



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOSIANE VIANA CRUZ

**Identificação de novos inibidores do Receptor de Interação de
Proteína Tirosina Quinase 2 com potencial atividade anti-
inflamatória através do ensino da Química Medicinal**

Macapá
2018

JOSIANE VIANA CRUZ

**Identificação de novos inibidores do Receptor de Interação
de Proteína Tirosina Quinase 2 com potencial atividade anti-
inflamatória através do ensino da Química Medicinal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Cleydson Breno Rodrigues dos Santos

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Bibliotecária Orinete Costa Souza CRB-11/920

616.7

C957i Cruz, Josiane Viana.

Identificação de novos inibidores do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 com potencial atividade anti-inflamatória através do ensino da Química Medicinal / Josiane Viana Cruz; orientador, Cleydson Breno Rodrigues dos Santos. – Macapá, 2018.

64 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. RIPK2. 2. Ponatinibe. 3. WEHI-345. 4. Artrite reumatoide. 5. Anti-inflamatório. I. Santos, Cleydson Breno Rodrigues dos, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Josiane Viana Cruz

Orientador(a): Cleydson Breno Rodrigues dos Santos

Cleydson Breno Rodrigues dos Santos

Cleydson Breno Rodrigues dos Santos

Presidente

Professor Adjunto do Curso de Biologia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP

Rosivaldo dos Santos Borges

Rosivaldo dos Santos Borges

Membro Titular

Professor Adjunto do curso de Farmácia da Universidade Federal do Pará, UFPA

Alessandra Azevedo do Nascimento

Alessandra Azevedo do Nascimento

Membro Titular

Professora Adjunta do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Data: 09/03/2018

Dedico este trabalho aos meus pais que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida e por conduzir meus pensamentos.

Aos meus pais, Francisco de Oliveira Cruz e Izabel Maria Viana Cruz por serem o meu alicerce. Aos meus irmãos Francilene, Eliane, Patricia e Junior por serem essenciais em minha vida. Ao Jean Carlos Vilhena por me incentivar e fornecer todo o apoio e carinho nesta conquista.

Aos meus sobrinhos João Pedro, Gael e Ana Paula por despertar em mim o sentimento mais puro que existe.

Ao meu orientador prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos, por confiar em meu potencial e ter me dado a chance de alcançar esse sonho.

A Universidade Federal do Amapá-UNIFAP e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- PPGCF pela estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório de Modelagem e Química Computacional, Universidade Federal do Amapá, pelo suporte fornecido durante o percurso deste estudo.

Ao prof. Dr. Franco Henrique Andrade Leite e Moysés Fagundes de Araújo Neto através do Laboratório de Modelagem Molecular, Universidade Estadual de Feira de Santana pela estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, através do Laboratório de Química Farmacêutica Computacional, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Aos companheiros de laboratório em especial Rozires Leão, Josivan Costa, Ryan Ramos e Luciane Barros por terem contribuído de forma marcante com o meu estudo. Aos meus amigos de turma Inana Fauro, Priscilla Ozela e Pedro Fauro por todo o companheirismo durante esses dois anos.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	ARTRITE REUMATOIDE.....	13
1.2	MECANISMO INFLAMATÓRIO E ARTRITE REUMATOIDE.....	14
1.3	FÁRMACOS QUE ATUAM NO TRATAMENTO DA DOENÇA.....	16
1.4	RECEPTOR DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASE 2 - RIPK2.	18
1.5	INIBIDORES DO RECEPTOR DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASE 2: PONATINIBE E WEHI-345.....	21
1.6	MÉTODOS ENVOLVIDOS NO PLANEJAMENTO RACIONAL <i>IN SÍLICO</i> DOS FÁRMACOS.....	25
1.7	TRIAGEM VIRTUAL.....	27
1.8	FARMACÓFORO.....	28
1.9	GALAHAD - ALGORITMO GENÉTICO COM ATRIBUIÇÃO LINEAR PARA ALINHAMENTO HIPERMOLECULAR DE CONJUNTOS DE DADOS.....	29
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	ARTIGO 1 - Identification of Novel Protein Kinase Receptor Type 2 Inhibitors Using Pharmacophore and Structure-Based Virtual Screening.....	31
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Articulação humana com comportamento alterado por artrite reumatoide.....	14
Figura 2-	Articulação normal (A) artrite reumatoide inicial (B) artrite reumatoide tardia (C).....	16
Figura 3-	Classificação dos fármacos utilizados no tratamento da Artrite Reumatoide.....	17
Figura 4-	Caracterização estrutural do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 - RIPK2. O inibidor Ponatinibe ligado ocupa a bolsa de ATP estabelecida entre os lóbulos N-terminal e C-terminal da proteína quinase. Proteína do domínio quinase em humano complexada no PDB de código 4C8B.....	20
Figura 5-	Estrutura química 2D do composto Ponatinibe.....	22
Figura 6-	Interações dos resíduos de aminoácidos do RIPK2 complexado ao Ponatinibe, através do servidor Discovery studio, de acordo com a estrutura cristalográfica depositada no PDB sob o código 4C8B.....	23
Figura 7-	Estrutura química 2D do composto WEHI-345.....	25
Figura 8-	Fases do planejamento de um fármaco.....	26
Figura 9-	Modelos farmacofóricos em diferentes servidores.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Fármacos utilizados no tratamento da Artrite Reumatoide.....	17
Tabela 2-	Códigos PDB relacionados ao Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quínase 2 (RIPK2)	21
Tabela 3-	Inibidores do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase – RIPK2 disponíveis atualmente	24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1-	Normas de publicação do periódico.....	64
-----------------	----------------------------------------	----

SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AINEs	Anti-Inflamatórios Não-Esteroides
AR	Artrite Reumatoide
ATP	Adenosina Trifosfato
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region - Abelson Murine Leukemia
Células T CD4 ⁺	Células T de Cluster de Diferenciação 4
DARMDs	Drogas Antirreumáticas Modificadoras da Doença
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
FDA	Food and Drug Administration
GALAHAD	Algoritmo Genético com Atribuição Linear para Alinhamento Hiper molecular de conjunto de Dados
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Inhibitor Concentration 50%
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
NOD1	Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 1
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2
PDB	Protein Data Bank
PhS	Pharmacophoric Similarity
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relations
RIPK2	Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 2
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Structure-Activity Relations
SE	Strain Energy
SH2	Src Homology 2
SO	Steric Overlap
TNF- α	Tumor Necrosis Factor - alpha

Identificação de novos inibidores do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 com potencial atividade anti-inflamatória através do ensino da Química Medicinal

Introdução: O Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 (RIPK2) desempenha um papel importante na patogênese das doenças inflamatórias, que sinaliza a jusante dos sensores intracelulares Nucleotídeos de Oligomerização de Domínio 1 e 2 (NOD1 e NOD2) para promover uma resposta inflamatória produtiva. No entanto, a sinalização excessiva de NOD2 tem sido associada a várias doenças, incluindo doença de sarcoidose e artrite reumatoide, de modo que a inibição farmacológica de RIPK2 é uma estratégia de afinidade que demonstra uma expressão aumentada de atividade de secreção pró-inflamatória.

Objetivo: Assim, o objetivo deste estudo foi planejar novos inibidores do RIPK2 com potencial atividade anti-inflamatória em artrite reumatoide. **Metodologia:** Foi construído um modelo farmacofórico baseado na pose cristalográfica do Ponatinibe, um potente inibidor de RIPK2 e outros 30 inibidores selecionados a partir do banco de dados BindingDB. A seleção dos compostos foi realizada a partir da base de dados ZINC através de compostos disponíveis, seguida de previsões *in silico* farmacocinética, toxicológica e atividade biológica potencial dos compostos selecionados. Em seguida, o acoplamento molecular foi realizado para identificar as prováveis interações, bem como a afinidade de ligação com RIPK2. Após, realizou-se a sobreposição molecular dos compostos aqui selecionados e foram analisados em relação ao Ponatinibe e WEHI-345, também usado como controle. E por conseguinte, determinou-se a viabilidade do composto ser sintetizado. Resultados e **discussões:** Após cálculos, o composto ZINC91881108 mostrou uma análise farmacocinética e toxicológica *in silico* dentro dos parâmetros estabelecidos e afinidade de ligação boa quando comparada à pose cristalográfica de WEHI-345 em complexo com RIPK2. **Conclusões:** Esse composto também possui acessibilidade sintética moderada, resultando em um potencial e promissor inibidor de RIPK2 para ser investigado com interesse em diferentes doenças, em especial as inflamatórias.

Palavras-Chave: RIPK2; Ponatinibe; WEHI-345; Artrite reumatoide; Anti-inflamatório.

Agradecimentos: LMQC, UEFS, FCFRP, PPGCF.

Identification of new inhibitors of the Protein Tyrosine Kinase 2 Interaction Receptor with potential anti-inflammatory activity through the teaching of Medicinal Chemistry

Introduction: The Receptor Interacting tyrosine Kinase 2 (RIPK2) plays an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases, which signals downstream of intracellular sensors nucleotide-binding oligomerization domain 1 and 2 (NOD1 and NOD2) to promote a productive inflammatory response. However, excessive NOD2 signaling has been associated with several diseases, including sarcoidosis disease and rheumatoid arthritis, so that the pharmacological inhibition of RIPK2 is an affinity strategy that demonstrates an increased expression of proinflammatory secretion activity. **Objective:** Thus, the purpose of this study was to plan new inhibitors of RIPK2 with potential anti-inflammatory activity in rheumatoid arthritis. **Methodology:** A pharmacophoric model was constructed based on the crystallographic pose of Ponatinib, a potent inhibitor of RIPK2 and another 30 inhibitors selected from the BindingDB database. The selection of the compounds was performed from the ZINC database through available compounds, followed by pharmacokinetic, toxicological and biological activity predictions potential of the selected compounds. Then, the molecular coupling was performed to identify the likely interactions as well as binding affinity for RIPK2. Thereafter, the molecular overlap of the compounds selected herein and were analyzed for Ponatinib and WEHI-345, also used as a control. And therefore, the viability of the compound to be synthesized was determined. **Results and discussion:** After calculations, the compound ZINC91881108 showed a pharmacokinetic and toxicological analysis in silica within the established parameters and good binding affinity when compared to the crystallographic pose of WEHI-345 in complex with RIPK2. **Conclusions:** This compound also has moderate synthetic accessibility, resulting in a potential and promising inhibitor of RIPK2 to be investigated with interest in different diseases, in particular the inflammatory.

Keywords: RIPK2; Ponatinib; WEHI-345; Virtual Screening; Rheumatoid Arthritis; Anti-inflammatory.

Acknowledgements: LMQC, UEFS, FCFRP, PPGCF.

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

O Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 (RIPK2) desempenha um papel essencial na resposta imune e é sugerido como alvo em doenças inflamatórias, tais como a doença de Crohn, doença inflamatória do intestino, asma e artrite (TIGNO-ARANJUEZ et al., 2014).

Os primeiros indícios da Artrite Reumatoide (AR) foram relatados em esqueletos indígenas datados de 4.500 a.C., descobertos no presente estado norte-americano do Tennessee. Em 1591 foi estabelecida a primeira escritura específica sobre AR através de Guillaume de Baillou, um médico da faculdade de medicina da Universidade de Paris. Para então, em 1859 o inglês Alfred Baring Garrod, denominar o termo “artrite reumatoide” (SILVA, 2009).

De acordo com dados do ministério da saúde AR é uma doença autoimune, inflamatória, sistêmica e crônica (BRASIL, 2015). Os dados no Brasil sobre esta doença são limitados, bem como os casos relacionados ao curso clínico, os sintomas extra-articulares e os desfechos (ALMEIDA; ALMEIDA; BERTOLO, 2014; DAVID et al, 2013; MOURA et al, 2012).

A AR é predominante no sexo feminino, com preponderância de aproximadamente, 1% na população brasileira, que é equivalente aos dados relatados na literatura mundial, considerada bastante heterogênea, em termos de gravidade, com tendência a surgir após a quarta década de vida (BRENOL et al, 2007). No Amapá, de acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde do IBGE (2013), conta-se com aproximadamente, por amostragem, um total de 8,2% de pessoas com diagnóstico médico de artrite reumatoide (IBGE, 2014).

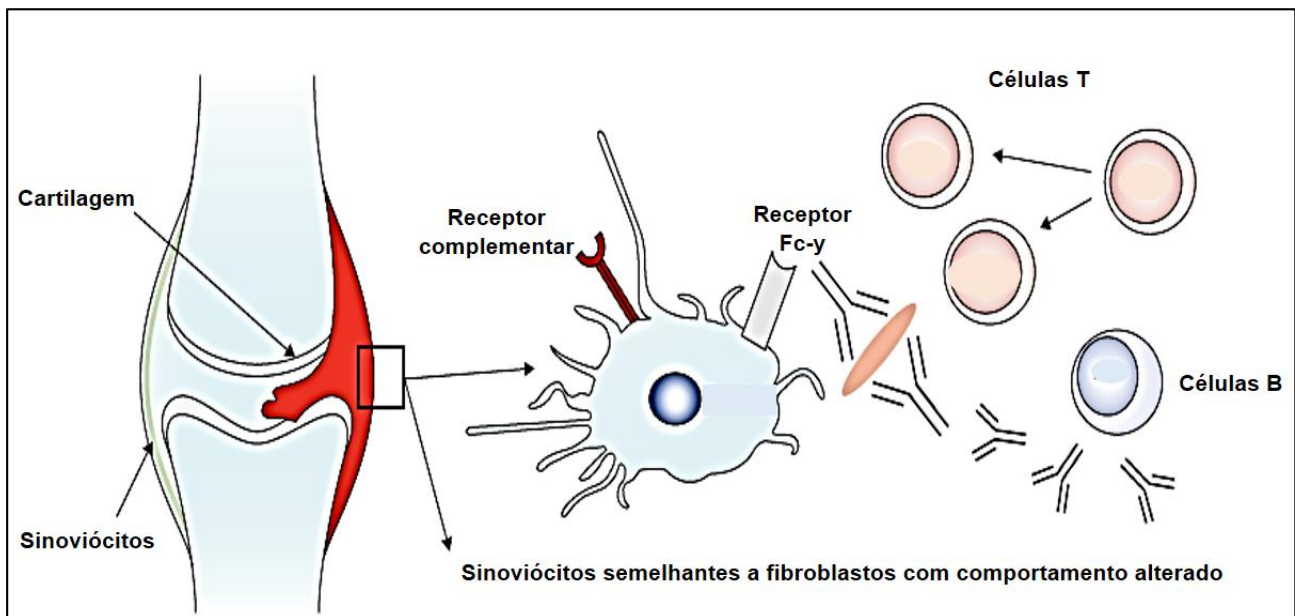
Os aspectos físicos, psicológicos e sociais podem ser afetados em um indivíduo que possui AR, pois em sua fase tardia, representa uma enfermidade de grande impacto na qualidade de vida de uma pessoa, em relação à outras enfermidades (FERREIRA et al, 2008; CHORUS et al, 2003; TIJHUIS et al, 2001).

Existem mais de 100 doenças reumáticas que estão associadas a processos patológicos de tecidos conectivos, músculos e ligamentos. Para tanto, o termo artrite constitui qualquer tipo de inflamação e lesão em uma articulação. Assim, no que se refere

à classificação das categorias sobre as causas da artrite, tem-se os aspectos associados ao sistema imunológico, além daqueles associados à degeneração das articulações e por fim, os aspectos metabólicos e depósito de cristais nas articulações (PANUS et al, 2011).

A articulação humana é formada por sinoviócitos, tipo fibroblastos que produzem um líquido sinovial. Quando esta é afetada pela artrite reumatoide, nota-se um infiltrado e um inchaço com a presença de sinoviócitos tipo: fibro-tipo, fibrófagos, macrófagos, várias populações de células T e células B. Os macrófagos são ativados por complexos imunes que se ligam aos receptores Fc- γ e aos receptores complementares, Figura 1 (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

Figura 1 - Articulação humana com comportamento alterado por artrite reumatoide.



Fonte: Adaptado de Scott; Wolfe; Huizinga (2010).

Detectou-se o antígeno leucocitário humano, como o principal fator genético no desenvolvimento da AR (BRASIL, 2015). A gravidade e a incidência da AR tem a ver também, com o nível socioeconômico e o estágio de desenvolvimento dos países, além dos fatores genéticos e ambientais. Esses estudos sugerem que pacientes com AR com diferente origem étnica podem exibir distintas manifestações e desfechos (ALMEIDA; ALMEIDA; BERTOLO, 2014).

1.2 MECANISMO INFLAMATÓRIO E ARTRITE REUMATOIDE

O processo inflamatório advém a partir de uma lesão, infecção e estresse físico ou químico. O qual impulsiona fatores de transcrição que monitoram a expressão de vários

intervenientes inflamatórios (CRAIG; STITZEL, 2011). Nesse sentido, no processo inflamatório, há participação de vários mediadores a exemplo de: citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1, IL-8), prostaglandinas, leucotrienos e peptídios liberados das terminações nervosas (substância – P) e relacionados ao gene da calcitonina (SAKATA; ISSY, 2008).

Existem três fases da resposta inflamatória, a inicial que envolve aspectos de percepção, a segunda denominada de platô que está relacionada a mecanismos efetores e a fase de resolução que é a final, onde há a regeneração do tecido original ou, caso não seja possível, à restauração do espaço lesado por fibrose (FUCHS; WANNMACHER, 2010).

O processo de destruição e desativação de organismos invasores no organismo é uma tentativa que surge a partir da formação do processo inflamatório, como forma de retirar os irritantes e preparar o cenário para a restauração tecidual. De modo que, quando a recuperação está completa, normalmente o processo inflamatório cessa. Todavia, pode ocorrer ativação imprópria do sistema imune resultando em inflamação e causando doenças imunomediadas, como por exemplo, a artrite reumatoide (CLARK et al, 2013).

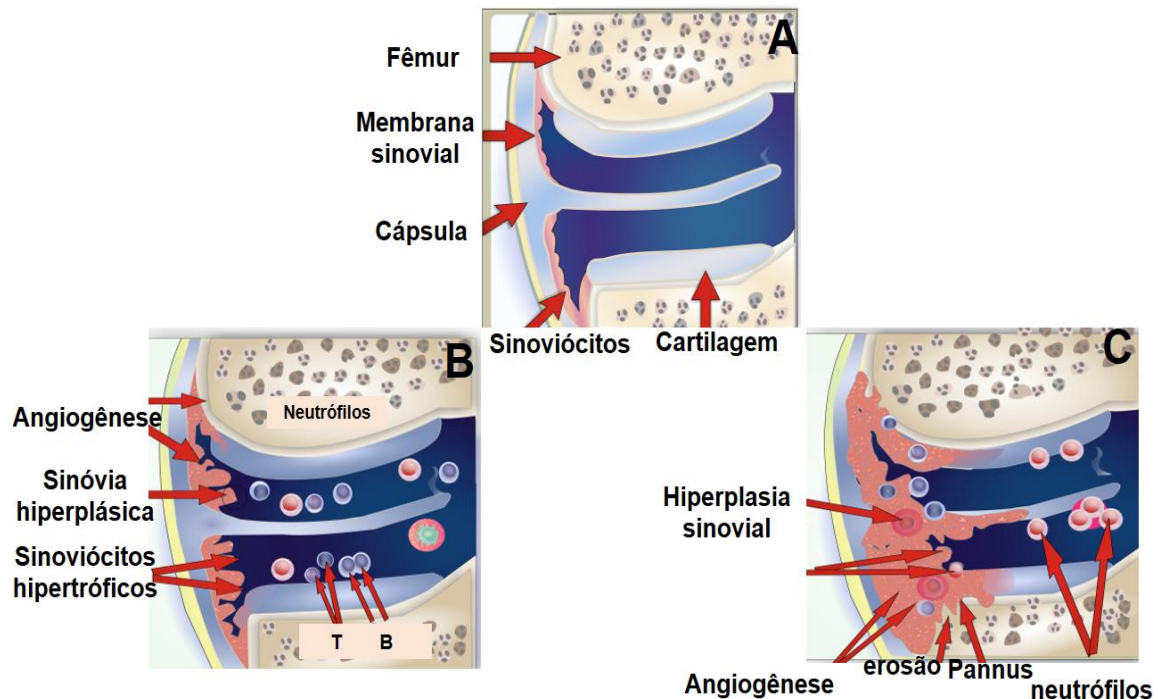
O fato de um processo inflamatório ser considerado autoimune e crônico faz deste um mecanismo fundamental para a lesão do tecido e o aparecimento de doenças idiopáticas a exemplo da artrite reumatoide (AR), que possui o seu sítio de lesão nas articulações diartrodiais (PANUS et al, 2011).

A AR é um processo onde se tem citocinas inflamatórias que mediam uma inflamação crônica da sinóvia das articulações periféricas. Em suma, esse processo ocorre quando células T CD4⁺, que são as principais mediadoras do desenvolvimento da AR, invadem, infiltram a articulação e liberam IL-2, IL-6 e interferon gama, que acabam por ativar células B e macrófagos, que por sua vez, quando essas células B são ativadas liberam o fator reumatoide, que dá início ao dano cartilaginoso e ósseo. Assim, os macrófagos ativados na sinóvia liberam IL-1 e TNF α que degradam a articulação ao ativarem a proliferação de células endoteliais e fibroblastos, a neovascularização e o remodelamento da articulação. De forma que, essas citocinas ativam osteoclastos que causam a proteólise do osso que cerca a articulação (KESTER et al, 2008).

A destruição articular ocorre na membrana sinovial que é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias em combinação com osteoclastos e condrócitos. Logo, projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o pannus, que é característico da AR (FIRESTEIN, 2003; GOELDNER et al, 2011). No líquido sinovial são encontrados neutrófilos que raramente são vistos na membrana sinovial, onde há um extravasamento deste, do sangue, para o espaço

articular. Do mesmo modo, as enzimas dos neutrófilos, juntamente com as que são secretadas por sinoviócitos e condrócitos, levam à degradação da cartilagem (VIEIRA et al, 2015). Na Figura 2, tem-se a representação da articulação normal (A) artrite reumatoide inicial (B) artrite reumatoide tardia (OLIVEIRA, 2011).

Figura 2 - Articulação normal (A) artrite reumatoide inicial (B) artrite reumatoide tardia (C).



Fonte: Adaptado de Oliveira (2011).

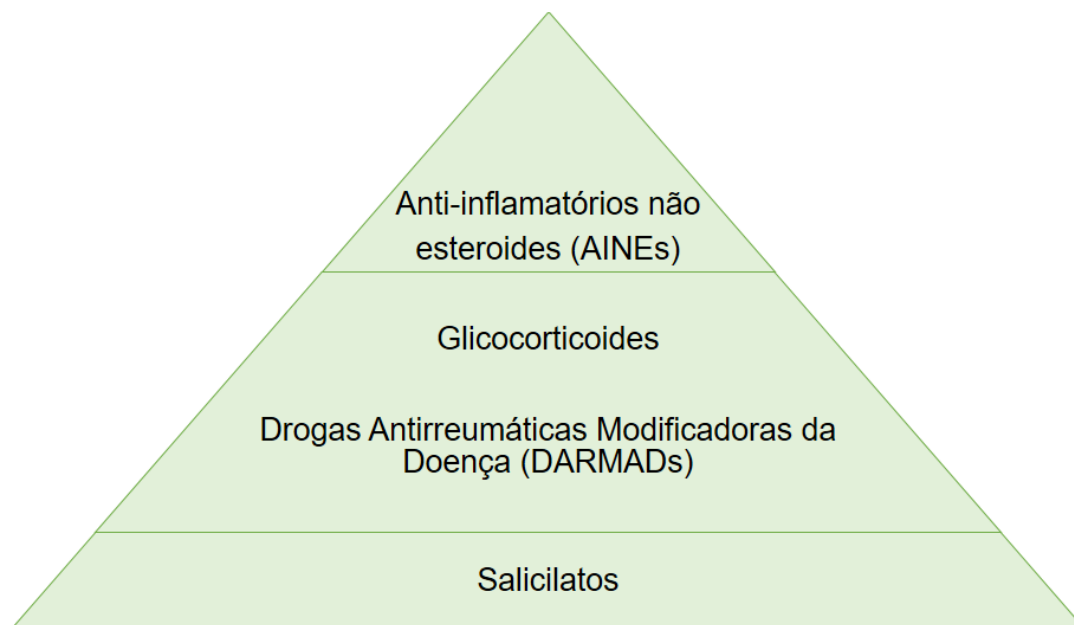
1.3 FÁRMACOS QUE ATUAM NO TRATAMENTO DA DOENÇA

O tratamento da AR, por vários anos, seguiu um modelo em pirâmide, Figura 3. Os salicilatos foram os primeiros fármacos utilizados, pois controlavam a dor e a rigidez (CRAIG; STITZEL, 2011). No que se refere às estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças reumáticas, têm-se fármacos que atuam, apenas, no alívio da dor ou atrasam/interrompem, quando conseguem, qualquer processo de lesão ao tecido de uma pessoa (PANUS et al, 2011).

Vale ressaltar que os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), em relação aos seus efeitos na doença AR, são atribuídos e utilizados por sua eficácia sintomática, pois estão associados ao alívio da dor e a supressão dos sintomas inflamatórios (FUCHS; WANNMACHER, 2010). E os glicocorticoides orais também podem ser usados para reduzir a inflamação crônica nos pacientes com AR (KESTER et al, 2008). Porém, a sua toxicidade associada ao uso crônico restringe a sua utilização para controlar as manifestações agudas

graves, e administração prolongada de baixas doses em pacientes com doença grave não controlada por outros agentes (PANUS et al, 2011).

Figura 3 – Classificação dos fármacos utilizados no tratamento da Artrite Reumatoide



Fonte: Cruz et al. (2017)

Desse modo, fármacos denominados antirreumáticos modificadores da doença (DARMADs) também presentes na Tabela 1, são utilizados no tratamento da AR e são uma categoria de drogas, farmacologicamente não relacionadas, que tem a característica comum de reduzir a remissão ou controle da AR e outras doenças imunomediadas. Além de prevenir a destruição adicional de articulações e dos tecidos envolvidos (CLARK et al, 2013).

Tabela 1 – Fármacos utilizados no tratamento da Artrite Reumatoide

Classificação	Fármacos	Principais mecanismo de ação
Anti-inflamatórios não esteróides (AINE's)	Ibuprofeno Naproxeno	Não seletivos, inibidores da COX-1 e 2 (Batlouni, 2010)
Glicocorticóides	Metilprednisolona Prednisona	Seletivos do receptor de glicocorticoides (Anti; Giorgi; Chahade, 2008)
	Adalimumabe Certolizumabe pegol Etanercepte Infliximabe Golimumabe	Inibe o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (CONITEC, 2012)

Drogas Antirreumáticas Modificadoras da Doença	Abatacepte	Inibe a ativação dos linfócitos T (CONITEC, 2012)
	Rituximabe	Provoca a destruição dos linfócitos B ao se ligar aos marcadores CD20 na superfície dessas células (CONITEC, 2012)
	Tocilizumabe	Inibe a sinalização mediada pelos receptores de interleucina-6 (IL-6) (CONITEC, 2012)

Fonte: Brasil, 2015

1.4 RECEPTOR DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASE 2 - RIPK2

Atualmente, considera-se, aproximadamente, que os seres humanos possuem 58 receptores de proteína tirosina quinase conhecidos, os quais são divididos em vinte subfamílias com um domínio extracelular, uma única hélice transmembrana e uma região citoplasmática que contém o domínio da proteína tirosina (LEITE et al., 2012; LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

As proteínas quinases constituem uma das maiores famílias de proteínas (MANNING et al, 2002). E estas estão subdivididas em categorias de tirosinas quinases receptoras e não receptoras (SILVA et al., 2009), de modo que, as suas alterações químicas e estruturais da proteína são reguladas por um grande número de vias de transdução de sinais em células, até mesmo o controle transcricional (ENGH; BOSSEMEYER, 2001) através da fosforilação da serina, treonina, ou resíduos de tirosina. Nesse sentido, as proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas e no momento em que ocorre a desregulação destas enzimas, esta poderá estar associada a diversas doenças. Logo, para a descoberta de novos fármacos, torna-se interessante entender de forma detalhada o mecanismo de controle das proteínas quinases (SILVA et al, 2009).

Tais alterações sejam elas genéticas ou anormalidades que causem uma desregulação, modificação de atividade, abundância e distribuição celular nas proteínas tirosina quinase, podem ativar sinalizações, as quais têm sido associadas a cânceres, diabetes, inflamação, além de outros distúrbios. Por este fato, tem-se impulsionado como alvo o desenvolvimento de medicamentos que bloqueiam ou amenizam a atividade nestes alvos (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

A interação entre o ligante e o receptor, inicialmente, monomérica ocorre entre o ATP e resíduos de tirosina, devido a dimerização que irá acontecer, e posteriormente, a fosforilação do domínio intracelular de proteínas-alvo com o domínio SH2, que é responsável pela identificação para as fosfotirosinas. Após, há mediações de respostas celulares provenientes da fosforilação intracelular. De modo que, as vias de sinalização são constituídas por reações citoplasmáticas em difíceis interações enzimáticas. Considera-se

que as principais formas de intervenção terapêuticas aplicadas nos receptores de tirosina quinase são através de anticorpos monoclonais e moléculas inibidoras, que podem agir de forma específica ou em vários receptores ao mesmo tempo, através de ligações reversíveis ou irreversíveis (LEITE et al., 2012).

Sob tal enfoque é sabido que algumas doenças a exemplo da artrite reumatoide são moduladas por quinases, logo uma grande maioria de inibidores de proteínas tem sido planejados e modelados para competirem por essa região do sítio ativo. Para tanto, a inibição seletiva de quinases constitui um objetivo de grande interesse para a indústria farmacêutica (LIAO, 2007; VOLPINI, 2010).

Nesse sentido, as técnicas de cristalografia de raios x do complexo proteína-ligante, espectroscopia de RMN e modelagem molecular, são utilizadas no processo iterativo de desenvolvimento do inibidor que pode ser analisado por estruturas tridimensionais de tal modo que permite o fornecimento de informações sobre interações da proteína e do ligante (VAN MONTFORT; WORKMAN, 2009).

Os inibidores agem por métodos irreversíveis e reversíveis, além disso são considerados substâncias químicas que reduzem a velocidade de reações catalisadas por enzimas (COPELAND; ANDERSON, 2001). A concentração de inibição que causa 50% de redução na atividade intrínseca da enzima é denominada de IC_{50} .

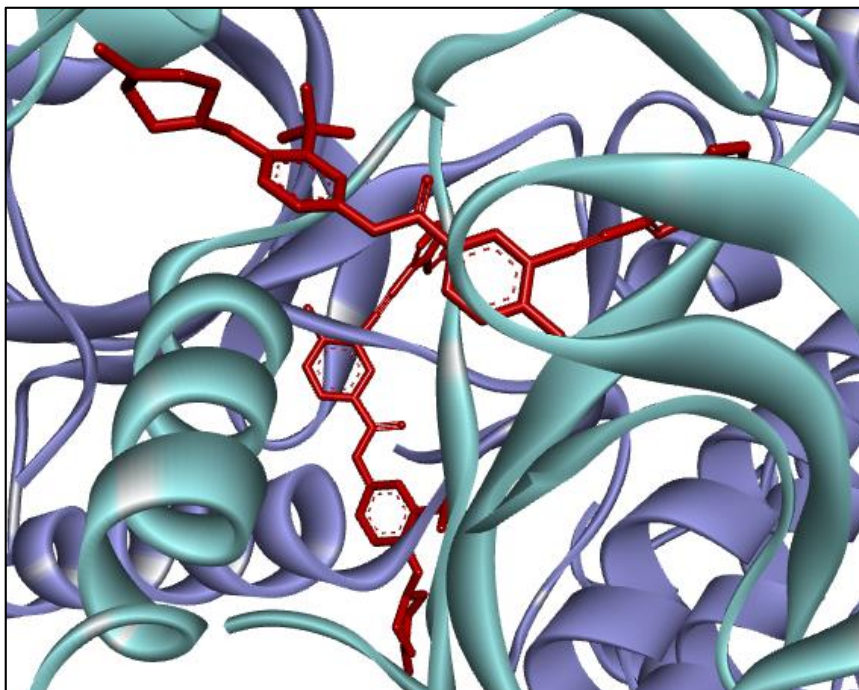
O RIPK2 atua de forma ativa na resposta imune, logo, é considerado um alvo para fármacos em doenças inflamatórias, bem como a AR. Quando o corpo é invadido por bactérias, estas podem ser detectadas por duas proteínas humanas, denominadas de domínios de oligomerização vinculado ao nucleotídeo (NOD1 e NOD2), cujos precisam passar em um sinal que irá ativar uma resposta imune para combater a invasão. Uma causa potencial da doença é, se as proteínas começam a sinalizar NOD constantemente, até mesmo quando não há bactérias em torno, o que é comum acontecer em doenças autoimunes, logo, isto produz então um sinal constante do RIPK2, que por sua vez desencadeia uma resposta inflamatória constante (HAILE et al., 2016; CANNING et al, 2015).

O RIPK2 sinaliza a jusante dos sensores intracelulares NOD1 e NOD2 para promover uma resposta inflamatória produtiva. No entanto, a sinalização excessiva de NOD2 tem sido associada com várias doenças, incluindo a doença inflamatória do intestino, sarcoidose e artrite inflamatória, de modo que a inibição farmacológica de RIPK2 é uma estratégia com afinidade que demonstra um aumento da expressão da atividade de secreção pró-inflamatórias (TIGNO-ARANJUEZ et al, 2014).

A importância de se compreender a estrutura do RIPK2, ou de qualquer outra proteína, está na informação necessária que esta irá trazer para um determinado alvo da droga. Para então, se chegar a um inibidor mais específico que irá afetar o RIPK2 apenas e não outras proteínas, como forma de diminuir os efeitos colaterais no organismo.

Logo, RIPK2 é uma proteína quinase com, aproximadamente, 540 aminoácidos que possui um domínio catalítico N-terminal de serina / treonina quinase, um domínio de ativação e recrutamento de caspase C-terminal (INOHARA et al., 1998). A caracterização estrutural do RIPK2 apresenta a dobra quinase bilobal canônica seguida por 16-resíduos e uma hélice α J associado ao lado do circuito que liga as hélices de α D e α E. O elemento estrutural C-terminal é comum na família de quinases. Assim, o inibidor Ponatinibe ligado ocupa a bolsa de ATP estabelecida entre os lóbulos N-terminal e C-terminal da proteína quinase, Figura 4 (CANNING et al, 2015).

Figura 4 - Caracterização estrutural do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 - RIPK2. O inibidor Ponatinibe ligado ocupa a bolsa de ATP estabelecida entre os lóbulos N-terminal e C-terminal da proteína quinase. Proteína do domínio quinase em humano complexada no PDB de código 4C8B.



Fonte: Adaptado de Berman et al. (2000)

As drogas que trabalham para inibir a ativação do RIPK2 seriam bastante eficazes em tratamentos de muitas doenças inflamatórias diferentes. Dessa forma, através de um estudo de desvio térmico à base de fluorescência, testou-se o efeito de um número de drogas sobre RIPK2 e descobriu-se que o composto Ponatinibe apresentou um efeito

significativo e forneceu uma base estrutural, ao identificar um sítio alostérico, para o desenvolvimento de novos inibidores (CANNING et al., 2015).

Existem atualmente 15 estruturas cristalográficas de RIPK2 associadas ao organismo humano, depositadas no Protein Data Bank (PDB) de acordo com os códigos da Tabela 2. Neste estudo o composto Ponatinibe foi utilizado como protótipo, de modo que o seu depósito no banco de dados pode ser obtido pelo código 4C8B combinado ao RIPK2 (BERMAN et al., 2000).

Tabela 2 – Códigos PDB relacionados ao Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quínase 2 (RIPK2)

Código PDB do inibidor	Resolução cristalográfica	Referência
4C8B	2.75 Å	Canning et al., (2015)
5W5J	2.85 Å	He et al., (2017)
5W5O	2.89 Å	
4E9M	2.15 Å	Berry; Huang; Walker-Kopp, (2012)
5J79	2.69 Å	Haile et al., (2016)
5J7B	2.53 Å	
5NG3	2.60 Å	Pellegrini et al., (2017)
5NG0	2.00 Å	
5NG2	2.80 Å	
5AR2	2.44 Å	Charnley et al., (2015)
5AR3	2.44 Å	
5AR4	2.44 Å	
5AR5	2.44 Å	
5AR7	2.44 Å	
5AR8	2.44 Å	

Fonte: Berman et al. (2000)

1.5 INIBIDORES DO RECEPTOR DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASE 2: PONATINIBE E WEHI-345

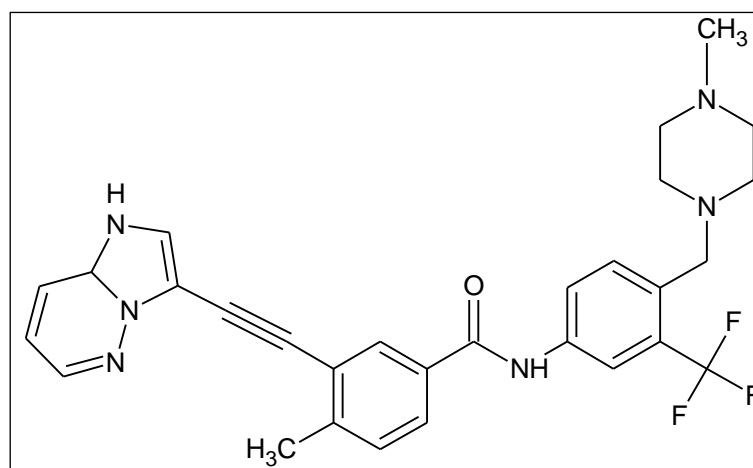
O composto Ponatinibe (3 - (2 - imidazol [1, 2 - b] piridazin - 3 - iletinil) – 4 - metil - N - [4 - [(4 – metilpiperazin – 1 - il) metil] – 3 - (trifluorometil) fenil] benzamida) de fórmula molecular (C₂₉H₂₇F₃N₆O), foi aprovado em 14 de dezembro de 2012 pela FDA (PRASAD; MAILANKODY, 2014). Este composto é um derivado do imatinibi que foi desenvolvido para o tratamento de Leucemia Mielóide Crônica (LMC), pois, há casos em que o imatinibe se tornou resistente ou intolerante aos pacientes com essa doença. O Ponatinibe é um inibidor de proteínas tirosina quinase multi-direcionado e é o produto de uma abordagem baseada em estrutura para o design de moléculas pequenas, inibe as formas nativas e mutantes de células de leucemia Ph-positivas resistentes a BCR-ABL (OKABE et al., 2013).

A caracterização do Ponatinibe apresenta características clínicas desejáveis em tratamento com inibidores da tirosina quinase e um inibidor de molécula pequena da referida proteína (CORTES et al, 2012). Desse modo, o Ponatinibe foi projetado a partir do imatinibi e se destina a tratar uma mutação muito específica de BCR-ABL de terceira geração de inibidores, que é exclusivamente eficaz na inibição da mutação “T315I do gatekeeper”, contudo, devido possuir efeitos colaterais no organismo humano, apresentou uma aprovação retraída em seu consumo, dentre os efeitos secundários dermatológicos, tem-se as erupções cutâneas, eritematosas e dermatite, pele seca e eritema nodoso (ZHANG et al, 2014).

Ao analisar o referido composto, observa-se que este possui regiões com a presença de um anel de imidazol, que forma ligações de hidrogênio, e piridazina que interage hidrofobicamente, Figura 5. Vale ressaltar que, o que torna o Ponatinibe diferente dos outros inibidores de BCR-ABL é o fato de possuir em sua estrutura um ligante de etinilo de ligação tripla, de forma que na relação estrutura-atividade a presença da ligação tripla potencializa o efeito quando analisado à dados moleculares iguais que contem ligação simples ou dupla. Neste estudo de ação do Ponatinibe como inibidor de BCR-ABL, tem-se este composto caracterizado por uma boa lipofilicidade e biodisponibilidade oral. Logo, o ponatinib é considerado oralmente biodisponível com potenciais atividades antiangiogênicas e antineoplásicas (MILLER; BRUNO; LIM, 2014).

O Ponatinibe foi sintetizado através da reação de radicais livres, reação de acoplamento de redução, acilação e sonogashira. A estrutura do composto final e intermediários foi confirmada por Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN) (KUN et al., 2013).

Figura 5 – Estrutura química 2D do composto Ponatinibe.

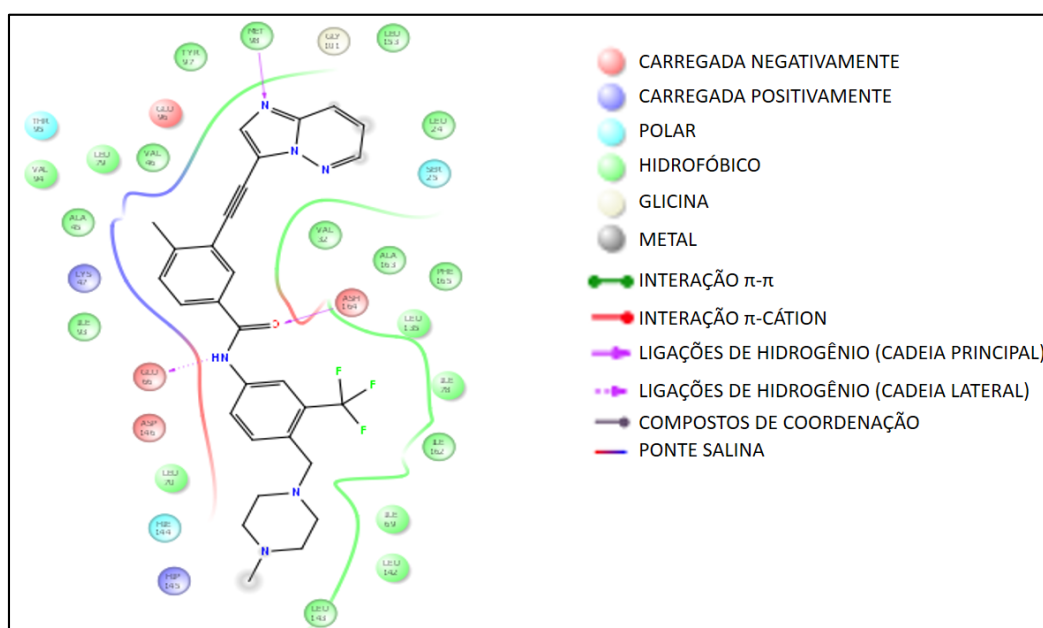


Fonte: ACD Chems sketch (2012)

Ao utilizar a cristalografia de raios X para determinar os arranjos 3D exatos dos átomos que formam a estrutura molecular de RIPK2 pela primeira vez. A estrutura mostrou em nível atômico como Ponatinibe funciona em RIPK2 e os resultados como inibidor é o mais eficaz, pois um bom inibidor pode aumentar a temperatura de desdobramento de uma proteína de cerca de 10°C. No entanto, com o Ponatinibe, em um ensaio de mudança térmica em fluorescência, o ponto de fusão RIPK2 aumentou 23°C, o que se mostrou bastante interessante, pois este estudo envolve a indução de quinases à formar cristais, logo, neste processo ao se fazer a utilização de um inibidor fez com que a proteína cristalizasse com mais facilidade por meio de um padrão de raio-X, através do cristal, e o Ponatinibe permitiu a estabilização do RIPK2 suficiente para cristalizar. A estrutura foi resolvida por substituição molecular e refinada em resolução de 2,75Å (CANING et al., 2015).

Além disso, esse processo ajudou a entender como as proteínas quinases agem, bem como trouxe a informação da sua estrutura, que é extremamente útil para detectar um alvo da droga. Nas interações do RIPK2 complexado ao Ponatinibe, obtido pelo código 4C8B, tem-se ligações de hidrogênio, ponte salina e interações metálicas. Bem como, mostra interações hidrofóbicas e interações π - π e π -catiões (BERMAN et al., 2000). Na Figura 6, tem-se as ligações e interações dos resíduos de aminoácidos do RIPK2 complexado ao Ponatinibe, através do servidor Discovery studio (BIOVIA, 2015).

Figura 6 – Interações dos resíduos de aminoácidos do RIPK2 complexado ao Ponatinibe, através do programa Maestro 9.9, de acordo com a estrutura cristalográfica depositada no PDB sob o código 4C8B.



Fonte: Adaptado de Berman et al. (2000)

Além disso, tem-se outros compostos, a exemplo do regorafenibe e o sorafenibe que são considerados também dois inibidores multi-alvo, que podem assumir uma ligação que representa uma molécula semelhante ao do Ponatinibe em RIPK2, só que em uma grandeza mais fraca, mas são conhecidos por serem mais seguros e com menos efeitos colaterais (CANNING et al, 2015). Tem-se ainda a identificação de dois medicamentos aprovados pela FDA que inibem a atividade RIPK2 denominados de erlotinibe e gefitinibe, que ajudaram a racionalizar o desenvolvimento de programas de inibidores específicos RIPK2 por várias empresas farmacêuticas (TIGNO-ARANJUEZ et al, 2014).

A descoberta de inibidores para o RIPK2 é altamente eficaz na autofosforilação desse receptor e a ubiquitinação que são bloqueados por medicamentos, como o Ponatinibe, são aprovados para melhorar a seletividade de drogas na sinalização inflamatória mediada por NOD. A tabela 3 demonstra valores de estudos que sugeriu a estas moléculas ao assumir uma ligação semelhante ao do Ponatinibe em RIPK2. De forma que o Ponatinibe inibiu a atividade da recombinante RIPK2 com um valor de IC₅₀ de 14 nM. Por comparação, a inibição do receptor por regorafenibe e sorafenibe foi uma ordem de grandeza mais fraca (IC₅₀ valores de 41,0 e 75,4 nM, respectivamente), mas semelhante anteriormente relatado o inibidor gefitinibi (IC₅₀ = 50,7 nM) (TIGNO-ARANJUEZ et al, 2014).

Tabela 3 – Inibidores do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase – RIPK2 disponíveis atualmente.

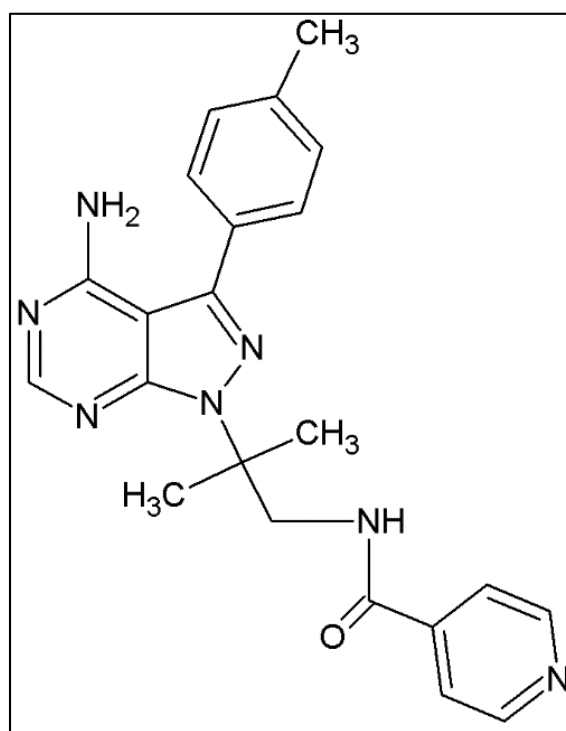
Compostos	Classe farmacológica	Parâmetros farmacológicos
Ponatinibe	Inibidor	IC ₅₀ = 14,0 nM
Regorafenibe	Inibidor	IC ₅₀ = 41,0 nM
Sorafenibe	Inibidor	IC ₅₀ = 75,4 nM
Gefitinibe	Inibidor	IC ₅₀ = 50,7 nM

Fonte: Tigno-aranjuez et al. (2014); Najjar et al. (2015); Canning et al. (2015).

O composto WEHI-345 foi identificado como um inibidor potente e seletivo para RIPK2. O WEHI-345 é um análogo ATP e se liga no bolso de ligação ATP de RIPK2. Para identificar informações acerca deste inibidor, gerou-se um modelo estrutural murino com a utilização da estrutura cristalina de raio-X do RIPK2 complexado com o composto Ponatinibe de código (4C8B) e o RIPK1. O WEHI-345, Figura 7, foi considerado não citotóxico ao ser estimulado com NOD inibe potentemente e especificamente RIPK2 em células para prevenir a produção de citocinas (NACHBUR et al., 2015).

O inibidor WEHI-345 (N - [2 - [4 - amino - 3 - (4 - metilfenil) pirazol [3, 4 - d] pirimidil-1] - 2 -metilpropil] piridina - 4 - carboxamida) foi desenvolvido por pesquisadores do instituto Walter e Eliza Hall, de modo que nos estudos in vitro e in vivo apresentou resultados eficientes, bem como uma potente atividade para RIPK2, alta especificidade, uma biodisponibilidade. Além disso, se tornou eficaz no tratamento de doenças inflamatórias a exemplo de: esclerose múltipla, crohn e artrite reumatoide e passou a ser então um composto protótipo importante no avanço da compreensão de RIPK2 e na sinalização de proteínas de controle inflamatório. O estudo acerca do WEHI-345, demonstrou que apenas atrasou a sinalização ao invés de inibir, contudo, esse intervalo é suficiente para cessar completamente a produção de citocinas (LESSENE; NACHBUR, 2015).

Figura 7 - Estrutura química 2D do composto WEHI-345.



Fonte: ACD Chems sketch (2012)

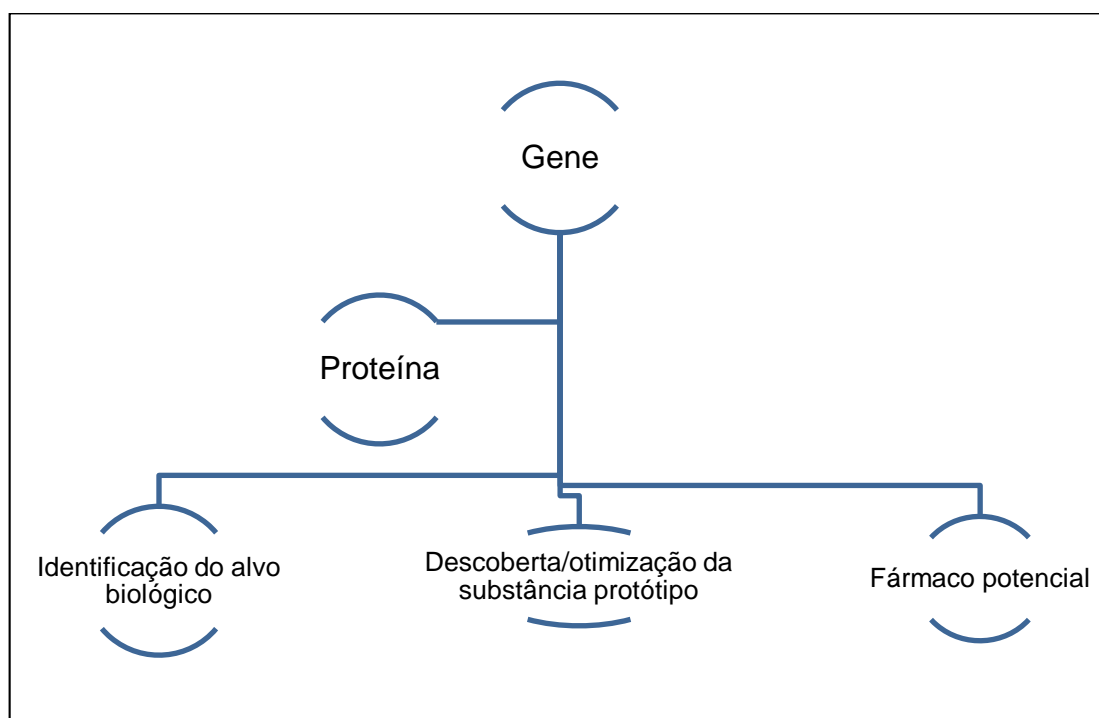
1.6 MÉTODOS ENVOLVIDOS NO PLANEJAMENTO RACIONAL *IN SÍLICO* DOS FÁRMACOS

Estratégias modernas de planejamento de fármacos se fundamentam no contínuo aprimoramento de processos que ajudaram a reduzir custos e o tempo necessários para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente para doenças que ainda não têm medicamentos efetivos para seu tratamento (RODRIGUES et al, 2012). Ademais, essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração

significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas computacionais associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Métodos computacionais podem ser usados como ferramentas do planejamento racional de compostos ativos, assim chamados porque é orientado por uma hipótese racional sobre o mecanismo de ação destes compostos (SANTANNA, 2009; BARREIRO; FRAGA, 2001). O alcance de novos fármacos está se voltando, progressivamente racional, associado a uma consistente fundamentação teórica com metodologias adequadas e um poderoso instrumento na compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos, pois se utiliza de técnicas combinadas como tecnologia computacional, estatística aplicada e estudo de interação biológica, permitindo, então, a proposição de descoberta de novas drogas, que vai desde a identificação da molécula que identifica o código genético até a obtenção do fármaco potencial, Figura 8 (MONTANARI, 2011).

Figura 8 – Fases do planejamento de um fármaco.



Fonte: Montanari (2011)

O estudo dos fármacos surge a partir da investigação de um composto já existente ou a descoberta de um inteiramente novo. Nestas duas situações a ideia é sintetizar

análogos dos envolvidos existentes ou do composto-protótipo para a triagem, para isso são criadas estratégias para ajudar o químico medicinal na escolha do fármaco adequado. Dentre elas tem-se: SAR (relações estrutura-atividade), QSAR (relações estrutura-atividade quantitativas), a análise de Hansch, a árvore de decisões de Topliss, a modelagem computadorizada e a química combinatória (THOMAS, 2012).

1.7 TRIAGEM VIRTUAL

A triagem virtual corresponde a métodos computacionais, conhecidos também pelo termo “*in silico*”, que podem auxiliar na seleção de novos ligantes bioativos promitentes e de interesse terapêutico, considerados agonistas ou antagonistas de receptores, ou inibidores enzimáticos. O objetivo principal da triagem virtual traz uma fase inicial, não avançada, da descoberta e otimização de compostos promissores, que estejam de acordo com os padrões farmacofóricos exigidos para o espaço químico de fármacos e ligantes bioativos de baixa afinidade (do inglês, hits) (MONTANARI, 2011).

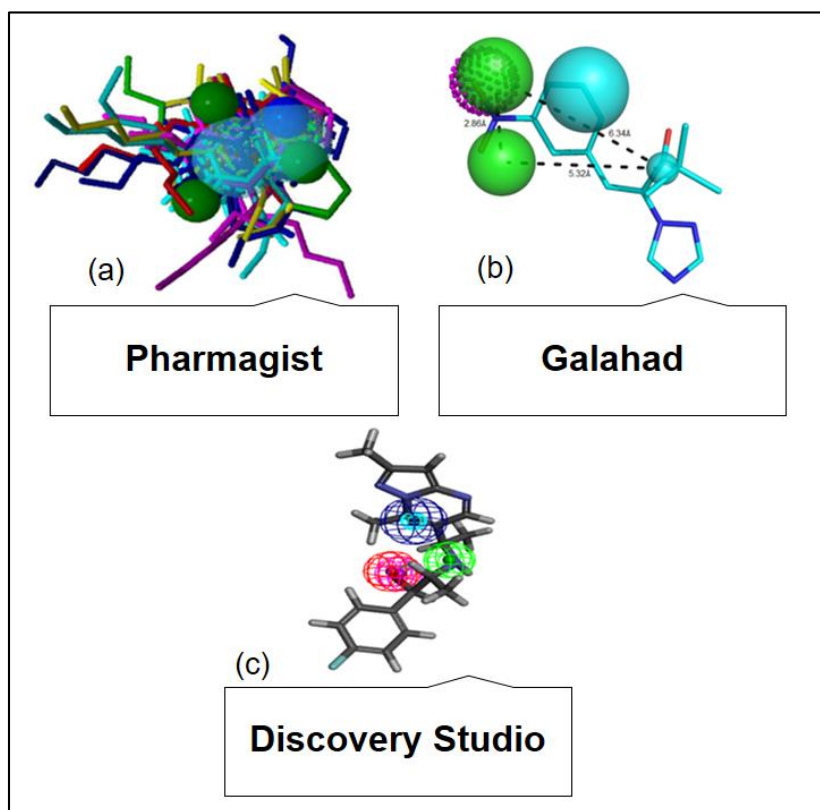
Dentre as formas de classificação da triagem virtual, tem-se a triagem baseada na estrutura do alvo molecular e a baseada em ligantes. De modo que a primeira considera a estrutura tridimensional (3D) do alvo terapêutico, utiliza, preferencialmente, os cálculos de docagem para selecionar ligantes potenciais, com características que podem ser química, eletrônicas e estruturais que proporcione a interação do alvo molecular. No que se refere a triagem baseada em ligantes, tem-se a utilização de moléculas com atividade biológica que funcionam com algum nível de similaridade e que compartilhe a sua triagem em bases de dados de novas entidades com a mesma atividade biológica (RODRIGUES et al, 2012).

A triagem virtual envolve componentes que vai desde a seleção e organização das bases de dados de componentes, até o estabelecimento do ensaio biológico, para triagem *in vitro* dos ligantes, de forma que, deve ser priorizado, logo de início, a aplicação de filtros de propriedades moleculares, avaliação, validação e seleção final de ligantes para aquisição comercial ou síntese orgânica. Vale ressaltar que, a bioinformática é um propulsor ideal no estabelecimento dos processos envolvendo a triagem virtual, uma vez que esta ferramenta é responsável por transformar os dados biológicos em informações. Comumente, existem bancos de dados disponíveis no meio informacional para pesquisas em relação as macromoléculas, estruturas, propriedades e rotas metabólicas, dentre essas interfaces on-line tem-se os bancos de dados BindinDB e PDB (MONTANARI, 2011).

1.8 FARMACÓFORO

Um farmacóforo é o arranjo espacial das características que permite que uma molécula possa interagir com um receptor alvo em um modo de ligação específica (SCHNEIDMAN-DUHOVNY, 2008), Figura 9.

Figura 9 – Modelos farmacofóricos em diferentes servidores.



Fonte: (a) Schneidman-Duhovny (2008); (b) Caballero (2010); (c) Biovia (2015).

O reconhecimento de um farmacóforo pode atender como um protótipo essencial no planejamento racional de fármacos, pois, colabora com a descoberta de novos compostos para se ligar a um alvo específico (INBAR et al., 2007).

O farmacóforo surge como suporte de extrema importância para um alvo biológico, de modo que, este arranjo de orientação espacial que é o farmacóforo, apresenta características eletrônicas e estéricas que garante a interação com o receptor para desempenhar o seu efeito biológico (GOOD; MASON; PICKETT, 2000).

Dentre as propriedades farmacofóricas tem-se: doadores e receptores de ligação de hidrogênio, centros de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, centroides e pontos virtuais. De modo que, o farmacóforo, torna-se essencial na triagem virtual, pois atua na base de dados de compostos através de um reconhecimento molecular em forma de buscas,

considerado um excelente filtro no processo de ensaio virtual *in silico* (MASON; GOOD; MARTIN, 2001).

A busca por compostos promissores tem visto grandes investimentos das empresas farmacêuticas, com o principal objetivo de reduzir o custo por compostos sintetizados ou ensaios. Desse modo, a construção e avaliação de um modelo via farmacóforo traz consigo o refinamento na velocidade e eficiência na obtenção de novos fármacos (CABALLERO, 2010).

Assim, o farmacóforo baseado em ligantes é um método eficiente e rápido para encontrar novos ligantes pela geração de hipóteses na busca de características químicas que uma molécula deve possuir para ser reconhecida pelo sitio ativo de uma macromolécula (LIU, 2012).

Os modelos farmacofóricos com base em alinhamento molecular traz uma análise importante na compreensão de uma variedade de compostos químicos disponíveis em banco de dados (DONG, 2011).

1.9 GALAHAD - ALGORITMO GENÉTICO COM ATRIBUIÇÃO LINEAR PARA ALINHAMENTO HIPERMOLECULAR DE CONJUNTOS DE DADOS

O método utilizado para a derivação do padrão farmacofórico, foi através do módulo de alinhamento GALAHAD (Algoritmo Genético com Atribuição Linear para Alinhamento Hipermelecular de Conjuntos de Dados), implementado na plataforma SYBYL, é capaz de alinhar um conjunto de moléculas com diferentes bases que compartilham um modo comum de atividade biológica e é uma estratégia adequada para encontrar um farmacóforo e alinhar moléculas ligantes ao sitio ativo do alvo (ZHAO et al., 2010). O método GALAHAD gera conformações com a construção de modelos que age nas coordenadas internas (torção) e também, alinha confórmeros em um mesmo espaço cartesiano. Além disso, este é capaz de determinar várias conformações de ligantes com baixa deformação (SE), sobreposição estérica (SO) e similaridade farmacofórica (PhS) (CABALLERO, 2010).

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a identificação de novos inibidores do Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 com potencial atividade anti-inflamatória através do ensino da Química Medicinal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Construir o modelo farmacofórico, no programa Galahad, a partir do inibidor protótipo Ponatinibe e inibidores selecionados na interface on-line BindingDB;
- b) Selecionar novos compostos comercialmente disponíveis com potencial atividade anti-inflamatória a partir de banco de dados ZINC, na interface on-line ZincPharmer;
- c) Determinar as propriedades físico-químicas e toxicológicas *in silico*, nos servidores QikProp e Derek, respectivamente, dos novos compostos selecionados no ZincPharmer;
- d) Predizer as atividades biológicas, anti-inflamatória *in silico*, na interface on-line PASS, dos compostos com as melhores propriedades físico-químicas e toxicológicas;
- e) Realizar o acoplamento molecular para identificar as interações e afinidade de ligação com o Receptor de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 (RIPK2), nos programas PyRx e AutoDock, dos compostos oriundos da triagem virtual de predição de atividade biológica;
- f) Analisar a configuração estereo-eletrônica de sobreposição molecular, no servidor Discovery Studio, em relação aos compostos protótipos Ponatinibe e WEHI-345 dos compostos selecionados no Docking Molecular;
- g) Analisar a configuração estereo-eletrônica de sobreposição ao modelo farmacofórico em relação aos mesmos compostos selecionados no item f, através do servidor CHEMGPS-NP;
- h) Predizer a viabilidade sintética do composto promissor, na interface on-line Sylvia, após a obtenção do seu valor de sobreposição QFIT em relação ao farmacofórico.

Publicado na revista: *Molecules* 2018, 23, 453; doi:10.3390/molecules23020453

Identification of Novel Protein Kinase Receptor Type 2 Inhibitors Using Pharmacophore and Structure-Based Virtual Screening

Josiane V. Cruz ^{1,2*}, Moysés F. A. Neto ³, Luciane B. Silva ², Ryan da S. Ramos ²,
Josivan da S. Costa ², Davi S. B. Brasil ⁴, Cleison C. Lobato ², Glauber V. da Costa ²,
José Adolfo H. M. Bittencourt ², Carlos H. T. P. da Silva ⁵, Franco H. A. Leite ³ and
Cleydson B. R. Santos ^{1,2*}

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amapá, Macapá, Amapá 68902-280, Brazil

² Laboratory of Modeling and Computational Chemistry, Federal University of Amapá, Macapá, Amapá 68902-280, Brazil; luciaanebarros@hotmail.com (L.B.S.); ryanquimico@hotmail.com (R.d.S.R.); josivan.chemistry@gmail.com (J.d.S.C.); cleyson.cl@gmail.com (C.C.L.); vilhenac@hotmail.com (G.V.d.C.); joseadolfo@unifap.br (J.A.H.M.B)

³ Laboratory Molecular Modeling, Estadual University of Feira de Santana, Bahia 44036-900, Brasil; moysesfagundes@gmail.com (M.F.A.N.); fhpharm@gmail.com (F.H.A.L.)

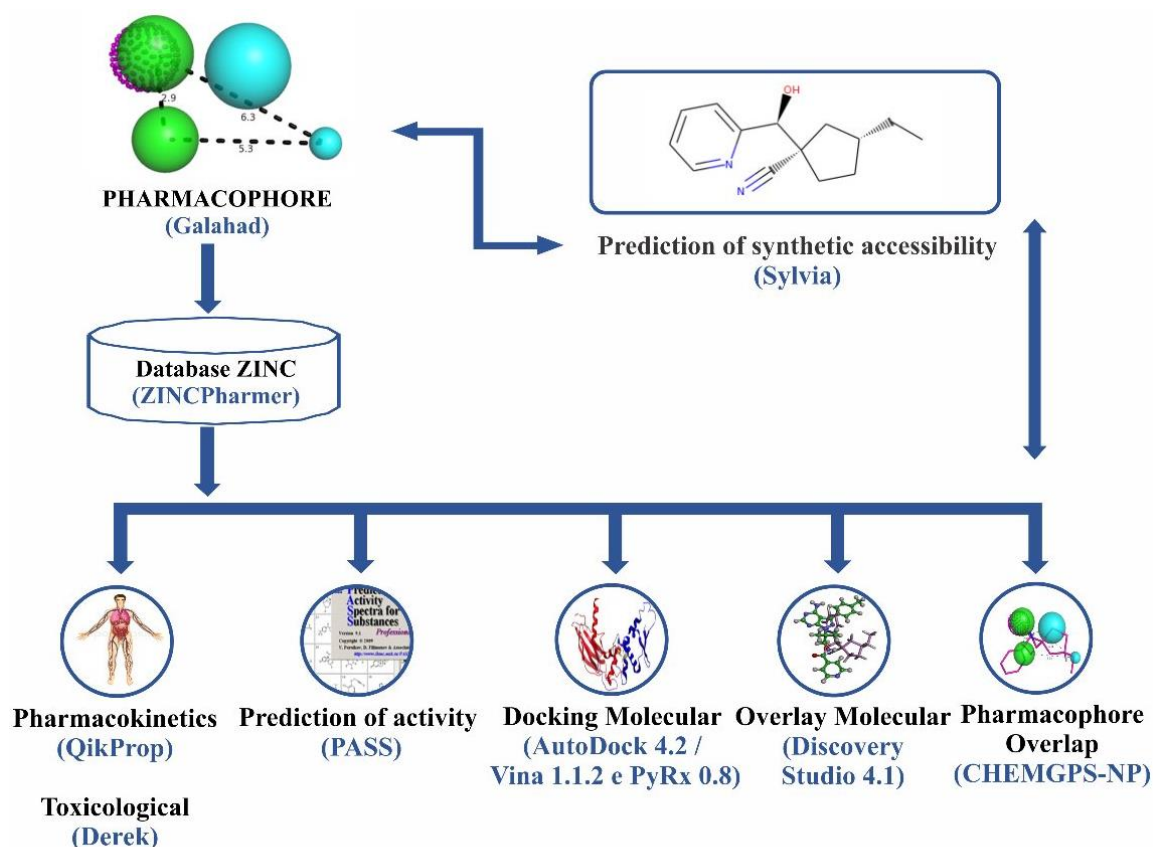
⁴ Institute of Technology, Federal University of Pará, Pará, Amazon, Belém 66075-900, Brazil; dsbbrasil@ig.com.br

⁵ Laboratory of Computational Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-020, Brazil; tomich@fcrp.usp.br

* Correspondence: josiane.viana2007@gmail.com (J.V.C.); breno@unifap.br (C.B.R.S.); Tel.: +55-96-99161-5786 (J.V.C.); +55-96-3312-1742 (C.B.R.S.)

Received: 03 January 2018; Accepted: 01 February 2018; Published: 18 February 2018

Graphical abstract



Abstract: The Protein Kinase Receptor type 2 (RIPK2) plays an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases; it signals downstream of the NOD1 and NOD2 intracellular sensors and promotes a productive inflammatory response. However, excessive NOD2 signaling has been associated with various diseases, including sarcoidosis and inflammatory arthritis; the pharmacological inhibition of RIPK2 is an affinity strategy that demonstrates an increased expression of pro-inflammatory secretion activity. In this study, a pharmacophoric model based on the crystallographic pose of ponatinib, a potent RIPK2 inhibitor, and 30 other ones selected from the BindingDB repository database, was built. Compounds were selected based on the available ZINC compounds database and in silico predictions of their pharmacokinetic, toxicity and potential biological activity. Molecular docking was performed to identify the probable interactions of the compounds as well as their binding affinity with RIPK2. The compounds were analyzed to ponatinib and WEHI-345, which also used as a control. At least one of the compounds exhibited suitable pharmacokinetic properties, low toxicity and an interesting binding affinity and high fitness compared with the crystallographic pose of WEHI-345 in complex with RIPK2. This compound also possessed suitable synthetic accessibility, rendering it a potential and very promising RIPK2 inhibitor to be further investigated in regards to different diseases, particularly inflammatory ones.

Keywords: RIPK2; ponatinib; WEHI-345; virtual screening; rheumatoid arthritis; anti-inflammatory.

1. Introduction

The protein kinase receptor type 2 (RIPK2) plays an essential role in the immune response and has been suggested to be a target in inflammatory diseases such as Crohn's disease, inflammatory bowel disease, asthma and arthritis [1]. RIPK2 signals downstream of the NOD1 and NOD2 intracellular sensors promote a productive inflammatory response. However, excessive NOD2 signaling has been associated with various diseases including sarcoidosis and inflammatory arthritis; the pharmacological inhibition of RIPK2 is an affinity strategy that demonstrates an increased expression of pro-inflammatory secretion activity [1].

Drugs that inhibit RIPK2 may be quite effective at treating many different inflammatory diseases. According to Canning et al. [2], the compound ponatinib provided a structural base, when identifying an allosteric site, for the development of new inhibitors at this target. Characterization of ponatinib reveals desirable clinical features in treatment with tyrosine kinase inhibitors and a small molecule inhibitor of said protein [3]. However, because ponatinib is associated with side effects, has ruled against its consumption. Its dermatological side effects include rashes, erythematous and dermatitis, dry skin and erythema nodosum [4]. WEHI-345, shown in Figure 1, has been identified as a potent and selective inhibitor for RIPK2 [5]. WEHI-345 is an ATP analog and binds to the ATP binding pocket of RIPK2, IC_{50} : 0.13 μ M [5].

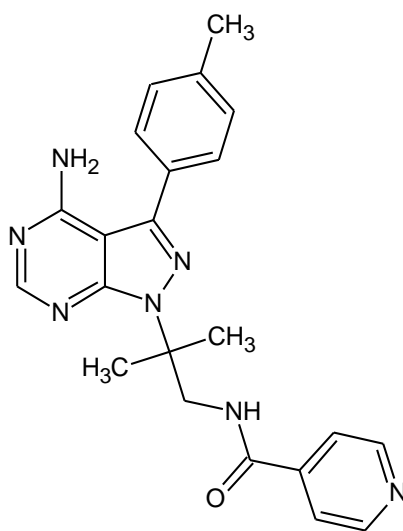


Figure 1. 2D chemical structure of compound WEHI-345.

This study presents the design of novel potential drugs with anti-inflammatory activity in rheumatoid arthritis. Pharmacophore- and structure-based virtual screening approaches have been employed, as in similar studies conducted by Cichero et al. [6,7] and Liessi et al. [8]. In this analysis, the ponatinib as a template as well as 30 reported RIPK2 inhibitors, were selected from the Protein Data Bank (PDB, code 4C8B) and the BindingDB web server, respectively. We used the ZINC compounds database and predicted the *in silico* pharmacokinetic and toxicological properties of all of the compounds using virtual screening. This methodology was also employed by Leung and Ma [9] and Shoichet [10]. Furthermore, we assessed the potential biological activity for all of the novel compounds and the main enzyme-inhibitor interactions and binding affinity (kcal/mol). Yang et al. [11] and Kitchen et al. [12] also followed this technique. At least one of the compounds exhibited suitable pharmacokinetic properties, low toxicity and an interesting binding affinity and high fitness compared with the crystallographic pose (conformation + orientation) of WEHI-345 in complex with RIPK2. This compound also possesses suitable synthetic accessibility, rendering it a potential and very promising RIPK2 inhibitor to be further investigated with respect to different diseases, particularly inflammatory ones.

2. Results and Discussion

2.1. Pharmacophore Perception

We used the GALAHAD software [13] to generate pharmacophoric models based on known RIPK2 inhibitors (Figure 2). We allowed their torsional angles to vary, consistent with work by different authors [13–15]. We analyzed different sets and arrays of features for each pharmacophoric model that was generated

(Table 1). Among the 10 pharmacophore models that we generated, five were discarded based on deformation energy criteria (<100 kcal mol).

Table 1. Features of each pharmacophoric model generated using GALAHAD.

Model	Specificity	N_Hits	Features	Pareto	Energy (kcal/mol)	Sterics	HBond	Mol_QRY
01	2.399	03	07	00	1215.88	541.80	57.00	3.29
02	3.069	01	09	00	90.97	532.10	54.00	2.22
03	3.875	00	06	00	303, 52.40	537.80	55.30	5.78
04	3.676	01	05	00	31.35	529.70	55.30	0.58
05	2.993	03	05	00	30.33	472.30	54.60	2.25
06	1.900	03	04	00	148.83	533.80	52.90	2.67
07	5.526	00	08	00	187, 147.79	547.20	56.80	0.53
08	3.939	01	06	00	4453, 411.50	549.30	56.50	1.67
09	3.068	03	05	00	45.49	536.90	54.60	0.22
10	3.082	04	04	00	72.56	514.90	55.20	0.80

Comparison of the Pareto indices revealed that they were statistically equivalent, although Model 07 indicated a high index of discrimination of the expected molecules (specificity > 5) compared with each model. Despite this fact, Model 07 did not satisfy the active training set as well as Model 03. Considering that the Mol_qry values reflect the agreement observed between the tuple query and the hypermolecule generated, several studies have suggested that this parameter can be used to select the best pharmacophoric models. However, useful models can also have low Mol_qry values [16].

To circumvent this limitation, a well-established approach was used to select favorable pharmacophoric models. We relied on the ability to differentiate true binders from false positives [13]. Using such a strategy, we identified the pharmacophore model with the highest specificity and sensitivity and the ability to detect/select RIPK2 inhibitors instead of congenital molecules lacking activity. A dataset containing 17 RIPK2 inhibitors and 850 false positives was used to build ROC curves and to analyze the respective areas under the curve (AUC-ROC) using the QFIT value (0–100) (UNITY module alignment result, implemented in SYBYL-X 2.0 software) [17]. An AUC-ROC equal to 1.0 would be found in a model with impeccable specificity and sensitivity, and AUC = 0.5 would be associated with models with a poorer selection ability that was more pronounced than a random one. AUC > 0.70 may be considered to be a moderate predictive ability [18,19] (Figure 3). Therefore, Model 05 (AUC = 0.72) was selected as the most reliable pharmacophore for further analysis (Figure 2).

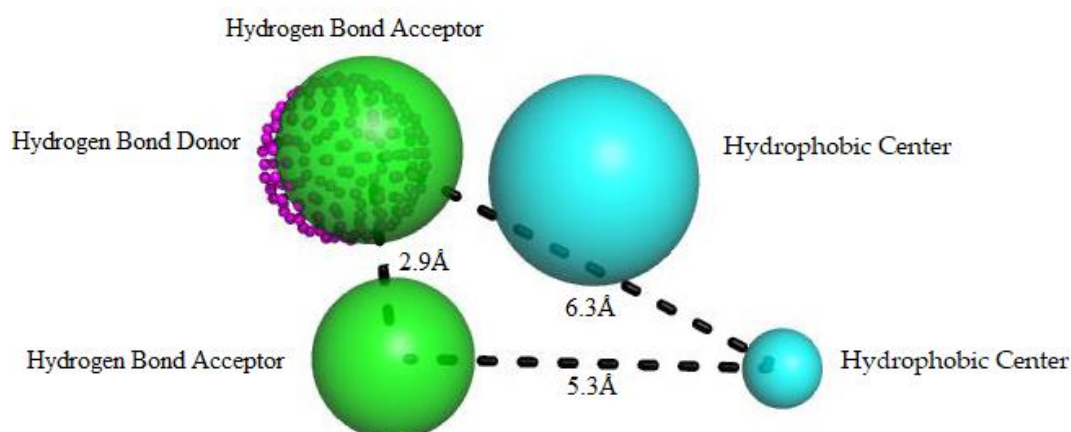


Figure 2. Best pharmacophore model here obtained for RIPK2 inhibitors. This model has two hydrophobic centers (cyan spheres), two hydrogen bond acceptors (green spheres) and a hydrogen bond donor (magenta dotted sphere). The size of the beads varies according to the tolerance radius calculated using GALAHAD. All the distances are measured in Angstroms.

In Figure 2, Model 05 has two hydrophobic centers (cyan spheres), two hydrogen bond acceptors (green spheres) and one hydrogen bond donor (dotted magenta spheres). As observed across the kinase family, RIPK2 is characterized by a conserved domain; Glu66 and Asp164 residues allow hydrogen bonds with donor

groups, and they are oriented towards a hydrophobic arrangement that offers an opportunity to optimize the selectivity of inhibitors [20].

Several authors have reported the importance of the polar interactions established by 25 residues for binding affinity; they have also noted that Ser176 plays an important role in modulating RIPK2 activity [2,5]. Among the common functional groups of molecules aligned generation of a common pharmacophoric pattern, the hydrophobic and hydrogen bond donor and/or acceptor ones can interact with the kinase domain, such as observed in Model 05.

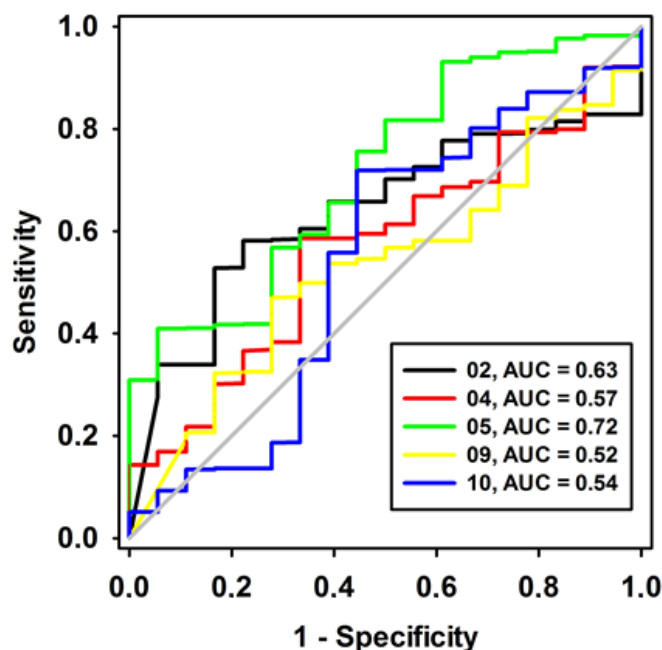


Figure 3. ROC curves of pharmacophore models here investigated, containing low strain energy. The diagonal line represents a model that would not be better than a random one ($AUC < 0.5$).

In addition to the predictive ability of the pharmacophoric model to recognize active compounds and false positives, model power measurement is essential information for virtual screening of new potential RIPK2 inhibitors. We assessed the ability of Model 05 to recognize inhibitors according to potency. By analyzing the conserved domain of kinases, we visualized the requirement of inhibitors containing hydrogen bond donor and acceptor groups and hydrophobic ones. Although compounds satisfied these pharmacophoric requirements to be potent RIPK2 inhibitors (Figure 4a), there was weak alignment between the inhibitor and Model 05 (Figure 4b). Despite the lack of a pharmacophore model for RIPK2 being reported thus far, the search for compounds fitting the pharmacophoric model that can make polar interactions with conserved catalytic residues increases the possibility of finding new hits. These compounds must possess characteristics that can be recognized by the active domain, and research is exploring the chemical diversity by enlarging the chemical space known thus far.

Once the Model 05 was chosen as the more reliable pharmacophoric one, virtual screening simulations we carried out virtual screening simulations in the ZINC compounds database [21] and found 1637 compounds with molecular groups that fit such a pharmacophore pattern. Thereafter, the pharmacokinetic predictions were subsequently performed for all of the compounds that we screened; 871 compounds were filtered/selected at this stage of the design process. In sequence, toxicological analyses were carried out using the next filter Derek 10.0.2 [22]; 414 “survivor” compounds were obtained.

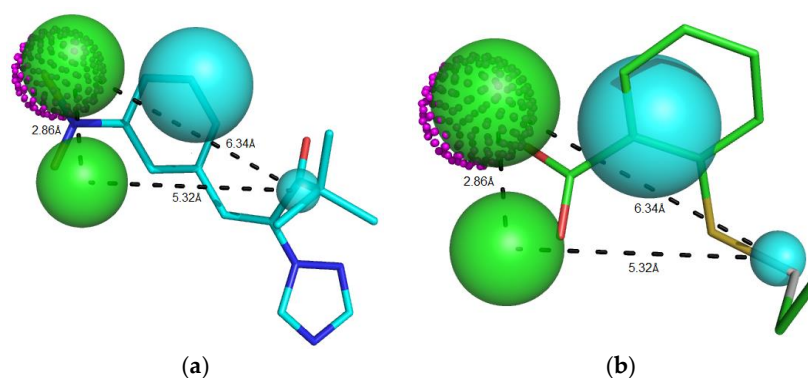


Figure 4. Potent RIPK2 inhibitor (a) $IC_{50} = 0.90 \mu M$, Mol_qry value = 51.35; and (b) weak RIPK2 inhibitor $IC_{50} = 1.40 \mu M$, Mol_qry value = 04.10 superimposed to the pharmacophoric Model 05, where green beads/spheres represents Hbond acceptor groups, magenta dotted sphere represents Hbond donor groups, while hydrophobic ones are shown in cyan spheres. The size of the beads varies according to the tolerance radius calculated using GALAHAD. All the distances are measured in angstroms.

2.2. Prediction of Activity Spectra for Substances

Prediction of potential biological activity was performed using the Prediction of Activity Spectral for Substances (PASS) [23] web server, which resulted in 29 selected compounds. Table 2 lists the characteristics/activity that we considered: anti-inflammatory activity, kinase inhibitor, autoimmune disease and treatment of rheumatoid arthritis. Values of Pa and Pi varying from 0 to 1 refer to the mean probability of being active or inactive, respectively. Estimates of the biological activity using PASS were related to aspects of similarity with other bioactive substances [24].

According to Table 2, the compounds ZINC69349685, ZINC69349687, ZINC69431616, ZINC69431621 (with autoimmune and/or anti-inflammatory activities) and ZINC91072217 (kinase inhibitor), all with $Pa > 0.5$, were associated with the highest possibilities of being similar to other known bioactive compounds [25]. However, other compounds with $Pa < 0.5$ have also been selected to the next steps of the design process, when $Pa > Pi$, such as considered by Rodrigues and Silva [26].

Table 2. Prediction of biological activity of substances (PASS).

Compound (ZINC Code)	Biological Activity	Pa	Pi
ZINC69349685	Autoimmune	0.84	0.005
	Anti-inflammatory	0.538	0.046
	Treatment of rheumatoid arthritis	0.434	0.019
	Kinase Inhibitor	0.316	0.128
ZINC69349687	Autoimmune	0.784	0.005
	Anti-inflamatória	0.538	0.046
	Treatment of rheumatoid arthritis	0.434	0.019
	Kinase Inhibitor	0.316	0.128
ZINC69431616	Autoimmune	0.790	0.005
	Anti-inflammatory	0.573	0.038
	Treatment of rheumatoid arthritis	0.436	0.019
	Kinase Inhibitor	0.133	0.104
ZINC69431621	Autoimmune	0.790	0.005
	Anti-inflammatory	0.573	0.038
	Treatment of rheumatoid arthritis	0.436	0.019
	Kinase Inhibitor	0.133	0.104
ZINC91072217	Kinase Inhibitor	0.572	0.023
	Anti-inflammatory	0.259	0.203

2.3. Molecular Docking: Molecular Interactions of the Selected Compounds

To validate the molecular docking approach that we used, the crystallographic pose of ponatinib, derived from the RPK2-ponatinib complex structure (PDB ID 4C8B), and the top-ranked docking pose that we obtained were compared. The results are shown in Figure 5, which reveals the superposition of the two binding poses of ponatinib inside the RPK2 binding site. This superposition results in a RMSD of superposition of 0.77. This result is below the well-established tolerance level of 2.0 Å, as has been reported by Hevener et al. and others [27,28].

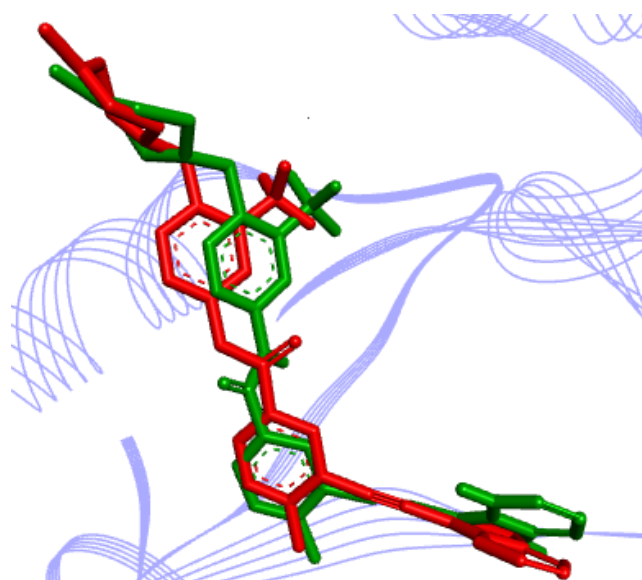


Figure 5. Result of validation for a known potent RPK2 inhibitor, ponatinib, inside the enzyme active site (derived from PDB ID 4C8B), obtained with the AutoDock software: in red, the crystallographic pose; in green, the top-ranked docking pose. Inhibitor is represented in stick, whereas the RPK2 active site is represented as a Ribbons diagram (in lines).

In Table 3, only the interactions of RPK2 with the crystallographic ponatinib or WEHI-345 are listed. Interactions of RPK2 and the potential inhibitors screened here are listed in Table 4.



Figure 6. Binding affinity provided by the AutoDock/Vina software for the potent RPK2 inhibitor and here used as a template – ponatinib, as well as for the control compound – WEHI-345 and the compounds obtained using a virtual screening approach, regarding RPK2.

In Table 4, we list the binding affinity values calculated using AutoDock for the best-ranked compounds selected with the virtual screening approach [29]. The binding affinity values ranged from -7.80 kcal/mol (for ZINC81021663) to -11.00 kcal/mol (for ZINC90174766) relative to RPK2. In Figure 6, we show all the

compounds with interesting potential affinity for RIPK2 and values similar to the observed for ponatinib and WEHI-345.

Table 3. Interactions between RIPK2 (PDB 4C8B) and ponatinib or WEHI-345, obtained using the AutoDock/Vina software are shown.

Compound	Amino Acid	Type	Distance (Å)	Binding Affinity (in kcal/mol)
Ponatinib	LYS47	Hydrogen Bond	3.09	-13.30
	HIS144	Hydrogen Bond	3.12	
	ALA45	Alkyl	3.33	
	VAL32	Alkyl	4.98	
	LYS47	Alkyl	4.80	
	LEU70	Alkyl	5.42	
	HIS144	π -Alkyl	4.90	
	LYS47	π -Alkyl	4.23	
	LEU79	π -Alkyl	5.47	
	ALA45	π -Alkyl	4.03	
	ALA163	π -Alkyl	5.04	
WEHI-345	ILE162	Hydrogen Bond	2.43	-7.50
	GLU66	Hydrogen Bond	3.06	
	THR95	π -Donor	4.03	
	ALA163	Alkyl	4.17	
	ALA163	Alkyl	3.09	
	LEU70	Alkyl	3.60	
	LEU79	Alkyl	3.87	
	LEU79	Alkyl	5.08	
	ILE69	Alkyl	4.98	
	LEU70	π -Alkyl	4.600	
	ALA163	π -Alkyl	5.19	
	VAL32	π -Alkyl	4.50	
	ALA45	π -Alkyl	4.48	
	LYS47	π -Alkyl	3.82	
ILE69	π -Alkyl	4.63		

Table 4. Interactions between RIPK2 (from PDB ID 4C8B) and the following compounds are shown, after docking calculations: ZINC90174766, ZINC91725665, ZINC69431616, ZINC12230819, ZINC12230826, ZINC12230756, ZINC69431621, ZINC90174764, ZINC91881108, ZINC69349687, ZINC91725663, ZINC89571615, ZINC87131463 and ZINC81021663.

Compound	Amino Acid	Type	Distance (Å)	Binding Affinity (in kcal/mol)
ZINC90174766	LEU70	π -Alkyl	5.12	-11.00
	ALA163	π -Alkyl	4.77	
	LEU79	π -Alkyl	5.23	
	ALA45	π -Alkyl	3.71	
	VAL32	π -Alkyl	5.14	
ZINC91725665	VAL32	Alkyl	4.12	-10.80
	ALA45	Alkyl	3.04	
	LEU79	Alkyl	4.42	
	LYS47	π -Alkyl	4.55	
	ALA163	Alkyl	2.94	
	GLU66	Hydrogen Bond	2.54	
	ILE69	π -Alkyl	5.11	
	LEU70	π -Alkyl	4.37	
ZINC69349685	LYS47	π -Alkyl	5.29	-10.40
	LEU79	Alkyl	5.06	
	ALA163	π -Alkyl	5.48	
	ILE69	π -Alkyl	4.56	

Table 4. Cont.

Compound	Amino Acid	Type	Distance (Å)	Binding Affinity (in kcal/mol)
ZINC69431616	VAL32	π -Alkyl	5.10	-10.20
	ALA45	π -Alkyl	3.65	
	LEU79	π -Alkyl	5.40	
	LEU70	π -Alkyl	4.28	
ZINC12230819	GLU66	Hydrogen Bond	2.71	-9.80
	ILE69	π -Alkyl	5.44	
	LYS47	Hydrogen Bond	2.79	
	LYS47	Hydrogen Bond	3.03	
ZINC12230826	LYS47	Hydrogen Bond	2.81	-9.80
	LYS47	Hydrogen Bond	2.64	
	GLU66	Hydrogen Bond	2.54	
	GLU66	Hydrogen Bond	3.32	
	HIS144	π -Alkyl	3.23	
ZINC12230756	LYS47	Hydrogen Bond	2.78	-8.50
	LYS47	Hydrogen Bond	2.33	
	GLU66	Hydrogen Bond	2.43	
	LEU70	Alkyl	4.82	
	ILE69	π -Alkyl	5.10	
	VAL32	π -Alkyl	5.04	
	ALA45	π -Alkyl	4.57	
	LYS47	π -Alkyl	4.55	
	LEU79	π -Alkyl	5.39	
ZINC91881108	ASP164	Hydrogen Bond	2.53	-8.10
	ILE162	Hydrogen Bond	2.18	
	GLU66	Hydrogen Bond	2.28	
	ALA45	Alkyl	3.84	
	ALA163	Alkyl	4.54	
	LEU70	Alkyl	5.24	
	LEU79	Alkyl	4.75	
	VAL32	Alkyl	4.31	
LYS47	Alkyl	4.39		
ZINC69349687	ALA163	π -Alkyl	5.08	-8.00
	VAL32	π -Alkyl	4.78	
	ALA45	π -Alkyl	5.27	
	LYS47	π -Alkyl	4.84	
	LEU79	π -Alkyl	5.33	
	ALA163	π -Alkyl	5.45	
ZINC89571615	LYS47	Hydrogen Bond	2.52	-7.90
	GLU66	Hydrogen Bond	3.04	
	HIS144	Hydrogen Bond	2.70	
	GLU66	Hydrogen Bond	2.74	
	LEU70	Alkyl	4.93	
	ILE69	π -Alkyl	5.38	
ZINC87131463	HIS144	Hydrogen Bond	3.62	-7.90
	ILE69	Alkyl	4.17	
	LEU70	Alkyl	3.73	
ZINC81021663	ILE162	Hydrogen Bond	2.89	-7.80
	LYS47	Alkyl	5.02	
	LEU70	Alkyl	5.06	
	LEU79	Alkyl	5.20	
	ALA163	Alkyl	4.00	
	LEU70	Alkyl	4.26	
LEU79	Alkyl	4.69		

A complete net of interactions and contacts between RIPK2 and the template compound, ponatinib, is shown in Figure 7; a similar net of molecular interactions between RIPK2 and the compounds selected after virtual screening, followed by docking single, is shown in Figure 8. Most of the interactions predicted with docking for the 12 compounds (Figure 9) were the same as those observed for ponatinib (Table 4).

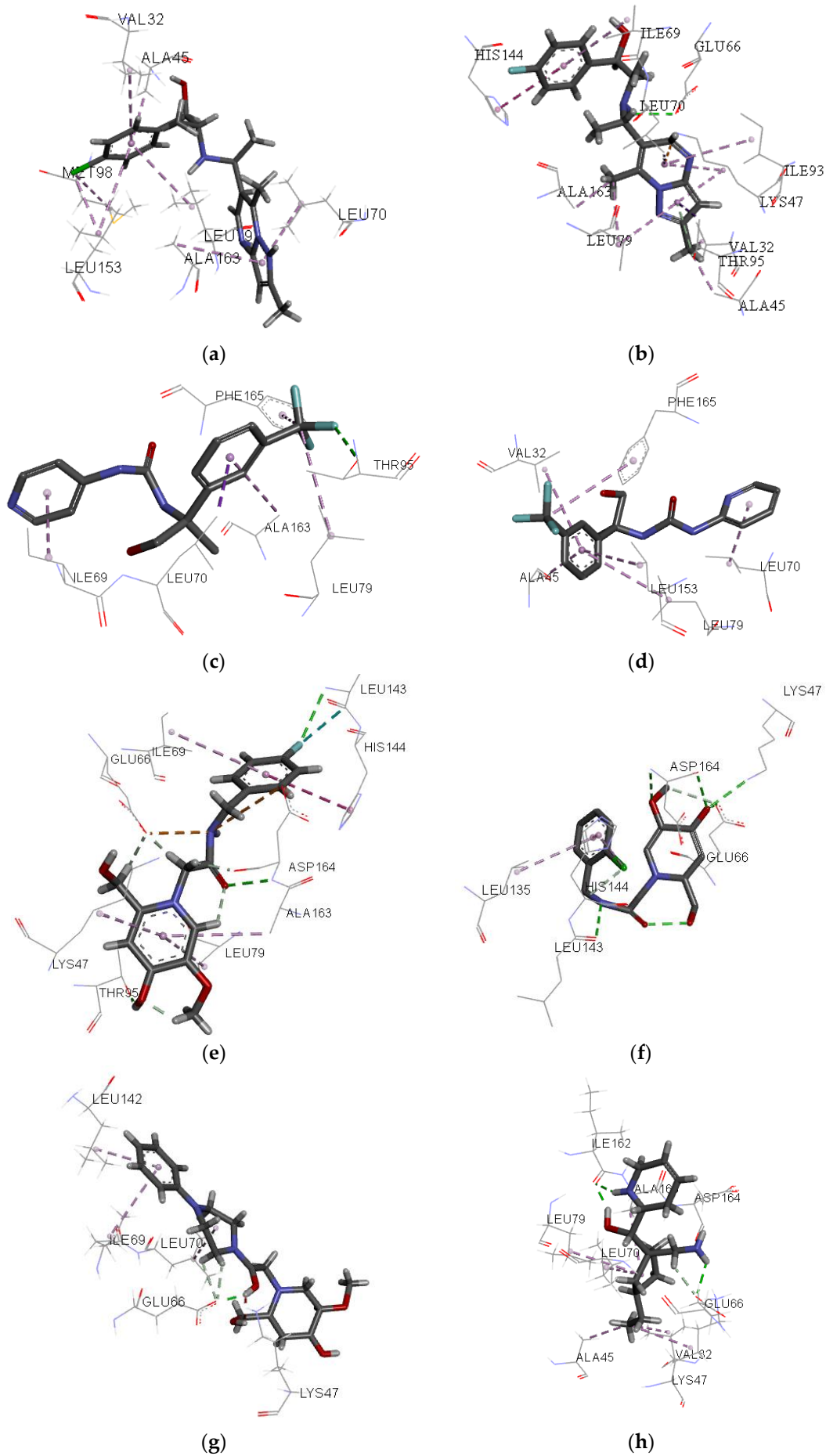


Figure 7. Cont.

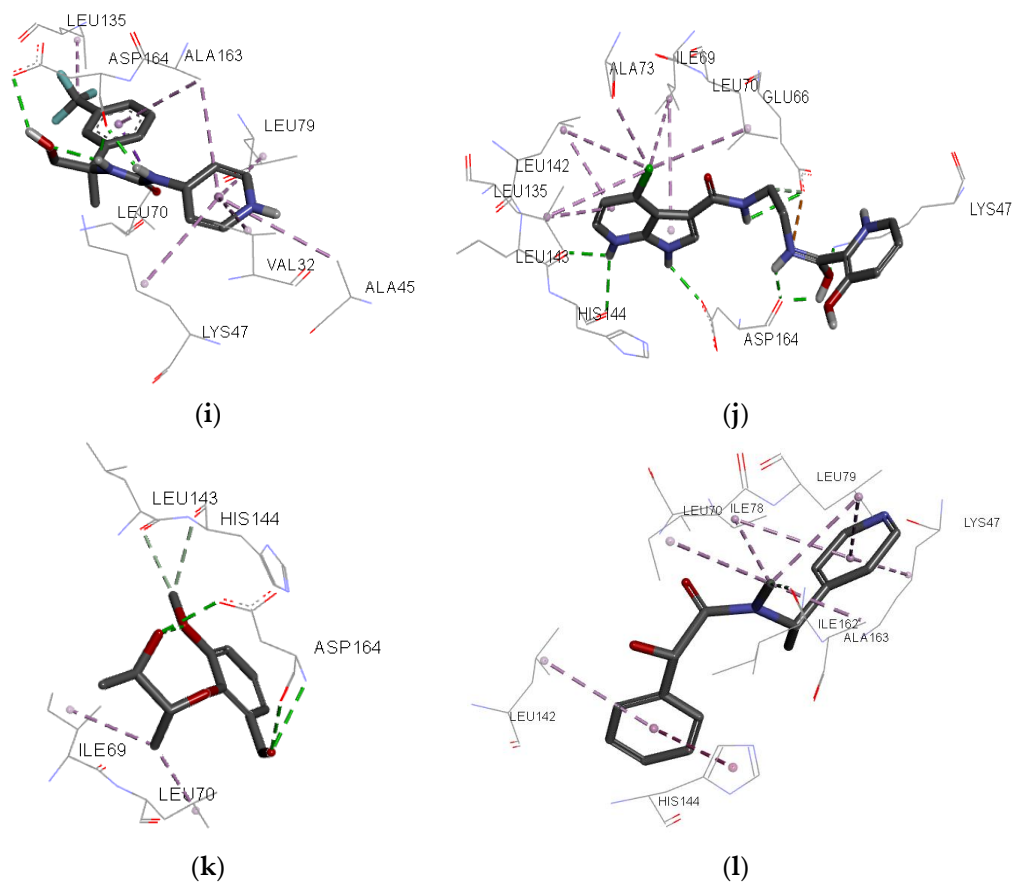


Figure 7. Individual net of interactions and contacts between RIPK2 (from PDB ID 4C8B) and the following compounds: (a) ZINC90174766; (b) ZINC91725665; (c) ZINC69349685; (d) ZINC69431616; (e) ZINC12230819; (f) ZINC12230826; (g) ZINC12230756; (h) ZINC91781108; (i) ZINC69349687; (j) ZINC89571615; (k) ZINC87131463; (l) ZINC81021663, thus calculated using the AutoDock/Vina software.

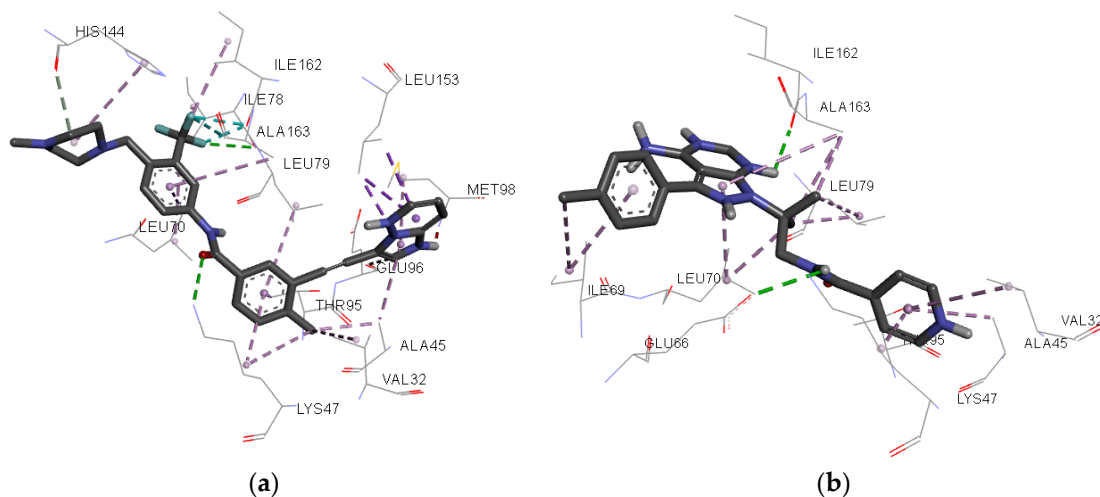


Figure 8. Individual net of interactions and contacts between RIPK2 (from PDB ID 4C8B) and (a) Ponatinib and (b) WEHI-345, thus calculated using the AutoDock/Vina software.

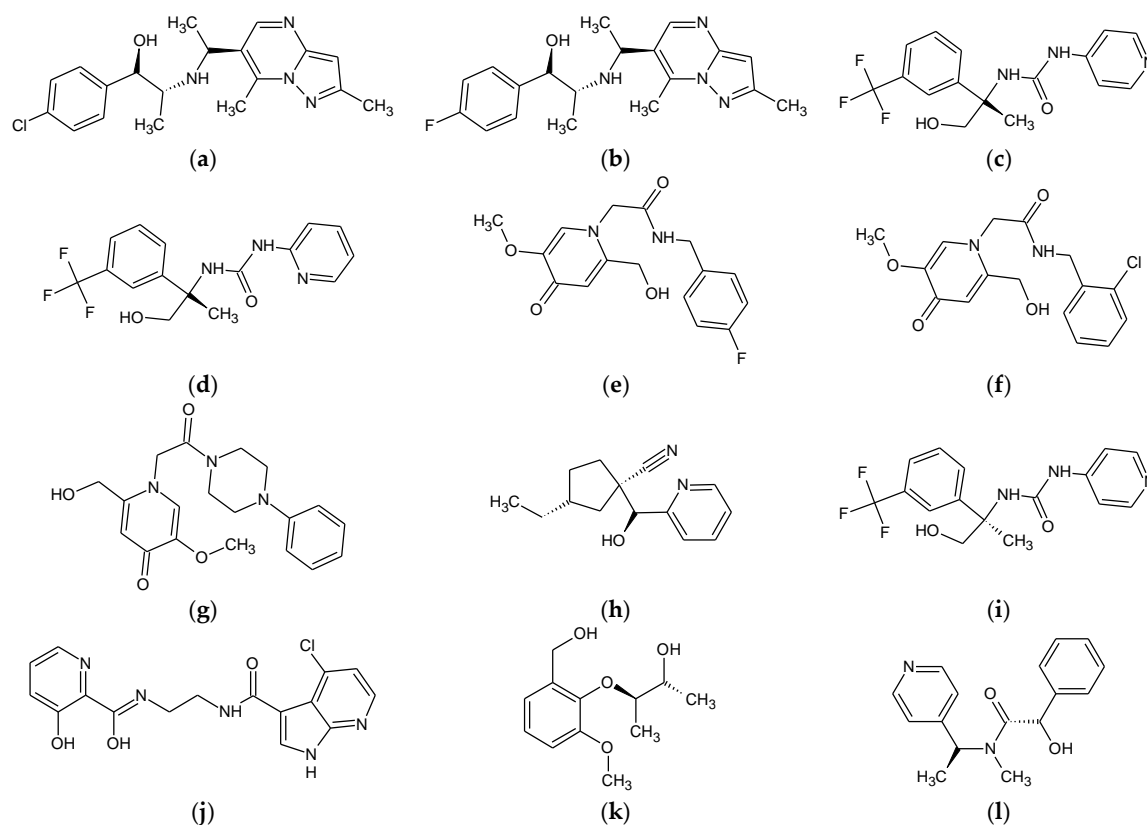


Figure 9. 2D chemical structures of 12 predicted molecules selected with molecular coupling: (a) ZINC90174766; (b) ZINC91725665; (c) ZINC69349685; (d) ZINC69431616; (e) ZINC12230819; (f) ZINC12230826; (g) ZINC12230756; (h) ZINC91881108; (i) ZINC69349687; (j) ZINC89571615; (k) ZINC87131463 and (l) ZINC81021663.

ZINC90174766 interacts by π -alkyl with the ALA163, LEU79 and ALA45 residues from RIPK2, and ZINC91725665 has two π -alkyl interactions with LYS47 and two alkyl interactions, with VAL32 and ALA45 from the same human enzyme structure. ZINC69349685 interacts only via the π -alkyl bond with ALA163 from RIPK2, and ZINC69431616 has two π -alkyl interactions, with ALA45 and LEU79 from the same enzyme structure. For ZINC12230819, two hydrogen bond interactions with LYS47 from RIPK2 were observed, and ZINC12230826 interacts with RIPK2 LYS47 via two hydrogen bonds and one π -alkyl with HIS144. ZINC12230756 has two hydrogen bonds with LYS47 from RIPK2 and three π -alkyl interactions (with ALA45, LYS47 and LEU79) and one alkyl interaction with LEU70 from the same human enzyme structure. ZINC91881108 has four alkyl interactions with RIPK2, via ALA45, LEU70, VAL32 and LYS47. ZINC69349687 interacts via π -alkyl bonds with ALA163, ALA45, LYS47, LEU79 and ALA163 from RIPK2. ZINC89571615 has two hydrogen bonds (LYS47 and HIS144) and an alkyl interaction (LEU70 from the same enzyme structure). ZINC87131463 interacts via hydrogen bond with RIPK2 HIS144 and an alkyl interaction with LEU70; ZINC81021663 has Alkyl bonds with LYS47 and LEU70.

Regarding the compound WEHI-345, all of the interactions observed with RIPK2 were also present in the RIPK2-inhibitor complex formed with the compounds selected. ZINC90174766 has four π -alkyl interactions with LEU70, ALA163, ALA45 and VAL32 from human RIPK2, and ZINC91725665 has a hydrogen bond with GLU66 and four π -alkyl interactions (with LYS47, ILE69, LEU70 and LYS47) and two alkyl interactions with LEU79 and ALA163 from the same enzyme structure. ZINC69349685 has an alkyl interaction with LEU79 and two π -alkyl interactions with ALA163 and ILE69 from RIPK2. Docking for ZINC69431616 reveals three π -alkyl interactions with VAL32, ALA45 and LEU70 from the same enzyme structure. For ZINC12230819, a hydrogen bond is observed with RIPK2 GLU66, as well as a π -alkyl with ILE69. ZINC12230826 has two hydrogen bonds with GLU66, and ZINC12230756 interacts via hydrogen bonds with GLU66 from RIPK2 and one Alkyl interaction with LEU70 as well as four π -alkyl bonds with ILE69, VAL32, ALA45 and LYS47 from the same enzyme structure. ZINC91881108 has hydrogen bonds with ILE162 and GLU66 from RIPK2 and three other alkyl interactions with ALA163, LEU70 and LEU79. ZINC69349687 interacts via five π -alkyl bonds with ALA163, VAL32, ALA45, LYS47 and ALA163. For ZINC89571615, two hydrogen bonds are observed with

RIPK2 GLU66, one Pi-alkyl interaction with ILE69, and one alkyl interaction with the same amino acid residue. **ZINC87131463** has two alkyl interactions with RIPK2, via ILE69 and LEU70, and **ZINC81021663** has alkyl interactions with LEU70, LEU79 and ALA163 and one hydrogen bond with ILE162 from the same enzyme structure.

2.4. Molecular Overlap of Screened Compounds with Ponatinib and WEHI-345

Similarity analysis of the molecular overlap of the compounds selected, after molecular docking, with ponatinib WEHI-345 can be observed for the most promising compounds based on the data in Tables 5 and 6, respectively. 100% steric (100ste) and 100% electronic (100elt), 60% steric (60est) and 40% electronic (40elt) and 50% steric and electronic (50est/elt) similarities to ponatinib are listed in Table 5, and the same pairs of similarities compared with WEHI-345 are listed in Table 6.

Table 5. Similarity analyses for the molecular overlap of the compounds for 100ste, 100elt, 60est and 40elt, 50est/elt, relative to ponatinib.

Compound	Similarity of Overlay (%)				
	100ste	100elt	60est/40elt	40est/60elt	50est/elt
ZINC90174766	0.7169	0.3917	0.4757	0.3669	0.4202
ZINC91725665	0.7128	0.4167	0.4802	0.3666	0.4234
ZINC91881108	0.4865	0.5520	0.4701	0.4775	0.4740

Our analysis regarding the template compound (ponatinib) revealed the compounds **ZINC90174766**, **ZINC91725665** (100ste), **ZINC91881108** (100elt) as exhibiting the highest values of similarity of the molecular overlap (Table 5). According to Costa et al. [30], the closer the value of is to 1 the greater the degree of structural similarity between the compounds.

Analysis regarding to the WEHI-345 revealed that the compounds **ZINC12230819**, **ZINC91881108** (100elt) and **ZINC81021663** (60est/40elt; 40est/60elt; 50est/elt) exhibited the largest values of similarity of overlay compared with the other ones (Table 6).

Table 6. Similarity analyses for the molecular overlap of the compounds for 100ste, 100elt, 60est and 40elt, 50est/elt, relative to WEHI-345.

Compound	Similarity of Overlay (%)				
	100ste	100elt	60est/40elt	40est/60elt	50est/elt
ZINC12230819	0.7824	0.3623	0.4717	0.3390	0.4036
ZINC91881108	0.6491	0.5645	0.4611	0.4131	0.4361
ZINC81021663	0.6802	0.3527	0.5687	0.5192	0.5438

It is worth noting that the compound **ZINC91881108** stood out with the highest value for similarity of molecular overlap, based on a 100% electronic analysis, compared with ponatinib and WEHI-345.

2.5. Overlap of Potential RIPK2 Inhibitors Regarding the Pharmacophoric Model

We evaluated the concordance between the pharmacophoric features and the groups found in these new molecules. Then, by superimposing them on the model, in accordance with the respective Cartesian coordinates and radii, we observed that only 10 of the 15 compounds successfully overlapped with the model. The overlapping score (QFIT) ranged from 12.21–52.28, as indicated in Table 7.

Table 7. Compounds with QFIT > 0, which were analyzed using the CHEMGPS-NP server.

Compound	QFIT Value
ZINC91881108	52.28
ZINC81021663	31.26
ZINC89571615	25.83
ZINC69349687	18.61
ZINC12230819	17.69
ZINC69349685	15.23
ZINC12230756	14.62
ZINC69431616	14.13
ZINC12230826	12.21

ZINC91881108 exhibited the best value of QFIT (52.28%). The aim of finding potential molecules that overlap with the best model is to identify a promising compound that possesses the essential stereo-electronic requirements for RIPK2 inhibition that is described/explained by the pharmacophoric model. Figure 10 shows the 20 compounds aligned according to the established Cartesian coordinates.

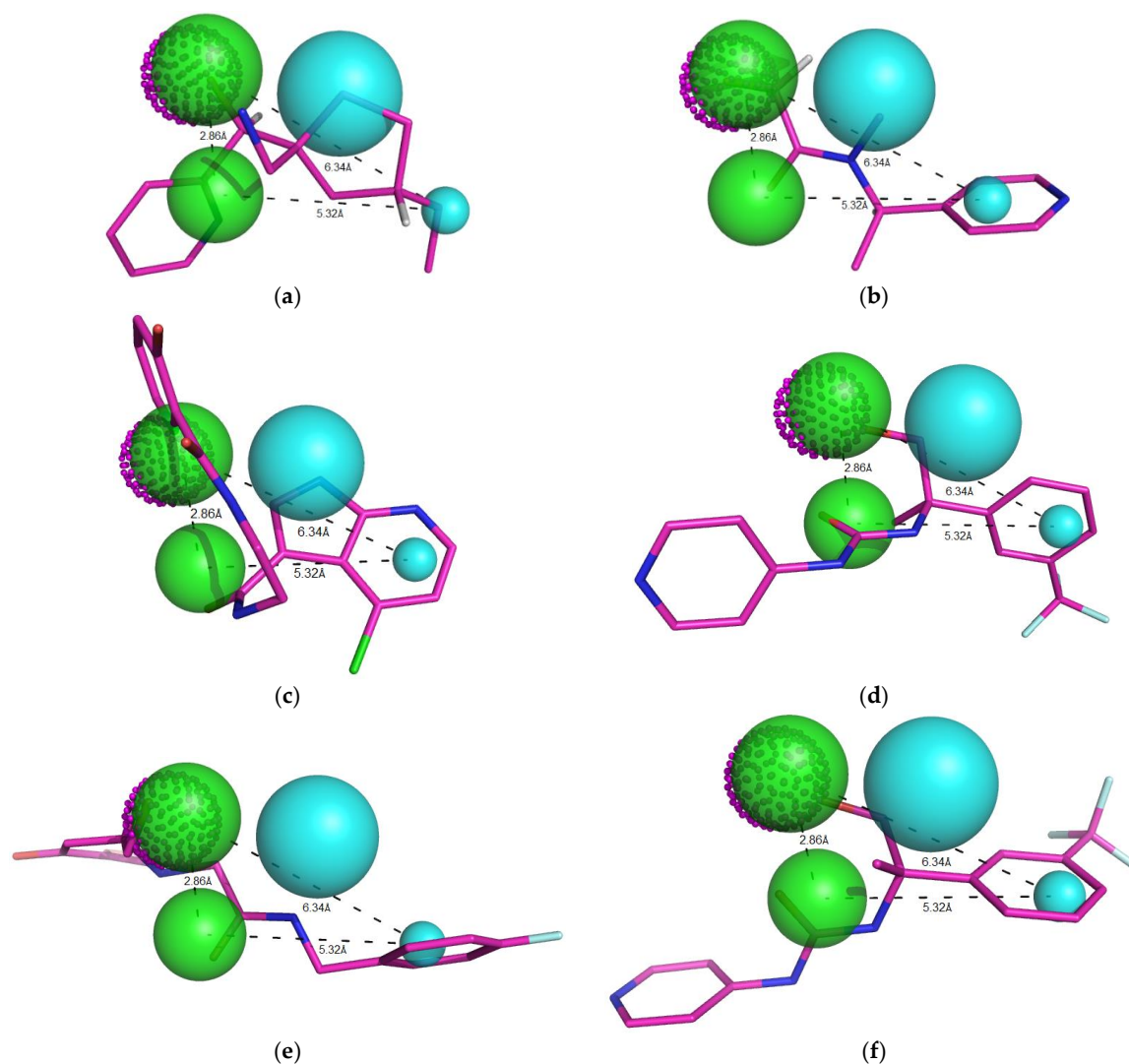


Figure 10. Cont.

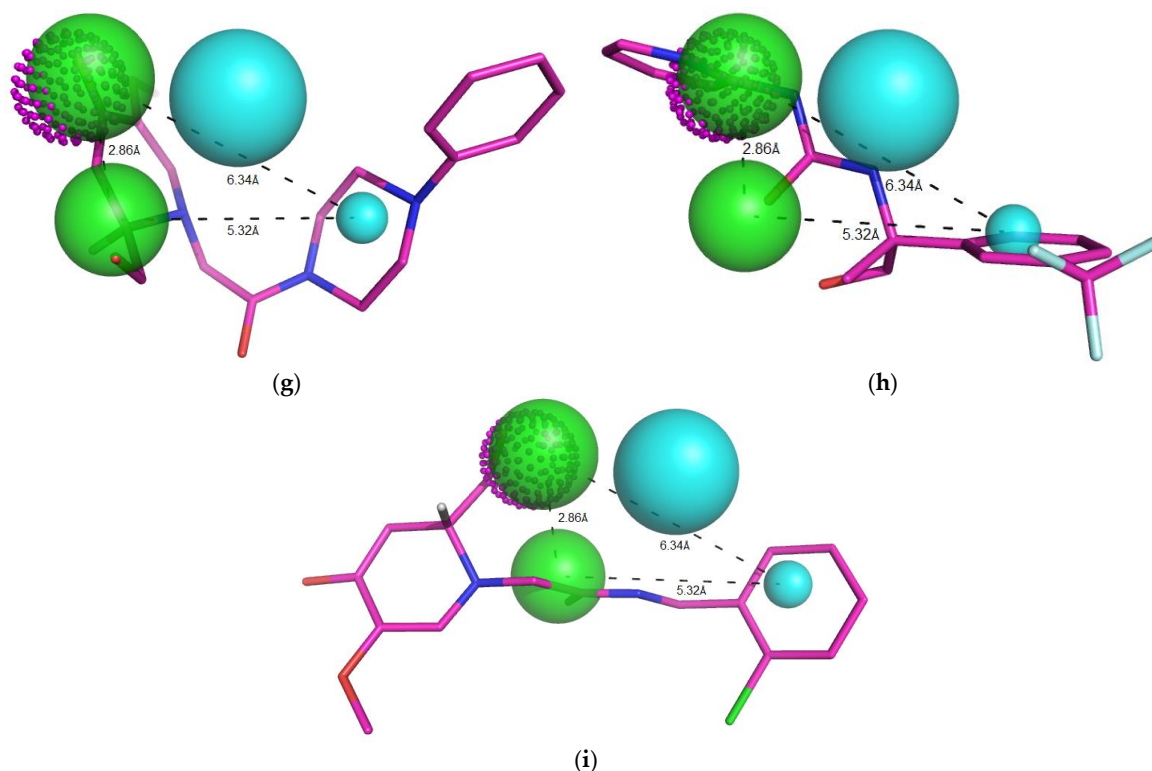


Figure 10. Representation of the ten compounds that fit to the pharmacophoric model, with QFIT > 0. Green beads/spheres represent H-bond acceptor groups, magenta dotted spheres represent H-bond donor groups, while hydrophobic centers are shown in cyan spheres. Size of the beads varies according to the tolerance radius calculated using GALAHAD. All the distances are measured in angstroms (a) ZINC91881108; (b) ZINC81021663; (c) ZINC89571615; (d) ZINC69349687; (e) ZINC12230819; (f) ZINC69349685; (g) ZINC12230756; (h) ZINC69431616 and (i) ZINC12230826.

2.6. Analysis of the Physicochemical and Toxicological Properties of the Compounds

Pharmacokinetic properties are strictly related to the administration of a drug, and they involve aspects of absorption, distribution, metabolism and excretion in the organism [31].

In Table 8, data are listed for eight molecular descriptors for analysis of 10 selected compounds. These data include the following parameters: drug similarity (number of stars/violations), Lipinski rule of five, percentage of human absorption (HOA%), Caco-2 and MDCK cell permeation, hydrophilic/lipophilic balance (Qplog Po/w), central nervous system (CNS) activity and blood-brain barrier permeability (Qplog BBB).

The parameter “stars” indicates descriptors that are outside (violations) the optimum range of values described for 95% of known drugs contained in the QikProp database. In such analyses, all of the selected compounds exhibited values equal to zero (no violations), indicating important similarity with commercially available drugs. On the other hand, ponatinib exhibited violations.

The Lipinski rule of five represents a well-established form of simple limits for absorption and permeability of drugs. In Table 8, data show that all the compounds selected exhibited interesting increases in oral absorption in the organism. The percentage of human oral absorption (HOA%) was considered to be high; all of the compounds exhibited values higher than 80%. On the other hand, ponatinib exhibited a value of 73%.

The apparent perception of absorption of drugs in the gastrointestinal tract using Caco-2 and MDCK cells (ACP and AMP, respectively) was investigated for values <25 (low) and >500 (optimum). Most of the molecules listed in Table 8 exhibit excellent values, except for the compounds ZINC12230819, ZINC12230826, ZINC89571615 and the template and control compounds (ponatinib and WEHI-345), which were considered to be intermediates.

The parameter established to indicate inactivity for penetration into the blood-brain barrier and consequent CNS activity includes values below 1 (CBrain/CBlood < 1). In this work, all the compounds exhibited values lower than 1. Ideally, these compounds can be thought as being inactive in the CNS and therefore immune to side effects in humans [32]. In considering the permeability of drugs into the CNS (calculating Qplog BBB)—negative values indicate a higher concentration of the compound in the blood than in the brain—

our results indicate that the compounds we investigated only exhibited negative values. The parameter established as QPlog Po/w, with an optimum interval ranging from -2.0 to 6.5, is related to the bioavailability and permeability of the compounds through the membranes in the hydrophilic and lipophilic balance. To this end, all of the compounds that we investigated fell within the given limits (Table 8).

Table 8. Pharmacokinetic properties of nine selected compounds as well as ponatinib and WEHI-345.

Compound	Stars	Rule of Five	% HOA	ACP (nm/s)	AMP (nm/s)	QPlog Po/w	CNS	QPlog BBB
Ponatinib	1	1	73.645	67.076	119.394	4.605	1	-0.026
WEHI-345	0	0	93.941	456.487	211.950	3.313	-2	-1.220
ZINC69349685	0	0	100.00	1300.94	3123.35	2.563	-1	-0.281
ZINC69431616	0	0	100.00	1695.74	4585.45	2.910	-1	-0.145
ZINC12230819	0	0	80.392	362.468	467.713	1.305	-2	-1.048
ZINC12230826	0	0	82.927	462.942	598.190	1.413	-1	-0.871
ZINC12230756	0	0	84.316	561.255	418.589	1.395	-1	-0.809
ZINC91881108	0	0	94.985	1169.73	586.063	2.242	0	-0.577
ZINC69349687	0	0	100.00	1297.59	3147.44	2.566	-1	-0.282
ZINC89571615	0	0	83.225	229.628	131.490	2.395	-2	-1.455
ZINC81021663	0	0	89.971	946.013	748.108	1.667	0	-0.526

In the toxicological in silico investigation of the nine selected compounds, which was performed using DEREK Nexus software, potential toxicity (carcinogenicity, chromosomal damage, genotoxicity, hepatotoxicity, HERG channel inhibition, irritation, mutagenicity, reproduction toxicity, respiratory sensitization, skin sensitization, thyroid toxicity) was analyzed. We found that none of the compounds analyzed had a potential toxic. On the other hand, the template compound (ponatinib) exhibited a toxicophoric group (aryl piperazine) based on DEREK 10.0.2 Nexus software [22] analysis.

2.7. Prediction of Synthetic Accessibility

The synthetic accessibility of the compound ZINC91881108 had a computed score of 5.01 (moderately difficult) (Table 9). This finding is similar to that of ponatinib as well as WEHI-345, leaving us to propose future synthesis and subsequent activity assays for such a compound.

Table 9. Prediction of synthetic accessibility of ponatinib, WEHI-345 and the selected compound ZINC91881108.

Compound	Accessibility
Ponatinib	5.10
WEHI-345	4.86
ZINC91881108	5.01

2.8. Structure—Activity Relationship of the Promising Molecule

The biological response of a structurally specific drug depends necessarily on the identification of the active site and its spatial mutuality. Therefore, analysis of the pharmacophore cluster enables the stereo-electronic recognition that is fundamental to its pharmacological activity [33]. According to a study by Canning et al. [2] of the crystallographic pose of the amino acid residue interactions of the RIPK2 complexed to ponatinib, there are hydrogen bonds (interactions with Glu66A, Asp164A, Met98A) and hydrophobic interactions. Therefore, the pharmacophore (Figure 2) shares hydrophobic regions and the promising molecule ZINC91881108 interacts with hydrogen bonds (Asp164 and Glu66) (Figure 11).

When analyzing ponatinib (Figure 12) (1) (compound template), we observed that it had regions characterized by an imidazole ring, which forms hydrogen bonds, and hydrophobically interacting pyridazine. In Figure 11, we show the molecule ZINC91881108 possessing the pyridine derivative group, which has anti-inflammatory activities. This finding has been reported by Sondhi et al. [34] and Sangshetti et al. [35].

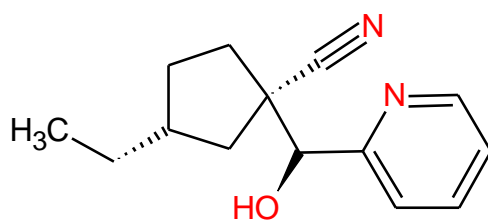


Figure 11. Promising molecule ZINC91881108 obtained after virtual screening.

The primary amine present in the compound and the hydroxyl is an important group because it is capable of improving the solubility of the compound and modifying the chemical reactivity of the drug-receptor interaction [36].

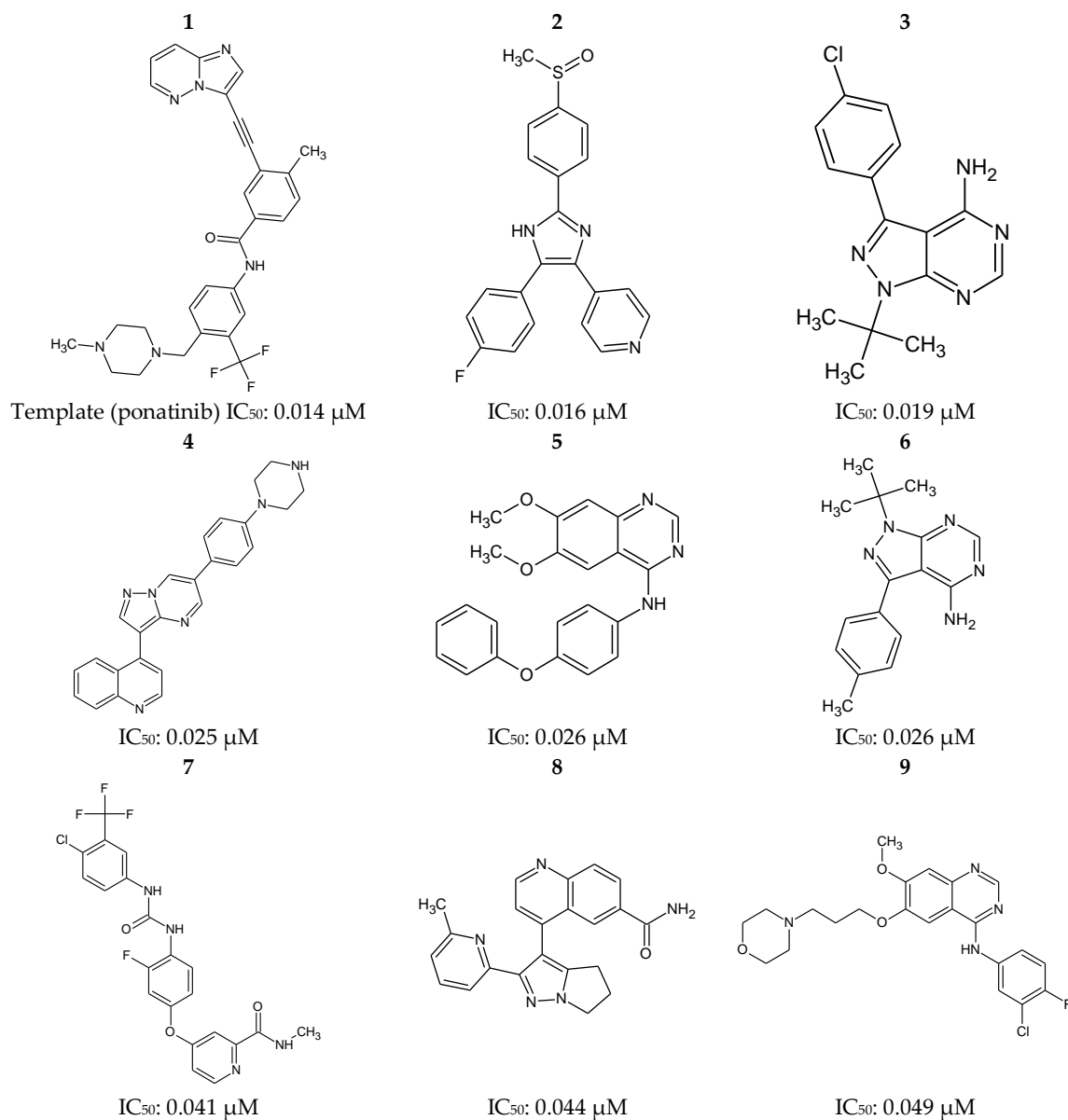


Figure 12. Cont.

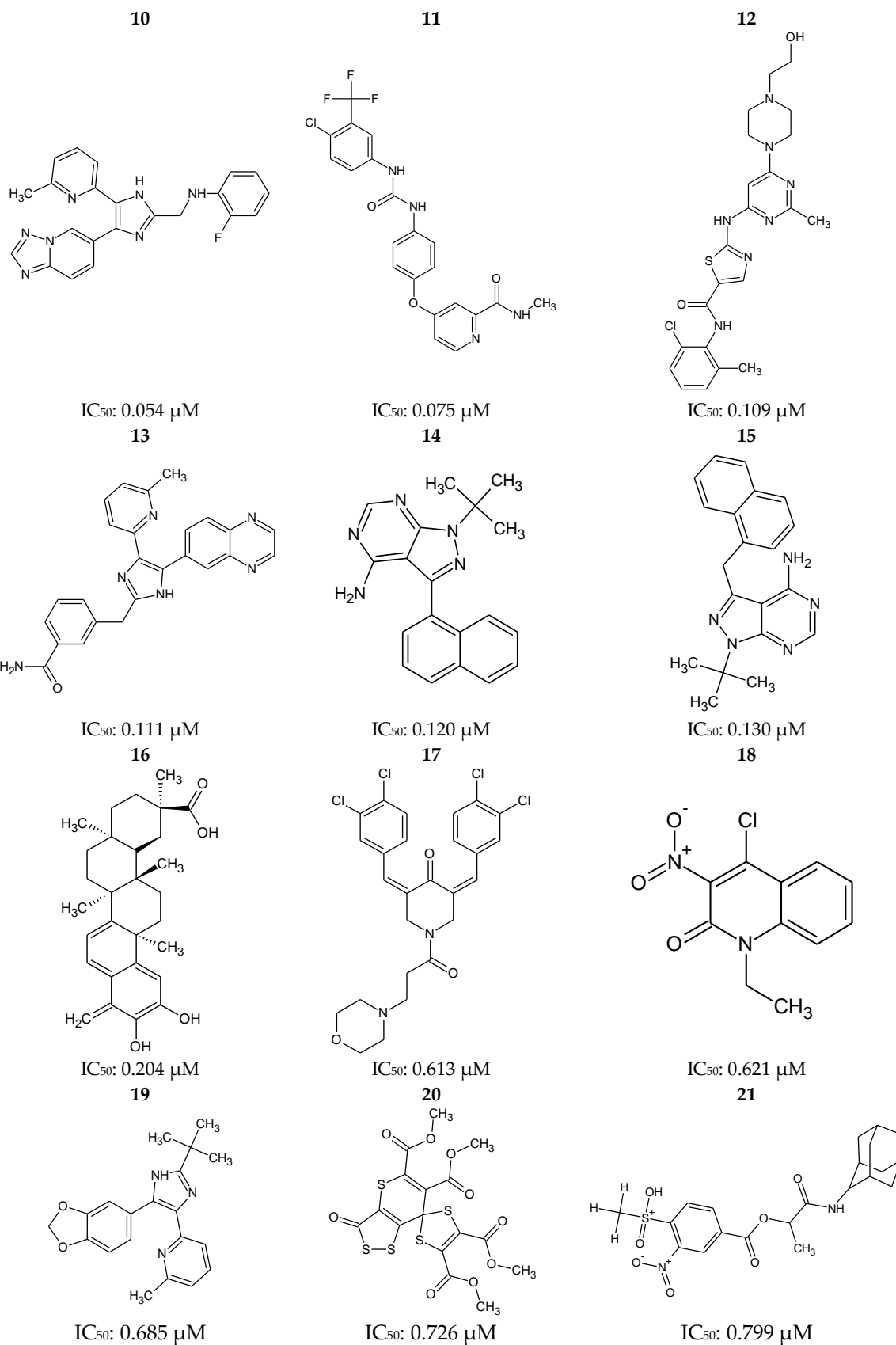


Figure 12. Cont.

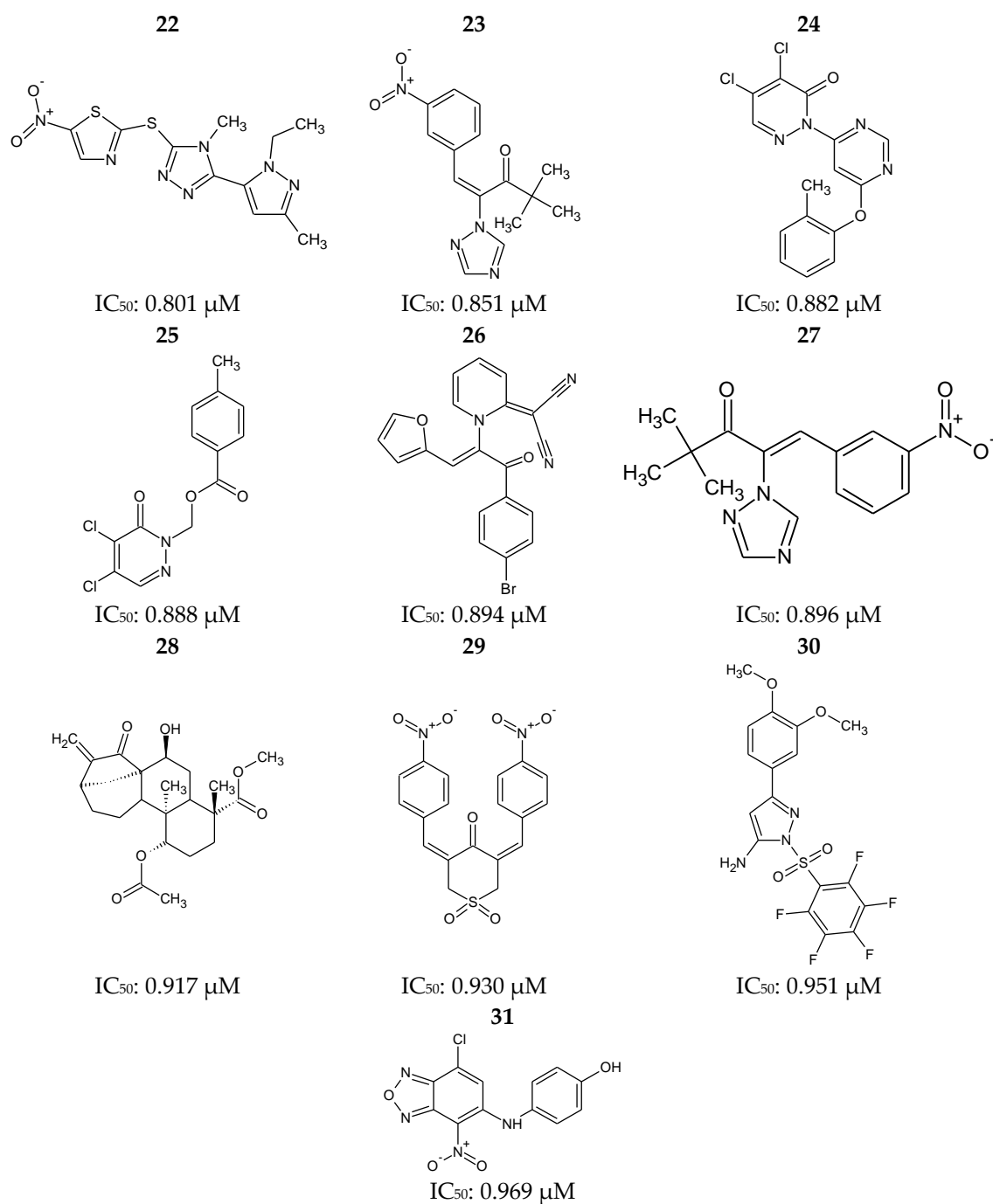


Figure 12. Ponatinib (1) and 30 most potent RIPK2 inhibitors (2–31) obtained from the Protein Data Bank (PDB) and the BindingDB database.

3. Materials and Methods

3.1. Selection of Compounds

Selection of the compound ponatinib [2] and other inhibitors reported in literature was done from the Protein Data Bank (PDB) and the BindingDB (<http://www.bindingdb.org>) [37] web server, respectively (2D structures are shown in Figure 12), according to the lower IC_{50} values there reported (between 0.016 and 0.969 μ M), which were considered limiting for this selection, such as observed in studies developed by Pereira and Costa et al. [30,38]. Such inhibitors are related to the Protein Kinase Receptor type 2—RIPK2, for which the structure of the potent inhibitor ponatinib is deposited in the PDB [39] in a complex with human RIPK2 (PDB ID 4C8B, at 2.75 Å resolution).

After definition of the small database to be built (ponatinib + 30 reported and potent RIPK2 inhibitors), the most reliable tautomers (at pH = 7.5) were selected for all the compounds, using the Marvin® Sketch 16.9.5

software (<https://www.chemaxon.com/>) [2,40]. Subsequently, structures were converted to 3D format using CONCORD, with default parameters, thus implemented on the SYBYL[®]-X 2.0 package [17]. All the structures were energy-minimized using Conjugate Gradient (CG) and a convergence criterion of 0.001 kcal/mol, using the Tripos [41] force field (with dielectric constant $\epsilon = 80.4$ and maximum number of iterations = 50,000). Partial atomic charges were calculated using the Gasteiger-Hückel method [42], such as available on the SYBYL[®]-X 2.0 platform.

In order to select the best set (the training set) of inhibitors able to generate a reliable pharmacophoric model, a chemical similarity study was carried out. Inhibitors were thus selected according to the chemical diversity, estimated using the web server ChemGPS-NP [43], so that the most potent compounds of each cluster were selected by hierarchical cluster analysis [44]. The first three principal components (PC1, PC2 and PC3) were used to construct the dendrogram related to the chemical similarity study (Figure 13).

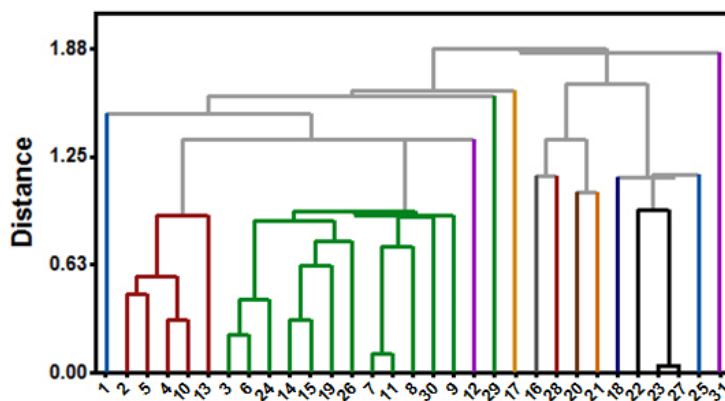


Figure 13. Dendrogram used to investigate chemical similarity of RIPK2 inhibitors.

A dendrogram was thus generated considering the centroid method and the Euclidean distance here used as a measurement parameters, and 85% (threshold) of similarity between the compounds [44]. In sequence, the representative one of each cluster that showed the highest biological activity was chosen to compose the so called “training set”, which was constructed from a dataset of 14 RIPK2 inhibitors (group A). IC₅₀ values are: 0.014 μM (1), 0.016 μM (2), 0.019 μM (3), 0.109 μM (12), 0.204 μM (16), 0.613 μM (17), 0.621 μM (18), 0.726 μM (20), 0.799 μM (21), 0.801 μM (22), 0.888 μM (25), 0.917 μM (28), 0.930 μM (29) and 0.969 μM (31).

A second dataset with 17 RIPK2 inhibitors (group B) was chosen, with IC₅₀ values of: 0.025 μM (4), 0.026 μM (5), 0.026 μM (6), 0.041 μM (7), 0.044 μM (8), 0.049 μM (9), 0.054 μM (10), 0.075 μM (11), 0.111 μM (13), 0.120 μM (14), 0.130 μM (15), 0.685 μM (19), 0.851 μM (23), 0.882 μM (24), 0.894 μM (26), 0.896 μM (27) and 0.951 μM (30). Such compounds were here submitted to the same protocol of energy minimization and they were used only for the evaluation of the pharmacophoric models, here so called the “test set”.

3.2. Pharmacophore Modelling

The method here used to derive the pharmacophoric pattern is Genetic Algorithm with Linear Algorithm for Hypermelecular Alignment of Data Sets (GALAHAD), a module implemented in the SYBYL platform [45]. Inhibitors of the training set were flexibly superimposed in order to create hypermolecular alignments that mapped common pharmacophore characteristics. The genetic algorithm employed in this step starts with 80 conformations (population size) of each RIPK2 inhibitor that evolves through a maximum of 50 generations through standard genetic operators (mutation rate—Angle: 0.6, Conf: 0.3; mutation drop-Angle: 1.0, Conf: 1.0 and crossover rate-Angle: 1.0, Conf: 1.0), such as implemented in the GALAHAD module from the SYBYL-X[®] 2.0 package. Statistical parameters (deformation energy, PARETO, hydrogen bonds and steric) and pharmacophore (Mol_qry values) were used to evaluate the models. Models with deformation energy containing two orders of magnitude higher than the others were discarded.

3.2.1. Evaluation of the Pharmacophoric Models

Pharmacophore models were first tested for their ability to differentiate true inhibitors from false positives, and they were constructed using the DUD-E server [46]. After, the test set database (17 false-positive RIPK2 inhibitors, with 850 compounds) was aligned to each pharmacophore model, using GALAHAD default parameters, and they were classified according to their Mol_qry values.

Operational Characteristic Receiver Curves (ROC) were then used to evaluate the specificity and sensitivity of each model. Next, the pharmacophoric models with AUC > 0.7 were probed by their ability to classify the inhibitors according to their potency. In this step, 34 RIPK2 inhibitors, the test set (17 inhibitors-Group B, see Figure 1) and 17 other inhibitors randomly selected (T1-T17), with IC₅₀ values of 0.0063 μM (T1), 0.0079 μM (T2), 0.01 μM (T3), 0.012 μM (T4), 1.03 μM (T5), 1.1 μM (T6), 1.12 μM (T7), 1.15 μM (T8), 1.18 μM (T9), 1.19 μM (T10), 1.20 μM (T11), 1.23 μM (T12), 1.32 μM (T13), 1.35 μM (T14), 1.36 μM (T15), 1.36 μM (T16) and 1.4 μM (T17), which were not used in the model generation, were individually aligned to a model, such as implemented in the GALAHAD module. The Mol_qry values were then plotted versus the biological activity classes of the compounds (using the pIC₅₀ = -logIC₅₀ equation) and classified as the following: weak = 5.0 to 5.9; moderate = 6.0 to 6.9 and strong = 7.0 to 9.0. ROC curves of pharmacophore models were build via the SigmaPlot® software [47].

3.2.2. Selection of Novel and Potential RIPK2 Inhibitors from the ZINC Compounds Database

The ZINC compounds database is the largest one commercially available for virtual screening purposes, and it contains more than 14 million compounds [21]. After building of the most reliable pharmacophore model, thus validated using the GALAHAD approach, the ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu>) [48] web server was used to search for compounds in the ZINC database, using the pharmacophoric model obtained and here used as a “probe”. For this step, we used some search filters, so that the maximum value of RMSD (Root Mean Square Deviation) employed was 0.3. In addition, interval values of 200 ≤ Molecular Weight ≤ 500 and 1 ≤ Rotational Connections ≤ 10, were here defined for predictions, as well as observed in studies of Birck et al. (2016) [49]. Therefore, in order to proceed with search for active compounds in the database, we considered the 3D coordinates described in Table 10, according to the respective pharmacophoric model generated.

Table 10. 3D Coordinates and pharmacophoric features of the best-ranked pharmacophoric model.

Pharmacophoric Feature	X	Y	Z	Radius (in Å)
Hydrogen Bond Donor	3.71	-0.53	1.86	1.10
Hydrogen Bond Acceptor	2.47	-1.65	-0.38	1.11
Hydrogen Bond Acceptor	3.51	-0.10	1.79	1.26
Hydrophobic	-2.33	0.63	-0.57	0.55
Hydrophobic	0.68	1.00	1.43	1.42

3.3. Pharmacokinetic and Toxicological Predictions – ADME/Tox

Pharmacokinetic in silico analyses were performed for the selected molecules, using the QikProp software [50], where criteria such HOA (human oral absorption), PHOA (percentage of human oral absorption) and “stars”, which indicates the number of violations of properties values intervals reported for 95% known drugs, were considered such as described by Onguéné et al. (2014) [51].

Toxicity profile of the compounds was evaluated using the Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge (DEREK) 10.0.2 software [22]. We have considered DEREK alerts of toxicity involving the human species and also classified as plausible in mammals, but compounds containing any toxicophoric groups were also discarded. The DEREK software [22] makes the prediction of toxicity of the compounds in a qualitative way, is a specialist system that focuses attention on the toxic action of chemical compounds. The system performs this analysis based on implemented rules and depicts the relationship between a structural feature and a toxicophore group present in the compounds as possible inducers of certain types of toxicity. It is considered that in addition to toxicity DEREK can identify aspects related to carcinogenicity, mutagenicity, skin sensitization, irritation, teratogenicity and neurotoxicity [52].

3.4. Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)

Prediction of potential biological activity was performed through the PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) web server, at <http://pharmaexpert.ru/passonline/predict> [24]. Inflammatory diseases and mechanisms associated were here considered, such as treatment of rheumatoid arthritis, autoimmune activity, kinase inhibitors, etc., according to studies of Volpini; Pedersoli-Mantoani et al. [25,53] Rodrigues and Silva [26].

3.5. Docking Procedures

For molecular docking here performed, the crystallographic structure of the RIPK2 derived from RIPK2-ponatinib complex structure (PDB ID 4C8B, at 2.75Å resolution) [2] was used. The enzyme structure was prepared by removing water and ligands, subsequently adding hydrogen atoms.

Compounds here selected using a virtual screening approach were submitted to the docking single simulations, using the PyRx 0.8 software, with further energy minimization [54]. Ponatinib [2] and WEHI-345, respectively a potent and a selective RIPK2 inhibitor [5], were used as template and control inhibitors. Docking calculations were performed using the AutoDock 4.2/Vina 1.1.2 [55] software, with default parameters of the genetic algorithm (with population size of 150), maximum number of evaluations of 250,000, maximum number of generations of 27,000 and crossing rate of 0.8. Interactions between the inhibitors and RIPK2 were visualized using the Discovery Studio 4.1 [56] software, with default parameters. We have used a grid box of $x = 56$, $y = 28$ and $z = 24$ coordinates, centered at $x = 14.254$, $y = 2.632$ and $z = 23.776$. Ten docking runs were considered and the ten poses were analyzed.

3.6. Molecular Overlay—Molecular Overlay

Molecular Overlay is used to overlap two or more molecules using a variety of features that includes, in addition to other aspects, alignment by a combination of steric (ste) and electrostatic (elt) fields [56]. For this purpose, analyses of the steric and electronic overlaps were predicted using the Discovery Studio 4.1 software [56], considering 100% ste, 100% elt, 60% ste/40% elt, 40% ste/60% elt and 50% ste/elt, according to studies of Costa et al. (2017) [30] between the RIPK2 inhibitors and Ponatinib. In sequence, similar protocol was employed using WEHI-345.

3.7. Alignment Overlap of Inhibitors with the Pharmacophoric Model

We have used the methodology implemented in the CHEMGPS-NP (<http://chemgps.bmc.uu.se>) web server to evaluate the quality of the alignment of each inhibitor. The QFIT value associated to the overlap means the degree of alignment ranging from 0 to 100, and it is calculated automatically to select the most promising models [57].

3.8. Sylwia—Estimation of the Synthetic Accessibility of Organic

In this step, the Sylwia 1.4 [58] server was used to estimate the synthetic viability of the compounds here investigated. For such prediction, the promising compound was compared with the template one (ponatinib) as well as to the control (WEHI-345). For analysis, it is considered that the estimation of synthetic accessibility provides a number between 1—for easily synthesized compounds, and 10—for compounds that are difficult to synthesize, according to studies developed by Ferreira et al. [59].

4. Conclusions

We indicate compound **ZINC91881108**, discovered using a virtual screening approach from the ZINC compounds database as a promising RIPK2 inhibitor, with further interest in control of inflammatory diseases. Pa » Pi is observed for such compound, besides a potential anti-inflammatory activity. Analysis of molecular docking for this compound reveals a potential higher binding affinity, in comparison to WEHI-345. In a 100% electronic analysis when overlapping of **ZINC91881108** with ponatinib or WEHI-345, such compound stand out for having a highest value for similarity of overlap. Thus, this compound has the best score of stereoelectronic overlap, when being sorted. The importance of this present work is evident because, regarding to structure-activity relationships (SAR), the steric arrangement is of fundamental relevance for the drug-enzyme

interaction. In addition, the electronic aspects are strictly related to the electronic density and physicochemical properties and polar interactions associated. Compound **ZINC91881108** shows suitable pharmacokinetic properties, when compared to the template compounds—RIPK2. Also, such compound does not contain any toxicophoric groups, such as analyzed using the DEREK software. Regarding synthetic accessibility, the said compound **ZINC91881108** is predicted in silico to be moderately difficult to prepare.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the support provided by Laboratório de Modelagem e Química Computacional, Universidade Federal do Amapá, Departamento de Ciências Biológicas, Macapá, Amapá, 68902-280, Brazil and Laboratório de Modelagem Molecular, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 44036-900, Brazil. The authors would like to thank the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences of Federal University of Amapá.

Author Contributions: Cleydson B. R. Santos and Carlos H. T. P. da Silva developed the concept of the work. Moysés F. A. Neto and Franco H. A. Leite carried out the pharmacophore screening work. Josiane V. Cruz, Ryan da S. Ramos, Josivan da S. Costa and Cleison C. Lobato conducted the molecule docking assay. Josiane V. Cruz, Davi S. B. Brasil, Luciane B. Silva, Glauber V. da Costa and José Adolfo H. M. Bittencourt discussed and analyzed the results. Josiane V. Cruz wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tigno-Aranjuez, J.T.; Benderitter, P.; Rombouts, F.; Deroose, F.; Bai, X.; Mattioli, B.; Cominelli, F.; Pizarro, T.T.; Hoflack, J.; Abbott, D.W. In vivo inhibition of RIPK2 kinase alleviates inflammatory disease. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 29651–29664.
2. Canning, P.; Ruan, Q.; Schwerd, T.; Hrdinka, M.; Maki, J.L.; Salch, D.; Suebsuwong, C.; Ray, S.; Brennan, P.E.; Cuny, G.D.; et al. Inflammatory Signaling by NOD-RIPK2 Is Inhibited by Clinically Relevant Type II Kinase Inhibitors. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1174–1184.
3. Cortes, J.E.; Kantarjian, H.; Shah, N.P.; Bixby, D.; Mauro, M.J.; Flinn, I.; O'hare, T.; Hu, S.; Narasimhan, N.I.; Rivera, V.M.; et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 2075–2088.
4. Zhang, M.; Hassan, K.M.; Musiek, A.; Rosman, I.S. Ponatinib-induced neutrophilic panniculitis. *J. Cutan. Pathol.* **2014**, *41*, 597–601.
5. Nachbur, U.; Stafford, C.A.; Bankovacki, A.; Zhan, Y.; Lindqvist, L.M.; Fiil, B.K. Khakham, Y.; Ko, H.; Sandow, J.J.; Falk, H.; et al. A RIPK2 inhibitor delays NOD signalling events yet prevents inflammatory cytokine production. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6442.
6. Cichero, E.; Cesarini, S.; Spallarossa, A.; Mosti, L.; Fossa, P. Acylthiocarbamates as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: Docking studies and ligand-based CoMFA and CoMSIA analyses. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 871–884.
7. Cichero, E.; D'Ursi, P.; Moscatelli, M.; Bruno, O.; Orro, A.; Rotolo, C.; Milanese, L.; Fossa, P. Homology Modeling, Docking Studies and Molecular Dynamic Simulations Using Graphical Processing Unit Architecture to Probe the Type-11 Phosphodiesterase Catalytic Site: A Computational Approach for the Rational Design of Selective Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82*, 718–731.
8. Liessi, N.; Cichero, E.; Pesce, E.; Arkel, M.; Salis, A.; Tomati, V.; Paccagnella, M.; Damonte, G.; Tasso, B.; Galiotta, L.J.V.; et al. Synthesis and biological evaluation of novel thiazole-VX-809 hybrid derivatives as F508del correctors by QSAR-based filtering tools. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 179–200.
9. Chung-Hang, L.; Dik-Lung, M. Recent advances in virtual screening for drug discovery. *Methods* **2015**, *71*, 1–3.
10. Shoichet, B.K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* **2004**, *16*, 862–865.
11. Yang, C.; Wang, W.; Chen, L.; Liang, J.; Lin, S.; Lee, M.-Y.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H. Discovery of a VHL and HIF1 α interaction inhibitor with in vivo angiogenic activity via structure based virtual screening. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12837–12840.
12. Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual Screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 9354–9359.
13. Shepphird, J.K.; Clark, R.D. A marriage made in torsional space: Using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches. *J. Comput. Aided Mol.* **2006**, *20*, 763–771.
14. Long, W.; Liu, P.; Li, Q.; Xu, Y.; Gao, J. 3D-QSAR Studies on a Class of IKK-2 Inhibitors with GALAHAD Used to Develop Molecular Alignment Models. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 1113–1119.
15. Liu, M.; Wu, Q.; Hu, W. Pharmacophore Screening on Piperidinecarboxamides Derivatives Based on GALAHAD and CoMFA Models. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 1075–1083.

16. Leite, F.H.A.; Froes, T.Q.; Silva, S.G.; Souza, E.I.M. Vital-Fugi, D.G.; Trossini, G.H.G.; Pita, S.S.D.R.; Castilho, M.S. Na integrated approach towards the Discovery of novel non-nucleoside leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 322–332.
17. SYBYL-X 2.0. Tripos. Molecular Modeling Software Packages; 1699 South Hanley Road Inc.: St. Louis, MO, 63144, USA, 2012.
18. Metz, C.E. Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* **1978**, *8*, 283–298.
19. Søreide, K.; Korner, H.; Søreide, J.A.S. Diagnostic accuracy and receiver-operating characteristics curve analysis in surgical research and decision making. *Ann. Surg.* **2011**, *253*, 27–34.
20. Haile, P.A.; Votta, B.J.; Marquis, R.W.; Bury, M.J.; Mehlmann, J.F.; Singhaus, R., Jr.; Charnley, A.K.; Lakdawala, A.S.; Convery, M.A.; Lipshutz, D.B.; et al. The Identification and Pharmacological Characterization of 6-(*tert*-Butylsulfonyl)-*N*-(5-fluoro-1*H*-indazol-3-yl)quinolin-4-amine (GSK583), a Highly Potent and Selective Inhibitor of RIP2 Kinase. *J. Med. Chem.* **2016**, *10*, 4867–4880.
21. Irwim, J.J.; Shoichet, B.K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177–182.
22. Derek for windows. Version 10.0.2. User Guide. Lhasa Limited, Department of Chemistry, University of Leeds, Leeds, UK, 2007.
23. Keiser, M.J.; Roth, B.L.; Armbruster, B.N.; Ernsberger, P.; Irwin, J.J.; Shoichet, B.K. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 197–206.
24. Poroikov, V.V.; Filimonov, D.A.; Ihlenfeldt, W.-D.; Glorizova, T.A.; Lagunin, A.A.; Borodina, Y.V.; Stepanchikova, A.V.; Nicklaus, M.C. PASS Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI Database Browser. *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 228–236.
25. Volpini, J.G.A.; Rodrigues, R.P.; Federico, L.B.; de Silva, C.H.T.P. Structure-Based Drug Design of Novel MARK-3 Inhibitors in Cancer. *Curr. Bioact. Compd.* **2014**, *10*, 131–138.
26. Rodrigues, R.P.; Silva, C.H.T.P. Pharmacophore, Similarity and ADMET Screening of Casein Kinase 1 inhibitors in Alzheimer's Disease. *Curr. Bioact. Compd.* **2013**, *9*, 27–36.
27. Rodrigues, R.P.; Mantoani, S.P.; DE Almeida, J.R.; Pinseta, F.R.; Semighini, E.P.; DA Silva, V.B.; DA Silva, C.H.P. Virtual Screening Strategies in Drug Design. *Rev. Virtual Quim.* **2012**, *4*, 739–776.
28. Hevener, K.E.; Zhao, W.; Ball, D.M.; Babaoglu, K.; Qi, J.; White, S.W.; Lee, R.E. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 444–460.
29. Padilha, E.C.; Serafim, R.B.; Sarmiento, D.Y.R.; Santos, C.F.; Santos, C.B.R.; Silva, C.H.T.P. New PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ Optimal Activator Rationally Designed by Computational Methods. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1636–1647.
30. Costa, J.S.; Costa, K.S.L.; Cruz, J.V.; Ramos, R.S.; Santos, C.B.R.; Padilha, E.C.; Brasil, D.S.B.; Macêdo, W.J.C. Virtual screening and statistical analysis in the design of new caffeine analogues molecules with potential epithelial anticancer activity. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, doi:10.2174/1381612823666170711112510.
31. Gardner, C.R.; Walsh, C.T.; Almarsson, O. Drugs as materials: Valuing physical form in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 926–934.
32. Bemis, G.W.; Murcko, M.A. Designing libraries with CNS activity. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4942–4951.
33. Montanari, C.A. (org.). *Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos*; Edusp: São Paulo, Brazil, 2011; pp. 732; ISBN 978-85-314-1266-0.
34. Sondhi, S.M.; Jain, S.; Dinodia, M.; Kumar, A. Synthesis of Some Thiophene, Imidazole and Pyridine Derivatives Exhibiting Good Anti-Inflammatory and Analgesic Activities. *Med. Chem.* **2008**, *4*, 146–154.
35. Sangshetti, J.N.; Zambare, A.S.; Khan, F.A.K.; Gonjari, I.; Zaheer, Z. Synthesis and Biological Activity of Substituted-4,5,6,7 tetrahydrothieno Pyridines: A Review. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2014**, *14*, 988–1020.
36. Martins, C.R.; Lopes, W.A.; de Andrade, J.B. Organic compound solubility. *Quim. Nova* **2013**, *36*, 1248–1255.
37. Gilson, M.K.; Tiqing Liu, M.B.; Nicola, G.; Hwang, L.; Chong, J. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *44*, 1045–1053.
38. Pereira, A.L.E.; Santos, G.B.F.; Franco, M.S.F.; Federico, L.B.; Silva, C.H.T.P.; Santos, C.B.R. Molecular modeling and statistical analysis in the design of derivatives of human dipeptidyl peptidase IV. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *24*, 318–334.
39. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
40. Chemaxon. *Marvin Sketch*, Version 16.9.5; [S.I]: Chemaxon: Cambridge, MA, USA, 2016.
41. Clark, M.; Cramer, R.D.; Van Opdenbosch, N.J. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *J. Comput. Chem.* **1998**, *10*, 982–1012.
42. Gasteiger, J.; Marsili, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3181–3184.

43. Larsson, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A. ChemGPS-NP: Tuned for Navigation in Biologically Relevant Chemical Space. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 789–794.
44. *Minitab*®; Minitab Inc.: State College, PA, USA, 2014.
45. Zhao, X.; Yuan, M.; Huang, B.; Ji, H.; Zhu, L. Ligand-based pharmacophore model of *N*-Aryl and *N*-Heteroaryl piperazine_1A-adrenoceptors antagonists using GALAHAD. *J. Mol. Gr. Model.* **2010**, *29*, 126–136.
46. Mysinger, M.M.; Carchia, M.; Irwin, J.J.; Shoichet, B.K. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6582–6594.
47. *SIGMA PLOT 12.0*; version 12.0; Systat Software: San Jose, CA, USA, 2014.
48. Koes, D.R.; Camacho, C.J. ZINCPharmer: Pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 409–414.
49. Birck, M.G.; Campos, L.J.; Melo, E.B. Estudo computacional de 1*h*-imidazol-2-il-pirimidina-4,6-diaminas para a identificação de potenciais precursores de novos agentes antimaláricos. *Quim. Nova* **2016**, *39*, 567–574.
50. Schrödinger. *QikProp: Rapid ADME Predictions of Drug Candidates*, version 3.4; LLC: New York, NY, USA, 2011.
51. Onguéné, P.A.; Ntie-Kang, F.; Mbah, J.A.; Lifongo, L.L.; Ndom, J.C.; Sippl, W.; Mbaze, L.M. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part III: An in silico evaluation of drug metabolism and pharmacokinetics profiling. *Organ. Med. Chem. Lett.* **2014**, *4*, 6.
52. Rindings, J.E.; Barratt, M.D.; Cary, R. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure, an update of the DEREK system. *Toxicology* **1996**, *106*, 267–279.
53. Pedersoli-Mantoani, S.; Silva, V.B.; Taft, C.A.; Silva, C.H.T.P. Pharmacophore-based Drug Design of Novel Potential Tau Ligands for Alzheimer’s Disease Treatment. *Curr. Phys. Chem.* **2014**, *4*, 35–44.
54. Dallakyan, S.; Olson, A.J. Small Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1263*, 243–250.
55. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Comput. Chem.* **2009**, *16*, 2785.
56. BIOVIA. *Discovery Studio Modeling 60 Environment*; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2015.
57. Chen, J.Z.; Myint, K.Z.; Xie, X.Q. New QSAR prediction models derived from GPCR CB2-antagonistic triaryl bis-sulfone analogues by a combined molecular morphological and pharmacophoric approach. *SAR QSAR Environ. Res.* **2012**, *22*, 525–544.
58. Boda, K.; Seidel, T.; Gasteiger, J. Structure and reaction based evaluation of synthetic accessibility. *J. Comp.-Aided Mol. Des.* **2007**, *21*, 311–325.
59. Ferreira, J.V.; Chaves, G.A.; Marino, B.L.B.; Sousa, K.P.A.; Souza, L.R.; Brito, M.F.B.; Teixeira, H.R.C.; Silva, C.H.T.P.; Santos, C.B.R.; Hage-Melim, L.I.S. Cannabinoid type 1 receptor (CB1) bioligand with therapeutic potential for withdrawal syndrome in chemical dependents *Cannabis sativa*. *ChemMedChem* **2017**, *22*, 1408–1416.

Sample Availability: Not available.



© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org>)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos têm demonstrado uma crescente investigação em relação aos Receptores de Interação de Proteína Tirosina Quinase 2 (RIPK2), no que se refere a pesquisas de inibição para este alvo. Nesse sentido, a busca de compostos inibidores traz a perspectiva de atenuantes no tratamento de doenças inflamatórias, bem como, a artrite reumatoide.

Embora se tenha estudos relacionados e fármacos que já atuem no trato desta doença, buscou-se aqueles que não possuam efeitos secundários no organismo humano, diferentemente, do composto base que se utilizou nesta análise. Nesta pesquisa, a ideia é de planejar um inibidor potencial que possua os mesmos efeitos ou mais efetivo que o composto protótipo (Ponatinibe) e composto controle (WEHI-345), contudo, sem apresentar reações tóxicas ao ser humano.

O planejamento racional de fármacos tem se propagado de forma marcante e ampla no estudo de novos compostos bioativos, dentro de sua limitação estrutural. Vale ressaltar que, aliado à isto, têm-se os métodos computacionais que foram os mecanismos utilizados como ferramenta nesta pesquisa.

A química medicinal traz um auxílio que pode significar a maximização para se planejar um novo fármaco. Desse modo, através das buscas realizadas em bancos de dados e literaturas, pode-se compreender aspectos primordiais de atividade inibitória do RIPK2, através dos bancos de dados PDB e bindingDB, que representaram a etapa inicial deste estudo. Por conseguinte, ao possuir os inibidores depositados para tal alvo, permitiu-se analisar uma abordagem baseada nestes ligantes, através da derivação de um padrão farmacofórico para se extrair as características físico-químicas e a região de maior atividade de ação biológica.

O modelo farmacofórico gerado possuiu dois Centros Hidrofóbicos, dois Aceitadores de Hidrogênio e um Doador de Hidrogênio, como na família de quinases, de forma que, o RIPK2 é caracterizado pelo domínio conservado, em que os resíduos de Glu66 e Asp164 permitem ligação de hidrogênio com aceites / grupos de doadores e está orientado para um arranjo hidrofóbico que oferece uma oportunidade de otimização da seletividade de inibidores.

Em seguida, um método de busca de novos compostos compatíveis com as regras de Lipinski, prontos para se ligarem às moléculas biologicamente significativas, foi feito em um banco de dados denominado ZINC, para então, prosseguir nas etapas farmacocinéticas

e toxicológicas dos novos compostos. Dentre estes, apenas 29 compostos apresentaram algum tipo de atividade biológica relacionada à doença em estudo, bem como: atividade antiinflamatória, inibidor de kinase, doença autoimune e tratamento de artrite reumatoide.

Portanto, para cada um desses compostos, fez-se uma docagem molecular, pois seria necessário analisar as interações entre os ligantes e o receptor (RIPK2), além disso, este método foi utilizado para filtrar as moléculas que possuíam as melhores afinidades de ligação, através de valores de pontuação, nas interações com os resíduos de aminoácidos presentes no alvo e melhorar a seleção dos potenciais inibidores obtidos. Assim, resultou em 15 compostos que foram avaliados com um valor de desvio de RMSD, abaixo do nível de tolerância estabelecido de 2,0 Å, em uma análise em relação ao composto base (Ponatinibe) e composto controle (WEHI-345) de interação mais detalhada fármaco-receptor.

Após essas etapas foi realizado um refinamento por similaridade de sobreposição, em uma análise de semelhança eletrônica e estérica, em relação ao composto base e controle. Nessa análise, o composto ZINC91881108 (eletrônica), se destacou por compartilhar similaridade ao se sobrepor aos compostos protótipos.

No processo de triagem virtual, nove compostos foram selecionados ao serem sobrepostos de acordo com os valores das coordenadas geradas no modelo farmacofórico, de modo que, avaliou-se a concordância entre as características farmacofóricas e os grupos encontrados nestas novas moléculas. Assim, tem-se como destaque o composto ZINC91881108 que apresentou o melhor valor de alinhamento na pontuação de sobreposição (QFIT), em que reproduziu uma sobreposição de 52,28% em relação ao modelo farmacofórico, considerado um composto promissor ao possuir os requisitos estereo-eletrônicos essenciais para a inibição neste alvo.

O composto ZINC91881108 apresentou parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção dentro dos limites estabelecidos e similares aos valores do composto base (Ponatinibe) e composto controle (WEHI-345). Além disso, o ZINC91881108 não possui efeito tóxico ao ser realizada a análise de previsão no programa Derek.

Portanto, as perspectivas futuras para os compostos selecionados serão a realização de ensaios biológicos com o Receptor de Proteína Quinase tipo 2(RIPK2), ou bem como, modificações sintéticas para serem realizados em análises. Além disso, a metodologia agrega métodos e técnicas em química teórica e medicinal como alternativa para uma nova compreensão no ensino desta ciência.

ACD/ChemSketch. Versão 12.0. Microsoft Windows. Disponível em: <<http://www.acdlabs.com>>, 2012.

ALMEIDA, M. S. T. M.; ALMEIDA, J. V. M.; BERTOLO, M. B. Demographic and clinical features of patients with rheumatoid arthritis in Piauí, Brazil – evaluation of 98 patients. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p. 360-365, 2014.

ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Steroidal antiinflammatory drugs: glucocorticoids. **Einstein**, v. 6, p. 59-65. 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Medicinal chemistry, the molecular basis of drug action**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 94, p. 556-563. 2010.

BERMAN, J.; WESTBROOK, Z.; FENG, G.; GILLILAND, T. N.; BHAT, H. WEISSIG, I. N.; SHINDYALOV, P. E.; BOURNE. The Protein Data Bank H. M. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 235-242. 2000.

BERRY, E. A.; HUANG, L. S.; WALKER-KOPP, N. Crystal structure of nod1 card domain with three disulfide-clinched, domain-swapped dimers in the asymmetric unit. 2012.

BIOVIA. Discovery studio modeling 60 environment. San Diego, CA: Dassault Systèmes, **2015**.

BRASIL, Portaria SAS/MS nº 996, 30 de setembro de 2015. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas. **Artrite reumatoide**. Revoga a portaria nº 710/SAS/MS, 27 de junho de 2013.

BRENOL, C. V.; MONTICIELO, O. A.; XAVIER, R.M.X.; BRENOL, J. C. T. Rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 53, p. 465–470. 2007.

BRESSAN, A. L.; SILVA, R. S. da; FONTENELLE, E.; GRIPP, A. C. Immunosuppressive agents in Dermatology. **An Bras Dermatol**, v. 85, p. 9-22. 2010.

CABALLERO, J. 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, p. 363–371. 2010.

CANNING, P.; RUAN, Q.; SCHWERD, T.; HRDINKA, M.; MAKI, J. L.; SALCH, D.; SUEBSUWONG, C.; RAY, S.; BRENNAN, P.E.; CUNY, G. D.; UHLIG, H. H.; GYRD-HANSEN, M.; DEGTEREV, A.; BULLOCK, A. N. Inflammatory Signaling by NOD-RIPK2 Is Inhibited by Clinically Relevant Type II Kinase Inhibitors. **Chem. Biol.**, v. 22, p. 1174–1184. 2015.

CHARNLEY, A. K.; CONVERY, M. A.; SHAH, A. L.; JONES, E.; HARDWICKE, P.; BRIDGES, A.; OUELLETTE, M.; TOTORITIS, R.; SCHWARTZ, B.; KING, B. W.; WISNOSKI, D. D.; KANG, J.; EIDAM, P. M.; VOTTA, B. J.; GOUGH, P. J.; MARQUIS, R. W.; BERTIN, J.; CASILLAS, L. Crystal structures of human RIP2 kinase catalytic domain complexed with ATP-competitive inhibitors: Foundations for understanding inhibitor selectivity. **Bioorg Med Chem.**, v. 23, p. 7000-6. 2015.

CHORUS, A. M. J.; MIEDEMA, H. S.; BOONEN, A.; LINDEN, S. J. V. D. Quality of life and work in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis of working age. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, p. 1178–1184. 2003.

CLARK, M. A.; FINKEL, R.; REY, J. A.; WHALEN, K. **Illustrated pharmacology**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

CONITEC, Relatório de recomendação da comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS. **Medicamentos biológicos (infliximabe, etanercepte, adalimumabe, rituximabe, abatacepte, tocilizumabe, golimumabe, certolizumabe pegol) para o tratamento de artrite reumatoide**. Ministério da saúde, 2012.

COPELAND, R. A.; ANDERSON, P. S. Enzymes and enzyme inhibitors in textbook of drug design and discovery. **Taylor and Francis**, 2001, 328-363.

CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H.; SHAH, N. P.; BIXBY, D.; MAURO, M. J.; FLINN, I.; O'HARE, T.; HU, S.; NARASIMHAN, N. I.; RIVERA, V. M.; CLACKSON, T.; TURNER, C. D.; HALUSKA, F. G.; DRUKER, B. J.; DEININGER, M. W. N.; TALPAZ, M. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, p. 2075–2088. 2012.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Modern Pharmacology with Clinical Applications**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

DAVID, J.M.; MATTEI, R.A.; MAUAD, J.L.; ALMEIDA, L.G.; NOGUEIRA, M.A.; MENOLLI, P.V.; MENOLLI, R.A. Clinical and laboratory features of patients with rheumatoid arthritis diagnosed at rheumatology services in the Brazilian municipality of Cascavel, PR, Brazil. **Bras. Reumatol.** v. 53, p. 57– 65. 2013.

DONG, X.; ZHOU, X.; JING, H.; CHEN, J.; LIU, T.; YANG, B.; HE, Q.; HU, Y. Pharmacophore identification, virtual screening and biological evaluation of prenylated flavonoids derivatives as PKB/Akt1 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5949-5958. 2011.

ENGH, R. A.; BOSSEMEYER D. **Advan. Enzyme Regul.** v. 41, p. 121. 2001.

FERREIRA, L. R. F.; PESTANA, P. R. OLIVEIRA, J. de.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Effects of aquatic rehabilitation on symptoms and quality of life in rheumatoid arthritis female patients. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, p. 136-41. 2008.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-61. 2003.

- FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Clinical Pharmacology and Rational Therapeutics**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. D. M.; UTIYAMA, S. R. D. R. Rheumatoid arthritis: a current view. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, p. 495-503. 2011.
- GOOD, A. C.; MASON, J. S.; PICKETT, S. D. Pharmacophore pattern application in virtual screening, library designer and QSAR. **Virtual screening for bioactive molecules**, v. 10, p. 131-156. 2000.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications in infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98. 2010.
- HAILE, P. A.; VOTTA, B. J.; MARQUIS, R. W.; BURY, M. J.; MEHLMANN, J. F.; SINGHAUS, R. Jr.; CHARNLEY, A. K.; LAKDAWALA, A. S.; CONVERY, M. A.; LIPSHUTZ, D. B.; DESAI, B. M.; SWIFT, B.; CAPRIOTTI, C. A.; BERGER, S. B.; MAHAJAN, M. K.; REILLY, M. A.; RIVERA, E. J.; SUN, H. H.; NAGILLA, R.; BEAL, A. M.; FINGER, J. N.; COOK, M. N.; KING, B. W.; OUELLETTE, M. T.; TOTORITIS, R. D.; PIERDOMENICO, M.; NEGRONI, A.; STRONATI, L.; CUCCHIARA, S.; ZIÓŁKOWSKI, B.; VOSENKÄMPER, A.; MACDONALD, T. T.; GOUGH, P. J.; BERTIN, J.; CASILLAS, L. N. The Identification and Pharmacological Characterization of 6-(tertButylsulfonyl)-N-(5-fluoro-1H-indazol-3-yl)quinolin-4-amine (GSK583), a Highly Potent and Selective Inhibitor of RIP2 Kinase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 4867-80. 2016.
- HE, X.; ROS, S. D.; NELSON, J.; ZHU, Xue-Feng; JIANG, T.; OKRAM, B.; JIANG, S.; MICHELLYS, Pierre-Yves; ISKANDAR, M.; ESPINOLA, S.; JIA, Y.; BURSULAYA, B.; KREUSCH, A.; GAO, Mu-Yun; SPRAGGON, G.; BAATEN, J. E.; CLEMMER, L.; MEEUSEN, S.; HUANG, D.; HILL, R.; NGUYEN-TRAN, V.; FATHMAN, J.; LIU, B.; TUNTLAND, T.; GORDON, W. P.; HOLLENBECK, T.; NG, K.; SHI, J.; BORDONE, L.; LIU, H. Identification of Potent and Selective RIPK2 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. **ACS Med Chem Lett.**, v. 8, p. 1048-1053. 2017.
- IBGE, **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. Pesquisa nacional de saúde, 2013. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro, 2014.
- INBAR, Y.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, J. H. Deterministic pharmacophore detection via multiple flexible alignments of drug-like molecules. **Research in Computational Molecular Biology**, v. 4453, p. 412-429. 2007
- INOHARA, N.; DEL PESO, L.; KOSEKI, T.; CHEN, S.; NÚÑEZ, G. RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 12296-12300. 1998.
- KESTER, M.; VRANA, K.E.; QURAIISHI, S.A.; KARPA, K.D. **Pharmacology**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- KUN, T.; HONGLIANG, Y.; CHANGLING, Z.; JUAN, D.; HAIXIA, C.; YAN, L.; HAO, X. Synthesis of Ponatinib. University of Technology. **Guangdong Chemical Industry**. 2013.

- LEITE, C. A. V. G.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N. L.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. A. Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, 2012.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. **Cell.**, v. 141, p. 1117–1134. 2010.
- LESSENE, G.; NACHBUR, U. **RIPK2 inhibitor for the treatment of multiple sclerosis and other inflammatory diseases**. Australia. Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research. Disponível em: [http:// www.wehi.edu.au/businessdevelopment](http://www.wehi.edu.au/businessdevelopment), 2015.
- LIAO, J. J. Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 409- 424. 2007.
- LIU, Ming; SUN, Zhiguo; HU, Wenxiang. Three-dimensional pharmacophore screening for fentanyl derivatives. **Neural Regen Res.**, v. 7, p.1398-1405. 2012.
- MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTÍNEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. The protein kinase complemente of the human genome. **Science**, v. 298, p. 1912-1934. 2002.
- MARTIN, P.; MEDEIROS, A. C. de; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. The Role of Tumor Necrosis Factor Inhibitors in the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, p. 126-133, 2006.
- MASON, J. S.; GOOD, A. C.; MARTIN, E. J. 3-D Pharmacophores in drug discovery. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 567-597. 2001.
- MILLER, G. D.; BRUNO, B. J.; LIM, C. S. Resistant mutations in CML and Ph⁺ALL – role of ponatinib. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 8, p. 243–254. 2014.
- MONTANARI, Carlos A. (Org.). **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo, 2011.
- MOURA, M. C.; ZAKSZEWSKI, P. T.; SILVA, M. B.; SKARE, T. L. Epidemiological profile of patients with extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis from the city of Curitiba, south of Brazil. **Bras. Reumatologia**, v. 52, p. 679–694. 2012.
- NACHBUR, U.; STAFFORD, C. A.; BANKOVACKI, A.; ZHAN, Y.; LINDQVIST, L. M.; FIIL, B. K. KHAKHAM, Y.; KO, H.; SANDOW, J. J.; FALK, H.; HOLIEN, J. K.; CHAU, D.; HILDEBRAND, J.; VINCE, J. E.; SHARP, P. P.; WEBB, A. I.; JACKMAN, K. A.; HLEN, S. M.; KENNEDY, C. L.; LOWES, K. N.; MURPHY, J. M.; GYRD-HANSEN, M.; PARKER, M. W.; HARTLAND, E. L.; LEW, A. M.; HUANG, D. C.S.; LESSENE, G.; SILKE, J. A RIPK2 inhibitor delays NOD signalling events yet prevents inflammatory cytokine production. **Nature communications**, v. 6, p. 6442. 2015.
- NAJJAR, M.; SUEBSUWONG, C.; RAY, S. S.; THAPA, R. J.; MAKI, J. L.; NOGUSA, S.; SHAH, S.; SALEH, D.; GOUGH, P. J.; BERTIN, J.; YUAN, J.; BALACHANDRAN, S.; CUNY, G. D.; DEGTEREV, A. Structure Guided Design of Potent and Selective Ponatinib-Based Hybrid Inhibitors for RIPK1., **Cell Reports**, v. 10, p. 1850–1860. 2015.

- OKABE, S.; TAUCHI, T.; TANAKA, Y.; OHYASHIKI, K. Efficacy of ponatinib against ABL tyrosine kinase inhibitor-resistant leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 435, 506–511. 2013.
- OLIVEIRA, P. G. **Evaluation of effectiveness of na antagonist of the peptide releaser of gastrin receptor in experimental models of arthritis**. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Rio Grande do Sul, 2011.
- PANUS, P. C.; KATZUNG, B.; JOBST, E. E.; TINSLEY, S. L.; MARSTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Pharmacology for the Physical Therapist**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- PELLEGRINI, E.; SIGNOR, L.; SINGH, S.; ERBA, E. B.; CUSACK, S. Structures of the inactive and active states of RIP2 kinase inform on the mechanism of activation. **Plos one**, v. 12, p.177-161. 2017.
- PRASAD, V.; MAILANKODY, S. The Accelerated Approval of Oncologic Drugs Lessons From Ponatinib. **JAMA**. v. 311, p. 22-29; 353-4. 2014.
- RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P. Virtual Screening Strategies in Drug Design. **Revi. Virtual Quim**. v. 4, p. 739- 776. 2012.
- RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P. Virtual Screening Strategies in Drug Design. **Rev. Virtual Quim**. v. 4, p. 739- 776. 2012.
- SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. **Drugs for treatment of pain**, São Paulo: Manole, 2008.
- SANTANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: Na introduction. **Rev. Virtual Quim**. v.1, p. 49-57. 2009.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 223-228, 2008.
- SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. **Rheumatoid arthritis**. v. 376, p. 1094–1108. 2010.
- SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C. DE ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. kinase protein: structural features and chemical inhibitors. **Quím. Nova**, v. 32, p. 453-462. 2009.
- SILVA, Isabela Goldner da. **Investigação da autoimunidade em pacientes com artrite Reumatoide e familiares: uma análise clínico-laboratorial**. Curitiba, 2009. Dissertação. Universidade Federal do Paraná.
- THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- TIGNO-ARANJUEZ, J. T.; BENDERITTER, P.; ROMBOUTS, F.; DEROOSE, F.; BAI, X.; MATTIOLI, B.; COMINELLI, F.; PIZARRO, T.T.; HOFACK, J.; ABBOTT, D.W. In vivo inhibition of RIPK2 kinase alleviates inflammatory disease. **J. Biol. Chem**. v. 289, p. 29651- 29664. 2014.

TIJHUIS, G. J.; JONG, Z.; ZWINDERMAN, A. H.; ZUIJDERDUIN, W. M.; JANSEN, L. M. A.; HAZES, J. M. W.; VLIET VLIELAND, T. P. M. The validity of the Rheumatoid Arthritis Quality of Life (RAQoL) questionnaire. **Rheumatology**, v. 40, p. 1112-1119. 2001.

VAN MONTFORT, R. L. M.; WORKMAN, P. Structurebased design of molecular cancer therapeutics. **Trends Biotechnol.** v. 27, p. 315-328. 2009.

VIEIRA, S. M. **NOD2/RIPK2/caspase-1 pathway regulates a TH17-dependent response that contributes to the development of arthritis.** PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2015.

VOLPINI, J. G. de A. **Planning and structure-activity relationship of inhibitors MARK 3 in head and neck cancer.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2010.

ZHANG, M; HASSAN, K. M.; MUSIEK, A.; ROSMAN, I. S. Ponatinib-induced neutrophilic panniculitis. **J Cutan Pathol.** 2014: 41: 597–601.

ZHANG, M; HASSAN, KM; MUSIEK, A; ROSMAN IS. Ponatinib-induced neutrophilic panniculitis. **J Cutan Pathol.** v. 41, p. 597–601. 2014.

ZHAO, X.; YUAN, M.; HUANG, B.; JI, H.; ZHU, L.. Ligand-based pharmacophore model of N-Aryl and N-Heteroaryl piperazine_1A-adrenoceptors antagonists using GALAHAD. **Journal of Molecular Graphics and Modelling.** v. 29, p.126–136. 2010.

Anexo 1 – Norma de publicação do respectivo periódico

Preparation of a Manuscript

General Considerations

Research manuscripts should comprise:

Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords

Research manuscript sections: Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Conclusions (optional).

Back matter: Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, References.

Review manuscripts should comprise the front matter, literature review sections and the back matter. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure. Structured reviews and meta-analyses should use the same structure as research articles and ensure they conform to the PRISMA guidelines.

Abstract graphic: Authors are encouraged to provide a graphical abstract as a self-explanatory image to appear alongside with the text abstract in the Table of Contents. Figures should be a high quality image in any common image format. Note that images displayed online will be up to 11 by 9 cm on screen and the figure should be clear at this size.

Abbreviations should be defined in parentheses the first time they appear in the abstract, main text, and in figure or table captions.

SI Units (International System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible.

Equations: If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.

Research Data and supplementary materials: Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about Supplementary Materials and Data Deposit for additional guidelines.

Preregistration: Where authors have preregistered studies or analysis plans, links to the preregistration must be provided in the manuscript.

Guidelines and standards: MDPI follows standards and guidelines for certain types of research. See http://www.mdpi.com/editorial_process for further information.