



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCA FERNANDA NUNES AZEVEDO

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL COM POTENCIAL
FARMACOLÓGICO SOBRE AS PROTEÍNAS PI3K α E mTOR**

FORTALEZA

2022

FRANCISCA FERNANDA NUNES AZEVEDO

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL COM POTENCIAL
FARMACOLÓGICO SOBRE AS PROTEÍNAS PI3K α E mTOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Azevedo, Francisca Fernanda Nunes.

Identificação de compostos de origem vegetal com potencial farmacológico sobre as proteínas PI3K α e mTOR / Francisca Fernanda Nunes Azevedo. – 2022.

110 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

1. Fitoquímicos. 2. Heveaflavone. 3. Estereoespecífico. 4. Câncer. 5. Biologia computacional . I. Título.

CDD 572

FRANCISCA FERNANDA NUNES AZEVEDO

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL COM POTENCIAL
FARMACOLÓGICO SOBRE AS PROTEÍNAS PI3K α E MTOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 04/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Geancarlo Zanatta (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fábio Klamt
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

A Deus.

Aos meus pais, Maria e João.

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais João e Maria pela educação, pelo amor, carinho e incentivo. Á minha filha Esther por todo amor incondicional que sempre me deu. Ao meu irmão Junior pela amizade e pela confiança.

Agradeço ao Prof. Dr. Geancarlo Zanatta, por seus ensinamentos, compreensão, confiança e amizade no desenvolvimento deste trabalho. Sua supervisão foi fundamental e instrutiva, não somente para aprender métodos, mas também por suas palavras amigas, que através delas soube me impulsionar.

Aos meus amigos e colegas da Bioquímica, Josy, Erica e Felipe pela convivência, conversas, apoio, comemorações e discussões científicas bastante construtivas.

Aos meus amigos Tadeu, Talitta, Maiara e minha comadre Kariny pelo apoio e carinho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Á Universidade Federal do Ceará e ao programa de Pós-graduação em Bioquímica por me conceder recursos e a oportunidade de desenvolvimento pessoal.

RESUMO

A via PI3K/AKT/mTOR está diretamente envolvida na regulação das principais vias metabólicas celulares em mamíferos. Alterações nesta via estão relacionadas à sobrevivência celular em vários tipos de câncer, sendo a PI3K α a segunda proteína oncogênica mais mutada. A super ativação da PI3K α gera uma cascata de sinalização secundária que estimula, entre outras, a atividade dos complexos 1 e 2 da mTOR. Dado a sua importância na fisiopatologia oncológica, a administração de inibidores individuais ou duais das proteínas PI3K α e mTOR tem sido amplamente explorada. Contudo, trabalhos recentes descrevem a incidência de efeitos colaterais, bem como de resistência farmacológica, e destacam a necessidade de desenvolvimento de novos compostos com menos efeitos secundários. Neste contexto, pesquisas atuais tem como alvo a utilização de compostos de origem vegetal, uma vez que esta classe é conhecida por apresentar atividades antioxidantes e anticancerígena. No presente trabalho, foram utilizadas ferramentas de biologia computacional para identificar novos compostos de origem vegetal com potencial inibitório seletivos ou dual nas enzimas PI3K α e mTOR. Inicialmente, foram realizadas análises computacionais na interface de interação entre a mTOR e a mLST8 e no sítio de ligação ao ATP da mTOR e da PI3K α utilizando-se cálculos de energia de interação. Em seguida, conjuntos conformacionais da mTOR e da PI3K α foram obtidos através da análise da eficiência de ancoramento das estruturas cristalográficas disponíveis para cada proteína. Após a validação das estratégias de ancoramento molecular, foi utilizada a técnica de triagem virtual baseada em ancoramento com múltiplas conformações para identificar compostos de origem vegetal com potencial de interação seletiva dual junto às proteínas estudadas. Ao total, foram testados 1.745 compostos de origem vegetal brasileira. Dentre estes, os compostos Amentoflavone 7",4"', Heveaflavone, Podocarpusflavone A e Amentoflavone foram selecionados e tiveram a sua ligação aos sítios catalíticos de ambas proteínas investigadas. Os resultados indicam que esses compostos pertencentes à classe dos biflavonóides, dentre os quais, Podocarpusflavone A apresentou perfil estereoespecífico para PI3K α e mTOR. O Amentoflavone 7",4"' apresentou perfil racêmico na ligação à PI3K α enquanto que para mTOR mostrou perfil estereoespecífico. Já Amentoflavone apresentou configuração específica para PI3K α e para a mTOR perfil racêmico, e o Heveaflavone apresentou perfil de ligação racêmico tanto na mTOR como na PI3K α . Ao todo, os dados obtidos nesse trabalho destacam o papel de resíduos chave na inibição PI3K/mTOR e indicam compostos de origem vegetal com potencial inibitório dual. Estes

resultados, além de aprofundarem o conhecimento sobre os mecanismos de inibição das enzimas estudadas, também indicam novas possibilidades de para o desenvolvimento de novos fármacos contra câncer.

Palavras-chave: fitoquímicos; heveaflavone; estereoespecifico; câncer; biologia computacional.

ABSTRACT

The PI3K/AKT/mTOR pathway is directly involved in the regulation of major cellular metabolic pathways in mammals. Alterations in this pathway are related to cell survival in several types of cancer, and PI3K α is the second most mutated oncogenic protein. Overactivation of PI3K α generates a secondary signaling cascade that stimulates, among others, the activity of mTOR complexes 1 and 2. Given their importance in cancer pathophysiology, the administration of individual or dual inhibitors of PI3K α and mTOR proteins has been widely explored. However, recent work describes the incidence of side effects as well as pharmacological resistance and highlights the need for the development of new compounds with fewer side effects. In this context, current research targets compounds of plant origin, since this class is known to exhibit antioxidant and anticancer activities. In the present work, computational biology tools were used to identify novel plant-based compounds with selective or dual inhibitory potential on PI3K α and mTOR enzymes. Initially, computational analyses were performed at the interaction interface between mTOR and mLST8 and the ATP-binding site of mTOR and PI3K α using interaction energy calculations. Next, conformational sets of mTOR and PI3K α were obtained by analyzing the anchoring efficiency of the available crystallographic structures for each protein. After validation of the molecular docking strategies, the virtual screening technique based on multi-conformational docking was used to identify plant-derived compounds with dual selective interaction potential with the studied proteins. In total, 1,745 compounds of Brazilian plant origin were tested. Among these, compounds Amentoflavone 7",4"', Heveaflavone, Podocarpusflavone A, and Amentoflavone were selected and had their binding to the catalytic sites of both proteins investigated. The results indicate that these compounds belong to the class of bioflavonoids, among which, Podocarpusflavone A showed a stereospecific profile for PI3K α and mTOR. Amentoflavone 7",4"' showed a racemic profile in binding to PI3K α while mTOR showed a stereospecific profile. Amentoflavone, on the other hand, showed a specific configuration for PI3K α and mTOR racemic profile, and Heveaflavone showed a racemic binding profile on both mTOR and PI3K α . Altogether, the data obtained in this work highlight the role of key residues in PI3K/mTOR inhibition and indicate compounds of plant origin with dual inhibitory potential. These results, besides deepening the knowledge about the inhibition mechanisms of the enzymes studied, also indicate new possibilities for the development of new cancer drugs.

Keywords: phytochemicals; heveaflavone; stereospecific; cancer; computational biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. mTOR	20
Figura 2 - Visão geral da PI3K α . As subunidades p110 α / p85 α 2(A) são coloridas de acordo com o esquema B.....	21
Figura 3 - Estrutura global dos complexos mTORC1(A) e mTORC2(B). O mTORC1 é formado por mTOR nas cores verde escuro e cinza, mLST8 na cor laranja, Deptor na cor lilás e Raptor nas cores verde e marrom. O mTORC2 formada por mTOR nas cores verde e azul, Deptor na cor lilás, mLST8 na cor amarela, Rictor nas cores marrom e cinza e mSin1 nas cores azul e amarelo	23
Figura 4 - Sobreposição, ao centro, do sítio de ligação do ATP da PI3K α e mTOR . O painel esquerdo mostra as subunidades catalíticas e reguladoras da PI3K α , enquanto o painel direito mostra a proteína mTOR	24
Figura 5 - Fluxograma da estratégia experimental do projeto	33
Figura 6 - Esquema MFCC aplicado para interação proteína-proteína.	38
Figura 7 - Desvio médio quadrático (RMSD) em simulação de auto-ancoramento utilizando distintas dimensões de caixa de busca para estruturas cristalográficas da PI3K α (A e B) e mTOR(C e D).	72
Figura 8 - Desvio médio quadrático (RMSD) em simulação de ancoramento cruzado para estruturas cristalográficas da PI3K α	74

Figura 9 - Desvio médio quadrático (RMSD) em simulação de ancoramento cruzado para estruturas cristalográficas da mTOR.....	75
Figura 10 - Distribuição da energia (Kcal/mol) dos compostos vegetais da triagem virtual nas proteínas PI3K α (cor azul) e mTOR(verde claro).....	76
Figura 11 - No gráfico é possível observar a distribuição de energia dos compostos vegetais candidatos a ligantes duais nas enzimas PI3K/mTOR(eixo y), número de ligações com livre rotação (eixo x), diferenças entre as classes dos compostos(mostrado em cores dife diferentes) e o peso molecular mostrado na diferenças de tamanhos de cada ponto, que corresponde a uma molécula diferente.....	77
Figura 12 - Estrutura plana dos onze melhores compostos de origem vegetal com perfil dual	79
Figura 13 - Energia de interação total dos complexos cristalográficos PI3K α sob a distância radial dos compostos vegetais Heveaflavone R e S, Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether R e S, Podocarpusflavone A e Amentoflavone. É mostrada a energia de interação em kcal/mol e distância em angstroms.....	85
Figura 14 - Energia de interação total dos complexos cristalográficos mTOR sob a distância radial dos compostos vegetais Heveaflavone R(verde), Heveaflavone S (preto), Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether(vermelho), Podocarpusflavone A(azul) e Amentoflavone R(roxo) e Amentoflavone S(amarelo). É mostrada a energia de interação em kcal/mol e distância em angstroms.....	86
Figura 15 - Energia de interação individual dos resíduos da PI3K α e compostos Heveaflavone, Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether, Podocarpusflavone	

A,Amentoflavone(B)	87
Figura 16 - Energia de interação individual dos resíduos da PI3K α e compostos Heveaflavone, Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether, Podocarpusflavone A, Amentoflavone(B).....	89
Figura 17 - Energia de interação individual dos resíduos mTOR e compostos Heveaflavone R e S, Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether, Podocarpusflavone A, Amentoflavone.....	90
Figura 18 - Organização espacial dos principais resíduos da mTOR interagindo com compostos Heveaflavone S(A) e Heveaflavone R (E), Amentoflavone 7",4""(B) Podocarpusflavone A(C) Amentoflavone R (D) e) Amentoflavone S (F) . As ligações de hidrogênio são mostradas com traços amarelo.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos cálculos de energia de interação obtidos durante o ancoramento molecular e através do método MM-PBSA. Energias expressas em kcal/mol.....	80
Tabela 2 - Comparação dos resultados do MM-PBSA com docking para inibidores potenciais e compostos de referência de topo de ranking.....	82
Tabela 3 - Energias dos resultados do ancoramento molecular e MM/PBSA para análise do atropoisomerismo dos compostos selecionados para proteína mTOR.....	83
Tabela 4 - Energias dos resultados do ancoramento molecular e MM/PBSA para análise do atropoisomerismo dos compostos selecionados para proteína PI3K α	84
Tabela 5 - Lista de propriedades farmacocinéticas (físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade da água, semelhança dos medicamentos, e química medicinal) dos quatro compostos selecionados.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
COV	Compostos vegetais
CHARMM	Chemistry at HARvard Molecular Mechanics
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
MM/PBSA	Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area
MFCC	Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas
mTOR	Proteína Alvo da Rapamicina
NuBBE	Banco de Dados de Ecofisiologia e Biossíntese de Produtos Naturais
PDB	Protein Data Bank
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinase
PI	Fosfatidilinositol
PIP2	Fosfatidilinositol fosfato
RMSD	Raiz do desvio quadrático médio
RMSF	Raiz da Flutuação do Quadrático Médio (Root mean square fluctuation)
RTKs	Receptor de proteína tirosina quinases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	CAPÍTULO I -REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Câncer.....	18
2.2	Via PI3K/Akt/mTOR.....	20
2.3	Proteína PI3K α	22
2.4	Proteína mTOR.....	22
2.5	Biologia computacional aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos...	24
2.5.1	<i>Ancoramento molecular e Triagem Virtual</i>	25
2.5.2	<i>Energia livre de ineração</i>	27
2.2.3	<i>Dinâmica Molecular</i>	27
2.6	Compostos de Origem Vegetais.....	28
2.6.1	<i>Polifenóis</i>	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivo específicos.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Obtenção das estruturas.....	34
4.2	Dinâmica Molecular.....	35
4.2.1	<i>Preparação</i>	35
4.2.2	<i>Minimização e equilíbrio do sistema</i>	35
4.2.3	<i>Produção da dinâmica molecular</i>	36
4.3	Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas MFCC.....	36
4.4	Teoria do Funcional da Densidade (DFT) aplicada a sistemas biológicos....	38
4.5	MM/PBSA.....	39
4.6	Interação total de energia e contribuições dos aminoácidos relativos.....	40
4.7	Ancoramento molecular.....	41
4.7.1	<i>Seleção de Conformações</i>	41

4.7.2	<i>Ancoramento Molecular e triagem virtual</i>	42
4.7.3	<i>Análises de Interação total de energia e contribuições dos aminoácidos</i>	43
5	PUBLICAÇÕES	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6.1	Seleção de conformações	72
6.2	Triagem virtual baseada em ancoramento molecular com conjuntos conformacionais	75
6.3	Rescoring MM/PBSA	79
6.4	Análise do comportamento da energia total de ligação	84
6.5	Contribuição Individual dos Resíduos	86
6.6	Análises ADME	93
7	DISCUSSÃO	95
8	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte nos países em desenvolvimento e causa secundária de mortalidade em países do terceiro mundo (MEYBODI *et al.*, 2017), representando um grande problema para a saúde pública e para a economia (REHAN, 2019). Anualmente, registram-se cerca de 18,1 milhões (TEWARI *et al.*, 2019) de novos casos de câncer no mundo e estima-se que em breve esta incidência aumentará para 22 milhões (SUVARNA *et al.*, 2017). Um mecanismo central que está subjacente ao desenvolvimento de tumores são a hiperativação das vias de sinalização, envolvidas na proliferação e sobrevivência do câncer (NUNES; XAVIER *et al.*, 2019).

Dentre as vias de sinalização comumente alteradas no câncer, está a via da fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt)/Proteína alvo mecanístico da Rapamicina (mTOR) (FURET *et al.*, 2013). Em condições fisiológicas normais, esta via está diretamente envolvida na regulação de importantes processos metabólicos, incluindo proliferação, sobrevivência e crescimento celular (TARANTELLI *et al.*, 2020). Por outro lado, a desregulação da atividade enzimática das proteínas mTOR e PI3K α tem sido fortemente relacionada à proliferação de células tumorais, sobrevivência e resistência medicamentosa em vários tipos de câncer (REHAN, 2019). De acordo com estudos previamente publicados, a via PI3K/AKT/mTOR está ativada em aproximadamente 70% dos cânceres de mama e ovário, 90% dos adenocarcinomas pulmonares (ADCs) e 40% dos carcinomas de células escamosas (CCS)(POPOVA; JÜCKER, 2021). Consequentemente, o uso de drogas que inibam a ação destas proteínas é amplamente explorado para terapia do câncer (REHAN, 2015)

Apesar dos avanços na investigação médica nos últimos anos, até o presente momento existe apenas um inibidor da PI3K α , Alpelisib, aprovado para uso no tratamento do câncer (ZHANG *et al.*, 2020). Já para a mTOR existem mais opções, dentre elas, o Temsirolímus e o Everolimus (MENG & ZHENG, 2015). Infelizmente, a administração desses inibidores está associada a vários efeitos indesejados, muitas vezes, culminando na descontinuação do tratamento (RUIZ-TORRES *et al.*, 2018).

Muita atenção tem sido direcionada ao uso de agentes naturais na terapia oncológica (PATRIDGE *et al.*, 2016). Os metabolitos de origem vegetal constituem uma importante fonte de biodiversidade na busca por novos compostos ativos e utilizados na química medicinal

(RUIZ-TORRES *et al.*, 2018). Neste contexto, compostos característicos de plantas, como os terpenos, flavonoides e alcaloides estão sendo explorados por sua capacidade de inibir o crescimento e iniciar a apoptose de células cancerígenas (SUVARNA *et al.*, 2017).

Dentre os principais grupos químicos investigados estão os polifenóis, os quais são encontrados em frutos e legumes e têm demonstrado atividades inflamatória e citotóxica promissoras no tratamento de doenças crônicas, incluindo câncer (ARBIZU;BERROCA *et al.*, 2019). Uma das vias celulares comumente afetadas pelos polifenóis é a via PI3K/Akt/mTOR, que tem efeitos muito variados sobre múltiplos aspectos-chave do crescimento celular, metabolismo e morte (MIRZA;AGHAZADEH;ATTARI *et al.*, 2020). Apesar das propriedades bioativas descritas dos polifenóis, são necessários estudos adicionais buscando a elucidação do seu mecanismo de ação enquanto inibidores das enzimas PI3K/mTOR

Considerando-se a grande relevância do desenvolvimento de fármacos destinados a inibição das enzimas PI3K/mTOR durante o tratamento de câncer, a presente dissertação, teve como objetivo utilizar métodos computacionais para identificar os principais resíduos que contribuem para a ligação de inibidores seletivos e inibidores duais no sítio ativo das enzimas PI3K α /mTOR, bem como, prospectar novos inibidores de origem vegetal. Durante os experimentos, foram utilizados cálculos de energia livre de interação através das técnicas de MFCC/DFT e MM/PBSA para obter a contribuição energética individual dos aminoácidos, e técnicas de ancoramento molecular, para identificar compostos candidatos entre as moléculas contidas no banco de dados NuBBE. Os resultados obtidos permitiram a compreensão do mecanismo de interação dos inibidores estudados e a identificação de novos compostos com potencial de inibição.

CAPÍTULO I

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é o nome geral dado a um grupo de mais de 100 doenças, caracterizadas por células que não respondem aos controles normais de divisão (TEWARI *et al.*, 2019). Células sadias respondem sinais externo e internos de como devem proceder, ou seja, como crescer, dividir e morrer, enquanto células cancerígenas tem um ou mais desses sinais prejudicados, levando as mesmas se proliferarem rápido e ininterruptamente, originando tumores sólidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Instituto Nacional do Câncer, 2020).

Estimativas mostram que o câncer é a segunda causa mundial de morte, com 8,97 milhões de óbitos por ano e estimou-se, ainda, que o número pode aumentar em 2060 com 18,63 milhões de óbitos (MATTIUZZI & LIPPI, 2019). Em 2020 ocorreram cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, para o triênio 2020-2022, estima-se que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Os tipos de câncer mais incidentes são os de pulmão (2,09 milhões de casos), mama (2,09 milhões de casos) e próstata (1,28 milhões de casos) (MATTIUZZI; LIPPI, 2019).

Apesar dos enormes esforços que têm sido feitos para a implementação de novas abordagens quimioterapêuticas para o tratamento do câncer, o mesmo continua a ser uma grande preocupação à escala mundial. Assim, é necessário procurar agentes terapêuticos mais recentes que possuam ações específicas contra os vários tipos de células cancerígenas (TEWARI *et al.*, 2019)

A busca global por drogas anticâncer eficazes levou o desenvolvimento de métodos computacionais avançados para concepção de medicamentos e compreensão aprofundada do papel das proteínas de vias de sinalização que estão envolvidas na proliferação e sobrevivência do câncer (MOHD REHAN & BAJOUH, 2019). A via PI3K/AKT/mTOR é uma das sinalizações mais relatadas em tumores malignos, devido à alta frequência de mutações. Portanto, as proteínas desta via têm sido amplamente exploradas para desenvolvimento de medicamentos na terapia do câncer (FAES *et al.*, 2019).

2.2 Via PI3K/Akt/mTOR

Na fisiologia normal, a via de sinalização intracelular PI3K/Akt/mTOR é importante na regulação do ciclo celular que responde a múltiplas questões nutricionais e ambientais, incluindo fatores de crescimento, níveis de energia e estresse celular (YANG *et al.*, 2019).

A via é ativada por meio de substratos extra/intracelulares da Fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) que fosforila e ativa a proteína quinase B (AKT) (ERDMANN *et al.*, 2017). A AKT, quando ativada (fosforilada em dois locais) e regula (direta ou indiretamente) os complexos TSC1/2, FOXO e mTOR (SOLIMAN, 2013; PORTA *et al.*, 2014; ZAROGOULIDIS *et al.*, 2014). A mTOR é uma proteína quinase serina/treonina que se associa com proteínas parceiras distintas para formar os complexos mTOR 1(mTORC1) e mTOR 2 (mTORC2). O mTORC1 pode ser ativado independentemente pelos percursos de sinalização TSC1/TSC2/Rheb, LKB1/AMPK e Rag GTPases (H. CHI, 2012) (figura 1) (DOWLING *et al.*, 2009). A tradução destes sinais leva à promoção do crescimento celular por fosforilação de substratos que desencadeiam processos anabólicos como síntese lipídica, ou limitam processos catabólicos como a autofagia (MATSUO, 2015).

Alterações nesta via de sinalização, seja por elevação nos níveis de expressão ou mutação de PI3K, perda da função de PTEN ou super expressão de Akt, mTOR e p70S6K, são comuns em vários tipos de tumores e desempenham um papel importante na sua progressão (LOPICCOLO *et al.*, 2008).

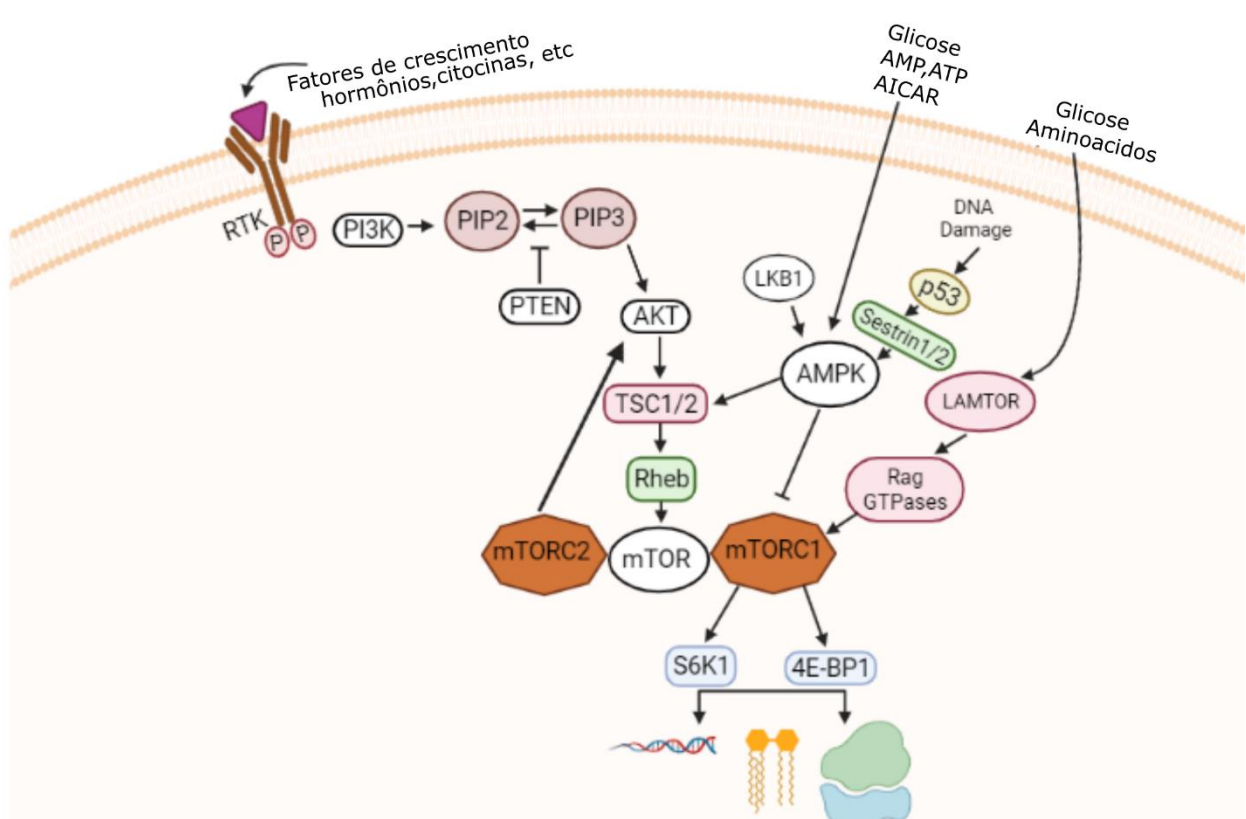


Figura 1: Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. mTOR .

2.3 Proteína PI3K α

Fosfatidilinositol-3-kinases (PI3Ks) são cinases lipídicas intracelulares, importantes no controle das vias de sinalização envolvidas na proliferação celular, motilidade, morte celular e invasão celular (FURET *et al.*, 2013). A família PI3K é dividida em três classes de acordo com a homologia de sequência e especificidade do substrato. Estas são ativadas por receptores na superfície celular, incluindo receptor de proteína tirosina quinases (RTKs), receptores de imunoglobulina, receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e pelas proteínas Ras (BEAUFILS *et al.*, 2017). PI3KS da classe I catalisam a conversão de substratos, os quais incluem fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol fosfato (PIP2) e fosfatidilinositol-bisfosfatos (PIP3) (ZHAO *et al.*, 2014).

A classe I pode ainda ser dividida em duas subclasses: a subclasse IA, que consiste em PI3K α , β , e δ , são heterodímeros, formados por uma subunidade catalítica p110 e uma

subunidade reguladora p85 (ERSAHIN *et al.*, 2015). Nas células humanas, as subunidades catalíticas classe I de PI3K, denominadas p110 α , p110 β e p110 δ são codificadas por três tipos de genes (PIK3CA, PIK3CB e PIK3CD) (FURET *et al.*, 2013). Entre as quatro isoformas catalíticas da classe I PI3K, o gene PIK3CA sofre mutações frequentes em mais de 30% dos tumores humanos (ZHAO *et al.*, 2014). As mutações em PIK3CB, o gene ubiquamente expresso, são raramente observadas (ENGELMAN *et al.*, 2008).

A proteína PI3K α é formada por um subunidade catalítica (p110 α) com cinco domínios, um domínio amino-terminal de ligação de adaptadores (ABD), domínio Ras-binding (RBD), C2 (homologia proteína-kinase-C-2), um domínio helicoidal, e um domínio carboxil-terminal cinase, já a subunidade p85 α é formada pelos domínios nSH2 e iSH2 (ZHAO *et al.*, 2014) (Figura 2).

Hiperativação de PI3K α está ligada ao aumento dos níveis de PIP3 que ativa ainda mais a AKT e leva à progressão celular (SUVARNA *et al.*, 2017). Recentemente, a FDA aprovou o primeiro fármaco (alpelisib pela Novartis) (HE & READ, 2019) como inibidor seletivo da PI3K α para o tratamento do câncer de mama e um segundo (GDC0077) está a ser submetido para ensaios clínicos. Estes fármacos competitivos de ATP na PI3K α provocam, geralmente, graves efeitos secundários dependentes da concentração (ZHANG *et al.*, 2020)

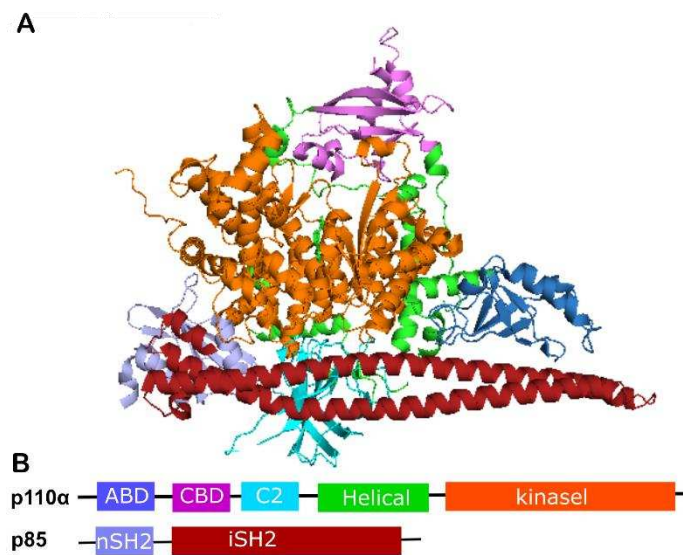


Figura 2: Visão geral da PI3K α . As subunidades p110 α / p85 α 2(A) são coloridas de acordo com o esquema B

(Fonte: Elaborado pelo autor)

2.4 Proteína mTOR

O alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) é uma proteína quinase serina / treonina que pertence à família 1 da proteína quinase relacionada à Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (REHAN & BAJOUH, 2019). Esta proteína desempenha um papel central na fisiologia humana, regulando atividade de, pelo menos, 800 proteínas. Atua na coordenação do metabolismo celular, no crescimento e sobrevivência em resposta a hormônios, sobre fatores de crescimento, nutrientes, energia e sinais de estresse (SIBANDA *et al.*, 2010).

A proteína mTOR é formada por dois complexos estrutural e funcionalmente distintos, mTORC1 e mTORC2, localizados em diferentes compartimentos celulares, cada um contendo subunidades distintas e comuns necessárias à atividade e regulação catalíticas da enzima principal (AYLETT *et al.*, 2016). O complexo mTORC1 transmite sinais de disponibilidade de nutrientes para controlar várias funções celulares (CUESTA *et al.*, 2019), enquanto que o complexo mTORC2 regula, principalmente, a montagem do citoesqueleto por actina (ALQURASHI *et al.*, 2018).

O complexo mTORC1 possui cinco componentes(Figura 3A): mTOR, que é a subunidade catalítica do complexo, proteína associada à regulação de mTOR (RAPTOR), mamífero letal com proteína SEC13 8 (mLST8) que são as subunidades regulatórias positivas, PRAS40 e DEPTOR, que são as subunidades regulatórias negativas (AYLETT *et al.*, 2016). Já o mTORC2(Figura 3B) é composto por: mTOR, companheiro insensível de rapamicina da mTOR (RICTOR), proteína ativada por estresse mamífero quinase interagindo proteína 1 (mSIN1) e proteína observada com RICTOR (Protor-1) que desempenham o papel de estabilizar o complexo formado, mLST8 e DEPTOR (FRANCIPANE & LAGASSE, 2013).

Estruturalmente, a mTOR é composta de 2.549 resíduos de aminoácidos que contam com um número distinto de domínios funcionais, incluindo: domínio FAT, domínio FRB, um domínio catalítico (*kinase domain*) (KD) e domínio FATC (WATANABE *et al.*, 2011). A extremidade C terminal de mTOR contém um domínio quinase catalítico que por sua vez contém pequenas regiões que são locais de fosforegulação, chamados domínios regulatórios negativos ou domínios repressores (YANG *et al.*, 2013). No interior destas regiões, a fosforilação da treonina 2996, serina 2448 e serina 2481 estão vinculadas a altos níveis de atividade de mTOR e próximo a este domínio quinase está o FRB (KIM & GUAN, 2019).

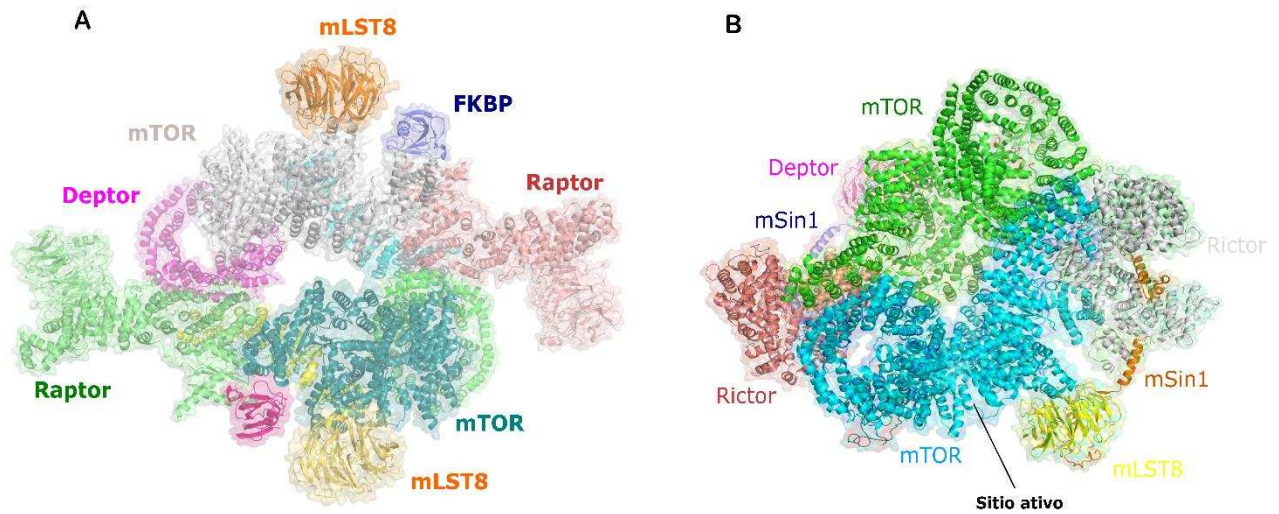


Figura 3: Estrutura global dos complexos mTORC1(A) e mTORC2(B). O mTORC1 é formado por mTOR nas cores verde escuro e cinza, mLST8 na cor laranja, Deptor na cor lilás e Raptor nas cores verde e marrom. O mTORC2 formada por mTOR nas cores verde e azul, Deptor na cor lilás, mLST8 na cor amarela, Rictor nas cores marrom e cinza e mSin1 nas cores azul e amarelo (Fonte: Elaborado pelo autor).

A desregulação da atividade da mTOR está envolvida em muitas atividades fisiopatológicas, tais como o envelhecimento, doença de Alzheimer, diabetes, obesidade e câncer, tais como mama, próstata, pulmão, fígado e carcinomas renais (HUA *et al.*, 2019). Ativação anormal da via mTOR deve-se principalmente a mutações das suas vias montante, incluindo o PI3K/AKT e o RAS/RAF/MEK/ERK que desempenha um papel central na progressão e metástase de vários cânceres (SAXTON & SABATINI, 2017). Portanto, prospecção de inibidores para mTOR, pode ser uma estratégia terapêutica viável para limitar o crescimento e progressão de várias doenças, incluindo o câncer.

A inibição clássica da via da mTOR é efetuada pela rapamicina e seus derivados análogos, denominados rapalogs, que são considerados os inibidores de primeira geração (ZONCU *et al.*, 2011). O mecanismo de inibição da mTOR pela rapamicina e seus análogos reside na ligação da proteína (FKBP12), formando o complexo rapamicina-FKBP12 que se liga direta e predominantemente ao domínio (FRB), bloqueando-o de forma alostérica (FRANCIPANE & LAGASSE, 2013). Porém, os inibidores de primeira geração têm demonstrado falhas especialmente devido ao mecanismo de feedback, já que a inibição do complexo resulta na

hiperativação da sinalização PI3K/Akt e incrementa a sobrevivência celular e determinada insensibilidade do mTORC1 (O'DONNELL *et al.*, 2018).

Estas limitações conduziram ao desenvolvimento de inibidores de mTOR que inibem a função catalítica de mTOR, conhecidos como inibidores competitivos do ATP no domínio kinase mTOR (ZHANG *et al.*, 2011). Nesse caso, pode-se citar fármacos com testes clínicos já iniciados, como os inibidores duplos de segunda geração, inibidores dual mTOR/PI3K, por exemplo, o XL765 e PKI-179 (REHAN, 2015., REHAN., 2019). Contudo, apesar de demonstrarem avanços terapêuticos, a maioria dos inibidores da mTOR e PI3K apresentam inúmeros efeitos secundários, logo, é importante a busca por inibidores cada vez mais seletivos e menos tóxicos (WANG *et al.*, 2016, M. CHRISTOPHER, 2016). As proteínas PI3K e mTOR apresentam sitio de ligação do ATP semelhantes, sendo assim uma oportunidade para explorar fármacos duais (LUSZCZAK *et al.*, 2020). Na figura 1, podemos observar sobreposição do sítio de ligação do ATP da PI3K α e mTOR.

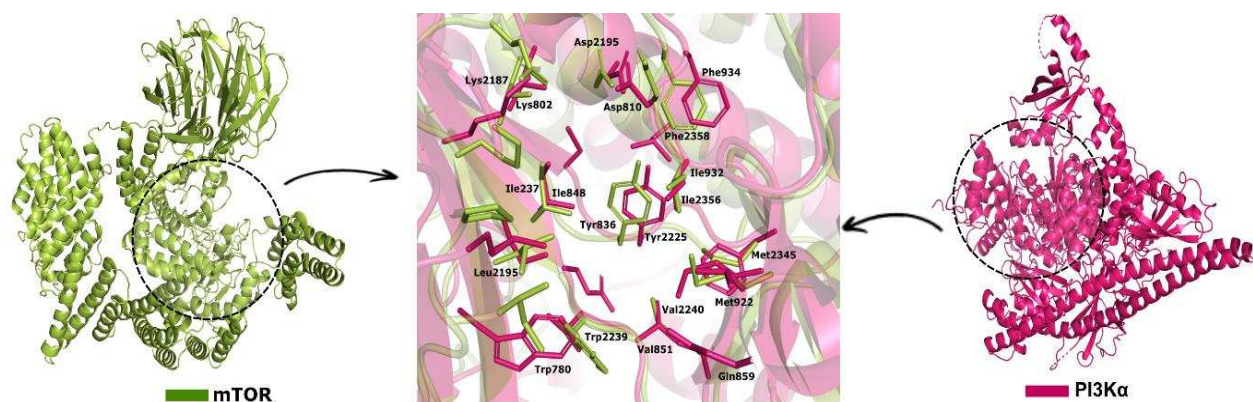


Figura 4. Sobreposição, ao centro, do sítio de ligação do ATP da PI3K α e mTOR . O painel esquerdo mostra as subunidades catalíticas e reguladoras da PI3K α , enquanto o painel direito mostra a proteína mTOR.

2.5 Biologia computacional aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos

A produção de um novo fármaco é bastante complexa, sendo que a indústria farmacêutica gasta aproximadamente 314 milhões a 2,8 bilhões de dólares para o desenvolvimento de um novo produto (WOUTERS *et al.*, 2020). Neste custo estão incluídos gastos envolvidos no desenvolvimento do medicamento, tais como os testes farmacocinéticos, farmacodinâmicos, e ensaios clínicos, bem como os custos despendidos com compostos que não conseguiram chegar

ao mercado, pois os projetos podem falhar em todas as diferentes etapas do processo. (WOOLLER et al., 2017).

O emprego de ferramentas de biologia computacional, principalmente na área de bioinformática estrutural, tem crescido gradualmente e tornando-se comum em pesquisas de concepção de medicamentos, ajudando a indústria farmacêutica, descobrindo novos compostos, sítios de ligação ou conformações, e até mesmo permitindo a reimplantação do fármaco para tratar outras doenças (PHILLIPS *et al.*, 2018). Dentre estas ferramentas, os métodos de ancoramento molecular e dinâmica molecular (ZANATTA *et al.*, 2016).

2.5.1 Ancoramento molecular e Triagem Virtual

O ancoramento molecular proporciona uma grande visão das interações proteína ligante e da orientação de moléculas no local de ligação de um alvo macromolecular, utilizando a forma e interações eletrostáticas para quantificar (TORRES *et al.*, 2019) e tem sido amplamente empregado como uma técnica rápida e barata nas últimas décadas, tanto em ambientes acadêmicos quanto industriais (TORRES *et al.*, 2019).

O primeiro passo no ancoramento molecular é escolher um alvo para droga. Por exemplo: enzimas, em seguida, a estrutura tridimensional deve ser determinadas ou previstas; estruturas de alta resolução podem ser determinadas usando raios X ou microscopia, essas estruturas proteicas encontram-se depositadas em bancos de dados computacionais, como o Protein Data Bank (PHILLIPS *et al.*, 2018). Exemplos de programas de ancoramento molecular são AutoDock (MORRIS *et al.*, 2010), Vina (TROTT e OLSON, 2010), UCSF DOCK (ALLEN *et al.*, 2015), GOLD (JONES *et al.*, 1997) e Glide (FRIESNER *et al.*, 2004 , 2006). Além do software autônomo, servidores web como o Portal DockThor (MAGALHÃES *et al.*, 2014), MTiOpenScreen (LABBÉ *et al.*, 2015), HADDOCK (VAN ZUNDERT *et al.*, 2016) e DOCK Blaster (IRWIN *et al.*, 2009) fornecem à comunidade científica interface de usuário amigável e tempo de resposta satisfatório para resultados de ancoramento.

O programa AutoDock Vina de código livre, utilizado neste trabalho, apresenta função escore baseada em campo de força, e tem se mostrado uma ferramenta rápida e eficaz na predição

de energia livre e modo de interação de ligantes em alvos macromoleculares (GUEDES; MAGALHÃES, 2014).

A utilização de conjuntos conformacionais (ensembles) da proteína alvo durante o ancoramento molecular permite a avaliação do encaixe de moléculas ligantes em várias conformações rígidas do receptor. Em um nível mais sofisticado, esta técnica pode ser combinada com a triagem virtual de bibliotecas de compostos, dando origem a técnica conhecida como triagem virtual baseada em ancoramento molecular com conjuntos conformacionais (do inglês, *ensemble docking-based virtual screening*) (AMARO *et al.*, 2018).

A triagem virtual pode ser baseada na técnica de ancoramento molecular e apresenta um número crescente de casos de sucesso relatados (VILLOUTREIX *et al.*, 2009 ; MATTER e SOTRIFFER, 2011 ; ROGNAN, 2017). A triagem virtual é uma técnica usada para prever a ligação de uma grande base de dados de ligantes a um determinado alvo, funcionando como um funil, selecionando moléculas mais promissoras com muitos sucessos na descoberta de novos fármacos(COSCONATI *et al.*, 2010).

Os bancos de dados têm sido cruciais no desenvolvimento de campos de pesquisas multidisciplinares, como a química medicinal; para descobrir a química dos produtos naturais brasileiros, o Banco de Dados de Ecofisiologia e Biossíntese de Produtos Naturais (NuBBE) foi criado como a primeira biblioteca de produtos naturais da biodiversidade brasileira, fornecendo informações multidisciplinares validadas, descritores químicos, fontes de espécies, localizações geográficas, dados espectroscópicos (NMR) e propriedades farmacológicas, provando ser um recurso importante para estudos de desenho de novos medicamentos (PILON *et al.*, 2017).

O ancoramento molecular vem mostrando sucesso na descoberta de drogas para algumas doenças, como: o tratamento do HIV (AMARO *et al.*, 2018) e anticânceres, por exemplo, a identificação do composto PI-083, que apresentou potencial inibitório de proteassoma e na compreensão do mecanismo de ligação dos inibidores do proteassoma (PHILLIPS *et al.*, 2018) e cânceres (REHAN;BAJOUH, 2019).Recentemente, os métodos de ancoramento e dinâmica molecular têm sido muito explorados na busca de fármacos contra a COVID-19 por apresentar eficácia e rapidez (TAO *et al.*, 2020). Através de cálculos de docking molecular e simulações de dinâmica molecular, os fármacos Mitoxantrona, Leucovorin, Birinapant e Dynasore mostraram potencial inibitório de SARS-CoV-2 Mpro (LOKHANDE *et al.*, 2020) .

2.5.2 Energia Livre de Interação

Cálculos de energia livre de interação consistem em poderosas ferramentas na elucidação do mecanismo de interação de inibidores enzimáticos conhecidos, bem como na prospecção de novos agentes terapêuticos. Dentre as principais metodologias utilizadas estão os cálculos quânticos baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (ZANATTA *et al.*, 2014) e os cálculos de integração termodinâmica clássicos, como a abordagem Mecânica Molecular/Poisson-Boltzmann Área de Superfície (MM/PBSA, do inglês, Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area) (KUMARI *et al.*, 2014).

Uma vez que os cálculos DFT demandam alto poder computacional e crescem exponencialmente com o número de átomos (elétrons) no sistema, cálculos de energia de interação de sistemas biológicos normalmente consideram somente uma conformação de contato do sistema analisado. Por outro lado, a abordagem MM/PBSA analisa um conjunto conformacional representativo das flutuações que ocorrem no contato entre dois entes moleculares e tem sido utilizada com sucesso para calcular a energia de interação entre uma vasta gama de pequenos ligantes e moléculas biológicas (POLI *et al.*, 2020).

Neste sentido, cálculos de MM/PBSA diferem dos cálculos de energia de ponto único, normalmente empregados na análise de estruturas cristalográficas, por requererem um conjunto de conformações extraídas de simulações de dinâmica molecular para aceder com precisão e medir o efeito de pequenas flutuações nas interações intermoleculares (KUMARI ET *et al.*, 2014). No entanto, embora a precisão da energia livre de ligação absoluta calculada na abordagem MM/PBSA seja discutível e muito dependente do sistema, a análise da energia por interação de resíduos entre alvos biológicos semelhantes ligados a ligantes distintos tem sido de grande valor para classificar as contribuições individuais de aminoácidos, o efeito das mutações e para guiar o desenvolvimento racional do medicamento (REN *et al.*, 2020).

2.5.3 Dinâmica Molecular

A simulação da dinâmica molecular (DM) é uma poderosa ferramenta computacional para a investigação de biomoléculas, a qual prevê como cada átomo de um sistema proteico se moverá no decorrer do tempo. Simulações de DM consistem em um modelo regido por leis físicas baseadas nos fundamentos da Mecânica Clássica (WANG *et al.*, 2019).

Estas simulações podem captar uma grande variedade de processos biomoleculares importantes, incluindo mudança conformacionais, ligação de ligantes e proteínas, revelando as posições de todos os átomos no femtossegundo em resolução temporal (XIAO *et al.*, 2019). Tais simulações podem também prever como as biomoléculas responderão a nível atômico, perturbações como: mutação, fosforilação, protonação, ou a adição ou remoção de um ligante (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018). Ainda, simulações de DM também podem ser utilizadas para testar a precisão de uma estrutura modelada ou mesmo para a refiná-la (BURG *et al.*, 2015).

O surgimento de pacotes padronizados como o GROMACS, ajudam tornar a realização da simulação mais cômoda, e auxiliam pesquisadores em ciências da vida nas pesquisas de modelagem molecular (PRONK *et al.*, 2013).

2.6 Compostos de Origem Vegetais

Dependendo do tipo e condição do câncer, os tratamentos convencionais podem envolver quimioterapia em combinação com cirurgia, radioterapia, terapia hormonal, e/ou terapias altamente direcionadas, tais como imunoterapia e terapia com anticorpos monoclonais e drogas quimioterapia (sintéticas e semi-sintéticas). Esses tratamentos, estão associados efeitos secundários proeminentes e, às vezes, são citotóxicas e matam frequentemente células cancerosas e saudáveis, por isso, tem crescido a procura por tratamentos com o melhor balanço entre uma alta eficácia e baixa toxicidade (MAHONEY; FREEMAN; MCDERMOTT, 2015).

Na tentativa de superar tais efeitos colaterais adversos associados a essas drogas, diversos pesquisadores têm focado no desenvolvimento de drogas anticancerígenas a partir de compostos fitoquímicos naturais (SAXENA, 2019). Os compostos naturais são fontes importantes de novas moléculas para tratamentos de doenças, representando mais de um terço de todas as novas entidades moleculares aprovadas pela agência norte americana Food and Drug Administration (FDA) (ROSSITER *et al.*, 2017; PATRIDGE *et al.*, 2016)

Os compostos naturais obtidos a partir de vegetais, vem sendo utilizado no decorrer da história pelos seres humanos para diferentes finalidades, dentre as quais se destacam os aspectos nutricional e desenvolvimento de medicamentos. As relações dinâmicas entre o homem e o ambiente, como na cura de doenças, têm colocado os extratos vegetais e seus fitoquímicos bioativos

como elementos essenciais no uso terapêuticos atuais (VISHNUPRASAD; UNNIKANNAN, 2017).

O aumento do custo de medicamentos sintéticos, juntamente com a ausência de efeitos colaterais, clinicamente relevantes, decorrente do uso de plantas medicinais (DWIVEDY *et al.*, 2018) tem impulsionado o interesse científico na descoberta de novas drogas baseadas de espécies vegetais e de seus constituintes ativos (TEWARI *et al.*, 2019). Os compostos vegetais são fontes importantes de novas moléculas: Glicosídeos, alcaloides, resinas, terpenoides e compostos fenólicos, como flavonoides e taninos, são as moléculas farmacologicamente ativas comumente encontradas nas formulações de medicamentos fitoterápicos (DWIVEDY *et al.*, 2018). Aproximadamente 70% das drogas desenvolvidas contra o câncer não são sintéticas e dessas 50% são de origem vegetal, como, por exemplo, as classes de vegetais, os triterpenoides, flavonoides, catecolinas, taninos e alcaloides vêm se destacando com potencial anticancerígeno (SUVARNA *et al.*, 2017).

Exemplos de drogas de origem vegetal são: vincristina, vinblastine, vinorelbine e vindesina apresentam atividades anticancerígenas e são derivadas de alcaloides (BARRALES-CURENO *et al.*, 2019). O Podophyllotoxin (PPT), um lignano de arilotetralina, encontrado naturalmente em rizomas e raízes de muitas ervas tais como *Podophyllum peltatum*, *P. hexandrum*, *Linum album*, *L. narbonense*, mostrou atividades anticancerígenas, através da inibição do Topo II, parando assim o ciclo celular na fase G2 e causando danos no DNA e apoptose das proteínas tirosina kinase (DHOLWANI *et al.*, 2018)

As espécies *Taxus* pertencem à família Taxaceae (Yew) e produzem o diterpenoid taxol, anticancerígeno de origem natural. O taxol é altamente eficaz no tratamento de vários tipos de cânceres e outras doenças, incluindo recuperação funcional cardíaca e psoríase (CHANGXING *et al.*, 2020). O taxol foi primeiramente isolado da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), mas começou a ser produzido por outros órgãos dos vegetais. (EHRlich *et al.*, 2004).

2.6.1 Polifenóis

Os polifenóis compreendem um grupo químico com uma grande diversidade, formados pela combinação de múltiplos anéis aromáticos, grupos hidroxilas com glicosídeos adjacentes e outros grupos químicos acetilados, apresentando efeitos diretos e indiretos na progressão do câncer,

na angiogênese e na proliferação das células, uma das vias celulares normalmente afetadas por polifenóis é a PI3K/Akt/mTOR, que têm efeitos muito variados em múltiplos aspectos chave do crescimento celular, metabolismo e morte (MIRZA;AGHAZADEH;ATTARI *et al.*, 2020).

Os polifenóis constituem um grande grupo de fotoquímicos bioativos que incluem múltiplas subclasses tais como flavonóides, estilbenos, ácidos fenólicos, e lignanos. Os flavonóides são uma classe importante de produtos naturais; em particular, pertencem a uma classe de metabolitos secundários de plantas com uma estrutura polifenólica, possuem diversas vantagens como: efeitos bioquímicos e antioxidantes associados a várias doenças como o câncer, doença de Alzheimer (AD) e aterosclerose (PANCHE *et al.*, 2016).

Quercetina (3,3,4,5-7-pentahidroxi flavona) é um composto polifenólico bioativo que se encontra amplamente distribuído em plantas e tem sido extensivamente estudada pela sua eficácia anticancerígena, incluindo a indução de apoptose, proliferação e supressão da metástase (AMIRI *et al.*, 2014). Foi também relatado por Ghalandarlak(2014) , que a curcumina um composto de polifenol extraído da raiz de *Curcuma longa* Linn é um excelente redutor da proliferação de uma grande variedade de células cancerígenas e ela pode afetar múltiplos alvos, tais como receptores, fatores de transcrição, quinases, citocinas, enzimas e factores de crescimento e pode afetar várias cascatas moleculares e bioquímicas(ZHANG *et al.*, 2018)

WEI e colaboradores (2021) mostraram em seus resultados que o composto Eupafolin da classe flavonoide diminuiu os níveis das proteínas PI3K, Akt e mTOR, inibindo invasão celular e promovendo a apoptose celular, portanto, as descobertas fornecem novas perspectivas sobre o uso de Eupafolin para tratamento de câncer de mama (WEI *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar constituintes estruturais na inibição seletiva ou dual das enzimas PI3K α /mTOR e utilizá-los na busca de compostos de origem vegetal com potencial inibitório sobre as mesmas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar mecanismo de inibição dos sítios catalíticos das enzimas mTOR e PI3K α , de forma a identificar e quantificar a ação de resíduos-chave na inibição promovida por compostos de ação seletiva e dual;
- Identificar resíduos-chave que controlam a interação entre proteína mTOR e sua proteína parceira mLST8;
- Desenvolver e validar protocolos de ancoramento molecular baseados em conjuntos conformacionais específicos para a PI3K α e mTOR;
- Identificar moléculas de origem vegetal com potencial inibitório sobre as enzimas PI3K α e mTOR.

4 METODOLOGIA

Valendo-se dos conhecimentos estruturais existentes das enzimas mTOR e PI3K α , foram utilizados métodos computacionais para mapear, em termos de energia de interação, a função dos aminoácidos na interface de interação entre a mTOR e a mLST8, e no sítio de ligação das enzimas mTOR e da PI3K α com seus ligantes. Posteriormente, realizou-se uma pesquisa, agrupamento e filtragem de informações de bases de dados de compostos de origem vegetal (COV). Cada complexo e inibidor de proteínas foi protonado a pH fisiológico e submetido a simulações de dinâmica molecular e cálculos de energia relativa de ligação através da abordagem MM/PBSA, conforme descrito abaixo.

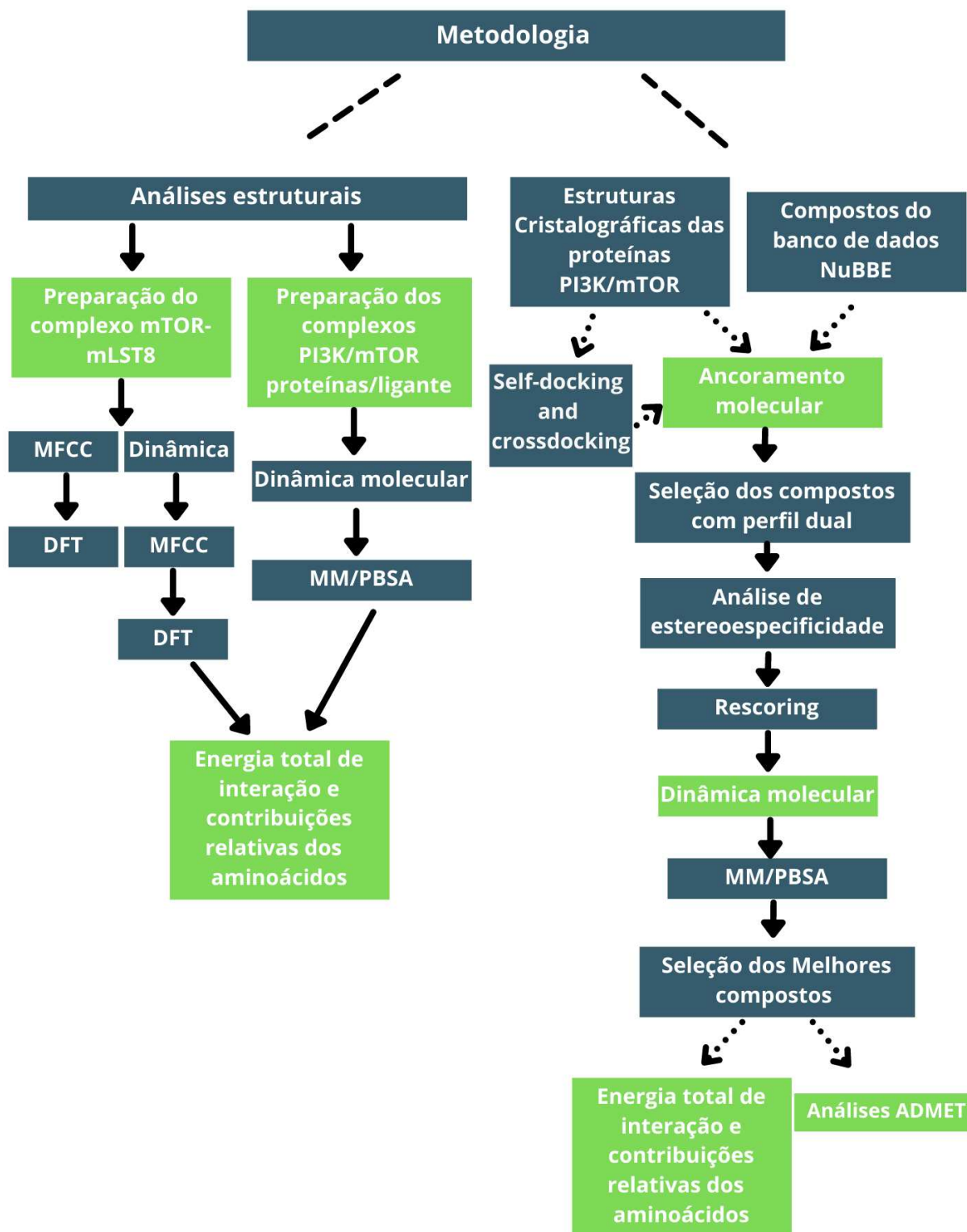


Figura 5: Fluxograma da estratégia experimental do projeto (Fonte: Elaborado pelo autor)

4.1 Obtenção das estruturas

Para caracterizar a energia de interação individual entre pares de resíduos de aminoácidos localizados na interface do complexo mTOR-mLST8, foram realizados cálculos quânticos, ao nível da DFT. Os cálculos foram efetuados utilizando coordenadas estruturais da estrutura cristalográfica mTOR-mLST8 (PDB ID: 4JSN), que representa a mTOR no seu estado ativo. O cristal tem uma resolução de 3,2 Å. A cela unitária assimétrica de cristal contém dois receptores (A e B) numa orientação antiparalela, ambos exibindo ligeiras diferenças de forma. Escolhemos arbitrariamente receptor (A) para utilizar no nosso estudo.

As análises de interações das proteínas e ligantes seletivos, e duais foram realizadas pelo método MM/PBSA. As estruturas utilizadas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) (BERMAN *et al.*, 2000). No total, foram analisadas quatro estruturas, sendo elas: PI3K α com inibidor dual PI103 (ZHAO *et al.*, 2014) (PDB ID 4L23; PubChem CID 9884685), PI3K α com inibidor seletivo alpelisib (FURET *et al.*, 2013) (PDB ID 4JPS); PubChem CID 5664945), mTOR com o inibidor dual PI103 (YANG *et al.*, 2013) (PDB ID 4JT6; PubChem CID 9884685) e mTOR com o inibidor seletivo torin-2 (YANG *et al.*, 2013) (PDB ID 4JSX; PubChem CID 51358113).

Para triagem virtual, foi realizada uma busca de todos os complexos PI3K α /mTOR disponíveis e preparado um conjunto conformacional das enzimas como receptores. Foram selecionados complexos apenas aqueles não mutantes, APO e de *Homo sapiens* para a etapa de classificação em grupos, totalizando 9 complexos proteína-ligante (PI3K α) e 7 complexos proteína-ligante mTOR.

4.1 Preparação de dados estruturais

A protonação das estruturas cristalográficas (PDB ID: 4JSN, 4JT6, 4JSX, 4L23 e 4JPS em pH 7,2 foram realizadas por meio do algoritmo PROPKA no servidor web PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2007). A protonação dos ligantes em pH fisiológico foi avaliada por meio do Marvin Sketch (versão 20.20), 2020, da ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

Para estruturas do conjunto conformacional das proteínas PI3K α /mTOR, moléculas pequena como água, íons, entre outros, foram removidas, utilizando a ferramenta PyMOL a qual

permite a visualização das estruturas. Na etapa seguinte de preparação, as estruturas proteicas foram protonadas com pH7.0 usando o ProPKA no PDB2PQR web server. Por fim, para gerar arquivos com as coordenadas de cada átomo e obter o átomo central do ligante e converter as estruturas no formato PDBQT, utilizou-se a ferramenta AutoDockTools (MORRIS *et al.*, 2010).

As estruturas tridimensionais dos compostos de origem vegetal testados foram obtidas na plataforma NuBBE. Os compostos foram protonados no software Open Babel v.2.3.1 com pH 7.0. e posteriormente convertidos para formato PDBQT.

4.2 Dinâmica Molecular

Nesta dissertação, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com auxílio do pacote GROMACS 2019 (ABRAHAM *et al* 2015).

4.2.1 Preparação

Para simulação da DM da mTOR/mLST8(4JSN), foi utilizado o campo de força CHARMM36. A simulação foi realizada em duplicado e consistia em ~365 000 átomos que incluía a mTOR-mLST8, 114 039 moléculas de água, 345 íons de Na⁺ e 334 íons de Cl⁻. A restrição foi aplicada à cadeia principal da mTOR (exceto para o loop que faz contato próximo com o mLST8) enquanto todo a mLST8 estava livre para se mover.

As simulações de dinâmica molecular dos complexos proteína-ligante foram realizadas utilizando o pacote GROMACS 2019 e o campo de força AmberSB99 (ABEL *et al* 2006). Em todos os sistemas, o modelo de água TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983) foi empregado para descrever moléculas de água e a carga líquida foi neutralizada adicionando íons Na⁺ e Cl⁻ na concentração de 0,15 M.

4.2.2 Minimização e equilíbrio do sistema

Antes da etapa de produção DM, a minimização de energia total foi realizada através da combinação do algoritmo mais acentuado e o método do gradiente conjugado em sequência. No total, cada sistema foi equilibrado usando etapas de integração de 1 fs até 2 ns, seguindo constantes

de força de restrição gradualmente decrescentes ao longo de 4 etapas de 250 ps cada. O cálculo de interação eletrostática de longo alcance foi modelado com o método Particle Mesh Ewald (PME) (ESSMANN *et al.*, 1995) para o acoplamento de temperatura usou-se o método Nose-Hoover thermostat á 310,15 K e Parrinello-Rahman barostat (PARRINELLO & RAHMAN, 1981) com uma pressão de referência de 1 atm. O algoritmo LINCS foi utilizado para restringir as ligações covalentes ao seu comprimento de equilíbrio (HESS *et al.*, 1997).

4.2.3 Produção da dinâmica molecular

As etapas de integração de todas as simulações durante a etapa de produção foram definidas para 2 fs. No final, foram obtidas duas trajetórias de 100 ns da estrutura cristalográfica mTOR-mLST8 e para analisar a estabilidade da estrutura foi calculado o desvios quadrado médio da raiz (RMSD). Posteriormente, a estrutura cristalográfica da DM foi submetida a fragmentação molecular(MFCC) e cálculos quânticos (DFT)

Para complexos PI3K α /PI103, PI3K α /Alpelisib, mTOR/PI103 e mTOR/Torin2 obteve-se uma trajetória de 500 ns para cada sistema e calculou-se desvios quadrado médio da raiz (RMSD) e a flutuação raiz-medida quadrática (RMSF). Seguido, o cálculo da energia de interação do sistema complexo (receptor-ligante)foi calculado utilizando a abordagem MM/PBSA.

Os complexos (proteína-ligante) do conjunto conformacional com compostos de origem vegetal , obteve-se uma trajetória de 10ns, que posteriormente foi utilizada para cálculo de energia de interação do sistema complexo (receptor-ligante) calculado utilizando pelo método MM/PBSA.

4.3 Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas MFCC

Foram produzidas as coordenadas da estrutura cristalográfica mTOR-mLST8 e da simulação DM, ambos submetidas a fragmentação molecular, usando o esquema MFCC, a fim de reduzir a dimensão do sistema de entrada durante os cálculos quânticos de aminoácidos individuais energia de interação. Devido ao expressivo número de elétrons em sistemas biológicos, há uma grande limitação na utilização de cálculos quânticos. Para solucionar estes problemas, Zhang (2003) e colaboradores desenvolveram uma abordagem de fragmentação molecular com capas conjugadas.

Os resíduos na interface da mTOR foram representados como R(a) para indicar o resíduo do i-ésimo aminoácido que interage com resíduos na interface do mLST8, R(b). Como observado na Fig. 6, os pares de bonés R(a-1)/R(a+1) e R(b-1)/R(b+1) são feitos dos resíduos covalentemente ligados à amina (carboxil) grupo de R(a) e R(b), respectivamente. Durante a fragmentação, átomos de hidrogénio foram adicionados para passivar qualquer ligação pendente. Nesta situação, a energia de interacção $E[R(a)R(b)]$ é calculado da seguinte forma:

$$E[R(a)R(b)] = E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)] - E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)] - E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)] + E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)] \quad (1)$$

No lado direito do eqn (1), o primeiro termo $E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)]$ é a energia total do sistema formado por R(a), R(b) e os resíduos selados; o segundo termo, $E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)]$, dá a energia total de R(a) e as suas tampas e os resíduos tampados de R(b) apenas, enquanto o terceiro termo, $E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)]$ é a energia total dos resíduos de R(a) só com R(a) e os seus limites; o último termo, $E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)]$ é a energia total do sistema formado pelas tampas isoladas. Em o fim, eqn (1) resulta na energia total de interacção dos resíduos investigados na interface do mTOR R(a) e do resíduo R(b), que faz parte da interface do mLST8.

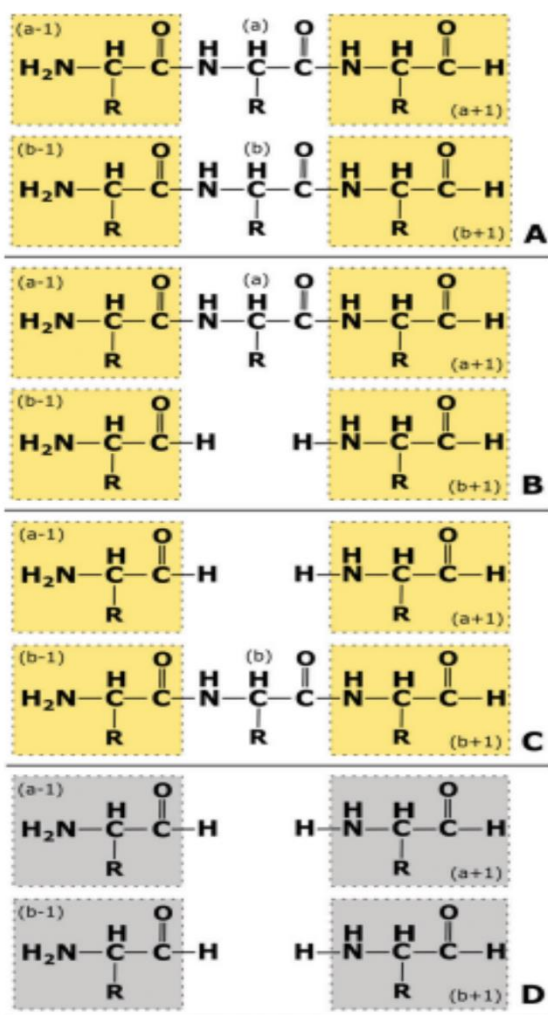


Figura 6: Esquema MFCC aplicado para interação proteína-proteína. (Fonte: Elaborado pelo autor)

4.4 Teoria do Funcional da Densidade (DFT) aplicada a sistemas biológicos

Através da teoria funcional da densidade a energia é expressa em termos da densidade total de elétrons. Os cálculos da DFT foram efetuados dentro da aproximação do gradiente generalizado (GGA) utilizando a função de correlação de troca Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE). Enquanto a função PBE produz resultados próximos aos da função PW91, os termos de correção da dispersão evitam a necessidade de utilizar métodos quânticos de alto nível para descrever as interações van der Waals.

O código DMOL3 (DELLEY; CHEM. PHYS., 2000) foi utilizado para cálculos; será escolhido um conjunto de base Double Numerical plus Polarization (DNP) para expandir os

orbitais Kohn-Sham. O corte orbital, que controla a qualidade do conjunto de bases numéricas e das integrações numéricas realizadas durante os cálculos, foi fixado em 5.5 para assegurar uma boa precisão. A variação total da energia para alcançar a convergência do campo autoconsistente (SCF) foi definida para 10^{-6} Ha.

4.5 MM/PBSA

MM/PBSA (do inglês “Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area”) é um método eficiente utilizado para estimar a energia livre de ligação em complexos proteína-ligante, ao longo de uma simulação de DM (WANG *et al.*, 2018). Os cálculos do (MM/PBSA) foram executado através do código `g_mmpbsa` (KUMARI ET AL., 2014). utilizando a abordagem MM/PBSA (equação 1), como se segue:

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}}) \quad (1)$$

Onde, G_{complex} é a energia total livre do complexo proteínas-ligantes e G_{protein} e G_{ligand} são energias total livre das proteínas isoladas e ligante em solvente, respectivamente.

A Energia livre (G) para cada unidade individual é estimada na equação 2

$$G = \langle E_{\text{MM}} \rangle + \langle G_{\text{solvation}} \rangle - \langle TS \rangle \quad (2)$$

Onde E_{MM} representa a soma da energia interna da Mecânica Molecular da molécula, $G_{\text{solvation}}$ é a energia livre da solvatação, T é a temperatura em unidades de Kelvin e S representa a entropia conformacional do Sistema.

A energia interna da Mecânica Molecular é dada pelos termos limite e não limite

$$E_{\text{MM}} = E_{\text{bonded}} + E_{\text{nonbonded}} \quad (3)$$

onde, para cada unidade molecular individual, o E_{bonded} representa as interações de ligação que consistem em ligação do ângulo diedro e interações impróprias. As interações não ligadas

($E_{\text{nonbonded}}$) incluem tanto a eletrostática (E_{elec}) como a van der Waals e são modeladas usando uma Função potencial Coulomb e Lennard-Jones (LJ) respectivamente.

Energia Livre de Solvação

$$G_{\text{solvation}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{nonpolar}} \quad (4)$$

$G_{\text{solvation}}$ representa a quantidade de energia gasta para transferir um soluto do vácuo para o solvente e é calculada utilizando um modelo implícito de solvente. O G_{polar} é a energia polar de solvatação de uma molécula, estimada através da resolução da equação de Poisson-Boltzmann (PB) e G_{nonpolar} é o termo para a energia de solvação não polar que é aproximada por uma área de superfície acessível a solventes (SASA)(ESSMANN *et al.*, 1995) termo, baseado na suposição de que tem uma dependência linear do termo G_{nonpolar} :

$$G_{\text{nonpolar}} = \gamma A + b \quad (5)$$

Onde γ é um coeficiente relacionado com a tensão superficial do solvente, A é SASA, e b é o parâmetro de encaixe.

Neste trabalho, utilizamos um protocolo de trajetória única onde apenas o complexo proteína-ligante é simulado e as conformações de proteína e ligante nos estados ligado e não ligado são assumidas como idênticas, pelo que os seus termos E_{bonded} e E_{bonded} anulam. Além disso, para complexos PI3K α /PI103, PI3K α /Alpelisib, mTOR/PI103 e mTOR/Torin2 foi avaliado a dependência do ΔG_{bind} do valor da constante dielétrica do soluto ϵ_{solute} , a constante dielétrica do soluto foi definida para 2 ou 8, em combinação com três valores distintos (20, 40 e 80) para as constantes dielétricas do solvente, para ter em conta o efeito do solvente na fenda de ligação. Outros parâmetros em g_mmpbsa foram deixados como padrão.

Para a reclassificação dos compostos de origem vegetal após acoramento molecular foi utilizado o cálculo de MM/PBSA, com constante dielétrica 2 e 80 para constante dielétrica .

4.6 Interação total de energia e contribuições dos aminoácidos relativos

Neste trabalho, foram utilizados scripts python "MmPbSaStat.py" e "MmPbSaDecomp.py" (KUMARI *et al.*, 2014) para realizar a decomposição de energia por resíduo com base nos componentes de energia calculados EMM, Gpolar, e Gnonpolar do MM/PBSA, a fim de identificar contribuições de aminoácidos chave para a ligação dos compostos distintos no sítio de ligação da PI3K α e mTOR. Para observar a flutuação da energia de interação total e a energia de interação individual de cada resíduo de aminoácidos dentro de 10 Å do ligante foi somada e traçada contra a sua distância radial ao ligante.

As distâncias foram calculadas utilizando o último FRAME das trajetórias das DM. Adicionalmente, para observar a principal contribuição individual de aminoácidos e a energia de ligação total, os pontos quentes que normalmente respondem a grandes alterações nesta curva são representados em gráficos de barras horizontais caracterizando (i) a energia de interação (em kJ/mol) dos ligantes com resíduos individuais de aminoácidos a partir dos quais se pode avaliar visualmente a relevância e o papel de cada resíduo, quer este atraia ou afaste o ligante; e (ii) os resíduos mais importantes que contribuem para a estabilidade do complexo na coluna de resíduos do lado esquerdo.

4.7 Ancoramento molecular

4.7.1 Seleção de Conformações

Para validação do sistema, utilizou-se as técnicas de auto-ancoramento (do inglês, self-docking) e ancoramento cruzado (do inglês, cross-docking). Os resultados de self-docking e cross-docking considerados satisfatórios quando as poses de menor energia apresentaram raiz do desvio quadrático médio (RMSD) do inglês Root Mean Square Deviation) abaixo de 3Å, quando comparada com a posição da estrutura de referência.

O self-docking consiste em fazer o ancoramento molecular entre uma proteína com estrutura resolvida experimentalmente e o ligante cristalizado junto com a mesma. Para o estudo, foram selecionadas 9 estruturas da enzima PI3K α obtidas do PDB (códigos PDB: 4JPS, 4L23, 4L2Y, 4YKN, 4ZOP, 5DXH, 5DXT, 5XGH, 5XGI) e 6 estruturas correspondente a enzima mTOR (códigos PDB: 3JBZ, 4JSV, 4JSX, 4JT5, 4JT6, 4JSP). Na primeira etapa do Self-docking, as

proteínas foram separadas do ligante utilizando o software PyMOL v.1.7.5.0. Na segunda etapa, as proteínas foram protonadas com pH 7.0 usando o ProPKA no PDB2PQR web server. Os ligantes também foram protonados com pH 7.0 usando o software Avogrado.

O ancoramento molecular foi realizada sobre um espaço de busca (caixa) que compreende o sítio ativo da proteína. Nese espaço, o software procura ancorar o ligante em uma posição e conformação que resulte em menor energia de ligação entre receptor e ligante. O algoritmo AutodockTools foi utilizado para a preparação do ancoramento molecular. Foi gerada uma caixa, os tamanhos da caixa 20 x 20 x 20 (x, y, z) apontam para o centro do sítio de ligação mTOR: centro_x = -17.728 centro_y = -32.917 centro_z = -57.784 e exhaustiveness 4. Na proteína PI3K α , a Caixa foi construída com seu centro em -1.166, -8.951, 18.068 (x,y,z) . O ancoramento foi repetido 10 vezes para cada receptor. As conformações encontradas foram comparadas com a conformação original do ligante em sua estrutura cristalográfica, por meio do cálculo de RMSD.

A análise de crossdocking foi importante para avaliar uma possível influência das diferentes conformações das enzimas, no modo de ligação proposto pelo ancoramento molecular para os inibidores testados e propor conjuntos de estruturas das enzimas. O experimento de crossdocking foi feito com 9 inibidores da PI3K α e 6 inibidores para mTOR, utilizando as estruturas representantes.

4.7.2 Ancoramento Molecular e triagem virtual

O experimento de ancoramento molecular foi feito com o auxílio do programa AutoDock Vina (TROTTE; OLSON, 2010). A área de busca foi definida com base nas coordenadas centrais dos sítios catalíticos das enzimas PI3K α /mTOR, empregando um ligante experimental como guia. O algoritmo AutodockTools foi utilizado para a preparação do ancoramento molecular. Os mesmos parâmetros usados no self-docking e crossdocking foram usados para ancoramento com os compostos vegetais.

Para o estudo de ancoramento molecular, foram selecionados um total de 1745 compostos. As estruturas tridimensionais destes inibidores foram retiradas do banco de dados NuBBE no formato de mol2. Os compostos foram convertidos em formato PDBQT e protonados através da automação do programa OpenBabel (O'BOYLE *et al.*, 2011). As simulações de ancoramento foram repetidas dez vezes para cada composto testado.

Dos 1745 compostos, foram selecionados 10% (174) com menor valor ΔG (kcal/mol) e desses, foram escolhidos somente aqueles com perfil de inibição dual (102). Por seguinte, foram analisadas as melhores energias e realizadas análises farmacocinéticas. Por fim, foram escolhidos os onze melhores composto com perfil dual, usando os critérios citados anteriormente e foram submetidos a análises de reescoring com cálculos de MM/PBSA.

4.7.3 Análises de Interação total de energia e contribuições dos aminoácidos

Foram analisadas a energia de interação total de ligação em função da distância do ligante, a energia individual de interação dos resíduos, localizados até 10 Å do ligante, foi somada e plotada contra a distância. Para visualizar as interações de ponte de hidrogênio proteína-ligante foram utilizados os softwares Discovery Studio e Pymol. Para analisar as propriedades tais como: físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade da água, farmacocinética e química medicina, foi utilizado a ferramenta SwissADME do Swiss Institute of Bioinformatics (DAINA *et al.*, 2017).

PUBLICAÇÕES

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2020, 44, 20982

mTOR–mLST8 interaction: hot spot identification through quantum biochemistry calculations†

Francisco Lucas Santos de Oliveira,^a Jaqueline Vieira Carletti,^b Francisca Fernanda Nunes Azevedo,^c Francisca Joseli Freitas de Sousa,^c Ewerton W. S. Caetano,^d Valder Nogueira Freire^a and Geancarlo Zanatta^{id}*^{ac}

The characterization of protein–protein interactions (PPIs) is an important step toward the development of therapeutic strategies. In this regard, the use of quantum calculations combined with protein fragmentation schemes can offer an opportunity to obtain high quality data and identify key interactions. The mechanistic target of rapamycin (mTOR) protein assembles with partner proteins, such as mLST8, to form two complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2), with distinct roles in the coordination of cellular metabolism, growth and survival. Imbalances in this pathway is highly related to cancer risk and recent reports have linked mLST8 upregulation with colon, prostate and liver cancers, demonstrating that the knockout of mLST8 genes in these cells makes them more vulnerable than healthy ones. Such upregulation seems to affect preferentially tumour cells, making this mechanism a pathway for emerging therapeutic strategies. In this work *in silico* approaches were employed to describe the interaction energy between each amino acid residue at the mTOR–mLST8 interface. PPI calculations were performed at the quantum level, within the density functional theory (DFT) framework, to identify hotspots at the interface side of both proteins. The calculated relative total interaction energy is -195.2 (-179.5) kcal mol⁻¹ for the crystallographic (MD) structure, with the strongest contribution from a portion at the C-terminal lobe, which is known for forming the binding site for mLST8. Calculated interactions identified the main residues at the mTOR interface as Met2281, Met2271, Glu2285, Glu2288 and His2277, whilst the main residues at the mLST8 interface are Tyr20, Tyr222 and Trp272. This work identifies for the first time, using quantum calculations, the key residues controlling the interaction between mTOR and its partner protein mLST8 and may represent the first step towards designing and probing new compounds to treat cancer through the disruption/modulation of mTOR interactions.

Received 14th August 2020,
Accepted 9th November 2020

DOI: 10.1039/d0nj04099a

rsc.li/njc

Introduction

The mechanistic target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine protein kinase which belongs to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)–related protein kinase (PIKK) family¹ and plays a central role in human physiology, regulating the activity of at least 800 proteins and coordinating cellular metabolism, growth and survival in response to hormones, growth factors, nutrients, energy and stress signals.^{2–5} According to the cell type and localization, mTOR can assemble with distinct partner

proteins to form mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). Although metabolically connected, each complex plays a distinct physiological role, being activated in distinct manners and working with different substrates. mTORC1 is sensitive to rapamycin and is formed by three core components: mTOR, regulatory protein associated with mTOR (Raptor), and mammalian lethal with Sec13 protein 8 – also referred to as G protein beta sub unit-like – GβL (mLST8).⁶ In addition, mTORC1 also contains Telomerase maintenance 2 (Tel2), Tel2-interacting protein 1 (Tti1), GRp58, Rac1 and two inhibitory subunits, proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40)^{7–9} and a DEP domain containing mTOR interaction protein (DEPTOR).¹⁰ Unlike mTORC1, mTORC2 is insensitive to rapamycin and is formed by mTOR, mLST8, rapamycin insensitive companion of mTOR (Rictor)^{11,12} and the regulatory subunit Stress-activated protein kinase Interaction protein 1 (mSin1).^{13–15} In addition mTORC2 contains DEPTOR, Tti1, Tel2, heat shock protein (Hsp) 70, protein observed with Rictor (Protor)^{1/2}¹⁶ and proline-rich protein (PRR) 5.

^a Department of Physics at Federal University of Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil. E-mail: geancarlo.zanatta@gmail.com

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Brazil

^c Postgraduate Research Program in Biochemistry at Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Federal Institute of Education, Science and Technology, 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0nj04099a

Imbalances in the pathways regulated by mTOR are linked to cancer,^{17,18} obesity,¹⁹ type 2 diabetes, tuberous sclerosis complex^{20,21} and neurodegenerative diseases,^{22,23} among others. Indeed, it is estimated that mTOR activity is increased in about 70% of all human tumours, which makes mTOR signalling an attractive target for cancer therapy.^{18,24}

Mutations in mTORC1/2 components or connected pathways often lead to metabolic imbalances and increase the risk of incidence of various cancer types.^{25–27} Nevertheless, despite the growing understanding of mTORC1/2 roles in cancer in the past few decades, the pharmacological tissue-specific mTOR modulation is far from being a reality in clinic. To make it worse, many of the drugs targeting the mTOR pathway have shown some limitations related to drug resistance linked to mutations^{28–31} or nonspecific toxicity (*i.e.* although rapalogs demonstrate antitumor activity in various cancers, they also inhibit mTOR in other tissues and are responsible for triggering severe side effects, such as metabolic disorders as diabetes and hyperlipidaemia,^{32–35} renal system impairments,^{36–38} dermatologic/mucosal aggression,^{39,40} hematologic disorders,⁴¹ hemodynamic imbalance,^{42,43} hormonal impairment,⁴⁴ and changes in wound healing capacity^{45–47}). For a review on the regulation of mTOR function and its involvement in cancer and other pathologies see ref. 48 and 49. Taking the relevance and implications of mTOR in cancer tumours, it is of utmost importance to find new strategies to tackle mTORC1/2 imbalances.

Previous studies suggested that the overexpression of mTOR may contribute to tumour progression and showed that the knockdown of mLST8 has significantly suppressed mTORC1 and mTORC2 complex formation, with inhibition in tumour growth and invasiveness in human colon carcinoma (HCT116) and prostate cancer (LNCap) cells. They notice that, while knockdown of mLST8 had a marginal effect on regulating the growth rate of normal epithelial cells, it reduced the formation of mTORC1/2 complexes in cancer cells, diminishing the phosphorylation of AKT and 4E-BP1.⁵⁰ Additionally, recent experimental evidence, using a panel of normal and cancer cells, has shown that interaction contact between mLST8 and mTOR with the SIN1-RICTOR complex is fundamental for the stabilization of mTORC2, and that mLST8 loss abrogates the mTORC2 activity.⁵¹ These findings lead to a new role of mLST8 in cancer treatment, especially human colon and prostate, where selective targeting could reduce side effects and improve efficacy. Moreover, when the level of mLST8 was assessed in hepatocellular carcinoma (HCC), researchers noted that the expression level of mLST8 was dramatically higher in HCC specimens than in adjacent non-tumor specimens. In that study, the overexpression of mLST8 was positively correlated with tumor size, differentiation, and vessel invasion.⁵² Structurally, human mLST8 consists of seven WD40 repeats with antiparallel β -blades formed by 40–60 residues and acts as a subunit of both mTOR1/2 complexes, interacting directly with mTOR proteins to stabilise its structure⁵³ and to enhance its kinase activity.^{54,55} With the elucidation of the first mTOR–mLST8 co-crystal in 2013,⁵⁶ followed by other structures of mLST8 solved through X-ray diffraction⁵⁷ and cryo-EM,^{57–60} it

was possible to observe that the mLST8 interface interacts with a segment (protein–loop–protein) at the C-lobe of mTOR, formed by about 40 residues (residues 2258 to 2296).⁶¹ Despite the relevance of mTOR–mLST8 interactions, to date, there has been only one computational study using the cavity of mLST8 containing the WD40 domain as the target against a set of compound analogues of BINOL (ZINC1634292) and SCF-12 (ZINC119674),^{62,63} suggesting three compounds as potential mLST8 inhibitors. Therefore, there is an urgent need for data on the interactions between mTOR and mLST8 to better comprehend their molecular relationship and improve the rational drug design focusing on these targets.

In this regard, the use of computational approaches to study protein–protein interactions (PPI) has grown in the past few decades. Among frequently used methods are those based on classical molecular dynamics, such as the analysis of dynamic perturbations,^{64–67} binding free energy methods (MM-PB(GB)SA),^{65,68} alanine-scanning,⁶⁹ pure Quantum Mechanics (QM)^{70–73} and hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods.^{65,72} When compared to classical molecular mechanical approaches, such as empirical force fields, QM and QM/MM methods produce better results due to their natural advantage of modelling polarization and charge transfer explicitly. Additionally, the performance of methods based on empirical parameterization is directly dependent of the force field employed or the tuning of key parameters.^{74,75} Therefore, QM methods are suitable tools for medicinal chemistry as they are able to speed up discoveries in all phases of *in silico* drug design,⁷⁶ providing highly accurate estimates of molecular geometries and properties, such as (relative) binding affinities^{77,78} and electronic states.^{79,80} In particular, for the analysis of large biological systems, the density functional theory (DFT) represents the best balance between accuracy – due to its ability to consider a very large number of electrons in the calculation of large molecules^{77,81,82} – and computational cost – as DFT describes the system by using the electronic density $\rho(r)$, which depends on three space coordinates only, while wave function methods depend on $3N$ space (plus spin) coordinates, instead. Thus, solving the Kohn–Sham equations is faster than wave function methods as the total energy of a multielectron system is expressed as a functional of electron charge density.^{83,84} Nevertheless, as full QM calculations of large biological systems – such as protein complexes, membrane patches, DNA, *etc.* – are still very costly, several linear scaling approaches have been proposed to make it computationally acceptable whilst preserving accuracy.^{77,85,86} Among them, fragment-based methods have been widely employed to obtain protein properties, including molecular fractionation with conjugate caps (MFCC), fragment molecular orbital (FMO) and generalized energy-based fragmentation (GEBF).^{87–89} In particular, the MFCC-based approach has been employed with great success in the calculation of interaction energy of protein–ligand and protein–protein complexes, overcoming the limitations imposed by large biological systems and making QM calculations more computationally acceptable while maintaining its high accuracy.^{70,72,90–92} In the MFCC

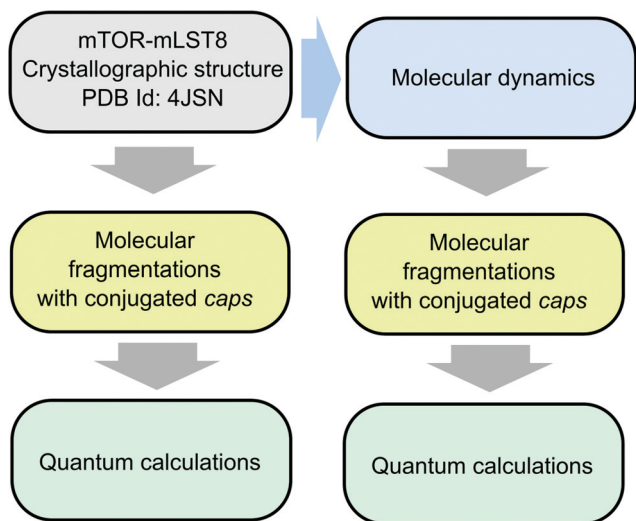


Fig. 1 Workflow of simulations.

method, the peptide bonds of the protein are fragmented, and the bonds are capped with portions of the neighbouring amino-acid residues of the molecule in order to resemble the local environment.^{77,88,93–95} Apart from making quantum calculations of large macromolecules and large complexes feasible, this method also brings the benefit of describing the individual energy contribution for each amino acid residue, resembling the powerful experimental essays of site direct mutagenesis.

In this work we acknowledge the need for a more comprehensive understanding of the molecular features controlling the interaction between mTOR and mLST8. In this regard, the identification of hot spots at the interface of proteins is the first step in the characterization of druggable sites and the development of new therapeutic strategies based on the disruption of protein–protein interactions under pathological conditions.

Therefore, to shed light on the atomic interactions responsible for the stability of the mTOR–mLST8 complex and help guiding the rational development of new therapeutic strategies to modulate mTOR activity in cancer tumours and other diseases, we have used quantum calculations, at the DFT level, to characterize the individual interaction energy between pairs of amino acid residues located at the interface of the mTOR–mLST8 complex. Calculations were performed using structural coordinates from the mTOR–mLST8 crystallographic structure (PDB id: 4JSN), which represents mTOR in its active state, and from molecular dynamics simulations, to account for protein flexibility.

Methods

As represented in Fig. 1, using the mTOR–mLST8 crystallographic structure (PDB id: 4JSN) as input, molecular dynamics (MD) trajectories of 100 ns were produced. Following it, the coordinates from both, the crystallographic structure and the MD simulation, underwent molecular fragmentation, using the MFCC scheme, in order to reduce the size of the input system during quantum calculations of individual amino acid

interaction energy. The details of methods employed in each step are described below.

Structural data

The calculations were performed using the X-ray co-crystal structures of human mTOR protein and mLST8 (PDB ID: 4JSN) with a resolution of 3.2 Å.⁵⁶ The crystal asymmetric unit cell contains two receptors (A and B) in an antiparallel orientation, both exhibiting slight shape differences. We arbitrarily chose receptor A to use in our study. The protein protonation at pH 7.2 was adopted as prescribed by the analysis performed through the PROPKA algorithm in the PDB2PQR web server.^{96–98} For the crystallographic data, prior to quantum calculations, all hydrogen atoms had their positions optimized classically using convergence tolerances set to 2.0×10^{-5} kcal mol⁻¹ (total energy variation), 0.001 kcal mol⁻¹ Å⁻¹ (maximum force per atom) and 1.0×10^{-5} Å (maximum atomic displacement).

Molecular dynamics

To account for protein flexibility, we employed molecular dynamics using GROMACS 2019⁹⁹ package with CHARMM36 forcefield.¹⁰⁰ The simulation was performed in duplicate and consisted of $\sim 365\,000$ atoms which included the mTOR–mLST8 system, 114 039 water molecules, 345 ions Na⁺ and 334 ions Cl⁻. Restraint was applied to the mTOR backbone (except for the loop making close contact with mLST8) while the whole mLST8 was free to move. Before the MD production step, the total energy minimization was accomplished by combining the steepest-descent algorithm and the conjugate gradient method in sequence. During MD simulations, the long-range electrostatics was modelled with the particle mesh Ewald (PME) method,¹⁰¹ temperature coupling was done with a Nose–Hoover thermostat at 310.15 K and a Parrinello–Rahman barostat¹⁰² with a reference pressure of 1 bar and a compressibility of 4.5×10^{-5} bar⁻¹ was applied for pressure control. The TIP3P water model was used to describe water molecules.¹⁰³ Covalent bonds were constrained to their equilibrium length by the LINCS algorithm.¹⁰⁴ The integration steps of all simulations were set to 2 fs. At the end, two trajectories of 100 ns were obtained and the distance root-mean-square deviation for the system was calculated to access the structural stability (Fig. 3B).

Molecular fractionation with conjugate caps (MFCC)

The MFCC scheme is a very useful method to achieve an accurate description of biological systems through quantum calculations^{88,94,95,105,106} with reduced computational cost. In this work, residues at the interface of mTOR were represented as $R(a)$ to indicate the i -th amino acid residue interacting with residues at the interface of mLST8, $R(b)$. As observed in Fig. 2, the pairs of caps $R(a-1)/R(a+1)$ and $R(b-1)/R(b+1)$ are made from the residues covalently bound to the amine (carboxyl) group of $R(a)$ and $R(b)$, respectively. During fragmentation, hydrogen atoms were added to passivate any dangling bonds.

In this situation, the interaction energy $E[R(a) - R(b)]$ is calculated as follows:

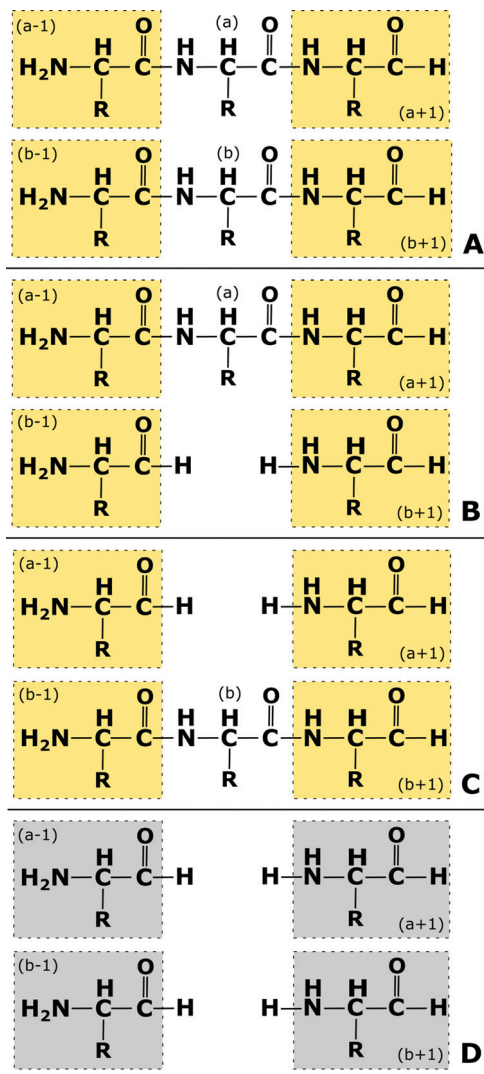


Fig. 2 MFCC scheme applied for protein–protein interactions.

$$\begin{aligned}
 E[R(a) - R(b)] &= E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)] \\
 &- E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)] - E[R(a-1)R(a+1) \\
 &+ R(b-1)R(b)R(b+1)] + E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)]
 \end{aligned}
 \quad (1)$$

At the right side of eqn (1), the first term $E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)]$ is the total energy of the system formed by $R(a)$, $R(b)$ and the capped residues; the second term, $E[R(a-1)R(a)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)]$, gives the total energy of $R(a)$ and its caps and the capped residues of $R(b)$ alone, while the third term, $E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b)R(b+1)]$ is the total energy of the capped residues of $R(a)$ alone with $R(a)$ and its caps; the last term, $E[R(a-1)R(a+1) + R(b-1)R(b+1)]$ is the total energy of the system formed by the isolated caps. At the end, eqn (1) results in the total interaction energy of the residue investigated at the interface of mTOR $R(a)$ and the residue $R(b)$, which is part of the interface of mLST8.

DFT calculation

The DFT calculations were carried out within the generalized gradient approximation (GGA) using the exchange–correlation functional Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE).¹⁰⁷ For the sake of accuracy, the dispersion corrected energy proposed by Tkatchenko and Scheffler¹⁰⁸ (GGA + TS) was employed in our calculations. While the PBE functional produces results close to those of the PW91 functional,¹⁰⁹ dispersion correction terms avoid the need to use high-level quantum methods to describe van der Waals interactions. DMOL3 code^{110,111} was used for calculations and a double numerical plus polarization (DNP) basis set was chosen to expand the Kohn–Sham orbitals. The orbital cut-off, which controls the quality of the numerical basis set and of the numerical integrations performed during the computations, was set to ensure a good balance between accuracy and computational time. The total energy variation to achieve self-consistent field (SCF) convergence was set to 10^{-6} Ha.

The total interaction energy and hot spot identification

To observe the relationship between the total interaction energy and the distance between interfaces, the individual interaction energy of every amino acid residue was summed up and plotted against its radial distance to the interface of the neighboring proteins. Hot spots which normally respond for large changes in this curve are plotted in a so-called BIRD panel. BIRD is an acronym for Binding site, Interaction energy and Residues Domain, and it shows: (i) the interaction energy (in kcal mol⁻¹) of each pair of interfacial residues using horizontal or vertical bars, from which one can assess visually the relevance and role of each residue, whether it attracts or repels the residue in the other face; and, (ii) the most important residues contributing to the stability of the complex in the column of residues at the left side.

Results and discussion

In this work, QM was employed to describe the PPI at the mTOR and mLST8 interfaces and highlight the hot spot residues in the mTOR–mLST8 complex. The PPI analysis among elements of mTOR complexes is a valuable strategy in drug design due to its potential for the identification of druggable sites and thus leading to the development of new therapeutic strategies to modulate this system under pathological conditions. To this task, we employed DFT calculations, as this approach has a natural advantage over classical approaches offering high quality results. Moreover, in the past decade the use of DFT calculations combined with the MFCC scheme to describe the electronic states of molecular systems^{86,95,112–114} has increased and this approach has been applied with success to analyse protein–ligand and protein–protein complexes^{70,89–92,115–117} in the same level as MM-PBSA.¹¹⁸

Our analysis employed mTOR–mLST8 coordinates obtained from the crystallographic structure (PDB id: 4JSN) and from MD simulations. A total of 43 residues belonging to mTOR and 71 residues belonging to mLST8 were considered in the analysis, resulting in 331 (440) pair-to-pair interaction energy calculated

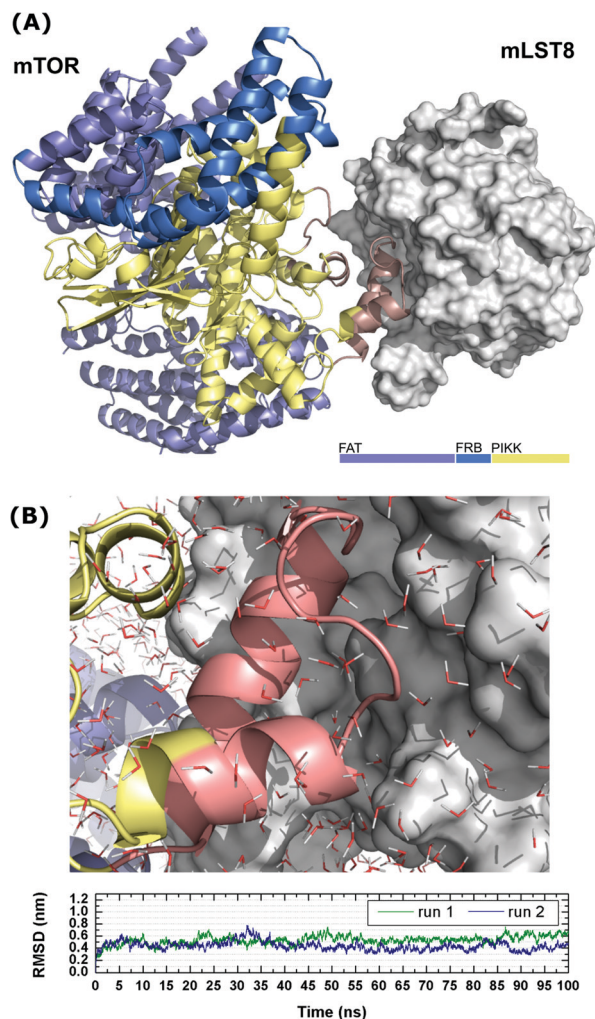


Fig. 3 Contact interface of mTOR–mLST8. (A) Crystallographic structure of the mTOR–mLST8 complex showing interface. (B) Snapshot of MD simulation showing the interfacial region and RMSD data. mTOR is represented as ribbon with catalytic domain colored yellow and interface region colored salmon while the mLST8 subunit is represented in space filling colored light gray.

for the crystallographic (MD) structure. For the completeness of the analysis, not only residues located at the interface, but all residues within 8 Å from the interface of both proteins were analysed. A schematic representation of the analysed region is shown in Fig. 3, where mTOR residues which took part in the calculations are coloured in salmon and a dashed line represents the mLST8 content analysed during calculations.

Seeking a detailed understanding of the residue–residue network supporting mTOR and mLST8 interactions, a list with all calculated interaction energies for individual residues from the crystallographic (MD) structures is shown in Table S1 (Table S3, ESI†). The convergence of the total interaction energy is shown in Fig. 4, which was obtained by summing up the interaction energy of all mTOR residues located within 8 Å of distance from the mLST8 crystallographic (MD simulated) structure. The calculated total interaction energy is -195.2 and -179.5 kcal mol⁻¹ for the crystallographic and MD structures,

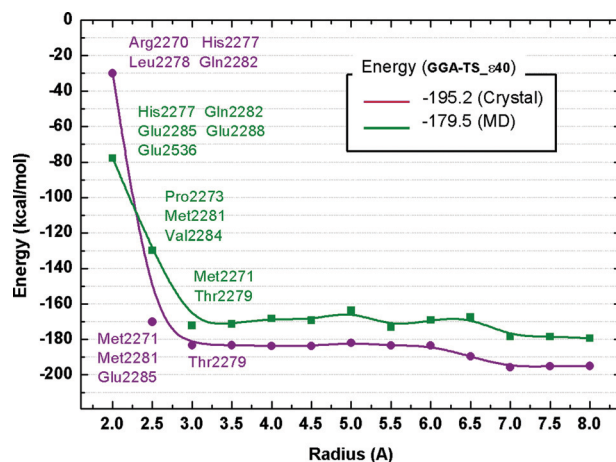


Fig. 4 Energy \times distance behavior of the mTOR–mLST8 total interaction energy as a function of the mLST8 residue distance. Energy calculated from the crystallographic structure is shown in violet while data from MD simulation structure is shown in green. Calculated energy is shown in kcal mol⁻¹ and the radius distance in angstroms; computations were performed within the DFT formalism using the GGA-TS functional.

respectively. As observed, the main residues contributing to mTOR–mLST8 interactions in the crystallographic structure are located within up to 3 Å, with residues Met2281 (-50.34 kcal mol⁻¹), Met2271 (-32.97 kcal mol⁻¹) and Glu2285 (-28.63 kcal mol⁻¹) being responsible for about 57% of the total calculated interaction energy with mLST8. Calculations with the MD structure pointed to the relevance of residues Met2281 (-25 kcal mol⁻¹), Glu2288 (-23 kcal mol⁻¹), Glu2285 (-18.8 kcal mol⁻¹), Met2271 (-18 kcal mol⁻¹) and His2277 (-15 kcal mol⁻¹), accounting for about 51% of the calculated total interaction energy.

As expected, residues with major interactions are located in the C-terminal lobe, which is known to form the binding site for mLST8.⁶¹ A throughout analysis shows the main pair-to-pair (mTOR–mLST8 residues) interactions occurring between Glu2285–Ser290, Glu2285–Trp272, Met2281–Tyr222 and

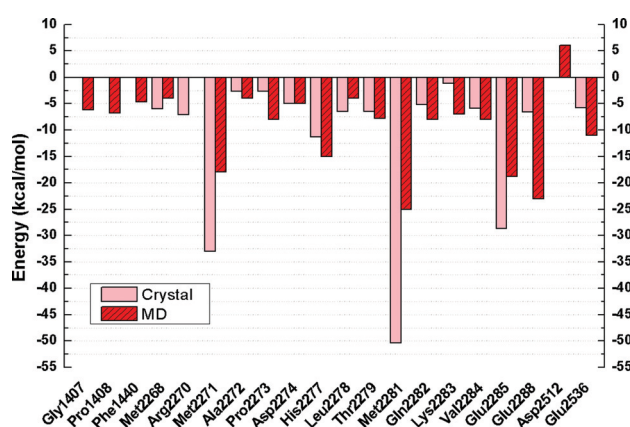


Fig. 5 Total interaction energy of each amino acid residues at the interface of mTOR protein. Only residues with interaction energy above (below) 4.0 (-4.0) kcal mol⁻¹ are shown. Calculated energies for the crystallographic structure (MD structure) are shown in salmon (red) bars.

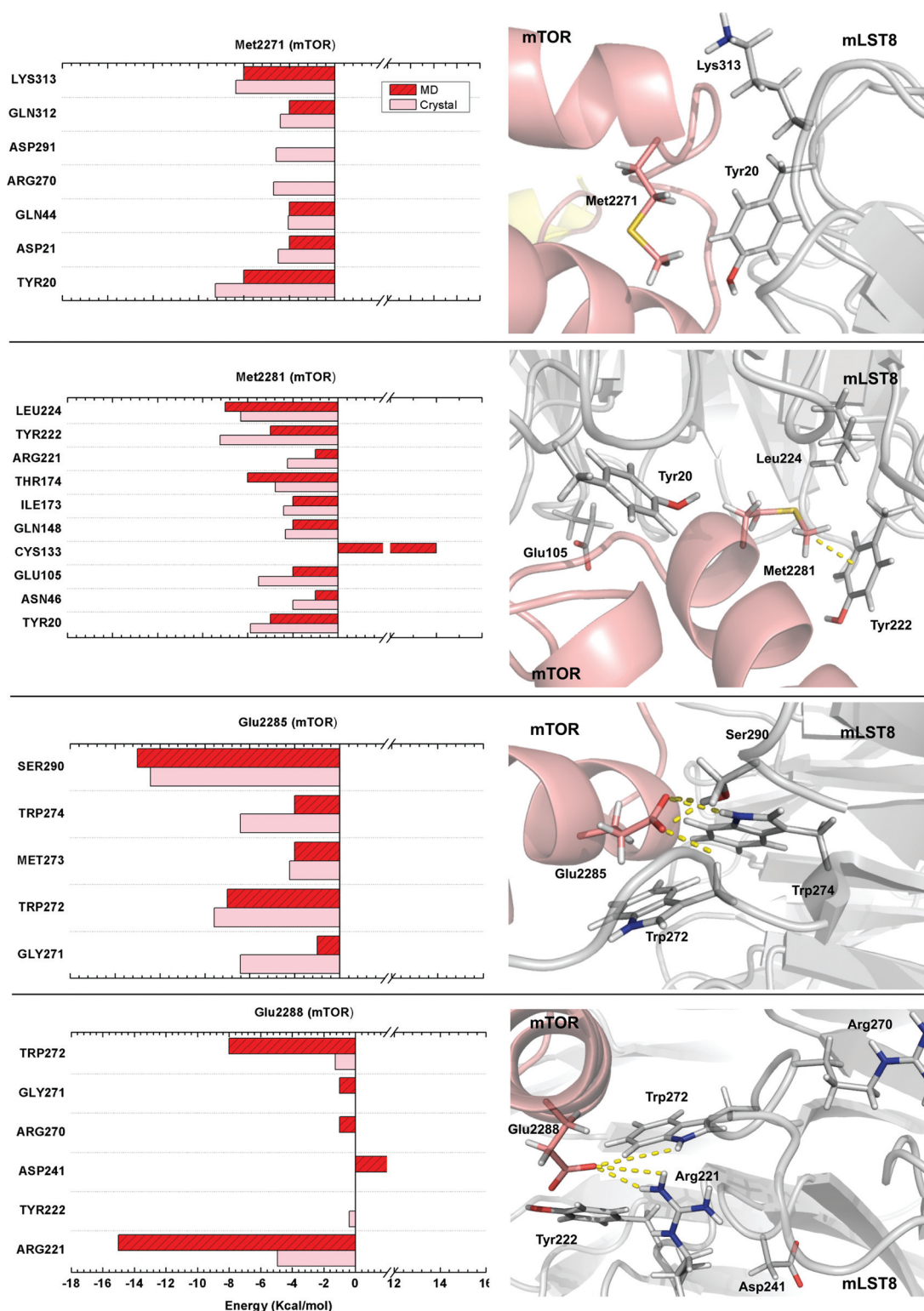


Fig. 6 BIRD panels (left) showing in detail the calculated interaction energy of Met2281 (mTOR), Met2271 (mTOR) and Glu2285 (mTOR) with mLST8 residues in the crystallographic (light grey) and MD (grey) structure. The detailed spatial organization of the main residues is shown in the right side of each BIRD panel, depicting the crystallographic structure with mTOR loops in salmon and mLST8 in grey.

Met2271–Lys313, with -8.41 , -5.59 , -5.23 and -4.36 kcal mol $^{-1}$, respectively. Note that after 100 ns of MD simulation the ranking of residue relevance remained almost the same, with

Glu2288 increasing its collaboration with attractive interaction and Asp2512 showing some repelling effects. In addition to quantum calculations, we have also employed the MM-PBSA

method through the `g_mmpbsa`¹¹⁹ code to estimate the binding contribution of individual residues. This task proved challenging with results varying hugely according to parameter settings adopted during simulations (for instance, calculations using the SASA model produced final positive binding free energies while using the SAV model resulted in negative values). Implications in the accuracy of MM-PBSA related to the choice of parameters¹¹⁹ or force field⁷⁴ have been reported by other authors. Results for mTOR and mLST8 calculations using the MM-PBSA method with the SAV model are shown in Fig. S1 and S2 (ESI[†]), respectively. MM-PBSA data were calculated from 100 snapshots representing the last 10 ns of a trajectory of 100 ns produced with `charmm27` or `amber99sb` force fields. Note that results from this method also suggest the relevance of mTOR residues Arg2270, Pro2273 and Gln2282, and mLST8 residues Arg221 and Pro265.

A graphical representation of the main interacting residues at the interface of mTOR in the crystallographic and MD structure with their total calculated interaction energy is shown in Fig. 5.

As observed in Fig. 6 (top panel), the main interactions of Met2271 are with Tyr20 (-5.25 kcal mol⁻¹) and Lys313 (-4.36 kcal mol⁻¹). Met2271 is located at about 2.5 Å and 3.5 Å away from the mLST8 residues Tyr20 and Lys313, respectively. The second panel highlights the attractive interactions of Met2281 with residues Tyr222 (about 3 Å far from the methyl group of Met2281) and Leu224 (about 3.8 Å away), among others. The pair Met2281–Tyr222 are strongly attracted (-5.23 kcal mol⁻¹) through a hydrophobic pi-alkyl interaction. Met2281–Leu224 interact attractively through -4.31 kcal mol⁻¹, followed by interactions with Tyr20 (-3.88 kcal mol⁻¹) and Glu105 (-3.52 kcal mol⁻¹) which are located more distant. mTOR residue Glu2285 (third panel) interacts mainly with mLST8 residues Ser290 (-8.41 kcal mol⁻¹), Trp272 (-5.59 kcal mol⁻¹) and Trp274 (-4.42 kcal mol⁻¹) through hydrogen bonds. Also, Glu2285 interacts attractively with the backbone of Gly271 with strength of -4.42 kcal mol⁻¹. The main interactions of mTOR residue Glu2288 are shown in the bottom panel which highlight interactions with Arg221 (4.94 kcal mol⁻¹) and Trp272 (-1.28 kcal mol⁻¹) through hydrogen bonds. Note that interactions between Glu2288–Arg221 and Glu2288–Trp272 improved during molecular dynamics, increasing up to -15.00 and -8.00 kcal mol⁻¹, respectively.

To seek a better understanding of the key interfacial interactions occurring in this biological system, the hot spot identification was also carried out at the interface of mLST8. As shown in Fig. 7, the analysis of 71 (95) mLST8 residues in the crystallographic (MD) structure highlighted the relevance of Tyr20, Tyr222, Trp272, Lys313 and Ser290 (41% of the total interaction energy). Interestingly, while in the crystallographic structure, Cys133 is located 8.5 Å away from the mTOR interface and shows a repulsive interaction of 0.3 kcal mol⁻¹, during MD simulation the side chain of Met2281 flipped around 180° (see Fig. S3, ESI[†]), getting closer to Cys133 and thus promoting a repulsive interaction of 14.0 kcal mol⁻¹, due to the electron negativity of sulphur atoms present in both side chains.

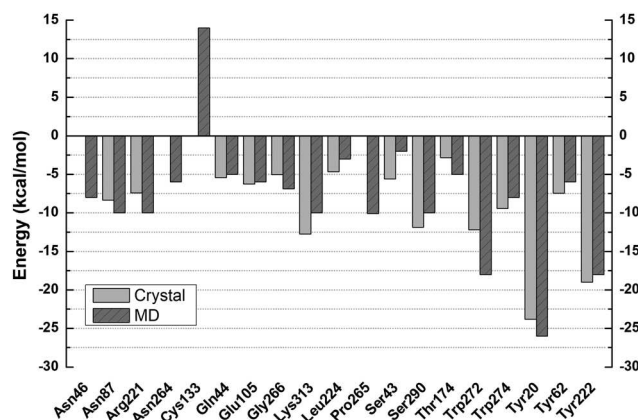


Fig. 7 Total interaction energy of each of the amino acid residues at the interface of the mLST8 protein. Only residues with interaction energy above (below) 4.0 (-4.0) kcal mol⁻¹ are shown. Calculated energies for the crystallographic structure (MD structure) are shown in light gray (gray) bars.

Residue Tyr20 interacts with 19 mTOR residues through a total interaction energy of -23.83 kcal mol⁻¹. The larger calculated individual interaction energy of Tyr20 is depicted in Fig. 8 (top panel), highlighting the interaction with Met2271 (-5.25 kcal mol⁻¹), Met2268 (-4.00 kcal mol⁻¹) and Met2281 (-3.88 kcal mol⁻¹). As previously observed (Fig. 6), both mTOR residues, Met2271 and Met2281, are located in the loop region and pointing to the inner of mLST8, with the Met2271 being closer to Tyr20. Interaction of Tyr20 with residue Met2268 (-4.0 kcal mol⁻¹) nearly accounts for the totality (-5.93 kcal mol⁻¹) of the interactions involving this residue (see Table S1, ESI[†]). The second most relevant attractive interaction is held by Tyr222 (mLST8) (Fig. 8, middle panel) which interacts with mTOR through -18.99 kcal mol⁻¹, this being residues Glu2536 (-6.52 kcal mol⁻¹), Met2281 (-5.23 kcal mol⁻¹), Cys2539 (-3.81 kcal mol⁻¹) and Val2284 (-2.40 kcal mol⁻¹), those with larger calculated interaction energies. Note that among these residues, the total calculated interaction energy of Glu2536 (-5.78 kcal mol⁻¹) remains underscored in face of the magnitude of Met2281 (-50.34 kcal mol⁻¹). Nevertheless, it gains relevance when interactions are taken pair-to-pair to approach the design of mLST8 inhibitors as the interaction energy between Tyr222–Glu2536 (-6.52 kcal mol⁻¹) is larger than between Tyr222–Met2281 (-5.23 kcal mol⁻¹), highlighting the relevance of a detailed study of hot spots at the interface of both proteins. Residue Trp272 (bottom panel) interacts with Glu2288 (-1.28 kcal mol⁻¹), Glu2285 (-5.59 kcal mol⁻¹) and Met2281 (-1.42 kcal mol⁻¹). In addition, we calculated the effect of G192D mutation in mLST8. Kim and collaborators (2003)⁵⁵ observed that the G192D mLST8 mutant completely lost the ability to bind (and thus inhibit) mTOR. Results from our calculations show that mLST8 residue Gly192 (located 8.5 Å from mTOR interface) has no significant effect on the binding of mLST8 at the mTOR interface. Nevertheless, when mutation G192D was introduced, it creates a repulsive effect (13.0 kcal mol⁻¹) through the interaction with mTOR residue Met2281. It is important to note that although these data clearly show the

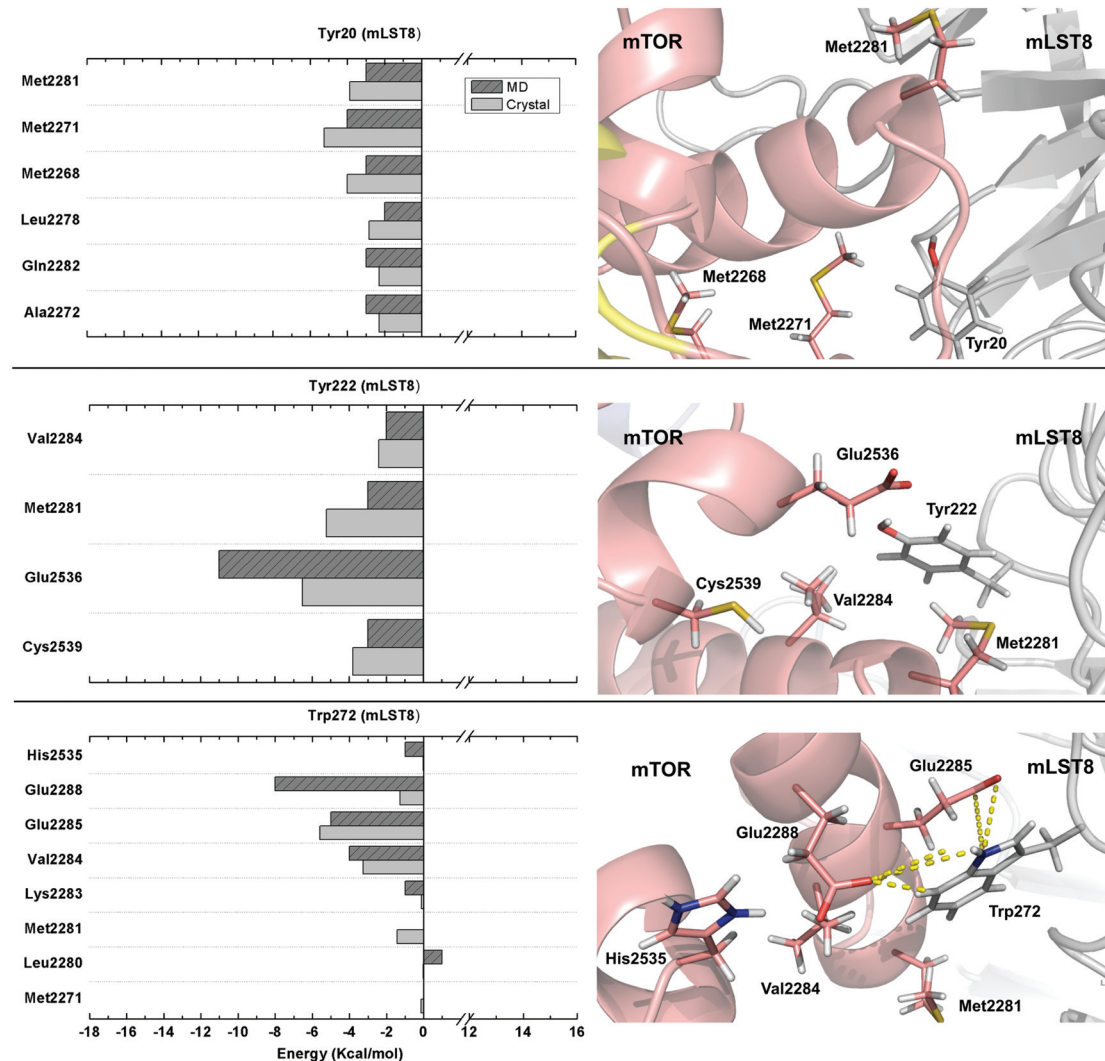


Fig. 8 BIRD panels (left) showing detailed interaction energy of mLST8 residues Tyr20 and Tyr222 with mTOR residues in the crystallographic (salmon) and MD (red) structure. Detailed spatial organization of main residues is shown in the right side of each BIRD panel, depicting the crystallographic structure with mTOR loop in salmon and mLST8 in grey.

repulsive effect of G192D mutation, this simulation performed side chain replacement prior to quantum calculations, without accounting for structural rearrangements caused by such mutation. To better address the effect of this mutation (and others) over the mTOR–mLST8 interaction network, long-term molecular dynamics simulations followed by the analysis of the interaction network would be more appropriate. For completeness, all calculated interaction energies between each mLST8 residue and mTOR protein, in the crystallographic (MD) structure, are available in Table S2 (S4) (ESI†).

Together, these results provide fresh and detailed information on the interaction between mTOR and mLST8 also offering a new approach to study molecular interactions among mTOR partner proteins through quantum methods. Considering the importance of mTOR regulation in many diseases,^{120,121} especially the effect of mTOR–mLST8 displacement in cancer cells,^{50,51} the authors hope that the identification of hot spots at the interface of these proteins will help the process of

rational design of small inhibitory molecules or small interfering peptides for this system.

Conclusions

In this work the interaction between mTOR and mLST8 was studied at the atomic level using quantum calculations at the DFT level. Our results show, for the first time in the literature, all interactions between the mTOR–mLST8 complex, reporting in detail the hot spots at the interface of both proteins. Analysis of the crystallographic structure showed that the main residues at the interface of mTOR are Met2281, Met2271 and Glu2285, while the main residues at the interface of mLST8 are Tyr20 and Tyr222, followed by Lys313, Trp272 and Ser290. No major differences were observed when energies were calculated after protein relaxation through molecular dynamics simulations, except for an increase in the attractive effect of Glu2288 (mTOR)

and in the repulsive effect of Cys133 (mLST8). PPI analysis is extremely useful during the rational design of small ligands and/or interfering peptides targeting protein interfaces. Therefore, the authors hope that the present work will help and stimulate medicinal chemists to develop and test new therapeutic strategies to fine tune the mTOR activity under pathological conditions through the interference with its partner proteins.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by grant 437373/2018-5 from the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq] (to GZ). FLS was supported by a UFC/PIBIC Fellowship (PIBIC 2018/2019 – Edital No. 2/2018). FFNA and FJFS fellowships were supported by CAPES. VNF received financial support from CNPq project 23038.007559-2011-8. EWSC received financial support from CNPq project 304781/2016-9. Molecular dynamics simulations by GZ were performed using resources from CENAPAD-UFC (Brazil) and CESUP-UFRGS (Brazil).

References

- C. T. Keith and S. L. Schreiber, *Science*, 1995, **270**, 50.
- B. L. Sibanda, D. Y. Chirgadze and T. L. Blundell, *Nature*, 2010, **463**, 118–121.
- D. H. Kim, D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini, *Cell*, 2002, **110**, 163–175.
- M. Laplante and D. M. Sabatini, *J. Cell Sci.*, 2009, **122**, 3589–3594.
- J. Kim and K.-L. Guan, *Nat. Cell Biol.*, 2019, **21**, 63–71.
- E. Y. Kim, N. Schrader, B. Smolinsky, C. Bedet, C. Vannier, G. Schwarz and H. Schindelin, *EMBO J.*, 2006, **25**, 1385–1395.
- Y. Sancak, C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini, *Mol. Cell*, 2007, **25**, 903–915.
- L. Wang, T. E. Harris, R. A. Roth and J. C. Lawrence, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 20036–20044.
- E. Vander Haar, S. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D.-H. Kim, *Nat. Cell Biol.*, 2007, **9**, 316–323.
- T. R. Peterson, M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray and D. M. Sabatini, *Cell*, 2009, **137**, 873–886.
- E. Jacinto, R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall, *Nat. Cell Biol.*, 2004, **6**, 1122–1128.
- D. S. Dos, S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini, *Curr. Biol.*, 2004, **14**, 1296–1302.
- M. A. Frias, C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini, *Curr. Biol.*, 2006, **16**, 1865–1870.
- E. Jacinto, V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su, *Cell*, 2006, **127**, 125–137.
- Q. Yang, K. Inoki, T. Ikenoue and K. L. Guan, *Genes Dev.*, 2006, **20**, 2820–2832.
- L. R. Pearce, X. Huang, J. Boudeau, R. Pawłowski, S. Wullschleger, M. Deak, A. F. M. Ibrahim, R. Gourlay, M. A. Magnuson and D. R. Alessi, *Biochem. J.*, 2007, **405**, 513–522.
- R. J. O. Dowling, I. Topisirovic, B. D. Fonseca and N. Sonenberg, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 2010, **1804**, 433–439.
- D. A. Guertin and D. M. Sabatini, *Cancer Cell*, 2007, **12**, 9–22.
- C. O. Malley and G. P. Pidgeon, *BBA Clin.*, 2016, **5**, 29–40.
- P. Curatolo and R. Moavero, *Curr. Neuropharmacol.*, 2012, **10**, 404–415.
- A. Sato, S. Kasai, T. Kobayashi, Y. Takamatsu, O. Hino, K. Ikeda and M. Mizuguchi, *Nat. Commun.*, 2012, **3**, 1292.
- M. Laplante and D. M. Sabatini, *Cell*, 2012, **149**, 274–293.
- M. Costa-Mattioli and L. M. Monteggia, *Nat. Neurosci.*, 2013, **16**, 1537–1543.
- J. Xie, X. Wang and C. G. Proud, *F1000Research*, 2016, **5**, F1000 Faculty Rev-2078.
- J. He, M.-Y. Wang, L.-X. Qiu, M.-L. Zhu, T.-Y. Shi, X.-Y. Zhou, M.-H. Sun, Y.-J. Yang, J.-C. Wang, L. Jin, Y.-N. Wang, J. Li, H.-P. Yu and Q.-Y. Wei, *Mol. Carcinog.*, 2013, **52**, 70–79.
- M. L. Slattery, J. S. Herrick, A. Lundgreen, F. A. Fitzpatrick, K. Curtin and R. K. Wolff, *Carcinogenesis*, 2010, **31**, 1604–1611.
- M. Chen, A. Cassidy, J. Gu, G. L. Delclos, F. Zhen, H. Yang, M. A. T. Hildebrandt, J. Lin, Y. Ye, R. M. Chamberlain, C. P. Dinney and X. Wu, *Carcinogenesis*, 2009, **30**, 2047–2052.
- B. C. Grabiner, V. Nardi, K. Birsoy, R. Possemato, K. Shen, S. Sinha, A. Jordan, A. H. Beck and D. M. Sabatini, *Cancer Discovery*, 2014, **4**, 554–563.
- N. Wagle, B. C. Grabiner, E. M. Van Allen, A. Amin-Mansour, A. Taylor-Weiner, M. Rosenberg, N. Gray, J. A. Barletta, Y. Guo, S. J. Swanson, D. T. Ruan, G. J. Hanna, R. I. Haddad, G. Getz, D. J. Kwiatkowski, S. L. Carter, D. M. Sabatini, P. A. Jänne, L. A. Garraway and J. H. Lorch, *N. Engl. J. Med.*, 2014, **371**, 1426–1433.
- J. Zining, X. Lu, H. Caiyun and Y. Yuan, *Oncotarget*, 2016, **7**, 57464–57480.
- S. Faes, N. Demartines and O. Dormond, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2017, **2017**, 1726078.
- V. P. Houde, S. Brûlé, W. T. Festuccia, P. G. Blanchard, K. Bellmann, Y. Deshaies and A. Marette, *Diabetes*, 2010, **59**, 1338–1348.
- V. Houde, S. Brûlé, W. T. Festuccia, P.-G. Blanchard, K. Bellmann, Y. Deshaies and A. Marette, *Diabetes*, 2010, **59**(6), 1338–1348.

- 34 D. W. Lamming, L. Ye, P. Katajisto, M. D. Goncalves, M. Saitoh, D. M. Stevens, J. G. Davis, A. B. Salmon, A. Richardson, R. S. Ahima, D. A. Guertin, D. M. Sabatini and J. A. Baur, *Science*, 2012, **335**, 1638–1643.
- 35 W. T. Festuccia, P.-G. Blanchard, T. Belchior, P. Chimin, V. A. Paschoal, J. Magdalon, S. M. Hirabara, D. Simões, P. St-Pierre, A. Carpinelli, A. Marette and Y. Deshaies, *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.*, 2014, **306**, E1046–E1054.
- 36 A. H. Kirsch, V. Riegelbauer, A. Tagwerker, M. Rudnicki, A. R. Rosenkranz and K. Eller, *Am. J. Physiol.: Renal, Fluid Electrolyte Physiol.*, 2012, **303**, F569–F575.
- 37 B. Kaplan, Y. Qazi and J. R. Wellen, *Transplant. Rev.*, 2014, **28**, 126–133.
- 38 F. Diekmann, A. Andrés and F. Oppenheimer, *Transplant. Rev.*, 2012, **26**, 27–29.
- 39 A. P. Pilotte, M. B. Hohos, K. M. O. Polson, T. M. Huftalen and N. Treister, *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 2011, **15**(5), 83–89, DOI: 10.1188/11.CJON.E83-E89.
- 40 J. Divers and J. O'Shaughnessy, *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 2015, **19**, 468–474.
- 41 S. Sofroniadou, T. Kassimatis and D. Goldsmith, *Nephrol., Dial., Transplant.*, 2010, **25**, 1667–1675.
- 42 M. Mangray and J. P. Vella, *Am. J. Kidney Dis.*, 2011, **57**, 331–341.
- 43 B. Thomas, D. J. Taber and T. R. Srinivas, *Curr. Hypertens. Rep.*, 2013, **15**, 458–469.
- 44 M. Braun, J. Young, C. S. Reiner, D. Poster, F. Krauer, A. D. Kistler, P. Kristanto, X. Wang, Y. Liu, J. Loffing, G. Andreisek, A. von Eckardstein, O. Senn, R. P. Wüthrich and A. L. Serra, *PLoS One*, 2012, **7**(10), e45868, DOI: 10.1371/journal.pone.0045868.
- 45 B. Nashan and F. Citterio, *Transplant. J.*, 2012, **94**, 547–561.
- 46 B. Kahan, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2011, **10**, 727–749.
- 47 C. J. E. Watson and J. A. Bradley, *Transplant. Rev.*, 2006, **20**, 104–114.
- 48 R. A. Saxton and D. M. Sabatini, *Cell*, 2017, **168**, 960–976.
- 49 F. Conciatori, L. Ciuffreda, C. Bazzichetto, I. Falcone, S. Pilotto, E. Bria, F. Cognetti and M. Milella, *Cancers*, 2018, **10**.
- 50 K. Kakumoto, J. I. Ikeda, M. Okada, E. Morii and C. Oneyama, *PLoS One*, 2015, **10**(4), e0119015, DOI: 10.1371/journal.pone.0119015.
- 51 Y. Hwang, L. C. Kim, W. Song, D. N. Edwards, R. S. Cook and J. Chen, *Cancer Res.*, 2019, **79**(13), 3178–3184.
- 52 X.-N. Yu, G.-C. Zhang, J.-L. Sun, H.-R. Zhu, X. Shi, G.-Q. Song, S.-Q. Weng, L. Dong, T.-T. Liu, X.-Z. Shen, H.-Y. Guo and J.-M. Zhu, *Ann. Surg. Oncol.*, 2020, **27**, 1546–1557.
- 53 D. A. Guertin, D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald and D. M. Sabatini, *Dev. Cell*, 2006, **11**, 859–871.
- 54 E. J. Chen and C. A. Kaiser, *J. Cell Biol.*, 2003, **161**(2), 333–347, DOI: 10.1083/jcb.200210141.
- 55 D. H. Kim, D. D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. P. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini, *Mol. Cell*, 2003, **11**, 895–904.
- 56 E. Y. T. Chien, W. Liu, Q. Zhao, V. Katritch, G. Won Han, M. A. Hanson, L. Shi, A. H. Newman, J. A. Javitch, V. Cherezov and R. C. Stevens, *Science*, 2010, **330**, 1091–1095.
- 57 H. Yang, X. Jiang, B. Li, H. J. Yang, M. Miller, A. Yang, A. Dhar and N. P. Pavletich, *Nature*, 2017, **552**, 368.
- 58 H. Yang, J. Wang, M. Liu, X. Chen, M. Huang, D. Tan, M.-Q. Dong, C. C. L. Wong, J. Wang, Y. Xu and H.-W. Wang, *Protein Cell*, 2016, **7**, 878–887.
- 59 X. Chen, M. Liu, Y. Tian, J. Li, Y. Qi, D. Zhao, Z. Wu, M. Huang, C. C. L. Wong, H.-W. Wang, J. Wang, H. Yang and Y. Xu, *Cell Res.*, 2018, **28**, 518–528.
- 60 C. H. S. Aylett, E. Sauer, S. Imseng, D. Boehringer, M. N. Hall, N. Ban and T. Maier, *Science*, 2015, **351**, 48–52.
- 61 H. Yang, D. G. Rudge, J. D. Koos, B. Vaidialingam, H. J. Yang and N. P. Pavletich, *Nature*, 2013, **497**, 217–223.
- 62 J. J. Irwin and B. K. Shoichet, *J. Chem. Inf. Model.*, 2005, **45**, 177–182.
- 63 T. D. Sapam, A. Velmurugan Ilavarasi, B. K. Palaka, E. Elumalai, N. D. Kanika and D. R. Ampasala, *J. Recept. Signal Transduction Res.*, 2018, **38**(1), 1–11, DOI: 10.1080/10799893.2017.1387920.
- 64 C. Sanchez-Martin, E. Moroni, M. Ferraro, C. Laquatra, G. Cannino, I. Masgras, A. Negro, P. Quadrelli, A. Rasola and G. Colombo, *Cell Rep.*, 2020, **31**(3), 107531, DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107531.
- 65 S. A. Serapian and M. W. Van Der Kamp, *ACS Catal.*, 2019, **9**(3), 2381–2394, DOI: 10.1021/acscatal.8b04846.
- 66 M. Montefiori, S. Pilotto, C. Marabelli, E. Moroni, M. Ferraro, S. A. Serapian, A. Mattevi and G. Colombo, *J. Chem. Inf. Model.*, 2019, **59**(9), 3927–3937, DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00588.
- 67 A. Paladino, M. R. Woodford, S. J. Backe, R. A. Sager, P. Kancherla, M. A. Daneshvar, V. Z. Chen, D. Bourboulia, E. F. Ahanin, C. Prodromou, G. Bergamaschi, A. Strada, M. Cretich, A. Gori, M. Veronesi, T. Bandiera, R. Vanna, G. Bratslavsky, S. A. Serapian, M. Mollapour and G. Colombo, *Chem. – Eur. J.*, 2020, **26**, 9459, DOI: 10.1002/chem.202000615.
- 68 W. R. Martin, F. C. Lightstone and F. Cheng, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**(5), 1550, DOI: 10.3390/ijms21051550.
- 69 R. Tambi, G. Morimoto, S. Kosuda, M. Taiji and Y. Kuroda, *Sci. Rep.*, 2019, **9**(1), 2530, DOI: 10.1038/s41598-018-38401-w.
- 70 J. X. Lima Neto, V. P. Soares-Rachetti, E. L. Albuquerque, V. Manzoni and U. L. Fulco, *New J. Chem.*, 2018, **42**, 2401–2412.
- 71 C. R. F. Rodrigues, J. I. N. Oliveira, U. L. Fulco, E. L. Albuquerque, R. M. Moura, E. W. S. Caetano and V. N. Freire, *Chem. Phys. Lett.*, 2013, **559**, 88–93.
- 72 G. Zanatta, G. Nunes, E. M. Bezerra, R. F. da Costa, A. Martins, E. W. S. Caetano, V. N. Freire and C. Gottfried, *ACS Chem. Neurosci.*, 2014, **5**, 1041–1054.
- 73 C. Solis-Calero, G. Zanatta, C. D. Ó. Pessoa, H. F. Carvalho and V. N. Freire, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 22818–22830.
- 74 J. Ren, X. Yuan, J. Li, S. Lin, B. Yang, C. Chen, J. Zhao, W. Zheng, H. Liao, Z. Yang and Z. Qu, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2020, **67**, 46–53, DOI: 10.1002/jccs.201900148.

- 75 B. Villavicencio, R. Ligabue-Braun and H. Verli, *J. Chem. Inf. Model.*, 2018, **58**(9), 2015–2023, DOI: 10.1021/acs.jcim.8b00404.
- 76 M. B. Raha Peters, B. Wang, N. Yu, A. M. Wollacott, L. M. Westerhoff and K. M. Merz, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 725–731.
- 77 X. He and J. Z. H. Zhang, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 31103.
- 78 T. Zhou, D. Huang and A. Caflisch, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2010, **10**, 33–45.
- 79 L. Riccardi, V. Genna and M. De Vivo, *Nat. Rev. Chem.*, 2018, **2**, 100–112, DOI: 10.1038/s41570-018-0018-6.
- 80 G. Zanatta, M. B. Da Silva, J. J. A. Da Silva, R. C. R. Dos Santos, F. A. M. Sales, C. Gottfried, E. W. S. Caetano and V. N. Freire, *New J. Chem.*, 2018, **42**, 13629–13640, DOI: 10.1039/c8nj01548a.
- 81 J. Antony and S. Grimme, *J. Comput. Chem.*, 2012, **33**, 1730–1739.
- 82 K. Burke, *J. Chem. Phys.*, 2012, **136**, 150901.
- 83 P. Hohenberg and W. Kohn, *Phys. Rev.*, 1964, **136**, B864.
- 84 W. Kohn and L. J. Sham, *Phys. Rev.*, 1965, **140**, A1133.
- 85 X. He, T. Zhu, X. Wang, J. Liu and J. Z. H. Zhang, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2748–2757.
- 86 K. M. Merz, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2804–2811.
- 87 M. A. Collins and R. P. A. Bettens, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 5607–5642.
- 88 M. S. Gordon, D. G. Fedorov, S. R. Pruitt and L. V. Slipchenko, *Chem. Rev.*, 2011, **112**, 632–672.
- 89 P. Söderhjelm, F. Aquilante and U. Ryde, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 11085–11094.
- 90 G. Zanatta, I. L. Barroso-Neto, V. Bambini-Junior, M. F. Dutra, E. M. Bezerra, R. F. da Costa, E. W. S. Caetano, B. S. Cavada, V. N. Freire and C. Gottfried, *J. Proteomics Bioinf.*, 2012, **5**, 155–162.
- 91 G. Zanatta, G. Della Flora Nunes, E. M. Bezerra, R. F. Da Costa, A. Martins, E. W. S. Caetano, V. N. Freire and C. Gottfried, *ACS Chem. Neurosci.*, 2016, **7**, 1331–1347.
- 92 J. X. Lima Neto, K. S. Bezerra, E. D. Barbosa, J. I. N. Oliveira, V. Manzoni, V. P. Soares-Rachetti, E. L. Albuquerque and U. L. Fulco, *J. Chem. Inf. Model.*, 2020, **60**, 1005–1018.
- 93 D. W. Zhang and J. Z. H. Zhang, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 3599–3605.
- 94 X. Chen, Y. Zhang and J. Z. H. Zhang, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 184105.
- 95 A. M. Gao, D. W. Zhang, J. Z. H. Zhang and Y. Zhang, *Chem. Phys. Lett.*, 2004, **394**, 293–297.
- 96 T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon and N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**(2), W665–W667, DOI: 10.1093/nar/gkh381.
- 97 T. J. Dolinsky, P. Czodrowski, H. Li, J. E. Nielsen, J. H. Jensen, G. Klebe and N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**(2), W522–W525, DOI: 10.1093/nar/gkm276.
- 98 T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, A. A. McCammon and N. A. Baker, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, W665–W667.
- 99 M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess and E. Lindahl, *SoftwareX*, 2015, **1**, 19–25, DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- 100 J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B. L. de Groot, H. Grubmüller and A. D. MacKerell Jr, *Nat. Methods*, 2016, **14**, 71.
- 101 U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee and L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 1995, **103**, 8577–8593.
- 102 M. Parrinello and A. Rahman, *J. Appl. Phys.*, 1981, **52**, 7182–7190.
- 103 W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein, *J. Chem. Phys.*, 1983, **79**, 926–935.
- 104 B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen and J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.*, 1997, **18**, 1463–1472.
- 105 X. He and J. Z. H. Zhang, *J. Chem. Phys.*, 2005, **122**, 31103–31104.
- 106 D. W. Zhang and J. Z. H. Zhang, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 3599–3605.
- 107 J. P. Perdew, K. Burke and M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, **77**, 3865–3868.
- 108 A. Tkatchenko and M. Scheffler, *Phys. Rev. Lett.*, 2009, **102**, 73005.
- 109 J. P. Perdew and Y. Wang, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1992, **45**, 13244–13249.
- 110 B. Delley, *J. Chem. Phys.*, 2000, **113**, 7756–7764.
- 111 B. Delley, *J. Chem. Phys.*, 1990, **92**, 508–517.
- 112 I. Bâldea, *Electrochem. Commun.*, 2013, **36**, 19–21.
- 113 R. D. Tosso, S. A. Andujar, L. Gutierrez, E. Angelina, R. Rodriguez, M. Nogueras, H. Baldoni, F. D. Suvire, J. Cobo and R. D. Enriz, *J. Chem. Inf. Model.*, 2013, **53**(8), 2018–2032.
- 114 G. Zanatta, C. Gottfried, A. M. Silva, E. W. S. Caetano, F. A. M. Sales and V. N. Freire, *J. Chem. Phys.*, 2014, **140**, 124511.
- 115 A. C. V. Martins, P. De-Lima-Neto, E. W. S. Caetano and V. N. Freire, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 6167–6179.
- 116 I. L. Barroso-Neto, J. P. C. Marques, R. F. da Costa, E. W. S. Caetano, B. S. Cavada, C. Gottfried and V. N. Freire, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 3270–3279.
- 117 G. Zanatta, G. Nunes, E. M. Bezerra, R. F. Da Costa, A. Martins, E. W. S. Caetano, V. N. Freire and C. Gottfried, *ACS Chem. Neurosci.*, 2014, **5**, 1041–1054.
- 118 E. L. Wu, Y. Mei, K. L. Han and J. Z. H. Zhang, *Biophys. J.*, 2007, **92**(12), 4244–4253.
- 119 R. Kumari, R. Kumar and A. Lynn, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, **54**(7), 1951–1962.
- 120 D. A. Guertin, D. A. Guertin, D. M. Sabatini and D. M. Sabatini, *Trends Mol. Med.*, 2005, **11**, 353–361.
- 121 D. M. Sabatini, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 729–734.



Binding site hotspot map of PI3K α and mTOR in the presence of selective and dual ATP-competitive inhibitors

Francisca Fernanda Nunes Azevedo, Francisca Joseli Freitas de Sousa, Francisco Lucas Santos de Oliveira, Jaqueline Vieira Carletti & Geancarlo Zanatta

To cite this article: Francisca Fernanda Nunes Azevedo, Francisca Joseli Freitas de Sousa, Francisco Lucas Santos de Oliveira, Jaqueline Vieira Carletti & Geancarlo Zanatta (2021): Binding site hotspot map of PI3K α and mTOR in the presence of selective and dual ATP-competitive inhibitors, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI: [10.1080/07391102.2021.2016487](https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2016487)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2016487>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 16 Dec 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Binding site hotspot map of PI3K α and mTOR in the presence of selective and dual ATP-competitive inhibitors

Francisca Fernanda Nunes Azevedo^a, Francisca Joseli Freitas de Sousa^a, Francisco Lucas Santos de Oliveira^b, Jaqueline Vieira Carletti^c and Geancarlo Zanatta^{a,b} 

^aPostgraduate Programme in Biochemistry, Department of Biochemistry at Federal, University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil; ^bDepartment of Physics at Federal, University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil; ^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway plays a pivotal role in cellular metabolism, growth and survival. PI3K α hyperactivation impairs downstream signaling, including mTOR regulation, and are linked to poor prognosis and refractory cancer treatment. To support multi-target drug discovery, we took advantage from existing PI3K α and mTOR crystallographic structures to map similarities and differences in their ATP-binding pockets in the presence of selective or dual inhibitors. Molecular dynamics and MM/PBSA calculations were employed to study the binding profile and identify the relative contribution of binding site residues. Our analysis showed that while varying parameters of solute and solvent dielectric constant interfered in the absolute binding free energy, it had no effect in the relative per residue contribution. In all complexes, the most important interactions were observed within 3–3.5 Å from inhibitors, responding for ~75–100% of the total calculated interaction energy. While closest residues are essential for the strength of the binding of all ligands, more distant residues seem to have a larger impact on the binding of the dual inhibitor, as observed for PI3K α residues Phe934, Lys802 and Asp805 and, mTOR residues Leu2192, Phe2358, Leu2354, Lys2187 and Tyr2225. A detailed description of individual residue contribution in the presence of selective or dual inhibitors is provided as an effort to improve the understanding of molecular mechanisms controlling multi-target inhibition. This work provides key information to support further studies seeking the rational design of potent PI3K/mTOR dual inhibitors for cancer treatment.

ARTICLE HISTORY

Received 13 August 2021
Accepted 4 December 2021



KEYWORDS


PI3K α ; mTOR; cancer; multi-target inhibitor; dual-inhibitor; MM/PBSA

1. Introduction

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinases (PI3Ks) and the mechanistic target of rapamycin (mTOR) have a pivotal role in the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway (Figure 1), tuning major metabolic processes, including proliferation, survival and growth. Imbalances in this pathway lead to a plethora of disorders (Costa-Mattioli & Monteggia, 2013; Curatolo & Moavero, 2012; Durandy & Kracker, 2020; Huang et al., 2018; Laplante & Sabatini, 2012; Malley & Pidgeon, 2016; Sato et al., 2012) and is observed in many types of malignancies. Indeed, PI3K pathway is activated in almost 50% of cancers (Yap et al., 2015) and is linked with metastasis and multidrug resistance (MDR) (Deng et al., 2017; García et al., 2009; Liu et al., 2020). In addition, recent reports have linked hyperactivation in this pathway with resistance to immune checkpoint inhibitor treatment, suggesting the need for a synergistic combination of multi-target PI3K and mTOR inhibitors with immunotherapy approach (Collins et al., 2017; Jiang et al., 2011).

PI3K belongs to the family of lipid and serine/threonine kinases, which phosphorylate 3' OH group of Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to generate Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃). PI3Ks class IA comprises isoforms PI3K α , PI3K β and PI3K δ which are heterodimers formed by a catalytic subunit (p110 α , p110 β or p110 δ) coupled to a p85 regulatory subunits (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α). Among them, p13K α is frequently mutated or amplified in the most common cancers (Samuels et al., 2004; Triscott & Rubin, 2018). In addition, selective suppression of PI3K α is also related to increase lifespan in model organisms (Foukas et al., 2013), without major risks of toxicity (Hedges et al., 2020, 2021). After activation, PI3Ks recruits Akt serine threonine kinases at the plasma membrane where it becomes activated (phosphorylated at two sites) and regulates (directly or indirectly) downstream proteins, including TSC1/2, FOXO and mTOR complex 1. mTOR is a serine/threonine protein kinase which associate with distinct partner proteins to forms the mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2) (Saxton & Sabatini, 2017). mTOR regulate, directly or indirectly, the activity of at least 800 proteins and has a central role in human physiology, coordinating cellular metabolism,

CONTACT Geancarlo Zanatta  geancarlo.zanatta@gmail.com  Postgraduate Programme in Biochemistry, Department of Biochemistry at Federal, University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2016487>.

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

growth and survival in response to hormones, growth factors, nutrients, memory CD8 T-cells differentiation, energy and stress signals (Araki et al., 2009; Kim et al., 2002; Laplante & Sabatini, 2009; Sibanda et al., 2010). Imbalances in mTOR activation are associated with important disorders and often negatively correlated with cancer remission (Xu et al., 2018). Following the positive impact using rapamycin analogues to inhibit mTORC1, a second generation of inhibitory compounds, targeting the mTOR ATP-binding site, made it possible to inhibit both mTOR complexes and achieve more effective levels of treatment (Feng et al., 2018; Hu et al., 2018; Zhang et al., 2015; Zhu et al., 2016).

Despite pharmacological efforts to disrupt the downstream cell survival signaling through single-target therapy using PI3K or mTOR inhibitors, the complex biochemical network regulation in cancer pathology has made such task extremely challenging (Hillmann & Fabbro, 2019; Shukuya et al., 2019). The use of pan-class I PI3K inhibitors have elicited high toxicity, and compounds selectively targeting PI3K isoforms have also failed due to the demand for high dosage during treatment (Cheson et al., 2019; Patsouris et al., 2019). In addition, the inhibition of PI3K/AKT is not enough to completely inactivate the mTOR downstream pathway as mTORC1 can be independently activate by the signalling pathways TSC1/TSC2/Rheb, LKB1/AMPK and Rag GTPases (Chi, 2012; Dowling et al., 2010). In this scenario, similarities between the ATP-binding site of PI3Ks and mTOR (shared homology ~32%) represents a unique opportunity to explore multi-target pharmacological approaches and some studies have focused on the multikinase inhibitory therapy to tackle prostate cancer (Huang et al., 2020; Luszcak et al., 2020), lung cancer (Wu et al., 2019), lymphoma (Bresin et al., 2020; Tarantelli et al., 2014, 2020), gastric cancer (Chen et al., 2018), ovarian cancer (Hu et al., 2020), breast cancer (Kennedy et al., 2020), neuroblastoma (Mohlin et al., 2019; O'Neil et al., 2014), haematological cancer (Reidy et al., 2014) and rare genetic diseases (Hillmann & Fabbro, 2019), among other malignancies.

In this work, to shed light in the binding mechanism controlling dual-PI3K/mTOR inhibition and investigate the role of binding-site residues interacting with selective or dual inhibitors, we took advantage of crystallographic coordinates of PI103 in complex with PI3K α (PDB ID: 4L23) (Zhao et al., 2014) or mTOR (PDB ID: 4JT6) (Yang et al., 2013), alpelisib complexed with PI3K α (PDB ID: 4JPS) (Furet et al., 2013) and torin-2 complexed with mTOR (PDB ID: 4JSX) (Yang et al., 2013). Alpelisib is a high selective PI3K α inhibitor approved for the treatment of metastatic breast cancer in 2019 (Narayan et al., 2021), torin-2 is a potent mTOR selective inhibitor (Wang et al., 2015) and PI103 is a potent dual-inhibitor targeting class I PI3Ks and mTOR proteins (Park et al., 2008). Molecular dynamics simulations were employed for structural relaxation and sampling while the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area (MM/PBSA) approach was employed to calculate the individual amino acid binding interactions, providing a description of the dependence of the total binding energy with the binding site radius. Our results characterize, under an energy-based point of view, key residues responding for the selective

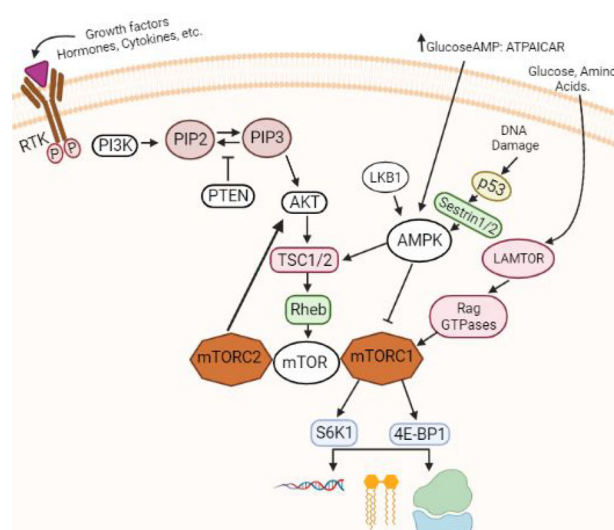


Figure 1. Schematic representation of PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. mTOR is present in two distinct complexes, mTORC1 and mTORC2, which are also subject to activation by alternative pathways.

inhibition of PI3K α and mTOR and highlight those participating in the mechanism of dual inhibition. Results from this work have potential to guide the design of new therapeutics to be used in the target-therapy against cancer and other diseases.

2. Computational details

2.1. Protein-ligand structures retrieval

The three-dimensional coordinate files of PI3K α and mTOR complexed with selective and dual inhibitors were retrieved from the Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman et al., 2000). At total four crystallographic structures were analyzed, as follows: PI3K α complexed with the dual inhibitor PI103 (Zhao et al., 2014) (PDB ID 4L23; PubChem CID 9884685), PI3K α complexed with selective inhibitor alpelisib (Furet et al., 2013) (PDB ID 4JPS; PubChem CID 5664945), mTOR complexed with the dual inhibitor PI103 (Yang et al., 2013) (PDB ID 4JT6; PubChem CID 9884685) and mTOR complexed with the selective inhibitor torin-2 (Yang et al., 2013) (PDB ID 4JSX; PubChem CID 51358113).

2.2. Structural data preparation

When necessary, crystallographic structures had missing atoms added using SwissPDBViewer (Guex & Peitsch, 1997). Amino acid side chains were protonated at pH 7.2 using the PROPKA algorithm on the PDB2PQR web server (Dolinsky et al., 2007; Olsson et al., 2011). Ligands were protonated at pH 7.2 were assessed through Marvin Sketch (version 20.20), 2020, from ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

2.3. Molecular dynamics

To account for protein flexibility, we performed molecular dynamics simulations, for each system, using GROMACS 2019 (Abraham et al., 2015) package with AmberSB99 force field

(Hornak et al., 2006). Simulation consisted in $\sim 190,000$ atoms for PI3K α -inhibitor systems, and $\sim 292,000$ atoms for mTOR-inhibitor systems. In all systems tip3p water model (Jorgensen et al., 1983) was employed to describe water molecules and net charge was neutralized by adding Na⁺ and Cl⁻ ions at 0.15 M concentration. Total energy minimization was accomplished by combining steepest-descent and conjugate gradient algorithms, in sequence. At total, each system was equilibrated using integration steps of 1 fs through 2 ns following gradually decreasing ligand restraint force constants along 4 steps of 250 ps each. Long-range electrostatics was modelled with the Particle Mesh Ewald (PME) method (Essmann et al., 1995), temperature coupling was done with Nose-Hoover thermostat at 310.15 K and the Parrinello-Rahman barostat (Parrinello & Rahman, 1981) with a reference pressure of 1 bar. LINCS algorithm was used to constrain covalent bonds to their equilibrium length (Hess et al., 1997). The integration steps of all simulations during the production step were set to 2 fs. At the end, a trajectory of 500 ns was obtained for each system and the distance root-mean-square deviation (rmsd) and the root-mean-square-fluctuation (rmsf) were calculated to assess structural stability of the complex.

2.4. Relative binding free energy calculations

Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) calculations were performed through the g_mmpbsa (Kumari et al., 2014) code. Relative binding energies were calculated from 100 snapshots representing the last 10 ns of each 100-ns trajectory, using the MM/PBSA approach (Eq. (1)). Additional comparison between calculated values using 100 and 1000 snapshots were performed by sampling the last 10 ns of 500-ns trajectories.

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{protein}} + G_{\text{ligand}}) \quad (1)$$

where ΔG_{bind} (the total binding free energy) is the free energy difference between the bound complex (formed by the association between the protein and the ligand), and the isolated protein and ligand in solvent.

The free energy (G) for each individual entity is estimated as in Eq. (2):

$$G = \langle E_{\text{MM}} \rangle + \langle G_{\text{solvation}} \rangle - \langle \Delta TS \rangle \quad (2)$$

where E_{MM} represents the sum of the Molecular Mechanics internal energy of the molecule, $G_{\text{solvation}}$ is the free energy of solvation, T is the temperature in units of Kelvin and S represents the conformational entropy of the system.

The Molecular Mechanics internal energy is given by the bounded and the nonbounded terms:

$$E_{\text{MM}} = E_{\text{bounded}} + E_{\text{nonbounded}} \quad (3)$$

where, for each individual molecular entity, E_{bounded} represents bonded interactions consisting of bond-stretch, angle-bend, torsion and improper-dihedral interactions, while $E_{\text{nonbounded}}$ represents the sum of both, the electrostatics and the van der Waals interactions calculated through Coulomb and Lennard-Jones potential functions, respectively. $G_{\text{solvation}}$ represents the amount of energy spent to transfer a solute from vacuum into solvent and is calculated using an

implicit solvent model:

$$G_{\text{solvation}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{nonpolar}} \quad (4)$$

where G_{polar} is the polar solvation energy of a molecule, estimated by solving the Poisson-Boltzmann (PB) equation and G_{nonpolar} is the term for the nonpolar solvation energy which is approximated by a solvent-accessible surface area (SASA) (Eisenhaber et al., 1995) term, based on the assumption it has a linear dependency on the G_{nonpolar} term:

$$G_{\text{nonpolar}} = \gamma A + b \quad (5)$$

where γ is a coefficient related to surface tension dependent of the solvent employed, A represents SASA and b is a fitting parameter.

In this work, we used a single-trajectory protocol where only the protein-ligand complex is simulated and the conformations of protein and ligand in the bound and unbound states are assumed to be identical, and therefore their E_{bounded} and E_{bounded} terms cancels out. In addition, to assess the dependence of ΔG_{bind} on the solute dielectric constant ϵ_{solute} value, the solute dielectric constant was set to 2 or 8, in combination with three distinct values (20, 40 and 80) for the solvent dielectric constants, to account for the effect of solvent in the binding cleft. Other parameters in g_mmpbsa were left as default (Kumari et al., 2014).

2.5. Interaction entropy (IE)

Interaction entropy (IE) has emerged as a fast and accurate method to estimate the entropic contribution directly from MD simulations, at negligible computational cost (Duan et al., 2016; Huang et al., 2020). The entropic contribution can be calculated by the IE method using the following term:

$$-T\Delta S_{IE} = kT \ln \langle e^{\beta \Delta E_{pl}^{int}} \rangle \quad (6)$$

where ΔE_{pl}^{int} represents the fluctuation of protein-ligand interaction energy E_{pl}^{int} around the average interaction energy $\langle E_{pl}^{int} \rangle$, as depicted in Eq. (7):

$$\Delta E_{pl}^{int} = E_{pl}^{int} - \langle E_{pl}^{int} \rangle \quad (7)$$

The term $\langle E_{pl}^{int} \rangle$ is obtained as shown below,

$$\langle E_{pl}^{int} \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T E_{pl}^{int}(t) dt = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E_{pl}^{int}(t_i) \quad (8)$$

While $\langle e^{\beta \Delta E_{pl}^{int}} \rangle$ is calculated as follows:

$$\langle e^{\beta \Delta E_{pl}^{int}} \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N e^{\beta \Delta E_{pl}^{int}(t_i)} \quad (9)$$

2.6. Total interaction energy and relative amino acid contributions

One of the great advantages in the MM/PBSA method is its ability to perform reliable comparison among distinct ligands

interacting with the similar target. In this work, python scripts 'MmPbSaStat.py' and 'MmPbSaDecomp.py' (Kumari et al., 2014) were employed to perform per-residue energy decomposition based on MM/PBSA calculated energy components E_{MM} , G_{polar} , and $G_{nonpolar}$ were performed in order to identify key amino acid contributions to the binding of distinct ligands in the binding site of PI3K α and mTOR. Total interaction energy is represented as ΔG_{MMPBSA} , or $\Delta G_{MMPBSA-IE}$ when the entropic contribution, calculated through the IE method, is considered. Following, to observe the fluctuation of the total interaction energy, the individual interaction energy of every amino acid residue within 10 Å from the ligand was summed up and plotted against its radial distance to the ligand. Distances were calculated using the last snapshot of 100 ns-MD trajectories. To observe the relative contribution of each amino acid residue to the total binding energy, hot spots which normally respond for large changes in this curve are plotted in horizontal bar charts representing (i) the interaction energy (in kJ/mol) of ligands with individual amino acids residues, from which it is possible to visually assess its attractive or repulsive nature in the given system; and, (ii) the most important residues contributing to the stability of the complex in the column of residues at the left side. In addition, to better compare the action of conserved and non-conserved residues across PI3K α and mTOR binding sites, calculated energies were depicted through a heatmap plot representation, where similarities and differences are easily assessed.

3. Results and discussions

Initially, to better analyze similarities and differences between PI3K α and mTOR ATP-binding site residues, crystallographic structures 4L23 and 4JT6 were superimposed to identify the spatial arrangement of conserved and non-conserved residues located within 6 Å from inhibitors. At total, it was identified 10 conserved and 07 non-conserved residues. A visual representation of the superimposed ATP-binding site is shown in Figure 2, and a list of conserved and non-conserved PI3K α -mTOR pair of residues, numbered from 1 to 17, is shown in Table 1, [supplementary material](#).

Following, each protein-inhibitor complex was protonated at physiological pH and submitted to molecular dynamics simulations and relative binding energy calculations through MM/PBSA approach as described below.

3.1. Inhibitor structures and protonation analysis

Protonation analysis showed that 100% of alpelisib ((2S)-1-N-[4-methyl-5-[2-(1,1,1-trifluoro-2-methylpropan-2-yl)pyridin-4-yl]-1,3-thiazol-2-yl]pyrrolidine-1,2-dicarboxamide) and PI103 (3-(6-morpholin-4-yl-8-oxa-3,5,10-triazatricyclo [7.4.0.0.2,7] trideca-1(9), 2(7), 3, 5, 10, 12-hexaen-4-yl)phenol) molecules have neutral charges at physiological pH, while about 86.0% of torin-2 (9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzo[h][1,6]-naphthyrin-2-one) molecules are in the neutral state and 14% have a protonated (+1 charge) nitrogen atom in the aminopyridine ring. The chemical structure of inhibitors at pH 7.2 and

the microspecies distribution in the pH range from 0 to 14 is shown in Figure 3.

3.2. Molecular dynamics simulation and structural stability

Due to the crystallographic nature of the selected protein-ligand complexes, it is of paramount importance to allow them to reach conformational equilibrium under explicit solvent at physiological pH prior to further energy analysis. Such approach is necessary because during crystal packing, sometimes spurious contacts are formed and both ligand and side chains are trapped in local/global minima which do not represent the equilibrium conformation at physiological pH. Therefore, to ensure a correct analysis of relative amino acid contribution, each selected protein-ligand complex must be adequately protonated and solvated, and any molecular clash must be removed, improving, and stabilizing their internal atomic contact network. In this study, molecular dynamics (MD) using the AmberSB99 force field and TIP3P water model were employed to sample protein-ligand conformations used during MM/PBSA calculations. As observed in Figure 4(A) and 4(B), which represents the rmsd fluctuation for the entire structure, all complexes were stable at 100 ns. Among them, the complex mTOR-PI103 took more time to stabilize, reaching plateau at about 82 ns of simulation. For the sake of comparison, MM/PBSA were calculated using snapshots from 10 ns of MD simulations extracted from the time 90 ns and 490 ns (yellow shadow). In addition, it was verified the root-mean square fluctuation (rmsf) of ATP-binding pocket residues in close contact with ligands along the first 100 ns and compared with fluctuation along the whole simulation (500 ns). As observed in Figure 4(C)–(F) only small displacements of binding site residues were observed, suggesting that most of the rearrangement observed in Figure 4(A) and 4(B) are related to domains external to the ATP-binding pocket.

3.3. Calculated interaction energy

In the past decades, the MM/PBSA approach has been successfully used to calculate the interaction energy between a wide range of small ligands and biological molecules (Poli et al., 2020). Different from single point energy calculations, which is commonly applied to crystallographic structures, MM/PBSA requires a set of snapshots from molecular dynamics simulations to accurately access and average the effect of small fluctuations in intermolecular interactions. Nevertheless, while the accuracy of the calculated absolute binding free energy in MM/PBSA approach is disputable and very system-dependent, the analysis of per residue interaction energy among similar biological targets bound to distinct ligands has been of great value to rank individual amino acid contributions, the effect of mutations and to guide rational drug design. In this work, to ensure the consistence of MM/PBSA results during our analysis, we sampled conformations for MM/PBSA calculations from two distinct points along the simulation time: the first, immediately after the stabilization of all structures (from 90 to 100 ns), and

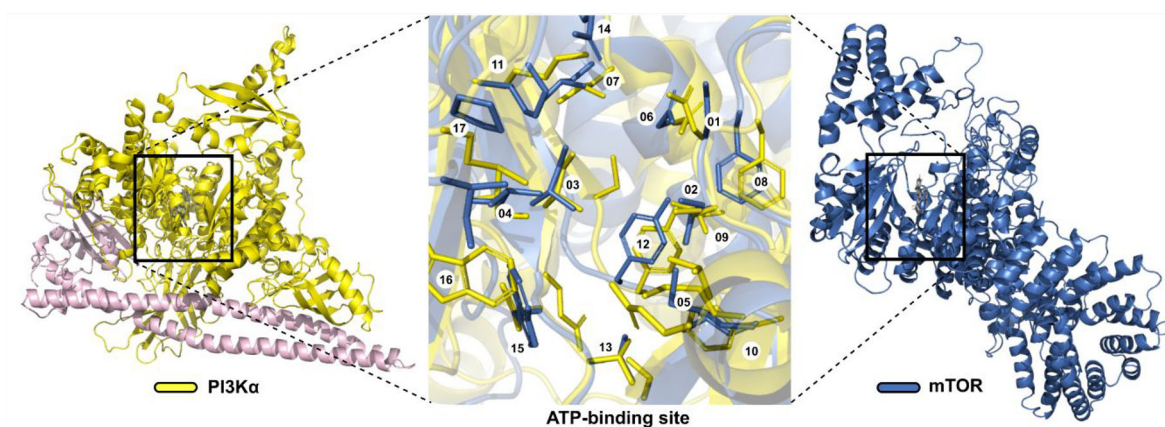


Figure 2. Overlay of PI3K α and mTOR ATP-binding site. Left panel shows catalytic and regulatory PI3K α subunits while right panel shows mTOR protein. Middle panel shows the overlay of both structures at the ATP-binding site, with numbers representing conserved or non-conserved pairs of PI3K α -mTOR residues as described in Table 1, supplementary material.

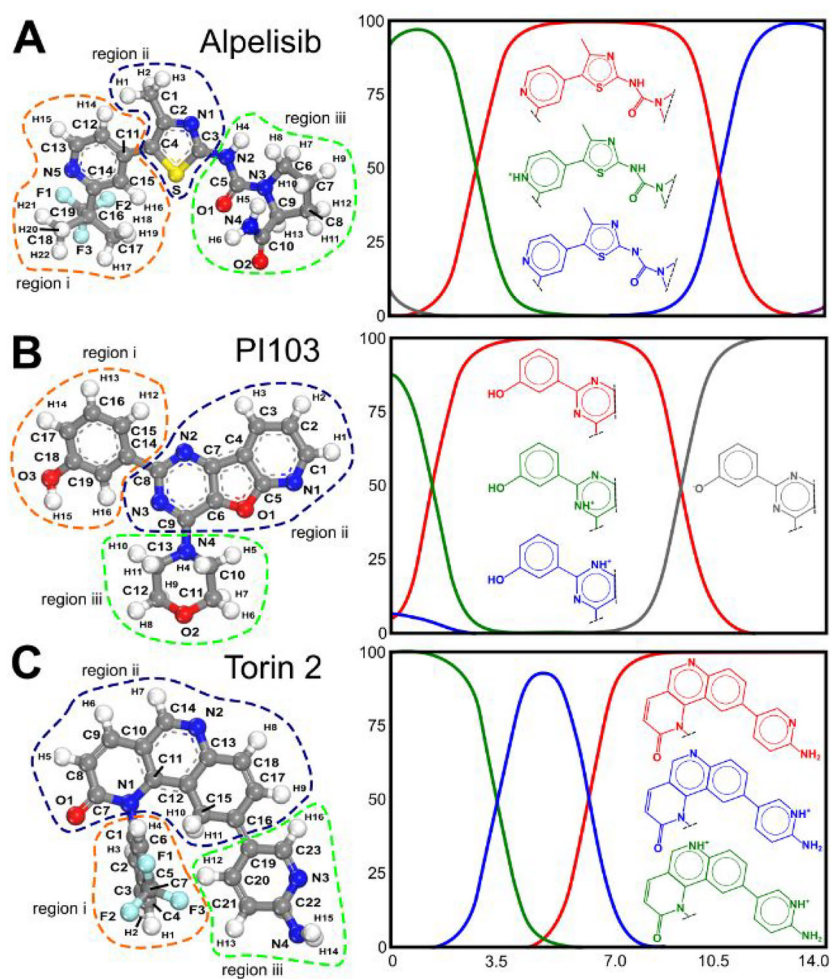


Figure 3. Chemical representation of inhibitors at pH 7.2 showing atom labels and protonation curves for (A) alpelisib, (B) PI103 and (C) torin-2.

the second at the end of the simulation (from 490 to 500 ns). Both ranges are depicted in yellow shadow in Figure 4(A) and 4(B). As observed in Table 2, supplementary material, MM/PBSA energies are consistent between the two ranges, reassuring that stabilization was reached prior to 90 ns. In addition, we have assessed the effect of sampling distinct number of snapshots during MM/PBSA and IE calculations and observed no significant changes in the MM/PBSA energies when the number of

snapshots increased from 100 to 1000 (see details in Table 2, supplementary material), indicating these systems are very stable in the timeframe analysed. Interestingly, consistency among calculated IE values varied according to the system and the number of snapshots considered (Table 3, supplementary material). This phenomenon was previously reported by Ekberg and Ryde (2021), who observed an increase in the entropy with number of energies considered. Following, we tested distinct

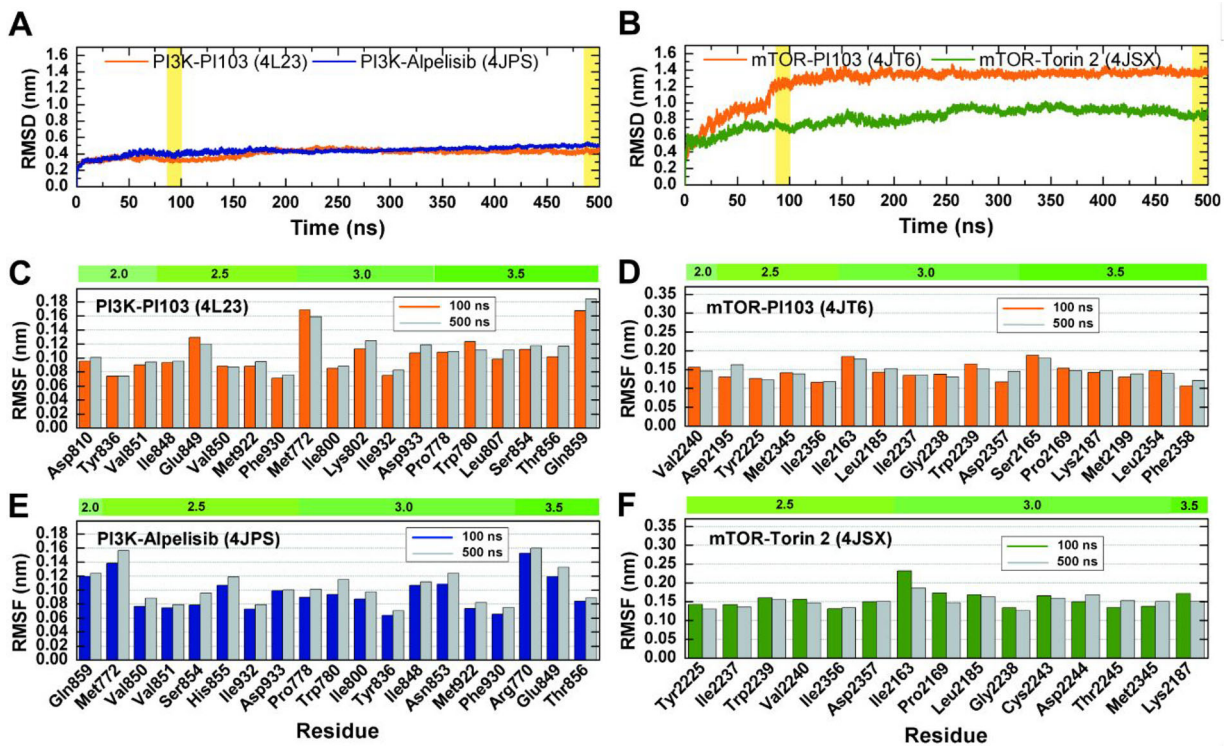


Figure 4. Molecular dynamics evolution for PI3K (left panel) and mTOR (right panel) complexes along 500-ns trajectories. (A, B) Time vs. backbone RMSDs. (C, E) RMSF of PI3K α ATP-binding site residues, considering 100-ns and 500-ns trajectories. (D, F) RMSF of mTOR ATP-binding site residues, considering 100-ns and 500-ns trajectories.

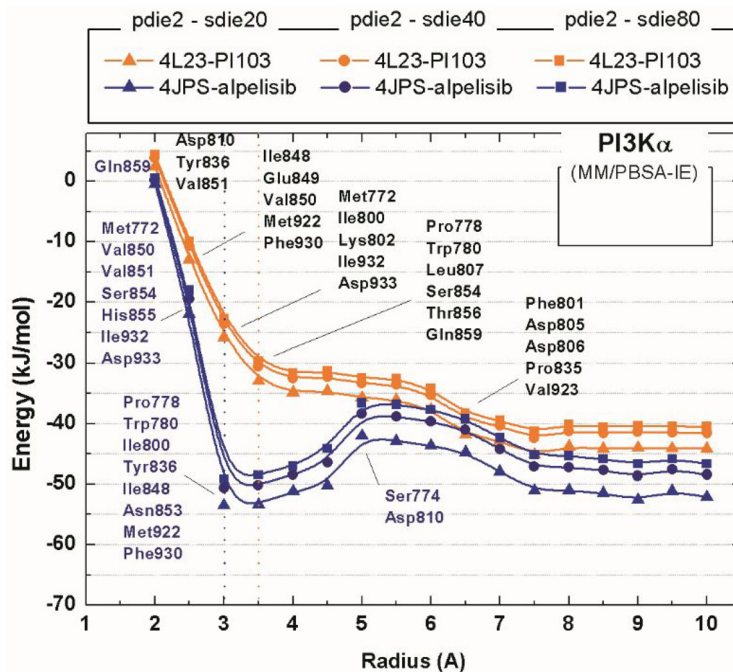


Figure 5. Total interaction energy of PI3K α complexes as a function of the radial distance from the dual-inhibitor PI103 (PDB ID: 4L23) and the selective ligand alpelisib (PDB ID: 4JPS). Interaction energy is shown in kJ/mol and distance in angstroms.

combinations of protein and solvent dielectric constant parameters under SAV or SASA nonpolar models during the free energy of solvation calculations. As shown in Table 4, [supplementary material](#), changes in the dielectric constant had only small impact in the total free binding energy and showed consistency under distinct nonpolar models. On the other hand,

the use of nonpolar model SAV produced results 2-times the magnitude of SASA model. Such overestimation in SAV energy were expected, as previously observed by Kumari and colleagues (2014), who compared calculated MM/PBSA binding free energy with a set of experimental data. Therefore, in this work we reported MM/PBSA and IE (MM/PBSA-IE) energies

calculated from 90 to 100 ns, using 100 snapshots, and applying SASA model to describe the per residues interactions in each complex. In addition, considering that the ATP-binding site in these systems consist in inner cavities, with low charge and limited exposition to the external medium (Li et al., 2013), the parameters of protein and solvent dielectric constant were set as 2 and 20, respectively.

By summing up the interaction energy of each residue within 10.0 Å from the ligand, it was possible to analyse the fluctuation in the total interaction energy as a function of the radial distance. As shown in Figures 5 and 6 (for PI3K α

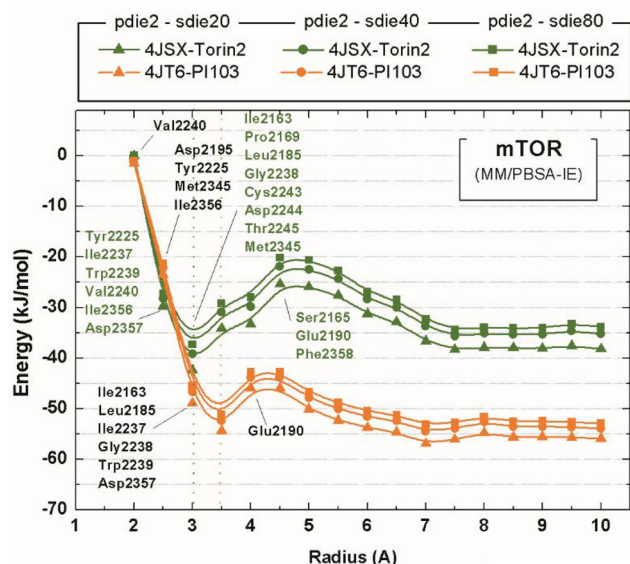


Figure 6. Total interaction energy of mTOR crystallographic complexes as a function of the radial distance from the dual-inhibitor PI103 (PDB ID: 4JT6) and the selective mTOR inhibitor Torin 2 (PDB ID: 4JXS). Interaction energy is shown in kJ/mol and distance in angstroms.

and mTOR complexes, respectively), despite the changes observed in the calculated total binding energy under distinct values of the solvent dielectric constant (20, 40 or 80), for all complexes, the fluctuations on the binding energy along the radius distance kept the same behaviour, indicating that the residue relevance do not change upon distinct parameters.

MM/PBSA calculations with the solute (solvent) dielectric constant set to 2 (20) showed that PI103 interacts with PI3K α through -44.10 kJ/mol, with residues located within 3.5 Å responding for about 75% (-32.92 kJ/mol). The calculated total energy for PI3K α -alpelisib complex was -52.13 kJ/mol, with residues within 3 Å responding for an interaction of -53.46 kJ/mol. After these distances, in both structures, it was also observed oscillations, with values returning to the same level after 7.5 Å.

In the same fashion, it was calculated total interaction energy as a function of the radius distance for mTOR complexes, shows that mTOR interacts with PI103 with a strength of -55.87 kJ/mol, with residues located within 3.5 Å responding for about 97% (-54.32 kJ/mol). The calculated total energy for mTOR-torin2 complex was -38.12 kJ/mol, with residues within 3.0 Å responding for an interaction of -42.35 kJ/mol. After these distances, in both structures, it was also observed oscillations, with values returning to the same level after 7.0 Å.

3.4. Calculated individual residue contribution

One of the key advantages in the analysis we have performed is its ability of ranking the individual amino acid contribution to the binding of distinct inhibitors. As depicted in Figure 7, PI3K α residues with stronger attractive contribution

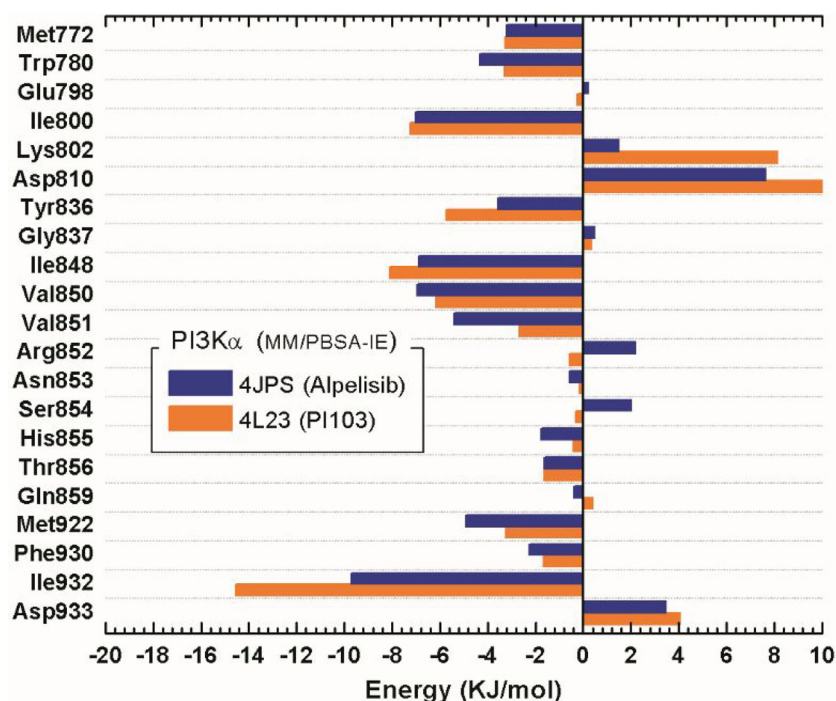


Figure 7. Individual interaction energy of PI3K α residues and compounds alpelisib and PI103. Interaction of PI3K α -alpelisib and -PI103 are shown in blue and orange horizontal bars, respectively.

to the binding of alpelisib are Ile932 (−9.70 kJ/mol), Ile848 (−6.89 kJ/mol), Ile800 (−7.00 kJ/mol), Val850 (−6.96 kJ/mol), Val851 (−5.42 kJ/mol) and Met922 (−4.92 kJ/mol). Among the strongest repulsive interactions are those between alpelisib and residues Asp810 (7.66 kJ/mol) and Asp933 (3.48 kJ/mol). Similar results were found for PI3K α residues interacting with PI103, where the strongest attractive energies were observed for residues Ile932 (−14.54 kJ/mol), Ile848 (−8.10 kJ/mol), Ile800 (−7.23 kJ/mol), Val850 (−6.17 kJ/mol), Val851 (−2.67 kJ/mol) and Met922 (−3.23 kJ/mol). Among repulsive interactions, the strongest were observed for residues Asp810 (10.92 kJ/mol), Lys802 (8.12 kJ/mol) and Asp933 (4.04 kJ/mol).

It is worth to note that, in both PI3K α complexes, the binding of inhibitors was stabilized mainly by hydrophobic residues, while amino acids with charged side chains are responding for repulsive effects. Nevertheless, despite remarkable behavioral similarities (attractive or repulsive effect) among most of the residues in PI3K α complexes, significant differences were observed when Ile932 ($\Delta E = 4.84$ kJ/mol, Lys802 ($\Delta E = 6.63$ kJ/mol), Asp810 ($\Delta E = 3.26$ kJ/mol), Val851 ($\Delta E = 2.75$ kJ/mol), Arg852 ($\Delta E = 2.73$ kJ/mol) and Tyr836 ($\Delta E = 2.19$ kJ/mol) and interacted with one or another inhibitor. Indeed, as shown in Figure 8, the non-polar amino acid Ile932 is close to the pyridofuro-pyrimidine group of PI103 (Figure 3B, region ii), while in the PI3K α -alpelisib complex it is close to the methyl-trifluoromethylpropanyl-pyridinyl group (Figure 3A, region i). In the PI3K α -PI103 complex, residue Val851 makes a hydrogen bond with the oxygen atom (O2) in the PI103 morpholine ring (Figure 3B, region iii), while in the PI3K α -alpelisib complex, Val851 forms a nitrogen bond with atom (N1) in the thiazole ring (Figure 3A, region ii) and are close to the nitrogen atom (N2) in the pyrrolidine-dicarboxamide group (Figure 3A, region iii). Interestingly, such interaction is conserved in mTOR-PI103 complex, with the oxygen atom (O2) in the PI103 morpholine forming a hydrogen bond with the mTOR residue Val2240. In addition, as shown in Figure 10, Val2240 also forms a hydrogen bond to the nitrogen atom (N2) in the benzo-naphthyridine ring of torin-2 (Figure 3C, region ii).

Interestingly, it is believed that selective inhibition of PI3K relies on a small number of non-conserved residues located in the periphery of the ATP-binding site, being four of them (⁸⁵²RNSH⁸⁵⁵, in PI3K α) located near the hinge (called region 1), and few others located at the P-loop (called region 2) (Frazzetto et al., 2008). Our results show that non-conserved residues in the hinge region hold weak interactions but distinct behaviours when interacting with PI103 or alpelisib. For instance, while the attractive strength of residue His855 was larger for alpelisib (almost 8x) than for PI103, residues Arg852 and Ser854 showed attractive interaction with PI103, but repelled alpelisib. The relevance of His855 for PI3K α selectivity was also shown previously by Zheng et al. (2011), using in vitro mutagenesis to evaluate the binding of the inhibitor PIK-75 (Zheng et al., 2011). In addition, residue Gln859, which is known as an important player in PI3K isoform selectivity (Furet et al., 2013; Zheng et al., 2012), showed attractive interaction for alpelisib, making two hydrogen bonds with the oxygen (O1) and nitrogen (N3) atoms,

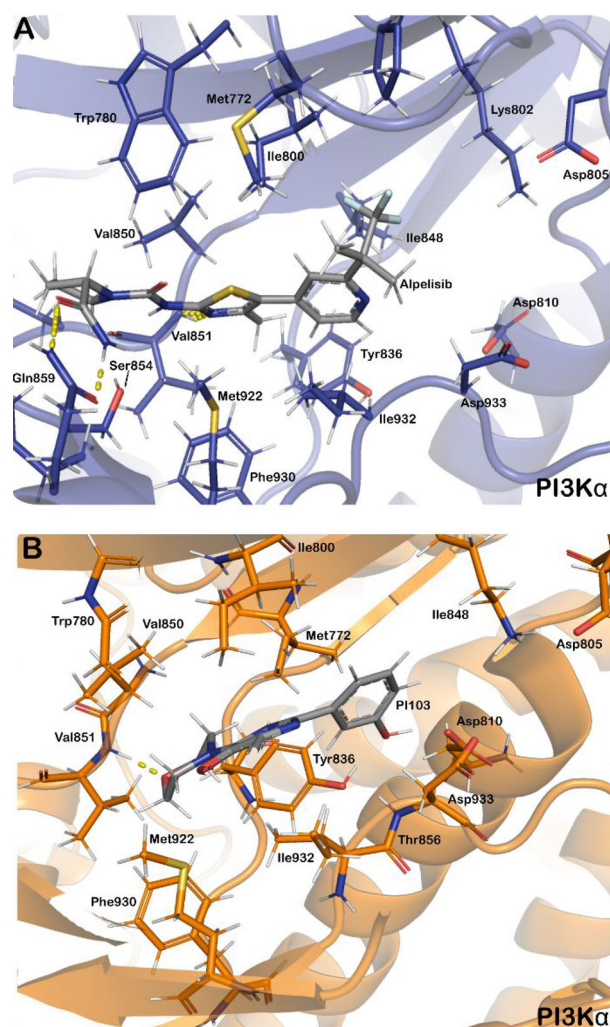


Figure 8. Spatial organization of main PI3K α residues interacting with (A) alpelisib and (B) PI103 compounds. Protein structures are shown as cartoon with side chains in stick. Inhibitors are shown as sticks. Hydrogen bonds are shown as yellow dashes.

but acted repulsively in the presence of the dual-inhibitor PI103 (see Figures 7 and 8).

Interestingly, in mTOR complexes, the hydrophobic residues are also those which contribute the most for the binding of inhibitors, while charged residues respond repulsively to them. As shown in Figure 9, the main mTOR residues interacting with torin-2 are Trp2239 (−13.88 kJ/mol), Ile2356 (−11.67 kJ/mol), Leu2185 (−9.08 kJ/mol), Ile2237 (−5.94 kJ/mol), Met2345 (−5.89 kJ/mol), Ile2163 (−3.48 kJ/mol), Val2240 (−2.93 kJ/mol), Tyr2245 (−2.61 kJ/mol) Arg2339 (−2.10 kJ/mol) and Tyr2225 (−1.31 kJ/mol). Among repulsive interactions, the strongest are from residues Glu2190 (7.85 kJ/mol), Lys2187 (8.28 kJ/mol), Asp2357 (6.05 kJ/mol), Gly2238 (3.54 kJ/mol) and Cys2243 (1.86 kJ/mol). Among strongest attractive mTOR residues interacting with PI103 are Ile2356 (−13.43 kJ/mol), Trp2239 (−10.23 kJ/mol), Ile2237 (−10.21 kJ/mol), Leu2185 (−9.59 kJ/mol), Tyr2225 (−5.51 kJ/mol), Met2345 (−3.59 kJ/mol) Ile2163 (−2.92 kJ/mol) and Leu2354 (−2.27 kJ/mol). Among repulsive interactions observed in the mTOR-PI103 complex, the strongest were from residues Glu2190 (8.45 kJ/mol), Asp2357 (6.27 kJ/mol) and Gly2238 (1.32 kJ/mol). Interestingly, as observed in Figure 9 and

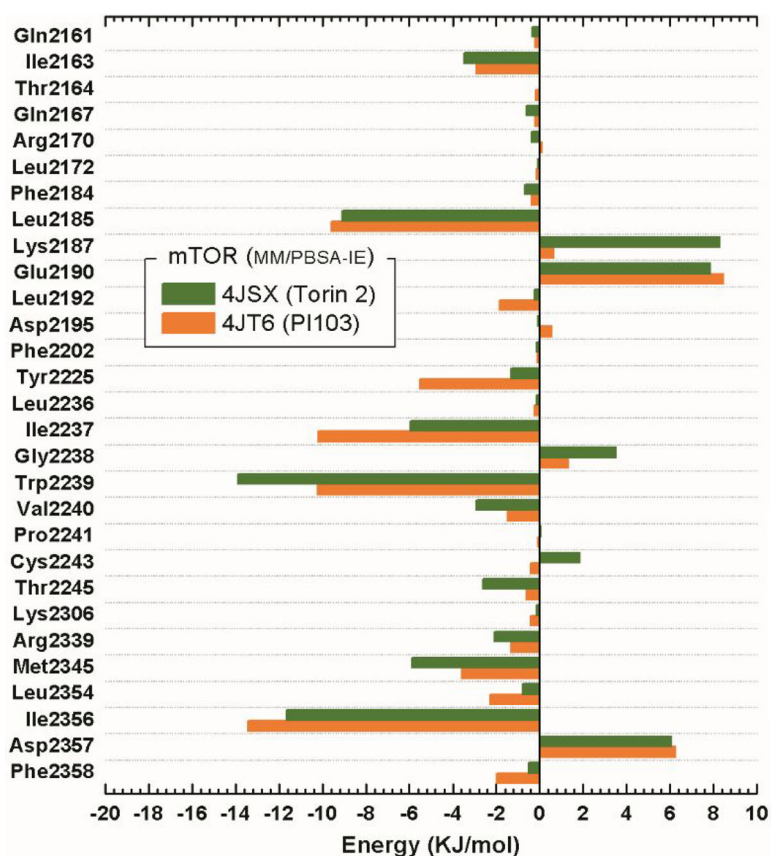


Figure 9. Individual interaction energy between of mTOR residues and compounds PP242, torin-2 and PI103. Interactions of mTOR-torin-2 and -PI103 complexes are shown in green and orange horizontal bars, respectively.

Tables 7 and 8, [supplementary material](#), the largest difference in the calculated energy of mTOR residues interacting with torin 2 or the dual inhibitor PI103, came from residues Tyr2225 ($\Delta E = 4.20$ kJ/mol), Lys2187 ($\Delta E = 7.62$ kJ/mol), Ile2237 ($\Delta E = 4.27$ kJ/mol), Trp2239 ($\Delta E = 3.65$ kJ/mol), Met2345 ($\Delta E = 2.30$ kJ/mol) and Cys2243 ($\Delta E = 2.30$ kJ/mol).

Recently, Rehan (2019) highlighted residues Trp2239, Ile2356, Leu2188, Met2345, Leu2185 and Ile2163 as relevant residues for the binding of the dual inhibitor XL765, a potent and selective class-I PI3K/mTOR inhibitor (Rehan, 2019). Interestingly, in both mTOR inhibitors analysed, the presence of aromatic rings leads to the formation of π -stack interactions with the tryptophan indole ring of Trp2239. As shown in [Figure 10](#), Trp2239 forms a stack interaction with the tricyclic benzo-naphthyridine ring of torin-2 (-13.88 kJ/mol), while it interacts with the pyrido-furo-pyrimidine ring of PI103 (-10.23 kJ/mol). The key role of Trp2239 in the binding of mTOR inhibitors was previously reported in the mTOR-torin2 crystallographic complex (Yang et al., 2013) as in the recently modelled mTOR-XL765 complex (Rehan, 2019). Residue Ile2237 is placed close to PI103 phenol ring ([Figure 3B](#), region i) and interacts through -10.21 kJ/mol while in mTOR-torin 2 complex it is facing the aminopyridine group ([Figure 3C](#), region iii) and interacting through -5.94 kJ/mol. Residue Met2345 interacts with the benzo-naphthyridinone group ([Figure 3C](#), region ii) of torin-2 through -5.89 kJ/mol, while interacts with the morpholine ring of PI103 ([Figure 3B](#), region iii) through -3.59 kJ/mol. Residue Tyr2225 forms a hydrogen bond (-5.51 kJ/mol) with the hydroxyl group (O3H15) of PI103 ([Figure](#)

[3B](#), region i), while interacts weakly (-1.31 kJ/mol) with the aminopyridine group in torin-2 ([Figure 3C](#), region iii). Like Asp810 in PI3K α , mTOR residue Asp2357 also showed repulsive interaction with inhibitors PI103 and torin-2. For clarity, the values of calculated individual energy contribution of PI3K α and mTOR residues are shown in [Tables 5–8, supplementary material](#).

To improve our analysis, we compare the calculated interaction energies of conserved and non-conserved ATP-binding site residues among all PI3K α and mTOR structures ([Figure 11](#)). As observed, among conserved residues, divergent behaviour was observed between Asp810 and Asp2195 and, Lys802 and Lys2187. While residue Asp810 showed a repulsive effect in both PI3K α complexes, Asp2195 showed a neutral interaction energy in mTOR complexes. For charged residues Lys802 and Lys2187 it was observed a mix of attractive to neutral behaviour depending on the inhibitor they were interacting. Among non-conserved residues, divergences were observed between Asp805 and Glu2190, Phe930 and Leu2354 and, Trp780 and Lys2171. The negatively charged residues Asp805 and Glu2190 showed opposite effect in PI3K α or mTOR, driven by their spatial orientation toward each inhibitor at the binding pocket. While Phe930 attracts both, alpelisib and PI103, Leu2354 attracts PI103 and has a neutral interaction with torin2. Interestingly, while the superposition of PI3K α and mTOR structures showed that the hydrophobic residue Trp780 and the electrically charged Lys2171 are occupying overlaid positions (see [Figure 2](#)), the adjacent hydrophobic residue

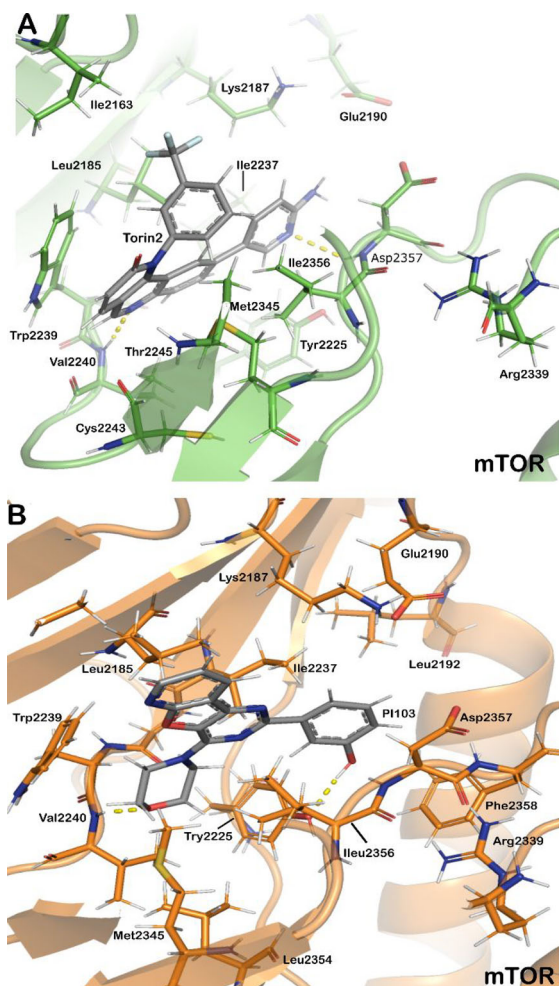


Figure 10. Spatial organization of main mTOR residues interacting with (A) torin-2 and (B) PI103 compounds. Protein structures are shown as cartoon with side chains in stick. Inhibitors are shown as sticks. Hydrogen bonds are shown as yellow dashes.

Trp2239 in mTOR binding pocket shields the effect of Lys2171. Indeed, the spatial orientation of Trp780 and Trp2239 seems to be pivotal for the binding of single and dual inhibitors as shown in Figures 8 and 10. In addition, our analysis shows the strong repulsive effect of negative charged residues Asp933 and Asp2357 and highlight the strongest attractive interaction of hydrophobic (PI3K α -mTOR) residues Ile932-Ile2356, followed by Ile848-Ile2237, Met922-Met2345 and Val851-Val2240. Among non-conserved hydrophobic residues, the strongest attractive interactions were observed with Ile800-Leu2185 and Val850-Trp2239.

Interestingly, when interacting with the dual inhibitor PI103, the conserved and positively charged (PI3K α -mTOR) residues Asp810-Asp2195 and Lys802-Lys2187 showed opposite behaviour. For Asp810 and Asp2195, the distances to the phenol group of PI103 (region i, Figure 2B) impacts the magnitude of the calculated interaction energy, with Asp810 (in PI3K α) strongly repelling PI103, whilst Asp2195 (in mTOR) holds a near neutral to weak attractive interaction ($\Delta E = 10.36$ kJ/mol). Similarly, the conserved PI3K α residue Lys802 showed stronger repulsion to PI103 than did Lys2187, in mTOR complex ($\Delta E = 7.46$ kJ/mol). For non-conserved residues Asp805-Glu2190, the spatial arrangement of PI103 into

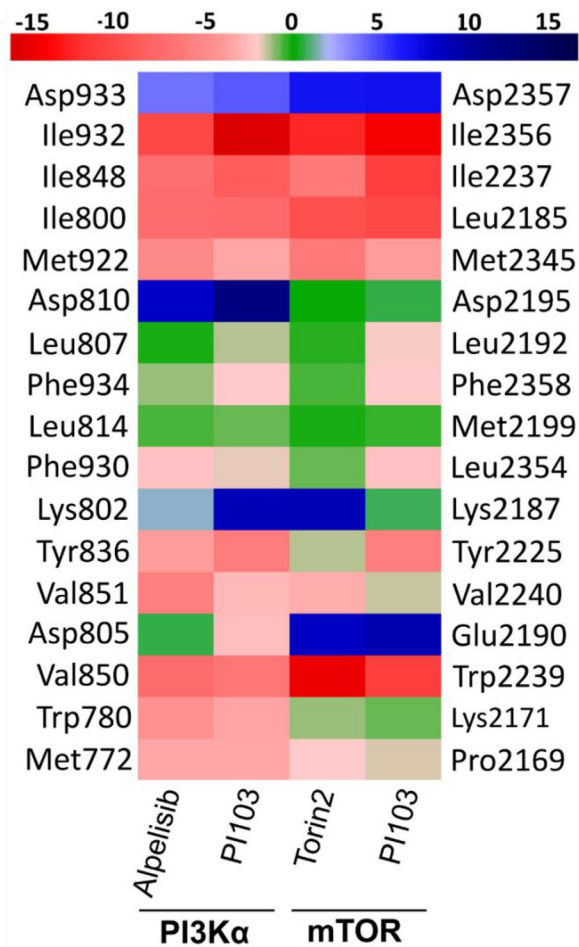


Figure 11. Heatmap showing similarities and differences between PI3K α and mTOR residues due to the ligand effect. Left column shows PI3K α residues, whilst mTOR residues are shown in the right. As shown in the scale, attractive energies are shown in red, while neutral and repulsive interactions are shown in green and blue, respectively.

the binding pocket results in distinct interaction pattern ($\Delta E = 10.88$ kJ/mol), while for Trp780-Lys2171 ($\Delta E = 2.55$ kJ/mol), the presence of residue Trp2239 in mTOR binding pocket shields the interaction between Lys2171 and PI103. In addition, there is a clear opportunity for improving the total binding energy of new inhibitors by increasing their interaction with PI3K α residues Asp933 and Leu814 and, mTOR residues Asp2357 and Met2199. To better visualize the attractive or repulsive behaviour of binding site residues, the calculated per residue interaction energies were plotted onto the cartoon representation of spatial coordinates for each complex, as shown in Supplementary Figure 1, supplementary material.

4. Conclusions

In this work, MM/PBSA approach was employed to calculate the relative individual amino acid contribution to the binding of selective or dual inhibitor into PI3K α and mTOR ATP-binding site. Calculations identified hydrophobic PI3K α residues Ile932, Ile848, Ile800, Val850, Val851 and Met922 as the most important for the binding of PI103 and alpelisib. In addition, calculations also identify hydrophobic mTOR residues

Trp2239, Ile2356, Leu2185, Ile2237 and Met2345 as the most important for the binding of torin-2 and PI103 inhibitors. Interestingly, PI3K α residues Asp810 and Lys802 showed opposite behaviour when compared with their conserved mTOR counterparts Asp2195 and Lys2187. While Asp810 repelled alpelisib and PI103, Asp2195 showed neutral behaviour with torin-2 and PI103. On the other hand, Lys802 repelled alpelisib and PI103, while Lys2187 showed neutral behaviour with PI103 and repelled torin2. In addition, while Asp805 showed neutral behaviour in the presence of alpelisib but acted attractively in the presence of PI103, its counterpart mTOR residue Glu2190 repelled both, torin2 and PI103. These results suggest that improving/balancing molecular contacts with these residues could be beneficial to tune selectivity in drug design studies. When our attention was turned to the binding of the dual-inhibitor PI103, we identify key interactions in PI3K α residues Phe934, Lys802, Asp805 and mTOR residues Leu2192, Phe2358, Leu2354, Lys2187 and Tyr2225 as their behaviour differs to that observed with respective selective inhibitors. Among interactions that could be improved during dual inhibition are those with PI3K α residues Asp810, Leu807, Leu814 and Lys802 and, with mTOR residues Asp2195, Met2199, Lys2187, Glu2190 and Lys2171. Therefore, the nature of each of those interaction should be carefully analyzed during the design of new multi-target inhibitors as they represent a clear opportunity for enhancing the binding strength in both proteins. Altogether, our results depict a clear panel representing the interaction network of selective and dual ATP-binding site inhibitors and highlight the key similarities and differences among their binding mechanism. Therefore, this work provides an improved understanding in the complex behaviour of PI3K α and mTOR residues controlling the binding of selective and dual ATP-binding site inhibitors and pave the way for the design of new multi-target single agents with better affinity and reduced side effects.

Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by grant 437373/2018-5 from the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq] (to GZ). FFNA and FJFS fellowships were supported by CAPES. FLS fellowship was supported by a UFC/PIBIC programme (PIBIC 2019/2020—Edital No. 7/2019).

ORCID

Geancarlo Zanatta  <http://orcid.org/0000-0003-0111-5347>

Authors' contribution

FFNA performed the calculations and analysis. FJFS and FLSO prepared figures and tables. GZ supervised the work and performed analysis. GZ and JVC wrote the initial manuscript. All authors discussed the results, modified the manuscript, and approved the final version.

References

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Araki, K., Turner, A. P., Shaffer, V. O., Gangappa, S., Keller, S. A., Bachmann, M. F., Larsen, C. P., & Ahmed, R. (2009). mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, 460(7251), 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature08155>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bresin, A., Cristoforoletti, C., Caprini, E., Cantonetti, M., Monopoli, A., Russo, G., & Narducci, M. G. (2020). Preclinical evidence for targeting PI3K/mTOR signaling with dual-inhibitors as a therapeutic strategy against cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(5), 1045–1053.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.454>
- Chen, D., Lin, X., Zhang, C., Liu, Z., Chen, Z., Li, Z., Wang, J., Li, B., Hu, Y., Dong, B., Shen, L., Ji, J., Gao, J., & Zhang, X. (2018). Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 as a promising therapeutic strategy against paclitaxel-resistant gastric cancer via targeting PI3K/Akt/mTOR pathway article. *Cell Death & Disease*, 9(2), 123. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0132-2>
- Cheson, B. D., O'Brien, S., Ewer, M. S., Goncalves, M. D., Farooki, A., Lenz, G., Yu, A., Fisher, R. I., Zinzani, P. L., & Dreyling, M. (2019). Optimal management of adverse events from copanlisib in the treatment of patients with non-Hodgkin lymphomas. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 19(3), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.11.021>
- Chi, H. (2012). Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nature Reviews. Immunology*, 12(5), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nri3198>
- Collins, D. C., Chenard-Poirier, M., & Lopez, J. S. (2017). The PI3K pathway at the crossroads of cancer and the immune system: Strategies for next generation immunotherapy combinations. *Current Cancer Drug Targets*, 18(4), 355–364. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170927114440>
- Costa-Mattioli, M., & Monteggia, L. M. (2013). mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 16(11), 1537–1543. <https://doi.org/10.1038/nn.3546>
- Curatolo, P., & Moavero, R. (2012). mTOR inhibitors in tuberous sclerosis complex. *Current Neuropharmacology*, 10(4), 404–415. <https://doi.org/10.2174/157015912804143595>
- Deng, L., Jiang, L., Lin, X. H., Tseng, K. F., Liu, Y., Zhang, X., Dong, R. H., Lu, Z. G., & Wang, X. J. (2017). The PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 suppresses proliferation and migration and reverses multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 382–391. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.121>
- Dolinsky, T. J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J. E., Jensen, J. H., Klebe, G., & Baker, N. A. (2007). PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Research*, 35, W522–W525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm276>
- Dowling, R. J. O., Topisirovic, I., Fonseca, B. D., & Sonenberg, N. (2010). Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(3), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.001>
- Duan, L., Liu, X., & Zhang, J. Z. H. (2016). Interaction entropy: A new paradigm for highly efficient and reliable computation of protein-ligand and binding free energy. *Journal of the American Chemical Society*, 138(17), 5722–5728. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02682>
- Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sander, C., & Scharf, M. (1995). The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, 16(3), 273–284. <https://doi.org/10.1002/jcc.540160303>
- Ekberg, V., & Ryde, U. (2021). On the use of interaction entropy and related methods to estimate binding entropies. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(8), 5379–5391. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00374>

- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*, *103*(19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Feng, H., Yang, Z., Bai, X., Yang, M., Fang, Y., Zhang, X., Guo, Q., & Ning, H. (2018). Therapeutic potential of a dual mTORC1/2 inhibitor for the prevention of posterior capsule opacification: An in vitro study. *International Journal of Molecular Medicine*, *41*, 2099–2107. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3398>.
- Foukas, L. C., Bilanges, B., Bettedi, L., Pearce, W., Ali, K., Sancho, S., Withers, D. J., & Vanhaesebroeck, B. (2013). Long-term p110 α PI3K inactivation exerts a beneficial effect on metabolism. *EMBO Molecular Medicine*, *5*, 563–571. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201953>.
- Frazzetto, M., Suphioglu, C., Zhu, J., Schmidt-Kittler, O., Jennings, I. G., Cranmer, S. L., Jackson, S. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Thompson, P. E. (2008). Dissecting isoform selectivity of P13K inhibitors: The role of non-conserved residues in the catalytic pocket. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20080512>.
- Furet, P., Guagnano, V., Fairhurst, R. A., Imbach-Weese, P., Bruce, I., Knapp, M., Fritsch, C., Blasco, F., Blanz, J., Aichholz, R., Hamon, J., Fabbro, D., & Caravatti, G. (2013). Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase α inhibitor selected for clinical evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *23*(13), 3741–3748. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.007>
- García, M. G., Alaniz, L. D., Cordo Russo, R. I., Alvarez, E., & Hajos, S. E. (2009). PI3K/Akt inhibition modulates multidrug resistance and activates NF- κ B in murine lymphoma cell lines. *Leukemia Research*, *33*(2), 288–96. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.06.010>.
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, *18*(15), 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Hedges, C. P., Boix, J., Jaiswal, J. K., Shetty, B., Shepherd, P. R., & Merry, T. L. (2021). Efficacy of providing the PI3K p110 α inhibitor BYL719 (alpelisib) to middle-aged mice in their diet. *Biomolecules*, *11*(2), 150. <https://doi.org/10.3390/biom11020150>
- Hedges, C. P., Pham, T., Shetty, B., Masson, S. W. C., Hickey, A. J. R., Shepherd, P. R., & Merry, T. L. (2020). Prolonged treatment with a PI3K p110 α inhibitor causes sex- and tissue-dependent changes in antioxidant content, but does not affect mitochondrial function. *Bioscience Reports*, *40*(10), BSR20201128. <https://doi.org/10.1042/BSR20201128>.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *18*(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Hillmann, P., & Fabbro, D. (2019). PI3K/mTOR pathway inhibition: Opportunities in oncology and rare genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22), 5792. <https://doi.org/10.3390/ijms20225792>
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *65*(3), 712–725. <https://doi.org/10.1002/prot.21123>
- Hu, X., Wang, Z., Chen, M., Chen, X., & Liang, W. (2018). The anti-osteosarcoma cell activity by a mTORC1/2 dual inhibitor RES-529. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *497*(2), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.050>.
- Hu, X., Xia, M., Wang, J., Yu, H., Chai, J., Zhang, Z., Sun, Y., Su, J., & Sun, L. (2020). Dual PI3K/mTOR inhibitor PKI-402 suppresses the growth of ovarian cancer cells by degradation of Mcl-1 through autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *129*, 110397. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110397>
- Huang, K., Luo, S., Cong, Y., Zhong, S., Zhang, J. Z. H., & Duan, L. (2020). An accurate free energy estimator: Based on MM/PBSA combined with interaction entropy for protein-ligand binding affinity. *Nanoscale*, *12*(19), 10737–10750. <https://doi.org/10.1039/C9NR10638C>
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. Q. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(11), 1483–1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
- Huang, Y., Xue, X., Li, X., Jia, B., Pan, C. X., Li, Y., & Lin, T. Y. (2020). Novel nanococktail of a dual PI3K/mTOR inhibitor and cabazitaxel for castration-resistant prostate cancer. *Advanced Therapeutics*, *3*(10), 2000075. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000075>
- Jiang, Q., Weiss, J. M., Back, T., Chan, T., Ortaldo, J. R., Guichard, S., & Wiltout, R. H. (2011). mTOR kinase inhibitor AZD8055 enhances the immunotherapeutic activity of an agonist CD40 antibody in cancer treatment. *Cancer Research*, *71*(12), 4074–4084. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3968>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Kennedy, S. P., O'Neill, M., Cunningham, D., Morris, P. G., Toomey, S., Blanco-Aparicio, C., Martinez, S., Pastor, J., Eustace, A. J., & Hennessy, B. T. (2020). Preclinical evaluation of a novel triple-acting PIM/PI3K/mTOR inhibitor, IBL-302, in breast cancer. *Oncogene*, *39*(14), 3028–3040. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1202-y>
- Kim, D. H., Sarbasov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, *110*(2), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5)
- Kumari, R., Kumar, R., Lynn, A., & Open Source Drug Discovery Consortium. (2014). G-mmpbsa - A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(7), 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>
- Laplanche, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 20), 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>
- Laplanche, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Li, L., Li, C., Zhang, Z., & Alexov, E. (2013). On the dielectric “constant” of proteins: Smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *9*(4), 2126–2136. <https://doi.org/10.1021/ct400065j>
- Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z., Li, W., Hu, J., Lu, C., & Liu, Y. (2020). PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death & Disease*, *11*(9), 797. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02998-6>
- Luszczak, S., Simpson, B. S., Stopka-Farooqui, U., Sathyadevan, V. K., Echeverria, L. M. C., Kumar, C., Costa, H., Haider, A., Freeman, A., Jameson, C., Ratynska, M., Ben-Salha, I., Sridhar, A., Shaw, G., Kelly, J. D., Pye, H., Gately, K. A., Whitaker, H. C., & Heavey, S. (2020). Co-targeting PIM and PI3K/mTOR using multikinase inhibitor AUM302 and a combination of AZD-1208 and BEZ235 in prostate cancer. *Scientific Reports*, *10*, 14380. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71263-9>.
- Malley, C. O., & Pidgeon, G. P. (2016). The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials. *BBA Clinical*, *5*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.11.003>
- Mohlin, S., Hansson, K., Radke, K., Martinez, S., Blanco-Aparicio, C., Garcia-Ruiz, C., Welinder, C., Esfandyari, J., O'Neill, M., Pastor, J., Stedingk, K., & Bexell, D. (2019). Anti-tumor effects of PIM/PI 3K/mTOR triple kinase inhibitor IBL -302 in neuroblastoma. *EMBO Molecular Medicine*, *11*, e10058. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810058>.
- Narayan, P., Prowell, T. M., Gao, J. J., Fernandes, L. L., Li, E., Jiang, X., Qiu, J., Fan, J., Song, P., Yu, J., Zhang, X., King-Kallimanis, B. L., Chen, W., Ricks, T. K., Gong, Y., Wang, X., Windsor, K., Rhieu, S. Y., Geiser, G., ... Beaver, J. A. (2021). FDA approval summary: Alpelisib plus fulvestrant for patients with HR-positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated, advanced or metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *27*(7), 1842–1849. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3652>
- O'Neil, M., Aparicio, C. B., Jiang, S., Martinez, S., McKenzie, A., Page, M., & Pastor, J. (2014). Abstract 4524: Combined inhibition of PIM and PI3 kinases shows an enhanced efficacy in a number of solid tumour cell lines [Paper presentation]. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2014-4524>
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pK_a predictions BT. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *7*(2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>

- Park, S., Chapuis, N., Bardet, V., Tamburini, J., Gallay, N., Willems, L., Knight, Z. A., Shokat, K. M., Azar, N., Vigiú, F., Ifrah, N., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., & Bouscary, D. (2008). PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia*, 22(9), 1698–1706. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.144>
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Patsouris, A., Augereau, P., Frenel, J. S., Robert, M., Gourmelon, C., Bourbouloux, E., Berton-Rigaud, D., Chevalier, L. M., & Campone, M. (2019). Benefits versus risk profile of buparlisib for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Drug Safety*, 18(7), 553–562. <https://doi.org/10.1080/14740338.2019.1623877>
- Poli, G., Granchi, C., Rizzolio, F., & Tuccinardi, T. (2020). Application of MM-PBSA methods in virtual screening. *Molecules*, 25(8), 1971. <https://doi.org/10.3390/molecules25081971>
- Rehan, M. (2019). Anticancer compound XL765 as PI3K/mTOR dual inhibitor: A structural insight into the inhibitory mechanism using computational approaches. *PLoS One*, 14(6), e0219180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219180>
- Reidy, M., vanDijk, M., Keane, N., O'Neill, M., & O'Dwyer, M. E. (2014). Initial evaluation of novel dual PIM/PI3K and triple PIM/PI3K/mTOR inhibitors in multiple myeloma. *Blood*, 124(21), 5713–5713. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.5713.5713>
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, NY)*, 304(5670), 554–554. <https://doi.org/10.1126/science.1096502>
- Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., Ikeda, K., & Mizuguchi, M. (2012). Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nature Communications*, 3, 1292. <https://doi.org/10.1038/ncomms2295>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Shukuya, T., Yamada, T., Koenig, M. J., Xu, J., Okimoto, T., Li, F., Amann, J. M., & Carbone, D. P. (2019). The effect of LKB1 activity on the sensitivity to PI3K/mTOR inhibition in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(6), 1061–1076. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.02.019>
- Sibanda, B. L., Chirgadze, D. Y., & Blundell, T. L. (2010). Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. *Nature*, 463(7277), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature08648>
- Tarantelli, C., Gaudio, E., Kwee, I., Rinaldi, A., Stifanelli, M., Bernasconi, E., Barassi, C., Hillmann, P., Stathis, A., Carrassa, L., Brogini, M., Stussi, G., Fabbro, D., Hebeisen, P., Betts, F., Wicki, A., Zucca, E., Cmilianovic, V., & Berton, F. (2014). The novel PI3K/mTOR dual inhibitor PQR309 in pre-clinical lymphoma models: Demonstration of anti-tumor activity as single agent and in combination and identification of gene expression signatures associated with response. *Blood*, 124(21), 1782. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/1782.abstract>. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.1782.1782>
- Tarantelli, C., Lupia, A., Stathis, A., & Berton, F. (2020). Is there a role for dual PI3K/mTOR inhibitors for patients affected with lymphoma? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1060. <https://doi.org/10.3390/ijms21031060>
- Triscott, J., & Rubin, M. A. (2018). Prostate power play: Does Pik3ca accelerate Pten-deficient cancer progression? *Cancer Discovery*, 8(6), 682–685. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0369>
- Wang, C., Wang, X., Su, Z., Fei, H., Liu, X., & Pan, Q. (2015). The novel mTOR inhibitor Torin-2 induces autophagy and downregulates the expression of UHRF1 to suppress hepatocarcinoma cell growth. *Oncology Reports*, 34(4), 1708–1716. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4146>
- Wu, Y. Y., Wu, H. C., Wu, J. E., Huang, K. Y., Yang, S. C., Chen, S. X., Tsao, C. J., Hsu, K. F., Chen, Y. L., & Hong, T. M. (2019). The dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 restricts the growth of lung cancer tumors regardless of EGFR status, as a potent accompanist in combined therapeutic regimens. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 282. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1282-0>
- Xu, Z.-Z., Shen, J.-K., Zhao, S.-Q., & Li, J.-M. (2018). Clinical significance of chemokine receptor CXCR4 and mammalian target of rapamycin (mTOR) expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 59(6), 1451–1460. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1379077>
- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P. (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448), 217–223. <https://doi.org/10.1038/nature12122>
- Yap, T. A., Bjerke, L., Clarke, P. A., & Workman, P. (2015). Drugging PI3K in cancer: Refining targets and therapeutic strategies. *Current Opinion in Pharmacology*, (23), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.016>
- Zhang, X., Wang, X., Qin, L., Xu, T., Zhu, Z., Zhong, S., Zhang, M., & Shen, Z. (2015). The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor PP242 shows strong antitumor activity in a pheochromocytoma PC12 cell tumor model. *Urology*, 85(1), 273.e1–273.e7. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.09.020>
- Zhao, Y., Zhang, X., Chen, Y., Lu, S., Peng, Y., Wang, X., Guo, C., Zhou, A., Zhang, J., Luo, Y., Shen, Q., Ding, J., Meng, L., & Zhang, J. (2014). Crystal structures of PI3K α complexed with PI103 and its derivatives: New directions for inhibitors design. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5(2), 138–142. <https://doi.org/10.1021/ml400378e>
- Zheng, Z., Amran, S. I., Thompson, P. E., & Jennings, I. G. (2011). Isoform-selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase: Identification of a New Region of nonconserved amino acids critical for p110 α inhibition. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.111.072546>
- Zheng, Z., Amran, S. I., Zhu, J., Schmidt-Kittler, O., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Shepherd, P. R., Thompson, P. E., & Jennings, I. G. (2012). Definition of the binding mode of a new class of phosphoinositide 3-kinase α -selective inhibitors using in vitro mutagenesis of non-conserved amino acids and kinetic analysis. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20120499>
- Zhu, Y. R., Zhou, X. Z., Qing Zhu, L., Yao, C., Fang, J. F., Zhou, F., Deng, X. W., & Zhang, Y. Q. (2016). The anti-cancer activity of the mTORC1/2 dual inhibitor XL388 in preclinical osteosarcoma models. *Oncotarget*, 7(31), 49527–49538. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10389>

**PROSPECÇÃO DE
INIBIDORES ENTRE
COMPOSTOS DE ORIGEM
VEGETAL**

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção de Conformações

A fim de identificar o número mínimo de conformações protéicas, necessárias para reproduzir os dados experimentais de complexos proteína-inibidores, foram realizados testes de auto-ancoramento (do inglês, self-docking) e ancoramento cruzado (do inglês, cross-docking). Adicionalmente, esta abordagem auxiliou na seleção dos parâmetros de ancoramento que foram posteriormente utilizados durante a triagem virtual.

Conforme observado para ambas as proteínas, os resultados de auto-ancoramento (figura 7) e ancoramento cruzado (figuras 8 e 9) foram melhores quando utilizado uma área de busca menor (20x20x20). Inicialmente, o tamanho da caixa foi definido com base na análise dos resultados de auto-ancoramento. Na figura 7 é possível notar que, enquanto na PI3K α a utilização de uma caixa menor promoveu apenas pequenas alterações durante o auto-ancoramento, na mTOR foi observada uma melhora significativa dos resultados ao reduzirmos as dimensões para 20x20x20 (x,y,z).

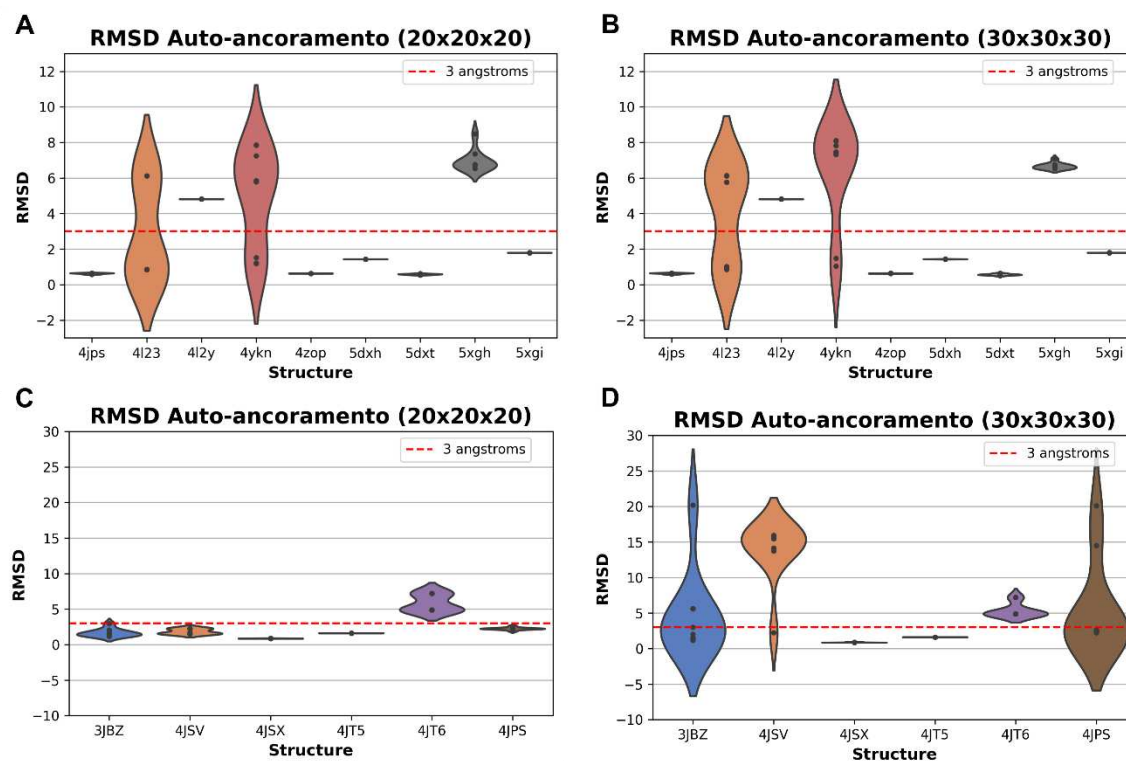


Figura 7: Desvio médio quadrático (RMSD) em simulação de auto-ancoramento utilizando distintas dimensões de caixa de busca para estruturas cristalográficas da PI3K α (A e B) e mTOR (C e D).

Em seguida, foram realizadas simulações de ancoramento cruzado com a finalidade de selecionarmos o menor número de estruturas capazes de reproduzir, com qualidade, todos os resultados experimentais observados através das estruturas cristalográficas disponíveis na literatura. Nestas simulações, cada um dos nove ligantes cristalográficos da PI3K α foi encaixados nos receptores cristalográficos dos outros oito ligantes. Conforme observado na figura 8, a qual descreve os resultados para a PI3K α , a remoção das estruturas 4JPS, 4L2Y, 4ZOP, 5DXH e 5DXT do conjunto conformacional não causa nenhum prejuízo aos resultados. Entre as estruturas mantidas, 5XGI e 4YKN foram capazes de reproduzir aproximadamente (RMSD abaixo de 3Å) dos dados cristalográficos de seis dos nove complexos analisados, enquanto que 4L23 reproduziu apenas um complexo.

Enquanto que a combinação das estruturas 5XGI e 4YKN sozinhas representam uma opção adequada para o ancoramento da maioria dos ligantes, a estrutura 4L23 foi mantida pois representa a única estrutura no conjunto final a ligar-se a um inibidor dual. Infelizmente, não foi possível reproduzir os dados observados no cristal 5XGH, conforme observado nas figuras 7 e 8, e por isto esta estrutura foi removida das etapas posteriores. Por fim, para tornar mais ampla a escolha de estruturas, de forma a considerar coordenadas dos receptores no estado ligado e desligado (na ausência de um ligante), foram adicionas as estruturas 3HIZ e 4LIB ao conjunto final de conformações selecionadas.

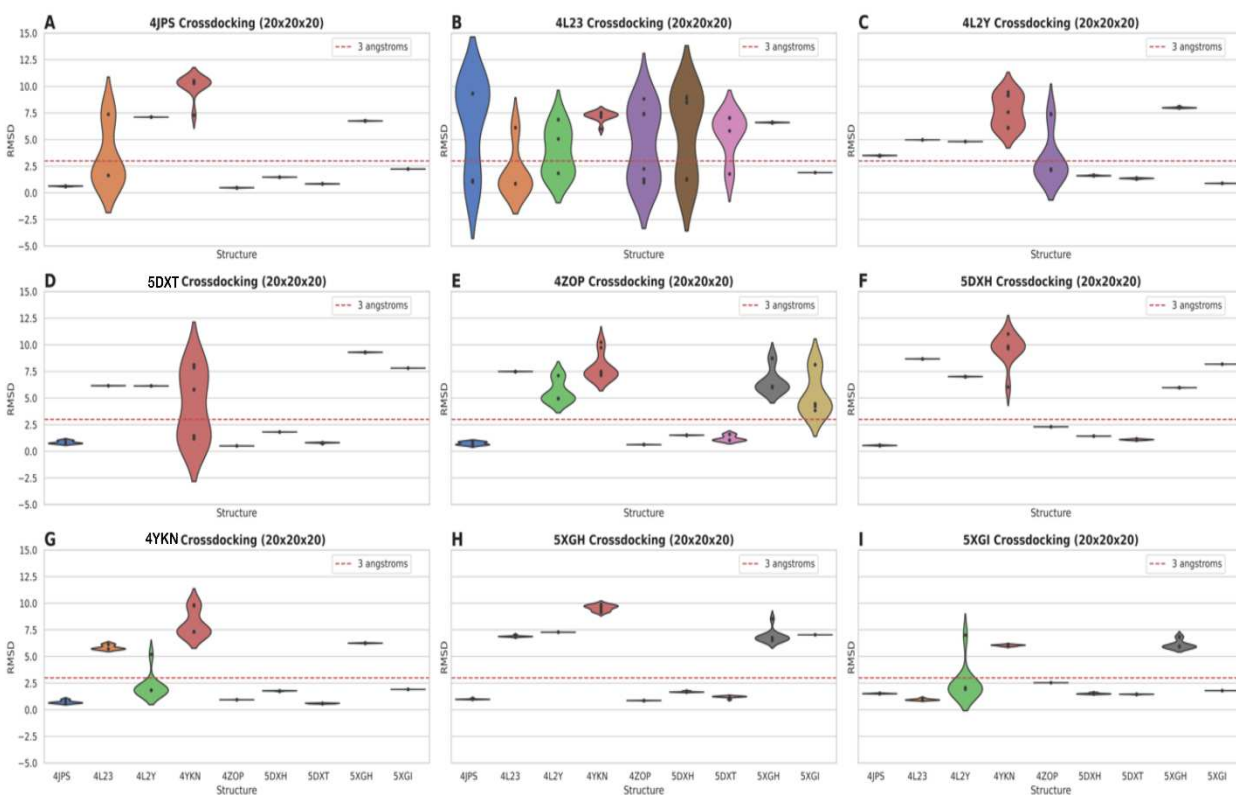


Figura 8: Desvio médio quadrático (RMSD) em simulação de ancoramento cruzado para estruturas cristalográficas da PI3K α .

De forma similar, conforme observado na figura 9, foram realizadas simulações de ancoramento cruzado com conjunto conformacional da mTOR. Nestas simulações, cada um dos seis ligantes cristalográficos da mTOR foram encaixados nos receptores cristalográficos dos outros cinco ligantes. Entre as estruturas mantidas, a 4JSV foi capaz de reproduzir aproximadamente (RMSD abaixo de 3Å) os dados cristalográficos de cinco dos seis complexos analisados, 4JSX reproduziu aproximadamente quatro, 4JSP e 3JBZ reproduziram em torno de três, 4JT5 e 4JT6 reproduziram dois. A 4JT6 foi conservada pois representa a única estrutura no conjunto final a ligar-se a um inibidor dual. Para finalizar, foi adicionada ao conjunto final de conformações selecionadas a estrutura 4JSN, para tornar mais ampla a escolha de estruturas ao considerar-se as coordenadas de um receptor no estado desligado (na ausência de um ligante).

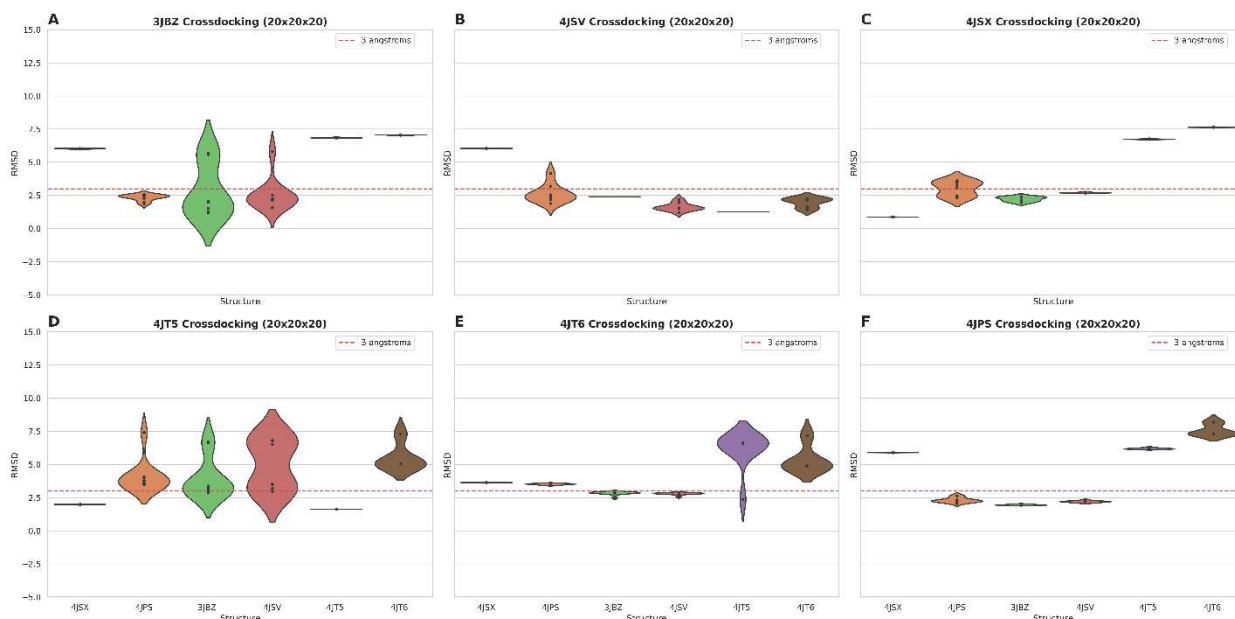


Figura 9: Desvio médio quadrático (RMSD) em simulação de ancoramento cruzado para estruturas cristalográficas da mTOR.

Portanto, foram selecionadas as estruturas 3HIZ, 3JBZ, 4L23, 4L1B, 4YKN e 5XGI como componentes do conjunto de conformações representativas da PI3K α , e as estruturas 4JT6, 3JBZ, 4JSX, 4JT5, 4JSV, 4JPS e 4JSN como componentes do conjunto de conformações representativas da mTOR. Todas estas estruturas foram posteriormente utilizadas nas etapas de triagem de compostos de origem vegetal.

6.2 Triagem virtual baseada em ancoramento molecular com conjuntos conformacionais

Após a seleção das estruturas para execução triagem virtual, realizou-se a ancoragem dos 1745 compostos vegetais do banco de dados NuBBE. Em seguida, esses compostos foram classificados seguindo o critério de afinidade, considerando energias de ligação mais baixas, com base na pontuação função da AutoDock Vina (TROT & OLSON, 2010).

Na figura 10, é mostrado a distribuição de energia durante a triagem virtual baseada em ancoramento molecular com conjuntos conformacionais da PI3K α e mTOR. Tanto mTOR quanto PI3K α foram semelhantes quanto a distribuição de energias dos compostos do NuBBE, as energias se concentram entre -11 kcal e -6 kcal, 1741. Os compostos apresentaram energia ≥ -11.0 kcal/mol, apenas 3 compostos apresentaram um energia ≤ -12.3 kJ/mol.

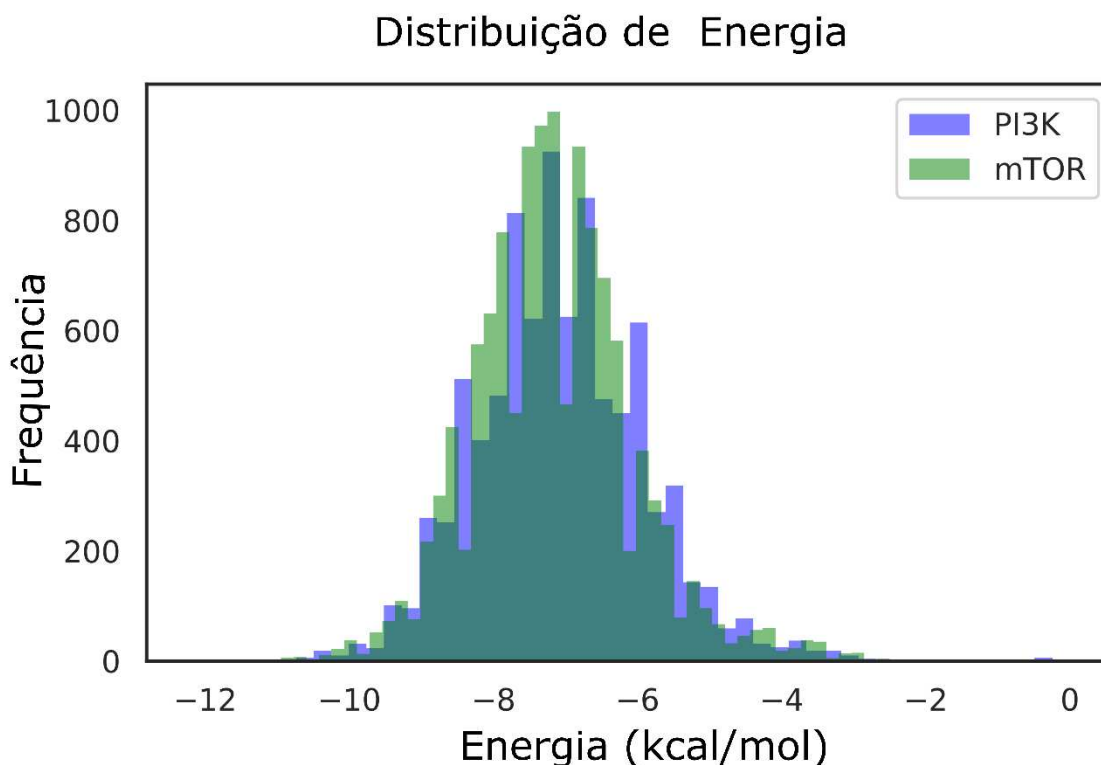


Figura 10: Distribuição da energia (Kcal/mol) dos compostos vegetais da triagem virtual nas proteínas PI3K α (cor azul) e mTOR (verde claro).

Para etapa seguinte, selecionou-se 10% (174) dos compostos com menores energias de cada proteína, e desses, foram selecionados somente aqueles com perfil de inibição dual (102), ou seja, tiveram a sua ligação aos sítios catalíticos de ambas proteínas (mTOR/PI3K α). Podemos observar na figura 11 que os candidatos estão distribuídos entre sete classes, sendo que, a maioria (41%) se concentram na classe dos flavonoides, seguido os alcaloides (22%), derivados aromáticos (16%), terpenos (15%), lignóides (4%), taninos (2%) e chalconas (2%). Corroborando com nossos resultados, Galúcio e colaboradores (2019) comparam os compostos naturais do NuBBE com drogas anticancerígenas aprovadas pela FDA usando abordagens *in silico*. Através das análises de Drug-likeness, 172 compostos do NuBBE se encaixam nas propriedades desejadas da análise, sendo que a maioria desses compostos eram flavonoides (61 compostos). Adicionalmente, os pesquisadores também identificaram compostos das classes terpenos (32) e lignóides (14) (GALÚCIO *et al.*, 2019).

Dentre os compostos selecionados como potenciais inibidores do sítio catalítico da PI3K α , a menor energia observada foi de -12.2 kcal/mol e a maior foi -9.1 kcal/mol. Para estruturas

da enzima mTOR, a menor energia de ligação foi -11.3 e a maior foi de -9.1 kcal/mol . Os números de ligações rotáveis apresentado no eixo x (figura 11) variaram entre 0 e 8. O peso molecular variara entre 245 a 650 g/mol, sendo que a maioria dos compostos (35) apresentaram peso molecular em torno de 300g/mol.

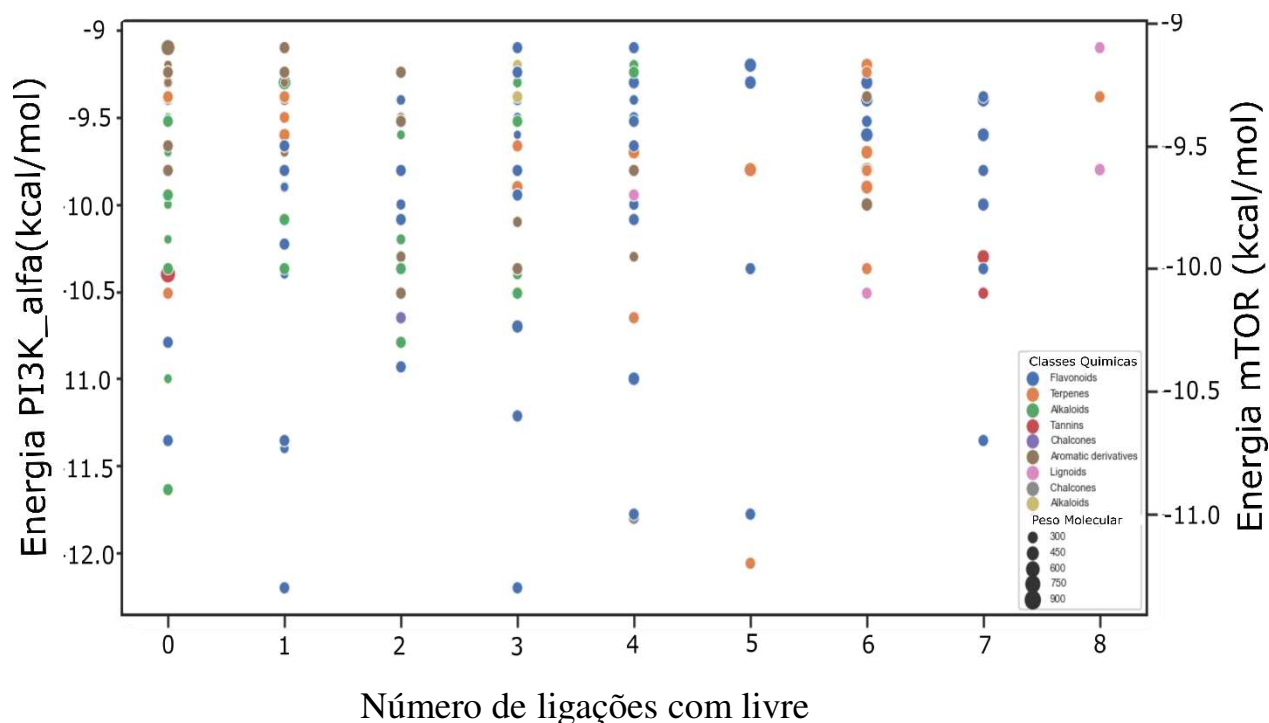


Figura 11: No gráfico é possível observar a distribuição de energia dos compostos vegetais candidatos a ligantes duais nas enzimas PI3K/mTOR(eixo y), número de ligações com livre rotação (eixo x), diferenças entre as classes dos compostos(mostrado em cores dife diferentes) e o peso molecular mostrado na diferenças de tamanhos de cada ponto, que corresponde a uma molécula diferente.

Entre os compostos candidatos a inibidores duais, foram identificados onze compostos com alta afinidade ao sítio catalítico de ambas as enzimas e ótimas características farmacocinéticas. Destes, nove pertencem à classe dos biflavonoides, enquanto que os demais pertencem às classes alcaloides e terpenos. Conforme descrito na tabela 1, o Amentoflavone mostrou mais valor negativo de energia livre de ligação -12.3 kcal/mol na estrutura PI3K α e -11.3 kcal/mol na mTOR, seguido Podocarpusflavone A com energia de -12 kcal/mol para PI3K α e -11.3 kcal/mol para mTOR. Para mTOR o terceiro melhor composto foi 3 β -O-trans-p-coumaroyl-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oi com energia de -11.2 kcal/mol, já para PI3K α ele ficou na última posição de melhor de energia de afinidade com -8.6 kcal/mol. O composto Heveaflavone ocupa o quarto lugar de melhor

energia de atração -11 kcal/mol para enzima mTOR e para PI3K α ele ocupa a sexta posição com -10.4 kcal/mol. Como quinto melhor composto de energia de ligação para ambas enzimas, o Amentoflavone 7",4"" com energia de -10.7 kcal/mol na PI3K α e na mTOR apresentou energia de -11 kcal/mol.

O Atalaphyllinine ocupa o sexto lugar de melhor energia de ligação -10.9 kcal/mol na mTOR já para PI3K α ele ficou na nona posição com -9.4 kcal/mol. Em sétima posição o 7,8-(2",2"-dimethylpyrano)-flavone) com energia de -10.7 kcal/mol no sitio catalítico da mTOR e para PI3K α apresentou energia de -9.4 (kcal/mol). Seguindo, o composto Xambioona ligou-se na mTOR com uma energia de -10.7 kcal/mol, ocupando a oitava posição, enquanto que, na PI3K α ele ocupou a terceira posição (-11.4 kcal/mol). Na nona posição para mTOR se destaca o composto 3',4'-methylenedioxy-7,8-(2",2"-dimethylpyrano)-flavone) com energia de -10.7 kcal/mol na estrutura da mTOR, o mesmo ocupa a quarta posição para PI3K α com melhor energia de ligação. Em décimo lugar para mTOR e PI3K α o composto Limonianin com energia de -10.6 kcal/mol e -9.1 kcal/mol respectivamente. Em último lugar o Erythrisenegalone apresentou energia de -10.4 kcal/mol na mTOR, o mesmo ficou em sétimo lugar como melhor energia de ligação -9.5 kcal/mol.

Por fim, os resultados da ancoramento molecular mostraram que a estrutura 4YKN da PI3K α reproduziu oito compostos dos onze melhores, enquanto a 4L1B reproduziu dois e a 5XGI reproduziu apenas um. Para mTOR, a estrutura que mais reproduziu os compostos foi a 4JT6, seguida a 4JSX com 4 compostos .

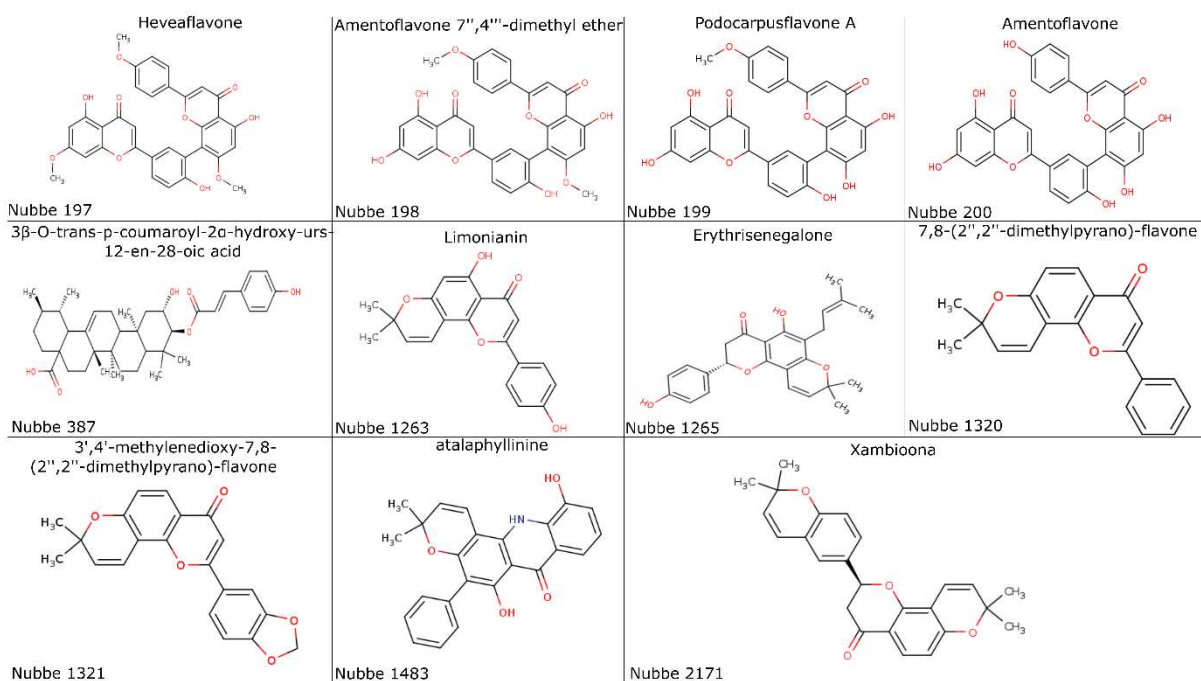


Figura 12: Estrutura plana dos onze melhores compostos de origem vegetal com perfil dual.

6.3. Rescoring MM/PBSA

Os onze complexos(Figura 12) selecionados na etapa anterior foram submetidos à dinâmica molecular e cálculos de energia relativa de ligação através do MM/PBSA. Neste contexto, o cálculo foi utilizado para reclassificar os compostos selecionados. O cálculo de MM/PBSA foi realizado a partir de uma dinâmica de tempo curto. O método MM/PBSA também pode ser executado em simulações de DM simples. Isso permite acelerar consideravelmente o tempo de computação necessário para calcular a energia de ligação associada a um único complexo ligante-proteína, e assim, avaliar um grande número de complexos em um tempo razoável (POLI *et al.*, 2020) .

O cálculo de energia livre de ligação foi realizado através da análise de 100 quadros da simulação, selecionados entre os tempos 2ns e 10ns. Os resultados permitiram selecionar os quatro melhores candidatos a inibidores duais das enzimas mTOR e PI3K α , os quais foram posteriormente submetidos a uma análise de atropoisomerismo.

As energias livres de ligação (MM/PBSA) dos Composto Heveaflavone, Amentoflavone 7",4"-dimethyl ether, Podocarpusflavone A, Amentoflavone , Xambioona , Erythrisenegalone , Atalaphyllinine , 3',4'-methylenedioxy-7,8-(2",2"-dimethylpyrano)-flavone) , Limonianin, 7,8-(2",2"-dimethylpyrano)-flavone) e 3 β -O-trans-p-coumaroyl-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid com os alvos mTOR e PI3K α são mostradas na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Resultados dos cálculos de energia de interação obtidos durante o ancoramento molecular e através do método MM-PBSA. Energias expressas em kcal/mol.

Compostos	Energia ancoramento (kcal/mol)	PI3K-alpha	MM/PBSA (kcal/mol)
3 β -O-trans-p-coumaroyl-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid	-8.6	5XGI	-35.25
Amentoflavone 7",4"-dimethyl ether	-10.7	4YKN	-28.33
<u>Amentoflavone</u>	-12.3	4YKN	-28.11
<u>Heveaflavone</u>	-10.4	4YKN	-27.79
<u>Podocarpusflavone A</u>	-12	4YKN	-26.48
<u>Atalaphyllinine</u>	-9.4	4YKN	-26.01
<u>3',4'-methylenedioxy-7,8-(2",2"-dimethylpyrano)-flavone</u>	-11	4YKN	-23.18
<u>Xambioona</u>	-11.4	4YKN	-21.74
<u>Erythrisenegalone</u>	-9.5	4L1B	-21.39
<u>7,8-(2",2"-dimethylpyrano)-flavone)</u>	-9.4	4LB1	-21.24
<u>Limonianin</u>	-9.1	4YKN	-21.22

Para proteína PI3K α , os cálculos mostraram que o composto 3 β -O-trans-p-coumaroyl-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid apresentou melhor energia de atração com -35.25 kcal/mol. Em segundo, o composto Amentoflavone 7",4"-dimethyl ether com energia de -28.33 kcal/mol. O terceiro melhor ligante previsto pelo cálculo de MM/PBSA foi composto Amentoflavone, com uma energia livre de ligação calculada de -28.11 kcal/mol, o quarto melhor foi o composto Heveaflavone com energia de -27.79 kcal/mol e em quinto lugar o composto Podocarpusflavone A com energia de -26.48 kcal/mol. Já para mTOR o cálculo mostrou que o composto Heveaflavone teve maior energia de ligação -34.82/mol, o segundo melhor ligante previsto pelo

cálculo de MM/PBSA foi composto Podocarpusflavone A com uma energia de -29.95 kcal/mol, em terceiro, o melhor composto com energia de atração foi o Amentoflavone com -28.11 /mol, em quarto o Erythrisenegalone (kcal/mol) e em quinto lugar Xambioona com energia de -25.84 kcal/mol.

Em resumo, a partir da afinidades de ligação através dos cálculos de MM/PBSA, alguns compostos foram classificados de forma diferente da ancoramento molecular, mas os compostos Heveaflavone, Podocarpusflavone A e Amentoflavone permaneceram entre as cinco melhores energias de atração. Podemos observar, que o composto 3 β -O-trans-p-coumaroyl-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid no cálculo de MM/PBSA apresentou maior energia (-35.25 kcal/mol) de atração para PI3K α , mas apresentou valores de energia repulsivas para mTOR (4.56 kcal/mol) e, por esse motivo, este composto foi removido das etapas posteriores de análise. O composto Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether foi o segundo melhor composto para PI3K α (-28.33 kcal/mol) e apresentou energia significativa na mTOR (-20.04 kcal/mol), por esse motivo esse composto foi mantido entre os quatro melhores.

No final, foi identificado que os quatro compostos (Heveaflavone, Amentoflavone 7",4"" , Podocarpusflavone A e Amentoflavone) apresentaram melhores energias de ligação para as duas enzimas PI3K α /mTOR, ou seja, ambos apresentam potencial inibitório dual. Interessantemente, os quatro compostos são isolados da mesma espécie, *Ouratea multiflora* (Ochnaceae) (CARBONEZI *et al.*, 2007), e pertencem a classe dos biflavonoides. um tipo de flavonoides, e compreendem um grande grupo de compostos com atividades antioxidantes e anticancerígenas (TEWARI *et al.*, 2019).

Tabela 2: Comparação dos resultados do MM-PBSA com docking para inibidores potenciais e compostos de referência de topo de ranking

Compostos	Ancoramento (kcal/mol)	mTOR	MM/PBSA (kcal/mol)
Heveaflavone	-11.1	4JT6	-34.82
Podocarpusflavone A	-11.3	4JSX	-29.95
Amentoflavone	-11.3	4JT6	-29.26
Erythrisenegalone	-10.4	4JSX	-26.59
Xambioona	-10.7	4JSX	-25.84
Atalaphyllinine	-10.9	4JT5	-25.56
3',4'-methylenedioxy-7,8-(2'',2''-dimethylpyrano)-flavone	-10.7	4JT6	-24.57
Limonianin	-10.6	4JT6	- 24.36
7,8-(2'',2''-dimethylpyrano)-flavone	-10.7	4jt6	-21.18
Amentoflavone 7'',4'''	-11.0	4JSX	-20.04
3 β -O-trans-p-coumaroyl-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid	-11.2	4JT6	4.56

Uma característica interessante dos biflavonóides é que os mesmos apresentam atropoisomerismo, a qual raramente é caracterizada durante o isolamento da substância. O atropoisomerismo, é um tipo de estereoisomerismo característico de sistemas onde a rotação livre em torno de uma ligação simples é impedida, este tipo de isomeria axial é caracterizada pela atividade ótica promovida por um eixo de ligação, a nomenclatura de substâncias que apresentam quiralidade axial pode ser atribuída como R ou S (YOGANATHAN et al., 2021). Dado que esta informação é fundamental para o melhor entendimento do perfil inibitório destes compostos, e poderá influenciar as etapas posteriores de síntese e teste dos compostos selecionados. Neste trabalho, para melhor compreendermos os efeitos das configurações do atropoisomerismo desses biflavonoides, foi realizado uma segunda bateria de ancoramento molecular considerando ambas as configurações, R ou S, seguida de cálculos MM/PBSA.

Tabela 3: Energias dos resultados do ancoramento molecular e MM/PBSA para análise do atropisomerismo dos compostos selecionados para proteína mTOR.

Compostos	mTOR	Energia ancoramento (kcal/mol)	MM/PBSA (kcal/mol)	Input	Output	mTOR	Energia ancoramento (kcal/mol)	MM/PBSA (kcal/mol)	Input	Output
Podocarpusflavone A	4JSX	-11.3	-29.95	SA	SA	4JSX	-10.8	-35.47	RA	SA
Amentoflavone	4JT6	-11.3	-29.26	RA	RA	4JT6	-10.9	-26.94	SA	SA
Heveaflavone	4JT6	-11	-34.82	SA	SA	4JT6	-10.6	-32.81	RA	RA
Amentoflavone 7",4"-dimethyl ether	4JSX	-11	-20.04	RA	SA	4JSX	-10.4	-28.84	SA	SA

Os resultados indicam que o composto Podocarpusflavone A tem preferência de ligação na mTOR através da configuração S, enquanto que na PI3K α a ligação preferencial se dá na conformação R. O composto Amentoflavone, por sua vez, apresentou perfil de ligação racêmico na mTOR (R: -29.26 kcal/mol; S: -26.94 kcal/mol), enquanto que na PI3K α a ligação preferencial ocorreu na conformação R. Já o composto Amentoflavone 7",4" apresentou ligação à mTOR preferencialmente na conformação S, enquanto que na PI3K α apresentou perfil de ligação racêmico (R: -20.05 kcal/mol; S: -25.61 kcal/mol). Por fim, o composto Heveaflavone diferenciou-se dos demais por não apresentar atividade estereoespecífica nas proteínas analisadas, interagindo com perfil de ligação racêmico tanto na mTOR, quanto na PI3K α .

O atropisomerismo na descoberta de drogas tem sido amplamente aceito devido à presença de uma ou mais quiralidades axiais em uma grande porcentagem de drogas usadas clinicamente. Do ponto de vista econômico e técnico, fármacos quirais são menos custosos e mais fáceis de serem sintetizados. Do ponto de vista farmacológico, a quiralidade pode estar envolvida em eventos adversos (SINGH *et al.*, 2021).. Desta forma, ao se pensar em fármacos com potencial de inibição dual, espera-se que doses menores representem maior tolerabilidade, ou seja, compostos cuja mesma configuração (R ou S) inibem ambas as enzimas são mais desejáveis do que aqueles que necessitam misturas racêmicas. A racemização é o processo de mistura de dois enantiômeros (R/S) com quantidades iguais, o paciente que recebe essa droga, provavelmente ficara exposto por muito tempo aos dois enantiômeros e podem apresentar propriedades diferentes

que podem precisar ser levados em consideração ao desenvolver um novo medicamento (BALLARD *et al.*, 2019).

Tabela 4: Energias dos resultados do ancoramento molecular e MM/PBSA para análise do atropoisomerismo dos compostos selecionados para proteína PI3K α

Compostos	PI3K-alpha	Energia ancoramento (Kcal/mol)	MM/PBSA (kcal/mol)	Input	Output	PI3K-alpha	Vina (kcal/mol)	MM/PBSA (kcal/mol)	Input	Output
Amentoflavone	4YKN	-12.3	-28.11	RA	RA	4YKN	-10.2	-17.93	SA	RA
Podocarpusflavone A	4YKN	-12	-26.5	SA	RA	4YKN	-10.2	-23.75	RA	RA
Amentoflavone 7",4"-dimethyl ether	4YKN	-10.7	-20.05	RA	RA	4YKN	-9.3	-25.61	SA	SA
Heveaflavone	4YKN	-10.4	-27.79	SA	SA	4YKN	-10.2	-24.17	RA	RA

6.4 Análise do comportamento da energia total de ligação

Para observar a flutuação da energia de interação total de ligação em função da distância do ligante, a energia individual de interação dos resíduos, localizados até 10 Å do ligante, foi somada e plotada contra a distância (figura 13). As distâncias foram calculadas utilizando a última configuração do sistema nas trajetórias de 10ns.

O cálculo de MMPBSA mostrou que o complexo PI3K α -Heveaflavone S interagiu com energia total de -11.67 (kcal/mol), com resíduos localizados a 3,5 Å correspondendo um total de 83.80%. Já interação entre PI3K α -Heveaflavone R apresentou uma interação de -9.17(kcal/mol), sendo que 88.79 % correspondem a energia de interação dos resíduos localizados até 3.5 Å.

O cálculo da energia total para o complexo PI3K α -Amentoflavone 7",4" R foi de -9.73 (kcal/mol), com resíduos dentro de 3.5 Å correspondendo um total 95%. Enquanto PI3K α -Amentoflavone 7",4" S interagiu com energia total -9.20 kcal/mol, sendo que 97% correspondem a energia de interação dos resíduos localizados até 3.5 Å. O complexo PI3K α - Podocarpusflavone A R apresentou energia total de -9.95kcal/mol, 84,22% da energia de interação resíduos é representada até 3,5 Å. Para finalizar, o complexo PI3K α - Amentoflavone R apresentou energia total de -11.7kcal/mol, com resíduos localizados a 3.5 Å representando 78.63% da energia de interação.

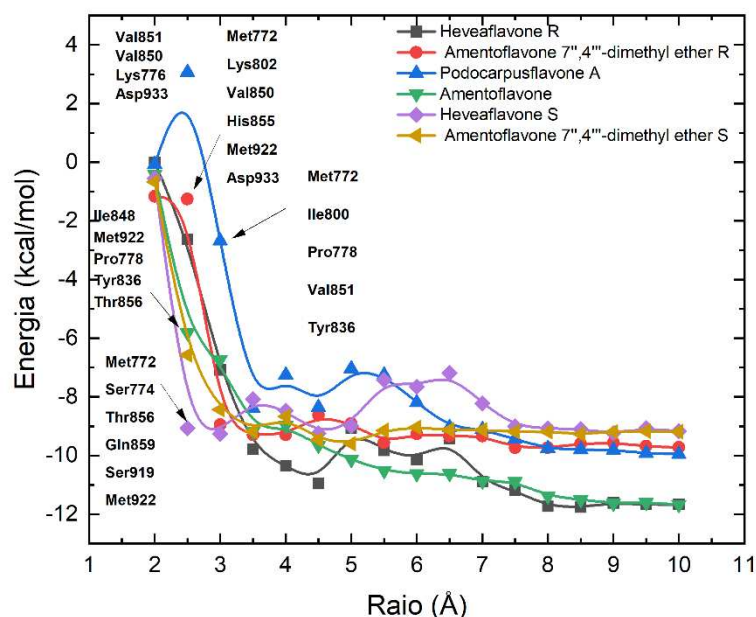


Figura 13: Energia de interação total dos complexos cristalográficos PI3K α sob a distância radial dos compostos vegetais Heveaflavone R e S, Amentoflavone 7'',4'''-dimethyl ether R e S, Podocarpusflavone A e Amentoflavone. É mostrada a energia de interação em kcal/mol e distância em angstroms

Da mesma forma, foi calculada a energia de interação total em função da distância do raio para os complexos da mTOR. Os cálculos mostraram que a energia de interação entre a mTOR e o compostos Heveaflavone na configuração S é de -15.49 kcal/mol, sendo que 82,31% correspondem a energia de interação dos resíduos localizados até 3,5 Å. Já a interação entre a mTOR e o Heveaflavone R foi de -10.73kcal/mol, sendo que 62,44% correspondem a energia de interação dos resíduos localizados até 3.5 Å.

O complexo mTOR- Amentoflavone 7'',4''' S apresentou energia total de -12.54 kcal/mol, sendo que a energia dos resíduos localizados até 3 Å correspondem 87,40%. O complexo mTOR- Podocarpusflavone S A apresentou uma energia total de -14.51 kcal/mol, com resíduos localizados á 3,5 Å equivalendo 67.12% da energia total. O complexo mTOR - Amentoflavone R apresentou energia total de -12.17 kcal/mol, com resíduos localizados a 3 Å com energia total de -94.24% kcal/mol. Enquanto, a mTOR com Amentoflavone S apresentou energia de total de 13.65kcal/mol, sendo que 50,18% correspondem energia de interação dos resíduos localizados até 3.5 Å.

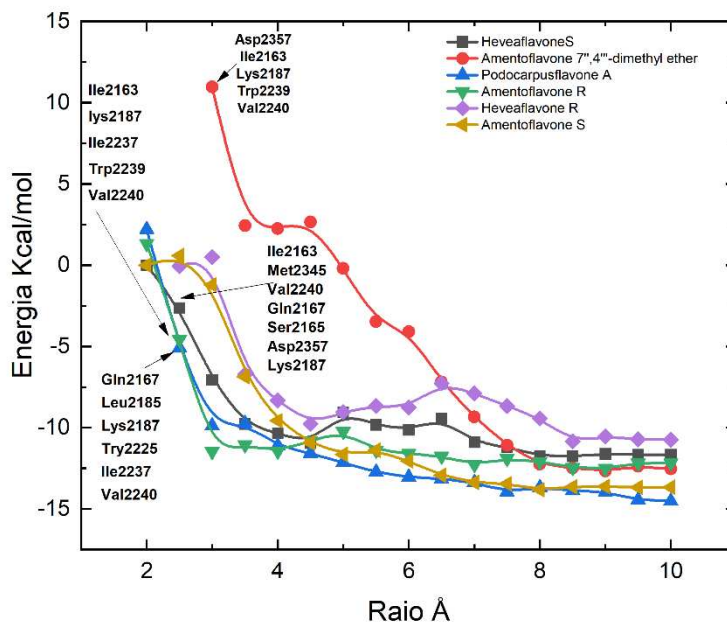


Figura 14: Energia de interação total dos complexos cristalográficos mTOR sob a distância radial dos compostos vegetais Heveaflavone R (verde), Heveaflavone S (preto), Amentoflavone 7'',4'''-dimethyl ether (vermelho), Podocarpusflavone A (azul) e Amentoflavone R (roxo) e Amentoflavone S (amarelo). É mostrada a energia de interação em kcal/mol e distância em angstroms.

6.5 Contribuição Individual dos Resíduos

Uma das principais vantagens na análise que realizamos é a sua capacidade de classificar a contribuição individual de aminoácidos para a ligação de inibidores distintos. Para identificar os aminoácidos com contribuições significativas para a ligação de cada composto, os resíduos que compunham pontos de grande alteração nas curvas dos gráficos 15 e 18 tiveram a sua energia individual representada em gráficos de barras horizontais.

Como descrito na Figura 15, os resíduos da PI3K α com maior contribuição atrativa para a ligação do Heveaflavone S são: Ile932 (-2.69 kcal/mol), Met772 (-1.62 kcal/mol), Met922 (-1.27 kcal/mol), Val850 (-1.25 kcal/mol), Thr856 (-1.17 kcal/mol) e Ile848 (-1.15 kcal/mol) e Met858 (-0.96 kcal/mol). Entre as interações repulsivas mais fortes entre Heveaflavone e resíduos estão: Glu849 (1.59 kcal/mol), Asp933 (1.25 kcal/mol), Ser854 (1.16 kcal/mol) e Asp810 (0.66 kcal/mol). Nas nossas análises, foi identificada a ligação de hidrogênios com o aminoácido Thr856 com o átomo de oxigênio (O1) do anel do composto Heveaflavone S (Figura 16 A). De forma similar, os resíduos da PI3K α com maior contribuição atrativa para a ligação do Heveaflavone R são Ile932 (-2.1 kcal/mol), Met772 (-1.68 kcal/mol), Ile800 (-1.62 kcal/mol), Val850 (-1.3 kcal/mol), Trp780 (-1.01 kcal/mol) e Met922 (-0.89 kcal/mol). Os resíduos que se mostraram

repulsivos são Glu849 (2.38 kcal/mol), Asp933 (2.39 kcal/mol) e Asp810 (1.19 kcal/mol). Foi possível observar que o Heveaflavone R realizou uma ponte de hidrogênio com resíduo Val851.

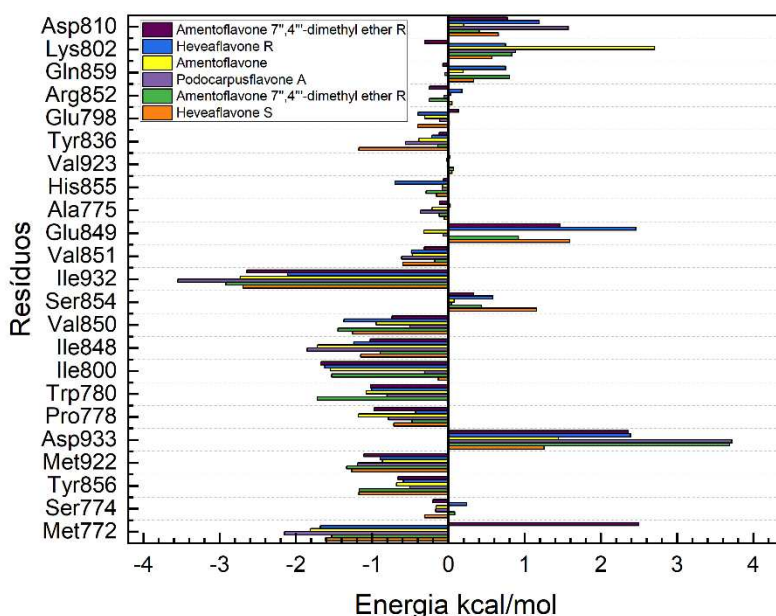


Figura 15: Energia de interação individual dos resíduos da PI3K α e compostos Heveaflavone, Amentoflavone 7'',4'''-dimethyl ether, Podocarpusflavone A, Amentoflavone(B).

Foram encontrados resultados semelhantes para os resíduos da PI3K α que interagem com Amentoflavone 7'',4''' R, as energias mais fortes e atrativas para resíduos Ile932 (-2.92kcal/mol), Trp780 (-1.72 Kcal/mol), Met772 (-1.53 kcal/mol), Ile800(-1.53kcal/mol), Val850 (-1.45 kcal/mol), Met922 (-1.34 kcal/mol), Thr856 (-1.17 kcal/mol) e Ile848 (-0.90 kcal/mol. Entre as interações repulsivas, as mais fortes estão os resíduos Asp933(3.69 kcal/mol), Glu849 (0.92 kcal/mol), Lys802 (0.83kcal/mol), Gln859 (0.80 kcal/mol) e Ser 854 (0.43 kcal/mol) e Asp810 (0.41 kcal/ mol). Foi possível identificar que o resíduo Val851 com energia de (-0.18 kcal/mol), formou uma ponte de hidrogênio com Amentoflavone 7'',4''' R (Figura 16 B). Com resultado similar, os resíduos Ile932 (-2.64kcal/mol), Met772(-1,96 kcal/mol), Ile800 -1.67 kcal/mol, Met922(-1.10 kcal/mol), Ile848(-1.02 kcal/mol, Trp780(-1.02 kcal/mol), Pro778 (-0,97 kcal/mol), Val850 (-0,73kcal/mol) e Thr856 (-0.66kcal/mol) apresentaram maior energia de atração com o composto Amentoflavone 7,4 S. Foi observado, que os resíduos repulsivos Asp933(2.33 kcal/mol), Glu849 (1.46 kcal/mol), e Asp810(0.77kcal/mol) para Amentoflavone 7,4 S foram semelhantes ao Amentoflavone 7,4 R. Nas análises de interação, foi identificado que o composto Amentoflavone 7,4 S formou ponte de hidrogênio com resíduo Ser773 (-0.55 kcal/mol).

Para o ligante Podocarpusflavone A , os resíduos que apresentaram forte atração foram: Ile932 (-3.5 kcal/mol), Met772 (-2.15 Kcal/mol), Ile848 (-1.85 Kcal/mol), Ile800 (-1.32 Kcal/mol), Met922 (-1.2 kcal/mol), Trp780 (-0.81 kcal/mol). Entre as interações repulsivas podemos destacar os resíduos Asp933(3.7 kcal/mol), Asp810 (1.58 kcal/mol) e Lys802 (0.88 kcal/mol). Os resultados mostraram que o resíduo Val851(-0.61kj/mol) está próximo do composto Podocarpusflavone e realiza uma ponte de hidrogênio (Figura 16 C).

Para os resíduos da PI3K α com ligantes Amentoflavone, foram observadas energias mais fortes atrativa para os resíduos Ile932 (-2.7Kcal/mol), Met772(-1.81 kcal/mol), Ile848(-1.7 kcal/mol), Ile800 (-1.55 kcal/mol), Pro778 (-1.18 kcal/mol), Trp780(-1.08 kcal/mol) e Val850(-0.9 kcal/mol). Os resíduos Lys802 (2.71kcal/mol), Asp933 (1.4 kcal/mol), Ser919 (0.35 kcal/mol) e Arg770 (0.24 kcal/mol) apresentaram maior energia repulsiva. Através de programa Pymol, foi possível constatar que os resíduos Tyr836 (-0.38 kcal/mol), Glu849 (-0.3 kcal/mol) e Asp805 (-0.10kcal/mol) formaram ponte com composto Amentoflavone (Figura 16 D). Pode-se observar, os resíduos Ile932, Ile800, Ile848, Val850 e Val851 como mais importantes na ligação dos compostos analisados, resultados estes, semelhantes aos identificados na ligação de PI103 e Alpelisib na PI3K α , onde os resíduos Ile932, Ile848, Ile800, Val850, Val851 e Met922 mostraram-se fundamentais.

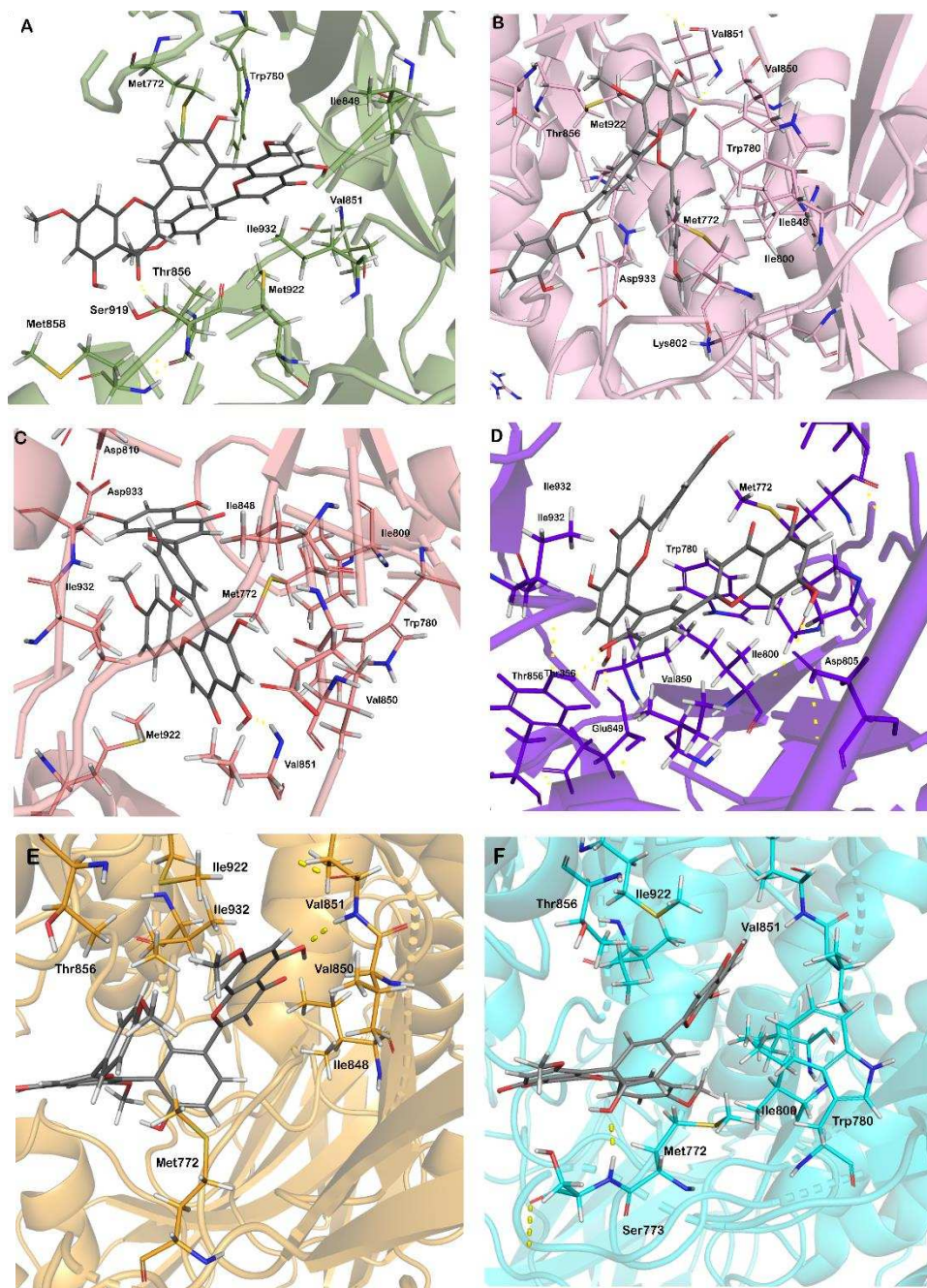
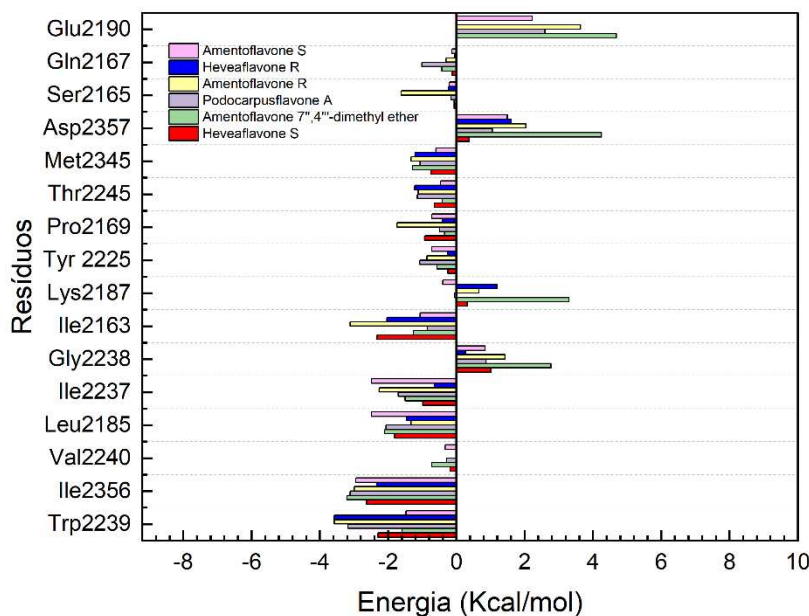


Figura 16: Organização espacial dos principais resíduos da PI3K α interagindo com compostos Heveaflavone S (A) e Heveaflavone R (E), Amentoflavone 7'',4''' R (B) e Amentoflavone 7'',4''' S(F), Podocarpusflavone A(C) e Amentoflavone (D). As ligações de hidrogênio são mostradas com traços amarelo.

Já para a mTOR, conforme observado na Figura 17, os resíduos que mais interagiram com composto Heveaflavone S foram Ile2356 com energia de -2.6 kcal/mol, Ile2163 -2.32 kcal/mol, Trp2239 (-2.30 kcal/mol), Leu2185 (-1.81 kcal/mol), Hid2247 (-1.21 kcal/mol) e Ile2237

(- 0.99 Kcal/mol). Os resíduos que apresentaram uma energia repulsiva foram os Gly2238 (1.01 kcal/mol), Asp2357(0.2 kcal/mol), Ser2342 (0.4kcal /mol) e Lys2187 (0.33 kcal/mol) . Importante destacar que os resíduos Hid2247, Gli2167 e Val2240 realizam ponte de hidrogênio com o composto (Figura 18 A). O Heveaflavone R apresentou os resíduos Trp2239 -4.45, kcal/mol, Ile2356 (-2.33kcal/mol), Ile2163(-2.85kcal/mol), Leu2185 (-1.4 kcal/mol), Thr2245 (-1.2kcal/mol) e Met2345 -1.21 kcal/mol com maior energia de atração e os resíduos Asp2244 -2.10 kcal/mol, Asp2357 -1.60 kcal/mol, Lys2187 -1.18 kcal/mol com energia repulsiva. O resíduo Gln2167 (-0.04 kcal/mol) realizou ponte de hidrogênio com composto Heveaflavone R.

Os resíduos que mais interagiram com ligante Amentoflavone 7",4"" foram Ile2356 - (3.2 kcal/mol), Leu2185 (-2.10 kcal/mol) , Trp2239 (-1.6 kcal/mol), Ile2237 (-1.5 kcal/mol) , Met 2345 (-1.3 kcal/mol), Ile2163 (-1.25 kcal/mol) e Val2240 (-0.7 kcal/mol). Os resíduos que apresentaram energia repulsivas foram os Glu2190 (4.69 kcal/mol), Asp2357 (4.3 kcal/mol) e Lys2187 (3.30 kcal/mol) . A Val2240 formou ponte de Hidrogênio com composto Amentoflavone 7",4"". Curiosamente, nossos resultados foram semelhantes aos resultados de Rehan(2019), em seu estudo com ancoramento molecular do ligante XL765 e mTOR, mostrou que o fármaco interagiu no sitio catalítico com 11 resíduos, incluindo Ile-2163, Leu-2185, Trp-2239, Val-2240, Asp2244, Thr2245, Ala2248, Arg2251, Asp2252, Met2345, e Ile2356 (MOHD REHAN, 2019).



17: Energia de interação individual dos resíduos mTOR e compostos Heveaflavone R e S, Amentoflavone 7",4""-dimethyl ether, Podocarpusflavone A, Amentoflavone.

Para complexo mTOR- Podocarpusflavone A os resíduos que mais interagiram foram: Ile (2356 -3.1 kcal/mol), Leu2185 (-2.06 kcal/mol), Trp2239 (-3.17 kcal/mol), Ile2237 (-1.70 kcal/mol), Met2345 (-1.06 kcal/mol), Ile2163 (-0.84kcal/mol) e Val2240 (-0.29 kcal/mol). Com resíduos repulsivos Glu2190 (2.06 kcal/mol) e Asp977 (1.06 kcal/mol). Conforme observado na Figura 18C os resíduos Val2240 e Gln2167 realizaram ponte de hidrogênio com composto.

O composto Amentoflavone R teve como resíduos com mais atração o Trp2239 (-3.58 kcal/mol), Ile2356 (-3.0 kcal/mol), Ile2163 (-1.91 kcal/mol), Leu2185 (-1.33 kcal/mol), Met2345 (-1.3 kcal/mol), Thr2245 (-1.1 kcal/mol). Os resíduos que se mostraram repulsivos foram Asp2357 (2.0kcal/mol), Glu2190 (0.87kcal/mol), Hid2340 (0.56kcal/mol). Os resíduos Val2240 e Asn2343 realizaram ponte de hidrogênio com composto Amentoflavone R. Comparando com nossos resultados, Reha(2015) no estudo de ancoramento molecular da mTOR e ligante PKI-179, mostrou que alguns resíduos hidrofóbicos Leu-2185, Tyr-2225, Ile2163, Ile-2237e Ileu2356 também interagiram com ligante (REHAN, 2015). De forma semelhante os resíduos Ile2356(-2.93 kcal/mol), Ile2237 (-2.49 kcal/mol), Leu2185 -2.48 kcal/mol) , Trp2239 (-1.6 kcal/mol) e Ile2163 (-1.25kcal/mol) apresentaram maior energia de interação com composto Amentoflavone S. O resíduo Val2240 formou de hidrogênio com composto Amentoflavone S. De forma interessante, em ambos os inibidores analisados com mTOR apresentaram maior interação com os resíduos Trp2239, Ile2356 e Ile2163. Ademais, maioria dos compostos testados apresentaram ponte de hidrogênios e ambos formaram com a Val2240 (Figura 18 F).

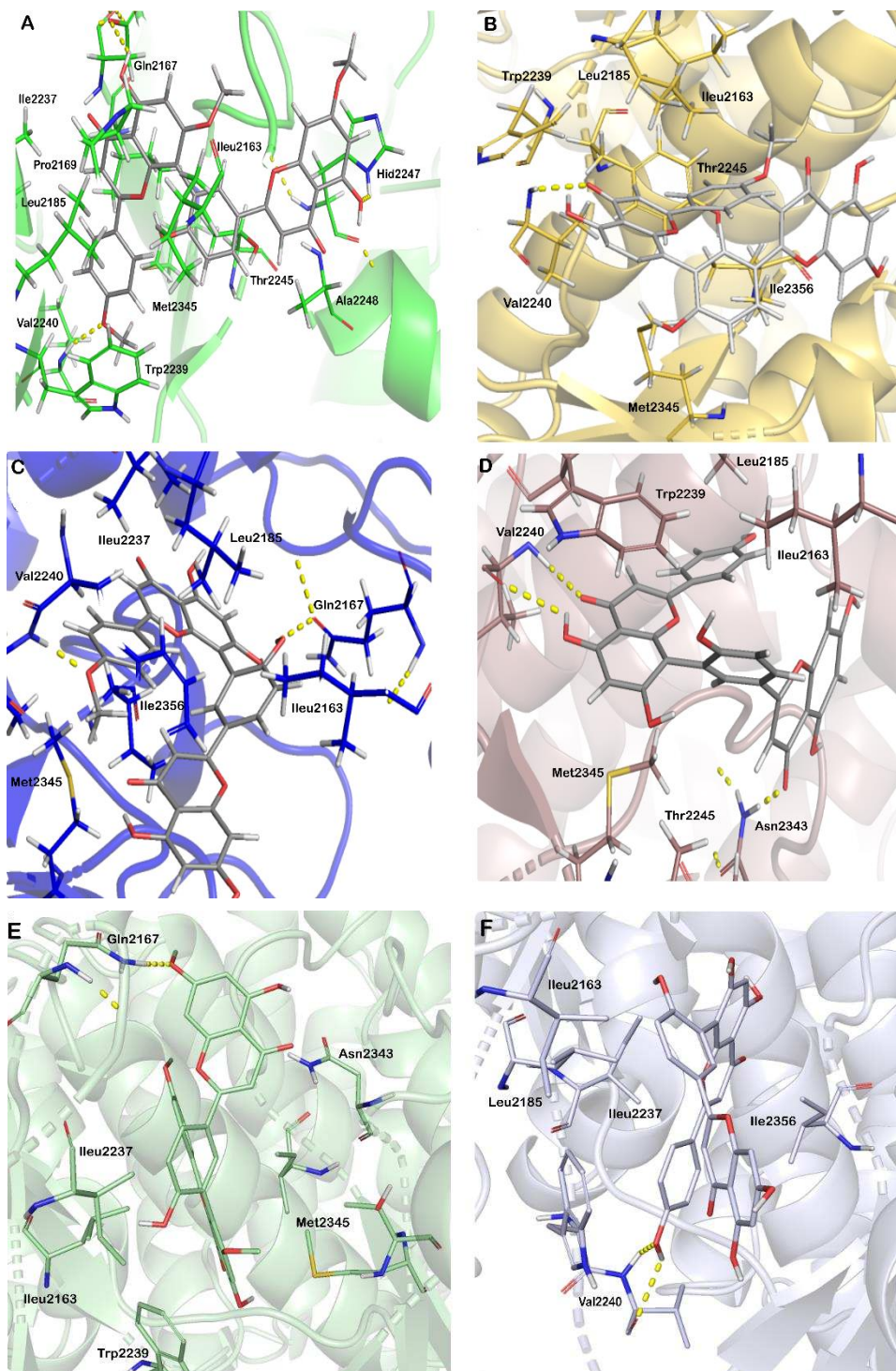


Figura 18: Organização espacial dos principais resíduos da mTOR interagindo com compostos Heveaflavone S(A) e Heveaflavone R (E), Amentoflavone 7'',4'''(B) Podocarpusflavone A(C) Amentoflavone R (D) e) Amentoflavone S (F) . As ligações de hidrogênio são mostradas com traços amarelo.

6.6 Análises ADME

A biodisponibilidade de um fármaco depende da segurança e eficácia, que dependem principalmente das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e Excreção(ADME)(OPO et al., 2021). Neste trabalho, analisamos as propriedades ADME dos quatro compostos selecionados através ferramenta SwissADME do Swiss Institute of Bioinformatics(DAINA *et al.*, 2017) ,foi observado a qualidade dos compostos selecionados em termos de características desejáveis para um fármaco, tais como propriedades físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade da água, farmacocinética, farmacocinética e química medicinal.

Foram calculados parâmetros farmacocinéticos que estão representados na tabela 5. Os compostos Heveaflavone, Amentoflavone 7",4" e Podocarpusflavone A mostraram apenas uma violação na regra de Linpinski, ou seja, apresentaram log P maior ou igual a 5, Massa Molecular menor ou igual a 500, aceptores de ligação de Hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5(LINPINSKI *et al.*,1997).

Dos quatros compostos selecionados, só o Amentoflavone mostrou duas violações na regra de Lipinski por conta do seu elevado peso molecular e mais de 5 doares de hidrogênio. Contudo, alguns estudos sugerem que medicamentos derivados produtos naturais estão isentos da regra de Lipinski. De acordo com Gordon M. Cragg (NEWMAN;CRAGG, 2016), existe a quinta regra de Lipinski, afirmando que são isentos das quatro regras, as classes de compostos que são substratos para os transportadores biológicos, isentando assim os produtos naturais e qualquer molécula que seja reconhecida por um sistema de transporte ativo quando se trata de "entidades químicas drogáveis".

Tabela 5: Lista de propriedades farmacocinéticas (físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade da água, semelhança dos medicamentos, e química medicinal) dos quatro compostos selecionados.

Propriedades	Parâmetros	Heveaflavone	Amentoflavone 7'',4'''	Podocarpusflavone A	Amentoflavone
Propriedades físico-químicas	Peso molecular	580.54	566.51	552.48	538.46
	Átomos pesados	43	42	41	40
	Átomos p.aromáticos	32	32	32	32
	Ligações rotáveis	6	5	4	3
	Aceptores de ligações H.	10	10	10	10
	Doadores de ligações H	3	4	5	6
	Refratividade molar	160.38	155.91	151.44	146.97
Lipofilicidade	Log Po/w	6.04	5.74	5.44	5.13
Solubilidade em água	Log S (ESOL)	-7.39	-7.17	-6.96	-6.75
Farmacocinética	Absorção GI	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
Druglikeness	Lipinski, Violação	1	1	1	2
Química medicinal	Acessibilidade Sintética	4.6	4.48	4.31	4.27

7 DISCUSSÃO

Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) fazem parte da via PI3K/Akt/mTOR que está associada a vários aspectos das funções celulares. Estas funções desempenham papéis vitais na sobrevivência, e crescimento em circunstâncias fisiológicas normais, bem como em várias doenças patológicas, incluindo o câncer. No presente trabalho foram utilizadas ferramentas computacionais de cálculo clássico e quântico para caracterizar mecanismo de inibição das enzimas mTOR e PI3K α . Adicionalmente, foi empregada a triagem virtual baseada em ancoramento com conjuntos conformacionais para identificar compostos vegetais com potencial inibitório em ambas as enzimas.

Na primeira etapa deste trabalho (capítulo 1), cálculos quânticos e clássicos foram utilizados para descrever o PPI na mTOR e interfaces mLST8 e identificar os principais resíduos que estabilizam as interações de interface do tipo proteína-proteína (PPI) no complexo mTOR-mLST8. A análise PPI entre os elementos da mTOR complexos é uma estratégia valiosa na concepção de medicamentos devido ao seu potencial para a identificação de sítios drogáveis e, portanto, levando ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para modular este sistema em condições patológicas.

Nossos resultados mostraram que os principais resíduos que contribuem para interação mTOR-mLST8 na estão localizados dentro de até 3 Å, com resíduos Met2281 (-50,34 kcal mol⁻¹), Met2271 (-32,97 kcal mol⁻¹) e Glu2285 (-28,63 kcal mol⁻¹) sendo responsável por cerca de 57% do total da energia de interação calculada com mLST8. Os cálculos com a estrutura DM apontavam para a relevância dos resíduos Met2281 (-25 kcal mol⁻¹), Glu2288 (-23 kcal mol⁻¹), Glu2285 (-18,8 kcal mol⁻¹), Met2271 (-18 kcal mol⁻¹) e o 2277 (-15 kcal mol⁻¹), representando cerca de 51% do valor calculado energia de interação total. Como esperado, os resíduos com interações importantes estão localizados em o lóbulo C-terminal, que é conhecido por formar o sítio de ligação para mLST8 (YANG et al., 2013). Enquanto os principais resíduos na interface mLST8 são Tyr20, Tyr222 e Trp272.

Na segunda etapa deste trabalho (capítulo 2), foi investigado o mecanismo de inibição do sítio de ligação do ATP na PI3K α e na mTOR. Através de cálculos clássicos, relatamos a energia livre de ligação (MM/PBSA-IE) tanto de inibidores seletivos quanto duais, permitindo assim uma análise comparativa. Os cálculos identificaram resíduos hidrofóbicos na PI3K α Ile932, Ile848, Ile800, Val850, Val851 e Met922 como os mais importantes para a ligação de PI103 e alpelisib.

Os resíduos com maior contribuição atrativa para a ligação do alpelisib são Ile932 (-9,70 kJ/mol), Ile848 (-6,89 kJ/mol), Ile800 (-7,00 kJ/mol), Val850 (-6,96 kJ/mol), Val851 (-5,42 kJ/mol) e Met922 (-4,92 kJ/mol). Entre as interações repulsivas mais fortes encontram-se aqueles entre o alpelisibe e os resíduos Asp810 (7,66 kJ/mol) e Asp933 (3,48 kJ/mol). Resultados semelhantes foram encontrados para complexo PI3K α -PI103, onde os resíduos mais fortes foram observados: Ile932 (-14,54 kJ/mol), Ile848 (-8,10 kJ/mol), Ile800 (-7,23 kJ/mol), Val850 (-6,17 kJ/mol), Val851 (-2,67 kJ/mol) e Met922 (-3,23 kJ/mol). O aminoácido não polar Ile932 está próximo do grupo pirido-furo-pirimidina de PI103, enquanto que no complexo PI3K α -alpelisib está próximo do grupo metiltrifluoro-metilpropanil-piridinil). No complexo PI3K α -PI103, o resíduo Val851 faz uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio (O2) no anel de morfolina enquanto do PI103 no complexo PI3K α -alpelisibe, Val851 forma uma ligação de nitrogênio com átomo (N1) no anel tiazol e estão próximos do átomo de nitrogênio (N2) no grupo pirrolidina-dicarboxamida.

Os nossos resultados mostram que os resíduos não conservados apresentam interações fracas, mas comportamentos distintos quando interagem com PI103 ou alpelisib. Por exemplo, enquanto a força atrativa do resíduo His855 era maior para alpelisib (quase 8x) do que para PI103, resíduos Arg852 e Ser854 mostraram uma interação atrativa com PI103, mas repeliu o alpelisib. A relevância da His855 para seletividade na PI3K α foi também demonstrada anteriormente por Zheng et al. (2011), utilizando a mutagênese in vitro para avaliar a ligação do inibidor PIK-75 (ZHENG et al., 2011). Além disso, os resíduos Gln859, é conhecido como um resíduo importante na seletividade da isoforma PI3K (FURET et al., 2013; ZHENG et al., 2012), a Gln859 mostrou uma interação atrativa com alpelisibe, fazendo duas ligações de hidrogênio com os átomos de oxigênio (O1) e nitrogênio (N3), mas agiu repulsivamente na presença do inibidor PI103.

Os principais resíduos da mTOR que interagem com Torin-2 são Trp2239 (-13.88 kJ/mol), Ile2356 (-11.67 kJ/mol), Leu2185 (-9.08 kJ/mol), Ile2237 (-5.94 kJ/mol), Met2345 (-5.89 kJ/mol), Ile2163 (-3.48 kJ/mol), Val2240 (-2.93 kJ/mol), Tyr2245 (-2.61 kJ/mol) Arg2339 (-2.10 kJ/mol) and Tyr2225 (-1.31 kJ/mol). Os resíduos da mTOR que apresentaram maior contribuição para ligação do PI103 são Ile2356 (-13,43 kJ/mol), Trp2239 (-10,23 kJ/mol), Ile2237 (-10,21 kJ/mol), Leu2185 (-9,59 kJ/mol), Tyr2225 (5,51 kJ/mol), Met2345 (-3,59 kJ/mol) Ile2163 (-2,92 kJ/mol) e Leu2354 (-2,27 kJ/mol).

Foi observado uma grande diferença na energia de alguns resíduos da mTOR que interagem com Torin 2 e PI103, entre eles : Tyr2225 (ΔE 4.20 kJ/mol), Lys2187 (ΔE 7.62 kJ/mol), Ile2237 (ΔE 4.27 kJ/mol), Trp2239 (ΔE 3.65 kJ/mol), Met2345 (ΔE 2.30 kJ/mol) and Cys2243 (ΔE 2.30 kJ/mol). Recentemente, Rehan (2019) destacou os resíduos Trp2239, Ile2356, Leu2188, Met2345, Leu2185 e Ile2163 como resíduos relevantes para a ligação do inibidor dual XL765, um potente inibidor seletivo da classe I PI3K/mTOR (REHAN, 2019). Curiosamente, em ambos inibidores de mTOR analisados, a presença de anéis aromáticos leva para a formação de interações π -stack com o triptofano anel interior de Trp2239. O Trp2239 forma um interação stack com o anel tricíclico de benzo-naftiridina de torin-2 (13,88 kJ/mol), enquanto o mesmo interage com o anel pirido-fuopirimidina do PI103 (10,23 kJ/mol). O papel-chave do Trp2239 na ligação de inibidores de mTOR foi previamente relatado no complexo cristalográfico mTOR-torin2 (Yang et al., 2013) como em o recentemente complexo mTOR-XL765 (REHAN, 2019)

Na última etapa deste trabalho (capítulo 3), foi realizado uma triagem virtual baseada em ancoramento com multiplas conformações para identificar de moléculas bioativas com potencial inibitório na pI3K α e mTOR. Neste trabalho, foram testados os compostos de origem vegetal brasileiros, depositados na plataforma NuBBE. Nossas análises identificaram quatro compostos com potencial de inibição dual, sendo eles: Heveaflavone, Amentoflavone 7",4"', Podocarpusflavone A e Amentoflavone. Estes compostos pertencem a classe dos biflavonoides, um grupo de metabólitos secundários de plantas de baixo peso molecular, com característica de atropisomerismo, e conhecidos por apresentarem potencial clínico, incluindo atividade anticancerígenas e antioxidativa (TORKI *et al.*,2021). Na química medicinal, o maior conhecimento da ocorrência de atropisomerismo e das técnicas de caracterização dos mesmos, tem ajudado no sucesso de desenvolvimento de drogas (GLUNZ, 2018).

Os compostos selecionados apresentaram atividade estereoespecífica e atividade racêmica nas enzimas PI3K e mTOR. O composto Podocarpusflavone A, apresentou perfil estereoespecifico na conformação R para PI3K α , já para mTOR o composto tem preferência na conformação S. Portanto, o Podocarpusflavone A pode não ser um composto propicio pois apresenta uma configuração para cada enzima, e isso levaria a necessidade de utilização de uma dosagem mais alta. O composto Amentoflavone 7",4"' apresentou perfil racêmico na ligação à PI3K α enquanto que ligou-se consistentemente na configuração S no sítio de ATP da mTOR. O composto Amentoflavone apresentou configuração especifica R para PI3K α e para a mTOR perfil

racêmico. Por fim, o composto Heveaflavone não apresentou estereoespecificidade em relação à ligação ao sítio de ATP nas enzimas estudadas, ou seja, apresentou perfil de ligação racêmico tanto na mTOR como na PI3K α , ou seja, esse composto provavelmente é o mais propício para inibição dual, utilizando dosagens baixas.

Os cálculos identificaram resíduos na PI3K α Ile932, Ile848, Ile800, Val850, Trp780 e Met772 como os mais importantes para a ligação dos compostos Heveaflavone, Amentoflavone 7",4"-dimethyl ether, Podocarpusflavone A e Amentoflavone. Pode-se observar, que nos cálculos anteriores os ligantes PI103 e Alpelisib também fizeram interações com esses resíduos. Foi possível identificar que o resíduo Thr856 da PI3K α faz uma ponte de hidrogênio com átomo de oxigênio (O1) do anel do composto Heveaflavone. O aminoácido Val851 forma uma ligação de hidrogênio com átomo de oxigênio(O2) no do anel do composto de Podocarpusflavone A. O resíduo Glu849 e Val851 fazem ponte de hidrogênio com composto Podocarpusflavone. A ligação de hidrogênio é um dos principais elementos dos sistemas biológicos responsável pelas interações moleculares, constituindo a base para o reconhecimento molecular (SINGH *et al.*, 2021).

Os principais resíduos da mTOR que interagem com os compostos Heveaflavone, Amentoflavone 7",4", Podocarpusflavone A e Amentoflavone foram Ile2356, Ile 2163, Ileu2237, Leu2185, Met2345 e Trp2239. Esses resultados corroboram com nossas análises realizadas com PI103 e Torin2 que apontam os resíduos Trp2239, Ile2356, Leu2185, Ile2237, Met2345, Ile2163, Val2240 e Tyr2245 como resíduos importantes para ligação dos inibidores (AZEVEDO *et al.*, 2021). Renan(2019) também destacou os resíduos Trp2239,Ile2356, leu2188, Met 2345, Leu2185 e Ile 2163 como resíduos relevantes para a ligação do inibidor dual XL765. Os resíduos Gln2167,Val2240 e Hid2247 da mTOR fazem ponte de hidrogênio com composto Heveaflavone. O resíduo Val2240 da mTOR forma ligação de hidrogênio com composto Amentoflavone 7",4". O composto Podocarpusflavone A forma ponte de hidrogênio com os resíduos Gli 2187 e Val2240. Os resíduos Val2240 e Asn2343 faz ponte de hidrogênio com composto Amentoflavone.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram estudadas características estruturais relacionadas a inibição/modulação farmacológica das proteínas PI3K α e mTOR e identificados compostos biflavonóides com potencial ação inibitória dual.

Os dados obtidos através da análise da interação de interface entre a mTOR e mLST8 sugerem uma nova região alvo para tratamentos farmacológicos, objetivando a interrupção da interação entre ambas proteínas durante o tratamento de certos tipos de câncer. Esta região envolve resíduos Met2281, Met2271 e Glu2285 da mTOR e Tyr20 e Tyr222, Lys313, Trp272 e Ser290 da mLST8.

Nossos resultados também identificaram contribuição relativa de aminoácidos individuais para a ligação de inibidores seletivos ou duais no sítio catalítico PI3K α e mTOR. Em todos os complexos, as interações mais importantes foram observadas dentro do raio de 3.0/3.5 angstroms dos inibidores. Os cálculos identificaram resíduos hidrofóbicos Ile932, Ile848, Ile800, Val850, Val851 e Met922 da PI3K α como os mais importantes para a ligação de PI103 e alpelisib. Para a mTOR, os resíduos mais importantes para a ligação dos inibidores torin-2 e PI103 foram: Trp2239, Ile2356, Leu2185, Ile2237 e Met2345. Além disso, os resíduos mais distantes tem um impacto maior na inibição dual, como observado para resíduos da PI3K α Lys802 e Asp805, e resíduos da mTOR Leu2192, Phe2358, Leu2354, Lys2187 e Tyr2225.

Com a finalidade de identificar compostos com atividade inibitória, foram estabelecidos protocolos de triagem virtual baseada em ancoramento com conjuntos conformacionais e análises energéticas baseadas nas características estruturais das proteínas PI3K α e mTOR. A aplicação de tais protocolos na análise de 1745 compostos vegetais do banco de dados do NuBBE, permitiram a identificação de quatro compostos biflavonóides com atividade inibitória dual PI3K α /mTOR. Os compostos apresentaram perfil de ligação racêmica e estereoespecífica.

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho fornecem informações inovadoras para o desenho racional de novos e potentes inibidores duais para PI3K α /mTOR no tratamento do câncer. Neste contexto, identificamos compostos de origem vegetal contendo boas características de ligação (inibição) dual nas enzimas estudadas, fornecendo subsídios valiosos para estudos futuros almejando o melhoramento de tais moléculas e a realização de ensaios experimentais. Acreditamos

que nossos resultados incentivarão novos estudos e abrirão novas oportunidades para o tratamento de doenças envolvendo a super ativação da PI3K α e mTOR, incluindo o câncer.

REFERÊNCIAS

- AMARO, R. E. *et al.* Ensemble Docking in Drug Discovery. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 10, p. 2271–2278, 2018.
- ARBIZU-BERROCAL, S. H. *et al.* Polyphenols from mango (*Mangifera indica* L.) modulate PI3K/AKT/mTOR-associated micro-RNAs and reduce inflammation in non-cancer and induce cell death in breast cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v. 55, n. September 2018, p. 9–16, 2019.
- AMIRI A, RAMAZANI A, JAHANSHAHI M, MOGHADAMNIA AA. Synthesis of a nanostructured molecularly imprinted acrylic acid-based network copolymer as a solid sorbent for the quercetin extraction. *J. Nanostruct.* 4(3), 277–283, 2014.
- AYLETT, C. H. S. *et al.* Architecture of human mTOR complex 1. **Science**, v. 351, n. 6268, p. 48–52, 2016.
- ALQURASHI, N., HASHIMI, S. M., ALOWAIDI, F., IVANOVSKI, S., & WEI, M. Q. Dual mTOR/PI3K inhibitor NVP-BEZ235 arrests colorectal cancer cell growth and displays differential inhibition of 4E-BP1. **Oncology Reports**, 40(2), 1083–1092, 2018. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6457>
- BALLARD, A. *et al.* Expert Opinion on Drug Discovery The problem of racemization in drug discovery and tools to predict it. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 6, p. 1–13, 2019.
- BEAUFILS, F. *et al.* 5-(4,6-Dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)-4-(trifluoromethyl)pyridin-2-amine (PQR309), a Potent, Brain-Penetrant, Orally Bioavailable, Pan-Class I PI3K/mTOR Inhibitor as Clinical Candidate in Oncology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 7524–7538, 2017.
- BURG, J.S., INGRAM, J.R., VENKATAKRISHNAN, A.J., JUDE, K.M., DUKKIPATI, A., FEINBERG, E.N., ANGELINI, A., WAGHRAY, D., DROR, R.O., PLOEGH, H.L., and Neuron 99, September 19, 2018 113 9 Neuron Review Garcia, K.C. (2015). Structural biology. Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor. *Science* 347, 1113–1117.
- BEAUFILS, F., CMILJANOVIC, N., CMILJANOVIC, V., BOHNACKER, T., MELONE, A., MARONE, R., JACKSON, E., ZHANG, X., SELE, A., BORSARI, C., MESTAN, J., HEBEISEN, P., HILLMANN, P., GIESE, B., ZVELEBIL, M., FABBRO, D., WILLIAMS, R. L., RAGEOT, D., & WYMAN, M. P. 5-(4,6-Dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)-4-(trifluoromethyl)pyridin-2-amine (PQR309), a Potent, Brain-Penetrant, Orally Bioavailable, Pan-Class I PI3K/mTOR Inhibitor as Clinical Candidate in Oncology. **Journal of Medicinal Chemistry**, 60(17), 7524–7538, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00930>
- BLASCO, F., BLANZ, J., AICHHOLZ, R., HAMON, J., FABBRO, D., & CARAVATTI, G. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor

selected for clinical evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 23(13), 3741–3748, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.007>

BLUNDELL, T. L., SIBANDA, B. L., MONTALVA, R. W., BREWERTON, S., CHELLIAH, V., WORTH, C. L., HARMER, N. J., DAVIES, O., & BURKE, D. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. February, 413–423, 2006. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1800>

CARBONEZI, C. A. *et al.* Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 319–324, 2007.

CUESTA, R. *et al.* Phosphoproteome Analysis Reveals Estrogen-ER Pathway as a Modulator of mTOR Activity Via DEPTOR. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 8, p. 1607–1618, ago. 2019.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017.

DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 92, n. 1, p. 508–517, 1990.

ENGELMAN, J. A. *et al.* Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. **Nature Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1351–1356, 30 dez. 2008.

ERSAHIN, T.; TUNCBAG, N.; CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1946–1954, 2015.

ESSMANN, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, nov. 1995.

ERDMANN, T. *et al.* Sensitivity to PI3K and AKT inhibitors is mediated by divergent molecular mechanisms in subtypes of DLBCL. *Blood* 2017.

ERSAHIN, T., TUNCBAG, N., & CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular BioSystems**, 11(7), 1946–1954, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5mb00101c>

FRANCIPANE, M. G.; LAGASSE, E. Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 1948–1962, 2013.

FURET, P. *et al.* Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 13, p. 3741–3748, 2013. FAES, S., SANTORO, T., TROQUIER, L., DE SOUZA

SILVA, O., & DORMOND, O. Rebound pathway overactivation by cancer cells following

discontinuation of PI3K or mTOR inhibition promotes cancer cell growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(3), 546–552, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.044>

FENG, H., YANG, Z., BAI, X., YANG, M., FANG, Y., ZHANG, X., GUO, Q., & NING, H. Therapeutic potential of a dual mTORC1/2 inhibitor for the prevention of posterior capsule opacification: An in vitro study. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 2099–2107, 2018. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3398>

FRANCIPANE, M. G., & LAGASSE, E. Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1. *Oncotarget*, 4(11), 1948–1962, 2013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1310>

FURET, P., GUAGNANO, V., FAIRHURST, R. A., IMBACH-WEESE, P., BRUCE, I., KNAPP, M., FRITSCH, C., GALÚCIO, J. M. et al. In silico identification of natural products with anticancer activity using a chemo-structural database of Brazilian biodiversity. *Computational Biology and Chemistry*, v. 83, n. June, p. 107102, 2019.

GLUNZ, P. W. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Recent encounters with atropisomerism in drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 28, n. 2, p. 53–60, 2018.

HE, J.; READ, I. Alpelisib Extends PFS in PIK3CA-Mutant Breast Cancer. *Cancer discovery*, v. 9, n. 1, p. 6–7, 2019.

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018.

HUA, H. *et al.* Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2019.

HE, J., & READ, I. Alpelisib Extends PFS in PIK3CA-Mutant Breast Cancer. *Cancer discovery*, 9(1), 6–7, 2019. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2018-146>

HELMY, K. Y., PATEL, S. A., NAHAS, G. R., & RAMESHWAR, P. Cancer immunotherapy: Accomplishments to date and future promise. *Therapeutic Delivery*, 4(10), 1307–1320, 2013. <https://doi.org/10.4155/tde.13.88>

HUA, H., KONG, Q., ZHANG, H., WANG, J., LUO, T., & JIANG, Y. Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, 12(1), 1–19, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13045-01>

HASHEMZAEI M, FAR AD, YARI A *et al.* Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncol. Rep*, 38(2), 819–828, 2017.

HILLMANN, P., & FABBRO, D. (2019). PI3K/mTOR pathway inhibition: Opportunities in oncology and rare genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 6–12.

<https://doi.org/10.3390/ijms202257929-0754-1>

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2014.

M. CHRISTOPHER, A. M. L. S. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.

KIM, J., & GUAN, K. L. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. **Nature Cell Biology**, 21(1), 63–71, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0205-1>

KUMAR, A., SUNDARAM, K., MU, J., DRYDEN, G. W., SRIWASTVA, M. K., LEI, C., ZHANG, L., QIU, X., XU, F., YAN, J., ZHANG, X., PARK, J. W., MERCHANT, M. L., BOHLER, H. C. L., WANG, B., ZHANG, S., QIN, C., XU, Z., HAN, X., ZHANG, H. G. (2021). High-fat diet-induced upregulation of exosomal phosphatidylcholine contributes to insulin resistance. **Nature Communications**, 12(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20500-w>

LI, Y. R., LI, S., HO, C. T., CHANG, Y. H., TAN, K. T., CHUNG, T. W., WANG, B. Y., CHEN, Y. K., & LIN, C. C. Tangeretin derivative, 5-acetyloxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone induces G2/M arrest, apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Biology and Therapy**, 17(1), 48–64, 2016. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1108491>

LI, A., QIU, M., ZHOU, H., WANG, T., & GUO, W. (2017). PTEN, Insulin Resistance and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, 23(25), 3667–3676. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170704124611>

L. WANG, L. CHEN, M. YU, L.-H. XU, B. CHENG, Y.-S. LIN, Q. GU, X.-H. HE, J. XU, Discovering new mTOR inhibitors for cancer treatment through virtual screening methods and in vitro assays, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18987. doi:10.1038/srep18987 <http://www.nature.com/articles/srep18987>

L.H. MENG, X.F. ZHENG, Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy, **Acta Pharmacol. Sin.** 36 (10), 1163-1169, 2015.

LOKHANDE, K. B., DOIPHODE, S., VYAS, R., & SWAMY, K. V. Molecular docking and simulation studies on SARS-CoV-2 Mpro reveals Mitoxantrone, Leucovorin, Birinapant, and Dynasore as potent drugs against COVID-19. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 0(0), 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1805019>

MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, M. et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by polyphenols: Implication for cancer therapy. **Life Sciences**, v. 255, p. 117481, 2020.

MORRIS, G. M. *et al.* NIH Public Access. v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2010. M. CHRISTOPHER, A. M. L. S. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, 176(1), 100–106. 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17963>.Overcoming

M. H. M. OLSSON, C. R. SØNDERGAARD, M. ROSTKOWSKI AND J. H. JENSEN, J. CHEM. M. J. ABRAHAM, T. MURTOLA, R. SCHULZ, S. PÁLL, J. C. SMITH, B. HESS AND E. LINDAH, *SoftwareX*, DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.

MAKII, C., IKEDA, Y., ODA, K., UEHARA, Y., NISHIJIMA, A., KOSO, T., KAWATA, Y., KASHIYAMA, T., MIYASAKA, A., SONE, K., TANIKAWA, M., TSURUGA, T., MORI-UCHINO, M., NAGASAKA, K., MATSUMOTO, Y., WADA-HIRAIKE, O., KAWANA, K., HASEGAWA, K., FUJIWARA, K., FUJII, T. Anti-tumor activity of dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and MDM2 against clear cell ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 155(2), 331–339, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.08.028>

MATSUO, F. S.. ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-Akt E GSK3 β EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES METASTÁTICOS E NÃO METASTÁTICOS DE CAVIDADE BUCAL. 2015, Ufu. MATTIUZZI, C., & LIPPI, G. Current Cancer Epidemiology glossary. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217–222, 2019.

MEYBODI, N. M., MORTAZAVIAN, A. M., MONFARED, A. B., SOHRABVANDI, S., & MEYBODI, F. A. Phytochemicals in cancer prevention: A review of the evidence. *International Journal of Cancer Management*, 10(1), 2017. <https://doi.org/10.17795/ijcp-7219>

MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, M., EKRAMI, E. M., AGHDAS, S. A. M., MIHANFAR, A., HALLAJ, S., YOUSEFI, B., SAFA, A., & MAJIDINIA, M. . Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by polyphenols: Implication for cancer therapy. *Life Sciences*, 255, 117-481, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117481>.

Ministério da Saúde - Brasil. Instituto Nacional de Câncer (2020). Estimativa 2020 – Incidência de Câncer no Brasil (pp. 25).

MILLER, M. S., Thompson, P. E., & Gabelli, S. B. Structural determinants of isoform selectivity in pi3k inhibitors. *In Biomolecules* Vol. 9, Issue 3, 2020. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom9030082>

O'DONNELL, J. S. *et al.* **PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux** *Seminars in Cancer Biology* Academic Press, 1 fev. 2018.

OPO, F. A. D. M. *et al.* Structure based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking and ADMET approaches for identification of natural anti-cancer agents targeting XIAP protein. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, v. 5, 2016.

PATRIDGE, E. *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.

PHILLIPS, M. A. *et al.* Has Molecular Docking Ever Brought us a Medicine? *Molecular*

Docking, 2018.

PILON, A. C., VALLI, M., DAMETTO, A. C., PINTO, M. E. F., FREIRE, R. T., CASTRO-GAMBOA, I., ANDRICOPULO, A. D., & BOLZANI, V. S. (2017). NuBBEDB: An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07451-x>

POLI, G. *et al.* Application of MM-PBSA Methods in Virtual Screening. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 8, abr. 2020.

POPOVA, N. V.; JÜCKER, M. The role of mtor signaling as a therapeutic target in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–30, 2021.

PAUL, S.M., MYTELKA, D.S., DUNWIDDIE, C.T., PERSINGER, C.C., MUNOS, B.H., LINDBORG, S.R. How to improve R &D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 203–214, 2010.

REHAN, M. A structural insight into the inhibitory mechanism of an orally active PI3K/mTOR dual inhibitor, PKI-179 using computational approaches. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 62, p. 226–234, 2015.

REN, J. *et al.* Assessing the performance of the g_mmpbsa tools to simulate the inhibition of oseltamivir to influenza virus neuraminidase by molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area methods. **Journal of the Chinese Chemical Society**, 2020.

RAGEOT, D., BOHNACKER, T., KELES, E., MCPHAIL, J. A., HOFFMANN, R. M., MELONE, A., BORSARI, C., SRIRAMARATNAM, R., SELE, A. M., BEAUFILS, F., HEBEISEN, P., FABBRO, D., HILLMANN, P., BURKE, J. E., & WYMAN, M. P. (2019b). (S)-4-(Difluoromethyl)-5-(4-(3-methylmorpholino)-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl) pyridin-2-amine (PQR530), a Potent, Orally Bioavailable, and Brain-Penetrable Dual Inhibitor of Class I PI3K and mTOR Kinase. **Journal of Medicinal Chemistry**, 62(13), 6241–6261. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00525>

REDDY, D., KUMAVATH, R., TAN, T. Z., AMPASALA, D. R., & KUMAR, A. P. (2020). Peruvoside targets apoptosis and autophagy through MAPK Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in human cancers. **Life Sciences**, 241, 117147. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117147>

REHAN, M. (2015). A structural insight into the inhibitory mechanism of an orally active PI3K/mTOR dual inhibitor, PKI-179 using computational approaches. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 62, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2015.10.005>

REHAN, MOHD, & BAJOUH, O. S. (2019). Virtual screening of naphthoquinone analogs for potent inhibitors against the cancer-signaling PI3K/AKT/mTOR pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, 120(2), 1328–1339. <https://doi.org/10.1002/jcb.27100>

REHAN, Mohd. (2019). Anticancer compound XL765 as PI3K/mTOR dual inhibitor: A

structural insight into the inhibitory mechanism using computational approaches. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219180>

RUIZ-TORRES, V., LOSADA-ECHEBERRÍA, M., HERRANZ-LÓPEZ, M., BARRAJÓN-CATALÁN, E., GALIANO, V., MICOL, V., & ENCINAR, J. A. (2018). New mammalian target of rapamycin (mTOR) modulators derived from natural product databases and marine extracts by using molecular docking techniques. *Marine Drugs*, 16(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/md16100385>

R.J.O. DOWLING, I. TOPISIROVIC, B.D. FONSECA, N. SONENBERG, Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1804 (2010) 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.001>.

SAXENA, G. Virtual screening, docking and molecular dynamics simulation of selected phytochemical compounds bound to receptor tyrosine kinases: A correlative anti angiogenic study. **Bioinformation**, v. 15, n. 9, p. 613–620, 2019.

SINGH, R. *et al.* Identification of potential plant bioactive as SARS-CoV-2 Spike protein and human ACE2 fusion inhibitors. **Computers in Biology and Medicine**, v. 136, n. July, p. 104631, 2021.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SHEN, G., LIU, M., LU, J., & MENG, T. (2019). Practical synthesis of Vistusertib (AZD2014), an ATP competitive mTOR inhibitor. *Tetrahedron Letters*, 60(52). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151333>

SUVARNA, V. *et al.* **Phytochemicals and PI3K inhibitors in cancer-An insight** *Frontiers in Pharmacology* *Frontiers Media S.A.*, , 14 dez. 2017.

TEWARI, D. *et al.* Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. **Seminars in Cancer Biology**, n. December, p. 1–17, 2019.

TORRES, P. H. M. *et al.* Key topics in molecular docking for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1–29, 2019.

TAO, Q., DU, J., LI, X., ZENG, J., TAN, B., XU, J., LIN, W., & CHEN, X. lin. (2020). Network pharmacology and molecular docking analysis on molecular targets and mechanisms of Huashi Baidu formula in the treatment of COVID-19. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 46(8), 1–9. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1788070>

T. J. DOLINSKY, P. CZODROWSKI, H. LI, J. E. NIELSEN, J. H. JENSEN, G. KLEBE AND N. A. BAKER, **Nucleic Acids Res.**, DOI:10.1093/nar/gkm276.

TARANTELLI, C., LUPIA, A., STATHIS, A., & BERTONI, F. (2020). Is There a Role for Dual PI3K/mTOR Inhibitors for Patients Affected with Lymphoma? **International Journal of Molecular Sciences**, 21(3), 1060. <https://doi.org/10.3390/ijms21031060>

TEWARI, D., PATNI, P., BISHAYEE, A., SAH, A. N., & BISHAYEE, A. (2019). Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. *Seminars in Cancer Biology*, December, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.008>

THORPE, L. M., YUZUGULLU, H., & ZHAO, J. J. (2015). PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 1, pp. 7–24). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>

TORRES, P. H. M., SODERO, A. C. R., JOFILY, P., & SILVA-Jr, F. P. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>

TIAN, T., LI, X., & ZHANG, J. (2019). mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms20030755>

WANG, A. H.; ZHANG, Z. C.; LI, G. H. Advances in enhanced sampling molecular dynamics simulations for biomolecules. **Chinese Journal of Chemical Physics**, v. 32, n. 3, p. 277–286, 2019.

WOOLLER, S. K. *et al.* Bioinformatics in translational drug discovery. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 4, p. 1–13, 2017.

WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 9, p. 844–853, 2020.

WEI, J., ZHANG, X., PAN, H., HE, S., YUAN, B., LIU, Q., ZHANG, J., & DING, Y. (2021). Eupafolin inhibits breast cancer cell proliferation and induces apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncology Letters*, 21(4), 1–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12593>

XIAO, B. L. *et al.* Steered molecular dynamic simulations of conformational lock of Cu, Zn-superoxide dismutase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

YANG, H. *et al.* MTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 217–223, 2013.

YANG, H., RUDGE, D. G., KOOS, J. D., VAIDIALINGAM, B., YANG, H. J., PAVLETICH, N. P., & PROGRAM, B. (2015). Chemical Synthesis of Hydrocarbon-Stapled Peptides for Protein **Interaction Research and Therapeutic Targeting**. 497(7448), 217–223. <https://doi.org/10.1038/nature12122.mTOR>

YOGANATHAN, S. *et al.* Ellagic acid and schisandrins: Natural biaryl polyphenols with therapeutic potential to overcome multidrug resistance in cancer. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2021.

ZANATTA, G., GOTTFRIED, C., SILVA, A. M., CAETANO, E. W. S., SALES, F. A. M., & FREIRE, V. N. (2014). L-asparagine crystals with wide gap semiconductor features: Optical absorption measurements and density functional theory computations. **Journal of Chemical Physics**, 140(12), 124511. <https://doi.org/10.1063/1.4869179>

ZHANG, M., JANG, H., NUSSINOV, R., & NUSSINOV, R. (2020). PI3K inhibitors: Review and new strategies. **Chemical Science**, 11(23), 5855–5865. <https://doi.org/10.1039/d0sc01676d>

ZHANG, M., JANG, H., NUSSINOV, R., & NUSSINOV, R. (2020). PI3K inhibitors: Review and new strategies. **Chemical Science**, 11(23), 5855–5865. <https://doi.org/10.1039/d0sc01676d>

ZHANG, M., JANG, H., NUSSINOV, R., & NUSSINOV, R. (2020). PI3K inhibitors: Review and new strategies. **Chemical Science**, 11(23), 5855–5865. <https://doi.org/10.1039/d0sc01676d>

ZHANG, Y. J., DUAN, Y., & ZHENG, X. F. S. (2011). Targeting the mTOR kinase domain: The second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discovery Today*, 16(7–8), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.008>

ZHANG, Y. J., DUAN, Y., & ZHENG, X. F. S. (2011). Targeting the mTOR kinase domain: The second generation of mTOR inhibitors. **Drug Discovery Today**, 16(7–8), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.008>

ZHAO, Y., ZHANG, X., CHEN, Y., LU, S., PENG, Y., WANG, X., GUO, C., ZHOU, A., ZHANG, J., LUO, Y., SHEN, Q., DING, J., MENG, L., & ZHANG, J. (2014). Crystal structures of PI3K α complexed with PI103 and its derivatives: New directions for inhibitors design. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, 5(2), 138–142. <https://doi.org/10.1021/ml400378e>

ZHOU, J., TOH, S. H. M., CHAN, Z. L., QUAH, J. Y., CHOOI, J. Y., TAN, T. Z., CHONG, P. S. Y., ZENG, Q., & CHNG, W. J. (2018). A loss-of-function genetic screening reveals synergistic targeting of AKT/mTOR and WTN/ β -catenin pathways for treatment of AML with high PRL-3 phosphatase. **Journal of Hematology and Oncology**, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0581-9>

ZONCU, R., SABATINI, D. M., & EFEYAN, A. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and Nat Rev Mol Cell Biol Author Manuscript Biol mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and aging. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025.mTOR>

ZANATTA, GEANCARLO, DELLA FLORA NUNES, G., BEZERRA, E. M., DA COSTA, R. F., MARTINS, A., CAETANO, E. W. S., FREIRE, V. N., & GOTTFRIED, C. (2016). Two Binding Geometries for Risperidone in Dopamine D3 Receptors: Insights on the Fast-Off Mechanism through Docking, Quantum Biochemistry, and Molecular Dynamics Simulations. **ACS Chemical Neuroscience**, 7(10), 1331–1347.

ZHANG, M. *et al.* PI3K inhibitors: Review and new strategies. **Chemical Science**, v. 11, n. 23, p. 5855–5865, 2020.

ZHANG, Y. J.; DUAN, Y.; ZHENG, X. F. S. Targeting the mTOR kinase domain: The second generation of mTOR inhibitors. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7–8, p. 325–331, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* Crystal structures of PI3K α complexed with PI103 and its derivatives: New directions for inhibitors design. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 138–142, 13 fev. 2014.

ZONCU, R.; SABATINI, D. M.; EFEYAN, A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and Nat Rev Mol Cell Biol Author Manuscript Biol mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and aging. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.