foi utilizado o programa OMEGA (KIRCHMAIR et al., 2008) para geração de confôrmeros especificando o valor de 9kcal/mol para o limiar de energia (do inglês, “energy threshold”) até um limite de 100 confôrmeros para cada estrutura química.

#### 3.6.2 Busca por similaridade 2D

A busca por similaridade 2D foi calculada empregando-se a ferramenta de triagem virtual do servidor BindingDB (HAWKINS et al., 2010). Foi utilizada base de dados contendo 1000 estruturas químicas, provenientes da etapa final do processo de triagem virtual baseada em ligantes, Figura 11).

#### 3.6.3 Cálculos de Docking

Na etapa de triagem virtual baseada em ligantes, os cálculos de “docking” foram realizados com o programa GOLD 5.1 (ABDO et al., 2010) para CK1 $\delta$ , com o intuito de propor modos de ligação para os compostos que foram selecionados nesta etapa para os ensaios *in vitro*. A estrutura tridimensional da proteína foi obtida através do PDB (código:

3UZP), a qual foi utilizada sem a presença de qualquer ligante.

A base metodológica deste programa é a execução de cálculos de “docking” flexível utilizando um algoritmo genético. Dentre os parâmetros disponíveis no programa, foi utilizada uma população equivalente a 100 indivíduos, 100.000 operações, 95 mutações e 95 “crossovers”. Os cálculos foram realizados dentro de uma esfera de raio de 10 Å, tendo como centro as coordenadas cartesianas referentes ao átomo de carbono  $sp_2$  central do inibidor da isoforma CK1 $\delta$  (código PDB: 3UZP). As 10 orientações de maior escore para cada estrutura química, em relação ao domínio CK1, foram selecionadas através da função de escore CHEMPLP. Com base nesta função, são classificadas as orientações das moléculas avaliadas de acordo com um padrão de afinidade (escore), do ponto de vista energético, em relação ao sítio ligante da proteína.

### **3.7 Triagem Virtual Baseada em Estrutura**

Para a etapa de triagem virtual baseada em estrutura foi utilizada a técnica de “docking” sequencial utilizando-se os complexos cristalográficos de código PDB: 1CSN, 3UZP e 4HGT.

A esfera de raio de 10 Å foi mantida, tendo como centro as coordenadas cartesianas referentes ao átomo de carbono  $sp_2$  central do inibidor da isoforma CK1 $\delta$ , no complexo cristalográfico de código PDB 3UZP. As poses de maior escore para cada estrutura química, em relação ao domínio CK1, foram selecionadas através da função de escore CHEMPLP, específica para triagem virtual (VERDONK et al., 2005; ZHONG; ZHANG; XIU, 2010). Inicialmente, a eficiência foi ajustada para 30% (padrão de triagem virtual) com 3 poses para cada estrutura química contida na base de dados. Em seguida, foi realizada a seleção das 50 estruturas químicas melhor classificadas de cada base: para cada base de dados foi criada uma outra, subsequente. Em seguida foi realizado o reescore, utilizando eficiência de 100%, com 10 poses para cada estrutura química. Por meio de inspeção visual, estas 10 poses de cada estrutura química foram analisadas no sítio ativo e separadas por famílias de poses, quando necessário. Em seguida foi selecionada a pose de maior escore proveniente da

família com maior número de poses, selecionando 1 pose para cada estrutura química desta nova base de dados. Sendo assim, ao final do processo de triagem virtual baseada em estrutura, para cada base de dados utilizada foi criada uma menor, contendo 50 estruturas.

### 3.7.1 Redocking

A fim de avaliar a capacidade de predição correta das poses pelo programa de “docking”, foi realizado o “redocking” de um ligante cristalográfico cuja orientação e conformação já são conhecidas comparando a pose obtida do cálculo de “docking” com esta conformação cristalográfica e medindo assim o RMSD (desvio médio quadrático). O “redocking” foi realizado com os inibidores dos complexos 1CSN, 3UZP e 4HGT, cujos valores de RMSD ficaram abaixo de 0,6.

### 3.7.2 Análise dos campos de interação molecular

É uma metodologia para o planejamento racional de fármacos que consiste em investigar as condições energéticas entre moléculas próximas umas das outras, gerando campos de interação molecular (do inglês, “Molecular Interaction Field” - MIF). Esses campos descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula-alvo e um grupo de prova que se move confinado ao interior de uma “caixa” de energia (um grid 3D), o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo biológico (o sítio receptor) (KORB et al., 2012). Os campos de interação molecular foram calculados com o programa GRID 22C (CRUCIANI, 2005) para a proteína do complexo cristalográfico de código PDB 3UZP. Para os cálculos, foram utilizados os seguintes grupos de prova: oxigênio de carbonila (energia =  $-8,04 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), carbono aromático (energia =  $-3,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), hidroxila (energia =  $-7,18 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) e nitrogênio de amida (energia =  $-10,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).

### 3.7.3 Predições de atividade e toxicidade

Para a predição das propriedades farmacocinéticas e atividade biológica das estruturas químicas selecionadas, foram utilizados, respectivamente os programas QikProp (SCHRÖDINGER, 2013) e PASS (“Prediction of Activity Spectra of Substances”) (FILIMONOV et al., 2014).

QikProp é um preditor de propriedades ADME. Além de prever propriedades moleculares, QikProp fornece faixas para comparar as propriedades de uma molécula em particular com as propriedades calculadas de 95% dos fármacos conhecidos. Além disso, também sinaliza mais de 30 tipos de grupos funcionais reativos que podem causar falsos positivos em ensaios high-throughput screening (HTS).

PASS utiliza-se de descritores do tipo MNA (do inglês, “Multilevel Neighborhoods of Atoms”), sugerindo que a atividade biológica é uma função da estrutura química. Seu algoritmo é capaz de estimar a atividade biológica comparando a estrutura de uma nova entidade química (NCE) com um conjunto de treinamento (“training set”) de aproximadamente 46.000 compostos com atividade conhecida.

Já para as predições de toxicidade foi utilizado o programa DEREK, o qual é baseado em tomadas de decisões, do tipo “knowledge-based expert system” (SCIABOLA et al., 2010) para situações específicas de toxicidade, incluindo genotoxicidade, inibição do canal HERG, Irritação, sensibilização do trato respiratório, sensibilidade da pele, toxicidade da tireoide, dentre outras.

### 3.7.4 Ensaios de inibição enzimática com a proteína humana CK1δ

Os compostos selecionados nas etapas de triagem virtual (baseada em ligantes e em estrutura) foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição da CK1. Os ensaios compreenderam o uso de 10µL do composto a ser ensaiado. 10µL (16 ng) da enzima CK1δ foi adicionada a cada poço seguido de 20µL de solução tampão, contendo 0,1% de caseína como

substrato e 4 $\mu$ M de ATP. A solução tampão do ensaio continha 50 mM HEPES, pH 7,5; 0,01% Brij-35; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA e 0,01 % NaN<sub>3</sub>. A concentração final de DMSO no experimento respeitou o limite de 1%. Após 60 minutos de incubação a 30 ° C o processo foi interrompido com a adição de 40  $\mu$ L do reagente “Kinase-Glo®”.

A luminescência foi medida após 10 minutos usando um leitor multimodo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemanha). A atividade é proporcional à diferença entre o ATP total e o consumido. As atividades de inibição foram calculadas com base na atividade máxima medida na ausência de inibidor. IC<sub>50</sub> é definida como a concentração de cada composto que reduz em 50% a atividade enzimática em relação àquela obtida sem inibidor.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Triagem virtual

Utilizando-se das técnicas de triagem virtual foi possível, a partir de um universo de mais de 500 mil moléculas, selecionar um número reduzido de estruturas químicas que foram adquiridas e submetidas aos ensaios biológicos a fim de comprovar sua atividade inibitória frente a CK1. Técnicas como triagem biológica automatizada (do inglês, “High-Throughput Screening” - HTS) têm aumentado consideravelmente o número de compostos avaliados quanto à sua atividade biológica e o uso de informações estruturais obtidas por triagem virtual reduz bastante esse número, tornando o processo mais dinâmico e otimizado, uma vez que prioriza as moléculas mais interessantes dentre as milhares disponíveis nas bases de dados utilizadas. Assim, a otimização de moléculas em espaços químicos que sejam acessíveis sinteticamente e que, concomitantemente, estejam de acordo com os padrões farmacofóricos exigidos para o espaço químico de fármacos e substâncias bioativas em Química Medicinal é relevante ao desenvolvimento deste tipo de pesquisa (BENFENATI; GINI, 1997).

Um dos primeiros critérios foi a seleção das bases de dados empregadas no processo de triagem virtual de forma a delimitar o espaço químico, direcionando-o à atividade que foi investigada. Assim, as bases de dados selecionadas foram aquelas pertencentes a grupos de atividade do Sistema Nervoso Central, de Cinasas e também em menor proporção, bases otimizadas para triagem virtual, como as subcoleções da MayBridge e Diverset, da Chembridge de acordo com a relação a seguir:

- MayBridge (58.271 compostos);
- ZINC, subcoleção CNS (377.655 compostos);
- ChemBridge, subcoleção CNS(63.005 compostos);
- ChemBridge, subcoleção Diverset (50.000 compostos);
- ChemBridge, subcoleção KINASet (11.000 compostos);
- ChemBridge, subcoleção KINACore (8.209 compostos).

#### **4.1.1 Triagem virtual baseada em ligantes**

Após a delimitação das bases de dados, foi desenvolvido o modelo farmacofórico empregado no processo de triagem virtual baseada em ligantes.

#### **4.1.2 Construção do modelo farmacofórico**

Para a construção do modelo farmacofórico foi selecionado um grupo de 10 inibidores ativos para CK1 (Figura 8). Estes inibidores são provenientes de dois bancos de dados: um de ligantes, o BindingDB (LIU et al., 2007), e outro de estruturas cristalográficas de proteínas, o Protein Data Bank (KIRCHMAIR et al., 2008).

As soluções farmacofóricas foram obtidas utilizando-se o algoritmo HypoGen, limitando o número de grupos farmacofóricos até um mínimo de 3 grupos comuns à construção do modelo e que se alinhassem à hipótese farmacofórica (“number of leads that may miss = 3; align ligants to hypothesis = true”). Esta opção se tornou necessária devido à

impossibilidade de conseguir modelos satisfatórios com número maior de grupos farmacofóricos. O modelo selecionado foi aquele contendo os seguintes grupos: acceptor de ligação de hidrogênio, doador de ligação de hidrogênio e hidrofóbico (Figura 9).

Este modelo farmacofórico escolhido teve como base os ligantes cristalográficos do PDB e um grupo de ligantes do site BindingDB (Figura 8). O farmacóforo foi criado usando estes inibidores, com a vantagem de que os ligantes obtidos do PDB já possuíam uma conformação tridimensional definida (estrutura cristalográfica). Desta forma, durante a análise das hipóteses farmacofóricas, poderiam ser descartadas aquelas hipóteses que fossem muito diferentes das interações esperadas para o sítio ativo de CK1. O modelo farmacofórico criado deveria ser capaz também de reconhecer aquelas moléculas que não possuíam estrutura tridimensional definida, como no caso dos inibidores reportados no site BindingDB (RODRIGUES; SILVA, 2013).

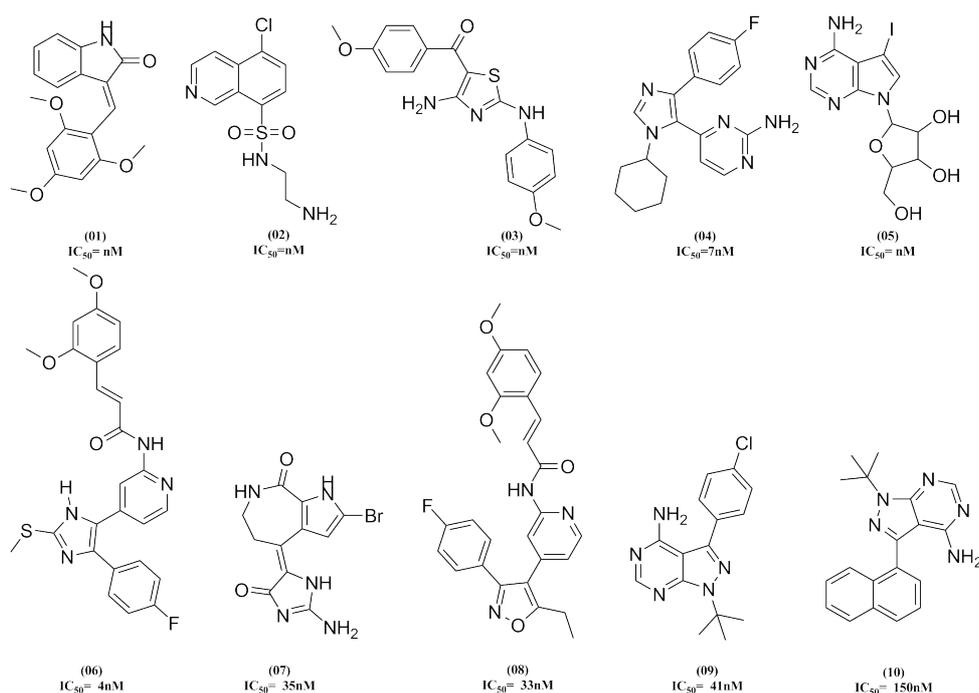


Figura 8. Inibidores selecionados da literatura para CK1, obtido dos bancos de dados do PDB (01 – 05) e do BindingDB (06 – 10).

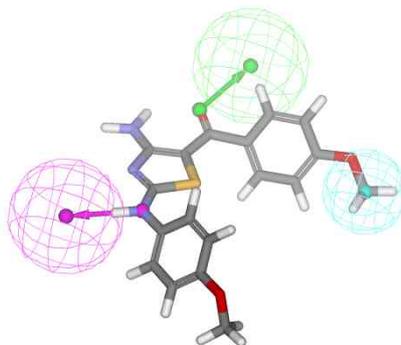


Figura 9. Modelo farmacofórico selecionado para a triagem virtual. Esfera azul, grupo hidrofóbico; em rosa, grupo doador de ligação de hidrogênio e em verde, acceptor de ligação de hidrogênio.

#### 4.1.3 Validação do Modelo Farmacofórico

Para a validação do modelo farmacofórico selecionado, a hipótese farmacofórica foi testada com um grupo de compostos ativos diferentes dos compostos usados para a geração do modelo farmacofórico (Figura 10), verificando a capacidade do modelo em prever outros compostos além daqueles utilizados na criação do modelo. A hipótese farmacofórica selecionada também foi analisada no sítio ativo da CK1, onde os 3 grupos farmacofóricos estão em regiões de interação com aminoácidos do sítio ativo da enzima: LEU85, SER17 e LYS38.

Apesar da triagem virtual baseada em ligante ser independente de informações da estrutura tridimensional do sítio ativo da proteína, o uso em conjunto com o modelo farmacofórico selecionado permite obter subsídios importantes para a seleção de um modelo farmacofórico adequado bem como a exclusão de hipóteses farmacofóricas inadequadas para o modelo proposto (Figura 10).

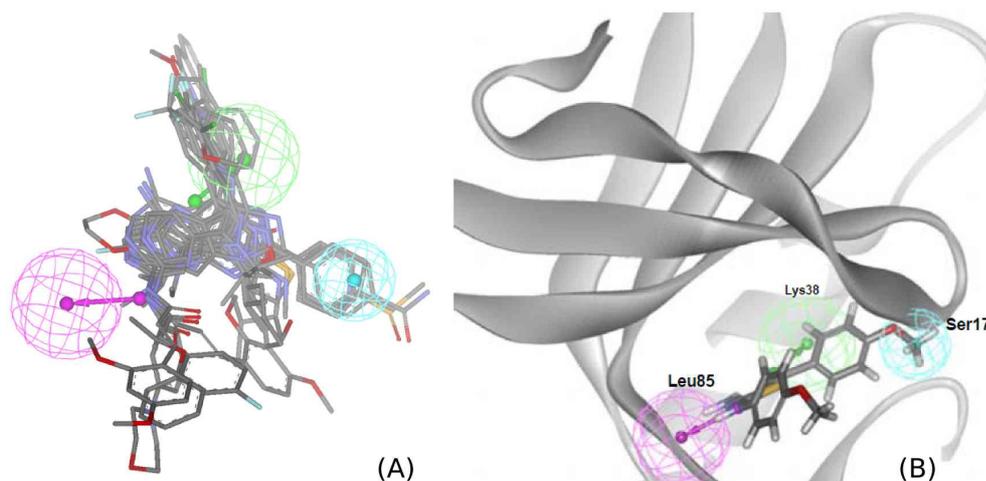


Figura 10. A) Hipótese farmacofórica testada com superposição de compostos ativos diferentes daqueles usados para a geração do modelo farmacofórico. B) Hipótese farmacofórica sobreposta no sítio ativo de CK1: os 3 grupos farmacofóricos estão em regiões de interação com aminoácidos do sítio ativo de CK1: LEU85, SER17 e LYS38.

#### 4.1.4 Triagem virtual por farmacóforo

O melhor modelo farmacofórico foi obtido ajustando o parâmetro “Maximum Omitted Features” para o valor zero. Tal modelo obtido foi posteriormente utilizado para a triagem virtual em diferentes bases de dados buscando compostos que possuíssem melhor valor de encaixe neste modelo farmacofórico de 3 grupos farmacofóricos. O cálculo para a determinação deste valor baseia-se na forma como a estrutura química como um todo se ajusta às características do modelo farmacofórico, bem como sua distância em relação ao centro de cada esfera que compreende a característica farmacofórica. Altos valores de encaixe (“high fit values”) indicam uma boa correspondência com o modelo farmacofórico utilizado (valores de encaixe com o modelo na faixa de 2,9 a 2,8 de um valor máximo de 3). A partir deste critério, os compostos químicos melhor classificados e que respeitaram as restrições conformacionais impostas pelo modelo farmacofórico foram selecionados.

De forma geral, o processo de busca utilizando um modelo farmacofórico como filtro é dividido em etapas distintas onde a cada etapa as estruturas químicas são classificadas pelo modelo farmacofórico com o objetivo de ir reduzindo o número de moléculas ao final do processo com melhor valor de encaixe ao modelo farmacofórico utilizado.

A primeira etapa do processo de triagem virtual foi realizada utilizando o parâmetro “FAST” para a geração de confôrmeros, resultando em 255 confôrmeros com uma tolerância máxima de energia de até 12kcal/mol acima do mínimo global de energia (Figura 11, etapa 01). Nesta etapa, foram selecionadas 2.000 estruturas de cada base de dados. Estas estruturas foram selecionadas levando-se em conta os valores de encaixe no modelo farmacofórico (“fit value”, de 2,4 até 2.9). Como resultado, foi obtido um total de 12.000 (2.000 x 6 bases) estruturas, as quais foram novamente submetidos à triagem virtual, porém agora usando o método BEST, para a geração de confôrmeros, resultando em 1.000 compostos finais (Figura 11, etapa 02).

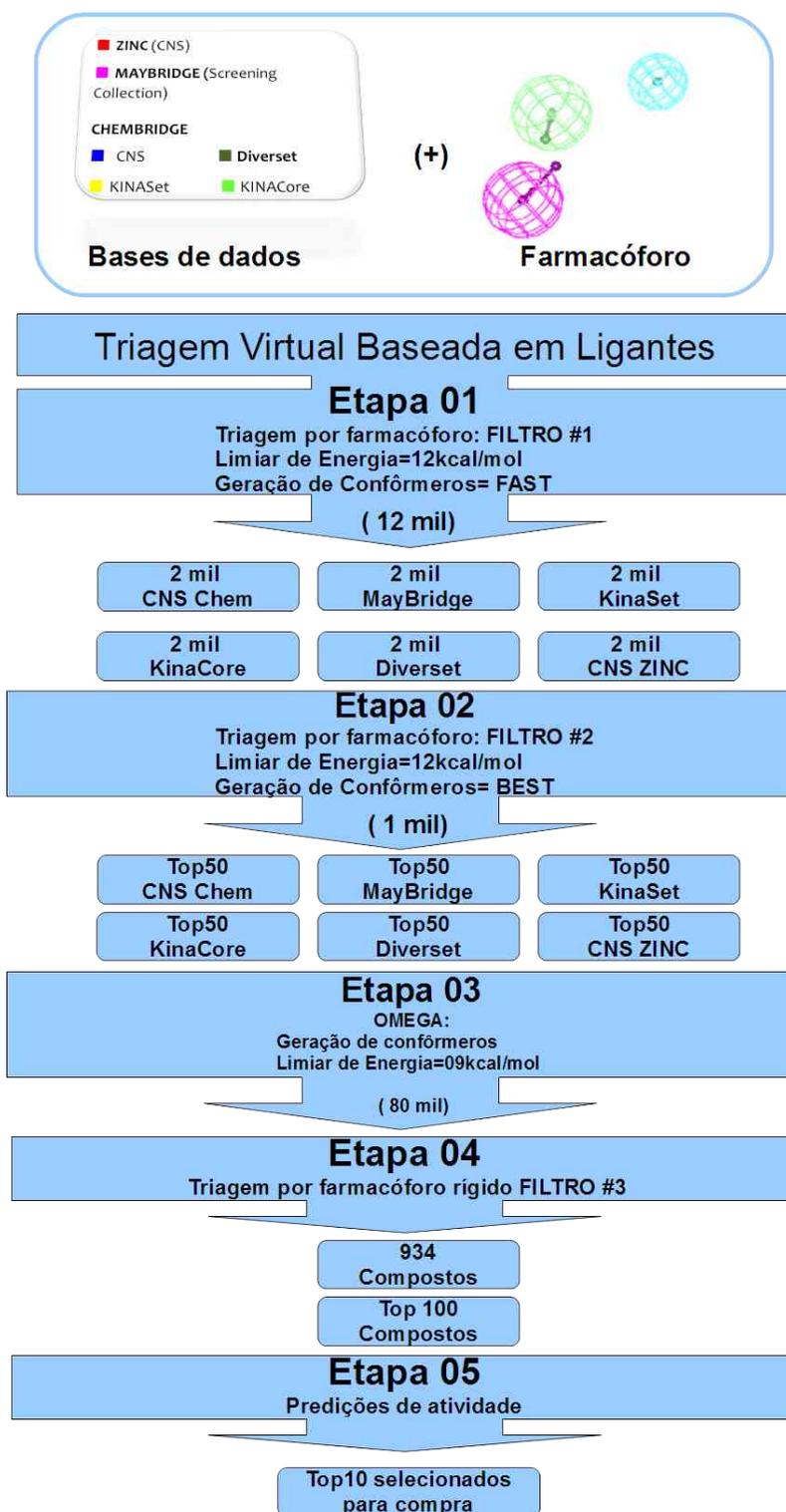


Figura 11. Protocolo de triagem virtual baseada em ligante.

#### 4.1.4 Refinamento do processo de triagem virtual baseado em ligantes

Esta nova base de dados de 1.000 estruturas químicas, previamente filtrada pelo farmacóforo, foi submetida à geração de novos conformêros pelo programa OMEGA (HAWKINS et al., 2010) e à busca por similaridade 2D (Figura 11, etapa 03).

#### 4.1.5 Geração de conformêros com o OMEGA

Para a busca 3D, o número de compostos selecionados foi aumentado com a geração de conformêros, utilizando o programa OMEGA, resultando em um total de 80 mil estruturas, incluindo mais de uma conformação por molécula. O objetivo foi gerar conformêros mais próximos de uma conformação bioativa, uma vez que o algoritmo de geração de conformêros deste programa já foi validado como eficiente para gerar conformação bioativa (HAWKINS et al., 2010). Para esta etapa do processo de triagem virtual, foi configurado o parâmetro relativo a diferença de energia entre a conformação da molécula e o mínimo global (“energy threshold”) para 9kcal/mol, que é um valor que se assemelha em muito ao valor dos compostos bioativos, de acordo com estudo proposto por Hawkins e colaboradores (HAWKINS et al., 2010). O padrão, de 20kcal/mol utilizado pelo programa Discovery Studio tem a tendência de gerar conformações não muito realistas, forçando a molécula a se ajustar ao modelo farmacofórico.

Sendo assim, com esta nova base de 80 mil estruturas químicas foi realizado novamente a triagem por farmacóforo (Figura 11, etapa 04), desmarcando a opção de gerar conformêros pelo Discovery Studio uma vez que estes já tinham sido obtidos pelo programa OMEGA. Ao final desta etapa, foi obtido um total de 934 estruturas químicas e destas, as 100 melhores foram selecionadas e submetidas a predições de atividade e toxicidade (Figura 11, etapa 05) para verificar quais teriam maior probabilidade de serem potenciais candidatos à atividade inibitória de CK1 (Figura 12).

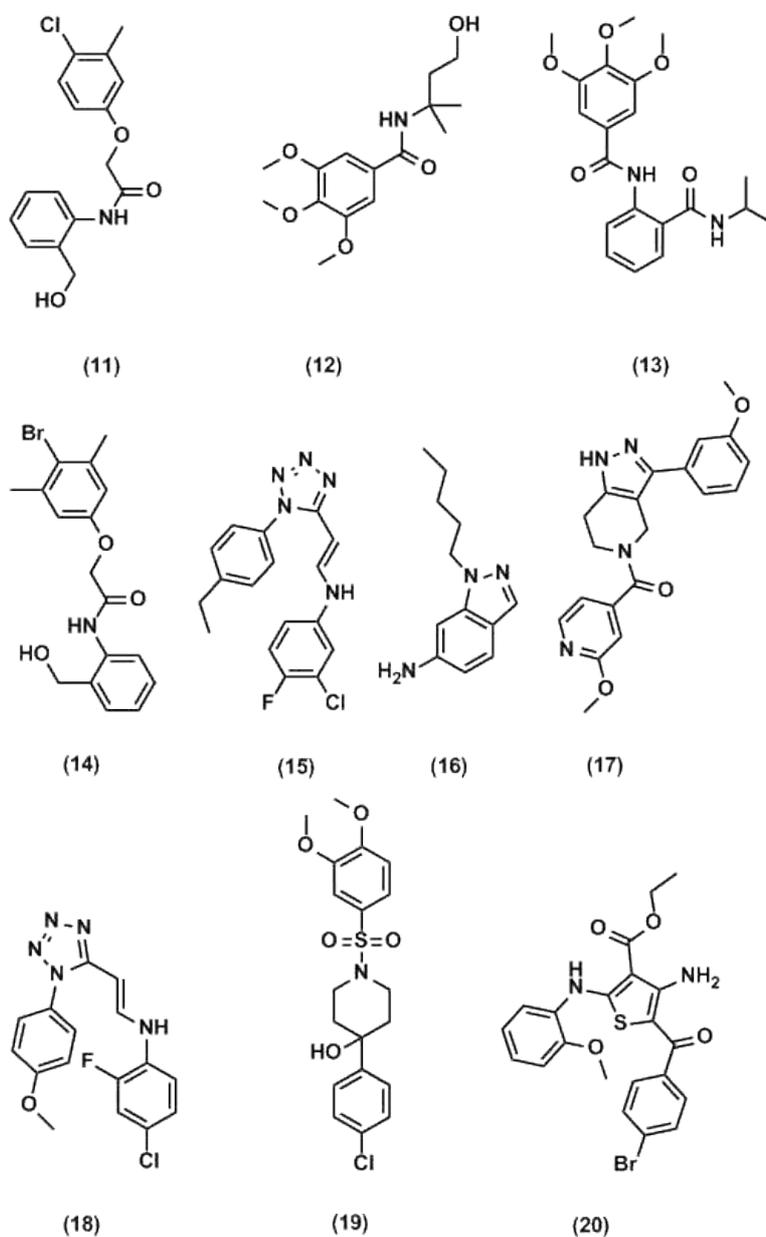


Figura 12. Compostos selecionados pela triagem virtual baseada em ligantes após geração de conformeros com o programa OMEGA para a base de 1.000 moléculas a qual foi submetida novamente à triagem virtual por farmacóforo.

#### **4.1.6 Busca por similaridade 2D**

Ao final do processo da triagem virtual baseada em ligantes chegou-se a uma base reduzida, de 1.000 compostos que foi também utilizada em busca por similaridade 2D, empregando a ferramenta de triagem virtual do servidor do BindingDB (índice de Tanimoto). As substâncias mais potentes foram utilizadas como referência e aquelas moléculas que apresentaram índice de Tanimoto maior ou igual a 0,6 com relação a pelo menos uma das substâncias de referência, foram selecionadas. Para aquelas moléculas que apresentaram índice de Tanimoto abaixo de 0,6, apenas aquelas que apresentaram melhor correspondência com o modelo farmacofórico foram selecionadas (Figura 13).

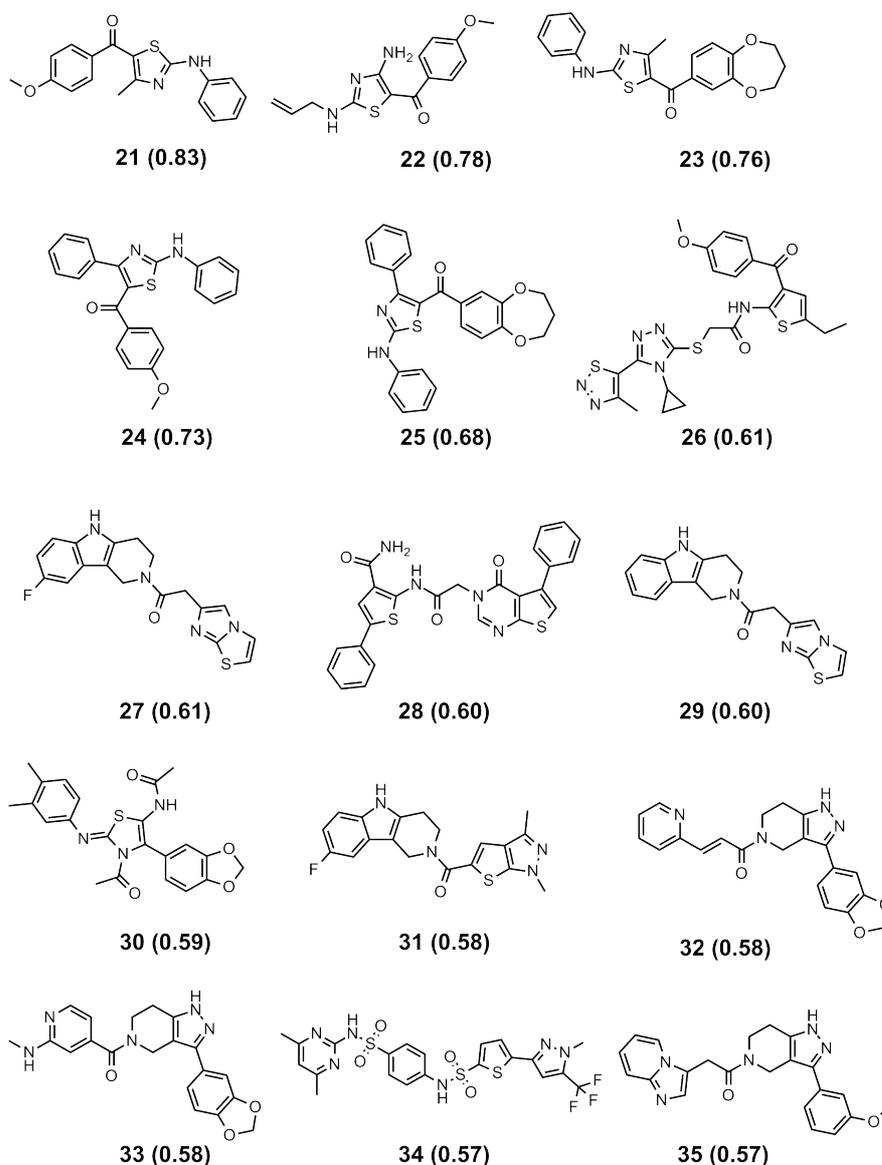


Figura 13. Compostos obtidos pela busca por similaridade 2D, usando índice de Tanimoto. Valores entre parênteses.

#### 4.1.7 Predições de atividade biológica

A determinação do espectro de atividade dos compostos selecionados foi realizado utilizando-se o programa PASS (FILIMONOV et al., 2014). PASS é uma ferramenta bastante empregada para descobrir e relacionar possíveis efeitos biológicos de determinados compostos, baseando-se inteiramente em sua fórmula química. Neste trabalho, somente as

atividades preditas com Pa (potencial de ser ativo) > Pi (potencial de ser inativo) foram consideradas para os compostos selecionados. Inicialmente, foi realizada predição daqueles inibidores reportados na literatura e que foram utilizados para derivação do modelo farmacofórico a fim de avaliar a capacidade do programa em realizar tais predições (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos de referência (**01** a **10**) que foram submetidos à predição do espectro de atividade (PASS). Pa/Pi indica potencial de atividade para Doença de Alzheimer.

<b>Moléculas</b>	<b>PASS</b>	<b>Pa/Pi</b>
01	Inibidor de Cinases	0,482/0,047
02	Inibidor de Proteínas Cinase	0,227/0,048
03	Inibidor de Cinases	0,438/0,067
04	Inibidor de Proteínas Cinase	0,487/0,004
05	Estimulante de Proteínas Cinase	0,084/0,051
06	Inibidor de Cinases	0,371/0,125
07	Inibidor de Proteínas Cinase	0,202/0,069
08	Inibidor de Cinases	0,421/0,078
09	Inibidor de Tirosina Cinase	0,869/0,003
10	Inibidor de Tirosina Cinase	0,879/0,003

A análise do resultado da predição das moléculas de referência permitiu observar que o programa é capaz de reconhecer o espectro de atividade destes compostos que já tem atividade documentada, indicando o potencial para inibir Tirosinas Cinases e Proteínas Cinases de uma forma geral. Dentre os resultados abordados pelo programa, destaca-se a predição para os compostos **09** e **10**. Dos 10 compostos analisados o programa não prevê, ao certo 3 compostos (**02**, **05** e **07**) como sendo inibidores de cinases. Resultando assim num índice de 70% de acerto nas predições, o que está de acordo com a literatura, que relata que acima de 0,7 é estatisticamente validado (LAGUNIN et al., 2000; KHURANA et al., 2011).

Nos compostos selecionados da triagem virtual (compostos de **11** a **20**), as predições são significativas para alguns deles. Algumas estruturas, de acordo com seu banco

de dados e algoritmo, não teriam significativo potencial de atividade para Alzheimer/Cinases (compostos **15**, **17** e **18**). Já o composto **16**, apesar de ter um valor abaixo do esperado para os padrões de atividade, possui correspondência para dois alvos que estão correlacionados: Inibidor para Proteínas Cinase e Tratamento da Doença de Alzheimer. O mesmo acontece com o composto **20**. Dentre os demais, o composto **19** foi o que apresentou a melhor correspondência para os valores de predição de espectro de atividade, atingido o índice Pa/Pi de 0,678/0,013 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Compostos selecionados por meio da triagem virtual, como potenciais protótipos para inibidores de CK1, que possuam Pa>Pi (compostos **11 – 20**)

<b>Moléculas Selecionadas</b>	<b>PASS</b>	<b>Pa/Pi</b>
11	Tratamento da Doença de Alzheimer	0,408/0,130
12	Tratamento da Doença de Alzheimer	0,426/0,114
13	Tratamento da Doença de Alzheimer	0,395/0,142
14	Tratamento da Doença de Alzheimer	0,435/0,107
15	Inibidor de Tirosina Cinase	0,151/0,028
16	Inibidor de Proteínas Cinase	0,206/0,066
	Tratamento da Doença de Alzheimer	0,327/0,196
17	Tratamento da Doença de Alzheimer	0,268/0,243
18	Inibidor de Proteínas Cinase	0,226/0,050
19	Inibidor de Cinases	0,678/0,013
20	Tratamento da Doença de Alzheimer e	0,375/0,159
	Inibidor de Cinases	0,295/0,263

Já nos compostos **21** a **35**, obtidos pela busca por similaridade 2D, o resultado obtido nesta etapa é um pouco menos expressivo, uma vez que dentre os 15 compostos

avaliados, 40% não apresentaram correspondência nas predições de atividade tanto para Cinasas ou Alzheimer. Entretanto, 60% dos compostos obtidos ficaram dentro do potencial de atividade proposto pelo programa, embora a relação Pa/Pi seja pouco expressiva. Dentre esses, o melhor resultado obtido foi com o composto **29** (Tabela 4). Embora tenha existido variação entre os valores de Pa/Pi, estes resultados obtidos foram promissores pois, com uma boa correspondência de espectro de atividade, foi possível utilizá-lo para auxiliar a selecionar, dentre os 25 compostos selecionados da triagem virtual baseada em ligantes (10 obtidos da triagem virtual e 15 da busca por similaridade 2D), um grupo de compostos que possuísse a melhor correspondência para o alvo desejado.

Tabela 4. Compostos selecionados pela busca por similaridade 2D como potenciais protótipos para inibidores de CK1, que possuam Pa>Pi (compostos **21 – 35**)

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Predição do espectro de atividade obtido pelo programa PASS</b>	<b>Relação Pa/Pi</b>
21	Inibidor de Proteínas Cinase	0,338/0,012
22	Inibidor de Tirosina Cinase	0,181/0,020
23	Inibidor de Proteínas Cinase	0,253/0,034
24	Inibidor de Proteínas Cinase	0,304/0,019
25	Inibidor de Proteínas Cinase	0,211/0,062
26	--	--
27	Inibidor de Cinasas	0,318/0,209
28	--	--
29	Inibidor de Cinasas	0,392/0,102
30	--	--
31	Inibidor de Cinasas	0,299/0,254
32	--	--
33	--	--

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Predição do espectro de atividade obtido pelo programa PASS</b>	<b>Relação Pa/Pi</b>
34	--	--
35	Inibidor de Proteínas Cinase	0,189/0,082

Com o objetivo de se obter um perfil para compostos com atividade para DA, e que por sua vez possuíssem atividade no SNC, foram priorizados aqueles descritores que contivessem melhor correlação com esta atividade, tais como capacidade de permear a barreira hematoencefálica (log BB), atividade para o SNC e a absorção por via oral. A fim de se estabelecer um parâmetro, o programa QikProp fornece uma faixa de valores, de acordo com o esperado para 95 % dos fármacos: log BB: de -3,0 até 1,2; Atividade no SNC: ++ (mais ativo)/- - (inativo); % de absorção por via oral: <25% é caracterizada como baixa (Tabelas de 6 a 8).

Foi realizada também a predição daqueles inibidores reportados na literatura e que foram utilizados para derivação do modelo farmacofórico a fim de avaliar a capacidade do programa QikProp em realizar as predições bem como as faixas de valores. Foi possível observar que de forma geral, os compostos ficaram dentro dos valores estabelecidos pelo programa, com destaque aos compostos **1, 2, 5, 9 e 10**, que apresentaram os melhores índices dentro dos intervalos previstos (Tabela 5)

Tabela 5. Compostos de Referência preditos no Qikprop (01 - 10)

<b>Compostos Seleccionados</b>	<b>Atividade no SNC</b>	<b>log BB (Brain/Blood)</b>	<b>% de absorção por via oral</b>
01	+/-	-0,478	100
02	+/-	-0,382	66,3
03	--	-1,139	94,1
04	--	-1,815	60,4
05	+/-	-0,367	100
06	-	-0,838	100
07	-	-0,803	100
08	--	-1,44	54,1
09	+/-	-0,068	100,00
10	+/-	-0,324	100,00

- Valores de referência para a faixa de 95% dos fármacos: log de BB: -3,0 até 1,2; Atividade no SNC: ++ (mais ativo)/-- (inativo); % de absorção por via oral: <25% é caracterizada como baixa.

Através da análise das predições do QikProp para os compostos de **11** a **20** é possível observar uma melhora nos índices das predições, com predominância na atividade para o SNC, além de 100% de absorção por via oral, evidenciando que o uso destas predições auxiliam a selecionar compostos com melhor perfil para a atividade desejada (Tabela 6)

Tabela 6. Predições de atividade para os 10 compostos selecionados pela triagem virtual (11 a 20 )

Compostos Selecionados	Atividade no SNC	log BB (Brain/Blood)	% de absorção por via oral
11	+/-	-0,658	100
12	+/-	-0,7	100
13	+/-	-0,485	100
14	+/-	-0,623	100
15	+/-	-0,493	100
16	+/-	-0,5	100
17	+/-	-0,662	100
18	+/-	-0,5	100
19	+/-	-0,556	100
20	+	-0,54	100

\* Valores de referência para a faixa de 95% dos fármacos: log de BB: -3,0 até 1,2; Atividade no SNC: ++ (mais ativo)/-- (inativo); % de absorção por via oral: <25% é caracterizada como baixa.

Pela análise dos 15 compostos selecionados pela similaridade 2D (compostos de 21 a 35) estes índices são um pouco menos pronunciados, entretanto, aproximam-se bastante daqueles compostos reportados da literatura (compostos de 01 a 10), mantendo-se a predominância de atividade no SNC além de alta % de absorção por via oral (Tabela 7).

Tabela 7. Predições de atividade com QikProp para os 15 compostos selecionados pela similaridade 2D (21 a 35)

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Atividade no SNC</b>	<b>log BB (Brain/Blood)</b>	<b>% de absorção por via oral</b>
21	+/-	-0,412	100
22	--	-1,155	90,38
23	+/-	-0,342	100
24	+/-	-0,34	100
25	+/-	-0,279	100
26	--	-1,14	86,16
27	+/-	-0,201	96,23
28	--	-1,64	90,32
29	+/-	-0,147	100
30	-	-0,487	100
31	+/-	-0,284	100
32	+/-	-0,679	93,3
33	+/-	-0,586	93,89
34	--	-1,224	63,73
35	+/-	-0,643	89,63

\* Valores de referência para a faixa de 95% dos fármacos: log de BB: -3,0 até 1,2; Atividade no SNC: ++ (mais ativo)/-- (inativo); % de absorção por via oral: <25% é caracterizada como baixa.

#### 4.1.8 Predições de toxicidade

A predição de toxicidade dos compostos selecionados foi realizada utilizando o

programa DEREK (MARCHANT et al., 2008), que utiliza modelos baseados nas estruturas químicas dos compostos e as correlaciona a possíveis riscos de toxicidade, incluindo: carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, sensibilização da pele, teratogenicidade e hepatotoxicidade. A identificação de grupos toxicofóricos é realizada por meio de um sistema “knowledge-based” onde correlações da estrutura química e das propriedades dos compostos químicos são buscadas em banco de dados construído a partir de dados da literatura com relação à informações toxicológicas (DA SILVA et al., 2009).

Nos compostos analisados, a maior parte dos grupos toxicofóricos detectados é derivado de amina ou amida aromática. Comparando os compostos que já tem atividade inibitória conhecida para CK1 (Tabela 8), uma alta incidência destes grupos também ocorre. Dessa forma, para a seleção de potenciais compostos para atividade inibitória de CK1, foram selecionados aqueles que possuíam o menor número de grupos toxicofóricos relacionados a amina/amida aromáticos (Tabelas 9 e 10).

Tabela 8. Predição de toxicidade com o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos nos compostos de referência (compostos **01** a **10**).

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Predição de Toxicidade</b>	<b>Possíveis grupos toxicofóricos</b>
01	Carcinogenicidade	Amida aromática
02	1) Fototoxicidade	1) Aril-sulfonamida
	2) Fosfolipidose	2) Amina
	1) Nefropatias	1)Amina secundária,
03	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática
	2) Mutagenicidade	2) Amina aromática ou amida.
	3) Sensibilização cutânea	3) Fenol ou precursor
04	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática
05	--	--
06	1) alpha-2-mu-Globulin Nefropatias	1) Amida aromática
	1) Carcinogenicidade	
07	1) alpha-2-mu-Globulin Nefropatias,	1) Amida aromática
	1) Carcinogenicidade	
08	--	--
09	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática
10	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática

Tabela 9. Predição de toxicidade com o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos selecionados pela triagem virtual (compostos 11 a 20).

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Predição de Toxicidade</b>	<b>Possíveis grupos toxicofóricos</b>
11	1) Carcinogenicidade	Amida aromática
12	--	--
13	1) Carcinogenicidade	Amida aromática
14	1) Carcinogenicidade; 2) Proliferação de peroxissomos	1) Amida aromática 2) Ácido carboxílico ou precursor
15	1) Carcinogenicidade	Amina secundária/ Amina aromática
16	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática
17	2) Mutagenicidade 1) Nefropatias	2) Amina aromática ou amida. Fenol ou precursor
18	2) Sensibilização cutânea 1) Carcinogenicidade 2) Sensibilização cutânea	1) Amina secundária, Amina aromática 2) Fenol ou precursor
19	1) Fototoxicidade	Aril sulfonamida
20	1) Nefropatias 2) Carcinogenicidade 3) Proliferação de peroxissomos 4) Sensibilização cutânea 5) Fototoxicidade	1) Amina secundária, Amina aromática, 2) Diaril cetona 3) Alquil aril ou ác. Carboxílico bisaril ou precursor 4) Fenol ou precursor 5) Diaril cetona

Tabela 10. Predição de toxicidade utilizando o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos nos compostos selecionados pela similaridade 2D (compostos 21 a 35).

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Predição de toxicidade</b>	<b>Possíveis toxicofóricos grupos</b>
21	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática.
22	2) Sensibilização cutânea	2) Fenol ou precursor
	1) Carcinogenicidade	1) Amina aromática
	2) Mutagenicidade	2) Amina aromática ou amida
23	3) Sensibilização cutânea	2) Amina alílica
	1) Nefropatias, carcinogenicidade	3) Fenol ou precursor
		1) Amina secundária e amina aromática
24	1) Nefropatias, carcinogenicidade	1) Amina secundária e amina aromática
	2) Sensibilização cutânea	2) Fenol ou precursor
25	1) Nefropatias, carcinogenicidade	1) Amina secundária e amina aromática
		1) Amina secundária e amina aromática
26	1) Nefropatias, carcinogenicidade	1) Amina secundária e amina aromática
	2) Proliferação de peroxissomos	2) Ácido carboxílico ou precursor
	3) Sensibilização cutânea	3) Fenol ou precursor
27	1) Nefropatias	1) Amina secundária e amina aromática
		1) Amida aromática
28	1) Nefropatias, carcinogenicidade	2) Amina aromática ou amida
	2) Mutagenicidade	--
29	--	--
30	Nefropatias	--
31	Nefropatias	--
32	Nefropatias	--
33	1) Nefropatias, carcinogenicidade	1) Amina secundária, amina aromática
		Pirimidina ou purina substituída
34	1) Nefropatias, carcinogenicidade	1) Fenol ou precursor
35	1) Nefropatias, sensibilização cutânea	

Nas predições do QikProp, os descritores mais importantes para esta etapa de triagem virtual foram: a capacidade de permear a barreira hematoencefálica (log de BB); atividade do Sistema Nervoso Central e capacidade de absorção por via oral, que compreendem características desejáveis ao desenvolvimento de compostos candidatos a tratamento de Alzheimer que possam ser eficientes após um regime de administração por via oral.

A fim de se obter compostos mais promissores para a atividade contra CK1, entre os 100 compostos selecionados, foram utilizados inicialmente descritores do tipo MNA (do inglês, Multilevel Neighborhoods of Atoms), os quais foram computados utilizando-se o programa PASS (FILIMONOV et al., 2014) para a predição de compostos que teriam potencial de atividade para CK1 ou implicações na DA. Considerando  $P_a > P_i$ , foram selecionados compostos com potencial inibitório para Cinases e Tratamento da DA. Os outros 56% foram implicados como inibidores para Cinases e os 16% restantes não tiveram nenhum potencial a reportar no PASS, com relação a estes dois grupos. Embora estes resultados não sejam específicos, uma vez que tratamentos para Doença de Alzheimer e Inibidor de Cinases abrangem um grupo muito diverso, principalmente diversas proteínas cinases, provavelmente estes resultados refletem um comportamento característico das proteínas cinases, que é o alto grau de conservação dos seus domínios cinase. Para as moléculas selecionadas pelo menos 25 demonstraram um índice significativo de  $P_a > P_i$  para DA ou inibidor de cinases (Tabelas 2 e 3).

#### **4.1.9 “Docking” e propostas de modos de ligação das estruturas químicas selecionadas por triagem virtual baseada em ligantes**

Baseados nos descritores dos programas PASS e QikProp bem como na avaliação dos grupos químicos presentes nestes compostos, foram selecionados 10 compostos com os melhores perfis para as atividades descritas (Figura 17). Em conjunto com os ensaios de inibição enzimática dos compostos selecionados na etapa de triagem virtual baseada em ligantes, foram realizados cálculos de “docking” e análise dos campos de interação molecular a fim de verificar se as poses propostas estavam condizentes com as características do sítio

ativo, evitando assim conformações pouco realistas. Dentre estes 10 compostos testados, o composto **14**, apresentou 3% de inibição da enzima CK1 na concentração de 10  $\mu$ M. A presença de 2 metilas na cadeia lateral do anel, em posições 3 e 5, prejudicariam estericamente as interações no sítio ativo, principalmente com ASP91. Outro fator que pode ter contribuído para a baixa atividade seria a presença do grupamento metoxi do anel benzílico que, apesar de estar em região favorável, a interação pode dificultar a entrada do anel no bolsão hidrofóbico. Fato semelhante é observado com **11** e **12** (Figura 14), onde a presença de metoxilas dificultaria a acomodação do anel no bolsão hidrofóbico, resultando em menor atividade.

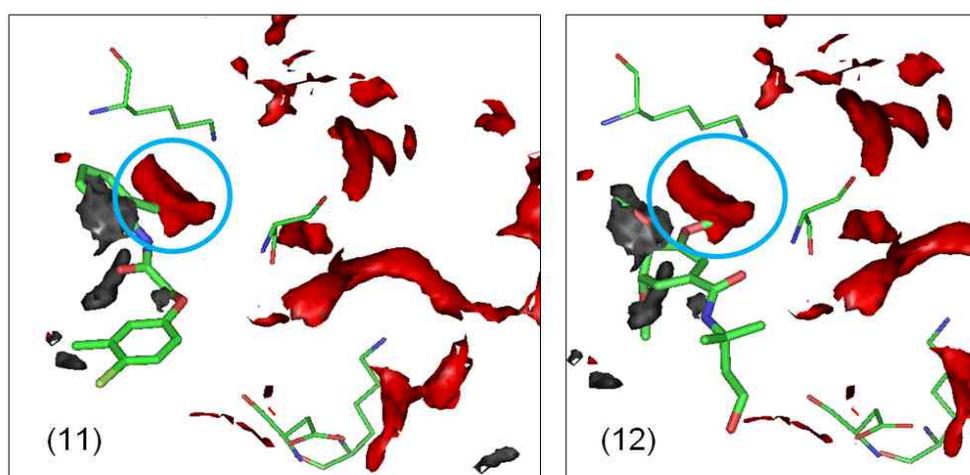


Figura 14. Proposição de modos de ligação por meio de “docking” em sobreposição com campos de interação molecular (MIFs), para os compostos **11** e **12**. Carbono aromático (contorno em cinza, (energia = -3,8 kcal.mol<sup>-1</sup>); hidroxila (contorno em vermelho, energia = -7,18 kcal.mol<sup>-1</sup>).

Embora o composto **20** apresente dois pontos de interação semelhantes ao observado com o composto **25** (a acomodação do seu anel no bolsão hidrofóbico e a metoxila da cadeia lateral interagindo com SER17), observa-se que a substituição do átomo de flúor por um halogênio maior (bromo) pode dificultar a acomodação do anel no bolsão hidrofóbico. Isto estaria de acordo com a fraca inibição de 2,26% observada com respeito à CK1 $\delta$  (Figura 15). O pequeno átomo de flúor auxilia, por meio de interações hidrofóbicas, a uma melhor acomodação do anel aromático no bolsão hidrofóbico.

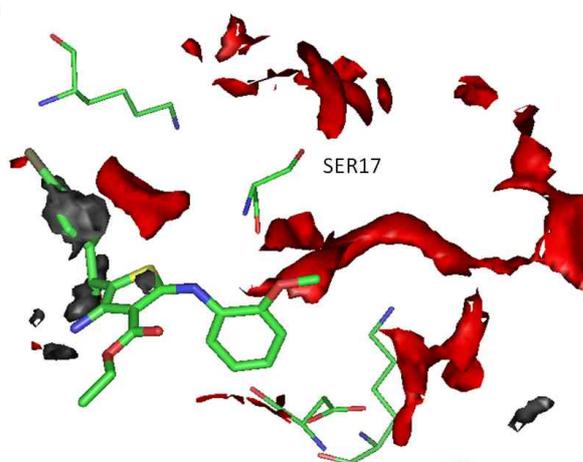


Figura 15. Proposição dos modos de ligação de **20**, por meio de “docking” em sobreposição com campos de interação molecular (MIFs), evidenciando poucos pontos de interação de **20** com o sítio de CK1, refletindo diretamente em sua atividade (2,26%). Carbono aromático (contorno em cinza, (energia = -3,8 kcal.mol<sup>-1</sup>); hidroxila (contorno em vermelho, energia = -7,18 kcal.mol<sup>-1</sup>).

Apesar de **24** e **25** serem estruturalmente semelhantes, as propostas de poses resultantes do “docking” indicam que, além da acomodação de anel aromático no bolsão hidrofóbico, **24** poderia interagir com o resíduo de LYS130, ao contrário de **25**, o qual teria duas interações na região de ligação da ribose, interagindo com SER17 e ASP132 (Figura 16). Isto deixaria **25** mais estabilizado no sítio de CK1 $\delta$  do que **24**, explicando assim o resultado obtido nos primeiros ensaios de inibição enzimática, onde é observado 14,61% de inibição para **24** e 40,80% para **25**.

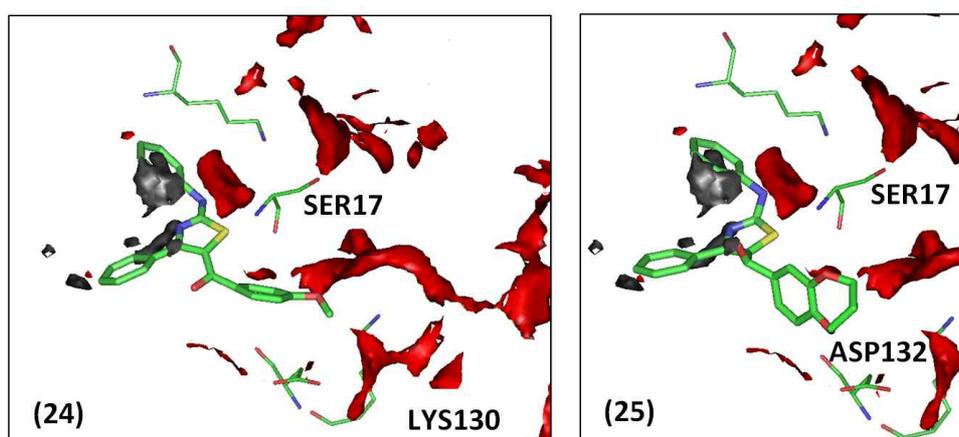


Figura 16. Propostas de modo de ligação de **24** e **25** em sobreposição com campos de interação molecular (MIFs), indicando uma melhor acomodação de **25** no sítio de CK1 $\delta$ , por realizar mais interações se comparado ao composto **24**. Carbono aromático (contorno em cinza, (energia = -3,8 kcal.mol<sup>-1</sup>), hidroxila (contorno em vermelho, energia = -7,18 kcal.mol<sup>-1</sup>).

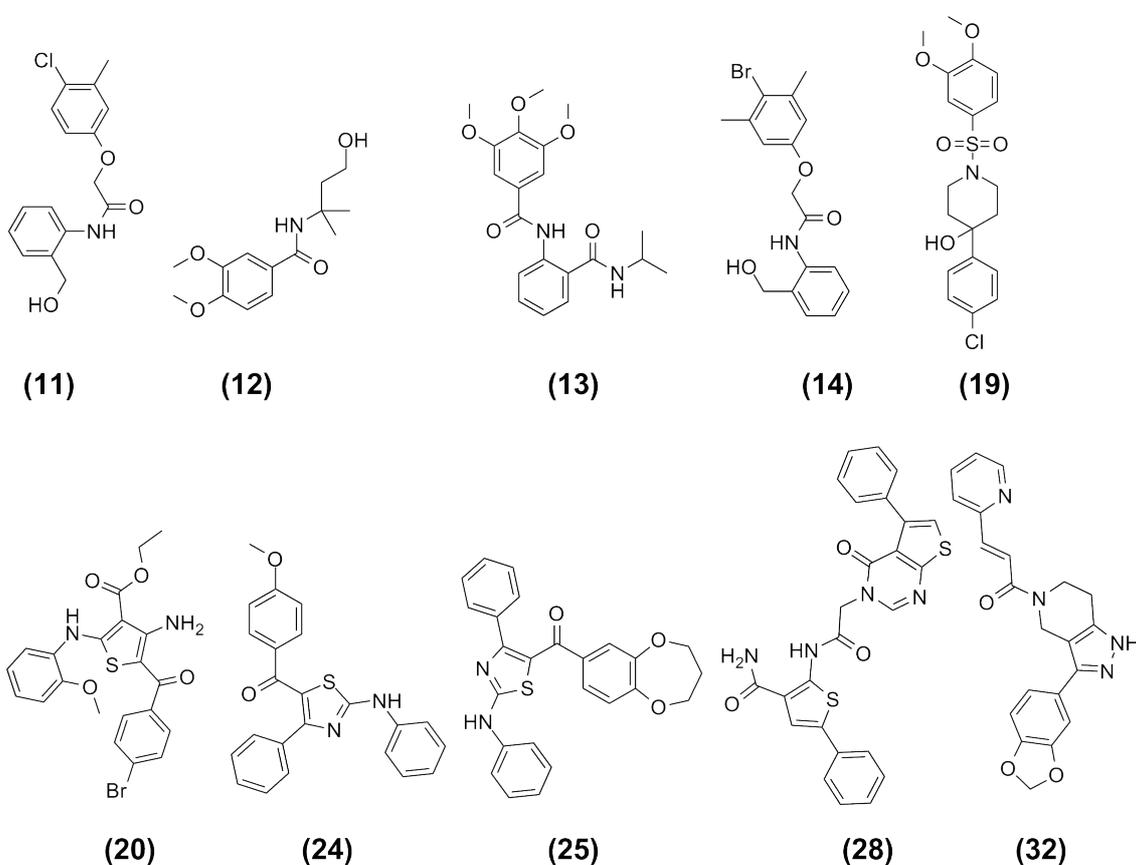


Figura 17. Estrutura química dos 10 compostos selecionados por meio de triagem virtual baseada em ligantes para ensaios de inibição.

#### 4.1.10 Ensaios de inibição enzimática

Nesta primeira etapa de avaliação, os ensaios biológicos foram conduzidos em colaboração com grupo da Espanha, do INSTITUTO DE QUÍMICA MÉDICA – CSIC, sob a coordenação da prof. Dra. Ana Martínez Gil, onde foi realizado ensaio de inibição enzimática (Tabela 11) para avaliar compostos capazes de competir com ATP à concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

Tabela 11: 10 compostos selecionados da etapa de triagem virtual baseada em ligantes submetidos ao teste de inibição enzimática.

Compostos selecionados	PASS (Alvo)	PASS (Pa/Pi)	QikProp (Atividade no SNC)	QikProp logBB (Brain/Blood)	QikProp (% de absorção)	CK1δ (% de inibição a 10μM)
11	Tratamento DA	0,408/0,130	+/-	-0,658	100	4,77 ± 0,74
12	Tratamento DA	0,426/0,114	+/-	-0,700	100	2,77 ± 0,29
13	Tratamento DA	0,395/0,142	+/-	-0,485	100	5,14 ± 1,12
14	Tratamento DA	0,435/0,107	+/-	-0,623	100	3,00 ± 0,26
19	Inibidor de Cinases	0,678/0,013	+/-	-0,493	100	5,92 ± 1,22
20	Inibidor de Cinases	0,375/0,159	+	-0,500	100	2,26 ± 1,03
24	Inibidor de Cinases	0,304/0,019	+/-	-0,662	100	14,61 ± 0,70
25	Inibidor de Cinases	0,211/0,062	+/-	-0,500	100	40,80 ± 0,44
28	Nada a reportar	--	--	-0,556	100	6,64 ± 0,44
32	Nada a reportar	--	+	-0,540	100	8,30 ± 0,77

Com o objetivo de avaliar sua seletividade, os compostos estão sendo avaliados para CK1 e também para outra proteína cinase homóloga implicada na DA, a GSK3. Estes ensaios servirão para complementar e ajustar os modelos teóricos desenvolvidos para a triagem virtual baseada em ligantes e em estrutura. Assim será possível obter informações acerca da estrutura química de compostos ativos, focando em grupos químicos que exercem maior potencial de inibição e ao mesmo tempo, conferem maior seletividade para a CK1.

## 4.2 Triagem Virtual Baseada em Estrutura

Para a triagem virtual baseada em estrutura foi necessário determinar a localização do sítio ativo bem como os aminoácidos envolvidos. Para a análise destas informações foi utilizado a inspeção visual dos complexos cristalográficos de CK1 disponíveis no PDB (Tabela 12), analisando o posicionamento dos ligantes provenientes destes complexos cristalográficos. Através da análise do complexo de código 1CSN, foi possível determinar a região de ligação do ATP. Os demais complexos disponíveis no PDB também indicavam a mesma região de interação para seus respectivos ligantes, com exceção dos complexos 3UZP e 4HGT, com os quais foi possível determinar a região de interação de ligantes que se utilizam do bolsão de ligação 1. A partir destas informações, foi possível determinar um raio de interação que atingisse a região de ligação 1 bem como o centro da região de ligação do ATP, a região da adenina além de parte da região da ribose.

Após a seleção do sítio ativo, uma preparação cuidadosa da estrutura da proteína foi realizada, removendo solventes e/ou cofatores indesejáveis presentes no complexo cristalográfico. Além disso, o estado de protonação dos aminoácidos envolvidos no sítio foi determinado e os átomos de hidrogênio foram adicionados em conformidade com a proteína utilizando o módulo HERMES® do programa GOLD®.

### 4.2.1 Busca por complexos cristalográficos da CK1

No banco de dados PDB (BIELSKA et al., 2011) estão descritos 15 complexos cristalográficos relacionados à proteína CK1. Estes complexos se subdividem em dois grupos principais de isoformas: CK1 $\gamma$  e CK1 $\delta$  (Tabela 12). Esta última, além da isoforma  $\epsilon$ , estão descritas na literatura como diretamente relacionadas à DA (KIRCHMAIR et al., 2008). Nas etapas iniciais deste projeto de pesquisa havia muito pouca informação disponível sobre a proteína CK1 humana. Nos bancos de dados de proteínas eram reportados somente 7 complexos cristalográficos da isoforma CK1 $\gamma$  e 5 outros, relativos à isoforma CK1 $\delta$ , a qual, a princípio seria a primeira escolha para o desenvolvimento do modelo teórico. Entretanto, ao

contrário dos complexos de CK1 $\gamma$  (PDB ID: 2CMW, 2C47, 2IZR, 2CHL, 2IZS, 2IZT e 2IZU) que eram relativos à espécie humana, os complexos disponíveis para a isoforma CK1 $\delta$  eram provenientes das espécies *Rattus norvegicus* (PDB ID: 1CKJ e 1CKI) e *Schizosaccharomyces pombe* (PDB ID: 1CSN, 1EH4 e 2CSN). O maior problema em utilizar-se de complexos cristalográficos de espécies distintas da espécie humana é a presença de mutações decorrentes da variação entre estas. Dessa forma, os dados obtidos inicialmente sobre as características estruturais das proteínas bem como os modelos criados foram direcionados para a isoforma  $\delta$  da espécie humana (código PDB: 3UZP).

Preliminarmente, os complexos foram avaliados a fim de selecionar aqueles que fossem mais viáveis para os cálculos de “docking”, excluindo desta seleção os complexos cristalográficos que possuíssem cadeias quebradas, priorizando aqueles que estivessem completos e fossem da espécie humana. Destes, foram selecionados os complexos de códigos PDB 1CSN, 3UZP e 4HNF: 1CSN foi selecionado por possuir o ATP no sítio ativo, 4HNF por apresentar ligante maior e 3UZP por apresentar ligante com modo de ligação distinto dos demais, além de possuir estrutura química pequena, diferenciando-o bastante do inibidor ligado à 4HNF.

**Tabela 12.** Isoformas de CK1 disponíveis no PDB

<b>Isoforma</b>	<b>Código PDB</b>	<b>Resolução (Å)</b>	<b>Espécie</b>
CK1 $\gamma^1$	2CMW	1,75	<i>Homo sapiens</i>
CK1 $\gamma^2$	2C47	2,40	<i>Homo sapiens</i>
CK1 $\gamma^3$	2IZR	1,32	<i>Homo sapiens</i>
CK1 $\gamma^3$	2CHL	1,95	<i>Homo sapiens</i>
CK1 $\gamma^3$	2IZS	1,95	<i>Homo sapiens</i>
CK1 $\gamma^3$	2IZT	2,00	<i>Homo sapiens</i>
CK1 $\gamma^3$	2IZU	1,85	<i>Homo sapiens</i>

<b>Isoforma</b>	<b>Código PDB</b>	<b>Resolução (Å)</b>	<b>Espécie</b>
CK1δ	1CSN	2,00	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
CK1δ	1EH4	2,80	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
CK1δ	2CSN	2,50	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
CK1δ	1CKJ	2,46	<i>Rattus norvegicus</i>
CK1δ	1CKI	2,30	<i>Rattus norvegicus</i>
CK1δ	3UYS	2,30	<i>Homo sapiens</i>
CK1δ	3UYT	2,00	<i>Homo sapiens</i>
CK1δ	3UZP	1,94	<i>Homo sapiens</i>
CK1δ	4HGT	1.80	<i>Homo sapiens</i>

A atividade catalítica das proteínas cinases é mediada por ATP, o qual se liga a uma fenda entre os lóbulos N-e C-terminal de um domínio único. Devido ao fato de que a sequência primária e as estruturas tridimensionais das cinases são semelhantes, o desenvolvimento de inibidores seletivos que exibem atividade mínima fora do alvo pode ser um desafio. Entretanto, algumas considerações podem ser feitas a libtfim de se obter maior seletividade:

Com base na análise de dados cristalográficos de várias proteínas cinases foi derivado um modelo do modo de ligação do ATP no sítio ativo das proteínas cinases (KANNANAYAKAL et al., 2006), subdividindo-o em 5 principais regiões de ligação: região da adenina, região da ribose, regiões de ligação 1 e 2 (bolsões hidrofóbicos) e região de ligação do fosfato (Figura 18).

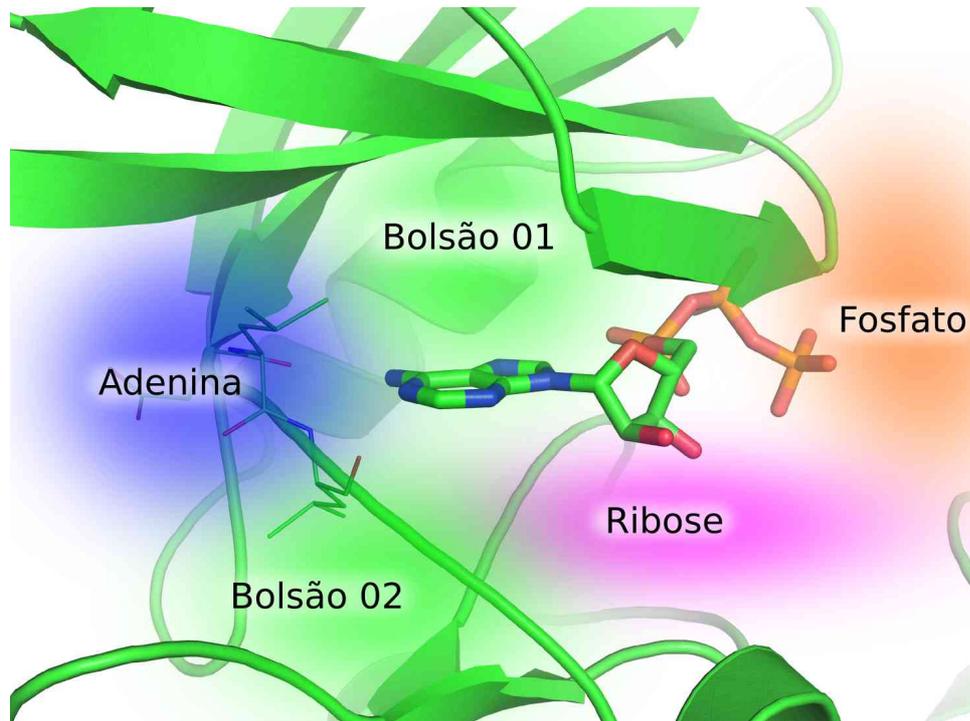


Figura 18: Diagrama em ribbons da proteína CK1 complexada com ATP no sítio ativo (complexo de código PDB: 1CSN) destacando as cinco principais regiões de ligação do ATP, como proposto por Traxler e colaboradores (BUIJSMAN, 2005; TRAXLER; FURET, 1999). Em verde, estão representados os átomos de carbono da proteína e do ATP além dos bolsões hidrofóbicos 1 e 2 (também denominados como Região de ligação 1 e 2, respectivamente). Em azul, região de ligação da adenina; em rosa, região de ligação da ribose; em laranja região de ligação do grupo fosfato. Imagem criada utilizando os programas PyMOL (SCHRÖDINGER, LLC, 2010) ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) e Inkscape (ALBERT et al., 2014) ([www.inkscape.org](http://www.inkscape.org)).

A região de ligação da adenina tem papel fundamental na atividade de modo que todos os inibidores competitivos se ligam nesta região hidrofóbica e/ou fazem ligações mediadas por moléculas de água. Mais especificamente, eles interagem com a região “hinge” via ligação de hidrogênio. Já a região da ribose apresenta caráter hidrofílico e frequentemente é explorada para acomodar grupos solubilizantes. Esta região possui alguns resíduos únicos entre as proteínas cinases e, portanto, pode ser utilizada para direcionar a seletividade. A região de Ligação 1 é formada por um bolsão que se estende em direção aos nitrogênios do ATP e não está envolvido com o ATP. Esta região não é conservada entre as proteínas cinases e vem sendo usada para melhorar a afinidade bem como a seletividade. O acesso a esta região é controlado por um resíduo denominado resíduo guardião (do inglês, “gatekeeper”) o qual corresponde ao aminoácido MET82 do complexo cristalográfico de código PDB 3UZP.

Região de Ligação 2: esta região não é acessada pelo ATP e pode ser utilizada para obter afinidade e seletividade. Região de ligação do fosfato: esta é outra região bastante hidrofílica e sua presença/ausência não parece afetar a afinidade, com relação aos inibidores.

Sendo assim é possível observar 3 regiões distintas que não são conservadas entre membros da família das proteínas cinases, de modo que vem sendo explorados para o desenvolvimento de inibidores seletivos para cinase (Figura 20). Dentre estas 3 regiões, a região de ligação 1 é a mais promissora e vem sendo recentemente explorada como a que melhor confere seletividade devido principalmente às rotações do resíduo-guardião que acaba por fechar/abrir a entrada neste bolsão de acordo com o tamanho da cadeia lateral de seu aminoácido vizinho e também por estar espacialmente mais próxima à região de ligação da adenina. Particularmente, no desenvolvimento de inibidores seletivos para CK1 este bolsão vem sendo explorado, garantindo seletividade inclusive dentre as isoformas de CK1 (BUIJSMAN, 2005; TRAXLER; FURET, 1999).

#### **4.2.2 Modos de ligação do ATP no sítio ativo**

Pela análise do ATP no sítio ativo de CK1 $\delta$  (PDBID: 1CSN), Figura 19, é possível identificar as regiões de interação propostas por Traxler, onde a região da adenina é representada pelas interações dos aminoácidos LEU88 e ASP86, interagindo, respectivamente, com o átomo de nitrogênio do anel e com o grupo amino, ligado a este mesmo anel. A região do fosfato apresenta 4 interações principais com os aminoácidos LYS41, SER22, ASP154 e ASP13. E por fim, na região da ribose é observada a interação de ASP136 com a hidroxila da ribose. De modo semelhante, interage o inibidor IC261 (Figura 20).

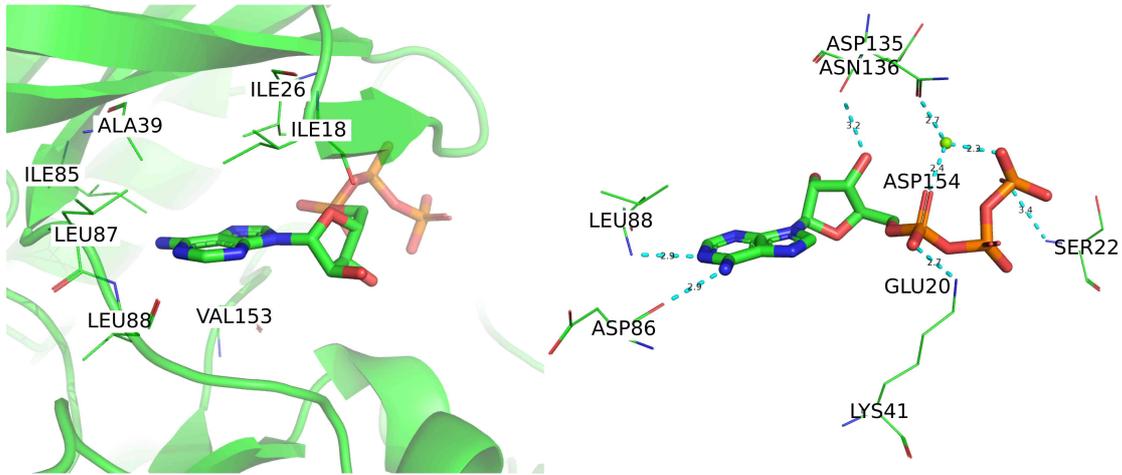


Figura 19: Modo de ligação ATP no sítio: Principais interações: **Bolsão da Adenina:** LEU88 com N do anel indólico; ASP86 com NH2 da cadeia lateral; **Região Fosfato:** LYS41, SER22, ASP154, ASP135; **Bolsão da Ribose:** ASP136 com hidroxila da ribose.

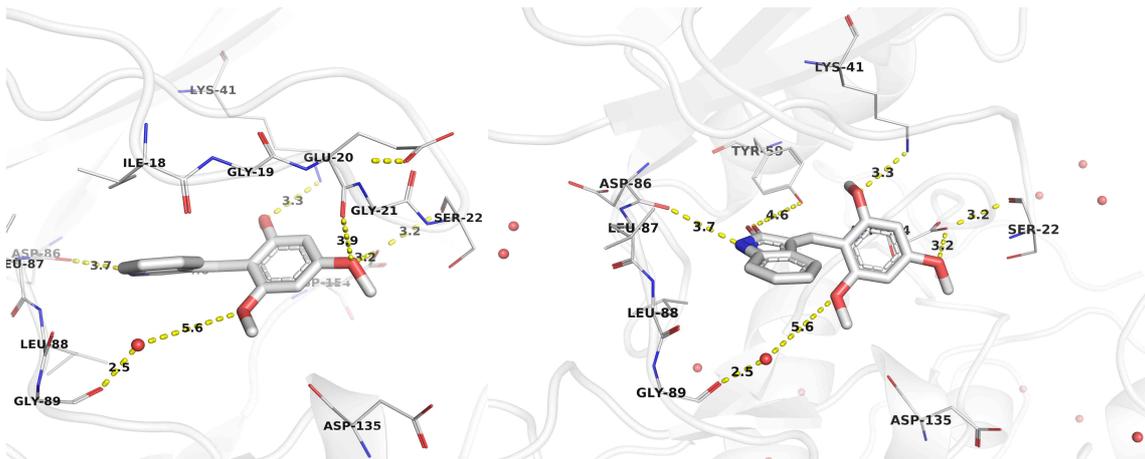


Figura 20: Modo de ligação de IC261 (PDB ID: 1EH4). Principais interações: ASP86 com átomo de nitrogênio do anel; LYS41 com metoxila da cadeia lateral.

A fim de determinar se o modo de ligação do inibidor IC261 resultava em mudanças na estrutura secundária da proteína, (LONG; ZHAO; HUANG, 2012), medidas de dicroísmo circular foram realizadas em uma variante truncada da proteína Cki1Δ298 na presença ou ausência tanto do nucleotídeo quanto do inibidor IC261. A interpretação do espectro resultante indicou que a ligação de IC261 à proteína não foi acompanhada por nenhuma mudança significativa às modificações na estrutura secundária da proteína.

Já o inibidor PF670462 (PDB ID – 3UZP) interage com a região da adenina e com

a região de ligação 1, bolsão este que se encontra aberto devido à livre rotação do resíduo-guardião (do inglês, “gatekeeper”) de forma a conseguir maior seletividade em relação as demais isoformas e cinases (Figura 21).

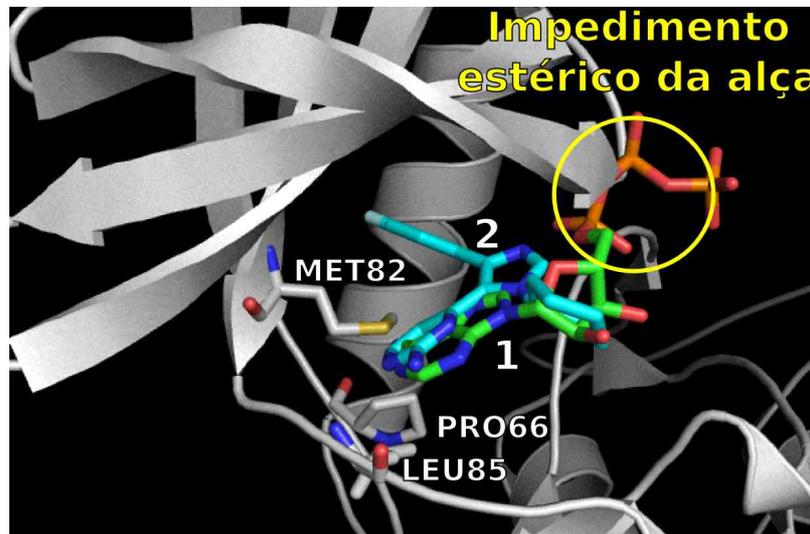


Figura 21: Modos de ligação do ATP (1) e do inibidor PF670462 (2) no sítio ativo de CK1 $\delta$ , evidenciando a acomodação de (2) pelo bolsão hidrofóbico, devido à livre rotação do resíduo-guardião, MET82 possibilitada pela pequena cadeia lateral de PRO66. Em amarelo, círculo destacando a flexibilidade da alça, evidenciando o impedimento estérico de ligantes maiores, como o próprio ATP, para o complexo de código 3UZP.

#### 4.2.3 Docking

Por meio de sobreposição dos complexos cristalográficos disponíveis no PDB foi verificado que existe uma flexibilidade nos resíduos (que compõem a alça do sítio ativo) (Figura 21). Embora seja possível especificar quais resíduos devem ficar flexíveis durante um cálculo de “docking”, os programas têm certas limitações quanto a possibilidade de realizar movimentos mais significativos no esqueleto da proteína (“backbone”), como no caso de uma alça, por exemplo. Em situações desta natureza, o mais recomendado é realizar os cálculos de “docking” utilizando o método de docagem sequencial (do inglês, “ensemble docking”) tomando como base um grupo distinto de conformações da proteína.

#### 4.2.4 Análise da conservação da flexibilidade de CK1δ

Uma etapa importante para a realização dos cálculos de “docking” foi a determinação de resíduos ou partes da proteína dotados de maior flexibilidade.

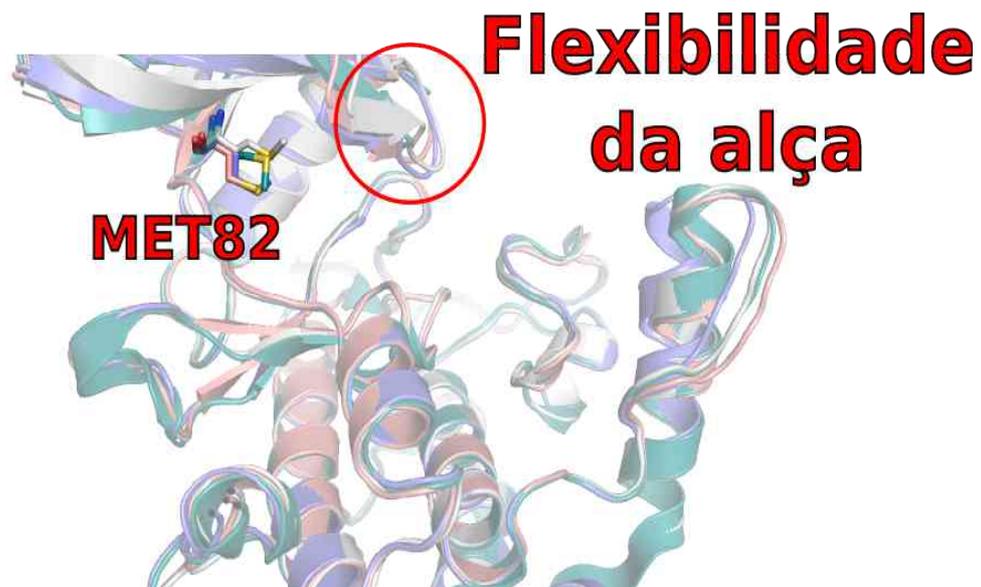


Figura 22: Sobreposição dos complexos 1CSN (cinza), 3UZP (rosa) e 4HNF (verde), evidenciando a rotação de MET82 além da movimentação da alça, localizada na entrada do sítio ativo.

#### 4.2.5 Redocking

Durante os primeiros estudos para os cálculos de “docking” foi realizado o “redocking” do inibidor do complexo 3UZP com sua proteína a fim de avaliar a capacidade do programa de reproduzir o modo de ligação cristalográfico do inibidor. Os RMSDs (do inglês, “Root Mean Square Deviation”) calculados ficaram abaixo de 0,6 Å sendo que até um valor de 2,0 Å é considerado satisfatório (Tabela 13).

Tabela 13: Cálculo do RMSD para cada pose de docking do inibidor PF670462 no sítio ativo de CK1δ, utilizando o ligante cristalográfico ((7)\_3uzp\_docking) como referência.

Pose de Docking	Referência	RMSD calculado (Å)
(1) inib._3uzp mol2 1 dock01	(7) 3uzp_docking	0,44
(2) inib._3uzp mol2 1 dock04	(7) 3uzp_docking	0,48
(3) inib._3uzp mol2 1 dock05	(7) 3uzp_docking	0,50
(4) inib._3uzp mol2 1 dock08	(7) 3uzp_docking	0,53
(5) inib._3uzp mol2 1 dock09	(7) 3uzp_docking	0,48
(6) inib._3uzp mol2 1 dock10	(7) 3uzp_docking	0,49

#### 4.2.6 Análise das moléculas de água envolvidas em interações no sítio ativo de CK1

Os complexos cristalográficos foram sobrepostos e foi verificada a conservação de moléculas de água que poderiam ter atuação importante na estabilização do inibidor no sítio ativo. De acordo com o que fora observado, quando existia um grupo químico do inibidor que poderia fazer ligação de hidrogênio, havia sempre entre ele e o aminoácido, uma molécula de água para fazer esta ponte e, assim, estabilizá-lo no interior do sítio. Então, assumiu-se que algumas moléculas de água poderiam fazer uma ponte, caso aparecesse um grupo químico favorável do inibidor naquela posição.

Durante os cálculos de “docking” é desejável que esta molécula de água tenha rotação livre (opção “spin” ativada, no programa GOLD). Este comportamento pode ser simulado adicionando as variações em seus eixos x, y, z, provenientes de vários complexos do PDB. Quanto à sua posição no eixo x, y, z, esta variaria de acordo com cada diferente inibidor, e dependendo do tamanho de sua cadeia lateral, este empurraria ou atrairia a molécula de água para perto ou longe de si. Assim, para um cálculo de “docking” mais preciso, adicionou-se mais de uma posição desta molécula de água, mesmo estando elas quase sobrepostas. Pela sobreposição dos complexos, foram observadas duas regiões de conservação de moléculas de água no interior do sítio ativo: perto dos resíduos GLY86 e TYR56,

realizando ponte entre estes aminoácidos do sítio e o inibidor (Tabela 14):

Tabela 14: Descrição das moléculas de água envolvidas em interações no sítio ativo de CK1 para os complexos 3UZP e 4HGT.

<b>Proteína</b>	<b>Água pos. 01</b>	<b>AA + próx.</b>	<b>Dist. (Å)</b>	<b>Água pos.02</b>	<b>AA + próx.</b>	<b>Dist. (Å)</b>
3UZP_A	HOH17(312)	GLY86	2,611	HOH18 (313)	TYR56	2,287
4HGT_A	HOH 27(427)	GLY86	2,613	HOH 36 (436)	TYR56	2,633

A partir destes parâmetros e correspondentes considerações, foi realizado então a etapa de triagem virtual baseada em estrutura, partindo do mesmo universo químico de 500 mil compostos, os quais foram sendo reduzidos a cada etapa do processo de triagem, resultando ao final desta etapa, em 10 moléculas selecionadas para os testes de atividade inibitória frente a proteína CK1 $\delta$ , de acordo com o organograma descrito na (Figura 23), dividido em cinco etapas principais.

Na etapa 1, foi realizado o cálculo de docking utilizando 30% de eficiência e ao final deste processo, foram selecionados 1 mil moléculas de cada base pequena e 5 mil da base maior, CNS da ZINC, resultando em uma base de 10 mil moléculas.

Após a redução no número de moléculas já é possível utilizar 100% de eficiência na triagem subsequente (Etapa 02), resultando ao final desta etapa em 300 moléculas, que correspondem ao somatório das 50 melhores classificadas de cada uma das seis bases (50x 6).

Na etapa 03, estas 50 moléculas de cada base são redocadas até o limite de 10 conformações para cada molécula, atingindo-se uma população de 500 moléculas por base, a qual é reduzida novamente para 50 na etapa 04, por meio de inspeção visual no sítio ativo da proteína CK1 de forma a selecionar a melhor pose para cada molécula e assim fosse possível calcular as predições de atividade para aqueles compostos que possuíssem melhor perfil de atividade no sítio ativo.

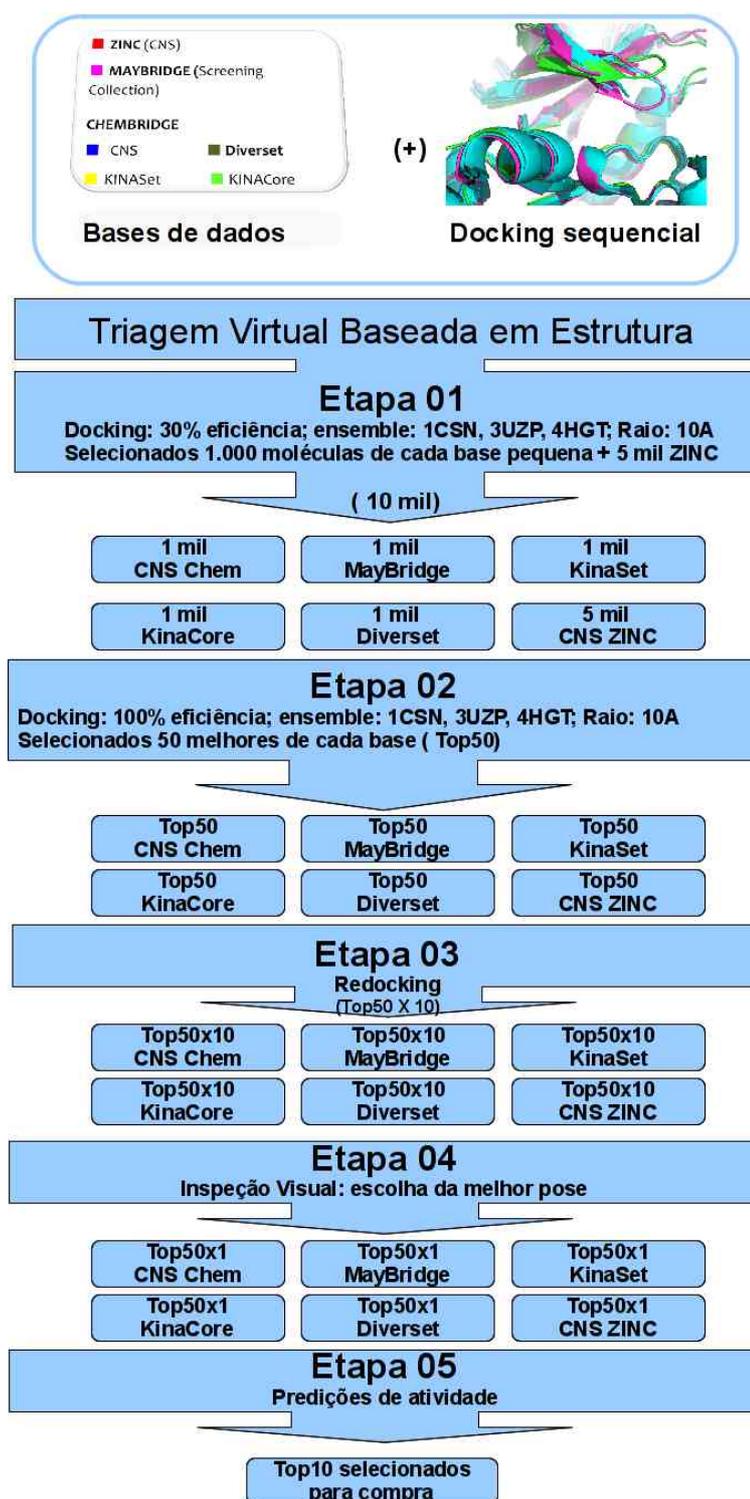


Figura 23: Esquema das técnicas de seleção utilizadas no processo de triagem virtual baseada em estrutura para a seleção de 10 compostos com potencial atividade inibitória da enzima CK1.

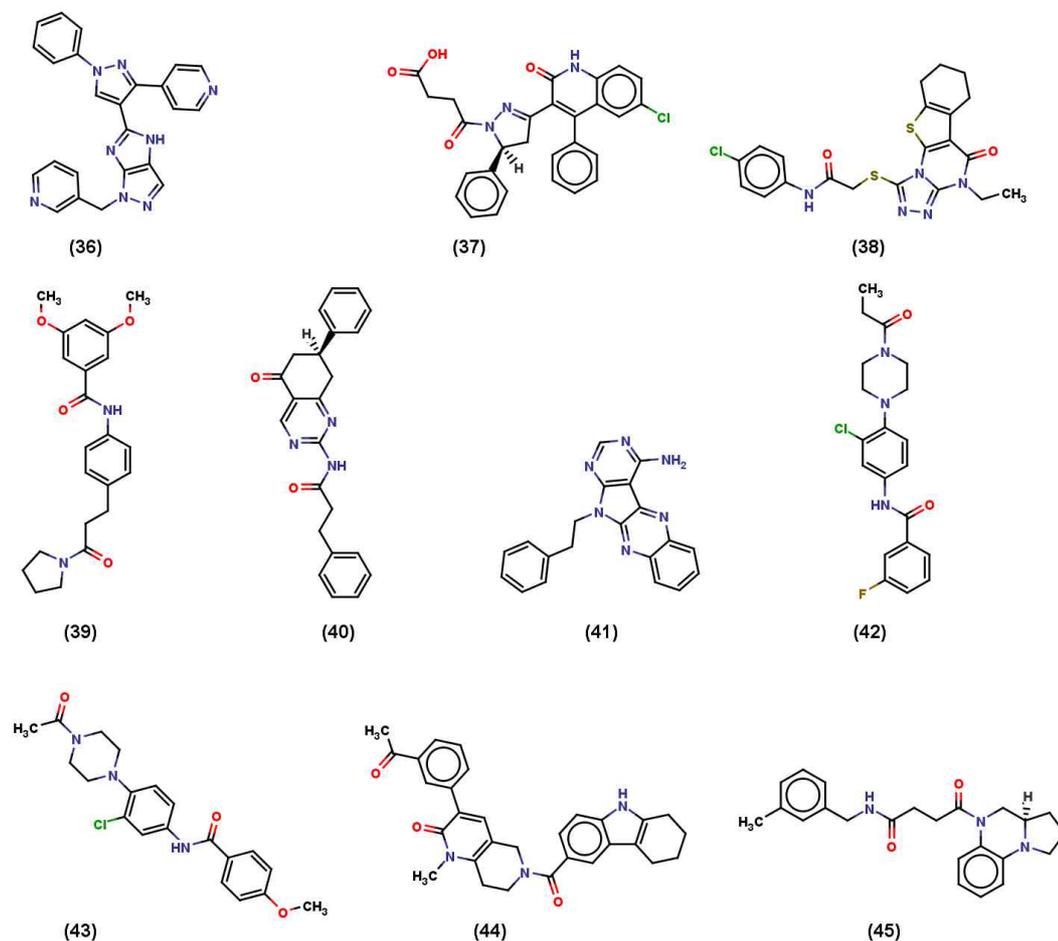


Figura 24: 10 compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura, com respeito à afinidade com a CK1 $\delta$ .

#### 4.2.7 Predições de atividade biológica

A determinação do espectro de atividade dos 300 compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura (50 melhores compostos de cada base X 06 bases) foi realizada seguindo o mesmo protocolo de predição de atividade empregado na triagem virtual baseada em ligantes, utilizando-se em conjunto os programas PASS e QikProp, com os quais obteve-se indicações como potenciais inibidores de cinase ou que possuíssem atividade inibitória para DA, e que por sua vez possuíssem potencial de atividade para o SNC.

O resultado de todas as predições da triagem virtual, além dos resultados de “docking” sequencial foram armazenados em banco de dados “in house” para referência futura no desenvolvimento de compostos para o tratamento da Doença de Alzheimer.

A seguir, são discutidos os resultados obtidos para os 10 compostos provenientes da triagem virtual baseada em estrutura, e que foram selecionados para ensaios de inibição enzimática para CK1 $\delta$ .

Nas predições que incluem o potencial de atividade pelo programa PASS foi possível observar que os 10 compostos apresentaram potenciais dentro da faixa esperada, figurando entre 3 principais atividades: Doenças Neurodegenerativas, Inibidor de Proteínas Cinases e Tratamento para Doença de Alzheimer. Em menor grau, apresentaram especificidade para Proteína Cinase, observando correspondência para CK1 $\delta$ . Além disso, os demais compostos apresentaram valores satisfatórios em suas relações Pa/Pi obtendo-se faixas de 0,6 – 0,3 e em menor grau, 0,277/0,01, para os alvos mais específicos, como observado para o composto **41**, o qual apresenta indicativo de atividade inibitória para CK1 $\delta$  (Tabela 15).

Tabela 15: Compostos selecionados ao final do processo de triagem virtual baseada em estrutura (36 – 45) submetidos à predição do espectro de atividade, com Pa>Pi demonstrando potencial de atividade para Doença de Alzheimer.

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>PASS</b>	<b>Pa/Pi</b>
36	Inibidor de Proteínas Cinase	0,645/0,01
36	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,625/0,013
36	Inibidor de Tirosina Cinase	0,37/0,023
37	Inibidor de Proteínas Cinase	0,261/0,198
38	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,319/0,12
38	Tratamento para doença de Alzheimer	0,204/0,146
39	Inibidor de Proteínas Cinase	0,312/0,131
40	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,412/0,063
41	Inibidor de Proteínas Cinase CK1 $\delta$	0,277/0,01
41	Inibidor de Proteínas Cinase CK1 $\delta$ e CK1 $\epsilon$	0,159/0,067
41	Inibidor de Proteínas Cinase CK1	0,311/0,016

<b>Compostos Seleccionados</b>	<b>PASS</b>	<b>Pa/Pi</b>
41	Inibidor de Proteínas Cinase	0,439/0,023
42	Tratamento para doença de Alzheimer	0,184/0,178
42	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,268/0,168
43	Inibidor de Proteínas Cinase	0,321/0,122
43	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,245/0,196
44	Tratamento para doença de Alzheimer	0,305/0,062
44	Inibidor de Proteínas Cinase	0,292/0,154
44	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,331/0,112
45	Tratamento de doenças neurodegenerativas	0,326/0,128

Com o objetivo de se obter um perfil para compostos com atividade para DA, também foram priorizados aqueles descritores que contivessem melhor correlação com atividade no SNC. Os resultados finais indicam que os 10 compostos seleccionados ficaram dentro dos limites estabelecidos pelo programa QikProp: com atividade moderada para SNC (+/-), dentro do esperado para capacidade de permear a barreira hematoencefálica (logBB entre -1,6 até -0,2) e absorção por via oral variando de 74 a 100% (Tabela 16).

Tabela 16: Predições de atividade para os 10 compostos seleccionados pela triagem virtual baseada em estrutura (36 a 45).

<b>Compostos Seleccionados</b>	<b>Atividade no SNC</b>	<b>Log BB (“Brain/Blood”)</b>	<b>% de absorção por via oral</b>
36	+/-	-0,659	100
37	+/-	-1,6	74,22
38	+/-	-0,807	100
39	+/-	-0,817	95,77
40	-	-1,047	100
41	+/-	-0,645	100
42	+/-	-0,272	100
43	+/-	-0,429	93,44

<b>Compostos Seleccionados</b>	<b>Atividade no SNC</b>	<b>Log BB (“Brain/Blood”)</b>	<b>% de absorção por via oral</b>
44	-	-1,326	100
45	+/-	-0,614	78

\* Valores de referência para a faixa de 95% dos fármacos: log de BB: -3,0 até 1,2; Atividade no SNC: ++ (mais ativo)/-- (inativo); % de absorção por via oral: <25% é caracterizada como baixa.

A predição de toxicidade dos compostos selecionados nesta etapa foi realizada utilizando o programa DEREK, o qual utiliza-se de um banco de dados proveniente da literatura para criar modelos baseados nas estruturas químicas avaliadas e correlaciona os possíveis riscos de toxicidade de acordo com a identificação de grupos toxicofóricos.

Da mesma forma que na etapa anterior, de triagem virtual baseada em ligantes, nos compostos analisados, a maior parte dos grupos toxicofóricos detectados é derivado de amina ou amida aromática, na mesma proporção daqueles compostos reportados na literatura para atividade inibitória para CK1, onde uma alta incidência destes grupos também ocorre. Dessa forma, para a seleção de potenciais compostos para tratamento da DA, foram selecionados aqueles que possuíam o menor número de grupos toxicofóricos relacionados a amina/amida aromáticos e ainda mantivessem modos de ligação condizentes com as interações no sítio ativo de CK1δ.

Tabela 17: Predição de toxicidade com o programa DEREK: identificação de potenciais grupos toxicofóricos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura (compostos 36 a 45).

<b>Compostos Seleccionados</b>	<b>Predição de Toxicidade</b>	<b>Grupos químicos com potencial de toxicidade</b>
36	Nada a reportar	
37	1) Carcinogenicidade	1) Amida aromática
	2) Sensibilização cutânea	2) Hidrazina ou precursor
38	1) Carcinogenicidade	1) Amida aromática
	2) Meta-hemoglobinemia	2) Anilina ou precursor
39	1) Carcinogenicidade	1) Amida aromática
	2) Meta-hemoglobinemia	2) Anilina ou precursor

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Predição de Toxicidade</b>	<b>Grupos químicos com potencial de toxicidade</b>
40	1) Carcinogenicidade	1) Amida aromática
41	Nada a reportar	
42	1) Carcinogenicidade 2) Meta-hemoglobinemia	1) Amida e amina aromáticos 2) Anilina ou precursor
43	1) Carcinogenicidade 2) Meta-hemoglobinemia	1) Amida e amina aromáticos 2) Anilina ou precursor
44	Nada a reportar	
45	Nada a reportar	

Com base nas predições de atividade e toxicidade além do estudo das interações no sítio ativo de CK1, a maior parte dos compostos selecionados possui potencial de interação nas regiões da adenina e bolsão de ligação 1 (Tabela 18).

Tabela 18: Compostos selecionados ao final do processo de triagem virtual baseada em estrutura. Com base no “docking” sequencial, foi possível selecionar o melhor valor de escore em relação aos 3 complexos cristalográficos utilizados: 1CSN, 3UZP e 4HGT.

<b>Compostos Selecionados</b>	<b>Código do PDB</b>	<b>Resultados do Docking</b>	<b>Regiões de Interação</b>	<b>Aminoácidos Envolvidos</b>	<b>Tipos de Interação (*)</b>	<b>Distância (Å)</b>
36	4HGT	94,15	Adenina	Leu85	LH	3,5
			Bolsão 01	Met80	WV	3,2
			Bolsão 01	Lys38	WV	2,9
37	1CSN	89,21	Adenina	Leu85	LH	2,9
			Adenina	Leu85	LH	4,0
			Bolsão 01	Lys38	LH	3,9
38	4HGT	89,14	Adenina	Leu85	LH	2,8
			Adenina	Glu83	LH	2,7
			Bolsão 01	Met82	LH	3,6
39	3UZP	82,79	Adenina	Leu85	LH	3,5
			Ribose	Asp91	LH	2,8
			Bolsão 01	Lys38	WV	3,5
40	4HGT	82,88	Adenina	Leu85	LH	2,6

Compostos Seleccionados	Código do PDB	Resultados do Docking	Regiões de Interação	Aminoácidos Envolvidos	Tipos de Interação (*)	Distância (Å)
			Adenina	Asp91	LH	2,7
			Bolsão 01	Lys38	WV	3,7
41	4HGT	81,15	Adenina	Leu85	LH	2,5
			Adenina	Glu83	LH	2,9
			Bolsão 01	Lys38	WV	3,6
42	3UZP	81,22	Adenina	Leu85	LH	2,6
			Adenina	Leu85	LH	3,2
				Lys38	LH	3,7
43	1CSN	81,05	Adenina	Leu88	LH	2,6
			Ribose	Asp94	LH-HOH	2,2
			Fosfato	Asp154	LH	2,9
			Fosfato	Lys41	WV	3,8
44	1CSN	93,36	Adenina	Leu88	LH	3,0
			Ribose	Asp94	LH	2,7
			Fosfato	Lys41	LH	2,9
			Fosfato	Lys41	LH-HOH	3,5
45	4HGT	89,48	Adenina	Leu85	LH	2,5
			Adenina	Leu85	LH	2,7
			Adenina	Asp91	WV	3,8

(\*) - LH, ligação de hidrogênio; WV: Interações de Van der Waals; LH-HOH: ligação de hidrogênio mediada por água.

Dentre os compostos selecionados pela triagem virtual baseada em estrutura os compostos **36**, **39**, **41** e **42** foram os que apresentaram modos de ligação mais condizentes com as interações no sítio, sendo que 3 destes (**36**, **39** e **42**) exploram o bolsão de ligação 1, como descrito por Long e colaboradores, com interações existindo principalmente entre os aminoácidos MET80, MET82 e LYS38 (Figura 25).

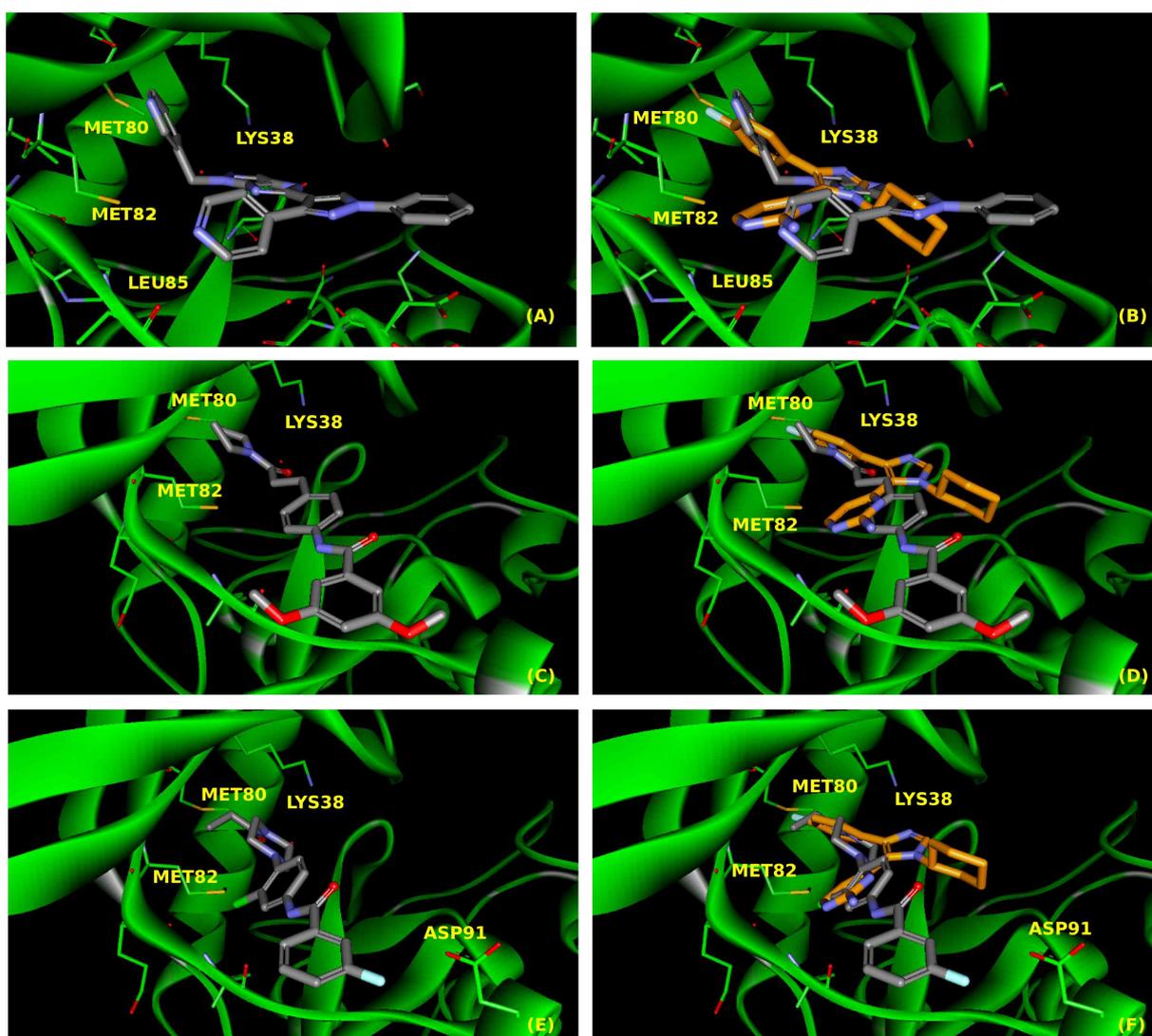


Figura 25: Compostos obtidos pela triagem virtual baseada em estrutura (átomos de carbono em cinza) que apresentaram modos de ligação semelhantes a inibidores que exploram o bolsão hidrofóbico (átomos de carbono em laranja). A, C e E (primeira coluna) evidencia a exploração do bolsão hidrofóbico pelos compostos **36**, **39** e **42**, respectivamente, enquanto que em B, D e F (segunda coluna) é possível observar que estes compostos (**36**, **39** e **42**) sobrepõem-se com o inibidor reportado na literatura PF670462, indicando modo de ligação semelhante.

Embora não explore o bolsão hidrofóbico, o composto **41** explora todas as demais regiões de interação que o inibidor PF670462. Além dos resultados obtidos pelo “docking” proteína-ligante, e tomando como base as predições de atividade e toxicidade, foi possível observar que dentre estes 10 compostos selecionados nesta última etapa, **41** destaca-se devido ao potencial de atividade para CK1δ que foi reportado pelo programa PASS (Tabela 15). Também obteve-se para ele índices satisfatórios para atividade no SNC, além de potencial de atividade moderada para o SNC, capacidade de permear a barreira hematoencefálica e % de absorção por via oral dentro da faixa padrão estabelecida pelo programa, a qual é obtida por meio da análise dos resultados das predições para fármacos já existentes no mercado (Tabela 16).

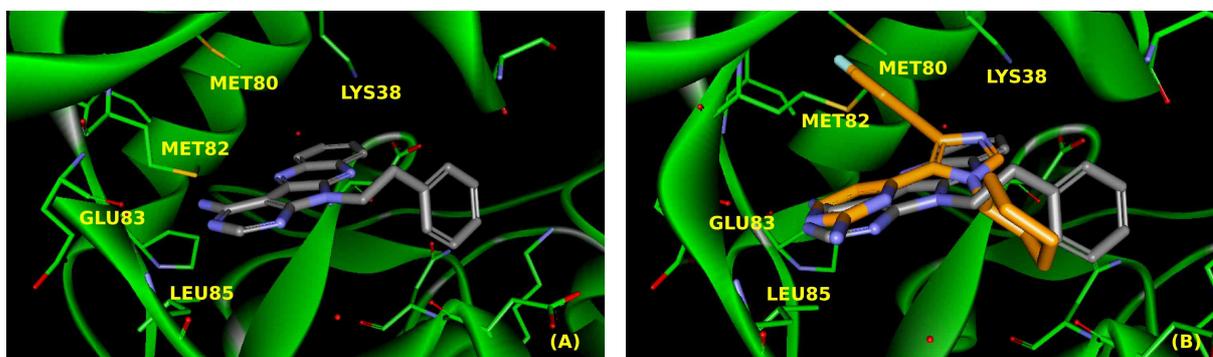


Figura 26: **A)** Modos de ligação propostos por “docking” para o composto **41**. **B)** Sobreposição do composto **42** (átomos de carbono em cinza) com inibidor PF670462 (átomos de carbono em laranja) indicando que o composto **41**, apesar de possuir modo de ligação semelhante à este inibidor, não é capaz de explorar o bolsão hidrofóbico.

## 5. CONCLUSÃO

Desordens na atividade de cinases vêm sendo atribuídas a diversas doenças, principalmente câncer e doenças neurodegenerativas. O grande e crescente número de publicações para doenças do sistema nervoso central nos recentes anos ilustram a importância deste tipo de abordagem no estudo de novos alvos terapêuticos.

O uso da estratégia de triagem virtual mostrou-se uma ferramenta importante para a sugestão de novos compostos protótipos, a serem investigados. A identificação inicial *in vitro* dos compostos **24** e **25** como potenciais ligantes da proteína CK1δ corrobora que os métodos

de química computacional são úteis no processo de planejamento de substâncias bioativas, guiando na busca de moléculas com propriedades para ligação ao alvo desejado.

Utilizando-se da estratégia de triagem virtual baseada em ligantes, foi possível selecionar compostos com atividade significativa para CK1 apenas levando em conta informações relativas à estrutura química de compostos de referência, evidenciando que, embora seja menos dispendiosa se comparada a uma triagem virtual baseada em estrutura, esta técnica é robusta e possui grande potencial de seleção de compostos protótipos.

Os resultados obtidos pelas análises estruturais da proteína e seu sítio receptor complementaram os limites obtidos na estratégia de triagem virtual baseada em ligantes onde não era possível a busca por seletividade somente com as informações de inibidores provenientes da literatura. Entretanto, com a riqueza de informações sobre a estrutura tridimensional da proteína proporcionada pela modelagem molecular bem como a análise de suas interações permitiram direcionar a seletividade para CK1 $\delta$ , buscando explorar uma característica ímpar que esta proteína possui com relação ao seu sítio ativo, e por meio deste estudo foi possível selecionar compostos com potencial de seletividade e que interajam no bolsão de ligação 1, como observado em (24, 25, 36, 39 e 42), que possuíam justamente esta característica.

Estas novas informações, obtidas por meio dos ensaios biológicos e dos modelos teóricos desenvolvidos por “docking” e por farmacóforo enriquecem o estudo desta proteína, aumentando assim, a capacidade de buscar inibidores mais seletivos para CK1 $\delta$ . Dos mais de 500 mil compostos avaliados em cada etapa de triagem virtual baseada em ligantes e em estrutura chegou-se a um número reduzido de estruturas químicas ao final do processo, e destas, os compostos 24, 25, 36, 39 41 e 42 apresentaram resultados significativos com relação ao potencial de inibição da enzima CK1 $\delta$ . Entre aqueles que já foram submetidos à ensaios de inibição enzimática, 25 apresentou seletividade para CK1 $\delta$ . Para estes compostos com melhor potencial de inibição à concentração de 10  $\mu$ M será determinado o IC<sub>50</sub> e uma extensa análise dos resultados será realizada futuramente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, A. et al. Ligand-based virtual screening using Bayesian networks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, p. 1012–20, 2010.

ALBERT, M. et al. **Inkscape: Vector Graphics Software, Version 0.48**, 2014. Disponível em: <<http://www.inkscape.org/pt/>>

ANTES, I. DynaDock: A new molecular dynamics-based algorithm for protein-peptide docking including receptor flexibility. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, p. 1084–104, 2010.

ARMSTRONG, J. W. **A review of high-throughput screening approaches for drug discovery**. Disponível em: <<http://www.combichemistry.com/review.html>>.

BENFENATI, E.; GINI, G. Computational predictive programs (expert systems) in toxicology. **Toxicology**, v. 119, p. 213–25, 1997.

BIELSKA, E. et al. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 3, p. 249–264, 2011.

BRAAK, E.; BRAAK, H.; MANDELKOW, E. M. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. **Acta Neuropathologica**, v. 87, p. 554–67, 1994.

BREDA, A. et al. Virtual Screening of Drugs: Score Functions, Docking, and Drug Design. **Current Computer - Aided Drug Design**, v. 4, p. 265–272, 2008.

BUIJSMAN, R. Structural Aspects of Kinases and Their Inhibitors. In: H. KUBINYI AND G. MÜLLER (Ed.). **Chemogenomics in Drug Discovery**. Weinheim (FRG): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., p. 191–219, 2005.

BURNETT, G.; KENNEDY, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 211, n. 2, p. 969–80, 1954.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141–2153, 2004.

CAMPS, P.; MUÑOZ-TORRERO, D. Cholinergic drugs in pharmacotherapy of Alzheimer's disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 2, n. 1, p. 11–25, 2002.

CHEONG, J. K.; VIRSHUP, D. M. Casein kinase 1: Complexity in the family. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, p. 465–469, 2011.

CHICO, L. K.; VAN ELDIK, L. J.; WATTERSON, D. M. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 892–909, 2009.

CRUCIANI, G. (ED.). **Molecular Interaction Fields**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

DROR, O. et al. Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 2333–2343, 2009.

DVIR, H. et al. 3D structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with huprine X at 2.1 Å resolution: kinetic and molecular dynamic correlates. **Biochemistry**, v. 41, p. 2970–81, 2002.

ENGEL, T. Chemoinformatics in Drug Discovery. Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol. 23. Edited by Tudor I. Oprea. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 7163–7163, 2005.

FILIMONOV, D. A. et al. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, n. 3, p. 444–457, 2014.

FLAJOLET, M. et al. Regulation of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  formation by casein kinase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 4159–4164, 2007.

GIACOBINI, E. Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy. **Journal of**

**Physiology-Paris**, v. 92, p. 283–7, 1998.

GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2042–2046, 2008.

GOMPEL, M. et al. Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian *Aplidium meridianum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1703–7, 2004.

GREENE, N. et al. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 10, n. 2-3, p. 299–314, 1999.

GROSS, S. D.; ANDERSON, R. A. Casein Kinase I: Spatial Organization and Positioning of a Multifunctional Protein Kinase Family. **Cellular Signalling**, v. 10, p. 699–711, 1998.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 37–46, 2008.

GU, J. et al. Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62839, 2013.

HANKS, S.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **The FASEB Journal**, v. 9, p. 576–596, 1995.

HAWKINS, P. C. et al. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, p. 572–84, 2010.

HERT, J. et al. New Methods for Ligand-Based Virtual Screening: Use of Data Fusion and Machine Learning to Enhance the Effectiveness of Similarity Searching. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, p. 462–470, 2006.

HORVATH, D. A virtual screening approach applied to the search for trypanothione reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 2412–23, 1997.

HUANG, S.-Y.; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3016–34, 2010.

HU, B.; LILL, M. A. Exploring the potential of protein-based pharmacophore models in ligand pose prediction and ranking. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2013.

IQBAL, K. et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1739, p. 198–210, 2005.

KANNANAYAKAL, T. et al. Casein kinase 1 phosphorylates tau and colocalizes with lesions in Alzheimer's disease and inclusion body myositis. **Neurobiology of Aging**, v. 25, p. S430–S430, 2004.

KANNANAYAKAL, T. J. et al. Casein kinase-1 isoforms differentially associate with neurofibrillary and granulovacuolar degeneration lesions. **Acta Neuropathologica**, v. 111, p. 413–421, 2006.

KIRCHMAIR, J. et al. The Protein Data Bank (PDB), Its Related Services and Software Tools as Key Components for In Silico Guided Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 7021–7040, 2008.

KNIPPSCHILD, U. et al. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 675–689, 2005.

KOEPPEN, H. et al. **Ligand-Based Virtual Screening**. In: [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. p. 61–85.

KORB, O. et al. Potential and limitations of ensemble docking. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 5, p. 1262–74, 2012.

KOSIK, K.; JOACHIM, C.; SELKOE, D. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. June, p. 4044–4048, 1986.

KRÜGER, D. M.; EVERS, A. Comparison of structure- and ligand-based virtual screening

protocols considering hit list complementarity and enrichment factors. **ChemMedChem**, v. 5, p. 148–158, 2010.

KURET, J. et al. Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 2506–15, 1997.

LAGORCE, D. et al. **In Silico ADME/Tox Predictions**. In: [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 29–124.

LARSON, E. B. New drug treatments for Alzheimer disease. **Archives of internal medicine**, v. 158, n. 9, p. 941–952, 2013.

LARSSON, S.; BACKLUND, A.; BOHLIN, L. Reappraising a decade old explanatory model for pharmacogenosy. **Phytochemistry Letters**, v. 1, n. 3, p. 131–134, 2008.

LASABENITO, M. et al. Golgi apparatus mammary gland casein kinase: Monitoring by a specific peptide substrate and definition of specificity determinants. **Febs Letters**, v. 382, p. 149–152, 1996.

LEACH, A R. Ligand docking to proteins with discrete side-chain flexibility. **Journal of molecular biology**, v. 235, n. 1, p. 345–56, 1994.

LEESON, P. Drug discovery: Chemical beauty contest. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 455–6, 2012.

LIEW, K. BIN; TAN, Y. T. F.; PEH, K. K. Taste-masked and affordable donepezil hydrochloride orally disintegrating tablet as promising solution for non-compliance in Alzheimer's disease patients. **Drug development and industrial pharmacy**, 2014.

LIU, T. et al. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D198–201, 2007.

LONG, A.; ZHAO, H.; HUANG, X. Structural basis for the interaction between casein kinase 1 delta and a potent and selective inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 956–60, 2012.

LONGENECKER, K. L.; ROACH, P. J.; HURLEY, T. D. Three-dimensional Structure of Mammalian Casein Kinase I: Molecular Basis for Phosphate Recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 257, p. 618–631, 1996.

LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug Discovery Today**, v. 7, p. 1047–1055, 2002.

MADHAVI SASTRY, G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 2013.

MARSHALL, G. Introduction to cheminformatics in drug discovery-A personal view. **Cheminformatics in Drug Discovery**. p. 1–22, 2004.

MARTI-RENOM, M. A. et al. The AnnoLite and AnnoLyze programs for comparative annotation of protein structures. **BMC Bioinformatics**, v. 8 Suppl 4, n. 4, p. 12, 2007.

MASHHOON, N. et al. Crystal Structure of a Conformation-selective Casein Kinase-1 Inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 20052–20060, 2000.

MUCKE, L. Neuroscience: Alzheimer's disease. **Nature**, v. 461, n. 7266, p. 895–7, 2009.

MUEGGE, I.; OLOFF, S. Advances in virtual screening. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 3, n. 4, p. 405–411, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

PARKER, K.; GOODMAN; GILMANS. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

PEREZ, D. I.; GIL, C.; MARTINEZ, A. Protein Kinases CK1 and CK2 as New Targets for Neurodegenerative Diseases. **Medicinal Research Reviews**, v. 31, n. 6, p. 924–54, 2011.

PINNA, L. A. A historical view of protein kinase CK2. **Cellular & Molecular Biology**

**research**, v. 40, n. 5-6, p. 383–90, 1994.

PYERIN, W.; ACKERMANN, K.; LORENZ, P. Casein Kinases. In: MARKS, F. (Ed.). **Protein Phosphorylation**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. p. 30.

REDDY, A. S. et al. Virtual Screening in Drug Discovery - A Computational Perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, p. 329–351, 2007.

RODRIGUES, R. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.

RODRIGUES, R.; SILVA, C. Pharmacophore, Similarity and ADMET Screening of Casein Kinase 1 inhibitors in Alzheimers Disease. **Current Bioactive Compounds**, p. 27–36, 2013.

SAVAGE, M. J.; GINGRICH, D. E. Advances in the development of kinase inhibitor therapeutics for Alzheimer's disease. **Drug Development Research**, v. 70, n. 2, p. 125–144, 2009.

SCHRÖDINGER, L. **QikProp V 3.8 User Manual**. New York, NY, Schrödinger, LLC, 2013.

SCHRÖDINGER, L. **Small-Molecule Drug Discovery Suite 2013-3: QikProp, Version 3.8**. New York, NY, Schrödinger, LLC, , 2013.

SCHRÖDINGER, LLC. **The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.3r1**. New York, NY, Schrödinger, LLC, 2013.

SCHWAB, C. et al. Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, p. 503–510, 2000.

SCIABOLA, S. et al. High-throughput virtual screening of proteins using GRID molecular interaction fields. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 1, p. 155–69, 2010.

SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, p. 862–5, 2004.

SINGH, T. J.; GRUNDKEIQBAL, I.; IQBAL, K. Phosphorylation of Tau-Protein by Casein Kinase-1 Converts It to an Abnormal Alzheimer-Like State. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 1420–1423, 1995.

STOTER, M. et al. Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. **Oncogene**, v. 24, p. 7964–7975, 2005.

SUMMERS, W. K. **Administration of monoamine acridines in cholinergic neuronal deficit states** Arcadia, CA, 1989.

T'JOLLYN, H. et al. Evaluation of three state-of-the-art metabolite prediction software packages (Meteor, MetaSite, and StarDrop) through independent and synergistic use. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 39, n. 11, p. 2066–75, 2011.

TRAXLER, P.; FURET, P. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. **Pharmacology & therapeutics**, v. 82, n. 2-3, p. 195–206, 1999.

VENERANDO, A. **Isoform specific phosphorylation of p53 Ser-20 by CK1 is dictated by both a local consensus and a remote docking site.** [s.l.] UNIVERSITY OF PADUA, 2010.

VERDONK, M. L. et al. Modeling water molecules in protein-ligand docking using GOLD. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6504–15, 2005.

VERDONK, M. L. et al. Protein-ligand docking against non-native protein conformers. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 11, p. 2214–25, 2008.

VIELHABER, E.; VIRSHUP, D. M. Casein kinase I: From obscurity to center stage. **Iubmb Life**, v. 51, p. 73–78, 2001.

VUORINEN, A.; ODERMATT, A.; SCHUSTER, D. In silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals. **The Journal of Steroid Biochemistry and molecular biology**, 2013.

WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.

WILLETT, P.; BARNARD, J. M.; DOWNS, G. M. Chemical Similarity Searching. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, p. 983–996, nov. 1998.

WOLFF, S. et al. Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 $\delta$ ) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1745, p. 196–206, 2005.

XIA, B. et al. A simplified PBPK modeling approach for prediction of pharmacokinetics of four primarily renally excreted and CYP3A metabolized compounds during pregnancy. **The AAPS journal**, v. 15, n. 4, p. 1012–24, 2013.

XU, R. M. et al. Crystal-Structure of Casein Kinase-1, a Phosphate-Directed Protein-Kinase. **Embo Journal**, v. 14, p. 1015–1023, 1995.

YASOJIMA, K. et al. Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. **Brain Research**, v. 865, p. 116–120, 2000.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy research : PTR**, v. 25, n. 2, p. 157–69, 2011.

ZHANG, H. et al. Support vector machine and pharmacophore-based prediction models of multidrug-resistance protein 2 (MRP2) inhibitors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 451–457, 2009.

ZHAO, X. et al. Ligand-based pharmacophore model of N-Aryl and N-Heteroaryl piperazine alpha 1A-adrenoceptors antagonists using GALAHAD. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, p. 126–36, 2010.

ZHONG, S.; ZHANG, Y.; XIU, Z. Rescoring ligand docking poses. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 13, n. 3, p. 326–334, 2010.

