



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEANDRO MARCOS SANTOS

**BUSCA *IN SILICO* DE NOVOS PROTÓTIPOS MOLECULARES PARA INIBIÇÃO
DA PROTEÍNA CINASE C IOTA EXPLORANDO O DESENHO DE LÍDERES
BASEADO EM FRAGMENTOS**

ALFENAS - MG

2023

LEANDRO MARCOS SANTOS

**BUSCA *IN SILICO* DE NOVOS PROTÓTIPOS MOLECULARES PARA INIBIÇÃO
DA PROTEÍNA CINASE C IOTA EXPLORANDO O DESENHO DE LÍDERES
BASEADO EM FRAGMENTOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr Nelson José Freitas da Silveira

ALFENAS - MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Leandro Marcos .

Busca in silico de novos protótipos moleculares para inibição da proteína cinase c iota explorando o desenho de líderes baseado em fragmentos / Leandro Marcos Santos. - Alfenas, MG, 2023.

214 f. : il. -

Orientador(a): Nelson José Freitas da Silveira.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Fragment-based lead design. 2. Medicinal chemistry. 3. Molecular docking. 4. Protein kinase c iota. 5. 7-azaindole. I. da Silveira, Nelson José Freitas, orient. II. Título.

LEANDRO MARCOS SANTOS

**BUSCA IN SILICO DE NOVOS PROTÓTIPOS MOLECULARES PARA INIBIÇÃO DA PROTEÍNA CINASE C IOTA
EXPLORANDO O DESENHO DE LÍDERES BASEADO EM FRAGMENTOS**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química

Aprovado em: 11 de setembro de 2023.

Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Fernanda Canduri
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Nelson José Freitas da Silveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/09/2023, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1079119** e o código CRC **A853C797**.

Ao Senhor dos Senhores:

Começo e Fim de toda Ciência e Sabedoria!

AGRADECIMENTOS

Nesta ocasião de entrega do manuscrito da Tese, agradeço:

Primeiramente, a DEUS e a meus pais pelo dom da Vida, da Fé e da Ciência!

A esta instituição, há 18 anos transformada em Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ / UNIFAL-MG), pela oportunidade, formação intelectual e apoio infraestrutural que me foram oferecidos para cursar meu doutoramento em Físico-Química!

Amplamente, a todas as iniciativas e agências de fomento à pesquisa nacional!

À Pró-Reitoria de Gestão de Pessoas (PROGEPE), na honrosa condição de técnico administrativo em educação (TAE) desta instituição, pelo Programa de Apoio à Qualificação dos Servidores TAEs (PROQUALITAE), concedendo-me 10 horas semanais para dedicação ao curso por meio do Regime Especial de Cumprimento de Jornada de Trabalho previstas na portaria de nº 2807 constante no processo SEI de nº 23087.008186/2018-75!

Aos docentes e discentes do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) pelo apoio e compreensão!

Sem exceção, a todos os *teams* do quadro pessoal desta instituição, efetivo ou terceirizado, diretamente envolvidos na promoção da tríade Ensino, Pesquisa e Extensão!

Sem exceção, a todos os Mestres e Agentes Formadores que contribuíram para minha educação, durante todo meu itinerário escolar, desde a Educação Básica à Superior!

Sem exceção, a todos os docentes do PPGQ / UNIFAL-MG, em especial àqueles responsáveis pelas disciplinas por mim cursadas durante a pós-graduação!

A todos os *experts* que integram minha genealogia científica, em particular, aos senhores Antônio Carlos Doriguetto e Cláudio Viegas Júnior pela orientação em minha jornada científica pregressa (Iniciação Científica e Mestrado)!

Imensamente, ao Prof. Dr Nelson José Freitas da Silveira, por me conceder sua orientação neste período de imersão científica no campo da Bioinformática, pelos conselhos e conversas informais, ensinamentos transmitidos, apoio financeiro em momentos críticos e pela profícua dedicação a mim dispensada durante minha trajetória científica em seu grupo de pesquisa *Molecular Modelling and Computer*

Simulation (MolMod-CS)!

Honrosamente, à banca avaliadora do exame de qualificação que muito contribuiu para o aprimoramento deste trabalho, formada pelo Prof. Dr Luciano Sindra Virtuoso, Prof. Dr José Maurício Schneedorf, Dr Tiago Henrique e Prof Dr Nelson José Freitas da Silveira!

Honrosamente, à banca avaliadora da Tese, composta pelo Prof. Dr Luciano Sindra Virtuoso, Prof. Dr José Maurício Schneedorf, Prof. Dr Walter Filgueira de Azevedo Júnior, Profa. Dra Fernanda Canduri e Prof. Dr Nelson José Freitas da Silveira, pelos comentários, correções, críticas construtivas e colaborações!

Aos colegas do MolMod-CS, em especial a Thiago Castilho Elias, pelo companheirismo e dicas compartilhadas para o aprimoramento científico em protocolos de Química Computacional e Bioinformática!

Grandemente a todos os personagens científicos que vieram antes de mim e contribuíram para o atual *status* da Química Medicinal, Química Computacional, Bioinformática e ciências correlatas, permitindo-me alcançar os resultados apresentados!

À minha companheira Grazielle e nossos filhos amados Leandro, Elisa e Matheus pelo apoio, carinho e compreensão durante esta árdua jornada!

Aos meus demais familiares, amigos e a todos que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

... do lado de cá da “*screen*” existe apenas um ser minimamente pensante, com os fragmentos de um capcioso quebra-cabeças ao alcance de poucos “*clicks*” ou “*assay vials*”. Certo dia desses, ele encorajou-se e decidiu desafiar-se na busca pela “*serendipity*” da inovação em fármacos. Cogita-se, que ele possa ser um daqueles entusiastas parados na esquina de algum algoritmo, que ouvindo o chamado ressonante de dois ilustres senhores da *14th street*, em *Mendeleev city*, vislumbrou o condão quimérico de transmutar Silício ($^{14}\text{Si}^{28}$) inorgânico em átomos de Carbono ($^6\text{C}^{12}$) bioativo ...

(Do autor, 2023)

RESUMO

O paradigma do desenho de compostos-líderes baseado em fragmentos moleculares é uma estratégia recente e prolífera da Química Medicinal. Na última década, sete moléculas oriundas desta abordagem foram promovidas a fármacos para a quimioterapia de cânceres perniciosos. A implementação de protocolos *in silico*, particularmente a simulação de *docking* molecular, contribuiu decisivamente para o sucesso de alguns desses fluxos de trabalho, e agregou indiscutivelmente maiores vantagens ao desenho racional de novos ligantes partindo de fragmentos. A proteína cinase c iota (PKC ι) é um biomarcador implicado em várias disfunções humanas, e vem recebendo merecida atenção para o desenvolvimento de novos inibidores. As estruturas cristalográficas reportadas para esta cinase corroboram o bolso de ligação do ATP como uma das principais cavidades para ancoragem de ligantes de pequenas moléculas. Preliminarmente, a inspeção visual minuciosa deste sítio de ligação sugeriu que importantes *hotspots* foram subexplorados no modo de ligação estabelecido com o inibidor submicromolar AFU601, cocrystalizado na estrutura PDB ID: 6ILZ. O desenho racional de novos inibidores virtuais, partindo de um fragmento central contendo o núcleo 7-azaindol, possibilitou a exploração otimizada destes *hotspots*, e permitiu interações mais exergônicas, com melhorias significativas na energia de ligação e afinidade. No total, 592 ligantes inéditos tiveram suas propriedades físico-químicas e biológicas preditas por diferentes ferramentas computacionais. Além do aspecto farmacodinâmico, o perfil farmacocinético destes compostos foi investigado no ambiente virtual. A seletividade das melhores moléculas pela PKC ι foi avaliada *in silico* frente a outras cinases do quinoma humano, e estes ligantes com a melhor combinação de propriedades *drug-like* foram submetidos a ensaios preditivos de acessibilidade e viabilidade sintéticas. Os compostos mais promissores foram iterativamente aprimorados em etapas subsequentes de otimização estrutural guiada por *docking*, e seus resultados satisfatórios encorajam a síntese química de amostras físicas para ensaios biológicos em modelos experimentais de doenças PKC ι -dependentes.

Palavras-chave: desenho de compostos-líderes; fragmentos moleculares; química medicinal; *docking* molecular; proteína cinase c iota; 7-azaindol.

ABSTRACT

Fragment-based lead design paradigm is a recent and prolific strategy in medicinal chemistry. Over the last decade, seven molecules from this approach have become approved drugs for the chemotherapy of pernicious cancers. *In silico* protocols, particularly molecular docking simulations, have contributed decisively to the success of some of these workflows, and have undoubtedly added greater advantages to the rational design of new ligands based on fragments. Protein kinase c iota (PKC ι) is a biomarker implicated in various human dysfunctions, and has been receiving considerable attention for the development of new inhibitors. The crystallographic structures reported for this kinase corroborate the ATP binding pocket as one of the main binding sites for small molecules. Preliminarily, close visual inspection of this pocket suggested that important hotspots were unexploited in the binding mode established with the submicromolar inhibitor AFU601, cocrystallized in the PDB ID: 6ILZ structure. The rational design of new virtual inhibitors, starting from a central fragment containing the 7-azaindole moiety, has enabled the optimized exploitation of these hotspots, and provided more exergonic interactions, with significant improvements in binding energy and affinity. In total, 592 novel ligands had their physicochemical and biological properties predicted by different computational tools. In addition to the pharmacodynamic aspect, the pharmacokinetic profile of these compounds was investigated in the virtual environment. The selectivity of the best molecules for PKC ι was evaluated *in silico* against other kinases of the human kinome, and these ligands exhibiting the best set of drug-like properties were analyzed in predictive tests of synthetic accessibility and feasibility. The most promising compounds were iteratively enhanced in subsequent docking-driven structural optimization steps, and their satisfactory results encourage the chemical synthesis of physical samples for biological assays in experimental models of PKC ι -dependent diseases.

Keywords: fragment-based lead design; medicinal chemistry; molecular docking; rational design; protein kinase c iota; 7-azaindole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação imagética do ecossistema <i>Drug Design</i> , que, segundo a perspectiva deste autor, consiste numa problemática composta por 3 partes principais (Ligante; Alvo; e, Doença), cuja solução depende do emprego de múltiplas abordagens da Química Medicinal, do ferramental estratégico da Era 4.0, e de otimização multi-parâmetros.....	28
Figura 2 -	Estrutura molecular do vemurafenib (ZELBORAF®).....	43
Figura 3 -	Perfil energético (<i>score</i> em kcal/mol) de termos do modelo matemático do <i>Vina</i> em função da distância inter superfícies (<i>surface distance, d</i>).....	65
Figura 4 -	Fluxograma ilustrativo de todas as etapas executadas durante o protocolo FBLD <i>in silico</i> praticado neste fluxo de trabalho iniciado no primeiro semestre de 2019 e finalizado no primeiro semestre de 2023. As ferramentas computacionais exploradas em cada estágio foram: 1°) <i>Scifinder, PDB, PubMed, PubChem, ChEMBL, e Google Scholar</i> ; 2°) <i>ZINC, DRUGBANK, Enamine, clinicaltrials.gov, PDB, PDBbinding, BindingDB, KLIFS, KIDFamMap, KinBase, PKIDB, AutoDockTools 1.5.6 e Vina</i> ; 3°) <i>ChemDraw 18.1, ACD / ChemSketch, Molview,, Marvin JS, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, Chem3D, Molegro, Avogadro, Molview, Molstar, PMV, Pymol, Openbabel, UCSF Chimera, RDKit, eMolfrag, AutoDockTools 1.5.6, e Vina</i> ; ; 4°) <i>MBIsoster, SwissBioisostere, SwissSimilarity, ZINC, PubChem, Enamine, AutoDockTools 1.5.6, e Vina</i> ; 5°) <i>MBIsoster, Swiss Bioisostere, Swiss Similarity, ChemDraw 18.1, Molview, AutoDockTools 1.5.6, e Vina</i> ; 6°) <i>SwissADME, Pro-ToxII, e PASS</i> ; 7°) <i>PDB, AutoDockTools 1.5.6, e Vina</i> ; e, 8°) <i>Scifinder</i>	80
Figura 5 -	Representação ilustrativa da primeira etapa (Escolha do Alvo) executada durante o protocolo FBLD <i>in silico</i> praticado neste fluxo de trabalho.....	81

- Figura 6 - Representação ilustrativa da segunda etapa (Formação da Quimioteca Padrão) executada durante o protocolo FBLD *in silico* praticado neste fluxo de trabalho..... 82
- Figura 7 - Representação ilustrativa da partição do sítio principal da PKCi em 3 sub-bolsos (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop) explorados em rotinas de FBVS durante as etapas 3 e 4 (Fragmentoteca Padrão e Fragmentoteca Isóstera, respectivamente). Aos subsítios A, D e L foram encaixados todos os fragmentos deste trabalho, representados pelas variáveis X, Y e Z. Esta separação em sub-bolsos distintos visou a otimização parcial do problema, possibilitando encontrar os melhores fragmentos para cada uma das regiões de reconhecimento molecular no sítio catalítico da enzima. Os melhores fragmentos para o subsítio D foram inicialmente investigados, e representaram 33,3% da estrutura molecular dos ligantes finais, supondo que estes seriam formados pela junção de 3 subestruturas. Posteriormente, os sítios laterais (A e L) foram explorados, completando a composição estrutural dos novos inibidores racionalmente desenhados..... 85
- Figura 8 - Representação ilustrativa da expansão amostral na coleção química de fragmentos realizada durante a etapa 4 (Formação da Fragmentoteca Isóstera). Os fragmentos-padrão foram adotados como pontos de partida químicos (“fragmentos-pai”) para originar, por meio de isosterismo e similaridade molecular (coeficiente de Tanimoto $\geq 80\%$), os novos fragmentos modificados..... 87
- Figura 9 - Representação ilustrativa da estratégia inicial de química medicinal (abordagem ABLD) adotada para concepção das primeiras séries químicas investigadas nesta Tese. Destaca-se a mudança conformacional significativa da molécula AFU601 para se encaixar no sítio receptor da enzima. Este *insight* estrutural sugeriu que moléculas com contorno molecular em formato de “U” devem possuir maior complementaridade 3D

	com a cavidade de ligação, aumentando a área superficial de interação do ligante com os pontos de reconhecimento molecular do receptor (Modelo chave-fechadura).....	88
Figura 10 -	Representação ilustrativa da principal estratégia de química medicinal (abordagem FBLD) explorada nesta Tese para concepção das séries químicas mais potentes <i>in silico</i> contra o alvo estudado. Moléculas em forma de 'U' foram construídas pela junção de 3 partes estruturais, correspondentes aos fragmentos mais promissores para cada sub-bolso de ligação. Tais fragmentos foram combinados entre si (química combinatória computacional em pequena escala) empregando as técnicas de <i>fragment linking</i> e <i>fragment merging</i>	89
Figura 11 -	Representação ilustrativa da sexta etapa referente à predição de parâmetros ADME e druglikeness (plataforma <i>SwissADME</i>), de espectro de ação (plataforma <i>PASS</i>), e de toxicidade (plataforma <i>Pro-ToxII</i>).....	91
Figura 12 -	Representação ilustrativa da sétima etapa da Tese referente à predição de seletividade dos inibidores virtuais de PKCi mais promissores em um painel de 14 cinases do quinoma humano.	92
Figura 13 -	Representação ilustrativa da oitava etapa do fluxo de trabalho referente à predição de acessibilidade e viabilidade sintéticas dos inibidores virtuais de PKCi mais promissores. O <i>SMILES</i> ou a estrutura 2D de cada um dos ligantes selecionados foi utilizado como argumento de entrada no ambiente da plataforma do <i>Scifinder</i>	93
Figura 14 -	Representação ilustrativa das unidades assimétricas de 4 das 10 estruturas cristalográficas depositadas no PDB para a enzima PKCi, com suas respectivas celas unitárias, grupos espaciais e resolução atômica. Com exceção da estrutura PDB ID: 5LI9, as demais são homomultiméricas, ou seja, apresentam a mesma cadeia polipeptídica em estados conformacionais distintos num mesmo arranjo 3D. Estas conformações proteicas são representadas propositalmente	

	com cores diferentes em cada uma das celas unitárias. A última pesquisa estrutural foi realizada no PDB em 07 de Agosto de 2023.....	94
Figura 15 -	Representação gráfica de cadeias específicas pertencentes às 4 estruturas da PKCi explorada nesta Tese. Em destaque, e de maneira ampliada, as pequenas moléculas que cocristalizaram com a enzima em cada estrutura (TPO = treoninafosfato; IMD = imidazol; ACT = acetato; FMT = ácido fórmico; PEG = polietilenoglicol; MRD = hexilenoglicol; ATP = adenosina trifosfato; ACP = éster adenilato de ácido fosfometilfosfônico; H ₂ O = moléculas de água; e, SO ₄ ²⁻ = íons sulfato.....	95
Figura 16 -	Resultados de <i>re-docking</i> e <i>cross-docking</i> dos padrões AFU601 e ATP com diferentes cadeias e estruturas da PKCi.....	97
Figura 17 -	Representação 2D, gerada pelo <i>software</i> BIOVIA <i>Discovery Studio Visualizer</i> , do modo de ligação do ATP quando complexado na cadeia A da estrutura PDB ID: 3A8W. Como ilustrado na figura, no mínimo 8 moléculas de H ₂ O participam do empacotamento, interagindo fortemente com grupos polares e rotáveis do substrato.....	98
Figura 18 -	Representação 2D, gerada pelo <i>software</i> BIOVIA <i>Discovery Studio Visualizer</i> , do modo de ligação do inibidor AFU601 quando complexado na cadeia A da estrutura PDB ID: 6ILZ, com seus principais hotspots de reconhecimento molecular.....	99
Figura 19 -	Representação 3D do inibidor AFU601 cristalizado no sítio ortostérico da PKCi (cadeia 6ILZa), destacando, com linhas pontilhadas amarelas, as fortes interações coulômbicas envolvendo os resíduos Asp396 e Lys283 o N piridínico do ligante. Átomos de H foram omitidos na figura por questões de clareza.....	100
Figura 20 -	Representação 3D do inibidor AFU601 cristalizado no sítio ortostérico da PKCi (cadeia 6ILZc), destacando, com linhas pontilhadas amarelas, as fortes interações coulômbicas	

	envolvendo os resíduos Asp553, Asp339 e Gln555 o NH piperazínico terminal do ligante. Átomos de H foram omitidos na figura por questões de clareza.....	100
Figura 21 -	Distribuição dos complexos P-L formados entre o alvo PKCi e ligantes padrão por faixas de energia de ligação (BE).....	103
Figura 22 -	(a) Valores médios de BE, e (b) valores médios de LE para os ligantes da quimioteca padrão. A linha vermelha em 22b representa a LE mínima considerada na literatura (LE = -0,30 kcal.mol ⁻¹ .átomo pesado ⁻¹).....	104
Figura 23 -	(a) Valores médios de BE, e (b) valores médios de LE para os ligantes da fragmentoteca padrão. Destaques circulados em laranja para mostrar o pior e o melhor fragmento (24CFMMCS e 52CFMMCS, respectivamente), bem como a mudança no ranqueamento dos fragmentos 42CFMMCS e 52CFMMCS. A linha vermelha representa a LE mínima considerada na literatura (LE = -0,30 kcal.mol ⁻¹ .átomo pesado ⁻¹). A linha verde representa a LE de corte (LE = -0,50 kcal.mol ⁻¹ .átomo pesado ⁻¹) considerada neste trabalho para a etapa de FBVS....	105
Figura 24 -	Fragmentos 52CFMMCS e 24CFMMCS com o melhor e pior desempenho, respectivamente, nos valores de LE.....	106
Figura 25 -	Ligantes 52MMCS e 115MMCS planejados com abordagem ABLD auxiliada pelo software <i>MB-Isoster</i> e <i>SwisBioisostere / SwissSimilarity</i> . Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.....	119
Figura 26 -	Fragmentos centrais mais frequentes nas estruturas moleculares dos ligantes mais promissores nesta etapa do trabalho. Em destaque, nos círculos vermelhos tracejados, as posições vetoriais para expansão molecular com a inserção dos grupos substituintes laterais.....	120
Figura 27 -	Ligantes promissores derivados do 7-AI desenhados via FBLD e Química Combinatória Computacional em pequena escala. À	

esquerda, a molécula 502MMCS com BE = -12,9 Kcal.mol⁻¹ e LE = -0,38 kcal.mol⁻¹.átomo pesado⁻¹. À direita, a molécula 403MMCS com BE = -15,2 kcal.mol⁻¹ e LE = -0,45 kcal.mol⁻¹.átomo pesado⁻¹..... 121

Figura 28 - Dois ligantes promissores, 574MMCS e 583MMCS, desenhados após tentativa bem-sucedida de otimização estrutural do ligante 403MMCS visando melhorias no seu perfil ADMET *in silico*..... 123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Termos e pesos que contribuem para a estimativa dos valores da função de interação, f_{ij} , implementada no <i>software AutoDock Vina</i>	64
Quadro 2 - Dados de diferentes cadeias e estruturas da PKCi. As estruturas foram sobrepostas aos pares no ambiente do <i>software Pymol</i> , e adotando a cadeia A da estrutura 6ILZ como referência.....	96
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média (kcal.mol ⁻¹ .átomo pesado ⁻¹) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = <i>Loop</i>). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.....	105
Quadro 4 - Fragmentos isósteros com valores médios de LE (kcal.mol ⁻¹ .átomo pesado ⁻¹) melhores que o valor de corte (-0,50). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.....	115
Quadro 5 - Energias de ligação (BEs) obtidas de ensaios para simulação molecular de docking através do <i>software AutoDock Vina</i> , visando avaliar a afinidade de 15 ligantes frente a múltiplas cinases para inferir sobre sua seletividade <i>in silico</i> pela PKCi.....	125
Quadro 6 - Resultados de viabilidade sintética <i>in silico</i> obtidos na plataforma do <i>Scifinder</i> para quatro moléculas inéditas desenhadas neste trabalho através da abordagem FBLD.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABDD	Analog-Based Drug Design
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity
7-AI	7-Azaindol
BA	Binding Affinity
BE	Binding Energy
CADD	Computer-Aided Drug Design
CFBLD	Computational Fragment-Based Lead Design
CRX	Cristalografia de Raios-X
DD	Drug Design
EC	Enzyme Commission number
FBLD	Fragment-Based Lead Design
FBVS	Fragment-Based Virtual Screening
FDA	United States Food and Drug Administration
F2L	Fragment-to-Lead
HK	Human Kinome
H2L	Hit-to-Lead
HTS	High Throughput Screening
LE	Ligand Efficiency
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PD	Pharmacodynamics or pharmacodynamic profile
PDB	Protein Data Bank
PK	Pharmacokinetics or pharmacokinetic profile
PKC	Protein Kinase C
PKC _ι	Protein Kinase C iota
RDD	Rational Drug Design
SBDD	Structure-Based Drug Design
Ro3	Rule of Three
Vina	AutoDock Vina molecular docking software

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	O GRANDE PARADIGMA DA QUÍMICA MEDICINAL.....	23
2.2	ASCENSÃO DE NOVOS PARADIGMAS.....	26
2.2.1	Paradigma do análogo ativo.....	27
2.2.2	A era dos computadores e os novos paradigmas da química medicinal.....	29
2.2.3	O paradigma dos fragmentos moleculares.....	36
2.2.3.1	Aspectos gerais de uma campanha de FBLD.....	37
2.2.3.2	Vemurafenib e outras campanhas bem-sucedidas.....	41
2.3	A BIOLOGIA E O ALVO.....	45
2.3.1	Protein data bank.....	50
2.4	SUÍTE AUTODOCK: UMA CAIXA VIRTUAL DE FERRAMENTAS. .	52
2.4.1	Perspectiva histórica.....	52
2.4.2	Autodock vina.....	53
2.4.2.1	Algoritmo BFGS.....	57
2.4.2.2	Algoritmo ILS.....	59
2.4.2.3	Função de pontuação.....	60
2.5	UM PONTO NO ESPAÇO BIOLÓGICO: PROTEÍNA CINASE C IOTA.....	68
3	OBJETIVOS.....	76
3.1	OBJETIVO GERAL.....	76
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	76
4	METODOLOGIA.....	79
4.1	ESCOLHA DO ALVO.....	79
4.2	CRIAÇÃO DA QUIMIOTECA PADRÃO.....	80
4.3	ENSAIOS DE DOCKING.....	81
4.4	CRIAÇÃO DA FRAGMENTOTECA PADRÃO.....	84
4.5	CRIAÇÃO DA FRAGMENTOTECA ISÓSTERA.....	85
4.6	CRIAÇÃO DA QUIMIOTECA ISÓSTERA.....	87
4.7	ENSAIOS ADMET IN SILICO.....	89

4.8	ENSAIOS DE SELETIVIDADE IN SILICO.....	90
4.9	ENSAIOS DE ACESSIBILIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA IN SILICO.....	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
5.1	ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DA PKC α DEPOSITADAS NO PDB.....	92
5.2	DOCKING DOS PADRÕES CRISTALOGRÁFICOS DO AFU601 E ATP.....	94
5.3	DOCKING DA QUIMIOTECA PADRÃO.....	100
5.4	DOCKING DA FRAGMENTOTECA PADRÃO.....	103
5.5	DOCKING DA FRAGMENTOTECA ISÓSTERA.....	114
5.6	DOCKING DA QUIMIOTECA ISÓSTERA.....	119
5.7	ENSAIOS ADMET IN SILICO.....	123
5.8	ENSAIOS DE SELETIVIDADE IN SILICO.....	124
5.9	ENSAIOS DE ACESSIBILIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICAS IN SILICO.....	127
6	CONCLUSÕES.....	129
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
	REFERÊNCIAS	134
	GLOSSÁRIO	153
	APÊNDICES	157

1 INTRODUÇÃO

Em face das inúmeras dificuldades de se descobrir novos fármacos, tornou-se uma máxima na comunidade científica dedicada ao assunto, que as chances de se obter êxito neste ofício aumentam se tais moléculas forem racionalmente planejadas. (1) O desenho racional de um fármaco envolve o emprego extensivo de inúmeras ferramentas disponíveis na tentativa de se obter moléculas com propriedades farmacodinâmicas (PD) e farmacocinéticas (PK) cada vez mais atraentes, e melhoradas em relação a seus precursores ou fármacos de referência. (2) Neste sentido, as técnicas computacionais tornaram-se imprescindíveis no planejamento de fármacos em plena Era 4.0, pois permitem prever e prever, *in silico*, os perfis PD e PK para uma dada molécula com boa fidedignidade e correlação experimental. Sendo assim, os estudos guiados por computadores possuem grande chance de apontar na direção correta para novas descobertas, resultando num maior número de campanhas bem-sucedidas de Química Medicinal. Todavia, é sensato admitir que é somente o comportamento *in vivo* desta nova molécula que vai provar, ou não, sua eficácia clínica e embasar seu uso seguro em humanos. Outrossim, deve-se salientar que, devido a sua alta complexidade, é praticamente impossível traduzir, com exatidão, qualquer ambiente vivo em um algoritmo perfeito e temporalmente solucionável. (3)

Desde o advento da informática, nos meados do século passado, é indiscutível o aumento na capacidade do ambiente *in silico* mimetizar ambientes reais. Não seria errôneo afirmar que, na atualidade, praticamente todas as áreas da Ciência não conseguem produzir conhecimento sem o auxílio de computadores ou métodos computacionais. A posse de uma gama enorme de valiosas informações teóricas, semi-empíricas e empíricas acerca do objeto de estudo, permitiu a criação de vários métodos computacionais que simulam, com cada vez mais acurácia, o seu ambiente real, propulsionando a inovação intelectual em todas as searas do conhecimento. (4) Uma das áreas que, desde os anos 1980, lança mão de ferramentas computacionais é a área de prospecção de novos fármacos. Resta indubitável que este é um campo científico essencialmente multi e interdisciplinar, e conta com a participação de profissionais de áreas essenciais (Química, Física, Matemática, Biologia, Medicina, dentre outras). (5)

O caminho que uma molécula bioativa promissora tem que percorrer desde o

tubo de ensaio até a prateleira de uma farmácia é longo e oneroso. Estima-se que, de cada dez mil moléculas, apenas uma tem chances reais de alcançar o status de fármaco, após várias etapas de estudo clínico. Isto significa que para uma molécula se tornar um fármaco, ela tem que demonstrar, *in vivo* e *a posteriori*, perfis PD e PK satisfatórios. (6) Está muito claro atualmente que um dos grandes anseios dos artífices da área é obter moléculas com cada vez mais especificidade na sua ação *in vivo*, direcionada a um único alvo (paradigma *one drug-one target*), (7) ou a múltiplos alvos (paradigma *one drug-multiple targets*). Tal atributo é mais facilmente alcançado se houver o conhecimento aprofundado e minucioso da estrutura / funcionalidade do(s) alvo(s) biológico(s) na biofase. (8)

É inegável que as grandes companhias farmacêuticas e os laboratórios de pesquisa em Química Medicinal planeta afora respiram constantemente em um cotidiano imbuído pela necessidade de invenção e inovação. (9, 10) De maneira pragmática, os seus fluxos de trabalho são voltados para esta finalidade, pois somente assim podem contribuir para o progresso da Ciência, e assumir um patamar competitivo, no anseio de se perpetuar por mais tempo no cenário atual de um mercado implacável e globalizado. Sob este prisma, e em face dos meandros existentes no longo e oneroso caminho que novas moléculas bioativas devem perpassar entre a pesquisa básica e as prateleiras das farmácias, os especialistas e entusiastas da área são unânimes em ponderar que as possibilidades de inovação radical, no que tange a identidade química do ingrediente farmacêutico ativo (IFA), (11, 12) estão se exaurindo paulatinamente ao longo do tempo, e dependem de alguns pontos cruciais elencados a seguir:

- (a) Fluxo contínuo e crescente de investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D, Recursos Físico-Instrumentais / Infraestrutura de Pesquisa);
- (b) Formação estratégica de Recursos Humanos com bom nível de engajamento intelectual, científico e pluridisciplinar (Líderes científicos e estafes qualificados);
- (c) Consolidação de parcerias entre universidade e indústria (Iniciativas público-privadas);
- (d) Descoberta / Elucidação de novas vias bioquímicas com seus alvos desafiadores e clinicamente relevantes (Avanços contínuos no campo da

Genômica / Proteômica);

- (e) Triagem / Identificação eficiente de novas moléculas semelhantes a fármacos que estão imersas num espaço químico estimado em 10^{63} moléculas com até 30 átomos não-hidrogenóides;
- (f) O próprio processo criativo *per se*, intrínseco ao ofício de arquitetar novas moléculas líderes baseando-se em artifícios racionais (*Hit-to-Lead*, “H2L”);
- (g) Métodos viáveis e eficientes para síntese total de moléculas de interesse farmacêutico;
- (h) Aperfeiçoamento das técnicas de análise química instrumental aplicadas a métodos biofísicos / bioquímicos;
- (i) Protocolos céleres, igualmente confiáveis e biosseguros, para testagem da eficácia clínica / segurança de novas moléculas aspirantes a fármacos;
- (j) Ascensão de novos paradigmas e aplicação dos recursos tecnológicos oferecidos pela Era 4.0, visando aprimorar e expandir o ferramental prático-estratégico para abordagem dos pontos anteriores. (Exceto os dois primeiros, que possuem caráter mais conjuntural-político do que puramente científico).

Por certo, cada um dos pontos supracitados possuem conteúdo literário-científico suficiente para render páginas incontáveis de discussão em artigos técnicos ou em capítulos de livros-texto. Entretanto, o presente manuscrito se limita a apresentar os resultados alcançados através da prospecção virtual de novas moléculas-líderes explorando múltiplas ferramentas computacionais e uma estratégia recente da Química Medicinal, que se situa dentro do universo de assuntos delimitado pelo último ponto. Em caráter multíscio, cabe mencionar que esta nova abordagem é referida tecnicamente pela sigla inglesa FBLD (significando *Fragment-Based Lead Design* ou *Fragment-Based Lead Discovery*), podendo ser livremente traduzida como “Desenho de Compostos Líderes Baseado em Fragmentos Moleculares”. Ela admite outra sinonímia amplamente empregada, podendo ser referida como FBDD (significando *Fragment-Based Drug Design* ou *Fragment-Based Drug Discovery*). (13)

2 REVISÃO DA LITERATURA

Destarte, como o presente trabalho de pesquisa básica em Química Medicinal *in silico* fundamenta-se principalmente no paradigma FBLD, pretende-se promover a difusão de conhecimento na área, oferecendo uma visão geral sobre esta temática, abordada de maneira holística e com o devido delineamento teórico-prático, abrangendo seu estado da arte, com alguns aspectos importantes relacionados ao contexto histórico de seu surgimento, suas dificuldades e vantagens, suas provas de conceito corroborativas com casos de sucesso, bem como, algumas mudanças e tendências observadas na área ao longo de suas três décadas de ascensão.

2.1 O GRANDE PARADIGMA DA QUÍMICA MEDICINAL

Se o século XIX findou com grandes acontecimentos para a Ciência, o século seguinte também foi palco de avanços substanciais em todas as áreas do conhecimento, e iniciou-se em igual nível. A Indústria Farmacêutica se estabelecia com grande vigor na época e o novo século literalmente foi aberto com uma verdadeira “*chave de ouro*”, numa sugestiva alusão ao modelo chave-fechadura proposto pelo químico orgânico alemão Hermann Emil Fischer (1852-1919), agraciado com os louros do prêmio Nobel de Química em 1902 por seus meritórios trabalhos envolvendo carboidratos e bases purínicas. (14, 15)

Em 1894, Fischer, que inclusive foi um dos orientadores de Eduard Buchner (Nobel de 1907), sabia que a sacarase era a enzima responsável por promover a quebra da sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) em glicose ($C_6H_{12}O_6$) mais frutose ($C_6H_{12}O_6$). Destarte, Fischer dedicou-se no estudo da atividade glicolítica da sacarase frente a outros análogos moleculares da sacarose, sendo que tais compostos foram por ele mesmo obtidos em seu laboratório. Fischer percebeu que estes produtos eram resistentes à enzima e, portanto, não eram quimicamente alterados por ela. Adicionalmente, outros resultados importantes foram alcançados por Fischer ao demonstrar que a sacarase e outras enzimas glicolíticas apresentavam a surpreendente capacidade de diferenciar até mesmo os antípodas ópticos (estereoisômeros) dos açúcares, uma vez que todos os carboidratos (exceção do mais simples que é a cetotriose, $C_3H_6O_3$) podem se apresentar na forma de seus enantiômeros, o dextrógiro (D, +) e o levógiro (L, -). (14, 16)

Persuadido por estes resultados, Fischer concebeu a pertinente analogia (da chave com a fechadura), que nomeia e ilustra o seu modelo, refletindo a capacidade brilhante e, ao mesmo tempo, simples, que ele teve para intuir sobre o modo como se dava, segundo sua acertada perspectiva, a interação entre o ligante (a chave) e seu bioreceptor (a fechadura). A ideia central que norteou a proposição de Fischer foi regida pela suposta complementaridade estrutural existente entre ambos (ligante-alvo = chave-fechadura), a qual seria responsável por favorecer a interação e desencadear algum efeito biológico (ação de abrir a fechadura). A descrição fornecida pelo modelo satisfazia uma explicação plausível para a especificidade de uma enzima frente ao seu substrato natural, revelando o âmago da Química Medicinal ao sugerir a noção de uma alta completividade estereoquímica propiciando encaixe tridimensional perfeito e a formação de um complexo enzima-substrato (E-S) estável. Entretanto, provavelmente instigado pela observação de relatos de efeitos adversos associados ao uso de alguns medicamentos da época, Fischer também admitiu a possibilidade de uma mesma chave poder abrir diferentes fechaduras e, também a recíproca, com a mesma fechadura sendo aberta por diferentes chaves, caso houvesse complementaridade estrutural mínima e suficiente para que isto ocorresse. (17)

Nesta mesma década, em 1908, outro nobelista, o médico alemão Paul Ehrlich (1854-1915), propôs o modelo da *“bala mágica”* que preconizava a possibilidade de algumas moléculas agirem especificamente sobre o alvo molecular relacionado à doença sem causar efeitos colaterais significativos (cunhando a expressão *“one drug-one target”*, *“um fármaco-um alvo”*, que também nomeia seu modelo). Ehrlich idealizou uma analogia na qual o ligante (a bala) pudesse atingir direta e unicamente o alvo biológico, combatendo o agente patogênico sem afetar as células saudáveis do hospedeiro. Nesta especificidade de ação, a qual confere direcionamento certo do ligante até o bioreceptor molecular de interesse, reside a justificativa do adjetivo *“mágica”* atribuído à bala (algo semelhante a um projétil perfeito que atinge exatamente o alvo almejado). (18)

Obstinado por esta premissa, Ehrlich e sua equipe empenharam esforços visando encontrar um fármaco que fosse eficaz contra a sífilis sem causar sérios efeitos tóxicos aos pacientes, o que infelizmente era comum entre as poucas opções do arsenal farmacológico da época para a terapia desta infecção bacteriana com elevado índice de mortalidade no início daquele século. A descoberta da

arsfenamina ($C_{12}H_{14}As_2Cl_2N_2O_2$), a molécula de número 606 de uma série química sintetizada com aproximadamente mil compostos derivados de arsênio (As), foi a grande prova de conceito que Ehrlich buscava, visto ter proporcionado a cura da sífilis mantendo a qualidade de vida dos infectados. Ou seja, conclusivamente ele conseguiu acertar o alvo da doença sem prejudicar o organismo acometido. Ehrlich e sua equipe encontraram a bala mágica para a sífilis e tal proeza acabou lhe rendendo, juntamente com outros importantes trabalhos voltados à Imunologia e Hematologia, a designação honrosa de Pai da Quimioterapia e o Nobel de Fisiologia / Medicina em 1908. (19) Não se pode, é claro, deixar de mencionar a parte mais importante e louvável deste achado: a molécula de Arsfenamina, comercializada sob o nome de Salvarsan pelos laboratórios Bayer, foi responsável por evitar o ceifamento de inúmeras vidas humanas acometidas por esta e outras infecções durante a primeira metade do século XX, e esta valia certamente é incalculável. (20)

A fusão ideológica dos modelos propostos por Fischer e Ehrlich no início do século XX deu origem ao primeiro grande paradigma da Química Medicinal. O paradigma de Fischer-Ehrlich está umbilicalmente conexo aos outros paradigmas que surgiram depois, norteando praticamente todas as inovações em fármacos desde então. Afinal, de uma maneira geral, em pleno século XXI, na era da medicina de precisão, continua-se perseguindo este mesmo propósito na busca pela compreensão meticulosa da complementaridade molecular ligante-receptor em um nível de especificidade aplicável e adequado para desencadear a resposta biológica desejada sem causar danos expressivos e ingeríveis. (21)

A primeira metade do século XX transcorreu com a descoberta de outras importantes moléculas para a humanidade, que na grande maioria foram encontradas intencionalmente, podendo ser citadas: Dopamina ($C_8H_{11}NO_2$), neurotransmissor e analgésico sintetizado por George Barger (1878-1939) em 1910; Ergotamina ($C_{33}H_{35}N_5O_5$), alcalóide vasoconstritor isolado em 1918; Sulfonamidas antimicrobianas, como o Prontosil ($C_{12}H_{13}N_5O_2S$) que foi o primeiro antibiótico produzido em escala industrial a partir de 1930; e, Lidocaína ($C_{14}H_{22}N_2O$), anestésico local sintetizado em 1943. (22)

Além disso, torna-se inevitável mencionar que às vezes o acaso também pode cooperar favoravelmente com esforços científicos incansáveis, como no caso da descoberta da Penicilina G ($C_{16}H_{18}N_2O_4S$) em 1928 pelo médico e farmacologista escocês Alexander Fleming (1881-1955), representando um achado fortuito em meio

aos seus inúmeros ensaios envolvendo fungos e bactérias. A penicilina é um dos exemplos mais emblemáticos de como é essencial contar com a serendipidade na Ciência. Esta molécula, tal qual a Arsfenamina para Ehrlich, também contribuiu decisivamente para que Fleming, ao lado de Ernst Boris Chain (1906-1979) e Howard Florey (1898-1968), recebesse a insigne honraria científica da academia sueca em 1945, além de ter inaugurado uma nova família de compostos antibióticos com padrão estrutural inovador e um tanto quanto instigante. (23, 24)

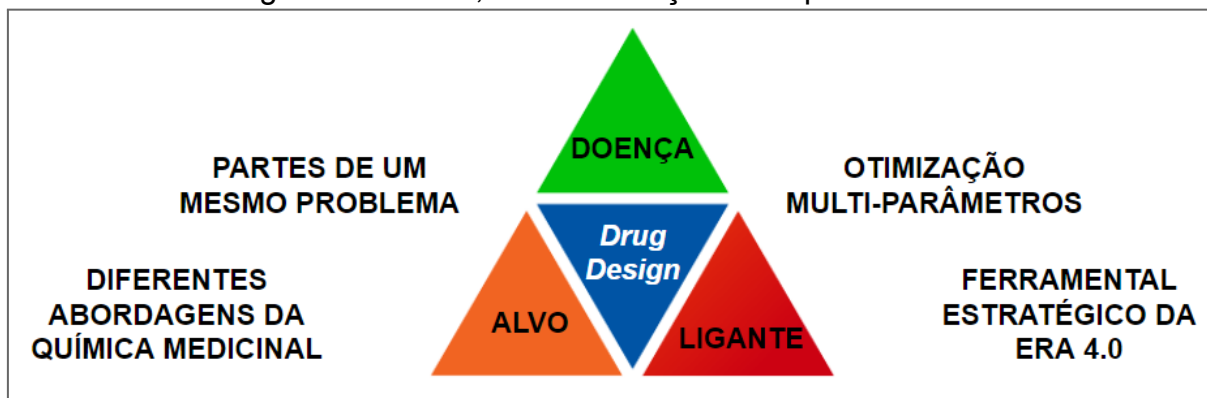
Por certo, este feliz acaso pôde ser considerado um dos mais oportunos para a humanidade, haja visto que a Penicilina G surgiu justamente em uma época de grande demanda, por conta da crise humanitária sem precedentes em virtude do período entreguerras e do pós-guerra, marcado por conflitos civis igualmente sangrentos e pela severa depressão econômica generalizada, que ainda foi agravada pela própria resistência microbiana, que se mostrava crescente frente aos poucos agentes antibióticos disponíveis na época. A serendipidade continuou sendo generosa com a Química Medicinal em outras ocasiões, a saber da descoberta do clordiazepóxido ($C_{16}H_{14}ClN_3O$) na década de 1950, que figurou, desde então, como o primeiro benzodiazepínico utilizado na clínica com ação ansiolítica. (25, 26)

2.2 ASCENSÃO DE NOVOS PARADIGMAS

Creriosamente, o desenho de substâncias bioativas compõe, sobretudo, uma arte façanhosa de encarar um problema bioquímico real, cujo grau de dificuldade é inerente à complexidade dos processos fisiológicos que regem a vida no seu nível molecular. Os pesquisadores da área são intrépidos profissionais que se debruçam sobre esta problemática na busca por soluções cada vez mais acertadas. Para tanto, eles podem lançar mão de diferentes perspectivas para enxergar as melhores respostas para o mesmo problema sob diversos aspectos. Um grande início rumo a estas respostas talvez seja a percepção de que tal problema possa ser atacado por diferentes caminhos, dividindo-o em três partes principais, figura 1:

- i) Ligante; ii) Alvo; e, iii) Doença.

Figura 1 - Representação imagética do ecossistema *Drug Design*, que, segundo a perspectiva deste autor, consiste numa problemática composta por 3 partes principais (Ligante; Alvo; e, Doença), cuja solução depende do emprego de múltiplas abordagens da Química Medicinal, do ferramental estratégico da Era 4.0, e de otimização multi-parâmetros.



Fonte: Autoria própria (2023)

2.2.1 Paradigma do análogo ativo

Desde o advento da Química Medicinal como ciência e do primeiro modelo proposto por Fischer-Ehrlich, outros paradigmas voltados à descoberta de fármacos, explorando estas partes isoladas ou de forma integrada, foram emergindo e evoluindo ao longo do século XX, conforme os próprios avanços da área e de outras ciências correlatas foram aparecendo. Embora Fischer e Ehrlich tenham conjecturado sobre a existência de alvos moleculares relacionados a disfunções e com papel crucial na proposição de seus modelos no início do século passado, ainda não haviam evidências científicas naquela época que comprovassem, de forma irrefutável, a existência de enzimas e o seu protagonismo fisiológico, nem tampouco, a sua natureza proteica, sua composição química e sua estrutura tridimensional (3D). Ante a realidade que se impunha e os recursos disponíveis, coube à Química Medicinal, no seu início, enfrentar o problema sob a perspectiva do ligante (paradigma *Analog-Based Drug Design*, ABDD). (27)

Esta era a única opção possível naquele momento, e representava aquela parte do problema (o ligante) sobre a qual já se tinha um relativo domínio. Esta época experimentou o conhecimento, em plena expansão, sobre Produtos Naturais (PN's), reações de Química Orgânica, e metodologias sintéticas hoje consideradas simples, como a própria reação de acetilação, que foi eficientemente usada por

Hoffman na síntese da Aspirina®. Ademais, este paradigma, explorando a estratégia baseada no análogo bioativo, foi responsável por praticamente todas as descobertas intencionais de fármacos da primeira metade do século XX, como a própria arsfenamina de Ehrlich, as sulfas antimicrobianas e os β -lactâmicos modernos ativos por via oral e de amplo espectro de ação derivados da Penicilina G. (28)

O aspecto principal que imperou neste tipo de abordagem foi o conceito de similaridade estrutural e funcional já conhecido desde 1791. A ideia central deste conceito reside na possibilidade de substâncias químicas semelhantes apresentarem propriedades semelhantes, o que geralmente se observa na maioria dos casos. (29) Sob este crivo, as moléculas podem ser divididas em três classes: a) análogos estruturais e funcionais, que possuem estruturas moleculares parecidas com propriedades químicas e farmacológicas semelhantes (também referidos na literatura da "Big Pharma" como fármacos "me-too" e "me-better"); (30) b) análogos funcionais, (31) que se diferem estruturalmente mas apresentam perfis farmacológicos semelhantes; e, c) análogos estruturais, que possuem apenas características químicas e estruturais parecidas mas se diferem nas propriedades farmacológicas. Nesta terceira categoria, diferenças estruturais mínimas acarretam perfis PD completamente divergentes, e estes casos também podem ser designados como *cliffs* de atividade. (32)

Uma nova roupagem foi dada à abordagem ABDD, durante a década de 1970, após a descoberta do captopril ($C_9H_{15}NO_3S$) a partir do veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*). A investigação cuidadosa sobre os efeitos causados pelas substâncias naturais constantes na peçonha da serpente, revelou um alvo biológico principal, a enzima conversora de angiotensina (*Angiotensin-converting enzyme*, ACE). Observou-se que esta metaloenzima de zinco (Zn^{2+}) exibia uma certa predileção por aquelas substâncias que se ligavam ao metal com maior facilidade, e uma série de análogos estruturais foi planejada por pesquisadores da Abbott, culminando na descoberta do primeiro anti-hipertensivo inibidor da ACE. (33) A noção clara de que estas moléculas se ligavam especificamente a um alvo molecular, motivou a disseminação de uma nova sigla, desde então, para um mesmo paradigma (LBDD, *Ligand-Based Drug Design*). (34)

De fato, a grande maioria dos fármacos comercializados foram inspirados em algum precursor molecular bioativo. Além disso, se for levado em consideração o fato de que praticamente a maioria dos fármacos passaram por melhorias estruturais

durante suas fases de desenvolvimento, visando aprimoramento de seu perfil PK (solubilidade, toxicidade entre outros), então quase todos, *a priori*, foram beneficiados por este paradigma (ABDD / LBDD), realçando que o mesmo permanece em voga no cenário atual da *Big Pharma*. A partir da segunda metade do século XX, uma nova revolução tecnológica (Era 2.0) se iniciava com o advento dos computadores, provocando avanços dramáticos no *know-how* para inventar novos fármacos. (35)

2.2.2 A era dos computadores e os novos paradigmas da química medicinal

Executar cálculos com maior facilidade, rapidez e acurácia é uma tarefa que o homem tenta “trivializar” desde épocas pretéritas. O ábaco foi um dos primeiros instrumentos criados por civilizações antigas para encontrar manualmente soluções de problemas do cotidiano relacionados às quatro operações aritméticas básicas. A evolução deste instrumento pelos milênios seguintes, de certa forma, culminou na origem das primeiras calculadoras automáticas do século XVII, a exemplo das máquinas de Blaise Pascal (1623-1662) e de Gottfried Wilhelm von Leibniz (1646-1716). Estas máquinas, inventadas para calcular, foram consideradas a primeira geração dos computadores mecânicos. No século seguinte, Charles Babbage (1791-1871) e Ada Lovelace (1815-1852) desenvolveram a Máquina Analítica, considerada o primeiro computador mecânico programável, capaz de resolver problemas complexos envolvendo equações polinomiais e tabelas de valores logarítmicos. A invenção de Babbage e Ada era movida a vapor, recebia instruções externas por meio de cartões perfurados, dispunha de uma unidade central de processamento (*Central Processing Unit*, CPU) mais memória expansível independentes. (36)

Com a ampla utilização da eletricidade nas décadas finais do século XIX, alguns protótipos de computadores funcionando à base de corrente elétrica passaram a ser projetados. Entretanto, os primeiros computadores eletrônicos foram apresentados oficialmente a partir da década de 1930, no período entreguerras. Antes de findar a primeira metade do século XX, o mundo foi definitivamente influenciado pelas contribuições de Alan Turing (1912-1954). Incitado por sua mente prodigiosa, Turing publicou um artigo em 1936 anunciando uma hipotética Máquina Universal com fluxo de processamento binário (1 e 0), capaz de resolver qualquer

problema e executar qualquer tarefa se recebesse as devidas instruções programáveis, inaugurando a noção intuitiva do termo “algoritmo” na área computacional e lançando as bases ideológicas do que viria a ser a computação digital moderna. (37)

Os trabalhos de Turing foram essenciais para o desenvolvimento do computador Colossus em 1943, designado para decodificação de enigmas militares do exército alemão. Além do Colossus, outros principais exemplares de computadores digitais dessa época foram: o ABC (*Atanasoff-Berry Computer*), lançado em 1941, para solução de equações algébricas lineares; o ENIAC (*Electronic Numerical Integrator And Computer*), lançado em 1946, para cálculos balísticos e produção de ogivas termonucleares; e, o EDSAC (*Electronic Delay Storage Automatic Calculator*), lançado em 1949, que também teve a participação de Turing e foi utilizado, principalmente, para armazenamento eletrônico, dispondo de uma memória de 1024 *bytes* (considerada “absurdamente espaçosa” naquela época). (38, 39)

De fato, até 1950, o uso desta primeira geração de computadores eletrônicos se restringia a repartições estratégicas de nações desenvolvidas. Eles pesavam dezenas de toneladas, ocupavam salas inteiras, custavam fortunas e eram grosseiramente empregados na conjuntura pós-guerra para fins governamentais relacionados a políticas de controle populacional (estatísticas de censo demográfico) e, sobretudo, de defesa (motivos bélicos). Em 1951, a disponibilização do UNIVAC I (EUA) e do Ferranti Mark I (Inglaterra e Europa) para o mercado geral, representou um dos marcos iniciais da terceira revolução industrial (Era 3.0, 1950-2000). (40)

De 1950-70, houveram melhorias dramáticas no que tange o tipo de tecnologia dos materiais que constituíam os principais componentes físicos (*hardware*) dos computadores. Nas máquinas da primeira geração (1940-50), as válvulas eletrônicas eram os componentes críticos e requeriam constante manutenção ou substituição. Entre 1950-60, estas válvulas foram sucedidas pelos transistores, tornando as máquinas da segunda geração mais compactas, rápidas e confiáveis. De 1960-70, foi a vez dos transistores serem suplantados por pequenos *chips* (circuitos integrados em escala reduzida), tornando os computadores da terceira geração mais portáteis, poderosos, afeitos ao atributo “pessoalidade” do usuário (*Personal Computer*, PC) e capazes de suportar um sistema operacional, oferecendo a possibilidade de executar diferentes programas concomitantemente

numa única máquina com velocidade razoável. Após 1960, conforme as melhorias eram implantadas, a aplicabilidade dos computadores se tornava cada vez mais popularizada e seu uso foi se difundindo nas comunidades de pesquisa científica, originando as metodologias assistidas por computadores (*Computer-Aided Methods, CAM*). (41)

No final da década de 1950, uma nova área do conhecimento, a Ciência da Computação, se consolidava e conquistava cada vez mais terreno e adeptos. O termo “*informatik*” foi usado pela primeira vez em 1956 por Karl Steinbuch (1917-2005) e Helmut Gröttrup (1916-1981) para se referir a uma vertente da Ciência da Computação que se dedica ao estudo de processos aplicados ao tratamento automático da informação. Evidentemente, desde o advento dos computadores e sua aplicação massiva em metodologias científicas, o ecossistema multidisciplinar da inovação farmacêutica nunca mais foi o mesmo. Até a década de 1970, o desenvolvimento de medicamentos se apoiava em uma abordagem de caráter mais empírico (tentativa e erro), inspirada pela literatura tradicional acerca de PNs ou precursores moleculares historicamente ativos (ABDD). Em casos emblemáticos e providenciais, a inovação neste período também foi premiada pela serendipidade. A partir de 1960, além do trabalho intenso visando o aperfeiçoamento de *hardware*, vários grupos científicos começaram a se dedicar com afinco na criação de programas específicos destinados à indústria biofarmacêutica, seja no simples gerenciamento de dados, seja na produção de *insights* a partir destas informações. (42)

Um dos primeiros relatos de uso bem-sucedido dos CAMs no campo da Biologia Estrutural foi promovido pela cristalógrafa Dorothy Hodgkin, cujos feitos foram merecedores de grande reconhecimento. Pesquisadora contemporânea a Hodgkin, a físico-química norte-americana Margareth Dayhoff (1925-1983), também alcançou, por seus méritos, grande expressividade científica, recebendo o simbólico título de “Mãe da Bioinformática”, por seu pioneirismo nesta área recém-fundada. De fato, Margareth explorou exaustivamente métodos computacionais em seu trabalho de doutorado e demonstrou o potencial do uso de computadores para o progresso da Biologia e da Medicina. Nesta época, os métodos para sequenciamento de proteínas já eram uma realidade e a primeira sequência de uma proteína (insulina) já havia sido publicada, colocando fim aos vários questionamentos sobre a natureza polipeptídica de cadeias proteicas. Margareth, visando facilitar e acelerar estes

escopos de pesquisa, desenvolveu o *COMPROTEIN*, considerado o primeiro *software* de Bioinformática, e o primeiro programa projetado para determinação da estrutura primária de proteínas baseada nos dados de sequenciamento peptídico oriundos do Método de Edman. (43, 44)

Ainda nesta época, o coeficiente de Tanimoto foi proposto (1958) como uma das mais importantes métricas de similaridade ou diversidade química em conjuntos amostrais arbitrários, tornando-se uma valiosa ferramenta para comparação de atributos moleculares em bibliotecas de substâncias químicas. No decorrer da década de 1960, duas duplas de pesquisadores, Hansch-Fujita e Free-Wilson, deram suas contribuições seminais para o nascimento dos modelos quimiométricos, suportados por computadores, que relacionam a estrutura química com suas propriedades (*Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR). Quando a propriedade em voga era a atividade biológica este termo passava a ser representado pela sigla inglesa QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*). (45, 46)

Em 1965, iniciou-se a primeira onda da Inteligência Artificial (*Artificial Intelligence*, AI), com o desenvolvimento do projeto DENDRAL. (47) O surgimento do que denominamos hoje *Internet* (termo cunhado em 1974), ou *World-Wide-Web* (termo cunhado em 2000), também data dessa época, quando, em 1965, pesquisadores do *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) se comunicavam à distância (de Massachusetts à Califórnia) por computador via cabos de telefonia, constituindo as redes locais (*Local Area Networks*, LANs) da ARPA (*Advanced Research Projects Agency Network*). (48)

Três das bases de dados mais importantes no campo farmoquímico surgiram nesta época, o *Chemical Abstracts Service* (CAS), o *Crystal Structure Database* (CSD), ambos em 1965, e este último contribuiu decisivamente para a fundação do PDB, em 1971. Considera-se que nesta época iniciou-se o “dilúvio” de informações técnico-científicas que seria posteriormente chamado de *Big Data* em diversas áreas do saber. O emprego de “cérebros eletrônicos” por profissionais e experts que se propunham a inventar novas moléculas para fins medicinais deu origem ao paradigma do Desenho de Fármacos Auxiliado por Computadores (*Computer-Aided Drug Design*, CADD). O caráter puramente empírico começou a dar espaço a fluxos de trabalho com requintes de planejamento detalhado e o emprego da expressão

“Desenho Racional de Fármacos” (*Rational Drug Design*, RDD) ganhou força e começou a se alastrar no meio científico especializado. (49-51)

Nesta época, a possibilidade de explorar recursos computacionais para otimizar ligantes selou o início de uma profícua parceria entre os paradigmas LBDD e CADD. Se antes, com o paradigma ABDD, era possível apenas “esculpir” as chaves, após essa junção tornou-se possível projetá-las computacionalmente, se atentando a detalhes da sua ação farmacológica de maneira mais racional. Além disso, com o avanço vertiginoso de protocolos computacionais, a partir da década de 1980, e o número crescente de estruturas proteicas resolvidas por cristalografia de raios-X (CRX), a segunda parte mais importante desta trama (o alvo) estava se tornando cada vez mais acessível, inaugurando um novo paradigma baseado na estrutura 3D do bioreceptor (paradigma *Structure-Based Drug Design*, SBDD). A partir de então, tornou-se possível explorar, também, a fechadura, mapeando todas as suas características estruturais. Um problema de “caixa-preta” estava ficando, aparentemente, cada vez mais fácil de ser solucionado, pois ora tínhamos o poder de confeccionar a chave, e, agora, o de conhecer a fechadura. Os anti-retrovirais, descobertos durante a última década do século XX, coroaram uma outra união prolífera de paradigmas, agora selada entre CADD e SBDD. (52, 53)

O ritmo acelerado das invenções tecnológicas e o surgimento de técnicas instrumentais de caracterização molecular e bioquímica nas décadas finais do século passado, ditou a velocidade com que a indústria farmacêutica deveria responder às demandas sanitárias emergentes a partir daquela época. Já findando a terceira revolução industrial (Era 3.0), na década de 1990, grandes companhias do setor biotecnológico e de inovação farmacêutica deram início às primeiras plantas industriais projetadas para experimentação de alto rendimento em larga escala (do inglês, *High Throughput Experimentation*, HTE), pretendendo celeridade e melhores taxas de sucesso em seus projetos. (54)

No âmbito da Química Medicinal, a HTE acendeu a esperança de exploração mais abrangente do vasto espaço químico semelhante a fármacos, sendo empregada como uma técnica poderosa para triagem (*High Throughput Screening*, HTS) de quimiotecas cada vez mais numerosas. Neste contexto, a HTS passou a ser definida tecnicamente como uma abordagem de experimentação científica que emprega extensivamente a instrumentação robotizada para testar, de maneira

célere, a atividade biológica e toxicidade de uma gama de moléculas frente a vários tipos de modelos biológicos. (55)

Na época de sua ascensão, a HTS era capaz de testar diariamente cerca de 100 compostos em uma única concentração. Atualmente, já em meio a Era 4.0 e após avanços dramáticos no setor, a HTS elevou sua capacidade diária de bioensaios para a ordem de 10^5 (*Ultra High Throughput Screening*, uHTS) e em diferentes faixas de concentração (*Quantitative High Throughput Screening*, qHTS). A detecção dos sinais de resposta biológica pode ser realizada através de análises instrumentais baseadas em fluorescência, luminescência e absorção atômica. Em uma rotina de HTS, geralmente designa-se, de forma deliberada, valores de referência (limite de corte) para discriminar compostos ativos e inativos dentro da biblioteca química avaliada. (56)

As moléculas com identidade química estabelecida e atividade reprodutível igual ou superior ao controle são consideradas putativos “acertos” ou “sucessos”, e são tecnicamente chamadas de ‘hits’. Testes biológicos complementares são realizados posteriormente para validação de sua atividade, pretendendo verificar se eles são resultados verdadeiramente exitosos ou casos meramente falso-positivos. O advento da HTS possibilitou rastrear, simultaneamente e de forma ágil, meios químicos multicomponentes, a exemplo de extratos de origem natural, e passou a servir como uma importante ferramenta para a Química de PNs e, posteriormente, para a Metabolômica, que é uma das ciências ômicas que surgiram no findar do século XX. (57)

Vista como grande aliada da HTS desde sua ascensão, a Química Combinatória (*CombChem*), desempenhou grande protagonismo na geração rápida de quimiotecas extensas por meio de rotas de síntese química *one-pot*, capazes de originar de dezenas a milhões de compostos em um mesmo processo. Esta importante vertente da Química Orgânica Sintética surgiu em meados da década de 1980 com os trabalhos de Geysen, em 1984, e de Houghten, em 1985, relatando tecnologias inovadoras capazes de sintetizar milhares de peptídeos paralelamente. Com o passar dos anos, várias metodologias sintéticas puderam ser exploradas através de reações, de via úmida ou em fase sólida, que ocorrem pela junção de misturas reacionais contendo enormes quantidades de substâncias reagentes, também conhecidas como blocos de construção química (*chemical building blocks*, CBBs). Atualmente, a Química Combinatória contempla outras classes químicas

além dos peptídeos, a saber da classe dos oligômeros não peptídicos, dos peptidomiméticos e de pequenas moléculas semelhantes a PNs. (58, 59)

Transpondo os gargalos típicos de abordagens empíricas de amostras físicas, a CADD coopera satisfatoriamente com a HTS, configurando metodologias classificadas como HTS virtual (vHTS). Mesmo as mais numerosas quimiotecas de amostras físicas mantidas por grandes empresas do setor, como *AstraZeneca PLC*, *Eli Lilly*, *Merck* e *Pfizer*, não ultrapassam a vírgula de poucos milhões de compostos. Em contrapartida, no ambiente computacional o número de compostos que pode ser vasculhado cresce exponencialmente enquanto houver disco rígido suficiente para armazená-los, formando quimiotecas cuja extensão era inimaginável décadas atrás. Atualmente, alguns bancos de moléculas possibilitam pesquisar coleções químicas com bilhões de compostos em questão de minutos, dispendo de um PC comum. Neste momento, se a curiosidade do leitor aguçar a ponto de motivá-lo a clicar nos *links* fornecido adiante (referenciados no final deste parágrafo), será direcionado a uma coleção eletrônica com 750 milhões de moléculas disponíveis comercialmente acessando o *ZINC20*, ou, a 36 bilhões de moléculas feitas sob demanda, acessando o *Enamine REAL Space*. (60, 61)

Com sua “badalada” ascensão em meio a era da robótica, a HTS fomentou, despropositadamente, o pensamento de que uma maior quantidade de pequenas moléculas exploradas, resultaria num número maior de descobertas farmacoterapêuticas. No início, esta ideologia era quase um consenso, entretanto, conforme as várias campanhas suportadas por HTS foram falhando ao longo do tempo, as esperanças, nela depositadas, deram lugar a outras propostas de metodologias para garimpar o espaço químico semelhante a fármaco com maior eficiência. De fato, a essência da HTS é a quantidade e não a qualidade, e isto foi visto como uma das principais justificativas para as diversas campanhas fracassadas. A HTS ficou reconhecida como uma ótima técnica para vasculhar quimiotecas com velocidade e apontar supostos compostos-líderes, entretanto tais compostos falhavam, de maneira recorrente, nos ensaios PK ou de toxicidade. (62)

Neste sentido, houve quem pudesse considerar a HTS como uma versão futurista do empirismo intrínseco do método milenar da tentativa e erro, e, do ponto de vista pragmático, não deixa de sê-lo. Entretanto, talvez não seja aplicável rotular esta abordagem como sendo irracional ou desprovida de intelecto, uma vez que ela jamais pretendeu incutir racionalidade aos fluxos de trabalho, mas sim dinamicidade.

É, de fato, incabível admitir que uma técnica dotada de tecnologias de ponta seja irracional, embora o patamar de êxito por ela alcançado seja bem inferior ao que era esperado, não fazendo jus ao vultoso ônus por ela requerido. Certamente, a pitada de irracionalidade pode ter sido adicionada ao debate justamente por aqueles que preferem “criar e fazer”, contrastando com aqueles que, convenientemente, podem “triar e fazer”. Além disso, deve-se lembrar o quão importante pode ser aprender com os erros na Ciência e isto implica em um certo grau de racionalidade e evolução, pois rastrear lotes de moléculas e percebê-las como malsucedidas para uma dada fisiopatologia pode evitar que outros grupos de pesquisa se frustrem pelos mesmos motivos. Talvez a questão precípua, neste caso, não seja encontrar justificativas para os “fracassos” com base na própria técnica (HTS), mas sim no uso que se faz dela. Um exemplo prático e factível é a própria FBLD, indiscutivelmente mais exitosa, que sem a infraestrutura e os *insights* propiciados pela HTS jamais teria alcançado seus sucessos em tão pouco tempo e ocupado lugar de destaque no portfólio de abordagens de *Drug Design* (DD) no atual cenário da Química Medicinal. Portanto, evoluir o *modus operandi* é possível, e *sine qua non*, em toda área científica, ainda que trabalhando com as mesmas ferramentas disponíveis. (63)

2.2.3 O paradigma dos fragmentos moleculares

As bases teóricas deste novo paradigma em Química Medicinal foram lançadas no final do século XX, e estão alicerçadas na premissa cujo enunciado primaz admite que a BA de uma dada molécula pelo sítio receptor do alvo biológico pode ser interpretada como sendo um somatório das contribuições de cada uma de suas partes ou subunidades estruturais (designadas, neste contexto, como fragmentos moleculares). (64) Sendo assim, a LE da molécula, como um todo, é vista como uma contribuição de cada átomo que a constitui, e não só daqueles grupos funcionais reconhecidos (farmacóforos), que interagem diretamente com resíduos do alvo. Logo, esta premissa encoraja a possibilidade de arquitetar moléculas com todos os seus átomos e grupos de reconhecimento molecular otimizados, tendo como pontos de partida justamente os fragmentos moleculares separados. Com isto, cada uma das partes ou grupos da molécula são racionalmente desenhados e unidos (ligados covalentemente) entre si, o que provavelmente pode originar moléculas com maior afinidade pelo alvo em questão. A

LE é o conceito-chave na FBLD e corresponde a uma valiosa métrica para comparar, de maneira “justa” (em termos de massa molecular), a BE ou a atividade biológica predita de fragmentos moleculares ou ligantes expandidos. (65, 66) Em termos físico-químicos, ela pode ser definida como sendo a variação da energia-livre ($\Delta G_{\text{Binding}}$), oriunda da estabilidade do complexo R-L, dividida pelo número de átomos pesados da molécula (átomos não-hidrogenóides, *Heavy Atoms Count*, HAC), equação (1):

$$LE_{(T, P, n)} = -\Delta G_{\text{Binding}} / \text{HAC}, \quad (1)$$

A literatura da FBLD preconiza que um fragmento molecular é considerado minimamente promissor quando sua LE é igual ou superior a $-0,30 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{átomo}$ pesado¹. (67) Portanto, independente do sinal (- ou +) convencionado para esta métrica, quanto maior o seu módulo, melhor o resultado obtido.

2.2.3.1 Aspectos gerais de uma campanha de FBLD

Atualmente o sucesso na descoberta de novos fármacos depende diretamente da eficiência de metodologias tecnológicas triarem o espaço químico extenso e diverso contra múltiplos alvos biológicos de interesse. Apesar de ser irrefutável o fato de o HTS ter experimentado melhorias formidáveis nos últimos anos resultando em projetos de prospecção bem-sucedidos com moléculas aprovadas como fármacos, é aconselhável ponderar que esta importante abordagem ainda carrega algumas limitações, como: a) Varredura limitada do espaço químico de moléculas semelhantes a fármacos; e, b) Baixa taxa de acerto.

Neste contexto particular, a FBLD emergiu como uma alternativa complementar ao HTS tradicional visto que torna praticável explorar uma quimioteca de 10^9 moléculas discretas com apenas 10^3 fragmentos, com base em uma estimativa combinatorial. Este detalhe faz toda diferença, visto que viabiliza varrer um universo químico com diversidade estrutural cerca de seis ordens de grandeza superior à grandeza do conjunto de fragmentos amostrados, amplificando consideravelmente as chances de acerto. (68)

Os critérios de seleção química em uma campanha FBLD são preconizados pela Regra do Três (*Rule of three*, 'Ro3'), que pode ser vista como uma versão

'customizada' da Regra dos Cinco de Lipinski (*Rule of five*, 'RO5'). A Ro3 permite conceituar com clareza fragmentos moleculares como sendo toda e qualquer molécula discreta, geralmente orgânica, com: (69)

- a) Peso molecular ≤ 300 Da (unidade de massa atômica);
- b) Número de doadores de interação de hidrogênio, HBD ≤ 3 ;
- c) Número de aceptores de interação de hidrogênio, HBA ≤ 3 ;
- d) Hidrofobicidade dada pelo coeficiente de partição, CLog P ≤ 3 ;
- e) Número de ligações rotáveis, Nrot ≤ 3 ; e,
- f) Área de superfície polar, PSA ≤ 60).

Além disso, torna-se aconselhável aplicar esta regra observando também alguns quesitos adicionais, como: a) O fato de considerar fragmentos com características estéricas (3D) preservadas em detrimento de apenas fragmentos com estruturas planas (2D) e aromáticas; b) Investigar se existem ou não diferenças estéricas / químicas / de complementaridade entre os bolsões de encaixe dos fragmentos e os demais sítios prováveis de encaixe do receptor; c) Investigar possíveis modos de ligação diferentes e o grau de promiscuidade supramolecular dos fragmentos frente aos diferentes bolsões de reconhecimento; d) estabelecer coerentemente parâmetros para apontar os acertos de fragmentos com base em resultados *in vitro* (potência / inibição) ou *in silico* (energias de ligação / escores de afinidade); e, e) discernir satisfatoriamente a estratégia de combinação e crescimento dos fragmentos em compostos líderes promissores.

Neste âmbito, se torna plausível ponderar que, apesar de a FBLD ser uma estratégia conceitualmente muito bem estabelecida, o emprego prático da própria Ro3 e das demais considerações supracitadas permanecem como fonte inesgotável de discussões na literatura sobre um guia genérico de requisitos para formação da biblioteca de fragmentos, seleção dos acertos e desenho molecular baseado em fragmentos. (70)

A FBLD experimental tem se mostrado uma área bastante profícua ao longo dos anos e podem ser encontrados facilmente alguns exemplos bem-sucedidos na literatura e na clínica a título de comprovação. Entretanto, ela também apresenta alguns desafios e obstáculos a serem enfrentados, e isto reduz apreciavelmente a aplicação dessa vertente. Não se torna difícil vislumbrar que as etapas críticas envolvendo CRX se referem à disponibilidade comercial e estabilidade dos biorreceptores-alvo (geralmente proteínas hidrossolúveis); quantidades (em massa)

apreciáveis de receptor e fragmentos puros para ensaios de cristalização em larga escala; diferenças significativas de solubilidade entre receptor e fragmentos; cocrystalização do receptor com múltiplos fragmentos da biblioteca; estabilidade de cristais multicomponentes; e, modelagem (resolução e refinamento) dos dados de difração para elucidação da estrutura 3D. Conclusivamente, admite-se que tais etapas podem tornar o processo caro, moroso e rotineiramente impraticável. Neste âmbito, torna-se interessante dispor de técnicas computacionais, tão promissoras e confiáveis quanto as empíricas, para o desenho racional de novos fármacos. Sendo assim, surgiu uma nova vertente da FBLD na ânsia de preencher as lacunas deixadas pela FBLD experimental e oferecer novas soluções para problemas intratáveis até então. A FBLD computacional (CFBLD) ou FBLD *in silico* agrega todas aquelas famigeradas vantagens que as metodologias computacionais possuem, não sendo enfadonho salientar três das principais como sendo economia de tempo, de recursos financeiros, de mão de obra e capacidade de modelar e mimetizar situações-problema intratáveis por outras vias. A FBLD explorada por meio de algoritmos computacionais pode facilitar e aprimorar todas as etapas da campanha, desde a formação das quimiotecas até a obtenção de protótipos otimizados e sinteticamente viáveis. (71)

Uma campanha de FBLD *in silico* pode ser disposta em quatro etapas básicas: (72, 73)

- (a) Formação da fragmentoteca enriquecida, com critérios de expansão amostral de moléculas (*Fragments Library*);
- (b) Triagem virtual dos fragmentos, explorando *docking* (valores de LE) como principal critério de redução amostral (*Fragment-Based Virtual Screening*, FBVS);
- (c) Desenho racional de moléculas líderes baseado em fragmentos (*Fragment-to-Lead*, F2L);
- (d) Predição e otimização dos parâmetros ADMET.

As duas últimas etapas geralmente são iterativas e guiadas por ensaios de *docking* e *re-docking*, visando as modificações moleculares mais exitosas. Em campanhas híbridas (fases experimentais subsequentes), estas etapas são de suma importância, porquanto podem fornecer valiosas informações para embasar as etapas seguintes de cunho empírico visando a descoberta de novos fármacos, a saber de algumas: a) Etapa de síntese química (Qual(is) molécula(s) fazer?); b)

Etapa de avaliação biológica *in vitro* (Corroborar os ensaios *in silico*?); e, c) Etapa de obtenção experimental do modo de ligação do composto-líder com o alvo molecular por meio de CRX, RMN e outras técnicas instrumentais (Acurácia do *docking*).

Criteriosamente, a etapa de F2L é uma das que mais exige perspicácia e intuição química da equipe multidisciplinar. Em uma campanha FBLD, experimental ou *in silico*, o desenho racional é a etapa criativa, na qual podem ser usadas algumas estratégias para arquitetar novas moléculas promissoras partindo de fragmentos, a exemplo das técnicas brevemente relatadas a seguir:

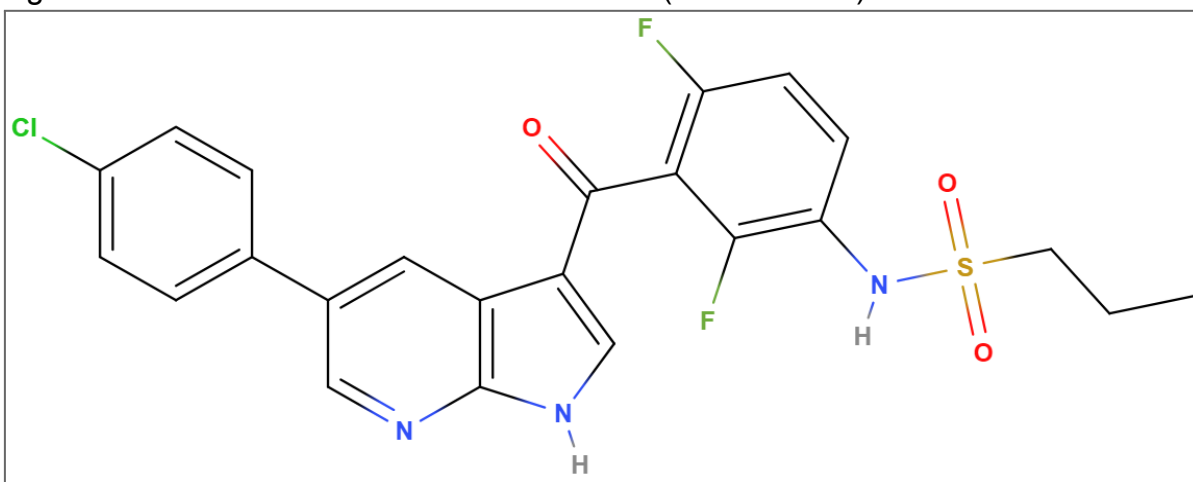
- (a) Crescimento de Fragmentos (*Fragment Growing*). Geralmente se aplica em casos nos quais um determinado fragmento exibe considerável predileção por um bolsão específico do receptor de forma que a afinidade envolvida nessa interação se sobressaia em relação aos demais modos de ligação existentes possíveis. Sendo assim, este fragmento-chave é tratado como uma semente molecular e partindo dela as ramificações de cadeias substituintes são exaustivamente variadas obedecendo as direções vetoriais sintéticas disponíveis, as quais geralmente estarão livres ou desimpedidas no complexo ou possuem disposição adjacente à superfície interagente do alvo. (74)
- (b) Combinação de Fragmentos (*Fragment Linking*). Ocorre quando mais de um fragmento exibe afinidade apreciável por diferentes bolsões. Neste caso, os vários pontos quentes do alvo são minuciosamente investigados no que tange às suas características químicas, estéricas e de hidrofobicidade, para posteriormente terem sua afinidade testada frente a vários fragmentos. Dessa forma, torna-se possível estabelecer um ranqueamento do melhor fragmento para cada bolsão e posteriormente otimiza-se a união covalente dos mesmos por meio de *linkers*, os quais serão criteriosamente propostos e escolhidos de forma a garantir que a conformação e disposição estérica dos fragmentos ligados sejam similares às adotadas pelos fragmentos isolados em cada bolsão. (75)
- (c) Mesclagem de Fragmentos (*Fragment Merging*). Nesta frente de trabalho, estudos precedentes demonstram que um determinado composto-líder, ou fármaco, ocupa parcialmente a cavidade interagente do alvo, deixando outros pontos quentes (*hotspots*) vazios com bolsões disponíveis para acomodar

fragmentos. Sendo assim, vários fragmentos são testados e os melhores passam a ser unidos covalentemente ao líder visando aumentar, em tese, a afinidade desta nova molécula mesclada pelo alvo em questão, visto que a mesma pode ser capaz de interagir com um maior número de regiões de reconhecimento. (76)

2.2.3.2 Vemurafenib e outras campanhas bem-sucedidas

Incontestemente o mês de Agosto de 2011 é considerado um marco emblemático para os entusiastas da FBLD, numa feliz coincidência com o aniversário de três décadas da concepção teórica desta nova abordagem. De fato, os compêndios da Química Medicinal e da Oncoterapia nunca mais seriam os mesmos desde então, sofrendo impactos indelévels em seus papiros com a excelente notícia de aprovação do ZELBORAF[®] naquele ano. Este era o nome comercial atribuído à formulação farmacêutica de via oral aprovada pelo FDA composta pelo princípio ativo conhecido como Vemurafenib, de fórmula molecular $C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$, figura 2: (77)

Figura 2 - Estrutura molecular do vemurafenib (ZELBORAF[®]).



Fonte: Autoria própria (2023)

O vemurafenib estabeleceu um divisor de águas na breve história da FBDD, elevando-a para um patamar científico superior, e digno daquele já ocupado pelas abordagens consagradas no panteão da Química Medicinal. Meritadamente, este composto veio a se tornar nada menos que o primeiro fármaco específico para o tratamento de uma severa forma de melanoma metastático, e também o primeiro

agente farmacológico bem-sucedido oriundo de uma campanha com escopo da FBDD. O seu mecanismo de ação envolve a inibição altamente seletiva de uma forma mutante do gene BRAF relacionado a um tipo terrivelmente letal de câncer de pele, cuja taxa de sobrevivência em 5 anos correspondia a pouco mais que 10% na época (conforme dados reportados pelo *National Cancer Institute*, NCI, dos EUA em 2011). (78)

Era cediço que, até aquele momento, a clínica não dispunha de recursos terapêuticos animadores para este tipo de tumor. Em virtude disso, se lançava mão de alguns coquetéis de quimioterapias paliativas, a exemplo de uma posologia combinando dacarbazina (DBZ) e altas doses de interleucina-2 (IL2), cuja resposta não era eficaz na maioria dos casos e, conseqüentemente, não incitava melhoria salutar no quadro clínico dos pacientes, provocando-lhes efeitos colaterais desagradáveis conseqüentes de sua toxicidade acentuada. Em meio a esta triste conjuntura sanitária e demonstrando resultados clínicos notáveis, associando maior afinidade com seletividade e menor ocorrência de efeitos tóxicos, o vemurafenib se despontou criando grandes expectativas. Afinal, não era para menos, pois mesmo na sua administração oral com baixas doses em uma posologia mais espaçada, ele contribuiu para prolongar significativamente a sobrevivência, bem como, a qualidade de vida da maioria dos pacientes tratados, despertando inevitavelmente um forte apelo popular e midiático. Logo, ele passou a ocupar o centro dos holofotes não só da comunidade científica especializada, mas também dos meios de comunicação e já despertava o anseio da população leiga em geral pela sua liberação, mesmo durante os ensaios de fase clínica quando ainda era rotulado pelo codinome PLX4032. (79)

Aliás, ao imergir um pouco mais nas entrelinhas da trajetória desta molécula é possível compreender as origens e os significados da codificação nominal a ela atribuída em meio aos bastidores do seu processo de desenvolvimento. Posto isso, conduziremos o assunto para um âmbito que aguça e, ao mesmo tempo, sacia nossa curiosidade, onde cabe tecer algumas notas interessantes a fim de criar maior familiaridade com uma das rotinas do trabalho serial de companhias farmacêuticas ou grupos acadêmicos que lidam com grandes quimiotecas.

Via de regra, as inúmeras moléculas constantes no espaço químico investigado recebem inicialmente um código serial e, conforme vão evoluindo etapas, elas acabam ganhando notoriedade, podendo ter sua identificação nominal alterada, já antecipando um caráter técnico-mercadológico agregado, que, muitas

vezes, guarda significado científico concernente ao seu perfil farmacológico. Exemplificação própria pode ser encontrada neste caso do ilustre *hit* rotulado de PLX4032, descoberto e desenvolvido através de uma empreitada colaborativa liderada por duas corporações: a *Plexxikon* (atualmente adquirida e incorporada pela companhia japonesa *Daiichi Sankyo*) e a *Genentech* (adquirida pela farmacêutica suíça *Roche*). O rótulo PLX4032 advém de um código serial dos laboratórios *Plexxikon*, em que “PLX” provavelmente designa alguma sigla do nome da corporação e é comum às milhares de moléculas “ainda anônimas” que são estudadas em seu domínio. Posteriormente, devido aos seus ofuscantes resultados clínicos, este *hit* evoluiu para o patamar de *lead compound* tendo seu rótulo PLX4032 substituído pelo nome vemurafenib, o qual, por sua vez, também guarda significação bastante pertinente. A propósito, as letras iniciais “V” e “E” são abreviações dos aminoácidos valina e ácido glutâmico respectivamente, ambos envolvidos na mutação do B-RAF, e pelos quais a molécula do fármaco é reconhecida no sítio de ligação do alvo; “MU”, remete ao processo de mutação gênica típica da patologia; “RAF”, remete a RAF da cinase alvo, compondo também o nome de mercado ZELBORAF; e, “ENIB”, que remete a inibidor. (80)

O programa que culminou na aprovação desta molécula ainda é considerado um caso excepcional na indústria dos inventores de novos fármacos já acostumada com trâmites a longo prazo. As pesquisas com este inibidor iniciaram em fevereiro de 2005 e em apenas 6 anos foi laureada pelo aceite do FDA, levando um prazo inferior à metade do tempo médio para a maioria dos fármacos. Ademais, este deferimento já era esperado no decorrer daquele ano de 2011, e ainda ocorreu dois meses antes do previsto. Certamente, a celeridade atípica na sua liberação clínica reflete não só o brilhante achado científico oriundo da competência de toda equipe pluridisciplinar de estafes, representando uma grande vitória para o campo da FBDD e da Medicina, mas também revelou a verdadeira face da Ciência que devolveu a esperança na terapêutica e permitiu aos pacientes acometidos vislumbrar um horizonte mais otimista, no qual alcançar uma possível cura ou alguns anos a mais de vida significava um verdadeiro renascimento. Afinal, é exatamente este o louro de valia inestimável que a Ciência almeja: não se trata de vangloriar egos ou maximizar cifras, mas se trata sempre de favorecer a vida em todas as suas formas e proporcionar continuamente o bem-estar da humanidade. (81)

Além do pioneiro ZELBORAF[®], os esforços empenhados por várias frentes de trabalho engajadas com a FBDD ao longo da última década também resultaram em outras moléculas aprovadas. Até o momento, o FDA autorizou a comercialização de mais seis medicamentos para uso clínico na terapêutica, a saber em ordem cronológica:

- 2°) Venetoclax (VENCLEXTA[®], *ABBVIE INC*, 04/11/2016) [6];
- 3°) Erdafitinib (BALVERSA[®], *JANSSEN BIOTECH*, 12/04/2019) [5];
- 4°) Pexidartinib (TURALIO[®], *DAIICHI SANKYO INC*, 02/08/2019) [3];
- 5°) Sotorasib (LUMAKRAS[®], *AMGEN INC*, 28/05/2021)[7];
- 6°) Asciminib (SCSEMBLIX[®], *NOVARTIS*, 29/10/2021);
- 7°) Capivasertib (TRUQAP[™], *AstraZeneca PLC*, 23/11/2023).

Obviamente que em uma seara molecular tão fértil propiciada pela FBDD, não é difícil imaginar que, além dos exemplares exitosos supracitados, ela também possua numerosos candidatos em fases de estudos clínicos com grande potencial para, em breve, pleitearem o cobiçado status de medicamento aprovado. Numa busca bibliográfica refinada, foi possível encontrar mais de 50 (58 para ser mais exato) moléculas distribuídas nas três diferentes fases de triagem clínica, entre as quais a maioria encontra-se em desenvolvimento e outras já foram abandonadas em algum momento do processo. Entre estes candidatos, uma porcentagem é representada por agentes anticâncer e outras classes farmacológicas também podem ser contempladas, visto que um percentual representa os agentes, além de ao menos um candidato disperso nas classes dos. A diversidade estrutural e o amplo leque de alvos biológicos alvejados pelos dardos mágicos com o selo da FBDD denotam o vasto alcance de aplicação deste novo paradigma, reforçando cada vez mais a pujança da área, aumentando a confiança da comunidade científica nesta nova abordagem, e, principalmente, permitindo o progresso da humanidade na terapia e cura de moléstias. (82, 83)

É importante observar que, de uma forma relativamente rara na Ciência, mesmo os avanços tecnológicos tendo instigado o surgimento e a evolução dos paradigmas da Química Medicinal, o novo padrão que surgia não suplantava o outro já existente. Geralmente, um novo modelo substitui o modelo antecessor, podendo relegá-lo ao desuso. Entretanto, notou-se o contrário, de forma que um pudesse complementar o outro, justamente, porque compõem partes de um mesmo problema. Sendo assim, a abordagem ABDD / LBDD continua em pleno uso, tendo

ou não conhecimento estrutural a respeito do biorreceptor. A abordagem SBDD sempre será uma ótima estratégia quando se dispõe da estrutura 3D elucidada do alvo. A abordagem CADD pode cooperar com as duas anteriores isoladamente ou de forma integrada. Por sua vez, a FBLD agrega simplesmente todas as abordagens conhecidas, contando ainda com a égide do HTS e de todos os recursos da Era 4.0, justificando sua taxa de acerto superior com vários agentes farmacológicos exitosos em tão pouco tempo. Atualmente esta constatação se torna ainda mais nítida, visto que praticamente todos os paradigmas podem ser explorados desde projetos de pesquisa básica a fluxos de trabalho mais avançados em diferentes etapas do processo, seja no ambiente acadêmico ou no âmbito da indústria farmacêutica voltada à invenção de novos fármacos. (84)

2.3 A BIOLOGIA E O ALVO

Pode-se admitir que a evolução do conceito de alvo molecular para a Química Medicinal iniciou-se quando o termo “*proteína*” (do grego “*proteios*”, primitivo) foi introduzido pelo químico holandês Gerardus Johannes Mulder (1802-1880) em 1835, após sugestão do sueco Jons Jacob Berzelius (1779-1848), outro químico orgânico de renome na época. De fato, Mulder e Berzelius se interessavam pelo estudo das chamadas “*substâncias albuminóides*” e defendiam que estas seriam componentes *sine qua non* (literalmente no sentido “vital” da expressão) de todo e qualquer organismo vivo. As propriedades do albúmen (clara do ovo) eram bem conhecidas e comuns a outros componentes oriundos de seres vivos, como o leite e o sangue, os quais também coagulavam conforme a acidez ou a temperatura do meio aumentavam. Paralelamente, os estudos sobre processos (milenarios) envolvendo fermentação alcoólica desenvolvidos pelo químico francês Louis Pasteur (1822-1895) demonstraram que os “*fermentos*” eram inerentes às células de leveduras (fungos unicelulares) que catalisavam a transformação de açúcar (glicose) em álcool (etanol, C₂H₆O). (85)

Estritamente amparado por estes resultados e com base em outros processos fermentativos investigados na época (como a digestão de alimentos por meio de secreções gástrica e saliva de animais), Pasteur enunciou que a fermentação seria um processo fisiológico (e não somente químico) decorrendo exclusivamente da ação de células vivas, o que “*fermentou*” (e fomentou) os ânimos resquiciais dos

ferrenhos defensores do vitalismo que, sem demora, disseram que tal processo era mediado pela mística “*força vital*”. Curiosamente, o próprio Pasteur hesitava com relação a isto e após suas tentativas frustradas de obter “*fermento*” puro sem células vivas de levedo, estas afirmações eram as únicas cabíveis que ele poderia conceber ante os resultados obtidos até então, embora ele mesmo dissesse abertamente que não aceitava e nem rejeitava a possibilidade de haver fermentação em meios não vivos, antecipando que ela poderia ser alcançada futuramente. (86)

Por certo, tempos depois, os estudos feitos por Hans Ernst August Buchner (1850-1902) e seu irmão mais novo, Eduard Buchner (1860-1917), demonstraram que a fermentação alcoólica também ocorria na ausência de células vivas do levedo. Os irmãos Buchner conseguiram obter extratos de leveduras nos quais suas células eram mecanicamente autolisadas (almofariz e prensa) resultando, portanto, em extratos desprovidos de células vivas, chamados por eles de “*sucos de prensa*”. À vista disso, os irmãos concluíram que o “*fermento*” era sim proveniente da célula do levedo (conforme Pasteur dizia), mas também era separável desta. Outrossim, eles enunciaram que devido a ação do “*fermento*” o fenômeno ocorria (não pela misteriosa “*força vital*” da célula), por meio de um processo puramente químico, livre de células, contrariando os resultados de Pasteur. Estes trabalhos renderam a Eduard Buchner o Nobel de Química de 1907, o qual não pôde ser partilhado com seu irmão mais velho Ernst, por este ter falecido anos antes. O termo “*fermento*”, muito usado por Pasteur, caiu no desuso após Wilhelm Friedrich Kühne (1837-1900) cunhar o termo “*enzima*” (“*en*”, que significa “*em*” ou “*dentro*”, e “*zymos*”, levedura) em 1876. Este último termo foi preferido pelos irmãos Buchner para designar o agente catalítico da fermentação, seja na presença ou na ausência de células, pois também admitiam que as enzimas eram os agentes responsáveis por catalisar reações bioquímicas no interior dos seres vivos. Vale mencionar que Eduard Buchner em sua palestra do Nobel, evidenciou seu reconhecimento à importância dos trabalhos precursores de outros cientistas que lhe eram contemporâneos, principalmente os de Pasteur, o qual chamou de “*Brilhante Químico*” e “*Grande Experimentador*”. (87)

Na virada para o século XX, tanto o conceito de proteína quanto o de enzima estavam muito bem estabelecidos sob o aspecto prático e já eram amplamente aceitos, porém, pouco se sabia e muito se cogitava sobre outros importantes aspectos a seu respeito, como natureza química, estrutura, papel fisiológico /

metabólico e uma possível relação de identidade química entre ambas, já que haviam semelhanças de comportamento bioquímico. Em 1902, outro químico alemão, Franz Hofmeister (1850-1922), insinuou que as proteínas pudessem ser constituídas por aminoácidos (AAs). Estes compostos de caráter anfótero já eram conhecidos desde o início do século XIX pelos trabalhos dos químicos franceses Louis Nicolas Vauquelin (1736-1829) e Pierre Jean Robiquet (1780-1840), que isolaram pela primeira vez o aminoácido natural asparagina (Asn) do aspargo (*Asparagus officinallis*), em 1806. Porém, foi somente em 1926, após sete anos de esforços incansáveis e muita obstinação, que o bioquímico estadunidense James Batcheller Sumner (1887-1955) conseguiu uma verdadeira façanha, ao isolar/purificar, pela primeira vez na história, através de recristalização, a urease (enzima muito estudada na época que hidrolisa a uréia em gás carbônico, CO₂, e amônio, NH₄⁺). Sumner, que inicialmente enfrentou grande descrença da comunidade científica de sua época, se dedicou pelos seus próximos vinte anos em fornecer evidências científicas de que seus cristais eram constituídos pela enzima urease, e esta, por sua vez, era formada por proteína. (88)

Durante a primeira metade do século XX mais de 100 enzimas cristalizadas haviam sido reportadas e todas elas ratificavam a conjectura de Sumner, mostrando que enzima e proteína possuem a mesma natureza química e que a maioria das enzimas teria natureza proteica, sendo formadas por uma ou mais moléculas de proteína. Em 1946, Sumner foi reconhecido pela ilustre academia sueca por mostrar que a cristalização de proteínas era factível e recebeu o Nobel de Química daquele ano, juntamente com John Howard Northrop (1891-1987) e Wendell Meredith Stanley (1904-1971). O reconhecimento a Stanley e Northrop se justificou por realizarem o feito da cristalização das primeiras proteínas virais que se tem relato. Resta irrefutável que desde os trabalhos de Sumner em 1919 com cristais de enzimas, a CRX passou a protagonizar os principais avanços da humanidade em diversos campos do conhecimento, incluindo-se as Ciências Médicas e a Biologia Estrutural. (89)

Em 1949, uma das ex-alunas do professor John Desmond Bernal (1901-1971), Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin (1910-1994), publicou a estrutura cristalina do potente antibiótico penicilina G, surpreendendo a todos com a proposição de um anel *beta*-lactâmico em sua estrutura molecular. De uma simples aluna aplicada a expoente da Ciência do século XX, Dorothy já havia esboçado

sinais de sua brilhante carreira acadêmica na década de 1930, quando relatou, juntamente com seu professor, o primeiro difratograma de uma proteína com qualidade aceitável gerado por cristais de pepsina. (90)

Anteriormente, Dorothy já havia observado o fenômeno da difração em cristais de macromoléculas, entretanto as suas primeiras imagens dos difratogramas tinham resolução precária. Dorothy concluiu que os cristais de macromoléculas geralmente eram suscetíveis à deterioração de forma espontânea quando expostos ao ar, e perdiam, por conseguinte, sua cristalinidade, implicando em um padrão de difração com baixa qualidade. Dorothy contornou esta limitação prática ao realizar os experimentos com suas proteínas envoltas por gotas de solução-mãe, evitando que os cristais dessecassem ao ar, conseguindo coletar dados cristalográficos tratáveis. (91)

Realçando o brilho de mãos femininas em prol de grandes descobertas da Ciência nessa época, Rosalind Franklin (1920-1958) começou a trabalhar com cristais de DNA em 1951, que já havia sido isolado em 1860 e fora chamado de “nucleína” por Friedrich Miescher (1844-1895). Rosalind conseguiu coletar bons difratogramas e, mirando um feito inédito, visava determinar sua estrutura 3D. Entretanto, Maurice Wilkins (1916-2004), seu então colaborador de pesquisa, ciente de que estava diante de uma verdadeira proeza, decidiu compartilhar, mesmo sem o consentimento de Rosalind, tais difratogramas com Francis Crick (1916-2004) e James Watson (hoje, aos 95 anos). De fato, Wilkins, Watson e Crick se “debruçaram” com afinco sobre os difratogramas de Rosalind e conseguiram resolver a estrutura do DNA em tempo recorde, publicando-a em 1953. Em virtude deste trabalho, que revelou o fascinante arranjo em dupla-hélice de uma das principais moléculas da vida, o trio de cientistas foi laureado com o Nobel de Medicina em 1962, enquanto Rosalind faleceu precocemente anos antes, em 1958, e sem qualquer reconhecimento. Linus Pauling (1901-1994) era um dos poucos químicos cristalógrafos da época que não se impressionaram com a dupla-hélice do DNA. Pauling (Nobel de Química em 1954), com base em sua mente engenhosa e intuição certa, já havia previsto este arranjo espacial para outras cadeias poliméricas se apoiando unicamente em geometria molecular, a exemplo da *alfa*-hélice de uma das formas de queratina publicada por ele e Robert Corey (1897-1971) em 1951. (92)

Também em 1962, a cobiçada medalha premiaria outros dois pesquisadores por seus resultados alcançados no campo da CRX Macromolecular, Sir John Cowdery Kendrew (1917-1997) e Max Ferdinand Perutz (1914-2002). Ambos trabalhavam colaborativamente e se interessavam pela pesquisa com proteínas globulares. De fato, eles mereceram dividir o Nobel de Química daquele ano, pois Kendrew, em 1957, e Perutz, em 1959, resolveram a mioglobina e a hemoglobina, respectivamente. A honraria lhes foi concedida por conseguirem realizar o feito de determinar a estrutura 3D das duas primeiras proteínas da história. Curiosamente, a hemoglobina já inquietava alguns cientistas há no mínimo 100 anos, pois em 1840 os misteriosos “cristais de sangue” já eram conhecidos. (93)

Pressagiando uma nova era tecnológica que começava a florescer nas primaveras da década de 1960, Dorothy liderou um projeto pioneiro visando determinar a estrutura da vitamina B12 sob o auxílio dos primeiros computadores eletrônicos. Dorothy atingiu seu objetivo rapidamente e inaugurou um novo *modus operandi* não só na CRX, mas na Ciência de uma forma geral, sendo praticamente impossível produzir e replicar o conhecimento desvencilhado do suporte de computadores (“mentes eletrônicas”) e técnicas computacionais. Este trabalho de Dorothy ganhou notoriedade no meio científico por ela ter resolvido simplesmente a maior estrutura cristalina da época, situando-a como merecedora incontestemente do Nobel de Química de 1964. (91, 94)

Apesar de conhecidas e passíveis de cristalização desde os trabalhos de Sumner, as enzimas ainda não haviam tido uma estrutura cristalina elucidada até a publicação da lisozima, em 1965. Em se tratando de proteínas, a função emana da forma, então a estrutura da lisozima foi extremamente útil para propor um mecanismo de seu funcionamento em nível atômico. Este fluxo de trabalho, configura um belo exemplo em que a aplicabilidade da CRX transpôs as arestas de um simples cristal e pôde ser extrapolada para interpretação de fenômenos que, originalmente, não são de sua alçada. Dorothy, em 1969, publicou a estrutura do primeiro hormônio proteico (insulina) em um trabalho solo, após ter perseguido este objetivo por 35 anos de sua carreira, uma vez que ela coletou os primeiros difratogramas da insulina em 1934. (95)

2.3.1 Protein data bank

Encorajado pelo progresso da CRX de macromoléculas que já se mostrava pujante durante as primeiras décadas da segunda metade do século XX, o *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB PDB, ou, simplesmente, PDB) foi inaugurado em Outubro de 1971. A iniciativa ousada de alcance bicontinental reuniu pesquisadores filiados ao *Brookhaven National Laboratory* (BNL), pertencente ao Departamento de Energia dos Estados Unidos da América (EUA), e do *Cambridge Crystallographic Data Center* (CCDC), vinculado à Universidade de Cambridge, no Reino Unido (RU). (96)

Desde a sua criação, o PDB possui como uma de suas principais funcionalidades a compilação de dados da estrutura tridimensional (3D) de biomacromoléculas com elevado interesse científico, como proteínas, ácidos nucléicos e carboidratos. Quando foi fundado, o PDB incluía 7 estruturas proteicas depositadas e este número, embora hoje seja considerado irrisório, representava um grande avanço para a época. Em pouco mais de meio século de existência, estes números cresceram exponencialmente ano após ano. Para suscitar uma vaga percepção desta escalada íngreme, saiba que, neste exato momento, acessar a *homepage* do depósito PDB significa ter o privilégio de explorar um número de estruturas experimentais quase 30 mil vezes superior ao inicial, com 208.066 entradas. Surpreendentemente, este repositório de acesso aberto é atualizado com frequência semanal (todas as quartas-feiras), mesmo armazenando mais de 100 *terabyte* (TB) de informações. Além disso, no PDB existem mais de 475 recursos para busca de dados biológicos, e a média diária atual de *downloads* supera a marca de 2 milhões de arquivos com coordenadas 3D. A grande maioria dos *IPs* (*Internet Protocols*) de usuários desta plataforma se concentra no país anfitrião (EUA), seguido pelos acessos requeridos por *IPs* endereçados na China. (97)

Desde 2003, o PDB é gerenciado pelo consórcio *Worldwide PDB* (wwPDB), que atualmente está sediado nos EUA e é integrado pelo próprio RCSB, por bancos de dados locais (Europa, PDBe; Japão, PDBj; e, mais recentemente, China, PDBc) e por bancos de dados gerados pelas estruturas resolvidas por técnicas distintas à CRX (*Biological Magnetic Resonance Bank*, BMRB; e, *Electron Microscopy Data Bank*, EMDB). Anualmente, o PDB recebe mais de 10 mil novos depósitos e oferece serviços essenciais aos seus depositantes e usuários, espelhando a observância,

desde 2013, dos princípios FAIR (*Findability, Accessibility, Interoperability, and Reusability*) e FACT (*Fairness, Accuracy, Confidentiality, and Transparency*), aplicáveis às bases de dados da Era 4.0. A grande maioria das estruturas 3D depositadas no PDB foram elucidadas por técnicas cristalográficas (PXRC: ~90%), seguida pela contribuição da microscopia eletrônica 3D (3DEM: ~7,6%), que, inobstante ser uma técnica mais recente, já ultrapassou a ressonância magnética nuclear (NMR: ~3,7%). (98)

Mais de 70% das estruturas depositadas correspondem a sistemas multicomponentes (*i.e.*, composição heteromérica; pequenas moléculas cocrystalizadas). Deste subtotal, cerca de 106 mil macromoléculas estão complexadas a ligantes de moléculas pequenas e podem ser facilmente exploradas como modelos supramoleculares por pesquisadores que se dedicam a desenvolver funções de pontuação mais acuradas com base em protocolos de *Machine Learning* (ML). Aliás, é inexorável não reconhecer que o halo de aplicabilidade do PDB está se expandindo rapidamente devido às contribuições das áreas de Inteligência Artificial (AI) e ML. De fato, apesar das mais de 200 mil macromoléculas resolvidas experimentalmente representarem um número expressivo, ainda existem milhões delas com estruturas desconhecidas. Neste sentido, os métodos computacionais vem exercendo seu papel com destreza e acurácia para ampliar o espaço biológico disponível. Afinal, desde 2020, os modelos estruturais calculados (CSMs) passaram a integrar o PDB e já somam mais de 1 milhão de estruturas 3D resolvidas computacionalmente. A confiabilidade destes modelos se justifica pelo baixo desvio em relação às estruturas empíricas usadas para corroborar o sucesso de seu funcionamento. Neste cenário, um horizonte amplo de oportunidades se apresenta através destes modelos, representado uma ótima alternativa para a exploração de alvos promissores e que antes eram inacessíveis. (99)

É fato concorde que o PDB possui valor científico inestimável, mas também apresenta alto valor financeiro agregado. Estima-se que o acervo 3D do PDB gera um retorno monetário anual cerca de 1500 vezes o custo para mantê-lo disponível. O ônus pelo seu funcionamento ininterrupto representa uma cifra impressionante estimada em 20 bilhões de dólares americanos, que são financiados por diversos institutos e órgãos governamentais de fomento à pesquisa científica global, situados nos EUA, Europa e Ásia. Uma análise bibliométrica recente apontou que uma das referências originais do PDB possui quase 40 mil citações e figura entre as fontes

mais referenciadas da literatura científica. Os dados oriundos do PDB foram cruciais para a elaboração de mais de 1 milhão de artigos de pesquisa em diversas searas da Ciência, além de terem contribuído decisivamente para inúmeros pedidos de patente de diferentes eixos tecnológicos nas últimas décadas. (100)

O leque de campos científicos que se beneficiam dos serviços de excelência (“*gold standard*”) oferecidos pelo PDB é bem amplo e diversificado. Obviamente que neste grupo heterogêneo e interconectado de áreas multidisciplinares se inclui a Química Medicinal. Em fluxos de trabalho visando a inovação molecular para fins terapêuticos, dispor da estrutura 3D do alvo biológico de interesse (SBDD / CADD) representa um grande estímulo, pois as chances de sucesso aumentam significativamente. O cenário da indústria farmacêutica dos últimos 15 anos sentiu vultosamente os impactos de campanhas inovadoras de Química Medicinal guiadas por estruturas depositadas no PDB. Numa tentativa de dimensionar este impacto, alguns números podem deixar o leitor estarecido, pois simplesmente 90% dos 210 programas de fármacos aprovados pelo FDA entre 2010-2016 foram facilitados por *insights* estereoquímicos e topológicos propiciados pelas ferramentas do PDB. Várias classes farmacológicas foram contempladas e novas opções farmacoterapêuticas passaram a integrar o arsenal molecular da clínica médica no combate às inúmeras enfermidades humanas. Valendo destacar que a maior parcela destes novos fármacos aprovados é formada por antitumorais (~30%) para o tratamento de cânceres raros e altamente perniciosos, a exemplo das 6 moléculas salva-vidas inventadas pela FBLD na última década. Pelas razões supramencionadas, o PDB passou a ser considerado um bem público global, uma fonte permanente geradora de conhecimento e inovação, acessível a qualquer “curioso *online*” de algum canto do planeta. (101)

2.4 SUÍTE AUTODOCK: UMA CAIXA VIRTUAL DE FERRAMENTAS

Essencialmente, o *docking* molecular denota uma técnica computacional baseada no paradigma chave-fechadura de Emil Fischer, que objetiva prever alguns microestados do perfil de estabilidade termodinâmica do sistema P-L, discriminando as conformações ligadas segundo estimativas de BA. O *AutoDock* compreende uma suíte de ferramentas computacionais gratuitas com código-fonte aberto, originalmente programadas em linguagem C/C++ e aplicáveis em sistemas

biomoleculares, abordando-os sob relevantes aspectos. Atualmente, os seus pacotes de *software* figuram entre os programas mais utilizados por pesquisadores acadêmicos e corporativos ao redor do globo para simulações de encaixe molecular em sistemas biomoleculares.

2.4.1 Perspectiva histórica

A primeira publicação dos desenvolvedores da suíte, relatando um método automatizado de encaixe, é datada do ano de 1990. Além de registrar o pioneirismo na área, este manuscrito pode ser considerado um verdadeiro marco na trajetória científica de muitos profissionais ou simples entusiastas da Bioinformática e da Química Computacional. De fato, os resultados apresentados por dois dos pesquisadores filiados ao *Scripps Research Institute* (SRI) provocaram certo espanto na comunidade científica da época por conseguirem prever (ou recuperar), com aproximação apreciável, os modos de ligação existentes em vários complexos supramoleculares envolvendo algumas proteínas e seus respectivos substratos com estrutura cristalográfica elucidada. (102)

O primeiro método computacional lançado pelo SRI foi chamado de “*Automated Docking*” na publicação original, pois ainda não havia recebido um nome específico de “mercado”. Ele combinou uma abordagem volumétrica (*volumetric approach*) para análise de energias, com um método de otimização meta-heurístico proposto por Metropolis *et al.*, conhecido como “*Simulated Annealing*” (SA), podendo ser traduzido livremente como recozimento simulado. (103) Em pleno início da década de 1990, a infraestrutura computacional e o gerenciamento de grande volume de dados eram muito incipientes, exigindo várias aproximações e etapas preliminares de cálculos dos mapas volumétricos de energia, para permitir a realização de simulações de *docking* em intervalos de tempo razoáveis. Em 1996, foi lançada uma versão atualizada, já com a denominação *AutoDock* (AD), que certamente é uma forma contracta de se referir ao termo inicial “***Automated Docking***”. (104)

AutoDock 2.4 (AD2) foi apresentada como uma versão aprimorada, pois alcançou níveis significativos de performance e acurácia. Ela foi robustecida pela incorporação de um algoritmo genético híbrido (*Hybrid Genetic Algorithm*, HGA), para buscar as conformações ligadas, e por um campo de força baseado em princípios da física,

semelhante ao AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), para avaliar as respectivas energias de interação por meio de um método rápido baseado em grades de distribuição. (105) No âmbito das terminologias, e considerando a sequência cronológica dos programas lançados, é frequente, entre diversos membros da comunidade de usuários, o uso informal do termo *AutoDock 1* (AD1) para se referir ao método pioneiro descrito em 1990.

O passar dos anos e a virada do século XXI permitiram ao SRI avanços expressivos em Quimioinformática, bem como em áreas afins, e culminaram no lançamento do *AutoDock 4.2* (AD4) em 2009, juntamente com o pacote de ferramentas gráficas e operacionais designado *AutoDockTools 4* (ADT4). (106) Cabe mencionar que, neste meio tempo, uma versão anterior (“experimental”) havia sido lançada, o *AutoDock 3* (AD3), (107) mas a sua acurácia modesta, recuperando apenas 50% dos complexos cristalográficos estudados, limitou a sua aceitação e acabou relegando-a a um relativo desuso, ensejando novos *upgrades*. Neste sentido, AD4 despontou anos mais tarde, correspondendo às expectativas e apresentando funcionalidades inovadoras, se tornando o segundo pacote AD mais explorado do SRI. (108)

AD4, que inclusive é uma das “*stable releases*” da suíte AD, incorpora um novo método de busca conformacional baseado num algoritmo genético lamarckiano (*Lamarckian Genetic Algorithm*, LGA), o de Solis-Wets (SW), além dos algoritmos já implementados nos programas anteriores. Para predição das LEs foi implementado um campo de força de energia-livre semi empírico (AMBER) calibrado por um conjunto de 188 complexos P-L, compreendendo um modelo termodinâmico capaz de acessar dados de energia intramolecular avaliando os estados “ligado” e “não ligado” do sistema P-L. Com isto, AD4 se consolidou como uma das primeiras plataformas de *docking* a estimar não apenas meras energias, mas sim energias-livres de ligação, que guardam relação direta com dados empíricos de BA. (109, 110)

A função score do AD4 utiliza, além do AMBER, termos do modelo de van der Waals, de potenciais eletrostáticos, interações de hidrogênio (*hydrogen bonds*, HBs), dessolvatação, hidrofobicidade e de penalidade de entropia conformacional. Indiscutivelmente, ela é reputada como uma das mais completas da suíte, entretanto seu arsenal de algoritmos foi considerado relativamente lento, insuficiente para executar seus múltiplos recursos e funcionalidades com celeridade e eficiência

aceitáveis. AD4 conta com um novo método de dessolvatação capaz de modelar moléculas de água (H₂O) de maneira explícita, e dimensionar efeitos do solvente sobre o processo de estabilização do complexo P-L. AD4 permite prever complexos tratando explicitamente tanto o ligante quanto partes específicas (cadeias laterais) da proteína como flexíveis (*docking* flexível-flexível), e possibilita ao usuário realizar estudos de *docking* envolvendo ligantes covalentes, que sempre será uma abordagem atraente de química medicinal para alvos desafiadores providos de resíduos quimicamente reativos. (111)

Além disso, AD4 permite modelar a flexibilidade de ligantes macrocíclicos (e.g., peptídeos ou compostos peptídeo-símiles de interesse terapêutico), e, até mesmo, metaloproteínas ou coordenação de metais em seus diferentes estados de oxidação (*AutoDock4_{Zn}*, AD4_{Zn}). Apesar do sucesso do AD4, ele inspirou outro desafio ao SRI, o de balancear habilmente a gangorra “função escore / algoritmo de busca”, visando o melhor binômio “desempenho / velocidade”. (112) Neste sentido, apenas um ano após o lançamento exitoso do AD4, o SRI ousou lançar o pacote do *AutoDock Vina* (AD*Vina*, ADV, ou simplesmente, *Vina*) em 2010, o qual se tornaria o verdadeiro “*blockbuster*” do instituto (i.e., sua principal “*stable release*”). Nesta Tese o *Vina* foi sistematicamente explorado e, destarte, recebeu atenção especial na seção subsequente. Por ora, alguns lacônicos comentários merecem ser tecidos a seu respeito no que se refere a sua velocidade superior, acurácia e facilidade de uso por uma comunidade heterogênea e crescente de indivíduos não especialistas, justificando sua hegemonia e popularidade. (113) Em 2015, o SRI lançou o *AutoDockFR* (ADFR) na tentativa de abordar o problema das simulações moleculares numa perspectiva mais abrangente e capciosa, imposta pela explicitação de receptores flexíveis, sem perder acurácia e celeridade. O desafio da vez foi simular a flexibilidade de outras partes do receptor, além de somente cadeias laterais. Neste sentido, ADFR se apresentou como uma abordagem mais ampla que o AD4 quando o quesito é modelar a flexibilidade do alvo (quase na sua completude) e do ligante, simultaneamente, para encontrar as melhores conformações ligadas. Além de permitir a atribuição de até 15 cadeias explicitamente flexíveis, o ADFR permite pré posicionar o ligante em sítios específicos, além de possibilitar estudos de *docking* covalente. (114)

Posteriormente, em 2019, foi a vez do SRI contribuir com sua expertise no âmbito do desenho racional de novos fármacos baseados em peptídeos, (115)

propondo o AutoDock *CrankPep* (ADCP). Interações proteína-proteína (PPIs) medeiam diversas funções biológicas e representam, ao mesmo tempo, um leque de gargalos e oportunidades na área de inovação farmacêutica. As PPIs geralmente ocorrem quando segmentos peptídicos de cadeias distensíveis de uma proteína se projetam na interface de bolsos rasos de outra proteína para estabelecerem a interação, formando multímeros proteicos supramoleculares. A pesquisa de peptídeos para fins terapêuticos representa uma área em plena expansão, e com o suporte do ADCP tornou-se possível realizar simulações confiáveis de encaixe envolvendo ligantes lineares ou cíclicos com até 20 AAs na sequência peptídica. O ADCP surgiu como o primeiro *software* que alcançou a façanha de reproduzir 91% das poses cristalográficas de um conjunto de 38 complexos formados por peptídeos cíclicos, longos e altamente flexíveis (com várias ligações saturadas). (116, 117)

Ainda em 2019, uma versão “turbinada” do AD4 foi lançada em meio ao *Grand Challenge 4* (GC4), evento promovido anualmente pelo *Drug Design Data Resource* (D3R), destinado a encorajar inovações na comunidade de química computacional e de áreas afins. Esta nova versão do AD4, acelerada por unidades gráficas de processamento (*AutoDock-GPU*), superou as expectativas, demonstrando performance superior, sendo centenas de vezes mais rápida que o AD4 executado em CPU única (*Central Processing Unit*). (118, 119) Até onde se sabe, ao menos enquanto digitam-se estas palavras, *AutoDock Vina 1.2.0*, é o produto mais recente lançado publicamente pelo SRI (2021). (120) Ele será abordado juntamente com o *Vina* logo à frente.

Em meio às múltiplas plataformas do SRI, ainda cabe menção para as interfaces gráficas *Raccoon2*, (121) *AGFRgui*, (122) e *MGLTools*, (123) (que incorporou o ADT4), além de outras duas ferramentas para predição de sítios de ligação, *AutoLigand*, (124) e *AutoSite*. (125) Diante deste esmerado portfólio de *softwares*, torna-se inescusável reconhecer, meritamente, o ritmo “frenético” e “efervescente” de trabalho do SRI para produzir ferramentas computacionais robustas e confiáveis, colocando-as gratuitamente à disposição da comunidade científica e respondendo a inúmeros anseios dos inventores de moléculas bioativas planeta afora. (126)

2.4.2 Autodock vina

Durante o período de desenvolvimento do *Vina*, uma variedade significativa de testes teve que ser explorada no que se refere a quais algoritmos e funções de pontuação seriam mais satisfatórios para serem implementados em sua lógica computacional. Sistemáticamente, o *software* fundamentou-se na premissa de receptores rígidos e foi avaliado, sob este prisma (*docking* semi-flexível), abordando várias funções *escore* e diversas abordagens estocásticas de otimização numérica. Aqui cabe mencionar algumas, como o algoritmo genético (*Genetic Algorithm*, GA), enxame de partículas (*Particle Swarm*, PS), e recozimento simulado (SA). Além disso, estes métodos foram combinados com outros procedimentos implementados para acelerar o processo de otimização, chamados pelos próprios autores de “truques especiais”. (127)

Após o período de ensaios e avaliação dos resultados, seus idealizadores optaram por um protocolo que combina dois algoritmos e promovem a otimização heurística do problema, ou seja, encontram as melhores soluções para a função de forma mais célere. O primeiro método de otimização não linear é o algoritmo de busca local, popularmente conhecido pela sigla BFGS, e o segundo corresponde ao método de otimização global que é referido como “*Iterated Local Search*” (ILS). Para prosseguir, é plausível mencionar que entende-se por ótimo global ou absoluto o maior ou o menor valor, como convier, que se sobressai entre todos os demais valores possíveis, inclusive ótimos locais, dentro de um espaço de busca (domínio viável). (128)

2.4.2.1 Algoritmo BFGS

O BFGS é um método numérico de otimização local cujo acrônimo se refere às iniciais dos sobrenomes de seus quatro idealizadores: Charles George **B**royden, Roger **F**letcher, Donald **G**oldfarb e David **S**hanno. Este tipo de algoritmo de busca é um dos mais empregados para ajustar outros algoritmos, como os de aprendizado de máquina. O BFGS utiliza aproximações numéricas das segundas derivadas parciais (componentes da matriz hessiana) da função objetivo multivariável (lei matemática que descreve o sistema real em questão, que neste caso é a função de pontuação) para realizar a otimização por meio da técnica das secantes de Newton.

Por isto, sugestivamente, o método BFGS é classificado como um algoritmo de segunda ordem quase-Newton. (129)

O método de otimização de Newton-Raphson, mais popularmente conhecido como método de Newton, tem uma sólida fundamentação geométrica e um vasto campo de aplicação, mas ele impõe a determinação numérica da inversa da hessiana e esta foi a principal razão para o surgimento de variantes que dispensassem esta tarefa, como o próprio BFGS. De fato, uma das principais motivações para evitar o método de Newton-Raphson em lógicas de programação é não ter que calcular os valores da matriz hessiana invertida, a qual requer um custo computacional relativamente elevado, associado a um intervalo de tempo maior para resolução analítica e que nem sempre pode resultar em soluções possíveis para a função objetivo em estudo. O método BFGS, assim como os demais algoritmos quase-Newton, não carece do exaustivo cálculo do valor da hessiana nem de sua inversa. Ou seja, os valores exatos da hessiana não precisam estar disponíveis em cada etapa do algoritmo, pois ele se baseia em estimativas obtidas por meio de fórmulas mais simples e rápidas. (130, 131)

No ambiente do *Vina*, o BFGS realiza a otimização usando o valor extraído da função de pontuação juntamente com o seu gradiente, que é a derivada parcial desta função em relação a cada uma de suas variáveis. Estes argumentos ou parâmetros do problema em análise, que neste caso é o complexo P-L, basicamente correspondem às coordenadas atômicas do ligante e de resíduos flexíveis (quando houverem), às suas orientações e aos ângulos diedro oriundos de ligações rotáveis ativas. Estes gradientes podem ser interpretados fisicamente como a força e o torque negativos atuantes sobre a pequena molécula que a impulsiona a adotar as conformações favoráveis nos complexos mais estáveis, conforme influências do campo de forças considerado. (132)

Paradoxalmente, apesar de a avaliação destes gradientes em cada ciclo acrescentar uma etapa a mais a ser executada pelo algoritmo, ela pode torná-lo mais célere. Este ganho de velocidade computacional se justifica facilmente, pois os gradientes atuam como verdadeiras “bússolas” ou “GPSs” (*Global Positioning System*, termo mais familiar para os filhos desta Era 4.0) apontando para os valores ótimos e a que distância eles se encontram do ponto de partida. De fato, o gradiente carrega em si um *combo* de valiosas informações para a resolução deste problema “caixa preta”, pois o seu sinal (+ ou -), a mudança deste, e o seu módulo, podem

indicar, respectivamente, a subida ou a descida do vale (a direção correta a ser seguida), a existência de um ponto crítico candidato a ótimo local, e a proximidade deste em relação ao ponto referencial. Em suas rotinas, o BFGS foi combinado com um algoritmo de Monte-Carlo (MC), (133) partindo de conformações aleatórias com o tamanho e o número de passos (ou perturbações) definidos de forma adaptativa. Ao final do processo, o BFGS reúne os valores ótimos locais encontrados em cada ciclo para posterior refinamento e decisão sobre o ótimo global, que são duas das atribuições a serem executadas pelo ILS, descrito na seção subsequente.

2.4.2.2 Algoritmo ILS

O ILS, cuja tradução livre pode ser “Busca Local Iterada”, compreende uma técnica metaheurística de pesquisa por valores ótimos (mínimos ou máximos) através da descida ou subida de vales que são característicos de funções multimodais, e cuja representação cartesiana (gráfica) serve para descrever o comportamento de vários problemas reais, entre os quais se enquadra a estabilidade termodinâmica (cenário energético) do complexo P-L. Interessante pontuar que, neste caso, o termo “complexo” pode exprimir uma ambiguidade semântica, uma vez que não seria exagero dizer que prever o modo de ligação no ambiente biológico implica em grande complexidade biomolecular praticamente impossível de ser traduzida, em sua completude, por uma lei matemática temporalmente solucionável.

Em geral, os métodos de busca podem fracassar na tarefa de encontrar ótimos globais, pois não apresentam artifícios capazes de explorar vales mais longínquos quando se deparam com um valor ótimo local de um vale com concavidade relativamente acentuada rodeado por vales adjacentes rasos. Portanto, devido ao fato de os vales mais próximos não apresentarem valores melhores, o algoritmo acaba “despencando em um precipício” (tecnicamente referido como “bacia de atração”) e ficando confinado no vale local mais íngreme dentro daquela região do espaço de busca, o qual pode não ser o vale mais profundo e detentor do valor ótimo absoluto. (134)

Inobstante estas “armadilhas”, o ILS consegue escapar por meio de uma sequência de etapas inteligentes de otimização. O ILS foi estruturado lógica e intuitivamente com base na premissa de que a busca pelos melhores ótimos pode

ser bem sucedida quando valores baixos (ou altos) forem adotados como pontos de partida, em vez de valores meramente aleatórios. Estes valores de referência podem ser recuperados das rotinas executadas preliminarmente pelo BFGS, e proporcionam considerável melhora no desempenho computacional. Criteriosamente, a tarefa de procura pelo ótimo pode ser facilitada e acelerada quando se parte de valores próximos a ele em detrimento de valores quaisquer, que podem estar distantes. Além disso, a cada rotina de busca, o ILS memoriza o aprendizado adquirido sobre os mínimos locais de rotinas anteriores e começa a nova rotina partindo de pontos de busca gradativamente melhores, caracterizando a iteratividade do processo. Ao encontrar um ótimo local, o ILS dá passos (impulsionados por saltos ou perturbações) com força suficiente para transpor o vale atual e definir pontos de partida em vales vizinhos, onde recomeça a tarefa de encontrar novos ótimos. Estas perturbações são incorporadas na estrutura do ILS por meio de outros algoritmos compatíveis e eficientes, como aqueles que propiciam perturbações adaptativas e de *benchmark*. Por fim, após realizar todos os ciclos aceitos pelo critério de Metropolis (MC) dentro do espaço de busca, o algoritmo ILS finaliza a tarefa e estabelece o ótimo global, mantendo e classificando um número prefixado de valores em ordem decrescente (neste caso, seriam as melhores poses do ligante no sítio de ligação que originou os complexos mais exergônicos). (135)

2.4.2.3 Função de pontuação

A função *escore* implementada no *Vina* pode ser considerada uma função *escore* de natureza mista e mais simples que a do AD4, agregando aspectos teóricos e parâmetros extraídos de um vasto conjunto de dados experimentais da literatura científica. Ela foi desenvolvida no anseio de quantificar e compreender um problema real no ambiente biomolecular governado por forças químicas, cuja descrição é alicerçada, inexoravelmente, pelo potencial de van der Waals e por alguns princípios da física clássica, como a segunda lei de Newton, as duas primeiras leis da termodinâmica e a lei de Hooke. (127, 136)

Tal função se propôs a estimar o potencial químico padrão do sistema P-L e, por isto, foi ponderada empiricamente, assim como a do AD4, por valores extraídos de testes laboratoriais que aferiram a magnitude da resposta biológica desencadeada pela interação de ligantes de pequenas moléculas com receptores

macromoleculares. Por esta razão, diferentemente de outras funções escore implementadas em programas computacionais para o mesmo fim, as estimativas fornecidas pela função do *Vina* guarda uma relação direta com os valores extraídos da lei que define a energia livre de Gibbs do sistema em questão. Sendo assim, os valores preditos não são meras representações numéricas de energia, mas carregam informações termodinâmicas relevantes. (127)

A variação da energia-livre de Gibbs e, conseqüentemente, o potencial químico padrão, representa a tendência / preferência do complexo P-L por uma dada conformação ligada. Em uma situação ideal, é interessante que esta conformação predita para o arranjo 3D apresente razoável proximidade com a estrutura cristalográfica, e a respectiva energia estimada seja a mais próxima possível daquela advinda dos dados de afinidade, como a K_i e o IC_{50} . Neste sentido, a função do *Vina* foi inspirada em outra função de pontuação já bem estabelecida na literatura, a *X-SCORE*. (128) Ambas foram aprimoradas com valores obtidos em testes biológicos práticos depositados em bases de dados, como a *PDBbind*. (129, 130) Pelo fato delas terem sido treinadas por uma miscelânea de resultados experimentais (aproximadamente 1300 complexos no caso do *Vina*), considera-se que elas possuam um certo grau de aprendizado de máquina na sua abordagem, sendo esta a principal égide que corrobora seu amplo emprego no meio científico especializado que inventa novas moléculas aspirantes a fármaco. (127)

De fato, a função do *Vina* incorpora as vantagens de funções escore empíricas, se beneficiando tanto de informações estruturais de complexos P-L elucidados, bem como dos valores disponíveis de ensaios de afinidade (*i.e.*, testes *in vitro*, pré-clínicos e clínicos). Além disso, cabe mencionar que a função do *Vina* possui alguns termos distintos da *X-SCORE*, permitindo-a ir além de uma rotina simples de regressão linear e considerar restrições internas específicas para discriminar previsões de estruturas potencialmente conflitantes. (127, 136)

A lei matemática implementada no *Vina* que guarda dependência direta com as variáveis conformacionais do sistema P-L é dada pela equação abaixo. Ela expressa o somatório de todas as contribuições intra e intermoleculares de pares de átomos vizinhos separados por até 3 ligações covalentes consecutivas, equação (2):

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) = C_{intra} + C_{inter} \quad (2)$$

em que f_{tij} denota as funções de interação entre átomos do tipo t_i e t_j separados por uma distância interatômica dada por r_{ij} . Os valores de c são expressos em unidades SI de energia e representam o conjunto de valores componentes do contradomínio viável da função c .

As energias de interação previstas (s_1) são calculadas baseando-se apenas no termo intermolecular, por isto ela é determinada subtraindo-se c_{intra} , da melhor conformação, dos valores de c . Portanto, os valores para as energias s_1 são dadas matematicamente pela equação (3):

$$s_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1}) \quad (3)$$

Em que o subscrito “1” designa um par atômico genérico e g geralmente é uma função não linear crescente e com leve inclinação. Na prática, tanto a função f_{tij} quanto a função g são essencialmente parâmetros inseridos na rotina de cálculo dos algoritmos do *Vina* e a tipagem atômica é realizada com base em abordagens progressas, como a do próprio AD4, da *X-SCORE* e *SYBIL*. Os algoritmos de otimização rastreiam os valores encontrados para s_1 , ranqueiam as conformações mais exergônicas e apontam a mais estável (o mínimo global). Basicamente, as funções de interação f_{tij} também podem ser derivadas da equação principal e definidas em relação aos raios de van der Waals (R_{ti} e R_{tj}) dos átomos t_i e t_j , equação (4):

$$f_{tij}(r_{ij}) \equiv h_{tij}(d_{ij}) \quad (4)$$

em que $d_{ij} = r_{ij} - R_{ti} - R_{tj}$ (chamada de distância inter superfícies) e h_{tij} é uma soma ponderada de todas as contribuições consideradas no problema, como os 3 termos fixos para todos os pares atômicos (gauss1, gauss2 e repulsão), o termo de hidrofobicidade, o termo referente ao número de ligações rotáveis e o termo referente a interações de hidrogênio, conforme explicitado no quadro 1:

Quadro 1- Termos e pesos que contribuem para a estimativa dos valores da função de interação, f_{ij} , implementada no *software AutoDock Vina*.

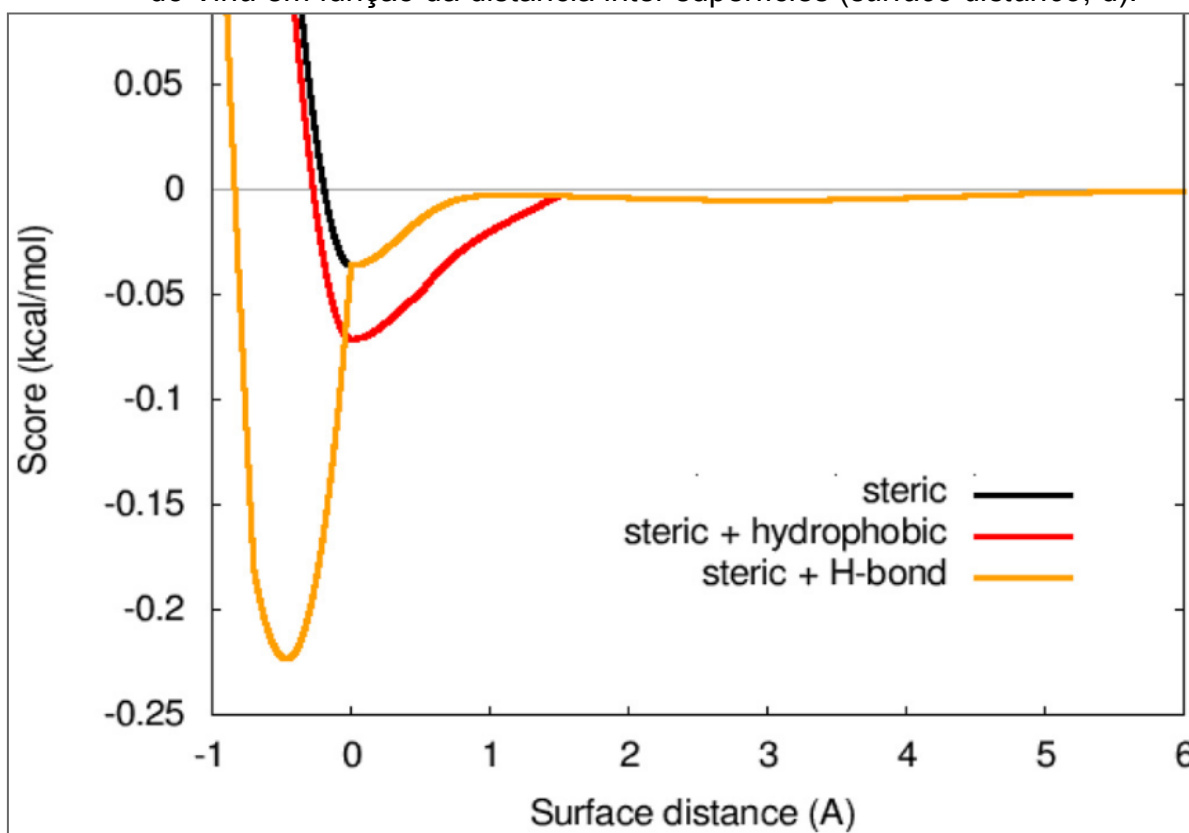
Termo	Peso*	Fórmula
gauss1	-0,0356	$\text{gauss1}(d) = e^{-(d/0.5\text{\AA})^2}$
gauss2	-0.00516	$\text{gauss2}(d) = e^{-((d-3\text{\AA})/2\text{\AA})^2}$
Repulsão	+0.840	$\text{repulsão}(d) = d^2$ se $d < 0$; ou $= 0$ se $d \geq 0\text{\AA}$
Hidrofóbico (Hf)	-0.0351	$Hf = 1$ se $d < 0,5\text{\AA}$; ou $= 0$ se $d > 1,5\text{\AA}$
Ligações rotáveis	+0.0585	$N_{\text{rot}} = 1, 2, 3, \dots, n$
Interações de H (HB)	-0.587	$HB = 1$ se $d < -0,7\text{\AA}$; ou $= 0$ se $d > 0\text{\AA}$

Fonte: Ref. 127 (2010)

Nota: *Para estes valores foram consideradas f_{ij} dentro de um $r_{ij} = 8\text{\AA}$.

A magnitude e o sinal destes termos apontam quais são os fatores mais favoráveis ou mais desfavoráveis à estabilidade do complexo. Sendo assim, os termos negativos contribuem para a formação de complexos mais exergônicos, destacando-se a parcela expressiva de cada HB formada, a qual é cerca de 10 vezes maior que as demais. Por outro lado, os dois termos positivos são aqueles fatores contrários à estabilidade dos arranjos supramoleculares, nos quais o efeito repulsivo representa um dos maiores custos energéticos a serem pagos. A figura 3 mostra o perfil da função g com a distância inter superfícies, d .

Figura 3 - Perfil energético (*score* em kcal/mol) de termos do modelo matemático do *Vina* em função da distância inter superfícies (*surface distance*, d).



Fonte: Ref. 127 (2010)

Nota-se que as curvas dos termos estérico e hidrofóbico atingem o mínimo quando a separação internuclear equivale justamente à soma dos raios de van der Waals dos átomos envolvidos. De fato, por definição, esta é a distância considerada ideal para a formação de uma ligação química covalente, a qual pode ser vista como o limiar de intensidade de qualquer interação não-covalente entre grupos atômicos interagentes. Quando d diminui paulatinamente, o efeito atrativo entre os núcleos atômicos e suas nuvens eletrônicas prevalece, fazendo com que o sistema atinja o seu ápice de estabilidade no instante em que $d = 0$. Entretanto, se d continuar diminuindo ($d < 0$), então o efeito repulsivo predomina, tornando o sistema cada vez mais instável, fazendo as curvas darem um salto positivo na energia potencial. Por outro lado, a curva que considera o termo referente a interações de hidrogênio atinge seu mínimo entre -1 e 0, pois o átomo de H, apesar de estar situado entre os núcleos dos átomos interagentes, induz uma anômala aproximação entre eles provocada pelo seu efeito potencialmente atrativo e estabilizante, sugerindo um leve grau de sobreposição de densidades eletrônicas entre o H e o átomo aceptor.

Na implementação do *Vina*, a função $g(c_{inter1})$ ficou definida pela seguinte expressão, equação (5):

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + wN_{rot}}, \quad (5)$$

em que w são pesos parametrizados para cada valor de N_{rot} .

Novamente, é possível intuir sobre o custo energético que se paga por um maior número de ligações rotáveis na estrutura molecular do ligante devido a sua influência inversamente proporcional para as energias de interação preditas. Do ponto de vista da Química Medicinal, tanto o efeito repulsivo quanto N_{rot} podem ser sabiamente modulados na etapa de desenho racional de ligantes. De fato, para diminuir as chances de uma penalidade estérica, *in silico* e *in vitro*, deve ser evitada a inserção de átomos ou grupos muito volumosos e que possam adquirir carga elétrica parcial de mesmo sinal daquela existente no ambiente químico receptor (cargas atribuídas aos resíduos de aminoácidos, AAs), considerando as peculiaridades de cada sub-cavidade de ligação. Isto significa que é recomendável optar por grupos químicos que sejam compatíveis e complementares com os hotspots receptores, abrangendo concomitantemente os fatores espaciais e eletrônicos mais adequados. No que tange à liberdade conformacional oriunda de ligações rotáveis, se a intenção é favorecer uma dada conformação ativa, torna-se indispensável utilizar técnicas de anelação de grupos funcionais ou empregar os princípios da técnica de restrição conformacional, já bem estabelecidas na literatura. (127, 136)

Certamente, a função implementada no *Vina*, apesar da boa acurácia que possui, apresenta limitações a serem ponderadas. Talvez, um dos fatores ainda não considerados pelos termos de sua função seja a existência de ligações rotáveis com grupos passíveis de desordem ocupacional (e.g., grupo nitro, R-NO₂), capazes de manterem seus graus de liberdade mesmo no estado cristalino. Neste caso, pode-se não ter redução da entropia conformacional, ou seja, a penalidade (efeito endergônico de N_{rot}) por este motivo não mais se justificaria e nem se aplicaria. (137)

Outro fator interessante, que talvez não tenha sido pretendido pela abordagem, compreende os casos de grupos interagentes complementares unidos

por ligações rotáveis, o que implicaria numa certa restrição conformacional intrínseca da molécula (interações intramoleculares). Neste caso, incorre-se no risco de o algoritmo não perceber que trata-se de uma ligação rotável inativa, pois ela dificilmente gira devido à interação intramolecular estabelecida (excluindo a possibilidade de rotâmetros), e penalizar a molécula pela perda de um conteúdo entrópico que ela já não possuía. Criteriosamente, se *Nrot* tiver impacto decisivo num determinado valor energético de corte (filtro de triagem), talvez ele possa estar contribuindo para que *hits* promissores sejam desconsiderados na etapa de triagem virtual, configurando casos excluídos de falsos-negativos. Cabe observar também que a função de pontuação do *Vina* não engloba termos concernentes às características eletrostáticas e de solvatação do ambiente químico no qual se dão as interações P-L. Contribuições energéticas provenientes de possíveis cargas elétricas parciais ou formais (deslocalizadas ou não) de resíduos do receptor ou de subunidades estruturais dos ligantes (e.g., pares conjugados ácido-base, tautômeros, *zwitterions*, íons metálicos, etc.) não são “vistas” pela função, portanto, influências de potenciais coulombianos não são contabilizadas. O papel das moléculas de água (solvente) pode ser determinante no sucesso da predição, pois, *a priori*, todos os receptores podem apresentar moléculas de solvente em seu sítio de ligação, mediando interações relevantes com ligantes de pequenas moléculas. (138)

Entretanto, é sensato ponderar também que implementar estas funcionalidades tão específicas para cada estrutura molecular exigiriam a compilação de dados empíricos relacionados, e poderiam tornar a função mais complexa do que já é. Provavelmente, o aumento na complexidade da função impactaria na velocidade e desempenho do algoritmo, maculando sua reputação de mais rápido e eficiente da suíte. Nesta gangorra energética e dilemática de variáveis, cabe ao químico medicinal lançar mão de outras duas qualidades que não lhe podem ser ausentes: a intuição e o discernimento. De fato, quando se trabalha com uma dada ferramenta de ofício (computacional ou não), deve-se buscar o conhecimento minimamente suficiente sobre ela para conhecer suas potencialidades e limitações. Logo, torna-se possível saber quais valores limites para um dado resultado podem ser relaxados ou flexibilizados com base, não somente em seu conhecimento, mas também na sua intuição. (139)

Devido às deficiências de sua função, o *Vina* não realiza predições com a mesma riqueza de recursos que o AD4, e esta comparação tornou-se inevitável

após seu lançamento em 2010. Visando sanar algumas dessas carências, desenvolvedores do SRI lançaram o *AutoDock Vina* 1.2.0 (*Vina* 1.2), em 2021. Neste *software*, a função *escore* e alguns dos principais recursos do AD4 foram implementados no código-fonte, mantendo-se o arsenal de algoritmos do *Vina* (ILS / MC / BFGS), que podem ser até 100 vezes mais rápidos que os do AD4 (LGA / SW) dependendo da complexidade da pesquisa, além de serem mais eficientes na busca pelas melhores poses com o menor número de avaliações da função de pontuação.

Em uma analogia simples, pode-se imaginar que a super máquina (AD4), repleta de recursos e dotada de um motor possante (função *escore*), agora possa contar com uma força motriz ou combustível de qualidade (algoritmos de busca) e à sua altura, permitindo-lhe entregar a melhor performance de maneira mais veloz. *Vina* 1.2 oferece ao usuário funcionalidades do AD4, já supracitadas, além de recursos adicionais, como a inclusão de ligações *Python* e o *docking* simultâneo de múltiplos ligantes. O primeiro “*plus*” facilita a programação em *Python* das funcionalidades existentes e de outras que podem ser implementadas segundo as pretensões do usuário, e neste horizonte a imaginação é o limite. O segundo “*plus*” pode ser de grande interesse aos exploradores da vertente *in silico* do desenho de líderes baseado em fragmentos (FBLD *in silico*, ou Computational FBLD, CFBLD), um dos temas centrais desta tese. Apesar de ser bem mais ágil que AD4, *Vina* 1.2 não supera seu predecessor no quesito velocidade, sendo até 3 vezes mais lento que o *Vina*.

O código-fonte do *Vina* foi disponibilizado publicamente assim que ele foi lançado e pôde ser customizado conforme as peculiaridades de cada nicho científico. Sendo assim, abordagens modificadas da função do *Vina* surgiram na literatura e receberam atenção especial de grupos de pesquisa específicos. (140, 141) Segundo dados divulgados pelo *Web of Knowledge*, *Google Scholar* e pela base dados químicos e bibliográficos do *CAS Scifinder*, acessados em 25 de Junho de 2023, a referência original do *Vina* vem apresentando números crescentes de citações ano após ano desde 2010 e já foi citada em mais 25 mil trabalhos, entre artigos científicos e patentes. Estes números expressivos a colocam no topo da lista das obras mais citadas do professor Arthur J. Olson, exibindo ampla vantagem em relação à segunda colocada, o artigo de 2009 relatando o AD4 e o ADT4, com pouco mais de 18 mil citações. Para tentar dimensionar o impacto científico do *Vina* e considerando apenas as 4890 citações do último ano civil (2022), este programa foi

referenciado, em média, por mais de 408 trabalhos ao mês ou 14 trabalhos ao dia. Apesar de suas sabidas deficiências, é formidável saber que a cada duas horas uma nova produção bibliográfica surge citando este *software* livre, corroborando sua importância e aplicabilidade. (142)

2.5 UM PONTO NO ESPAÇO BIOLÓGICO: PROTEÍNA CINASE C IOTA

Desde a sua caracterização bioquímica no final da década de 1970, as isoformas da proteína cinase C (PKC) vem sendo extensivamente estudadas por diversos grupos de pesquisa ao redor do globo. Primorosos artigos originais e de revisão denotando a sua relevância foram publicados em jornais renomados da literatura científica nos últimos anos abordando esta notável família de enzimas sinalizadoras sob alguns de seus principais aspectos (e.g. histórico de sua descoberta / identificação, funções bioquímicas, regulação / ativação / inibição, topologia / estrutura / estereoquímica, entre outros). (143, 144) Brevemente, cabe mencionar alguns tópicos importantes sobre o universo particular e instigante destas proteínas cinases.

PKC compreende uma família de isoenzimas altamente relacionadas que desempenham papel central em múltiplas vias de sinalização celular fosforilando resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) de outras proteínas após reação com adenosine triphosphate (ATP, $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$), pequena molécula que é um de seus principais substratos naturais. Estas PKs correspondem a 2% do quinoma humano (*human kinome*, HK) e são importantes para a transdução de sinal entre os meios intra e extracelular, controlando (como reguladores positivos ou negativos) uma miríade de eventos celulares críticos como invasão, migração, diferenciação, sobrevivência, apoptose, proliferação, pleiotrópicos (i.e., expressão gênica), angiogênese, metástase, motilidade, resistência farmacológica, entre outros. A família das PKCs pertence ao grande grupo AGC (Ser/Thr kinases dos tipos “A”, “G” e “C”) do HK e é subdividida em três classes distintas segundo algumas diferenças nos seus modos de ativação e em motivos estruturais específicos em seu sequenciamento peptídico. (145) Sendo assim, estas isoenzimas estão categorizadas em PKCs convencionais ou clássicas (cPKCs) com três membros (alfa- α , beta- β e gamma- γ), PKCs novas ou não-clássicas (nPKCs) com quatro

representantes (delta- δ , epsilon- ϵ , eta- η e theta- θ) e PKCs atípicas (aPKCs) com duas isoformas (zeta- ζ e iota- ι).

A primeira subclasse (cPKCs) é ativada por íons Ca^{2+} , por cofatores fosfolipídicos e por mensageiros lipídicos (*i.e.* diacilglicerol-DAG e ésteres de forbol). A segunda subclasse (nPKCs) só não é ativada por íons Ca^{2+} , mas é regulada pelos demais cofatores. E, a terceira subclasse (aPKCs) não é sensível a estes cofatores canônicos e é ativada por meio de interações proteína-proteína (PPIs). Sob o aspecto estrutural, todas as isoformas da PKC apresentam dois grandes domínios, um catalítico (*catalytic domain*, CD) carboxi-terminal (C-terminal) e um regulatório (*regulatory domain*, RD) amino-terminal (N-terminal). Ambos são unidos por uma região de dobradiça e apresentam características e funções distintas. (146) O CD é bem conservado e bastante semelhante (com alta homologia) entre os membros da família sendo formado por três sub-regiões, uma mais extensa (*activation loop* ou *kinase domain-KD*) e duas mais curtas (*turn motif* e *hydrophobic motif*). Por outro lado, o RD consiste na parte variável da cadeia peptídica destas proteínas e é constituída por diferentes subdomínios que permitem distinguir as três subfamílias. A única característica comum entre as PKCs neste domínio é uma sub-região chamada de pseudo substrato autoinibitório. As demais sub porções do RD das cPKCs são C1A, C1B (ambos receptores de diacilglicerol, *DAG-binding*) e C2 (receptor de íons Ca^{2+} , Ca^{2+} -binding). Nas nPKCs C2 não está mais presente, mas sim uma sub porção chamada de *novel* C2 que não se liga aos íons Ca^{2+} e nas aPKCs inexistem os subdomínios C1 e C2 e aparecem as sub regiões C1 atípica e a que medeia as PPIs participando do mecanismo de dimerização proteica, chamada de Phox/Bem 1 (PB1). (147, 148)

A atuação desarmoniosa desta família de PKs em condições anormais pode impactar diretamente o bom funcionamento de processos celulares cruciais à homeostase fisiológica e influenciar diversos distúrbios humanos, *e.g.* doenças cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas, inflamatórias, imunológicas e câncer. (149-154) De fato, é justamente por estarem implicadas em diversos eventos celulares importantes e ter uma putativa relação causal entre sua desregulação e várias doenças perniciosas que as PKCs sempre foram historicamente consideradas alvos moleculares atraentes para os profissionais da indústria de inovação farmacêutica e da clínica médica. Neste sentido, tais enzimas encorajaram inúmeros esforços científicos na tentativa de desenvolver pequenas moléculas como potentes

moduladores de sua função multi sinalizadora visando novas opções e benefícios terapêuticos para o gerenciamento clínico destas doenças. Recentemente, PKC β foi apontada como alvo promissor para tratar pacientes diabéticos com SARS-CoV-2 (155) e também como estratégia terapêutica baseada em nanopartículas contra o câncer de próstata neuroendócrino (NEPC). (156) Além disso, diversos produtos naturais (NPs) de origem vegetal e marinha foram investigados e apresentaram atividade contra isoformas de PKC. (157-162) Entretanto, a relevância de algumas PKCs enquanto alvos terapêuticos foi colocada à prova ao longo destes anos devido a sua atuação dupla em alguns contextos patológicos. Vários resultados pré-clínicos e clínicos controversos de elevada fidedignidade fizeram com que este tema fosse considerado uma verdadeira dicotomia, principalmente no campo da oncologia clínica revelando as duas faces opostas de uma mesma moeda. (163)

De fato, o conhecimento acumulado por trabalhos publicados na área ao longo dos anos sugere que a superexpressão de isoenzimas da PKC é de aceitação praticamente unânime, *i.e.* um dado empírico corroborado para vários tipos de câncer. Além disso, ficou demonstrado que as isoformas da PKC podem interferir em processos celulares associados à tumorigênese e à progressão tumoral. De maneira intrigante, o microambiente tumoral consegue atuar arditosamente para regular positivamente PKCs pró-oncogênicas e negativamente PKCs supressoras. (164) No início da década de 80, as cPKCs e nPKCs eram tratadas como oncoproteínas justamente por estarem envolvidas nas vias sinalizadoras e por serem ativadas pelos ésteres de forbol, que são reconhecidamente promotores tumorais de vários tipos de neoplasias. Logo, esta crença inicial se tornou quase irrefutável e induziu a ideia de que estas enzimas também pudessem atuar sempre como promotoras tumorais. Entretanto, resultados recentes impuseram uma inversão deste paradigma e contribuíram para deixar esta questão ainda mais complexa. (165) Particularmente, a PKC α passa de supressora em condições normais para promotora tumoral em modelos de câncer de próstata em estágio inicial, (166) nos quais sua expressão anormal foi verificada e sua depleção prejudicou alguns processos cruciais para células cancerosas, como progressão, proliferação e invasão do ciclo celular. Por outro lado, diversas análises funcionais de linhagens mutantes de cPKCs e nPKCs foram reportadas e demonstraram que, ao contrário do que se esperava, ocorre perda de função (LOF) e não ganho de função (GOF), (167)

suprimindo as vias de sinalização e derrocando o dogma de que estas enzimas são oncoproteínas, *i.e.* geralmente não atuam apenas como promotoras tumorais.

Neste cenário dúbio, é fato que ao longo de mais de três décadas vários esforços partindo deste pressuposto fracassaram na busca por inibidores destas PKCs e não resultaram em respostas terapêuticas benéficas ou, em vários casos, até provocaram piora do quadro clínico dos pacientes oncológicos. (168) Estas evidências mostraram que a investigação sobre o real papel funcional de cada PKC deve ser previamente priorizada em cada doença para direcionar corretamente qual estratégia de química medicinal deve ser adotada em cada contexto para não se assumir um prejuízo evitável de se desenvolver inibidores ou ativadores com dígitos nanomolares e não produzirem benefícios terapêuticos desejáveis nos ensaios *in vivo*. Logo, conforme estas incertezas eram divulgadas, notava-se uma leve redução no número de campanhas visando opções farmacológicas inovadoras para as duas primeiras classes de PKCs. Entretanto, existem projetos recentes que continuam respondendo a estes desafios após o delineamento prévio do real papel da PKC na doença em questão e têm alcançado resultados louváveis. (169-172) Se por um lado a inovação farmacêutica visando cPKCs e nPKCs pode parecer um caminho escorregadio e hesitante, por outro lado, até o momento, vários trabalhos foram emergindo e ratificando as aPKCs como oncoproteínas para vários tumores. Portanto, PKC ζ e PKC ι se tornaram alvos moleculares elegíveis para o design de novos inibidores como armas contra cânceres altamente deletérios. (173-176)

Entre as duas isoformas de aPKCs, a PKC ι é a que mais vem sendo explorada neste intuito por estar inequivocamente implicada em vários tumores, (177, 178) e também por ser a primeira aPKC a ter estrutura 3D elucidada no início dos anos 2000, representando um grande estímulo facilitador do ofício de químicos medicinais. Ao todo, existem dez estruturas 3D da PKC ι reportadas no PDB, sendo que a primeira foi divulgada no ano de 2004, (179) e a mais recente data de 2019. (180) Exceto a primeira, que foi resolvida em fase líquida por Ressonância Magnética Nuclear de solução (*solution* NMR), as subsequentes foram elucidadas através de caracterizações de estado sólido por meio de CRX. Além disso, somente as duas primeiras estruturas contêm apenas o subdomínio PB1, enquanto as demais contêm o KD completo da enzima ligada a pequenas moléculas (substratos naturais ou ligantes) em alguns casos. (181-184)

Diferentemente das outras estruturas reportadas, PDB ID: 6ILZ possui 4 cadeias de PKC α na unidade assimétrica e cada uma delas se liga covalentemente a duas moléculas de L-treoninafosfato ($C_4H_{10}NO_6P$, TPO) em sítios alostéricos, além de uma molécula do inibidor 2-amino-5-[3-(piperazin-1-il)fenil]-N-(piridin-4-il)piridina-3-carboxamida ($C_{21}H_{22}N_6O$, AFU601) no sítio do ATP (*ATP-binding*) no interior do KD. Este bolso de ligação é consideravelmente profundo e estreito, pois suas dimensões de profundidade e largura medem em torno de 15Å, já sua altura não passa de 10Å (considerando a cadeia A). Neste arranjo supramolecular, o bolso de ligação foi formado por paredes nas quais os contatos polares ficaram expostos para a luz da cavidade, enquanto que o ‘teto’ e o ‘assoalho’ da cavidade foram predominantemente formados pelas subunidades lipofílicas dos resíduos de aminoácidos (AAs). Criteriosamente, em bolsos de ligação profundos as interações entálpicas devem ser maximizadas para compensar eventuais custos entrópicos adicionais. AFU601 foi capaz de acessar este sítio de ligação e explorar pouco mais da metade dos contatos disponíveis, se ancorando através de interações polares envolvendo alguns resíduos da região de dobradiça (paredes dorsal, do fundo da cavidade), da região de alça (parede lateral-esquerda) e de um *loop* C-terminal flexível (parede lateral-direita), além de interações de van der Waals com os contatos apolares do teto e do assoalho, contribuindo para a estabilidade do empacotamento. Outro detalhe importante é a superfície côncava do sítio de ligação que certamente induziu a molécula do inibidor a adotar um *shape* 3D bastante peculiar, visando o melhor encaixe no complexo mais estável, assemelhando-se a um sólido em forma de “U”. PDB ID: 6ILZ serviu posteriormente como prova de conceito cabal para uma campanha de química medicinal que visava um novo inibidor para se ligar justamente à região de dobradiça da PKC α e alcançou satisfatoriamente seu objetivo. (185)

AFU601 além de se ligar no bolso para o qual foi planejado, apresentou dados de potência inibitória submicromolar ($IC_{50} = 0,34\mu M$), alta solubilidade em pH fisiológico e boa estabilidade metabólica em microsomas hepáticos humanos. Entretanto, sua pobre permeabilidade medida em ensaios de Caco-2 (acrônimo para *Cancer coli*), sua baixa seletividade em relação às demais isoformas de PKC e, conseqüentemente, seus dados razoáveis de inibição proliferativa ($GI_{50} = 11,3\mu M$) contra células de carcinoma hepatocelular (HUH-7) demonstram que ele é um bom

protótipo molecular mas que requer lapidações estruturais visando melhorias tanto na resposta farmacodinâmica (PD) quanto no perfil farmacocinético (PK). (186)

Uma das estratégias de química medicinal a ser usada para esta finalidade pode ser a mesma que lhe deu origem e é conhecida como desenho de compostos-líderes baseado em fragmentos moleculares (FBLD). (187) De fato, esta abordagem é uma das mais recentes na área e também uma das mais poderosas no atual cenário da indústria que inventa fármacos e que vem inspirando grande entusiasmo em centros acadêmicos de pesquisa, (188) pois possui cobertura mais abrangente do espaço químico semelhante a fármacos com maior diversidade de grupos funcionais e farmacofóricos, apresenta taxa de acerto superior às estratégias tradicionais e já produziu um arsenal molecular com sete fármacos anticâncer aprovados somente na última década (inclusive quatro deles são inibidores de cinases, *kinase inhibitors*, KIs), além de mais de meia centena de moléculas avançando em diferentes estágios de ensaios clínicos. (189, 190)

Isto pode ser surpreendente para tão pouco tempo de existência, mas sua principal fonte de sucesso é facilmente explicada pela mescla e observância de princípios importantes de abordagens consolidadas, como a SBDD, LBDD, CADD e HTS. Basicamente, a FBLD se dedica a desenvolver pequenas moléculas bioativas partindo de fragmentos moleculares (pequenos ligantes de baixa massa e volume molecular) que obedecem à regra dos 3 (“RO3”) e são previamente triados contra um alvo biológico específico com auxílio de métodos experimentais (técnicas biofísicas, *biophysical techniques* BPT, e bioquímicas, *biochemical techniques* BCT) ou métodos computacionais (*Virtual screening* - VS, *molecular docking* - MD, *machine learning* - ML, entre outros). Aliás, esta vertente da FBLD, conhecida como FBLD *in silico*, vem recebendo grande prestígio e ampliando o ‘halo’ de aplicação da técnica, fazendo com que ela seja cada vez mais praticada pelos grupos de pesquisa básica, pois possui alta capacidade preditiva fornecendo *insights* estruturais refinados com maior celeridade, dispensando as técnicas instrumentais convencionais, e evitando o uso de amostras físicas de proteínas e pequenos ligantes para ensaios bioquímicos em larga escala. Afinal, praticar FBLD experimental pode ser uma tarefa onerosa e relativamente demorada, logo a FBLD *in silico* surgiu como uma ótima alternativa e vem ganhando cada vez mais espaço no desenho racional de novos ligantes baseado em fragmentos. (191-194)

Na campanha que descobriu o inibidor AFU601, partiu-se de um fragmento 2-amino-N-fenilpiridina-3-carboxamida com $IC_{50} = 424\mu\text{M}$ (fraco inibidor) que foi evoluído em etapas subseqüentes de otimização molecular iterativa. Apesar de não se dispor de um suporte cristalográfico inicial (os autores não conseguiram cristalizar a PKC α com este fragmento) para provar o seu modo de ligação, o projeto avançou com a formulação de hipóteses plausíveis, uso de ferramentas computacionais, exploração sistemática da relação estrutura-atividade (SAR) e das métricas da eficiência de ligante (LE), que é uma praxe intrínseca a toda campanha de FBLD. Entre as métricas mais usadas estão a própria eficiência de ligante (LE), a eficiência de grupo (GE) e a eficiência de ligante lipofílico (LLE) que podem ser rapidamente consultadas nos trabalhos sugeridos, mas quanto maior seu valor melhor a afinidade/potência da pequena molécula pelo bolso de ligação / alvo. (195, 196)

Com relação ao putativo modo de ligação do fragmento, a hipótese inicial era a de que ele atuasse como ATP-mimético e se ligasse à região de dobradiça, (197) por possuir requisitos estruturais (caráter anfotérico da subunidade 2-aminopiridina) com a capacidade de formar interações de hidrogênio (HBs) bidentadas, imitando o modo de ligação da adenosina do ATP e do fragmento versátil 7-azaindol (7-AI), que está presente na estrutura de três dos fármacos aprovados derivados de FBLD e outros candidatos clínicos. (198-200) Criteriosamente, saber ou presumir o sub-bolso de ligação preferencial do fragmento semente é de suma importância numa campanha FBLD, pois determina o ponto de partida e as direções vetoriais de expansão molecular que serão certas para exploração dos sub-bolsos vizinhos. AFU601 apresentou um dos melhores valores de LE (0,32) entre os compostos finais de sua série e também um valor de potência mais de 3 ordens de grandeza superior ao seu fragmento inicial, por isto foi eleito o composto-líder daquela campanha. Entretanto, seu perfil PK razoável e seu fragment-like peso molecular ainda na casa dos 300Da encorajam modificações estruturais adicionais visando um composto com características melhoradas. (201) Além disso, sua shape 3D sugere o contorno de superfície molecular predileto (em forma de "U") para o melhor encaixe neste bolso de ligação e a exploração otimizada dos hotspots disponíveis no sítio de ligação da PKC α pode permitir ganho de afinidade, melhor LE e possivelmente aumento de potência e seletividade. (202)

Com base no exposto, neste presente trabalho serão apresentados compostos inéditos como potentes inibidores virtuais da PKC α inspirados no *shape*

3D de AFU601, concebidos à luz do paradigma FBLD *in silico* e usando o núcleo 7-AI, e seus isósteros não-clássicos, como principais pontos de reconhecimento molecular do fragmento central. Estes compostos se mostraram bastante promissores, pois além de exibir valores consideravelmente melhores de BA em relação aos controles, ainda apresentaram boas características *druglikeness*, um bom perfil PK predito, seletividade em relação ao alvo de interesse e alta acessibilidade sintética, encorajando sua síntese química em etapas futuras para realização de ensaios experimentais.

3 OBJETIVOS

Abaixo estão elencados os objetivos principais da Tese:

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção virtual de novos padrões estruturais de baixo peso molecular para inibição de isoformas da proteína cinase c, abordando de maneira integrada alguns paradigmas da Química Medicinal e empregando diversas ferramentas recentes da Química Computacional e da Bioinformática.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (a) Realizar uma extensa revisão bibliográfica no intuito de discernir sobre as isoformas de PKC com melhor drogabilidade e que, portanto, sejam mais atraentes como alvo biológico para ligantes de pequenas moléculas;
- (b) Com base neste primeiro critério, eleger o alvo biológico a ser explorado neste fluxo de trabalho, levando em consideração, também, o seu papel bioquímico em condições fisiopatológicas conexas, demanda farmacoterapêutica na clínica médica e a disponibilidade de estruturas 3D elucidadas (preferencialmente aquelas em que o alvo esteja complexado com moléculas de substrato, fármacos relacionados ou potenciais inibidores de baixo peso molecular);
- (c) Com base na estrutura 3D do alvo biológico, reconhecer ou determinar computacionalmente os principais hotspots e sítios de ligação do alvo em questão;
- (d) Pesquisar na literatura possíveis fármacos específicos ou relacionados, quando disponíveis, bem como compostos cuja atividade inibitória esteja relatada contra o alvo biológico eleito, visando compor a biblioteca enriquecida por estes ligantes que serão adotados como referência neste fluxo de trabalho (quimioteca padrão);
- (e) Realizar estudos de simulação molecular de *re-docking* e *cross-docking* destes compostos de referência contra o alvo biológico em questão, usando

o software *AutoDock Vina*, a fim de acessar seu perfil energético no ambiente virtual, estimar sua BA e LE, bem como confirmar ou prever seu modo de ligação;

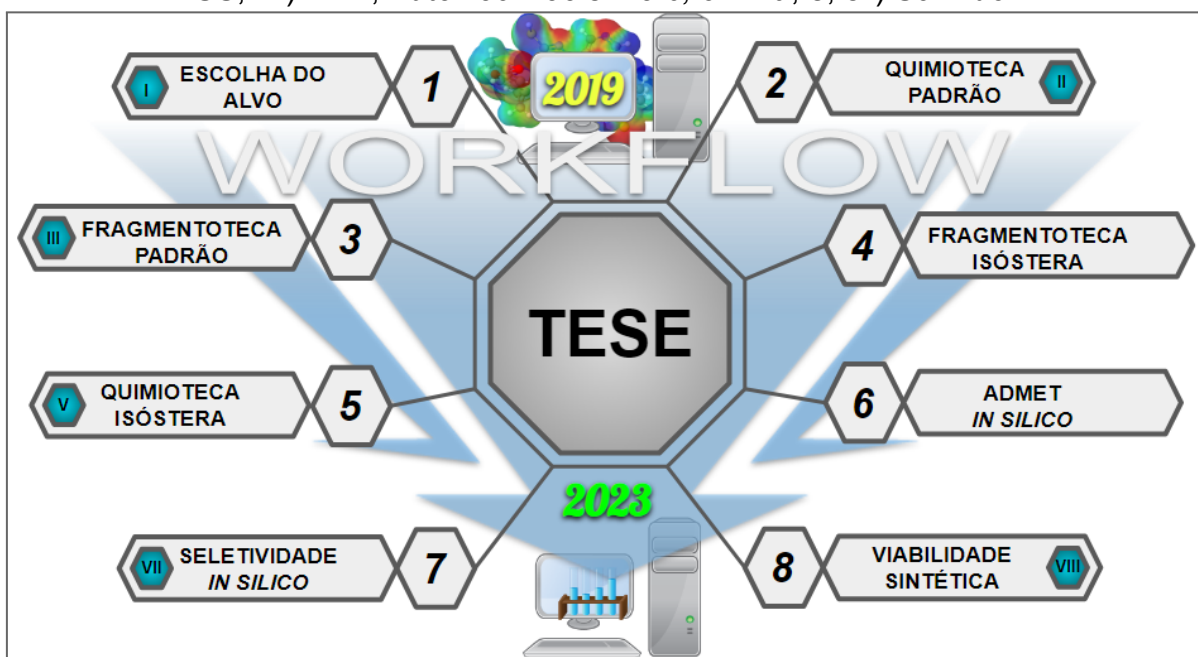
- (f) Fragmentar a estrutura destes padrões moleculares, manualmente ou por auxílio de algoritmos apropriados, a fim de criar uma coleção enriquecida por fragmentos moleculares de referência (fragmentoteca padrão);
- (g) Realizar estudos de simulação molecular de docking envolvendo os ligantes da fragmentoteca padrão e o alvo biológico em questão, usando o software *AutoDock Vina*, a fim de acessar seu perfil energético no ambiente virtual, estimar sua BA e LE, bem como prever seus múltiplos modos de ligação (promiscuidade supramolecular), e seus *hotspots* preferidos;
- (h) Expandir o acervo de fragmentos moleculares e ampliar a diversidade química deste trabalho, criando uma segunda fragmentoteca através do software *MB-Isoster* (203) e por buscas de similaridade 2D e 3D dos fragmentos padrão em bancos de moléculas comercialmente disponíveis, como *Enamine*, *ZINC20* e *PubChem* (204);
- (i) Realizar estudos de simulação molecular de docking envolvendo os ligantes desta segunda fragmentoteca e o alvo biológico em questão, usando o software *AutoDock Vina*, a fim de acessar seu perfil energético no ambiente virtual, estimar sua BA e LE, bem como prever seus múltiplos modos de ligação (promiscuidade supramolecular), e seus *hotspots* preferidos;
- (j) Com base nos resultados de *docking*, e principalmente na LE, eleger subgrupos contendo os melhores fragmentos para cada um dos principais *hotspots* do sítio de ligação, estabelecendo os fragmentos prediletos de cada hotspot;
- (k) Com base na estrutura 3D do alvo, nos resultados de *docking* e LE das etapas anteriores, e na inspiração molecular abstraída dos melhores padrões estruturais (quimiotecas anteriores), planejar e criar uma segunda quimioteca com novas moléculas ligantes explorando principalmente o paradigma FBLD *in silico*, em observância aos parâmetros *druglikeness*, princípios de bioisosterismo (*MB-Isoster*) e Química Combinatória;
- (l) Realizar estudos de simulação molecular de *docking* destes ligantes inéditos contra o alvo biológico em questão, usando o software *AutoDock Vina*, a fim

- de acessar seu perfil energético no ambiente virtual, estimar sua BA e LE, bem como prever seu modo de ligação mais exergônico;
- (m) Prever parâmetros PK, simulando o perfil ADMET para os ligantes mais promissores nas plataformas *SwissADME* (205), *PASS* (206), e *ProTox-II* (207), bem como estabelecer qualitativamente relações de estrutura-propriedade (SPR);
 - (n) Avaliar, *in silico*, a seletividade dos melhores ligantes pelo alvo biológico em questão frente a outras isoformas de PKC e a outros alvos biológicos do quinoma humano, por meio de estudos de simulação molecular de *docking*, usando o software *AutoDock Vina*;
 - (o) Promover a otimização estrutural de ligantes com LE atraente, mas com baixa especificidade ou perfil PK pobre ou razoável, por meio de um processo iterativo de re-desenho e re-testes visando novos compostos-líderes com o melhor conjunto de propriedades PD e PK;
 - (p) Estimar a acessibilidade sintética e avaliar a possibilidade de síntese química destes protótipos moleculares promissores para posteriores estudos experimentais *in vitro*;
 - (q) Produzir manuscritos de revisão abordando temas concernentes à Tese e promover a divulgação científica destes achados através de publicações em periódicos cujo JCR satisfaça aos requisitos exigidos pelo PPGQ ($\geq 2,0$);
 - (r) Disponibilizar publicamente no banco de moléculas do MolMod-CS (208) todos os compostos inéditos planejados neste trabalho, inclusive aqueles potenciais inibidores *in silico* com perfil farmacológico promissor.

4 METODOLOGIA

Nesta seção será descrita a parte experimental do trabalho e os protocolos computacionais utilizados, conforme esquema geral ilustrado a seguir, figura 4:

Figura 4 - Fluxograma ilustrativo de todas as etapas executadas durante o protocolo FBLD *in silico* praticado neste fluxo de trabalho iniciado no primeiro semestre de 2019 e finalizado no primeiro semestre de 2023. As ferramentas computacionais exploradas em cada estágio foram: 1°) Scifinder, PDB, PubMed, PubChem, ChEMBL, e Google Scholar; 2°) ZINC20, DRUGBANK, Enamine, clinicaltrials.gov, PDB, PDBbinding, BindingDB, KLIFS, KIDFamMap, KinBase, PKIDB, AutoDockTools 1.5.6 e Vina; 3°) ChemDraw 18.1, ACD / ChemSketch, Molview, Marvin JS, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, Chem3D, Molegro, Avogadro, Molview, Molstar, PMV, Pymol, Openbabel, UCSF Chimera, RDKit, eMolfrag, AutoDockTools 1.5.6, e Vina; 4°) MB-Isoster, Swiss Bioisostere, Swiss Similarity, ZINC20, PubChem, Enamine, AutoDockTools 1.5.6, e Vina; 5°) MB-Isoster, SwissBioisostere, SwissSimilarity, ChemDraw 18.1, Molview, AutoDockTools 1.5.6, e Vina; 6°) SwissADME, Pro-ToxII, e PASS; 7°) PDB, AutoDockTools 1.5.6, e Vina; e, 8°) Scifinder.



Fonte: Autoria própria (2023)

4.1 ESCOLHA DO ALVO

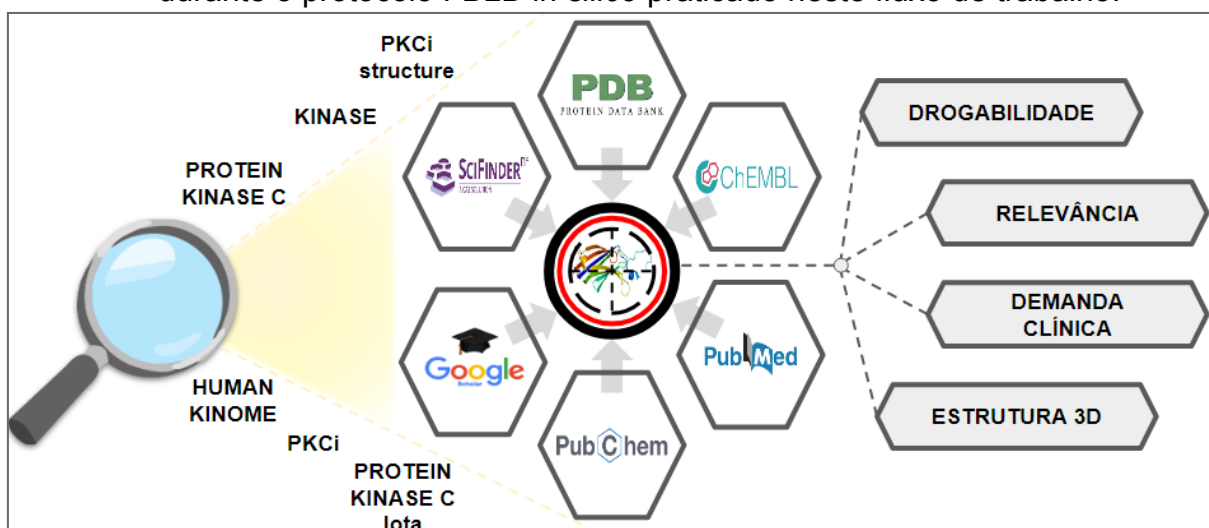
A escolha do alvo foi feita com base em quatro critérios principais:

- i) Drogabilidade;
- ii) Papel bioquímico / Relevância;
- iii) Demanda clínica;

iv) Disponibilidade de estruturas 3D.

Uma ampla revisão da literatura sobre as isoformas de PKC (EC: 2.7.11.13), observando estes quatro aspectos centrais, foi realizada através de bases bibliográficas como o *Scifinder* (209), *PubMed* (210), *PubChem*, *ChEMBL* (211), *Google Scholar* (212) e *PDB*, figura 5, usando alguns termos-chave em inglês: -Kinase; -Human kinome; -Serine / Threonine kinase, *STK*; -AGC protein kinase; -Protein kinase C, *PKC*; -Protein kinase C isoforms; -Protein kinase C drugability; -Protein kinase C structure; -Atypical protein kinase C, *aPKC*; -*PRKCi* protein kinase; -Protein kinase C *iota*, *PKCiota*, *PKCi*; -*PKCi* structure.

Figura 5 - Representação ilustrativa da primeira etapa (Escolha do Alvo) executada durante o protocolo *FBLD in silico* praticado neste fluxo de trabalho.



Fonte: Autoria própria (2023)

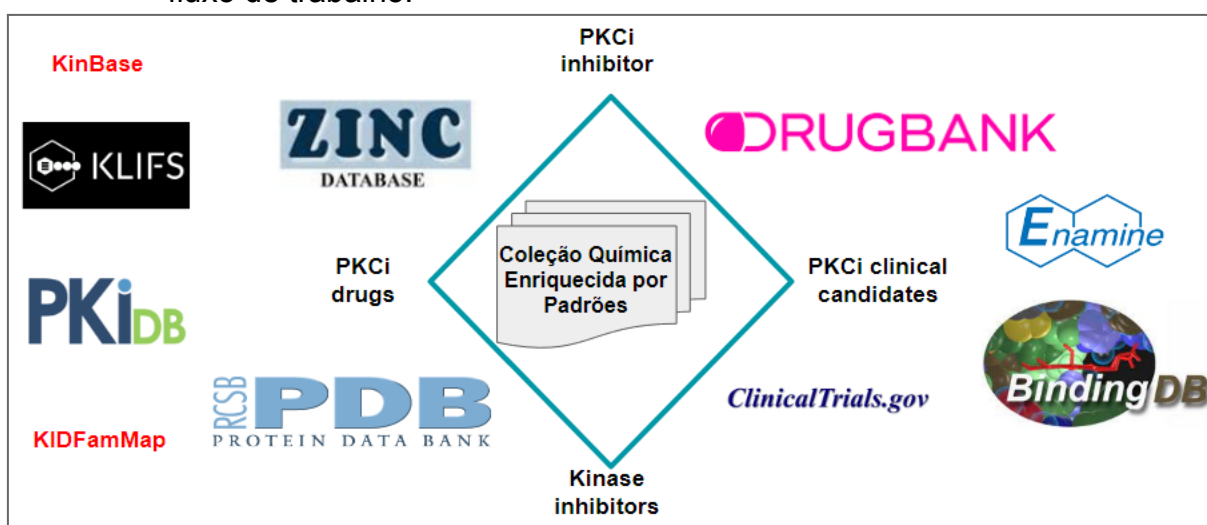
Dois filtros foram usados para atualizar e ordenar a busca de referências, entre eles a relevância ou número de citações e a data de publicação, priorizando referências dos últimos 5 anos civis, com exceção de artigos originais que foram publicados há mais tempo. Ao final do processo, o alvo *PKCiota* (sigla *PKCi*) foi escolhido, e 4 diferentes estruturas cristalográficas depositadas no *PDB* foram consideradas para essa cinase atípica, sendo elas: *PDB* ID: 6ILZ / *PDB* ID: 3A8W / *PDB* ID: 3A8X / *PDB* ID: 5LI9.

4.2 CRIAÇÃO DA QUIMIOTECA PADRÃO

Os fármacos e compostos com atividade inibitória relatada para *PKCi* foram encontrados em diversas bases de dados, figura 6, entre elas: *ZINC20*; *PDB*;

clinicaltrials.gov (213); *DRUGBANK* (214); *PKIDB* (215); *KLIFS* (216); *KIDFamMap* (217); *Enamine*; *KinBase* (218); *clinicaltrials.gov*, *PDBbind*; e, *BindingDB* (219). Alguns termos-chave em inglês foram utilizados na busca, sendo eles: *-Kinase*; *-Kinase inhibitors*; *-PKCi inhibitors*; *-PKCi ligands*; *-PKCi clinical candidates*; *-PKCi drugs*.

Figura 6 - Representação ilustrativa da segunda etapa (Formação da Quimioteca Padrão) executada durante o protocolo FBLD *in silico* praticado neste fluxo de trabalho.



Fonte: Autoria própria (2023)

Dois filtros foram usados para atualizar e ordenar a busca bibliográfica, entre eles a relevância ou número de citações e a data de publicação, priorizando referências dos últimos 5 anos civis, com exceção de artigos originais que foram publicados há mais tempo. No total, 27 moléculas foram adotadas como ligantes de referência (controles), sendo posteriormente preparados para ensaios de *re-docking* e *cross-docking*. Elas passaram a integrar o banco de moléculas do MolMod-CS e receberam a seguinte codificação: xCMMCS, em que x é um número serial arbitrário atribuído a cada ligante.

4.3 ENSAIOS DE DOCKING

Todas as tarefas computacionais de *docking* molecular foram realizadas na estação de trabalho de nosso grupo de pesquisa *Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation* (MolMod-CS), localizada na sala D311F, nas dependências do campus sede da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Basicamente, dois computadores independentes foram usados para a realização

das tarefas infra escritas, sendo eles: 1º) Nome do dispositivo: Molmod-CS2 / Processador: AMD Phenom (tm) II x4 945 Processor x4 / RAM instalada: 3,6 GiB / Tipo de sistema: Sistema operacional de 64 bits, processador baseado em x64 e x32 / Patrimônio (UNIFAL-MG): 087002; 2º) Nome do dispositivo: icexp087003 / Processador: Intel(R) Core(TM) i7-2600 CPU @ 3.40GHz 3.40 GHz / RAM instalada: 16,0 GB / ID do dispositivo: B8B58FDD-8670-45A4-9F30-DC67402956DF / ID do produto: 00380-00000-00001-AA614 / Tipo de sistema: Sistema operacional de 64 bits, processador baseado em x64 / Patrimônio (UNIFAL-MG): 087003.

As estruturas cristalinas de todas as proteínas exploradas neste fluxo de trabalho foram previamente elucidadas pela CRX e depositadas no PDB por outros grupos de pesquisadores devidamente citados ao longo do manuscrito. Todos os ligantes foram manipulados computacionalmente por meio de uma gama de *softwares* e com diversas finalidades, desde a simples edição / visualização molecular, até a conversão de extensão ou minimização conformacional. Sendo assim, os *softwares* *ChemDraw 18.1* (220), *ACD / ChemSketch* (221), *Molview* (222) e *Marvin JS* (223) foram empregados para edição e visualização molecular 2D dos ligantes. Os *softwares* *Chem3D*, *Molegro*, *Avogadro*, *Molview*, *Molstar* (224), *PMV*, *Pymol* (225), *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* (226), e *UCSF Chimera* (227) foram usados para visualização molecular 3D e para minimização de energia da geometria intramolecular dos ligantes. A plataforma *OpenBabel* também foi utilizada, quando necessário, para conversão de extensões de arquivos de moléculas em lote, bem como para fixar os estados de protonação dos ligantes na faixa de acidez fisiológica, considerando o pH 7.4 para corrente sanguínea.

Após *download* dos arquivos das proteínas na base do *PDB*, e em posse dos arquivos dos ligantes, no formato “.mol2”, iniciou-se a etapa de preparo dos respectivos arquivos de entrada (*input files*) para a realização dos ensaios de *docking* no ambiente do *AutoDock Vina 1.1.2*, pois somente arquivos no formato “.pdbqt” são aceitos pelo programa para execução dos encaixes. O preparo dos arquivos de entrada dos ligantes foi realizado no ambiente do *AutoDockTools 1.5.6* através de um *script Shell*, comandado via terminal *Linux*. Este algoritmo pode ser satisfatoriamente aplicado a quimiotecas extensas, pois é capaz de converter lotes de arquivos de ligantes de forma bem rápida e automatizada. Importante frisar que após a conversão de formato, foi feita a inspeção visual da conectividade e da geometria de cada ligante para evitar qualquer erro eventual e, conseqüentemente,

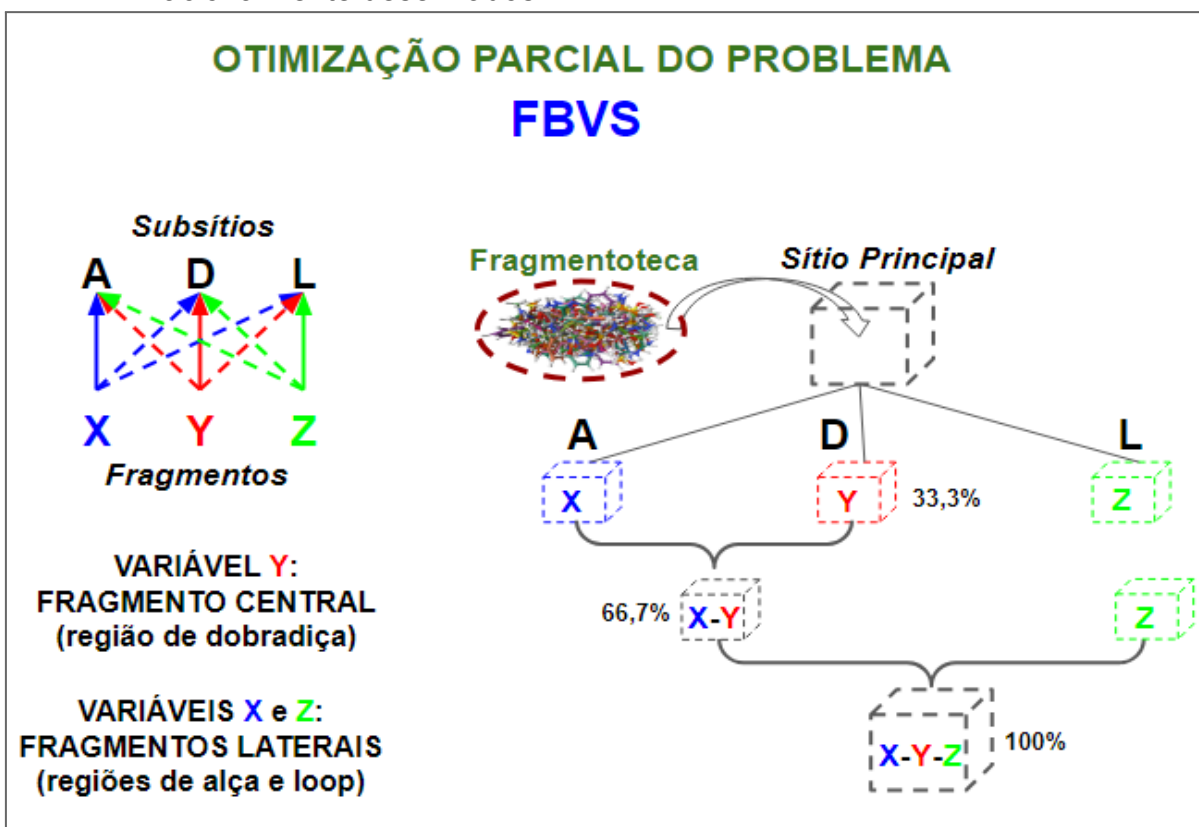
resultados equivocados de *docking*. O preparo dos arquivos de entrada dos receptores foi realizado manualmente através da interface gráfica do *AutoDockTools* 1.5.6, originando ao menos um arquivo “.pdbqt” para cada estrutura, pois em alguns casos de estruturas homomultiméricas optou-se por avaliar o impacto das mudanças topológicas e conformacionais das diferentes cadeias da estrutura do receptor na energia livre dos complexos.

No geral, as cinases exploradas neste trabalho possuem boa drogabilidade, com cavidades muito bem definidas e fáceis de serem reconhecidas visualmente como bolsos acessíveis a ligantes de pequenas moléculas. Obviamente, uma das principais cavidades destas proteínas corresponde ao seu sítio catalítico (ortostérico), também chamado de sítio do ATP. A delimitação do espaço de busca (*gridbox*, ou caixa) foi realizada adotando o centro de massa do substrato ou ligante cocrystalizado (aqui considerados como padrões cristalográficos ou estruturais) como centro da caixa, quando este esteve presente no sítio ortostérico. Para estruturas sem substrato ou ligante, a delimitação da *gridbox* foi realizada visualmente para o sítio ortostérico ou em sítios marcados, no caso de *docking* exploratório visando sítios alostéricos. Uma semente aleatória foi fixada para cada estrutura a partir do ensaio de *docking* com os padrões cristalográficos ou com a molécula adotada como referência em cada caso. A exaustividade da rotina de busca pelas conformações ótimas foi estabelecida como 16 ou 32 nos casos de *gridbox* com volumes superiores a 27.000\AA^3 (e.g., $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$).

Para as quimiotecas de fragmentos (tecnicamente chamadas de “fragmentotecas”), o fluxo de trabalho FBLD *in silico* explorou sistematicamente uma estratégia conhecida como *Fragment-Based Virtual Screening* (FBVS) através de encaixe molecular em sub-bolsos marcados do sítio catalítico da enzima. Esta etapa consistiu em separar, de maneira imaginária e deliberada, figura 7, o sítio de ligação da PKCi (PDB ID: 6ILZ) em três sub-bolsos com *hotspots* específicos, sendo eles: 1) sub-bolso central (região de dobradiça, “D”), 2) sub-bolso lateral esquerdo (alça rica em glicina, “A”) e, 3) sub-bolso lateral direito (cadeia lateral com *loop* de ativação C-terminal, “L”). Para cada um destes sub-bolsos foi delimitada uma *gridbox* e uma semente aleatória específica baseada no controle cristalográfico AFU601 e seus respectivos fragmentos, por meio de testes preliminares. Todos os fragmentos considerados nesta Tese foram encaixados nos 3 sub-bolsos e ranqueados em ordem decrescente de LE, possibilitando desenhar novas moléculas usando os

melhores fragmentos como blocos químicos de partida ou sementes moleculares para regiões específicas do bolso de ligação.

Figura 7- Representação ilustrativa da partição do sítio principal da PKCi em 3 sub-bolsos (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = *Loop*) explorados em rotinas de FBVS durante as etapas 3 e 4 (Fragmentoteca Padrão e Fragmentoteca Isósterica, respectivamente). Aos subsítios A, D e L foram encaixados todos os fragmentos deste trabalho, representados pelas variáveis X, Y e Z. Esta separação em sub-bolsos distintos visou a otimização parcial do problema, possibilitando encontrar os melhores fragmentos para cada uma das regiões de reconhecimento molecular no sítio catalítico da enzima. Os melhores fragmentos para o subsítio D foram inicialmente investigados, e representaram 33,3% da estrutura molecular dos ligantes finais, supondo que estes seriam formados pela junção de 3 subestruturas. Posteriormente, os sítios laterais (A e L) foram explorados, completando a composição estrutural dos novos inibidores racionalmente desenhados.



Fonte: Autoria própria (2023)

4.4 CRIAÇÃO DA FRAGMENTOTECA PADRÃO

Os 27 ligantes da quimioteca padrão foram fragmentados manualmente no ambiente computacional por meio de programas de edição molecular. Tecnicamente, no âmbito da FBLD, este processo é denominado como desconstrução molecular.

Essencialmente, esta fragmentação consistiu em redesenhar subunidades estruturais dos ligantes padrão (consideradas “moléculas-mãe”) através de *softwares* para edição / visualização molecular, como o *ChemDraw 18.1*, *Chem3D*, *ACD / ChemSketch*, *Molview*, e *Marvin JS*. Esta etapa foi procedida segundo critérios preconizados pela literatura da FBDD com esta finalidade, que basicamente consiste em quebrar as moléculas preferencialmente nos átomos que ocupam posição alfa em relação a anéis, cadeias laterais de substituintes, grupos funcionais heteroatômicos ou farmacóforos previamente identificados. A valência de átomos terminais foi satisfeita com a inserção suficiente de átomos de hidrogênio.

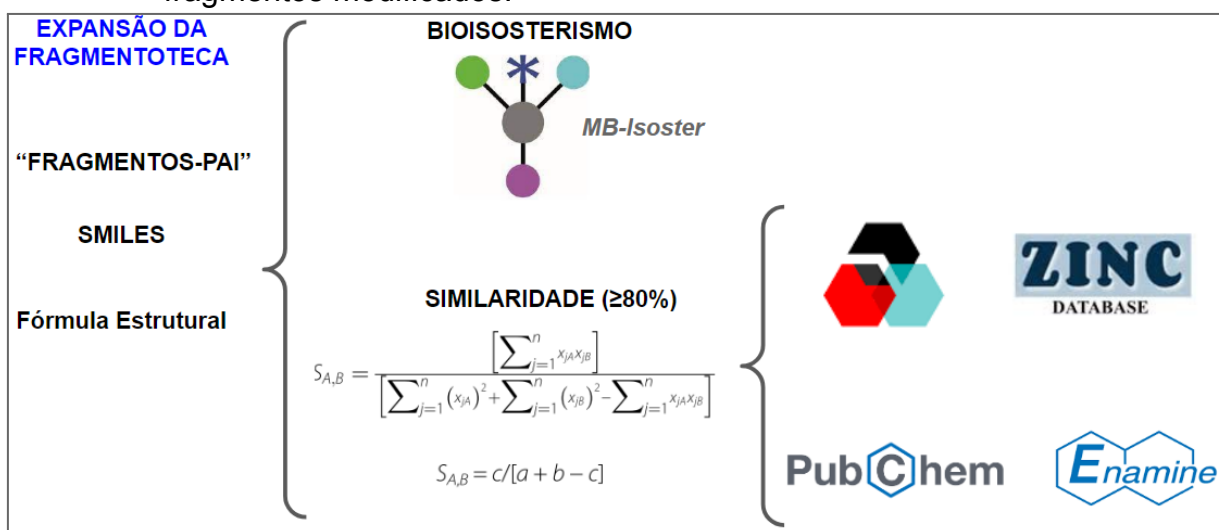
Salienta-se que o critério dos precursores sintéticos disponíveis comercialmente também foi utilizado por este proponente. Além disso, o algoritmo *BRICS* também foi explorado, havendo razoável coincidência nos fragmentos gerados, pois os princípios de seu funcionamento aplicam basicamente os mesmos critérios descritos acima. O *BRICS* se encontra publicamente disponível na plataforma do *RDKit* (228), e implementado no *software eMolFrag* (229, 230), que foi desenvolvido para realizar a fragmentação virtual de moléculas semelhantes a fármacos. Cerca de 2 a 3 fragmentos moleculares foram gerados para cada composto de referência, dependendo de seu tamanho molecular e de sua diversidade farmacofórica. Ao final do processo, 79 fragmentos padrão foram considerados e disponibilizados para ensaios de *docking*. Após estes ensaios de encaixe, os fragmentos padrão puderam ser avaliados quanto à conservação ou não de seu modo de ligação, foram ranqueados entre si com base em sua LE, e separados em subgrupos, quando complexados a *hotspots* específicos de cada um dos 3 sub-bolsos do sítio receptor. Estes fragmentos moleculares padrão passaram a integrar o banco de moléculas do MolMod-CS e receberam a seguinte codificação: xCFMMCS, em que x é um número serial arbitrário atribuído a cada ligante.

4.5 CRIAÇÃO DA FRAGMENTOTECA ISÓSTERA

Princípios de isosterismo e similaridade molecular foram usados para ampliar e diversificar a coleção química de fragmentos. Neste sentido, o *software MB-Isoster* e os servidores *online* (“*web servers*”) *SwissBioisostere* (231) / *SwissSimilarity* (232) foram explorados ativamente. Quando necessário, pequenas modificações estruturais foram realizadas manualmente no ambiente computacional por meio dos

softwares de edição molecular supra elencados. Bancos de moléculas comercialmente disponíveis, como o *ZINC20* e o *PubChem* foram extensivamente explorados, usando como argumento de pesquisa o *SMILES* ou a estrutura 2D de cada fragmento. O *Enamine* também foi utilizado, pois este repositório de blocos químicos disponibiliza um portfólio eletrônico de coleções tipificadas de fragmentos moleculares a pronta entrega, permitindo aos interessados explorá-las virtualmente conforme suas demandas ou intenções de uso, antes de sua efetiva aquisição como amostra física, figura 8.

Figura 8 - Representação ilustrativa da expansão amostral na coleção química de fragmentos realizada durante a etapa 4 (Formação da Fragmentoteca Isóstera). Os fragmentos-padrão foram adotados como pontos de partida químicos (“fragmentos-pai”) para originar, por meio de isosterismo e similaridade molecular (coeficiente de Tanimoto $\geq 80\%$), os novos fragmentos modificados.



Fonte: Autoria própria (2023)

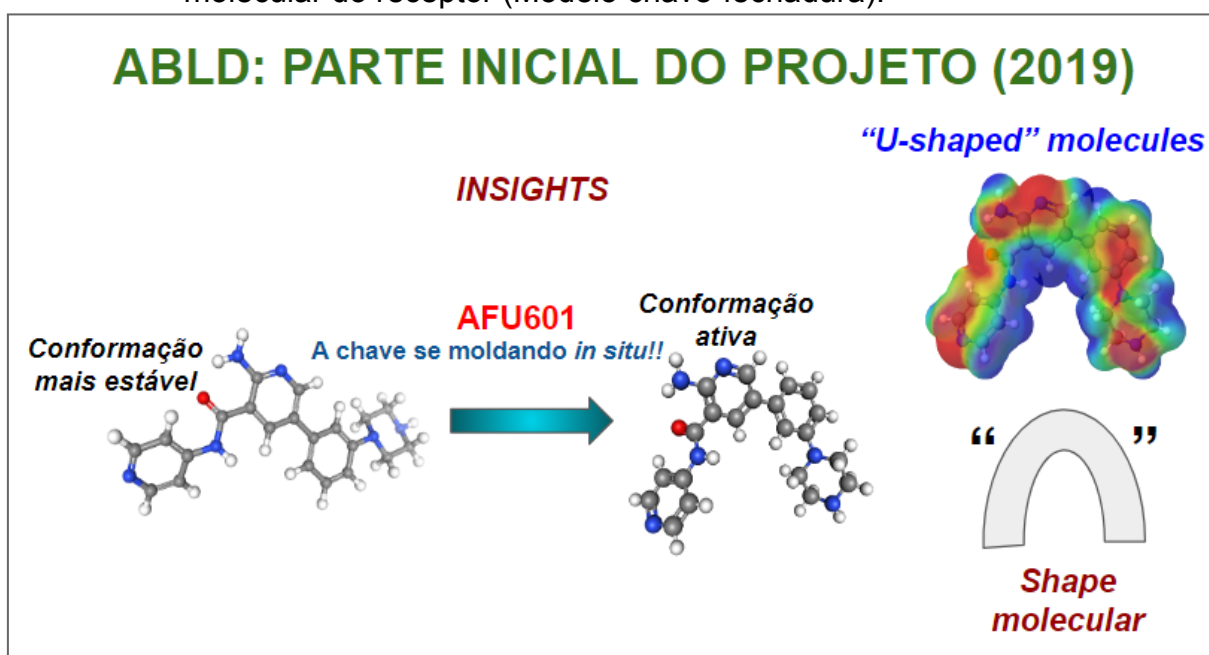
A ampliação do acervo de fragmentos ocorreu segundo um princípio central da FBLD, em que diversidade química não implica em quantidades exorbitantes de moléculas na biblioteca de compostos. Portanto, para refinar as buscas de novas estruturas químicas, somente fragmentos com coeficientes de similaridade 2D / 3D superiores a 80% foram recrutados, de forma a ampliar a coleção química com qualidade, sem deixar de preservar as principais características farmacofóricas dos padrões. Ao final do processo, 466 fragmentos moleculares isósteros foram considerados para compor a fragmentoteca enriquecida, os quais foram posteriormente preparados e submetidos a ensaios de *docking*. Após os encaixes no ambiente virtual, os fragmentos foram comparados aos fragmentos-pai, foram

ranqueados entre si com base na LE, e puderam ser separados em subgrupos, segundo sua LE quando complexados a sub-bolsos específicos do sítio de ligação. Estes fragmentos moleculares isósteros passaram a integrar o banco de moléculas do MolMod-CS e receberam a seguinte codificação: xFMMCS, em que x é um número serial arbitrário atribuído a cada ligante.

4.6 CRIAÇÃO DA QUIMIOTECA ISÓSTERA

Inicialmente, algumas séries de moléculas isósteras foram geradas pelo software *MB-Isoster* e na plataforma dos web servers *SwissBioisostere / SwissSimilarity* (abordagem ABLD), usando o *SMILES* do composto de referência AFU601 como argumento de entrada, ou sua estrutura 2D para ser quimicamente modificada, conforme esquematizado na figura 9:

Figura 9 - Representação ilustrativa da estratégia inicial de química medicinal (abordagem ABLD) adotada para concepção das primeiras séries químicas investigadas nesta Tese. Destaca-se a mudança conformacional significativa da molécula AFU601 para se encaixar no sítio receptor da enzima. Este *insight* estrutural sugeriu que moléculas com contorno molecular em formato de “U” devem possuir maior complementaridade 3D com a cavidade de ligação, aumentando a área superficial de interação do ligante com os pontos de reconhecimento molecular do receptor (Modelo chave-fechadura).

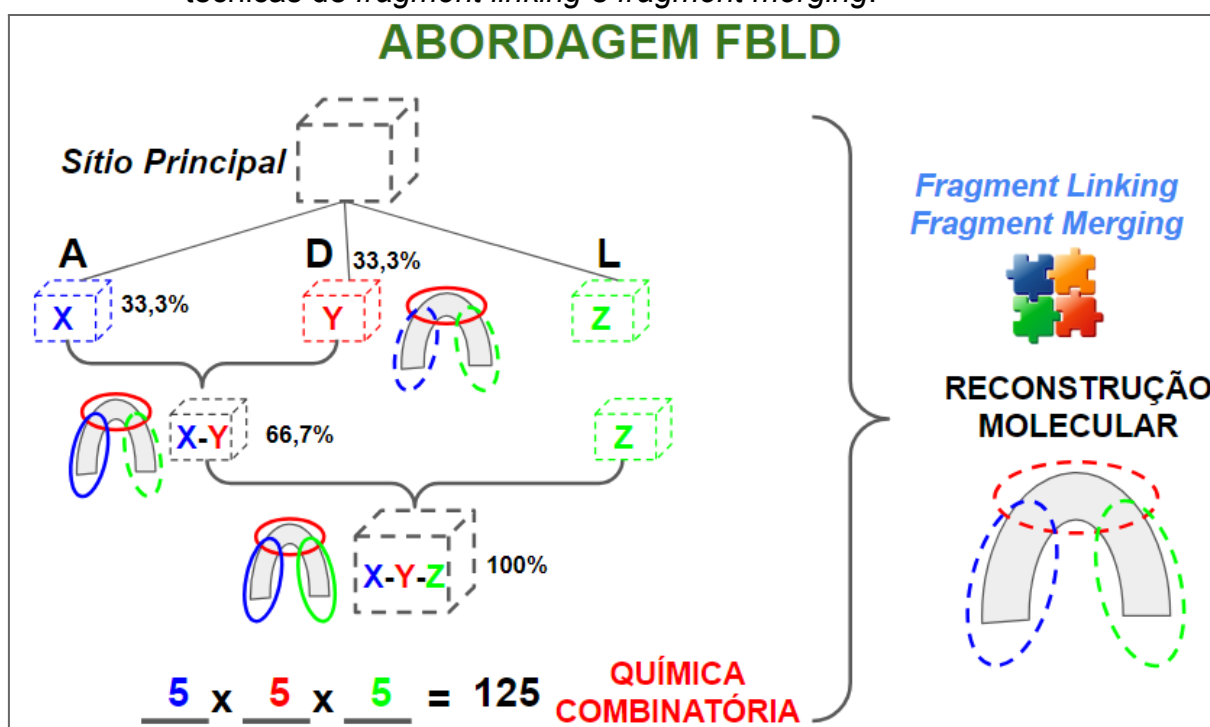


Fonte: Autoria própria (2023)

Com base na abordagem ABLD, 268 novos ligantes foram planejados e

avaliados em ensaios de *docking*. Uma segunda linha de desenho racional de moléculas, figura 10, baseou-se nos subgrupos contendo os melhores fragmentos por sub-bolso, e empregou-se duas técnicas de FBLD conhecidas como *fragment linking* e *fragment merging* para expansão molecular e concepção de novos ligantes maiores. Tecnicamente, no âmbito da FBLD, este processo é denominado como reconstrução molecular. A química combinatória computacional em pequena escala foi explorada, originando as diversas combinações estruturais que poderiam ser feitas entre os fragmentos previamente selecionados por *docking*, e permitindo que 324 compostos inéditos fossem concebidos (coleções combinatórias baseadas em fragmentos moleculares).

Figura 10 - Representação ilustrativa da principal estratégia de química medicinal (abordagem FBLD) explorada nesta Tese para concepção das séries químicas mais potentes *in silico* contra o alvo estudado. Moléculas em forma de 'U' foram construídas pela junção de 3 partes estruturais, correspondentes aos fragmentos mais promissores para cada sub-bolso de ligação. Tais fragmentos foram combinados entre si (química combinatória computacional em pequena escala) empregando as técnicas de *fragment linking* e *fragment merging*.



Fonte: Autoria própria (2023)

Os ajustes necessários na conectividade entre os fragmentos foram feitos para não ultrapassar os limites dimensionais do bolso de ligação ($\approx 15\text{\AA}$ de largura, $\approx 15\text{\AA}$ de profundidade, e $\approx 10\text{\AA}$ de altura), e, obviamente, para preservar os

principais pontos farmacofóricos de cada fragmento. Este planejamento estrutural foi feito manualmente no ambiente computacional por meio dos programas de edição / visualização molecular supra elencados, com base na inspiração molecular fornecida pelos melhores padrões moleculares e na intuição química deste proponente, observando parâmetros *druglikeness* (principalmente, as Regras de Lipinski). Nesta etapa, também explorou-se o *software eSynth* (233), amplamente empregado na reconstrução de moléculas usando blocos químicos menores, como os fragmentos moleculares. Ao final do processo, 592 novos ligantes no total foram considerados e preparados para os ensaios de *docking*. Estes compostos isómeros passaram a integrar o banco de moléculas do MolMod-CS e receberam a seguinte codificação: xMMCS, em que x é um número serial arbitrário atribuído a cada ligante.

4.7 ENSAIOS ADMET IN SILICO

Os ensaios de predição do espectro de ação e do perfil PK dos melhores ligantes foram realizados nos *web servers* *SwissADME*, *Pro-ToxII* e *PASS*. O *SMILES* ou a representação 2D de cada composto foi utilizado como argumento de entrada, conforme ilustrado na figura 11:

Figura 11 - Representação ilustrativa da sexta etapa referente à predição de parâmetros ADME e *druglikeness* (plataforma *SwissADME*), de espectro de ação (plataforma *PASS*), e de toxicidade (*Pro-ToxII*).

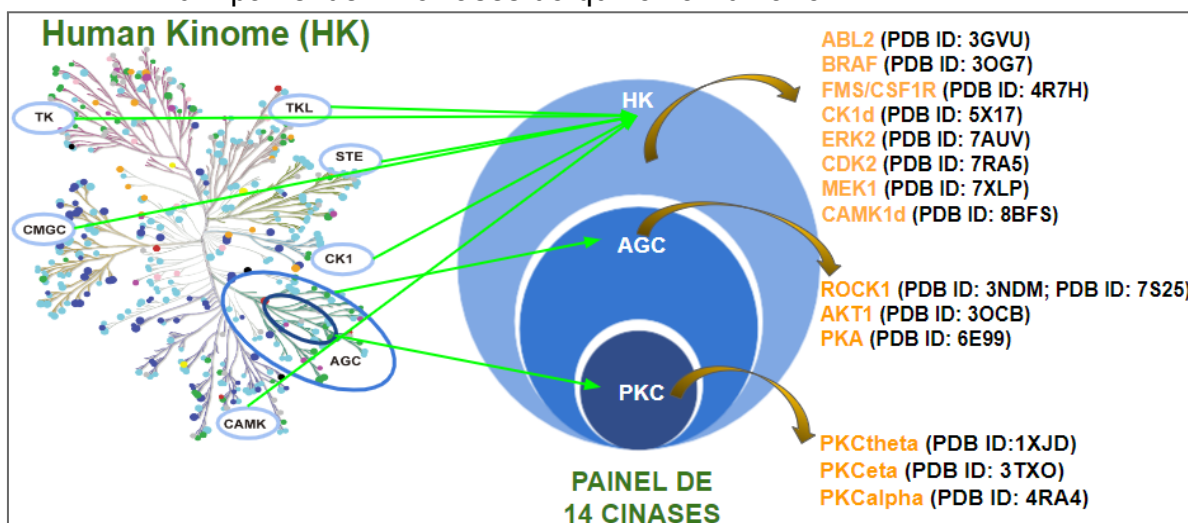


Fonte: Autoria própria (2023)

4.8 ENSAIOS DE SELETIVIDADE IN SILICO

Simulações moleculares de *docking* foram utilizadas para prever a BE, e intuir sobre a seletividade, dos ligantes mais promissores pela PKCi frente a outras cinases presentes no quinoma humano, figura 12. No total, foi considerado um painel de 14 cinases para os ensaios de seletividade *in silico*. A escolha destas cinases seguiu a sistemática de avaliar a seletividade desses compostos em diferentes níveis de similaridade filogenética com o alvo desejado. Portanto, primeiramente foram testados alvos biológicos pertencentes à mesma família da PKCi, sendo eles: PKCtheta (PDB ID: 1XJD; EC: 2.7.11.13) (234); PKCeta (PDB ID: 3TXO; EC: 2.7.11.13) (235); e, PKCalpha (PDB ID: 4RA4; EC: 2.7.11.13) (236). Posteriormente, foram testados alvos fora da família PKC, mas pertencentes ao mesmo grupo AGC, sendo eles: ROCK1 (PDB ID: 3NDM; PDB ID: 7S25; EC: 2.7.11.1) (237, 238); AKT1 (PDB ID: 3OCB; EC: 2.7.11.1) (239); e, PKA (PDB ID: 6E99; EC: 2.7.11.1) (240). Finalmente, alvos fora do grupo AGC e pertencentes a outros grandes grupos do dendrograma do quinoma humano foram avaliados, sendo eles: ABL2 (PDB ID: 3GVU; EC: 2.7.10.2) (241); BRAF (PDB ID: 3OG7; EC: 2.7.11.1) (242); FMS/CSF1R (PDB ID: 4R7H; EC: 2.7.10.1) (243); CK1d (PDB ID: 5X17; EC: 2.7.11.1) (244); ERK2 (PDB ID: 7AUV; EC: 2.7.11.24) (245); CDK2 (PDB ID: 7RA5; EC: 2.7.11.22) (246); MEK1 (PDB ID: 7XLP; EC: 2.7.11.1) (247); e, CAMK1d (PDB ID: 8BFS; EC: 2.7.11.17) (248).

Figura 12 - Representação ilustrativa da sétima etapa da Tese referente à predição de seletividade dos inibidores virtuais de PKCi mais promissores em um painel de 14 cinases do quinoma humano.



Fonte: Autoria própria (2023)

4.9 ENSAIOS DE ACESSIBILIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA IN SILICO

Os compostos-líderes tiveram sua acessibilidade sintética prevista pela plataforma do *Scifinder*, a qual baseia-se em princípios de retrosíntese da Química Orgânica Sintética e, portanto, fornece rotas para obtenção do composto desejado usando precursores comercialmente disponíveis ou sintetizáveis, e discriminando os tipos de reações químicas necessárias, a sequência de etapas sintéticas, bem como uma porcentagem média de rendimento reacional para cada uma delas. O *SMILES* ou a representação 2D de cada composto foi utilizado como argumento de entrada, conforme ilustrado na figura 13:

Figura 13 - Representação ilustrativa da oitava etapa do fluxo de trabalho referente à predição de acessibilidade e viabilidade sintéticas dos inibidores virtuais de PKCi mais promissores. O *SMILES* ou a estrutura 2D de cada um dos ligantes selecionados foi utilizado como argumento de entrada no ambiente da plataforma do *Scifinder*.



Fonte: Autoria própria (2023)

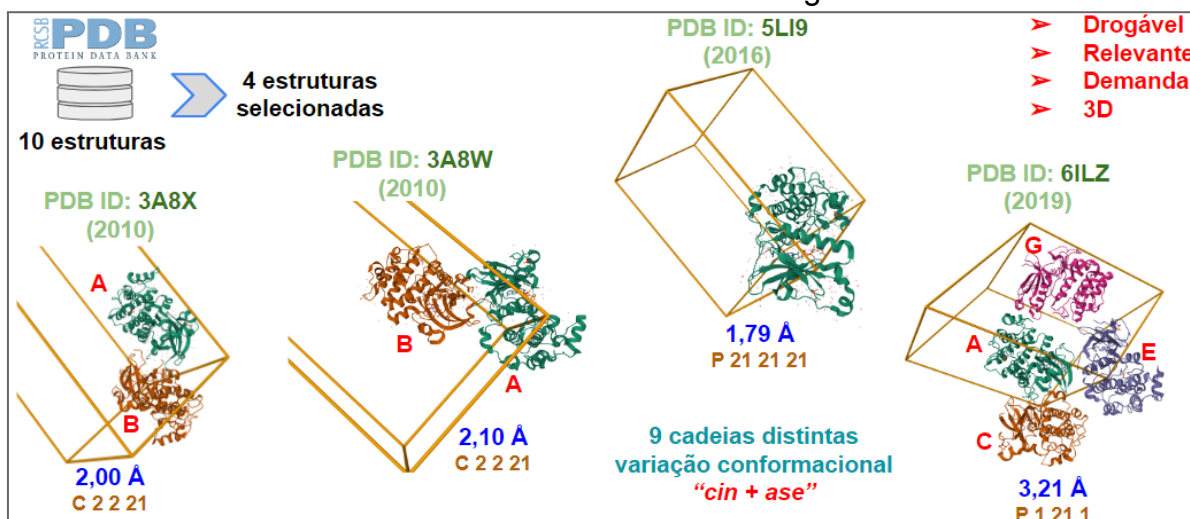
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados alcançados no decurso da Tese.

5.1 ESTRUTURAS CRISTALOGRAFICAS DA PKCi DEPOSITADAS NO PDB

Em resposta a uma busca recente no repositório PDB referente à enzima-alvo, foram encontradas 10 estruturas tridimensionais (3D) elucidadas por CRX. Para a condução da Tese, 4 estruturas foram consideradas: i) PDB ID: 3A8X; ii) PDB ID: 3A8W; iii) PDB ID: 5LI9; e, iv) PDB ID: 6ILZ. Com exceção da estrutura PDB ID:5LI9, as demais são homomultiméricas, ou seja, apresentam a mesma cadeia polipeptídica em estados conformacionais distintos, figura 14:

Figura 14 - Representação ilustrativa das unidades assimétricas de 4 das 10 estruturas cristalográficas depositadas no PDB para a enzima PKCi, com suas respectivas celas unitárias, grupos espaciais e resolução atômica. Com exceção da estrutura PDB ID:5LI9, as demais são homomultiméricas, ou seja, apresentam a mesma cadeia polipeptídica em estados conformacionais distintos num mesmo arranjo 3D. Estas conformações proteicas são representadas propositalmente com cores diferentes em cada uma das celas unitárias. A última pesquisa estrutural foi realizada no PDB em 07 de Agosto de 2023.

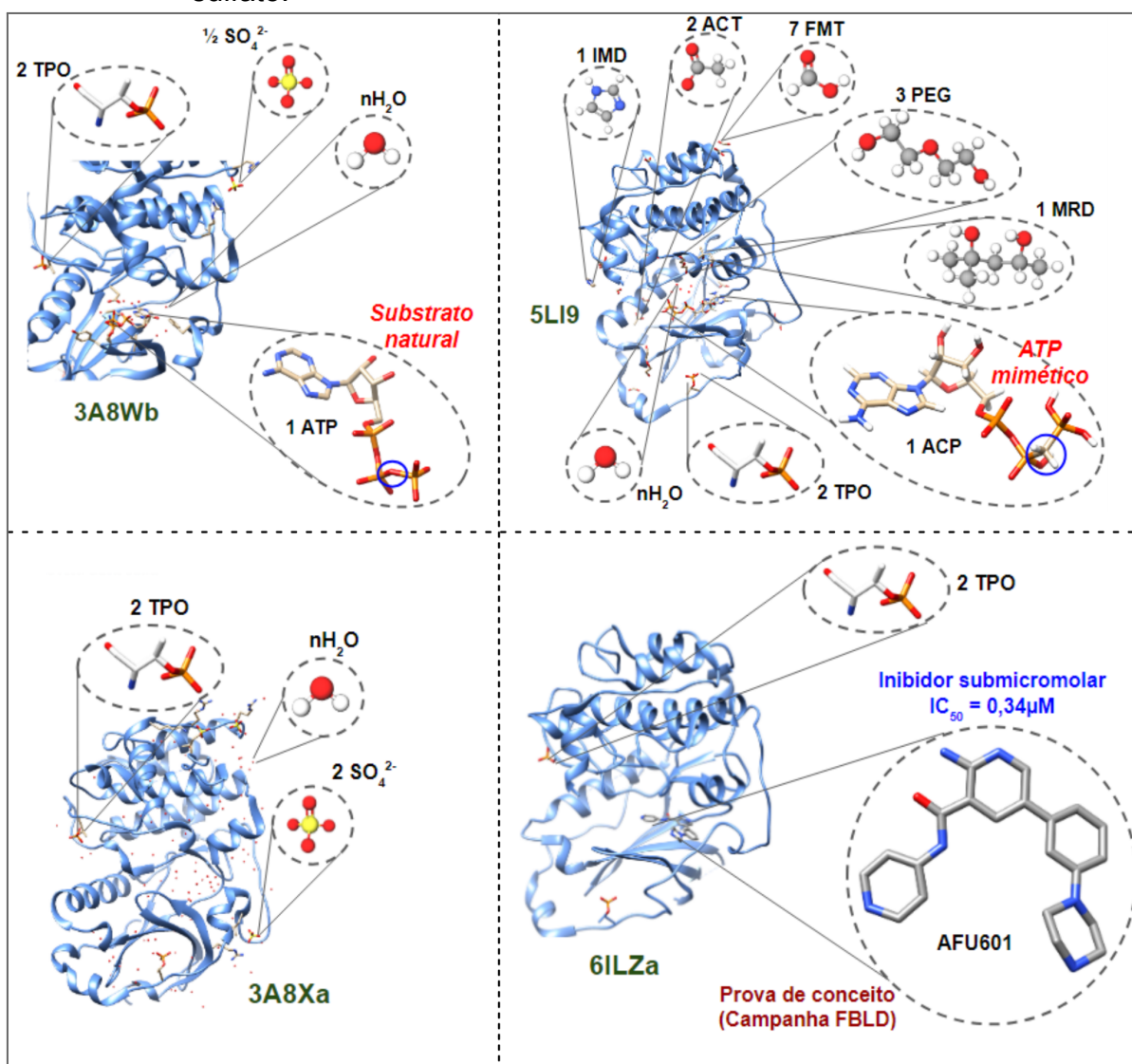


Fonte: Autoria própria (2023)

Com exceção da estrutura PDB ID: 6ILZ, todas elas apresentam várias pequenas moléculas compondo o arranjo estrutural, observando-se a presença de moléculas de água, íons, e agentes de cristalização, como os glicóis polietilenoglicol (PEG) e hexilenoglicol (MRD). Vale destacar que, além dessas pequenas moléculas

de menor interesse farmacêutico, as estruturas PDB ID: 3A8W e PDB ID: 5LI9 são cocrystalais da enzima com seu substrato (ATP) e com o seu isómero (ACP), respectivamente. Além disso, é importante frisar que na estrutura PDB ID: 6ILZ a enzima se cocrystalizou, pela primeira vez, com um ligante de pequena molécula com dados de inibição relatados (AFU601, $IC_{50} = 3,4 \times 10^{-7}M$), figura 15:

Figura 15 - Representação gráfica de cadeias específicas pertencentes às 4 estruturas da PKCi explorada nesta Tese. Em destaque, e de maneira ampliada, as pequenas moléculas que cocrystalizaram com a enzima em cada estrutura (TPO = treoninafosfato; IMD = imidazol; ACT = acetato; FMT = ácido fórmico; PEG = polietilenoglicol; MRD = hexilenoglicol; ATP = adenosina trifosfato; ACP = éster adenilato de ácido fosfometilfosfônico; H_2O = moléculas de água; e, SO_4^{2-} = íons sulfato).



Fonte: Autoria própria (2023)

O composto AFU601 foi considerado prova de conceito crucial para uma campanha FBLD reportada em 2019, visando justamente a descoberta de novos inibidores da PKCi baseados em fragmentos moleculares. (185) Os *insights* estruturais extraídos deste inibidor submicromolar serviram de inspiração molecular para o planejamento das primeiras séries químicas investigadas nesta Tese. De fato, até então, sabia-se que a maioria dos ligantes com ação direcionada à PKCi comprovada clinicamente consistiam de moléculas complexas de origem natural, como o próprio fármaco midostaurina (semissintética) e o taraxasterol (PN). Portanto, encontrar uma molécula relativamente mais simples, do ponto de vista estrutural, e com peso molecular inferior a 500Da, encorajou uma busca inicial por inibidores planejados como análogos ou isósteros de AFU601 (268 novos ligantes).

5.2 DOCKING DOS PADRÕES CRISTALOGRAFICOS DO AFU601 E ATP

Uma análise conformacional comparativa envolvendo as diferentes estruturas do receptor (quadro 2), sugeriram uma variabilidade posicional oriunda, majoritariamente, das cadeias laterais de cada arranjo 3D da enzima, já que o sítio catalítico desta cinase é altamente conservado:

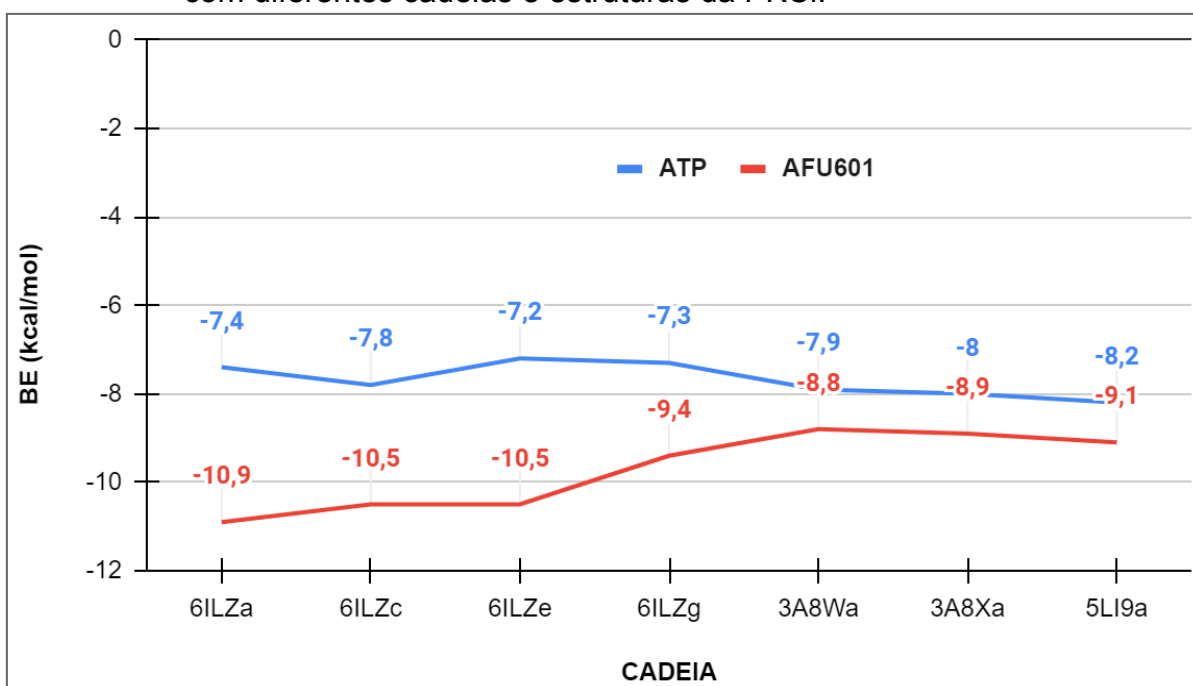
Quadro 2 - Dados de diferentes cadeias e estruturas da PKCi. As estruturas foram sobrepostas aos pares no ambiente do *software Pymol*, e adotando a cadeia A da estrutura 6ILZ como referência.

PDB ID	Resolução (Å)	Cadeia	RMSD (Å)
6ILZ	3,21	A	0,000
		C	7,452
		E	8,967
		G	8,842
3A8W	2,10	A	9,105
3A8X	2,00	A	9,256
5LI9	1,79	A	9,188

Fonte: Autoria própria (2023)

Com base nos *inputs* fornecidos ao *Vina* e nos resultados originados após a realização dos ensaios de *docking* envolvendo as estruturas do receptor (tabela 2) e os padrões cristalográficos (AFU601 e ATP), foi possível abstrair algumas informações relevantes, contidas na figura 16:

Figura 16 - Resultados de *re-docking* e *cross-docking* dos padrões AFU601 e ATP com diferentes cadeias e estruturas da PKCi.



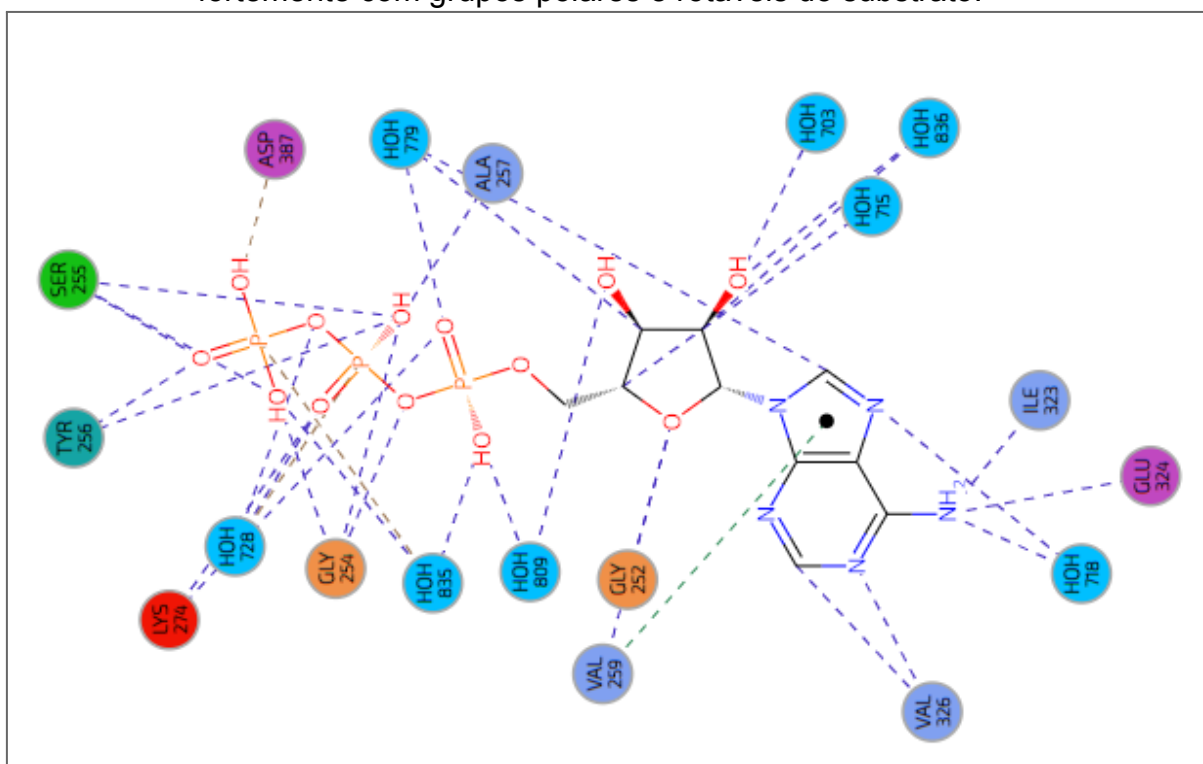
Fonte: Autoria própria (2023)

De uma forma geral, os complexos E-L (complexos enzima-ligante) destes dois ligantes com as cadeias da estrutura PDB ID: 6ILZ foram mais estáveis que os das demais (PDB ID: 3A8W, PDB ID: 3A8X, e PDB ID: 5LI9). Invariavelmente, em todos os ensaios, o ligante AFU601 forneceu complexos mais exergônicos que o ATP, até mesmo quando complexado à estrutura PDB ID: 3A8W, que é a estrutura em que a enzima PKCi foi cocristalizada com seu substrato natural (ATP). Portanto, no ambiente computacional do *Vina*, pode-se admitir que o AFU601 é um ligante com maior afinidade pela enzima PKCi. Logo, a competição por este sítio ortostérico de ligação deve lhe ser favorável em detrimento da molécula de substrato. Todavia, o valor previsto para o ATP (código 16CMMCS) provavelmente foi subestimado, pois o modelo de pontuação do *Vina* o desfavorece sob dois importantes aspectos: o de não considerar efeitos do solvente; e, a penalidade imposta pelo número elevado de ligações rotáveis em sua estrutura molecular. Este caso pode ser um típico exemplo

em que o número de ligações rotáveis consideradas ativas pelo *Vina* não condiz com o que deve ocorrer no ambiente real.

É sensato esperar que as moléculas de água presentes no sítio ativo da PKCi, PDB ID: 3A8W, figura 17, cujos efeitos são imperceptíveis para o *Vina*, possam estabilizar o empacotamento e estabelecer fortes interações de H com a cauda fosforada do ATP e com hidroxilas (-OH) da pentose, o que reduz sua capacidade de girar, lhe impondo uma certa rigidez, e diminuindo sua entropia.

Figura 17 - Representação 2D, gerada pelo *software* BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*, do modo de ligação do ATP quando complexado na cadeia A da estrutura PDB ID: 3A8W. Como ilustrado na figura, no mínimo 8 moléculas de H₂O participam do empacotamento, interagindo fortemente com grupos polares e rotáveis do substrato.

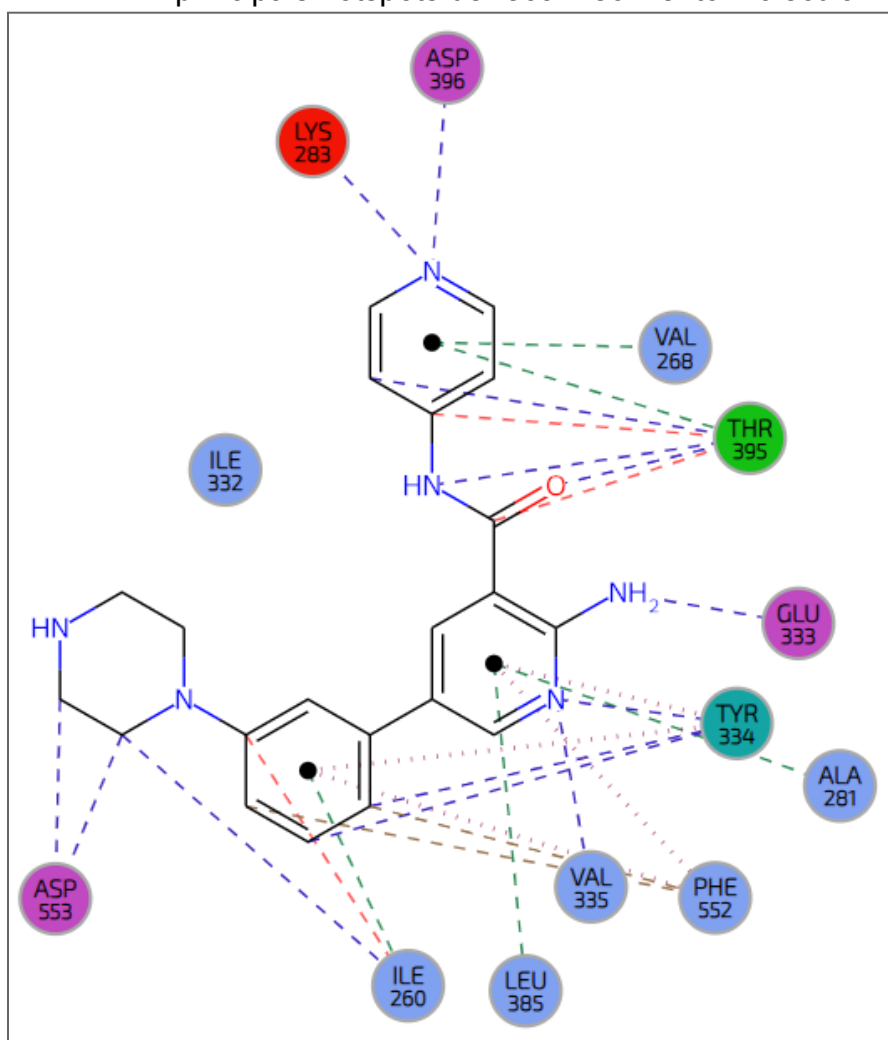


Fonte: Autoria própria (2023)

Inobstante desta possível discordância em termos energéticos preditos pelo modelo do *software* *Vina*, o modo de ligação do ATP foi recuperado com aproximação razoável, apesar da ausência das moléculas de H₂O, principalmente para a subunidade adenina da molécula do substrato. De forma semelhante, o controle AFU601 também teve seu modo de ligação recuperado pelo *Vina* com boa concordância em relação à pose cristalográfica na cadeia 6ILZa, cuja representação 2D pode ser encontrada na figura 18. Além disso, é importante salientar que o valor de IC₅₀ estimado (358 nM) com base no valor médio de suas energias livres (-9,9

kcal/mol), se aproxima do valor determinado em testes clínicos para o AFU601 (340 nM). Considerando não haver variações geométricas profundas entre as melhores conformações do padrão AFU601 em cada cadeia proteica, torna-se plausível admitir influência majoritária das diferenças estereoquímicas e supramoleculares entre as quatro conformações distintas do sítio receptor (valores de RMSD na tabela 2).

Figura 18 - Representação 2D, gerada pelo *software* BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*, do modo de ligação do inibidor AFU601 quando complexado na cadeia A da estrutura PDB ID: 6ILZ, com seus principais hotspots de reconhecimento molecular.

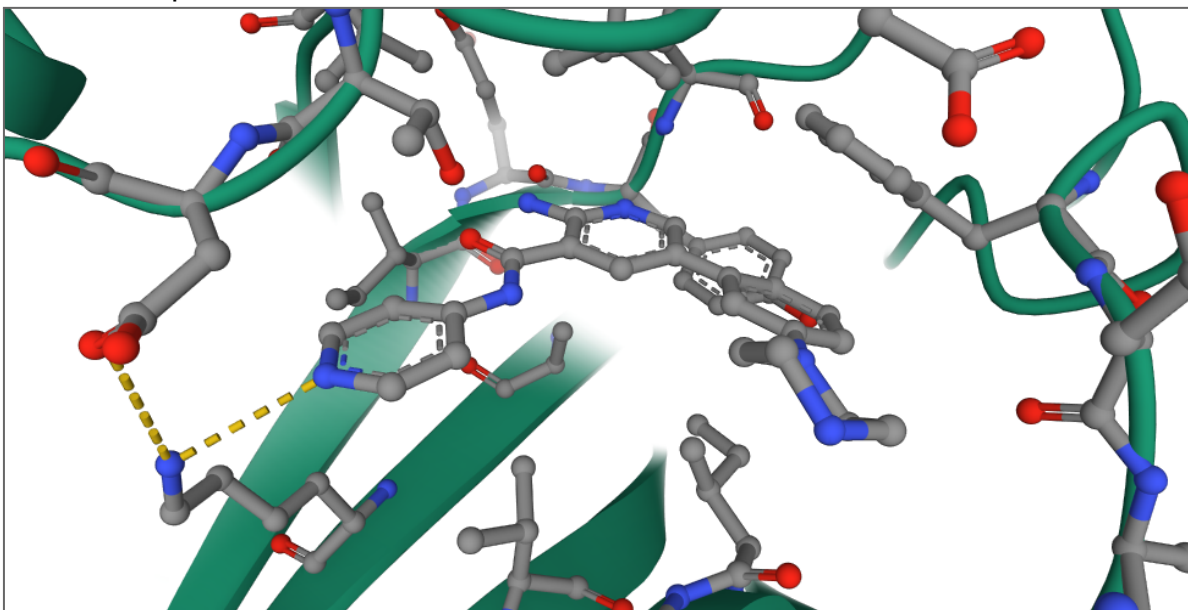


Fonte: Autoria própria (2023)

A cadeia 6ILZa possui uma coluna iônica formada pelos resíduos Asp396 e Lys283 na entrada do bolso de ligação que precede a região de dobradiça, figura 19. A cadeia 6ILZc também possui uma coluna iônica formada pelos resíduos Asp553,

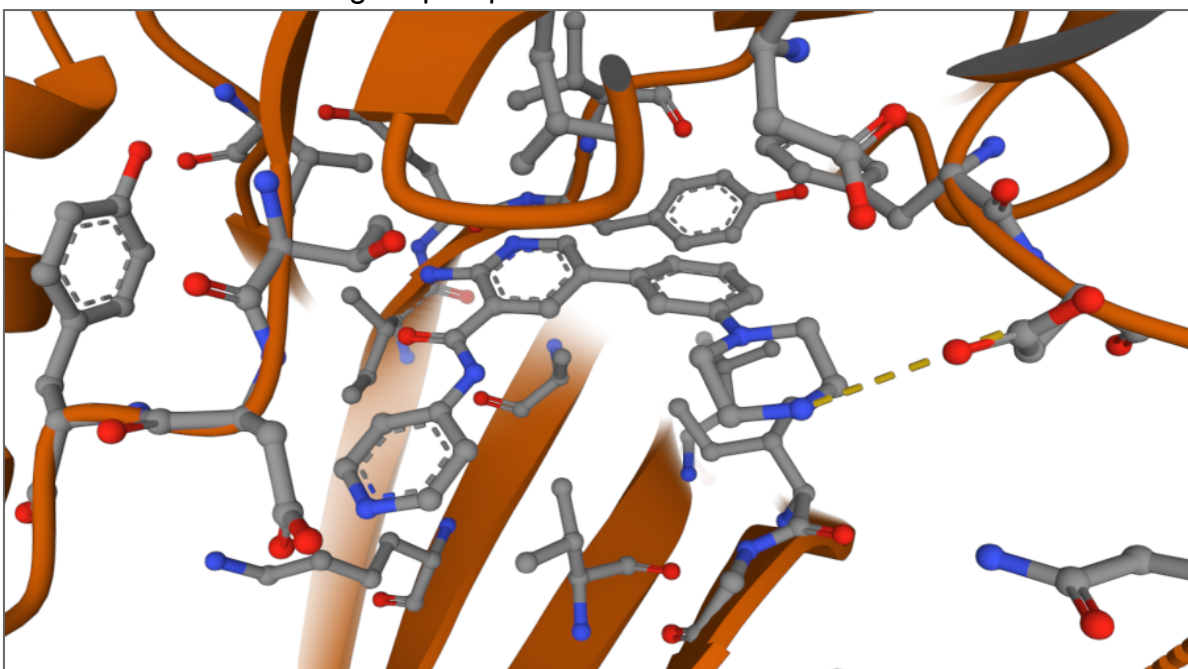
Asp339 e Gln555, mas localizada do lado oposto, na extremidade do *loop* C-terminal, figura 20.

Figura 19 - Representação 3D do inibidor AFU601 cristalizado no sítio ortostérico da PKCi (cadeia 6lLZa), destacando, com linhas pontilhadas amarelas, as fortes interações coulômbicas envolvendo os resíduos Asp396 e Lys283 o N piridínico do ligante. Átomos de H foram omitidos na figura por questões de clareza.



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 20- Representação 3D do inibidor AFU601 cristalizado no sítio ortostérico da PKCi (cadeia 6lLZc), destacando, com linhas pontilhadas amarelas, as fortes interações coulômbicas envolvendo os resíduos Asp553, Asp339 e Gln555 o NH piperazínico terminal do ligante. Átomos de H foram omitidos na figura por questões de clareza.



Fonte: Autoria própria (2023)

De fato, apesar de fatores iônicos não serem considerados pelo modelo do *Vina*, estas colunas contribuem com uma parcela adicional de estabilização do empacotamento, pois participam de interações coulômbicas envolvendo os dois grupos periféricos da molécula AFU601. A porção piridina interage com a coluna iônica da cadeia 6ILZa, e a piperazina participa de interação semelhante, do lado oposto, na cadeia 6ILZc. Nas cadeias 6ILZe e 6ILZg, além de não haver formação destes *hotspots* iônicos no bolso de ligação, os respectivos resíduos estão distantes entre si e também não formam nenhum tipo de interação polar com quaisquer porções do ligante. Certamente, isto justifica seus arranjos supramoleculares menos propensos a formarem complexos mais estáveis, corroborando a escolha das cadeias 6ILZa e 6ILZc como as preferidas para a extração de *insights* estruturais para o desenho racional de novos inibidores.

Na prática, além destas, no mínimo uma cadeia das demais estruturas foram avaliadas nos ensaios, visando estabelecer comparações energéticas, topológicas e estereoquímicas. Além disso, pode ser sensato que todas essas cadeias da PKCi representam uma amostra populacional de conformações possíveis para a enzima, sendo interessante investigar o efeito de mudanças topológicas do sítio receptor na estabilidade dos complexos E-L formados.

Inicialmente, numa fase preliminar de otimização dos parâmetros de ancoragem, as dimensões usadas no espaço de pesquisa formaram caixas cujo volume correspondeu aos exatos 27.000\AA^3 ($30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$) preconizados como um limite superior pelos mentores do *Vina*. A exaustividade executada também foi condizente com o *default* (=8) do *software*, que é o valor mínimo recomendado. Ao expandir a caixa para além do volume de *setup* e dobrar a exaustividade (=16) dos ciclos, melhores valores de RMSD entre as conformações foram obtidos, e valores de energia muito próximos ou idênticos foram alcançados, considerando o mesmo local de ligação. Logo, optou-se por usar caixas maiores e dobrar a exaustividade dos ciclos de busca. Estas escolhas foram propositais, e pretendiam, além de otimizar os ensaios, investigar outros putativos modos de ligação em sítios alostéricos para suportar estratégias auxiliares de desenho molecular, caso fossem pertinentes se a estratégia pelo sítio principal falhasse.

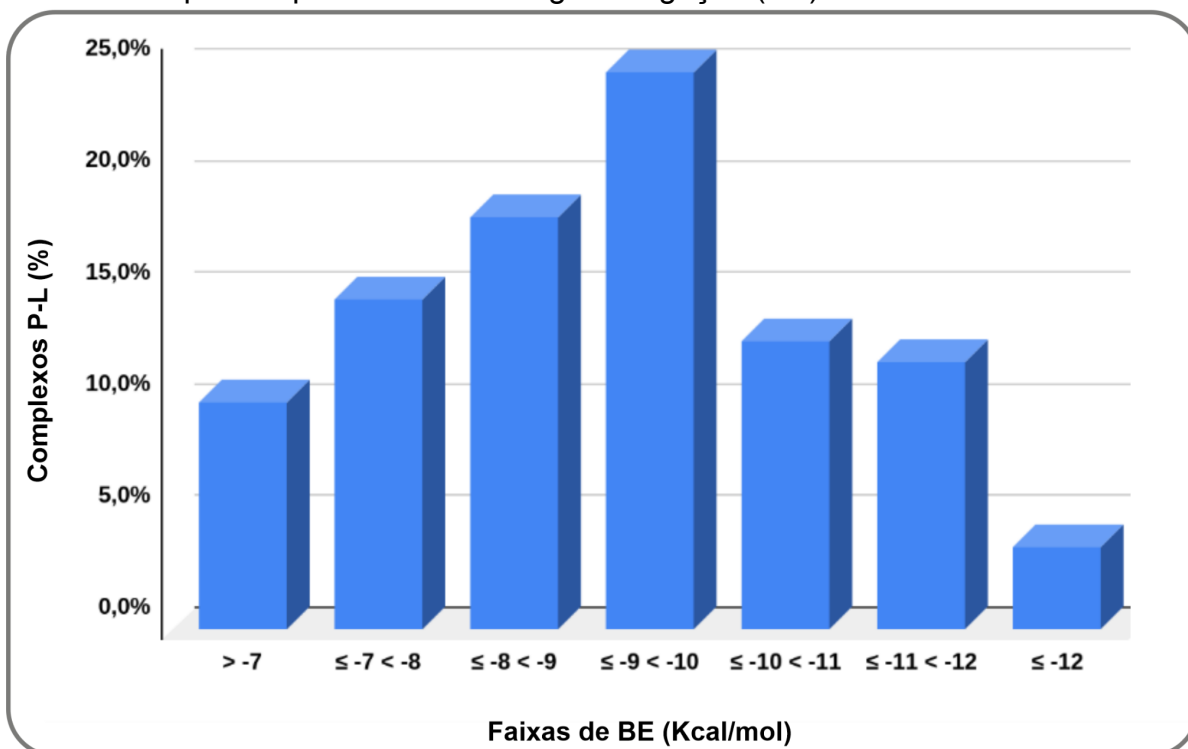
Interessante reiterar que todas as melhores conformações de grande parte dos padrões (*aprox.* 70%) e seus respectivos modos de ligação preditos são muito

semelhantes aos verificados nas estruturas cristalográficas, demonstrando ótimo nível de acurácia do *software* de *docking* em prever modos de ligação coerentes com dados experimentais. Entretanto, observou-se, em alguns casos, valores relativamente altos de RMSD para algumas conformações com BEs próximas. Portanto, foi inevitável admitir um grau considerável de promiscuidade supramolecular dos compostos-padrões e dos novos ligantes *in silico*. (249, 250) De fato, as moléculas quando soltas em caixas de busca mais amplas tiveram maior liberdade espacial para encontrar *hotspots* distintos para interagir em regiões longínquas pertencentes ao mesmo sítio. Mesmo assim, elas foram capazes de originar complexos E-L praticamente isoenergéticos, sugerindo a existência de outros *hotspots* potenciais em sub-bolsos distintos e que a variabilidade conformacional do ligante não reduz sua afinidade pelo sítio principal. De fato, possuir uma população conformacional com resposta inibitória *in silico* ligeiramente homogênea, pode resultar em permanência prolongada do ligante no sítio receptor, aumentando o tempo de interação e provocando uma resposta farmacológica mais duradoura, caso esta ação farmacodinâmica seja constatada em modelos biológicos reais. Além disso, estes dados podem sugerir novas possibilidades para exploração estrutural de novos ligantes partindo de fragmentos.

5.3 DOCKING DA QUIMIOTECA PADRÃO

Avaliando os resultados de *docking* dos ligantes adotados como padrões neste fluxo de trabalho, somente com base nos valores de BE, foi possível observar o pior valor de energia livre para o controle 6CMMCS (-5,1 kcal/mol) e os melhores valores (em torno de -12,0 kcal/mol) para os controles 3CMMCS, 19CMMCS, 23CMMCS e 25CMMCS. Cerca de 25% dos complexos apresentaram valores de BE na faixa mediana, de -9 a -10 kcal/mol, e esta correspondeu à faixa energética com a maior população de complexos E-L, figuras 21 e 22(a):

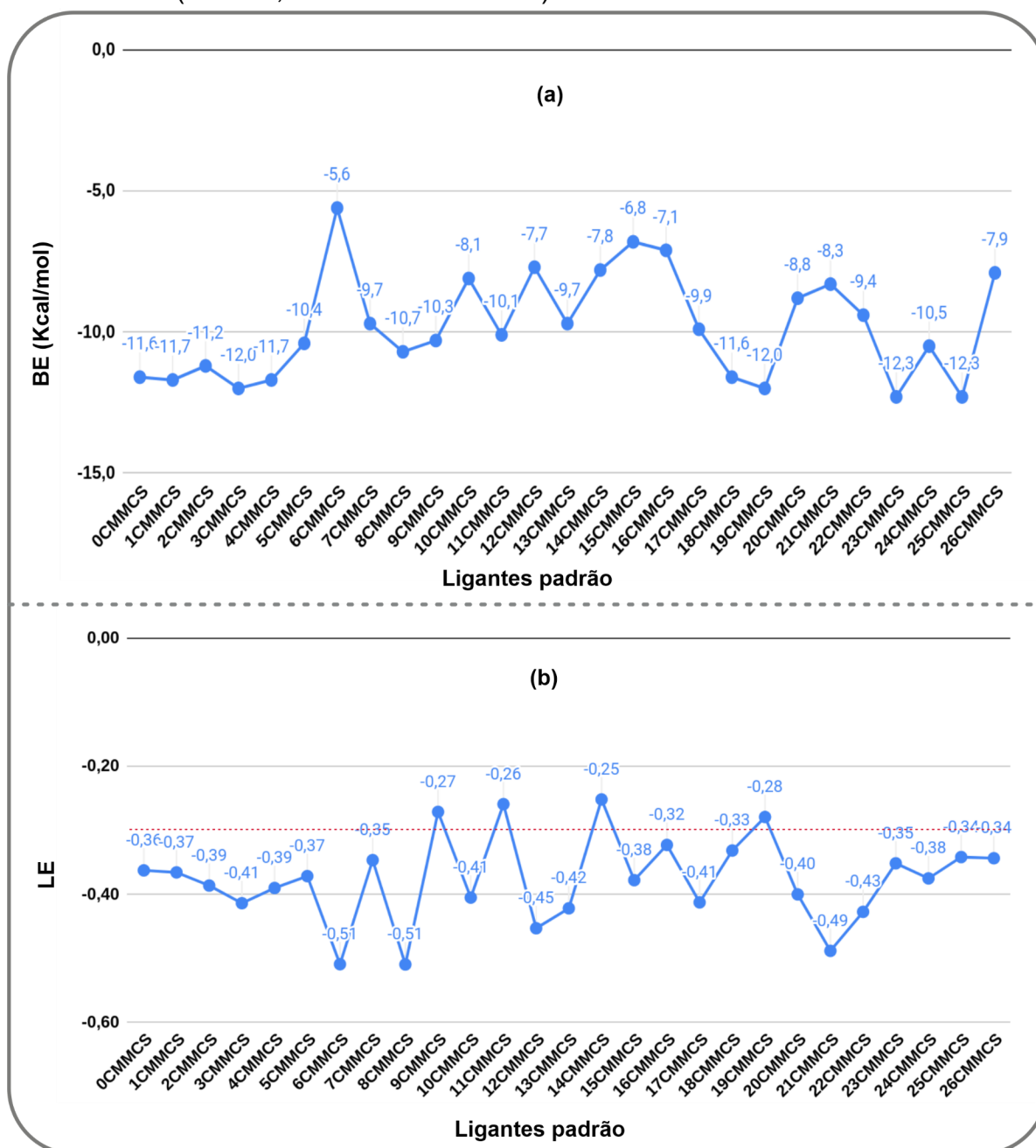
Figura 21 - Distribuição dos complexos E-L formados entre o alvo PKCi e ligantes padrão por faixas de energia de ligação (BE).



Fonte: Autoria própria (2023)

Considerando, agora, a métrica da LE, figura 22(b), observa-se que o controle 19CMMCS (-0,28) figura entre os piores valores encontrados, e que o controle 6CMMCS (-0,51) é um dos dois melhores valores, contrastando com seus ranqueamentos anteriores baseados na BE.

Figura 22 - (a) Valores médios de BE (kcal.mol⁻¹), e (b) valores médios de LE (kcal.mol⁻¹.átomo⁻¹) para os ligantes da quimioteca padrão. A linha vermelha em 22b representa a LE mínima considerada na literatura (LE = -0,30 kcal.mol⁻¹.átomo⁻¹).



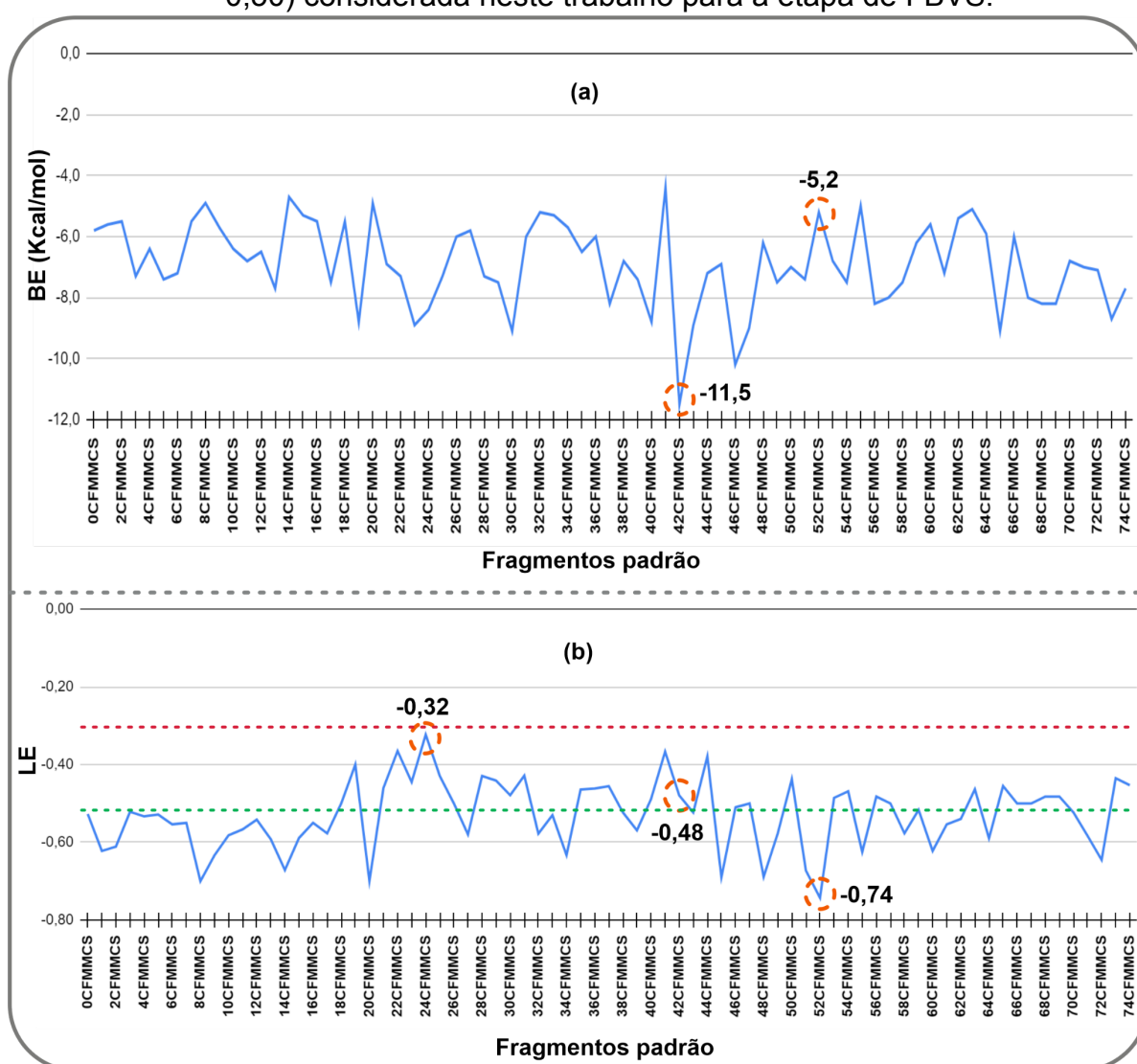
Fonte: Autoria própria (2023)

Os demais controles apresentaram LE entre o valor máximo (-0,51) e -0,30, superando a LE mínima preconizada pela FBLD para moléculas semelhantes a fármacos. (67) O valor de LE encontrado para o ATP foi de apenas -0,28, enquanto o controle cristalográfico AFU601 (7CMMCS) apresentou LE igual a -0,35 e seu isómero (N-AFU: 5CMMCS) demonstrou um valor levemente superior (-0,37).

5.4 DOCKING DA FRAGMENTOTECA PADRÃO

Novamente, houveram inversões de ranqueamento comparando os valores de BE e LE para alguns fragmentos, figuras 23(a) e 23(b).

Figura 23 - (a) Valores médios de BE (kcal.mol^{-1}), e (b) valores médios de LE ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) para os ligantes da fragmentoteca padrão. Destaques circulados em laranja para mostrar o pior e o melhor fragmento (24CFMMCS e 52CFMMCS, respectivamente), bem como a mudança no ranqueamento dos fragmentos 42CFMMCS e 52CFMMCS. A linha vermelha representa a LE mínima considerada na literatura ($LE = -0,30$). A linha verde representa a LE de corte ($LE = -0,50$) considerada neste trabalho para a etapa de FBVS.

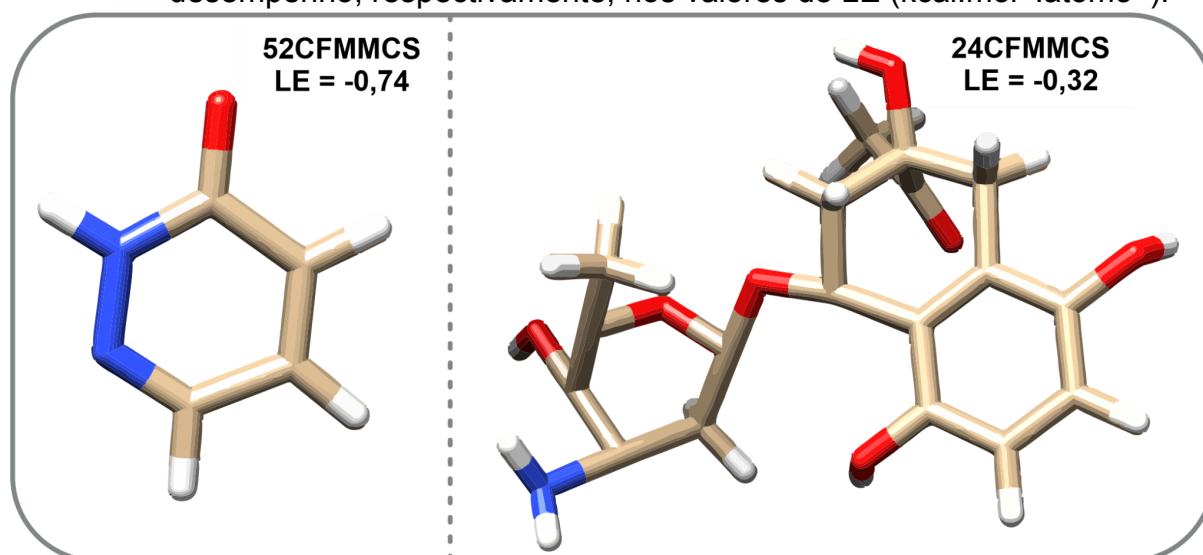


Fonte: Autoria própria (2023)

No geral, considerando completamente o bolso ortostérico da PKCi como espaço de busca, os fragmentos padrão apresentaram valores de LE melhores que

-0,30 e a faixa de valores observados ocorreu entre -0,32 para o fragmento 24CFMMCS (pior valor) e -0,74 para o fragmento 52CFMMCS (melhor valor), figura 24. O valor médio de LE para este grupo de fragmentos padrão foi de -0,50, e este foi considerado o valor de corte para as etapas seguintes de FBVS.

Figura 24 - Fragmentos 52CFMMCS e 24CFMMCS com o melhor e pior desempenho, respectivamente, nos valores de LE ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{átomo}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria (2023)

Notou-se, por inspeção visual, que vários fragmentos apresentaram promiscuidade supramolecular intrasítio (ortostérico) e intersítios (ocupando sítios alostéricos), embora seus modos de ligação também tenham sido recuperados pelo *Vina* em alguns casos (fragmentos de AFU601 e ATP, por exemplo).

No geral, como esperado, os fragmentos apresentaram valores de BE próximos ou idênticos, comparando os ensaios de *docking* no bolso completo com os dos sub-bolsos ensaiados separadamente. Ou seja, o *Vina* encontrou praticamente as mesmas conformações ótimas, e suas respectivas energias-livre, em diferentes tamanhos do espaço de busca.

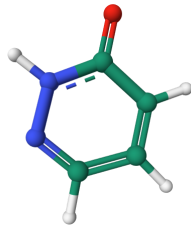
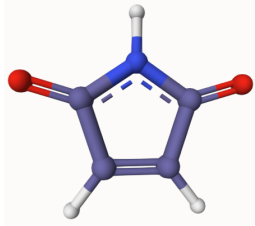
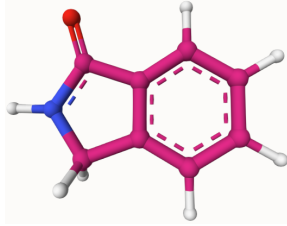
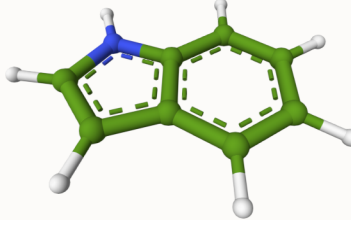
Avaliando a interação dos fragmentos padrão com as três regiões distintas do sítio ortostérico, foi possível perceber que tiveram fragmentos se complexando a diferentes sub-bolsos com energias próximas, enquanto outros demonstraram maior preferência por um sub-bolso específico.

A inspeção visual do local de ligação que alojou a melhor conformação de cada fragmento-padrão e a comparação de energia entre elas, possibilitaram a

separação destes fragmentos por sub-bolso de ligação, conforme apresentado no quadro 3:

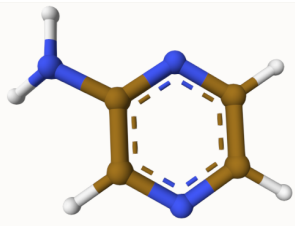
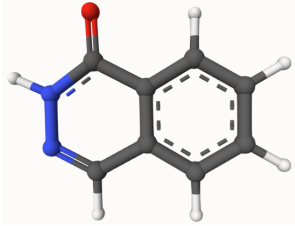
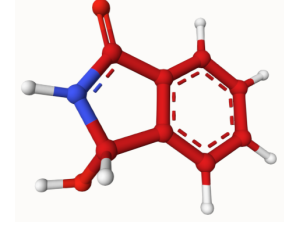
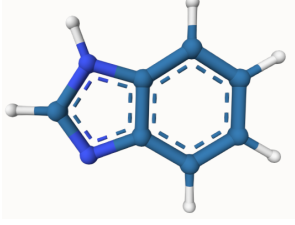
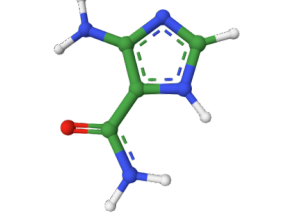
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.

(continua)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
52CFMMCS	-0,74	D	
20CFMMCS	-0,70	D	
45CFMMCS	-0,69	D	
48CFMMCS	-0,69	D	

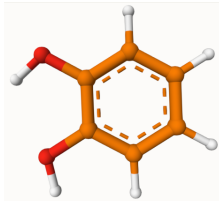
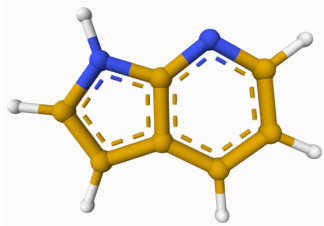
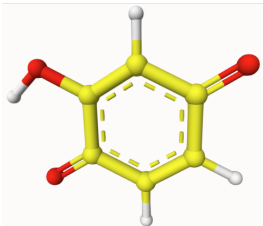
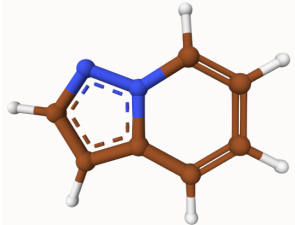
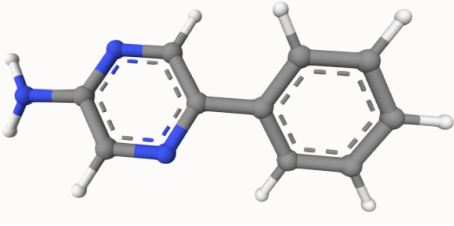
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
14CFMMCS	-0,67	D	
51CFMMCS	0,67	A	
72CFMMCS	-0,65	D	
9CFMMCS	-0,63	D	
34CFMMCS	-0,63	D	

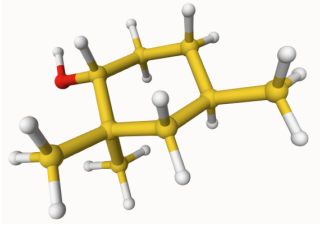

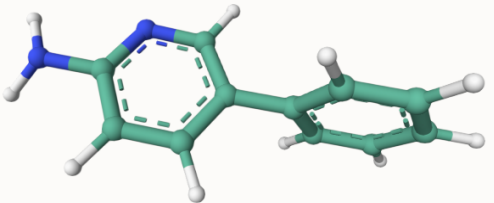
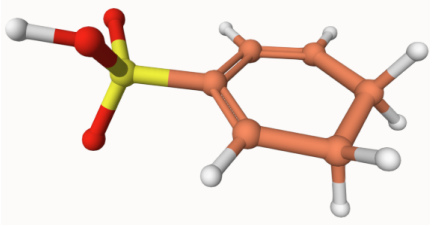
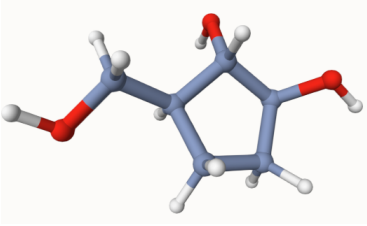
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte ($\text{LE} = -0,50$) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
55CFMMCS	-0,63	L	
1CFMMCS	-0,62	D	
60CFMMCS	-0,62	D	
2CFMMCS	-0,61	D	
13CFMMCS	-0,59	D	

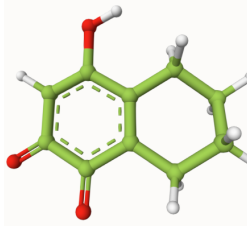
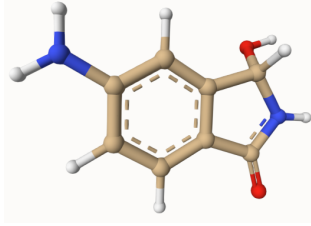
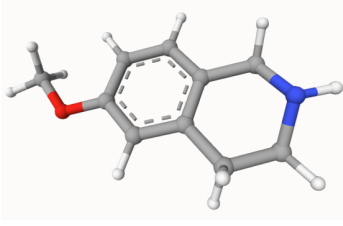
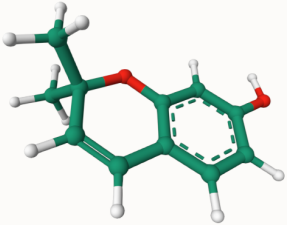
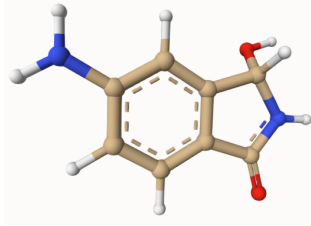
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte ($\text{LE} = -0,50$) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
64CFMMCS	-0,59	L	
10CFMMCS	-0,58	L	
17CFMMCS	-0,58	D	
27CFMMCS	-0,58	A	
32CFMMCS	-0,58	A	

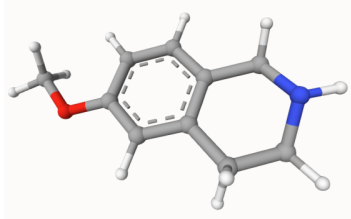
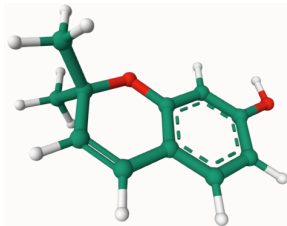
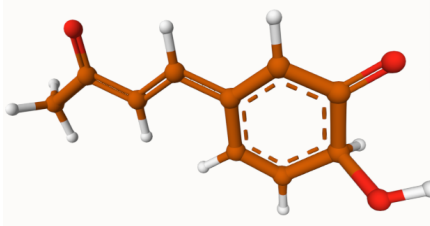
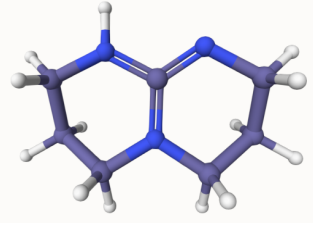
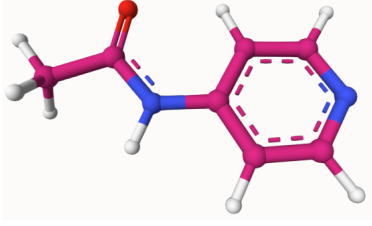
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
58CFMMCS	-0,58	D	
71CFMMCS	-0,58	D	
11CFMMCS	-0,57	L	
39CFMMCS	-0,57	L	
71CFMMCS	-0,58	D	

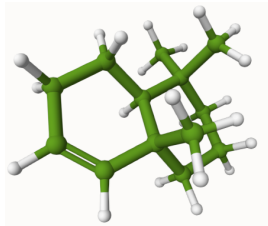
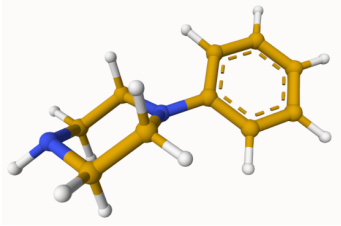
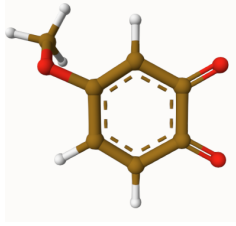
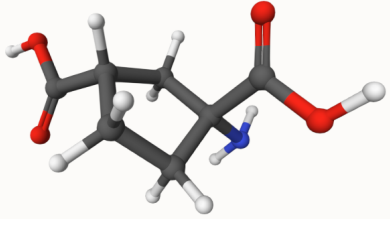
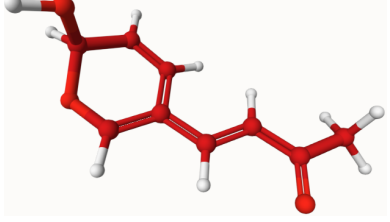
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte ($\text{LE} = -0,50$) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
11CFMMCS	-0,57	L	
39CFMMCS	-0,57	L	
6CFMMCS	-0,55	L	
7CFMMCS	-0,55	D	
16CFMMCS	-0,55	D	

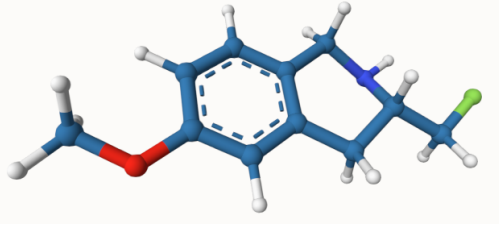
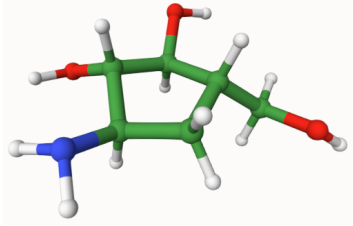
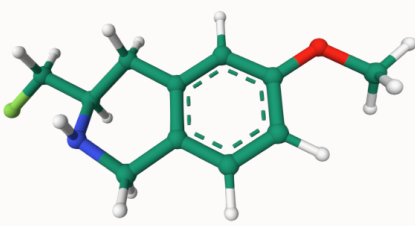


Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
61CFMMCS	-0,55	D	
12CFMMCS	-0,54	L	
62CFMMCS	-0,54	L	
0CFMMCS	-0,53	L	
4CFMMCS	-0,53	L	


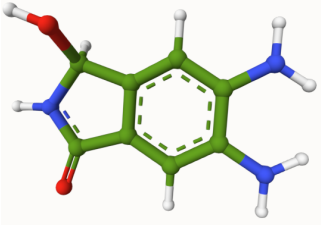
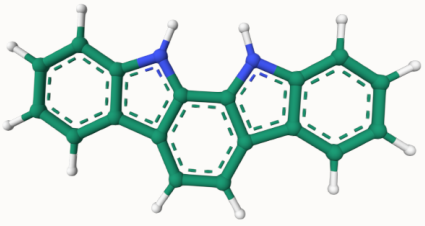
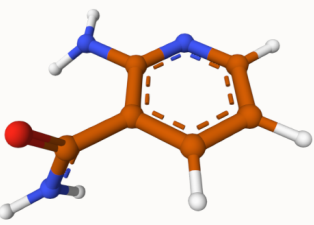
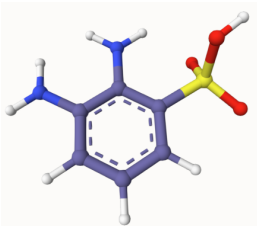
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte ($\text{LE} = -0,50$) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
5CFMMCS	-0,53		
33CFMMCS	-0,53	A	
3CFMMCS	-0,52	A	
38CFMMCS	-0,52	D	
43CFMMCS	-0,52	D	


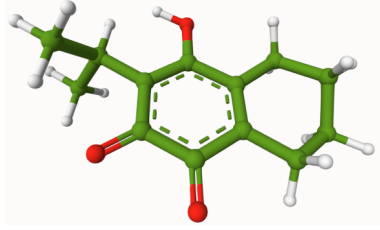
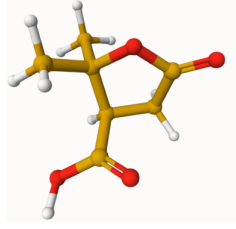
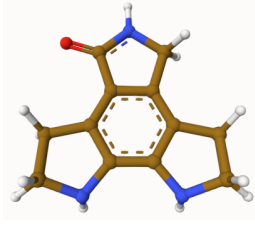
Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.

(continuação)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
59CFMMCS	-0,52	D	
70CFMMCS	-0,52	D	
46CFMMCS	-0,51	L	
18CFMMCS	-0,50	A	
26CFMMCS	-0,50	A	

Quadro 3 - Valores em ordem decrescente de LE média ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}^{-1}$) dos fragmentos-padrão separados por sub-bolso de ligação (A = Alça; D = Dobradiça; e, L = Loop). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cores variadas e diferentes das demais. Somente os fragmentos com valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte (LE = -0,50) foram considerados.

(conclusão)

Fragmento	LE	Sub-bolso	Estrutura
47CFMMCS	-0,50	A	
57CFMMCS	-0,50	L	
66CFMMCS	-0,50	L	
67CFMMCS	-0,50	L	

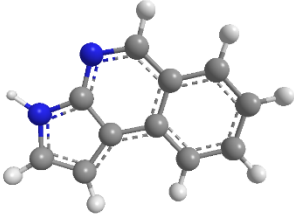
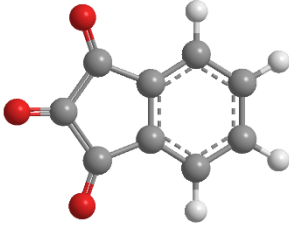
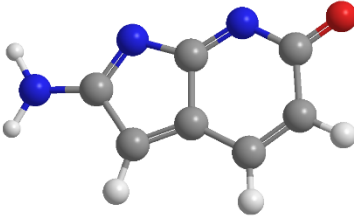
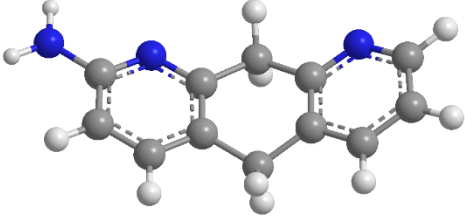
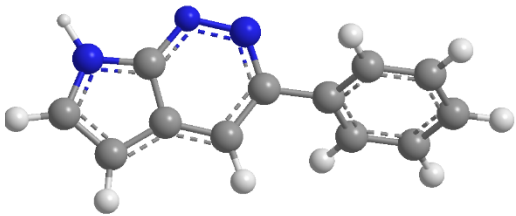
Fonte: Autoria própria (2023)

5.5 DOCKING DA FRAGMENTOTECA ISÓSTERA

Os melhores fragmentos considerados promissores para a etapa de planejamento da quimioteca isóstera combinatória estão elencados no quadro 4:

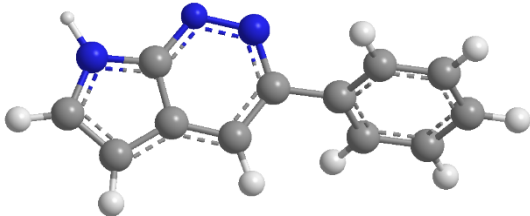
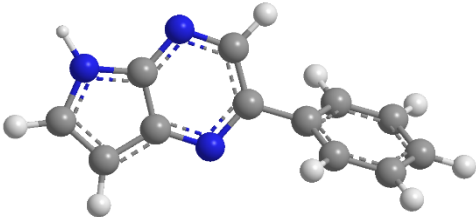
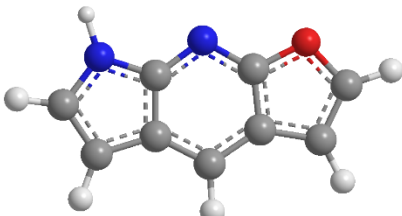
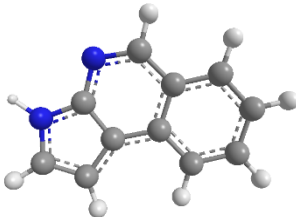
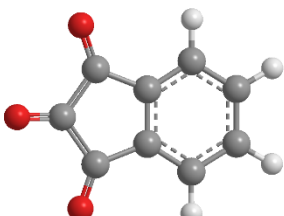
Quadro 4 - Fragmentos isósteros com valores médios de LE ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo}$ pesado⁻¹) melhores que o valor de corte (-0,50). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.

(continua)

Fragmento	Sub-bolso	LE	Estrutura
104FMMCS	D	-0,62	
8FMMCS		-0,61	
106FMMCS		-0,61	
108FMMCS		-0,58	
106FMMCS		-0,58	

Quadro 4 - Fragmentos isósteros com valores médios de LE ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo pesado}^{-1}$) melhores que o valor de corte (-0,50). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.

(continuação)

Fragmento	Sub-bolso	LE	Estrutura
17FMMCS	D	-0,57	
19FMMCS		-0,57	
118FMMCS		-0,57	
104FMMCS	L	-0,61	
8FMMCS		-0,60	

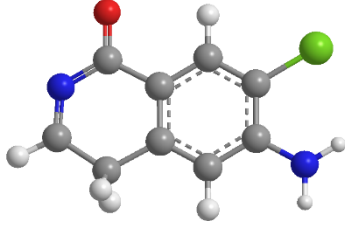
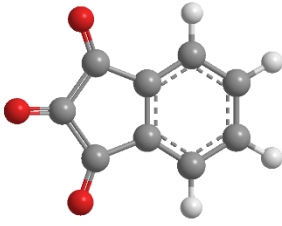
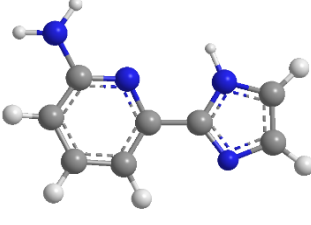
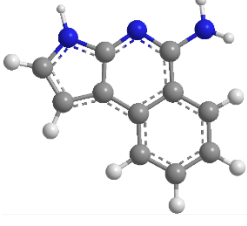
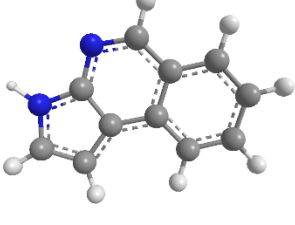
Quadro 4 - Fragmentos isósteros com valores médios de LE ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo pesado}^{-1}$) melhores que o valor de corte (-0,50). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.

(continuação)

Fragmento	Sub-bolso	LE	Estrutura
103FMMCS	L	-0,59	
101FMMCS		-0,58	
9FMMCS		-0,57	
17FMMCS		-0,57	
53FMMCS		-0,57	

Quadro 4 - Fragmentos isósteros com valores médios de LE ($\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átomo pesado}^{-1}$) melhores que o valor de corte (-0,50). Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.

(conclusão)

Fragmento	Sub-bolso	LE	Estrutura
88FMMCS	L	-0,57	
8FMMCS	A	-0,56	
		-0,56	
103FMMCS		-0,56	
104FMMCS		-0,56	

Fonte: Autoria própria (2023)

A escolha destes fragmentos se baseou nos valores de LE iguais ou melhores que o valor de corte estabelecido com base na fragmentoteca padrão (-0,50), nos modos de ligação com dois ou mais pontos de reconhecimento, e nas possibilidades

vetoriais mais viáveis para expansão molecular. Numa rotina de FBLD, geralmente fragmentos com LEs bem superiores a -0,30 são perseguidos (ou literalmente “caçados”) com grande obstinação e devem ser priorizados quando encontrados, pois à medida em que ocorre o crescimento molecular, usando-os como blocos de construção química, é comum haver redução na LE das novas moléculas expandidas. Logo, opta-se por partir de fragmentos altamente eficientes, pois, mesmo havendo esta redução esperada na LE a cada etapa de crescimento estrutural, as moléculas originadas ainda podem apresentar valores de LE melhores que o mínimo preconizado pela literatura (-0,30), e, principalmente, manter boa afinidade pelo alvo molecular em questão.

Além disso, é interessante notar outra tendência estrutural marcante, em cada um destes 3 subgrupos, referente à presença majoritária de fragmentos que contêm o núcleo 7-AI (1CFMMCS) em sua estrutura, ou outro bem similar a ele. Nesta coleção contendo 20 fragmentos isósteros no total (somatório dos 3 sub-bolsos), simplesmente 14 deles (70%) podem ser considerados derivados ou análogos estruturais do 7-AI, evidenciando a preferência “histórica” que as cinases possuem por pequenas moléculas com atributos estruturais semelhantes a este núcleo pirrolopiridínico. Honestamente, esta predileção das cinases pelo 7-AI, era um fato desconhecido até estes indícios começarem a aparecer no curso dos fluxos de trabalho de FBVS. Na curiosidade pela busca de maiores informações sobre esta classe química, pôde-se encontrar as razões moleculares para estes achados, as quais foram amplamente investigadas na literatura e motivaram a redação de duas mini-revisões sobre o assunto. De fato, estes resultados de *docking* encorajaram a publicação de ambos os artigos (vide Apêndices N e O), (81, 83) cujo escopo impulsiona a divulgação de conhecimento na área, bem como influencia novos projetos de inibidores de cinases usando o 7-AI como ponto de partida químico. Recomenda-se imensamente a leitura de ambos trabalhos, bem como o constante no Apêndice M, (29) que apresenta o primeiro artigo publicado referente a esta Tese, e integra a base conceitual de bioisosterismo explorado nesta pesquisa.

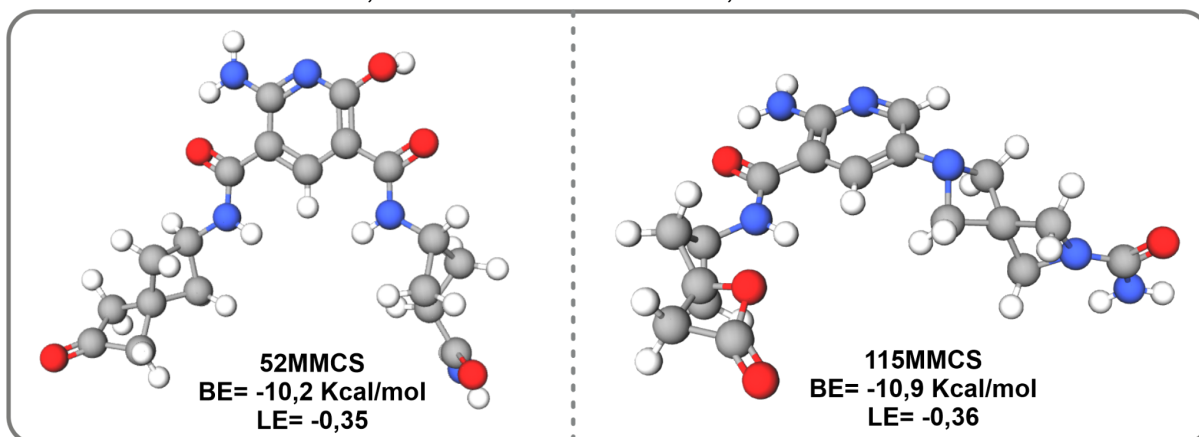
5.6 DOCKING DA QUIMIOTECA ISÓSTERA

Inicialmente, os ensaios de *docking* envolveram ligantes que foram desenhados explorando a abordagem do análogo ativo (*Analog-Based Lead Design*,

ABLD), na qual vários isómeros do inibidor AFU601, e de outros padrões, foram planejados com auxílio do *MB-Isoster* e das plataformas *SwissBioisostere* / *SwissSimilarity*.

No geral, os valores de LE apresentados pela maioria dos compostos se situam entre -0,30 e -0,35. Portanto, a maioria dos ligantes pode ser considerada minimamente aceitável, embora não supere a molécula adotada como padrão para comparação (AFU601). Aproximadamente 10% dos ligantes planejados apresentaram LE igual ou superior a -0,35, e isto representa uma taxa de acerto razoável. Observou-se que a maioria destes ligantes mais potentes apresentavam o núcleo central planar ou aromático, e o *shape* molecular da conformação mais exergônica se assemelhava ao contorno superficial delineado pela conformação ativa do padrão AFU601, como pode ser exemplificado pelos ligantes 52MMCS e 115MMCS na figura 25.

Figura 25 - Ligantes 52MMCS e 115MMCS planejados com abordagem ABLD auxiliada pelo software *MB-Isoster* e *SwisBioisostere* / *SwissSimilarity*. Nas estruturas moleculares os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de F em verde, átomos de S em amarelo, átomos de H em branco, e átomos de C em cinza.



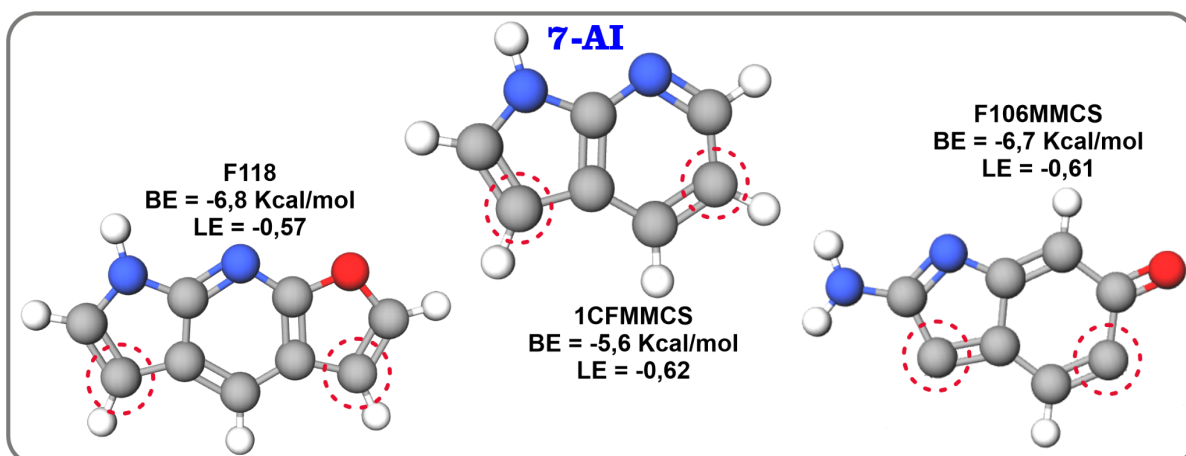
Fonte: Autoria própria (2023)

Ambas moléculas apresentam o anel piridínico central, que se prolonga em outros dois *pseudo*-anéis de 6 membros a ele adjacentes. Estes dois anéis intramoleculares são formados e estabilizados por fortes interações de H que se estabelecem entre o átomo de O das carbonilas (C=O) e os dois grupos doadores de H nas posições *orto* (NH₂, de um lado, e OH, do outro). Os grupos laterais inseridos nas posições *meta*, conferem o formato espacial característico do padrão AFU601, delineando um *shape* molecular em formato de “U”.

Em contrapartida, os ligantes com LE entre -0,30 e -0,35 apresentaram núcleos com *shape* 3D na região central da molécula e seus modos de ligação, bem como suas melhores conformações, eram consideravelmente distintos aos do AFU601, podendo ser estes os fatores determinantes para perda de afinidade *in silico*. Apesar de os ligantes da parte inicial do projeto, planejados *via* ABLD, não apresentarem valores excelentes de LE, eles revelaram *insights* estruturais importantes para a concepção de novas moléculas. Entretanto, percebeu-se que outra abordagem de *design* molecular seria necessária para inventar ligantes com LE que superasse o padrão com uma larga vantagem, optando-se por agregar a FBLD *in silico* e princípios de química combinatória computacional neste fluxo de trabalho.

No geral, a maioria dos ligantes (c.a. 88%) desenhados *via* FBLD, usando os melhores fragmentos-padrão e isósteros (tabelas 3), apresentaram LE igual ou superior a -0,35. A parcela daqueles que superaram -0,40 de LE se aproximou de 34%. Os melhores ligantes apresentaram na região central da molécula o núcleo 7-AI (fragmento 1CFMMCS), ou núcleos análogos a ele, como o 118FMMCS e o 106FMMCS, figura 26.

Figura 26 - Fragmentos centrais mais frequentes nas estruturas moleculares dos ligantes mais promissores nesta etapa do trabalho. Em destaque, nos círculos vermelhos tracejados, as posições vetoriais para expansão molecular com a inserção dos grupos substituintes laterais.



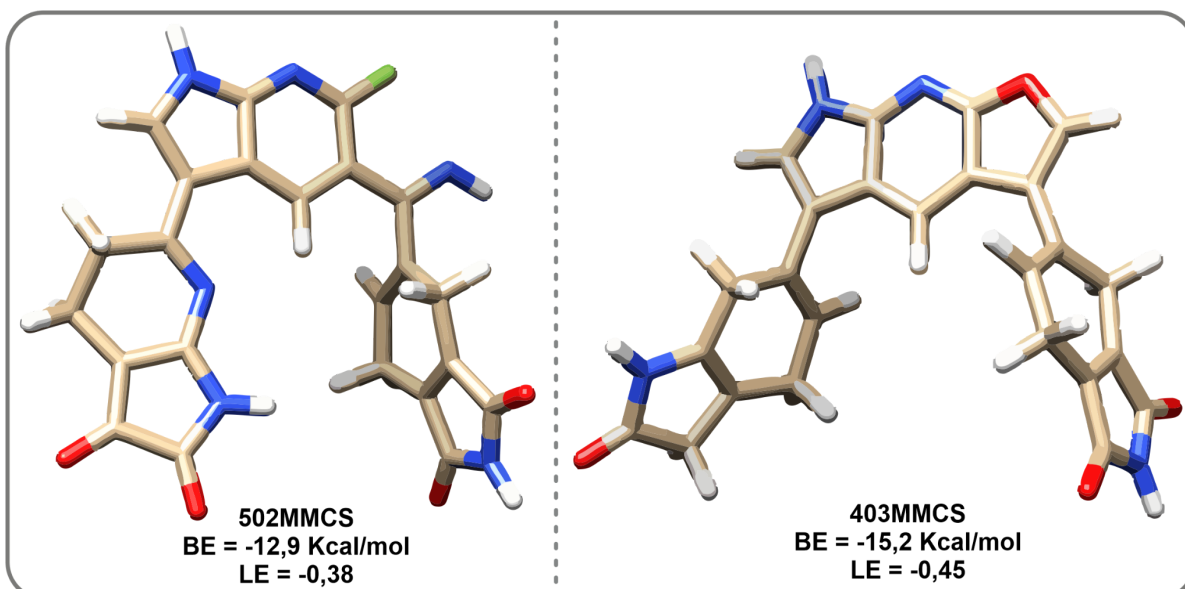
Fonte: Autoria própria (2023)

Estes fragmentos centrais atuaram como verdadeiras “âncoras” ao se ligarem aos resíduos da região de dobradiça através de interações de H bidentadas intensas, mimetizando o modo de ligação da adenina quando a

molécula de ATP (substrato natural) se aloja no sítio catalítico da PKCi. Além destes fragmentos centrais, os ligantes mais promissores apresentaram grupos substituintes laterais formados pelos fragmentos isósteros 118FMMCS e 105FMMCS, além dos fragmentos padrão 20CFMMCS, 72CFMMCS, 45CFMMCS e 71CFMMCS.

Os resultados alcançados até então, baseados em múltiplas abordagens de planejamento molecular, demonstraram o quão salutar pode ser para o ecossistema da Química Medicinal o emprego associativo e integrado das melhores ferramentas disponíveis para a solução de questões-problema conexas. Ligantes com BE superior a -12 Kcal/mol foram obtidos, figura 27, correspondendo a uma LE igual a -0,45 para o composto 403MMCS. Pela relação de Gibbs (vide GLOSSÁRIO), ao converter estes valores de BE em métricas de afinidade (K_i ou IC_{50}), obtém-se valores de concentração inibitória com dígitos nanomolares (para o ligante 502MMCS) e picomolares (para o ligante 403MMCS), encorajando fortemente sua síntese química para testes biológicos corroborativos.

Figura 27 - Ligantes promissores derivados do 7-AI desenhados via FBLD e Química Combinatória Computacional em pequena escala. À esquerda, a molécula 502MMCS com BE = -12,9 Kcal/mol e LE = -0,38. À direita, a molécula 403MMCS com BE = -15,2 Kcal/mol e LE = -0,45.



Fonte: Autoria própria (2023)

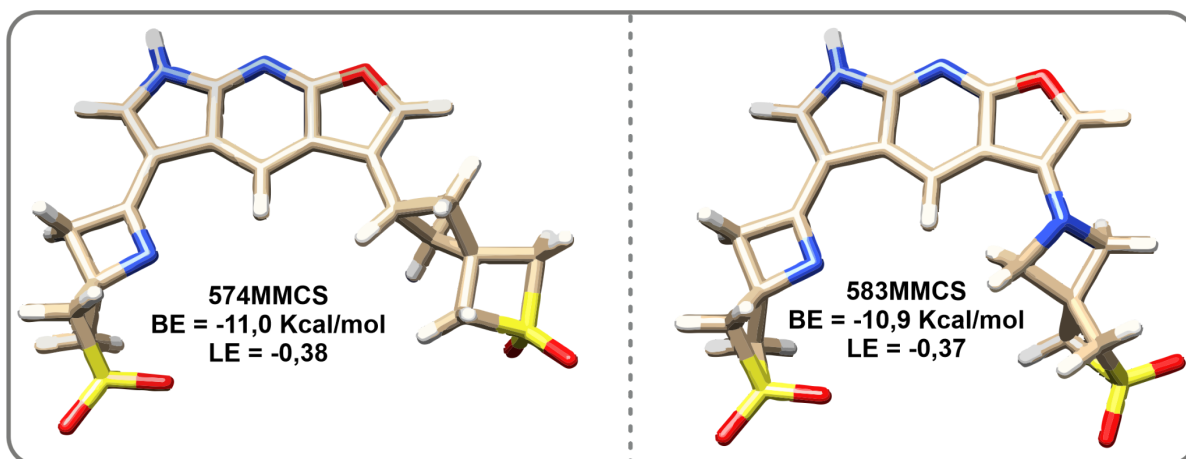
5.7 ENSAIOS ADMET IN SILICO

Dos resultados de *docking* da etapa anterior emergiram três séries de compostos com valores notáveis de LE, contendo os três fragmentos centrais da figura 15. Entretanto, o entusiasmo provocado por estes resultados animadores de afinidade *in silico* foi logo contido pelos primeiros ensaios preditivos do perfil ADMET. De fato, todas as moléculas consideradas promissoras até então apresentaram algumas propriedades PK ou violações de *druglikeness* que deveriam ser melhoradas. O principal composto, 403MMCS (BE de -15,2 kcal/mol e LE de -0,45; Apêndice A), apresentou, principalmente, o alerta de Brenk referente aos dois substituintes laterais (grupos ftalimida), e isto, de alguma forma, lançou uma cortina de hesitação sobre os avanços que haviam sido obtidos na etapa anterior, dada a toxicidade deste grupo funcional. (251, 252) Entretanto, considerando um cenário em que tal inibidor seja indicado para farmacoterapia oncológica, e que a ftalimida já está presente na estrutura de fármacos antitumorais aprovados (a exemplo da midostaurina, estaurosporina, entre outros), estes alertas não seriam fortes o suficiente para desestimular trabalhos futuros de síntese química e testes biológicos deste composto. Além disso, os resultados extraídos das plataformas do *PASS* e *ProTox-II*, reafirmam as expectativas depositadas nesta molécula (Apêndices B e C). No *PASS*, a segunda melhor atividade biológica estimada para ela (48,7% de chance) é justamente como um potencial fármaco antitumoral da classe dos inibidores de proteínas cinase (*Protein Kinase Inhibitors*, PKIs). Já no *ProTox-II*, esta molécula apresentou boas chances de não ser tóxico acima de níveis médios toleráveis em diversos modelos biológicos, embora sua probabilidade de ser hepatotóxico e carcinogênico se aproximou de 50%, o que desperta uma certa suspeita sobre sua segurança, caso seja testado na clínica futuramente.

Visando melhorar estes parâmetros, bem como eliminar o alerta de Brenk, uma nova série química foi desenhada com base em grupos isósteros em relação à ftalimida. Estes esforços foram bem-sucedidos, embora a LE tenha sido reduzida, e frutificaram nos ligantes 574MMCS (BE = -11,0 kcal/mol e LE = -0,38; Apêndices D e E) e 583MMCS (BE = -10,9 kcal/mol e LE = -0,37; Apêndices F e G), dois dos melhores compostos desenhados nesta etapa, figura 28. Estes

resultados demonstram que o binômio risco / benefício realmente é dilemático em projetos visando novos candidatos a fármacos, e, quase sempre, perdas na afinidade de ligação são justificadas no processo de otimização estrutural para aprimoramento de seu perfil PK.

Figura 28 - Dois ligantes promissores, 574MMCS e 583MMCS, desenhados após tentativa bem-sucedida de otimização estrutural do ligante 403MMCS visando melhorias no seu perfil ADMET *in silico*.



Fonte: Autoria própria (2023)

5.8 ENSAIOS DE SELETIVIDADE IN SILICO

No total, 15 ligantes mais promissores, ver Apêndice H, foram testados contra um painel de 14 cinases, quadro 5:

Quadro 5 - Energias de ligação (BEs) obtidas de ensaios para simulação molecular de docking através do *software AutoDock Vina*, visando avaliar a afinidade de 15 ligantes frente a múltiplas cinases para inferir sobre sua seletividade *in silico* pela PKCi.

(continua)

Ligantes	PKCi	PKCtheta	PKCeta	PKCalpha	ROCK1	CDK2
AFU601	-10,9	-10,2	-10,5	-10,4	-10,8	-9,2
403MMCS	-15,2	-11,2	-11,5	-12,4	-11,8	-12,2
205MMCS	-11,8	-11,7	-11,0	-12,1	-12,5	-11,2
106MMCS	-12,7	-12,2	-11,6	-12,3	-11,9	-12,0
223MMCS	-13,3	-12,7	-12,4	-12,6	-12,4	-11,9
493MMCS	-15,1	-11,4	-11,2	-12,7	-11,4	-11,7

Quadro 5 - Energias de ligação (BEs) obtidas de ensaios para simulação molecular de docking através do *software AutoDock Vina*, visando avaliar a afinidade de 15 ligantes frente a múltiplas cinases para inferir sobre sua seletividade *in silico* pela PKCi.

(conclusão)

Ligantes	PKCi	PKCtheta	PKCeta	PKCalpha	ROCK1	CDK2
394MMCS	-11,9	-11,5	-11,3	-12,0	-12,2	-11,9
412MMCS	-12,1	-11,7	-11,6	-11,9	-11,3	-11,7
376MMCS	-12,2	-11,6	-11,3	-12,0	-11,8	-12,0
439MMCS	-13,6	-12,4	-12,2	-11,7	-11,8	-11,0
502MMCS	-13,9	-11,8	-11,5	-11,9	-11,2	-11,4
475MMCS	-13,7	-11,9	-12,3	-12,8	-11,4	-11,1
520MMCS	-14,0	-11,9	-11,7	-12,0	-11,9	-11,8
538MMCS	-14,0	-10,9	-11,9	-11,5	-12,3	-11,5
556MMCS	-15,2	-11,1	-11,8	-12,1	-11,5	-11,7

Fonte: Autoria própria (2023)

Considerando o subgrupo das cinases pertencentes à PKCi, os resultados de BE, por serem próximos, fornecem indícios de que a maioria destas moléculas (excetuando 403MMCS, 493MMCS e 520MMCS) podem atuar nos outros membros da família, embora os valores de energia de ligação sejam menos exergônicos. Esta suposta falta de seletividade pode implicar em ineficácia clínica, caso sejam testados futuramente, haja visto o papel bioquímico oposto exercido por PKCs no complexo contexto de certas condições fisiopatológicas, a exemplo da vários tipos de neoplasias. Além disso, dentro do grupo AGC, alguns ligantes mostraram melhor afinidade com ROCK1 (205MMCS e 394MMCS) em detrimento da PKCi. Isto, pode significar que um outro alvo cinase importante também pode ser explorado, já que ROCK1 está envolvida, com protagonismo, em diversos tipos de disfunções humanas. (253) Para as cinases de outros grupos do quinoma humano, alguns ligantes (106MMCS e 376MMCS) exibiram afinidade equiparável com CDK2, uma cinase crucial na regulação do ciclo celular eucariótico que exhibe estreita relação com diversos tipos de neoplasias. (254) Diante deste espectro de ação farmacológica, aparentemente amplo, dos compostos desenhados neste fluxo de trabalho, cabe fazer uma importante consideração, pautada na literatura, sem transparecer que seja uma mera justificativa para estes resultados.

De maneira pragmática, o paradigma “*one drug-one target*” aparenta ser utópico se analisado realisticamente, pois, por mais racional que seja o planejamento de uma dada molécula como ligante altamente específico de um único alvo, não existe esta especificidade absoluta num organismo vivo, onde uma gama de alvos moleculares acessíveis coexistem. Mesmo em níveis ínfimos ou imperceptíveis, a promiscuidade farmacológica provavelmente existirá para qualquer substância endógena ou exógena, com ação medicamentosa ou não. (255)

Estudos recentes demonstraram que fármacos de alvo único podem atuar em, no mínimo, 6 alvos inesperados. Em alguns casos, esta promiscuidade pode ser ainda mais ampla, com o fármaco podendo interagir com até 28 alvos distintos daquele originalmente almejado. Estes efeitos secundários (ou “fora do alvo”), também são designados como efeitos pleiotrópicos, e esta promiscuidade farmacodinâmica foi chamada de polifarmacologia. Exemplos bem comuns na literatura são a aspirina e os representantes da classe das estatinas. (256)

A polifarmacologia, antigamente, era tida como um atributo altamente indesejável e possuía conotação tecnicamente negativa. Entretanto, houve uma inversão neste pensamento devido à demanda imposta pela descoberta das causas multifatoriais de doenças importantes, como as disfunções neurodegenerativas, asma, tumores, entre outras. De fato, nestes casos, a promiscuidade farmacológica é proposital e passa a ser desejável (paradigma *one drug-multiple targets*), embora deva ser minimamente modulável. Ou seja, pode ser bom que o fármaco atue em múltiplos alvos, em certos contextos, desde que tais alvos tenham sido “mirados” previamente, e se relacionem estreitamente à fisiopatologia, para que sua modulação acarrete efeitos benéficos mais expressivos que os possíveis efeitos tóxicos. (257)

Portanto, estes resultados de seletividade *in silico* podem ser vistos de forma antagônica quando observados de perspectivas diferentes e, particularmente, eles aparentam ser mais proveitosos que frustrantes, já que os compostos 403MMCS, 493MMCS e 520MMCS mantiveram sua predileção pela PKCi, na razão de 1/1000 (considerando que cada unidade de BE, em kcal/mol, equivale, aproximadamente, a uma ordem de grandeza a menos na concentração inibitória). Ainda assim, para aqueles ligantes considerados promíscuos, sempre

haverá um grupo de céticos colecionando supostos fracassos pelo caminho, mesmo sabendo que podem estar diante de um novo horizonte de oportunidades a ser explorado. Por fim, cabe acrescentar que os *links* dispostos a seguir permitirão acesso à quimioteca *MolecBank* (originada nesta Tese), além de informações e materiais suplementares, bem como novos projetos e publicações oriundos desta pesquisa: 1) *MolecBank*; 2) *Thesis_Sl*.

5.9 ENSAIOS DE ACESSIBILIDADE E VIABILIDADE SINTÉTICA IN SILICO

O plano de síntese química foi traçado para os principais ligantes, incluindo o composto-líder 403MMCS (ver Apêndices I-L), e as principais informações são apresentadas no quadro 6 a seguir:

Quadro 6 - Resultados de viabilidade sintética in silico obtidos na plataforma do *Scifinder* para quatro moléculas inéditas desenhadas neste trabalho através da abordagem FBLD.

Composto	Etapas reacionais	Rendimento (%)	Custo (USD/100g)
52MMCS	8	15	281.306,17
502MMCS	6	37	5.969,60
583MMCS	5	37	6.128,69
403MMCS	5	61	3.764,52

Fonte: Autoria própria (2023)

A plataforma do *Scifinder* além de ser um dos bancos de moléculas mais prestigiados no meio científico, também fornece rotas completas de síntese química para compostos de interesse do usuário, explanando os tipos de reações químicas e condições reacionais envolvidas, bem como o uso de catalisadores, quando necessários para melhor rendimento reacional. Além disso, os procedimentos reacionais atrelados a cada etapa sintética são detalhados com clareza, estimando até o número de fornecedores dos precursores sintéticos listados e o custo final (em *USD*, dólares americanos) de cada 100 gramas de composto puro produzido.

No geral, estes compostos podem ser considerados acessíveis

sinteticamente, ou seja, na prática, suas amostras físicas podem ser relativamente fáceis de serem obtidas em quantidade e pureza aceitáveis num laboratório acadêmico ou farmoquímico. Entretanto, quando se avalia o quesito viabilidade, estas quatro moléculas ilustram cenários bem díspares. Por um lado, o composto 52MMCS apresentou o menor rendimento (15%), envolve o maior número de etapas reacionais (8) e requer o maior investimento financeiro (\$ 281.306,17 / 100g), sendo, portanto, o menos viável do grupo. Por outro lado, o composto-líder 403MMCS pode ser produzido com rendimentos satisfatórios em torno de 60%, possui o menor número de etapas reacionais (5) e oferece o plano sintético menos oneroso (\$ 3.764,52 / 100g), sendo considerado, merecidamente, o mais acessível e viável para ser produzido.

6 CONCLUSÕES

Uma busca bibliográfica direcionada permitiu a escolha de um alvo cinase com requisitos desejáveis para todo alvo tratável, sob as perspectivas da Química Medicinal e da Farmacoterapia. Afinal, a PKCi possui papel bioquímico crucial em várias condições fisiopatológicas, possui boa drogabilidade, possui várias estruturas 3D depositadas, bem como demanda clínica, ainda não atendida, por opções farmacológicas específicas, embora já possua alguns candidatos clínicos sob investigação que prometem esta especificidade de ação. De maneira interessante, as quatro estruturas cristalinas escolhidas para esta enzima ilustram muito bem a dinamicidade conformacional típica de alvos moleculares da superfamília das cinases, que, sugestivamente, carrega no próprio nome o prefixo “*cin*”, remetendo à riqueza estrutural oriunda de suas cadeias peptídicas e seus múltiplos movimentos (cinéticas) espaciais. Neste cenário topológico heterogêneo oferecido pelo alvo, demonstrou-se, neste trabalho *in silico*, que mudanças conformacionais discretas do sítio de ligação do ATP podem resultar em complexos P-L com perfil energético e arranjos 3Ds diversificados, possibilitando a adoção de diferentes abordagens de *design* molecular visando novos inibidores. Aliás, a literatura conexas a este alvo biológico apresenta um número considerável de trabalhos relatando compostos com diversidade estrutural sob investigação pré-clínica ou clínica, facilitando a criação de uma quimioteca inicial enriquecida com padrões cristalográficos (como o AFU601 e ATP), padrões clínicos (como o próprio AFU601, a midostaurina, a estaurosporina, entre outros), e padrões estruturais (como derivados do 7-AI, ATP miméticos, adenosina miméticos, entre outros). Neste sentido, as bases de dados químicos e aquelas dedicadas, especificamente, às cinases, cujo crescimento vertiginoso é notável nos últimos anos, também foram de suma importância para a amplitude experimental alcançada pelos ensaios de *docking* deste fluxo de trabalho, possibilitando confrontar uma fração estratégica (embora ínfima) do imenso espaço químico, contra um bom alvo terapêutico no espaço biológico.

Sob o prisma da FBLD, aliada estrategicamente a ferramentas computacionais para fragmentação virtual de moléculas e à intuição química do propositor deste projeto, foi possível criar, satisfatoriamente, uma quimioteca

enriquecida com fragmentos oriundos dos padrões moleculares escolhidos previamente. Essa fragmentoteca padrão conseguiu herdar as principais características farmacofóricas de suas moléculas-mãe e originou novos blocos de construção química selecionados por meio da FBVS.

O *software MB-Isoster* e as plataformas *SwissBioisostere / SwissSimilarity* foram imprescindíveis para expansão do acervo de fragmentos por meio de princípios do Bioisosterismo e da Similaridade Estrutural aplicados aos fragmentos padrão. Empregando essas valiosas ferramentas computacionais, foi possível garimpar fragmentos com alta similaridade 2D / 3D em relação a seus fragmentos-pai. Uma nova etapa de FBVS direcionada a 3 sub-bolsos distintos do sítio ortostérico da PKCi permitiu selecionar os melhores fragmentos para cada um desses 3 locais de ligação, possibilitando otimizar o processo de reconhecimento molecular de maneira setorizada e conforme a complementaridade requerida por seus *hotspots* específicos.

A abordagem ABLD foi explorada na parte inicial do projeto e gerou ligantes isósteros com afinidade razoável e equiparável à do padrão AFU601. Apesar de ter sido alcançada uma taxa de acerto modesta nesta etapa, sem ela seria praticamente impossível adquirir os *insights* estruturais *sine qua non* para as etapas subsequentes de *design* molecular, inspirando a criação da quimioteca combinatória, por meio da técnica *fragment linking*, de novas moléculas expandidas, preservando o grupo central aromático, com baixo índice PBF, e mantendo o *shape* 3D da superfície molecular em forma de “U”. Além disso, por meio de uma análise qualitativa de REA e de novas consultas à literatura científica, foi possível perceber que o núcleo 7-AI se destacou como o fragmento hegemônico, com presença marcante e indispensável na estrutura química das moléculas mais promissoras.

Os ensaios de ADMET *in silico* permitiram traçar o perfil PK de vários compostos inéditos e, sobremaneira, eleger aqueles que se tornaram os principais protótipos moleculares neste contexto. A realização de ensaios de *docking* para inferir sobre a seletividade destes ligantes pela PKCi frente a 14 cinases com diferentes níveis de proximidade filogenética, sugeriu certa promiscuidade farmacológica para a maioria dos compostos, excetuando as moléculas 403MMCS, 493MMCS e 520MMCS. Os resultados de acessibilidade e viabilidade

sintética demonstraram que, em geral, estes compostos inéditos são sinteticamente acessíveis. Entretanto, eles apresentaram diferenças consideráveis no quesito viabilidade, sendo a molécula 403MMCS prevista como a mais viável. De uma perspectiva holística dos resultados alcançados neste projeto, sopesando todo o dossiê de propriedades previstas (PD, PK, seletividade e viabilidade sintética), é possível corroborar, ao menos no ambiente computacional, a molécula 403MMCS como um composto-líder quase irrefutável deste fluxo de trabalho. Esta molécula, quimicamente simples, faz jus a este *status* por ter servido como prova de conceito para um protocolo inovador de FBLD *in silico*, despertando grande curiosidade sobre como será seu desempenho quando testado em modelos biológicos reais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por fontes fidedignas da literatura científica em bases bibliográficas virtuais é indispensável para a disseminação e geração de conhecimento na atual era da informação científica praticamente em tempo real. Neste projeto de Tese, quase todas as referências foram encontradas e consultadas eletronicamente. Foi mencionado “quase todas”, porque a outra parcela de referências é formada por aqueles livros “canônicos” inseparáveis e inerentes à própria formação acadêmica ou à área de pesquisa, como Físico-Química, Química Medicinal, e, agora, Bioinformática. Afinal, mesmo imerso nesta esfera tecnológica inescapável, o gesto de se assentar no fundo de uma biblioteca, rodeado por uma pilha de livros, jamais deve ser abandonado e esteve presente durante esta jornada, embora, honestamente, não tenha sido recorrente. De qualquer forma, estes livros-texto também, em sua grande maioria, já se encontram disponíveis na *web* (“*www*”), podendo ser acessados com poucos “*clicks*” ou “*touches*”, sugerindo que o “fazer ciência” depende umbilicalmente de computadores ou dispositivos móveis, desde a formulação das primeiras hipóteses até a divulgação dos resultados. Sendo assim, é sensato admitir, portanto, que o impacto causado pelas bases de dados científicos, veiculados por mídias eletrônicas ou digitais, é amplamente benéfico na geração de recursos humanos, e sem essas fontes o presente projeto de doutorado, certamente, nem concebido seria.

Através da FBLD *in silico* e baseando-se nos valores de LE dos compostos planejados, considerou-se que a taxa de acerto obtida foi de 34%. Deliberadamente, todas as moléculas inéditas, sem exceção, ficarão disponíveis publicamente na quimioteca doméstica a ser estabelecida, em breve, no sítio eletrônico do MolMod-CS e no ambiente do *software MB-Isoster*. A divulgação imediata destes achados pode encorajar outros grupos de pesquisa na área e acelerar a síntese química e triagem biológica destas novas entidades moleculares (NEMs). O despojamento relegado a esta plausível possibilidade de propriedade intelectual está em acordo com uma “proposta-mor” e é reflexo de uma constatação recente de que, pode ser sempre mais “rentável” para a saúde coletiva se as grandes corporações, as iniciativas públicas e os cientistas imersos no ecossistema da inovação farmacêutica assumirem uma postura mais

cooperativa e “voluntariada” à solução de emergências sanitárias globais, focando, principalmente, na manutenção do bem-estar da humanidade, deixando em segundo plano as cifras vultosas que podem ser obtidas nestes contextos. Afinal, no último cenário crítico mundial, as cepas intrépidas do vírus SARS-CoV-2 mostrou, com sua face mais atroz, que a humanidade é apenas uma espécie, contra uma verdadeira infantaria funesta e desconhecida de flagelos que, de tempos em tempos, aparecem para tentar dizimá-la.

Além disso, demonstrou-se, neste trabalho *in silico*, que é plenamente possível “desenhar primeiro, fazer depois” na Química Medicinal praticada sob a redoma de uma atmosfera acadêmica de um laboratório computacional modesto, e sem recursos exorbitantes. Baseando-se no paradigma recente da FBLD, empregado de forma integrada a paradigmas tradicionais, foi possível arquitetar e otimizar novas moléculas, estruturalmente modestas, como candidatas a potenciais inibidores da PKCi. Estes compostos inovadores são derivados do 7-AI, o qual, simplesmente, é um dos fragmentos moleculares mais versáteis e privilegiados no universo das cinases. Admitindo que o protocolo de FBLD *in silico* praticado neste contexto pode ser “customizável” e mostrou-se bem-sucedido para o alvo biológico em questão, torna-se impossível silenciar a seguinte indagação:

Por que não explorá-lo em outros projetos visando novos alvos moleculares desafiadores?

REFERÊNCIAS

- 1 SADYBEKOV, A. V.; KATRITCH, V. Computational approaches streamlining drug discovery. **Nature**, v. 616, n. 7958, p. 673–685, 2023.
- 2 DOYTCHINOVA, I. Drug Design - past, present, future. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 5, p. 1496, 2022.
- 3 BASSANI, D.; MORO, S. Past, present, and future perspectives on computer-aided drug design methodologies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 9, p. 3906, 2023.
- 4 OU-YANG, S.-S. et al. Computational drug discovery. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 9, p. 1131–1140, 2012.
- 5 NASCIMENTO, I. J. DOS S.; DE AQUINO, T. M.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F. The New Era of drug discovery: The power of computer-aided drug design (CADD). **Letters in drug design & discovery**, v. 19, n. 11, p. 951–955, 2022.
- 6 MERVIN, L. H. et al. Uncertainty quantification in drug design. **Drug discovery today**, v. 26, n. 2, p. 474–489, 2021.
- 7 MAKHOBA, X. H. et al. Potential impact of the multi-target drug approach in the treatment of some complex diseases. **Drug design, development and therapy**, v. 14, p. 3235–3249, 2020.
- 8 KABIR, A.; MUTH, A. Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 176, n. 106055, p. 106055, 2022.
- 9 ALIAGAS, I. et al. Sustainable practices in medicinal chemistry part 2: Green by design: Miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 14, p. 5955–5968, 2017.
- 10 WU, G. et al. Overview of recent strategic advances in medicinal chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 62, n. 21, p. 9375–9414, 2019.
- 11 PAMMOLLI, F.; MAGAZZINI, L.; RICCABONI, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 6, p. 428–438, 2011.
- 12 ADASME, M. F. et al. Structure-based drug repositioning: Potential and limits. **Seminars in cancer biology**, v. 68, p. 192–198, 2021.
- 13 MULLARD, A. Fragment-based screening sees the light. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 19, n. 11, p. 742–743, 2020.
- 14 FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894.

- 15 **The Nobel Prize in Chemistry 1902**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1902/summary/>>. Acesso em: 13 dec. 2023.
- 16 KOSHLAND, D. E., Jr. The key–lock theory and the induced fit theory. **Angewandte Chemie. International edition in English**, v. 33, n. 23–24, p. 2375–2378, 1995.
- 17 TALEVI, A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, 2015.
- 18 STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473–480, 2008.
- 19 **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/ehrlich/facts/>>. Acesso em: 13 dec. 2023.
- 20 KAUFMANN, S. H. E. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 373–373, 2008.
- 21 BARREIRO, E. J. Chapter 1. Privileged scaffolds in medicinal chemistry: An introduction. In: **Drug Discovery**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. p. 1–15.
- 22 MARSDEN, C. A. Dopamine: the rewarding years. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. S1, 2006.
- 23 LIMA, L. M. et al. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European journal of medicinal chemistry**, v. 208, n. 112829, p. 112829, 2020.
- 24 **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1945**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/facts/>>. Acesso em: 13 dec. 2023.
- 25 THOMPSON, D. C.; COPELAND, S. M. Serendipity in research and development: The promise of putting into place patterns for paying attention. **Drug discovery today**, v. 28, n. 8, p. 103648, 2023.
- 26 BAN, T. A. The role of serendipity in drug discovery. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 335–344, 2006.
- 27 DANGI, M. et al. Growing preferences towards analog-based drug discovery. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 1030–1045, 2021.
- 28 WERMUTH, C. G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. **Drug discovery today**, v. 11, n. 7–8, p. 348–354, 2006.

- 29 DA SILVEIRA, N. J. F. et al. Bioinformatics approach on bioisosterism softwares to be used in drug discovery and development. **Current bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 19–30, 2022.
- 30 ARONSON, J. K.; GREEN, A. R. Me-too pharmaceutical products: History, definitions, examples, and relevance to drug shortages and essential medicines lists. **British journal of clinical pharmacology**, v. 86, n. 11, p. 2114–2122, 2020.
- 31 HUANG, L. et al. Drug–drug similarity measure and its applications. **Briefings in bioinformatics**, 2020.
- 32 BAJORATH, J. Duality of activity cliffs in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 6, p. 517–520, 2019.
- 33 EL-AZIZ, M. A.; SOARES, G.; STOCKAND. Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 564, 2019.
- 34 SHARMA, V.; WAKODE, S.; KUMAR, H. Structure- and ligand-based drug design. In: **Chemoinformatics and Bioinformatics in the Pharmaceutical Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 27–53.
- 35 YOUNG, R. J. et al. The time and place for nature in drug discovery. **JACS Au**, v. 2, n. 11, p. 2400–2416, 2022.
- 36 RICO, D. F.; SAYANI, H. H.; FIELD, R. F. History of computers, electronic commerce and agile methods. In: **Advances in Computers**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 1–55.
- 37 JAEGER, H.; NOHEDA, B.; VAN DER WIEL, W. G. Toward a formal theory for computing machines made out of whatever physics offers. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 2023.
- 38 GETOV, V. Insights into the origins of the IEEE computer society and the invention of electronic digital computing. **Computer**, v. 54, n. 8, p. 13–18, 2021.
- 39 MAHONEY, M. S. The histories of computing(s). **Interdisciplinary science reviews: ISR**, v. 30, n. 2, p. 119–135, 2005.
- 40 TURKEL, W. J.; MUHAMMEDI, S.; START, M. B. Grounding digital history in the history of computing. **IEEE annals of the history of computing**, v. 36, n. 2, p. 72–75, 2014.
- 41 ALSHEHRI, A. S.; GANI, R.; YOU, F. Deep learning and knowledge-based methods for computer-aided molecular design—toward a unified approach: State-of-the-art and future directions. **Computers & chemical engineering**, v. 141, n. 107005, p. 107005, 2020.
- 42 COLLEN, M. F. The origins of informatics. **Journal of the American Medical Informatics Association: JAMIA**, v. 1, n. 2, p. 91–107, 1994.

- 43 PEARSON, E. R. Dorothy Hodgkin Lecture 2021: Drugs, genes and diabetes. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 38, n. 12, 2021.
- 44 HAGEN, J. B. The origins of bioinformatics. **Nature reviews. Genetics**, v. 1, n. 3, p. 231–236, 2000.
- 45 JIAO, Z. et al. Review of recent developments of quantitative structure-property relationship models on fire and explosion-related properties. **Process safety and environmental protection : transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part B**, v. 129, p. 280–290, 2019.
- 46 SHARMA, S.; BHATIA, V. Recent trends in QSAR in modelling of drug-Protein and Protein-Protein Interactions. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 24, n. 7, p. 1031–1041, 2021.
- 47 GASTEIGER, J. Chemistry in times of artificial intelligence. **Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry**, v. 21, n. 20, p. 2233–2242, 2020.
- 48 CHONG, C.-Y.; KUMAR, S. P. Sensor networks: Evolution, opportunities, and challenges. **Proceedings of the IEEE. Institute of Electrical and Electronics Engineers**, v. 91, n. 8, p. 1247–1256, 2003.
- 49 **Empowering innovation & scientific discoveries**. Disponível em: <<https://www.cas.org/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 50 **Advancing Structural Science**. Disponível em: <<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 51 RCSB PROTEIN DATA BANK. **RCSB PDB: Homepage**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 52 POROIKOV, V. V. Computer-aided drug design: From discovery of novel pharmaceutical agents to systems pharmacology. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 216–227, 2020.
- 53 GERONIKAKI, A. et al. Computer-aided drug design: An overview. In: **Cheminformatics, QSAR and Machine Learning Applications for Novel Drug Development**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 39–68.
- 54 EYKE, N. S.; KOSCHER, B. A.; JENSEN, K. F. Toward machine learning-enhanced high-throughput experimentation. **Trends in chemistry**, v. 3, n. 2, p. 120–132, 2021.
- 55 BLAY, V. et al. High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. **Drug discovery today**, v. 25, n. 10, p. 1807–1821, 2020.
- 56 MARKEL, U. et al. Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution. **Chemical Society reviews**, v. 49, n. 1, p. 233–262, 2020.

- 57 SCHNEIDER, G. Automating drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 17, n. 2, p. 97–113, 2018.
- 58 GEYSEN, H. M.; MELOEN, R. H.; BARTELING, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 13, p. 3998–4002, 1984.
- 59 HOUGHTEN, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 15, p. 5131–5135, 1985.
- 60 **ZINC**. Disponível em: <<https://zinc.docking.org/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 61 **Enamine**. Disponível em: <<https://enamine.net/compound-collections/real-compounds/real-space-navigator>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 62 YANG, Z.-Y. et al. Frequent hitters: nuisance artifacts in high-throughput screening. **Drug discovery today**, v. 25, n. 4, p. 657–667, 2020.
- 63 MOINUL, M. et al. Recent trends in fragment-based anticancer drug design strategies against different targets: A mini-review. **Biochemical pharmacology**, v. 206, n. 115301, p. 115301, 2022.
- 64 JENCKS, W. P. On the attribution and additivity of binding energies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 7, p. 4046–4050, 1981.
- 65 KENNY, P. W. The nature of ligand efficiency. **Journal of cheminformatics**, v. 11, n. 1, 2019.
- 66 POLANSKI, J. et al. Scoring Ligand Efficiency: Potency, Ligand Efficiency and Product Ligand Efficiency within big data landscape. **Letters in drug design & discovery**, v. 16, n. 11, p. 1258–1263, 2019.
- 67 KIRSCH, P. et al. Concepts and core principles of fragment-based drug design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 23, p. 4309, 2019.
- 68 LI, Q.; KANG, C. Perspectives on fragment-based Drug Discovery: A strategy applicable to diverse targets. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 21, n. 13, p. 1099–1112, 2021.
- 69 CONGREVE, M. et al. A ‘Rule of Three’ for fragment-based lead discovery? **Drug discovery today**, v. 8, n. 19, p. 876–877, 2003.
- 70 JHOTI, H. et al. The “rule of three” for fragment-based drug discovery: where are we now? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 8, p. 644–644, 2013.

- 71 BIAN, Y.; XIE, X.-Q. Computational fragment-based drug design: Current trends, strategies, and applications. **The AAPS journal**, v. 20, n. 3, 2018.
- 72 ERLANSON, D. A. et al. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 15, n. 9, p. 605–619, 2016.
- 73 CARBERY, A. et al. Fragment libraries designed to be functionally diverse recover protein binding information more efficiently than standard structurally diverse libraries. **Journal of medicinal chemistry**, v. 65, n. 16, p. 11404–11413, 2022.
- 74 LI, Q. Application of fragment-based drug discovery to versatile targets. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, 2020.
- 75 BEDWELL, E. V. et al. Development of potent inhibitors by fragment-linking strategies. **Chemical biology & drug design**, v. 100, n. 4, p. 469–486, 2022.
- 76 BANCET, A. et al. Fragment linking strategies for structure-based drug design. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 20, p. 11420–11435, 2020.
- 77 IBRAHIM, P. et al. **Discovery and development of vemurafenib: First-in-class inhibitor of mutant BRAF for the treatment of cancer. Methods and Principles in Medicinal Chemistry** Wiley, , 18 dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9783527677252.ch04>>
- 78 BOLLAG, G. et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 11, p. 873–886, 2012.
- 79 LUKE, J. J.; HODI, F. S. Vemurafenib and BRAF inhibition: A new class of treatment for metastatic melanoma. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 9–14, 2012.
- 80 SHAW, H. M.; NATHAN, P. D. Vemurafenib in melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, v. 13, n. 5, p. 513–522, 2013.
- 81 SANTOS, L. M.; DA SILVEIRA, N. J. F. Fragment-based drug discovery successful contributions to current pharmacotherapeutic agents arsenal against aggressive cancers: A mini-review. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 23, n. 16, p. 1796–1810, 2023.
- 82 WALSH, L. et al. Fragment-to-lead medicinal chemistry publications in 2021. **Journal of medicinal chemistry**, v. 66, n. 2, p. 1137–1156, 2023.
- 83 MARCOS SANTOS, L.; DA SILVEIRA, N. J. F. Current fragment-to-lead approaches starting from the 7-azaindole: The pharmacological versatility of a privileged molecular fragment. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 23, n. 22, p. 2116–2130, 2023.
- 84 GIOIELLO, A. et al. The medicinal chemistry in the era of machines and automation: Recent advances in continuous flow technology. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 13, p. 6624–6647, 2020.

- 85 PERRETT, D. From 'protein' to the beginnings of clinical proteomics. **Proteomics. Clinical applications**, v. 1, n. 8, p. 720–738, 2007.
- 86 CAVAILLON, J.-M.; LEGOUT, S. Louis Pasteur: Between myth and reality. **Biomolecules**, v. 12, n. 4, p. 596, 2022.
- 87 **The Nobel Prize in Chemistry 1907**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/facts/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 88 **The Nobel Prize in Chemistry 1946**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/sumner/facts/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 89 LILJAS, A. Crystallography of the past and in the future. **Crystallography reviews**, v. 26, n. 2, p. 101–112, 2020.
- 90 **The Nobel Prize in Chemistry 1964**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1964/hodgkin/facts/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 91 HOWARD, J. A. K. Dorothy Hodgkin and her contributions to biochemistry. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 11, p. 891–896, 2003.
- 92 JASKOLSKI, M.; DAUTER, Z.; WLODAWER, A. A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 3985–4009, 2014.
- 93 **The Nobel Prize in Chemistry 1962**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1962/kendrew/facts/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 94 BROWN, K. L. Chemistry and enzymology of vitamin B12. **Chemical reviews**, v. 105, n. 6, p. 2075–2150, 2005.
- 95 BLUNDELL, T. et al. Insulin: The structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology by. In: **Advances in Protein Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 1972. p. 279–402.
- 96 BURLEY, S. K. et al. Protein Data Bank: A comprehensive review of 3D structure holdings and worldwide utilization by researchers, educators, and students. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1425, 2022.
- 97 BEHZADI, P.; GAJDÁCS, M. Worldwide Protein Data Bank (wwPDB): A virtual treasure for research in biotechnology. **European journal of microbiology & immunology**, v. 11, n. 4, p. 77–86, 2022.

- 98 KURISU, G.; BEKKER, G.-J.; NAKAGAWA, A. History of Protein Data Bank Japan: standing at the beginning of the age of structural genomics. **Biophysical reviews**, v. 14, n. 6, p. 1233–1238, 2022.
- 99 KURISU, G. Fifty years of Protein Data Bank in the Journal of Biochemistry. **The journal of biochemistry**, v. 171, n. 1, p. 3–11, 2022.
- 100 VARADI, M.; VELANKAR, S. The impact of AlphaFold Protein Structure Database on the fields of life sciences. **Proteomics**, v. 23, n. 17, 2023.
- 101 LI, Z.-L.; BUCK, M. Beyond history and “on a roll”: The list of the most well-studied human protein structures and overall trends in the protein data bank. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 30, n. 4, p. 745–760, 2021.
- 102 GOODSELL, D. S. et al. The AutoDock suite at 30. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 30, n. 1, p. 31–43, 2021.
- 103 GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. **Proteins**, v. 8, n. 3, p. 195–202, 1990.
- 104 GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: Applications of autodock. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 9, n. 1, p. 1–5, 1996.
- 105 MORRIS, G. M. et al. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 10, n. 4, p. 293–304, 1996.
- 106 MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
- 107 **Automated docking of flexible ligands to receptors**. Disponível em: <https://autodock.scripps.edu/wp-content/uploads/sites/56/2022/04/AutoDock3.0.5_UserGuide.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 108 MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking. et al [**Current protocols in bioinformatics**], v. 24, n. 1, 2008.
- 109 BITENCOURT-FERREIRA, G.; PINTRO, V. O.; DE AZEVEDO, W. F., Jr. Docking with AutoDock4. In: **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer New York, 2019. p. 125–148.
- 110 SOTRIFFER, C. Docking of covalent ligands: Challenges and approaches. **Molecular informatics**, v. 37, n. 9–10, 2018.
- 111 BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO JUNIOR, W. F. Electrostatic potential energy in protein-drug complexes. **Current medicinal chemistry**, v. 28, n. 24, p. 4954–4971, 2021.

- 112 SANTOS-MARTINS, D. et al. AutoDock4Zn: An improved AutoDock force field for small-molecule docking to zinc metalloproteins. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 8, p. 2371–2379, 2014.
- 113 TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.
- 114 RAVINDRANATH, P. A. et al. AutoDockFR: Advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. **PLoS computational biology**, v. 11, n. 12, p. e1004586, 2015.
- 115 SHARMA, K. et al. Peptide-based drug discovery: Current status and recent advances. **Drug discovery today**, v. 28, n. 2, p. 103464, 2023.
- 116 ZHANG, Y.; SANNER, M. F. *AutoDock CrankPep*: combining folding and docking to predict protein–peptide complexes. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 35, n. 24, p. 5121–5127, 2019.
- 117 ZHANG, Y.; SANNER, M. F. Docking flexible cyclic peptides with *AutoDock CrankPep*. **Journal of chemical theory and computation**, v. 15, n. 10, p. 5161–5168, 2019.
- 118 SANTOS-MARTINS, D. et al. **Accelerating AutoDock4 with GPUs and gradient-based local search**. 2019. Disponível em: <<https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/60c743f4702a9b2ad818a6f7>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 119 SANTOS-MARTINS, D. et al. Accelerating AutoDock4 with GPUs and gradient-based local search. **Journal of chemical theory and computation**, v. 17, n. 2, p. 1060–1073, 2021.
- 120 EBERHARDT, J. et al. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of chemical information and modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 2021.
- 121 **Raccoon 2**. Disponível em: <<https://autodock.scripps.edu/resources/raccoon2/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 122 **Documentation**. Disponível em: <<https://ccsb.scripps.edu/agfr/documentation/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 123 **Homepage**. Disponível em: <<http://mglttools.scripps.edu/documentation>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 124 HARRIS, R.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. Automated prediction of ligand-binding sites in proteins. **Proteins**, v. 70, n. 4, p. 1506–1517, 2008.

- 125 RAVINDRANATH, P. A.; SANNER, M. F. AutoSite: an automated approach for pseudo-ligands prediction—from ligand-binding sites identification to predicting key ligand atoms. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 32, n. 20, p. 3142–3149, 2016.
- 126 GOODSELL, D. S. et al. The AutoDock suite at 30. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 30, n. 1, p. 31–43, 2021.
- 127 TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.
- 128 VIEIRA, T. F.; SOUSA, S. F. Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening. **Applied sciences (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 21, p. 4538, 2019.
- 129 PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.
- 130 AL-BAALI, M.; SPEDICATO, E.; MAGGIONI, F. Broyden's quasi-Newton methods for a nonlinear system of equations and unconstrained optimization: a review and open problems. **Optimization methods & software**, v. 29, n. 5, p. 937–954, 2014.
- 131 BOUTET, N.; DEGROOTE, J.; HAELTERMAN, R. A symmetric grouped and ordered multi-secant Quasi-Newton update formula. **Optimization methods & software**, v. 37, n. 6, p. 1979–2000, 2022.
- 132 SRIVASTAVA, R. Application of optimization algorithms in clusters. **Frontiers in chemistry**, v. 9, 2021.
- 133 Disponível em:
<https://scholar.google.com.br/scholar?q=The+Monte+Carlo+Methods:+Recent+Advances,+New+Perspectives+and+Applications&hl=pt-BR&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 134 BLUM, C. Hybrid Metaheuristics in Combinatorial Optimization: A Tutorial. Em: **Theory and Practice of Natural Computing**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 1–10.
- 135 LOURENÇO, H. R. et al. **Iterated Local Search**. Disponível em:
<<http://arxiv.org/abs/math/0102188>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 136 BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F., Jr. How docking programs work. In: **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer New York, 2019. p. 35–50.
- 137 SIMONOV, A.; GOODWIN, A. L. Designing disorder into crystalline materials. **Nature Reviews Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 657–673, 2020.

- 138 AGARWAL, R.; SMITH, J. C. Speed vs accuracy: Effect on ligand pose accuracy of varying box size and exhaustiveness in AutoDock Vina. **Molecular informatics**, v. 42, n. 2, 2023.
- 139 NGUYEN, N. T. et al. Autodock Vina adopts more accurate binding poses but Autodock4 forms better binding affinity. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 1, p. 204–211, 2020.
- 140 QUIROGA, R.; VILLARREAL, M. A. Vinardo: A scoring function based on autodock Vina improves scoring, docking, and virtual screening. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155183, 2016.
- 141 PAN, X. et al. AA-score: A new scoring function based on amino acid-specific interaction for molecular docking. **Journal of chemical information and modeling**, v. 62, n. 10, p. 2499–2509, 2022.
- 142 TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.
- 143 SPITALER, M.; CANTRELL, D. A. Protein kinase C and beyond. **Nature immunology**, v. 5, n. 8, p. 785–790, 2004.
- 144 KIKKAWA, U. The story of PKC: A discovery marked by unexpected twists and turns. **IUBMB life**, v. 71, n. 6, p. 697–705, 2019.
- 145 KAWANO, T. et al. Activators and inhibitors of protein kinase C (PKC): Their applications in clinical trials. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1748, 2021.
- 146 KATTI, S. S. et al. Structural anatomy of Protein Kinase C C1 domain interactions with diacylglycerol and other agonists. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 2022.
- 147 ROSSE, C. et al. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2010.
- 148 NEWTON, A. C. Protein kinase C: poised to signal. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 298, n. 3, p. E395–E402, 2010.
- 149 VOROBEVA, N. et al. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps. **International immunopharmacology**, v. 114, n. 109448, p. 109448, 2023.
- 150 CHEN, X.-Z. et al. Insights into the structural requirements of PKC ζ inhibitors as potential anti-arthritis agents based on 3D-QSAR, homology modeling and docking approach. **Journal of molecular structure**, v. 1246, n. 131148, p. 131148, 2021.
- 151 LAUTALA, S. et al. Expanding the paradigm of structure-based drug design: Molecular dynamics simulations support the development of new pyridine-based protein kinase C-targeted agonists. **Journal of medicinal chemistry**, v. 66, n. 7, p. 4588–4602, 2023.

- 152 YANG, Q. et al. The role of tyrosine phosphorylation of protein Kinase C delta in infection and inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1498, 2019.
- 153 SIPKA, S. et al. The role of protein kinase C isoenzymes in the pathogenesis of human autoimmune diseases. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 241, n. 109071, p. 109071, 2022.
- 154 KAWANO, T. et al. Protein kinase C (PKC) isozymes as diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic targets for cancer. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5425, 2022.
- 155 STAROSYLA, S. A. et al. Pharmacophore modeling, docking and molecular dynamics simulation for identification of novel human protein kinase C beta (PKC β) inhibitors. **Structural chemistry**, v. 34, n. 3, p. 1157–1171, 2023.
- 156 QIE, Y. et al. Identification of protein kinase C beta as a therapeutic target for neuroendocrine prostate cancer and development of a nanoparticle-based therapeutic strategy. **Nano today**, v. 48, n. 101705, p. 101705, 2023.
- 157 RAGHUVANSHI, R.; BHARATE, S. B. Preclinical and clinical studies on bryostatins, A class of marine-derived protein kinase C modulators: A mini-review. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 20, n. 12, p. 1124–1135, 2020.
- 158 KIM, H. et al. A novel atypical PKC-iota inhibitor, echinochrome A, enhances cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. **Marine drugs**, v. 16, n. 6, p. 192, 2018.
- 159 SINGH, R. K. et al. Putative role of natural products as Protein Kinase C modulator in different disease conditions. **Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 397–414, 2021.
- 160 YUAN, X. et al. Inhibition of protein kinase C by isojacareubin suppresses hepatocellular carcinoma metastasis and induces apoptosis in vitro and in vivo. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, 2015.
- 161 MATIAS, D. et al. Natural products as lead protein kinase C modulators for cancer therapy. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 45–79.
- 162 ISCA, V. et al. Activity to breast cancer cell lines of different malignancy and predicted interaction with protein kinase C isoforms of royleanones. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 10, p. 3671, 2020.
- 163 MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K.; GRIMES, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 12, p. 937–957, 2012.
- 164 SADEGHI, M. M.; SALAMA, M. F.; HANNUN, Y. A. Protein kinase C as a therapeutic target in non-small cell lung cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 11, p. 5527, 2021.

- 165 BASU, A. The enigmatic protein kinase C-eta. **Cancers**, v. 11, n. 2, p. 214, 2019.
- 166 COOKE, M. et al. Protein kinase C alpha is a central node for tumorigenic transcriptional networks in human prostate cancer. **Cancer research communications**, v. 2, n. 11, p. 1372–1387, 2022
- 167 VAN, A.-A. N. et al. Protein kinase C fusion proteins are paradoxically loss of function in cancer. **The journal of biological chemistry**, v. 296, n. 100445, p. 100445, 2021.
- 168 NEWTON, A. C.; BROGNARD, J. Reversing the paradigm: Protein kinase C as a tumor suppressor. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 5, p. 438–447, 2017.
- 169 OIKAWA, T. et al. Protein kinase C delta is a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. **Gastro hep advances**, v. 2, n. 1, p. 83–95, 2023.
- 170 PAPA, P. et al. Discovery of the selective protein kinase C- θ kinase inhibitor, CC-90005. **Journal of medicinal chemistry**, v. 64, n. 16, p. 11886–11903, 2021.
- 171 ZHOU, B. et al. B7-H4 expression is upregulated by PKC δ activation and contributes to PKC δ -induced cell motility in colorectal cancer. **Cancer cell international**, v. 22, n. 1, 2022.
- 172 PIPERNO-NEUMANN, S. et al. A phase I trial of LXS196, a protein kinase C (PKC) inhibitor, for metastatic uveal melanoma. **British journal of cancer**, v. 128, n. 6, p. 1040–1051, 2023.
- 173 LOPEZ-GARCIA, L. A. et al. Allosteric regulation of protein kinase PKC ζ by the N-terminal C1 domain and small compounds to the PIF-pocket. **Chemistry & biology**, v. 18, n. 11, p. 1463–1473, 2011.
- 174 KAJIMOTO, T. et al. Activation of atypical protein kinase C by sphingosine 1-phosphate revealed by an aPKC-specific activity reporter. **Science signaling**, v. 12, n. 562, 2019.
- 175 SHAH, H. et al. Impact of deleterious missense PRKCI variants on structural and functional dynamics of protein. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 2022.
- 176 ARENCIBIA, J. M. et al. An allosteric inhibitor scaffold targeting the PIF-pocket of atypical protein kinase C isoforms. **ACS chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 564–573, 2017.
- 177 OISHEE, N. N.; KHALID, K. M.; ACEVEDO-DUNCAN, D. M. Abstract 5022: Atypical protein kinase C inhibitors abrogate malignant breast cancer. **Cancer research**, v. 83, n. 7_Supplement, p. 5022–5022, 2023.
- 178 REGALA, R. P. et al. Atypical Protein kinase C ι is an oncogene in human non-small cell lung cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 19, p. 8905–8911, 2005.

- 179 HIRANO, Y. et al. Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31883–31890, 2004.
- 180 BABURAJENDRAN, N.; HILL, J. **Crystal structure of PKC ι in complex with inhibitor**. Worldwide Protein Data Bank, , 26 jun. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2210/pdb6ilz/pdb>>
- 181 MESSERSCHMIDT, A. et al. Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- ι reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. **Journal of molecular biology**, v. 352, n. 4, p. 918–931, 2005.
- 182 TAKIMURA, T. et al. Structures of the PKC- ι kinase domain in its ATP-bound and apo forms reveal defined structures of residues 533–551 in the C-terminal tail and their roles in ATP binding. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. 5, p. 577–583, 2010.
- 183 SORIANO, E. V. et al. APKC inhibition by Par3 CR3 flanking regions controls substrate access and underpins apical-junctional polarization. **Developmental cell**, v. 38, n. 4, p. 384–398, 2016.
- 184 KWIATKOWSKI, J. et al. Fragment-based drug discovery of potent protein kinase C ι inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 10, p. 4386–4396, 2018.
- 185 KWIATKOWSKI, J. et al. Fragment-based discovery of a small-molecule protein kinase C- ι inhibitor binding post-kinase domain residues. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 10, n. 3, p. 318–323, 2019.
- 186 REES, D. C. et al. Fragment-based lead discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 660–672, 2004.
- 187 KIRSCH, P. et al. Concepts and core principles of fragment-based drug design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 23, p. 4309, 2019.
- 188 MULLARD, A. Fragment-based screening sees the light. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 19, n. 11, p. 742–743, 2020.
- 189 WALSH, L. et al. Fragment-to-lead medicinal chemistry publications in 2021. **Journal of medicinal chemistry**, v. 66, n. 2, p. 1137–1156, 2023.
- 190 ERLANSON, D. **Practical Fragments**. Disponível em: <<https://practicalfragments.blogspot.com/2022/11/fragments-in-clinic-2022-edition.html>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 191 AZIMI, S. et al. *In Silico* study and design of some new potent threonine tyrosine kinase inhibitors using molecular docking simulation. **Molecular simulation**, v. 49, n. 5, p. 517–524, 2023.

- 192 BISSARO, M.; STURLESE, M.; MORO, S. The rise of molecular simulations in fragment-based drug design (FBDD): an overview. **Drug discovery today**, v. 25, n. 9, p. 1693–1701, 2020.
- 193 RACHMAN, M. et al. Fragment-to-lead tailored in silico design. **Drug discovery today. Technologies**, v. 40, p. 44–57, 2021.
- 194 DE SOUZA NETO, L. R. et al. In silico strategies to support fragment-to-lead optimization in drug discovery. **Frontiers in chemistry**, v. 8, 2020.
- 195 HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug discovery today**, v. 9, n. 10, p. 430–431, 2004.
- 196 HOPKINS, A. L. et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 105–121, 2014.
- 197 OEBBEKE, M. et al. Fragment binding to kinase hinge: If charge distribution and local pKa shifts mislead popular bioisosterism concepts. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 60, n. 1, p. 252–258, 2021.
- 198 SOUERS, A. J. et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 202–208, 2013.
- 199 TAP, W. D. et al. Structure-guided blockade of CSF1R kinase in tenosynovial giant-cell tumor. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 5, p. 428–437, 2015.
- 200 IRIE, T.; SAWA, M. 7-azaindole: A versatile scaffold for developing kinase inhibitors. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 66, n. 1, p. 29–36, 2018.
- 201 ALIBAY, I. et al. Evaluating the use of absolute binding free energy in the fragment optimisation process. **Communications chemistry**, v. 5, n. 1, 2022.
- 202 BAJUSZ, D. et al. Exploring protein hotspots by optimized fragment pharmacophores. **Nature communications**, v. 12, n. 1, 2021.
- 203 ELIAS, T. C.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; DA SILVEIRA, N. J. F. MB-Isoster: A software for bioisosterism simulation. **Journal of computational chemistry**, v. 39, n. 29, p. 2481–2487, 2018.
- 204 PUBCHEM. **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 205 **SwissADME**. Disponível em: <<http://www.swissadme.ch/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 206 **Way2Drug - main**. Disponível em: <<http://www.way2drug.com/passonline/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.

- 207 **ProTox-II - prediction of TOXicity of chemicals**. Disponível em: <https://tox-new.charite.de/prottox_II/>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 208 **Tools – group research on molecular modeling and computer simulation**. Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/molmodcs/tools/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 209 **CAS SciFindern**. Disponível em: <<https://www.cas.org/pt-br/solutions/cas-scifinder-discovery-platform/cas-scifinder>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 210 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 211 **ChEMBL Database**. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 212 **Google Scholar**. Disponível em: <<https://scholar.google.com/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 213 **CTG labs - NCBI**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 214 **DrugBank online**. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 215 **PKIDB**. Disponível em: <<https://www.icoa.fr/pkidb/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 216 **KLIFS - the kinase structures database**. Disponível em: <<https://klifs.net/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 217 **KIDFamMap**. Disponível em: <<http://gemdock.life.nctu.edu.tw/KIDFamMap/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 218 CHEN, M. J. **KinBase: Kinase Database at Manning's Group**. Disponível em: <<http://kinase.com/web/current/kinbase/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 219 LIU, T. **Binding database home**. Disponível em: <<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 220 Disponível em: <https://chem.beloit.edu/classes/programs/ChemDraw_18_manual.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 221 **Draw chemical structures, molecules, and reactions**. Disponível em: <<https://www.acdlabs.com/products/chemsketch/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 222 BERGWERF, H. **MolView**. Disponível em: <<https://molview.org/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.

- 223 **Marvin JS**. Disponível em: <<https://marvinjs-demo.chemaxon.com/latest/demo.html>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 224 **Mol* viewer**. Disponível em: <<https://molstar.org/viewer/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 225 **PyMOL**. Disponível em: <<https://pymol.org/2/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 226 **BIOVIA Discovery Studio**. Disponível em: <<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 227 **UCSF Chimera Home Page**. Disponível em: <<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 228 **rdkit.Chem.BRICS module — The RDKit 2023.09.3 documentation**. Disponível em: <<https://www.rdkit.org/docs/source/rdkit.Chem.BRICS.html>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 229 LIU, T. et al. Break down in order to build up: Decomposing small molecules for fragment-based drug design with eMolFrag. **Journal of chemical information and modeling**, v. 57, n. 4, p. 627–631, 2017.
- 230 **EMolFrag**. Disponível em: <<https://www.brylinski.org/emolfrag>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 231 CUOZZO, A. et al. **SwissBioisostere - A database of molecular replacements for ligand design**. Disponível em: <<http://www.swissbioisostere.ch/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 232 **SwissSimilarity**. Disponível em: <<http://www.swisssimilarity.ch/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 233 NADERI, M. et al. A graph-based approach to construct target-focused libraries for virtual screening. **Journal of cheminformatics**, v. 8, n. 1, 2016.
- 234 **WwPDB: 1XJD**. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001xjd>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 235 **WwPDB: 3TXO**. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00003txo>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 236 **WwPDB: 4RA4**. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00004ra4>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 237 **WwPDB: 3NDM**. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00003ndm>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 238 **WwPDB: 7S25**. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00007s25>. Acesso em: 13 dez. 2023.

- 239 **WwPDB: 3OCB**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00003 ocb](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00003 ocb >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 240 **WwPDB: 6E99**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00006 e99](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00006 e99 >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 241 **WwPDB: 3GVU**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00003 gvu](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00003 gvu >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 242 **WwPDB: 3OG7**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00003 og7](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00003 og7 >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 243 **WwPDB: 47RH**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 000047 rh](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 000047 rh >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 244 **WwPDB: 5X17**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00005 x17](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00005 x17 >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 245 **WwPDB: 7AUV**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00007 auv](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00007 auv >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 246 **WwPDB: 7RA5**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00007 ra5](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00007 ra5 >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 247 **WwPDB: 7XLP**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00007 xlp](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00007 xlp >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 248 **WwPDB: 8BFS**. Disponível em: <[https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00008 bfs](https://www ww pdb . org / pdb ? id = pdb _ 00008 bfs >)>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 249 GILBERG, E.; BAJORATH, J. Recent progress in structure-based evaluation of compound promiscuity. **ACS omega**, v. 4, n. 2, p. 2758–2765, 2019.
- 250 KABIR, A.; MUTH, A. Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 176, n. 106055, p. 106055, 2022.
- 251 DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- 252 FERNANDES, G. F. S. et al. Phthalimide as a versatile pharmacophore scaffold: Unlocking its diverse biological activities. **Drug development research**, v. 84, n. 7, p. 1346–1375, 2023.
- 253 BEROZA, P. et al. Chemical space docking enables large-scale structure-based virtual screening to discover ROCK1 kinase inhibitors. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 2022.

- 254 TADESSE, S. et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy. **Drug discovery today**, v. 25, n. 2, p. 406–413, 2020.
- 255 EHRT, C.; BRINKJOST, T.; KOCH, O. Binding site characterization – similarity, promiscuity, and druggability. **MedChemComm**, v. 10, n. 7, p. 1145–1159, 2019.
- 256 MENCHER, S. K.; WANG, L. G. Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue). **BMC clinical pharmacology**, v. 5, n. 1, 2005.
- 257 BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A. Multitarget drug discovery and polypharmacology. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1190–1192, 2016.
- 258 THE INTERNATIONAL UNION OF PURE; (IUPAC), A. C. **Compendium of chemical terminology**. Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 259 HARDING, S. D. et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2024. **Nucleic acids research**, 2023.
- 260 ANSERMET, J.-P.; BRECHET, S. D. **Principles of thermodynamics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2018.
- 261 **Glossário Semântico de Farmacologia – SBFTE**. Disponível em: <<https://sbfte.org.br/glossario-farmacologico/>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
- 262 NEUBIG, R. R. et al. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 4, p. 597–606, 2003.
- 263 JARMOSKAITE, I. et al. How to measure and evaluate binding affinities. **eLife**, v. 9, 2020.
- 264 VAUQUELIN, G. Effects of target binding kinetics on *in vivo* drug efficacy: koff, kon and rebinding. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 15, p. 2319–2334, 2016.
- 265 YUNG-CHI, C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. **Biochemical pharmacology**, v. 22, n. 23, p. 3099–3108, 1973.
- 266 HAUPT, L. J. et al. The reliability of estimating K_i values for direct, reversible inhibition of cytochrome P450 enzymes from corresponding IC50 values: A retrospective analysis of 343 experiments. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 43, n. 11, p. 1744–1750, 2015.
- 267 YUNG-CHI, C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. **Biochemical pharmacology**, v. 22, n. 23, p. 3099–3108, 1973.
- 268 CHENG, H. C. The power issue: determination of K_B or K_i from IC50. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 46, n. 2, p. 61–71, 2001.

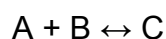
GLOSSÁRIO

Termodinâmica Química: Subárea do conhecimento científico situada na intersecção entre a Física e a Química, dedicada ao estudo das relações entre matéria e energia através das propriedades dos fenômenos físico-químicos em escala macroscópica.

Entidade molecular: Qualquer átomo, molécula, íon, par iônico, radical, íon radical, complexo, confômero, ou espécie química identificável e separadamente distinguível provida de constituição e composição isotópica bem definidas. (258)

Espécie química: Forma específica de um elemento químico com propriedades definidas, como composição isotópica, configuração eletrônica, e estado de oxidação. Também pode referir-se a um conjunto de entidades moleculares quimicamente idênticas. (258)

Afinidade: Em Química, este termo refere-se à tendência de uma espécie química A se combinar com outra espécie química B para formar uma nova espécie química C:



Esta combinação é intimamente regida pelos princípios do equilíbrio termodinâmico, pode envolver interações covalentes e/ou não-covalentes, e depende da complementaridade de dois fatores principais relacionados às características eletrônicas e estéricas das espécies químicas envolvidas. Matematicamente a afinidade (A) pode ser formulada em função de grandezas termodinâmicas intrínsecas a este processo, equação (5). Sendo assim, ela é definida como a derivada parcial negativa da energia livre de Gibbs (G) em relação ao avanço (ξ) do processo, sob pressão (P) e temperatura (T) constantes:

$$A = -(\partial G / \partial \xi)_{P,T} \quad (5)$$

Em Farmacologia, refere-se a uma medida da afeição com que um fármaco se combina com um receptor. Neste contexto, A possui uma relação inversa com K_D e direta com K_A . Portanto, A será tanto maior quanto menor for K_D ou maior for K_A . (258, 259)

Constante de equilíbrio padrão: Quantidade representada por K° e definida pela seguinte expressão termodinâmica, equação (6):

$$K^\circ = e^{-\Delta G^\circ / RT} \quad (6)$$

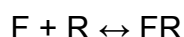
em que ΔG° corresponde à variação da energia livre de Gibbs padrão, R à constante universal dos gases ideais, e T à temperatura termodinâmica. (260) O rearranjo de tal expressão possibilita determinar ΔG° partindo de K° , equação (7):

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K^\circ \quad (7)$$

Eficácia ou Atividade Intrínseca: Em Farmacologia, refere-se a uma medida da magnitude do efeito biológico. (261)

Potência: Em Farmacologia, refere-se a uma quantidade de fármaco necessária para produzir o efeito biológico máximo. (262)

Constante de dissociação: Em Farmacologia, denota uma quantidade representada por K_D que equivale à concentração molar do fármaco (F) para a qual metade dos receptores (R) estão ocupados. (263) Considerando o seguinte sistema binário (fármaco e receptor) em equilíbrio durante um processo de associação bimolecular:



Existe uma constante da taxa de associação (k_{on} ou k_{+1} dependente de $[FR]$) no sentido direto e uma constante da taxa de dissociação (k_{off} ou k_{-1} dependente de $[F][R]$) no sentido inverso. Matematicamente, K_D é determinada pela razão entre k_{off} e k_{on} , ou seja:

$$K_D = k_{off} / k_{on} = [F][R] / [FR]$$

Quando 50% dos receptores estão ocupados, então $[R] = [FR]$ e $K_D = [F]$.

Quanto menor o valor de K_D , menor a $[F]$ necessária para ocupar metade dos receptores. Por outro lado, nota-se o contrário quando K_D assume valores elevados. Neste contexto de equilíbrio, K_D permite encontrar ΔG através da seguinte expressão, equação (8):

$$\Delta G = RT \ln K_D \quad (8)$$

Constante de associação: Em Farmacologia, (264) denota uma quantidade representada por K_A e equivale ao inverso de K_D , portanto:

$$K_A = 1 / K_D = k_{on} / k_{off} = [FR] / [F][R]$$

De maneira análoga à K_D , K_A também permite acessar valores de ΔG , equação (9):

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (9)$$

Constante de Michaelis-Menten: Em Farmacologia, (262) denota uma quantidade representada por K_M e equivale à concentração molar de substrato ($[S]$) para a qual a taxa (velocidade) de uma reação enzimática (V) corresponde à metade da taxa máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Supondo o seguinte processo enzimático ocorrendo conforme a cinética de Michaelis-Menten:



E = Enzima; S = Substrato; ES = Complexo enzima-substrato; P = Produto.

Existe uma constante da taxa de associação (k_{on} dependente de $[ES]$) no sentido direto e uma constante da taxa de dissociação (k_{off} dependente de $[E][S]$) no sentido inverso. Além disso, existe uma terceira taxa referente à reação de catálise enzimática que dissocia o complexo ES e origina P (k_{cat} dependente de $[E][P]$). Matematicamente, K_M pode ser determinada pela seguinte expressão:

$$K_M = (k_{off} + k_{cat}) / k_{on} = [E][S] / [ES]$$

Logo, se no estado estacionário $[ES] = [E]$, então $K_M = [S]$. Portanto, K_M pode variar conforme a concentração de um mesmo substrato, ou com a natureza química de substratos distintos numa mesma concentração. Se $k_{cat} \ll k_{off}$, então K_M pode ser uma medida da afinidade da enzima por um substrato, representando a própria K_D . De fato, quanto menor K_M maior a afinidade, e quanto maior K_M menor a afinidade. Além disso, a V_0 do processo é dada pela equação de Michaelis-Menten, equação (10):

$$V = V_{m\acute{a}x} \cdot [S] / (K_M + [S]) \quad (10)$$

Logo, se $K_M = [S]$, então $V = V_{m\acute{a}x} / 2$.

Constante de inibição: Em Farmacologia, denota uma quantidade representada por K_i correspondente à concentração molar do inibidor, $[I]$, na qual este ocupa 50% dos sítios do receptor na ausência de um substrato competitivo. Tal constante é considerada um tipo particular de K_D e fornece uma medida da potência de inibição ou afinidade de ligação. (265, 266)

Metade da concentração inibitória máxima: Em Farmacologia, denota uma quantidade representada por IC_{50} correspondente à concentração molar de um ligante que reduz a atividade da enzima-alvo em 50%. Para casos em que o inibidor

compete com o substrato pelo receptor, a IC_{50} pode ser determinada pela seguinte equação de Cheng-Prusoff, (267) equação (11):

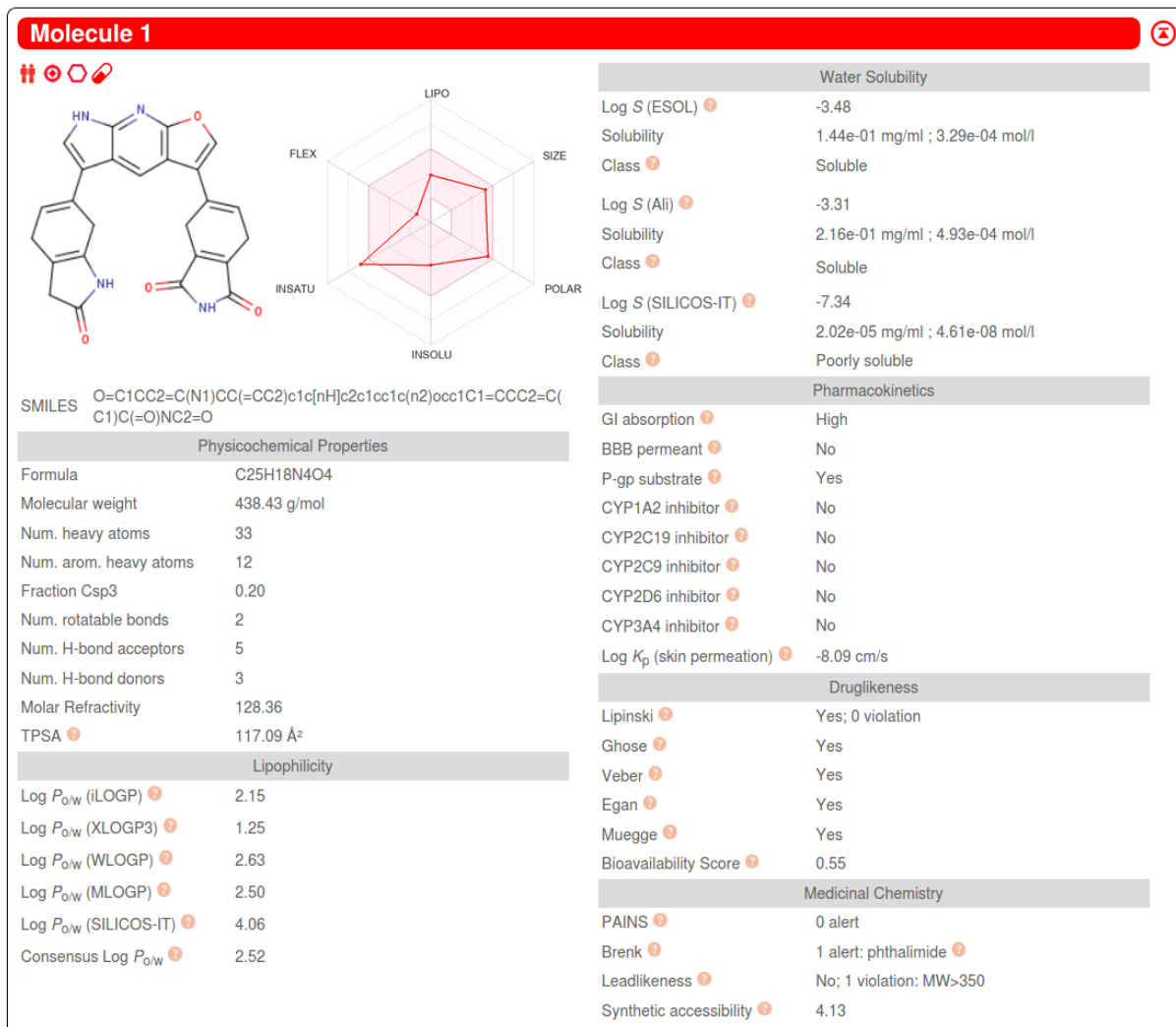
$$IC_{50} = K_i(1 + [S]/K_M) \quad (11)$$

A equação demonstra que para cada $[S]$ haverá um valor diferente de IC_{50} . Especificamente, quando $[S] = K_M$ esta equação pode ser reescrita, equação (12):




$$IC_{50} = 2K_i \quad (12)$$

Ou seja, os valores de IC_{50} medidos quando $[S] = K_M$ equivalem ao dobro de K_i . (266, 268)

APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados ADMET *in silico* do composto-líder 403MMCS. (Fonte: Autoria própria)

APÊNDICE B – Dados do espectro de ação *in silico* do composto-líder 403MMCS. (Fonte: Autor)

PASSonline leandro santos ([Log out](#)) [Go](#)   

» [Home](#) | » [Definitions](#) | » [Products](#) | » [Services](#) | » [FAQ](#) | » [Contacts](#)

[Predict new compound](#) [View old results](#) [View/change profile](#)
[SMILES](#) [MOL file](#) [Marvin JS](#)

C=C1C(C3CC4NC(=O)CC=4CC=3)=CNC1=N2

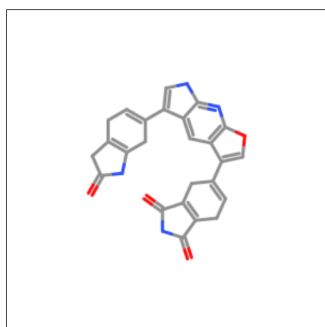
[Get prediction](#)

All Pa>Pi Pa>0,3 Pa>0,7 [ok](#)

Pa	Pi	Activity
0,516	0,005	Serum-glucocorticoid regulated kinase 1 inhibitor
0,480	0,020	Protein kinase inhibitor
0,469	0,040	Neurodegenerative diseases treatment
0,487	0,076	Antineoplastic
0,401	0,003	Cyclin-dependent kinase 9 inhibitor
0,414	0,034	Angiogenesis inhibitor
0,342	0,004	Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitor

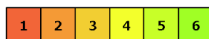
APÊNDICE C – Dados de toxicidade *in silico* do composto-líder 403MMCS. (Fonte: Autor)

Oral toxicity prediction results for input compound



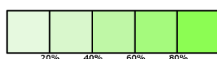
Predicted LD50: 400mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 37.82%

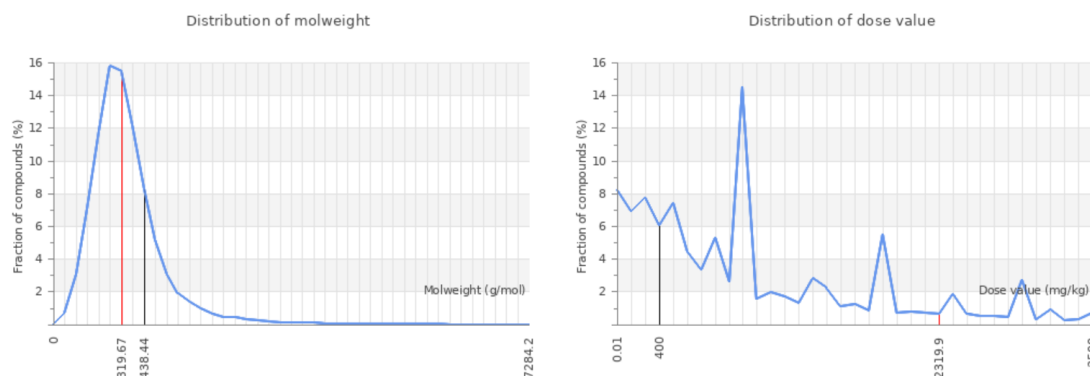
Prediction accuracy: 23%



Name	C12OC=C(C3=CCC4C(=
Molweight	438.44
Number of hydrogen bond acceptors	24
Number of hydrogen bond donors	3
Number of atoms	51
Number of bonds	57
Number of rotatable bonds	2
Molecular refractivity	128.36
Topological Polar Surface Area	117.09
octanol/water partition coefficient(logP)	4.05

Comparison of input compound with dataset compounds

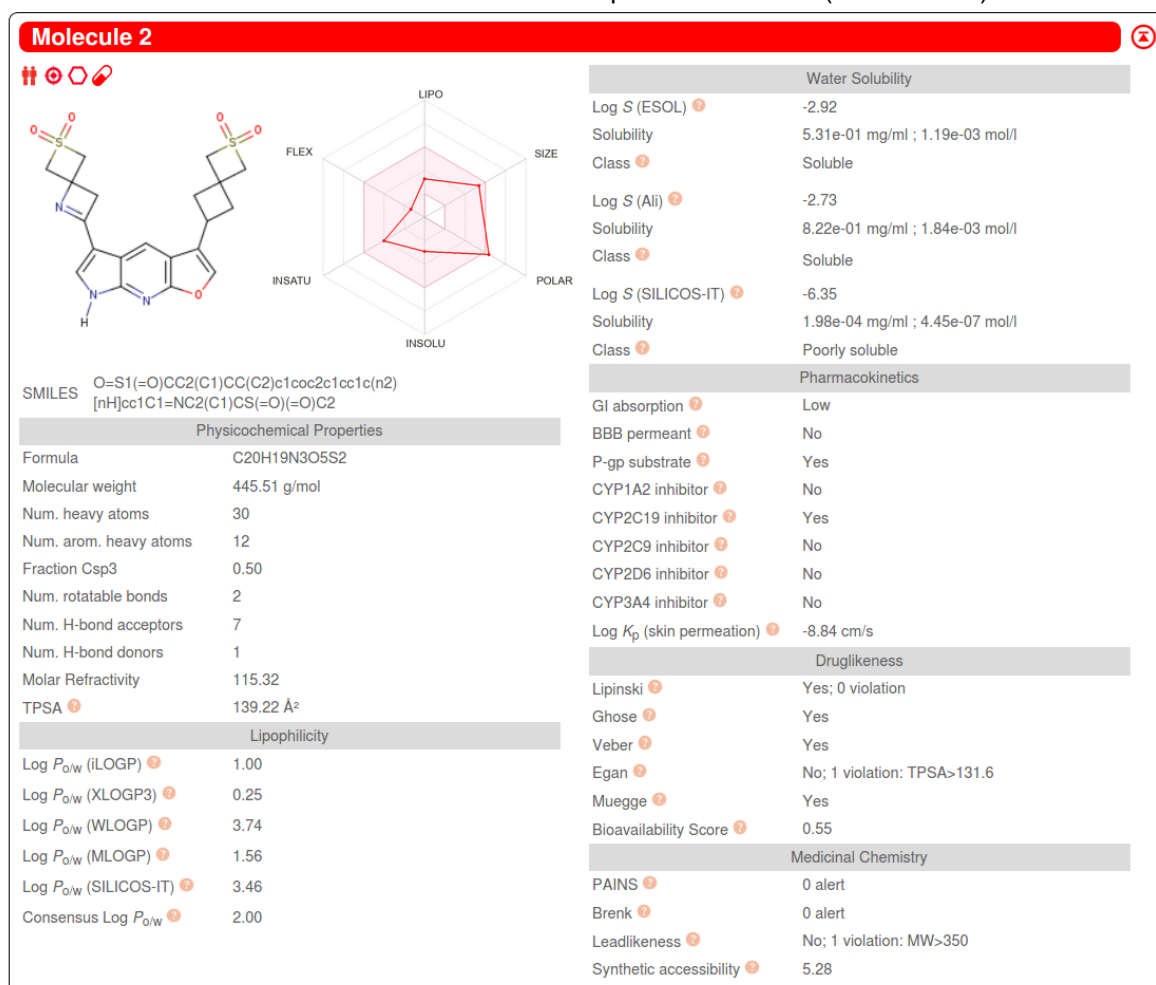
■ Value of input compound
■ Mean value of dataset



Toxicity Model Report

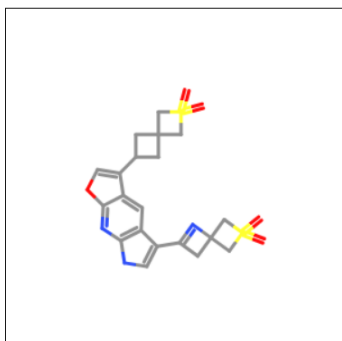
Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.58
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.53
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.98
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.57
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.71
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.8
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.93
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.94
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.92
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.89
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.95
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.92
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.90
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.90
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.71
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.85
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.91

APÊNDICE D – Dados ADMET *in silico* do composto 574MMCS. (Fonte: Autor)



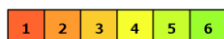
APÊNDICE E – Dados de toxicidade *in silico* do composto 574MMCS. (Fonte: Autor)

Oral toxicity prediction results for input compound



Predicted LD50: 1000mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 36.67%

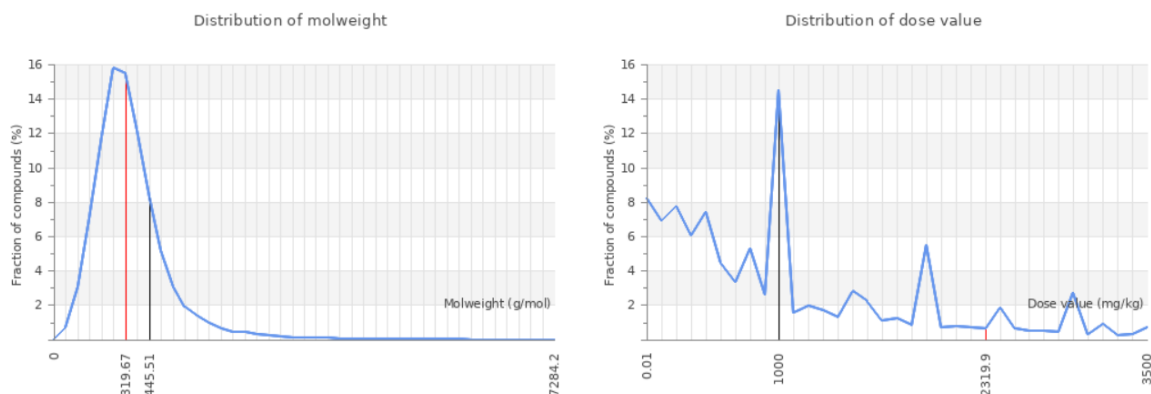
Prediction accuracy: 23%



Name	C12OC=C(C3CC4(CS=((=O)C4)C3)C1=CC1C(C: (=O)C4)C3)=CNC=1N=2
Molweight	445.51
Number of hydrogen bond acceptors	25
Number of hydrogen bond donors	1
Number of atoms	49
Number of bonds	55
Number of rotatable bonds	2
Molecular refractivity	115.32
Topological Polar Surface Area	139.22
octanol/water partition coefficient(logP)	3.56

Comparison of input compound with dataset compounds

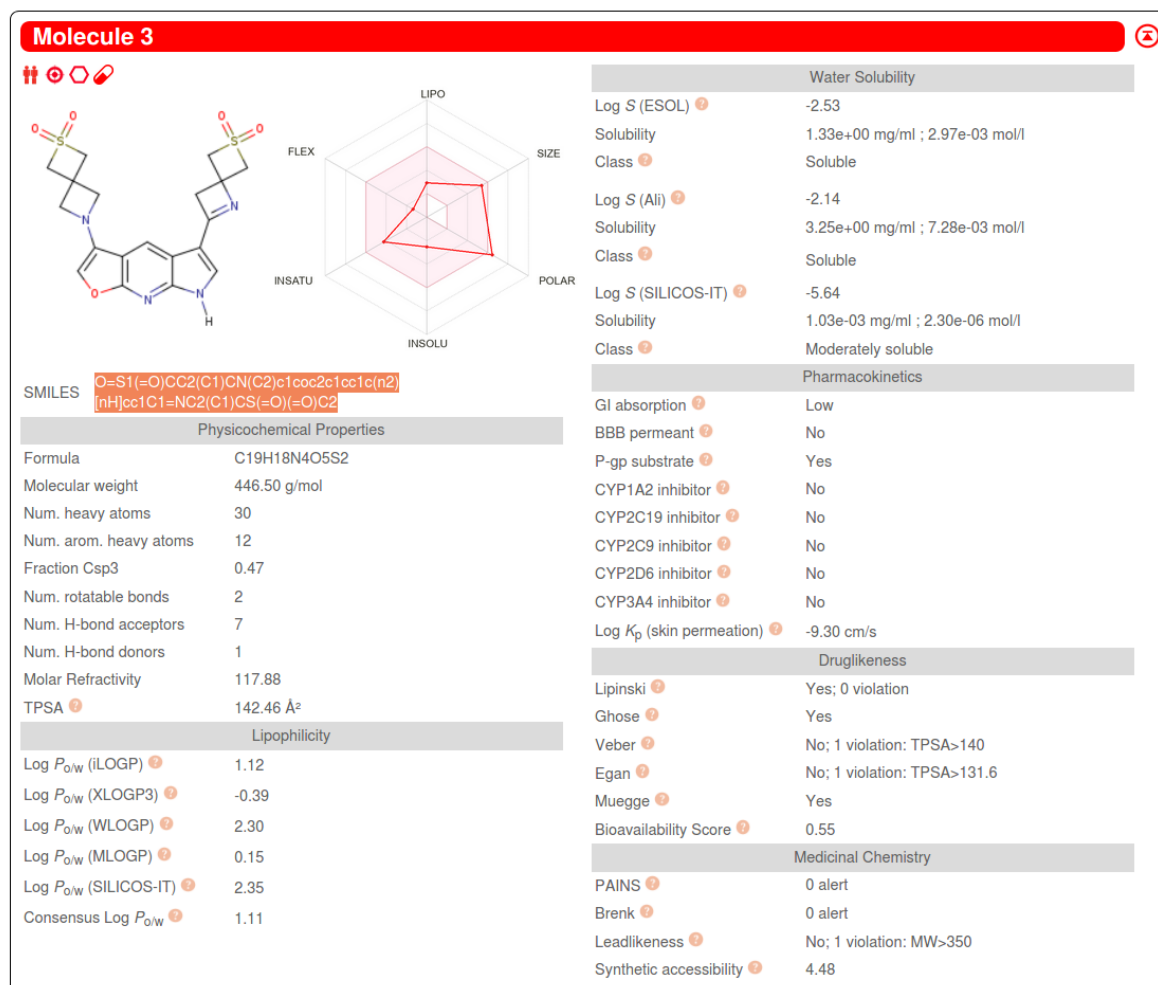
■ Value of input compound
■ Mean value of dataset



Toxicity Model Report

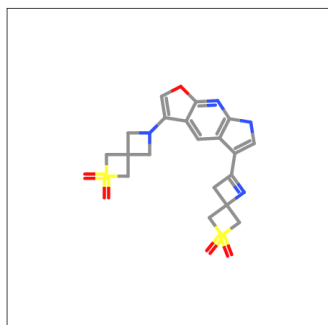
Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.60
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.56
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.84
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.63
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.65
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.85
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.97
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.96
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.92
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.87
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.93
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.95
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.89
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.89
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.83
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.92
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.93

APÊNDICE F – Dados ADMET *in silico* do composto 583MMCS. (Fonte: Autor)



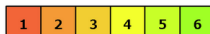
APÊNDICE G – Dados de toxicidade *in silico* do composto 583MMCS. (Fonte: Autor)

Oral toxicity prediction results for input compound



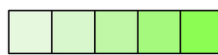
Predicted LD50: 2000mg/kg

Predicted Toxicity Class: 4



Average similarity: 34.63%

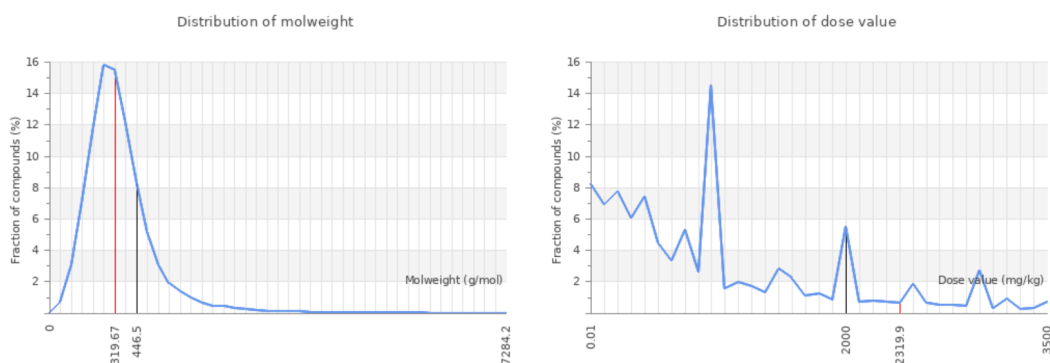
Prediction accuracy: 23%



Name	O=S1(=O)CC2(C1)CN(C[nH]cc1C1=NC2(C1)CS(-=O)C2
Molweight	446.5
Number of hydrogen bond acceptors	25
Number of hydrogen bond donors	1
Number of atoms	48
Number of bonds	54
Number of rotatable bonds	2
Molecular refractivity	117.88
Topological Polar Surface Area	142.46
octanol/water partition coefficient(logP)	2.57

Comparison of input compound with dataset compounds

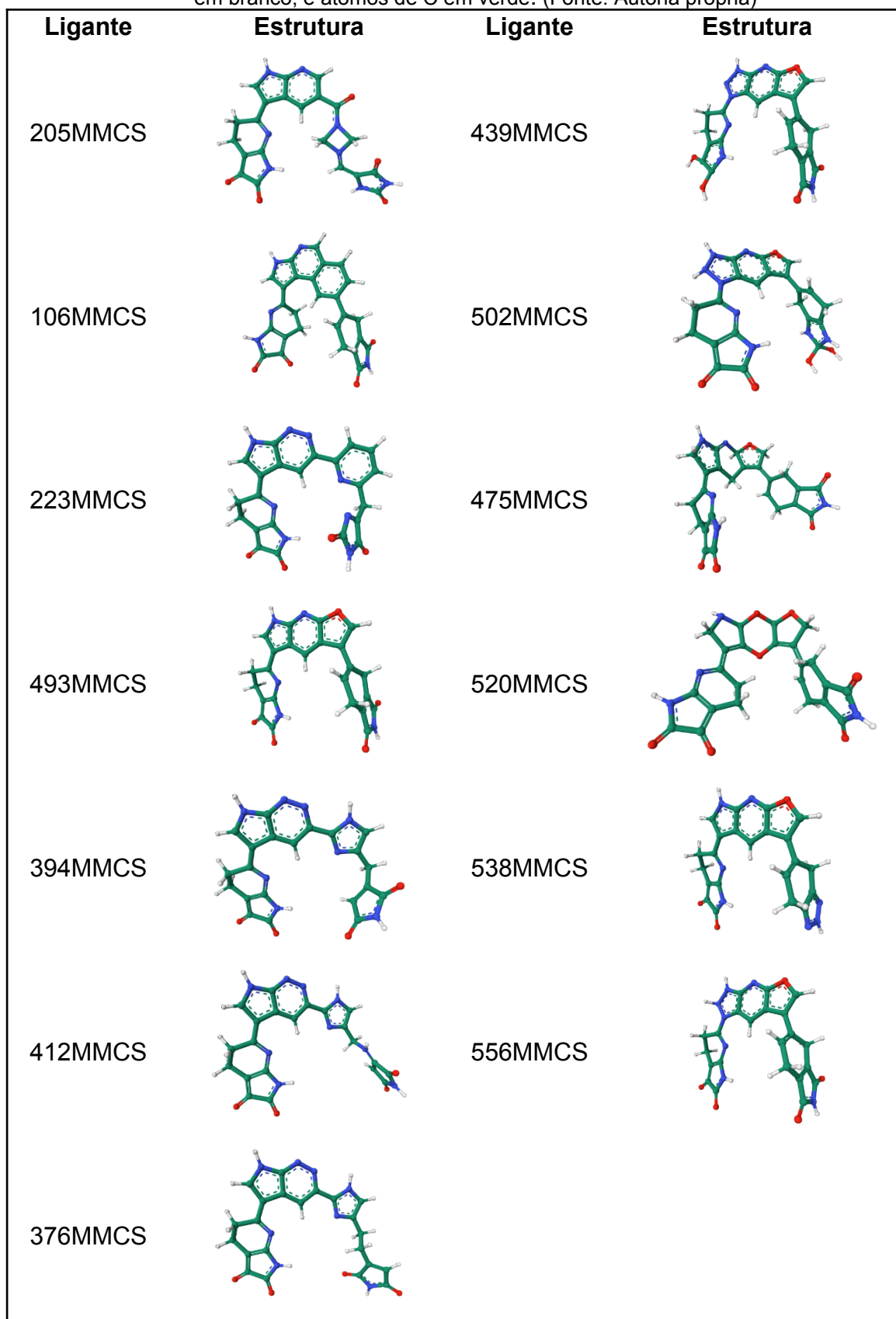
■ Value of input compound
■ Mean value of dataset



Toxicity Model Report

Classification	Target	Shorthand	Prediction	Probability
Organ toxicity	Hepatotoxicity	dili	Inactive	0.6
Toxicity end points	Carcinogenicity	carcino	Inactive	0.52
Toxicity end points	Immunotoxicity	immuno	Inactive	0.91
Toxicity end points	Mutagenicity	mutagen	Inactive	0.60
Toxicity end points	Cytotoxicity	cyto	Inactive	0.61
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	nr_ahr	Inactive	0.89
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor (AR)	nr_ar	Inactive	0.94
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	nr_ar_lbd	Inactive	0.95
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Aromatase	nr_aromatase	Inactive	0.93
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Alpha (ER)	nr_er	Inactive	0.86
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	nr_er_lbd	Inactive	0.94
Tox21-Nuclear receptor signalling pathways	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)	nr_ppar_gamma	Inactive	0.94
Tox21-Stress response pathways	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE)	sr_are	Inactive	0.90
Tox21-Stress response pathways	Heat shock factor response element (HSE)	sr_hse	Inactive	0.90
Tox21-Stress response pathways	Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	sr_mmp	Inactive	0.84
Tox21-Stress response pathways	Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	sr_p53	Inactive	0.93
Tox21-Stress response pathways	ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)	sr_atad5	Inactive	0.92

APÊNDICE H – Estrutura molecular dos ligantes testados *in silico* contra um painel de 14 cinases visando avaliar seletividade. Nas estruturas moleculares, os átomos de O foram representados em vermelho, átomos de N em azul, átomos de H em branco, e átomos de C em verde. (Fonte: Autoria própria)



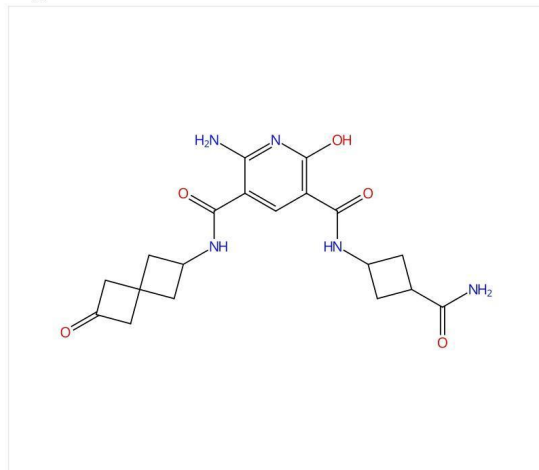
APÊNDICE I – Resultados preditivos de acessibilidade e viabilidade sintéticas do composto 52MMCS na plataforma *SciFinder*. (Fonte: Autoria própria)

CAS SciFinder®

Retrosynthesis

[View Plan in SciFinder®](#)

Target Structure



Plan Options

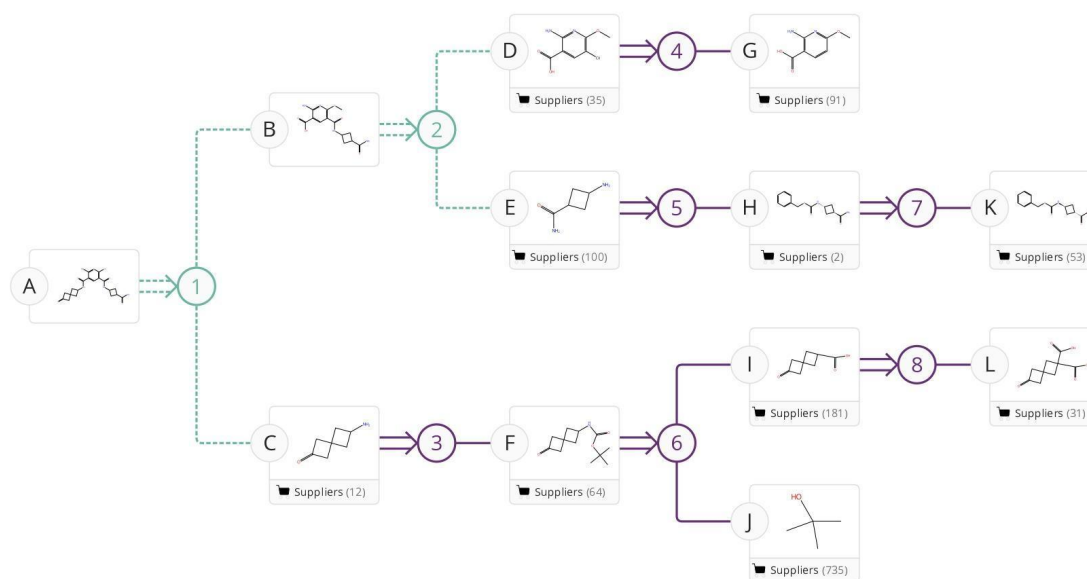
Synthetic Depth: 3
Supporting Predicted Reactions: **Common**
Break & Protect Bonds: **No**
Starting Material Cost Limit: **\$1,000.00 USD/mol**

Plan Information

At the time of export, your plan included:
Experimental and Predicted Steps
Estimated Yield: **15%**
Overall Price: **\$281,306.17 (USD per 100 grams)**
Commercially Available Substances: C, D, E, F, G, H, I, J, K, L
Total Steps: **8**

SciFinder®

Page 1



SciFinder®

Step Key: Experimental ⇒ Predicted ⇨

Page 2

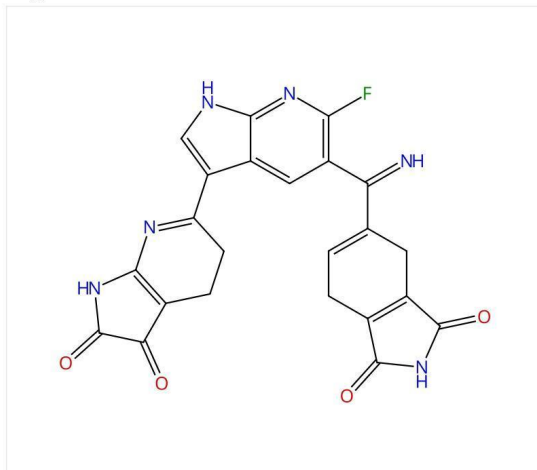
APÊNDICE J – Resultados preditivos de acessibilidade e viabilidade sintéticas do composto 502MMCS na plataforma *SciFinder*. (Fonte: Autoria própria)

CAS  SciFinder[®]

Retrosynthesis

[View Plan in SciFinder[®]](#)

Target Structure



Plan Options

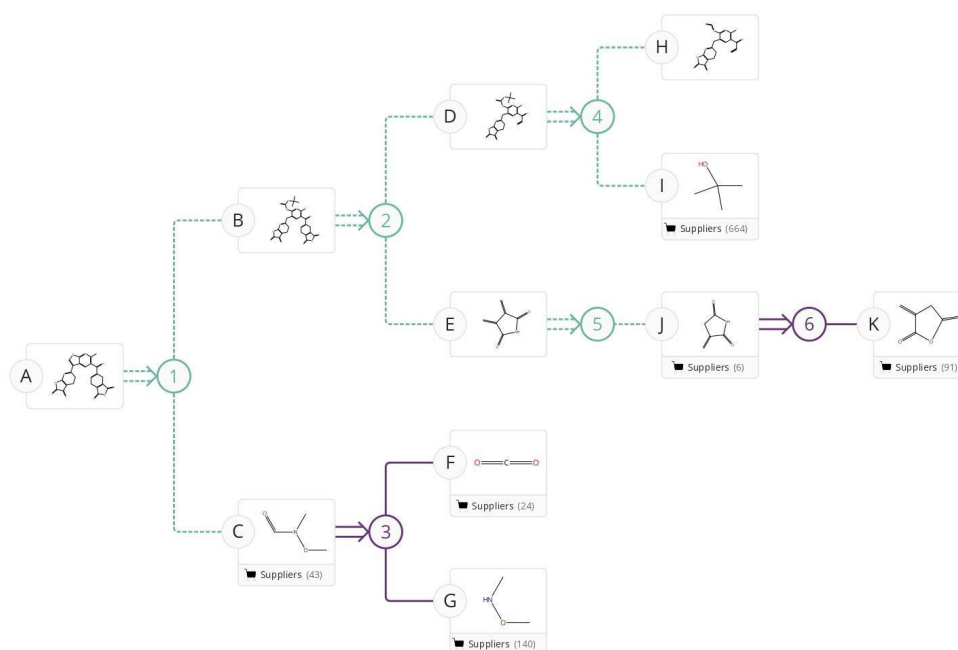
Synthetic Depth: 3
Supporting Predicted Reactions: Common
Break & Protect Bonds: No
Starting Material Cost Limit: \$1,000.00 USD/mol

Plan Information

At the time of export, your plan included:
Experimental and Predicted Steps
Estimated Yield: 37%
Overall Price: \$5,969.60 (USD per 100 grams)
Commercially Available Substances: C, F, G, I, J, K
Total Steps: 6

SciFinder[®]

Page 1



Step Key: Experimental \Rightarrow Predicted \Rightarrow

SciFinder[®]

Page 2

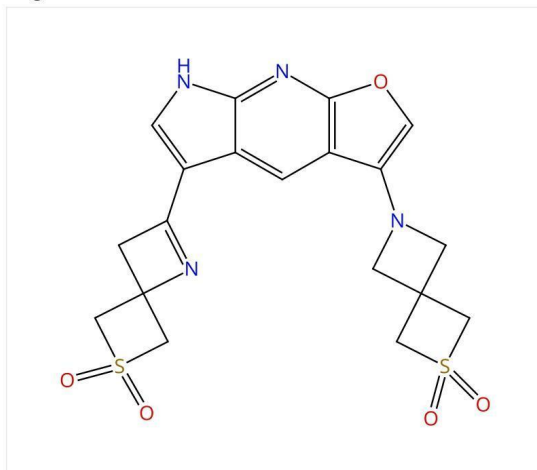
APÊNDICE K – Resultados preditivos de acessibilidade e viabilidade sintéticas do composto 583MMCS na plataforma *SciFinder*. (Fonte: Autoria própria)

CAS  SciFinder®

Retrosynthesis

[View Plan in SciFinder®](#)

Target Structure



Plan Options

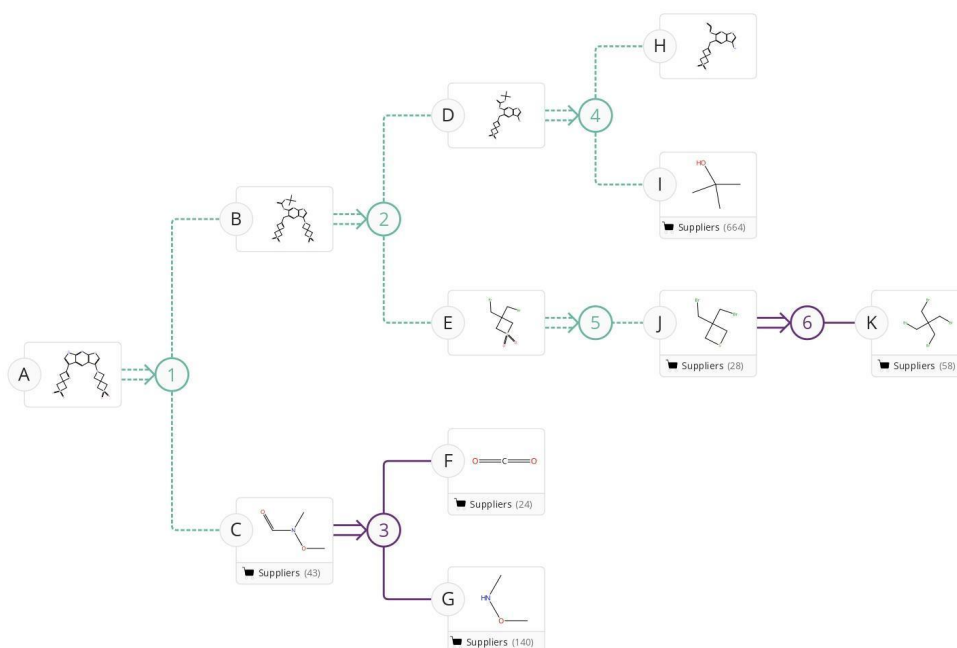
Synthetic Depth: **3**
 Supporting Predicted Reactions: **Common**
 Break & Protect Bonds: **No**
 Starting Material Cost Limit: **\$1,000.00 USD/mol**

Plan Information

At the time of export, your plan included:
 Experimental and Predicted Steps
 Estimated Yield: **37%**
 Overall Price: **\$6,128.69 (USD per 100 grams)**
 Commercially Available Substances: C, F, G, I, J, K
 Total Steps: **6**

SciFinder®

Page 1



Step Key: Experimental \Rightarrow Predicted \Rightarrow

SciFinder®

Page 2

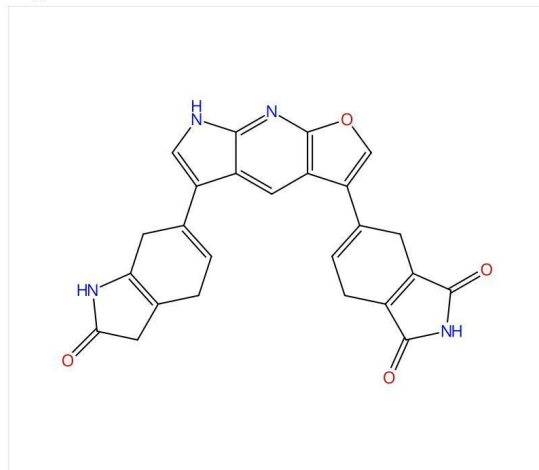
APÊNDICE L – Resultados preditivos de acessibilidade e viabilidade sintéticas do composto 403MMCS na plataforma *SciFinder*. (Fonte: Autoria própria)

CAS SciFinder®

Retrosynthesis

[View Plan in SciFinder®](#)

Target Structure



Plan Options

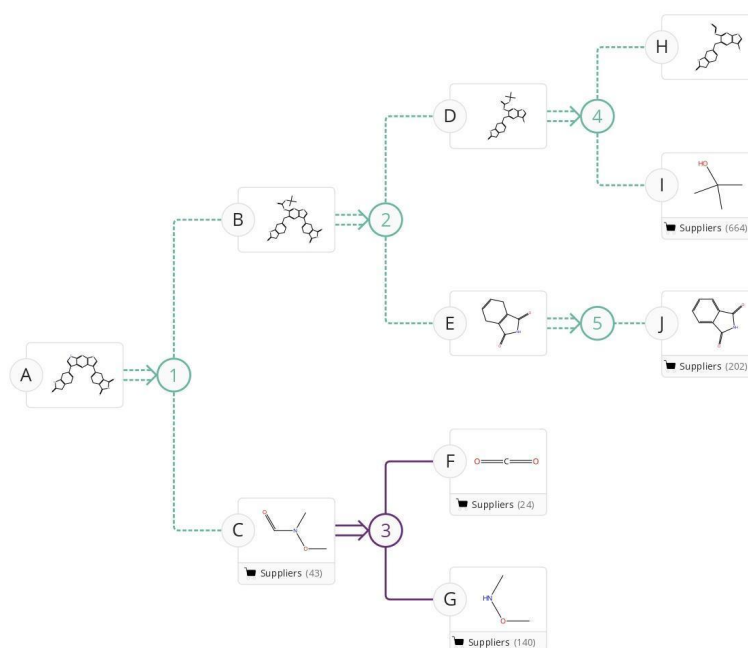
Synthetic Depth: 3
 Supporting Predicted Reactions: **Common**
 Break & Protect Bonds: **No**
 Starting Material Cost Limit: **\$1,000.00 USD/mol**

Plan Information

At the time of export, your plan included:
 Experimental and Predicted Steps
 Estimated Yield: **61%**
 Overall Price: **\$3,764.52 (USD per 100 grams)**
 Commercially Available Substances: C, F, G, I, J
 Total Steps: 5

SciFinder®

Page 1



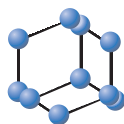
Step Key: Experimental ⇒ Predicted ⇨

SciFinder®

Page 2

APÊNDICE M – Primeiro artigo publicado concernente ao tema da Tese intitulado: *Bioinformatics Approach on Bioisosterism Softwares to be Used in Drug Discovery and Development*

REVIEW ARTICLE


**BENTHAM
SCIENCE**

Bioinformatics Approach on Bioisosterism Softwares to be Used in Drug Discovery and Development



Nelson José Freitas da Silveira^{1,*}, Walter Filgueira de Azevedo Jr.², Rita Cardoso Guedes³, Leandro Marcos Santos¹, Rodolfo Cabral Marcelino¹, Patrícia da Silva Antunes¹ and Thiago Castilho Elias¹

¹Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation, Department of Exact Science, Federal University of Alfenas/UNIFAL-MG, Alfenas, Brazil; ²Laboratory of Computational Systems Biology, School of Health and Life Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil; ³The Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa) and Department of Pharmaceutical Chemistry and Therapeutics, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisboa, Portugal

Abstract: Background: In the rational drug development field, bioisosterism is a tool that improves lead compounds' performance, referring to molecular fragment substitution that has similar physical-chemical properties. Thus, it is possible to modulate drug properties such as absorption, toxicity, and half-life increase. This modulation is of pivotal importance in the discovery, development, identification, and interpretation of the mode of action of biologically active compounds.

Objective: Our purpose here is to review the development and application of bioisosterism in drug discovery. In this study history, applications, and use of bioisosteric molecules to create new drugs with high binding affinity in the protein-ligand complexes are described.

Methods: It is an approach for molecular modification of a prototype based on the replacement of molecular fragments with similar physicochemical properties, being related to the pharmacokinetic and pharmacodynamic phase, aiming at the optimization of the molecules.

Results: Discovery, development, identification, and interpretation of the mode of action of biologically active compounds are the most important factors for drug design. The strategy adopted for the improvement of leading compounds is bioisosterism.

Conclusion: Bioisosterism methodology is a great advance for obtaining new analogs to existing drugs, enabling the development of new drugs with reduced toxicity, in a comparative analysis with existing drugs. Bioisosterism has a wide spectrum to assist in several research areas.

ARTICLE HISTORY

Received: November 18, 2020
Revised: February 09, 2021
Accepted: March 01, 2021

DOI:
10.2174/1574893616666210525150747



CrossMark

Keywords: Protein-ligand interaction, bioisosterism, computational chemistry, medicinal chemistry, structural bioinformatics, pharmacokinetic.

1. INTRODUCTION

Computer-Aided Drug Design is a term used for computational tools used in research and drug development projects, having two basic methods: Structure-Based Drug Design, and Ligand-Based Drug Design. In the first approach, the three-dimensional structure of the molecular target - which may be an enzyme, membrane receptor, RNA, or DNA - is known. Thus, a molecule that best fits the target binding site can be modeled [1, 2].

In the second technique, biological activity of interest, such as antimicrobial or antifungal activity, and based on the

relationship between their physical-chemical properties and biological activities, structural modifications can be carried out to improve biological activities [3].

Another term used is Computer-aided Drug Discovery and Development, which involves both computational and experimental techniques in a complementary way [4-7] with the characteristics given below:

1. The use of computers to speed up the steps of drug discovery and development;
2. The increase in chemical and biological information concerning ligands and molecular targets for identification and optimization of new drugs;
3. Development of filters to eliminate molecules with unwanted characteristics;

*Address correspondence to this author at the Institute of Exact Science, Department of Computer Science, Federal University of Alfenas, P.O. Box: 37130-001, Alfenas, Minas Gerais, Brazil; Tel/Fax: +55-35-3701-9602, +55-35-3701-9603; E-mail: nelson.silveira@unifal-mg.edu.br

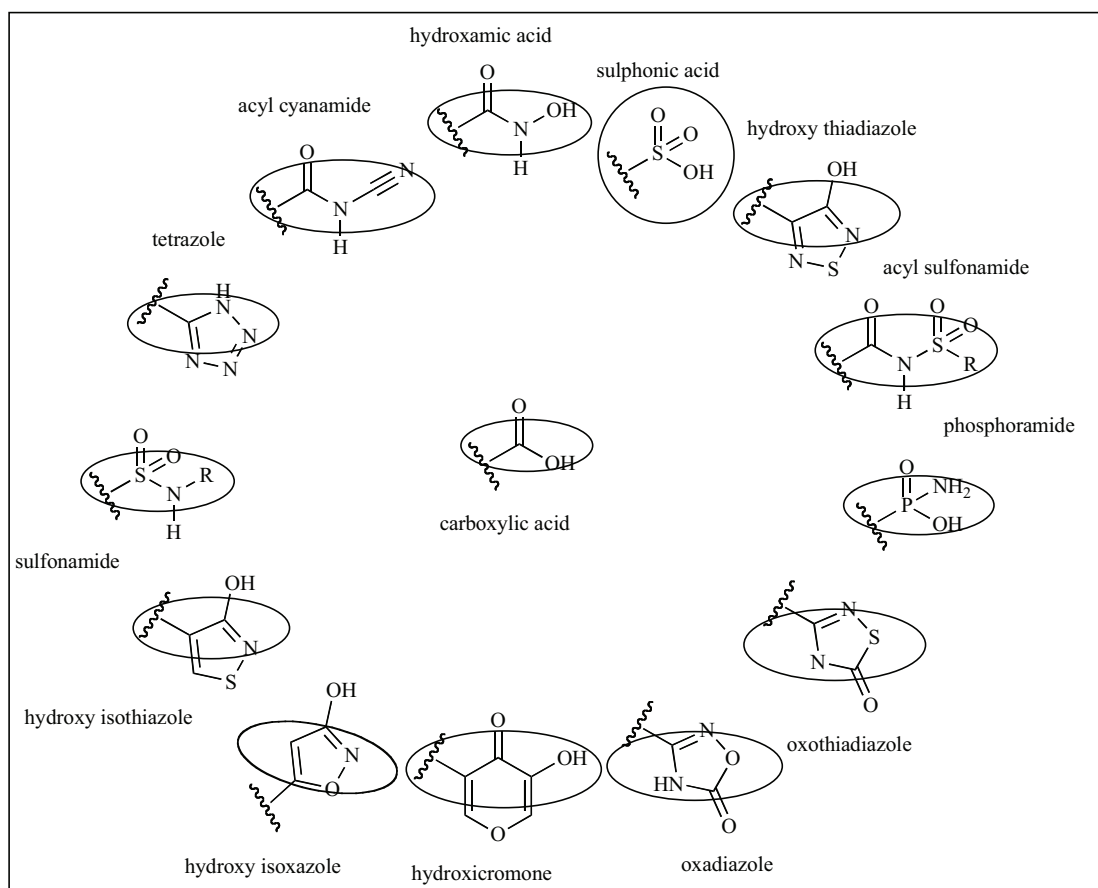


Fig. (1). Bioisosteres of the carboxylic acid group.

4. Methods to computational biology, such as Artificial Intelligence, Machine Learning, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation for obtaining new drugs for several diseases.

Computational chemistry can assist in the search for pharmacologically interesting molecules by reducing the number of compounds and experiments that must be carried out until clinical tests are available [8-10]. Due to the great potential of computational approaches in the early stages of drug discovery and development, pharmaceutical industries have invested in software development to search for new drugs in recent years [11]. For a molecule to become a new drug, it must have some characteristics: be safe, effective, chemically and metabolically stable, able to reach the molecular target, available from natural sources or synthesis, and patentable [12-15]. In the use of rational drug discovery candidates, there is identification and interpretation of the mode of action of biologically active compounds at the molecular level [16]. Among the strategies adopted in Medicinal Chemistry for the optimization of lead compounds, bioisosterism, a concept derived from isosteric, whose first research dates from the year 1919 with the researcher Langmuir, who investigated the similarities in physicochemical properties of different molecules, is there. Langmuir realized that molecules like N_2 and CO were similar in many physicochemical properties, concluding that this was due to the number and arrangement of electrons being equal between these molecules, thus the term isosteric. Later, in 1951,

Friedman proposed the term bioisosterism, which encompasses the concepts of isosteric, being extended to molecules with similar biological activity, in some cases antagonistic. Burger broadened this concept by saying that bioisosteres are compounds with a similar molecular shape and volume, with a similar electron distribution, showing common physical properties [17]. What characterizes bioisosterism is the fact that bioisosteres compounds interact with the same molecular target, and consequently, have similar biological activity [18]. Bioisosterism is used in the modification of lead compounds to improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties [19, 20].

2. BIOISOSTERISM

Bioisosterism is one of the strategies employed to modify compounds to enhance their activity. The term bioisosterism is related to molecular subunits with common physicochemical properties, such as molecular volume, electronic distribution, pKa, and logP. Due to this similarity, they may also have the same biological activity [21-23]. Because of this concept, a leading molecule can have one of its fragments replaced by another, which can modulate its pharmacokinetic and/or pharmacodynamic properties [24, 25]. For example, the carboxylic acid group has a set of bioisosteres subunits, as shown in Fig. (1) [26].

Bioisosterism can be classified as classic and non-classic [17]. Classical bioisosterism is based on the common

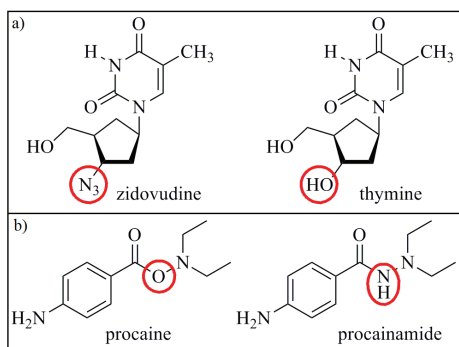


Fig. (2). In (a) drug zidovudine, an analog of the nucleotide thymine, and (b) bioisosteric relationship between the drugs procaine and procainamide.

valence of bioisosteric groups. In this category, the equivalent rings are also included. Thus, we have:

- Atoms and monovalent groups
- Atoms and divalent groups
- Atoms and trivalent groups

d) Atoms and tetravalent groups

e) Equivalent rings

Zidovudine, or AZT, is an antiretroviral drug used in the treatment of AIDS, acting on the enzyme reverse transcriptase (EC: 2.7.7.49) of HIV. It constitutes a monovalent type bioisomer related to the nucleoside thymine, in which an -OH group is replaced by an azide (Fig. 2a) [27].

The bioisosteric relationship of divalent groups is observed between the drugs procaine and procainamide, as shown in Fig. (2b). Procaine is used as a local anesthetic, while procainamide is used to treat cardiac arrhythmia. The structural difference between these two molecules is the replacement of an oxygen atom in procaine with an NH group in procainamide, resulting in an ester→amide transformation, making procainamide four times more stable *in vivo* than procaine [28].

The replacement of a hydrogen atom by fluorine is widely used in the development of antiviral and anti-tumor drugs. Such drugs are natural nucleoside analogs to inhibit DNA synthesis [29]. Fluoride can mimic hydrogen due to its van der Waals radius being 1.35 Å, while for hydrogen, there is a van der Waals radius of 1.10 Å, with a minimal increase in

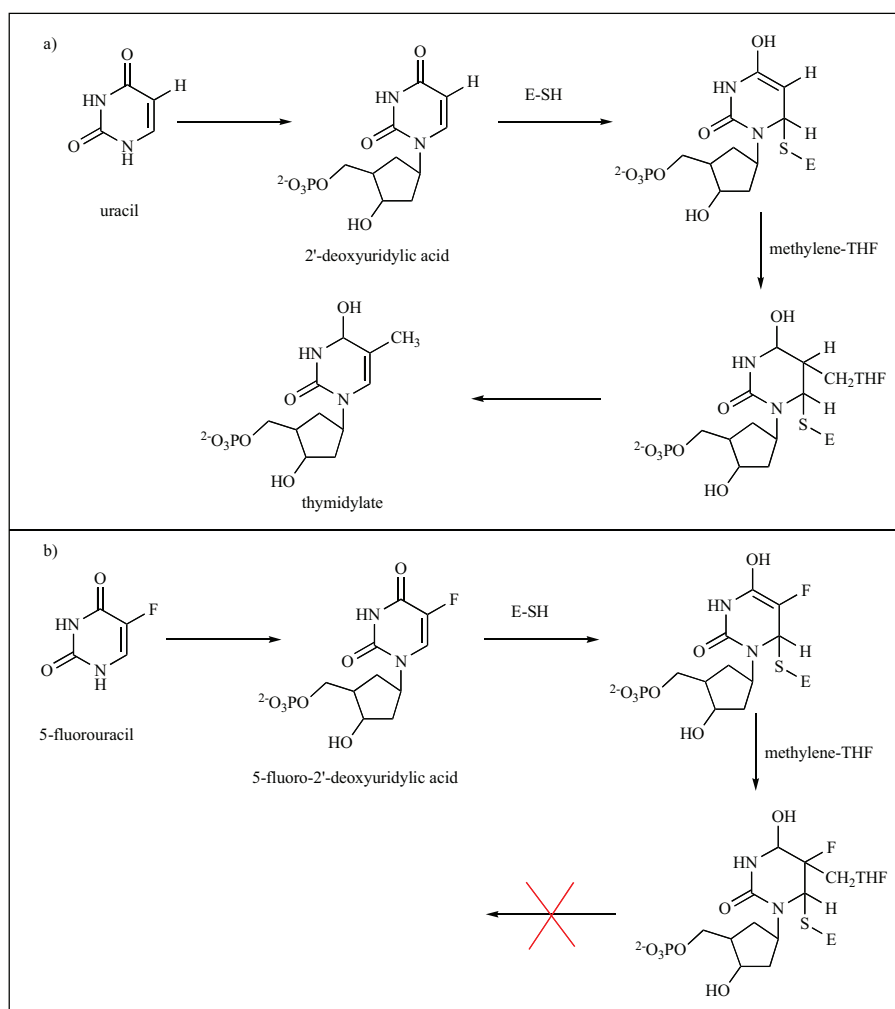


Fig. (3). Mechanism of inhibition of the enzyme thymidylate synthase by the drug 5-fluorouracil. In (a) normal biosynthetic route, and (b) inhibition with 5-fluorouracil. E-SH: thymidylate synthase enzyme; methylene-THF: acid 5,10-methylenetetrahydrofolic.

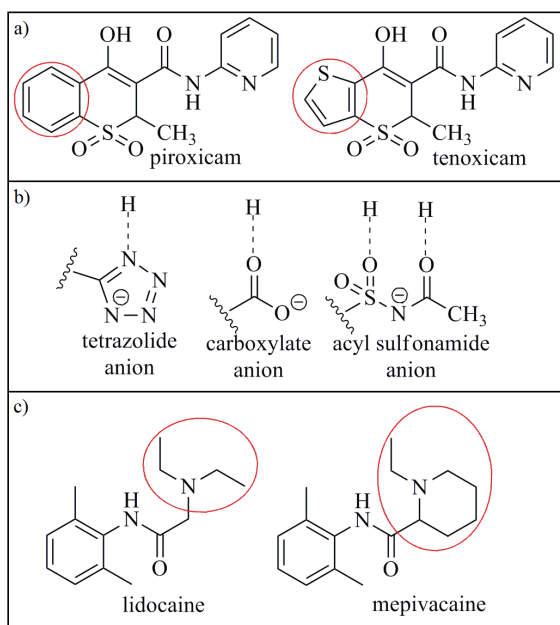


Fig. (4). In (a) development of the drug tenoxicam by ring bioisosterism, (b) an example of non-classical bioisosterism by biophors, and (c) biospheric ringing relationship between drugs lidocaine and mepivacaine.

steric effects [30]. However, the greater electronegativity of fluorine, and the impossibility of removing an F^+ ion from the molecule, in contrast to the easy removal of H^+ ions - commonly found in enzymatic reactions - make fluorinated nucleosides resistant to enzymatic action, blocking the pathway [31]. This mechanism is found in the anticancer drug 5-fluorouracil, an analog of uracil, a precursor of thymidylate [32]. In the body, 5-fluorouracil is converted to 5-fluoro-2'-deoxyuridyl acid, which in turn inhibits the enzyme thymidylate synthase by covalent bonding (Fig. 3).

The bioisosterism of equivalent rings is exemplified by the bioisosteric relationship between the phenyl ring and the thiophene. The drug tenoxicam was developed based on this strategy, as shown in Fig. (4a); its precursor is the drug piroxicam. Both molecules act on the enzyme cyclooxygen-

ase (EC: 1.14.99.1), having an application for the treatment of arthritis and osteoarthritis, however, the drug tenoxicam, with the thiophene group, has a longer half-life in blood plasma, allowing administration doses lower than 20 mg only once a day [33].

Biophor fragments are those which can interact with the receptor site of a biomacromolecule through a similar mechanism, as is the case with H-bond acceptors, exemplified by the tetrazole, carboxylate, and acyl sulfonamide fragments (Fig. 4b) [26]. Ringing occurs when an open-chain structure is replaced by another having a ring. The conformational restriction resulting from annealing will have positive effects if the active conformation of the open-chain bioisosteres is similar to that presented by the ringed bioisosteric. This relationship is observed between the drugs such as lidocaine and mepivacaine, first clinically used in 1948, and the second in 1957, both used as local anesthetics (Fig. 4c) [34]. Although they have equivalent properties, mepivacaine has a slightly longer action.

Non-classical bioisosterism includes functional groups with equivalent properties, retro-isosteric, isosteric biophors, annealing, and retro-annealing [20]. An example of non-classical bioisosterism for equivalent functional groups involves replacing the hydroxyl of a phenol function with the $-NHSO_2CH_3$ group (Fig. 5). Larsen and Lish synthesized a series of phenethanolamines with the alkyl sulfonamide group attached to the benzene ring, some of which showed activity on adrenergic receptors Fig. (5a) [35]. In another study, performed by Lin and collaborators, the same type of substitution was carried out on molecules with gonadotropin hormone antagonist activity with the sulfonamide derivative showing the better performance (Fig. 5b) [36].

Bioisosterism can be used to protect groups sensitive to the body's metabolic processes, as is the case with molecules that have the ester function, easily cleaved by plasma esterases (EC: 3.1.1.1). However, the replacement of the ester function by an oxazolic group prevents this metabolism (Fig. 6a) [37]. Another case is molecules with an amide group, a target of the action of amidases (EC: 3.5.1.4); exchanging the amide group for a pyrrole produces a molecule resistant to degradation by amidases (Fig. 6b) [38].

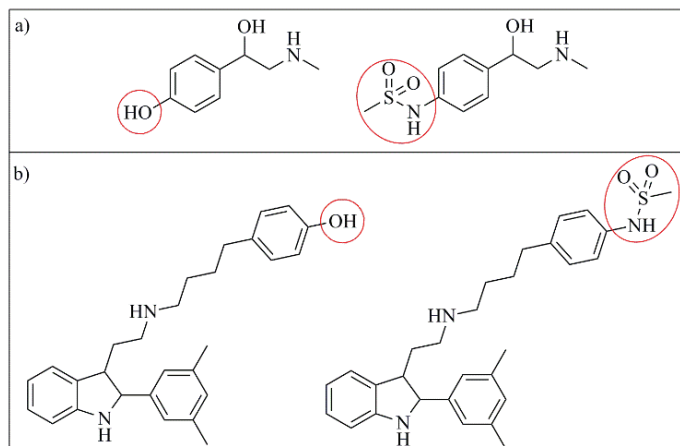


Fig. (5). Non-classical bioisosterism involving the exchange of hydroxyl of the phenol group by the group $-NHSO_2CH_3$. (a) showing compounds with activity on adrenergic receptors, and (b) showing compounds with gonadotropin hormone antagonist activity.

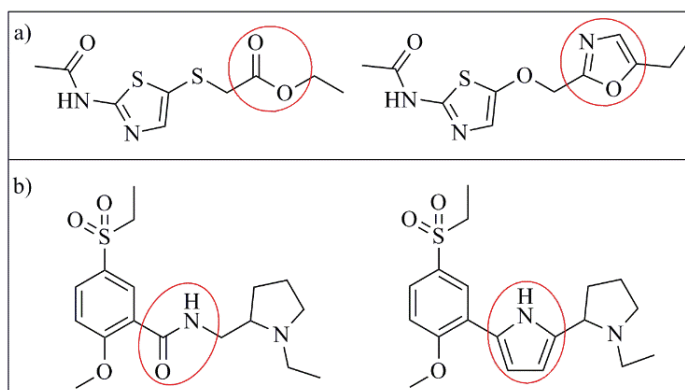


Fig. (6). Bioisosterism is used as a way to protect the molecule from the metabolic action of the body. (a) showing replacement of the ester group by an oxazolic group; (b) showing replacing an amide with a pyrrole.

3. WORKS INVOLVING BIOISOSTERISM

Several reports are highlighting the successful application of bioisosterism in drug design [19, 39-53, 56, 57]. In this section, four recent applications of this methodology in the development of drugs are described.

Hydrogen \rightarrow Fluorine replacement is a classic bioisosteric motif. Three-fluorinated mesoacetate analog has been investigated in its ability to change enzymatic stereoselectivity in prochiral substrates Fig. (7) [40]. Using HU380 lipase from *Pseudomonas fluorescens* as an enzymatic model, molecular docking showed that mesoacetate and its fluorinated analog binds to the active site in a different way exposing each one a diverse acetate group to catalytic residues A350, L345, S374, and S376. Experimental analysis in aq. buffer/DMF confirmed a change in enzymatic stereoselectivity with $> 95\%$ conversion. The authors suggested that this fluorinated analog can be used as a substrate in stereoselective synthesis.

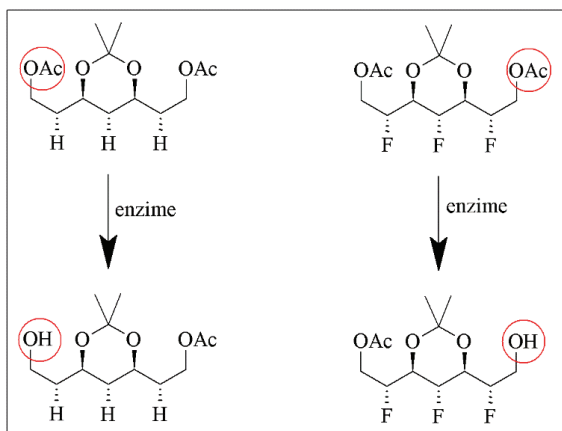


Fig. (7). Stereoselectivity in enzymatic reaction involving fluorinated analog.

Leishmaniasis is a tropical disease caused by *Leishmania* parasite species. Based on previous studies showing imidazolidinone compounds as potent antileishmanial, Ramu *et al.* (2019) synthesized three analogs, in which imidazolidinone ring has replaced by hydantoin or thiohydantoin ring. *In vitro* assay proved antileishmanial activity for these compounds. *In silico* molecular target, deconvolution indicated MAPK

(Mitogen-Activated Protein Kinase) as the most probable target. Apoptosis-like death was reported as a probable mechanism of action, supported by the following reasons observed in parasites treated with test compounds: intracellular Na^+ -homeostasis alteration (increasing Na^+ level), reactive oxygen species elevated level, cytochrome c present in cytosol, and DNA fragmentation [41] (Fig. 8).

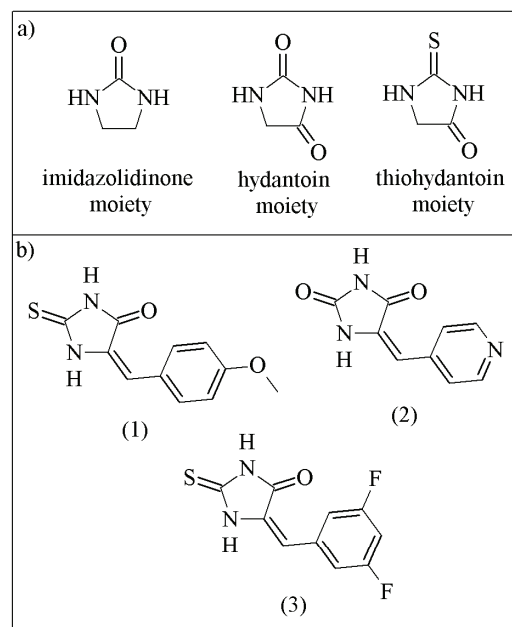


Fig. (8). Imidazolidinone derivatives with anti-leishmanial activity. In (a) Imidazolidinone's bioisosteric moieties and (b) Leishmanicidal imidazolidinone derivatives with bioisosteric moieties showed in (a).

AIDS is a retroviral disease caused by HIV. Drug-resistant mutants emerging is a challenge to combat this disease. Based on Rilpivirine structure, a marketed drug against HIV, Kang *et al.* (2020) developed compound **25a**, containing a thiophene[3,2-*d*]pyrimidine central ring (Fig. 9). Although compound **25a** showed high potency against wild-type and mutant strains, its hERG inhibitory activity and higher cytotoxicity block is used as a therapeutic agent. Therefore, researchers make a bioisosteric modification in the central ring, replacing thiophene[3,2-*d*]pyrimidine with thiophene[2,3-*d*]pyrimidine, developing six compounds with

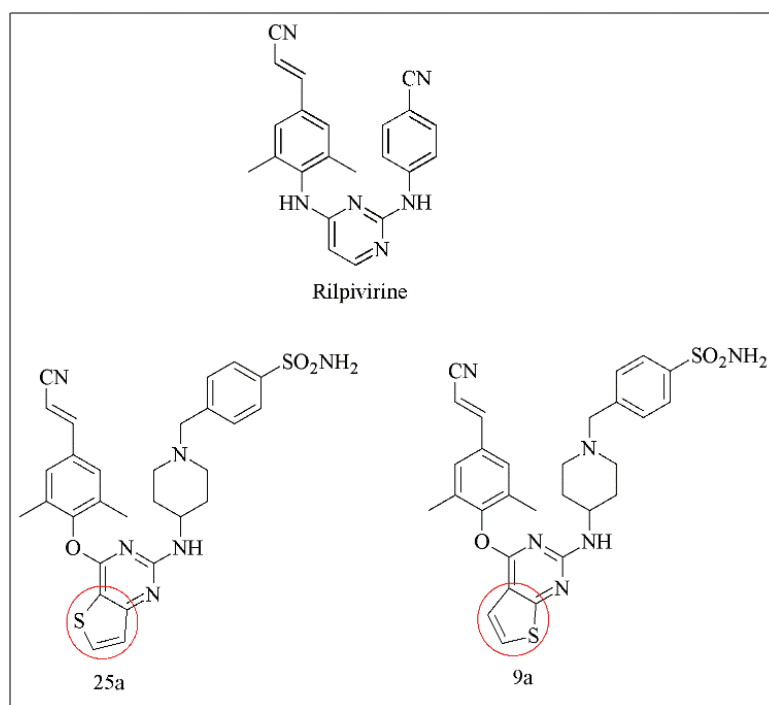


Fig. (9). HIV inhibitor development using thiophene[2,3-d]pyrimidine replacement.

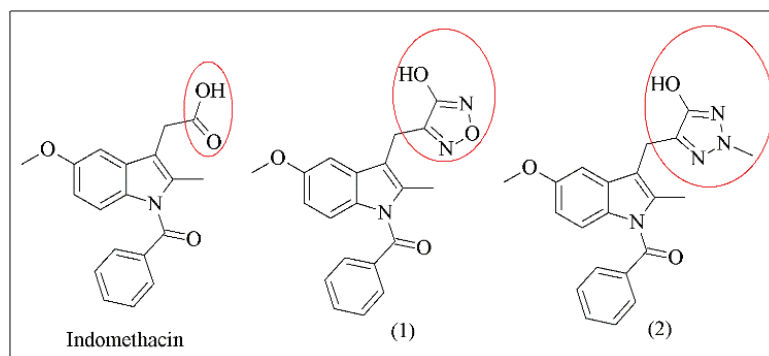


Fig. (10). Carboxylic acid replacement in indomethacin analogs.

different aryl substituents attached to piperidin-4-yl-amino moiety. Compound **9a** showed the most potent inhibition against wild type and mutant strains [42].

AKR1C3 (Aldo-keto reductase 1C3) is an enzyme involved in steroidal metabolism. Elevated AKR1C3 expression appears in some cancers, such as adenocarcinoma and colorectal cancer, making this enzyme a potential therapeutic target. To develop an inhibitor selective to AKR1C3 and not active against AKR1C1 and AKR1C2 isoforms and COX, avoiding gastrointestinal toxicity; marketed drug Indomethacin was used as a prototype compound [43, 58, 59]. Two indomethacin analogs were developed, replacing carboxylic acid moiety with hydroxyfurazan and 3-hydroxy-N1-methyl-1,2,5-triazole, respectively. Both analogs showed best selectivity compared to indomethacin (Fig. **10**).

Combinatorial chemistry is another technique used to discover lead compounds. It is based on the construction of a library of different molecules formed from the covalent bond between different building blocks, performed at random in the solid or liquid phase [44]. Once built, the chemical li-

brary can be screened against one or more molecular targets using HTS (High Throughput Screening) [45]. An example of a drug obtained by combinatorial chemistry is imatinib, whose anticancer activity occurs through the inhibition of tyrosine kinase. Its discovery came from a leading compound identified in a chemical library with ATP mimicking substances [46].

Bioisosterism is one of the strategies employed by medicinal chemists to modify compounds to enhance their activity. Bioisoster fragments are those capable of interacting with the receptor site of a biological macromolecule through a similar mechanism, as is the case with H-bond acceptors, exemplified by the tetrazole, carboxylate, and acyl sulfonamide fragments [47]. Ringing occurs when an open-chain structure is replaced by another having a ring. The conformational restriction resulting from annealing can have positive effects if the active conformation of the open-chain bioisoster is similar to that presented by the ringed bioisoster. This relationship is observed between the drugs such as lidocaine and mepivacaine, the first used clinically in 1948 and

SwissBioisostere

Home Examples FAQ License Contact

Welcome to the SwissBioisostere database

This website provides access to our knowledgebase of molecular replacements, useful for compound optimization in drug design.

Two different queries are possible:

- you are interested in a range of possible replacements for a single substructure (e.g. replacements for an amide group)
- you want to know details about a particular substructural replacement of interest (e.g. carboxylic acid vs. tetrazole)

Depending on your question, please enter either one or two substructures of interest in the following molecular sketchers. By submitting via "Query Database" the database will be queried.

For a replacement A->B query, please indicate attachment points in your substructures by R-groups R1-R3.

Examples can be found here.

ChEMBL version: 17
Data points: 19'523'709
Status: 14.01.2014
Release: 1.2.17

This web service is free for non-commercial use.
Commercial users find more information here.

Fragment 1

Fragment 2

Marvin for JavaScript Version 6.2

ChemAxon

SMILES

Fig. (11). The web page from the SwissBioisostere database server.

second in 1957, both used as local anesthetics [34]. Although they have equivalent properties, mepivacaine has a slightly longer action.

Bioisosterism can be used to protect groups sensitive to the metabolic processes of the organism, as is the case of molecules that present the ester function, easily cleaved by plasma esterases, however, the replacement of the ester function by an oxazolic group prevents this metabolization [48]. Another case is molecules with an amide group, the target of amidase action; exchanging the amide group for a pyrrole produces a molecule resistant to degradation by amidases [38]. Therefore, we observe the extensive power of support for the development of new drugs through the methodology of bioisosterisms in conjunction with computational methodologies of Artificial Intelligence and Machine Learning, producing software that can optimize the process of design and development of drugs.

4. SOFTWARES CREATED USING BIOISOSTERISM

Softwares created using the bioisosterism methodology is extremely useful for discovering and developing new drugs,

collaborating with research in several areas of knowledge for the solution of problems related to the cure of diseases. The softwares identified to modify molecular structures through bioisosterism were:

- SwissBioisostere [49]
- BoBER [50]
- MB-Isoster [51]
- MolOpt [52]

SwissBioisostere is a database containing data on 5 586 462 different types of bioisosteric transformations available at <http://www.swissbioisostere.ch> (Fig. 11). It was built using Matched Molecular Pairs (MMP) methods, in which almost identical molecules are sought, except for a small region, correlating their structures with physical-chemistry and pharmacological properties. The ChEMBL database [53] was used as the primary basis for data extraction and analysis, selecting molecules for which biological activity data, such as IC_{50} , EC_{50} , K_i , and K_d were noted. To use the base, the user must draw the fragment that he wants to search and the base returns the bioisosteric fragments are found, and a

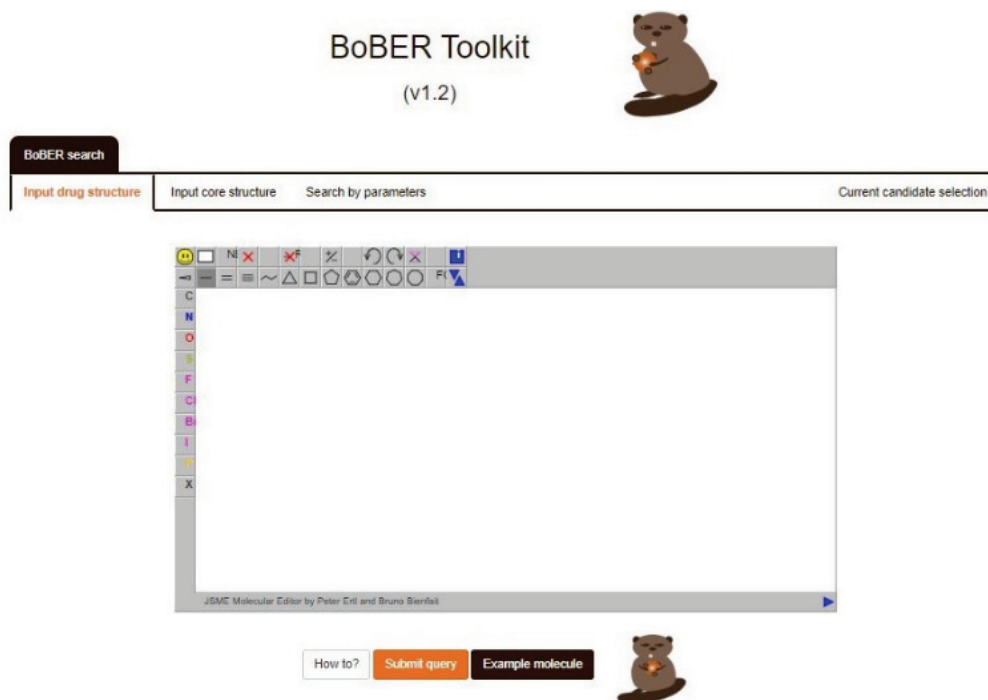


Fig. (12). The web page from the BoBER server. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

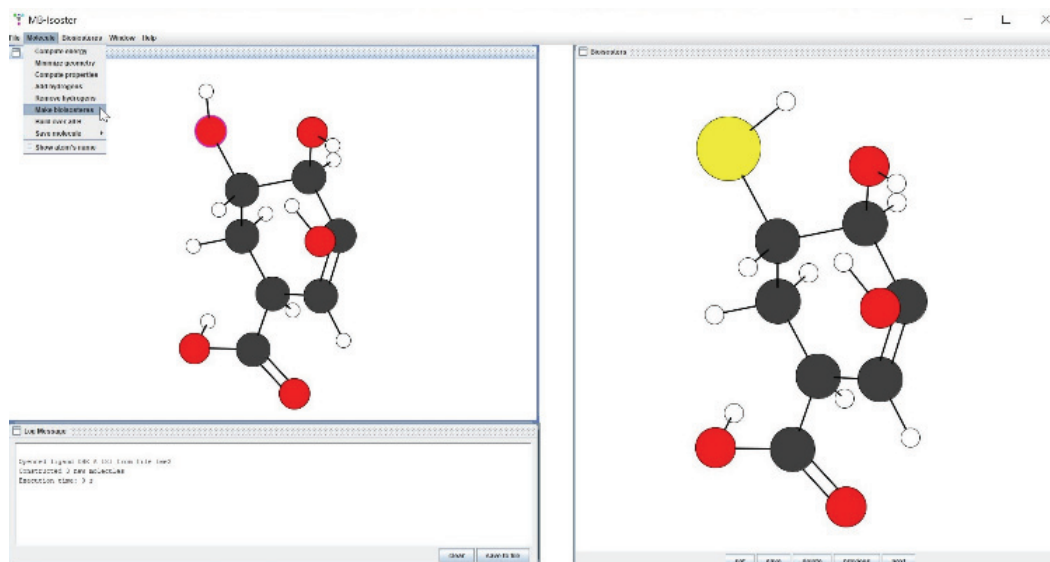


Fig. (13). The graphical interface from MB-Isoster software. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

percentage ratio of how many times a given bioisosteric substitution resulted in an improvement or worsening of biological activity or an equivalent compound. The SwissBioisostere database has the advantage of having a great library of bioisosteric relationships, with more than five million pairs of transformations.

BoBER is a web server that implements an interface for bioisosteric replacements, available at <http://bober.insilab.org> Fig. (12). In the construction of this database, PDB was used as the primary base. A process of overlapping proteins belonging to the same family and having cocrystallized ligands was carried out; the overlapping ligands were compared three-dimensionally to search for bioisosteric correla-

tions. When using the server, the user draws the complete molecule for which he wants bioisosteric analogs; the server fragments the molecule, and the user can select which fragment to use as a replacement. After the search, the found fragments are returned, the user chooses the fragment he intends to use, the molecule is built and can be downloaded.

The MB-Isoster program was developed at the Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation / MolMod-CS, to assist in the rational drug design based on the strategy of bioisosterism and is available free of charge at the electronic address <https://www.unifal-mg.edu.br/molmodcs/tools/> Fig. (13). The user enters the structure of the molecule of interest and selects the molecular fragment he

Fig. (14). The web page from the MolOpt server. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

wishes to modify, the program then consults a database containing bioisosteric relations based on the literature and builds new molecules. The bioisosteres generated can be filtered according to physical-chemistry properties calculated internally, such as $\log P$ and $\log S$, to select molecules with suitable pharmacokinetic properties. Another available function, which does not require the selection of fragments, consists of replacing a hydrogen atom in the original molecule with a substituent from a set of 35 radicals containing representative organic functions (methyl, hydroxyl, phenyl, *etc.*). A third function allows the user to read a receptor-ligand complex from a PDB file; non-ligand interactions (van der Waals and electrostatic) are computed between the atoms of the receptor and the ligand to indicate atoms of the ligand with higher energy values, as potential points for bioisosteric changes. Finally, a plugin was installed that allows running virtual screening between bioisosteres and a receiver of interest using the AutoDock Vina [54, 55] program as a molecular docking engine.

MolOpt is a web server for in silico drug design using bioisosteric transformation rules derived from data mining, deep generative machine learning models, and similarity comparison, available at <http://xundrug.cn/molopt> (Fig. (14)). MolOpt is useful for the navigation of historical bioisosteric group space and identifying new bioisosteric transformation ideas. MolOpt automatically generates lists of

analogs by replacing molecular substructures with chemical groups with similar biological properties. The resulting set of transformed analogs can be evaluated for possible future synthesis. MolOpt also evaluates forty important pharmacokinetic and toxic properties for each newly designed molecule.

CONCLUSION

Bioisosterism has been widely used in drug design research as a way to improve the activity of leading compounds. The substitution of a molecular fragment by another with similar physicochemical properties promotes the modulation of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Such observations make the bioisosterism method a great advance for obtaining new analogs to existing drugs, enabling the development of new drugs with less potential for toxicity in a comparative analysis with existing drugs.

The tools that use bioisosterism techniques have a wide spectrum to assist several research areas, mainly in chemistry and pharmacy, where all other subsequent areas fall under. There is an imminent need to establish effective methods for the design of drugs, as some researchers cited in the present work, along with their studies.

LIST OF ABBREVIATIONS

CDK	=	Chemistry Development Kit
MORT	=	Molecular Objects and Relevant Templates
N ₂	=	Nitrogen
CO	=	Carbon and Oxygen
pKa	=	Indicates the Strength of an Acid
logP	=	Partition Coefficient
AIDS	=	Acquired Immunodeficiency Syndrome
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
AZT	=	Zidovudine
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
F ⁺	=	Fluor
H ⁺	=	Hydrogen
E-SH	=	Thymidylate Synthase Enzyme
methylene-THF	=	Acid 5,10-methylenetetrahydro-folate
NH group	=	Nitrogen and Hydrogen Group
EC	=	Enzyme Coding
IC ₅₀	=	50% Inhibiting Concentration
VEGF	=	Vascular Endothelial Growth Factor
MMP	=	Matched Molecular Pairs
EC ₅₀	=	50% of the Experiment Shows a Response
K _i	=	Inhibition Constant
K _d	=	Dissociation Constant
MolMod-CS	=	Molecular Modeling and Computer Simulation
logS	=	Solubility Coefficient

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

NJFS is a senior researcher from UNIFAL-MG and head from researcher group MolMod-CS (CNPq group directories). WFA is a senior researcher for CNPq (Brazil) (Process Numbers: 308883/2014-4 and 309029/2018-0). RCG is a senior researcher from Institute for Medicines (iMed.Ulisboa) and Department of Pharmaceutical Chemistry and Therapeutics, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon. LMS is a Ph.D. student in the PPGQ and a member of the MolMod-CS Laboratory. RCM is an MSc student in the PPGCB and a member of the MolMod-CS Laboratory. PSA is a graduate student in Biotechnology and a member of the MolMod-CS Laboratory. TCE is a Ph.D. in chemistry, developed the MB-Isoster software, and is a member of the MolMod-CS Laboratory.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

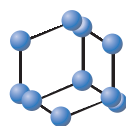
REFERENCES

- [1] Srivastava P, Tiwari A. Critical role of computer simulations in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem* 2017; 17(21): 2422-32. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026617666170403113541> PMID: 28366137
- [2] Freitas PG, Elias TC, Pinto IA, *et al.* Computational approach to the discovery of phytochemical molecules with therapeutic potential targets to the PKCZ protein. *Lett Drug Des Discov* 2017; 14: 1-12.
- [3] Yu W, Mackerell ADJ. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. 2017; Vol. 1520: pp. 85-106.
- [4] Moretti L, Sartori L. Software infrastructure for computer-aided drug discovery and development, a practical example with guidelines. *Mol Inform* 2016; 35(8-9): 382-90. <http://dx.doi.org/10.1002/minf.201501037> PMID: 27546042
- [5] Wang Y, Du Y, Huang N. A survey of the role of nitrile groups in protein-ligand interactions. *Future Med Chem* 2018; 10(23): 2713-28. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2018-0252> PMID: 30518255
- [6] Nagarajan N, Yapp EKY, Le NQK, Yeh HY. *In silico* screening of sugar alcohol compounds to inhibit viral matrix protein VP40 of Ebola virus. *Mol Biol Rep* 2019; 46(3): 3315-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-019-04792-w> PMID: 30982214
- [7] Nagarajan N, Yapp EKY, Le NQK, Kamaraj B, Al-Subaie AM, Yeh HY. Application of computational biology and artificial intelligence technologies in cancer precision drug discovery. *BioMed Res Int* 2019; 2019: 8427042.
- [8] Tsui V, Ortwine DF, Blaney JM. Enabling drug discovery project decisions with integrated computational chemistry and informatics. *J Comput Aided Mol Des* 2017; 31(3): 287-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-016-9988-y> PMID: 27796615
- [9] Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(D1): D353-61. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1092> PMID: 27899662
- [10] Croft RA, Mousseau JJ, Choi C, Bull JA. Lithium-catalyzed thiol alkylation with tertiary and secondary alcohols: synthesis of 3-sulfanyl-oxetanes as bioisosteres. *Chemistry* 2018; 24(4): 818-21. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201705576> PMID: 29181870
- [11] Luty B, Rose PW. The need for scientific software engineering in the pharmaceutical industry. *J Comput Aided Mol Des* 2017; 31(3): 301-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-016-9997-x> PMID: 27995514
- [12] Case DA, Cheatham TE III, Darden T, *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 2005; 26(16): 1668-88. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20290> PMID: 16200636
- [13] Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, Load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput* 2008; 4(3): 435-47. <http://dx.doi.org/10.1021/ct700301q> PMID: 26620784
- [14] Labute P, Williams C, Feher M, Sourial E, Schmidt JM. Flexible alignment of small molecules. *J Med Chem* 2001; 44(10): 1483-90. <http://dx.doi.org/10.1021/jm0002634> PMID: 11334559

- [15] Dixon SL, Smondryev AM, Knoll EH, Rao SN, Shaw DE, Friesner RA. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *J Comput Aided Mol Des* 2006; 20(10-11): 647-71.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10822-006-9087-6> PMID: 17124629
- [16] Steinbeck C, Han Y, Kuhn S, Horlacher O, Luttmann E, Willighagen E. The Chemistry Development Kit (CDK): an open-source Java library for Chemo- and Bioinformatics. *J Chem Inf Comput Sci* 2003; 43(2): 493-500.
<http://dx.doi.org/10.1021/ci025584y> PMID: 12653513
- [17] Burger A. Isosterism and bioisosterism in drug design. *Prog Drug Res* 1991; 37: 287-371.
PMID: 1763185
- [18] Meanwell NA. Fluorine and fluorinated motifs in the design and application of bioisosteres for drug design. *J Med Chem* 2018; 61(14): 5822-80.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788> PMID: 29400967
- [19] Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F. The bioisosteric concept applied to cannabinoid ligands. *Curr Med Chem* 2012; 19(28): 4794-815.
<http://dx.doi.org/10.2174/092986712803341575> PMID: 22830341
- [20] Lin Y, Chen Z-Y, Yang F, *et al.* Application of molecular imaging technologies in antitumor drug development and therapy. *Curr Pharm Des* 2015; 21(16): 2136-46.
<http://dx.doi.org/10.2174/1381612821666150109122915> PMID: 25578891
- [21] Barreiro EJ, Fraga CAM. Bioisosterism as a Strategy for Planning, Design, Molecular Modification and Optimization of Binders and Prototype Compounds. In: *Medicinal chemistry: The molecular basis of drugs action*. Porto Alegre 2015; pp. 30.
- [22] Jampilek J. Heterocycles in medicinal chemistry. *Molecules* 2019; 24(21): 3839.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules24213839> PMID: 31731387
- [23] Hevey R. Bioisosteres of carbohydrate functional groups in glycomimetic design. *Biomimetics* (Basel) 2019; 4(3): 53.
<http://dx.doi.org/10.3390/biomimetics4030053> PMID: 31357673
- [24] Langmuir I. Isomorphism, isosterism and covalence. *J Am Chem Soc* 1919; 41: 1543-59.
<http://dx.doi.org/10.1021/ja02231a009>
- [25] Tseng CC, Baillie G, Donvito G, *et al.* The trifluoromethyl group as a bioisosteric replacement of the aliphatic nitro group in CB1 receptor positive allosteric modulators. *J Med Chem* 2019; 62(10): 5049-62.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00252> PMID: 31050898
- [26] Barreiro EJ. *Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. 3rd ed. Porto Alegre: ARTMED 2015.
- [27] van Wijngaarden I, Kruse CG, van Hes R, van der Heyden JAM, Tulp MT. 2-Phenylpyrroles as conformationally restricted benzamide analogues. A new class of potential antipsychotics. 1. *J Med Chem* 1987; 30(11): 2099-104.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm00394a028> PMID: 2889830
- [28] Loftsson. *T Drug stability for pharmaceutical scientists*. Oxford: Academic Press 2014.
- [29] Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2011; 7(2): 146-57.
<http://dx.doi.org/10.2174/157340911795677602> PMID: 21534921
- [30] Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 4559-60.
<http://dx.doi.org/10.1021/ja01573a087>
- [31] Kirk KL. Selective fluorination in drug design and development: an overview of biochemical rationales. *Curr Top Med Chem* 2006; 6(14): 1447-56.
<http://dx.doi.org/10.2174/156802606777951073> PMID: 16918460
- [32] Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, *et al.* Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179(4561): 663-6.
<http://dx.doi.org/10.1038/179663a0> PMID: 13418758
- [33] Binder D, Hromatka O, Geissler F, *et al.* Analogues and derivatives of tenoxicam. 1. Synthesis and antiinflammatory activity of analogues with different residues on the ring nitrogen and the amide nitrogen. *J Med Chem* 1987; 30(4): 678-82.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm00387a017> PMID: 3494124
- [34] Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(3): 175-82.
<http://dx.doi.org/10.2174/1568026013395335> PMID: 11895133
- [35] Mykhailiuk PK. Saturated bioisosteres of benzene: where to go next? *Org Biomol Chem* 2019; 17(11): 2839-49.
<http://dx.doi.org/10.1039/C8OB02812E> PMID: 30672560
- [36] Lin P, Marino D, Lo JL, *et al.* 2-(3,5-Dimethylphenyl)tryptamine derivatives that bind to the GnRH receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(8): 1073-6.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00134-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00134-2) PMID: 11327593
- [37] Kim KS, Kimball SD, Misra RN, *et al.* Discovery of aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and biological activities. *J Med Chem* 2002; 45(18): 3905-27.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm0201520> PMID: 12190313
- [38] Swapna GVT, Jagannadh B, Gurjar MK, Kunwar AC. NMR investigation on the structure and conformation of 3'-azido-2',3'-dideoxyribosylthymine (AZT), an inhibitor of the HIV (AIDS virus). *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164(3): 1086-92.
[http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91780-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(89)91780-4) PMID: 2590188
- [39] Vital DG, Damasceno FS, Rapado LN, *et al.* Application of bioisosterism in design of the semicarbazone derivatives as cruzain inhibitors: a theoretical and experimental study. *J Biomol Struct Dyn* 2017; 35(6): 1244-59.
<http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2016.1176603> PMID: 27064715
- [40] Bentler P, Bergander K, Daniliuc CG, *et al.* Inverting small molecule-protein recognition by the fluorine *Gauche* effect: Selectivity regulated by multiple H→F bioisosterism. *Angew Chem Int Ed Engl* 2019; 58(32): 10990-4.
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201905452> PMID: 31157945
- [41] Ramu D, Jain R, Kumar RR, *et al.* Design and synthesis of imidazolidinone derivatives as potent anti-leishmanial agents by bioisosterism. *Arch Pharm (Weinheim)* 2019; 352(4): e1800290.
<http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201800290> PMID: 30801775
- [42] Kang D, Feng D, Sun Y, *et al.* Structure-based bioisosterism Yields HIV-1 NNRTIs with improved drug-resistance profiles and favorable pharmacokinetic properties. *J Med Chem* 2020; 63(9): 4837-48.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00117> PMID: 32293182
- [43] Khanim F, Davies N, Veliça P, *et al.* Selective AKR1C3 inhibitors do not recapitulate the anti-leukaemic activities of the pan-AKR1C inhibitor medroxyprogesterone acetate. *Br J Cancer* 2014; 110(6): 1506-16.
<http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.83> PMID: 24569460
- [44] Liu R, Li X, Lam KS. Combinatorial chemistry in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2017; 38: 117-26.
- [45] Pandeya SN, Thakkar D. Combinatorial chemistry: A novel method in drug discovery and its application. *Indian J Chem Nova Deli* 2005; 44B: 335-48.
- [46] Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(7): 493-502.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd839> PMID: 12120256
- [47] Barreiro EJ, Fraga CAM. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed 2008.
- [48] Kim KS, Kimball SD, Misra RN, *et al.* Discovery of aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and biological activities. *J Med Chem* 2002; 45(18): 3905-27.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm0201520> PMID: 12190313
- [49] Wirth M, Zoete V, Michielin O, Sauer WHB. SwissBioisostere: a database of molecular replacements for ligand design. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D1137-43.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1059> PMID: 23161688
- [50] Lešnik S, Škrlić B, Eržen N, *et al.* BoBER: web interface to the base of bioisosterically exchangeable replacements. *J Cheminform* 2017; 9(1): 62.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13321-017-0251-x> PMID: 29234984
- [51] Elias TC, de Oliveira HCB, da Silveira NJF. MB-Isoster: A software for bioisosterism simulation. *J Comput Chem* 2018; 39(29): 2481-7.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.25581> PMID: 30318630

- [52] Shan J, Ji C. MolOpt: a web server for drug design using bioisosteric transformation. *Curr Comput Aided Drug Des* 2020; 16(4): 460-6.
- [53] Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, et al. ChEMBL: A large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res* 2011; 40. PMID: 21948594
- [54] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009; 30(16): 2785-91. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256> PMID: 19399780
- [55] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010; 31(2): 455-61. PMID: 19499576
- [56] Coelho CM, Santos T, Freitas PG, et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of novel eugenol esters as leishmanicidal agents. *J Braz Chem Soc* 2018; 29: 715-28.
- [57] Freitas PG, Castilho TE, Almeida L, et al. An *in silico* study of Benzophenone derivatives as potential non-competitive inhibitors of trypanosoma cruzi and leishmania amazonensis cysteine proteases. *J Braz Chem Soc* 2018; 29(3): 515-27. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170164>
- [58] Henrique T, José Freitas da Silveira N, Henrique Cunha Volpato A, et al. HNdb: an integrated database of gene and protein information on head and neck squamous cell carcinoma. *Database (Oxford)* 2016; 2016: 1-11. <http://dx.doi.org/10.1093/database/baw026> PMID: 27013077
- [59] Alves Pinto I, Freitas Da Silveira NJ. *In silico* identification of potential inhibitors of the wnt signaling pathway in human breast cancer. *J Comput Biol* 2020; 27(7): 999-1010. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2019.0311> PMID: 31647315

APÊNDICE N – Segundo artigo publicado concernente ao tema central da Tese intitulado:
Fragment-based drug discovery successful contributions to current pharmacotherapeutic agents arsenal against aggressive cancers: A mini-review.



Fragment-based Drug Discovery Successful Contributions to Current Pharmacotherapeutic Agents Arsenal against Aggressive Cancers: A Mini-Review



Leandro Marcos Santos^{1,2,*} and Nelson José Freitas da Silveira¹

¹Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation / MolMod-CS (D311-F), Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas / UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, 37130-001, Brazil; ²Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory / LQFar (D202A), Department of Food and Medicines, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas / UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, 37130-001, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: January 31, 2023
Revised: May 08, 2023
Accepted: May 12, 2023

DOI:
10.2174/1871520623666230714163823



CrossMark

Abstract: After a decade of approval of the drug vemurafenib in 2011, the hopeless scenario imposed by some severe cancer types has been mitigated by the magic bullets developed through fragment-based drug discovery. Moreover, this recent approach to medicinal chemistry has been successfully practiced by academic laboratories and pharmaceutical industry workflows focused on drug design with an enhanced profile for chemotherapy of aggressive tumors. This mini-review highlights the successes achieved by these research campaigns in the fruitful field of the molecular fragment paradigm that resulted in the approval of six new anticancer drugs in the last decade (2011-2021), as well as several promising clinical candidates. It is a particularly encouraging opportunity for other researchers who want to become aware of the applicability and potency of this new paradigm applied to the design and development of powerful molecular weapons in the constant war against these merciless scourges of humanity.

Keywords: Cancer, magic bullets, fragment-based drug discovery, medicinal chemistry, pharmaceutical industry, drug design, chemotherapy.

1. INTRODUCTION

Malignant neoplasm incidence and mortality rates have been gradually increasing worldwide. Cancer, with all its perverse facets, represents one of the major maladies that are detrimental to improving the quality and life expectancy of human populations. The latest statistics released by the World Health Organization (WHO) indicate that malignant tumors are the leading cause of death before the age of 70 in both sexes in 112 countries, (Fig. 1).

These tragic figures show that 19 million new cases were diagnosed and almost 10 million deaths occurred in 2020, confirming cancer as one of the most difficult global public health problems to combat [1]. In this sense, clinical oncology is increasingly demanded and challenged by this complex health conjuncture [2]. New effective forms of therapy have always contributed tirelessly to the field of medicine and pharmaceutical innovation and, in this multi-disciplinary horizon, medicinal chemistry plays a strategic and crucial role [3, 4]. The ideological merging of the models proposed by Hermann Emil Fischer ("lock and key" model) and Paul Ehrlich ("magic bullet" or "one drug, one target" paradigm) at the beginning of the 20th century gave rise to the first great paradigm of medicinal chemistry that is implicitly embedded in the other paradigms that followed. It has guided practically all innovations in drugs since then and in the 21st century this same purpose is still being pursued in the search for a meticulous understanding of the ligand-receptor molecular complementarity at a level of specificity applicable and adequate to trigger the desired biological response without causing significant collateral damage [5-7].

One of the most recent strategies for new drug development is fragment-based drug discovery (FBDD, whose acronym is also used for fragment-based drug design) [8]. This strategy emerged in

the late 20th century (less than three decades of rise) and simply aggregates the best features of some of the main approaches known and used in medicinal chemistry to invent drugs, such as ligand-based drug discovery (LBDD, which provides chemical inspiration coming from small biologically active molecules, *i.e.*, the "key template", or the "magic bullet"), structure-based drug discovery (SBDD, which provides the structural insight from binding sites for the most stable fitting of designed molecules with high structural complementarity, *i.e.*, the "lock template"), and high-throughput screening (HTS, which makes it possible to examine large subsets of the chemical space against biological targets). Among the main FBDD advantages can be mentioned: i) more efficient exploration of the drug-like chemical space, with greater chemical diversity of functional groups and pharmacophores; ii) lower degree of molecular complexity; iii) savings in time, and experimental costs; and, iv) greater versatility of application, whether in industry or academia. Furthermore, FBDD relies on X-ray crystallography (XRC) and other valuable resources of age 4.0 (*e.g.*, computer-aided drug design, CADD, and biophysical/biochemical screening techniques, BT) to justify its higher success rate compared to conventional approaches (LBDD, SBDD, and HTS) with a few successful pharmacological agents and several clinical candidates in such a short period of time [8, 9]. Six new anticancer drugs resulting from the FBDD strategy are shown in Fig. (2). These chemotherapeutics obtained approval from the US Food and Drug Administration (FDA) during the period 2011-2021 [10]:

1. ZELBORAF[®] / FDA Approval: August 2011 / Indication: Metastatic Melanoma (MM) / Active ingredient: Vemurafenib / Molecular Target: BRAF^{V600E} (mutant B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein);

2. VENCLEXTA[®] / FDA Approval: April 2016 / Indication: Acute (ALL) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) / Active ingredient: Venetoclax / Molecular Target: Bcl-2 (B-cell lymphoma 2 oncoproteins);

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation / MolMod-CS (D311-F), Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas / UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, 37130-001, Brazil; E-mail: leandro.santos@unifal-mg.edu.br

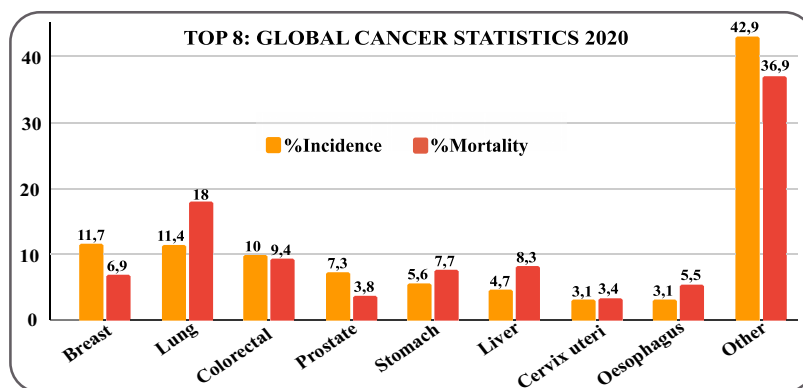


Fig. (1). Latest global cancer statistics released for the calendar year 2020 by the International Agency for Research on Cancer (IARC) from the WHO. The top 8 most incidental and deadly cancers worldwide considering individuals of both sexes up to 70 years of age. In absolute number of incidence/mortality 19,292,789/9,958,133 cases were reported: Breast (2,261,419/684,996); Lung (2,20,771/1,796,144); Colorectum (1,931,590/935,173); Prostate(1,414,259/375,304); Stomach (1,089,103/768,793); Liver (905,677/830,180); Cervix uteri (604,127/341,831); Oesophagus (604,100/544,076); Other (8,275,743/3,681,636). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

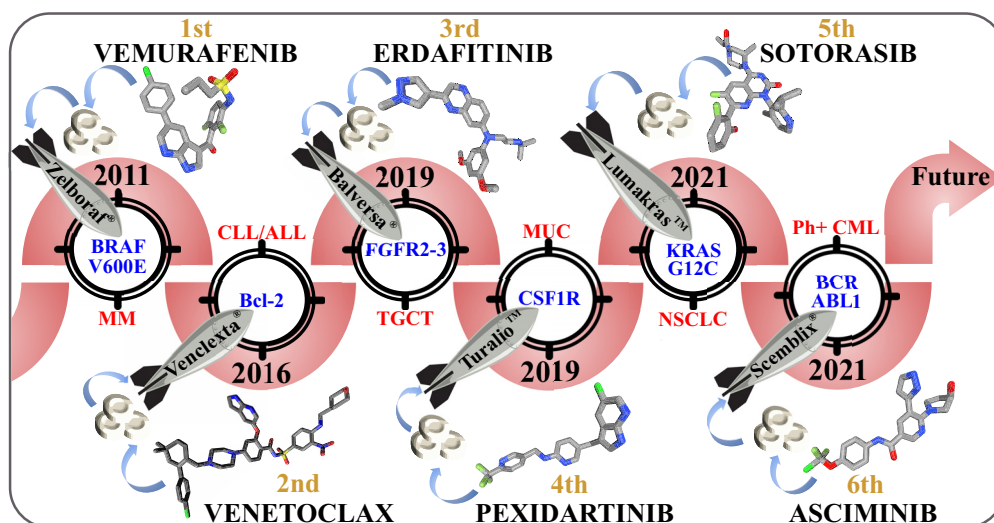


Fig. (2). FBDD timeline of its six FDA-approved magic bullets over the past decade against highly dangerous cancers. Hydrogen atoms have been omitted in the illustration of the drug molecular structures for clarity (carbon atoms = gray; chlorine atoms = green; fluorine atoms = light-green; nitrogen atoms = blue; oxygen atoms = red; sulfur atoms = yellow). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

3. BALVERSA® / FDA Approval: April 2019 / Indication: Metastatic Urothelial Carcinoma (MUC) / Active principle: Erdafitinib / Molecular target: FGFR2-3 (Fibroblast Growth Factor Receptors 2-3);

4. TURALIO™ / FDA Approval: August 2019 / Indication: Tenosynovial Giant Cell Tumor (TGCT) / Active principle: Pexidartinib / Molecular target: CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor);

5. LUMAKRAS™ / FDA Approval: May 2021 / Indication: Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) / Active principle: Sotorasib / Molecular target: KRAS^{G12C} (mutant Kirsten Rat Sarcoma protein);

6. SCEMBLIX® / FDA Approval: October 2021 / Indication: Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myeloid Leukemia (Ph+ CML) / Active principle: Asciminib / Molecular target: BCR-ABL1 (mutant Breakpoint Cluster Region-Abelson Leukemia protein).

The theoretical basis of this new paradigm in medicinal chemistry is founded on the premise whose prime statement admits that the binding affinity of a given molecule for the receptor site of the bio-

logical target can be interpreted as the sum of the contributions of each of its structural parts or subunits. Thus, the ligand efficiency (LE) of the molecule as a whole is considered a contribution of each constituent atom and not only of those recognized functional groups (pharmacophores) that interact directly with target residues. FBDD, as well as other paradigms, can be explored from basic research projects to more advanced workflows in different stages of the discovery/development process, either in the academic environment or in the pharmaceutical industry focused on the invention of new drugs [9-11].

The present article aims at the dissemination of knowledge in the area of FBDD, offering a brief review of this theme, approached in a manner directly applied to the current scenario of clinical oncology and exalting the most important aspects of the rise of its corroborative proof of concept with six anticancer agents approved in just one decade.

2. ZELBORAF®: VEMURAFENIB

Coincidentally, the molecular roots of vemurafenib (3e), (Fig. 3), emerged around the same time as the theoretical conception of the

FBDD paradigm. In 1983, homologous genes related to the molecular target that this drug strikes, began to be reported in the literature. The team of researchers accomplished a feat this time, succeeding in cloning the mouse retrovirus, murine sarcoma virus (3611-MSV), and completely mapping the oncogene it transduces. The retrovirus 3611-MSV induces rapid growth of fibrosarcoma in mice, and therefore the oncogene it originated was named viral rapidly accelerated fibrosarcoma (V-RAF) [12]. Another homologous oncogene of cellular origin was described in this same work and named cell-rapidly accelerated fibrosarcoma (C-raf). Subsequently, the other two isoforms of c-RAF were identified, in 1987, the human oncogene A-RAF was reported [13], and in 1988 its paralog, the human oncogene B-raf, was identified as a transformation gene in a sample of Ewing's sarcoma [14]. This RAF gene family encodes the RAF family proteins formed by serine/threonine (Ser/Thr) kinases that participate in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade. In addition to RAF kinases, other proteins also integrate this cascade, such as rat sarcoma protein (RAS), mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK). Thus, RAF kinases play key roles in several important cell cycle pathways including cell progression, proliferation, metabolism, migration, differentiation, and apoptosis. It is widely proven that dysregulation of the MAPK pathway is driven by BRAF mutations that may be associated with 30% of human cancers including breast, ovarian, thyroid, prostate, melanoma, and others [15]. In 2002, the role of BRAF in the development of skin cancer was elucidated after a systematic genetic screening of several human cutaneous melanomas. It was found that almost all BRAF mutations had the substitution of valine (Val600) at position 600 by glutamine (Glu), so this oncogenic mutant isoform was called BRAF^{V600E}. This simple point change causes BRAF^{V600E} to promote constitutive activation (autoactivation) of the B-RAF kinase, resulting in permanent downstream MAPK pathway signaling in the absence of an extracellular stimulus, stimulating uncontrolled cell growth and proliferation. Mutant B-RAF kinase is associated with most malignant melanomas (down to 70%) implicating growth, survival, migration of cancer cells, and other aforementioned cellular processes [16].

Extensive studies have demonstrated a clear relationship between BRAF oncogene mutational status and cancer progression and when it was identified in specific diagnostic tests, it was usually associated with the worst possible prognosis of the disease which is metastatic melanoma with considerably reduced survival [17, 18]. In fact, until the first decade of the 21st century, the clinic did not have encouraging pharmacotherapeutic resources for this type of tumor. As a result, some nonspecific chemotherapy cocktails were used, such as a combination of dacarbazine (DTIC) and high doses of interleukin-2 (IL-2), which were not effective in most cases and, consequently, did not bring about a healthy improvement in the clinical condition of the patients, causing them unpleasant side effects due to its marked toxicity. This one possibility was the reality of a sad health conjuncture that settled in clinical oncology and challenged the researchers to quest, in the immense chemical space available, for specific pharmacological options, still non-existent at that time, to inhibit the oncogenic B-RAF kinase and benefit patients diagnosed with this highly deleterious and lethal melanoma [19]. The pharmaceutical innovation project began in 2005 by screening a chemical library with approximately 20,000 fragments against several kinases using biophysical techniques, (Fig. 3) [20-22].

A concentration of 200 μ M (micromolar, *i.e.*, 10⁻⁶M) represented the minimum expected inhibition threshold for consideration of potential hits. Based on this criterion, a collection of 238 hits was selected to undergo crystallization assays on these kinases. This crystallographic step was crucial and resulted in over 100 elucidated structures containing these proteins and the co-crystallized ligand. In particular, the kinase encoded by the proto-oncogene Pim-1 (PIM1 kinase) crystallized with several ligands and among them the 7-azaindole (7-AI) fragment (3b). Similarly, this heterocyclic group occupied positions very close to those of the adenine ring (3a) of adenosine triphosphate (ATP) and exhibited distinct binding modes in each of the four kinase monomers of the asymmetric unit. Subsequently, the first chemical series derived from 7-AI was designed and synthesized. Among the most prominent compounds were the 3-aminophenyl derivative (3c) that exhibited an inhibitory concentration (IC₅₀, concentration required to inhibit 50% of the activity)

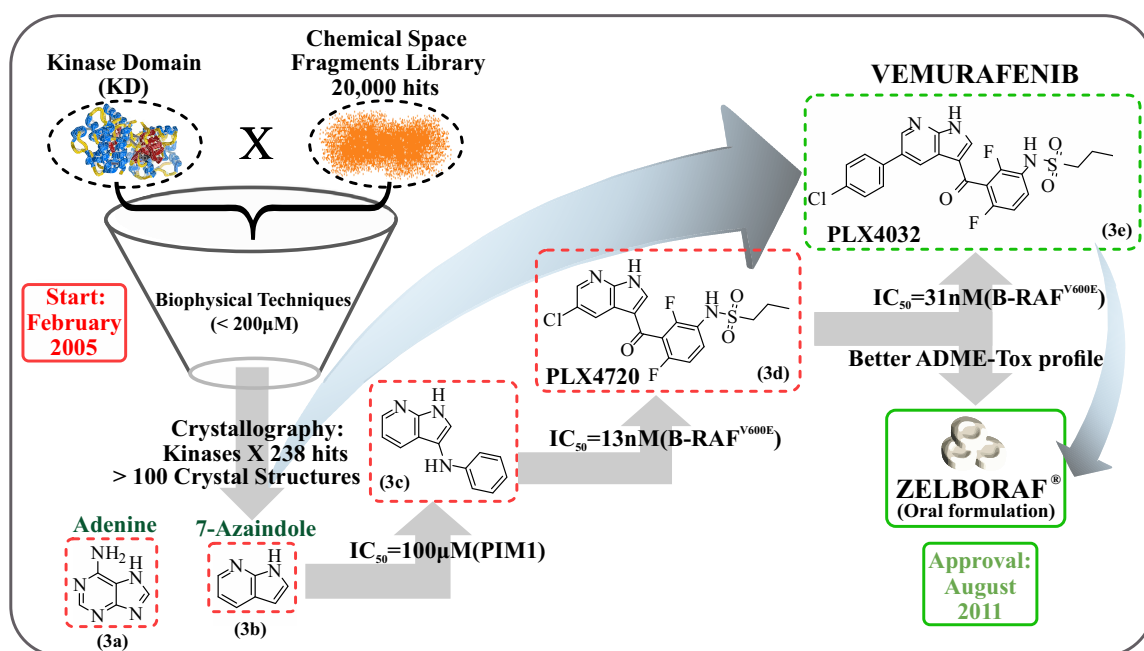


Fig. (3). Medicinal chemistry program that culminates in the ZELBORAF[®] development: from the 7-azaindole (7-AI), (3b), an adenine (3a) mimetic scaffold screened by biophysical techniques to the PLX4032 (vemurafenib), (3e), the first FBDD-derived drug approved by the FDA. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

twice that of its precursor and a well-defined binding mode with PIM1. This molecule established two strong hydrogen interactions with residues in the hinge region of the kinase and an overlap of this complex with the structure of other kinases suggested that this could be an excellent molecular recognition site to explore. In order to further intensify the interactions and elicit other adjacent and accessory interactions, the next step involves iterative structural modification with the introduction of substituents at various positions in the heterocyclic ring aimed at a gain in potency and selectivity.

A new series of analogues was obtained and revealed compounds with excellent potency and selectivity for oncogenic B-RAF kinase and low activity against wild-type B-RAF kinase. These compounds had a common structural subunit formed by a difluorophenylsulfonamide group that, due to its amphiphilic character, was able to establish polar and apolar interactions in the binding pocket. Some members of this chemical series were crystallized with B-RAF^{V600E} and such crystal structures provided new insights for subsequent molecular optimization that culminated in the discovery of the derivative PLX4720 (**3d**). In the crystal packing, the asymmetric unit was composed of two kinase monomers complexed with the inhibitor, suggesting the existence of different conformational populations in the bound state.

The peculiar conformational behavior of kinases causes these proteins to exhibit a dynamic balance between active and inactive conformational states. The main topological differences are found in the aspartate-phenylalanine-glycine (Asp-Phe-Gly) motif of the catalytic domain of these proteins. This structural motif is well conserved among the kinases and is better known as the “DFG motif”. It makes up a flexible activation loop formed by 20 to 30 amino acids. The phosphorylation reaction of this loop by ATP or the interaction with an exogenous molecule (*e.g.*, inhibitors, other ligands) is a common mechanism of kinase activation and this conformation is called “DFG-in” or “on-state”. In its inactive conformation, the loop is dephosphorylated, the catalytic site is blocked, and this conformation can also be called “DFG-out” or “off-state” [20]. The implications of these conformational states of the kinase for medicinal chemistry are of high interest. The active state provides the orthosteric site for fitting type I inhibitors, while some inactive states compensate for the loss of the orthosteric pocket by forming an allosteric site suitable for accommodating small molecules, called type II inhibitors. The occupancy of compound PLX4720 (**3d**) in the DFG-out conformation of B-RAF kinase was relatively low (60%), indicating that this was not the most populated conformation of the complex. On the other hand, PLX4720 (**3d**) showed 100% occupancy in the DFG-in conformation, demonstrating that this is its preferred conformation.

A detailed supramolecular analysis of the complex showed that in addition to the 7-AI group that mimics adenine and binds strongly to the hinge residues, the sulfonamide moiety is another decisive anchor point of the molecule on the target forming intense hydrogen and electrostatic interactions with residues Asp-594 (deprotonated NH) and Phe-595 of DFG-in, which does not happen when the protein is in DFG-out. Therefore, this is the main structural feature that gives PLX4720 (**3d**) specificity for the DFG-in state over the DFG-out state. The third important structural attribute of PLX4720 (**3d**) that gives it selectivity for oncogenic and wild-type BRAF versus other kinases is the presence of the *n*-propyl group of this same sulfonamide that when anchored to the DFG-in the motif ends up directing the *n*-propyl tail to a small lipophilic pocket unique to RAF proteins (called the selective RAF pocket).

Other accessory interactions responsible for enhancing potency were carbonyl oxygen (ketone), which forms a hydrogen interaction with the solvation water molecules, and the difluoro-phenyl moiety which is surrounded by a hydrophobic pocket formed by residues Ala-481, Val-482, Lys-483, Val-471, Ile-527, Thr-529, Leu-514

and Phe-583 [21]. Despite its excellent pharmacodynamic (PD) properties, PLX4720 (**3d**) did not proceed as a therapeutic agent due to its pharmacokinetic (PK) properties being regular and amenable to improvement (ADME/Tox profile, technical acronym for Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity). Therefore, a slight structural modification was performed on the scaffold and yielded the derivative PLX4032 (**3e**), in which the terminal chlorine atom was spaced by a phenyl bonded 7-AI. This modification improved the PK profile and added better properties of pharmaceutical interest. PLX4032 (**3e**) has advanced into clinical oncology testing under the name vemurafenib, showing remarkable clinical results, combining higher affinity with selectivity and fewer toxic effects [22].

Vemurafenib was launched with great expectations and did not disappoint. After all, it was not for less, because even in its oral administration with low doses in a more spaced posology, it contributed to significantly prolonging survival, as well as the quality of life of most treated patients, inevitably arousing a strong popular and media appeal. Therefore, at that time, it started to occupy the spotlight not only of the specialized scientific community, but also of the media, and it had already aroused the desire of the lay population in general for its release [23].

In fact, even with this putative influence, vemurafenib was approved in record time by the FDA as an oral formulation with the trade name ZELBORAF[®] acting as a selective and potent inhibitor of B-RAF^{V600E} and indicated for the chemotherapy of patients with metastatic melanoma with previously detected BRAF^{V600E} mutation [24]. The program that culminated in the approval of this molecule is still considered an exceptional case in the industry of new drug inventors already accustomed to long-term acceptance. Research with this inhibitor began in February 2005 and in only 6 years it was granted FDA acceptance, taking less than half the average time for most drugs [25]. Moreover, this approval was already expected during that year, 2011, and even occurred two months ahead of schedule.

Certainly, the atypical celerity in its clinical release reflects not only the brilliant scientific findings resulting from the competence of the entire multidisciplinary team, representing a great victory for the field of FBDD and medicine but also revealing the true face of science that has restored hope in therapy and allowed affected patients to glimpse a more optimistic horizon, in which achieving a possible cure or a few more years of life meant a true rebirth. After all, this is exactly the priceless laurel that science aims for: it is not about boasting egos or maximizing monetary figures, but it is always about favoring life in all its forms and continuously providing for the well-being of humanity.

3. VENCLEXTA[®]: VENETOCLAX

Venetoclax inventors began their journey in 1996, as shown in Fig. (4) when they published the three-dimensional structure of the B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) protein, which was elucidated by XRC and NMR. Bcl-xL is a member of the Bcl-2 family of proteins that regulate programmed cell death (apoptosis) and, when overexpressed, directly contribute to the initiation, progression, and resistance of cancers to chemotherapy.

Cancer cells armor themselves from apoptotic processes using these proteins as a shield. In fact, they are largely responsible for keeping the tumor cells alive, and for this reason, they are also called prosurvival or antiapoptotic proteins. Previous XRC studies have shown that members of the Bcl-2 family have a common structural feature, which is the molecular recognition domain known as BH3 (a peptide motif of ~7-15 amino acids constituting a hydrophobic cleft) [26]. The early work stream targeting small molecules (**4a-c**) to bind to this target region gave rise to the potent inhibitor ABT-737 (**4d**). The PD profile of this compound was very

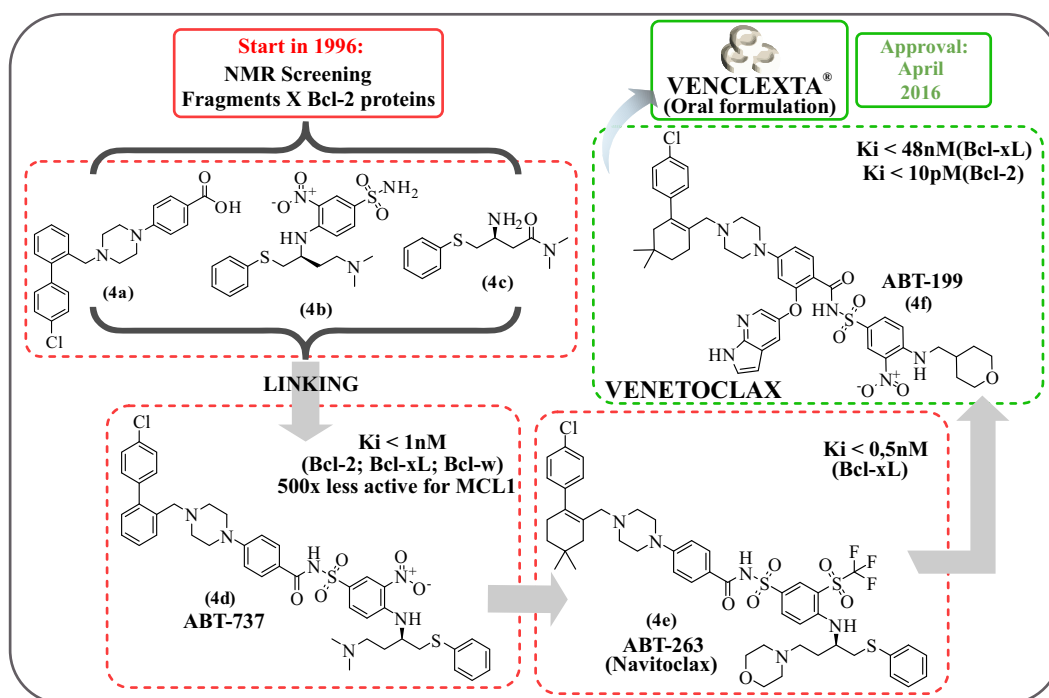


Fig. (4). Medicinal chemistry program resulted in the development of VENCLEXTA®: starting with initial NMR fragments (4a-c) that gave rise to ABT-737 (4d), which evolved into ABT-263 (4e) with an improved ADMETox profile. The last optimization step yielded the specific Bcl-2 inhibitor ABT-199, venetoclax, (4f), the second FBDD-derived drug approved by the FDA. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

encouraging, as it exhibited high affinity (subnanomolar, *i.e.*, <math><10^{-9}</math>M) towards Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl2l2 (Bcl-2-like protein 2). Moreover, it showed significant activity against small cell lung cancer (SCLC) and lymphoid malignancies, such as acute lymphocytic leukemia (ALL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, its inadequate PK properties (*e.g.*, low aqueous solubility and virtually no oral bioavailability) have caused its studies to be discontinued, even though its parenteral administration of monotherapy has shown maximum efficacy in xenograft models [27, 28]. However, those undesirable results dashed all expectations of ABT-737 (4d) becoming a therapeutic agent against cancer. In light of this setback, the search for a new molecule with the PD properties of ABT-737 (4d) but with acceptable oral bioavailability was initiated. Based on structure-property relationship analysis, it was possible to identify 3 subunits of ABT-737 (4d) responsible for the unsatisfactory properties and, after iterative molecular modifications, these positions were optimized and culminated in the discovery of the analogue molecule, a BH3 mimetic, called ABT-263 (4e). This molecule maintained a high affinity for Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w and showed an acceptable PK profile in animal models with low plasma clearance values and distribution volumes associated with oral bioavailability data that ranged from 20-50% depending on the composition of the excipients in the solid formulation. Interestingly, both ABT-263 (4e) and its precursor can exist in the form of enantiomer pairs, and in the case of ABT-263 (4e), it has been confirmed through time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET) that one of the stereoisomers is 40 times more potent [29]. Members of the Bcl-2 family normally form strong protein-protein interactions (PPIs) with each other *in vivo*. ABT-263 (4e) inhibits these interactions between the antiapoptotic proteins when administered separately, blocking their action which depends on the interaction with other proteins. It also potentiated the beneficial response of other anticancer agents when administered in associated formulations [30]. Essentially, ABT-263's potent action was taking advantage of the weaknesses of a difficult target. The con-

siderably promising PD and PK results of this molecule made it enter the clinic under the name navitoclax, arousing great enthusiasm. It made it through phase I clinical trials but failed in phase II trials and was subsequently discontinued. One of the main adverse effects that warranted its abandonment was recurrent clinical reports of severe dose-limiting thrombocytopenia. The dual inhibitor ABT-263 (4e) inherited this negative characteristic from its molecular precursor, ABT-737, (4d), as both caused decreased platelet survival.

The Bcl-xL target has been proven to be important in the process that ensures platelet survival, and the gradual reduction in Bcl-xL levels results in the apoptosis of senescent platelets. Thus, it emerged from this impasse the need to design a new inhibitor that would preferentially target Bcl-2 and spare Bcl-xL so that this side effect could be circumvented or expressed at minimal and manageable levels. The XRC structures of these targets were thoroughly revisited and minor stereochemical differences in their binding sites were found. Although these two pockets are mostly hydrophobic, they exhibit a hot spot amenable to forming electrostatic interactions with ease. In this specific region, there is a decisive difference between the two targets of interest, which is the presence of an arginine residue (Arg103) in Bcl-2 instead of a glutamine residue (Glu96) in Bcl-xL. The thiophenyl and 1-chloro-4-(4,4-dimethylcyclohex-1-enyl)benzene subunits of navitoclax establish strong interactions in this binding pocket. Based on this information and exploiting these subtle differences, new medicinal chemistry efforts culminated in a new inhibitor, ABT-199 (4f), which retained the ability to establish hydrophobic interactions and formed a different electrostatic interaction with Arg103 [31]. From navitoclax to ABT-199 (4f), the thiophenyl group was extinguished (also extinguishing only chiral center of the molecule) and the 1-chloro-4-(4,4-dimethylcyclohex-1-enyl)benzene group was preserved. Besides, other structural modifications were made aiming to optimize its pharmaceutical properties, highlighting the replacement of the trifluoromethane sulfonamide group by the unexpected nitro group

and the introduction of the 7-AI fragment (the most polyvalent scaffold of FBDD) in the central region of the molecule. ABT-199 (**4f**) aggregated acceptable PK properties with potency, selectivity to Bcl-2, and manageable adverse effects in a single molecule [32]. Consequently, it entered the clinic already under the name venetoclax and was approved by the FDA in April 2016. Its oral formulation was given the brand name VENCLEXTA[®] and was indicated for chemotherapy of patients with first-line relapsed or refractory CLL.

VENCLEXTA[®] crowned a two-decade-long pharmaceutical innovation campaign and inaugurated the pioneering of venetoclax as the first successful Bcl-2 protein inhibitor [33, 34]. It is worth noting that FBDD has also proven effective in designing potent molecules to reach a target typically considered invincible and that exceptions to Lipinski and "anti-nitro" rules are because the nitro group also known as "historically toxicophore", can be very welcoming when they are indispensable and life-saving [9, 33].

4. BALVERSA[®]: ERDAFITINIB

The four fibroblast growth factor receptors (FGFR1-4) are transmembrane tyrosine kinases involved in cell proliferation, antiapoptotic signaling, and migration of various cell types. In addition, upon activation induced by their natural substrates or other ligands, FGFR acts in pathways involving some equally important proteins for oncology, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) associated with cell motility and survival. Dysregulation of these pathways or the emergence of mutant forms of FGFR are closely implicated in multiple tumors, including urothelial cancer (UC), among others (*e.g.*, lung, gastric, liver, endometrial cancer, and glioblastoma). Until the end of the last decade, pharmacological options for the chemotherapy of advanced UC were scarce. Platinum-based therapy failed in the vast majority of cases and some second-line drugs had low efficacy and response rates of no more than 20%. Historically, the available FGFR inhibitors were not selective and inhibited vascular endothelial growth factor 2 (VEGFR2) at comparable concentrations, resulting in clinically intolerable side effects. Against this backdrop,

FGFR receptors have become attractive molecular targets for the discovery of novel anticancer agents to inhibit important tumor processes such as growth, survival, migration, and angiogenesis [35-38]. Workflows aiming at a selective inhibitor for FGFR started in 2006 employing experimental FBDD and relied on collaboration between professionals from corporate and academic circles. Although they obtained encouraging results for a chemical series consisting of imidazopyridines (**5b**) in 2008, the researchers decided to integrate a valuable computational tool into the discovery process, (Fig. 5).

Based on the virtual screening of a fragment library (FBDD *in silico*) against some known crystal structures of FGFR1, some quinoxaline fragments (**5a**) with promising LE data were identified. These fragments were obtained synthetically and revealed good IC₅₀ of FGFR3 from *in vitro* trials (**5a** exhibited 120 μM for FGFR3 and 140 μM for VEGFR2). Posteriorly, (**5a**), called fragment 1, was co-crystallized with FGFR1 and provided new structural insights that were explored through medicinal chemistry aiming for affinity and selectivity gain. The overlay of the crystal structure of **5a** with imidazopyridines (**5b**) encouraged molecular merging efforts (between both scaffolds) and resulted in the derivative labeled as compound 3 (**5c**) that showed considerably improved IC₅₀ for FGFR3 (6.5 μM) and 15-fold higher than VEGFR2 (5.5 μM). Another successful structural modification was the substitution of the benzyl group by an aniline giving rise to compound 4 (**5d**), whose potency (12 nM) is 30 times that of its precursor (**5c**) [39-43]. Once again, XRC analysis enabled the overlapping of the crystal structure of (**5d**) with the best hits of a series formed by imidazopyridines (previously designed in 2008) stimulating the insertion of N-substituents into the aniline, as there was a putative unoccupied pocket that could receive a substituent at that position in the molecule.

This expert insight resulted in the discovery of an even more potent (3 nM) and selective inhibitor (**5e**). This new lead was called erdafitinib and showed even better IC₅₀ values against cancer cell lines mutated in FGFR (down to 0.1 nM). Its high selectivity for this target against VEGFR2 was desirable and was demonstrated in tests

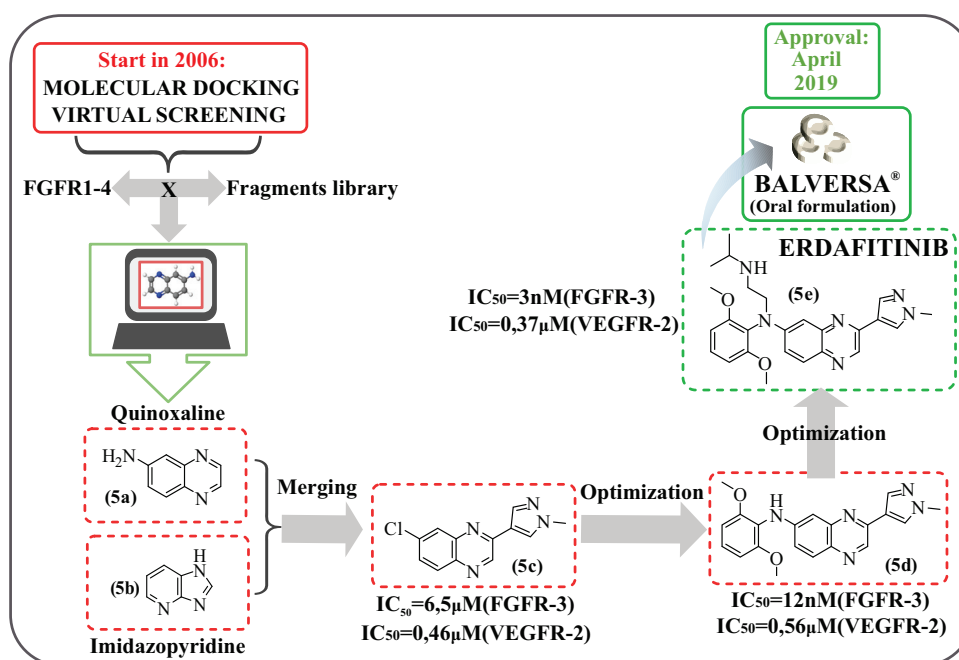


Fig. (5). Medicinal chemistry project resulted in the successful development of BALVERSA[®]: from early *in silico* steps that provided the quinoxaline (**5a**) fragment merged with an imidazopyridine (**5b**) scaffold and evolved chemically into erdafitinib (**5e**), the third FDA-approved FBDD-derived drug. (*A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article.*)

with ba/F3 cells, the results of which indicated at least 50-fold selectivity. In addition, its PK properties were favorable based on preclinical results from animal models. Combining high potency, selectivity, antitumor efficacy, and good PK profile, erdafitinib advanced to the clinical phase in which it repeated its great performance and confirmed its real chances of becoming a therapeutic agent [44, 45]. In April 2019, the efforts of this collaborative campaign between industry and academia were rewarded, as this compound became the first FDA-approved FGFR kinase inhibitor. It was cleared in the oral formulation marketed under the name BALVERSA[®] indicated for the pharmacotherapy of patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma who have diagnosed mutations in FGFR3 or FGFR2 whose prior chemotherapy has failed [46].

A striking point of the erdafitinib campaign lies in the hybrid and cooperative character of this project, combining experts from two major pharmaceutical companies (Astex Pharmaceuticals and Janssen Research & Development LLC) and a Britain university (Newcastle University Centre for Cancer). The thirteen-year period between the beginning of the journey and the approval of the inhibitor also stands out, chasing this noble objective of providing those who need it most with a new chemotherapy option with the FBDD stamp.

5. TURALIO[™]: PEXIDARTINIB

Usually, the tumor environment coexists with surrounding inflammatory processes, and from the perspective of medicinal chemistry, it becomes pertinent to employ efforts in the search for versatile molecules capable of acting simultaneously on specific components of these microenvironments, since they are related to the growth and progression of cancer cells and provide immune evasion pathways and resistance to chemotherapy. Tenosynovial giant cell tumor (TGCT) is a rare type of cancer that initiates in the tendon sheath and can be considered aggressive and pernicious [47, 48]. Some biomarkers of this type of tumor are already well known and among them are two enzymes belonging to the extensive family of kinases, the homologous enzyme of the CSF1R, and the homologous enzyme of the feline sarcoma viral oncogene of v-kit Hardy-Zuckerman 4 (KIT). The CSF1R enzyme is a member of the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) subfamily of class III receptor tyrosine kinases (RTKs). Similarly, KIT also belongs to

the PDGFR group and is a receptor for stem cell factor (SCF) [49]. Both enzymes have related structures and are surface receptors on hematopoietic cells that act as regulators of biochemical pathways that result in the activation of macrophages, osteoclasts, and mast cells [50]. Encouraged by this knowledge gained about these two promising molecular targets and already envisioning their potential therapeutic opportunities, a team of researchers affiliated with the Plexxikon laboratories aimed to design and develop molecules through the FBDD approach to act as dual inhibitors against this tumor type and inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA), (Fig. 6).

The key fragment 7-AI (the same precursor as vemurafenib) [22-24] was chosen as the starting scaffold after mining a chemical library with approximately 20,000 fragments against multiple kinases by low-affinity enzyme screening and crystallographic characterization when possible [51]. It is essential to emphasize that the pexidartinib campaign was successful precisely because it explored a new series of compounds inspired by the 7-AI fragment that was generated from a set of information and results coming from the vemurafenib project enshrined years earlier. This highlights continuity as a crucial factor in the evolution of science. The scientists realized that the CSF1R and KIT targets possessed a site generating a strong hydrogen interaction that distinguished it from most other kinases, so they decided to investigate this distinguishing attribute to discover new highly selective inhibitors. This molecular recognition region was also common to the mutant B-RAF protein and fibroblast growth receptor 1 (FGFR1). Within the congener series, one of the first compounds to stand out was PLX070 (**6a**). This derivative was cocrystallized with FGFR1 and a thorough analysis of the ligand-enzyme complex pointed out this key supramolecular interaction. Indeed, a hydrogen interaction involving the oxygen acceptor of the terminal ether group of PLX070 (**6a**) and the NH donor group of a conserved amide in the gatekeeper region of the target composed of the aspartate residue could be confirmed. Subsequent molecular optimization steps were guided by this main objective of maintaining or increasing the intensity of this interaction by combining other adjacent accessory interactions as strong as that one in order to maximize the affinity and differentiate the specificity of the molecules for the targets of interest.

Thus, two other series were synthesized from PLX070 (**6a**). One of them was composed of electron-deficient sulfonamides that

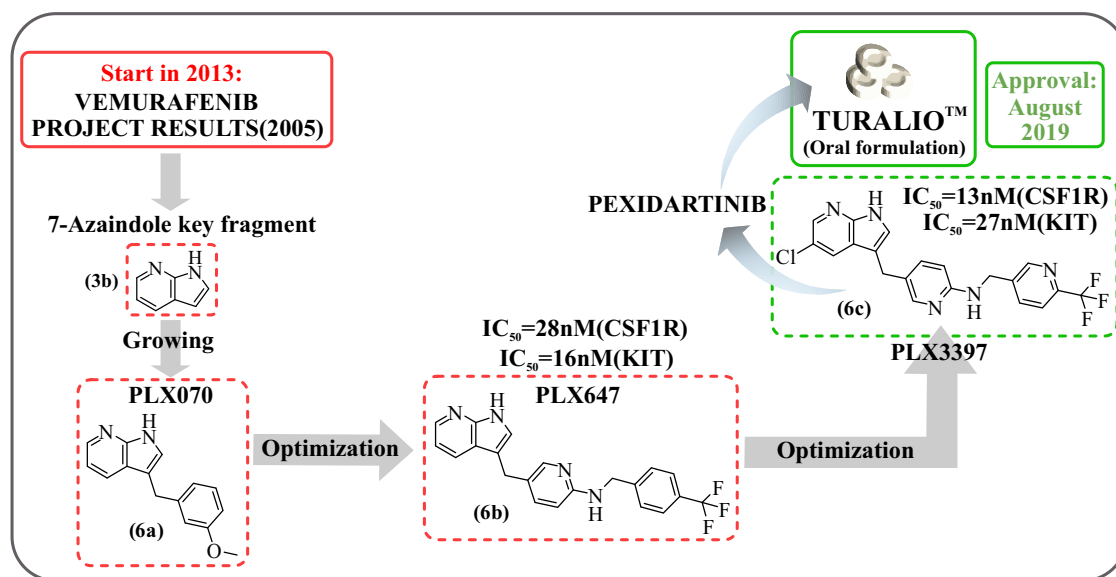


Fig. (6). Medicinal chemistry program culminated in the successful development of TURALIO[™]: from the key scaffold 7-AI (previously discovered in the vemurafenib project in 2005) through the intermediates PLX070 (**6a**) and PLX647 (**6b**) resulting in PLX3397, pexidartinib, (**6c**), which became the fourth FBDD-derived drug approved by the FDA. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

were strategically thought to make their nitrogen a stronger acid since it was expected to deprotonate in the biophase pH and become a better acceptor for hydrogen interaction. The specimen that stood out in this series was PLX4720 (**3d**), (Fig. 3), already mentioned in Section 2. It was considerably more active against the mutant B-RAF protein compared to CSF1R and KIT, giving rise to vemurafenib [52, 22-24]. The other series derived from PLX070 (**6a**) was formed by pyridine amines that were planned to offer aromatic nitrogen as the hydrogen interaction acceptor in place of the exocyclic oxygen of the terminal ether group of PLX070 (**6a**). Derivatives of this series exhibited a good selectivity and activity profile for CSF1R and KIT in a panel containing about 400 kinases. The molecule that stood out the most was PLX647 (**6b**), which showed the best inhibitory capacity data in the *in vitro* enzyme assays. In addition, it had a good PK profile and showed anti-inflammatory activity in animal models. Using PLX647 (**6b**) as a precursor and proceeding with the structural optimization project, the team of experts finally succeeded in discovering the PLX3397 (**6c**) inhibitor [52]. It was obtained by replacing the terminal 4-trifluoromethyl phenyl group with 4-trifluoromethyl pyridine and by introducing a chlorine substituent at position 5 of the 7-AI ring. This derivative was significantly more potent than its precursor PLX647 (**6b**) and imatinib (reference drug) in tests against CSF1R-dependent cells. In addition, it showed desirable PK results in preclinical trials and also had proven efficacy in tests with experimental arthritis models. The PLX3397 (**6c**) inhibitor, which was renamed *peixidartinib*, entered the clinic in 2015 to also be tested against several other types of cancer and was approved in 2019 by the FDA for the chemotherapy of TGCT and available in an oral formulation under the brand name TURALIOTM [53-55].

6. LUMAKRASTM: SOTORASIB

Unquestionably, the RAS family proteins are among the most prominent molecular targets for researchers investigating new chemotherapeutic options against cancer. Although these targets have been known and hankered for almost half a century, they have always had the reputation of being practically intractable, as various HTS-based workflows with a few million molecules and other con-

ventional approaches have failed. This superfamily of GTPases has some members that are worth highlighting because they are closely associated with most human tumors, such as RalA, RalB, NRAS, HRAS, and KRAS [56, 57]. Among these mentioned proteins, KRAS viral oncogene homolog has raised great scientific interest and has been the reason for several research efforts aiming to prospect possible inhibitors, which have been sought for a long time. This protein is involved in the cell signaling cascade established between membrane receptors and intracellular effectors. It is responsible for activating the transcription of genes related to cell cycle progression, cell growth, and proliferation, inhibition of apoptosis, angiogenesis, migration, adhesion, and cell invasion [58]. To exert these roles, it alternates between two very distinct conformational states, namely: i) an active state, in which KRAS is bound to the guanosine triphosphate (GTP) molecule; and, ii) an inactive state, in which GTP is hydrolyzed to guanosine diphosphate (GDP). In their natural cycle, GAPs (GTPase Activating Proteins) promote KRAS inactivation through the GTP hydrolysis reaction. However, its oncogenic mutant isoforms are resistant to hydrolysis and, therefore, are not sensitive to this natural inactivation mechanism and remain to perform all functions inherent to its activated state, which now becomes irreversible and permanent. One of the mutant forms of KRAS that are of great interest in oncology and medicinal chemistry is a variant in which a glycine amino acid is replaced by a cysteine (G12C), known as KRAS^{G12C} [59]. The molecular origins of the fifth FBDD-derived drug approved date to 2013, (Fig. 7).

The tethering technique was exploited to examine a library of 480 disulfide fragments in order to find a chemical starting point. Data obtained through intact protein mass spectrometry (IPMS) indicated two promising hits, named 2E07 (**7a**) and 6H05 (**7b**). The initial structural changes performed on 6H05 (**7b**) resulted in compound 6 (**7c**) which demonstrated the best relative potency and was bound to the targeted nucleophilic site (Cys12) *via* disulfide bonding. In addition to this chemical binding, the molecule of compound 6 (**7b**) establishes several non-covalent interactions with residues in an adjacent allosteric pocket called switch-II (S-IIP). The search was for irreversible inhibitors, however, the covalent binding of these sulfur-based compounds shows low stability in the biological environment [60]. Therefore, the researchers decided to synthesize

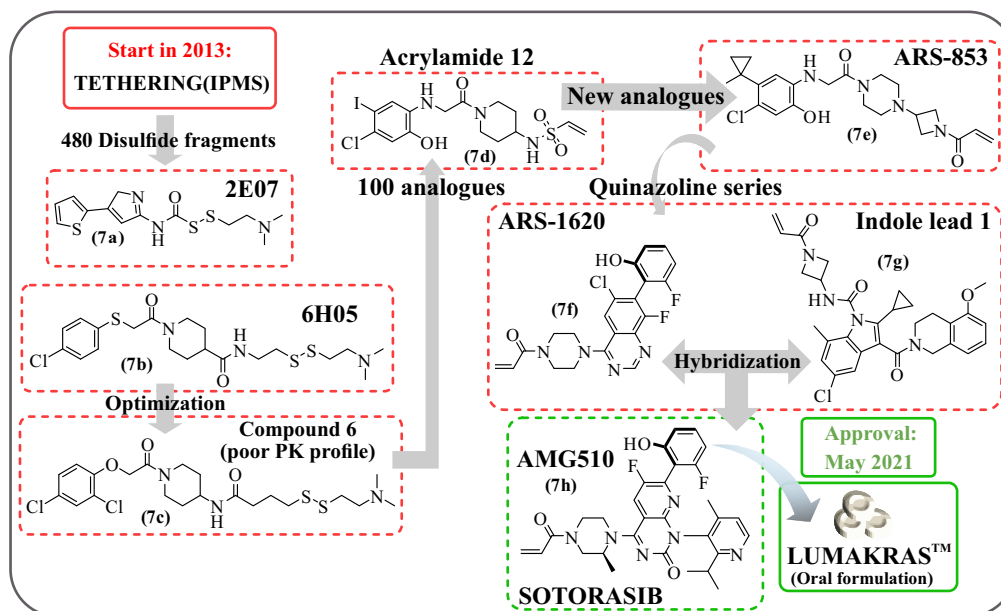


Fig. (7). Medicinal chemistry campaign fruited in the successful discovery of LUMAKRASTM: starting with the initial tethering step (IPMS) that gave rise to 2E07 which went through subsequent structural optimization steps and yielded AMG510 (sotorasib), the fifth FBDD-derived drug approved by the FDA. (*A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article.*)

100 new analogues of 7b in which the disulfide group was replaced by acrylamide or vinyl sulfonamide. These two categories of compounds were chemoselective, formed irreversible bonds with the target's cysteine, and provided the compounds with satisfactory *in vitro* results, such as acrylamide 12 (7d), which was the most potent. In 2016, another group of researchers synthesized a series of analogs of (7d) and were able to discover a molecule, ARS-853 (7e), that showed a considerable improvement in potency. However, it had some PK disadvantages, such as a short plasma metabolic stability ($t_{1/2} < 20$ min, half-life time shorter than 20 minutes) and a very low oral bioavailability ($F < 2\%$, F = fraction less than 2%). These unfavorable properties prevented its continuation and motivated the search for another structural pattern with comparable or better potency but with minimally acceptable PK properties. After extensive structural modification efforts of ARS-853 (7e) reported in a paper in 2018, a new chemical series with the quinazoline core was discovered and proved to be versatile. In this series, the molecule ARS-1620 (7f) stood out by exhibiting the best PK and PD profiles.

In 2019, work resulting from a collaboration between researchers from two pharmaceutical companies reported a new series of acrylamides. Indole lead 1 (7g) excelled in this series and exhibited greater potency than ARS-1620 (7f) in cellular assays. However, such a compound, like ARS-1620, also showed low oral bioavailability and rapid clearance in animal model tests and was partially rejected. In a new workflow, this same group of collaborators synthesized a series of molecular hybrids of the two compounds in the hope of obtaining a successful new inhibitor with optimized pharmacological properties [61, 62]. One of the derived molecules met these expectations and, due to its highly attractive results, entered the clinic labeled AMG510 (7h) in August 2018. AMG510 (7h) was later named sotorasib and became the fifth FBDD-derived drug approved by the FDA for the chemotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC). It is the first covalent drug using this approach and acts precisely by binding irreversibly to one of the mutated forms of KRAS in which a glycine amino acid is replaced by a cysteine (G12C). KRAS^{G12C} became attractive because it was very convenient to exploit cysteine as one of the main nucleophilic sites that serve as starting points for drugs that covalently bind to the target [63].

It was interesting to see the subtleness of gene serendipity that propitiated the medicinal chemistry turnaround in this case because

the same mutation that was turning an already difficult target into an invincible target was the weak point responsible for its downfall. Surely, a hallmark of the program that invented sotorasib was speed, as it was released for clinical evaluation just 5 years after the publication of the first paper showing that KRAS was a ligandable molecular target [60]. Moreover, after entering the clinic, it demonstrated commendable clinical data and had its efficacy and safety proven in just 3 years, after being approved by the FDA in May 2021. This molecule was formulated orally and marketed under the brand name LUMAKRASTM and became a strong option for chemotherapy in a subset of patients with NSCLC [64]. Since then, sotorasib is yet another potent molecular weapon in the therapeutic arsenal against cancer and the fifth successful pharmacological agent derived from the FBDD paradigm.

7. SCEMBLIX[®]: ASCIMINIB

Asciminib was approved by the FDA at the end of 2021 against two advanced chronic myeloid leukemia (CML) subtypes that resist the 1st and 2nd line drugs (*e.g.*, imatinib and dasatinib, respectively) manifested in patients that expressing threonine-to-isoleucine (Thr-Ile) exchange at amino acid position 315 (T315I mutation) on kinase domain (KD). These patient subgroups present a mutation corresponding to the Philadelphia chromosome, which is responsible for approximately 20% of therapeutic resistance cases to conventional tyrosine kinase inhibitors (TKIs). This chromosome results from a specific genetic abnormality in which a piece of chromosome 9 (named portion ABL) and a piece of chromosome 22 break off and permute places the originating of the mutant BCR-ABL1 gene [65]. Asciminib was labeled as ABL001 (8d) during its development phase and became the first allosteric BCR-ABL1 inhibitor to overcome these steps and reach the clinic, (Fig. 8).

Unlike other TKIs that target the active site of this oncoprotein, ABL001 (8d) represents an innovative molecule that was designed as well to act through a different mechanism and therefore targets not the hinge region of BCR-ABL1 (ATP-binding catalytic site), but an allosteric myristoyl-binding pocket on the protein. This peculiar mechanism of action provides improved selectivity over conventional kinase inhibitors, which could be part of the reason the drug causes fewer side effects than other BCR-ABL1 inhibitors. Moreover, another great advantage of targeting the allosteric pocket is to sidestep drug resistance. In contrast to sotorasib [56-64], Section 6, which was approved with less than three years spent in clini-

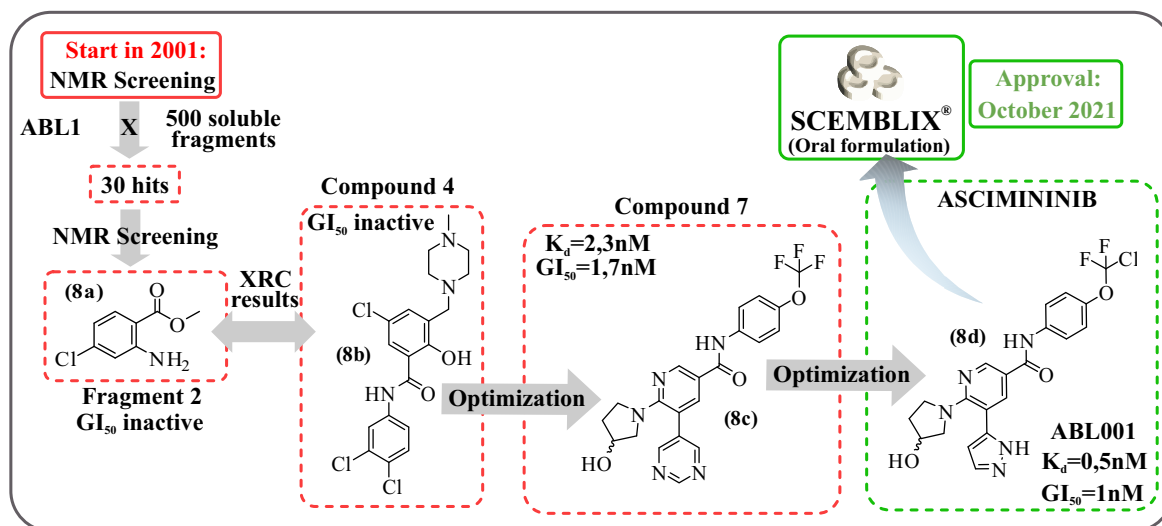


Fig. (8). A long medicinal chemistry journey that fructified in the successful development of SCSEMBLIX[®]. It took two decades from the discovery of the target to the approval of the drug. Early NMR/XRC efforts revealed fragment 2 (8a) and compound 4 (8b), both inactive, which went through the subsequent structural optimization step giving rise to active compound 7 (8c), to lead compound ABL001, asciminib, (8d), the sixth FDA-approved FBDD-derived drug. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

cal studies, asciminib started its trials in 2014 and has been suspended twice before its acceptance [66]. However, seven years can still be considered a short time to obtain success in the pharmaceutical industry accustomed to long-term approval. Similarly, imatinib, the first approved TKI for the treatment of CML that targets the hinge region of BCR-ABL1, also faced a great and hard journey into the clinic before being approved twenty years ago in 2001 [67]. However, if on the one hand asciminib's path was arduous, on the other, the insight and knowledge gained during its invention process was also impressive and a source of inspiration for restless and obstinate researchers who set out to explore the instigating universe of mutant kinases. According to the inventors of asciminib themselves, the main motivation for its invention was the observation that many patients with mutant BCR-ABL1 kinase were refractory to type I and II inhibitors. These patients developed drug resistance due to stereochemical changes caused by T315I mutations in the ATP-binding site (also called SH1 domain) that prevented the drug from entering the active pocket and, consequently, the interaction between it and the target. In addition, several patients had poor tolerability to these inhibitors because their adverse effects were recurrent and resulted from their probable action on other biological targets. Given this critical clinical scenario, it was salutary that a new drug should be developed to combat the mutant kinases causing fewer side effects and ensuring great patient survival [66-68]. Critically, this compound should bind with high selectivity at another binding site to exert activity on the resistant isoforms.

The first valuable insight came from a work published in 2003 by Kuriyan and his team of collaborators who reported the myristate group as a molecule involved in the autoregulation of ABL1- and ABL2-like protein kinases (non-mutant isoforms). This molecule forms a covalent bond with a terminal nitrogen atom (N-terminal) of a peptide chain adjacent to SH1, inducing an inactive state in which three other domains (SH2, SH3, and helix I), cause conformational constraints on SH1. When the protein is mutated, the N-terminal region is replaced by the BCR subunit, and the myristoylation site is lost, leading to the activation of the protein again [69, 70]. The inventors of asciminib, in possession of this information, considered designing a molecule that would occupy the same lipophilic cleft where myristate binds. A team of researchers from Novartis Institutes for BioMedical Research (NIBR) began the FBDD program by screening a library containing approximately 500 soluble fragments using NMR spectroscopy. Thirty promising hits were identified with dissociation constants (k_d) and LE comparable to the controls. These encouraging results were subsequently thwarted by cell trials in which the two main fragments (**8a**) and the initially expanded compounds were inactive at concentrations lower than 50 μ M (**8b**). Based on X-ray crystallography (XRC) and baffled by the *in vitro* biochemical assays, the researchers sought possible explanations through the crystal structures containing these fragments, (**8a**) and (**8b**), in which they were able to prove that they were bound to the myristate pocket and why they were not active in the cell assays. Despite binding in the expected site, these fragments collide sterically with helix I preventing its folded conformation and the conformational changes required for the formation of the inactivated state of the protein. Thus, these fragments were acting as authentic activators rather than allosteric inhibitors. The next step was to design new molecules that would bind at this site but avoid steric shock. It was done based on a search for new pharmacophores and structural similarity through closely related crystal structures that contained co-crystallized fragments. However, again the attempt failed and the new compounds did not exhibit inhibitory activity in biochemical assays. Pursuing this objective, the researchers had another important insight when they realized that some heterocyclic compounds reported in the literature by Adrian *et al.* displayed remarkable BCR-ABL1-dependent cell inhibition capacity [66, 71].

In these compounds, the trifluoromethoxy groups and free NH were found to be crucial for inhibitory activity. Moreover, it is worth mentioning that the trifluoromethyl group is also present in nilotinib and ponatinib drugs, which are the only type II inhibitor that exhibit activity against the mutant kinases. Therefore, based on this clue, the trifluoromethoxy substituent was inserted in the structure of the newly designed compounds and in the same *p*-position of the aniline (**8c**). The hypothesis that the trifluoromethoxy group could induce helix-I folding and confer activity was proven, as these new molecules exhibited remarkable IC₅₀ results. The next steps involved structural optimization aimed at enhancing the PD and especially PK profile that culminated in the clinical candidate ABL001 (**8d**), subsequently approved and marketed under the brand name SCEMBLIX[®] [66, 72] representing a new chemotherapy for patients subset with Ph+ CML who presented low response or intolerance after at least TKIs therapies.

Certainly, in view of this brief summary, in a few paragraphs, it was clear how inspiring this drug discovery campaign can be and a perfect example of scientific resilience in the field of medicinal chemistry. This scientist's team has remained true to its convictions from the beginning until the consecration of the program in October of 2021, even in the face of the various mishaps and pitfalls that appeared along the way.

8. CLINICAL CANDIDATES

The core activity of oncology and medicinal chemistry has been successfully exercised and several fragment-based clinical candidates may soon reach approved drug status. With this most desired triumph, numerous molecules are currently evolving in this race and facing batteries of clinical trials at different stages of development. A small sample of ten promising candidates can be seen in Table 1 [73-87]. They are being tested against pernicious cancers with few pharmacological options at present, so they represent great possibilities to fill this lacuna in chemotherapy and help numerous affected patients [10, 11].

Based on the above, it is worth mentioning especially two of these molecules that are about to achieve this feat. The molecule labeled as AZD5363 (capiwasertib) is a potent competitive ATP inhibitor and suppresses the biochemical functional role of the pan-AKT isoforms (AKT1, 2 and 3), which is a molecular target of great therapeutic interest and is also known as protein kinase B (PKB). Capiwasertib has already passed the first two stages and is currently being evaluated in phase III clinical trials, in which it is showing encouraging results in studies targeting patients diagnosed with locally advanced or metastatic solid tumors, as well as cancers of the breast, lung among other types of malignancies [73].

Another promising FBDD-issued drug candidate is the molecule CPI-0610 (pelabresib), which selectively inhibits proteins with bromodomain and extra terminal domain (BET). Pelabresib has recently entered phase III clinical trials (October 2020) for patient groups recruited from among myelofibrosis, solid tumors, hematologic cancers, and various types of malignancies [74, 75]. Certainly, these chemotherapeutic candidates represent promises of better days in clinical oncology and reiterate the irrefutable fact that the beneficial impacts generated by FBDD magic bullets are mitigating the clinical scenario of severe oncology patients and, in the near future, other better chemotherapy options may become available [10, 11]. Moreover, it is worth mentioning that other therapeutic classes may also be contemplated, *e.g.*, the non-opioid molecule CFTX-1554 is in phase I for neuropathic pain [76], anti-Alzheimer HTL9936 [77], and the anti-inflammatories LYS006 [78] and PF-06650833 [79] are in phase II. Particularly, it is important to emphasize that the latter is being tested in hospitalized patients with pneumonia caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and this could be a major progress towards eradication or management of this very harmful and deadly virus.

Table 1. Ten FBDD-derived therapeutic candidates are being tested in different clinical phases [10, 11, 72-87].

Candidate (Code or Name)	Therapy Tests (Target)	Phase	References
AZD5363 (Capivasertib)	ST/AST/Lymphoma (pan-AKT)	III	[73]
CPI-0610 (Pelabresib)	ST/AST/HC/MF (BET)	III	[74, 75]
VK-1248	NC/EBVRC (EBNA1)	II	[80]
S64315	AML/MDS (MCL1)	II	[81]
eFT508	CRPC/TNBC/HCC/ST/RCC/ST/Lymphoma (MNK1/2)	II	[82]
AZD5991	AML (MCL1)	II	[83]
ASTX660	PTCL/CTCL/ATLL/AML/ST/TNBC/CC/ Lymphoma (XIAP/cIAP1)	II	[84]
ASTX029	AST (ERK1/2)	II	[85]
MRTX1719	MT/NSCLC/MPNST/ST/AST/PA (PRMT5.MTA)	I/II	[86]
AG-270	AST/Lymphoma (MAT2A)	I	[87]

Abbreviations: (ST = Solid tumor; AST = Advanced Solid Tumor; pan-AKT = Protein kinase b isoforms; HC = Hematologic cancers; MF = Myelofibrosis; BET = Bromodomain and extraterminal domain proteins; NC = Nasopharyngeal cancer; EBVRC = Epstein-Barr Virus Related Carcinoma; EBNA1 = Epstein-Barr nuclear antigen ; AML = Acute Myeloid Leukemia; MDS = Myelodysplastic Syndrome; MCL1 = Myeloid leukemia 1 antiapoptotic protein; CRPC = Castrate-resistant Prostate Cancer; TNBC = Triple Negative Breast Cancer; HCC = Hepatocellular Carcinoma; RCC = Refractory Colorectal Cancer; MNK1/2 = Mitogen-activated Protein Kinases-interacting Kinases 1 and 2; PTCL = Peripheral T-cell Lymphoma (PTCL); CTCL = Cutaneous T-cell Lymphoma; ATLL = Adult T-cell Leukemia/Lymphoma; CC = Cervical Cancer; XIAP/cIAP1 = Inhibitor of Apoptosis Proteins; ERK1/2 = Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2; MT = Mesothelioma; NSCLC = Non Small Cell Lung Cancer; MPNST = Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors; PA = Pancreatic Adenocarcinoma; PRMT5.MTA = Protein Arginine Methyltransferase 5 complexed with Methylthioadenosine Phosphorylase; MAT2A = Methionine adenosyltransferase 2A).

CONCLUSION

In this mini-review, the potential of the FBDD paradigm in the current landscape of medicinal chemistry and the pharmaceutical innovation industry has been highlighted and deserves to be acknowledged. Because for over a decade, its contributions with novel pharmacological agents to the medical clinic are reinforcing the therapeutic arsenal with potent molecular arms against difficult biological targets and bringing remarkable benefits to those who matter most, the patients afflicted by considerably severe cancers. Fortunately, the current rhythm of workflow in the FBDD field is relentless and allows one to glimpse great news soon about new effective chemotherapeutic options and drugs from other pharmacological classes.

LIST OF ABBREVIATIONS

BT	= Biophysical/Biochemical Techniques
CADD	= Computer-Aided Drug Design
FBDD	= Fragment-Based Drug Discovery
FDA	= United States Food and Drug Administration
FRET	= Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy
HTS	= High-Throughput Screening
LBDD	= Ligand-Based Drug Discovery
LE	= Ligand Efficiency
NMR	= Nuclear Magnetic Resonance
SBDD	= Structure-Based Drug Discovery
WHO	= World Health Organization
XRC	= X-ray Crystallography

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

The authors are hugely thankful to the Brazilian Funding Agencies for Research and Innovation, CNPq, CAPES-Finance Code 001.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly grateful to the Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation (MolMod-CS) from the Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), with which they are affiliated.

REFERENCES

- [1] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, **2021**, *71*(3), 209-249. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660> PMID: 33538338
- [2] Ugai, T.; Sasamoto, N.; Lee, H.Y.; Ando, M.; Song, M.; Tamimi, R.M.; Kawachi, I.; Campbell, P.T.; Giovannucci, E.L.; Weiderpass, E.; Rebbeck, T.R.; Ogino, S. Is early-onset cancer an emerging global epidemic? Current evidence and future implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2022**, *19*(10), 656-673. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-022-00672-8> PMID: 36068272
- [3] Chen, W.; Sun, Z.; Lu, L. Targeted engineering of medicinal chemistry for cancer therapy: Recent advances and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(11), 5626-5643.

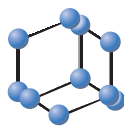
- <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201914511> PMID: 32096328
- [4] Stine, Z.E.; Schug, Z.T.; Salvino, J.M.; Dang, C.V. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2022**, *21*(2), 141-162.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41573-021-00339-6> PMID: 34862480
- [5] Pedreira, J.G.B.; Franco, L.S.; Barreiro, E.J. Chemical intuition in drug design and discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2019**, *19*(19), 1679-1693.
<http://dx.doi.org/10.2174/1568026619666190620144142> PMID: 31258088
- [6] Fischer, E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzima. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1894**, *27*(3), 2985-2993.
<http://dx.doi.org/10.1002/cber.18940270364>
- [7] Ehrlich, P. Chemotherapeutics: Scientific principles, methods and results. *Lancet*, **1913**, *182*, 445-451.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)38705-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)38705-6)
- [8] Li, Q.; Kang, C. Perspectives on fragment-based drug discovery: A strategy applicable to diverse targets. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2021**, *21*(13), 1099-1112.
<http://dx.doi.org/10.2174/1568026621666210804115700> PMID: 34348623
- [9] Bon, M.; Bilsland, A.; Bower, J.; McAulay, K. Fragment based drug discovery—the importance of high quality molecule libraries. *Mol. Oncol.*, **2022**, *16*(21), 3761-3777.
<http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.13277> PMID: 35749608
- [10] de Esch, I.J.P.; Erlanson, D.A.; Jahnke, W.; Johnson, C.N.; Walsh, L. Fragment-to-lead medicinal chemistry publications in 2020. *J. Med. Chem.*, **2022**, *65*(1), 84-99.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01803> PMID: 34928151
- [11] Erlanson, D. Practical fragments. Available From: <https://practicalfragments.blogspot.com/2022/11/fragments-in-clinic-2022-edition.html> (accessed December 20, 2022).
- [12] Rapp, U.R.; Goldsborough, M.D.; Mark, G.E.; Bonner, T.I.; Groffen, J.; Reynolds, F.H., Jr; Stephenson, J.R. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*(14), 4218-4222.
<https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.80.14.4218>
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.80.14.4218> PMID: 6308607
- [13] Beck, T.W.; Huleihel, M.; Gunnell, M.; Bonner, T.I.; Rapp, U.R. The complete coding sequence of the human A-raf -1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15*(2), 595-609.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/15.2.595> PMID: 3029685
- [14] Ikawa, S.; Fukui, M.; Ueyama, Y.; Tamaoki, N.; Yamamoto, T.; Toyoshima, K. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol. Cell. Biol.*, **1988**, *8*(6), 2651-2654.
<http://dx.doi.org/10.1128/mcb.8.6.2651-2654.1988> PMID: 3043188
- [15] Holderfield, M.; Deuker, M.M.; McCormick, F.; McMahon, M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, **2014**, *14*(7), 455-467.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3760> PMID: 24957944
- [16] Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B.A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G.J.; Bigner, D.D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J.W.C.; Leung, S.Y.; Yuen, S.T.; Weber, B.L.; Seigler, H.F.; Darrow, T.L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C.J.; Wooster, R.; Stratton, M.R.; Futreal, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **2002**, *417*(6892), 949-954.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature00766> PMID: 12068308
- [17] Schirripa, M.; BIASON, P.; Lonardi, S.; Pella, N.; Pino, M.S.; Urbano, F.; Antoniotti, C.; Cremolini, C.; Corallo, S.; Pietrantonio, F.; Gelsomino, F.; Cascinu, S.; Orlandi, A.; Munari, G.; Malapelle, U.; Saggio, S.; Fontanini, G.; Rugge, M.; Mescoli, C.; Lazzi, S.; Reggiani Bonetti, L.; Lanza, G.; Dei Tos, A.P.; De Maglio, G.; Martini, M.; Bergamo, F.; Zagonel, V.; Loupakis, F.; Fassin, M. Class 1, 2, and 3 BRAF-mutated metastatic colorectal cancer: A detailed clinical, pathologic, and molecular characterization. *Clin. Cancer Res.*, **2019**, *25*(13), 3954-3961.
<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0311> PMID: 30967421
- [18] Śmiech, M.; Leszczyński, P.; Kono, H.; Wardell, C.; Taniguchi, H. Emerging BRAF mutations in cancer progression and their possible effects on transcriptional networks. *Genes*, **2020**, *11*(11), 1342.
<http://dx.doi.org/10.3390/genes11111342> PMID: 33198372
- [19] Ko, J.S. The immunology of melanoma. *Clin. Lab. Med.*, **2017**, *37*(3), 449-471.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2017.06.001> PMID: 28802495
- [20] Kumar, A.; Mandiyan, V.; Suzuki, Y.; Zhang, C.; Rice, J.; Tsai, J.; Artis, D.R.; Ibrahim, P.; Bremer, R. Crystal structures of proto-oncogene kinase Pim1: A target of aberrant somatic hypermutations in diffuse large cell lymphoma. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *348*(1), 183-193.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.039> PMID: 15808862
- [21] Tsai, J.; Lee, J.T.; Wang, W.; Zhang, J.; Cho, H.; Mamo, S.; Bremer, R.; Gillette, S.; Kong, J.; Haass, N.K.; Sproesser, K.; Li, L.; Smalley, K.S.M.; Fong, D.; Zhu, Y.L.; Marimuthu, A.; Nguyen, H.; Lam, B.; Liu, J.; Cheung, I.; Rice, J.; Suzuki, Y.; Luu, C.; Settachatgul, C.; Shellooe, R.; Cantwell, J.; Kim, S.H.; Schlessinger, J.; Zhang, K.Y.J.; West, B.L.; Powell, B.; Habets, G.; Zhang, C.; Ibrahim, P.N.; Hirth, P.; Artis, D.R.; Herlyn, M.; Bollag, G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*(8), 3041-3046.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711741105> PMID: 18287029
- [22] Bollag, G.; Hirth, P.; Tsai, J.; Zhang, J.; Ibrahim, P.N.; Cho, H.; Spevak, W.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Habets, G.; Burton, E.A.; Wong, B.; Tsang, G.; West, B.L.; Powell, B.; Shellooe, R.; Marimuthu, A.; Nguyen, H.; Zhang, K.Y.J.; Artis, D.R.; Schlessinger, J.; Su, F.; Higgins, B.; Iyer, R.; D'Andrea, K.; Koehler, A.; Stumm, M.; Lin, P.S.; Lee, R.J.; Grippo, J.; Puzanov, I.; Kim, K.B.; Ribas, A.; McArthur, G.A.; Sosman, J.A.; Chapman, P.B.; Flaherty, K.T.; Xu, X.; Nathanson, K.L.; Nolop, K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, **2010**, *467*(7315), 596-599.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature09454> PMID: 20823850
- [23] Flaherty, K.T.; Yasothan, U.; Kirkpatrick, P. Vemurafenib. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*(11), 811-812.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd3579> PMID: 22037033
- [24] Bollag, G.; Tsai, J.; Zhang, J.; Zhang, C.; Ibrahim, P.; Nolop, K.; Hirth, P. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*(11), 873-886.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd3847> PMID: 23060265
- [25] Brown, D.G.; Wobst, H.J. A decade of FDA-approved drugs (2010-2019): Trends and future directions. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64*(5), 2312-2338.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01516> PMID: 33617254
- [26] Muchmore, S.W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R.P.; Harlan, J.E.; Yoon, H.S.; Nettlesheim, D.; Chang, B.S.; Thompson, C.B.; Wong, S.L.; Ng, S.C.; Fesik, S.W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **1996**, *381*(6580), 335-341.
<http://dx.doi.org/10.1038/381335a0> PMID: 8692274
- [27] Oltersdorf, T.; Elmore, S.W.; Shoemaker, A.R.; Armstrong, R.C.; Augeri, D.J.; Belli, B.A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T.L.; Dinges, J.; Hajduk, P.J.; Joseph, M.K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S.J.; Kunzer, A.R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M.J.; Nettlesheim, D.G.; Ng, S.; Nimmer, P.M.; O'Connor, J.M.; Oleksijew, A.; Petros, A.M.; Reed, J.C.; Shen, W.; Tahir, S.K.; Thompson, C.B.; Tomaselli, K.J.; Wang, B.; Wendt, M.D.; Zhang, H.; Fesik, S.W.; Rosenberg, S.H. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, **2005**, *435*(7042), 677-681.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature03579> PMID: 15902208
- [28] Shoemaker, A.R.; Oleksijew, A.; Bauch, J.; Belli, B.A.; Borre, T.; Bruncko, M.; Deckwerth, T.; Frost, D.J.; Jarvis, K.; Joseph, M.K.; Marsh, K.; McClellan, W.; Nellans, H.; Ng, S.; Nimmer, P.; O'Connor, J.M.; Oltersdorf, T.; Qing, W.; Shen, W.; Stavropoulos, J.; Tahir, S.K.; Wang, B.; Warner, R.; Zhang, H.; Fesik, S.W.; Rosenberg, S.H.; Elmore, S.W. A small-molecule inhibitor of Bcl-XL potentiates the activity of cytotoxic drugs *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **2006**, *66*(17), 8731-8739.
<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0367> PMID: 16951189

- [29] Tse, C.; Shoemaker, A.R.; Adickes, J.; Anderson, M.G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E.F.; Marsh, K.C.; Mitten, M.J.; Nimmer, P.; Roberts, L.; Tahir, S.K.; Xiao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S.; Rosenberg, S.H.; Elmore, S.W. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.*, **2008**, *68*(9), 3421-3428. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5836> PMID: 18451170
- [30] Ackler, S.; Xiao, Y.; Mitten, M.J.; Foster, K.; Oleksijew, A.; Refici, M.; Schlessinger, S.; Wang, B.; Chemburkar, S.R.; Bauch, J.; Tse, C.; Frost, D.J.; Fesik, S.W.; Rosenberg, S.H.; Elmore, S.W.; Shoemaker, A.R. ABT-263 and rapamycin act cooperatively to kill lymphoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*(10), 3265-3274. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0268> PMID: 18852130
- [31] Souers, A.J.; Levenson, J.D.; Boghaert, E.R.; Ackler, S.L.; Catron, N.D.; Chen, J.; Dayton, B.D.; Ding, H.; Enschede, S.H.; Fairbrother, W.J.; Huang, D.C.S.; Hymowitz, S.G.; Jin, S.; Khaw, S.L.; Kovar, P.J.; Lam, L.T.; Lee, J.; Maecker, H.L.; Marsh, K.C.; Mason, K.D.; Mitten, M.J.; Nimmer, P.M.; Oleksijew, A.; Park, C.H.; Park, C.M.; Phillips, D.C.; Roberts, A.W.; Sampath, D.; Seymour, J.F.; Smith, M.L.; Sullivan, G.M.; Tahir, S.K.; Tse, C.; Wendt, M.D.; Xiao, Y.; Xue, J.C.; Zhang, H.; Humerickhouse, R.A.; Rosenberg, S.H.; Elmore, S.W. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.*, **2013**, *19*(2), 202-208. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3048> PMID: 23291630
- [32] Cang, S.; Iragavarapu, C.; Savooji, J.; Song, Y.; Liu, D. ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J. Hematol. Oncol.*, **2015**, *8*(1), 129. <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-015-0224-3> PMID: 26589495
- [33] Levenson, J.D.; Sampath, D.; Souers, A.J.; Rosenberg, S.H.; Fairbrother, W.J.; Amiot, M.; Konopleva, M.; Letai, A. Found in translation: How preclinical research is guiding the clinical development of the BCL2-selective inhibitor venetoclax. *Cancer Discov.*, **2017**, *7*(12), 1376-1393. <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0797> PMID: 29146569
- [34] Erlanson, D.A.; Fesik, S.W.; Hubbard, R.E.; Jahnke, W.; Jhoti, H. Twenty years on: The impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2016**, *15*(9), 605-619. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.109> PMID: 27417849
- [35] Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3-25. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *46*(1-3), 3-26. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0) PMID: 11259830
- [36] Siefker-Radtke, A.O.; Necchi, A.; Park, S.H.; Garcia-Donas, J.; Huddart, R.A.; Burgess, E.F.; Fleming, M.T.; Rezazadeh Kalebasty, A.; Mellado, B.; Varlamov, S.; Joshi, M.; Duran, I.; Tagawa, S.T.; Zakharia, Y.; Akapame, S.; Santiago-Walker, A.E.; Monga, M.; O'Hagan, A.; Loriot, Y.; Necchi, A.; Loriot, Y.; Park, S.H.; Tagawa, S.; Flechon, A.; Alexeev, B.; Varlamov, S.; Huddart, R.; Burgess, E.; Rezazadeh, A.; Siefker-Radtke, A.; Vano, Y.; Gasparro, D.; Hamzaj, A.; Kopyltsov, E.; Gracia Donas, J.; Mellado, B.; Parikh, O.; Schatteman, P.; Culine, S.; Houédé, N.; Zanetta, S.; Facchini, G.; Scagliotti, G.; Schinzari, G.; Lee, J.L.; Shkolnik, M.; Fleming, M.; Joshi, M.; O'Donnell, P.; Stöger, H.; Decaestecker, K.; Dirix, L.; Machiels, J.P.; Borchiellini, D.; Delva, R.; Rolland, F.; Hadaschik, B.; Retz, M.; Rosenbaum, E.; Basso, U.; Mosca, A.; Lee, H.J.; Shin, D.B.; Cebotaru, C.; Duran, I.; Moreno, V.; Perez Gracia, J.L.; Pinto, A.; Su, W-P.; Wang, S-S.; Hainsworth, J.; Schnadig, I.; Srinivas, S.; Vogelzang, N.; Loidl, W.; Meran, J.; Gross Goupil, M.; Joly, F.; Imkamp, F.; Klotz, T.; Krege, S.; May, M.; Schultze-Seemann, W.; Strauss, A.; Zimmermann, U.; Keizman, D.; Peer, A.; Sella, A.; Berardi, R.; De Giorgi, U.; Sternberg, C.N.; Rha, S.Y.; Bulat, I.; Izmailov, A.; Matveev, V.; Vladimirov, V.; Carles, J.; Font, A.; Saez, M.; Syndikus, I.; Tarver, K.; Appleman, L.; Burke, J.; Dawson, N.; Jain, S.; Zakharia, Y. Efficacy and safety of erdafitinib in patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: long-term follow-up of a phase 2 study. *Lancet Oncol.*, **2022**, *23*(2), 248-258. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00660-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00660-4) PMID: 35030333
- [37] Krook, M.A.; Reeser, J.W.; Ernst, G.; Barker, H.; Wilberding, M.; Li, G.; Chen, H.Z.; Roychowdhury, S. Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance. *Br. J. Cancer*, **2021**, *124*(5), 880-892. <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-020-01157-0> PMID: 33268819
- [38] Peng, J.; Sridhar, S.; Siefker-Radtke, A.O.; Selvarajah, S.; Jiang, D.M. Targeting the FGFR pathway in urothelial carcinoma: The future is now. *Curr. Treat. Options Oncol.*, **2022**, *23*(9), 1269-1287. <http://dx.doi.org/10.1007/s11864-022-01009-4> PMID: 35962938
- [39] Squires, M.; Ward, G.; Saxty, G.; Berdini, V.; Cleasby, A.; King, P.; Angibaud, P.; Perera, T.; Fazal, L.; Ross, D.; Jones, C.G.; Madin, A.; Benning, R.K.; Vickerstaffe, E.; O'Brien, A.; Frederickson, M.; Reader, M.; Hamlett, C.; Batey, M.A.; Rich, S.; Carr, M.; Miller, D.; Feltell, R.; Thiru, A.; Bethell, S.; Devine, L.A.; Graham, B.L.; Pike, A.; Cosme, J.; Lewis, E.J.; Freyne, E.; Lyons, J.; Irving, J.; Murray, C.; Newell, D.R.; Thompson, N.T. Potent, selective inhibitors of fibroblast growth factor receptor define fibroblast growth factor dependence in preclinical cancer models. *Mol. Cancer Ther.*, **2011**, *10*(9), 1542-1552. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0426> PMID: 21764904
- [40] Murray, C.W.; Newell, D.R.; Angibaud, P. A successful collaboration between academia, biotech and pharma led to discovery of erdafitinib, a selective FGFR inhibitor recently approved by the FDA. *MedChemComm*, **2019**, *10*(9), 1509-1511. <http://dx.doi.org/10.1039/C9MD90044F>
- [41] El Newahie, A.M.S.; Ismail, N.S.M.; Abou El Ella, D.A.; Abouzeid, K.A.M. Quinoxaline-based scaffolds targeting tyrosine kinases and their potential anticancer activity: Quinoxaline-based scaffolds targeting tyrosine kinases. *Arch. Pharm.*, **2016**, *349*(5), 309-326. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201500468> PMID: 27062086
- [42] Kumar, V.; Kaur, N.; Sahu, S. Role of tyrosine kinases and their inhibitors in cancer therapy: A comprehensive review. *Curr. Med. Chem.*, **2022**, *30*(13), 1464-1481. <http://dx.doi.org/10.2174/092986732966622072122952>
- [43] Rees, D.C. Medicines for millions of patients. *RSC Med. Chem.*, **2022**, *13*(1), 7-12. <http://dx.doi.org/10.1039/D1MD00279A> PMID: 35211673
- [44] Nishina, T.; Takahashi, S.; Iwasawa, R.; Noguchi, H.; Aoki, M.; Doi, T. Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamics of erdafitinib, a pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced or refractory solid tumors. *Invest. New Drugs*, **2018**, *36*(3), 424-434. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-017-0514-4> PMID: 28965185
- [45] Perera, T.P.S.; Jovcheva, E.; Mevellec, L.; Vialard, J.; De Lange, D.; Verhulst, T.; Paulussen, C.; Van De Ven, K.; King, P.; Freyne, E.; Rees, D.C.; Squires, M.; Saxty, G.; Page, M.; Murray, C.W.; Gilissen, R.; Ward, G.; Thompson, N.T.; Newell, D.R.; Cheng, N.; Xie, L.; Yang, J.; Platero, S.J.; Karkera, J.D.; Moy, C.; Angibaud, P.; Laquerre, S.; Lorenzi, M.V. Discovery and pharmacological characterization of JNJ-42756493 (erdafitinib), a functionally selective small-molecule FGFR family inhibitor. *Mol. Cancer Ther.*, **2017**, *16*(6), 1010-1020. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0589> PMID: 28341788
- [46] Bansal, P.; Dwivedi, D.K.; Hatwal, D.; Sharma, P.; Gupta, V.; Goyal, S.; Maithani, M. Erdafitinib as a novel and advanced treatment strategy of metastatic urothelial carcinoma. *Anticancer. Agents Med. Chem.*, **2021**, *21*(18), 2478-2486. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520621666210121093852> PMID: 33475078
- [47] Spierenburg, G.; van der Heijden, L.; van Langevelde, K.; Szuhai, K.; Bovée, J.V.G.M.; van de Sande, M.A.J.; Gelderblom, H. Teno-synovial giant cell tumors (TGCT): Molecular biology, drug targets and non-surgical pharmacological approaches. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2022**, *26*(4), 333-345. <http://dx.doi.org/10.1080/14728222.2022.2067040> PMID: 35443852

- [48] Dupont, C.A.; Riegel, K.; Pempaiah, M.; Juhl, H.; Rajalingam, K. Druggable genome and precision medicine in cancer: current challenges. *FEBS J.*, **2021**, *288*(21), 6142-6158. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15788> PMID: 33626231
- [49] Wen, J.; Wang, S.; Guo, R.; Liu, D. CSF1R inhibitors are emerging immunotherapeutic drugs for cancer treatment. *Eur. J. Med. Chem.*, **2023**, *245*(Pt 1), 114884. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114884> PMID: 36335744
- [50] Palmerini, E.; Staals, E.L. Treatment updates on tenosynovial giant cell tumor. *Curr. Opin. Oncol.*, **2022**, *34*(4), 322-327. <http://dx.doi.org/10.1097/CCO.0000000000000853> PMID: 35837703
- [51] Zhang, C.; Ibrahim, P.N.; Zhang, J.; Burton, E.A.; Habets, G.; Zhang, Y.; Powell, B.; West, B.L.; Matusow, B.; Tsang, G.; Shellooe, R.; Carias, H.; Nguyen, H.; Marimuthu, A.; Zhang, K.Y.J.; Oh, A.; Bremer, R.; Hurt, C.R.; Artis, D.R.; Wu, G.; Nespi, M.; Spevak, W.; Lin, P.; Nolop, K.; Hirth, P.; Tesch, G.H.; Bollag, G. Design and pharmacology of a highly specific dual FMS and KIT kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*(14), 5689-5694. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1219457110> PMID: 23493555
- [52] Tap, W.D.; Wainberg, Z.A.; Anthony, S.P.; Ibrahim, P.N.; Zhang, C.; Healey, J.H.; Chmielowski, B.; Staddon, A.P.; Cohn, A.L.; Shapiro, G.I.; Keedy, V.L.; Singh, A.S.; Puzanov, I.; Kwak, E.L.; Wagner, A.J.; Von Hoff, D.D.; Weiss, G.J.; Ramanathan, R.K.; Zhang, J.; Habets, G.; Zhang, Y.; Burton, E.A.; Visor, G.; Sanftner, L.; Severson, P.; Nguyen, H.; Kim, M.J.; Marimuthu, A.; Tsang, G.; Shellooe, R.; Gee, C.; West, B.L.; Hirth, P.; Nolop, K.; van de Rijm, N.; Hsu, H.H.; Peterfy, C.; Lin, P.S.; Tong-Starksen, S.; Bollag, G. Structure-guided blockade of CSF1R kinase in tenosynovial giant-cell tumor. *N. Engl. J. Med.*, **2015**, *373*(5), 428-437. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1411366> PMID: 26222558
- [53] Alsayadi, Y.M.M.A.; Chawla, P.A. Prospects of treating tenosynovial giant cell tumor through pexidartinib: A review. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2021**, *21*(12), 1510-1519. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520620999201102123555> PMID: 33143617
- [54] Benner, B.; Good, L.; Quiroga, D.; Schultz, T.E.; Kassem, M.; Carlson, W.E.; Cherian, M.A.; Sardesai, S.; Wesolowski, R. Pexidartinib, a novel small molecule CSF-1R inhibitor in use for tenosynovial giant cell tumor: A systematic review of pre-clinical and clinical development. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2020**, *14*, 1693-1704. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S253232> PMID: 32440095
- [55] Liang, X.; Wu, P.; Yang, Q.; Xie, Y.; He, C.; Yin, L.; Yin, Z.; Yue, G.; Zou, Y.; Li, L.; Song, X.; Lv, C.; Zhang, W.; Jing, B. An update of new small-molecule anticancer drugs approved from 2015 to 2020. *Eur. J. Med. Chem.*, **2021**, *220*, 113473. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113473> PMID: 33906047
- [56] Rio-Vilariño, A.; del Puerto-Nevado, L.; García-Foncillas, J.; Cebrián, A. Ras family of small GTPases in CRC: New perspectives for overcoming drug resistance. *Cancers (Basel)*, **2021**, *13*(15), 3757. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13153757> PMID: 34359657
- [57] Sheffels, E.; Kortum, R.L. The role of wild-type RAS in oncogenic RAS transformation. *Genes*, **2021**, *12*(5), 662. <http://dx.doi.org/10.3390/genes12050662>
- [58] Erlanson, D.A.; Webster, K.R. Targeting mutant KRAS. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2021**, *62*, 101-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.02.010> PMID: 33838397
- [59] Li, H.-Y.; Qi, W.-L.; Wang, Y.-X. Covalent inhibitor targets KRASG12C: A new paradigm for drugging the undruggable and challenges ahead. *Genes Dis.*, **2021**. Epub ahead of print <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2021.08.011>
- [60] Ostrem, J.M.; Peters, U.; Sos, M.L.; Wells, J.A.; Shokat, K.M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, **2013**, *503*(7477), 548-551. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12796> PMID: 24256730
- [61] Janes, M.R.; Zhang, J.; Li, L.S.; Hansen, R.; Peters, U.; Guo, X.; Chen, Y.; Babbar, A.; Firdaus, S.J.; Darjania, L.; Feng, J.; Chen, J.H.; Li, S.; Li, S.; Long, Y.O.; Thach, C.; Liu, Y.; Zariw, A.; Ely, T.; Kucharski, J.M.; Kessler, L.V.; Wu, T.; Yu, K.; Wang, Y.; Yao, Y.; Deng, X.; Zarrinkar, P.P.; Brehmer, D.; Dhanak, D.; Lorenzi, M.V.; Hu-Lowe, D.; Patricelli, M.P.; Ren, P.; Liu, Y. Targeting KRAS mutant cancers with a covalent G12C-specific inhibitor. *Cell*, **2018**, *172*(3), 578-589.e17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.006> PMID: 29373830
- [62] Shin, Y.; Jeong, J.W.; Wurz, R.P.; Achanta, P.; Arvedson, T.; Bartberger, M.D.; Campuzano, I.D.G.; Fucini, R.; Hansen, S.K.; Ingersoll, J.; Iwig, J.S.; Lipford, J.R.; Ma, V.; Kopecky, D.J.; McCarter, J.; San Miguel, T.; Mohr, C.; Sabet, S.; Saiki, A.Y.; Sawayama, A.; Sethofer, S.; Tegley, C.M.; Volak, L.P.; Yang, K.; Lanman, B.A.; Erlanson, D.A.; Cee, V.J. Discovery of *N*-(1-Acryloylazetid-3-yl)-2-(1-*H*-indol-1-yl)acetamides as Covalent Inhibitors of KRAS^{G12C}. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2019**, *10*(9), 1302-1308. <http://dx.doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00258> PMID: 31531201
- [63] Lanman, B.A.; Allen, J.R.; Allen, J.G.; Amegadzie, A.K.; Ashton, K.S.; Booker, S.K.; Chen, J.J.; Chen, N.; Frohn, M.J.; Goodman, G.; Kopecky, D.J.; Liu, L.; Lopez, P.; Low, J.D.; Ma, V.; Minatti, A.E.; Nguyen, T.T.; Nishimura, N.; Pickrell, A.J.; Reed, A.B.; Shin, Y.; Siegmund, A.C.; Tamayo, N.A.; Tegley, C.M.; Walton, M.C.; Wang, H.L.; Wurz, R.P.; Xue, M.; Yang, K.C.; Achanta, P.; Bartberger, M.D.; Canon, J.; Hollis, L.S.; McCarter, J.D.; Mohr, C.; Rex, K.; Saiki, A.Y.; San, M.T.; Volak, L.P.; Wang, K.H.; Whittington, D.A.; Zech, S.G.; Lipford, J.R.; Cee, V.J. Discovery of a covalent inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the treatment of solid tumors. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*(1), 52-65. <http://dx.doi.org/10.1021/acscimedchem.9b01180> PMID: 31820981
- [64] Blair, H.A. Sotorasib: First Approval. *Drugs*, **2021**, *81*(13), 1573-1579. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-021-01574-2> PMID: 34357500
- [65] Deeks, E.D. Asciminib: First Approval. *Drugs*, **2022**, *82*(2), 219-226. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-021-01662-3> PMID: 35041175
- [66] Schoepfer, J.; Jahnke, W.; Berellini, G.; Buonamici, S.; Cotesta, S.; Cowan-Jacob, S.W.; Dodd, S.; Druce, P.; Fabbro, D.; Gabriel, T.; Groell, J.M.; Grotzfeld, R.M.; Hassan, A.Q.; Henry, C.; Iyer, V.; Jones, D.; Lombardo, F.; Loo, A.; Manley, P.A.; Pellé, X.; Rummel, G.; Salem, B.; Warmuth, M.; Wylie, A.A.; Zoller, T.; Marzinzik, A.L.; Furet, P. Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(18), 8120-8135. <http://dx.doi.org/10.1021/acscimedchem.8b01040> PMID: 30137981
- [67] Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P.A. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: Progress and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2021**, *20*(7), 551-569. <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-021-00195-4> PMID: 34002056
- [68] Réa, D.; Hughes, T.P. Development of asciminib, a novel allosteric inhibitor of BCR-ABL1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2022**, *171*, 103580. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103580> PMID: 35021069
- [69] Nagar, B.; Hantschel, O.; Young, M.A.; Scheffzek, K.; Veach, D.; Bornmann, W.; Clarkson, B.; Superti-Furga, G.; Kuriyan, J. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, **2003**, *112*(6), 859-871. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00194-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00194-6) PMID: 12654251
- [70] Hantschel, O.; Nagar, B.; Guettler, S.; Kretzschmar, J.; Dorey, K.; Kuriyan, J.; Superti-Furga, G. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, **2003**, *112*(6), 845-857. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00191-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00191-0) PMID: 12654250
- [71] Adrián, F.J.; Ding, Q.; Sim, T.; Velentza, A.; Sloan, C.; Liu, Y.; Zhang, G.; Hur, W.; Ding, S.; Manley, P.; Mestan, J.; Fabbro, D.; Gray, N.S. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*(2), 95-102. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio760> PMID: 16415863
- [72] Schiffer, C.A. Asciminib for CML: Same target, new arrow. *Blood*, **2021**, *138*(21), 2009-2010. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2021013257> PMID: 34821938
- [73] Addie, M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Crafter, C.; Currie, G.; Davies, B.R.; Debreczeni, J.; Dry, H.; Dudley, P.; Greenwood, R.; Johnson, P.D.; Kettle, J.G.; Lane, C.; Lamont, G.; Leach, A.; Luke, R.W.A.; Morris, J.; Ogilvie, D.; Page, K.; Pass, M.; Pearson, S.; Ruston, L. Discovery of 4-Amino-*N*-(1*S*)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl-1-(7-*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an Orally Bioavailable, Potent Inhibitor of Akt Kinases. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*(5), 2059-2073. <http://dx.doi.org/10.1021/jm301762v> PMID: 23394218

- [74] Siu, K.T.; Ramachandran, J.; Yee, A.J.; Eda, H.; Santo, L.; Panaroni, C.; Mertz, J.A.; Sims, R.J., III; Cooper, M.R.; Raje, N. Pre-clinical activity of CPI-0610, a novel small-molecule bromodomain and extra-terminal protein inhibitor in the therapy of multiple myeloma. *Leukemia*, **2017**, *31*(8), 1760-1769. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.355> PMID: 27890933
- [75] Gehling, V.S.; Hewitt, M.C.; Vaswani, R.G.; Leblanc, Y.; Côté, A.; Nasveschuk, C.G.; Taylor, A.M.; Harmange, J.C.; Audia, J.E.; Pardo, E.; Joshi, S.; Sandy, P.; Mertz, J.A.; Sims, R.J., III; Bergeron, L.; Bryant, B.M.; Bellon, S.; Poy, F.; Jayaram, H.; Sankaranarayanan, R.; Yellapantula, S.; Bangalore Srinivasamurthy, N.; Birudukota, S.; Albrecht, B.K. Discovery, design, and optimization of isoxazole azepine BET inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, *4*(9), 835-840. <http://dx.doi.org/10.1021/ml4001485> PMID: 24900758
- [76] Mullard, A. Antibody clamps pry open small-molecule drug discovery opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2022**, *21*(4), 247-248. <http://dx.doi.org/10.1038/d41573-022-00054-w> PMID: 35288684
- [77] Brown, A.J.H.; Bradley, S.J.; Marshall, F.H.; Brown, G.A.; Bennett, K.A.; Brown, J.; Cansfield, J.E.; Cross, D.M.; de Graaf, C.; Hudson, B.D.; Dwomoh, L.; Dias, J.M.; Errey, J.C.; Hurrell, E.; Liptrot, J.; Mattedi, G.; Molloy, C.; Nathan, P.J.; Okrasa, K.; Osborne, G.; Patel, J.C.; Pickworth, M.; Robertson, N.; Shahabi, S.; Bundgaard, C.; Phillips, K.; Broad, L.M.; Goonawardena, A.V.; Morairty, S.R.; Browning, M.; Perini, F.; Dawson, G.R.; Deakin, J.F.W.; Smith, R.T.; Sexton, P.M.; Wameck, J.; Vinson, M.; Tasker, T.; Tehan, B.G.; Teobald, B.; Christopoulos, A.; Langmead, C.J.; Jazayeri, A.; Cooke, R.M.; Rucktooa, P.; Congreve, M.S.; Weir, M.; Tobin, A.B. From structure to clinic: Design of a muscarinic M1 receptor agonist with the potential to treat Alzheimer's disease. *Cell*, **2021**, *184*(24), 5886-5901.e22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.001> PMID: 34822784
- [78] Markert, C.; Thoma, G.; Srinivas, H.; Bollbuck, B.; Lüönd, R.M.; Miltz, W.; Wälchli, R.; Wolf, R.; Hinrichs, J.; Bergsdorf, C.; Azzouli, K.; Penno, C.A.; Klein, K.; Wack, N.; Jäger, P.; Hasler, F.; Beerli, C.; Loetscher, P.; Dawson, J.; Wiczorek, G.; Numao, S.; Littlewood-Evans, A.; Röhn, T.A. Discovery of LYS006, a potent and highly selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64*(4), 1889-1903. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01955> PMID: 33592148
- [79] Lee, K.L.; Ambler, C.M.; Anderson, D.R.; Boscoe, B.P.; Bree, A.G.; Brodfuehrer, J.I.; Chang, J.S.; Choi, C.; Chung, S.; Curran, K.J.; Day, J.E.; Dehnhardt, C.M.; Dower, K.; Drozda, S.E.; Frisbie, R.K.; Gavrin, L.K.; Goldberg, J.A.; Han, S.; Hegen, M.; Hepworth, D.; Hope, H.R.; Kamtekar, S.; Kilty, I.C.; Lee, A.; Lin, L.L.; Lovering, F.E.; Lowe, M.D.; Mathias, J.P.; Morgan, H.M.; Murphy, E.A.; Papaioannou, N.; Patny, A.; Pierce, B.S.; Rao, V.R.; Saiah, E.; Samardjiev, I.J.; Samas, B.M.; Shen, M.W.H.; Shin, J.H.; Soutter, H.H.; Strohbach, J.W.; Symanowicz, P.T.; Thomason, J.R.; Trzupke, J.D.; Vargas, R.; Vincent, F.; Yan, J.; Zapf, C.W.; Wright, S.W. Discovery of Clinical Candidate 1-[(2*S*, 3*S*, 4*S*)-3-ethyl-4-fluoro-5-oxopyrrolidin-2-yl]methoxy-7-methoxyisoquinoline-6-carboxamide (PF-06650833), a potent, selective inhibitor of interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK4), by fragment-based drug design. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*(13), 5521-5542. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00231> PMID: 28498658
- [80] Messick, T.E.; Smith, G.R.; Soldan, S.S.; McDonnell, M.E.; Deakynne, J.S.; Malecka, K.A.; Tolvinski, L.; van den Heuvel, A.P.J.; Gu, B.W.; Cassel, J.A.; Tran, D.H.; Wassermann, B.R.; Zhang, Y.; Velvadapu, V.; Zartler, E.R.; Busson, P.; Reitz, A.B.; Lieberman, P.M. Structure-based design of small-molecule inhibitors of EBNA1 DNA binding blocks Epstein-Barr virus latent infection and tumor growth. *Sci. Transl. Med.*, **2019**, *11*(482), eaau5612. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5612> PMID: 30842315
- [81] Maragno, A.L.; Mistry, P.; Kotschy, A. Abstract 4482: S64315 (MIK665) is a potent and selective Mcl1 inhibitor with strong anti-tumor activity across a diverse range of hematologic tumor models. *Exper. Mol. Therap.*, American Association for Cancer Research, **2019**. <http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-4482>
- [82] Reich, S.H.; Sprengeler, P.A.; Chiang, G.G.; Appleman, J.R.; Chen, J.; Clarine, J.; Eam, B.; Ernst, J.T.; Han, Q.; Goel, V.K.; Han, E.Z.R.; Huang, V.; Hung, I.N.J.; Jemison, A.; Jessen, K.A.; Molter, J.; Murphy, D.; Neal, M.; Parker, G.S.; Shaghafi, M.; Sperry, S.; Staunton, J.; Stumpf, C.R.; Thompson, P.A.; Tran, C.; Webber, S.E.; Wegerski, C.J.; Zheng, H.; Webster, K.R. Structure-based design of pyridone-aminal eFT508 targeting dysregulated translation by selective mitogen-activated protein kinase interacting kinases 1 and 2(MNK1/2) inhibition. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(8), 3516-3540. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01795> PMID: 29526098
- [83] Tron, A.E.; Belmonte, M.A.; Adam, A.; Aquila, B.M.; Boise, L.H.; Chiarparin, E.; Cidado, J.; Embrey, K.J.; Gangl, E.; Gibbons, F.D.; Gregory, G.P.; Hargreaves, D.; Hendricks, J.A.; Johannes, J.W.; Johnstone, R.W.; Kazmirski, S.L.; Kettle, J.G.; Lamb, M.L.; Matulis, S.M.; Nooka, A.K.; Packer, M.J.; Peng, B.; Rawlins, P.B.; Robbins, D.W.; Schuller, A.G.; Su, N.; Yang, W.; Ye, Q.; Zheng, X.; Secrist, J.P.; Clark, E.A.; Wilson, D.M.; Fawell, S.E.; Hird, A.W. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.*, **2018**, *9*(1), 5341. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w> PMID: 30559424
- [84] Johnson, C.N.; Ahn, J.S.; Buck, I.M.; Chiarparin, E.; Day, J.E.H.; Hopkins, A.; Howard, S.; Lewis, E.J.; Martins, V.; Millemaggi, A.; Munck, J.M.; Page, L.W.; Peakman, T.; Reader, M.; Rich, S.J.; Saxty, G.; Smyth, T.; Thompson, N.T.; Ward, G.A.; Williams, P.A.; Wilshner, N.E.; Chessari, G. A fragment-derived clinical candidate for antagonism of X-Linked and Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins: 1-(6-[(4-Fluorophenyl)methyl]-5-(hydroxymethyl)-3,3-dimethyl-1*H*, 2*H*, 3*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-1-yl)-2-[(2*R*, 5*R*)-5-methyl-2-[(3*R*)-3-methylmorpholin-4-yl]methyl]piperazin-1-yl]ethan-1-one (ASTX660). *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(16), 7314-7329. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00900> PMID: 30091600
- [85] Munck, J.M.; Berdini, V.; Bevan, L.; Brothwood, J.L.; Castro, J.; Courtin, A.; East, C.; Ferraldeschi, R.; Heightman, T.D.; Hindley, C.J.; Kucia-Tran, J.; Lyons, J.F.; Martins, V.; Muench, S.; Murray, C.W.; Norton, D.; O'Reilly, M.; Reader, M.; Rees, D.C.; Rich, S.J.; Richardson, C.J.; Shah, A.D.; Stanczuk, L.; Thompson, N.T.; Wilshner, N.E.; Woolford, A.J.A.; Wallis, N.G. ASTX029, a novel dual-mechanism ERK inhibitor, modulates both the phosphorylation and catalytic activity of ERK. *Mol. Cancer Ther.*, **2021**, *20*(10), 1757-1768. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0909> PMID: 34330842
- [86] Smith, C.R.; Aranda, R.; Bobinski, T.P.; Briere, D.M.; Burns, A.C.; Christensen, J.G.; Clarine, J.; Engstrom, L.D.; Gunn, R.J.; Ivetaç, A.; Jean-Baptiste, R.; Ketcham, J.M.; Kobayashi, M.; Kuehler, J.; Kulyk, S.; Lawson, J.D.; Moya, K.; Olson, P.; Rahbaek, L.; Thomas, N.C.; Wang, X.; Waters, L.M.; Marx, M.A. Fragment-based discovery of MRTX1719, a synthetic lethal inhibitor of the PRMT5•MTA complex for the treatment of MTAP-deleted cancers. *J. Med. Chem.*, **2022**, *65*(3), 1749-1766. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01900> PMID: 35041419
- [87] Konteatis, Z.; Travins, J.; Gross, S.; Marjon, K.; Barnett, A.; Mandley, E.; Nicolay, B.; Nagaraja, R.; Chen, Y.; Sun, Y.; Liu, Z.; Yu, J.; Ye, Z.; Jiang, F.; Wei, W.; Fang, C.; Gao, Y.; Kalev, P.; Hyer, M.L.; DeLaBarre, B.; Jin, L.; Padyana, A.K.; Dang, L.; Murte, J.; Biller, S.A.; Sui, Z.; Marks, K.M. Discovery of AG-270, a first-in-class oral MAT2A inhibitor for the treatment of tumors with homozygous MTAP deletion. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64*(8), 4430-4449. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01895> PMID: 33829783

APÊNDICE O – Terceiro artigo publicado concernente ao tema central da Tese intitulado: *Current Fragment-to-lead Approaches Starting from the 7-azaindole: The Pharmacological Versatility of a Privileged Molecular Fragment.*



Current Fragment-to-lead Approaches Starting from the 7-azaindole: The Pharmacological Versatility of a Privileged Molecular Fragment



Leandro Marcos Santos^{1,2,*} and Nelson José Freitas da Silveira¹

¹Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation / MolMod-CS (D311-F), Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas / UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, 37130-001, Brazil; ²Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory / LQFar (D202A), Department of Food and Medicines, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas / UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, 37130-001, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: March 26, 2023
Revised: June 03, 2023
Accepted: June 15, 2023

DOI:
10.2174/1568026623666230718100541



CrossMark

Abstract: Fragment-based drug discovery is one of the most powerful paradigms in the recent context of medicinal chemistry and is being widely practiced by academic and industrial researchers. Currently, azaindoles are among the most exploited molecular fragments in pharmaceutical innovation projects inspired by fragment-to-lead strategies. The 7-azaindole is the most prominent representative within this remarkable family of pyrrolopyridine fragments, as it is present in the chemical structure of several approved antitumor drugs and also of numerous therapeutic candidates. In this paper, a brief overview on existing proofs of concept in the literature will be presented, as well as some recent works that corroborate 7-azaindole as a privileged and pharmacologically versatile molecular fragment.

Keywords: Fragment-based Drug Discovery (FBDD), Fragment-to-lead (F2L), Pyrrolopyridine, 7-azaindole, Antitumor.

1. INTRODUCTION

The pyridine (C₅H₅N) and pyrrole (C₄H₅N) rings are chemical building blocks of huge notoriety in medicinal chemistry. The fusion of these two historically pharmacophore rings forms bicyclic compounds with seven carbon (C) atoms and one nitrogen (N) atom in each nucleus. This new heteroaromatic ring is quite peculiar, exhibiting mixed and distinctive characteristics compared to the individual rings. In fact, pyridine N has its basicity changed after fusion and this directly interferes with its ability to interact (establish non-covalent bond, *e.g.*, hydrogen bond, HB) or react (form covalent bond, *e.g.*, acid-base reaction, nucleophilic substitution). In addition, the H of the pyrrole N remains labile and both factors contribute to the improved amphoteric character of the new nine-membered ring [1-4].

One of the numerous chemical families that originate by the junction of the pyrrole ring and the pyridine ring is given the suggestive name pyrrolopyridines (“*pyrrole+pyridine=pyrrolopyridine*”). These compounds belong to a particular class of bicyclic azaarenes, in which the N of pyridine occupies different positions in the ring compared to the N of pyrrole, whose position can be either central or lateral after fusion. If this N of pyrrolopyridine is central (positions 2 or 6), pyrrolopyridine is called azaisoindole (AII) [5]. Now, if it is lateral (positions 1 or 3), pyrrolopyridine characterizes the class of azaindoles (AIs) [1, 6]. In Fig. (1), some pyrrolopyridines are represented by six positional isomers

(C₇H₆N₂), two of which are AIIs (5-AII and 1-AII) and four AIs (4-AI, 5-AI, 6-AI and 7-AI), which will receive special attention in this article.

As such, Fig. (2) shows some data on AIs that allow one to compare 7-AI with its congener counterparts and realize that it is one of the most prominent isomers in this family of compounds due to its prominent features and modulable drug-like properties [7]. An interesting metric is its frequency as a chemical scaffold in important molecule banks, in which most of the chemicals derived from AIs contain this isomer in their molecular structure. The search was performed using the SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) notation of each isomer as an input argument. These data reflect the relative hegemony of this isomer depicting its majority occurrence as a structural subunit of several molecules with great pharma-chemical and technological interest [8-10].

The mere exchange of the position of the two N atoms in the ring considerably affects the properties of each isomer. However, they all have as a common virtue being part of larger molecules of synthetic or natural origin (Natural Products, NPs) with high medicinal and pharmaceutical potential [11]. Factually, a wide spectrum of biological activities is reported in the scientific literature for this family of compounds: analgesic, anti-inflammatory, anti-diabetes, antibacterial, antifungal, antituberculosis, antileishmaniasis, autoimmune, antitumor and antiviral, including against AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) and SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) [1, 6, 12-35]. Due to this vast field of possibilities for therapeutic application, AIs have been extensively studied by the worldwide scientific community in recent decades and several

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation / MolMod-CS (D311-F), Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas/UNIFAL-MG, Alfenas, Minas Gerais, 37130-001, Brazil; E-mail: leandro.santos@unifal-mg.edu.br

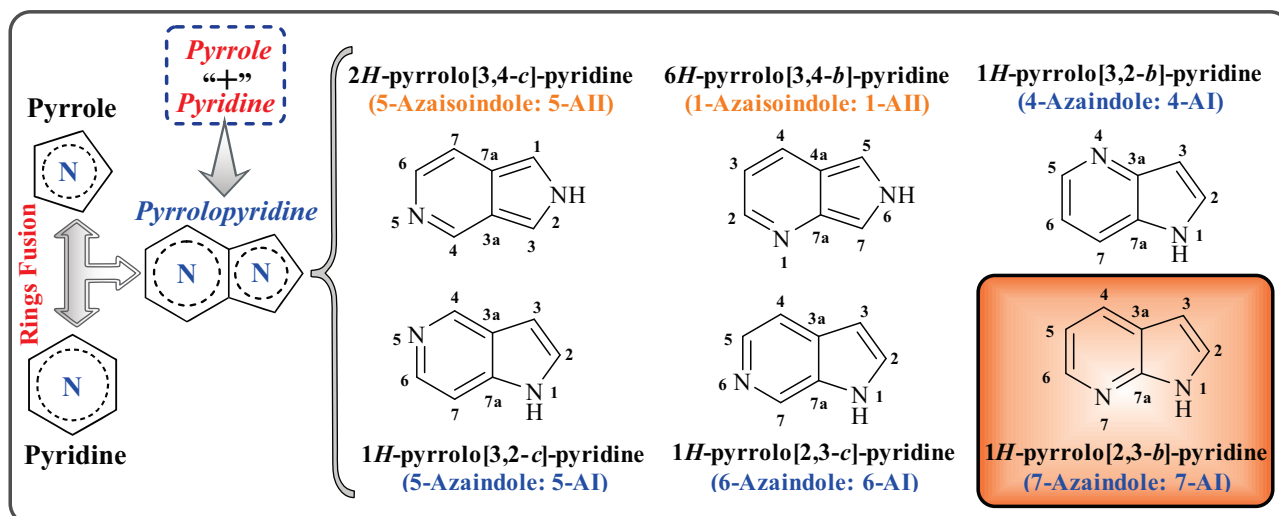


Fig. (1). Illustrative representation of the junction between the pyrrole and pyridine rings originating 6 pyrolopyridine isomeric structures, whose main focus will be attributed to 7-AI (some H atoms have been omitted for clarity). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

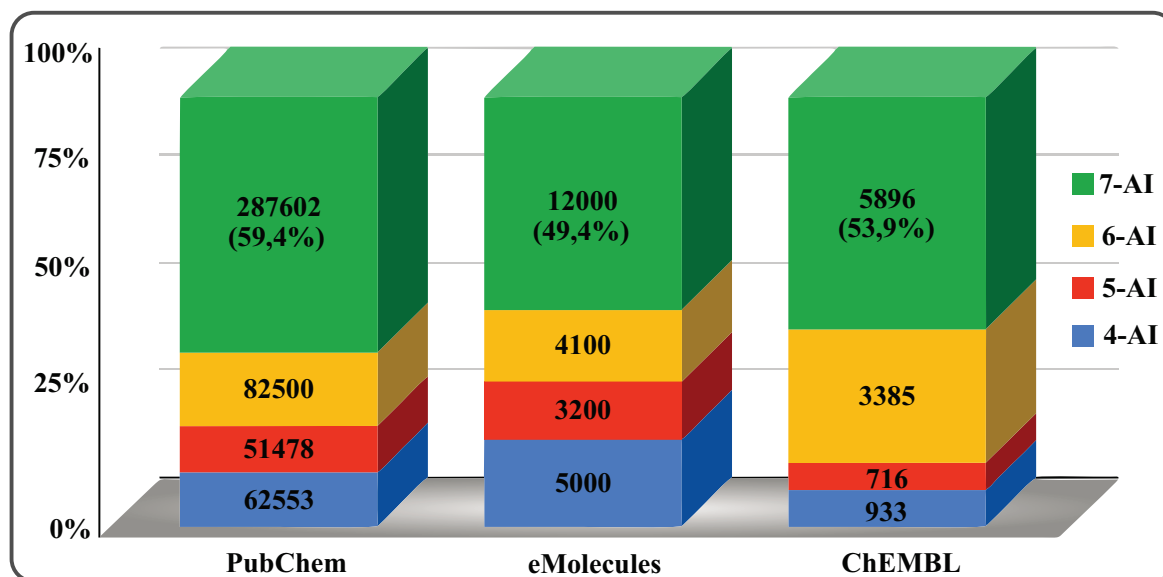


Fig. (2). Occurrence of AIs scaffolds as substructures of molecules deposited in three important databases (Pubchem [8]; e-Molecules [9]; and, ChEMBL [10]), corroborating the 7-AI as the most frequent and important isomer in this chemical family (SMILES notation of each isomer was used as entry argument. Search performed on 09 February 2023). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

synthetic methodologies have been successfully developed with high yields [3, 36]. As a consequence of these numerous laboratory efforts, it has become very easy to find molecular representatives of this chemical class as therapeutic candidates or approved drugs in the current BigPharma landscape. Table 1 presents some relevant molecules containing AIs nuclei provided with great therapeutic potential.

Based on the data summarized in Table 1, which are representative of the approximate proportion of each isomer found in the literature, it is inevitable to mention that 7-AI is

also the isomer with the largest number of therapeutic agents released for the medical clinic (some of them are listed in Table 1), corroborating its supremacy [28-34]. Moreover, it can be considered a chemically versatile molecular block, offering several functionalization possibilities around the ring and attracting the interest of distinguished professionals engaged in the chemical synthesis of new therapeutic agents. In fact, this pyrolopyridine has been the starting point and the key to the success of some successful programs in the current portfolio of large pharmaceutical companies and

Table 1. Biologically active small molecules derived from AIs with their myriad of biological targets and related diseases. The original references can be consulted for more details on the chemical structures of the compounds and their respective biological activities.

AIs	Biological Target(s)	Disease Tests	Status (Name or Code)	References
4-AI; 5-AI; 6-AI; 7-AI	HIV gp120; HIV integrase; HIV transcriptase HCV RNA; Proteases; IL-1; JAK	SARS-CoV-2 HIV; EVD HCV; Dengue; Influenza	Candidates	[1]
	Phosphatase; Kinases; M1 mAChR PAM	Cancer; Arthritis; Diabetes; Alzheimer; Tuberculosis; HIV; Inflammation; Allergy	Candidates	[6]
	+20 kinases	Cancer; Diabetes; CNS: Inflammatory; Cardiovascular	Candidates	[15]
4-AI	Not specified	Gram-Negative Bacteria	Candidates	[16]
	DprE1	Tuberculosis	Candidate (TBA7371)	[17]
5-AI	CB ₂	Chronic Pain; CNS	Candidate (GSK554418A)	[18]
6-AI	Spike protein; 3CL ^{pro} ; PL ^{pro} ; M ^{pro}	SARS-CoV-2	Candidate	[1, 14]
	HIV gp120	HIV	Drug (Temsavir)	[19]
7-AI	5-HT ₆ R	Alzheimer	Candidates	[20]
	GLO1	Diabetes; Cancer	Candidates	[21]
	CDK12	Cancer	Candidates (Meriolin1-3)	[11, 22]
	HNE	Inflammation	Candidates	[23]
	LmCK1; GSK-3β	Leishmaniasis; Cancer	Candidates	[24]
	PGD ₂	Asthma	Candidate (Fevipirant)	[25, 26]
	CB ₂	Antipsychotic	Candidate (SGT-263)	[27]
	FGFR	Cancer	Drug (Pemigartinib)	[28]
	JAK3	Cancer	Drug (Decernotinib)	[29]
	B-RAF ^{V600E}	Cancer	Drug (Vemurafenib)	[30]
	Bcl-2	Cancer	Drug (Venetoclax)	[31]
	CSF1R	Cancer	Drug (Pexidartinib)	[32]
	JAK	Cancer	Drug (Peficitinib)	[33]
	PB ₂ subunit	Influenza	Drug (Pimodivir)	[34]

Note:[1, 6, 12-35]

Abbreviations: HIV = Human Immunodeficiency Virus; HIV gp120 = HIV Glycoprotein 120; HCV RNA = Hepatitis C Virus Ribonucleic Acid; IL-1 = Interleukin 1; JAK = Janus Kinase; SARS-CoV-2 = Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; EVD = Ebola Virus Disease; M1 mAChR PAM = M1 Subtype of Muscarinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulator; CNS = Central Nervous System; DprE1 = Decaprenylphosphoryl-β-D-ribose 2'-epimerase 1; CB₂ = Cannabinoid 2 Receptor; 3CL^{pro} = 3 Chymotrypsin-like protease; PL^{pro} = Papain-like protease; M^{pro} = Main Protease; 5-HT₆R = 5-hydroxytryptamine 6 receptor or serotonin 6 receptor; GLO1 = Glyoxalase 1; CDK12 = Cyclin-dependent Kinase 12; HNE = Human Neutrophil Elastase; LmCK1 = *Leishmania* Casein Kinase 1; GSK-3β = Glycogen Synthase Kinase-3beta; PGD₂ = Prostaglandin D₂; FGFR = Fibroblast Growth Factor Receptor; JAK3 = Janus Kinase 3; B-RAF^{V600E} = B-type rapidly accelerated fibrosarcoma mutated valine 600; Bcl-2 = B-cell lymphoma-2; CSF1R = Colony-stimulating Factor 1 Receptor; PB₂ = Polymerase Basic 2.

academic research laboratories that relentlessly pursue innovation in pharmaceuticals [36, 37]. Some of these successful campaigns were engineered under the prism of a recent medicinal chemistry paradigm aptly referred to in the literature as Fragment-based Drug Discovery (FBDD) [30-32, 38-40].

FBDD is a rational drug design strategy that emerged late last century, whose basic steps, (Fig. 3), initially consisted of biological target selection and formation of the chemical library of small ligands, followed by screening and identification of promising ligands by means of High Throughput Screening (HTS) in custom and diverse chemical

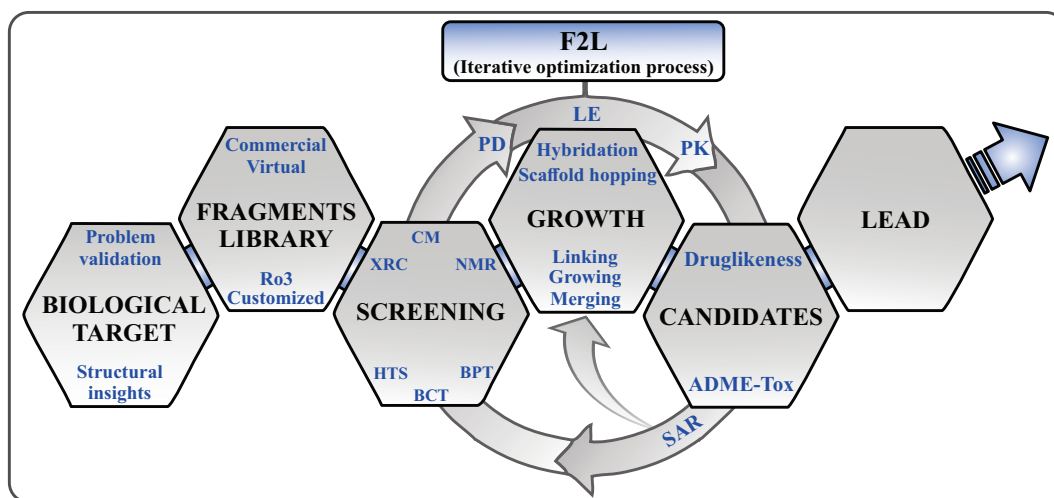


Fig. (3). FBDD pipeline arranged in sequence of basic steps and its main tools, highlighting the F2L approach as an iterative molecular optimization process aiming at the best candidates and, consequently, the best lead compound to progress to the clinical steps. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

space, Biochemical (BCT) / Biophysical (BPT) techniques, Computational Methods (CM), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and X-ray Crystallography (XRC) [41]. In the context of FBDD it is worth mentioning that these small ligands are defined as low bulky, low mass molecular fragments that generally conform to the rule of 3 (“Ro3”). Usually these fragments bind weakly to the biological target, requiring considerable sensitivity of experimental screening techniques (e.g., BCT/BPT). The best fragments are selected based on the Pharmacodynamic Response (PD) that results from their affinity to the target and can be measured empirically by properties expressing inhibitory capacity (e.g., IC_{50} -inhibitory concentration; GI_{50} -growth inhibition; K_i -inhibition constant; K_d -dissociation constant) or calculated computationally (*in silico* protocols, e.g., virtual screening/molecular docking) by binding energy (ΔG -variation of Gibbs free energy). In addition, two other parameters as or more important than affinity itself are Ligand Efficiency (LE) and Group Efficiency (GE), which consist of two of the key metrics during an FBDD project. After the screening and selection step of promising fragments, next stage is molecular growth, in which the main fragments are grown and expanded into larger and more potent ligands (candidates) through fragment-to-lead (F2L) approaches, whose iterative structural optimization process can be guided by insights extracted from the XRC structures of the target (when available) and the Structure-activity Relationships (SAR) of the candidates, aiming to improve their Pharmacokinetic (PK) and ADME-Tox (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity) properties, evolving them towards a lead compound with the best drug-like parameters [41-43].

Currently, FBDD has a few dozen compounds that are being evaluated in different phases of clinical trials and with great potential to reach the much desired drug status. Moreover, this strategy enjoyed its rise marked by several proofs of concept that emerged in the last decade to enhance the molecular arsenal of therapeutics in the medical clinic, cor-

roborating the list of potentialities of this new *modus operandi* within the industry that invents molecules to improve and save lives [44]. Precisely, six FBDD-derived molecules have already been approved by the US Agency Food and Drug Administration (USFDA) from 2011 to 2021:

- 1st: Vemurafenib, Zelboraf[®], $C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$ [30];
- 2nd: Venetoclax, Venclexta[®], $C_{45}H_{50}ClN_7O_7S$ [31];
- 3rd: Erdafitinib, Balversa[®], $C_{25}H_{30}N_6O_2$ [38];
- 4th: Pexidartinib, Turalio[™], $C_{20}H_{15}ClF_3N_5$ [32];
- 5th: Sotorasib, Lumakras[™], $C_{30}H_{30}F_2N_6O_3$ [39]; and,
- 6th: Asciminib, Scemblix[®], $C_{20}H_{18}ClF_2N_5O_3$ [40].

All of these molecules were designed to combat rare and pernicious cancers, elevating FBDD to a level of scientific notoriety and inspiring great recognition from medicinal chemistry and clinical oncology professionals. Of these six drugs, three of them (50%) have the 7-AI fragment listed in Table 1 (Vemurafenib [30], Venetoclax [31] and Pexidartinib [32]) and four of them (66.7%) are kinase inhibitors (Vemurafenib [30], Erdafitinib [38], Pexidartinib [32] and Asciminib [40]). Coincidentally, looking at the subgroup of the three 7-AI-derived drugs and their respective molecular targets, (Fig. 4a), one notices that the proportion of kinase inhibitors remains at this percentage (66.7%), because two of them (Vemurafenib [30] and Pexidartinib [32]) act against human kinome enzymes (B-RAF^{V600E} and CSF1R, respectively) can occupy a rather peculiar binding pocket. A plausible reason for this preference for kinases is that 7-AI has a close bioisosteric relationship with the purine bases adenine ($C_5H_5N_5$) and guanine ($C_5H_5N_5O$). It mimics the pharmacophore role of these endogenous molecules in biophase and establishes similar supramolecular interactions in ligand-receptor complexes. This attribute of 7-AI can be corroborated

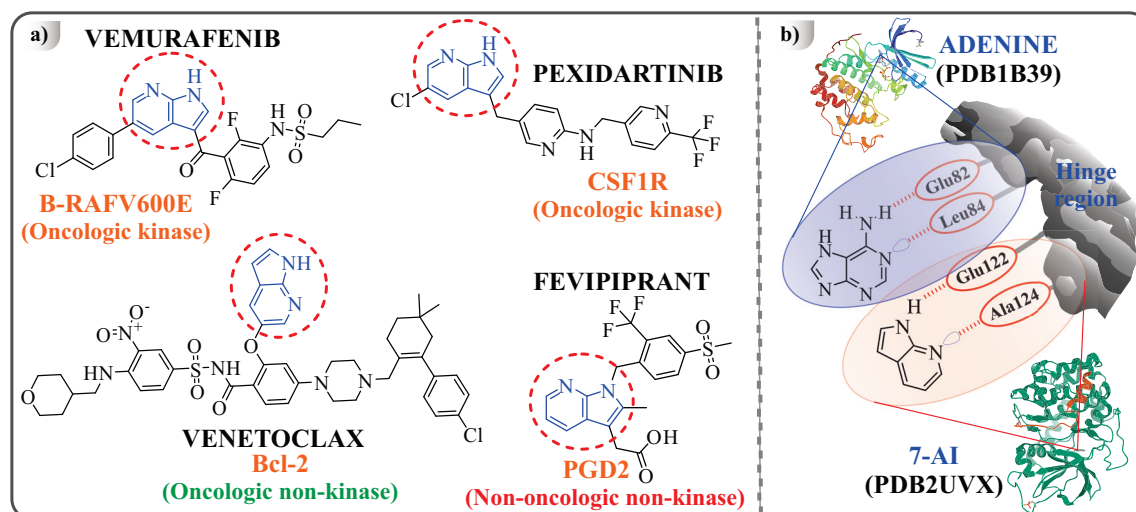


Fig. (4). (a) Some approved drugs containing the 7-AI fragment. Three of them have been successfully developed through FBDD campaigns in the last decade and are potent molecular weapons against severe cancers. (b) Beside, one of the most frequent binding modes of 7-AI (PD-B2UVX) [45] mimicking adenine (PDB1B39) [46] in the catalytic site (hinge region) of the kinase domain. Important to mention that the hinge region illustrated is merely hypothetical, both ligands were drawn together to show that they fit in very close locations in the receptor binding pocket within different crystal structures. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

based on the example of two different crystallographic structures reported in the Protein Data Bank (PDB), (Fig. 4b) [6, 15].

Indeed, like purines, the 7-AI fragment exhibits amphoteric behavior and can form strong bidentate H interactions through the NH of the pyridine (H-donor, HD) and the N of the pyridine (H-acceptor, HA). Adenine integrates the terminal part of the molecule Adenosine triphosphate (ATP, $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$), which is the natural substrate for several of these enzyme kinases. When ATP is lodging itself in the catalytic site of the enzyme, it generally directs adenine to the hinge region of the kinase domain and this is its main binding mode, in which adenine generally anchors through the interactions mentioned above. Obviously, additional interactions contribute to the stabilization of the complex, however, adenine is considered the main anchoring point. Due to the structural similarity to this endogenous molecule, 7-AI was initially exploited as an ATP mimetic fragment to exhibit a purposeful predilection for adeno-like targets, precisely targeting this region of the receptor and occupying the adeno pocket [45, 46].

As a fact, this binding mode is one of the most frequent for 7-AI, which is why it is considered a genuinely privileged and promiscuous fragment in relation to the kinases, since it inhibits more than ninety enzymes of this family [47]. However, several studies prove that this fragment may be more versatile than imagined, as shown in Table 1. Like the most emblematic and multifunctional card in the card game, 7-AI can be considered a “joker fragment” in this “biochemical game”, as it can be adequately exploited with different substituents on the ring targeting other binding modes to inhibit with high efficiency and selectivity the ki-

nases themselves and other enzymes implicated in cancer (e.g., Venetoclax [31]), as well as non-oncological kinases and other biological targets implicated in different pathologies (e.g., Fevipiprant [25], $C_{19}H_{17}F_3N_2O_4S$).

This mini-review is intended to highlight perceptions from three recent FBDD campaigns, whose F2L approaches started from 7-AI as the initial key fragment and culminated in highly potent and selective lead compounds for kinase and non-kinase cancer targets. Evidently, these workflows in medicinal chemistry are useful to highlight the pharmacological versatility of this privileged fragment and encourage future pharmaceutical innovation journeys using the toolbox of the FBDD paradigm to optimize this distinguished chemical scaffold that is deservedly the title compound of this paper. It is worth mentioning that for coherency, the same numbering/coding used by the research authors to label the molecules within the original publications has been retained in the present mini-review.

2. 7-AI vs. PKC ι : A LEAD WITH ONLY 51 MOLECULES

Kwiatkowski *et al.* published a recent paper reporting the discovery of promising anticancer agent candidates *via* a FBDD protocol that was shown to be considerably potent and selective against protein kinase C ι (PKC ι or PKC- ι) [48]. This enzyme is one of two isoforms of the atypical protein kinase C (atypical protein kinase c, aPKC) implicated in various biochemical processes of various types of neoplasms [49]. The researchers initiated this discovery program, (Fig. 5), by performing a biochemical screening of 1700 molecular fragments employing a BT known as Microfluidic Capillary Mobility Assay (MMSA) [50].

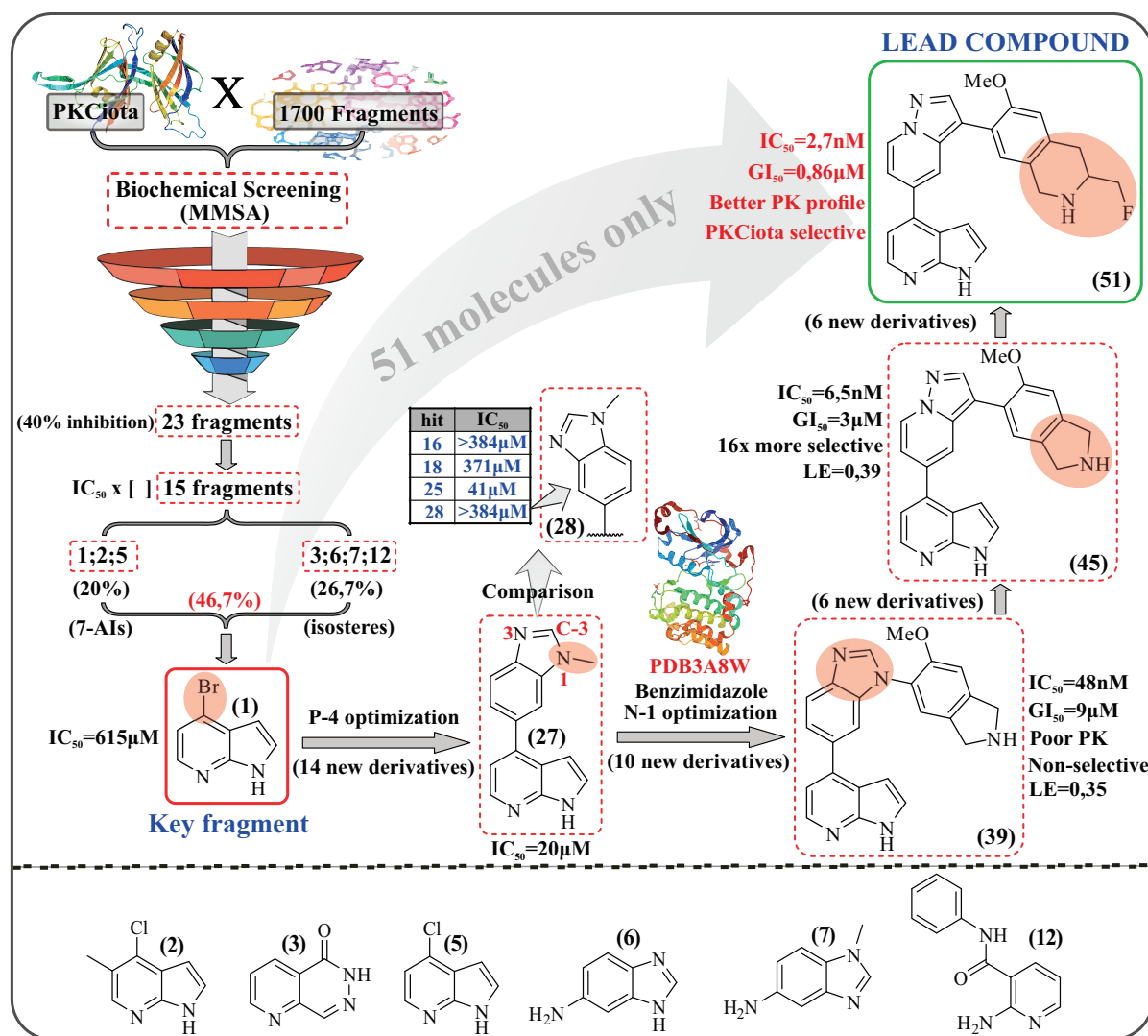


Fig. (5). FBDD project with as few as half a hundred molecules synthesized. In this successful F2L approach the lead compound **51** was prospected from molecule **1**, a key fragment 7-AI. Chemical and structural details of the ligand-receptor complex can be easily obtained from the original paper or from the PDB repository [48, 51, 52]. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

In light of the biochemical screening results, the researchers were able to identify 23 fragments with inhibition point higher than 40% (for fragments tested at 500 μ M concentration), and only 15 hits showed concentration-dependent inhibitory potency with attractive LE (from 0.26 to 0.44) and IC₅₀ (from 2300 μ M to 37 μ M) values. It is interesting to note that in this list of the 15 best fragments, three of them (20%) are 7-AI (hits **1**, **2** and **5**), and this already represents a commendable number. In addition, it should be mentioned that another 4 fragments (26.7%) are closely related structures (non-classical bioisosterism [51], hit **3** is a phthalazinone, hit **6** is a benzimidazole, hit **7** is an indole and hit **12** is nicotinamide). Again, even in this small group of efficient molecular scaffolding samples, the structural predominance of 7-AI fragments and their bioisosteres representing about

half (46.7%) of the most active compounds in this PKC- ι screen was evident. After this initial step, the next phase of the research consisted of exploring one of the directions of the existing molecular growth vector in the 7-AI core of one of the two best hits (fragment **1**). Until then, there was no elucidated crystal structure for PKC- ι cocrystallized with these fragments to direct the structural optimization of this organic halide, and the researchers conveniently deliberated to introduce bulkier substituents at position 4 of the ring (occupied by the bromine halide, Br). Surely, they were seeking a starting point for preliminary SAR studies, and also for the relative synthetic ease of promoting the substitution of halogens (optimal leaving groups) with stronger nucleophiles in aryl halides. Therefore, a small initial series of fourteen new 4- substituted derivatives of hit **1** (compounds **16-29**) were

obtained and tested against the target in question, allowing some interesting SAR analysis to be extracted. It was perceived that the insertion of amide radicals was either ineffective (hit **16**) or caused only weak enzyme inhibition (hit **18**), according to data in a mini frame in Fig. (5). On the other hand, direct connection between the 7-AI core and a substituent group with similar characteristics (benzimidazole) generated derivatives with enhanced inhibitory values (hits **25** and **27**), suggesting a likely structural substitution pattern capable of causing significant potency enhancements, and revealing that molecular growth of position 4 of 7-AI was indeed a wise choice. In addition, another important insight was gained through an *in silico* study of **25** with the crystallographically determined structure for the target in question (PDB3A8W). These molecular docking studies allowed the insight that the unsubstituted N-3 (HA) of the benzimidazole nucleus was crucial for the molecular recognition of the lysine residue 274 (Lys274, HD), and for the expression of the best PD response achieved so far. Indeed, the derivative with methylated N-3 (**28**) or the one without N as HA at this ring position (**26**) had its inhibitory activity drastically reduced ($IC_{50} > 384 \mu\text{M}$) [52].

Evaluating in more detail the interesting structural relationship between compounds **27** and **28**, one can see how thin the line between “active” and “non-active” is in medicinal chemistry. In this case, comparing these two compounds, it would be plausible to admit that apparently both are chemically very similar structures (in fact, this is a typical example of constitutional isomers) and that **28** could behave in the same way as **27** within the binding pocket. In fact, a simple horizontal rotation (180° rotation about the axis of the sigma bond joining the rings) of the benzimidazole ring of **28** generates a conformer very similar to the active conformer of **27** since, in this conformation, **28** could also expose the face with the HB acceptor N to the Lys274 residue and could therefore be able to establish the same putative HB that **27** establishes with such a residue. However, the dramatic loss of power did not confirm this conjecture of equivalence between both molecules and revealed that there could be another important supramolecular detail. The intensity, and even the existence, of HB depends closely on the directionality and distance between the interacting groups, with stronger interactions being established when some suitable values are reached [53, 54].

Hence, in addition to exposing the face with the HB acceptor N in front of the target's Lys274 residue, it was crucial that the directionality of the interaction was appropriate. Presumably, there was a subtle difference in directionality between the N of both isomers (**27** and **28**), and the amino acid residue sufficient to cause a large difference in the ability to form the interaction. Probably, this caused a significant discrepancy in the biological response of these two very similar compounds, showing how fascinating and surprising the field of medicinal chemistry can be to those who engage in it, requiring, among other skills, the expertise of an eye for meticulous analysis of the chemical structure of bioactive molecules. Convinced of keeping N-3 intact (a crucial pharmacophore point), the researchers again relied on molecular

docking results to proceed with the structural optimization of **27**. In evaluating the best fit of an analog compound **25** in the receptor binding pocket (PDB3A8W), the authors realized that the other N at the 1 (N-1) position of the benzimidazole ring could be a potential direction for molecular expansion, as successful branching at this position of the molecule could provide the formation of more HBs involving two distal aspartate residues (Asp330 and Asp373) of the target that were exposed and available to interact. Furthermore, another irrefutable empirical evidence was extracted from SAR analysis of the methyl ($-\text{CH}_3$) group at the available positions of the benzimidazole ring and further encouraged molecular growth from N-1, as compound **27** (methylated N-1) was shown to be twice as potent as its analog **25** (unmethylated at this point), and compounds **28** and **29** had their potency markedly decreased (methylated N-3 and C-3, respectively). Encouraged by these two credible hypotheses, the researchers designed and synthesized a new series in which the N-1 position was expanded, giving rise to the new compounds **30-39**. From these ten newly synthesized and biologically tested compounds, emerged the PKC- ι inhibitor **39** which showed potency ($IC_{50} = 48 \text{ nM}$) 400 times higher than its precursor (**27**), proving once again that the authors were on the right track. Subsequent biochemical assays showed that this parent compound was reasonably selective when tested in a non-mutant kinome panel (101 kinases were screened), having its significant activity expressed only for PKC family kinases. As such, it was less active and selective for PKC- α (about 6-fold lower) and PKC- ϵ (more than 10-fold lower) compared to PKC- ι . Furthermore, **39** inhibited PKC- ζ (atypical) with higher potency ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$, about 5-fold higher compared to PKC- ι), showing that there was no selectivity within the subset of aPKCs. Subsequently, **39** were subjected to biochemical cellular activity assays (HUH-7 cells) and unfortunately showed low antiproliferative potency ($GI_{50} = 9 \mu\text{M}$). PK assays of **39** revealed good release consequent to weak inhibition of cytochrome P450 (CYP3A4/CYP2D6) enzymes and this is a desirable property for any drug candidate. However, **39** exhibited insufficient permeation rates (human colon adenocarcinoma cell line assay, CACO-2) and low solubility at physiological pH ($\text{pH} = 7.4$). These depreciative PK properties were attributed to the presence of a basic site (N of isoindoline) that is likely protonated in this neutral pH range. These results showed that although a leading compound with appreciable potency (nanomolar digits) had been discovered by then, it needed to have its chemical structure modified to optimize its drug-like properties. At this stage of the research, the authors decided to explore the GE analysis of compound **39** (whose LE = 0.35), which is quite useful in FBDD campaigns to indicate which parts of the molecule are contributing less to the activity and are amenable to improvement. In this regard, analysis of the GE of **39** revealed that the benzimidazole core group was the least efficient part of the molecule (GE = 0.26) compared to the other moieties (7-AI, GE = 0.81, justifying its adjective-title “privileged”; Methoxy, GE = 0.55; and, Isoindoline, GE = 0.33). Therefore, the authors decided to alter the benzimidazole subunit to increase the intensity of

the HB that this group establishes *via* N-3 with the Lys274 residue, aiming consequently to increase its GE, the LE of the molecule, and its potency as a whole [48, 55].

Previously, the team chose to develop *in silico* studies to calculate the effect of changing the position of the N-1 or inserting another N around the benzimidazole ring to favor this key interaction. Based on this computational step, six new compounds were designed, synthesized (**40-45**) and tested in a PKC- ι , PKC- α , PKC- ϵ and HUH-7 screen. Inhibitor **45**, a pyrazolopyridine compound, stood out among the others by having the best inhibitory activity ($IC_{50} = 6.5$ nM), best LE (0.39), being about 7 times more potent than **39**, being 16 times more selective for PKC- ι when compared to the other two PKCs, and by being 3 times more potent ($GI_{50} = 9$ μ M) against HUH-7 cells in the antiproliferative assay when compared to **39**. In order to increase cellular potency and simultaneously improve the PK profile, six other novel inhibitors were synthesized (**46-51**) and biologically evaluated, revealing a new leader, compound **51**. The expansion of the isoquinoline (5-membered) ring to a tetrahydroisoquinoline (6-membered) ring, and the insertion of the fluoromethyl group at the α -position were the modifications responsible for increasing potency more than 2-fold and maintaining good selectivity for PKC- ι ($IC_{50} = 2.7$ nM; $GI_{50} = 0.86$ μ M). In addition, **51** showed improvements in permeability (CA-CO-2 assay) and solubility explained by the presence of the fluorine (F) atom that exerts inductive electron-withdrawing effect from the neighboring N reducing its basicity considerably [55]. Certainly, this is a good stimulus for medicinal chemists aiming for success in molecular optimization through FBDD, even if starting from a simple but “*magic*” fragment like 7-AI. This example illustrates a challenging case of planning a new potent and selective inhibitor by exploring only half a hundred compounds with no initial crystallographic support, but having a clever strategy that combines biochemical screening, SAR analysis, subsequent crystallographic support, computational studies, and a high dose of chemical acumen.

3. 7-AI vs. c-MET: A LEAD WITH ONLY 9 MOLECULES

In 2021, Collie *et al.* reported a FBDD campaign that resulted in the discovery of a nanomolar selective inhibitor for mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) [56]. The c-MET protein belongs to the tyrosine kinases family and is considered a strategic biological target in the field of oncology, as its overexpression or hyperactivation is directly implicated in the development of several types of cancer, as well as in biochemical pathways that imply resistance to chemotherapy [57, 58]. The workflow in this discovery process, (Fig. 6), began with an NMR screening step of 1150 fragments against the kinase domain isolated from human wild-type c-MET and resulted in a hit rate close to 6% (about 70 fragments were considered promising) [59]. Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis was used to further mine this select group of chemical scaffolds and demonstrated that approximately 20 fragments were indeed bound with better

affinity to c-Met [60]. Crystallization assays were developed in order to cocrystallize these fragments with the receptor in question. These efforts resulted in an elucidated crystal structure with acceptable resolution involving compound **1** and the kinase domain of c-Met (PDB2G15) [61].

The binding mode of **1** occurred in the hinge region, something common for AI isosteres. But surprisingly, the ligand-enzyme complex formed with the p-loop in the collapsed conformation of the macromolecule and this is a relatively rare event, as there are few reports in the literature of small molecules that have achieved the supramolecular feat of lodging in this conformation of the target. The main molecular recognition points involved the N of the pyridone and carbonyl groups of **1** with residues P1158 and M1160. In addition, the benzyl ring of **1** was able to accommodate exceptionally within a conserved, narrow hydrophobic site (residues F1223-R1227). Upon comparison with another previously reported crystal structure, it was realized that compound **1** exhibited a binding mode more similar to that of type I inhibitors, albeit with some peculiarities. These rare and occasional differences in the unusual binding mode of **1** encouraged the team to search for new analogous fragments based on two-dimensional (2D) structural similarity descriptors within a refined library of AstraZeneca compounds with corroborative biochemical assays of inhibitory activity [62].

This new search revealed the 7-AI derivative, compound **2**, which was also successfully cocrystallized with c-MET (PDB7B3T) [63], and packaged into the complex through key interactions involving the N atoms of the 7-AI group with residues P1158 and M1160, in a similar manner to **1**. However, the benzyl ring of **2** aligned differently in the p-loop binding pocket. Now aiming to find analogues of **2**, a new structural search was performed and ended up revealing two other encouraging fragments: compounds **3** and **4**, which were also corroborated by SPR tests and inhibitory activity. Both molecules were cocrystallized with c-MET and revealed new structural insights. The 4-fluoroindazole group established interactions with residues in the hinge region and in the p-loop region of the target adopted an extended conformation (unprecedented in this study so far), probably to avoid an unfavorable steric shock between the 4-pyrrolopyrrolinone group with the F1089 motif. In the complex formed by **3** (PDB7B3V), there was only a minor conformational change involving these two interacting groups resulting in minor deviations from the crystallographic structure of **2**. Furthermore, superposition of the structures of **3** and **2** highlighted important similarities between them, the main one being the overlap observed between the 7-AI group and the hinge region of these two complexes. Therefore, the authors hypothesized that fusion between fragments **2** and **3** could give rise to derivatives with attractive PD responses. Thus, a molecular hybrid (compound **5**) was obtained and biologically tested against c-MET exhibiting IC_{50} with three nanomolar digits ($IC_{50} = 660$ nM). The cocrystal of this compound with the target was obtained revealing that **5** repeated the binding mode with the folded p-loop and the optimal overlap with the original fragments (**2** and **3**) was verified [56, 64].

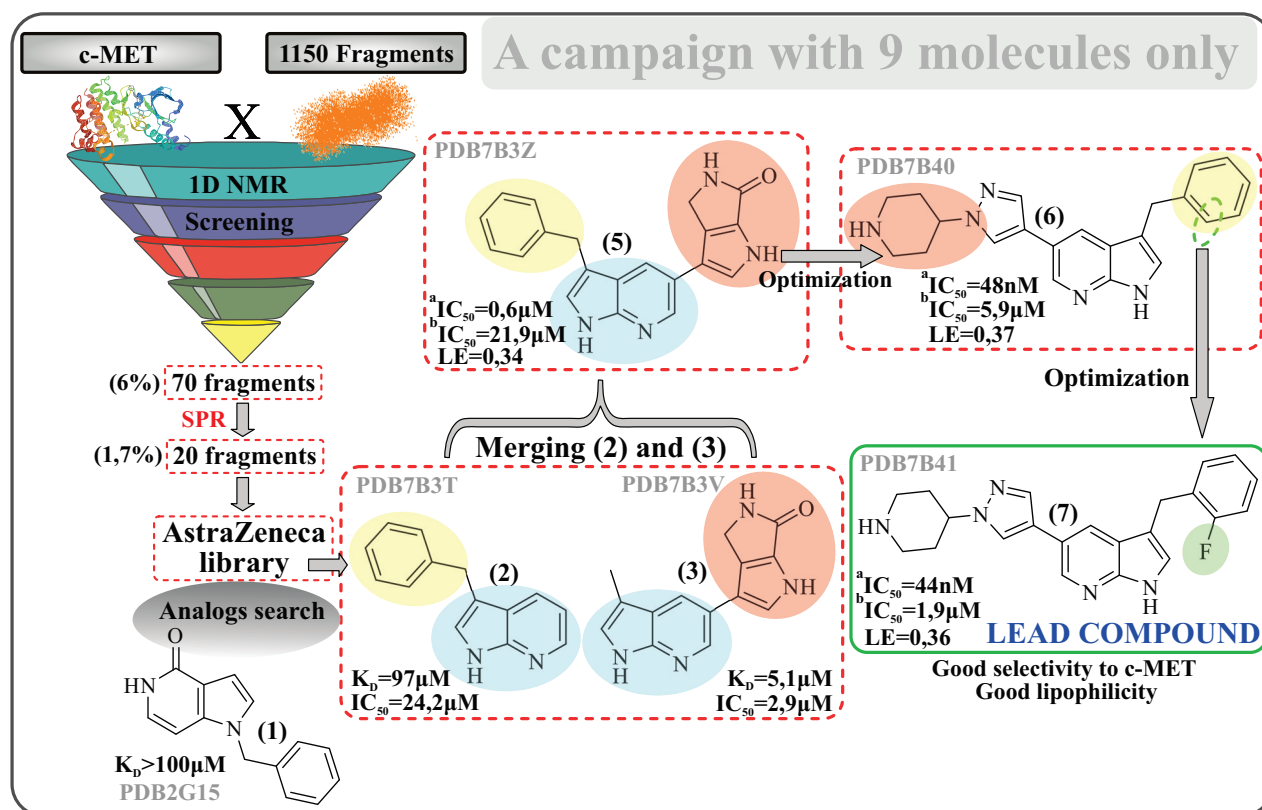


Fig. (6). FBDD campaign with less than ten molecules synthesized. This F2L approach was entirely guided by crystallographic structures and gave rise to the lead compound **7** starting from a 7-AI derivative **2**. Chemical and structural details of each ligand-receptor complex can be easily obtained from the original papers or from the PDB files [56, 61-66]. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Furthermore, the pyrrolopyrrolinone group was the solvent-facing subunit and became the region of the molecule amenable to modification to improve some PK parameters (e.g., solubility and lipophilicity-logD) without decreasing potency. These structural modifications gave rise to compound **6**, in which pyrrolopyrrolinone was replaced by pyrazole-piperidine causing potency gain ($IC_{50} = 48 \text{ nM}$) and decreased logD. Supramolecular analysis of the cocrystal structure of **6** with c-MET (PDB7B40) provided the likely explanation for this more than 10-fold gain in inhibitory activity, as an additional strong interaction was observed in which the water molecule establishes a bridge between the pyrazole group of **6** and the D1164 residue. In addition, the dihedral angles between the rings of **6** were found to be markedly larger than those of **5**. This more pronounced torsion between these cyclic groups likely helped to decrease the tension between the rings, reducing possible steric effects of intramolecular repulsion and allowing **6** to reach the most energetically favorable conformation in the bond pocket increasing potency. Subsequent chemical changes in **6** led to the discovery of constitutional isomers (compounds **7**, **8**, and **9**) monofluorinated at the 3 positions of the benzyl ring. The *p*-isomer, **9**, was the least active of the three ($IC_{50} = 137 \text{ nM}$) followed by the *m*-isomer, **8** ($IC_{50} = 65 \text{ nM}$). Both were out-

performed by the lead compound of this project, the *o*-isomer, **7**, with $IC_{50} = 44 \text{ nM}$ [56, 65].

This isomer was also cocrystallized with c-MET (PDB7B41) [66] and bound to the folded p-loop conformation of the kinase, following the same supramolecular trend as its counterparts. Subsequent biochemical testing revealed that the most active inhibitor of this campaign (**7**) exhibited inhibitory activity in single micromolar digit cell assays. Subsequently, **7** had its selectivity evaluated in a human kinome panel containing 140 kinases at a concentration of 100 nM. The results showed that **7** was able to inhibit only 27 kinases (approximately 19%) at a rate of 60% or higher. The research team did not report further studies for this molecule, but pointed out that certainly these parameters can be improved with further structural alterations of molecule **7**, since it can still be considered a fragment with mass in the 300Da range with low logD allowing for future optimizations [56, 66]. Critically, this FBDD campaign provides an understanding of the great importance of XRC in driving a fragment growth project. Obviously, these crystal structure efforts added to SAR analysis around the 7-AI fragment, precise biochemical techniques and the expertise of the multidisciplinary team form the ideal ingredients of a perfect formula for the genesis of a fertile soil in the FBDD field, from which potent bioactive molecules can emerge.

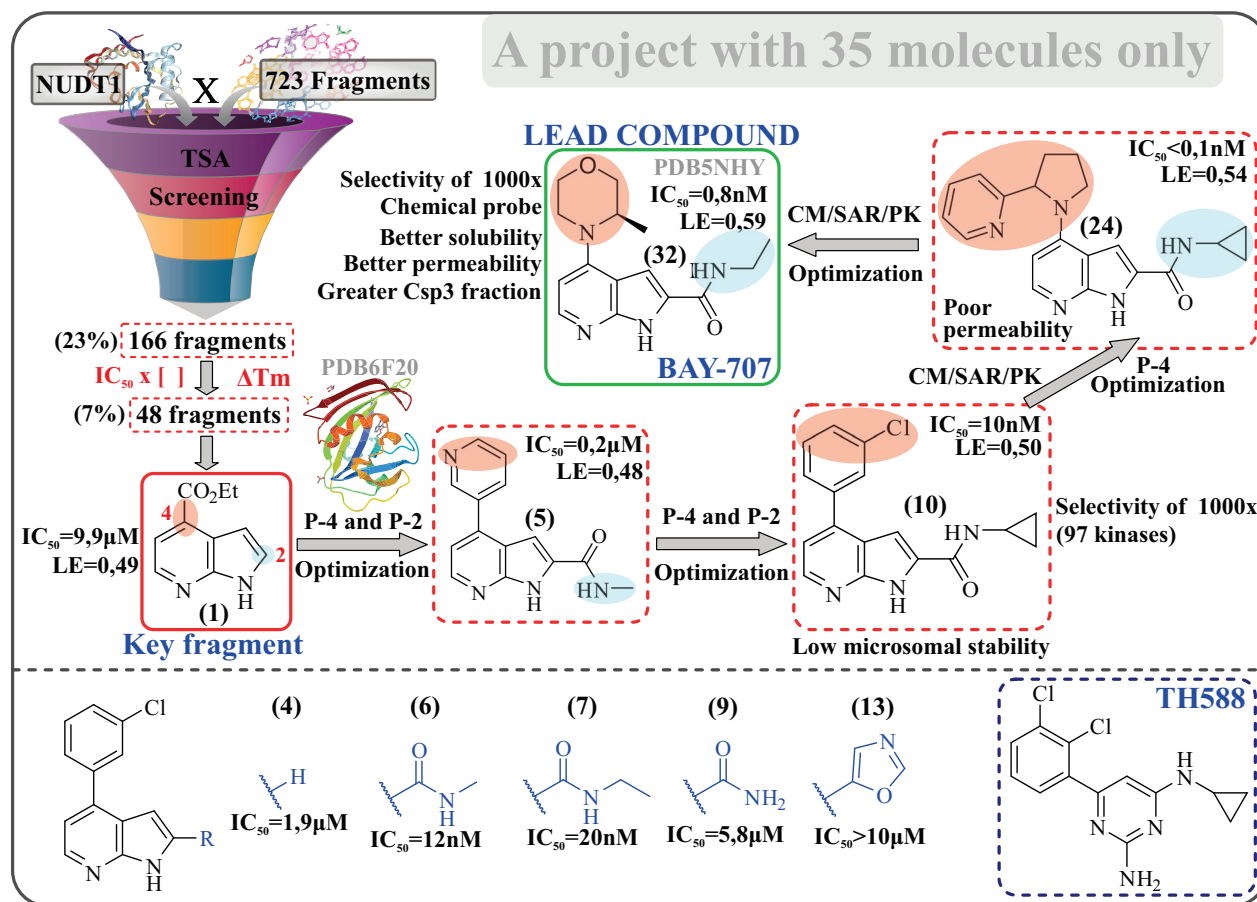


Fig. (7). FBDD program with only 35 molecules prepared. In this study F2L approach culminated in the discovery of the lead compound **32** (BAY-707) starting from precursor **1**, a key molecular fragment derivative of 7-AI. Chemical and structural details of each ligand-receptor complex can be easily obtained from the original papers or from the PDB archives [67, 70, 71]. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

4. 7-AI vs. NUDT1: A LEAD WITH ONLY 35 MOLECULES

In another recent paper, Rahm *et al.* reported on an FBDD campaign that culminated in the invention of a new class of highly potent and selective molecules against human nudix hydrolase 1 (NUDT1, also known by the acronym MTH1) [67]. Despite some structural similarities and having ATP as the main substrate, this enzyme is not a kinase and belongs to another superfamily of proteins called nudix hydrolase. Since their discovery, several pieces of cumulative evidence point to these enzymes as attractive drug targets because they are involved in important biochemical cascades and play a crucial role in the context of several diseases [68]. The workflows started with a screening step through fluorescence-based Thermal Shift Assays (TSA) [69], as illustrated in Fig. (7).

A collection of compounds containing 723 fragments at 1mM concentration was evaluated against the NUDT1 target. A range of 1.0°C ($\Delta Tm = 1.0^\circ C$) was adopted as an indicative success parameter, resulting in the identification of 166 fragments, which represented a considerable initial hit

rate of 23%. Subsequent biochemical assays were developed for 49 hits from this subset and the results showed that 48 of them expressed a dose-dependent TSA response, ranging from 62.5 to 1000 μM . From this group of 48 hits, the derivative 7-AI, key fragment **1**, was selected for molecular growth, although it was neither the most active nor the most efficient. Intuitively, the researchers decided to choose it taking into consideration other important aspects such as low modulatable logD, diversity of vector directions for structural expansion, easy functionalization with relative synthetic feasibility of the derivatives. Protein crystallography efforts came to fruition by elucidating the structure of a cocrystal containing **1** and NUDT1 (PDB6F20), revealing strong HBs involving the N atoms of **1** and residues Asp120 (HA) and Asp119 (HD) [70].

Based on visual analysis of the fit of **1** in the binding pocket, the expansion of position 2 of **1** was considered in order to reach a smaller cavity adjacent to Asp120. Because it is a less bulky pocket, it became the consensus to insert smaller groups in this position of **1**, precisely to allow more effective access to the pocket and the formation of favorable

interactions. Obviously, this could be a wise decision, as larger groups inevitably present great difficulties (physical and energy barrier) to access points with narrow topology due to the three-dimensional (3D) non-complementarity that can still result in strong steric repulsion effects. On the contrary, it was considered to expand position 4 of **1** by inserting a larger group, since in this direction there is a larger cavity that could be filled. Given this insight, the first group attached to position 2 of **1** was the acetamide subunit giving rise to compound **5**, whose position 4 of the ring was replaced by a 3-pyridinyl subunit. Satisfactorily, this derivative was the most potent within an initial small series of only five molecules, whose SAR analysis confirmed the previous hypotheses. The inhibitory potency increased as more bulky lipophilic groups were inserted at position 4 and that the acetamide group actually occasioned a jump in potency on the order of 50-fold over **1** and 20-fold over **4** (which was the most potent unsubstituted derivative at position 2 and contained the *m*-chlorophenyl group at position 4). In a next series with nine new compounds synthesized and biologically evaluated, precisely the derivative with the *m*-chlorophenyl group at position 4 and containing the acetamide at position 2, compound **7**, was the most efficient (despite being the second most potent). In this series, it was observed that insertion at position 2 of saturated amides (tertiaries), derivative **13**, or without the alkyl tail (derivative **9**) exhibited a drastic reduction in the biological response. These explanations were found after elucidation of the crystal structure of **7** with the receptor in question. Indeed, the amide group of **7** formed two strong HBs involving its N atom (HD) and its carbonyl C atom (HA) with residues Asp120 and Gly34, respectively. Furthermore, it was observed that the alkyl tail lodged in a small hydrophobic region formed by residues Leu11, Leu20, Met116, and Phe124. Soon, the justifications for the reduced potency in the case of derivatives **13** and **9** became evident, as one lacked the HB donor N and the other lacked the alkyl tail to form van der Waals type hydrophobic interactions. At this stage of the work, it became evident that further attempts to improve the PD profile through position 2 might not be successful, as there were probably no mimetic or isosteric groups to overcome the ideal pharmacophore role played by the secondary amides of the three most active compounds so far: derivatives **6**, **7** and **10**. Momentarily satisfied with the optimization of position 2, the authors turned their attention to another relevant fact which was to test the selectivity of the most active compound, **10**, against a panel of 97 kinases and NUDT1. The results showed that **10** was virtually inactive for all kinases at the 1 μ M concentration and maintained a minimum 1000-fold selectivity range for NUDT1. This kinase selectivity profile was quite surprising and encouraging because, as duly mentioned, the 7-AI group is a favorite for a broad spectrum of human kinome and this was an unavoidable fear of the researchers at the beginning of this medicinal chemistry campaign. After these encouraging results, the team continued the project now with the goal of optimizing position 4 of the 7-AI ring. Based on initial reagent availability, molecular docking studies, SAR analysis and modulation of PK properties, a new series was synthesized giving rise to compounds **24** and **25** with improved

potency (both subnanomolar) and reasonable metabolic stability and permeability results in CACO-2 assays. Compound **24** also had its selectivity profile evaluated and showed similar results to **10**, being much more selective (more than 1000-fold) for NUDT1 compared to the human kinome subset with 97 kinases. In addition, biochemical tests against K562 cells using the compound TH588 (C₁₃H₁₂Cl₂N) as a control and the results revealed that **24** again stood out among the other derivatives and was still 100-fold more potent than TH588. At this stage of the program, it would not be imprudent for the multidisciplinary team to consider themselves satisfied with the performance of **24** due to its set of promising PD/PK properties and enter it as a new therapeutic candidate to proceed to clinical trials. However, a new cycle of structural optimization was developed aimed at improving primarily the permeability and metabolic stability of CACO-2. Using a predictive computational model developed based on accumulated data and accurate SAR analysis, the team designed and synthesized four new compounds whose results revealed the ideal pharmacological combination so desired by each medicinal chemical group in which picomolar potency, improved metabolic stability and high solubility/permeability were observed. Among these four compounds, one of them, derivative **32**, was cocrystallized with this hydrolase (PDB5NHY) and stood out with the best pharmacological profile. Thus, it was chosen as the lead compound of the project moving forward to *in vivo* studies, in which it was labeled as BAY-707 [67, 71].

Faced with the impeccable development of this medicinal chemistry program, it would be impossible to imagine future disappointments. However, in another paper, a team of researchers reports the devaluation of NUDT1 as a promising target for cancer therapy [72]. Because BAY-707 showed picomolar potency against NUDT1 in cellular tests, it failed to achieve beneficial effects in mouse xenograft assays, nor did it manifest antiproliferative effects against various cancer cell lines. In this scenario, chance was apparently unfavorable, but the prodigious feat of achieving the “*magic bullet*” of a “*magic*” fragment (7-AI) cannot be overshadowed by the misfortune of hitting the wrong target [73]. Sometimes science reserves these paradoxes, for BAY-707 hit the wrong target. The acute inhibition of this molecular target did not cause the expected effect of a hit, but rather the astonishment at the silence (absence of biological response) of a sure mistake. Despite these disappointing results (and it would not be an exaggeration to place the total blame on the “*pseudo-therapeutic*” oncotarget), one can consider that this F2L project definitely did not fail. On the contrary, it provided several interesting lessons from the medicinal chemistry aspect, such as:

- Provide a powerful chemical probe for the target in question;
- Provide great insights into molecular prototypes for inhibition of other NUDT1-related biological targets;
- Provide a better understanding of the true biochemical role of NUDT1, preventing other teams from

committing future efforts to search for antitumor agents that inhibit this ineffective target for cancer therapy;

- Encourage the search for new therapeutic agents based on the 7-AI fragment that targets non-kinase;
- Encourage further biological testing of BAY-707 and possible derivatives against NUDT1 targeting other biological activities that extend the pharmacological spectrum of the 7-AI fragment beyond antitumor agents, as new studies have validated this target for inflammatory and autoimmune diseases such as psoriasis [74, 75] and multiple sclerosis [76].

CONCLUSION

In view of the above presented in this brief review, one must admit that the 7-AI nucleus really integrates a privileged family of molecular fragments. It gathers atomic, electronic, structural, pharmacological attributes and other important physicochemical parameters in a simple and chemically feasible carbon skeleton, with easy molecular growth. These peculiarities put it in a prominent place in the chemical library of successful inventors of bioactive molecules designed to fight cancer and other diseases. Certainly, this fragment has already proven to be, and should continue to be, one of the chemical building blocks most in demand by the molecular architects of today's medicinal chemistry, featuring one of the best cost/benefit ratios per carbon atom in the recent history of BigPharma. It is very likely that in the near future there will be approvals of new 7-AI-derived drugs on the shelves of medical clinics, and drugstores, promoting patient well-being and saving human lives, which is surely the most important impact that science can have on society.

LIST OF ABBREVIATIONS

BCT	=	Biochemical Techniques
BPT	=	Biophysical Techniques
CM	=	Computational Methods
FBDD	=	Fragment-based Drug Discovery
HTS	=	High Throughput Screening
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
PD	=	Pharmacodynamic Response
XRC	=	X-ray Crystallography

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

The authors are hugely thankful to the Brazilian Funding Agencies for Research and Innovation CNPq, CAPES-Finance Code 001, FAPEMIG and PRPPG for educational, learning resources, necessary research facilities and infrastructure support on the UNIFAL-MG postgraduate program.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly grateful to the Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation (MolMod-C-S) from Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), to which they are affiliated.

The authors are hugely thankful to the Brazilian Funding Agencies for Research and Innovation CNPq, CAPES-Finance Code 001, FAPEMIG and PRPPG for educational, learning resources, necessary research facilities and infrastructure support on the UNIFAL-MG postgraduate program. This manuscript represents one of works published in partial fulfillment of the postgraduate program in Chemistry (PPGQ/UNIFAL-MG) rules for the doctoral student L.M.S in the aforementioned scientific theme of this paper, under the excellent direction and supervision of N.J.F.S.

REFERENCES

- [1] Urvashi; Senthil Kumar, J.B.; Das, P.; Tandon, V. Development of azaindole-based frameworks as potential antiviral agents and their future perspectives. *J Med Chem.*, **2022**, *65*, 6454-6495. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00444> PMID: 35477274
- [2] Mohi-ud-din, R.; Pottou, F.H.; Mir, R.H.; Mir, P.A.; Sabreen, S.; Maqbool, M.; Shah, A.J.; Shenmar, K.; Raza, S.N. A comprehensive review on journey of pyrrole scaffold against multiple therapeutic targets. *Anticancer. Agents Med. Chem.*, **2022**, *22*(19), 3291-3303. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520622666220613140607> PMID: 35702764
- [3] Manaihiya, A.; Alam, O.; Sharma, V.; Naim, M.J.; Mittal, S.; Azam, F.; Husain, A.; Sheikh, A.A.; Imran, M.; Khan, I.A. Current status of novel pyridine fused derivatives as anticancer agents: An insight into future perspectives and Structure Activity Relationship (SAR). *Curr. Top. Med. Chem.*, **2021**, *21*(25), 2292-2349. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026621666210916171015> PMID: 34530713
- [4] Ling, Y.; Hao, Z.Y.; Liang, D.; Zhang, C.L.; Liu, Y.F.; Wang, Y. The expanding role of pyridine and dihydropyridine scaffolds in drug design. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2021**, *15*, 4289-4338. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S329547> PMID: 34675489
- [5] Wójcicka, A.; Redzicka, A. An overview of the biological activity of pyrrolo[3,4-c]pyridine derivatives. *Pharmaceuticals*, **2021**, *14*(4), 354. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14040354> PMID: 33920479
- [6] Motati, D.R.; Amaradhi, R.; Ganesh, T. Azaindole therapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2020**, *28*(24), 115830. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115830> PMID: 33161343
- [7] Sharma, N.; Anurag 7-azaindole analogues as bioactive agents and recent results. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2019**, *19*(9), 727-736. <http://dx.doi.org/10.2174/1389557518666180928154004> PMID: 30264679
- [8] PubChem. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed February 9, 2023)
- [9] eMolecules. Available from: <https://www.emolecules.com/http://www.emolecules.com/> (accessed February 9, 2023)
- [10] ChEMBL Database. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/http://www.ebi.ac.uk/chembl/> (accessed February 9, 2023)
- [11] Kruppa, M.; Müller, T.J.J. A survey on the synthesis of variolins, meridianins, and meriolins-naturally occurring marine (aza)indole alkaloids and their semisynthetic derivatives. *Molecules*, **2023**, *28*(3), 947.

- <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28030947> PMID: 36770618
[12] Zhang, J.; Dai, J.; Lan, X.; Zhao, Y.; Yang, F.; Zhang, H.; Tang, S.; Liang, G.; Wang, X.; Tang, Q. Synthesis, bioevaluation and molecular dynamics of pyrrolo-pyridine benzamide derivatives as potential antitumor agents *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Med. Chem.*, **2022**, *233*, 114215.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114215> PMID: 35227978
- [13] Zhao, X.Z.; Maddali, K.; Metifiot, M.; Smith, S.J.; Vu, B.C.; Marchand, C.; Hughes, S.H.; Pommier, Y.; Burke, T.R., Jr Bicyclic hydroxy-1H-pyrrolopyridine-trione containing HIV-1 integrase inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2012**, *79*(2), 157-165.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01270.x> PMID: 22107736
- [14] Chhetri, B.K.; Tedbury, P.R.; Sweeney-Jones, A.M.; Mani, L.; Soapi, K.; Manfredi, C.; Sorscher, E.; Sarafianos, S.G.; Kubanek, J. Marine natural products as leads against SARS-CoV-2 infection. *J. Nat. Prod.*, **2022**, *85*(3), 657-665.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00015> PMID: 35290044
- [15] Mérou, J.Y.; Buron, F.; Plé, K.; Bonnet, P.; Routier, S. The azaindole framework in the design of kinase inhibitors. *Molecules*, **2014**, *19*(12), 19935-19979.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules191219935> PMID: 25460315
- [16] Sharma, S.; Rao, R.; Reeve, S.M.; Phelps, G.A.; Bharatham, N.; Katagihallimath, N.; Ramachandran, V.; Raveendran, S.; Sarma, M.; Nath, A.; Thomas, T.; Manickam, D.; Nagaraj, S.; Balasubramanian, V.; Lee, R.E.; Hameed P, S.; Datta, S. Azaindole based potentiator of antibiotics against Gram-negative bacteria. *ACS Infect. Dis.*, **2021**, *7*(11), 3009-3024.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00171> PMID: 34699190
- [17] Tiberi, S.; du Plessis, N.; Walz, G.; Vjecha, M.J.; Rao, M.; Ntouni, F.; Mfinanga, S.; Kapata, N.; Mwaba, P.; McHugh, T.D.; Ippolito, G.; Migliori, G.B.; Mauerer, M.J.; Zumla, A. Tuberculosis: Progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *Lancet Infect. Dis.*, **2018**, *18*(7), e183-e198.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30110-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30110-5) PMID: 29580819
- [18] Giblin, G.M.P.; Billinton, A.; Briggs, M.; Brown, A.J.; Chessell, I.P.; Clayton, N.M.; Eatherton, A.J.; Goldsmith, P.; Haslam, C.; Johnson, M.R.; Mitchell, W.L.; Naylor, A.; Perboni, A.; Slingsby, B.P.; Wilson, A.W. Discovery of 1-[4-(3-Chlorophenylamino)-1-methyl-1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-7-yl]-1-morpholin-4-yl-methanone (GSK554418A), a brain penetrant 5-Azaindole CB₂ agonist for the treatment of chronic pain. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*(19), 5785-5788.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm9009857> PMID: 19743867
- [19] Meanwell, N.A.; Krystal, M.R.; Nowicka-Sans, B.; Langley, D.R.; Conlon, D.A.; Eastgate, M.D.; Grasela, D.M.; Timmins, P.; Wang, T.; Kadow, J.F. Inhibitors of HIV-1 attachment: The discovery and development of temsavir and its prodrug fostemsavir. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(1), 62-80.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01337> PMID: 29271653
- [20] Kucwaj-Brysz, K.; Baltrukevich, H.; Czarnota, K.; Handzlik, J. Chemical update on the potential for serotonin 5-HT₂ and 5-HT₁ receptor agents in the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, *49*, 128275.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128275> PMID: 34311086
- [21] Jin, T.; Zhao, L.; Wang, H.P.; Huang, M.L.; Yue, Y.; Lu, C.; Zheng, Z.B. Recent advances in the discovery and development of glyoxalase I inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2020**, *28*(4), 115243.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115243> PMID: 31879183
- [22] Drießen, D.; Stuhldreier, F.; Frank, A.; Stark, H.; Wesselborg, S.; Stork, B.; Müller, T.J.J. Novel meriolin derivatives as rapid apoptosis inducers. *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, *27*(15), 3463-3468.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.06.029> PMID: 31248707
- [23] Crocetti, L.; Giovannoni, M.P.; Schepetkin, I.A.; Quinn, M.T.; Khelebnikov, A.I.; Cantini, N.; Guerrini, G.; Iacovone, A.; Teodori, E.; Vergelli, C. 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine: A new scaffold for human neutrophil elastase (HNE) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, *26*(21), 5583-5595.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.09.034> PMID: 30385225
- [24] Qhobosheane, M.A.; Beteck, R.M.; Baratte, B.; Robert, T.; Ruchaud, S.; Bach, S.; Legoabe, L.J. Exploration of 7-azaindole-coumarone hybrids and their analogues as protein kinase inhibitors. *Chem. Biol. Interact.*, **2021**, *343*, 109478.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109478> PMID: 33905741
- [25] Sandham, D.A.; Barker, L.; Brown, L.; Brown, Z.; Budd, D.; Charlton, S.J.; Chatterjee, D.; Cox, B.; Dubois, G.; Duggan, N.; Hall, E.; Hatto, J.; Maas, J.; Manini, J.; Profit, R.; Riddy, D.; Ritchie, C.; Sohal, B.; Shaw, D.; Stringer, R.; Sykes, D.A.; Thomas, M.; Turner, K.L.; Watson, S.J.; West, R.; Willard, E.; Williams, G.; Willis, J. Discovery of fevipiprant (NVP-QAW039), a potent and selective DP2 receptor antagonist for treatment of asthma. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, *8*(5), 582-586.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.7b00157> PMID: 28523115
- [26] Castro, M.; Kerwin, E.; Miller, D.; Pedinoff, A.; Sher, L.; Cardenas, P.; Knorr, B.; Lawrence, D.; Ossa, D.; Wang, W.; Maspero, J.F. Efficacy and safety of fevipiprant in patients with uncontrolled asthma: Two replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials (ZEA-1 and ZEA-2). *EClinicalMedicine*, **2021**, *35*, 100847.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eclim.2021.100847> PMID: 33997741
- [27] Alam, R.M.; Keating, J.J. Adding more "spice" to the pot: A review of the chemistry and pharmacology of newly emerging heterocyclic synthetic cannabinoid receptor agonists. *Drug Test. Anal.*, **2020**, *12*(3), 297-315.
<http://dx.doi.org/10.1002/dta.2752> PMID: 31854124
- [28] Wu, L.; Zhang, C.; He, C.; Qian, D.; Lu, L.; Sun, Y.; Xu, M.; Zhuo, J.; Liu, P.C.C.; Klabe, R.; Wynn, R.; Covington, M.; Gallagher, K.; Leffet, L.; Bowman, K.; Diamond, S.; Koblisch, H.; Zhang, Y.; Soloviev, M.; Hollis, G.; Burn, T.C.; Scherle, P.; Yelleswaram, S.; Huber, R.; Yao, W. Discovery of pemigatinib: A potent and selective Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) inhibitor. *J. Med. Chem.*, **2021**, *64*(15), 10666-10679.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00713> PMID: 34269576
- [29] Farmer, L.J.; Ledebor, M.W.; Hoock, T.; Arnost, M.J.; Bethiel, R.S.; Bennani, Y.L.; Black, J.J.; Brummel, C.L.; Chakilam, A.; Dorsch, W.A.; Fan, B.; Cochran, J.E.; Halas, S.; Harrington, E.M.; Hogan, J.K.; Howe, D.; Huang, H.; Jacobs, D.H.; Laitinen, L.M.; Liao, S.; Mahajan, S.; Marone, V.; Martinez-Botella, G.; McCarthy, P.; Messersmith, D.; Namchuk, M.; Oh, L.; Penney, M.S.; Pierce, A.C.; Raybuck, S.A.; Rugg, A.; Salituro, F.G.; Saxena, K.; Shannon, D.; Shlyakter, D.; Swenson, L.; Tian, S.K.; Town, C.; Wang, J.; Wang, T.; Wannamaker, M.W.; Winquist, R.J.; Zuccola, H.J. Discovery of VX-509 (decernotinib): A potent and selective Janus kinase 3 inhibitor for the treatment of autoimmune diseases. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*(18), 7195-7216.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00301> PMID: 26230873
- [30] Bollag, G.; Tsai, J.; Zhang, J.; Zhang, C.; Ibrahim, P.; Nolop, K.; Hirth, P. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*(11), 873-886.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd3847> PMID: 23060265
- [31] Souers, A.J.; Leverson, J.D.; Boghaert, E.R.; Ackler, S.L.; Catron, N.D.; Chen, J.; Dayton, B.D.; Ding, H.; Enschede, S.H.; Fairbrother, W.J.; Huang, D.C.S.; Hymowitz, S.G.; Jin, S.; Khaw, S.L.; Kovar, P.J.; Lam, L.T.; Lee, J.; Maecker, H.L.; Marsh, K.C.; Mason, K.D.; Mitten, M.J.; Nimmer, P.M.; Oleksijew, A.; Park, C.H.; Park, C.M.; Phillips, D.C.; Roberts, A.W.; Sampath, D.; Seymour, J.F.; Smith, M.L.; Sullivan, G.M.; Tahir, S.K.; Tse, C.; Wendt, M.D.; Xiao, Y.; Xue, J.C.; Zhang, H.; Humerickhouse, R.A.; Rosenberg, S.H.; Elmore, S.W. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.*, **2013**, *19*(2), 202-208.
<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3048> PMID: 23291630
- [32] Tap, W.D.; Wainberg, Z.A.; Anthony, S.P.; Ibrahim, P.N.; Zhang, C.; Healey, J.H.; Chmielowski, B.; Staddon, A.P.; Cohn, A.L.; Shapiro, G.I.; Keedy, V.L.; Singh, A.S.; Puzanov, I.; Kwak, E.L.; Wagner, A.J.; Von Hoff, D.D.; Weiss, G.J.; Ramanathan, R.K.; Zhang, J.; Habets, G.; Zhang, Y.; Burton, E.A.; Visor, G.; Sanftner, L.; Severson, P.; Nguyen, H.; Kim, M.J.; Marimuthu, A.; Tsang, G.; Shelloo, R.; Gee, C.; West, B.L.; Hirth, P.; Nolop, K.; van de Rijn, M.; Hsu, H.H.; Peterfy, C.; Lin, P.S.; Tong-Starksen,

- S.; Bollag, G. Structure-guided blockade of CSF1R kinase in tenosynovial giant-cell tumor. *N. Engl. J. Med.*, **2015**, *373*(5), 428-437.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1411366> PMID: 26222558
- [33] Hamaguchi, H.; Amano, Y.; Moritomo, A.; Shirakami, S.; Nakajima, Y.; Nakai, K.; Nomura, N.; Ito, M.; Higashi, Y.; Inoue, T. Discovery and structural characterization of peficitinib (ASP015K) as a novel and potent JAK inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, *26*(18), 4971-4983.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.08.005> PMID: 30145050
- [34] Byrn, R.A.; Jones, S.M.; Bennett, H.B.; Bral, C.; Clark, M.P.; Jacobs, M.D.; Kwong, A.D.; Ledebor, M.W.; Leeman, J.R.; McNeil, C.F.; Murcko, M.A.; Nezami, A.; Perola, E.; Rijnbrand, R.; Saxena, K.; Tsai, A.W.; Zhou, Y.; Charifson, P.S. Preclinical activity of VX-787, a first-in-class, orally bioavailable inhibitor of the influenza virus polymerase PB2 subunit. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2015**, *59*(3), 1569-1582.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04623-14> PMID: 25547360
- [35] Adhikari, A.; Mandal, D.; Rana, D.; Nath, J.; Bose, A.; Sonika; Orasugh, J.T.; De, S.; Chattopadhyay, D. COVID-19 mitigation: Nanotechnological intervention, perspective, and future scope. *Materials Advances*, **2023**, *4*(1), 52-78.
<http://dx.doi.org/10.1039/D2MA00797E>
- [36] Motati, D.R.; Amaradhi, R.; Ganesh, T. Recent developments in the synthesis of azaindoles from pyridine and pyrrole building blocks. *Org. Chem. Front.*, **2021**, *8*(3), 466-513.
<http://dx.doi.org/10.1039/D0QO01079K>
- [37] Kannaboina, P.; Mondal, K.; Laha, J.K.; Das, P. Recent advances in the global ring functionalization of 7-azaindoles. *Chem. Commun.*, **2020**, *56*(79), 11749-11762.
<http://dx.doi.org/10.1039/D0CC04264A> PMID: 32935671
- [38] Perera, T.P.S.; Jovcheva, E.; Mevellec, L.; Vialard, J.; De Lange, D.; Verhulst, T.; Paulussen, C.; Van De Ven, K.; King, P.; Freyne, E.; Rees, D.C.; Squires, M.; Saxty, G.; Page, M.; Murray, C.W.; Gilissen, R.; Ward, G.; Thompson, N.T.; Newell, D.R.; Cheng, N.; Xie, L.; Yang, J.; Platero, S.J.; Karkera, J.D.; Moy, C.; Angibaud, P.; Laquerre, S.; Lorenzi, M.V. Discovery and pharmacological characterization of JNJ-42756493 (erdafitinib), a functionally selective small-molecule FGFR family inhibitor. *Mol. Cancer Ther.*, **2017**, *16*(6), 1010-1020.
<http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0589> PMID: 28341788
- [39] Lanman, B.A.; Allen, J.R.; Allen, J.G.; Amegadzie, A.K.; Ashton, K.S.; Booker, S.K.; Chen, J.J.; Chen, N.; Frohn, M.J.; Goodman, G.; Kopecky, D.J.; Liu, L.; Lopez, P.; Low, J.D.; Ma, V.; Minatti, A.E.; Nguyen, T.T.; Nishimura, N.; Pickrell, A.J.; Reed, A.B.; Shin, Y.; Siegmund, A.C.; Tamayo, N.A.; Tegley, C.M.; Walton, M.C.; Wang, H.L.; Wurz, R.P.; Xue, M.; Yang, K.C.; Achanta, P.; Bartberger, M.D.; Canon, J.; Hollis, L.S.; McCarter, J.D.; Mohr, C.; Rex, K.; Saiki, A.Y.; San Miguel, T.; Volak, L.P.; Wang, K.H.; Whittington, D.A.; Zech, S.G.; Lipford, J.R.; Cee, V.J. Discovery of a covalent inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the treatment of solid tumors. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*(1), 52-65.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01180> PMID: 31820981
- [40] Schoepfer, J.; Jahnke, W.; Berellini, G.; Buonamici, S.; Cotesta, S.; Cowan-Jacob, S.W.; Dodd, S.; Drucekes, P.; Fabbro, D.; Gabriel, T.; Groell, J.M.; Grotzfeld, R.M.; Hassan, A.Q.; Henry, C.; Iyer, V.; Jones, D.; Lombardo, F.; Loo, A.; Manley, P.W.; Pellé, X.; Rummel, G.; Salem, B.; Warmuth, M.; Wylie, A.A.; Zoller, T.; Marzinzik, A.L.; Furet, P. Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(18), 8120-8135.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01040> PMID: 30137981
- [41] Kirsch, P.; Hartman, A.M.; Hirsch, A.K.H.; Empting, M. Concepts and core principles of fragment-based drug design. *Molecules*, **2019**, *24*(23), 4309.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules24234309> PMID: 31779114
- [42] Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*(19), 876-877.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02831-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02831-9) PMID: 14554012
- [43] Jhoti, H.; Williams, G.; Rees, D.C.; Murray, C.W. The 'rule of three' for fragment-based drug discovery: Where are we now? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2013**, *12*(8), 644-645.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd3926-c1> PMID: 23845999
- [44] Walsh, L.; Erlanson, D.A.; de Esch, I.J.P.; Jahnke, W.; Woodhead, A.; Wren, E. Fragment-to-Lead medicinal chemistry publications in 2021. *J. Med. Chem.*, **2023**, *66*(2), 1137-1156.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01827> PMID: 36622056
- [45] Brown, N.R.; Noble, M.E.M.; Lawrie, A.M.; Morris, M.C.; Tunnah, P.; Divita, G.; Johnson, L.N.; Endicott, J.A. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*(13), 8746-8756.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.13.8746> PMID: 10085115
- [46] Donald, A.; McHardy, T.; Rowlands, M.G.; Hunter, L.J.K.; Davies, T.G.; Berdini, V.; Boyle, R.G.; Aherne, G.W.; Garrett, M.D.; Collins, I. Rapid evolution of 6-phenylpurine inhibitors of protein kinase B through structure-based design. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*(10), 2289-2292.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm0700924> PMID: 17451235
- [47] Irie, T.; Sawa, M. 7-azaindole: A versatile scaffold for developing kinase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, **2018**, *66*(1), 29-36.
<http://dx.doi.org/10.1248/cpb.c17-00380> PMID: 29311509
- [48] Kwiatkowski, J.; Liu, B.; Tee, D.H.Y.; Chen, G.; Ahmad, N.H.B.; Wong, Y.X.; Poh, Z.Y.; Ang, S.H.; Tan, E.S.W.; Ong, E.H.Q.; Nurul Dinie; Poulsen, A.; Pendharkar, V.; Sangthongpitag, K.; Lee, M.A.; Sepramaniam, S.; Ho, S.Y.; Cheria, J.; Hill, J.; Keller, T.H.; Hung, A.W. Fragment-based drug discovery of potent protein kinase C iota inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(10), 4386-4396.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00060> PMID: 29688013
- [49] Reina-Campos, M.; Diaz-Meco, M.T.; Moscat, J. The dual roles of the atypical protein kinase cs in cancer. *Cancer Cell*, **2019**, *36*(3), 218-235.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.010> PMID: 31474570
- [50] Chavez-Pineda, O.G.; Rodriguez-Moncayo, R.; Cedillo-Alcantar, D.F.; Guevara-Pantoja, P.E.; Amador-Hernandez, J.U.; Garcia-Cordero, J.L. Microfluidic systems for the analysis of blood-derived molecular biomarkers. *Electrophoresis*, **2022**, *43*(16-17), 1667-1700.
<http://dx.doi.org/10.1002/elps.202200067> PMID: 35767850
- [51] da Silveira, N.J.F.; de Azevedo, W.F.; Guedes, R.C.; Santos, L.M.; Marcelino, R.C.; da Silva Antunes, P.; Elias, T.C. Bioinformatics approach on bioisosterism softwares to be used in drug discovery and development. *Curr. Bioinform.*, **2022**, *17*(1), 19-30.
<http://dx.doi.org/10.2174/1574893616666210525150747>
- [52] Takimura, T.; Kamata, K.; Fukasawa, K.; Ohsawa, H.; Komatani, H.; Yoshizumi, T.; Takahashi, I.; Kotani, H.; Iwasawa, Y. Structures of the PKC- ι kinase domain in its ATP-bound and apo forms reveal defined structures of residues 533-551 in the C-terminal tail and their roles in ATP binding. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2010**, *66*(5), 577-583.
<http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910005639> PMID: 20445233
- [53] van der Lubbe, S.C.C.; Fonseca Guerra, C. The nature of hydrogen bonds: A delineation of the role of different energy components on hydrogen bond strengths and lengths. *Chem. Asian J.*, **2019**, *14*(16), asia.201900717.
<http://dx.doi.org/10.1002/asia.201900717> PMID: 31241855
- [54] Kenny, P.W. Hydrogen-bond donors in drug design. *J. Med. Chem.*, **2022**, *65*(21), 14261-14275.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01147> PMID: 36282210
- [55] Moinul, M.; Khatun, S.; Amin, S.A.; Jha, T.; Gayen, S. Recent trends in fragment-based anticancer drug design strategies against different targets: A mini-review. *Biochem. Pharmacol.*, **2022**, *206*, 115301.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115301> PMID: 36265594
- [56] Collie, G.W.; Michaelides, I.N.; Embrey, K.; Stubbs, C.J.; Börjesson, U.; Dale, I.L.; Snijder, A.; Barlind, L.; Song, K.; Khurana, P.; Phillips, C.; Storer, R.I. Structural basis for targeting the folded P-loop conformation of c-MET. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2021**, *12*(1),

- 162-167.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00392> PMID: 33488978
- [57] To, K.K.W.; Cho, W.C.S. Mesenchymal epithelial transition (MET): A key player in chemotherapy resistance and an emerging target for potentiating cancer immunotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **2022**, *22*(4), 269-285.
<http://dx.doi.org/10.2174/1568009622666220307105107> PMID: 35255791
- [58] Ribatti, D.; Tamma, R.; Annese, T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: A historical overview. *Transl. Oncol.*, **2020**, *13*(6), 100773.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773> PMID: 32334405
- [59] Diethelm-Varela, B. Using NMR spectroscopy in the fragment-based drug discovery of small-molecule anticancer targeted therapies. *ChemMedChem*, **2021**, *16*(5), 725-742.
<http://dx.doi.org/10.1002/cmde.202000756> PMID: 33236493
- [60] Navratilova, I.; Hopkins, AL Fragment screening by surface plasmon resonance. *ACS Med Chem Lett.*, **2010**, *1*(1), 44-8.
<http://dx.doi.org/10.1021/ml900002k> PMID: 24900174
- [61] Wang, W.; Marimuthu, A.; Tsai, J.; Kumar, A.; Krupka, H.I.; Zhang, C.; Powell, B.; Suzuki, Y.; Nguyen, H.; Tabrizid, M.; Luu, C.; West, B.L. Structural characterization of autoinhibited c-Met kinase produced by coexpression in bacteria with phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, *103*(10), 3563-3568.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600048103> PMID: 16537444
- [62] D'Angelo, N.D.; Bellon, S.F.; Booker, S.K.; Cheng, Y.; Coxon, A.; Dominguez, C.; Fellows, I.; Hoffman, D.; Hungate, R.; Kaplan-Lefko, P.; Lee, M.R.; Li, C.; Liu, L.; Rainbeau, E.; Reider, P.J.; Rex, K.; Siegmund, A.; Sun, Y.; Tasker, A.S.; Xi, N.; Xu, S.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Burgess, T.L.; Dussault, I.; Kim, T.S. Design, synthesis, and biological evaluation of potent c-Met inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*(18), 5766-5779.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm8006189> PMID: 18763753
- [63] Collie, G.W. Crystal structure of c-MET bound by compound 2. **2020**.
<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.2210/pdb7b3t/pdb>
- [64] Collie, G.W. Crystal structure of c-MET bound by compound 3. **2020**.
<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.2210/pdb7b3v/pdb>
- [65] Collie, G.W. Crystal structure of c-MET bound by compound 6. **2020**.
<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.2210/pdb7b40/pdb>
- [66] Collie, G.W. Crystal structure of c-MET bound by compound 7. **2020**.
<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.2210/pdb7b41/pdb>
- [67] Rahm, F.; Viklund, J.; Trésaugues, L.; Ellermann, M.; Giese, A.; Ericsson, U.; Forsblom, R.; Ginman, T.; Günther, J.; Hallberg, K.; Lindström, J.; Persson, L.B.; Silvander, C.; Talagas, A.; Díaz-Sáez, L.; Fedorov, O.; Huber, K.V.M.; Panagakou, I.; Siejka, P.; Gorjánác, M.; Bauser, M.; Andersson, M. Creation of a novel class of potent and selective MutT homologue 1 (MTH1) inhibitors using fragment-based screening and structure-based drug design. *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(6), 2533-2551.
<http://dx.doi.org/10.1021/acsmchem.7b01884> PMID: 29485874
- [68] Carreras-Puigvert, J.; Zitnik, M.; Jemth, A-S; Carter, M.; Unterlass, J.E.; Hallström, B.; Loseva, O.; Karem, Z.; Calderón-Montaño, J.M.; Lindskog, C.; Edqvist, P-H; Matuszewski, DJ; Blal, HA; Berntsson, RPA; Häggblad, M; Martens, U; Studham, M; Lundgren, B; Wählby, C; Sonnhammer, ELL; Lundberg, E; Stenmark, P; Zupan, B; Helleday, T A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nat Commun.*, **2017**, *8*(1), 1541.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01642-w> PMID: 29142246
- [69] Perrin, J.; Werner, T.; Kurzawa, N.; Rutkowska, A.; Childs, D.D.; Kalkdorf, M.; Poekkel, D.; Stonehouse, E.; Strohm, K.; Heller, B.; Thomson, D.W.; Krause, J.; Becher, I.; Eberl, H.C.; Vappiani, J.; Sevin, D.C.; Rau, C.E.; Franken, H.; Huber, W.; Faelth-Savitski, M.; Savitski, M.M.; Bantscheff, M.; Bergamini, G. Identifying drug targets in tissues and whole blood with thermal-shift profiling. *Nat. Biotechnol.*, **2020**, *38*(3), 303-308.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0388-4> PMID: 31959954
- [70] Viklund, J.; Talagas, A.; Trésaugues, L. Complex between MTH1 and compound 1 (a 7-azaindole-4-ester derivative). **2018**.
<http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.2210/pdb6f20/pdb>
- [71] Ellermann, M.; Eheim, A.; Rahm, F.; Viklund, J.; Guenther, J.; Andersson, M.; Ericsson, U.; Forsblom, R.; Ginman, T.; Lindström, J.; Silvander, C.; Trésaugues, L.; Giese, A.; Bunse, S.; Neuhaus, R.; Weiske, J.; Quanz, M.; Glasauer, A.; Nowak-Reppel, K.; Bader, B.; Irlbacher, H.; Meyer, H.; Queisser, N.; Bauser, M.; Haegerbarth, A.; Gorjánác, M. Novel class of potent and cellularly active inhibitors devalidates MTH1 as broad-spectrum cancer target. *ACS Chem. Biol.*, **2017**, *12*(8), 1986-1992.
<http://dx.doi.org/10.1021/acscembio.7b00370> PMID: 28679043
- [72] Samaranyake, G.; Huynh, M.; Rai, P. MTH1 as a chemotherapeutic target: The elephant in the room. *Cancers*, **2017**, *9*(12), 47.
<http://dx.doi.org/10.3390/cancers9050047> PMID: 28481306
- [73] Ban, T.A. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin. Neurosci.*, **2006**, *8*(3), 335-344.
<http://dx.doi.org/10.31887/DCNS.2006.8.3/tban> PMID: 17117615
- [74] Bivik Eding, C.; Köhler, I.; Verma, D.; Sjögren, F.; Bamberg, C.; Karsten, S.; Pham, T.; Scobie, M.; Helleday, T.; Warpman Berglund, U.; Enerbäck, C. MTH1 inhibitors for the treatment of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, **2021**, *141*(8), 2037-2048.e4.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2021.01.026> PMID: 33676948
- [75] Karsten, S.; Fiskesund, R.; Zhang, X.M.; Marttila, P.; Sanjiv, K.; Pham, T.; Rasti, A.; Bräutigam, L.; Almlöf, I.; Marcusson-Ståhl, M.; Sandman, C.; Platzack, B.; Harris, R.A.; Kalderén, C.; Cederbrant, K.; Helleday, T.; Warpman Berglund, U. MTH1 as a target to alleviate T cell driven diseases by selective suppression of activated T cells. *Cell Death Differ.*, **2022**, *29*(1), 246-261.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41418-021-00854-4> PMID: 34453118
- [76] Karsten, S. Targeting the DNA repair enzymes MTH1 and OGG1 as a novel approach to treat inflammatory diseases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2022**, *131*(2), 95-103.
<http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.13765> PMID: 35708697