UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIANA SABO FERNANDES

ESTUDO COMPUTACIONAL E PLANEJAMENTO DE COMPOSTOS DERIVADOS COM AÇÃO INIBITÓRIA POTENCIAL DA PROTEÍNA CASEÍNA QUINASE 2 (CK2)

Uruguaiana 2021

MARIANA SABO FERNANDES

ESTUDO COMPUTACIONAL E PLANEJAMENTO DE COMPOSTOS DERIVADOS COM AÇÃO INIBITÓRIA POTENCIAL DA PROTEÍNA CASEÍNA QUINASE 2 (CK2)

Dissertação apresentada ao Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em (Ciências Farmacêuticas).

Dissertação defendida e aprovada em: 07 de julho de 2021.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo

UNIOESTE

Profa. Dra. Sandra Elisa Haas

UNIPAMPA

Assinado eletronicamente por **FAVERO REISDORFER PAULA**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/02/2022, às 15:53, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

Assinado eletronicamente por **SANDRA ELISA HAAS**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/02/2022, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

Assinado eletronicamente por **Eduardo Borges de Melo**, **Usuário Externo**, em 06/02/2022, às 17:26, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0726521** e o código CRC **FEA503F5**.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal do Pampa

ATA DE DEFESA DE (X) DISSERTAÇÃO ( ) TESE ( )

Aos 07 dias do mês de julho do ano de 2021, às 09 horas no (a) Sistema Google Meet (Campus Uruguaiana) realizou-se a Defesa Pública de (X) Dissertação ( ) Tese ( ), intitulada: Estudo Computacional e Planejamento de Compostos Derivados com Ação Inibitória Potencial da Proteína Caseína Quinase 2 (CK2), área de conhecimento Farmácia e na linha de pesquisa "Obtenção e Avaliação de Propriedades Químicas e Biológicas de Compostos Bioativos e Insumos Farmacêuticos", de autoria do(a) Aluno(a) Mariana Sabo Fernandes, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores:

Presidente: Fávero Reisdorfer Paula (UNIPAMPA)

Membros: Eduardo Borges de Melo (UNIOESTE), Sandra Elisa Haas (UNIPAMPA)

Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o(a) discente foi aprovada pela Banca Examinadora. Foi concedido um prazo de (30) dias, para que o mesmo efetue as correções sugeridas pela Banca Examinadora no parecer, e apresente o trabalho em sua redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca examinadora.

Por sugestão da Banca Examinadora, o novo titulo passa a ser (preencher se pertinente):

À Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Eu, Fávero Reisdorfer Paula, Presidente da Banca, certifico que o(a) discente cumpriu com as exigências da Banca Examinadora e do Regimento Interno dos Programas de Pós-Graduação da UNIPAMPA .

Em, 07/07/2021.

Assinado eletronicamente por **FAVERO REISDORFER PAULA**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 08/07/2021, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0563737** eo código CRC **D7199F37**.

Referência: Processo nº 23100.009292/2021-56 SEI nº 0563737

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

F345e FERNANDES, MARIANA SABO
ESTUDO COMPUTACIONAL E PLANEJAMENTO DE COMPOSTOS DERIVADOS COM AÇÃO INIBITÓRIA POTENCIAL DA PROTEÍNA CASEÍNA QUINASE 2 (CK2) / MARIANA SABO FERNANDES.
82 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2021.
"Orientação: Fávero Reisdorfer Paula".

1. Docking molecular. 2. Triagem Virtual. 3. Farmacófaro. 4. 2-aminotiazol. 5. ck2. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos por todo apoio e confiança depositados em mim ao longo da minha graduação e pós-graduação. Essa conquista também é de vocês!

Ao meu orientador, Fávero, meu agredecimento é mais que especial, pois foi quem abriu as portas da iniciação científica na minha graduação, meu primeiro contato com a pesquisa e laboratório. Hoje encerramos mais uma parceria com "chave de ouro", e sou muito feliz pelos frutos colhidos durante essa trajetória. Obrigada por ser esse excelente professor e orientador, que sempre tem uma palavra de motivação, até nos dias mais difíceis.

Às minhas colegas de laboratório Ana, Fran e Pâmela: saibam que as coisas se tornaram mais leve com vocês por perto! Agradeço por dividir essa experiência com vocês! Vocês são muito especiais!

Agradeço aos meus queridos professores da graduação e pós-graduação por todo conhecimento compartilhado, vocês são demais! E um agradecimento especial para os professores que fazem parte da minha banca, por dedicarem seu tempo e sabedoria para aperfeiçoar este trabalho.

Por fim eu gostaria de agradecer a Universidade Federal do Pampa e todos os colaboradores que prestam um serviço incrível para manter esta estrutura em pé. A universidade me acolheu, aqui fiz amigos, vivi histórias para contar para os meus netos! E entre quedas nas escadas e sustos no elevador, me graduei no curso de Farmácia e, agora, sou Mestre em Ciências Farmacêuticas!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Subunidade catalítica da CK2 (a esquerda) e estrutura tetramérica da CK2 a direita), ambas estruturas cristalizadas da proteína CK2 retiradas do sítio eletrônico Protein Data Bank (PDB).....26
FIGURA 2: Representação da holoenzima CK2 humana e organização dos domínios de CK2α humana (adaptado de COZZA et al., 2013).....27
FIGURA 3: Estrutura química do composto bioativo longdaysina e do tigilanol tiglate.....29
FIGURA 4: Estruturas químicas dos compostos inibidores de tirosina quinase imatinibe, sorafenibe, trematenibe e afatinibe.....30
FIGURA 5: Estruturas químicas dos compostos inibidores de serina/treonina quinases duvelisibe, palbociclibe e silmitasertibe.....31
FIGURA 6: Estruturas químicas dos compostos derivado do 2-aminotiazol (A) e derivado do azonaftaleno (B). 35
FIGURA 7: Fluxograma de procedimentos utilizados na busca de inibidores potenciais da CK2 44
FIGURA 8: Representação da proteína PDB: 3PE1 em azul claro e a cavidade molecular *druggable* forte em modelo tubo (imagem do CavityPlus) 48
FIGURA 9: Representação da proteína PDB: 5KU8 em azul claro e verde, e as três cavidades moleculares *druggable* forte em tubos, a primeira cavidade à esquerda e a segunda ao centro e a terceira à esquerda, numeradas pelo score (imagens do CavityPlus). 51
FIGURA 10: Representação da proteína PDB: 4UB7 em azul claro e a cavidade molecular *druggable* forte em modelo tubo (imagem do CavityPlus) 53
FIGURA 11: Representação da proteína PDB: 6TEI em azul claro e verde, e as duas cavidades moleculares *druggable* forte em tubo, a primeira cavidade à esquerda e a segunda à direita, numeradas pelo score (imagens do CavityPlus). 55
FIGURA 12: Modelo em 2 e 3D (forma de tubo) de um derivado de 2-aminotiazol (A) e de um derivado de azonaftaleno (B) que demostraram atividade inibitória frente a CK2 57
FIGURA 13: Derivados de 2-aminotiazol que apresentaram maior interação com a proteína quinase CK2 nos estudos preliminares. 58

FIGURA 14: Modelos em 3D do conjunto de 2-aminotiazois alinhadas (A), farmacóforo número 1 gerado com sítios de propriedades físico-químicas (B) e distâncias intra-moleculares entre os sítios dos farmacóforos em Angstroms (C) (com autorização de PRADEL, 2020). 60
FIGURA 15: Modelo de farmacóforo gerado com sítios de propriedades físico-químicas sobreposto a derivado aminotiazol.....61
FIGURA 16: Composto com anel aminotiazol e função ácida característica do conjunto de origem obtido a partir de triagem virtual.....62
FIGURA 17: Estuturas químicas dos compostos obtidos pela triagem virtual A (via Zinc e PubChem), B (via ChemBL25), C, D e E (via PubChem). 64
FIGURA 18: Interação entre o composto obtido pela triagem virtual com a proteína CK2 PDB ID: 3PE1 (A), 5KU8 (B), 4UB7 (C) e 6TEI (D), e os principais aminoácidos envolvidos (imagem obtida do Pymol).....67
FIGURA 19: Interação entre os compostos 1 (amarelo), 2 (rosa), 3 (azul), 4 (vermelho) e 5 (laranja) com a proteína CK2 PDB ID: 4UB7, e os principais aminoácidos envolvidos (imagem obtida pelo Pymol).....68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Resultados da busca de cavidade de modelos 3D da proteína CK2. 47
TABELA 2: Descrição dos principais modelos farmacóforos obtidos utilizando software Pharmagist e uso de abordagem LBDD..... 60
TABELA 3: Valores de probabilidade e de máxima similaridade de Tanimoto (2D) a alvo caseína quinase 2, subunidade alfa, identificados por predições em software SEA..... 65
TABELA 4: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 3PE1 cavidade 3NG..... 68
TABELA 5: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 3PE1 cavidade 3NG 69
TABELA 6: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 5KU8 cavidade 6XK..... 69
TABELA 7: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 5KU8 cavidade 6XK..... 69
TABELA 8: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 4UB7 cavidade 3G5..... 70
TABELA 9: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 4UB7 cavidade 3G5..... 70
TABELA 10: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 6TEI cavidade N4N. 70
TABELA 11: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 6TEI cavidade N4N..... 71

RESUMO

A proteína caseína quinase 2 (CK2) quando superexpressa ou quando há perda de sua função, tem sido relacionada às neoplasias. Desta forma, a inibição da CK2 apresenta-se como uma proposta interessante para a descoberta de novos compostos antitumorais. Os derivados de 2-aminotiazois e os derivados de azonaftaleno são compostos com ação antitumoral com atividade inibitória da CK2. Para fins de obtenção de informações e modelos que permitam entendimento maior e mais detalhado sobre a atividade antineoplásica destes compostos nesta proteína, foi realizado este estudo. As estruturas dos compostos foram submetidas a otimização de geometria e análise conformacional através do software Spartan'08 for Windows. Os modelos da estrutura 3D da proteína CK2 foram obtidos do sítio eletrônico Protein Data Bank (PDB ID:3PE1, 5KU8, 4UB7 e 6TEI). A busca de cavidades foi realizada com o emprego do servidor online CavityPlus, onde foi obtida 1 cavidade *druggable* para a 3PE1, 3 para a 5KU8, 1 para a 4UB7 e 2 para a 6TEI. Os estudos prévios de predição de atividade e busca de similaridade, utilizando a plataforma online Self Ensemble Approach (SEA), demonstraram que somente os derivados do 2-aminotiazóis apresentaram resultado significativo em relação aos azonaftalenos, com potencial interação com a CK2 e com índice de similaridade de 0,3 entre si. O modelo farmacóforo *LBDD* foi obtido pelo software Pharmagist, que foi carregado no servidor ZincPharmer, permitindo a realização da triagem virtual, onde um composto foi escolhido por apresentar o grupamento 2-aminotiazol e uma função ácida. Para o modelo obtido pelo farmacófaro *SBDD* foi utilizado o software Pharmit, assim como a triagem virtual desta etapa, onde foram obtidos cinco compostos a partir de bancos digitais de pequenas moléculas. Os compostos obtidos pela triagem não apresentaram efeito tóxico teórico e três deles apresentaram predição de atividade biológica positiva para a CK2. O estudo de ancoramento molecular foi realizado no software iGemdock 2.1 com as estruturas 3D da proteína CK2, derivados do 2-aminotiazól e o composto obtido pela triagem virtual com farmacófaro *LBDD*. Estas interações ocorrem com os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo, estando de acordo com a literatura recente. Sugere-se que os modelos

3D da proteína CK2 utilizados neste trabalho podem ser aplicados para o planejamento e desenvolvimento de novos compostos bioativos que apresentem inibição ativa a partir de derivados de 2-aminotiazól que possuam atividade antineoplásica promissora.

ABSTRACT

The protein casein kinase II (CK2) when overexpressed or when there is loss of function, has been related to neoplasms. Thus, the inhibition of CK2 presents itself as an interesting proposal for the discovery of new antitumor compounds. Derivatives of 2-aminothiazoles and derivatives of azonaphthalene are compounds with antitumor action with inhibitory activity on CK2. In order to obtain information and models that allow a greater and more detailed understanding of the antineoplastic activity of these compounds in this protein, this study was tool place out. The compounds were submitted to geometry optimization and conformational analysis using Spartan Sparta08 software for Windows. The 3D structure models of the CK2 protein were obtained from the Protein Database website (PDB ID: 3PE1, 5KU8, 4UB7 and 6TEI). The search for cavities was performed using the CavityPlus online server, where 1 druggable cavity was obtained for 3PE1, 3 for 5KU8, 1 for 4UB7 and 2 for 6TEI. Previous studies on activity prediction and search for similarity, using the Self Ensemble Approach (SEA) online platform, demonstrated that only 2-aminothiazoles derivatives showed significant results in relation to azonaphthalenes, with potential interaction with CK2 and with an index of similarity of 0.3 to each other. The pharmacophore LBDD model was obtained by the Pharmagist software, which was loaded on the ZincPharmer server, allowing the realization of virtual screening, where a compound was chosen because it presents the 2-aminothiazole group and an acid function. For the model obtained by the pharmacophare SBDD, the Pharmit software was used, as well as the virtual screening of this step, where five compounds were obtained from digital banks of small molecules. The compounds obtained by virtual screening showed no toxic effect and three of them showed a prediction of positive biological activity for CK2. The docking molecular study was performed using iGemdock 2.1 software with the 3D structures of the CK2 protein, 2-aminothiazole derivatives and the compound obtained by virtual screening with pharmacophare LBDD. These interactions occur with the main amino acid residues of the active active, according to recent literature. It is suggested that the 3D models of the CK2 protein used in this work may be competent for the planning and development of new bioactive compounds that show active inhibition from 2-aminothiazole

derivatives that have promising antineoplastic activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. OBJETIVOS 20
3.1. GERAL 20
3.2. ESPECÍFICOS 20
3. JUSTIFICATIVA 21
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22
4.1. CÂNCER E PROTEÍNAS QUINASES 22
4.2. CASEÍNA QUINASES 23
4.3. ESTRUTURA DA PROTEÍNA CK2 26
4.4. COMPOSTOS BIOATIVOS QUE ATUAM EM QUINASES E CK2 27
4.5. MODELAGEM MOLECULAR 35
5. MATERIAIS E MÉTODOS 39
5.1. ESCOLHA DA PROTEÍNA E BUSCA DE CAVIDADES 39
5.2. DESENHO, OTIMIZAÇÃO E ESCOLHA DOS COMPOSTOS 39
5.3. ESTUDO DE FARMACÓFARO 40
5.4. TRIAGEM VIRTUAL 41
5.5. PREDIÇÃO DE TOXICIDADE E PREDIÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA 42
5.6. ANÁLISE DE ANCORAMENTO MOLECULAR (DOCKING) 43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
6.1. ESCOLHA DA PROTEÍNA E BUSCA DE CAVIDADES 45
6.2. DESENHO, OTIMIZAÇÃO E ESCOLHA DOS COMPOSTOS 56
6.3. ESTUDO DE FARMACÓFARO 58
6.4. TRIAGEM VIRTUAL 61
6.5. PREDIÇÃO DE TOXICIDADE E PREDIÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA 63
6.6. ANÁLISE DE ANCORAMENTO MOLECULAR (DOCKING) 65
7. CONCLUSÃO 73
REFERÊNCIAS 74

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de disfunções e enfermidades caracterizado pelo crescimento desordenado das células. O câncer causa a morte de aproximadamente 8,2 milhões de pessoas no mundo, sendo que no Brasil, no ano de 2020, foram registrados 232,03 óbitos devido a estas patologias (INCA, 2021). Esses dados remetem a necessidade constante do desenvolvimento de novos fármacos que possam atenuar a doença, bem como o estudo do aperfeiçoamento de compostos que vem se apresentando como possíveis detentores de atividade antitumoral.

As proteínas quinases ou *protein kinases (PKs)* são enzimas que possuem a função de transferir o grupamento fosfato do trifosfato de adenosina (ATP) para proteínas-alvo, mediando sinais responsáveis por diversas funções celulares fundamentais no organismo humano. É responsável por fosforilar mais de 300 proteínas (MEGGIO and PINNA, 2003) e suas principais funções envolvem o crescimento, proliferação, sobrevivência celular (GUO et al., 2001), função antiapoptótica global (AHMAD et al., 2008; RUZZENE et al., 2019) e função de resistência a medicamentos (BORGO and RUZZENE, 2019). A desregulação dessas proteínas está relacionada às diversas doenças como diabetes, inflamações e a diversos tipos de câncer (SILVA et al., 2009).

Em 1956, Edmond Fischer e Edwin Krebs relataram o primeiro estudo evidenciando a importância das PKs na sinalização celular (KREBS e FISCHER, 1956). Em 1992, ambos foram laureados com o prêmio Nobel em fisiologia e medicina pela descoberta da fosforilação reversível como um mecanismo de regulação biológica (NOBEL PRIZES, 1992). Desde então as PKs são alvo de estudos e já foram descritas mais de 518 proteínas quinases humanas, as quais correspondem a aproximadamente 1,7% de todos os genes humanos (MANNING et al. 2002), representando a maior família de proteínas de organismos eucariontes (SILVA, 2009).

A classificação das proteínas quinases está relacionada à especificidade do aminoácido a ser fosforilado. Quando o grupamento fosfato é transferido para resíduos de tirosina, as PKs são classificadas como tirosina-quinases. Quando a fosforilação ocorre em resíduos de treonina ou serina, as PKs são

classificadas como serina-treonina quinases (SILVA, 2009; HAMILTON, 1998).

Dentre as principais proteínas quinases do tipo serina-treonina encontra-se a proteína quinase C (PKC), que está envolvida em eventos de transdução de sinais, uma vez que envolve estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. Possui como ação catalisar a transferência do grupo fosfato do ATP a outras proteínas. Da mesma maneira, a PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Esse evento ocorre em resposta ao aumento transitório de diacilglicerol (DAG) em nível celular ou a exposição a compostos do tipo forbol-ésteres (IDRIS et al., 2001).

A caseína quinase 2 (CK2) ou proteína quinase CK2 também é uma PK que fosforila serina-treonina. Quando ela se encontra em níveis elevados, considerados anormais, tem sido relacionada a uma série de enfermidades, com especial referência às neoplasias. Desta forma, a inibição potencial das proteínas quinases CK2 apresenta-se como uma proposta interessante para a descoberta de novos compostos antitumorais. Essa observação proporciona o interesse na realização de investigações que visam à identificação de substâncias capazes de inibir a atividade desta quinase (PAULI et al., 2018)

Alguns compostos inibidores das proteínas quinases com atividades antitumorais encontram-se em estudos pré-clínicos ou clínicos. Destaca-se, no primeiro caso, dois inibidores da CK2, o TBB (4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzotriazol) e o DMAT (2-dimetilamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol) (PAGANO et al., 2008), onde se sabe que o TBB apresenta uma maior atividade inibitória contra as proteínas quinases CK2 do que o DMAT (PAGANO et al., 2008). Em estudo clínico temos como exemplo o silmitasertib (KIM et al. 2018), um potente e seletivo inibidor de CK2. A atividade antiproliferativa do CX-4945 (silmitasertib) contra as células neoplásicas correlacionou-se com os níveis de expressão da subunidade catalítica CK2α. A atenuação da sinalização PI3K/Akt por CX-4945 foi evidenciada por desfosforilação de Akt no local S129 específico de CK2 e nos locais reguladores S473 e T308 canônicos. O CX-4945 causou a interrupção do ciclo celular e induziu seletivamente a apoptose em células neoplásicas em relação às células normais (SIDDIQUI-JAIN et al., 2010). No entanto, parte dos inibidores competitivos por ATP podem ser proibidos a serem candidatos a medicamentos devido à citotoxicidade,

genotoxicidade e outras deficiências farmacêuticas (PAGANO et al.,2008 ; SARNO et al., 2011 ; LI et al., 2010).

No estudo de Bestgen et.al. (2019), foram identificados os derivados do 2-aminotiazóis como uma nova classe de inibidores da Ck2, exibindo um modelo não competitivo por ATP, onde foi estabilizada uma conformação inativa de CK2 em solução. Os estudos de cinética enzimática, *de RMN de diferença* da *transferência de saturação* (STD NMR), e espectroscopia de massa demonstram que os compostos se ligam em uma bolsa alostérica fora do local de ligação do ATP.

No estudo de Moucadel et al. (2011), foi realizada uma triagem automatizada onde identificaram compostos derivados do azonaftaleno como novos inibidores de CK2 altamente potente, e que essa inibição era não competitiva por ATP. Estes compostos promoveram a parada do ciclo celular de células U373 de glioblastoma humano. Ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que esses compostos poderiam diminuir a massa do tumor de células U373 em 83%, ressaltando sua eficácia contra esses tumores resistentes à apoptose. Estes resultados demonstram que a inibição alostérica da atividade da CK2 pode ser alcançada com inibidores não competitivos em ATP, expandindo as opções para modular essa enzima.

O planejamento de compostos bioativos pode ser aplicado no uso de receptor biológico (planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, SBDD, do inglês *structure-based drug design*) ou em estruturas químicas (planejamento de fármacos baseado na estrutura da molécula ou ligante (LBDD, do inglês *ligand- based drug design*) (Guido *et al.*, 2010).

O ancoramento molecular (*molecular docking*) é um exemplo de metodologia SBDD, e sua técnica consiste do cálculo e obtenção de diferentes conformações espaciais do ligante possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante-alvo biológico. (Ruyck *et al*. 2016; Erickson *et al*. 2004). Estas funções usam valores de energia livre de ligação, onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (Kitchen, 2004).

Entre os métodos de LBDD destaca-se o estudo de farmacófaro. Um farmacóforo é a estrutura química ou porção molecular que possui as propriedades físico-químicas e estruturais essenciais responsáveis por um

grupo de moléculas exercer efeito ou interromper este (agonistas ou antagonista). O grupo farmacofórico, que está presente no farmacóforo, é a porção estrutural mínima que é necessária para a ação biológica de um fármaco ou grupo de classe terapêutica, e compreende todas as principais características envolvidas no desempenho da atividade biológica ou com a interação do ligante com o sítio receptor (Kaserer *et al*. 2015, Bhattacharjee *et al*. 2007). Para o uso desta técnica não é necessário o emprego da estrutura do alvo biológico (Guido *et al.*, 2010; Ferreira *et al.,* 2010).

Entre as principais características de uma molécula que podem influenciar a atividade biológica se destacam os descritores de propriedades estereoeletrônicas, como: volume molecular, potencial eletrostático molecular, densidade eletrônica, energia e coeficiente dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, energia de ionização, ordem de ligação e momento de dipolo, grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, e de hidrofobicidade, como presença de grupos hidrofóbicos e o coeficiente de partição (BARREIRO, 1997).

Os custos de aplicação computacional da realização destes estudos são bem menores se comparados aos gastos laboratoriais, despendidos ao sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias. As ferramentas de planejamento de fármacos aplicadas com o uso de computador têm sido usadas para filtrar compostos que não se apresentam como ligantes potenciais de interação com o alvo biológico estudado. Adicionalmente, esta metodologia *in silico* é utilizada para desenhar os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o receptor (RODRIGUES, 2012) e sugerir prováveis substâncias protótipo.

O emprego de metodologias computacionais no processo de planejamento de fármacos, consolidadas e apropriadas, complementa o emprego de técnicas experimentais e amplia a possibilidade de êxito (FERREIRA, 2015). No contexto deste trabalho, se apresentam como proposta viável para o desenvolvimento de inibidores novos e potentes, que possam ter maior eficiência como antitumorais.

No cenário de pesquisas e desenvolvimento de antitumorais novos espera-se que a busca de moléculas promova a obtenção de compostos que apresentem eficácia, especificidade e o mínimo possível de reações não

desejadas (PALMEIRA FILHO, 2012).

Em posse do conhecimento da importância da descoberta de compostos capazes de atuar com ação antitumoral e de se utilizar metodologias computacionais de planejamento de fármacos, realizou-se este trabalho para fins de obtenção de informações e modelos que permitam entendimento maior e detalhado sobre a atividade antineoplásica dos compostos inibidores da proteína quinase CK2. Os resultados obtidos a partir deste estudo podem indicar a influência de grupos funcionais, estrutura química e farmacófaro dos compostos na inibição da CK2. Neste contexto, estes dados podem ser utilizados para o desenvolvimento de compostos novos candidatos a agentes terapêuticos a serem utilizados no tratamento de neoplasias.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar conjuntos de compostos bioativos inibidores de quinases, que possam ser empregados como protótipos, e modelos de proteínas que possam ser alvos de fármacos, em pesquisas que visem à busca de substâncias terapêuticas novas.

2.2. Específicos

- Trabalhar com dois grupos de compostos inibidores da CK2 descritos na literatura, a saber: derivados do 2-aminotiazol e do azonaftaleno;
- Desenhar e otimizar a geometria estrutural das estruturas químicas dos compostos derivados do 2-aminotiazol e derivados do azonaftaleno;
- Realizar a modelagem e estudo de propriedades físico-químicas das moléculas estudadas;
- Realizar estudos similaridade e de predição de atividade dos compostos estudados;
- Realizar a busca de cavidades das proteínas CK2 utilizadas neste estudo;
- Definir a(s) melhor(es) estrutura(s) 3D de proteína CK2 para ser utilizada neste estudo;
- Desenvolver um modelo farmacófaro com os compostos modelados;
- Realizar estudo de triagem virtual com o farmacófaro encontrado;
- Realizar estudo de predição de toxicidade e predição de atividade dos compostos obtidos pela triagem virtual;
- Realizar estudos de ancoramento molecular dos compostos selecionados.

3. JUSTIFICATIVA

Sabendo-se da relevância da descoberta de compostos bioativos capazes de atuar com ação antitumoral potencial e das vantagens de utilizar metodologias computacionais, sugere-se a realização deste trabalho para fins de obtenção de modelos que permitam desenvolver compostos derivados do 2-aminotiazol com atividade inibidora potencial da proteína quinase 2, e sugerir uma compreensão sobre esta atividade inibitória. Os resultados obtidos a partir deste estudo indicam a influência de grupos funcionais, estrutura química e farmacóforo dos compostos bioativos derivados do 2-aminotiazol e sobre a atuação destes compostos na proteína CK2. Também é sugerido o melhor modelo de estrutura 3D desta proteína. Neste contexto, estes dados podem ser utilizados para o desenvolvimento de compostos novos candidatos a agentes terapêuticos a serem utilizados no tratamento antineoplásicos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Câncer e proteínas quinases

O câncer é um conjunto de disfunções e enfermidades que se caracterizam por ser um conjunto de distúrbios responsáveis pelo crescimento celular descontrolado ou inadequado, perda de função, diferenciação, desenvolvimento de poder invasivo e capacidade de migrar para outros tecidos (metástase). Estima-se que no Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, ocorrerão 625 mil novos casos de câncer (INCA, 2019). Esses dados remetem a necessidade constante do desenvolvimento de novos fármacos que possam atenuar essa patologia, bem como o estudo do aperfeiçoamento de compostos que vem se apresentando como possíveis detentores de atividade antitumoral.

As proteínas quinases (PK) são enzimas que têm a função de fosforilar uma única proteína ou diversos alvos diferentes (multifuncionfais) a estruturas biológicas em organismos vivos, podendo apresentar variações em graus de especificidade a substratos orgânicos. No genoma humano há codificação de aproximadamente 630 quinases o que demonstra a diversidade de funções, a amplitude de atividades e podem coordenar diversos processos fisiológicos (BHULLAR *et al*. 2018).

Segundo Pauli *et al*. (2018) é possível classificar as PKs de acordo com a sua localização celular e organização estrutural, onde são divididas em PKs receptoras e não receptoras. As estruturas da primeira classificação estão localizadas em membranas e apresentam estrutura com porções em regiões extra, intracelular e intermembrana. Neste contexto, as PKs deste tipo são ativadas por um ligante extracelular. Já as PKs da segunda classificação estão localizadas no citoplasma da célula. Os dois tipos de proteínas apresentam um domínio molecular de ligação do trifosfato de adenosina (ATP) que exerce o seu efeito catalítico (PAULI *et al*. 2018).

As PKs multifuncionais principais podem ser do tipo tirosina ou serina/treonina quinases. As proteinas do tipo serina/treonina geralmente apresentam sequências de aminoácidos relacionados em sua estrutura molecular onde o fragmento envolvido é Arg-Arg-X-Ser-Z ou Arg-Arg-X-Thr-Z, em que X é um resíduo pequeno, e Z é um grande e hidrofóbico de Ser ou Thr.

A lisina, por exemplo, pode substituir um dos resíduos de arginina, mas com alguma perda de afinidade da enzima pelo substrato envolvido. Assim, o principal determinante da especificidade é a sequência de aminoácidos que rodeia o local de fosforilação de serina ou treonina. Entretanto, resíduos distantes podem contribuir para a especificidade de interação da enzima. Por exemplo, dependendo da presença de alguns aminoácidos há alterações na conformação da proteína, o que pode alterar a acessibilidade de um possível local de fosforilação (BERG *et al*., 2002).

Uma disfunção ou deformidade nas vias de sinalização celular pode levar a estados patológicos, como diversos tipos de câncer. Neste cenário, o câncer está fortemente associado com defeitos de proteínas envolvidas na transdução de sinal. Algumas diferenças discretas nas sequências de aminoácidos entre as proteínas codificadas por proto-oncogenes e oncogenes são responsáveis pelo produto oncogênico que fica preso na posição ativada "*on*", que continua a estimular o crescimento celular de forma contínua (ELLIS e CLARK, 2000).

As proteínas quinases estão mais ativas em células neoplásicas, e essa ocorrência generalizada sugere que moléculas que possam atuar inibindo essas enzimas funcionariam como agentes antitumorais. Os resultados de alguns trabalhos descritos na literatura apoiam esse conceito. Entre estes, se elenca o trabalho desenvolvido por Druker (2001) que versou a hipótese em que mais de 90% de pacientes com leucemia mieloide crônica (LCM) mostram um defeito cromossômico nas células afetadas e subsequente alteração na concentração de enzimas quinases (LOPES, 2019). Neste contexto, substâncias inibidoras de enzimas quinases têm sido amplamente utilizadas como agentes antitumorais e se apresentam como proposta eficiênte no desenvolvimento de fármacos novos (BHULLAR *et al*. 2018).

4.2. Caseína Quinases

As proteínas caseína quinases (CK) podem ser encontradas em subtipos 1 e 2 e estão envolvidas na regulação de ciclos celulares. A proteína quinase CK2 representa um grupo de proteínas quinases intimamente relacionadas que exibem especificidade diversa e tendem a fosforilar centenas de proteínas

distintas dentro das células (PINNA, 1990).

A CK2 é uma enzima altamente pleiotrópica e constitutivamente ativa, sendo responsável pela geração de uma proporção significativa do fosfoproteoma humano, pela regulação de funções de apoptose, proliferação celular, reparo do DNA, e até o ritmo circadiano (AHMAD *et al*. 2008; LITCHFIELD, 2003). A CK2 fosforila centenas de substratos, envolvidos em praticamente todos os processos celulares, e dentre algumas funções importantes podem se destacar a fosforilação das estruturas fosfoproteína p53 e quinase ativada por mitógeno (MAPK), que podem estar envolvidas em algumas disfunções no organismo, como câncer e inflamação (AHMAD et al. 2008; LITCHFIELD, 2003).

O cenário emergente proposto nos estudos descritos na literatura e a experimentação com células neoplásicas tratadas com inibidores de CK2 sugerem que o nível anormalmente elevado de CK2 gera um ambiente celular que favorece a progressão do tumor por meio do mecanismo de “dependência”. Na verdade, a CK2 regula quase todos os processos celulares essenciais para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Em particular, seu papel global como um supressor chave de apoptose torna a CK2 um elemento importante no progresso de tumores (COZZA, 2015).

Por muito tempo, a proteína CK2 não foi considerada um alvo conveniente para fármacos devido à sua onipresença no organismo humano. No presente momento há concordância de que as células neoplásicas dependem da atividade de CK2 mais do que as células saudáveis (RUZENNE e PINNA, 2010). Em pesquisas realizadas com o emprego da tecnologia CRISPR/Cas9 em células normais e tumorais observou-se a produção com sucesso de células não tumorais depletadas de isoformas catalíticas da CK2. Por outro lado, nenhuma célula tumoral completamente desprovida de atividade CK2 foi viável no estudo (BORGO e RUZENNE, 2019).

A supressão da apoptose e demais funções da CK2 são especialmente importantes para as células cancerosas. Adicionalmente a estas informações, Rabalski *et al*. (2016) sugeriram que esta proteína está ligada ao aumento da prevalência de cânceres de mama, pulmão, cólon e próstata. Assim, neste cenário, a CK2 foi de fato definida como uma peça-chave na biologia do câncer (TREMBLEY *et al*., 2009). Vários estudos in vitro com inibidores de CK2

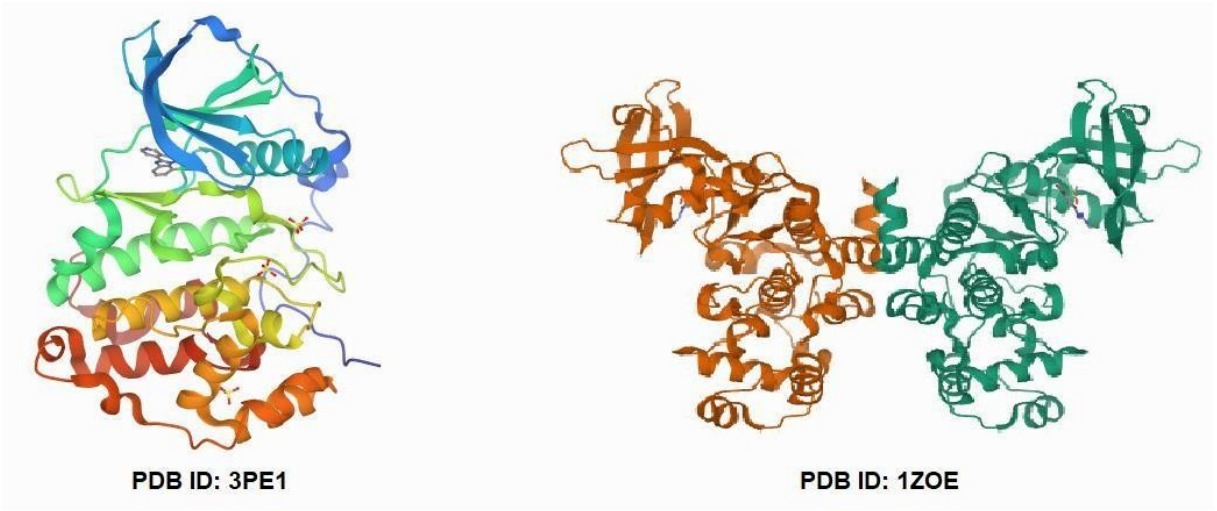
confirmaram uma maior sensibilidade das células tumorais em comparação com as células normais, e os tratamentos em animais, assim como os ensaios clínicos iniciais em humanos, estão fornecendo evidências da viabilidade do direcionamento de CK2 para terapia tumoral (BORGO e RUZENNE, 2019). Por esta razão esta proteína tem sido escolhida como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos que atuem de forma inibidora com ação antitumoral potencial (COZZA, 2017).

4.3. Estrutura da proteína CK2

A atividade da proteína CK2 humana depende da sua subunidade catalítica, que pode ser encontrada sozinha ou ligada a uma estrutura tetramérica (Figura 1), conhecida como holoenzima, composta por duas subunidades regulatórias (β) e duas subunidades catalíticas que pode ser do tipo α e α', α e α, e α' e α' (LITCHFIELD, 2003). A presença de subunidade α ou α' pode apresentar ações diferentes, onde a isoforma α' pode ser visulizada em maior presença no cérebro ou mesmo desta exercer fosforilação da enzima chamada caspase 3 em comparação a subunidade α (RABALSKI *et al*. 2016).

A subunidade regulatória tem como funções interagir com a proteína a ser fosforilada pela CK2 para estabilizar o complexo formado com a holoenzima, e modular a conformação da holoenzima para interagir com os substratos biológicos (GRAHAM e LITCHFIELD, 2000). Oposto da maioria de outras quinases, a CK2 não requer nenhum evento de fosforilação para sua ativação (LITCHFIELD *et al.,* 2003), porém diversos mecanismos de regulação desta proteína estão sendo estudados e envolvem tanto a formação de estruturas multiméricas a partir da holoenzima, como a potencial ocorrência de interações com estruturas de cofator (TUAZON e TRAUGH, 1991).

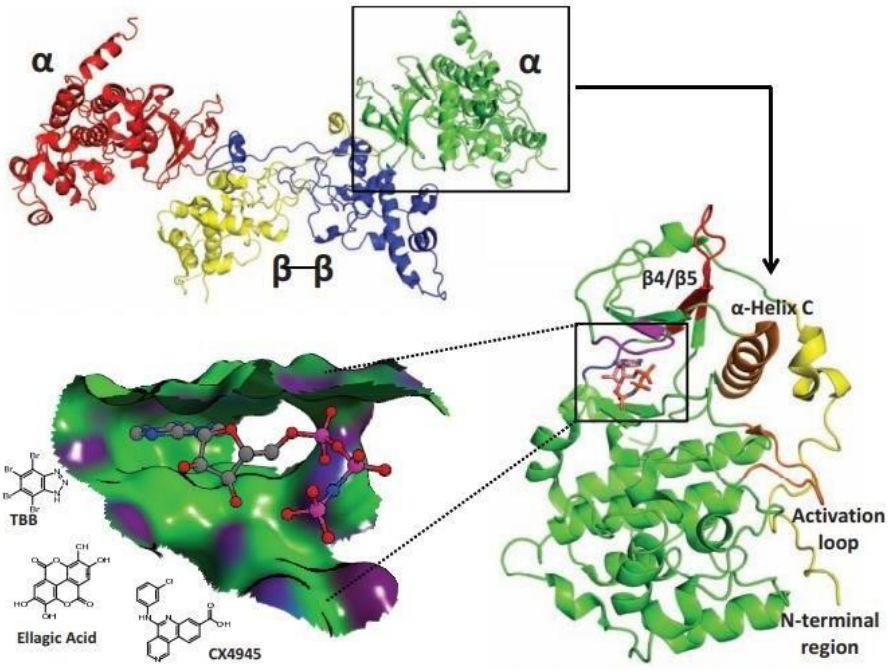
Figura 1: Subunidade catalítica da CK2 (a esquerda) e estrutura tetramérica da CK2 (a direita), ambas estruturas cristalizadas da proteína CK2 retiradas do sítio eletrônico Protein Data Bank (PDB).



As duas subunidades catalíticas apresentam sequencia global com similaridade de cerca de 75%. As diferenças entre α e α' estão no segmento carbono terminal (C-terminal), onde a subunidade α' é menor, uma vez que possui 41 resíduos mais curtos do que subunidade α. A similaridade entre essa sequência é de apenas 38% (COZZA *et al*., 2013).

Ambas as subunidades catalíticas possuem as principais estruturas típicas de todas as proteínas quinases relacionadas ao cinoma humano, como uma alça P (que é alça de ligação de fosfato, também conhecida como alça rica em glicina ou G-loop), a região molecular catalítica, um laço de ativação (também chamado de T-loop), e o local de ligação do substrato. Como para todos os membros da família do cinoma humano, as subunidades catálticas da CK2 exibem duas características topológicas principais, sendo um pequeno lóbulo rico em β-strand (com exceção da α-helixC), e um grande lóbulo dominado por α-helices (Figura 2). O local de ligação do ATP é localizado entre esses dois lóbulos conectados por um laço (loop) curto, denominado "região de dobradiça" (COZZA *et al*., 2013).

Figura 2: representação da holoenzima CK2 humana e organização dos domínios de CK2α humana (adaptado de COZZA *et al*., 2013).



A subunidade regulatória (β) é onipresente no reino eucariótico e não possui sequência semelhante a outras proteínas, exceto para a proteína *Drosophila melanogaster* estrelada (LIVAK, 1990). Experimentos bioquímicos, juntamente com as estruturas cristalinas disponíveis da subunidade β, esclareceram os papéis dos domínios carbono (C) e nitrogênio (N) terminais da subunidade reguladora da CK2. Neste contexto, a região N-terminal hospeda o sítio de auto fosforilação (MSSSEE) (BOLDYREFF *et al*., 1993) e um cluster de aminoácidos de carater ácido (resíduo 55-64) está envolvido na regulação negativa da CK2 (MEGGIO *et al*., 1994). Já a região C-terminal é responsável pela dimerização, pela associação com a subunidade, por sua regulação positiva e preservação contra desdobramento estrutural e ocorrência de proteólise (BOLDYREFF *et al*., 1996).

4.4. Compostos bioativos que atuam em quinases e CK2

Atualmente cerca de 49 quinases são alvos de fármacos considerados inibidores de quinases. Vários estudos têm sido realizados com a finalidade de

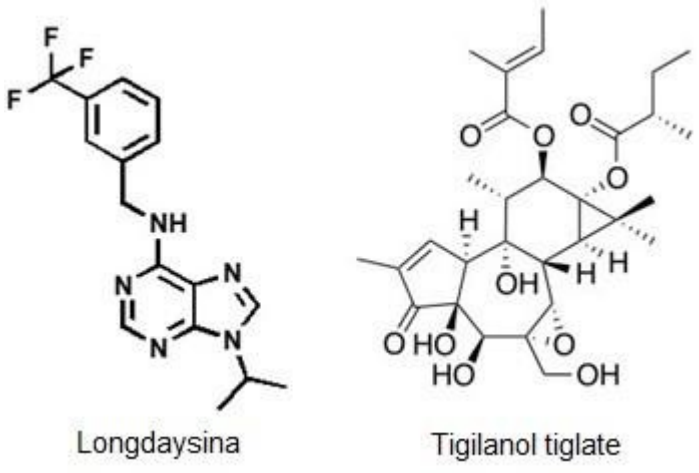
se estudar a inibição de quinases. No presente momento 175 compostos bioativos candidatos a novos fármacos estão em estudos clínicos e há potencial de estudo de diversas outras enzimas quinase, como as Aurora quinases, proteínas quinases B (AKT) e N3 (PKN3), quinases dependentes de ciclinas (CDK) e de Ca2+/Calmodulinas (CAMK), e PCTAIRE quinases (ESSEGIAN *et al*. 2020; BOURNEZ *et al*. 2020).

No contexto apresentado alguns estudos podem ser elencados. Entre estes, Hirota et al. (2010) identificaram um derivado de purina, chamado de longdaysina (Figura 3), como um novo modulador de ritmos circadianos celulares. Este composto exerce um forte efeito de prolongamento do período em células de mamíferos cultivadas e em peixes-zebra vivos através do envolvimento de proteínas quinases CK1δ, CK1α e ERK2. Em 2019, Xiong e colaboradores demostraram que a longdaysina suprimiu a sinalização de Wnt/β-catenina via direcionamento de CK1 e CK1. A administração de longdaysina retardou o crescimento do tumor com uma inibição concomitante da via de sinalização Wnt / β-catenina em xenoenxertos de câncer de mama MDA-MB-231. Estes resultados indicam que longdaysina pode ser um agente promissor para o tratamento do câncer de mama.

A proteína quinase C (PKC) e suas isoformas há muito são consideradas proteínas envolvidas no desenvolvimento de tumores, sendo alvos diretos de ésteres de forbol, que estimulam a proteína e são considerados "promotores de tumor" (MOCHLYROSEN *et al*., 2012). Estudos recentes encontraram mais de 1.000 mutações somáticas associadas ao câncer em isoformas de PKC, resultando principalmente em perda de função (ANTAL *et al*., 2015). Além disso, muitos cânceres são conhecidos por apresentar expressão regulada negativamente de membros da família de PKC (PONGRACZ *et al*., 1995; SUGA *et al*., 1998; DOWLING *et al*., 2016). Portanto, foi proposto que as terapias anticâncer deveriam se concentrar na restauração da atividade de PKC (NEWTON, 2018). O composto tigilanol tiglate (TT, também conhecido como EBC-46) (Figura 3), é um derivado epoxitigliane isolado da semente da *Fontainea picrosperma* (Euphorbiaceae), planta nativa da floresta tropical australiana (REDDELL *et al*., 2007), considerado um modulador da Proteína Quinase C (PKC) e suas isoformas, onde uma única dose intratumoral de TT causou necrose hemorrágica e ablação de tumor em melanoma, e outros

modelos de câncer em camundongo (BARNET *et al.,* 2019). No estudo de Cullen *et al*. (2021) foi demonstrado evidências de uma ligação entre isoformas de PKC e a regressão do tumor após administração intratumoral de derivados do Tigilanol Tiglate (TT).

Figura 3. Estrutura química do composto bioativo longdaysina e do tigilanol tiglate.



Longdaysina Tigilanol tiglate

A maioria de fármacos inibidores de quinases envolvem as PKs relacionadas as tirosina-quinases. Os alvos de fármacos são ABL (Abelson) ligada a protooncogene ABL1, ligadas aos receptores do fator de crescimento epidérmico 1 e 2 (EGFR 1 e ERBB2), do fator de crescimento endotelial (VEGFRs), fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs), ao protooncogne c-Kit, ao carbono terminal de proteínas citoplasmática SRC, e alvo mecanistico da rapamicína (mTOR), quinases dependentes de ciclinas (CDKs), entre outras (BHULLAR *et al*., 2018).

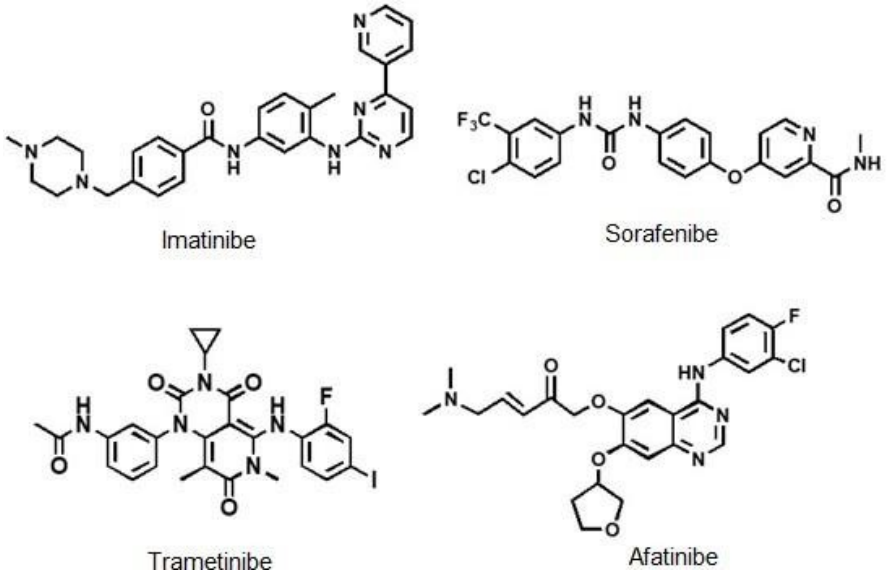
A pesquisa da modulação farmacológica da atividade e inibição de diferentes PKs é de extrema importância no tratamento de tumores. As duas principais abordagens utilizadas são o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos capazes de se ligarem ao domínio extracelular das PKs receptoras ou aos fatores e mediadores que se ligam a estes, e a identificação de moléculas capazes de atuarem como inibidoras da atividade catalítica no domínio quinase intracelular destas proteínas (AURORA e SCHOLAR, 2005).

O enfoque farmacológico baseado em moléculas de fármacos utilizados

na regulação da atividade das PKs baseia-se em moléculas ATP-miméticas ou alostéricas capazes de inibir a atividade catalítica no seu domínio quinase intracelular (FERRARA *et al*., 2005). A agência regulatória norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou 38 substâncias que atuam como inibidoras de diferentes PKs, e o mercado farmacêutico mundial desta classe de fármacos observou expressivo crescimento, passando de US$ 28,1 bilhões em 2010 para US$ 40,3 em 2016, o que representa um crescimento anual de 6,7 %, em média (GLOBAL MARKETS, 2016).

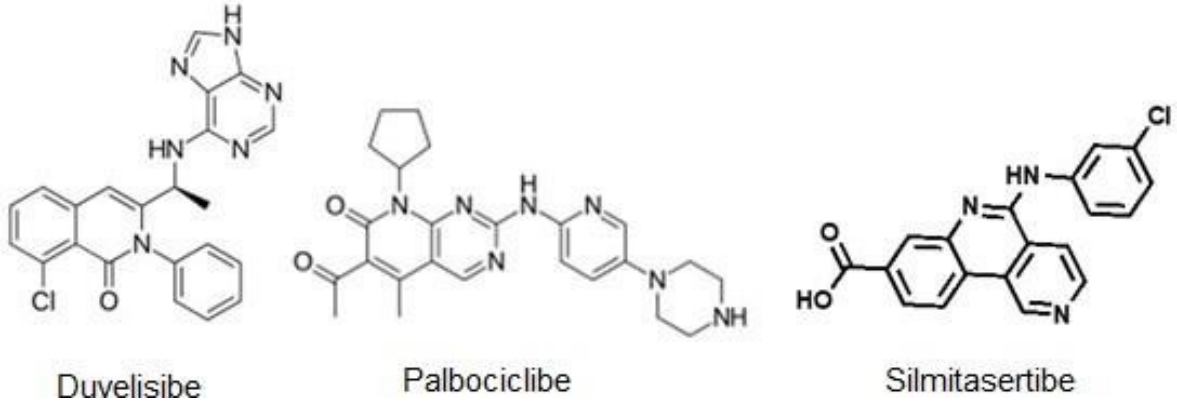
O primeiro inibidor de PKs aprovado pelo FDA foi o imatinibe em 2001, tendo sido inicialmente descoberto como inibidor da proteína Bcr-Abl (tirosina quinase resultante dos genes Bcr e Abl). No entanto, atualmente é descrito também como inibidor de PDGFR-α e β e c-Kit (FDA, 2001; FDA, 2018). Os compostos inibidores de tirosina quinases podem ser classificados como inibidores reversíveis, que possuem subclassificações em tipos I, II, III ou IV de acordo com seu sitio de ligação e modo de interação no sítio catalítico ou regiões moleculares adjacentes a este sítio, ou ainda alostéricos na proteína, se interações do tipo reversível ou irreversível (PAULI *et al.*, 2018). Entre estes podemos elencar a seguir os fármacos: imatinibe, sorafenibe e trametinibe, exemplos dos tipos I a III, de interações reversíveis, e o afatinibe, de ligação irreversível com as proteínas (Figura 4).

Figura 4. Estruturas químicas dos compostos inibidores de tirosina quinase imatinibe, sorafenibe, trematenibe e afatinibe.



.No cenário apresentado, algumas substâncias inibidoras de serina/treonina quinases também estão disponíveis como fármacos antitumorais. Entre estes se destacam os compostos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) duvelisibe inibidor de isoformas da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e da ciclina dependente de quinase 6 (CDK6) (Figura 5) (ROCCA *et al*., 2014).

Figura 5: Estruturas químicas dos compostos inibidores de serina/treonina quinases duvelisibe, palbociclibe e silmitasertibe.



Diversos compostos têm sido estudados com a finalidade de se obter inibidores de CK2 com ação antitumoral. Entre estes citam-se derivados antraquinonas, cumarinas, flavonas, benzoimidazois, pirazolo-triazinas, e de aril- ácidos carboxílicos (COZZA, 2017). Neste cenário, se destaca o silmitasertibe (figura 5) que, atualmente, há um estudo de Fase I em andamento e dois estudos de Fase II de silmitasertibe em andamento. Em dezembro de 2016, o silmitasertibe recebeu a designação de medicamento órfão pelo FDA para o tratamento de colangiocarcinoma. Em julho de 2020, o silmitasertibe recebeu a designação pelo FDA para Doença Pediátrica Rara (RPD) meduloblastoma (TAIPEI e SAN DIEGO, 2020).

Os inibidores da CK2 diminuem a viabilidade das células cancerosas e muitos inibidores de CK2 estão disponíveis atualmente e, a maioria deles pertence à classe I dos inibidores da quinase, ou seja, compostos capazes de atingir diretamente o sítio de ligação do ATP (BESTGEN *et al*., 2019). A região de ligação do ATP da CK2 isoforma α tem sido considerada como o local ortostérico para projetar inibidores competitivos de ATP, como a antraquinona

derivada do benzimidazol, derivados tricíclicos de quinolona e produtos naturais. Infelizmente, ainda que vários inibidores competitivos de ATP de CK2, com doses ativas variando de micromolar a nanomolar, tenham sido descobertos, a maioria deles foi impossibilitado na sua capacidade de se tornarem candidatos a fármacos promissores devido à sua especificidade mais reduzida (CHEN *et al*., 2020).

A interação em sítio alostérico altera a conformação espacial destas enzimas e, consequentemente, bloqueia o acesso aos sítios de ligação do ATP. Por causar este episódio molecular este processo se torna promissor para ser aplicado no planejamento de fármacos, principalmente para moléculas consideradas pequenas (SILVA *et al*., 2009). Portanto, para superar as deficiências gerais, a realização de estudos e aplicação de metodologias computacionais se apresentam como estratégias interessantes para identificar os locais de ação de inibidores não competitivos de ATP fora do sítio ativo (CHEN *et al*., 2020).

Com o crescente conhecimento da estrutura da CK2 sozinha ou em complexo com diferentes inibidores, em conjunto com o emprego de métodos rápidos e otimizados de planejamento, descoberta e desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador, permite a racionalização da modificação estrutural e se apresenta de particular relevância no projeto de inibidores novos de CK2 (COZZA, 2017).

Os derivados do 2-aminotiazol (Figura 6A) têm recebido uma atenção considerável devido à sua diversa aplicação como uma estrutura privilegiada na química medicinal e dentro da pesquisa na descoberta de fármacos. A porção 2-aminotiazol consiste em um núcleo tiazol e um grupo amino, onde o núcleo do tiazol é um heterociclo de cinco membros com enxofre e nitrogênio nas posições 1, 3, que existe em muitos compostos bioativos, como na vitamina tiamina B1, por exemplo. O grupo amino do 2-aminotiazol é um grupo funcional ativo que pode ser ligado a muitos fragmentos químicos por meio de diferentes reações sintéticas (WAN, *et al*., 2020). Em vista de sua estrutura versátil, o 2-aminotiazol foi amplamente modificado para construir diversos derivados com excelentes atividades biológicas. Segundo Wan *et al.* (2020), muitos agentes com a porção 2-aminotiazol foram aprovados para comercialização. Entre estes, a famotidina, um antagonista do receptor H2 da histamina, é usada para

curar úlcera péptica e refluxo gastroesofágico, inibindo a secreção de suco gástrico. Outro fármaco, o abafungin, um medicamento antifúngico, é aplicado na terapia de dermatomicoses. O cefdinir, um antibiótico de cefalosporina de terceira geração, pode ser usado para tratar pneumonia, bronquite crônica, sinusite, faringite, tonsilite. Outro composto denomidado riluzol é um medicamento aprovado para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica com a estrutura do 2- aminotiazol., que também mostrou efeitos anticancerígenos promissores contra o câncer de mama, melanoma, glioma e câncer de próstata.

Recentemente, Bestgen *et al.* (2019) descobriram derivados de aminotiazol como moduladores alostéricos de CK2, visando a interface entre a hélice αC e a alça rica em glicina (G-alça), que é denominada de local 3. Inibidores alostéricos da CK2 do chamado local 3 são menos utilizados entre as famílias de proteína quinase do que os do sítio de ligação de ATP, o que geralmente fornece alta seletividade para a quinase de interesse. Portanto, uma seletividade inicial pronunciada deve ser observada com um inibidor direcionado a um sítio alostérico, antes mesmo da otimização desse parâmetro.

Em estudo de relações estrutura-atividade foi determinado que o núcleo aminotiazol e uma função de ácido carboxílico eram essenciais para a atividade inibitória (CHEN *et al*., 2020) desta classe de compostos. Ao combinar os experimentos de análise de RMN (com descrição de diferença de transferência de saturação), análise mutacional de varredura de alanina, detecção baseada em espectrometria de massas e docking molecular, os autores deste estudo sugeriram que os derivados 2-aminotiazol tiveram predição de ligação com interface localizada entre o G-loop e α-hélice. Esta interação ocorreria através da formação de ponte salina (carboxilato com Lys74 e Lys77) ou interações cátion-π (anel de naftaleno com Lys71). Após a otimização sistemática na posição 4 e amina do núcleo de aminotiazol, alguns compostos foram identificados por possuírem uma potência submicromolar contra a CK2α (IC_{50} de 0,6 μM) com efeitos pró-apoptóticos e anti-crescimento celular (CHEN *et al*., 2020).

Também por Bestgen *et al.* (2019), descobriu-se derivados 2-aminotiazois como moduladores alostéricos da CK2, que possuem interação com a interface entre a α-hélice e a alça rica em glicina. No entanto, a maioria dos moduladores alostéricos foram descobertos por experimento de triagem de

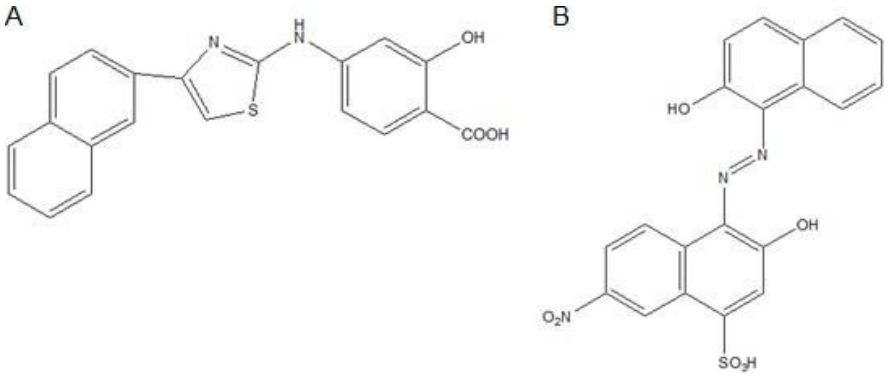
alto rendimento, devido à falta de compreensão abrangente sobre os locais e mecanismos alostéricos. Conforme ocorreu o desenvolvimento de métodos computacionais de predição alostérica, incluindo triagem virtual baseada em estrutura e avaliação das interações entre a proteína e a molécula, uma abordagem computacional e experimental posterior a ser integrada, fornece uma ferramenta importante no auxílio para a descoberta de novos inibidores alostéricos (LI *et al*., 2020).

Em contrapartida, o estudo de Lindenblatt *et. al*. (2020), relatou que os inibidores derivados do 2-aminotiazol ocupam a cavidade do ATP, onde a isoforma da proteína cristalizada da CK2 utilizada por Bestgen *et al*. (2019) possuía um ponto mutante, deixando-a diferente da CK2 humana que, dos seus 351 aminoácidos, a forma mutante possuía somente os 332 aminoácidos iniciais. Além do estudo computacional, foi realizado um estudo de cinética enzimática, que foi essencial para a validação dos resultados encontrados. Estes dois estudos apresentaram resultados diferentes e demonstram a necessidade da realização de pesquisas sobre a interação dos 2-aminotiazóis junto a CK2.

Em 2011, Mocaudel e colaboradores relataram a descoberta de derivados de azonaftaleno (Figura 6B) como uma nova família de inibidores de CK2 altamente específicos. Primeiramente, demonstraram que a inibição de CK2 (IC_{50} de 0,4 µM) era altamente específica, reversível e não competitivo com ATP. Experimentos de espalhamento de raios-X de pequeno ângulo mostraram que esta inibição foi devido à grande mudança conformacional de CK2, isoforma α, após a ligação de esses inibidores com a proteína. Os autores demonstraram que vários compostos análogos eram potentes para as células, onde estes inibidores de CK2 promoveram a parada do ciclo celular de células U373 de glioblastoma humano. Nos ensaios in vitro e in vivo os compostos azonaftaleno mostraram redução de massa tumoral em 83%, enfatizando sua eficácia contra esses resistentes à apoptose tumores. Do mesmo modo, os derivados do azonaftaleno inativos na inbição da CK2 não mostraram efeito na formação de colônias e ensaios de regressão tumoral, o que indica a importância da inibição desta proteína. Estes trabalhos ilustram a emergência do estudo de inibidores não clássicos de CK2, uma vez que fornecem oportunidades interessantes para o desenvolvimento de novos inibidores

alostéricos de CK2.

Figura 6: Estruturas químicas dos compostos derivado do 2-aminotiazol (A) e derivado do azonaftaleno (B).



4.5. Modelagem molecular

A modelagem molecular de estruturas químicas de compostos orgânicos e proteínas é considerada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como um modelo de investigação de estruturas e de propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica (CARVALHO *et al.*, 2001).

A modelagem molecular, através do emprego de programas computacionais e banco de dados, é uma importante ferramenta para a descoberta, planejamento e desenvolvimento de compostos bioativos e fármacos. As informações e os resultados fornecidos por estas ferramentas permitem uma avaliação das propriedades físico-químicas de compostos e sua influência sobre a atividade biológica de uma ou série de moléculas de interesse. Esta metodologia permite a detecção e a determinação quantitativa de informações que podem influenciar na interação entre um composto e seu receptor, ou interferir no desenvolvimento de ação biológica (GUIDO *et al*. 2010; CARVALHO *et al*., 2001).

A pesquisa de novos compostos bioativos baseia-se em duas estratégias principais: Indireta e direta. A indireta é usada para se estudar a estrutura dos compostos, principalmente, e se a molécula alvo não é conhecida. Assim, informações sobre determinadas atividades biológicas,

características estruturais e propriedades físico-químicas podem ser utilizadas para se obter informações que permitam aperfeiçoar sua obtenção ou mesmo a sua atividade biológica. Entre as principais características de uma molécula que podem influenciar a atividade biológica se destacam os descritores de propriedades estereoeletrônicas, como: volume molecular, potencial eletrostático molecular, densidade eletrônica, energia e coeficiente dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, energia de ionização, ordem de ligação e momento de dipolo, grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, e de hidrofobicidade, como presença de grupos hidrofóbicos e o coeficiente de partição (BARREIRO, 1997).

A estratégia direta considera um alvo biológico conhecido e suas características tridimensionais, que podem ser enzima ou receptor, relacionado com a disfunção que se quer estudar, e a análise do complexo formado entre ligante e este alvo, identificando-se possíveis sítios preferenciais de ligação e principais modos de interação. Estes dados permitem propor modificações especificas na estrutura do ligante, com o objetivo de aumentar a afinidade e especificidade ao alvo (VAN GUNSTEREN, 1994; AJAY & MURCKO, 1995).

No estudo de farmacófaro pode ser empregado tanto a estratégia direta quanto a indireta, utilizando ou não o modelo 3D do alvo molecular. De acordo com a definição oficial da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), farmacóforo é definido como o conjunto de características eletrônicas e estéricas necessárias para garantir uma interação supramolecular ótima em um alvo biológico específico e, deste modo, desencadear ou impedir uma resposta biológica. Quando usado na estratégia direta, uma das formas mais comuns de construção de um farmacofóro é por meio da sobreposição da estrutura de compostos com o mesmo mecanismo de ação e alvo (WERMUTH, 2003).

Assim como o estudo de farmacófaro, a triagem virtual também pode ser baseada tanto na estratégia direta quanto na indireta, que seriam a triagem baseada na estrutura do alvo molecular e a triagem baseada em ligantes, respectivamente. O estudo baseado na estrutura do alvo molecular considera a estrutura tridimensional (3D) deste alvo, utilizando como estratégia principal os cálculos de docagem para seleção de compostos ligantes potenciais, com

características químicas, eletrônicas e estruturais que favorecem interações com algum sítio ligante do alvo molecular. O planejamento de compostos com potencial atividade com base na estrutura do alvo molecular é uma das estratégias mais robustas para a descoberta de novos candidatos a fármacos, capaz de contribuir em todo o processo, desde a análise da estrutura 3D do alvo terapêutico até a otimização das interações moleculares e propriedades farmacocinéticas destes compostos (TAFT *et al*., 2008) Já o estudo baseado no ligante utiliza compostos orgânicos com atividade biológica conhecida, atuando como moldes para a triagem em bases de dados de novos compostos com algum nível de similaridade, compartilhando com estes moldes a mesma atividade biológica. Assim, compostos são selecionados de acordo com os mais variados métodos de similaridade molecular e farmacofórica, direcionados por relações entre propriedades estruturais e atividade biológica (ECKERT e BAJORATH, 2006; SHOICHET, 2004)

O estudo de ancoramento ou *docking* molecular é aquele que melhor exemplifica a estratégia direta. Essa técnica fornece estimativas da energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados. A partir do docking molecular são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável de estar presente na interação ligante-alvo. E a partir de cada conformação espacial são obtidas energias livre de ligação, onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN *et al.*, 2004).

O estudo de busca de cavidades analisa cavidades de ligação nas superfícies das proteínas que são importantes para a função destas, já que geralmente são os locais em que uma proteína se liga a outras macromoléculas biológicas, como ácidos nucléicos, ou pequenas moléculas, como fármacos. A detecção computacional de cavidades proteicas tem sido considerada uma etapa importante para achados funcionais de proteínas e o design de drogas com base na estrutura (ZHENG *et al*., 2013). Também é crucial caracterizar as cavidades de ligação detectadas para compreender os princípios da ligação molecular (NISIUS e GOHLKE, 2012).

Outra ferramenta importante utilizada neste trabalho é o estudo de

predição, onde diversos softwares ou servidores online são capazes de predizer, com grau elevado de confiabilidade, diversas propriedades e características de compostos, sem a necessidade de se realizar experimentos "*in vitro"* ou *'in vivo"*, especialmente como estratégia de filtragem de compostos potencialmente problemáticos. (CARLSON *et al*., 1999). Os programas comparam estruturalmente cada região da molécula com informações contidas em seus bancos de dados. Dessa forma, é possível prever, por exemplo, que determinado grupo químico pode ser hepatotóxico, ou que outro tem maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (MARCHANT *et al*., 2008).

5. MATERIAS E MÉTODOS

5.1. Escolha da proteína e busca de cavidades

Os modelos da estrutura molecular da CK2 em 3D (3PE1, 5KU8, 4UB7 e 6TEI) foram retirados do site Protein Data Bank (PDB) disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> no formado .pdb. para a realização dos estudos de busca de cavidades, obtenção de Farmacófaro e ancoramento molecular.

A plataforma online CavityPlus web server foi utilizada para identificar as cavidades existentes nos modelos de proteínas estudados, possibilitando a obtenção das características *druggable* e seus respectivos sítios de ligação. Na primeira etapa, os modelos de proteína 3D foram baixados usando o site Protein Data Bank (PDB). Os resíduos de aminoácidos que constituem a estrutura molecular das cavidades foram identificados nesta etapa. Os parâmetros utilizados foram: Separated min depth: 8 Å, Max abstract limit: 1.500 A3, Separate max limit: 6.000 A3, Min abstract depth: 2 Å, Limit the minimum value: 100 A3, Limit the minimum score: 1.5. O software utiliza dados de afinidade de ligação experimental máxima com conjunto de dados PDBBind para prever a pontuação da cavidade (Pred Max pKd), o pKdAve que é a afinidade de ligação média do bolso associado e um drugcore. As saídas CAVITY podem empregadas em outros aplicativos do Cavity como o CavPharmer, CorrSite e CovCys. Recursos de farmacóforo podem ser calculados com o uso do CavPharmer, como centro hidrofóbico, doador e aceitador de ligações de hidrogênio, pontos centrais positivos e negativos e excluem volume (XU *et al*. 2018). O CorrSite permite a identificação da localização de sites permitidos e o CovCys é usado para analisar cisteínas modificadas covalentemente. Ambas as ferramentas foram utilizadas em resultados para bolsões de proteínas de maior *druggability* 3D para fins de verificação se os sítios ativos têm potencial de serem alvo de compostos bioativos.

5.2. Desenho, otimização e escolha dos compostos

Os compostos utilizados neste estudo foram achados a partir da literatura, tendo relato de sua ação inibidora na proteína quinase CK2. O programa computacional *Spartan for Windows, versão 08*, Wavefunction, Inc. USA, foi empregado para o desenho, a otimização de geometria molecular da estrutura. Estas propriedades serão determinadas com o emprego dos métodos semi-empírico AM1 e empírico teoria do funcional de densidade (DFT) e parâmetro Becke 3 Lee-Yang-Parr (B3LYP) com o emprego de base de dados teóricos 6-31G*. A estrutura química otimizada foi salva em formatos pdb e mol2 para uso posterior em outros softwares.

A escolha dos compostos a serem estudados nas próximas etapas baseou-se na predição de atividade biológica dos compostos, que foi realizada pelo cálculo de similaridade química 2D, através da plataforma online Self Ensemble Approach (SEA), fornecido pelo Laboratório Shoichet do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade da Califórnia, San Francisco (UCSF). Os compostos que não apresentaram efeito tóxico e valor positivo de druglikeness nesta etapa foram submetidos à pesquisa de predição de atividade biológica utilizando a abordagem de conjunto de similaridade (SEA, http://sea.bkslab.org/). O servidor web SEA compara alvos de proteína considerando similaridades estatísticas de Tanimoto 2D calculadas entre seus ligantes. Os códigos Smiles das moléculas com atividade teórica sobre a CK2 positiva foram utilizadas para esta avaliação.

5.3. Estudo de Farmacófaro

a) <u>Farmacóforo com o uso de LBDD</u>

O conjunto de compostos inibidores da CK2 foi submetido à análise de farmacóforo com o emprego de software Pharmagist, disponível para uso na internet (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/pharma/index.html>) (SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al*., 2008). As estruturas em 3D, em extensão de formato digital Sybyl mol.2, foram alinhadas com o emprego do sofware Spartan for Windows, e foram agrupadas em arquivo único (caracterizada como uma lista de moléculas) e inseridas no Pharmagist. Para o cálculo do farmacóforo foi

escolhida a molécula mais ativa da série como estrutura líder, “*pivot*”, utilizada como referência para alinhamentos de medidas farmacofóricas. Foram inseridos os filtros de efeito doador ou aceptor de hidrogênio, aníon ou cátion e anel aromático utilizado, onde os valores selecionados foram de 5 a 20 para o número de farmacóforos de saída; 3 a 10 para o número mínimo de características farmacoforicas; 0 a 3,0 para anel aromático, 1,0 para carga (ânion/cátion), 0 a 1,5 para ligações de hidrogênio (aceptor/doador) e 0 a 0,3 para hidrofobicidade em relação aos coeficientes característicos; e 0 a 100,0 para peso característico. Os melhores resultados foram salvos no formato Sybyl mol.2 para análise e também para ser empregados nos estudos de triagem virtual.

b) Farmacóforo com o uso de SBDD

A estrutura cristalina da proteína quinase CK2 complexada com inibidores (PDB ID: 4UB7) foi usada para gerar um farmacóforo do inibidor de peptídeo usando Pharmit (SUNSERI e KOES, 2016). Pharmit é um servidor online para gerar um farmacóforo editável com base no complexo proteína-ligante usando interações do tipo aceptor e doador de ligação de hidrogênio, iônica, hidrofóbica, e aromáticidade. As medidas farmacofóricas e suas descrições de diâmetro em Ângstrons e as coordenadas espaciais podem ser sugeridos pelo programa de acordo com o seu banco de dados ou inseridas pelo pesquisador. Estes dados são utilizados pelo programa computacional para a triagem virtual em vários bancos de dados.

5.4. Triagem virtual

A triagem virtual com o farmacóforo obtido via LBDD ocorreu com o emprego de website ZincPharmer e a base de dados associada a este site (http://zincpharmer.csb.pitt.edu/). Os dados dos farmacóforos obtidos pelo Pharmagist serão inseridos em software em website do Zinc e para fins da realização deste estudo. Ao abrir o programa foram escolhidos os filtros “Max Hits per Conf”, “Max Hits per Mol”, “Max Total de Hits”, “Max RMSD”, “Molecular

Weight", e "Rotatable Bonds" com intervalos de 0 a 200 para "Max Hits per Conf" e "Max Hits per Mol"; 0 a 100 para "Max Total de Hits; 0 a 1.0 para "Max RMSD", 0 a 500 para "Molecular Weight" e 3 a 10 "Rotatable Bonds", para a realização da triagem virtual. Os resultados foram expressos em uma tabela de acordo a similaridade com outras moléculas do banco de dados (em torno de
22.000.000 moléculas), e são expressas a partir de menores valores de 0.09 de desvio (RMSD).

A triagem virtual com o farmacóforo obtido via SBDD ocorreu com o emprego do software Pharmit, onde foram aplicadas medidas de farmacóforo sugerido pelo programa e seu emprego para triagem em bancos de dados de pequenas moléculas digitais. Os bancos utilizados foram o ChemBL 25 (23.136.925 confôrmeros de 1.752.844 moléculas), ZINC 123.399.574 confôrmeros de 13.190.317 moléculas), PubChem (450.708.705 confôrmeros de 93.067.404 moléculas), Dud-E SRC Benchmark (509.608 confôrmeros de 34.966 moléculas) e medicamentos aprovados pela FDA (17.471 confôrmeros de 1.677 moléculas). Os filtros usados foram redução de acerto, com acertos máximos por conformador e por molécula e acertos totais máximos de 50, e triagem de acertos com conjunto de peso molecular de 5 - 500 Daltons, ligações rotacionais de 0 - 4, logarítmico do coeficiente de partição (logP) de -1,0 a 4,0, área de superfície polar (PSA) de 30-140, aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) de 1 - 5 e doador de ligação de hidrogênio (HBD) 1 - 10, respectivamente. Este software permitiu a minimização dos resultados gerados pelo emprego de docking junto a estrutura da proteína e do farmacóforo estudado a partir do uso de Autodock Vina Scoring Function (metodologia de descida do gradiente na superfície de energia). Estes resultados envolvem a consulta inicial de pose alinhada e aplicação de funcionalidade smina (KOES *et al*., 2018).

5.5. Predição de toxicidade e predição de atividade Biológica

Os compostos gerados por estudos de triagem virtual foram submetidos à previsão de toxicidade computacional por meio do software Osiris Property Explorer (Actelion Pharmaceuticals Ltd, Allschwil, Suíça, CH), que calcula o estudo teórico de toxicidade (por meio de efeitos mutagênicos, tumorigênicos e

irritantes, além de impactos sobre o sistema reprodutivo) e também a propriedade "*druglikeness*" de compostos bioativos.

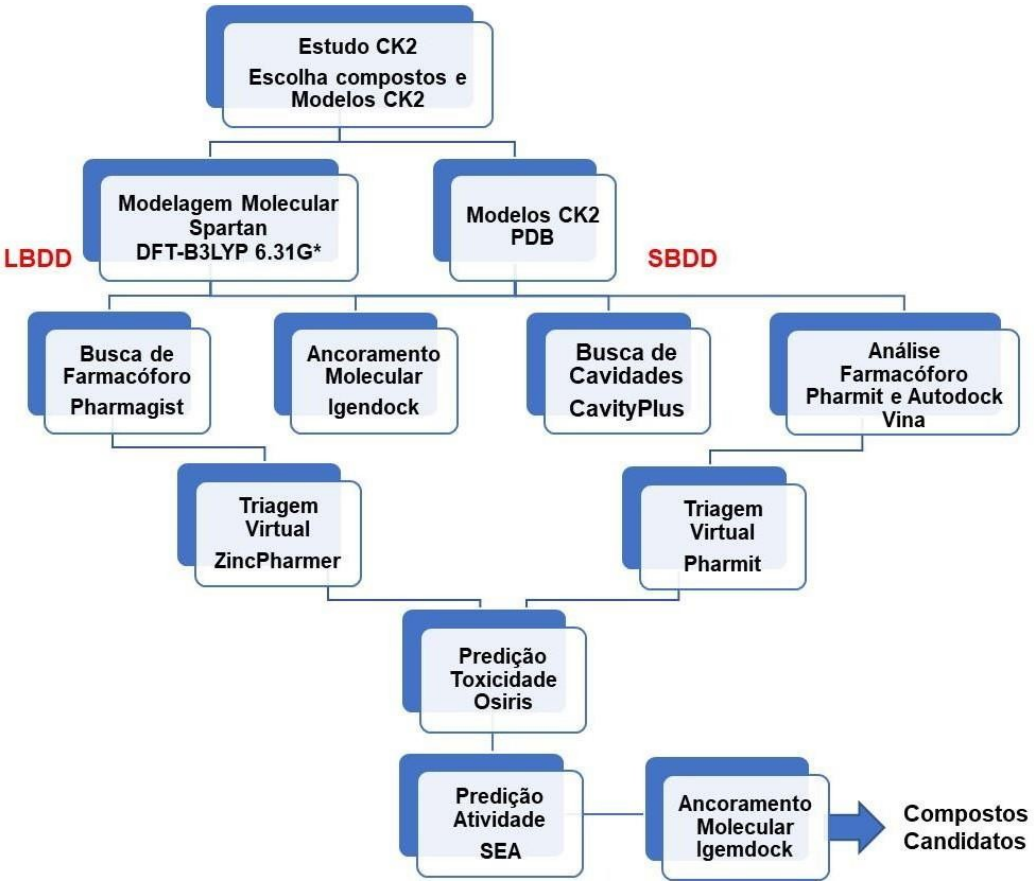
A predição de atividade biológica dos compostos foi realizada pelo cálculo de similaridade química 2D, através da plataforma online *Self Ensemble Approach* (SEA), fornecido pelo Laboratório Shoichet do Departamento de Química Farmacêutica da Universidade da Califórnia, San Francisco (UCSF). Os compostos que não apresentaram efeito tóxico e valor positivo de druglikeness nesta etapa foram submetidos à pesquisa de predição de atividade biológica utilizando a abordagem de conjunto de similaridade (SEA, http://sea.bkslab.org/). O servidor web SEA compara alvos de proteína considerando similaridades estatísticas de Tanimoto 2D calculadas entre seus ligantes. Os códigos Smiles das moléculas com atividade teórica sobre a CK2 positiva foram utilizadas para esta avaliação.

5.6. Análise de ancoramento molecular (Docking)

O estudo de ancoramento molecular foi realizado pelo software iGemdock 2.1 (BioXGEM, TW), onde é feita uma análise de interação entre os compostos estudados e os obtidos pela triagem molecular e estruturas cristalizada da proteína CK2, PDB ID: 3PE1; 5KU8; 4UB7, retirada do banco de dados online Protein Data Bank (PDB). As estruturas 3D foram submetidas à remoção de água e adição de hidrogênios polares por meio do software Autodock Tools 1.5.6 (MORRIS *et al*., 2009). Os cálculos de docking foram realizados utilizando parâmetros de algoritmo genético (GA) escolhidos para tamanho da população, geração e número de soluções como 200, 70 e 3, respectivamente, uso de cálculo de docking padrão, função de pontuação de Gemdock hidrofóbica e eletrostática (de preferência 1: 1), e aplicação das funções estrutura total da proteína (estrutura completa do receptor) e sítio de ligação do ligante.

O fluxograma de ferramentas computacionais utilizadas neste trabalho é demonstrado pela Figura 7.

Figura 7: Fluxograma de procedimentos utilizados na busca de inibidores potenciais da CK2.



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados a partir dos estudos de modelos computacionais da proteína CK2 e de conjuntos de moléculas inibidoras desta proteína. Neste contexto os resultados e as discussões estão descritos a seguir.

6.1. Escolha da proteína e busca de cavidades

Existe uma longa e crescente lista de estruturas cristalinas de proteínas disponíveis para download na plataforma online Protein Data Bank, https://www.rcsb.org. Estas proteínas-alvo são utilizadas em estudos computacionais na busca de novos candidatos à fármacos, especialmente, no caso desse trabalho, antitumorais potenciais com ação inibitória da CK2. Até este momento, estão disponíveis 347 estruturas cristalizadas da proteína quinase CK2 neste banco de dados, com variação da data de depósito, métodos de obtenção de dados, resolução, valores de validade, presença de unidades alfa, isolada ou junto com a alfa', ou ainda contendo as subunidades β, ou em forma de holoenzima em sua estrutura.

Vários sítios de interação têm sido propostos para atuação de compostos bioativos na proteína CK2 (LINDENBLATT *et al*., 2020; BEGSTEN *et al*., 2019; PRUDENT e COUCHET, 2009). No entanto, tem-se observado na literatura uma grande dificuldade em distinguir o local exato do sítio alostérico da proteína CK2. Begsten *et al*. (2019) demonstrou em seu estudo que os compostos derivados de 2-aminotiazol não deslocavam o composto CX-4945 em estudos de STD/NMR (Diferença de transferência de saturação/Ressonância magnética nuclear), em vez disso, ele se ligou além do CX-4945, fora do local do ATP e, de acordo com fatores atômicos de STD, com seu anel fenila enterrado em uma cavidade adjascente. Porém, neste estudo, os experimentos de co-cristalização da proteína falharam, faltando assim as estruturas cristalinas complexas da CK2 com o derivado do 2-aminotiazol no sítio considerado alostérico.

Lindenblatt *et al*. (2020) visaram complementar os estudos de Begsten *et al.*, usando um novo procedimento para determinar estruturas cristalinas de

resolução atômica de complexos inibidor de CK2 via saturação de cristal, em vez de co-cristalização. Mas em seu estudo inesperadamente os compostos derivados de 2-aminotiazol ocuparam a região molecular do sítio ativo ATP e não no sítio alostérico com quatro estruturas cristalinas da proteína CK2, o que foi demonstrado a partir da análise da proteína e dos modelos computacionais códigos PDB: 6TEU, 6TEW, 6TE2 e 6TEI. Estas informações são contraditórias e demonstram a necessidade de estudos mais aprofundados com proteínas da CK2, dos sítios de interação e de ligantes candidatos a inibidores desta proteína.

A escolha das estruturas cristalinas da proteína CK2 utilizadas neste trabalho foi fundamentada em revisão de literatura, onde os principais dados foram avaliados de acordo com a sequência de aminoácidos de referência e dados experimentais e de validação da estrutura da proteína, disponíveis no banco de dados Protein Data Bank (PDB).

Deste modo, foram obtidos os modelos de estruturas moleculares da proteína alvo, com os códigos PDB: 3PE1, 4UB7, 5KU8 e 6TEI. Sendo o primeiro referente à estrutura cristalina da subunidade alfa da CK2 em complexo com o inibidor CX-4945, o segundo fornecendo uma estrutura cristalina da CK2 complexada com 2- (aminometil)ciclopropil-5-[[3-ciano-7-(ciclopropilamino)pirazol[1,5-pirimidin-5-il]amino] fenil-etanamida, e o terceiro modelo à estrutura cristalina da subunidade alfa da CK2 em complexo com 4'-carboxi-6,8-bromo-flavonol (FLC26). O quarto modelo foi uma estrutura cristalina da subunidade alfa da CK2 complexada com um derivado de 2-aminotizol.

O site Cavity Plus web server disponível online no sítio eletrônico http://www.pkumdl.cn/cavityplus/ possibilita a determinação e a visualização de todas as cavidades existentes na proteína, bem como permite reconhecer os escores (ranqueamento) de cada cavidade, acesso aos aminoácidos pertencentes a estas. O software Cavity Plus implementa um método baseado em geometria para detecção e análise de sítios de ligantes e permite a determinação quantitativa de um ranqueamento de valores de cavidade para provável interação com compostos e a *druggability* (ligandabilidade) de um sítio de ligação molecular. O valor de ligandabilidade representa a possibilidade de ligantes interagirem com uma cavidade. Neste contexto, a pontuação é influenciada pelo volume da cavidade, tamanho do lábio

da bolsa, volume hidrofóbico, área de superfície da cavidade e área de superfície de formação de ligação de hidrogênio

A partir destes estudos, esses dados fornecem auxílio para a escolha, ou descarte de cavidades que não possuem capacidade de serem submetidas a interações com fármacos, ou seja, que não contém características “similares a fármacos” (*druggable*).

Os resultados da busca de cavidades realizado neste trabalho para os modelos 3D de proteínas escolhidas são demonstrados na Tabela 1. Os resíduos de aminoácidos encontrados foram analisados junto as demais etapas deste trabalho, onde é possível a ocorrência da confirmação da interação dos compostos com a proteína alvo através da observação da similaridade dos resíduos, revelando que as cavidades de maior escore, consideradas “*druggable*” serão o local de encaixe.

Tabela 1. Resultados da busca de cavidade de modelos 3D da proteína CK2.

Modelo de Proteina	**Modelo de cavidade**	**Pred.Max pkd**	**Pred.Avg pkd**	**Escore**	**Druggability**
3PE1	1	11,89	6,69	820,00	Strong
5KU8	1	10,57	6.94	3983,00	Strong
	3	11,40	6,99	1137,00	Strong
	4	11,54	6,93	1331,00	Strong
4UB7	4	11,54	6.93	1331,00	Strong
6TEI	1	11,29	6,49	957,00	Strong
	1	11.23	6.99	2088.00	Strong
	2	11.64	6,88	1871,00	Strong

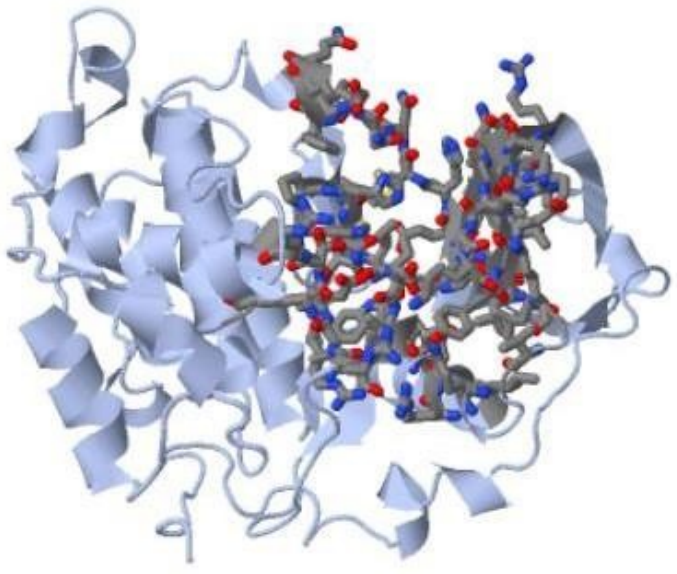
a) Modelo 3PE1

Os resultados encontrados para a proteína CK2 PDB ID: 3PE1 foram de 15 cavidades, sendo apenas uma considerada como *druggable* forte, demonstrada na Figura 8.

A cavidade considerada *druggable* encontrada no modelo 3PE1

apresentou os seguintes resíduos de aminoácidos ARG:43:A, LYS:44:A, LEU:45:A, GLY:46:A, ARG:47:A, GLY:48:A, LYS:49:A, TYR:50:A, SER:51:A, GLU:52:A, VAL:53:A, PHE:54:A, GLU:55:A, LYS:64:A, VAL:65:A, VAL:66:A, VAL:67:A, LYS:68:A, LEU:70:A, LYS:71:A, VAL:73:A, LYS:77:A, ILE:78:A, ARG:80:A, GLU:81:A, LEU:85:A, ILE:95:A, THR:96:A, LEU:111:A, PHE:113:A, GLU:114:A, HIS:115:A, VAL:116:A, ASN:117:A, ASN:118:A, THR:119:A, ASP:120:A, PHE:121:A, LYS:122:A, GLN:123:A, ARG:155:A, ASP:156:A, LYS:158:A, PRO:159:A, HIS:160:A, ASN:161:A, MET:163:A, ARG:172:A, LEU:173:A, ILE:174:A, ASP:175:A, TRP:176:A, GLY:177:A, LEU:178:A, ALA:179:A, ARG:191:A, VAL:192:A, ALA:193:A, SER:194:A, ARG:195:A, LYS:198:A. Destes, 8 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os descritos na literatura por Lindenblatt *et al*. (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto CX-4945 competitivo por ATP. Em contrapartida, 9 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al.* (2019), sugerindo que ambos os sítios ativo e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Além disto, esta cavidade apresentou 6 locais com Z-score maior que 0,5, significando 6 locais com possível alosterismo.

Figura 8: Representação da proteína PDB: 3PE1 em azul claro e a cavidade molecular *druggable* forte em modelo tubo (imagem do CavityPlus).



b) Modelo 5KU8

Os resultados obtidos para o modelo 5KU8 foram de 20 cavidades, sendo apenas três consideradas como forte *druggable*, que são demonstradas na Figura 9.

Para o modelo 5KU8, a primeira cavidade considerada *druggable* encontrada apresentou os seguintes resíduos de aminoácidos LYS:44:A, LEU:45:A, GLY:46:A, ARG:47:A, GLY:48:A, LYS:49:A, TYR:50:A, SER:51:A, GLU:52:A, VAL:53:A, PHE:54:A, VAL:66:A, VAL:67:A, LYS:68:A, ILE:69:A, LEU:70:A, LYS:71:A, PRO:72:A, VAL:73:A, LYS:74:A, LYS:77:A, ILE:78:A, ARG:80:A, GLU:81:A, LEU:85:A, ILE:95:A, THR:96:A, LEU:111:A, PHE:113:A, GLU:114:A, HIS:115:A, VAL:116:A, ASN:117:A, ASN:118:A, THR:119:A, ASP:120:A, PHE:121:A, LYS:122:A, GLN:123:A, LEU:124:A, TYR:125:A, GLN:126:A, THR:127:A, LEU:128:A, ILE:133:A, HIS:154:A, ARG:155:A, ASP:156:A, LYS:158:A, PRO:159:A, HIS:160:A, ASN:161:A, VAL:162:A, MET:163:A, ARG:172:A, LEU:173:A, ILE:174:A, ASP:175:A, TRP:176:A, GLY:177:A, LEU:178:A, ALA:179:A, ASN:189:A, VAL:190:A, ARG:191:A, VAL:192:A, ALA:193:A, SER:194:A, ARG:195:A, TYR:196:A, PHE:197:A, LYS:198:A, LEU:202:A, LEU:203:A, ASP:205:A, CYS:220:A, MET:221:A, ALA:223:A, SER:224:A, MET:225:A, ILE:226:A, PHE:227:A, ARG:228:A, LYS:229:A, GLU:230:A, PRO:231:A, PHE:232:A, HIS:234:A, HIS:236:A, ASP:237:A, ASN:238:A, TYR:239:A, PHE:284:A, HIS:286:A, SER:287:A, GLU:288:A, ASN:289:A, HIS:291:A, LEU:292:A, PRO:20:B, ARG:21:B, GLU:22:B, TYR:23:B, TRP:24:B, ASP:25:B, TYR:26:B, GLU:27:B, SER:28:B, HIS:29:B, VAL:30:B, VAL:31:B, GLU:32:B, TRP:33:B, GLY:34:B, ASN:35:B, GLN:36:B, ASP:37:B, ASP:38:B, TYR:39:B, ASN:58:B, ILE:59:B, THR:60:B, LEU:70:B, LYS:71:B, PRO:72:B, VAL:73:B, LYS:74:B, LYS:75:B, LYS:76:B, LYS:77:B, ILE:78:B, LYS:79:B, ILE:82:B, LYS:83:B, LEU:85:B, GLU:86:B, ASN:87:B, ILE:100:B, VAL:101:B, LYS:102:B, ASP:103:B, PRO:104:B, VAL:105:B, SER:106:B, ARG:107:B, THR:108:B, PRO:109:B (sendo A para subunidade alfa e B para beta). Destes, 8 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os achados na literatura por Lindenblatt *et al.* (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína

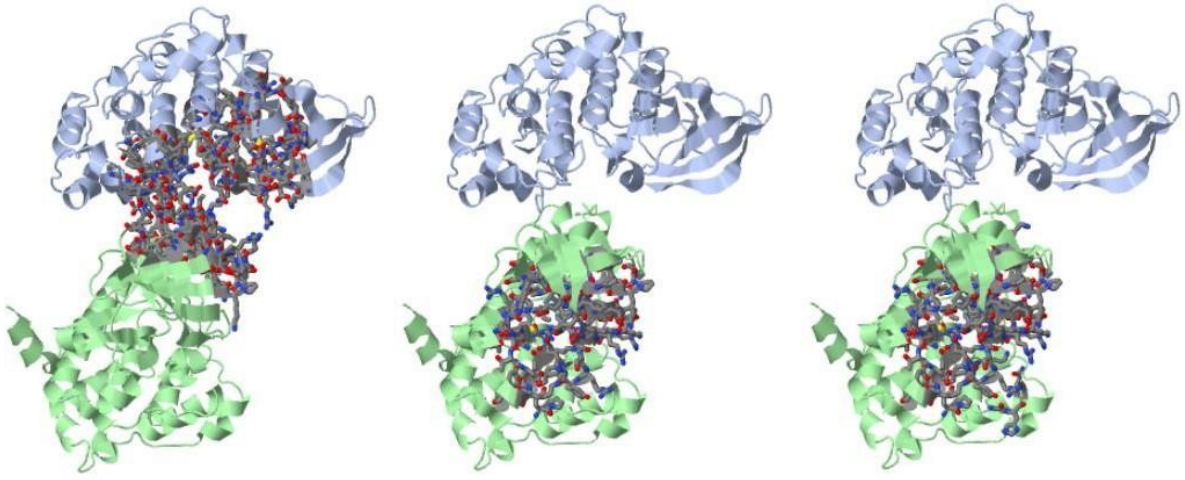
CK2 complexada com o composto CX-4945 competitivo por ATP. Em contrapartida, 11 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al*. (2019), sugerindo que ambos os sítios ativos e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Esta cavidade apresentou 4 locais que possuem Z-score maior que 0,5 indicando, assim, possível local de alosterismo.

A segunda cavidade considerada drogável forte encontrada no modelo 5KU8 apresentou os seguintes resíduos de aminoácidos ARG:43:B, LYS:44:B, LEU:45:B, GLY:46:B, ARG:47:B, GLY:48:B, LYS:49:B, TYR:50:B, SER:51:B, GLU:52:B, VAL:53:B, PHE:54:B, GLU:55:B, LYS:64:B, VAL:65:B, VAL:66:B, VAL:67:B, LYS:68:B, ILE:69:B, LEU:70:B, LYS:71:B, PRO:72:B, VAL:73:B, LYS:74:B, LYS:77:B, ILE:78:B, ARG:80:B, GLU:81:B, LEU:85:B, ILE:95:B, THR:96:B, LEU:111:B, PHE:113:B, GLU:114:B, HIS:115:B, VAL:116:B, ASN:117:B, ASN:118:B, THR:119:B, ASP:120:B, PHE:121:B, LYS:122:B, TYR:125:B, ARG:155:B, ASP:156:B, LYS:158:B, PRO:159:B, HIS:160:B, ASN:161:B, VAL:162:B, MET:163:B, ILE:164:B, ARG:172:B, LEU:173:B, ILE:174:B, ASP:175:B, TRP:176:B, GLY:177:B, LEU:178:B, ALA:179:B, ASN:189:B, ARG:191:B, VAL:192:B, ALA:193:B, SER:194:B, ARG:195:B, TYR:196:B, PHE:197:B, GLU:230:B, PRO:231:B. Da mesma forma como demonstrado para a cavidade anterior, 8 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os achados na literatura por Lindenblatt *et al.* (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto CX-4945 competitivo por ATP. Em contrapartida, 11 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al.* (2019), sugerindo que ambos os sítios ativos e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Esta cavidade apresentou 4 locais que possuem Z-score maior que 0,5 indicando, assim, possível local de alosterismo.

A terceira cavidade considerada *druggable* forte encontrada no modelo 5KU8 apresentou os seguintes resíduos de aminoácidos ARG:43:B, LYS:44:B, LEU:45:B, GLY:46:B, ARG:47:B, GLY:48:B, LYS:49:B, TYR:50:B, SER:51:B, GLU:52:B, VAL:53:B, PHE:54:B, GLU:55:B, VAL:65:B, VAL:66:B, VAL:67:B, LYS:68:B, ILE:69:B, LEU:70:B, LYS:71:B, PRO:72:B, VAL:73:B, LYS:74:B, LYS:76:B, LYS:77:B, ILE:78:B, LYS:79:B, ARG:80:B, GLU:81:B, LEU:85:B,

ILE:95:B, THR:96:B, LEU:111:B, PHE:113:B, GLU:114:B, HIS:115:B, VAL:116:B, ASN:117:B, ASN:118:B, THR:119:B, ASP:120:B, PHE:121:B, LYS:122:B, TYR:125:B, ARG:155:B, ASP:156:B, LYS:158:B, PRO:159:B, HIS:160:B, ASN:161:B, VAL:162:B, MET:163:B, ILE:164:B, ARG:172:B, LEU:173:B, ILE:174:B, ASP:175:B, TRP:176:B, GLY:177:B, LEU:178:B, ALA:179:B, GLU:180:B, TYR:188:B, ASN:189:B, VAL:190:B, ARG:191:B, VAL:192:B, ALA:193:B, SER:194:B, ARG:195:B, TYR:196:B, PHE:197:B, LYS:198:B, TYR:209:B, GLU:230:B, PRO:231:B, GLY:235:B, HIS:236:B, ASN:238:B. Destes, também foram encontrados 8 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os achados na literatura por Lindenblatt *et al*. (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto CX-4945 competitivo por ATP. Em contrapartida, 11 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al.* (2019), sugerindo que ambos os sítios ativos e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Esta cavidade apresentou 3 locais que possuem Z-score maior que 0,5 indicando, assim, possível local de alosterismo.

Figura 9: Representação da proteína PDB: 5KU8 em azul claro e verde, e as três cavidades moleculares *druggable* forte em tubos, a primeira cavidade à esquerda e a segunda ao centro e a terceira à esquerda, numeradas pelo score (imagens do CavityPlus).

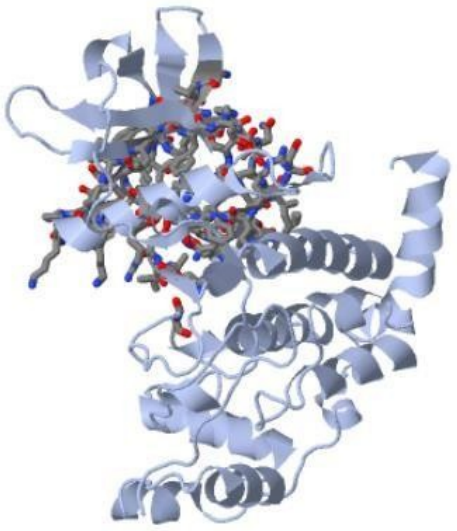


Embora 3 cavidades tenham sido identificadas como forte druggable a primeira foi apresentou maior valor de ranqueamento (escores) e se apresenta como a mais promissora para o estudo de interação com moléculas bioativas.

c) Modelo 4UB7

O modelo PDB ID: 4UB7 apresentou 20 cavidades, sendo considerada apenas uma como *druggable* forte (figura 10). Esta cavidade encontrada no modelo 3PE1 apresentou a cavidade constituída com os seguintes resíduos de aminoácidos ARG:43:A, LYS:44:A, LEU:45:A, GLY:46:A, ARG:47:A, GLY:48:A, LYS:49:A, TYR:50:A, SER:51:A, GLU:52:A, VAL:53:A, PHE:54:A, GLU:55:A, LYS:64:A, VAL:65:A, VAL:66:A, VAL:67:A, LYS:68:A, ILE:69:A, LEU:70:A, LYS:71:A, PRO:72:A, VAL:73:A, LYS:74:A, LYS:77:A, ILE:78:A, ARG:80:A, GLU:81:A, LEU:85:A, ILE:95:A, THR:96:A, LEU:111:A, PHE:113:A, GLU:114:A, HIS:115:A, VAL:116:A, ASN:117:A, ASN:118:A, THR:119:A, ASP:120:A, LYS:122:A, GLN:123:A, LEU:124:A, ASP:156:A, LYS:158:A, HIS:160:A, ASN:161:A, MET:163:A, ILE:164:A, ASP:165:A, ARG:172:A, LEU:173:A, ILE:174:A, ASP:175:A, TRP:176:A, GLY:177:A, LEU:178:A, ALA:179:A, SER:194:A. Destes, 7 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os achados na literatura por Lindenblatt *et al*. (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto CX-4945 competitivo por ATP. Em contrapartida, 11 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al.* (2019), sugerindo que ambos os sítos ativo e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Esta cavidade apresentou 4 locais que possuem Z-score maior que 0,5 indicando, assim, possível local de alosterismo.

Figura 10: Representação da proteína PDB: 4UB7 em azul claro e a cavidade molecular *druggable* forte em modelo tubo (imagem do CavityPlus).



d) Modelo 6TEI

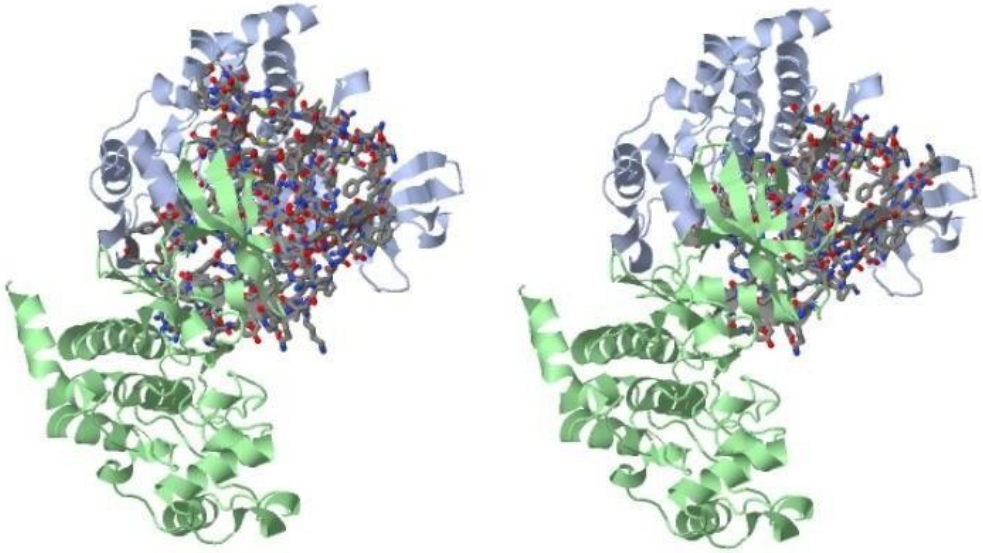
Os resultados encontrados para a proteína CK2 PDB ID: 6TEI foram de 20 cavidades, sendo apenas duas consideradas como forte *druggable*, onde estas estão demonstradas na Figura 11. Para o modelo 6TEI, a primeira cavidade encontrada apresentou os seguintes resíduos de aminoácidos: LYS:44:A, LEU:45:A, GLY:46:A, ARG:47:A, GLY:48:A, LYS:49:A, TYR:50:A, SER:51:A, GLU:52:A, VAL:53:A, PHE:54:A, VAL:66:A, VAL:67:A, LYS:68:A, ILE:69:A, LEU:70:A, LYS:71:A, PRO:72:A, VAL:73:A, LYS:74:A, LYS:77:A, ILE:78:A, ARG:80:A, GLU:81:A, LEU:85:A, ILE:95:A, THR:96:A, LEU:111:A, PHE:113:A, GLU:114:A, HIS:115:A, VAL:116:A, ASN:117:A, ASN:118:A, THR:119:A, ASP:120:A, PHE:121:A, LYS:122:A, GLN:123:A, LEU:124:A, TYR:125:A, GLN:126:A, ARG:155:A, ASP:156:A, LYS:158:A, PRO:159:A, HIS:160:A, ASN:161:A, VAL:162:A, MET:163:A, ILE:164:A, ARG:172:A, LEU:173:A, ILE:174:A, ASP:175:A, TRP:176:A, GLY:177:A, LEU:178:A, ALA:179:A, ASN:189:A, VAL:190:A, ARG:191:A, VAL:192:A, ALA:193:A, SER:194:A, ARG:195:A, TYR:196:A, PHE:197:A, LYS:198:A, GLU:201:A, LEU:202:A, LEU:203:A, VAL:204:A, ASP:205:A, TYR:206:A, MET:221:A, ALA:223:A, SER:224:A, MET:225:A, ILE:226:A, PHE:227:A, ARG:228:A, LYS:229:A, GLU:230:A, PRO:231:A, HIS:236:A, ASP:237:A, ASN:238:A,

TYR:239:A, ASP:240:A, ARG:268:A, PHE:269:A, HIS:286:A, GLU:288:A, ASN:289:A, ARG:19:B, PRO:20:B, ARG:21:B, GLU:22:B, TYR:23:B, TRP:24:B, ASP:25:B, TYR:26:B, GLU:27:B, SER:28:B, HIS:29:B, VAL:30:B, VAL:31:B, GLU:32:B, TRP:33:B, GLY:34:B, ASN:35:B, GLN:36:B, ASP:37:B, ASP:38:B, TYR:39:B, ILE:59:B, THR:60:B, LEU:70:B, LYS:71:B, PRO:72:B, VAL:73:B, LYS:74:B, LYS:75:B, LYS:76:B, LYS:77:B, ILE:78:B, LYS:79:B, ILE:82:B, LYS:83:B, LEU:85:B, GLU:86:B, ASN:87:B, LEU:88:B, ARG:89:B, ILE:100:B, VAL:101:B, LYS:102:B, ASP:103:B, PRO:104:B, VAL:105:B, SER:106:B, ARG:107:B, THR:108:B, PRO:109:B. Destes, 9 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os achados na literatura por Lindenblatt *et al*. (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto CX-4945 competitivo por ATP. Em contrapartida, 9 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al*. (2019), sugerindo que ambos os sítios ativos e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Esta cavidade apresentou 4 locais que possuem Z-score maior que 0,5 indicando, assim, possível local de alosterismo.

A segunda cavidade considerada *druggable* forte encontrada no modelo 6TEI apresentou os seguintes resíduos de aminoácidos: TYR:26:A, ARG:43:A, LYS:44:A, LEU:45:A, GLY:46:A, ARG:47:A, GLY:48:A, LYS:49:A, TYR:50:A, SER:51:A, GLU:52:A, VAL:53:A, PHE:54:A, GLU:55:A, LYS:64:A, VAL:65:A, VAL:66:A, VAL:67:A, LYS:68:A, ILE:69:A, LEU:70:A, LYS:71:A, PRO:72:A, VAL:73:A, LYS:74:A, LYS:75:A, LYS:76:A, LYS:77:A, ILE:78:A, LYS:79:A, ARG:80:A, GLU:81:A, LEU:85:A, ILE:95:A, THR:96:A, LEU:111:A, PHE:113:A, GLU:114:A, HIS:115:A, VAL:116:A, ASN:117:A, ASN:118:A, THR:119:A, ASP:120:A, PHE:121:A, LYS:122:A, GLN:123:A, LEU:124:A, TYR:125:A, ARG:155:A, ASP:156:A, LYS:158:A, PRO:159:A, HIS:160:A, ASN:161:A, VAL:162:A, MET:163:A, ILE:164:A, ARG:172:A, LEU:173:A, ILE:174:A, ASP:175:A, TRP:176:A, GLY:177:A, LEU:178:A, ALA:179:A, GLU:180:A, GLN:186:A, GLU:187:A, TYR:188:A, ASN:189:A, VAL:190:A, ARG:191:A, VAL:192:A, ALA:193:A, SER:194:A, ARG:195:A, TYR:196:A, PHE:197:A, LYS:198:A, TYR:209:A, GLU:230:A, PRO:231:A, ASN:238:A, ARG:21:B, GLU:22:B, ASP:25:B, TYR:26:B, GLU:27:B, SER:28:B, HIS:29:B, VAL:30:B, VAL:31:B, GLU:32:B, TRP:33:B, GLY:34:B, ASN:35:B, LYS:75:B, LYS:76:B,

LYS:79:B, ILE:82:B, LYS:83:B, LYS:102:B. Destes, 6 resíduos de aminoácidos estão em concordância com os achados na literatura por Lindenblatt *et al*. (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes resíduos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto CX-4945 (silmitasertibe) competitivo por ATP. Em contrapartida, 9 destes resíduos de aminoácidos estão em concordância com o estudo de Bestgen *et al*. (2019), sugerindo que ambos os sítios ativos e alostérico podem estar localizados nesta cavidade. Esta cavidade apresentou 4 locais que possuem Z score maior que 0,5 indicando, assim, possível local de alosterismo.

Figura 11: Representação da proteína PDB: 6TEI em azul claro e verde, e as duas cavidades moleculares *druggable* forte em tubo, a primeira cavidade à esquerda e a segunda à direita, numeradas pelo score (imagens do CavityPlus).



Os estudos de busca de cavidades nos modelos da CK2 permitiram a obtenção de vários sítios de interação molecular candidatos para o estudo de alvos potenciais para a ação de compostos bioativos inibidores desta proteína. Entre os resultados obtidos verificou-se que o modelo da 5KU8 apresentou maior valor de ranqueamento (escore) de 3983,00 e valor máximo preditivo de 10,57. Já o modelo 3PE1 apresentou valor no ranqueamento menor 820,00 em comparação aos outros modelos estudados, no entanto demonstrou maior valor máximo preditivo, de 11,89. Embora estes valores indiquem que estes modelos devem ser indicados para a continuidade dos estudos todos os sítios *druggable*

podem se apresentar como locais de interação com compostos bioativos.

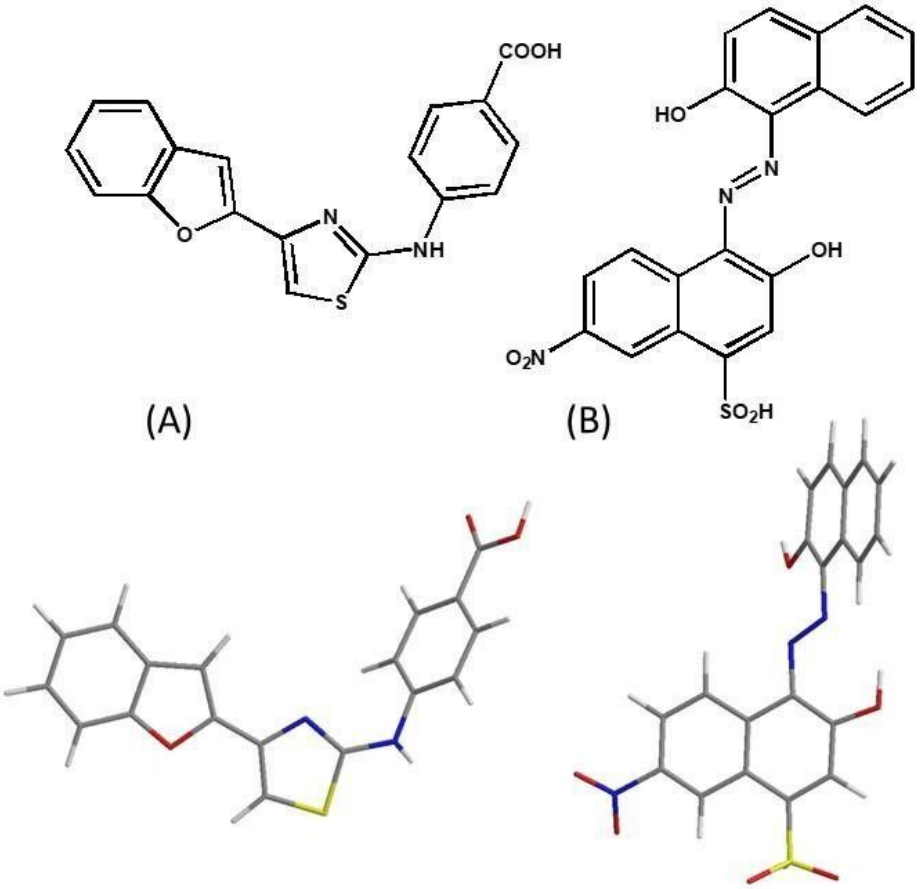
Outro fator importante é a determinação dos resíduos de aminoácidos constituintes nas cavidades dos estudados. A partir dos resultados obtidos na busca de cavidades verificou-se que os sítios ativos dos modelos envolvem resíduos do sítio ativo do ATP, como citado por Lindenblatt *et al*. (2020), e do sítio adjascente, considerado alostérico, citado por Bestgen *et al*. (2019). Este fato demonstra que há possibilidades de compostos atuarem tanto no sítio ativo quanto no alostérico, e a interação vai depender do composto estudado.

6.2. Desenho, otimização e escolha dos compostos

Na literatura compostos derivados de 2-aminotiazóis e derivados do azonaftaleno foram selecionados de acordo com o relato de suas ações inibitórias na proteína quinase CK2 (MOUCADEL *et al*., 2011; BESTGEN *et al*., 2019).

O desenho destas moléculas foi realizado utilizando o software *Spartan for Windows,* também utilizado na otimização de geometria molecular da estrutura com o emprego dos métodos semi-empírico AM1 e o empírico teoria do funcional de densidade (DFT) B3LYP e bases de dados 6.31G*. Os modelos dos compostos em três dimensões (3D) foram obtidos neste cálculo e salvos em formato PDB e mol.2. A partir disso, as moléculas com estrutura química otimizada estavam aptas para compor o estudo de busca de farmacóforo e ancoramento molecular. Através da Figura 12 é possível observar o exemplo do desenho em 2D de uma molécula derivada do 2-aminotiazol e outra derivada do azonaftaleno, onde ambas demonstraram atividade inibitória frente à CK2.

Figura 12: Modelo em 2 e 3D (forma de tubo) de um derivado de 2-aminotiazol (A) e de um derivado de azonaftaleno (B) que demostraram atividade inibitória frente a CK2.



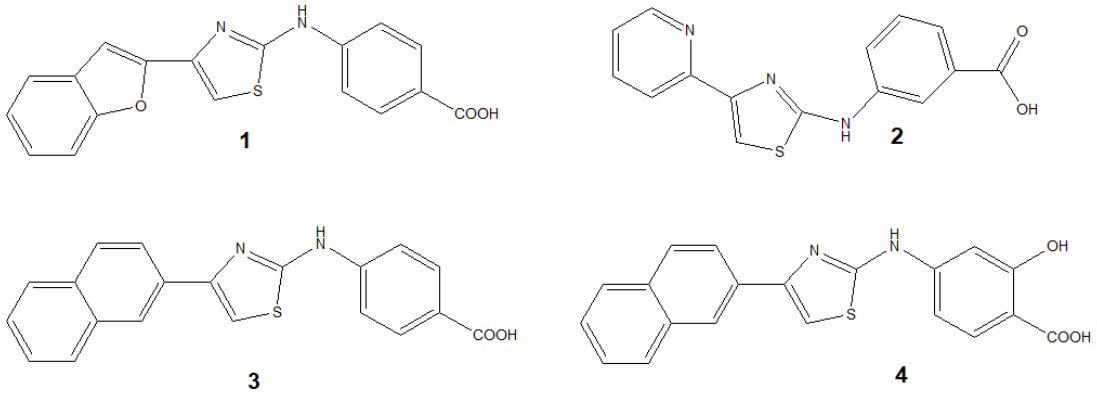
A partir da escolha dos dois grupos de compostos a serem utilizados neste trabalho escolheu-se empregar um processo de de predição de atividade som o software Self Ensemble Approach (SEA) para fins de avaliação de qual é o grupo mais apropriado para se estudar o farmacóforo. Nesta etapa somente os derivados de 2-aminotiazois apresentaram resultado significativo, de similaridade de 0.3 entre si, demonstrando que análogos destes podem ter ação também sobre a CK2, bem como somente os derivados de 2-aminotiazois apresentaram potencial interação com a proteína quinase CK2 no estudo de predição de atividade.

O servidor web SEA compara alvos de proteína considerando similaridades estatísticas de Tanimoto 2D calculadas entre seus ligantes.

De acordo com os resultados obtidos pela predição de atividade e busca de similaridade, percebeu-se que o grupo mais relevante para este estudo foram

os derivados do 2-aminotiazois, onde quatro compostos deste grupo demostraram ser mais ativos frente a proteína quinase CK2 (figura 13). Ressalta-se que a presença do grupamento 2-aminotiazol (BESTGEN *et al.*, 2019) é a característica comum que possuem em suas estruturas, sendo este o critério fundamental empregado na escolha e seleção das moléculas (CHEN *et al.*, 2020).

Figura 13: Derivados de 2-aminotiazol que apresentaram maior interação com a proteína quinase CK2 nos estudos preliminares.



6.3. Estudo de Farmacófaro

O estudo de farmacóforo foi estruturado em duas abordagens sendo que uma envolveu o emprego das moléculas de compostos bioativos sem considerar a estrutura molecular da proteína alvo (LBDD) e outra com a presença da estrutura química de compostos bioativo complexada em sítio ativo da proteína CK2.

a) Farmacóforo com o uso de LBDD

Um conjunto de 23 compostos derivados do 2-aminotiazol, devidamente alinhados de acordo com suas estruturas químicas, foi submetido à análise de farmacóforo com o emprego de software Pharmagist, disponível online <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/pharma/index.html>. As estruturas em 3D, em

extensão de formato digital Sybyl mol.2, foram classificadas em arquivo único (caracterizada como uma lista de moléculas) e inseridas no Pharmagist, que envia um relatório por e-mail com os resultados obtidos. Para o cálculo do farmacóforo foi escolhida a molécula mais ativa da série, de número 23, descrita como estrutura líder ("*pivot*"), utilizada como referência para alinhamentos, e logo, foram inseridos os filtros de efeito doador ou aceptor de hidrogênio, aníon ou cátion e presença/ausência de anel aromático.

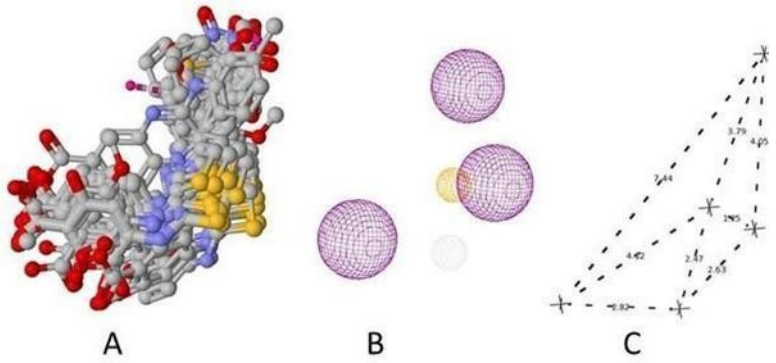
A partir desta etapa foram determinados 9 farmacóforos no total, sendo que os 6 principais estão demonstrados na Tabela 2. Os modelos que apresentaram os maiores valores de escore foram os de número 6 e o 3, respectivamente. No entanto, estes modelos apresentaram número menor de moléculas alinhadas e devido a este fato não foram escolhidas para a continuidade dos estudos. Dentre os demais modelos, o farmacóforo escolhido envolveu o modelo com equilíbrio entre o maior número de moléculas alinhadas em conjunto e com o maior escore, que neste caso específico foi o de número 1. Este modelo apresentou a pontuação de escore 61.188, incluindo 5 medidas farmacofóricas, e sua construção foi baseada em 23 moléculas.

O modelo 3D obtido permitiu a determinção das distâncias entre os pontos espaciais de propriedades de aromaticidade, de aceptor e de doador de ligação de hidrogênio. A Figura 14A demonstra sítios das propriedades de aromaticidade disponível em coloração violeta e os sítios de aceptor ou doador de ligação de hidrogênio apresentou coloração branca e laranja, respectivamente (Figura 14B). A disposição espacial e distância molecular entre sítios do farmacóforo em Angstrons se encontram demostrados na Figura 14C. Este modelo sugere que substâncias derivadas dos aminotiazois que possam interagir com a CK2 devem apresentar grupos funcionais com as relativas características físico-químicas localizados o mais próximo possível das regiões espaciais indicadas no modelo. Estas informações podem ser utilizadas para uma nova seleção de compostos candidatos a interagir com esta proteína. Neste contexto, este modelo de farmacóforo foi utilizado como filtro molecular para a triagem virtual de moléculas inibidoras potenciais da CK2 baseadas no ligante.

Tabela 2: Descrição dos principais modelos farmacóforos obtidos utilizando software Pharmagist e uso de abordagem LBDD.

Nº	Escore	Medidas Espaciais	Aromática	Hidrofóbica	Doador lig H	Aceptor lig H	Posítivo/ Negativo	Número de moléculas alinhadas
1	61.188	5	3	0	1	1	0/0	23
2	61.188	5	3	0	1	1	0/0	23
3	67.500	6	3	0	1	2	0/0	22
4	39.869	5	1	0	0	3	0/1	20
5	48.117	5	2	0	1	2	0/0	19
Maior Escore	74.246	9	3	0	1	4	0/1	15

Figura 14: Modelos em 3D do conjunto de 2-aminotiazois alinhadas (A), farmacóforo número 1 gerado com sítios de propriedades físico-químicas (B) e distâncias intra-moleculares entre os sítios dos farmacóforos em Angstroms (C) (com autorização de PRADEL, 2020).

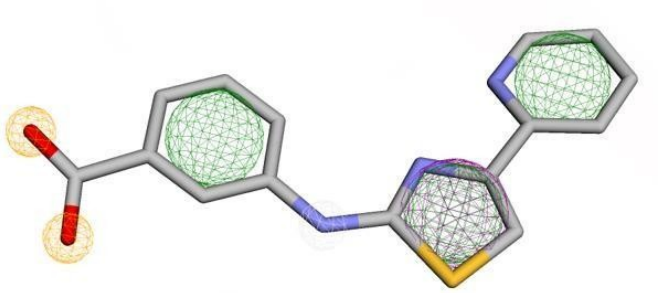


b) <u>Farmacóforo com o uso de SBDD</u>

Nesta etapa da busca de farmacóforo foi utilizado o software Pharmit, e foi empregada com o uso de modelo de proteína CK2 em formato PDB 6TEI do ligante derivado de aminotiazol (cavidade N4N) complexado a esta. Este modelo foi usado devido ao ligante complexado ser da mesma classe que os compostos estudados na busca de farmacóforo no modo LBDD. Várias medidas farmacofóricas foram avaliadas com o uso deste softaware, sendo que

as sete medidas escolhidas foram aceptor de ligação de hidrogênio de cor laranja (raio 0,5 Angstroms), hidrofóbico de cor verde (raio 1,0), aromático de cor roxa (raio 1,0). As medidas espaciais do farmacóforo escolhido e do composto aminotiazol complexado estão demonstradas na figura 15.

Figura 15. Modelo de farmacóforo gerado com sítios de propriedades físico-químicas sobreposto a derivado aminotiazol.



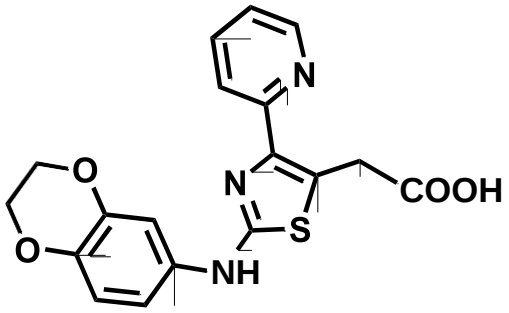
6.4. Triagem Virtual

O software ZincPharmer <http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>, associado a base de dados Zinc 15, permite que façamos a visualização do farmacóforo e busca de compostos neste banco de dados, o qual contém mais de 21 milhões de compostos comerciais. Este software permite ainda a realização da triagem virtual baseada na estrutura do farmacóforo e aplicação de filtros de valores de propriedades físico-químicas. Portanto, o farmacóforo obtido através do Pharmagist foi inserido no ZincPharmer, onde foram gerados milhares de compostos que se encaixam dentro do farmacóforo proposto. Foi necessário a aplicação dos filtros para redução do número de moléculas com atividade frente à CK2 e para facilitar a obtenção de compostos na triagem virtual.

Ao abrir o programa foram escolhidos os filtros “Max Hits per Conf”, “Max Hits per Mol”, “Max Total de Hits”, “Max RMSD”, “Molecular Weight”, e “Rotatable Bonds” com intervalos de 0 a 100 para “Max Hits per Conf” e “Max Hits per Mol”; 0 a 300 para “Max Total de Hits; 0 a 0.300 para “Max RMSD”, 5 a 500 para “Molecular Weight” e 0 a 10 “Rotatable Bonds”. Os resultados são expressos em uma tabela de acordo com o desvio padrão relativo correlacionado com a diferença de encaixe no farmacóforo em questão e um ranqueamento entre as moléculas do banco de dados.

Após a corrida dos compostos, 300 moléculas foram selecionadas com o uso do farmacóforo escolhido após a aplicação de filtros (baseando-se nas propriedades do farmacóforo obtido). Ao se considerar a presença de grupos 2-aminotiazol entre estes compostos buscou-se achar moléculas que apresentassem este grupo e também a presença de grupo ácido no conjunto de moléculas obtidas. A partir destes resultados reduziu-se o número de moléculas para 1 (Figura 16). Desta forma, esta molécula se encaixa no farmacóforo mantendo o grupamento aminotiazol e uma porção ácida.

Figura 16: Composto com anel aminotiazol e função ácida característica do conjunto de origem obtido a partir de triagem virtual.

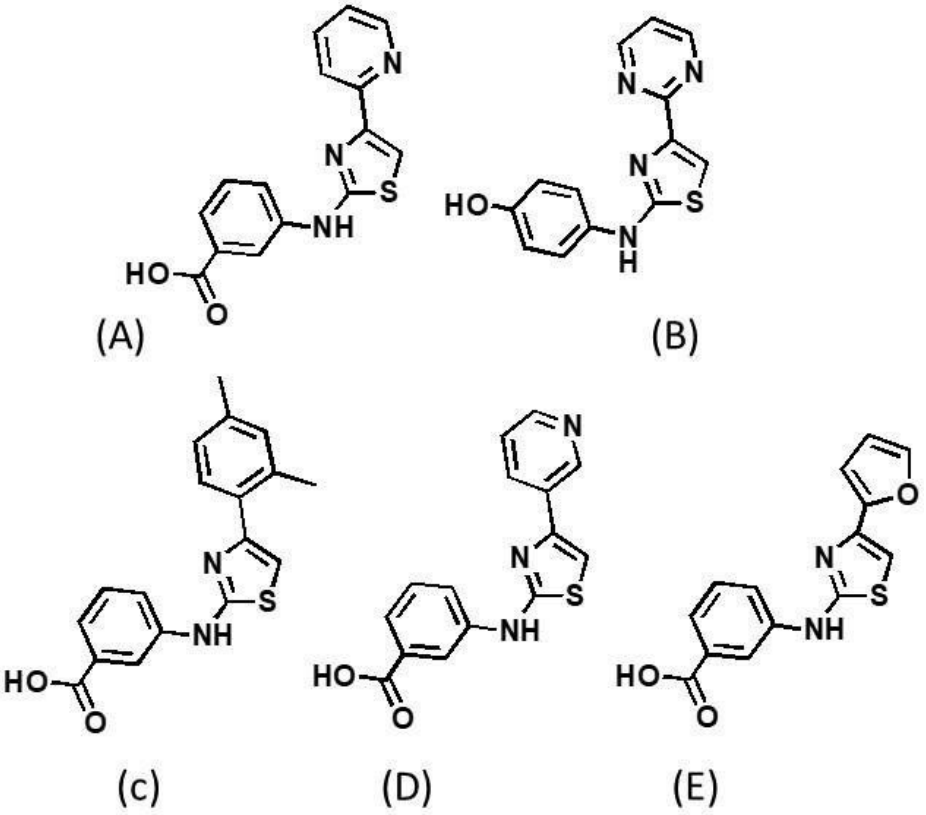


A triagem virtual realizada com o emprego do fármacoforo obtido com o uso de estrutura molecular do ligante complexado a proteína alvo envolveu o emprego de software Pharmit. Os procedimentos de triagem virtual Pharmit foram aplicados em bancos de dados digitais de pequenas moléculas, como ChemBL 25 (23.136.925 confôrmeros de 1.752.844 moléculas), ZINC 15 (123.399.574 confôrmeros de 13.190.317 moléculas), PubChem (450.708.705 confôrmeros de 93.067.404 moléculas), Dud-E SRC Benchmark (509.608 confôrmeros de 34.966 moléculas) e medicamentos aprovados pela FDA (17.471 confôrmeros de 1.677 moléculas). Os filtros usados foram hit reduction: com número máximos de hit por confôrmeros e por molécula, além de número máximo de hit de 100. Os filtros utilizados envolveram a adoção de peso molecular de 5 - 500 Daltons, ligações rotacionais de 0 - 4, logarítmico do coeficiente de partição (logP) de -1,0 a 4,0, área de superfície polar (PSA) de 30-140, número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) de 1 - 5 e número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBD) 1 - 10,

respectivamente. A minimização dos resultados gerados pelo Autodock Vina Scoring Function pela metodologia de descida do gradiente na superfície de energia, a partir da consulta inicial de pose alinhada, e a funcionalidade smina foram realizadas com essas opções.

Nesta análise, verificou-se que a triagem virtual no banco de dados Zinc possibilitou a determinação de 53 moléculas. Após a aplicação de minimização com o emprego de Autodock Vina e máximo desvio padrão relativo de 1,5 o conjunto de compostos foi reduzido a 21. Neste contexto o único derivado aminotiazol e grupo ácido foi a molécula A. Quando se utilizou o banco de dados ChemBL25 obteve-se o montante de 44 e após a minimização destas foram obtidos 16 conformações de compostos sendo a molécula B (3 conformações desta) a única com a porção aminotiazol presente no grupo. Para a triagem em banco de dados PubChem verificou-se a obtenção do número de 100 moléculas, máximo estipulado, e a partir da minimização do banco de dados o grupo foi reduzido a 71 compostos. Entre estes foram identificados confôrmeros das moléculas A, também observada no banco de dados Zinc, C, D e E. A molécula A é descrita no estudo original publicado por Bestgen *et al*. 2019 o que indica que o farmacóforo utilizado na triagem é acertar a atividade de inibidores de CK2, e se apresenta como potencial para o estudo de novos inibidores desta quinase. O modelo de farmácoro não apresentou encaixe com nenhuma molécula proposta em banco de dados FDA-aproved drugs e Decoys ligados ao software. As moléculas estão representadas na Figura 17.

Figura 17: Estuturas químicas dos compostos obtidos pela triagem virtual A (via Zinc e PubChem), B (via ChemBL25), C, D e E (via PubChem).



6.5. Predição de toxicidade e predição de atividade biológica

A partir da triagem virtual, os compostos obtidos foram submetidos a análise de predição de toxicidade com o uso de software Osiris Property Explorer e de predição de atividade biológica (alvos). Os efeitos de toxicidade teóricos avaliados envolveram mutagenicidade, carcinogenicidade, efeito sobre o sistema reprodutor e irritante. A predição da atividade envolveu o software SEA Search Server <Self Ensemble Approach, http://sea.bkslab.org/> que busca similaridade estrutural entre o composto ensaiado e outros com atividade biológica reconhecida. Estes dois softwares foram utilizados como filtros do conjunto de moléculas da triagem molecular candidatas de inibidores de CK2 (Tabela 3).

Todos os compostos derivados de aminotiazóis obtidos na triagem virtual não apresentaram predição de risco de toxicidade do tipo mutagênica e

tumorigênica sobre o sistema reprodutivo e irritante, podendo apresentar-se como candidato para o estudo de fármacos potenciais antitumorais.

Tabela 3: Valores de probabilidade e de máxima similaridade de Tanimoto (2D) a alvo caseína quinase 2, subunidade alfa, identificados por predições em software SEA.

Molécula	**Valor de P**	**MaxTC**
1 Pharmagist	1,327 e^{-36}	0.35
A Pharmit	2.857e^{-7}	0.33
B Pharmit	-	-
C Pharmit	1.12e^{-32}	0,44
D Pharmit	1.176e^{-54}	0,43
E Pharmit	1.093e^{-36}	0.37

A molécula A apresentou atividade prevista para caseína quinase 1. A molécula B não apresentou atividade predita para a proteína em questão. Os melhores resultados foram observados para as moléculas D, 1 e E. A molécula 1 é inédita e se encaixa no farmacóforo, demonstra possuir atividade predita frente a proteína quinase CK2, subunidade alfa, considerados adequados nesta análise e se apresenta como candidata para o estudo experimental de atividade de inibição da referida enzima ou de avaliação de efeito antitumoral. A partir destes resultados, a molécula 1 foi utilizada para os estudos de ancoramento molecular.

6.6. Análise de ancoramento molecular (Docking)

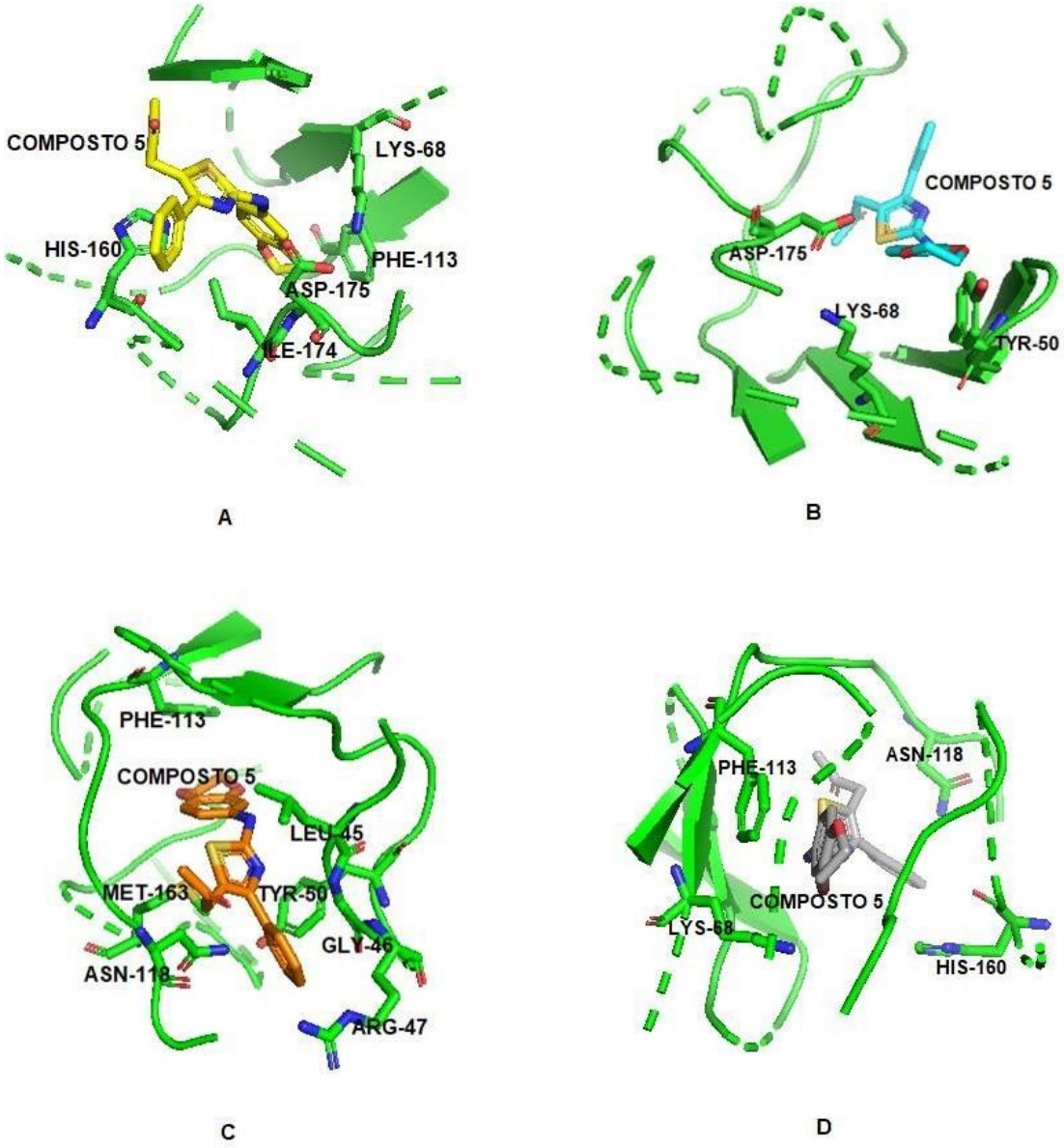
Para a análise do ancoramento molecular foram utilizados 5 compostos com estrutura química otimizada, sendo eles: 4 derivados dos 2-aminotiazóis com maior atividade inibitória da CK2 descritos na literatura por Begsten *et al*. 2019, e utilizados na confecção do modelo farmacóforo, e o composto obtido pela triagem virtual *LBDD* realizada neste estudo. Para esta análise foram

empregadas estruturas da proteína quinase CK2 em formato pdb (Protein Data Banking), <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Nesta etapa utilizou-se o software iGemdock 2.1, onde os resultados foram expressos em forma de tabelas e figuras, demonstradas a seguir, que foram utilizadas para comparação com os dados da literatura.

O estudo de ancoragem molecular determina a energia de interação total, interação de Van de Waals (VDW), ligação de hidrogênio (ligação H), interações eletrostática e moleculares entre os compostos e a proteína. Os estudos envolveram o emprego total da proteína ou de sítios moleculares de ligação com ligantes. Na aplicação da função estrutura total da proteína não foram atingidos resultados satisfatórios em nenhuma das análises realizadas. Na aplicação da função utilizando o sítio de ligação do ligante como referência obtivemos resultados satisfatórios, que são descritos e discutidos a seguir.

A partir dos dados de ancoramento molecular com as proteínas 3PE1, 5KU8, 6TEI, e 4UB7, verificou-se que o composto obtido pela triagem virtual apresentou a menor energia de interação (-94,94 Kcal.mol-1) em relação aos outros compostos na estrutura cristalizada da CK2 PDB ID: 5KU8, onde sua interação com a proteína está demonstrada na Figura 18B. Quando analisado junto a PDB ID: 3PE1, apresentou a segunda menor energia de interação (-84,06 Kcal.mol-1), Figura 18A. No estudo do modelo PDB ID: 6TEI, verificou-se que o composto apresenta a segunda menor energia de interação (-97,74 Kcal.mol-1), Figura 18D, e quando analisado junto a PDB ID: 4UB7, apresentou a terceira menor energia de interação (-91,64 Kcal.mol-1), e sua interação com a proteína está demonstrada na Figura 18C.

Figura 18: Interação entre o composto obtido pela triagem virtual com a proteína CK2 PDB ID: 3PE1 (A), 5KU8 (B), 4UB7 (C) e 6TEI (D), e os principais aminoácidos envolvidos (imagem obtida do Pymol).



Os resultados totais das proteínas 3PE1, 5KU8, 4UB7 e 6TEI bem como os principais resíduos de aminoácidos envolvidos nesta interação estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5, 6 e 7, 8 e 9, 10 e 11, respectivamente, onde os compostos 1, 2, 3 e 4 são derivados de 2-aminotiazol e o composto 5 foi obtido pela triagem virtual. Na figura 19 podemos observar a interação do modelo 4UB7 com os todos os compostos estudados nesta etapa, onde a partir deste modelo obtivemos uma maior interação entre os resíduos de aminoácidos principais e os

compostos estudados nesta etapa.

Figura19: Interação entre os compostos 1 (amarelo), 2 (rosa), 3 (azul), 4 (vermelho) e 5 (laranja) com a proteína CK2 PDB ID: 4UB7, e os principais aminoácidos envolvidos (imagem obtida pelo Pymol).

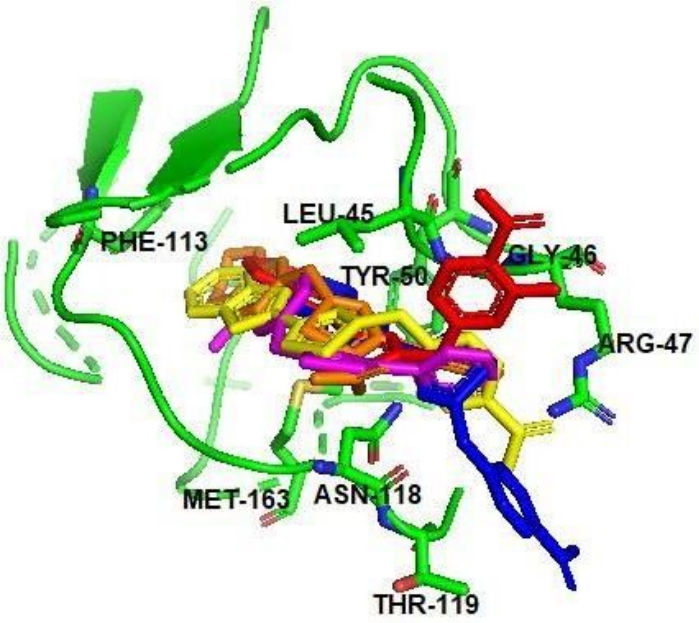


Tabela 4: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 3PE1 cavidade 3NG.

Compostos	Energia	VDW	H-Bond	Eletrostatica
4	-88,53	-79,86	-8,67	0
5	-84,06	-74,01	-10,05	0
3	-82,97	-71,85	-11,66	0,54
2	-76,04	-66,49	-9,14	0
1	-73,56	-66,14	-7,42	0

Tabela 5: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 3PE1 cavidade 3NG.

Compostos	H-S ASP 175	H-S ASN 118	H-M VAL 116	V-S ILE 174	V-S LYS 68	V-S PHE 113	V-S HIS 160	V-M VAL 116	V-S ASP 120
4	-6,7	0	0	-9,5	-7,1	-10,5	-16,1	0	0
5	-6,5	0	0	-9,3	-5,4	-7,6	-14,5	0	0
3	0	-7	-4,4	-4,8	-0,2	-6,6	0	-6,5	-1,4
2	-3,5	0	0	-8,1	-8,5	-8,4	-1,5	0	0
1	-2,6	0	0	-8,1	-4,2	-4,2	-8,4	0	0

Tabela 6: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 5KU8 cavidade 6XK.

Compostos	Energia	VDW	H-Bond	Eletrostatica
5	-94,94	-78,6	-16,34	0
1	-92,23	-75,91	-16,97	0,65
4	-90,89	-74,07	-13,23	-3,59
3	-88,51	-66,57	-23,53	1,58
2	-84,77	-74,16	-10,6	-0,06

Tabela 7: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 5KU8 cavidade 6XK.

Compostos	H-M ASN 118	H-S HIS 160	V-S TYR 50	V-S LYS 68	V-S ASP 175	V-S PHE 113	V-S HIS 115	V-M ASN 118	V-S ASP 120
5	0	0	-9,7	-8,7	-5,5	0	0	0	0
1	0	0	-5,8	-7	-6,7	0	0	0	0
4	0	-6,9	0	-7	-6,9	-10,2	0	0	0

3	0	0	-5,1	-7,9	6,6	0	0	0	-4,2
2	-3,5	0	0	0	0	-0,8	-6,3	-8,8	0

Tabela 8: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 4UB7 cavidade 3G5.

Compostos	**Energia**	**VDW**	**H-Bond**	**Eletrostatica**
1	-93,21	-78,84	-12,38	-1,99
4	-92,03	-83.36	-6,99	-1,68
5	-91,64	-91.54	0	0
3	-89,06	-82.11	-6,8	0
2	-77,79	-70.99	-6,8	0

Tabela 9: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 4UB7 cavidade 3G5.

Compostos	**H-M ASN 118**	**V-S LEU 45**	**V-M GLY 46**	**V-S ARG 47**	**V-S PHE 113**	**V-M ASN 118**	**V-S ANS 118**	**V-S THR 119**	**V-S MET 163**	**V-S TYR 50**
1	0	-7,9	-6,5	-4,7	-5,7	-2,5	-6,6	-0,4	-6,6	0
4	0	-9,2	-7,9	-6,9	-1,9	-4,3	-7,7	0	-7,7	-8,4
5	0	-8,3	-9,3	-5,7	-8,6	-7	-3,7	0	-3,7	-2,5
3	-6,8	-8,7	-5,6	-9	0	-7,3	-9,5	-5,4	-9,5	-5,4
2	-3,5	-4,7	-4,7	-5,9	-1,5	-7,3	-6,4	0	-6,4	-0,3

Tabela 10: Interações centrais (Van der Waals, ligação de hidrogênio e eletrostática) de compostos derivados de 2-aminotiazol e composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase PDB ID: 6TEI cavidade N4N.

Compostos	**Energia**	**VDW**	**H-Bond**	**Eletrostatica**
4	-98,32	-78,59	-21,45	1,72

5	-97,74	-89,74	-8	0
2	-84,79	-74,64	-10,44	0,29
1	-81,99	-70,18	-13,06	1,85
3	-79,37	-69,48	-5,32	0

Tabela 11: Compostos derivados do 2-aminotiazois e composto obtido por triagem virtual e os principais resíduos de aminoácidos envolvido na interação com a proteína CK2 PDB ID: 6TEI cavidade N4N.

Compostos	**H-S LYS 68**	**H-S ASN 118**	**H-S HIS 160**	**V-S LYS 68**	**V-S PHE 113**	**V-S ASN 118**	**V-M HIS 160**
4	-2,8	0	-2,5	-3,8	0	-7,3	-10,2
5	-3,5	0	0	-5,7	-15,5	-7,5	-0,7
2	-3,5	0	0	-5,4	-2,7	-6,1	-4,7
1	-3,5	-3,5	0	-3,3	-0,1	-8,5	-5,3
3	0	0	0	-6,6	0	0	-0

A análise do ancoramento molecular foi realizada para fornecer informações sobre a interação entre os compostos derivados do 2-aminotiazol e o composto obtido pela triagem virtual com a proteína quinase CK2, bem como sugerir a possível maneira de como esta interação vem sendo exercida.

Os resíduos de aminoácidos encontrados neste estudo estão em concordância com os encontrados na literatura por Lindenblatt *et al.* (2020), que demonstrou em seu estudo a presença destes aminoácidos no sítio ativo da proteína CK2 complexada com o composto similtasertibe, inibidor da proteína que atua por competição no sítio do ATP. Este local de interação ocorreu também com os quatro compostos derivados de 2-aminotiazol descrito por Bestgen *et al*. (2019) utilizados nesta análise. Os resultados estão em discordância com os dados relatados por Bestgen *et al*. (2019), que demonstra a presença dos derivados da classe de compostos estudada em uma cavidade alostérica independente do sítio ativo onde encontra-se o composto de referência, silmitasertibe, apesar desta cavidade estar ao lado do sitío ativo e

assim compartilhar de alguns resíduos de aminoácidos em comum. Neste cenário, este estudo demonstra que as estruturas 3D da proteína CK2 utilizadas apresentaram resultados semelhantes de posicionamento no interior da proteína, reforçando a ideia de que este grupo de inibidores da CK2 estariam atuando no sítio ativo.

Todos os resíduos de aminoácido determinados nas interações dos diferentes modelos computacionais da CK2 estão descritos nas análises das cavidades moleculares consideradas *druggable* nos estudos de busca de cavidades. Este fato confirma a importância do sítio ativo como principal alvo de derivados aminotiazóis ligado a estrutura química contendo grupamento ácido.

Os estudos realizados permitiram obter informações sobre a importância do uso de metodologias de ancoramento molecular para fins de maior compreensão sobre o mecanismo de ação destes compostos bioativos. Os pesquisadores que desenvolvem estudos com aminotiazóis que possuam atividade inibitória potencial da CK2 devem focar no sítio ativo do ATP, sem considerar os prováveis sítios alostéricos ou cavidades adicionais. Estas informações podem ser utilizadas para o planejamento de compostos inibidores desta proteína com potencial atividade antitumoral.

7. CONCLUSÃO

As ferramentas computacionais utilizadas neste trabalho envolveram a modelagem molecular dos compostos, busca de cavidades, busca de farmacóforo, triagem virtual, estudo de predições e ancoramento molecular. Os resultados obtidos sugerem que dos inibidores da proteína CK2 achados na literatura, os derivados do 2-aminotiazól se apresentaram como melhor opção frente aos derivados do azonaftaleno, bem como sugerem que os modelos estruturais em 3D da proteína CK2 (PDB ID: 3PE1, 5KU8, 4UB7 e 6TEI) possam ser empregados em análises futuras de compostos candidatos a inibidores ativos da CK2.

Os derivados do 2-aminotiazól se mostraram eficientes quando utilizados como base para obtenção de modelos farmacófaros. Estes farmacófaros podem ser utilizados para o planejamento e desenvolvimento de novos compostos candidatos a antineoplásicos inibidores da proteína quinase 2. O composto obtido pela triagem virtual, a partir do farmacófaro LBDD baseado nos derivados do 2-aminotiazol, demonstrou-se inédito e promissor, e deve ter seus estudos continuados, sendo necessárias análises adicionais e otimização estrutural racional por metodologias *in silico*, juntamente com procedimentos experimentais, para fins de confirmação de sua atividade biológica potencial.

No estudo de predição de toxicidade os compostos obtidos pela triagem virtual não apresentaram predição de risco para a toxicidade testada, podendo apresentarem-se como candidatos para o estudo de fármacos potenciais antitumorais. No estudo de predição de atividade biológica três compostos obtidos pela triagem virtual apresentaram predição de atividade frente a CK2.

Pelo estudo de ancoramento molecular compreendeu-se que o possível mecanismo de ação dos derivados do 2-aminotiazol está ligado à inibição competitiva por ATP, sendo assim pesquisadores que desenvolvem estudos com aminotiazóis que possuam atividade inibitória potencial da CK2 devem focar no sítio ativo desta proteína. Esta informação pode ser utilizada para o desenvolvimento e planejamento de compostos inibidores de CK2 com potencial atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

AHMAD, KASHIF; WANG, GUIXIA; UNGER, GRETCHEN. **Protein Kinase CK2 - A Key Suppressor of Apoptosis**. May 2008Advances in Enzyme Regulation 48(1):179-87. DOI: 10.1016/j.advenzreg.2008.04.002

AJAY, and M. A. MURCKO. 1995**. Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes**. J. Med. Chem. 38:4953–4967. BARREIRO, E. J.; Quimíca Nova. 1996

ANTAL, CE *et al*. **Mutações da proteína quinase C associadas ao câncer revelam o papel da quinase como supressor de tumor**. Cell 160 , 489–502. 2015.

AURORA, A.; SCHOLAR, E. M. **Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy**. Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics 2005, 315, 971.

BARNETT, CME *et al*. **Otimizando o tratamento intratumoral de modelos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço com o éster diterpeno Tigilanol tiglato**. Investig. New Drugs 37 , 1–8. 2019.

BERG et al. Biochemistry 5ª ed. Nova Iorque: WH Freeman ; 2002

BARREIRO, E. **Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal.** SBQ. Química nova. Vol.20. 1997.

BESTGEN, B., KRIMM, I., KUFAREVA, I., ASHRAF, A. K. M., SEETOH, W., ABELL C., HARTMANN, R. W., ABAGYAN, R., COCHET, C., LE BORGNE M., ENGEL, M.,LOMBERGET, T. **2-Aminothiazole Derivatives as Selective Allosteric Modulators of the Protein Kinase CK2. 1. Identification of an Allosteric Binding Site**. Journal of Medicinal Chemistry, 62 (4), 1803-1816, Cambridge, 2019.

BESTGEN, B., KUFAREVA, I., SEETOH, W., ABELL, C., HARTMANN R. W., ABAGYAN, R., LE BORGNE, M., FILHOL, O., COCHET, C., LOMBERGET, T., ENGEL, M. **2-Aminothiazole Derivatives as Selective Allosteric Modulators of the Protein Kinase CK2. 2. Structure-Based Optimization and Investigation of Effects Specific to the Allosteric Mode of Action**. Journal of Medicinal Chemistry, 62 (4), 1817-1836. Saarbrucken, 2019.

BHULLAR, K. S., LAGARÓN, N. O., MCGOWAN, E. M., PARMAR, I., JHA, A., HUBBARD, B. P., & RUPASINGHE, H. (2018). **Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. Molecular cancer**, 17(1), 48

BOLDYREFF, B.; MEGGIO, F.; PINNA, L.A.; ISSINGER, O.G., **Reconstitution of normal and hyperactivated forms of casein kinase-2 by variably mutated beta-subunits.** Biochemistry, 1993, 32, (47), 12672-12677.

BOLDYREFF, B.; MIETENS, U.; ISSINGER, O.G., **Structure of protein kinase CK2: dimerization of the human beta-subunit.** FEBS Lett, 1996, 379, (2), 153-156.

BORGO, CHRISTIAN; RUZZENE, MARIA. **Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance.** 2019 Jul 5;38(1):287. doi: 10.1186/s13046-019-1292-y.

BOURNEZ C, CARLES F, PEYRAT G, ACI-SÈCHE S, BOURG S, MEYER C, BONNET P. **Comparative Assessment of Protein Kinase Inhibitors in Public Databases and in PKIDB**. Molecules. 2020 Jul 15;25(14):3226.

CARLSON, HEATHER A.; KEVIN M. MASUKAWA; AND J. ANDREW MCCAMMON. **Method for Including the Dynamic Fluctuations of a Protein in Computer-Aided Drug Design**. The Journal of Physical Chemistry A 1999 103 (49), 10213-10219

CARVALHO, I., PUPO, M. T., BORGES, A. D. L., BERNARDES, L. S. C., Quim. Nova, 26, 428-438, 2001.

CHEN, X.; LI, C.; WANG, D.; CHEN, Y.; ZHANG, N. **Recent Advances in the Discovery of CK2 Allosteric Inhibitors: From Traditional Screening to Structure-Based Design.** Molecules v.25, p.10. Beijing, 2020.

COZZA, GIORGIO; PINNA, LORENZO A; MORO, STEFANO. **Kinase CK2 inhibition: An update**. 2013. Current Medicinal Chemistry 20(5)

COZZA, G. **The Development of CK2 Inhibitors: From Traditional Pharmacology to in Silico Rational Drug Design**. Pharmaceuticals. v. 10, n. 26, p. 1 – 23, 2017.

CULLEN, JASON K. *et al*. **Activation of PKC supports the anticancer activity of tigilanol tiglate and related epoxytiglianes.** Scientific Reports. 8 January 2021.

DOWLING, CM *et al.* **A proteína quinase C beta II suprime o câncer colorretal regulando a sobrevivência celular mediada por IGF-1**. Oncotarget 7 , 20919–20933. 2016

DRUKER B.J., C.L. SAWYERS, H. KANTARJIAN, D.J. RESTA, S.F. REESE, J.M. FORD, R. CAPDEVILLE, AND M. TALPAZ. 2001**. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome N**. Engl. J. Med. 344: 1038-1042.

ELLIS C.A. AND CLARK, G. **The importance of being K-Ras Cell**. Signal. 12: 425-434. 2000.

ERICKSON, J. A.; JALAIE, M.; ROBERTSON, D. H.; LEWIS, R. A.; VIETH, M. J. Med. Chem. 47, 45-55, 2004

ESSEGIAN, D.; KHURANA, R.; STATHIAS, V.; SCHÜRER, S.C. **The Clinical Kinase Index: A Method to Prioritize Understudied Kinases as Drug Targets for the Treatment of Cancer Cell Rep.** Med. 1, 7, 100128, 2020.

ECKERT, H.; BAJORATH, J. Drug Discov. Today 2007, 12, 225.

FERRARA N.; HILLAN K.J.; NOVOTNY, W. **Bevacizumab (Avastin), a humanized antiVEGF monoclonal antibody for cancer therapy**. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005, 2, 328.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, INCA**. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

FERREIRA, I. M. L. **Estudo por simulação molecular do sistema proteína quinase-inibidores**. 2015

Food and Drug Administration – FDA. **Gleevec (Imatinib Mesylate)**. Disponível em: < https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2001/21335_Gleevec.cfm >. Acesso em: 11 janeiro 2018.

FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D**. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos.** Química. Nova [online]. vol.34, n.10 p.1770-1778 São Carlos, 2010.

GLOBAL MARKETS. **Kinase Inhibitors**. Report Highlights. 2016.

GRAHAM KC, LITCHFIELD DW. **The regulatory beta subunit of protein kinase CK2 mediates formation of tetrameric CK2 complexes**. J Biol Chem. 2000 Feb 18;275(7):5003-10.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. **Planejamento de fármacos,**

biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. Estud. Avançados, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

GUO C, YU S, DAVIS AT, GREEN JE, AHMED K. **A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells**. *J Biol Chem.* 2001;276:5992–5999.

HAMILTON, T. A.; **Protein Kinase - Encyclopedia of Immunology**, 2nd ed., Academic Press: Cambridge, 1998.

HIROTA T, LEE JW, LEWIS WG, ZHANG EE, BRETON G, LIU X, GARCIA M, PETERS EC, ETCHEGARAY JP, TRAVER D, SCHULTZ PG, KAY SA PLoS Biol. 14 de dezembro de 2010; 8 (12): e1000559.

IDRIS, I.; GRAY, S.; DONNELLY. **Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metbolism and cardiovascular cmplication in diabetes**. 2001

KASERER, T.; BECK, K. R.; AKRA, M.; ODERMATT, A.; SCHUSTER, D. **Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases**. Molecules, 20, 22799-22832, 2015.

KIM, H.M.; JEONG, I.; KIM, H.J.; KANG, S. K.; KWON, W. S.; KIM, T. S.; PARK, K.H.; JUNG, M.; SOONG, J.; LIN, S. C.; CHUNG, H. C.; RHA, S. Y. **Casein Kinase 2 Inhibitor, CX-4945, as a Potential Targeted Anticancer Agent in Gastric Cancer**. Anticancer Res. v. 38, n. 11, p. 6171-6180, 2018.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications**. Nature Reviews, v. 3, p. 935-949, nov. 2004.

KOES DR. **The Pharmit Backend: A Computer Systems Approach to Enabling Interactive Online Drug Discovery**. IBM J Res Dev. 2018 Nov-Dec;62(6):1-6.

KREBS, E. G.; FISCHER, E. H. **The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle**. Biochimica et Biophysica Acta 1956, 20, 150.

LI C., ZHANG, X., ZHANG, N., ZHOU Y., SUN G., ZHAO, L., ZHONG, R. **Identification and Biological Evaluation of CK2 Allosteric Fragments through Structure-Based Virtual Screening**. Molecules. 25(1):237. Beijing, 2020.

LINDENBLATT D, NICKELSEN A, APPLEGATE VM, JOSE J, NIEFIND K. **Structural and Mechanistic Basis of the Inhibitory Potency of Selected 2-Aminothiazole Compounds on Protein Kinase CK2**. J Med Chem. 2020 Jul 23;63(14):7766-7772

LITCHFIELD, D. W. **Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death.** The Biochemical journal, 369 (1), 1–15, 2003

LOPES, N. R.; ABREU, M. T. C. L**. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São Paulo , v. 31, n. 6, p. 449-453, 2009

MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, T. **The Protein Kinase Complement of the Human Genome**. Science 2002, 298, 1912

MARCHANT, C.A., BRIGGS, K.A., LONG A., **Toxicol. Mech. Methods**, 2008, 18(2-3), 177- 187.

MEGGIO, F.; BOLDYREFF, B.; ISSINGER, O.G.; PINNA, L.A., **Casein kinase 2 down-regulation and activation by polybasic peptides are mediated by**

acidic residues in the 55-64 region of the beta-subunit. A study with calmodulin as phosphorylatable substrate. Biochemistry, 1994, 33, (14), 4336-4342.

MEGGIO, FLAVIO; PINNA, LORENZO A. **One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?** 2003 Mar;17(3):349-68. doi: 10.1096/fj.02-0473rev.

MOCHLYROSEN D, DAS K, GRIMES KV. (2012). **Protein kinase C, an elusive therapeutic target?** Nat Rev Drug Discov. 11: 937-57.

MORRIS GM, HUEY R, LINDSTROM W, SANNER MF, BELEW RK, GOODSELL DS, OLSON AJ. **AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility**. J Comput Chem. 2009 Dec;30(16):2785-91

MOUCADEL V, PRUDENT R, SAUTEL CF, et al. **Antitumoral activity of allosteric inhibitors of protein kinase CK2**. Oncotarget. 2011;2(12):997-1010. doi:10.18632/oncotarget.361

NISIUS B., SHA F., GOHLKE H. **Structure-based computational analysis of protein binding sites for function and druggability prediction**. J. Biotechnol. 2012; 159:123–134

NEWTON, AC & BROGNARD, J. **Reversing the paradigm: Protein kinase C as a tumor supressor. Trends Pharmacol**. Sci. 38 , 438–447. (2017).

NEWTON, AC. **Protein kinase C as a tumor suppressor**. Semin. Cancer Biol. 48 , 18–26. (2018).

PAGANO, M.A.; BAIN, J.; KAZIMIERCZUK, Z.; SARNO, S.; RUZZENE, M.; DI MARIA, G.; ELLIOTT, M.; ORZESZKO, A.; COZZA, G.; MEGGIO, F.; PINNA, L.A. **The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update**. Journal of Biochemistry, v. 415, p. 353-365, 2008. DOI: 10.1042/BJ20080309

PALMEIRA FILHO, P.; PIMENTEL, V.; GOMES, R.; LANDIM, A.; PIERONI, J.,

Saúde como desenvolvimento: perspectivas para atuação do BNDS no complexo industrial da saúde, BNDS Setorial – Complexo Industrial da Saúde, p. 301-332. Rio de Janeiro, 2012

PAULI, F. P.; BARREIRO, E. J.; BARBOSA, M. L. C. **Características Estruturais das Proteínas Cinases e Seus Inibidores em Uso Clínico**. Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (5), 1280-1303

PINNA, L. A. (1990) **Casein kinase 2 : an ‘ eminence grise ’ in cellular regulation?** Biochim. Biophys. Acta 1054, 267–284

PONGRACZ, J., CLARK, P., NEOPTOLEMOS, JP & LORD, JM. **Expression of protein kinase C isoenzymes in colorretal cancer tissue and your diferencial ativação by diferentes bile acid**. Int. J. Cancer 61 , 35-39. 1995

PRADEL, PAMELA DA SILVA. **estudo computacional de compostos inibidores de enzima caseína quinase 2 com atividade antitumoral potencial.** Trabalho de conclusão de curso. UNIPAMPA. 2020

PRUDENT R, COCHET C. **New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box.** Chem Biol. 2009 Feb 27;16(2):112-20.

RABALSKI AJ, GYENIS L, LITCHFIELD DW. **Molecular Pathways: Emergence of Protein Kinase CK2 (CSNK2) as a Potential Target to Inhibit Survival and DNA Damage Response and Repair Pathways in Cancer Cells**. Clin Cancer Res. 2016 Jun 15;22(12):2840-7

REDDELL, PW & GORDON, VA. **TIGLIEN-3-ONE DERIVATIVES.** Patente internacional número WO 2007/070985 A1. WO 2007/070985 A1 (2007).

ROCCA, ANDREA. ALBERTO FAROLFI, SARA BRAVACCINI, ALESSIO SCHIRONE & DINO AMADORI (2014). **Palbociclib (PD 0332991): targeting the cell cycle machinery in breast cancer**. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 15:3, 407-420,

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P., **Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos**, Revista Virtual de Química, v. 4, n. 6, p.739- 736, dez., 2012.

RUYCK, J.; BRYSBAERT, G.; BLOSSEY, R.; LENSINK, M.F. Adv. Appl. Bioinform. Chem. 9, 1–11, 2016.

RUZZENE M, PINNA LA. **Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells?** Biochim Biophys Acta. 2010 Mar;1804(3):499-504.

SIDDIQUI-JAIN A, DRYGIN D, STREINER N, CHUA P, PIERRE F, O'BRIEN SE, BLIESATH J, OMORI M, HUSER N, HO C, PROFFITT C, SCHWAEBE MK, RYCKMAN DM, RICE WG, ANDERES K. **CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy**. Cancer Res. 2010 Dec 15;70(24):10288-98. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1893. PMID: 21159648.

SILVA, B. V .; HORTA, B.A.C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. **Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos.** Quím. Nova. 2009, vol.32, n.2, pp.453-462. ISSN 1678-7064

SCHNEIDMAN-DUHOVNY D, DROR O, INBAR Y, NUSSINOV R, WOLFSON HJ. **PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. Nucleic Acids Res**. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W223-8.

SHOICHET, BK. **Virtual screening of chemical libraries**. Nature. 2004 Dec 16;432(7019):862-5.

SUGA, K., SUGIMOTO, I., ITO, H. & HASHIMOTO, E. **Regulação negativa da proteína quinase C-alfa detectada em câncer colorretal humano**. Biochem.

Mol. Biol. Int. 44 , 523-528.1998

SUNSERI J, KOES DR. **Pharmit: interactive exploration of chemical space. Nucleic Acids** Res. 2016 Jul 8;44(W1):W442-8.

TAIPEI e SAN DIEGO , 2 de novembro de 2020 / PRNewswire / - Senhwa Biosciences, Inc. (TPEx: 6492).

TAFT, C. A; DA SILVA, C. H. T. P.; CURRENT. **Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**, 1a. ed., Research Singpost: Kerala, 2008.

TREMBLEY JH, WANG G, UNGER G, SLATON J, AHMED K. **Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology**. Cell Mol Life Sci CMLS. 2009; 66 (11–12): 1858–67.

TUAZON PT, TRAUGH JA. **Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation**. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. 1991; 23():123-64.

VAN GUSTEN, W. F., and H. J. C. BERENDSEN. 1987. **GROMOS: Groningen Molecular Simulation Computer Program Package**. University of Groningen, Groningen, the Netherlands

XIONG Y, ZHOU L, SU Z, SONG J, SUN Q, LIU SS, XIA Y, WANG Z, LU D. **Longdaysin inhibits Wnt/β-catenin signaling and exhibits antitumor activity against breast cancer**. Onco Targets Ther. 2019 Feb 5;12:993-1005.

XU Y, WANG S, HU Q, GAO S, MA X, ZHANG W, SHEN Y, CHEN F, LAI L, PEI J. **CavityPlus: a web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction**. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2;46(W1):W374-W379.

WAN, Y., LONG, J., GAO, H., TANG, Z**. 2-Aminothiazole: a privileged scaffold for the discovery of anti-cancer agents**. European Journal of Medicinal

Chemistry, 112953, Xiangtan, 2020.

WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry London: Academic Press. 2003.

ZHENG X., GAN L., WANG E., WANG J. **Pocket-based drug design: exploring pocket space**. AAPS J. 2013; 15:228–241.