

15^o Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL PARA INIBIR A VIA WNT ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS ASSISTIDO POR FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS.

PEDRO ROBERTO PEREIRA DO RÊGO BARROS¹
EMANUELLA MARIA BARRETO FONSECA²

¹ Graduando em licenciatura em química no IFSP, Campus Campinas, pereira.roberto@aluno.ifsp.edu.br

² Doutora em Química pela UNICAMP e docente do IFSP, Campus Campinas, emanuella.fonseca@ifsp.edu.br

RESUMO: Atualmente o câncer é considerado como um problema de saúde mundial. No Brasil, as expectativas são de 700 mil casos/ano até 2025. Apesar do cenário pessimista, os investimentos em pesquisa para o seu tratamento são baixos. Um caminho é a busca por inibidores de alvos macromoleculares, ou seja, compostos que inibam a ação de determinadas proteínas ao “ligar-se” a elas. Esforços e pesquisas apontam que a Via Wnt possui grande importância na replicação de células tumorais. Um dos desafios dessa via é a reprovação dos protótipos nos testes de toxicidade. Outra problemática é que a síntese de novos compostos ativos é um processo custoso, sendo o reposicionamento de fármacos (aprovados ou em fase clínica) uma estratégia interessante para economizar tempo e recursos. A realização deste trabalho visou a busca de moléculas similares ao LGK974, fármaco em fase experimental que interrompe a Via Wnt, com métodos *in silico*, como a docagem e estudos de similaridade. Cinco compostos foram identificados com potencial para inibir a via Wnt através de análises de similaridade química, eletrostática e estudos de docagem molecular.

PALAVRAS-CHAVE: câncer; reposicionamento de fármacos; LGK974; docagem.

IDENTIFICATION OF COMPOUNDS WITH THE POTENTIAL TO INHIBIT THE WNT SIGNALING PATHWAY THROUGH DRUG DESIGN ASSISTED BY COMPUTATIONAL TOOLS.

ABSTRACT: In modern days, cancer is considered a global health issue. In Brazil, the projections estimate 700,000 cases per year by 2025. Despite this pessimistic scenario, research investments for its treatment remains low. One approach involves the search for inhibitors of macromolecular targets, i.e., compounds that inhibit the action of specific proteins by "binding" to them. Efforts and studies indicate that the Wnt pathway plays a significant role in the replication of tumor cells. One challenge faced by the studies of this pathway is the failure of prototypes in the toxicity tests. Another issue is that the synthesis of new active compounds is a costly process. Thus, drug repositioning — using approved and experimental drugs — emerges as an interesting strategy to save time and resources. This study aimed to search for molecules like LGK974, an experimental drug that disrupts the Wnt pathway, using *in silico* methods, such as docking and similarity studies. Five compounds were identified with potential to inhibit the Wnt pathway through chemical and electrostatics similarity analysis and molecular docking studies.

KEYWORDS: cancer; drug repositioning; LGK974; docking.

INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como um complexo ecossistema, chamado de microambiente tumoral (do inglês: TME, *tumor microenvironment*), onde há mudanças genéticas e as diversas interações que ocorrem entre células não-tumorais e o tumor. Partindo dessa complexidade, diversos fatores são determinantes para a formação, desenvolvimento e a metástase (De Visser *et al.* 2023).

Estima-se que o número de pacientes afetados pelo câncer no triênio de 2023-2025 aumente em 703 mil ocorrências apenas no Brasil (INCA, 2022). Nesse prisma, ganha destaque o câncer de cólon e reto, que corresponde a 9,2% dos novos casos, sendo o terceiro mais incidente no país. Contudo, conforme Musherda Begum *et al* (2023), os investimentos públicos brasileiros negligenciam a pesquisa para o tratamento de câncer de cólon e reto, apesar do cenário pessimista. O que indica que é necessário buscar medidas para o controle da situação.

Diversos estudos apontam diferentes possibilidades para o tratamento de tumores malignos, tais como a via Hedgehog. Porém, graças à complexidade dessas vias de sinalização, muitos dos fármacos produzidos para interagir com elas não passam das fases iniciais de testes clínicos. Entretanto, a via Wnt — que é um alvo interessante, pois sua desregulação está diretamente correlacionada com os processos do câncer — tem seus componentes disponíveis para estudos, e um composto em desenvolvimento chamado LGK974, que é capaz de inibir a via, e está em fase clínica (Xie *et al.*, 2020; Moshawih *et al.*, 2022).

O objetivo deste estudo é buscar, via métodos computacionais, fármacos aprovados ou em fase experimental que se assemelham ao LGK974, visando a melhora do tratamento ao concentrar em apenas um medicamento, ao invés de vários, evitando, dessa forma, interações fármaco-fármaco indesejadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste trabalho baseou-se em métodos *in silico*, dentro do campo da bio/quimioinformática, onde se encontra os estudos sobre planejamento racional de fármacos *Ligand Based Drug Design* (LBDD, do inglês: Planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante) e também *Structure-based drug design* (SBDD, do inglês: Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor) conforme etapas a seguir:

1. Montagem do banco de fármacos comercial:

O banco de estruturas comerciais, DrugBank, foi selecionado. Os compostos foram preparados com o programa FILTER, que faz parte do pacote OMEGA, com o objetivo de corrigir o estado de protonação em pH fisiológico dos fármacos e, possibilitar, posteriormente, não apenas traçar o perfil do banco de dados utilizado mas, também, produzir uma coleção multiconformacional dos compostos

para o estudo de similaridade de forma (FILTER 4.2.2.0. e OMEGA 4.2.2.0. OpenEye, Cadence Molecular Sciences, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>.) (Hawkins *et al.*, 2010).

2. Similaridade de forma e eletrostática:

A partir do composto LGK974 realizou-se estudos de similaridade. Para isso, utilizou-se o programa ROCS, que opera com base na comparação de formas moleculares, partindo da ideia que moléculas têm formatos semelhantes quando possuem volumes que se sobrepõem de forma compatível. Enquanto a similaridade eletrostática foi feita adicionalmente para complementar as informações obtidas pela similaridade de forma, e realizada pelo programa EON, onde é feita uma comparação e o mapeamento do potencial eletrostático dos compostos alinhados anteriormente (EON 2.4.1.0. e ROCS 3.6.0.0. OpenEye, Cadence Molecular Sciences, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>) (Hawkins *et al.*, 2007).

3. Similaridade por múltiplos descritores:

De modo paralelo, utilizando o servidor DrugRep, que usa como algoritmo o LigMate, comparou-se o composto de interesse (LGK974) com o banco de fármacos comerciais do próprio servidor. Dentre as informações analisadas estão: centro de massa, subestrutura em comum, diferenças em anéis/ciclos e distância atômica intra-ligante (Grimm *et al.*, 2020; Gan *et al.*, 2023).

4. Análise visual comparativa:

Após as etapas anteriores, uma análise visual foi realizada com o foco de selecionar os 20 melhores compostos destacados nas métricas de similaridade utilizadas. Descarta-se nessa etapa os compostos que não possuem semelhanças significativas com o modelo que se busca.

5. Docagem molecular:

A docagem molecular possui 3 questões a serem abordadas: A representação do sistema, a busca no espaço conformacional e a pontuação dos potenciais candidatos (que foram selecionados nas etapas anteriores). As estruturas tridimensionais da proteína alvo do composto LGK974 foram avaliadas e, a de melhor qualidade (PDB ID 7URD, Liu *et al.*, 2022), selecionada para prosseguir com os estudos de docagem (Berman *et al.*, 2000). O programa FRED (FRED 3.3.0.3. OpenEye, Cadence Molecular Sciences, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>., McGann, 2011) com a função *chemgauss4*, foi utilizado durante esta etapa. O composto LGK974 foi re-docado de modo a reproduzir a estrutura experimental, agora considerando um desvio de até 2Å. Os parâmetros selecionados foram então utilizados para a docagem dos 20 melhores compostos obtidos no estudo de similaridade. A análise finaliza com outra inspeção visual, que visa entender as interações proteína-ligante a partir do sítio ativo da proteína e eliminar inconsistências.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As filtrações realizadas foram compiladas para a comparação das propriedades de interesse dos compostos, definidas por: MW - massa molecular; HBD - átomos doadores de ligação de hidrogênio; HBA - átomos aceitadores de ligação de hidrogênio, RB - ligações rotacionáveis; PSA - área superficial polar; xlogP - coeficiente de partição. Tomando como princípio a regra dos 5 Lipinski (Lipinski *et. al*, 1997) — que delimita esses fatores ao compará-los com fármacos que possuem êxito — grande parte dos candidatos se encaixam, portanto possuem MW<500, HBD<5, HBA<10, xlogP entre -0,5 e 5,6, RB<10 e PSA<140. Apesar disso, nenhum composto foi descartado nesta etapa, pois existem fármacos em fase clínica que infringem múltiplos critérios.

Subsequentemente, todos os compostos foram submetidos a análises de similaridade estrutural (ROCs) e, este arquivo gerado foi utilizado para o cálculo da similaridade eletrostática (EON), em relação ao LGK974. A análise estrutural revela que grupos amidas e anéis aromáticos se apresentam em todos os 20 melhores ranqueados, onze apresentam átomos de halogênios e seis apresentam ciclos conjugados. Enquanto a análise consensual realizada pelo DrugRep apresentou divergências consideráveis quanto aos compostos selecionados, o que era esperado, dado que a análise do servidor leva em consideração apenas a estrutura 3D, e não considera as características eletrostáticas dos compostos. A seleção pelo DrugRep resultou em compostos principalmente com átomos de halogênios, grupos de amidas e anéis aromáticos.

Todos os compostos selecionados pela análise consensual dos estudos de similaridade foram então docados na proteína alvo do composto de referência (LGK974) e apresentaram posições similares no sítio de interação (FIGURA 1).

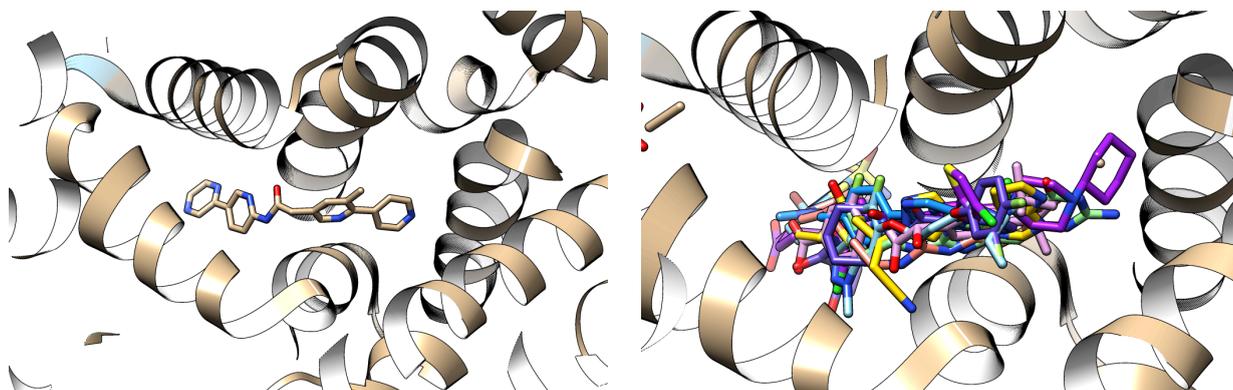


FIGURA 1. Composto LGK974 e os 20 melhores compostos sobrepostos, ambos dentro do sítio de interação.

Dentre os fármacos selecionados, dois se destacam. O primeiro será objeto de estudo em um projeto posterior, portanto não será divulgado neste momento. O segundo melhor, DB02139, apresentou resultados acima da média quando comparado com os demais (FIGURA 2). Dentro do sítio, seu posicionamento se assemelhou ao LGK974 (FIGURA 3). Foram observadas interações do

tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Ser332 e de van der Waals (apolares) com os resíduos: His336, Phe246, Phe313, Val297, Val325, Leu308, Leu346, Tyr329, Trp300, Trp304.

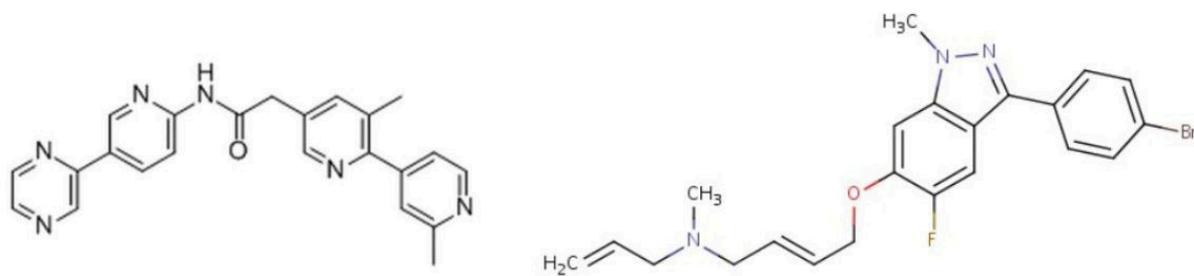


FIGURA 2. Diagrama 2D, respectivamente, dos compostos LGK974 e DB02139.

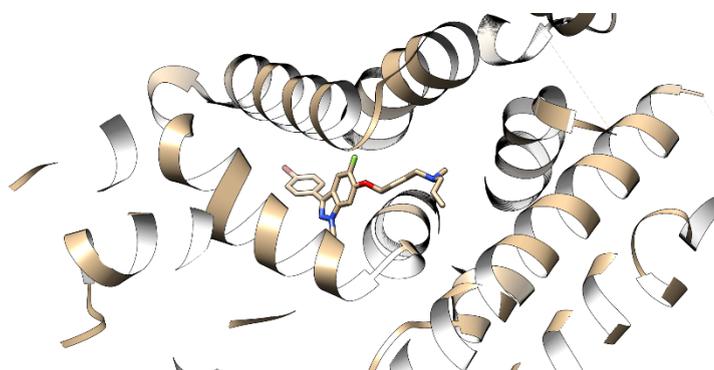


FIGURA 3. Posição do composto DB02139 no sítio ativo após a docagem.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através das diversas análises *in silico* realizadas neste estudo apontaram para compostos promissores com características semelhantes ao fármaco LGK974. Destaca-se para o composto não declarado e DB02139, que apresentaram interações favoráveis dentro do sítio-alvo, reforçando a viabilidade de estudos futuros para avaliação experimental. Embora as abordagens computacionais ofereçam uma base sólida para a seleção de potenciais candidatos a fármacos, é importante salientar que estas ferramentas não substituem a validação experimental, sendo imprescindíveis estudos *in vitro* e *in vivo* para confirmação da eficácia e segurança dos compostos identificados. Portanto, o próximo passo será a condução de estudos experimentais que possam corroborar os dados obtidos deste projeto e fornecer mais informações sobre o potencial terapêutico dos compostos selecionados.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram com o desenho experimental, análise e escrita dos dados bem como a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pelo investimento cedido ao projeto, que permitiu a sua realização. Agradecem também à OpenEye Scientific Software Inc e DrugBank pela licença acadêmica.

REFERÊNCIAS

- BEGUM, M.; LEWISON, G.; WANG, X.; DUNNE, P. D.; MAUGHAN, T.; SULLIVAN, R.; LAWLER, M. Global colorectal cancer research, 2007-2021: Outputs and funding. *International Journal of Cancer*, v. 152, n. 3, p. 470-479, 2023.
- BERMAN, H. M.; BHAT, T. N.; BOURNE, P. E.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; WEISSIG, H.; WESTBROOK, J. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature Structural Biology*, v. 7, supl., p. 957-959, 2000.
- VISSER, K. E. de; JOYCE, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, v. 41, n. 3, p. 374-403, 2023.
- GAN, J.-H.; LIU, J.-X.; LIU, Y.; CHEN, S.-W.; DAI, W.-T.; XIAO, Z.-X.; CAO, Y. DrugRep: an automatic virtual screening server for drug repurposing. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 44, n. 4, p. 888-896, 2023.
- GRIMM, M.; LIU, Y.; YANG, X.; BU, C.; XIAO, Z.; CAO, Y. LigMate: A multifeature integration algorithm for ligand-similarity-based virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 60, n. 12, p. 6044-6053, 2020.
- HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 1, p. 74-82, 2007.
- INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160p.
- LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 1997.
- LIU, Y.; QI, X.; DONNELLY, L.; ELGHOBASHI-MEINHARDT, N.; LONG, T.; ZHOU, R. W.; SUN, Y.; WANG, B.; LI, X. Mechanisms and inhibition of Porcupine-mediated Wnt acylation. *Nature*, v. 607, p. 816–822, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04952-2>.
- MCGANN, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 51, n. 3, p. 578-596, 2011.
- MOSHAWIH, S.; LIM, A. F.; ARDIANTO, C.; GOH, K. W.; KIFILI, N.; GOH, H. P.; JARRAR, Q.; MING, L. C. Target-Based Small Molecule Drug Discovery for Colorectal Cancer: A Review of Molecular Pathways and In Silico Studies. *Biomolecules*, v. 12, p. 29, 2022.
- XIE, Y.-H.; CHEN, Y.-X.; FANG, J.-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 22, 2020.