

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática

Luan Carvalho Martins

**PYAUTOFEP: UMA FERRAMENTA DE AUTOMAÇÃO PARA CÁLCULOS DE FEP PARA O
PROGRAMA GROMACS INTEGRANDO TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM ESTENDIDA**

Belo Horizonte

2021

Luan Carvalho Martins

**PYAUTOFEP: UMA FERRAMENTA DE AUTOMAÇÃO PARA CÁLCULOS DE FEP PARA O
PROGRAMA GROMACS INTEGRANDO TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM ESTENDIDA**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática do Instituto de Ciência Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioinformática.

Orientadora: Prof. Dra. Rafaela Salgado Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Elio Anthony Cino

**BELO HORIZONTE
2021**

043

Martins, Luan Carvalho.

PyAutoFEP: uma ferramenta de automação para cálculos de FEP para o programa GROMACS integrando técnicas de amostragem estendida [manuscrito] / Luan Carvalho Martins. - 2021.

127 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora Prof. Dra. Rafaela Salgado Ferreira. Coorientador Prof. Dr. Elio Anthony Cino.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Software. 3. Preparações Farmacêuticas. I. Ferreira, Rafaela Salgado. II. Cino, Elio Anthony. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"PyAutoFEP: uma ferramenta de automação para cálculos de FEP para o programa GROMACS integrando técnicas de amostragem estendida"

Luan Carvalho Martins

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa Rafaela Salgado Ferreira - Orientadora
UFMG

Prof. Elio Anthony Cino - Coorientador
UFMG

Profa Mariana Torquato Quezado de Magalhaes
UFMG

Profa Raquel Cardoso de Melo Minardi
UFMG

Prof. Pedro Geraldo Pascutti
UFRJ

Profa Manuela Leal da Silva
UFRJ

Belo Horizonte, 04 de junho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Torquato Quezado de Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 04/06/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafaela Salgado Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 04/06/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Geraldo Pascutti, Usuário Externo**, em 04/06/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manuela Leal da Silva, Usuário Externo**, em 04/06/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Cardoso de Melo Minardi, Professora do Magistério Superior**, em 04/06/2021, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elio Anthony Cino, Professor do Magistério Superior**, em 04/06/2021, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0764880** e o código CRC **3928FCE5**.

In memoriam, dedico este trabalho a Genaro Porfírio de Souza, meu sogro, e Valéria Soares de Melo Franco, minha amiga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, à minha esposa, Di, que esteve do meu lado, me apoiou e fez meus dias mais felizes nesses quatro anos, inclusive nos momentos mais difíceis. Obrigado por ser uma pessoa maravilhosa e por me dar forças para continuar. Agradeço por, acima de tudo, ter escolhido o amor.

Agradeço também a meus pais, Beatriz e Geraldo, a minhas irmãs, Ananda e Carolina, e irmão, Caio, pelo apoio, torcida e companhia. Pelas chamadas de vídeo, pelos bolos e pelas palavras de suporte. De longe e de perto, eu não teria conseguido sem vocês.

Agradeço também aos amigos, longe ou perto, que a vida reuniu ou separou, Aline, Ágata, Carol, Maria Luiza, Ingrid, Cristina, Cindy, Nathália, Iara, Cíntia, Camila, Ludmila, Taís, Buba, Ítalo, Raquel, Patrícia e Miguel.

Agradeço às amigas e aos amigos do Laboratório de Modelagem Molecular da UFMG, especialmente a Viviane dos Santos, Elany Barbosa, Naiá Porã, Thales do Valle, Augusto Campos e Lucianna Helene. Obrigado pelas ideias, discussões, cafés e risos. Obrigado por serem um grupo de pesquisa e um grupo de amigos. Agradeço também às amigas e aos amigos do Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos e do Laboratório de Biologia Computacional de Proteínas, especialmente Marcella Braga, Milene Carvalho, Laís Cardoso, Marcelo Afonso e Lucas Carrijo. Obrigado pela ciência, pelas boas conversas e pelos dias mais divertidos no ICB. Agradeço também a Profa. Liza Felicori e ao Prof. Lucas Bleicher do grupo de Biologia Computacional, que compreende estes três últimos laboratórios. Agradeço também aos colegas e amigos do ICB e da Farmácia Verônica Valadares, Mariana Amália Costa, Marina Andrade, Carmelina Leite, Flaviano Ottoni, Arthur Augusto, Ludmila Alves, Priscila Araújo, Natália Rocha e Mariana Costa Dias.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Rafaela Ferreira, e coorientador, Prof. Elio Cino, pela orientação neste projeto tão desafiador e com tantas reviravoltas. Obrigado pela orientação e pelo apoio neste e em outros projetos ao longo destes anos. Agradeço a Profa. Renata Barbosa e aos Prof. Marcos dos Santos e Prof. Adolfo Silva pelas colaborações nas quais trabalhamos juntos. Agradeço também ao Prof. Pedro Pascutti (UFRJ) pelas contribuições na ocasião de minha qualificação que foram muito importantes para o desfecho deste projeto.

Agradeço ao Professor Brian Shoichet por ter me recebido em seu laboratório e pela orientação durante o tempo em que estive em San Francisco. Agradeço também as amigas e amigos que fiz na UCSF, especialmente Ying Yang, Chase Webb, Stephan Gahbauer, Parnian Lak, Isha Singh e Tia Tummino. Obrigado pela ciência, pelo acolhimento, pela companhia e pelas histórias. Agradeço também aos meus *flatmates*, Faisal Bwahab e Usman Chaudhri. Obrigado por compartilharem comigo um ano de alegrias e tristezas na 2460 Fulton Street.

Agradeço aos amigos e colegas do Instituto de Geociências e da UFMG, pelo ambiente de trabalho e pela compreensão ao longo destes quatro anos, especialmente Raquel Silva, Alfredo Ribeiro, Bruno Neves, Mara Rosa, Diana Quadros. Obrigado por tudo.

Agradeço às agências financiadoras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais pelo financiamento para o Laboratório de Modelagem Molecular e Planejamento de Fármacos. Agradeço, adicionalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelos recursos, no âmbito do programa de internacionalização CAPES-PrInt, que me permitiram realizar o doutorado sanduíche. Agradeço também aos recursos computacionais disponibilizados pela Compute Canada (<http://www.computecanada.ca>) que permitiram executar parte deste trabalho.

RESUMO

Cálculos de Perturbações de Energia Livre (*Free Energy Perturbation*, FEP) são, na atualidade, rotineiramente aplicados na descoberta de fármacos para estimar a energia de Gibbs relativa de ligação de pequenas moléculas a alvos biomoleculares de interesse. A aplicação de técnicas de amostragem estendida pode melhorar a correlação entre previsões e dados experimentais, especialmente em sistemas com mudanças conformacionais. Devido ao grande número de perturbações necessárias em uma campanha de descoberta de fármacos, a preparação manual de cálculos de FEP não é viável. Neste trabalho, apresentamos o PyAutoFEP, uma ferramenta flexível e de código aberto para automatizar a preparação de cálculos de FEP para energia de Gibbs relativa de ligação. PyAutoFEP foi escrito em Python3 e automatiza a geração de mapas de perturbação, topologias duplas, construção de sistemas para simulações de Dinâmica molecular e análise. O PyAutoFEP suporta diversos campos de força, incorpora diferentes versões de métodos de amostragem REST2 e esquemas flexíveis de janelas de λ para representar a perturbação. Para validar a ferramenta PyAutoFEP, esta foi aplicada para uma série de 14 ligantes do receptor Farnesóide X. Este sistema fez parte do desafio para a comunidade Grand Challenge 2, organizado pelo grupo Drug Design Data Resources. Uma média de 88% de sinais corretos das previsões foi observado e 75% das previsões alcançaram erros menores do que 1,5 kcal/mol. Resultados utilizando os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OLSA-AA/M/LigParGen obtiveram r de Pearson de $0,71 \pm 0,13$, $0,30 \pm 0,27$ e $0,66 \pm 0,20$, respectivamente. Os resultados utilizando o Amber03/GAFF e OPSA-AA/M/LigParGen foram comparáveis às melhores submissões originais ao Grand Challenge 2. A aplicação da REST2 melhorou os resultados utilizando o CHARMM36m/CGenFF (r de Pearson = $0,43 \pm 0,21$), porém pouco impacto foi observado para os outros campos de força. Finalmente, utilizando um modelo estatístico, foi estimada a probabilidade de descoberta de moléculas com potência ao menos uma unidade de 1 pK_i melhor do que um protótipo hipotético, quando uma ferramenta como o PyAutoFEP é aplicada para triar 10 ou 100 análogos. As probabilidades são até 7 vezes maiores se comparadas àquela obtida usando seleção aleatória, quando 100 moléculas são triadas, indicando que o PyAutoFEP pode ser útil em problemas de otimização de protótipos. O PyAutoFEP está disponível no repositório do grupo, <https://github.com/lmmpf/PyAutoFEP>.

Palavras-chave: Perturbação de energia livre. FEP. Dinâmicas Moleculares. Ligantes. Descoberta de fármacos de pequenas moléculas

ABSTRACT

Free Energy Perturbation (FEP) calculations are now routinely used in drug discovery to estimate the relative free energy of binding (RFEB) of small molecules to a biomolecular target of interest. Using enhanced sampling can improve the correlation between predictions and experimental data, especially in systems with conformational changes. Due to the large number of perturbations required in drug discovery campaigns, manual setup of FEP calculations is no longer viable. Here, we introduce PyAutoFEP, a flexible and open-source tool to aid the setup of RFEB FEP. PyAutoFEP is written in Python3, and automates the generation of perturbation maps, dual-topologies, system building and molecular dynamics (MD), and analysis. PyAutoFEP supports multiple force fields, incorporates two flavors of REST2 enhanced sampling method, and allows flexible λ values along perturbation windows. To validate PyAutoFEP, it was applied to a set of 14 Farnesoid X receptor ligands, a system included in the Drug Design Data Resource Grand Challenge 2. A mean 88% correct sign prediction was achieved, and 75% of the predictions had an error below 1.5 kcal/mol. Results using Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF, and OLSA-AA/M/LigParGen had Pearson's r values of 0.71 ± 0.13 , 0.30 ± 0.27 and 0.66 ± 0.20 , respectively. The Amber03/GAFF and OLSA-AA/M/LigParGen results were on par with the top Grand Challenge 2 submissions. Applying REST2 improved the results using CHARMM36m/CGenFF (Pearson's $r = 0.43 \pm 0.21$), but had little impact on the other force fields. Finally, we estimated the probability of finding a molecule 1 pK_i better than a lead when using PyAutoFEP to screen 10 or 100 analogs. The probabilities, when comparing to random sampling, increased up 7-fold when 100 molecules were to be screened, suggesting that PyAutoFEP would likely be useful for lead optimization. PyAutoFEP is available on GitHub at <https://github.com/lmmpf/PyAutoFEP>.

Keywords: Free Energy Perturbations. FEP. Molecular dynamics. Ligands. Small molecule drug discovery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Modelo matemático simplificado do fluxo de descoberta de fármacos. Adaptado de Abel e colaboradores (ABEL et al., 2018). 19
- Figura 2** - Perfil de energia de Gibbs de um sistema ao longo de uma variável coletiva arbitrária descrevendo diferentes conformações de um sistema. Em verde, possíveis confirmações amostradas em uma DM hipotética, todos presos em um estado metaestável de alta energia. A simulação não consegue superar a barreira que permitiria explorar regiões de energia mais baixas. 26
- Figura 3** - Esquema simplificado de uma simulação a troca de réplicas é aplicada. A cada m passos de integração, uma tentativa de troca de réplicas executada entre réplicas adjacentes. As trocas aceitas levam a inversão das temperaturas das réplicas em questão, representados pelas linhas coloridas. Diferentes níveis de temperatura são denotados pelos níveis horizontais. 27
- Figura 4** – Representação do ciclo termodinâmico utilizado para cálculo de $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ de ligação a um alvo macromolecular (representado pela forma cinza) entre os ligantes A (representado por um triângulo azul) e B (representado por uma estrela verde). O $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ de ligação pode ser obtido simulando o evento de ligação ou desligamento de cada ligante ao alvo (setas horizontais) ou pela simulação não-física da transformação do ligante A em B em complexo e em solvente (setas verticais). 31
- Figura 5** – Representação esquemática da transformação de uma pequena molécula A em B em água. Na parte superior uma representação da amostragem ao longo da coordenada de transformação em cada estado inicial, intermediários e final. Regiões de sobreposição de amostragem na coordenada de transformação por diferentes estados estão destacadas (regiões verdes). Na parte inferior, uma representação dos estados gerados por cada valor de λ : o estado inicial é obtido com $\lambda=0$ (triângulo azul) e o final, com $\lambda=1$ (estrela verde). Valores entre 1 e 0 produzem uma mistura não-física dos estados inicial e final (representados por um híbrido entre a estrela e o triângulo). 35
- Figura 6** – Exemplo de mapa de perturbações (como grafo não direcional) gerado com o programa LOMAP. Cada vértice do grafo representa uma molécula e cada aresta, uma perturbação conectando estas moléculas. Adapado de Liu e colaboradores (LIU et al., 2013). 48

Figura 7 - Visão geral dos mecanismos de inibição da síntese de ácidos biliares via ativação do FXR. Adaptado de Claudel e colaboradores (CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT, 2005).	55
Figura 8 - Visão geral da circulação de ácidos biliares entre o fígado e o intestino e a regulação do FXR sobre este processo. Adaptado com modificações de (CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT, 2005).	56
Figura 9 - Estrutura do receptor Farnesóide X. (A) Visão geral da proteína. Ressaltado em roxo, região de ligação ao RXR. Ressaltado em verde, sítio de ligação aos ácidos biliares. (B) Modo de ligação do ligante FXR_10 ao receptor FXR , ressaltando resíduos próximos ao ligante.	58
Figura 10 - Visão geral do fluxo do programa PyAutoFEP, ressaltando suas três partes principais: generate_perturbation_map.py, que gera mapas de perturbação; prepare_dual_topologies.py, que gera topologias duplas dos ligantes e prepara sistemas para execução das simulações; e analyze_results.py, que analisa os resultados das DM. Itens em amarelo são entradas de usuário, em vermelho são saídas, em azul são funções internas do PyAutoFEP e, em cinza a execução do GROMACS.	61
Figura 11 - Três tipos de mapa de perturbação gerados pelo programa PyAutoFEP. (A) Mapa em forma de estrela. (B) Mapa em forma de roda. (C) Mapa otimizado.	62
Figura 12 - Fluxograma geral do script prepare_dual_topology.py e da execução das simulações. Caixas em amarelo são entradas do usuário, em azul funções internas do PyAutoFEP e vermelhas, saídas para o usuário. O mapa de perturbação (célula verde) é uma entrada para este script, porém pode ser gerado pelo próprio PyAutoFEP e carregado automaticamente. Na execução das simulações, as formas representam as coordenadas e a cor, as hamiltonianas.	67
Figura 13 – Representação esquemática de topologias duplas (acima) e simples (abaixo) usadas para modelar a transformação não física de uma molécula contendo átomos alaranjados em uma molécula contendo átomos verdes.	69
Figura 14 - Esquemas de perturbação utilizando diferentes estratégias. (A) Perturbação concomitante de termos de Coulomb e Van der Waals. (B) Perturbação utilizando três etapas separadas denotadas por uma linha vertical tracejada: descarga da região A, transformação dos termos de Van de Waals e	

carregamento da região B. (C) Transformação independente dos termos de Coulomb e Van der Waals das regiões A e B. 72

Figura 15 - Mapa de perturbações utilizado para os ligantes da série spiro do receptor Farnesóide X. 75

Figura 16 - Esquema da perturbação **FXR_10**→**FXR_79**. Átomos perturbados ressaltados em azul. 82

Figura 17 - Matrizes de sobreposição de estados vindas do estimador Multistep Bennet Acceptance Ratio. (A) Matriz de sobreposição da perturbação **FXR_10**→**FXR_79** utilizando 12 janelas de lambda e o campo de força Amber03/GAFF, sem REST2. (B) Matriz de sobreposição da perturbação **FXR_10**→**FXR_79** utilizando 24 janelas de lambda e o campo de força Amber03/GAFF, sem REST2. (C) Matriz de sobreposição da perturbação **FXR_10**→**FXR_76** utilizando 12 janelas de lambda e o campo de força Amber03/GAFF, sem REST2. 84

Figura 18 - Distribuição de erros das predições médias, dados como $\Delta\Delta G_{\text{exp}} - \Delta\Delta G_{\text{calc}}$, em relação ao ligante **FXR_10**, obtidos com todos os campos de força e com ou sem REST2. 86

Figura 19 - Correlação entre energias de Gibbs experimentais e energias de Gibbs médias previstas em relação ao ligante **FXR_10** utilizando os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen. A região cinza clara delimita a região de erro de 2 kcal/mol, a região cinza escura, a região de erro de 1 kcal/mol. A linha preta tracejada marca a correlação teórica $Y = X$ 88

Figura 20 - Resultados da simulação estatística avaliando o efeito de métodos de triagem sobre uma campanha de otimização hipotética triando $N=10$ (a) e $N=100$ (b). A distribuição preta representa o ddG relativo de análogos selecionados aleatoriamente. A distribuição azul representa o ddG relativo de análogos selecionados por um método teórico perfeito, com desvio padrão nulo. A distribuição laranja representa o ddG relativo de análogos selecionados por um método com desvio padrão de 1,35 kcal/mol. 99

Figura 21 - Resíduos próximos do sítio de ligação afetados pelos parâmetros refinados de Lennard-Jones das variantes CHARMM36-YF e CHARMM36-WYF do CHARMM36. Estrutura da proteína em *cartoon* verde, ligante cristalográfico **FXR_10** com carbonos em laranja. (A) Tir264 e Arg335, com carbonos em rosa, resíduos entre os quais é possível haver interação cátion-pi. (B) Phe333, Tir365 e Trp473, com carbonos em cinza, resíduos aromáticos próximos ao ligante cristalográfico. 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das principais características dos métodos para cálculo energia livre discutidos nesta seção quando aplicados para estimar afinidade relativas entre ligantes se ligando a um alvo macromolecular.....	42
Tabela 2 – comparação das principais características de ferramentas de automação de cálculos de FEP reportadas da literatura.....	53
Tabela 3 - Perturbações para as quais uma caixa com distância mínima de 1,5 nm entre as faces e o soluto foi utilizada nas simulações em água	76
Tabela 4 - Coeficientes de escalonamento de termos de Van der Waals (VdW) e Coulomb (Coul) das topologias A e B ao longo da transformação em função de λ utilizando 12 janelas para representar a perturbação.....	77
Tabela 5 - Coeficientes de escalonamento de termos de Van der Waals (VdW) e Coulomb (Coul) das topologias A e B ao longo da transformação em função de λ utilizando 24 janelas para representar a perturbação.....	77
Tabela 6 - Média e desvio padrão das predições para cada ligante da série spiro contra o FXR, em relação ao ligante de referência FXR_10, obtidas utilizando 12 janelas de λ (Tabela 4) e diferentes campos de força e na presença ou ausência da técnica de amostragem estendida REST2.....	81
Tabela 7 - Resultados individuais das réplicas utilizando o campo de força Amber03/GAFF sem REST2 utilizando 12 e 24 janelas de λ para todas as perturbações, exceto FXR_10 → FXR_79	85
Tabela 8 - Dados estatísticos das predições médias obtidas com os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, com ou sem aplicação da técnica de amostragem estendida REST2.....	89
Tabela 9 - Dados estatísticos das predições médias obtidas com variantes do campo de força CHARMM36: CHARMM36m/CGenFF, CHARMM36-YF/CGenFF e CHARMM36-WYF/CGenFF.	91

Tabela 10 - Dados das submissões originais ao *Grand Challenge 2* extraídos do *site* do consórcio *Drug Discovery Data* e adaptados..... 93

Tabela 11 - Dados estatísticos das predições obtidas por réplicas individuais obtidas com os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, com ou sem aplicação da técnica de amostragem estendida REST2. (continua)..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO	<i>Ant Colony Optimization</i>
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
Ala	Alanina
Arg	Arginina
BAR	<i>Bennett Acceptance Ratio</i>
CI₅₀	Concentração necessária para produzir 50% de inibição
D3R	<i>Drug Design Data Resources</i>
DM	Dinâmica molecular
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i> , Perturbação de Energia Livre
FXR	Receptor Farnesóide X
GBSA	<i>Generalized Born Solvent Accessible Surface Area</i>
GC2	<i>Grand Challenge 2</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LIE	<i>Linear Interaction Energy</i>
LOMAP	<i>Lead Optimization Mapper</i>
MAE	<i>Mean Absolute Error</i> , erro absoluto médio
MBAR	<i>Multistep Bennett Acceptance Ratio</i>
MCS	<i>Maximum Common Substructure</i>
PBSA	<i>Poisson-Boltzmann Solvent Accessible Surface Area</i>
Phe	Fenilalanina
pK_i	Negativo do logaritmo da constante de inibição
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
REMD	<i>Replica-Exchange Molecular Dynamics</i> , Dinâmicas moleculares com troca de réplicas
REST	<i>Replica Exchange with Solute Tempering</i>
REST2	<i>Replica-Exchange with Solute Scaling</i>
RFEB	<i>Relative Free Energy of Binding</i> , Energia de Gibbs Relativa de Ligação
RMSD	<i>Root mean square deviation (of atomic positions)</i>
RMSEc	<i>Centered Root Mean Square Error</i>
SMILES	<i>Simplified molecular-input line-entry system</i>
TI	<i>Thermodynamical integration</i> , integração termodinâmica
Tir	Tirosina
Trp	Triptofano
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Planejamento de fármacos assistido por computador.....	18
1.2	Dinâmica molecular	20
1.3	Métodos para aumento da amostragem	25
1.4	Método FEP.....	30
1.5	Metodologias computacionais para estimativa de energia livre aplicadas a interação de pequenas moléculas a alvos macromoleculares	37
1.6	Aplicação da FEP para determinação de energia de Gibbs de interação entre pequenas moléculas e alvos biológicos.....	44
1.7	Ferramentas de automação de cálculos de FEP.....	50
1.8	Receptor Farnesóide X como sistema modelo	53
2	OBJETIVOS	59
2.1	Objetivo geral	59
2.2	Objetivos específicos.....	59
3	METODOLOGIA	60
3.1	Desenvolvimento da ferramenta de automação PyAutoFEP	60
3.1.1	Geração de mapa de perturbações.....	61
3.1.2	Preparação de topologias duplas e de sistemas para DM.....	66
3.1.3	Análise dos resultados.....	73
3.2	Cálculos de FEP de uma série de ligantes do receptor Farnesóide X	74
3.2.1	Análises estatísticas.....	78
3.2.2	Simulação estatística de aplicação do PyAutoFEP em processos de otimização de ligantes	79
4	RESULTADOS	80
5	DISCUSSÃO	100
6	CONCLUSÃO	107
7	PERSPECTIVAS	109
8	REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Planejamento de fármacos assistido por computador

A importância do planejamento de fármacos assistido por computador para a descoberta de fármacos, tanto na academia quanto na indústria, se tornou incontestável (VIVO et al., 2016; WARR, 2017). Entre as diversas aplicações, a predição de energia de Gibbs de ligação de uma pequena molécula a um alvo biomolecular é de especial interesse. Em geral, uma campanha de desenvolvimento de fármacos é iniciada pela seleção de um alvo biológico a ser modulado por uma pequena molécula orgânica. Em seguida, um ou um grupo de protótipos – pequenas moléculas com atividade contra o alvo de interesse – é selecionado. Protótipos frequentemente são oriundos de campanhas de triagem virtual ou experimental em larga escala (BROWN, 2007). Em seguida, é necessária a otimização do ou dos protótipos, onde a eficácia, seletividade e propriedades farmacocinéticas são consideradas (KESERÚ; MAKARA, 2006; WUNBERG et al., 2006). Este processo envolve a síntese de uma variedade de análogos do composto protótipo, ensaios para avaliação da potência contra o alvo, ensaios fenotípicos e determinação de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Cada nova proposta sintética se traduz em custo de tempo e recursos para gerar, ao final, um candidato para as etapas subsequentes (BAILLIE; MACCOSS, 2004). Abel e colaboradores apresentaram, em trabalho de 2018, uma discussão sobre a distribuição de potência de análogos sintetizados em campanhas de descoberta de fármacos, especialmente em contextos industriais (ABEL et al., 2018). Analisando retrospectivamente uma campanha industrial de otimização de um protótipo contra um alvo não revelado, propõe que cerca de 10% das moléculas sintetizadas e testadas se mostram suficientemente potentes para seguir para ensaios *in vivo*. Adicionalmente, os autores sugerem que, em geral, o maior desafio na otimização é a otimização de propriedades de ADMET, mantendo a potência, o que estaria associado a uma baixa taxa de acerto. Esta baixa taxa seria causada por *activity cliffs* observados quando propriedades físico-químicas são otimizadas. Na construção do modelo matemático os autores consideraram como suficientemente potente moléculas com potência de $pIC_{50} = 8$. Destas moléculas que avançam para estudos *in vivo*, os autores afirmam que apenas uma pequena fração tem as propriedades necessárias para o seguimento do desenvolvimento (**Figura 1**). Assim, ferramentas que subsidiem a priorização de compostos para a síntese e ensaios, maximizando a probabilidade de que moléculas escolhidas sejam efetivamente ativas, tem potencial de reduzir o atrito e diminuir custos de campanhas de descoberta de fármacos.

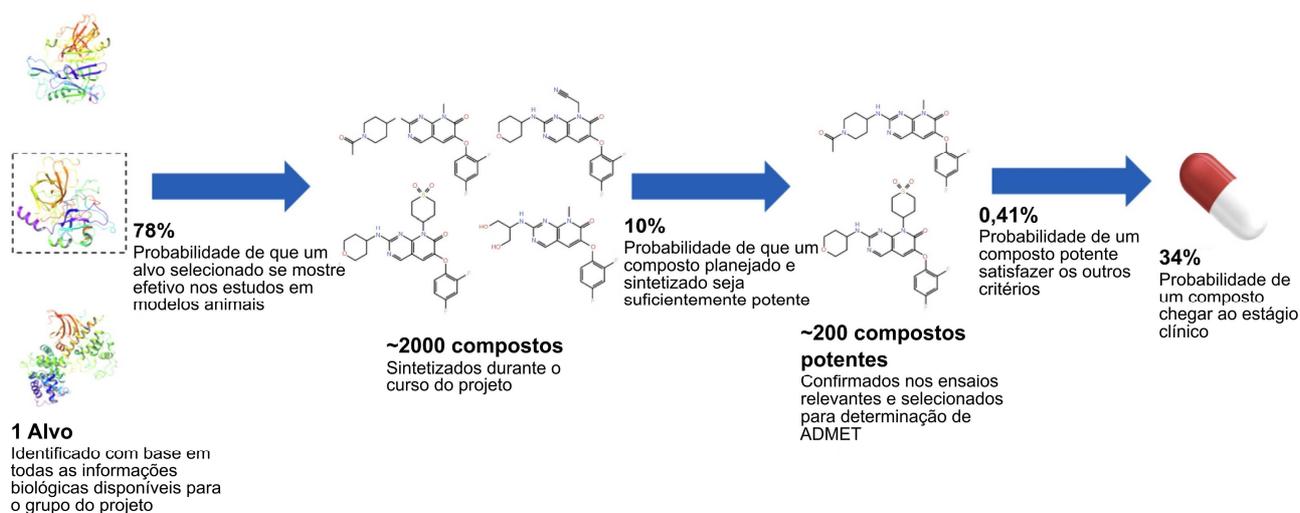


Figura 1 - Modelo simplificado do fluxo de descoberta de fármacos. Adaptado de Abel e colaboradores (ABEL *et al.*, 2018).

A priorização de moléculas para a síntese pode ser auxiliada por técnicas que estimem a afinidade da interação de pequenas moléculas contra o alvo biomolecular em estudo. A afinidade, medida pela constante de inibição K_i , está relacionada à energia de Gibbs de interação pela (Equação 1). Logo, a estimativa da variação da energia de Gibbs (ΔG) de interação permite inferir sobre o K_i de um ligante, assim, e propor compostos mais ativos.

$$\Delta G = -RT \ln K_i \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde ΔG é a variação da energia de Gibbs, R é a constante dos gases, T é temperatura absoluta, e K_i a constante de inibição.

É também de grande interesse a predição da afinidade relativa entre um grupo de moléculas – ou seja, estimar $\Delta \Delta G$ entre os complexos de dois ligantes com um mesmo alvo em vez de estimar o ΔG de formação de um complexo. Em um contexto de otimização, predizer a afinidade relativa $\Delta \Delta G$ entre uma molécula planejada e um protótipo conhecido é suficiente, mesmo sem a predição absoluta ΔG , permitindo reduzir esforços sintéticos e experimentais, através do foco em compostos com maior probabilidade de potência aumentada. A afinidade relativa entre dois ligantes está relacionada à energia de Gibbs relativa de ligação (*Relative Free Energy of Binding*, RFEB).

Em geral, no contexto acadêmico, rodadas de otimização significam a síntese de poucas dezenas de compostos. Em um contexto industrial, onde há mais recursos disponíveis, várias centenas de compostos podem ser sintetizados (**Figura 1**). Assim, uma ferramenta útil para subsidiar a otimização de protótipos precisa apresentar escalabilidade para um grande número de predições.

Adicionalmente, um nível baixo de erros é desejável, embora exista uma discussão na literatura a este respeito. Brown e colaboradores, utilizando modelos matemáticos derivados de dados internos de campanhas de otimização da farmacêutica Abbot, propõe que um erro de no máximo 1,4 kcal/mol é necessário para uma técnica de predição ter impacto relevante em uma otimização (BROWN; MUCHMORE; HAJDUK, 2009). Pouco depois, baseado em um conjunto de dados mais amplo da mesma empresa (HAJDUK; SAUER, 2008), Shirts e colaboradores concluem que, para auxiliar na obtenção compostos mais potentes por 1 unidade de pK_i em relação a um protótipo hipotético, uma técnica de priorização deve ter um erro de até 2,0 kcal/mol (SHIRTS; MOBLEY; BROWN, 2010). Esse estudo, entretanto, pressupôs que os erros associados a essa técnica sigam uma distribuição normal, o que pode não ser realista. Observando essa possibilidade, Abel e colaboradores modelaram o impacto de uma técnica de priorização com erros seguindo distribuições normais e de Cauchy – uma distribuição com distribuição similar à normal, mas com probabilidade aumentada nas caudas (ABEL et al., 2018). Os resultados mostram que a distribuição de erros tem um impacto maior do que o desvio padrão em si, e sugere que idealmente os erros de um método devem seguir uma distribuição normal com desvio de até 2,0 kcal/mol (nota: a distribuição de Cauchy tem desvio padrão indefinido). Consequentemente, uma técnica de priorização deve ter uma distribuição normal de erros com desvio padrão de 1-2 kcal/mol.

A RFEB experimental de um par de compostos é uma média da energia de Gibbs de um conjunto de conformações microscópicas do receptor, ligante e proximidades. Por isso, diversas técnicas de predição de RFEB utilizam uma amostragem de diferentes conformações para aumentar a acurácia. Algumas poucas aplicações utilizam o método de Monte Carlo para gerar tais conformações (JORGENSEN, 2016). A maioria das implementações, entretanto, utilizam dinâmicas moleculares.

1.2 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica que simula a evolução temporal de um sistema de partículas através da solução numérica de equações de movimento. Em que pese que existam métodos nos quais o movimento dos núcleos seja tratado quanticamente (SHIMOJO et al., 2019), para aplicações em sistemas biomoleculares, equações clássicas de movimento são quase que exclusivamente utilizadas.

As equações clássicas de movimento ((**Equação 2**) não têm solução analítica para mais de dois corpos e, por isso, precisam ser integradas numericamente. Utilizando um método numérico estável e escolhendo um intervalo dt suficientemente pequeno, é possível simular um grande número de passos que perfazem uma trajetória de um sistema de partículas.

$$\begin{aligned} d\vec{x} &= v d\vec{t} \\ d\vec{v} &= \frac{\vec{F}}{m} dt \end{aligned} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde \vec{x} são as posições da partícula; \vec{v} é a velocidade; \vec{F} é a força agindo sobre a partícula e m sua massa.

Um formalismo alternativo foi proposto por William Hamilton, dito, por isto, mecânica Hamiltoniana (**Equação 3**). Ambas as formulações são equivalentes.

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{p}}{dt} &= \frac{-\partial H}{\partial \vec{q}} \\ \frac{d\vec{q}}{dt} &= \frac{\partial H}{\partial \vec{p}} \end{aligned} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde \vec{p} são os momentos; \vec{q} são as posições das partículas; $\frac{d\vec{p}}{dt}$ é a força agindo sobre a partícula; e H é a Hamiltoniana, um operador que corresponde à energia total do sistema.

Um dos primeiros usos da Dinâmica Molecular foi descrito em 1959 por Alder e Wainwright, que aplicaram um integrador numérico especial para estudar pequenos grupos ($n=32$ até $n=500$) de esferas rígidas descritas por um potencial retangular. Este sistema extremamente simples apresenta algumas propriedades correlacionadas com fluídos, de forma que os autores aplicaram este método para estudar transições de fase (ALDER; WAINWRIGHT, 1959). Em 1969 Levitt e Lifson reportaram a primeira minimização da energia de uma proteína completa, aplicando campos de força e coordenadas

cartesianas – uma inovação na época. Os autores refinaram as estruturas cristalográficas da lisozima e da mioglobina (LEVITT; LIFSON, 1969). Em 1971 Rahman e Stillinger reportaram a primeira dinâmica de um líquido polar, a água. Neste estudo os autores utilizaram condições periódicas de contorno, controle de temperatura e um integrador numérico para simular uma caixa de 216 moléculas de água (RAHMAN; STILLINGER, 1971).

Embora DM utilizando outras abordagens existam (GIBSON; IONOVA; CARTER, 1995; ZHOU et al., 2016), neste trabalho serão discutidos exclusivamente sistemas cujas hamiltonianas são descritas por campos de força. Um campo de força é um conjunto de equações simples que descrevem o potencial de interação entre partículas, que representam átomos. Os elétrons e todos os efeitos eletrônicos são abstraídos nestas equações, que, por isso, são aproximações extremas da realidade microscópica. Esta aproximação extrema permite que a hamiltoniana e o gradiente do sistema tenham soluções analíticas, com custo computacional mínimo em relação ao formalismo quântico, o que permite a simulação rotineira de sistemas com milhares ou até mesmo milhões de átomos, necessário para representar biomoléculas em solução.

Diversos campos de força foram desenvolvidos para DM de biomoléculas (HUANG et al., 2017; LINDORFF-LARSEN et al., 2010) e para aplicações especializadas (SENFTLE et al., 2016; STERNBERG; WITTER; ULRICH, 2007). Dentre os campos de força mais utilizados do primeiro grupo estão os campos de força AMBER, cujas equações gerais estão apresentadas na **Equação 4**.

$$E_{total} = \sum_{\text{ligações}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{n} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i \neq j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde E_{total} é a energia potencial do sistema; K_r , K_θ , V_n , A_{ij} , B_{ij} são constantes de estiramento, deformação angular, rotação diedral, repulsão de van der Waals e atração de van der Waals, respectivamente; r é a distância entre dois átomos ligados; r_{eq} é a distância de equilíbrio de uma ligação; θ é o ângulo entre três átomos; θ_{eq} é o ângulo de equilíbrio entre três átomos; $n \in \mathbb{N}^*$, é a ordem; ϕ é o ângulo de diedro entre quatro átomos; γ é um ângulo de deslocamento de fase; R_{ij} é a distância entre um par de átomos; q_i e q_j é a carga nos átomos i e j , respectivamente; ϵ é a constante dielétrica.

Os três primeiros somatórios da **Equação 4** são ditos termos ligados, por descrevem o potencial entre átomos que estão conectados por ligações químicas. O último somatório agrupa o potencial de van der Waals $\left(\sum_{i<j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \right)$ e o potencial eletrostático $\left(\sum_{i<j} \left[\frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \right)$. Estes dois últimos termos são ditos não ligados, embora atuem sobre átomos em diferentes moléculas e na mesma molécula separada por três ou mais ligações. Embora a forma exata do funcional seja específica para cada campo de força, a maior parte dos campos de força para aplicações biomoleculares (ou seja, campos de força não especializados) apresentam um formato geral similar ao apresentado na **Equação 4**.

Para aplicação das equações clássicas de movimento, é necessário calcular a força em cada partícula \vec{F} na (**Equação 2**) ou as derivadas parciais da Hamiltoniana em relação às posições das partículas $\left(-\frac{\partial H}{\partial \vec{q}}\right)$ e as velocidades, ou as derivadas parciais da Hamiltoniana em relação aos momentos $\left(-\frac{\partial H}{\partial \vec{p}}\right)$, ambos na (**Equação 3**). As derivadas de equações como as da **Equações 6** são analíticas, podem ser implementadas com facilidade e calculadas rapidamente. Desta forma, campos de força são muito úteis associados à equações clássicas de movimento.

É importante observar que a ligação entre duas partículas e os ângulos entre três partículas é representada por um potencial harmônico. Isto é uma aproximação aceitável próximo ao equilíbrio e próximo à temperatura fisiológica, mas totalmente incorreta longe deste. Naturalmente, não é possível modelar ruptura e formação de ligações utilizando estas funções. Adicionalmente, as cargas q_n são fixas ao longo da simulação, logo efeitos de polarização não serão representados. Esta última aproximação é uma relevante limitação para aplicações biomoleculares (BAKER, 2015; HUANG et al., 2014; SÖDERHJELM; RYDE, 2009).

Recentemente, a introdução da computação sobre processadores massivamente paralelos, como os presentes em placas gráficas, permitiu um novo ganho de velocidade. Com máquinas modernas é possível atingir rotineiramente simulações de milhares ou mesmo milhões de átomos. Por exemplo, Perilla e Schulten, utilizaram DM para estudar a estrutura do capsídeo viral do HIV-1 numa simulação com 64 milhões de átomos ao longo de 1 μ s (PERILLA; SCHULTEN, 2017). Jung e colaboradores demonstraram recentemente a viabilidade de simulações de larga escala massivamente paralelas ao simular cerca de 1 ns de um sistema atômico do locus genômico GATA4, com 83 kb e 427

nucleossomos, perfazendo um total de 1 bilhão de átomos (JUNG et al., 2019). Os autores, utilizando o código altamente paralelizado GENESIS e mais de 100,000 CPU, foram capazes de obter velocidades de cerca de 1 ns/dia com um passo de integração de 1 fs. O estudo deste tipo de sistema de grande escala permite aproximar as simulações de observações macroscópicas e estudar processos estruturais complexos. Por outro lado, esses ganhos de velocidade permitem estudos com simulações de períodos antes inacessíveis. Num trabalho clássico de 2010, Shaw e colaboradores aplicaram DM para estudar o enovelamento de proteínas sem aplicar qualquer técnica que acelere tal processo. Até a publicação deste trabalho, acreditava-se que observar o enovelamento de proteínas utilizando DM era infactível, devido ao tempo de simulação necessário. Entretanto, em simulações de até 1 ms, os autores observaram o enovelamento espontâneo de 12 proteínas com diferentes motivos estruturais (SHAW et al., 2010). Em 2013, parte dos autores deste trabalho reportaram o enovelamento e desenovelamento espontâneo da ubiquitina, proteína com 76 resíduos de aminoácidos, a maior proteína cujo enovelamento espontâneo foi observado por DM (PIANA; LINDORFF-LARSEN; SHAW, 2013). Mais recentemente, como parte do esforço global de identificação de alvos, o grupo de pesquisa D. E. Shaw disponibilizou trajetórias de simulação de diversas proteínas do SARS-CoV-2, incluindo trajetórias de 100 μ s das MPro e 3CLPro (“Molecular Dynamics Simulations Related to SARS-CoV-2”, 2020, p. 2). Tais simulações longas permitem observar processos em escalas de tempo antes não acessíveis por DM. Por exemplo, analisando a trajetória de 100 μ s da MPro supracitada, Carli e colaboradores identificaram sítios alostéricos putativos em tal proteína (CARLI et al., 2021). Tais simulações de larga escala ou longa duração só são possíveis devido à utilização de campos de força. Efetivamente, as DM que não aplicam campos de força ou aplicam uma combinação de campos de força e mecânica quântica têm grande custo computacional, de forma que sua aplicação é limitada.

Alguns campos de força especializados empregam uma simplificação ainda mais severa da realidade microscópica, representando grupos de átomos como uma única pseudopartícula, visando aumento de velocidade da simulação às expensas de uma representação menos acurada da realidade (JARIN; NEWHOUSE; VOTH, 2021). Em geral, estas simulações aplicam solvente implícito onde, em vez de uma representação molecular do solvente – que é quase sempre água –, utilizam-se equações que descrevem o efeito médio do meio, baseado em sua constante dielétrica. DM aplicando estes campos de força são chamadas de *coarse grained*, em oposição às simulações atomísticas, onde todos os átomos são representados. Este métodos permitem a amostragem de tempos de simulação mais longos e de

sistemas maiores (NAWAE et al., 2014), devido ao número menor de partículas combinado com passos de integração numérica mais longos. Alguns dos campos de força *coarse grained* para biomoléculas mais utilizados são o MARTINI (BARNOUD; MONTICELLI, 2015) e o SIRAH (MACHADO et al., 2019), sendo que esta abordagem é também frequentemente aplicada para polímeros (BOCHICCHIO; PAVAN, 2017; KEMPFER et al., 2019).

Um sistema amostrado por DM – seja atomístico seja *coarse grained* – como descrito acima pode estar em diferentes estados, neste caso entendido como diferentes posições das partículas. O conjunto de todos os possíveis estados acessíveis a um sistema é chamado de espaço de fase. A teoria fundamental da DM é a ideia de ergodicidade, uma situação do sistema no qual a amostragem ao longo do tempo é equivalente a amostrar o espaço de fase. Assim, uma simulação suficientemente longa permite visitar uma região importante do espaço de fase, representativa das principais conformações acessíveis ao sistema.

1.3 Métodos para aumento da amostragem

Embora a ergodicidade seja um pressuposto geral para as DM, na prática barreiras de energia de Gibbs da ordem de alguns poucos kcal/mol estão associados a uma probabilidade muito baixa de transição (PIETRUCCI, 2017). A travessia espontânea destas barreiras requer um tempo de simulação infactível. Assim, frequentemente a amostragem é prejudicada por estados de pseudo-ergodicidade, ou seja, estados onde a amostragem no tempo parece amostrar o espaço de fase, porém apenas uma pequena região próxima a um mínimo local é efetivamente visitada. Isto ocorre quando múltiplos mínimos locais na hiper-superfície de energia, ditos estados metaestáveis, são separados por barreiras suficientemente grandes para que a DM não as atravesse no tempos de simulação realizado (**Figura 2**) (PIETRUCCI, 2017).



Figura 2 - Perfil de energia de Gibbs de um sistema ao longo de uma variável coletiva arbitrária descrevendo diferentes conformações de um sistema. Em verde, possíveis conformações amostradas em uma DM hipotética, todos presos em um estado metaestável de alta energia. A simulação não consegue superar a barreira que permitiria explorar regiões de energia mais baixas.

Um exemplo clássico é a cavidade da lisozima de T4 com mutação L99A. Este mutante foi desenvolvido com uma cavidade capaz de receber ligantes (ERIKSSON et al., 1992). Um estado de baixa população e transição em escala de tempo de μs foi observado em experimentos (BOUVIGNIES et al., 2011) e simulações (SCHIFFER et al., 2016). Este estado afeta cálculos de energia de Gibbs. Por exemplo, Mobley e colaboradores observaram que o movimento lento da Val111 afeta a predição de ΔG de pequenos ligantes aromáticos à cavidade (MOBLEY et al., 2007).

Diversas técnicas de amostragem estendida foram propostas na literatura. Uma das técnicas mais populares se chama *Replica Exchange Molecular Dynamics* (REMD) e se baseia na simulação paralela de diversas cópias de um mesmo sistema a diferentes temperaturas (SUGITA; OKAMOTO, 1999). Periodicamente, ocorre uma tentativa de permuta entre as réplicas a diferentes temperaturas (**Figura 3**), utilizando o critério de Metropolis ((**Equação 5**), de forma que as réplicas em altas temperaturas são capazes de cruzar barreiras conformacionais e esta informação é propagada para a réplica na temperatura de referência via troca de réplicas.

$$P(r_m \rightarrow r_n) = \begin{cases} \exp \left[\left(\frac{1}{k_B T_m} - \frac{1}{k_B T_n} \right) (U_n - U_m) \right] & \text{se } (U_n - U_m) > 0 \\ 1 & \text{se } (U_n - U_m) < 0 \end{cases} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde $P(r_m \rightarrow r_n)$ é a probabilidade da transição da réplica m para n ; T_x é temperatura da réplica x ; e U_x é a energia potencial da réplica x .

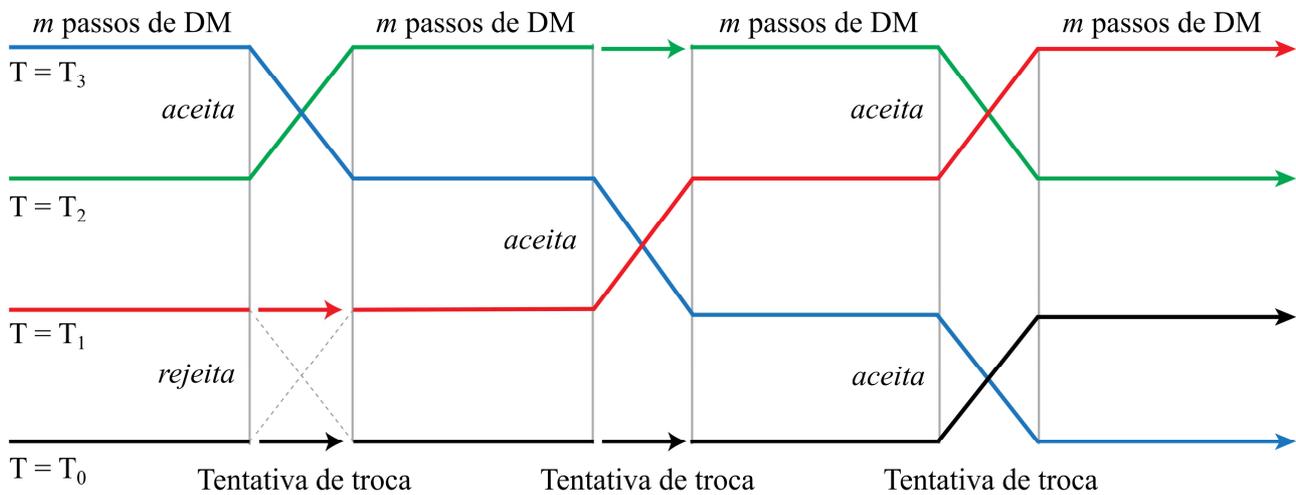


Figura 3 - Esquema simplificado de uma simulação a troca de réplicas é aplicada. A cada m passos de integração, uma tentativa de troca de réplicas executada entre réplicas adjacentes. As trocas aceitas levam a inversão das temperaturas das réplicas em questão, representados pelas linhas coloridas. Diferentes níveis de temperatura são denotados pelos níveis horizontais.

A REMD foi amplamente aplicada para estudar conformações de macromoléculas em solução. Por exemplo, Baumketner e Shea aplicaram REMD para estudar conformações do peptídeo β -amiloide 10-35, observando um equilíbrio conformacional entre diversas estruturas globulares (BAUMKETNER; SHEA, 2007). Periole e Mark estudaram um β -heptapeptídeo com REMD e com DM convencionais e observaram um aumento de amostragem de cerca de 4 vezes utilizando REMD em relação ao mesmo número de réplicas convencionais partindo de diferentes conformações. Ke e colaboradores utilizaram a REMD para estudar o equilíbrio conformacional do aptâmero de DNA ligador de trombina e observaram efeitos de O-metilações nas posições 10 e 11 da sequência (KE; JIN; SUN, 2019). Em relação ao uso de REMD para cálculos de energia livre, Essex e King combinaram REMD com Integração Termodinâmica (TI), um método para calcular a energia livre de Gibbs, e observaram melhora na convergência em comparação com FEP e TI convencionais em um sistema modelo da energia relativa de solvatação do metano e da água (WOODS; ESSEX; KING, 2003).

Alguns autores apontaram limitações relevantes nesta técnica. Zuckerman e Lyman propuseram que a REMD não acelera o cruzamento de barreiras entrópicas e que aceleração em sistemas com barreiras

modestas (até 3-4 kcal/mol) pode não ser observado (ZUCKERMAN; LYMAN, 2008). Denschlag e colaboradores propuseram um modelo aplicando uma cadeia de Markov representando o equilíbrio de enovelamento e desenovelamento de um peptídeo e mostram que a REMD pode levar à redução da eficiência de amostragem e pseudo-convergência em certos sistemas (DENSCHLAG; LINGENHEIL; TAVAN, 2008). Finalmente, possivelmente a limitação mais relevante da REMD é que a probabilidade de uma troca de réplica ser aceita varia exponencialmente com a variação da energia, de forma que para sistemas grandes um número muito grande de réplicas é necessário (LIU et al., 2005). Com vistas a contornar esta limitação, Liu e colaboradores propuseram uma evolução da REMD, a *Replica Exchange with Solute Tempering* (REST) (LIU et al., 2005). Este método funciona de forma similar à REMD, entretanto, adicionalmente, as interações das réplicas que não aquela em temperatura de referência serão escalonadas ((**Equação 6**). Isto faz com que a diferença de energia potencial $U_n - U_m$ ((**Equação 5**) não dependa do solvente, que é o maior contribuinte para a redução da probabilidade de troca com o aumento do tamanho do sistema, uma vez que quase sempre o número de partículas do solvente é muito maior do que do soluto.

$$U_m(\vec{p}) = U_{pp}(\vec{p}) + \left(\frac{T_m}{T_0}\right) U_{ss}(\vec{p}) + \left(\frac{T_m + T_0}{2T_0}\right) U_{ps}(\vec{p}) \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde $U_m(\vec{p})$ é a energia potencial da réplica m ; $U_{pp}(\vec{p})$ é a energia interna do soluto; $U_{ss}(\vec{p})$ a energia de interação de moléculas do soluto umas com as outras; $U_{ps}(\vec{p})$ é a energia de interação entre proteína e solvente; T_m e T_0 são a temperatura da réplica m e a temperatura de referência, respectivamente.

Todas as réplicas que não estiverem na temperatura de referência T_0 amostrarão estados não físicos, uma vez que as interações intermoleculares entre diversas moléculas do sistema estarão reduzidas. Ainda assim, aplicando esta técnica ao sistema modelo do dipeptídeo AA, os autores observaram um ganho de eficiência de cerca de 10 vezes em comparação com a REMD (LIU et al., 2005). Em se tratando de aplicações deste método de amostragem acelerada a cálculos de RFEB, Wang e colaboradores propuseram a integração da metodologia de cálculo da FEP com a REST (WANG; BERNE; FRIESNER, 2012). Os autores verificaram que a FEP/REST produziu resultados mais próximos aos experimentais do que aqueles da FEP pura para os sistemas estudados, com melhora do erro médio absoluto de 0,6 kcal/mol para 0,3 kcal/mol (de 2,4 kJ/mol para 1,4 kJ/mol). Embora os erros

reportados sejam baixos, é necessário considerar que os autores somente estudaram dois sistemas modelo simples.

Terakawa e colaboradores portaram uma variante da técnica REST para programa GROMACS e, utilizando esta implementação estudaram a dialanina e o peptídeo N-terminal da p53. Para a dialanina, os autores avaliaram a distribuição de energia potencial e a abundância de quatro estados conformacionais, enquanto que para a p53 foi avaliado a amostragem de contatos internos similares à conformação da p53 ligada a um de seus reguladores, o MDM2. Comparando estas propriedades das simulações utilizando a variante da REST e a REMD, os autores observaram um aumento de amostragem similar à REST original (TERAKAWA; KAMEDA; TAKADA, 2011). A modificação de Terakawa e colaboradores apresenta duas diferenças principais em relação ao algoritmo original: (a) a temperatura efetiva do soluto é obtida via escalonamento dos termos do campo de forças, mas a temperatura da simulação não é alterada; e (b) o escalonamento das interações tem outro formato ((Equação 7). Desta forma, os potenciais, e não a temperatura, são diferentes entre as réplicas, o que aumenta a amostragem de um sistema, já que as barreiras a serem cruzadas são reduzidas por uma redução nos potenciais.

$$U_m(\vec{p}) = \left(\frac{T_0}{T_m}\right) U_{pp}(\vec{p}) + \left(\sqrt{\frac{T_0}{T_m}}\right) U_{ps}(\vec{p}) + U_{ss}(\vec{p}) \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde $U_m(\vec{p})$ é a energia potencial da réplica m ; $U_{pp}(\vec{p})$ é a energia interna do soluto; $U_{ss}(\vec{p})$ a energia de interação de moléculas do soluto umas com as outras; $U_{ps}(\vec{p})$ é a energia de interação entre proteína e solvente; T_m e T_0 são a temperatura da réplica m e a temperatura de referência, respectivamente.

Baseados na modificação da REST proposta por Terakawa e colaboradores, Wang e colaboradores propuseram pequena modificação, nomeada pelos autores de *Replica Exchange with Solute Scaling* (REST2) (WANG; FRIESNER; BERNE, 2011). Os autores utilizaram o mesmo escalonamento proposto por Terakawa e colaboradores, porém, dentre os termos ligados, somente os termos relativos aos ângulos de diedro são escalonados. Wang e colaboradores afirmam que esta modificação acelera ainda mais a amostragem, uma vez que o escalonamento de termos de vibrações de ligações e deformações angulares reduz a transição entre réplicas. Os autores aplicaram esta técnica para estudar

um peptídeo com motivo β -hairpin e para a proteína Trp-cage, observando importante aumento da amostragem em relação à REMD e a REST. Os autores observaram um aumento do desvio quadrático médio das posições em relação à estrutura nativa, uma melhor distribuição de energia potencial (WANG; FRIESNER; BERNE, 2011). Esta técnica de amostragem estendida foi amplamente utilizada em associação à FEP para estimar RFEB em contexto de desenvolvimento de fármacos, em grande parte por sua implementação no programa FEP+. Por exemplo, em um trabalho avaliando o impacto da equilibrção e da região do soluto escalonada pelo algoritmo de REST2, Fratev e Sirimulla utilizaram FEP com o FEP+ (FRATEV; SIRIMULLA, 2019). Os autores observaram que um tempo de equilibrção mais longo, de 5 ns, antes do início da amostragem, melhorou a qualidade das predições, assim como a inclusão de todo o ligante e de resíduos sabidamente flexíveis do sítio de ligação na região de REST2. Em relação à aplicações para descoberta de fármacos, Kuhn e colaboradores utilizaram FEP combinada com REST2 aplicando o programa FEP+ para otimizar ligantes covalentes da catepsína L humana que exploram o subsítio S2 (KUHN et al., 2017). Os autores compararam a FEP à escolha manual de análogos, modelagem seguida de minimização e ancoragem molecular, tendo concluído que a FEP foi a técnica capaz de sugerir análogos mais potentes. Mais recentemente, Leger e colaboradores aplicaram FEP e REST2 também com o programa FEP+ para otimizar inibidores da protease 7 específica para ubiquitina (*Ubiquitin-specific protease 7*, USP7) (LEGER et al., 2020). Em um ponto específico da otimização, a aplicação da FEP sugeriu que a substituição de um espaçador de oxigênio por um carbono manteria a potência do composto e a substituição por nitrogênio aumentaria esta. O análogo contendo a substituição por nitrogênio foi sintetizado e foi experimentalmente observada uma redução de 3 vezes na CI_{50} .

1.4 Método FEP

A FEP é possivelmente o método mais aplicado para estimativa de RFEB no contexto de descoberta de fármacos. Isto ocorre devido aos baixos erros, alta acurácia do método e a facilidade de sua implementação em diversos programas de DM. O método de FEP vem diretamente da aplicação de uma aproximação da equação de Gibbs para mecânica estatística. Esta equação relaciona a energia de Gibbs absoluta à função de partição de um sistema ((Equação 8) e, conseqüentemente, ΔG à razão das funções de partição entre dois estados A e B ((Equação 9).

$$G = -k_b T \ln Z \quad \text{(Equação 8)}$$

$$\Delta G_{AB} = -k_b T \ln \frac{Z_a}{Z_b} \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde G é a energia de Gibbs; ΔG_{AB} é energia de Gibbs relativa entre os estados A e B; k_b é a constante de Boltzmann; Z é a função de partição; e T é a temperatura absoluta.

Embora as equações acima sejam gerais para quaisquer estados A e B, no caso específico dos sistemas discutidos aqui, os estados A e B se referem a dois ligantes complexados a um alvo molecular ou em solução e intenta-se estimar a RFEB entre estes ligantes. A RFEB é calculada aplicando um ciclo termodinâmico (**Figura 4**), sendo que tal ciclo poderia ser utilizado para calcular $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ tanto utilizando $\Delta G_{\text{ligação}(B)} - \Delta G_{\text{ligação}(A)}$ como utilizando $\Delta G_{\text{complexo}(A \rightarrow B)} - \Delta G_{\text{solvente}(A \rightarrow B)}$. No primeiro caso, a determinação de cada $\Delta G_{\text{ligação}(X)}$ dos ligantes é a determinação da afinidade absoluta destes ligantes, de forma que o estado inicial se referiria ao ligante em complexo e o estado final, ao ligante em solução. No segundo caso, a transformação não física do ligante A no ligante B em solvente e em complexo seria simulada, de forma que o estado inicial seria o ligante A em complexo ou solvente e o estado final, o ligante B em complexo ou solvente. Por razões práticas, a estimativa do ΔG de ligação é em geral mais desafiadora e está associada a maiores erros do que a estimativa da RFEB, assim esta forma é a mais aplicada em campanhas de descoberta de fármacos.

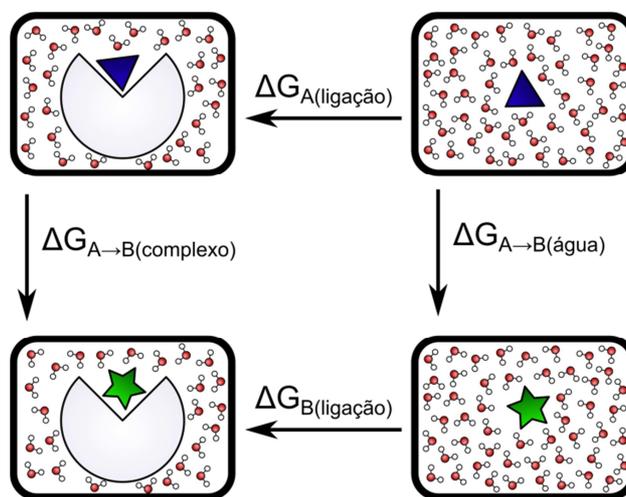


Figura 4 – Representação do ciclo termodinâmico utilizado para cálculo de $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ de ligação a um alvo macromolecular (representado pela forma cinza) entre os ligantes A (representado por um triângulo azul) e B (representado por uma estrela verde). O $\Delta\Delta G_{A \rightarrow B}$ de ligação pode ser obtido simulando o evento de ligação ou desligamento de cada ligante ao alvo (setas horizontais) ou pela simulação não-física da transformação do ligante A em B em complexo e em solvente (setas verticais).

A função de partição Z é dada por:

$$Z = \int_{\Gamma} e^{\frac{-U(\vec{q})+pV}{k_bT}} d\vec{q} \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde Γ é o volume do espaço de fase; k_b é a constante de Boltzmann; T é temperatura absoluta; U é energia potencial; p é a pressão; V é o volume; e \vec{q} cada configuração do sistema

A determinação de Z envolve uma integração sobre todo o espaço de fase, um problema intratável para sistemas que não sejam extremamente simples. Para contornar este problema, a equação de Zwanzig ((Equação 11) substitui o quociente das funções de partição pela amostragem de conformações um sistema em dado estado.

$$\Delta G = -k_b T \ln \left\langle \exp \left(\frac{-(U_B + pV_B) + (U_A + pV_A)}{k_b T} \right) \right\rangle_A \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde ΔG é a variação da energia de Gibbs; k_b é a constante de Boltzmann; T é temperatura absoluta; U_X é a energia potencial do sistema no estado X ; os parênteses angulares significam a média ao longo da amostragem do estado A .

A (Equação 11) pode ser interpretada da seguinte forma: um número de configurações \vec{q} do sistema é amostrada e uma série de energias potenciais U_A e de pV_A associadas ao estado A são obtidas. Então, utilizando exatamente as mesmas configurações \vec{q} , as energias potenciais U_B e o produto pV_B são calculadas utilizando a hamiltoniana do estado B . Finalmente, a equação é resolvida considerando a média ao longo das configurações \vec{q} . No presente, a amostragem comumente é obtida utilizando DM.

A equação de Zwanzig, entretanto, sofre de uma grave limitação. Se as configurações \vec{q} amostrados no estado A forem de baixa probabilidade no estado B , a estimativa de ΔG será ruim (JORGENSEN; THOMAS, 2008), pois a exponencial na (Equação 11) será uma aproximação ruim de Z_a/Z_b ((Equação 9). Isto equivale a dizer que, se a sobreposição do espaço de fase dos estados A e B for pequena, amostrar o estado A não é uma forma aceitável de amostrar o estado B . Infelizmente, a pouca sobreposição do espaço de fase é a situação mais comum em se tratando de problemas de interesse biológico.

Uma forma de melhorar a amostragem entre os estados vem da constatação de que a energia de Gibbs é uma função do estado, não do caminho. Assim, se houver um estado intermediário I entre os estados A e B, temos que:

$$\Delta G_{AB} = \Delta G_{AI} + \Delta G_{IB} = G_I - G_A + G_B - G_I = G_B - G_A \quad \text{(Equação 12)}$$

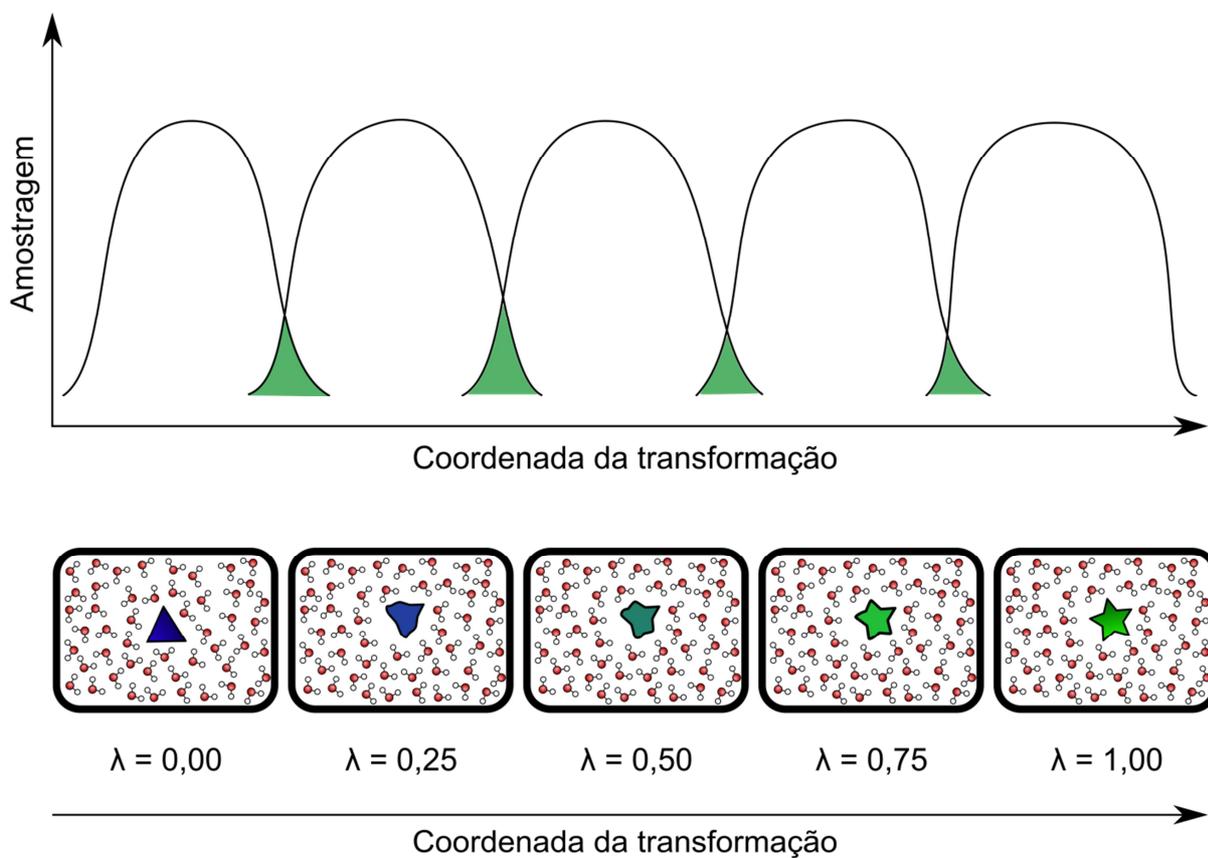
Onde G é a energia de Gibbs e ΔG sua variação

Logo, uma estratégia para melhorar a estimativa de Z_a/Z_b é construir n estados intermediários I_n entre os estados finais A e B de forma que a sobreposição do espaço de fase entre os estados intermediários I_n e I_{n+1} seja suficientemente grande. Assim, uma sequência de estimativas mais corretas de $\Delta G_{I_n \rightarrow I_{n+1}}$ são somadas para produzir a estimativa de ΔG_{AB} . Para construir estados intermediários, a estratégia mais empregada é a mistura dos estados A e B ao longo da coordenada de transformação λ . No caso específico de RFEB utilizando o ciclo termodinâmico apresentado na **Figura 4**, transforma-se o ligante do estado A no ligante do estado B utilizando intermediários que são uma combinação não-física dos ligantes

A

e

B



(**Figura 5**). Outras estratégias foram propostas na literatura, porém ainda são menos bem estabelecidas (SIDLER; CRISTÒFOL-CLOUGH; RINIKER, 2017).

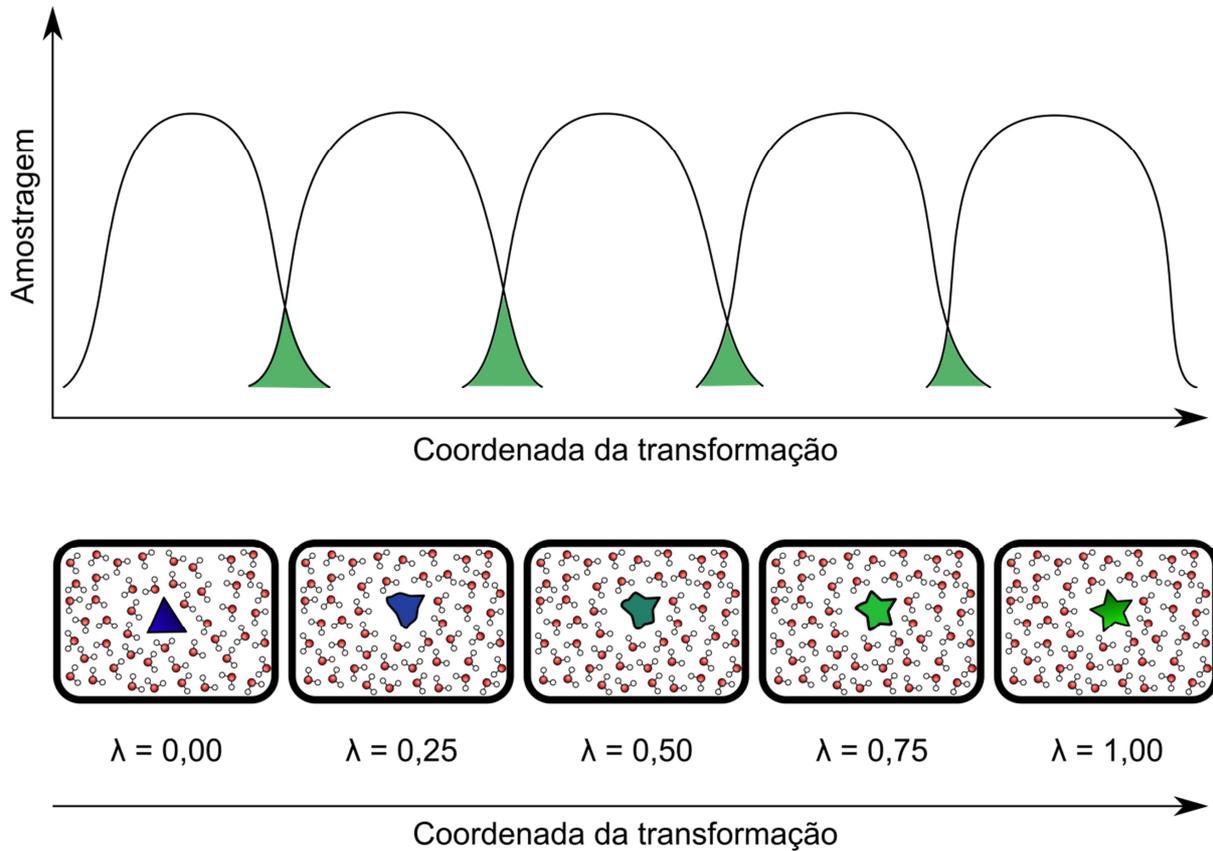


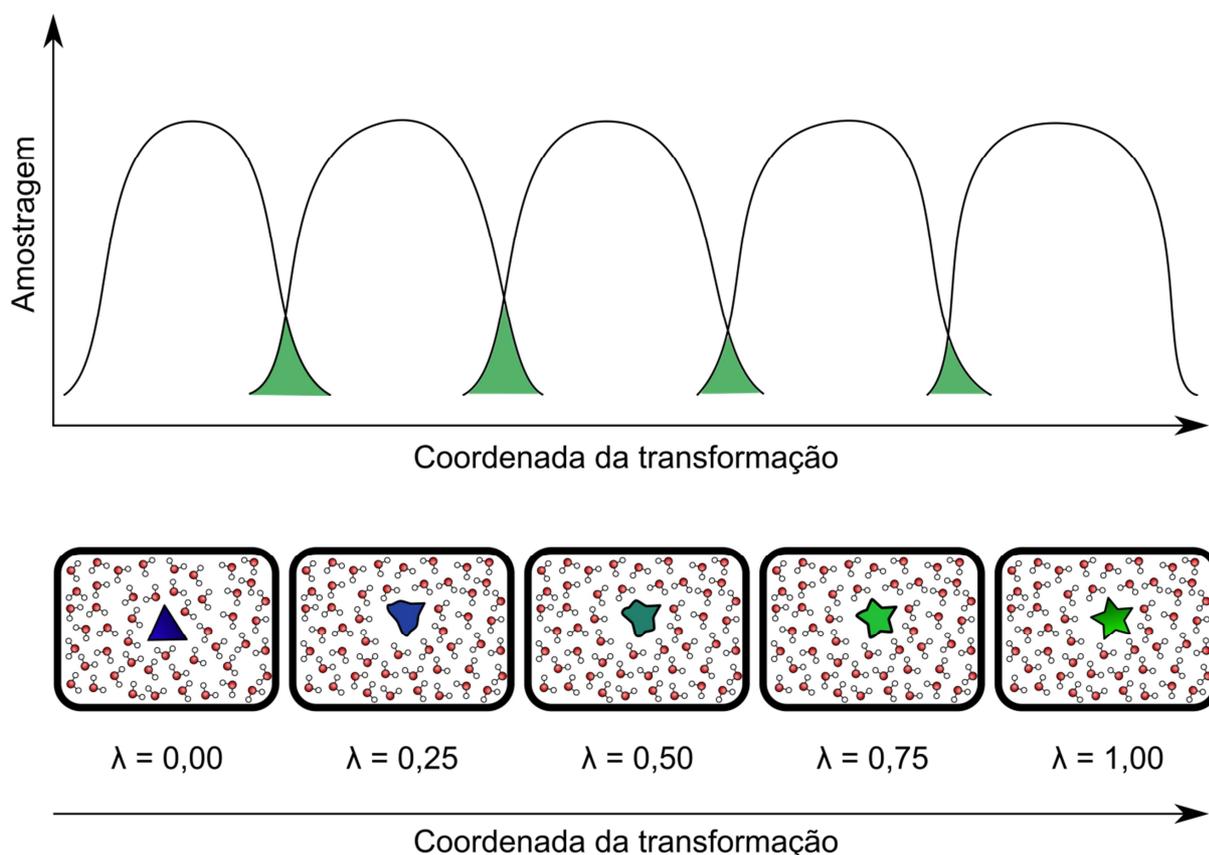
Figura 5 – Representação esquemática da transformação de uma pequena molécula A em B em água. Na parte superior uma representação da amostragem ao longo da coordenada de transformação em cada estado inicial, intermediários e final. Regiões de sobreposição de amostragem na coordenada de transformação por diferentes estados estão destacadas (regiões verdes). Na parte inferior, uma representação dos estados gerados por cada valor de λ : o estado inicial é obtido com $\lambda=0$ (triângulo azul) e o final, com $\lambda=1$ (estrela verde). Valores entre 1 e 0 produzem uma mistura não-física dos estados inicial e final (representados por um híbrido entre a estrela e o triângulo).

A hamiltoniana de cada estado intermediário I_n é dado por uma combinação linear das hamiltonianas dos estados A e B, dado, por exemplo, por:

$$H_{I_n} = \lambda H_A + (1 - \lambda) H_B \quad \text{(Equação 13)}$$

Onde H_{I_X} é a hamiltoniana do estado X; e $0 \leq \lambda \leq 1$ é um fator de combinação entre os estados A e B

H_{λ} é a hamiltoniana de um estado não físico, uma combinação entre os estados A e B. Uma vez que a energia de Gibbs é uma função de estado, ΔG pode ser obtida mesmo que o caminho envolva estados não físicos. Por este motivo, os métodos de energia livre que transformam a hamiltoniana são por vezes chamados de métodos de transmutação ou métodos alquímicos. Efetivamente, uma série de estados intermediários, ditos janelas de λ , onde λ assume um valor fixo entre 0 e 1 são simulados e utilizados para construir um caminho conectando o estado A e B. Os diferentes valores de λ significam uma caminhada com o sistema sobre a coordenada não-física de transformação (**Figura 5**). Quando $\lambda = 0$ a hamiltoniana é equivalente àquela do estado A, e na medida em que ela aumenta nas janelas intermediárias, se afastando de 0 e se aproximando de 1, a hamiltoniana se torna cada vez mais similar àquela do estado B, até a equivalência quando $\lambda = 1$



(**Figura 5**). Especificamente em simulações que aplicam campos de força, λ escalona o potencial de interações intra e intermoleculares que representam os estados A e B, permitindo a construção da Hamiltoniana híbrida (**Equação 13**).

Efetivamente, a estimativa da energia de Gibbs não é obtida utilizando a **(Equação 12)**, sendo frequentemente obtida com o estimador estatístico *Multistep Bennet Acceptance Ratio* (MBAR), um método mais refinado proposto por Shirts e Chodera, que reúne informações de todos os estados intermediários (SHIRTS; CHODERA, 2008). O estimador MBAR é dado por

$$\hat{G}_A = -k_b T \ln \left(\frac{\exp\left(\frac{-U_A}{k_b T}\right)}{\sum_{k=1}^K N_k \exp\left(\frac{\hat{G}_K - U_K}{k_b T}\right)} \right) \quad \text{(Equação 14)}$$

Onde \hat{G}_A é a energia de Gibbs do estado A, k_b é a constante de Boltzmann; T é temperatura absoluta; e U_X é a energia potencial do sistema no estado X.

Nesta equação, a avaliação da energia potencial pode ser feita utilizando todas as conformações de um estado amostrado, se disponíveis. Uma vez que a exponencial no denominador depende da energia de Gibbs de todos os estados (\hat{G}_k), a **Equação 14** precisa ser resolvida iterativamente. Efetivamente, este procedimento usa informação de todos os estados para estimar a energia de Gibbs de cada um dos estados. Devido a constantes de normalização presente no denominador, a energia livre de Gibbs estimada (\hat{G}_A) não tem sentido físico e somente diferenças, ou seja, ΔG , devem ser avaliadas. Uma conveniência adicional do método é que o MBAR tem um estimador do erro associado ao valor, algo indisponível para o método de Zwanzig, por exemplo. Efetivamente, o MBAR é o estimador estatístico com menor variância para energias de Gibbs proposto até o momento utilizando dados de múltiplos estados (SHIRTS; CHODERA, 2008).

1.5 Metodologias computacionais para estimativa de energia livre aplicadas a interação de pequenas moléculas a alvos macromoleculares

Além da FEP, diversas metodologias para estimar a afinidade de ligantes a moléculas bioativas foram propostas na literatura. Algumas delas lançam mão de informações sobre a afinidade de ligantes descritos para esta estimativa, o que pode limitar a aplicação para alvos menos estudados e substâncias estruturalmente dissimilares. Entre estes métodos estão o QSAR (DANISHUDDIN; KHAN, 2016; LILL, 2007), métodos baseados em aprendizagem de máquina (GHASEMI et al., 2018; KARLOV et al., 2020; MERZLIKINE et al., 2011; STEPNIEWSKA-DZIUBINSKA; ZIELENKIEWICZ;

SIEDLECKI, 2018) e ancoragem molecular utilizando potenciais empíricos (FRIESNER et al., 2006; MORRIS et al., 1998).

Os métodos de QSAR e aprendizagem de máquina buscam construir uma função que relaciona descritores com a afinidade de uma molécula por um alvo. Os descritores mais comuns são representações de propriedades físico-químicas, da conectividade ou das características de moléculas (PUZYN; LESZCZYŃSKI; CRONIN, 2010). Enquanto o QSAR busca expressar esta relação utilizando equações polinomiais (DANISHUDDIN; KHAN, 2016; LILL, 2007), os métodos utilizando aprendizagem de máquina aplicam redes neurais, *support vector machine*, árvores de regressão e outros métodos da área (KARLOV et al., 2020; STEPNIEWSKA-DZIUBINSKA; ZIELENKIEWICZ; SIEDLECKI, 2018). A ancoragem molecular utiliza uma função de pontuação que descreve as interações entre um ligante e um receptor para estimar a afinidade da interação (FRIESNER et al., 2006; HUEY et al., 2007; MOITESSIER et al., 2008). Este último método alcançou grande popularidade por seu reduzido custo em relação aos métodos baseados em dinâmica molecular, e por sua simplicidade de uso. Entretanto, devido às severas aproximações utilizadas para obter a estimativa de energia de Gibbs de ligação, a ancoragem molecular não é tão precisa para este tipo de predição quanto os métodos baseados em dinâmica molecular ou métodos modernos baseados em aprendizagem de máquina (KARLOV et al., 2020; STEPNIEWSKA-DZIUBINSKA; ZIELENKIEWICZ; SIEDLECKI, 2018; WARREN et al., 2006).

Métodos derivados somente de parâmetros físico-químicos, independente de um conjunto de treinamento, potencialmente podem ser aplicados em situações mais diversas. Exemplos deste segundo caso são métodos que utilizam área de superfície, como *Poisson-Boltzmann solvent-accessible surface area* (PBSA) e *Generalized Born solvent-accessible surface area* (GBSA) (GENHEDEN; RYDE, 2015; HOU et al., 2011; WANG et al., 2019), o método de *linear interaction energy* (LIE) (AQVIST; MARELIUS, 2001; GUTIÉRREZ-DE-TERÁN; ÅQVIST, 2012) e métodos de ancoragem molecular que utilizam campos de força físico-químicos (COLEMAN et al., 2013; DOMINGUEZ; BOELEN; BONVIN, 2003).

O método LIE é uma aproximação rústica da energia de Gibbs interação de um sistema ligante-receptor que assume uma resposta linear do ambiente químico com a mudança do potencial eletrostático e de

van der Waals (ÅQVIST; MEDINA; SAMUELSSON, 1994; HANSSON; MARELIUS; ÅQVIST, 1998). No LIE a energia de Gibbs de interação entre um ligante e um alvo é obtida pela diferença entre os potenciais de van der Waals e de Coulomb entre um ligante e o sistema para o ligante em solução e em complexo (**Equação 15**).

$$\Delta G = \alpha(V_{ligado}^{vdW} - V_{livre}^{vdW}) + \beta(V_{ligado}^{Coulomb} - V_{livre}^{Coulomb}) + \gamma \quad \text{(Equação 15)}$$

Onde ΔG é a variação da energia de Gibbs, α , β e γ são constantes empíricas de ajuste para linearização; V_{ligado}^{vdW} e V_{livre}^{vdW} são o potencial de van der Waals de interação entre o ligante e o sistema calculado no complexo e em solução, respectivamente; $V_{ligado}^{eletrostático}$ e $V_{livre}^{Coulomb}$ são o potencial eletrostático de interação entre o ligante e o sistema calculado no complexo e em solução, respectivamente.

Os métodos de PBSA e GBSA são um avanço em relação ao método LIE e aproximam a energia de Gibbs absoluta de interação de um ligante a um alvo utilizando um método baseado em solvente implícito para representar a variação de energia de Gibbs de dessolvatação (KOLLMAN et al., 2000). Frequentemente simulações por Dinâmica Molecular são utilizadas para amostrar diferentes conformações do complexo ligante-receptor, e chama-se esta combinação de MM/PBSA e MM/GBSA (GENHEDEN; RYDE, 2015). A equação geral dos métodos GBSA e PBSA estão apresentadas na (**Equação 16**). Frequentemente se utiliza um aproximação adicional que evita o cálculo de ΔE_{ligado} e TS. A diferença entre os métodos é o tipo de modelo de solvente implícito utilizado: GBSA utiliza o modelo de Born (JAYARAM; SPROUS; BEVERIDGE, 1998) e é mais rápida; PBSA utiliza as equações de Poisson-Boltzmann e é, teoricamente, mais exato (KOLLMAN et al., 2000).

$$\Delta G = \Delta E_{ligado} + \Delta E_{vdW} + \Delta E_{eletrostático} + \Delta E_{polar} + \Delta E_{apolar} - TS \quad \text{(Equação 16)}$$

Onde ΔG é a variação da energia de Gibbs, ΔE_{ligado} é a variação de entalpia devido aos termos ligados, derivados diretamente do campo de força; $\Delta E_{eletrostático}$ é a variação de entalpia devido às cargas, calculado usando a equação de Coulomb; ΔE_{vdW} é a variação de entalpia devido ao efeito de van der Waals; ΔG_{polar} é a variação da energia livre de Gibbs gerada pelo componente polar da dessolvatação, obtida utilizando um método do solvente contínuo; ΔG_{apolar} é a variação da energia livre de Gibbs gerada pelo componente apolar da dessolvatação, aproximada como uma função linear da área acessível ao solvente estimada por diferentes métodos; T é temperatura absoluta; e S é a entropia absoluta, possivelmente estimada utilizando uma análise de modos normais, mas frequentemente negligenciada.

Em um estudo comparando LIE, MM/GBSA, MM/PBSA e Integração Termodinâmica (TI) para séries de ligantes do fator Xa, da quinase dependente de ciclina 2 e do receptor mineralocorticóide, Homeyer e colaboradores observaram uma performance insatisfatória do método LIE para todas as séries, ainda que possivelmente causada por desafios vindos do sistema em estudo (HOMEYER et al., 2014). Estudando séries de ligantes simples interagindo com os receptores não biológicos α -ciclodextrina e cucurbit[8]uril, Genheden comparou LIE, MM/PBSA e MM/GBSA. Os resultados obtidos mostram que o LIE teve correlação próximo de nula para o cucurbit[8]uril ($r^2 = 0,03 \pm 0,01$), enquanto MM/PBSA ($r^2 = 0,47 \pm 0,0$) e principalmente MM/PBSA ($r^2 = 0,89 \pm 0,01$) apresentaram correlações melhores (GENHEDEN, 2011). Para a α -ciclodextrina, os três métodos apresentaram correlações próximas de 1 (LIE = $0,95 \pm 0,02$, MM/GBSA = $0,96 \pm 0,02$, MM/PBSA = $0,96 \pm 0,02$). Ainda que não haja consenso sobre na literatura sobre quais métodos, LIE, PBSA e GBSA, são mais precisos (WANG et al., 2019), é em geral aceito que técnicas baseadas em perturbação são mais precisas. Em comum, essas técnicas são computacionalmente mais caras e utilizam informações de estados intermediários entre o estado ligado e não-ligado ou ligante A e B para estimar ΔG ou $\Delta\Delta G$, utilizando diferentes técnicas. Em geral, estes métodos também aplicam DM para amostrar a interação de um complexo de interesse.

Uma das maiores limitações dos métodos como GBSA, PBSA e LIE é que eles amostram somente os estados ligados e desligados dos ligantes ou da macromolécula, razão pela qual tais métodos são ditos *end-point methods*. Amostrar somente os estados finais – no caso, ligado e desligado – faz com que seja muito difícil estimar a contribuição entrópica, uma vez que rearranjos do solvente e do receptor que ocorrem durante o processo de ligação. Embora metodologias para inclusão de um termo entrópico nos métodos de *end-point* tenham sido propostas (BEN-SHALOM et al., 2017; HUANG et al., 2020; SUN et al., 2018), tais metodologias são, em geral, computacionalmente caras.

Basicamente, há duas formas de perturbar um sistema para permitir amostrar a transformação necessária para o cálculo do ΔG ou $\Delta\Delta G$: afetando as coordenadas ou afetando a hamiltoniana. Em geral, os métodos que afetam as coordenadas não são capazes de obter $\Delta\Delta G$. Exemplos destes métodos são Umbrella Sampling e Accelerated Weight Histogram (LINDAHL; LIDMAR; HESS, 2014). O método de Adaptive Biasing Force é um exemplo de método que afeta a hamiltoniana, mas se parece muito com os métodos que afetam as coordenadas em todos os aspectos (COMER et al., 2015).

Métodos que transformam as coordenadas modificam de alguma forma as coordenadas de um grupo de partículas do sistema com o intuito de amostrar diretamente a transição geométrica que separa os estados finais e iniciais da transformação que se deseja simular. Em contextos de cálculos de RFEB entre ligantes, estes métodos em geral são aplicados para simular o evento de dissociação do complexo receptor-ligante através da amostragem direta da saída da pequena molécula do sítio de ligação.

Alternativamente, há métodos que perturbam a hamiltoniana do sistema, de forma que a evolução ao longo da coordenada de transformação λ da **(Equação 13)** significa a alteração do próprio potencial de interação entre as partículas. Dois exemplos deste tipo de método que podem ser utilizados para estimar ΔG ou $\Delta\Delta G$ com maior precisão são a FEP e a TI. Estes métodos compartilham muitas semelhanças, sendo que a principal diferença é que a TI requer o cálculo da derivada da hamiltoniana em relação às coordenadas e a FEP não. Estas técnicas, especialmente quando estados intermediários são aplicados, permitem que a contribuição entrópica à energia de Gibbs seja estimada, uma vez que rearranjos pouco extensos do solvente e do receptor podem ser amostrados ao longo das simulações. Quando os rearranjos são grandes demais para que essa amostragem seja efetiva, técnicas como TI e FEP provavelmente falharão em obter bons resultados. Recentemente a FEP vem ganhado destaque na literatura. Isto se deve, principalmente, aos bons resultados que esta metodologia tem apresentado e ao grau de automação para preparação de cálculos e análise dos dados. Um sumário dos métodos de cálculo de energia de Gibbs aplicados a RFEB entre pequenas moléculas orgânicas ligantes de um alvo macromolecular estão sumarizadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Resumo das principais características dos métodos para cálculo energia livre discutidos nesta seção quando aplicados para estimar afinidade relativas entre ligantes se ligando a um alvo macromolecular.

Técnica	Tipo	Metodologia para mostragem conformacional	Custo computacional ^a	Precisão preditiva ^a	Vantagens	Desvantagens	Referência
<i>Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)</i>	Baseado em estrutura dos ligantes	Nenhuma	Mínimo	Baixa	Custo computacional mínimo	Fortemente dependente de conjunto de treinamento	(PUZYN; LESZCZYŃSKI; CRONIN, 2010)
Métodos baseados em aprendizagem de máquina	Baseado em estrutura dos ligantes	Nenhuma	Mínimo	Média	Custo computacional mínimo; mais flexível que QSAR	Fortemente dependente de conjunto de treinamento	(GHASEMI et al., 2018)
Ancoragem molecular	Baseado em parâmetros empíricos ou baseado em parâmetros físico-químicos	Geralmente nenhuma	Muito baixo	Muito baixa	Custo computacional baixo; muito popular; facilidade de execução	Precisão insuficiente para diferenciar entre afinidade de ligantes	(COLEMAN et al., 2013)
LIE	<i>End-point method</i>	Nenhuma ou dinâmica molecular	Baixo	Baixa	Custo computacional menor do que GBSA e PBSA; pode ser realizado após DM	Ajuste de parâmetros pode ser necessário; performance dependente do sistema; contribuição entrópica difícil de ser obtida	(GUTIÉRREZ-DE-TERÁN; ÅQVIST, 2012)
PBSA e GBSA	<i>End-point method</i>	Nenhuma ou dinâmica molecular	Baixo	Baixa a média	Pode ser realizado após DM; muito popular	Performance dependente do sistema; resultados sensíveis à constante dielétrica; contribuição entrópica difícil de ser obtida	(WANG et al., 2019)

Técnica	Tipo	Metodologia para mostragem conformacional	Custo computacional ^a	Precisão preditiva ^a	Vantagens	Desvantagens	Referência
<i>Umbrella Sampling</i> (US)	Modificação das coordenadas	Dinâmica molecular	Alto	Média	Simplicidade de aplicação; pode ser usada com cálculos <i>ab initio</i> ; mais estados intermediários podem ser adicionados <i>a posteriori</i>	Requer informação sobre coordenada de reação; custo computacional elevado	(NISHIKAWA et al., 2018)
<i>Adaptive Biasing Force</i>	Modificação das coordenadas	Dinâmica molecular	Alto	Média	Pouca intervenção do usuário necessária; convergência mais rápida do que US	Requer informação sobre coordenada de reação; custo computacional elevado	(COMER et al., 2015)
Integração Termodinâmica (TI)	Perturbação da hamiltoniana	Dinâmica molecular ou Monte Carlo	Similar	Similar	Alta precisão	Requer similaridade estrutural entre ligantes; requer cálculo da derivada do potencial em relação à coordenada de transformação; alto custo computacional	(GAPSYS et al., 2020)
Perturbação de Energia Livre (FEP)	Perturbação da hamiltoniana	Dinâmica molecular ou Monte Carlo	-	-	Alta precisão	Requer similaridade estrutural entre ligantes; alto custo computacional	(ABEL et al., 2017)

^a: em relação à FEP

1.6 Aplicação da FEP para determinação de energia de Gibbs de interação entre pequenas moléculas e alvos biológicos

A primeira aplicação da FEP empregando exatamente a equação de Zwanzig (**Equação 11**) para cálculos de afinidade em um problema de interesse biológico data de 1986. Wong e McCammom utilizaram esta técnica para estimar a energia livre de Helmutz de ligação da benzamidina e da paraflúorbenzamidina à tripsina e ao mutante G216A da tripsina (WONG; MCCAMMON, 1986). Ainda que o trabalho tenha utilizado uma amostragem muito limitada (22 – 64 ps), e considerando a grande limitação dos campos de força da época, os autores observaram que a direção e magnitude da energia livre de Helmutz foi predita corretamente.

Em 1988, Lybrand e McCammom utilizaram a mesma técnica para tentar prever o efeito da mutação V188L da proteína VP1 do capsídeo do rinovírus humano 14 para a ligação de um agente antiviral (LYBRAND; MCCAMMON, 1989). Neste trabalho os autores empregaram um estado intermediário entre a valina e a leucina na tentativa de melhorar a convergência. Ainda assim, provavelmente devido à amostragem ainda muito limitada, os resultados da FEP não condisseram com os experimentos.

Jorgensen, em uma revisão sobre aplicação de técnicas computacionais para descoberta de fármacos anti-HIV inibidores da transcriptase reversa do HIV-1 no contexto de seu laboratório, reporta esforços aplicando FEP (JORGENSEN, 2016). Em tal trabalho, o autor relata resultados de FEP de seu grupo desde o final da década de 1980 até 2016, e como o uso desta técnica permitiu guiar o desenvolvimento de inibidores mais potentes. Embora estas aplicações utilizaram o método de Monte-Carlo, e não DM, para gerar conformações dos sistemas, esta revisão mostra, em diferentes séries, a utilidade da FEP para guiar a otimização de compostos e gerar hipóteses sobre diferenças de atividade experimentalmente observadas.

O caminho para o avanço da técnica de FEP começou a ser pavimentado com o desenvolvimento da computação sobre unidades gráficas e a incorporação desta inovação aos principais programas de dinâmica molecular (LE GRAND; GÖTZ; WALKER, 2013; PÁLL; HESS, 2013; STONE et al., 2007). Adicionalmente, campos de força mais modernos e metodologias para melhorar a amostragem foram desenvolvidos (ver seção anterior), levando à melhora dos resultados da técnica.

Em 2015, Wang e colaboradores reportaram a integração da metodologia em um programa que automatiza as etapas mais relevantes do processo, além de apresentarem resultados de aplicação industrial de cerca de 200 ligantes contra oito alvos (WANG et al., 2015). Os autores afirmam que a aplicação da FEP se beneficiou da combinação do campo de força moderno OPLS 2.1 (SHIVAKUMAR et al., 2012), aceleração das DM com o uso de cálculos em placas de vídeo e métodos de amostragem estendida. Analisando os desvios de um total de 330 perturbações de séries contra 8 alvos, uma distribuição gaussiana foi observada com $\sigma = 1.1$ kcal/mol e $\mu = 0$ (distribuição centrada no verdadeiro valor). Finalmente, um pequeno estudo prospectivo foi apresentado, com bons resultados. Este trabalho introduziu duas mudanças fundamentais nos cálculos de RFEB: a demonstração de resultados de qualidade, em um tempo compatível com campanhas de otimização de protótipos; e uma plataforma automatizada, denominada FEP+, que permite que usuários não especialistas sejam capazes de preparar, conduzir e analisar os cálculos. A partir da publicação do artigo dos Wang e colaboradores, uma série de estudos de FEP foram relatados (ALBANESE et al., 2020; KONZE et al., 2019; KUHN et al., 2017; LEGER et al., 2020; PÉREZ-BENITO et al., 2018; SCHINDLER et al., 2020), sua maioria utilizando a aplicação comercial FEP+, desenvolvido e comercializado pela empresa Schrödinger. Numa indicação do impacto do programa FEP+ é que a publicação de Wang e colaboradores, referência para este, foi citado mais de 500 vezes até o presente momento.

Aplicações de FEP no contexto de descoberta de fármacos foram relatadas por Leger e colaboradores em um estudo que relata a otimização de um inibidor da Protease específica para Ubiquitina 7, um alvo terapêutico de interesse para descoberta de antitumorais. Os autores aplicaram FEP utilizando o programa FEP+ em diversas etapas da otimização, especialmente em momentos onde novos análogos requereram sínteses complexas ou longas (LEGER et al., 2020). Schindler e colaboradores também reportaram o uso preditivo do FEP+ em contexto industrial de descoberta de fármacos na farmacêutica Merck. Os autores reportam a aplicação de FEP para 23 séries direcionadas a 12 alvos, resultando em um total de mais de 6.000 predições de afinidade, das quais 400 foram selecionados para a síntese, perfazendo um conjunto de 400 cálculos de $\Delta\Delta G$ preditivos. Embora os autores tenham observado boa precisão para vários alvos, é interessante apontar que houve um número limitado de alvos onde predições de alta acurácia ($RMSE < 1,0$ kcal/mol) foram obtidos, e em alguns casos uma alta precisão em termos de RMSE não se traduziu em valor preditivo.

Em relação às aplicações da FEP em GPCR, estudos tem demonstrado sua viabilidade, em que pese a dificuldade aumentada destes sistemas devido à presença da membrana, menos disponibilidade de estruturas experimentais e resolução limitada destas, flexibilidade da proteína e equilíbrio lento. Lenselink e colaboradores reportaram a aplicação do FEP+ para estudos de 45 ligantes contra quatro GPCR (receptores A_{2A} para adenosina, chemocina CXCR4, δ -opióide e β_1 -adrenérgico) (LENSELINK et al., 2016). Os autores observam uma média do erro absoluto (MUE) de 0,94 kcal/mol e um coeficiente de correlação total R de 0,62 (entre 0,39 e 0,85). Finalmente, os autores realizaram um pequeno estudo prospectivo com quatro compostos, obtendo duas predições de qualidade (erros absolutos de 0,26 e 0,98 kcal/mol) e duas ruins (erros absolutos de 2,49 e 3,76 kcal/mol). Os autores concluem que técnicas similares às aquelas utilizadas para proteínas solúveis são válidas para alvos de membrana. Matricon e colaboradores utilizaram o programa Q para estudar uma biblioteca de 23 fragmentos e propor afinidade de outros 12, depois testados, contra o receptor A_{2A} adrenérgico *in vitro* (MATRICON et al., 2017). Para a série retrospectiva, os autores obtiveram um coeficiente de correlação R² de 0,78. Interessante observar que os autores foram capazes de propor o modo de ligação de fragmentos derivados da purina ao correlacionar as predições com os resultados experimentais. Os autores simularam a transformação de uma pose de ligação do ligante protótipo em outra e observaram uma grande diferença de energia de Gibbs, de 6,5 kcal/mol, sugerindo uma pose mais estável. Adicionalmente, o estudo preditivo com 12 outros heterociclos de três séries teve bons resultados. Neste estudo preditivo, os autores observaram índices de acerto de direção (ou seja, a FEP foi capaz de prever o aumento ou queda da afinidade) de 100%, 33% e 75% para cada uma das três séries de 3, 4 e 5 compostos. Deflorian e colaboradores, aplicando o FEP+, recentemente estudaram retrospectivamente seis séries de ligantes do A_{2A} e o receptor para orexina 2 por diferentes protocolos. Os autores observaram a utilidade de algoritmos que permitem a hidratação/remoção de moléculas de água de cavidades, como o Grand Canonical Monte-Carlo, além da importância da predição dos estados de protonação dos resíduos da cavidade, da amostragem e da equilíbrio. No geral, os protocolos otimizados alcançaram correlações R² na faixa de 0,6 a 0,9, enquanto o protocolo padrão apresentou R² entre 0,02 e 0,38.

1.7 Mapas de perturbação

A princípio, dada um número N de ligantes de uma série, poder-se-ia obter todas as RFEB par-a-par ao custo de $N(N - 1)$ perturbações. Entretanto, isto se torna proibitivo para um grande número de

ligantes. Uma possibilidade que reduz o custo computacional é gerar um conjunto de perturbações que permita obter o $\Delta\Delta G$ entre todos os pares através da soma de RFEB. Para representar este conjunto, é usual que sejam aplicados grafos, estrutura de dados que foi aplicada também neste trabalho. Um grafo pode ser definido como um par (V, E) , onde V é um grupo de vértices e E é um grupo de arestas entre os vértices $E \subseteq \{(u, v) : u, v \in V\}$. Se o grafo é não direcionado, então as relações de adjacência definida pelas arestas é simétrica, $E \subseteq \{(u, v) : v, u \in V\}$. Se o grafo não permite laços – uma aresta que conecta um vértice a si mesmo – a adjacência é irreflexiva, $(u, u) \notin E$. Um grafo representando perturbações entre moléculas é dito um mapa de perturbações, um grafo direcional, conectado, onde os vértices são os ligantes e cada aresta representa uma transformação (**Figura 6**). A aplicação de um mapa de perturbações permite que o $\Delta\Delta G$ entre um par para qual uma perturbação não foi simulada pode ser obtida utilizando o somatório dos $\Delta\Delta G$ ao longo de um caminho que conecte tal par. Adicionalmente, o uso de mapas de perturbação permite a aplicação de análises de ciclos fechados (WANG et al., 2013) e médias e amostragem de diferentes caminhos (CUI et al., 2020). Estas técnicas podem ser de grande valor para avaliar a convergência das estimativas de RFEB e para aumentar a precisão destes cálculos, respectivamente.

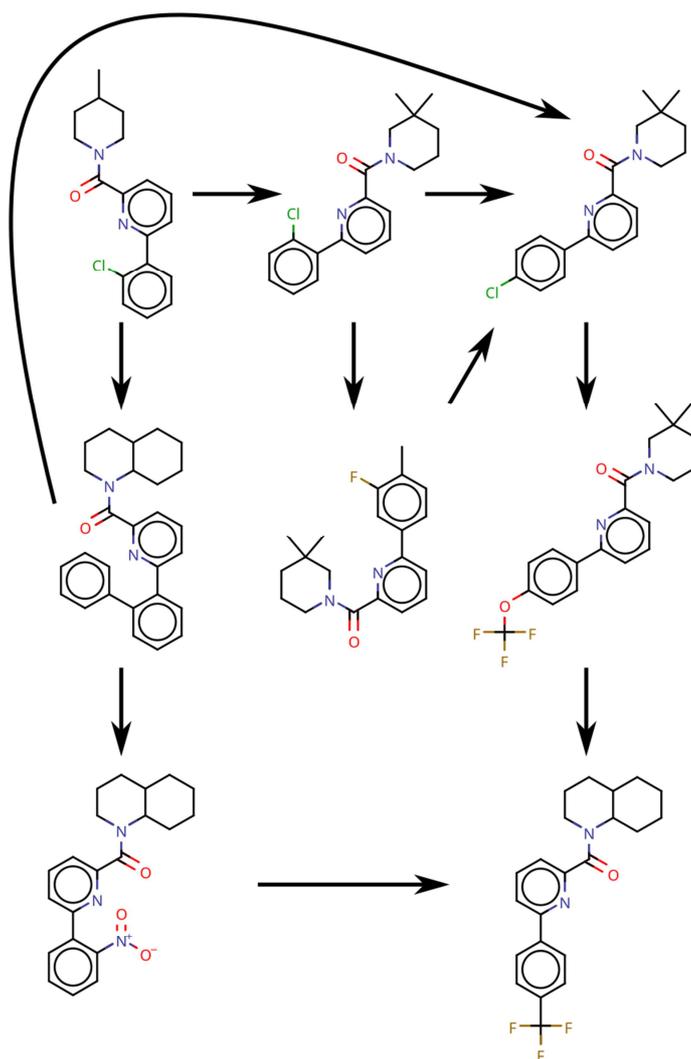


Figura 6 – Exemplo de mapa de perturbações como grafo direcional. Cada vértice do grafo representa uma molécula e cada aresta, uma perturbação conectando estas moléculas, onde o estado inicial é a molécula de origem da aresta e o estado final é a molécula de destino da aresta. Um ciclo fechado com quatro moléculas está presente neste grafo.

Liu e colaboradores desenvolveram o LOMAP, um programa de construção automatizada de mapas de perturbação (LIU et al., 2013). O LOMAP utiliza a máxima estrutura comum (MCS) e um algoritmo glutão para construir um grafo com perturbações entre moléculas com mais similaridade e criar ciclos fechados. A MCS entre duas ou mais moléculas é definida como a maior subestrutura molecular comum entre elas, onde maior em geral significa maior número de átomos ou ligações (CAO; JIANG; GIRKE, 2008). A definição exata da equivalência entre átomos e ligações entre as subestruturas moleculares pode variar de acordo com a implementação.

Diversos algoritmos que podem ser utilizados para a construção de mapas de perturbação. Um possível algoritmo que poderia ser aplicado para este fim é o algoritmo de colônia de formigas (*Ant Colony Optimization*, ACO) (DORIGO; GAMBARDILLA, 1997). Este algoritmo foi inspirado no comportamento das formigas ao utilizar ferormônios para sinalizar caminhos e foi originalmente proposto para atacar o problema do caixeiro viajante. Neste problema clássico, busca-se encontrar um caminho mais curto percorrendo N cidades de forma que cada cidade seja visitada somente uma vez e que a cidade de partida seja a mesma de chegada. Este problema pode ser expresso como encontrar, de um grafo conectado, um grafo cíclico que minimiza a soma do custo (distância) das arestas. O ACO busca encontrar este caminho utilizando diversas instâncias, ditas formigas, que encontram caminhos progressivamente melhores se comunicando através de ferormônio depositado pelo caminho percorrido. Uma formiga inicia em um nó do grafo e escolhe aleatoriamente uma aresta para percorrer, com a probabilidade da escolha afetada pela distância e pela quantidade de ferormônio depositado. A formiga se desloca para o nó subsequente e em seguida uma nova aresta é selecionada da mesma forma, sendo que nós já visitados não pode ser escolhidos. Quando o último nó é encontrado e o grafo cíclico concluído, a formiga deposita uma quantidade de ferormônio proporcional ao custo da solução, no caso, a distância total percorrida.

Por exemplo, a aplicação do ACO para encontrar o menor caminho entre 6 cidades (**Figura 7A**) começa com as formigas percorrendo diferentes caminhos e depositando uma quantidade de ferormônio proporcional à pontuação da solução final (neste caso, a distância total percorrida) (**Figura 7B**). O ferormônio é utilizado para enviesar a escolha das próximas cidades e vai sendo progressivamente mais depositado nos melhores caminhos (**Figura 7C**). Finalmente, a melhor solução pode ser encontrada, o que não é certo, uma vez que se trata de um algoritmo heurístico (**Figura 7D**).

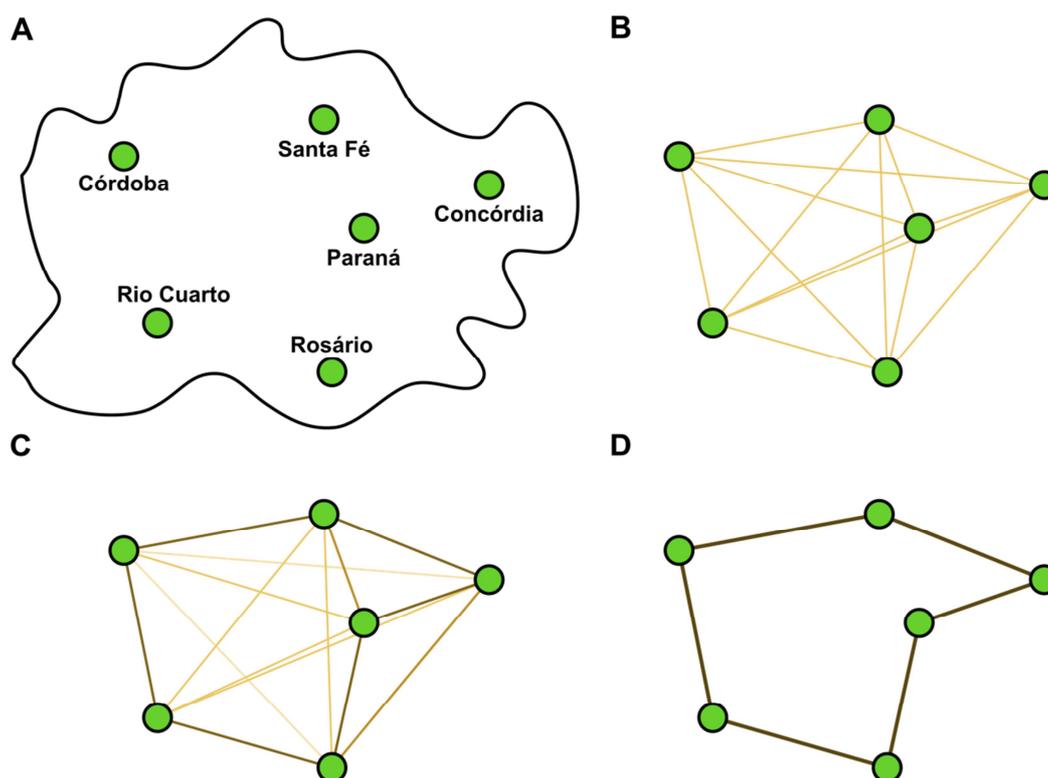


Figura 7 – Exemplo de aplicação do algoritmo de colônia de formigas. (A) Seis cidades a serem visitadas. (B) As primeiras formigas utilizam diversos caminhos e depositam ferormônio, representado pelas linhas. (C) O ferormônio depositado, cuja quantidade está representada proporcionalmente a cor da linha, leva à soluções cada vez melhores. (D) O melhor caminho é finalmente encontrado.

1.8 Ferramentas de automação de cálculos de FEP

Embora o formalismo da FEP possa ser facilmente implementado nos programas de DM, a preparação e análise de grande volume de cálculos é uma tarefa infactível sem auxílio de sistemas de automação. Em grande parte, a popularidade da FEP se deveu ao desenvolvimento do programa FEP+, que automatiza a preparação, execução e análise destes cálculos. Além da aplicação comercial FEP+, alternativas de código aberto ou disponíveis sem custo para pesquisa foram reportadas recentemente, parte delas durante a realização deste projeto de doutorado.

Do ponto de vista da implementação, o programa FEP+, introduzido em 2015, utiliza uma versão modificada do LOMAP para gerar mapas de perturbação e um algoritmo que combina posição tridimensional e estrutura química para gerar topologias duplas. O campo de força proprietário OPLS3e

é utilizado e as simulações são executadas no programa de DM Desmond, utilizando a técnica de amostragem estendida REST2 (ABEL et al., 2017; WANG et al., 2015).

O FESetup foi uma das primeiras aplicações de automação de cálculos de FEP (LOEFFLER; MICHEL; WOODS, 2015), tendo sido reportado em 2015, meses após a introdução do FEP+. Escrito em Python2, o FESetup utiliza o programa Sire e ferramentas do AmberTools (CASE et al., 2018) para ler e editar topologias, a biblioteca openbabel (O'BOYLE et al., 2011) para converter formatos e RDKit (RDKit: Open-source cheminformatics, 2019) para obter MCS entre as moléculas. O FESetup pode utilizar os programas de DM Amber (CASE et al., 2018), GROMACS (ABRAHAM et al., 2015), Sire e NAMD (PHILLIPS et al., 2005) e suporta campos de força da família Amber.

Em 2019, Jaspers e colaboradores reportaram o desenvolvimento do programa QLigFEP, que utiliza o programa Q (MARELIUS et al., 1998) para preparação dos sistemas e execução das DM (JESPERS et al., 2019). O QLigFEP não gera mapas de perturbação, que devem ser supridos pelo usuário, e suporta os campos de força Amber ff14sb/GAFF, CHARMM36/CGenFF e OPLS-AA/M. Interessantemente, os autores aplicaram condições esféricas de contorno, onde uma pequena esfera de solvente explícito é simulada. Isto contrasta com a opção muito mais comum em DM, a aplicação de condições periódicas de contorno, onde imagens periódicas do sistema são utilizadas para aproximar um ambiente líquido maior do que o efetivamente simulado. O programa QLigFEP é de código aberto, embora o programa Q não o seja.

Em maio de 2020, foi reportado o desenvolvimento da aplicação comercial Flare, desenvolvida por parte do grupo que reportou o FESetup, e que compartilha várias similaridades com este (KUHN et al., 2020). Os programas Sire e OpenMM são utilizados para preparar os sistemas e executar as DM, utilizando o campo de força Amber ff14sb/GAFF2.1. Assim como o FEP+, o Flare tem uma interface gráfica e é capaz de realizar análises de histerese de fechamento de ciclo. Este tipo de análise se baseia na ideia de que a soma de todos os $\Delta\Delta G$ em um ciclo fechado deve ter soma nula. A magnitude da soma dos $\Delta\Delta G$ é utilizado como indicador de convergência dos cálculos. O Flare é distribuído pela empresa Cresset.

Em novembro de 2020, um módulo voltado para cálculo de energia livre chamado *Free Energy Calculator* foi adicionado ao CHARMM-GUI (KIM et al., 2020). O CHARMM-GUI é uma ferramenta online de preparação de sistemas para DM (JO et al., 2008; WU et al., 2014). O *Free Energy Calculator* suporta os programas de DM NAMD (PHILLIPS et al., 2005) e GENESIS (KOBAYASHI et al., 2017) e o campo de força CHARMM36/CGenFF v1.x (versões mais novas do CGenFF ainda não são suportadas). Dois tipos de mapas de perturbação podem ser gerados automaticamente: mapas circulares e em formato de estrela. O *Free Energy Calculator* não realiza análise dos resultados das simulações.

Embora ferramentas de automação da FEP tenham sido relatadas da literatura, há um déficit de programas de código aberto que integrem métodos de amostragem estendida e suporte múltiplos campos de força (**Tabela 2**). Adicionalmente, uma ferramenta de automação de FEP idealmente deveria automatizar desde a preparação dos mapas de perturbação até a análise dos resultados. A possibilidade de suportar múltiplos campos de força também pode ser grande utilidade, uma vez que diferentes campos de força podem apresentar melhores representações de certas classes de pequenas moléculas ou macromoléculas.

Tabela 2 – comparação das principais características de ferramentas de automação de cálculos de FEP reportadas da literatura

Ferramenta de automação	FEP+	FESetup	QLigFEP	Flare	CHARMM-GUI Free Energy Calculator
Código de DM	Desmond	AMBER, GROMACS, SIRE, NAMD	Q	Sire + OpenMM	NAMD, GENESIS
Campos de força suportados	OPLS3e	Campos da família Amber	Amber ff14sb/GAFF, CHARMM36/C GenFF e OPLS-AA/M	Amber ff14sb/GAFF2.1	CHARMM36/C GenFF v1.x
Mapa de perturbação	LOMAP modificado	<i>Nenhum</i>	<i>Nenhum</i>	<i>LOMAP modificado</i>	Circulares e em estrela
Amostragem estendida integrada	REST2	<i>Nenhuma</i>	<i>Nenhuma</i>	<i>Nenhuma</i>	<i>Nenhuma</i>
Análises avançada dos resultados	Análises de correlação e linearidade, análise de ciclos fechados, análises de torções do ligante	<i>Nenhuma análise</i>	Análises de correlação e linearidade	Análises de correlação e linearidade, análise de ciclos fechados, análise de sobreposição de estados	<i>Nenhuma análise</i>
Interface	Interface gráfica	Linha de comando	Linha de comando	Interface gráfica	Interface Web
Licença	Proprietário	Código aberto	Código aberto	Proprietário	<i>Não informado</i>
Referência	(WANG et al., 2015)	(LOEFFLER; MICHEL; WOODS, 2015)	(JESPERs et al., 2019)	(KUHN et al., 2020)	(KIM et al., 2020)

1.9 Receptor Farnesóide X como sistema modelo

Uma das dificuldades enfrentadas durante o desenvolvimento e validação de métodos para cálculo da RFEB é a necessidade de encontrar sistemas a serem utilizados como modelo para comparação de métodos e ferramentas. Comumente, este tipo de desenvolvimento se baseia em estudos retrospectivos, que são menos desafiadores do que aqueles prospectivos. Idealmente, tal sistema deve consistir de uma ou algumas séries de ligantes de um alvo com certa similaridade estrutural (em se tratando de métodos de aplicam ciclos termodinâmicos como os da **Figura 4**), cujo modo de ligação foi experimentalmente determinado, assim como as afinidades em relação ao alvo. A similaridade estrutural é desejável primeiro, porque para validar métodos de RFEB que utilizam transformações entre moléculas, uma

região comum entre os ligantes é geralmente necessária. Segundo, a similaridade estrutural aumenta a chance de que o modo de ligação da série seja conservado, uma propriedade altamente desejada, já que cálculos de RFEB de séries com variações no modo de ligação são muito mais desafiadores. Terceiro, a similaridade estrutural geralmente implica em cálculos menos difíceis. Por último, porque séries de análogos com variações em uma região da estrutura molecular são as situações mais comuns em otimização de protótipos – embora exista também a estratégia de *scaffold hopping*, onde o núcleo da molécula é alterado mantendo outros grupos existentes.

Alguns grupos têm se dedicado a organizar desafios para a comunidade, eventos onde um conjunto de dados de alta qualidade para problemas de predição é gerado e mantido em segredo, de forma que possíveis soluções são submetidas e, ao final, avaliadas contra os dados experimentais. Este tipo de evento tem sido organizado para predição de estrutura de proteínas partindo da sequência (*CASP: Critical Assessment of protein Structure Prediction*), predição de contatos entre proteínas (*CAPRI: Critical Assessment of PRediction of Interactions*), predição de propriedades físico-químicas de pequenas moléculas e interação de pequenas moléculas com receptores artificiais (*SAMPL: Statistical Assessment of Modeling of Proteins and Ligands*), e até mesmo desafios fora da área da bioinformática, como predições de modelos de evolução de costas marítimas ao longo dos anos (MONTAÑO et al., 2020). Especificamente em se tratando de descoberta de fármacos, o grupo Drug Design Data Resource (D3R) vem organizando desafios de comunidade chamados Grand Challenges, que envolvem a predição cega de poses de ligação de pequenas moléculas a alvos macromoleculares, predição de RFEB de séries com baixa similaridade estrutural e predição de RFEB para séries de análogos. Cinco destes desafios já foram organizados utilizando a HSP90 e a MAP4K4 (*Grand Challenge 2015*), uma proteína que se liga à 17-hidroxiprogesterona e uma que se liga ao colecalciferol (*Challenge PL-2016-1*), o receptor Farnesoide X (*Grand Challenge 2*), a catepsina S e as cinases VEGFGR2, JAK2, p38, ABL1 e TIE2 (*Grand Challenge 3*) e a betasecretase-1 e a catepsina S (*Grand Challenge 4*). Em todas estas ocasiões, as predições de afinidade relativa dos conjuntos de análogos, chamados de conjuntos de energia livre, devem se basear na estrutura cristalográfica de um ou alguns dos análogos complexados ao alvo, as estruturas moleculares destes compostos e as informações sobre as condições dos ensaios de afinidade. Após um certo tempo limite do desafio, todos os dados são disponibilizados no site do grupo D3R, de forma que estes conjuntos de dados se tornam interessantes para aplicação no desenvolvimento de métodos subsequentes. Neste trabalho, escolhemos utilizar retrospectivamente o

conjunto do *Grand Challenge 2* (GC2) como sistema modelo para teste de nossa ferramenta. O GC2, do qual não participamos, ocorreu entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017.

O FXR é um receptor nuclear de ácidos biliares expresso em hepatócitos, enterócitos e células renais, ativado principalmente pelo ácido biliar primário ácido quenodesoxicólico, e muito menos sensível aos ácidos secundários deoxicólico e litocólico (MAKISHIMA et al., 1999). Após a ligação de um ativador, o FXR, por diferentes vias de transdução de sinal, como dímero ou monômero, interage com o receptor retinóide X (RXR). Nos enterócitos, uma das vias de modulação do FXR como monômero é estimular a transcrição do *small heterodimer partner* (SHP) e do fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF-19). O SHP interage com a *liver receptor homologue-1* (LRH-1), o que reduz a transcrição da CYP7A1, e com o fator hepático nuclear 4 (HNF4), o que reduz a expressão da esterol-12- α -hidroxilase (CYP8B1). O FGF-19 ativa o receptor para FGF 4 (FGFR4), que ativa a c-Jun N-terminal cinase (JNK), o que leva a redução da atividade da colesterol 7- α -monooxigenase (CYP7A1) (**Figura 8**). As CYP7A1 e CYP8B1 são enzimas da via de biossíntese de ácidos biliares, que tem o colesterol como precursor, e sua inibição leva a uma redução da produção desses ácidos.

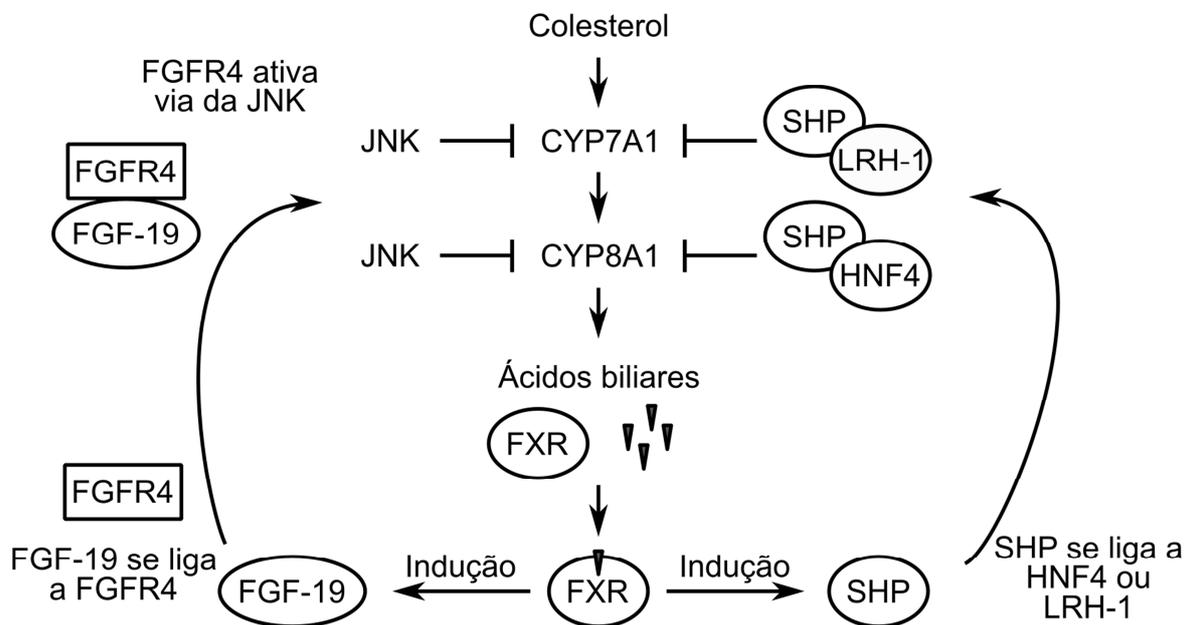


Figura 8 - Visão geral dos mecanismos de inibição da síntese de ácidos biliares via ativação do FXR. Adaptado de Claudel e colaboradores (CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT, 2005).

O FXR também regula a recirculação de ácidos biliares, uma via de grande relevância haja visto que cerca de 95% destes são reabsorvidos no lúmen do intestino. Nos enterócitos, o FXR reprime a expressão do transportador apical de ácidos biliares dependente de sódio (ASBT), via inibição da LRH-1, assim como descrito para a inibição do CYP7A1 (**Figura 9**) (LEFEBVRE et al., 2009). Há evidência sugerindo que o FXR ative a proteína intestinal ligadora de ácidos biliares (IBAB-P), porém não está clara a relevância desta proteína sobre o transporte de ácidos biliares no enterócito (CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT, 2005; DAWSON, 2011). Os ácidos biliares são exportados dos enterócitos por diversos transportadores e reabsorvidos nos hepatócitos, via circulação porta, pelos transportadores polipeptídeo cotransportador de taurocolato/ Na^+ (NTCP) e pelos peptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP). O NTCP é reprimido pela SHP, e, logo, pela ativação do FXR, entretanto não está claro o efeito do FXR sobre o OATP (CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT, 2005; JUNG et al., 2002). O FXR também induz a expressão de diversas enzimas envolvidas em na destoxificação dos ácidos biliares (**Figura 9**).

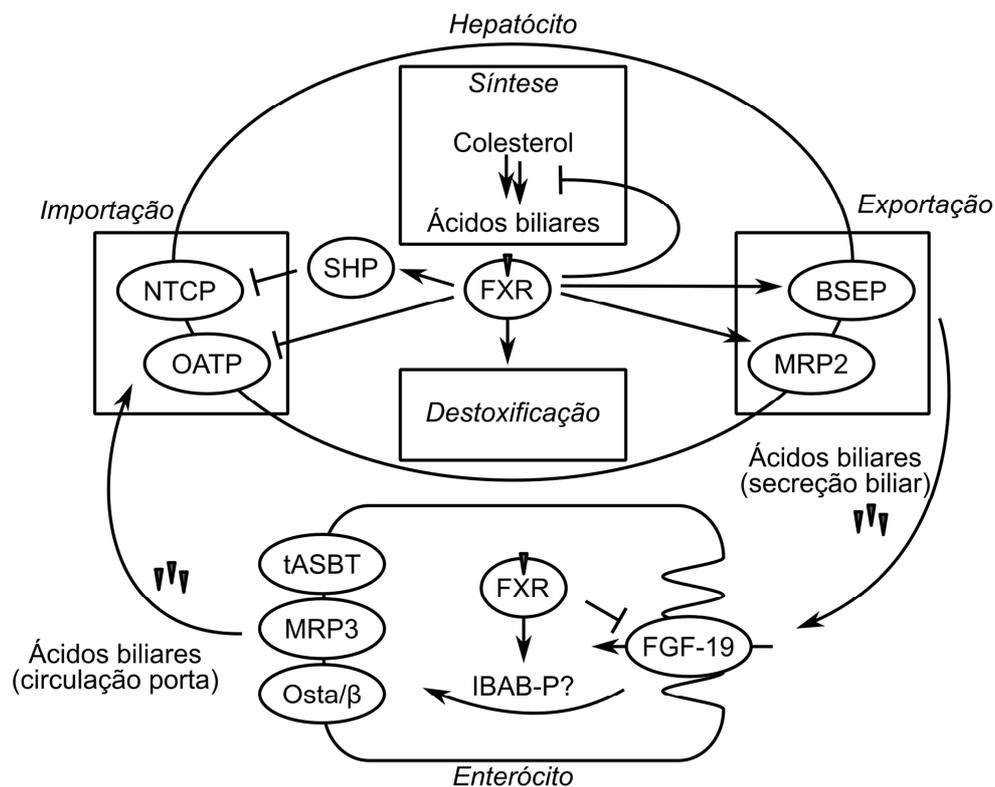


Figura 9 - Visão geral da circulação de ácidos biliares entre o fígado e o intestino e a regulação do FXR sobre este processo. Adaptado com modificações de (CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT, 2005).

O FXR também está envolvido no controle da glicemia, embora os mecanismos não estejam completamente elucidados. Foi demonstrado que o FXR modula a absorção intestinal de glicose (VAN DIJK et al., 2009), além de regular a expressão de diversos genes relacionados à gliconeogênese (YAMAGATA et al., 2004). Adicionalmente, devido a relevância dos ácidos biliares para a absorção de lipídeos e da regulação do FXR sobre o metabolismo de triglicerídeos (via, por exemplo repressão transcrição da apolipoproteína A1 e da ativação da expressão da proteína transferidora de fosfolípedes) , o FXR é um potencial alvo biomolecular para tratamento da diabetes tipo II e dislipidemias (GARDÈS et al., 2011; VAN DE WIEL et al., 2019). Inclusive, estudos em humanos foram conduzidos avaliando o agonista ácido obeticolico em pacientes com diabetes tipo II (MUDALIAR et al., 2013) e em pacientes com cirrose biliar primária que não respondem ao ácido ursodeoxicólico (HIRSCHFIELD et al., 2015). Logo, existe interesse em desenvolvimento de ligantes do FXR em química medicinal. Especificamente, quatro séries de 102 ligantes, junto com 36 estruturas cristalográficas, foram disponibilizados pela farmacêutica La Roche para a organização do GC2. Duas séries, a spiro e a de sulfonamidas, fizeram parte do conjunto de predição de energia livre.

Do ponto de vista estrutural, o FXR é uma proteína globular composta de α -hélices, com um domínio de ligação ao RXR e um sítio de ligação aos ácidos biliares. Kudlinzki e colaboradores obtiveram uma estrutura cristalográfica do FXR complexado ao ácido quenodesoxicólico e interagindo com um peptídeo (de sequência KENALLRYLLDKD) ocupando a região de ligação ao RXR (**Figura 10A**), que identifica um motivo LXXLL. O sítio de ligação do ácido quenodesoxicólico (região verde na **Figura 10A**) é o mesmo ao qual se ligam os ligantes do GC2. Especificamente, a estrutura cristalográfica do ligante protótipo da série spiro, o **FXR_10**, mostra que este se liga ao FXR no sítio de ligação dos ácidos biliares, porém nenhuma interação de hidrogênio ou íon-íon é predita para este ligante (**Figura 10B**). A série de ligantes spiro é composta de 18 moléculas, sendo 4 neutras e 14 aniônicas na condição de ensaio, bastante rígidas (com até 4 ligações rotacionáveis) e com pequenas diferenças entre as moléculas, principalmente modificações de substituintes do anel aromático ligado.

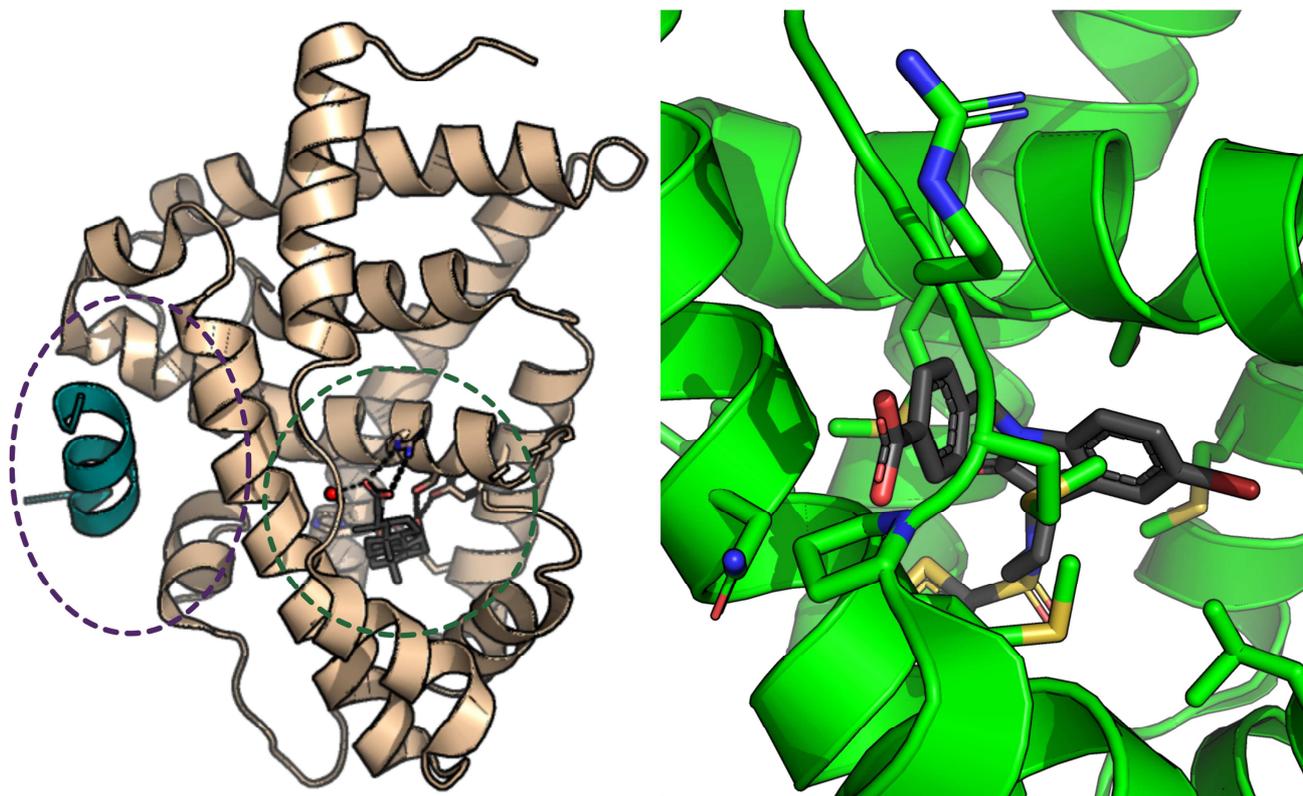


Figura 10 - Estrutura do receptor Farnesóide X (PBDID 5Q17). (A) Visão geral da proteína. Ressaltado em roxo, região de ligação ao RXR. Ressaltado em verde, sítio de ligação aos ácidos biliares. (B) Modo de ligação do ligante **FXR_10** ao receptor **FXR**, ressaltando resíduos próximos ao ligante.

Nesta tese, desenvolvemos o PyAutoFEP, um sistema de automação para cálculos de FEP utilizando o programa GROMACS, integrando técnicas de amostragem de estendida. O PyAutoFEP é, até onde sabemos, o único programa de FEP de código aberto a integrar técnicas de amostragem estendida e suportar múltiplos campos de força. O fato de que o código de DM escolhido seja o GROMACS visa ampliar a base de usuários potenciais, já que este é um dos códigos mais aplicados para DM, assim como maximizar a velocidade das simulações. Utilizamos os 14 ligantes aniônicos da série spiro como sistema modelo, e o estudamos com cinco campos de força e utilizando ou não a técnica REST2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um sistema de automação para cálculos de Perturbação de Energia Livre que integre algoritmos de amostragem estendida, com foco em otimização de protótipos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo de FEP para o programa GROMACS que permita a separação das transformações dos potenciais de van der Waals e de Coulomb
- Desenvolver um programa de automação de cálculos de FEP para o programa GROMACS que integre técnicas de amostragem estendida
- Validar este sistema de automação utilizando a série spiro de ligantes do Receptor Farnesóide X
- Avaliar o impacto da utilização de diferentes campos de força sobre as predições de RFEB
- Avaliar impacto da aplicação ou não a técnica de amostragem estendida REST2 sobre as predições de RFEB

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento da ferramenta de automação PyAutoFEP

O programa PyAutoFEP foi desenvolvido como uma série de *scripts* em Python3 automatizando o processo de preparação, execução e análise de um conjunto de cálculos de FEP para estimar a energia livre de Gibbs de interação entre pequenas moléculas e um alvo macromolecular. Ao longo de todo o processo, a biblioteca RDKit é utilizada para ler e representar moléculas, calcular Estruturas Máximas Comuns (*Maximum Common Substructure*, MCS), comparar estruturas moleculares, comparar estruturas com SMARTS, sobrepor moléculas, e realizar manipulação da estrutura tridimensional dos ligantes. Adicionalmente, grafos e a biblioteca networkx são utilizados para gerar, representar e manipular mapas de perturbação em todos os *scripts*.

O programa PyAutoFEP tem três partes principais: um gerador de mapas de perturbação, um preparador de topologias duplas e entradas para o programa GROMACS e uma ferramenta de análise dos resultados de FEP. O fluxograma geral de funcionamento (**Figura 11**) começa com a preparação de um mapa de perturbações partindo da estrutura dos ligantes, seguido da preparação das topologias duplas e complexos de entrada para programa GROMACS, e após a execução das simulações de DM, ocorre a análises dos resultados.

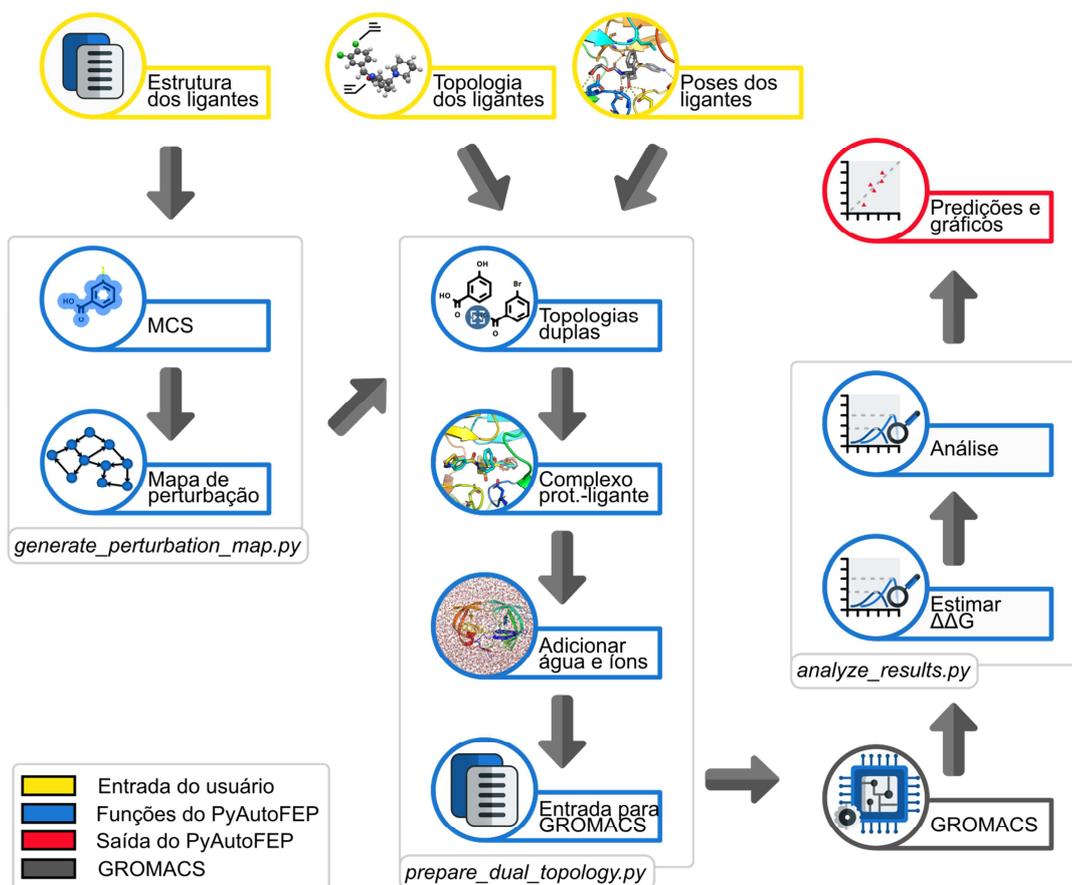


Figura 11 - Visão geral do fluxo do programa PyAutoFEP, ressaltando suas três partes principais: *generate_perturbation_map.py*, que gera mapas de perturbação; *prepare_dual_topologies.py*, que gera topologias duplas dos ligantes e prepara sistemas para execução das simulações; e *analyze_results.py*, que analisa os resultados das DM. Itens em amarelo são entradas de usuário, em vermelho são saídas, em azul são funções internas do PyAutoFEP e, em cinza a execução do GROMACS.

3.1.1 Geração de mapa de perturbações

A primeira parte do programa PyAutoFEP, o *script generate_perturbation_map.py*, prepara diferentes tipos de mapas de perturbação, representados por grafos simples direcionados, onde vértices direcionados correspondem às moléculas e arestas correspondem às perturbações que as conectam. Um vértice direcionado $A \rightarrow B$ representa a perturbação onde a molécula A é transformada, através de estados intermediários, na molécula B. Primeiramente o *script generate_perturbation_map.py* lê arquivos fornecidos pelo usuário contendo as estruturas químicas da série de ligantes nos formatos mol, mol2 ou SMILES. Em seguida, três tipos de mapas de perturbação podem ser gerados: mapas em forma de estrela, de roda e mapas otimizados (**Figura 12**). Estes três tipos de mapa se diferenciam em relação

a possibilidade de serem executadas análises de ciclo fechado e o número de perturbações necessárias. Uma vez que a energia livre de Gibbs é uma função de estado e não de caminho, tem-se que em um ciclo fechado de transformações, a somatória de todas as arestas é, necessariamente, nulo. Desta forma, a análise de ciclos fechados permite estimar o erro de um grupo de perturbações ao avaliar a soma dos valores de $\Delta\Delta G$ (WANG et al., 2013).

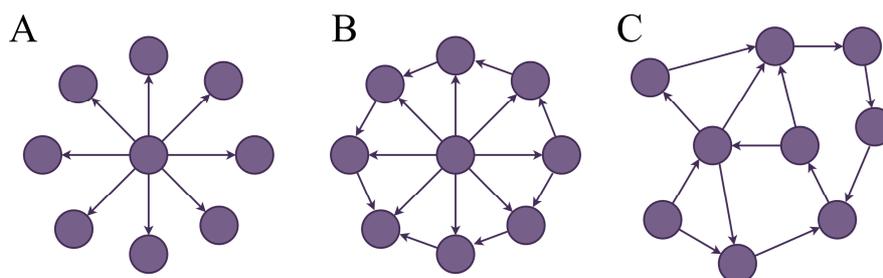


Figura 12 - Três tipos de mapa de perturbação gerados pelo programa PyAutoFEP. (A) Mapa em forma de estrela. (B) Mapa em forma de roda. (C) Mapa otimizado.

Um mapa em forma de estrela é um mapa em que todas as moléculas são conectadas a uma molécula central, e só a ela. Este tipo de mapa, pois, possui o número mínimo possível de perturbações $n-1$, onde n é o número de moléculas, porém, não há nenhum ciclo fechado, de forma que uma análise de ciclos fechados é impossível. Um mapa em forma de estrela (**Figura 12A**) é representado por um grafo estrela, um grafo conectado onde todos os vértices, menos o vértice central, tem grau 1, e o vértice central tem grau $n-1$, onde n é o número de vértices. Para que tal grafo seja gerado, é necessário que o usuário defina uma molécula central, que será utilizada como vértice central. Frequentemente, em campanhas de otimização de um protótipo, tal molécula central será o próprio protótipo cuja afinidade experimental contra o alvo macromolecular de interesse é conhecida e, idealmente, um modo de ligação foi determinado experimentalmente. O *script generate_perturbation_map.py* gera um mapa em forma de estrela enumerando as moléculas não centrais e conectando a molécula central a estas. Desta forma a pose da molécula central será utilizada como base para construir o sistema de entrada para dinâmica molecular na segunda etapa do programa PyAutoFEP.

Um mapa em forma de roda (**Figura 12B**) é um grafo roda, um grafo cíclico com $n-1$ vértices onde todos os vértices do ciclo são adicionalmente conectados a um vértice central, onde n é o número de vértices. Neste tipo de mapa cada molécula pertence a exatamente dois ciclos com três vértices – e $n-1$

ciclos com n vértices –, permitindo uma análise de erros de ciclos fechados. Este tipo de mapa tem $2n-3$ perturbações, onde n é o número de moléculas. Neste caso específico, embora o grafo seja direcionado, não necessariamente um circuito será gerado, ou seja, não necessariamente todos os vértices do ciclo externo terão a mesma orientação (representado, por exemplo, na **Figura 12B**). Para gerar este tipo de mapa de perturbação também é necessária a definição de uma molécula central por parte do usuário inicialmente. Inicialmente o *script generate_perturbation_map.py* constrói um mapa de perturbações em forma de estrela. Em seguida, os vértices externos da estrela são conectados de forma a minimizar o número de átomos perturbados. Para determinar este número de átomos perturbados, é necessário que os átomos correspondentes às topologias A e B e a região constante sejam assinalados. Para tanto, a MCS entre todos os pares de moléculas externas é calculada, de forma que os átomos pertencentes as estruturas máximas comuns entre os pares fazem parte da região constante e os átomos díspares entre os pares fazem parte das topologias A e B.

O problema de encontrar o ciclo que minimize o número de átomos perturbados é análogo ao problema do caixeiro viajante, onde a distância entre as cidades A e B é substituída pela distância $\eta_{A,B}$ entre duas moléculas, uma função do número de átomos perturbados entre elas, normalizado para valores entre 0 e 1 (LIU et al., 2013), dado por

$$\eta_{A,B} = 1 - e^{-\beta(N_A+N_B-2N_C)} \quad \text{(Equação 17)}$$

Onde β é uma constante arbitrária, N_A e N_B são o número de átomos nas moléculas A e B, respectivamente, e N_C é o número de átomos na região comum. O parâmetro β é ajustável pelo usuário.

Após a construção da matriz triangular de distâncias entre os pares de moléculas, um algoritmo de tipo ACO é aplicado para obter uma solução otimizada. Resumidamente, a cada rodada, uma instância (dita formiga) percorre o grafo sem repetir vértices, escolhendo arestas baseado em uma probabilidade dada pela distância entre os vértices e a quantidade de ferormônio depositado na aresta. A probabilidade de escolher a aresta $A \rightarrow B$, $p_k(A,B)$, é dada por:

$$p_k(A,B) = \begin{cases} \frac{\tau(A,B)^\alpha \eta(A,B)^\beta}{\sum_{u \in J_k(A)} \tau(A,u)^\alpha \eta(A,u)^\beta}, & \text{se } B \in J_k(A) \\ 0, & \text{senão} \end{cases} \quad \text{(Equação 18)}$$

Onde $\tau_{(A,B)}$ é o viés de se escolher a aresta $A \rightarrow B$ vindo do ferormônio depositado, $\eta_{(A,B)}$ é o viés de se escolher a aresta $A \rightarrow B$ vindo do custo da perturbação, α e β são parâmetros para balancear os efeitos

do custo e do ferormônio, u é qualquer vértice do grafo, e $J_k(A)$ é o conjunto de vértices permitidos ligados ao vértices A. Os parâmetros α e β são ajustáveis pelo usuário.

Quando um vértice é visitado, ele é removido de todos os grupos $J_k(u)$, se tornando, pois, inacessível por esta formiga. Quando todos os vértices são visitados, a formiga termina seu percurso, todos os conjuntos $J_k(u)$ são reiniciados, e uma quantidade de ferormônio é depositado nas arestas percorridas. A quantidade de ferormônio efetivamente depositado, $\Delta\tau_{k,eff}$, é dado por:

$$\Delta\tau_k = \frac{\left(\frac{\sum_{soluções} Tot_{cost}(j)}{N_{soluções} - 1}\right)^{d_e}}{Tot_{cost}(solução_i)^{d_e}} \quad \text{(Equação 19)}$$

$$\Delta\tau_{k,eff} = \begin{cases} max_d, \wedge se \Delta\tau_{k,eff} > max_d \\ \Delta\tau_{k,eff}, \wedge senão \end{cases}$$

Onde $\Delta\tau_k$ é a quantidade normalizada de ferormônio depositado, d_e é um parâmetro de balanceamento do ferormônio depositado, $Tot_{cost}(solução_i)$ é o custo total da solução i , e max_d é o máximo de ferormônio depositado por uma formiga. Os parâmetros d_e e max_d são ajustáveis pelo usuário.

Quando novas formigas percorrem o grafo, a informação do ferormônio depositado leva a escolha de caminhos progressivamente melhores. O algoritmo é executado até um número determinado de formigas terem percorrido o grafo, quando, então, a melhor solução é utilizada para construir o mapa de perturbações.

O último tipo de mapa de perturbação é o mapa otimizado (**Figura 12C**). A ferramenta de geração de mapas otimizados no PyAutoFEP busca objetivos similares ao Lead Optimization Mapper (LOMAP) (LIU et al., 2013), quais sejam, gerar mapas cujas transformações envolvam o mínimo possível de átomos, que anéis não sejam transformados, que todas as moléculas sejam parte de um ciclo fechado, e que qualquer par de moléculas estejam separadas por no máximo um certo número de perturbações. O LOMAP utiliza uma medida de similaridade que é composta por regras de incluem todos estes fatores, cria uma quantidade de vértices e aplica um algoritmo guloso para remover vértices em excesso, finalmente, conectando grupos desconectados utilizando um critério mais frouxo de similaridade. O LOMAP foi desenvolvido para trabalhar com grupos médios e grandes de moléculas potencialmente dissimilares. O script `generate_perturbation_map.py`, por outro lado, utiliza uma modificação do algoritmo ACO e uma métrica de custo global para buscar um mapa otimizado. Este algoritmo busca

maximizar a eficiência do mapa para grupos com até poucas dezenas de moléculas que contenham um núcleo comum a todas elas. Este algoritmo privilegia (a) a formação de ciclos fechados com três, quatro ou cinco vértices; (b) grafos com distância máxima entre vértices (diâmetro do grafo) reduzida; e (c) grafos com uma conectividade maior (mais arestas redundantes). Isto ocorre às expensas de tornar a geração de mapas otimizados do PyAutoFEP inadequado para grupos com mais do que cerca de 50 moléculas, grupos que não contenham um núcleo comum ou com baixa similaridade. Finalmente, o *script_generate_perturbation_map.py* permite selecionar moléculas centrais também para mapas otimizados, de forma que haverá um viés para mapas com mais vértices conectados a estas moléculas. Isto visa reduzir, em média, a distância das moléculas para estas moléculas com viés, o que pode ser conveniente para aumentar a confiança das estimativas em relação ao protótipo ou aos protótipos. Assim, em um mapa otimizado, cada molécula deve idealmente pertencer a vários ciclos de diversos tamanhos com moléculas distintas, o que permite uma análise de ciclos fechados utilizando ciclos menos similares do que os ciclos de um mapa em roda. Adicionalmente, este tipo de mapa permite o uso de múltiplas ou nenhuma molécula central, o que pode ser conveniente quando há múltiplos protótipos.

O algoritmo para mapas otimizados implementado no PyAutoFEP começa construindo uma matriz de distâncias entre todos os pares de moléculas de entrada (**Equação 17**). Em seguida, um grafo unidirecional completo – um grafo onde cada vértice está conectado a todos os outros por uma e somente uma aresta – é gerado. A cada instância de execução do algoritmo, arestas são selecionadas para serem removidas com probabilidade proporcional ao ferromônio depositado e a distância entre as duas perturbações ((**Equação 18**). Uma aresta não é removida se sua remoção geraria (a) um grafo desconectado; (b) um grafo com a distância máxima entre dois vértices maior do que um valor estabelecido; (c) ou algum vértice com uma conectividade menor do que um valor estabelecido. A instância pára usando uma condição aleatória ou quando número mínimo de vértices é atingido. O número mínimo de vértices é dado pelo grafo de Harary $H_{a,v}$, onde a é o número mínimo de arestas por vértice e v é o número de vértices (LIU et al., 2013). Após a parada, cada instância deposita uma quantidade de ferromônio $\Delta\tau_{k,eff}$ proporcional ao custo da solução encontrada ((**Equação 19**). O custo $Tot_{cost}(solution_i)$ é dado por

$$\begin{aligned}
Tot_{cost} = & \sum_{v\u00e9rtice_A} \sum_{v\u00e9rtice_B} (d_{A,B})^{l_e} \\
+ e_m & \sum_{v\u00e9rtice_A} (f_{grau}(v\u00e9rtice_A) - c_d)^{e_p} \\
+ p_m & \sum_{v\u00e9rtice_A} \sum_{v\u00e9rtice_B} \eta_{A,B}^{p_e}
\end{aligned}
\tag{Equa\u00e7\u00e3o 20}$$

Onde $d_{A,B}$ \u00e9 a dist\u00e2ncia, em n\u00famero de arestas, entre os v\u00e9rtices A e B , $f_{deg}(v\u00e9rtice_A)$ \u00e9 o grau do v\u00e9rtice A , c_d \u00e9 o n\u00famero desejado de arestas por v\u00e9rtice, e l_e , e_p , p_e , e_m e p_m s\u00e3o constantes de balanceamento entre os custos vindos das dist\u00e2ncias, dos graus e dos $\eta_{A,B}$. Os par\u00e2metros l_e , e_p , p_e , e_m e p_m s\u00e3o ajust\u00e1veis pelo usu\u00e1rio.

A implementa\u00e7\u00e3o dos algoritmos ACO e ACO modificado no PyAutoFEP s\u00e3o paralelizadas segundo o trabalho de Piriya Kumar e Levi (PIRIYAKUMAR; LEVI, 2002). O n\u00famero de formigas, de col\u00f4nias paralelas e todos os par\u00e2metros das equa\u00e7\u00f5es acima s\u00e3o configur\u00e1veis pelo usu\u00e1rio. Os valores padr\u00e3o s\u00e3o razo\u00e1veis para gerar mapas otimizados para s\u00e9ries com 30-40 mol\u00e9culas e mapas em forma de roda para qualquer n\u00famero de mol\u00e9culas. Neste trabalho, o algoritmo ACO modificado foi proposto e implementado, e o algoritmo ACO cl\u00e1ssico foi implementado, ambos paralelizados.

3.1.2 Prepara\u00e7\u00e3o de topologias duplas e de sistemas para DM

A segunda etapa do programa PyAutoFEP, o *script prepare_dual_topology.py*, constr\u00f3i topologias duplas dos ligantes – usadas para representar a transforma\u00e7\u00e3o entre o par de mol\u00e9culas –, monta os sistemas para DM e prepara os arquivos de entrada para o programa GROMACS (**Figura 13**).

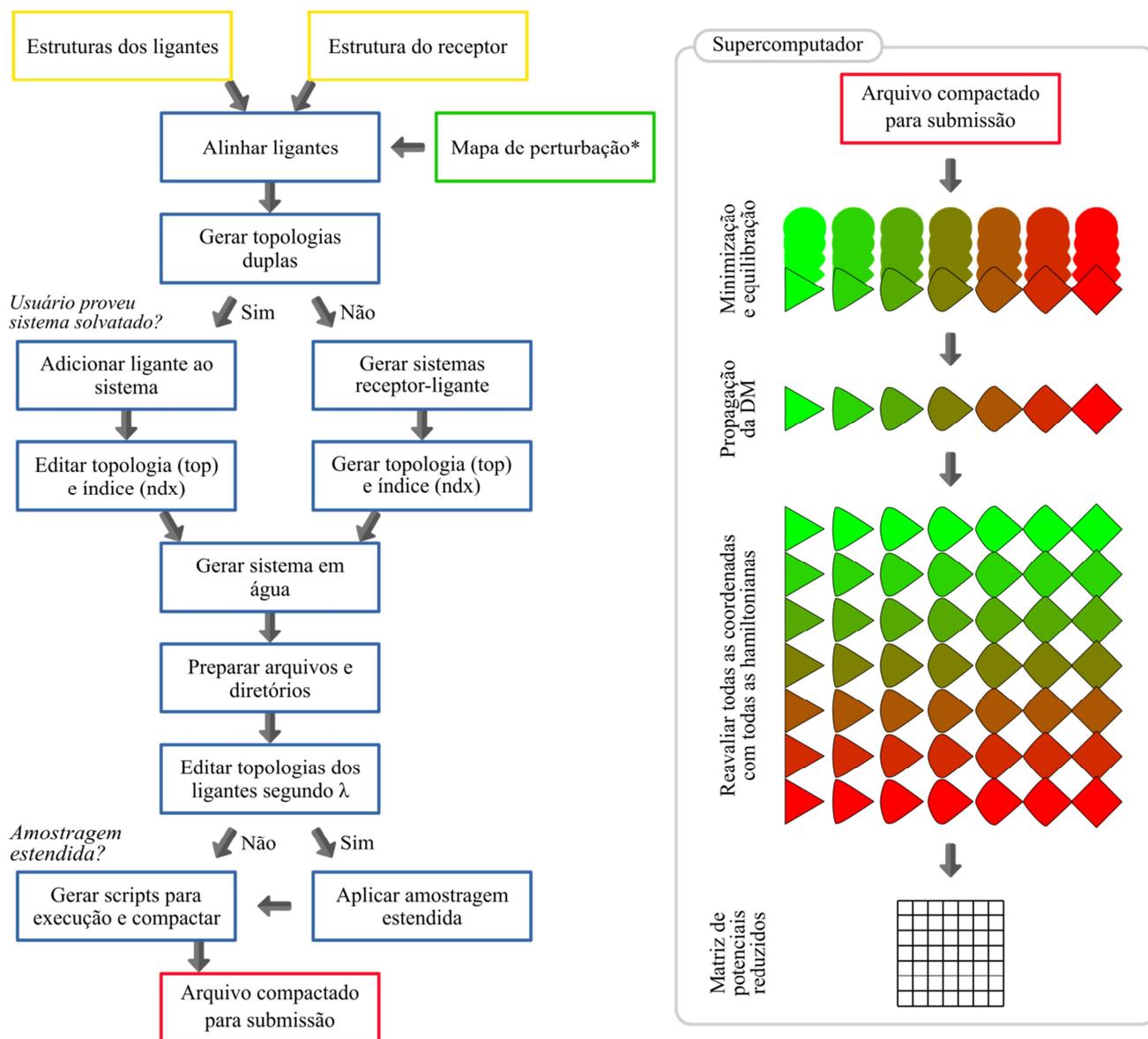


Figura 13 - Fluxograma geral do *script prepare_dual_topology.py* e da execução das simulações. Caixas em amarelo são entradas do usuário, em azul funções internas do PyAutoFEP e vermelhas, saídas para o usuário. O mapa de perturbação (célula verde) é uma entrada para este script, porém pode ser gerado pelo próprio PyAutoFEP e carregado automaticamente. Na execução das simulações, as formas representam as coordenadas e a cor, as hamiltonianas.

Inicialmente, um grupo de moléculas e suas respectivas topologias em formato compatível com o programa GRAMACS é lido, junto a poses dos ligantes em relação ao alvo macromolecular. Em geral, tais poses são lidas de resultados de ancoragem molecular, de quadros de dinâmicas moleculares ou de estruturas experimentais. Alternativamente, o PyAutoFEP é capaz de gerar poses para ligantes

utilizando um algoritmo de sobreposição de estruturas. Para tal, a MCS entre a molécula a ser alinhada e uma molécula de referência é calculada, seguido de um alinhamento dos átomos do núcleo comum. Em seguida, diversas conformações da região não comum da molécula a ser alinhada são geradas e a mais similar à pose de referência é escolhida.

Paralelamente, um mapa de perturbação, gerado pelo script *generate_perturbation_map.py* ou fornecido pelo usuário, é lido. Para cada perturbação no mapa, uma topologia dupla é construída usando como base as topologias lidas para cada molécula. Em uma topologia dupla, os átomos pertencentes à molécula A são progressivamente transformados em átomos sem interações (**Figura 14**), enquanto os átomos pertencentes à molécula B são representados por átomos sem interações (ditos desacoplados) e são progressivamente transformados em átomos com interações (ditos acoplados). Esta transformação progressiva se dá pelo escalonamento dos termos de Coulomb e van der Waals dos átomos a cada janela de λ (ver abaixo). Um modelo alternativo, não empregado pelo PyAutoFEP, é o de topologia simples, onde átomos da molécula A são mapeados para átomos da molécula B e ocorre transformações de tipos atômicos (**Figura 14**).

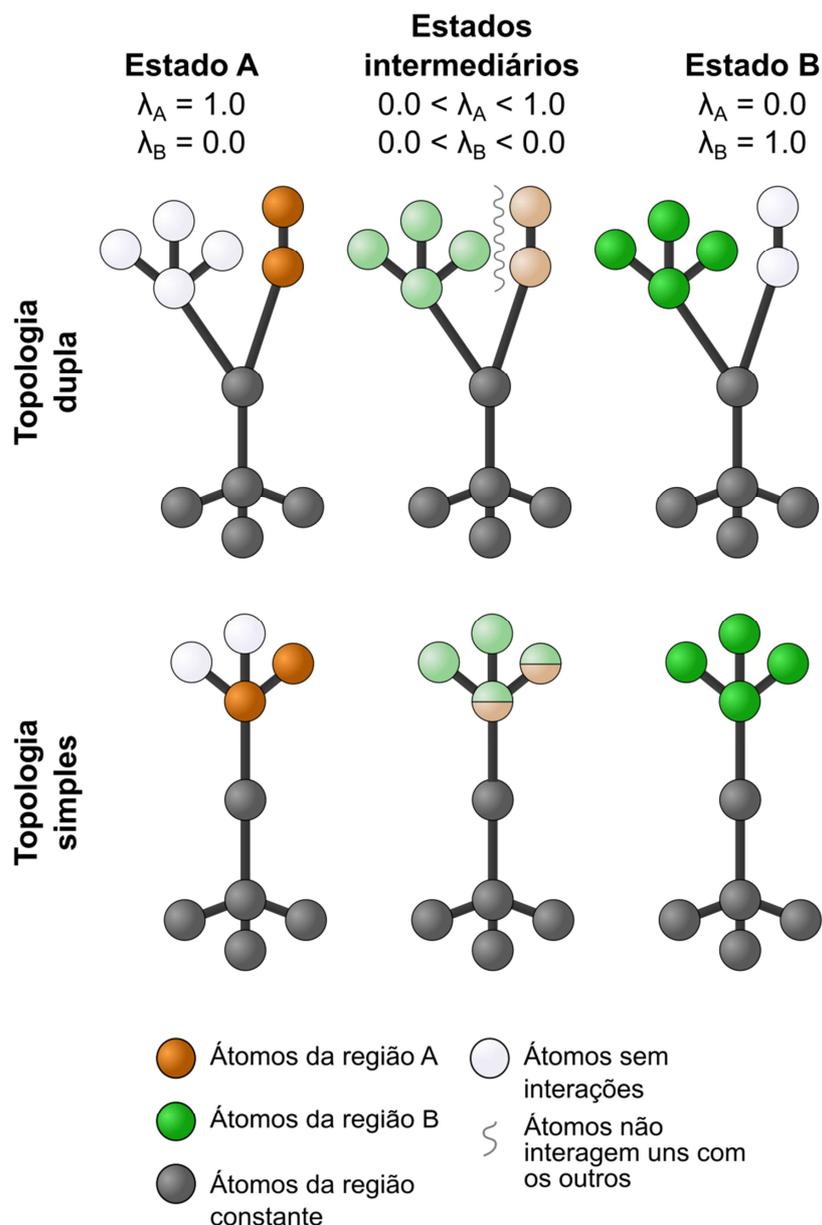


Figura 14 – Representação esquemática de topologias duplas (acima) e simples (abaixo) usadas para modelar a transformação não física de uma molécula contendo átomos alaranjados em uma molécula contendo átomos verdes.

Embora a princípio ambas as abordagens sejam capazes de produzir resultados equivalentes (BORESCH; KARPLUS, 1999; LOEFFLER et al., 2018), apenas topologias duplas são construídas pelo *script prepare_dual_topology.py*. Primeiro, porque perturbações utilizando topologias duplas podem não perturbar termos ligados, desde que o mesmo tipo de esquema de transformação seja utilizado em ambas as pernas do ciclo termodinâmico (**Figura 4**), simplificando a implementação.

Segundo, porque o uso de topologias duplas pode aumentar a amostragem da perturbação, já que os átomos parcialmente desacoplados interagem com o sistema e podem explorar o espaço conformacional. Este efeito pode ser maximizado com o uso de uma técnica de troca de réplicas (JIANG; CHIPOT; ROUX, 2019). Por outro lado, alguns autores sugerem que o uso de mais átomos desacoplados numa topologia híbrida pode requerer o uso de mais estados intermediários (MEY et al., 2020). Considerando a importância da amostragem na qualidade das previsões de FEP e a integração de técnicas de amostragem estendida no PyAutoFEP, optou-se pela utilização de topologias duplas.

Uma vez que topologias duplas representando as perturbações presentes no mapa de perturbações foram geradas, o *script generate_dual_topology.py* prepara sistemas para as simulações de DM. Isto pode ser feito de duas formas: utilizando um sistema pronto fornecido pelo usuário ou utilizando a ferramenta de geração de sistemas embutida. Em ambos os casos, para cada perturbação será preparado um sistema de simulação diferente, contendo os ligantes correspondentes.

Um sistema pronto em geral é um quadro de uma simulação comum de DM executada para equilibrar os componentes do sistema. Isto é especialmente útil – e, atualmente, requerido – em sistemas com membranas, misturas de solventes ou sistemas com regiões de vácuo. Nestes sistemas, é conveniente que uma primeira equilibração seja executada antes do início da FEP para permitir que ocorram relaxamentos que requerem uma escala de tempo longa (**Figura 13**). Caso um sistema pronto seja fornecido pelo usuário, o *script generate_dual_topology.py* alinhará os ligantes ao sistema pronto e os inserirá neste, opcionalmente removendo moléculas de água excessivamente próximas.

Alternativamente, em sistemas contendo somente um complexo proteína-ligante, é possível utilizar a ferramenta da construção de sistemas do *generate_dual_topology.py*. Esta ferramenta lê a estrutura da macromolécula, prepara um complexo macromolécula-ligante, e, utilizando as ferramentas do GROMACS, o solvata com moléculas de água e adiciona contra-íons ao sistema. Considerando que o relaxamento das moléculas de água em uma DM é relativamente rápida, esta é uma opção viável para sistemas simples.

Após a preparação dos sistemas para DM, o PyAutoFEP gera topologias do GROMACS segundo o esquema estados intermediários, ditos de janelas de λ , escolhido pelo usuário. As janelas de λ são,

efetivamente, simulações aplicando um valor de λ ente 0 e 1, perfazendo, pois um estado não físico que conecta os estados A e B. Efetivamente, em cada uma destes estados intermediários, usualmente ditos janelas de λ , os termos do campo de força que descrevem interações específicas são escalonados, sendo que os detalhes do escalonamento variam com a implementação. Uma das vantagens do PyAutoFEP é desacoplar completametne o escalonamento das interações das regiões da molécula A e B (**Figura 14**). O código nativo de energia livre do GROMACS implementa a seguinte Hamiltoniana em função da variável da perturbação, λ :

$$H = H_C + \lambda H_A + (1 - \lambda) H_B \quad \text{(Equação 21)}$$

Onde H_C é a Hamiltoniana da região constante, e H_A e H_B são, respectivamente, as Hamiltonianas das regiões A e B.

Logo, um mesmo parâmetro controla o desacoplamento dos átomos da topologia A e acoplamento dos átomos da topologia B, ou seja, todos os termos ligados e não ligados do campo de força das topologias A e B são escalonados concomitantemente. Desta forma, para que uma única sequência de estados intermediários, descritos por uma única sequência de valores de λ , descreva a perturbação, é necessário transformar concomitantemente termos de Coulomb e de van der Waals (**Figura 15A**). Uma limitação desta abordagem é que a transformação concomitante de termos de Coulomb e de Van der Waals pode causar instabilidade numérica (STEINBRECHER; JOUNG; CASE, 2011). Uma alternativa é utilizar uma abordagem de etapas separadas, de forma que se simula a redução até 0 dos termos de Coulomb da região A, seguido pela transformação dos termos de van de Waals concomitantemente das regiões A e B, e, finalmente, o aumento dos termos de Coulomb da região B (**Figura 15B**). Esta alternativa, entretanto, introduz um problema: para maximizar os ganhos de amostragem por métodos de amostragem estendida, é desejável que as réplicas possam transitar por todos os estados intermediários da perturbação, o que não é possível quando se usa etapas separadas. Uma terceira opção é desacoplar os multiplicadores λ para os estados A e B, de forma que a Hamiltoniana total do sistema passa a ser dada por:

$$H = H_C + \lambda_{vdW,A} H_{vdW,A} + \lambda_{Coul,A} H_{Coul,A} + \lambda_{vdW,B} H_{vdW,B} + \lambda_{Coul,B} H_{Coul,B} \quad \text{(Equação 22)}$$

Onde H_C é a Hamiltoniana da região constante, $H_{Coul,A}$ e $H_{Coul,B}$ são as Hamiltonianas das interações eletrostáticas das regiões A e B, $H_{vdW,A}$ e $H_{vdW,B}$ são as Hamiltonianas das interações de van der Waals

das regiões A e B, e $\lambda_{Coul,A}$, $\lambda_{Coul,B}$, $\lambda_{vdW,A}$ e $\lambda_{vdW,B}$ são fatores de escalonamento independentes, tal que $\lambda \in [0,1]$.

Desta forma, é possível separar o desacoplamento dos termos de van der Waals e Coulomb da região A do acoplamento de tais termos da região B, mantendo uma única sequência de valores de λ (**Figura 15C**) e permitindo a máxima eficiência de métodos de amostragem estendida com troca de réplicas. Esta alternativa é utilizada, por exemplo, no programa de DM Desmond (BOWERS et al., 2006) e, com variações, no programa NAMD (PHILLIPS et al., 2005). Outros códigos de DM, como o Amber (CASE et al., 2018) e o GROMACS (ABRAHAM et al., 2015), entretanto, não implementam a **Equação 22**. Uma vez que o PyAutoFEP utiliza o programa GROMACS para realizar a FEP, optou-se por implementar a **Equação 22** editando diretamente as topologias duplas dos ligantes. Assim, uma topologia editada é criada para cada janela de λ .

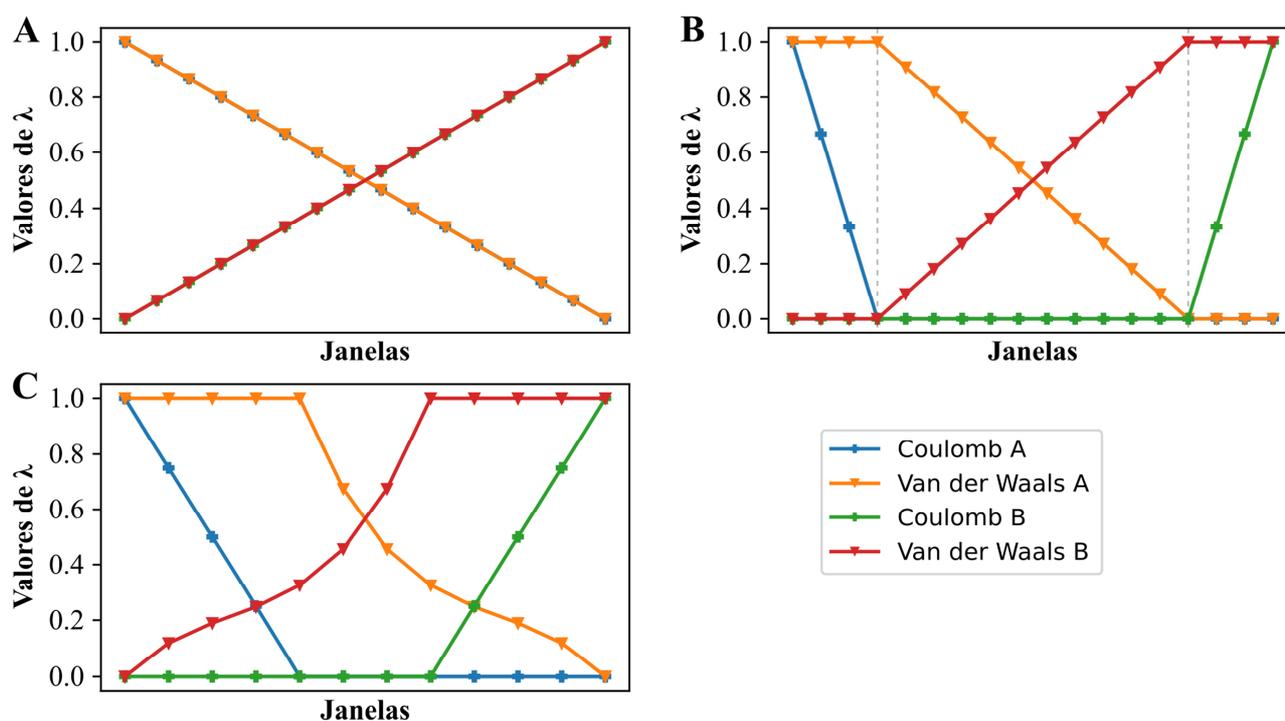


Figura 15 - Esquemas de perturbação utilizando diferentes estratégias. (A) Perturbação concomitante de termos de Coulomb e van der Waals. (B) Perturbação utilizando três etapas separadas denotadas por uma linha vertical tracejada: descarga da região A, transformação dos termos de van de Waals e carregamento da região B. (C) Transformação independente dos termos de Coulomb e van der Waals das regiões A e B.

Nesta etapa do processo, opcionalmente, pode ser aplicado o escalonamento dos parâmetros do soluto, conforme as técnicas de amostragem estendida REST ou REST2. O escalonamento para aplicação do REST2 é feito utilizando a ferramenta disponibilizada no programa Plumed (TRIBELLO et al., 2014). O escalonamento para aplicação do REST é feito utilizando uma modificação da mesma ferramenta. A região do soluto escalonada pode ser livremente definida pelo usuário. Para que a amostragem estendida seja de fato realizada, durante a execução das simulações de DM, é necessário utilizar uma versão do GROMACS modificada pelo programa Plumed.

Com os sistemas para DM prontos, o script *generate_dual_topology.py* prepara uma estrutura de diretórios e script para automatizar a execução das simulações. É importante ressaltar que, por não utilizar o código nativo de energia livre do GROMACS, as perturbações ocorrem em duas etapas: primeiro ocorre a simulação de DM de todas as janelas concomitantemente, em seguida, a energia potencial de cada quadro de cada uma das DM de cada janela é obtida utilizando a Hamiltoniana de todas as janelas (**Figura 13**). Ao final da execução de todas as perturbações, os resultados podem ser analisados.

Foram contribuições deste trabalho as funções de MCS tridimensional, de processamento e topologias e preparação de topologias duplas, incluindo com moléculas com pares não ligados. As funções de processamento de poses de ligantes e de sobreposição utilizando um núcleo comum também são contribuições originais. A geração de sistemas é uma automação de funções do programa GROMACS, assim como o *script* de execução. O uso de REST e REST2 são adaptações de um script disponível com o programa PLUMED (TRIBELLO et al., 2014), sendo que o código para REST é uma adaptação com incorporação de grande quantidade de código original.

3.1.3 Análise dos resultados

Os resultados das perturbações podem ser analisados utilizando o script *analyze_results.py* que, utilizando as bibliotecas *alchemy* e *pymbar* (SHIRTS; CHODERA, 2008), estima os valores de energia livre de Gibbs com os estimadores MBAR ou BAR. Tais estimativas de energia livre entre os pares presentes no mapa de perturbação podem ser, opcionalmente, convertidos para energias livres em relação a uma molécula de referência presente no mapa. Adicionalmente, gráficos podem ser gerados utilizando a biblioteca *alchemy-analysis* (KLIMOVICH; SHIRTS; MOBLEY, 2015) e código nativo.

3.2 Cálculos de FEP de uma série de ligantes do receptor Farnesóide X

Como sistema modelo para teste do PyAutoFEP, foi utilizado uma série de ligantes spiro do receptor Farnesóide X, utilizada como parte do desafio para comunidade Grand Challenge 2 (GC2). Esta série foi apresentada como o *Free Energy Set 2*, parte do desafio especificamente voltada para cálculos de RFEB. Estruturas cristalográficas, dados de afinidade e estruturas químicas foram obtidas dos dados do originais do GC2 (GAIEB et al., 2018). 14 dos 18 ligantes do grupo de moléculas spiro, preditas como monoânions pelo programa Marvin Sketch versão 20.3, foram utilizadas (**Figura 16**). Os estados de protonação dos resíduos do receptor Farnesóide X foram calculados utilizando o servidor PropKa (OLSSON et al., 2011). As poses iniciais das moléculas foram geradas utilizando a função de alinhamento de sobreposição de estruturas a partir da pose cristalográfica do ligante FXR_10 (PDB ID 5Q17, **Figura 10**). Este alinhamento utilizou a MCS para definição do núcleo comum, 500 poses foram geradas e classificadas por similaridade de forma usando o coeficiente de Tanimoto, conforme implementado no RDKit (RDKit: Open-source cheminformatics, 2019), e estrutura com formato mais similar à referência foi utilizada. O mapa de perturbação foi gerado utilizando o algoritmo para mapas otimizados.

As simulações de DM foram executadas em triplicada para cada perturbação utilizando o GROMACS 2019.2 (ABRAHAM et al., 2015) modificado com o programa Plumed 2.5.2 (TRIBELLO et al., 2014). Os sistemas foram construídos utilizando a ferramenta de geração de sistemas do PyAutoFEP. Caixas ortorrômbicas com distâncias mínimas de 1,0 nm das faces até o soluto foram utilizadas. Para algumas simulações do ligante em água, onde somente o ligante e moléculas de solvente estão presentes, utilizando campos de força derivados do CHARMM, este tamanho de caixa não foi suficiente, levando à interação do ligante com sua imagem periódica (**Tabela 3**). Para estes sistemas, as simulações em água foram refeitas com uma distância mínima de 1,5 nm para as faces da caixa.

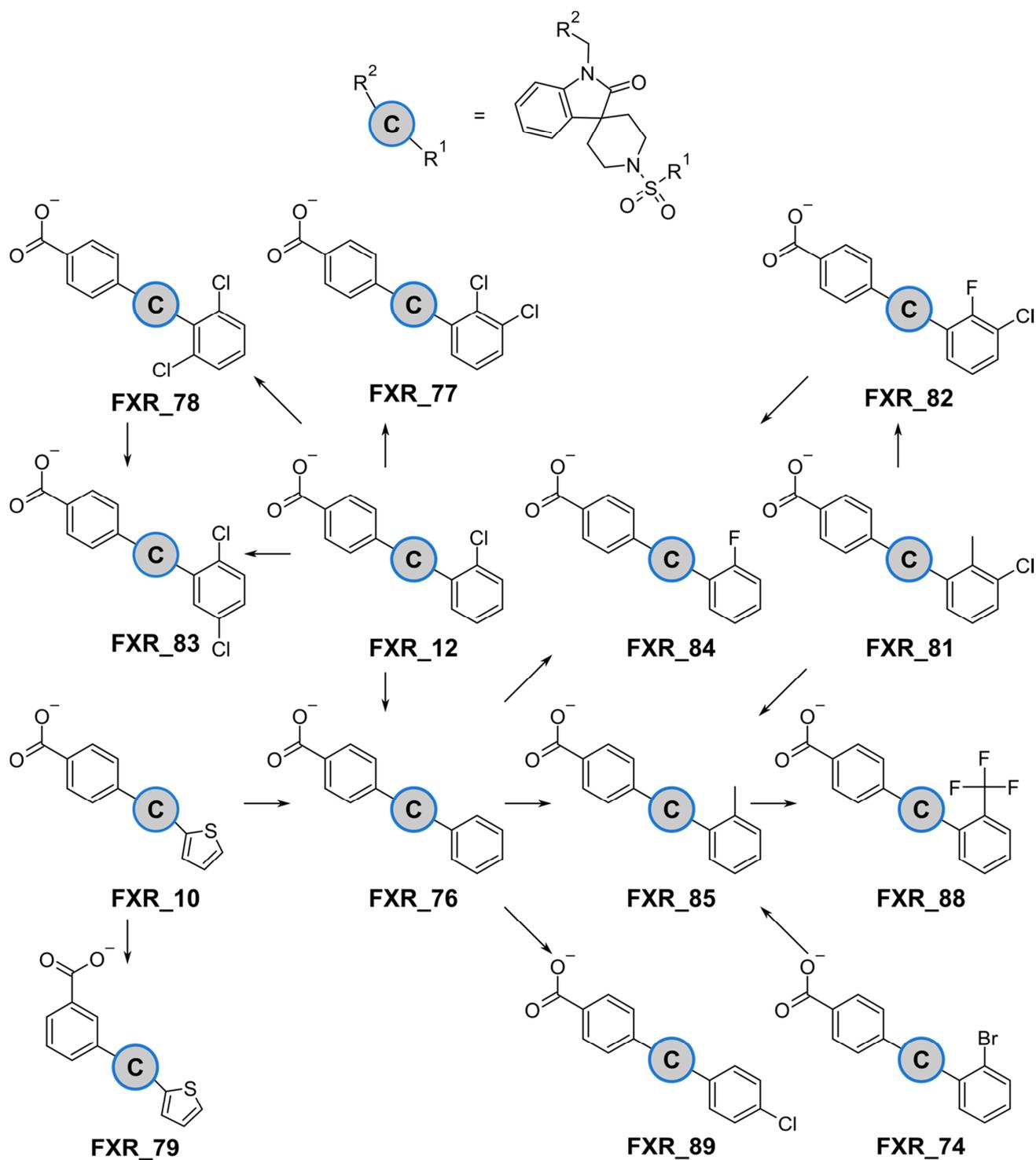


Figura 16 - Mapa de perturbações utilizado para os ligantes da série spiro do receptor Farnesóide X

Tabela 3 - Perturbações para as quais uma caixa com distância mínima de 1,5 nm entre as faces e o soluto foi utilizada nas simulações em água

Campo de força	REST2	Perturbações	Réplicas	
CHARMM36m/CGen FF	Não	FXR_10→FXR_79	2	
		FXR_12→FXR_76	1	
		FXR_12→FXR_77	3	
		FXR_76→FXR_84	1	
		FXR_76→FXR_89	1 e 2	
		FXR_81→FXR_82	2	
		FXR_81→FXR_85	2	
		FXR_82→FXR_84	1 e 3	
	Sim	FXR_76→FXR_84	1	
		FXR_76→FXR_89	2 e 3	
		FXR_78→FXR_83	2	
		FXR_81→FXR_85	2	
		CHARMM36- YF/CGenFF	FXR_76→FXR_84	3
			FXR_76→FXR_89	2
FXR_81→FXR_82	2			
FXR_81→FXR_85	1			
FXR_82→FXR_84	2			
CHARMM36- WYF/CGenFF	FXR_76→FXR_89	2		
	FXR_82→FXR_84	3		
	FXR_85→FXR_88	2		

Íons Na⁺ e Cl⁻ foram adicionados para neutralizar o sistema e até uma concentração de 0,15 mM. Todas as janelas foram minimizadas e então equilibradas utilizando amostragem NVE, NVT e NPT, sequencialmente, por 0,2 ns. As janelas foram amostradas por 10 ns utilizando amostragem NPT a 1 atm e 298,15 K. Foram utilizadas 12 janelas de λ (**Tabela 4**), para todas as perturbações, e 24 janelas (**Tabela 5**) de λ , para a perturbação **FXR_10→FXR_79** e para todas as perturbações de uma réplica de teste utilizando o campo de força Amber03/GAFF. Nas simulações utilizando REST2, foi empregado um fator de 0,5 (WANG; FRIESNER; BERNE, 2011) nas janelas centrais com escalonamento linear até os estados finais e iniciais. As energias de Gibbs entre os pares foram estimadas utilizando MBAR (SHIRTS; CHODERA, 2008) e convertidas em energias em relação ao ligante **FXR_10**.

Tabela 4 - Coeficientes de escalonamento de termos de van der Waals (VdW) e Coulomb (Coul) das topologias A e B ao longo da transformação em função de λ utilizando 12 janelas para representar a perturbação

$\lambda =$	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VdW A	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	0,67 479	0,45 630	0,32 525	0,24 741	0,18 978	0,11 850	0,00 000
VdW B	0,00 000	0,11 850	0,18 978	0,24 741	0,32 525	0,45 630	0,67 479	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000
Coul A	1,00 000	0,75 000	0,50 000	0,25 000	0,00 000							
Coul B	0,00 000	0,25 000	0,50 000	0,75 000	1,00 000							

Tabela 5 - Coeficientes de escalonamento de termos de van der Waals (VdW) e Coulomb (Coul) das topologias A e B ao longo da transformação em função de λ utilizando 24 janelas para representar a perturbação

$\lambda =$	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VdW A	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	0,67 479	0,45 630	0,32 525	0,24 741	0,18 978	0,11 850	0,00 000
VdW B	0,00 000	0,11 850	0,18 978	0,24 741	0,32 525	0,45 630	0,67 479	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000
Coul A	1,00 000	0,75 000	0,50 000	0,25 000	0,00 000							
Coul B	0,00 000	0,25 000	0,50 000	0,75 000	1,00 000							

$\lambda =$	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
VdW A	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	0,67 479	0,45 630	0,32 525	0,24 741	0,18 978	0,11 850	0,00 000
VdW B	0,00 000	0,11 850	0,18 978	0,24 741	0,32 525	0,45 630	0,67 479	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000	1,00 000
Coul A	1,00 000	0,75 000	0,50 000	0,25 000	0,00 000							
Coul B	0,00 000	0,25 000	0,50 000	0,75 000	1,00 000							

Especificamente, para as simulações utilizando o Amber03/GAFF, ligantes foram parametrizados utilizando o AcPype (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012) para o campo de força Generalized Amber Force Field (GAFF) e cargas AM1-BCC (JAKALIAN; JACK; BAYLY, 2002). O campo de força Amber03 (PONDER; CASE, 2003) foi utilizado para modelar a proteína e íons e o modelo TIP3P foi utilizado para modelar a água. Para as simulações utilizando variante do CHARMM36, ligantes foram parametrizados utilizando o campo de força CGenFF e convertidos para formato compatível com o GROMACS. Os campos de força CHARMM36m (HUANG et al., 2017), CHARMM36-YF (KHAN et al., 2016), CHARMM36-WYF (KHAN; MACKERELL; REUTER, 2019) foram utilizados para modelar proteína e íons e o modelo de água TIP3P modificado para o campo de força CHARMM (MACKERELL et al., 1998) foi utilizado. Para as simulações utilizando OPLS-AA/M/LigParGen, os ligantes foram parametrizados com o servidor LigParGen (DODDA et al., 2017), o campo de força OPLS-AA/M (ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2015) foi utilizado para modelar a proteína e os íons e o modelo de água TIP4P foi utilizado.

3.2.1 Análises estatísticas

Análises de τ de Kendall (**Equação 23**), r de Pearson, r de Spearman e RMSEc (**Equação 24**) foram executadas utilizando o *script* de avaliação dos resultados disponibilizado pela D3R junto ao desafio GC2, disponível em https://github.com/drugdata/D3R_grandchallenge_evaluator. Outras análises estatísticas foram realizadas com a biblioteca scipy 1.3.1 e o interpretador Python 3.7.

$$\tau = \frac{n_c - n_d}{\binom{n}{2}} \quad \text{(Equação 23)}$$

Onde n_c é o número de pares, entre todos os possíveis pares no conjunto de dados; n_d é o número de pares, entre todos os possíveis pares no conjunto de dados, discordantes; n é o número elementos. Um par (x_i, y_i) e (x_j, y_j) é dito concordante se ambos $x_i > y_j$ e $y_i > y_j$ ou ambos $x_i < y_j$ e $y_i < y_j$, caso contrário o par é dito discordante.

$$RMSE_c = \sqrt{\frac{\sum((\hat{x}_i - x_i) - \bar{\epsilon})^2}{N}} \quad \text{(Equação 24)}$$

$$\bar{\epsilon} = \frac{\sum(\hat{x}_i - x_i)}{N}$$

Onde x_i é cada uma das predições; \hat{x}_i é a média de todos os x_i ; e N é o número de predições.

3.2.2 Simulação estatística de aplicação do PyAutoFEP em processos de otimização de ligantes

A simulação estatística foi executada utilizando a biblioteca scipy 1.3.1 e o interpretador Python 3.7. Inicialmente, um conjunto de tamanho N modelando afinidades relativas experimentais de análogos em relação a um protótipo foi gerado. Este conjunto foi modelado com um gerador de números aleatórios com distribuição normal de $\mu = 0,0$ kcal/mol e $\sigma = 1,02$ kcal/mol. Em seguida, a cada afinidade relativa calculada foi modelada como afinidade experimental somada a um erro, sendo que esse foi obtido com um gerador de números aleatórios com distribuição normal de $\mu = 0,0$ kcal/mol e $\sigma = 1,35$ kcal/mol. A menor afinidade relativa calculada (ou seja, a mais negativa) foi selecionada, e a afinidade experimental associada, foi salva. Esta simulação foi repetida 1.000.000 com $N=10$ e $N=100$, e a distribuição das afinidades experimentais selecionadas foram utilizadas para gerar um gráfico de distribuição, com a biblioteca matplotlib 3.1.1. As probabilidades de a afinidade experimental dos compostos selecionados serem menores do que 1,4 kcal/mol foram estimadas.

4 RESULTADOS

Utilizando o programa PyAutoFEP, foram preparados, executados e analisados cálculos de FEP para ligantes monoaniônicos do receptor Farnesóide X da série spiro. A pose cristalográfica do ligante **FXR_10** foi utilizada como referência e diferentes campos de força foram avaliados, com e sem amostragem estendida por REST2. Os cálculos foram realizados em triplicata e as médias dos valores preditos de $\Delta\Delta G$ foram calculados (**Tabela 6**). Estes valores médios preditos de $\Delta\Delta G$ foram utilizados nas análises subsequentes, afora onde outra abordagem for explicitamente indicada.

Observa-se na **Tabela 6** que todas os ligantes da série estudados são mais potentes do que o protótipo, afora a molécula **FXR_76**. Consistente com isto, a maior parte das predições tem sinal negativo, o que sugere que a maior parte das predições foi capaz de recuperar o sinal da RFEB em relação ao **FXR_10**. Interessantemente, as predições da RFEB do ligante **FXR_76**, as quais são obtidas diretamente da perturbação **FXR_10**→**FXR_76**, foram corretamente preditas como positivas somente pelo campo de força OPLS-A/M/LigParGen. Os desvios padrão das predições variaram entre 0,1 e 1,7 kcal/mol, excluindo as predições para o ligante **FXR_79** (ver abaixo), o que sugere uma boa reprodutibilidade entre as réplicas. Observa-se que o uso de valores de consenso, como proposto por Gapsys e colaboradores (GAPSYS et al., 2020), leva a um erro absoluto médio (*mean absolute error*, MAE) de 0,73 kcal/mol, o que sugere uma alta precisão.

Tabela 6 - Média e desvio padrão das predições para cada ligante da série spiro contra o FXR, em relação ao ligante de referência FXR_10, obtidas utilizando 12 janelas de λ (**Tabela 4**) e diferentes campos de força e na presença ou ausência da técnica de amostragem estendida REST2.

Ligante	$\Delta\Delta G$ experimental (kcal/mol)	Amber03/GAFF		Charmm36m/CGenFF		Charmm36- YF/ CGenFF	Charmm36- WYF/ CGenFF	OPLS-AA/M/LigParGen	
		Sem REST2 (kcal/mol)	Com REST2 (kcal/mol)	Sem REST2 (kcal/mol)	Com REST2 (kcal/mol)	Sem REST2 (kcal/mol)	Sem REST2 (kcal/mol)	Sem REST2 (kcal/mol)	Com REST2 (kcal/mol)
FXR_12	-2,7	-2,4 ± 0,3	-3,0 ± 0,6	-1,7 ± 0,5	-1,2 ± 0,6	-1,6 ± 0,8	-1,0 ± 0,3	-0,6 ± 0,7	-0,7 ± 0,7
FXR_74	-1,3	-1,8 ± 1,1	-2,9 ± 1,0	-2,7 ± 0,8	-1,1 ± 0,6	-1,0 ± 1,0	-1,8 ± 0,6	-0,6 ± 0,9	-1,2 ± 0,2
FXR_76	1,2	0,0 ± 0,3	-0,7 ± 0,3	-1,6 ± 0,6	-1,3 ± 0,5	-1,4 ± 0,4	-1,3 ± 0,3	0,5 ± 0,4	0,2 ± 0,1
FXR_77	-1,9	-3,3 ± 0,3	-4,7 ± 0,7	-2,3 ± 0,9	-2,3 ± 0,8	-2,0 ± 0,6	-1,6 ± 0,4	-2,7 ± 1,3	-2,7 ± 1,1
FXR_78	-3,2	-3,6 ± 0,4	-3,4 ± 0,5	-2,1 ± 0,9	-2,2 ± 0,8	-0,9 ± 0,8	0,5 ± 1,7	-1,9 ± 0,9	-1,7 ± 1,2
FXR_79	-0,2	3,4 ± 2,7	6,9 ± 5,1	0,1 ± 16,5	-0,3 ± 5,8	-11,6 ± 14,3	-2,5 ± 15,5	2,0 ± 2,9	-3,6 ± 7,3
FXR_79^a	-0,2	1,3 ± 1,0	2,4 ± 0,9	-2,6 ± 0,9	-1,8 ± 2,0	-1,9 ± 2,3	-4,2 ± 1,3	-0,8 ± 2,3	4,5 ± 6,4
FXR_81	-0,4	-2,2 ± 0,9	-3,3 ± 1,0	-3,2 ± 0,8	-2,2 ± 0,5	-1,5 ± 1,0	-2,8 ± 0,6	-1,8 ± 1,1	-1,6 ± 1,3
FXR_82	-2,1	-2,1 ± 1,1	-2,6 ± 0,6	-2,3 ± 1,2	-2,1 ± 0,9	-1,7 ± 0,9	-1,2 ± 0,1	-1,5 ± 0,9	-2,1 ± 0,5
FXR_83	-1,7	-2,9 ± 0,7	-2,8 ± 0,4	-2,4 ± 0,3	-2,1 ± 0,8	-3,1 ± 0,6	-1,8 ± 0,3	-1,4 ± 1,6	-2,1 ± 0,3
FXR_84	-0,1	-0,5 ± 0,9	-0,7 ± 0,4	-1,1 ± 0,8	-0,9 ± 0,5	-1,0 ± 0,3	-0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,5	-0,2 ± 0,3
FXR_85	-1,8	-0,6 ± 0,8	-1,6 ± 0,9	-2,9 ± 0,8	-1,4 ± 0,4	-0,9 ± 1,0	-1,7 ± 0,8	-1,5 ± 0,7	-1,9 ± 0,5
FXR_88	-1,4	-1,8 ± 1,1	-3,2 ± 0,7	-3,6 ± 1,1	-1,8 ± 0,7	-1,0 ± 0,4	-2,2 ± 1,4	-1,6 ± 0,7	-0,8 ± 1,1
FXR_89	-1,2	0,5 ± 0,2	-0,9 ± 0,8	-2,3 ± 0,4	-1,2 ± 0,5	-2,0 ± 0,5	-1,7 ± 0,3	-0,9 ± 0,7	-1,4 ± 0,2

^a: média das predições para o ligante **FXR_79** obtidas utilizando 24 janelas de λ (**Tabela 5**).

Em relação às predições médias para o ligante **FXR_79** (Tabela 6), inicialmente aplicamos 12 janelas de λ (Tabela 4) para todas as perturbações. As predições de RFEB do ligante **FXR_79**, entretanto, apresentaram altos erros, com média de $3,9 \pm 3,6$ kcal/mol, e desvios padrão, com média de $8,8 \pm 5,7$ kcal/mol, considerando todos os campos de força. Conforme o mapa de perturbações, a predição de energia relativa do ligante **FXR_79** em relação à molécula de referência **FXR_10** é obtida diretamente pela perturbação **FXR_10**→**FXR_79**. Ocorre que esta perturbação requer a modificação da posição de um carboxilato ligado a um anel benzênico, modificando, pois, a posição de uma carga localizada (Figura 17). Esta modificação da posição da carga pode levar a um aumento da diferença de energia entre as janelas adjacentes da perturbação, consequentemente reduzindo a sobreposição entre estas e causando problemas de convergência. Nós testamos esta hipótese expandindo o número de janelas de λ utilizadas para representar a transformação **FXR_10**→**FXR_79** de 12 para 24 (Tabela 5) utilizando todos os campos de força estudados na presença e ausência da REST2. Uma abordagem similar foi aplicada por Chen e colaboradores (2018) estudando protocolos para cálculos de FEP envolvendo perturbações da carga total do sistema e perturbação da posição da carga em pequenas moléculas (CHEN et al., 2018). É interessante observar que a mesma perturbação **FXR_10**→**FXR_79** foi simulada por Olsson e colaboradores utilizando o programa Amber14 e Amber16 e o campo de força Amberff14SB/GAFF com cargas RESP (OLSSON; GARCÍA-SOSA; RYDE, 2018). Os autores utilizaram 23 janelas de λ observaram um erro de $3,0 \pm 0,1$ kcal/mol nesta perturbação, acima da RMSEc geral de $1,46 \pm 0,20$ (ver também Tabela 10).

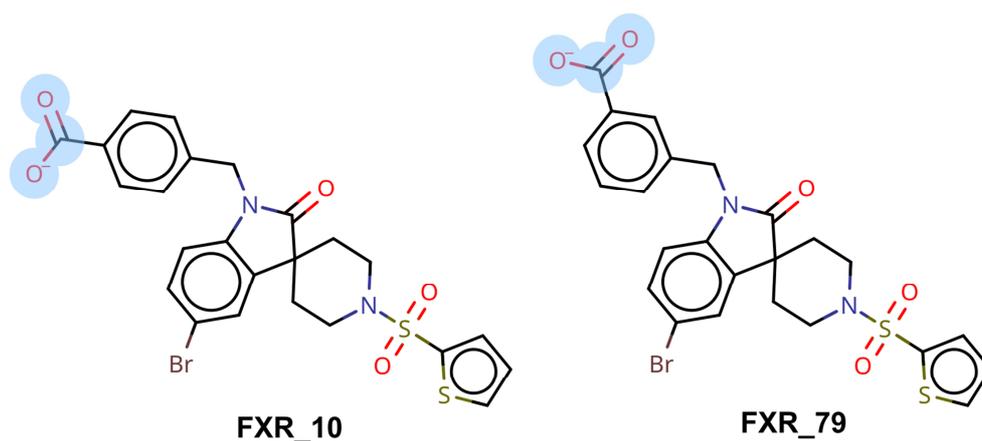


Figura 17 - Esquema da perturbação **FXR_10**→**FXR_79**. Átomos perturbados ressaltados em azul.

Comparando os resultados das predições médias da RFEB do ligante **FXR_79** utilizando 12 e 24 janelas de λ , observa-se uma redução no erro médio absoluto de $3,8 \pm 3,8$ kcal/mol para $2,4 \pm 1,4$

kcal/mol e no desvio padrão médio de $8,8 \pm 5,7$ kcal/mol para $2,1 \pm 1,8$ kcal/mol. O erro e desvio padrão médio com 24 janelas foi influenciado pela predição média para o composto **FXR_79** obtida utilizando o campo de força OPLS-AA/M/LigParGen, que teve um erro absoluto de 4,7 kcal/mol e desvio padrão de 6,4 kcal/mol. Analisando as predições individuais de cada réplica, observou-se que o erro absoluto médio foi reduzido de $11,12 \pm 8,87$ kcal/mol para $2,30 \pm 2,37$ kcal/mol utilizando 24 janelas, uma diferença estatisticamente significativa para a média e para a variância (p-valor do teste T de Welch = 0,0001 para igualdade da média; p-valor do teste Levene = 0,0002 para igualdade das variâncias). Estes resultados mostram a superioridade dos resultados utilizando 24 janelas de λ .

Adicionalmente, o valor médio de $\Delta\Delta G$ predito para o ligante **FXR_79** por todas as réplicas de todos os campos de força foi de $1,91 \pm 13,96$ kcal/mol utilizando 12 janelas de λ e $-0,38 \pm 3,51$ kcal/mol utilizando 24 janelas. Enquanto a variação no desvio padrão é estatisticamente significativa (p-valor do teste Levene = 0,0002 para igualdade das variâncias), a variação na média não é (p-valor do teste T de Welch = 0,4528 para igualdade da média). Isto sugere que, possivelmente, as predições utilizando 12 janelas de λ não sofrem de erro sistemático em comparação às predições com 24 janelas de λ , mas sim amostram uma população de predições centrada no mesmo valor, porém com uma variância muito maior. Isto é compatível com a hipótese de problemas de amostragem da perturbação utilizando 12 janelas.

Finalmente, para avaliar a sobreposição entre estados adjacentes nas perturbações **FXR_10**→**FXR_79**, nós avaliamos a matriz de sobreposição de estados (**Figura 18**). Tais matrizes foram geradas utilizando o PyAutoFEP e a biblioteca pymbar (SHIRTS; CHODERA, 2008). A matriz de sobreposição obtida para a réplica 1 utilizando o campo de força Amber03/GAFF ser REST2 com 12 janelas de lambda (**Figura 18A**) mostra pouca sobreposição entre estados adjacentes. Klimovich e colaboradores, por exemplo, sugerem que idealmente todos os elementos das sub e superdiagonais devem ser maiores ou iguais a 0,03 (KLIMOVICH; SHIRTS; MOBLEY, 2015). A utilização de 24 janelas melhora consideravelmente a sobreposição entre estados adjacentes (**Figura 18B**). Entretanto, a análise de outras matrizes de sobreposição, como por exemplo a da perturbação **FXR_10**→**FXR_76** também mostrou um padrão de pouca sobreposição entre estados adjacentes (**Figura 18C**). Assim, não está claro que os resultados substancialmente piores da perturbação **FXR_10**→**FXR_79** utilizando 12 janelas de λ se deveram a este efeito.

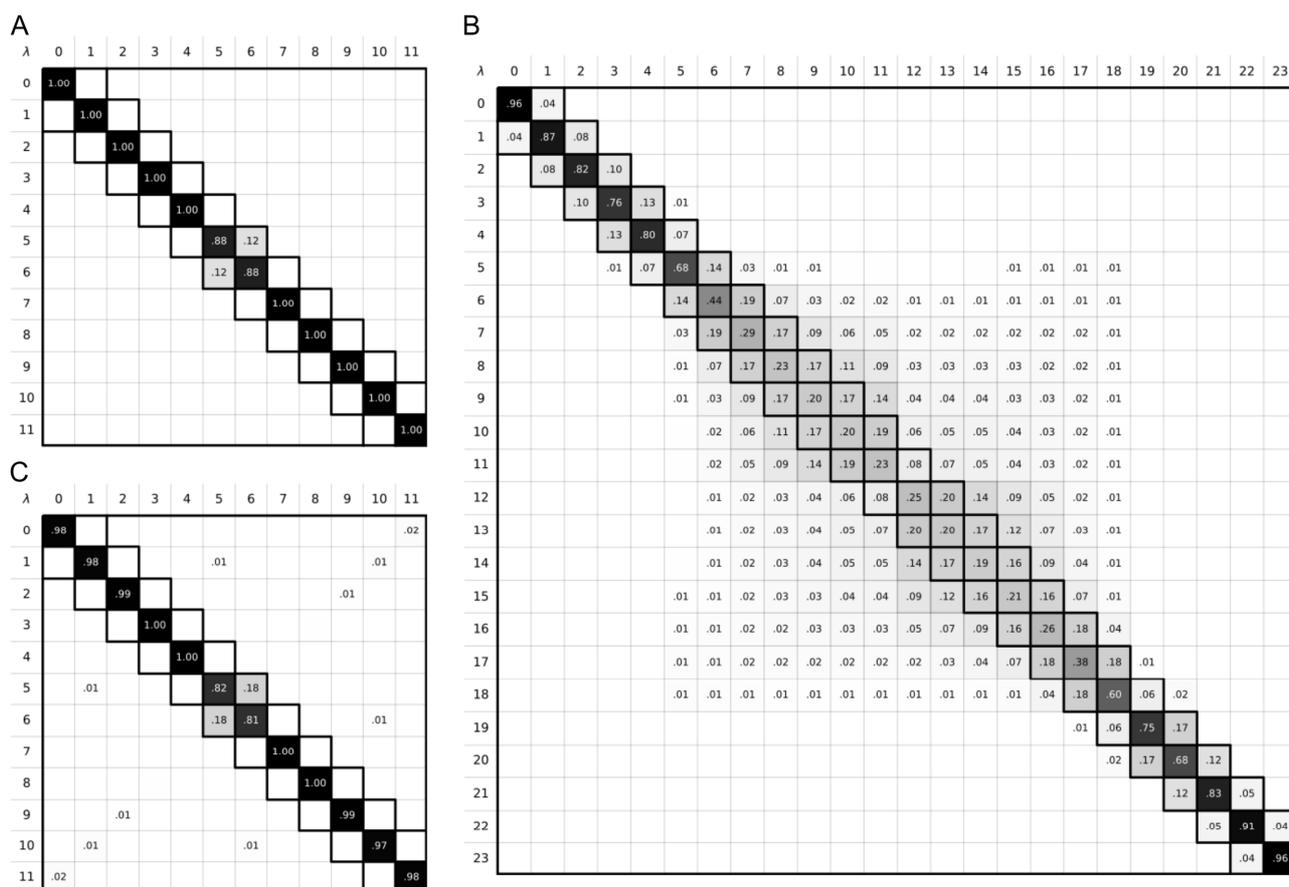


Figura 18 - Matrizes de sobreposição de estados vindas do estimador Multistep Bennet Acceptance Ratio. (A) Matriz de sobreposição da perturbação **FXR_10**→**FXR_79** utilizando 12 janelas de λ e o campo de força Amber03/GAFF, sem REST2. (B) Matriz de sobreposição da perturbação **FXR_10**→**FXR_79** utilizando 24 janelas de λ e o campo de força Amber03/GAFF, sem REST2. (C) Matriz de sobreposição da perturbação **FXR_10**→**FXR_76** utilizando 12 janelas de λ e o campo de força Amber03/GAFF, sem REST2.

Motivados pelos resultados superiores da predição **FXR_10**→**FXR_79** utilizando 24 janelas de λ , foi executada uma réplica utilizando o campo de força Amber03/GAFF e 24 janelas de λ para todas as perturbações (**Tabela 7**). Estes resultados mostraram valores de correlação (τ de Kendall $0,45 \pm 0,18$ e $0,66 \pm 0,17$ e r de Pearson de $0,47 \pm 0,12$ e $0,66 \pm 0,05$, respectivamente) similares aos das médias das réplicas que utilizaram 24 janelas para a perturbação **FXR_10**→**FXR_79** e 12 janelas para todas as outras. Um padrão similar foi observado em relação aos erros: foram observados RMSEc e Erro Absoluto Médio de $1,09 \pm 0,20$ kcal/mol e $0,94 \pm 0,72$ kcal/mol, respectivamente, utilizando 24 janelas para todas as perturbações, similar às médias utilizando 24 janelas apenas para a perturbação **FXR_10**→**FXR_79** $1,16 \pm 0,01$ kcal/mol e $1,06 \pm 0,67$ kcal/mol. Estes dados indicam que a aplicação de 24 janelas de λ para todas as perturbações não se traduziu em uma melhora, como foi observado

para a perturbação **FXR_10**→**FXR_79**. Assim, todos os resultados discutidos em sequência utilizam 24 janelas de λ apenas para a perturbação **FXR_10**→**FXR_79** e 12 janelas para todas as outras.

Tabela 7 - Resultados individuais das réplicas utilizando o campo de força Amber03/GAFF sem REST2 utilizando 12 e 24 janelas de λ para todas as perturbações, exceto **FXR_10**→**FXR_79**.

Campo de força	Janelas de λ	Réplica	τ de Kendall ^b	r de Spearman ^b	r de Pearson ^b	RMSE ^c (kcal/mol) ^b	Erro médio \pm desvio padrão (kcal/mol)	Erro absoluto médio \pm desvio padrão (kcal/mol)
Amber03/GAFF	12	1	0,52 \pm 0,14	0,70 \pm 0,16	0,67 \pm 0,13	1,15 \pm 0,16	0,20 \pm 1,20	1,05 \pm 0,61
	12	2	0,56 \pm 0,12	0,74 \pm 0,13	0,69 \pm 0,11	1,17 \pm 0,19	-0,18 \pm 1,21	1,04 \pm 0,64
	12	3	0,34 \pm 0,16	0,56 \pm 0,20	0,61 \pm 0,16	1,16 \pm 0,22	0,62 \pm 1,19	1,11 \pm 0,75
	12	<i>Média</i> ^a	0,47 \pm 0,12	0,67 \pm 0,10	0,66 \pm 0,05	1,16 \pm 0,01	0,21 \pm 1,24	1,06 \pm 0,67 ^d
	24	1	0,45 \pm 0,18	0,66 \pm 0,20	0,66 \pm 0,17	1,09 \pm 0,20	0,32 \pm 1,17	0,94 \pm 0,72

^a: média entre as três réplicas \pm desvio padrão. ^b: valores calculados utilizando script disponibilizado junto ao desafio GC2.

^c: Erros calculados como $\Delta\Delta G_{\text{exp}} - \Delta\Delta G_{\text{calc}}$, médias calculadas utilizando erros individuais das predições de cada réplica. ^d:

Erro absoluto médio das predições individuais de cada réplica.

Além de ser capaz de capturar as tendências de afinidade experimentais, é desejável que cálculos para estimar RFEB sejam reprodutíveis. De uma forma geral, pode-se racionalizar as estimativas de RFEB obtidas por cálculos como um processo de amostragem aleatória de valores de uma população teórica, que idealmente segue uma distribuição normal, com uma certa média e um certo desvio padrão. Uma distribuição normal de erros é muito relevante para a utilidade de uma técnica de avaliação de energia livre para otimização de protótipos e uma distribuição gaussiana é mais efetiva (ABEL et al., 2018). Utilizando os dados da **Tabela 6**, foi analisada a distribuição dos erros dos $\Delta\Delta G$ médios preditos em relação aos $\Delta\Delta G$ experimentais obtidos com todos os campos de força, com ou sem REST2. Observou-se que estes erros (N=104) seguem uma distribuição normal com média $0,32 \pm 1,38$ kcal/mol (**Figura 19A**).

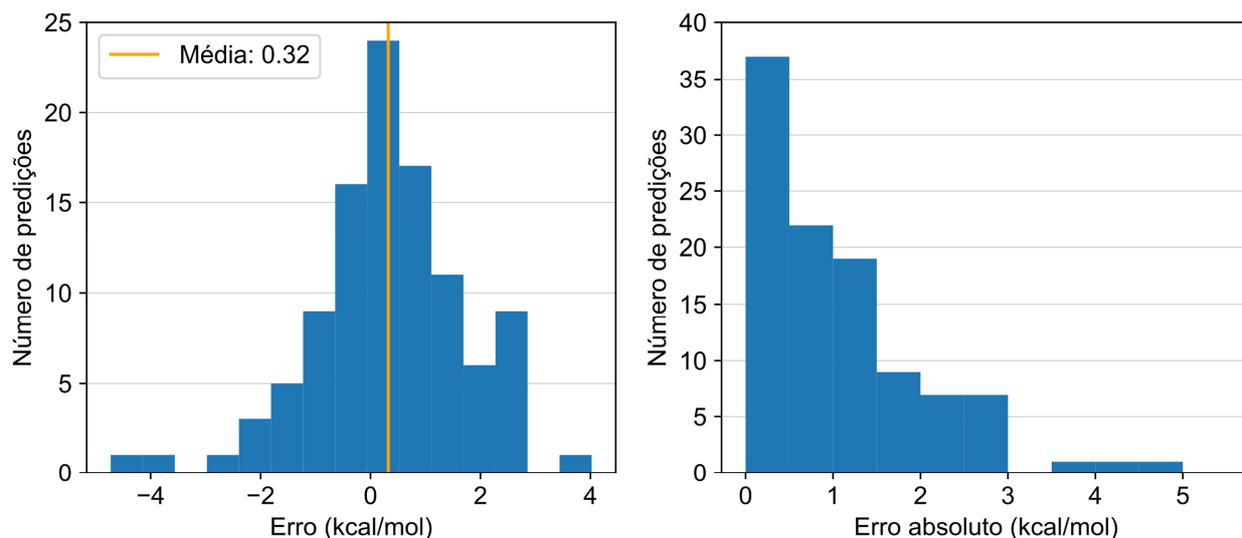


Figura 19 - Distribuição de erros das predições médias, dados como $\Delta\Delta G_{\text{exp}} - \Delta\Delta G_{\text{calc}}$, em relação ao ligante **FXR_10**, obtidos com todos os campos de força e com ou sem REST2.

Adicionalmente, em relação à distribuição, observa-se que não se pode rejeitar a hipótese de que a distribuição dos erros siga uma distribuição normal (p -valor do teste de Shapiro-Wilk = 0,0643), assim como não é possível rejeitar que a distribuição seja centrada em 0,0 kcal/mol (p -valor do teste T para um grupo = 0,0200). Uma distribuição normal de erros, centrada em 0,0 kcal/mol, ou seja, centrada no verdadeiro valor da RFEB experimental é condizente com os resultados de Wang e colaboradores no artigo que introduziu o FEP+ (WANG et al., 2015) e observou uma distribuição normal, centrada em 0,0 kcal/mol e com desvio padrão de 1,14 kcal/mol para 337 perturbações em diferentes 8 alvos. Os valores obtidos neste trabalho apresentaram um desvio padrão maior (1,38 kcal/mol), porém essa diferença não é estatisticamente significativa (p -valor do teste de χ^2 para a variância = 0,0968). Isto sugere que estes resultados são comparáveis aos obtidos por Wang e colaboradores. Analisando a distribuição de erros absolutos das predições (**Figura 19B**), observa-se que 59 (57%) das predições apresentaram erros menores do que 1,0 kcal/mol, 78 (75%) menores do que 1,5 kcal/mol e 87 (84%), erros menores do que 2,0 kcal/mol. Isto mostra que a maioria das predições teve baixos erros, comparáveis às distribuições de absolutos apresentados por Schindler e colaboradores no contexto de aplicações industriais de FEP, quais sejam, 1,43 kcal/mol e 1,61 kcal/mol (SCHINDLER et al., 2020).

Para avaliar a precisão e acurácia das predições em relação às afinidades experimentais, foi utilizado o *script* de avaliação do desafio GC2. Esta ferramenta calcula as métricas de correlação τ de Kendall ((**Equação 23**), r de Spearman e Pearson, e de a métrica de erro RMSEc ((**Equação 24**) e utiliza um método de *bootstrap* para estimar o erro associado a cada uma dessas estatísticas. Esta análise mostra

que resultados obtidos utilizando os campos de força Amber03/GAFF com cargas AM1-BCC e OPLS-AA/M/LigParGen com cargas CM1A mostraram boa reprodução das energias de Gibbs experimentais (**Tabela 8, Figura 20**). A medida de correlação r de Spearman foi de $0,77 \pm 0,13$, $0,19 \pm 0,31$ e $0,71 \pm 0,13$ para os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, enquanto que os valores de r de Pearson foram de $0,71 \pm 0,13$, $0,30 \pm 0,27$ e $0,66 \pm 0,20$, respectivamente. A correlação medida pelo τ de Kendall, que mede o correto ordenamento de todos os possíveis pares de valores, foi de $0,59 \pm 0,12$, $0,07 \pm 0,23$ e $0,50 \pm 0,19$.

A predição correta do sinal da RFEB é especialmente interessante em contextos de otimização de uma molécula protótipo, uma vez que, frequentemente a informação mais relevante do ponto de vista da química medicinal é sobre se uma certa modificação na estrutura química do protótipo aumenta (ou seja, produz um $\Delta\Delta G < 0$) ou reduz a afinidade (ou seja, produz um $\Delta\Delta G > 0$). Considerando a proporção de sinais corretamente preditos (**Tabela 8**), também observável no número de pontos nos primeiros e terceiros quadrantes (**Figura 20**), os resultados com todos os campos de força foram de alta qualidade, especialmente o CHARMM36m/CGenFF e o OPLS-AA/M/LigParGen. Interessante observar que a aplicação da técnica de amostragem estendida REST2 aumentou o número de predições com sinal correto para todos os campos de força.

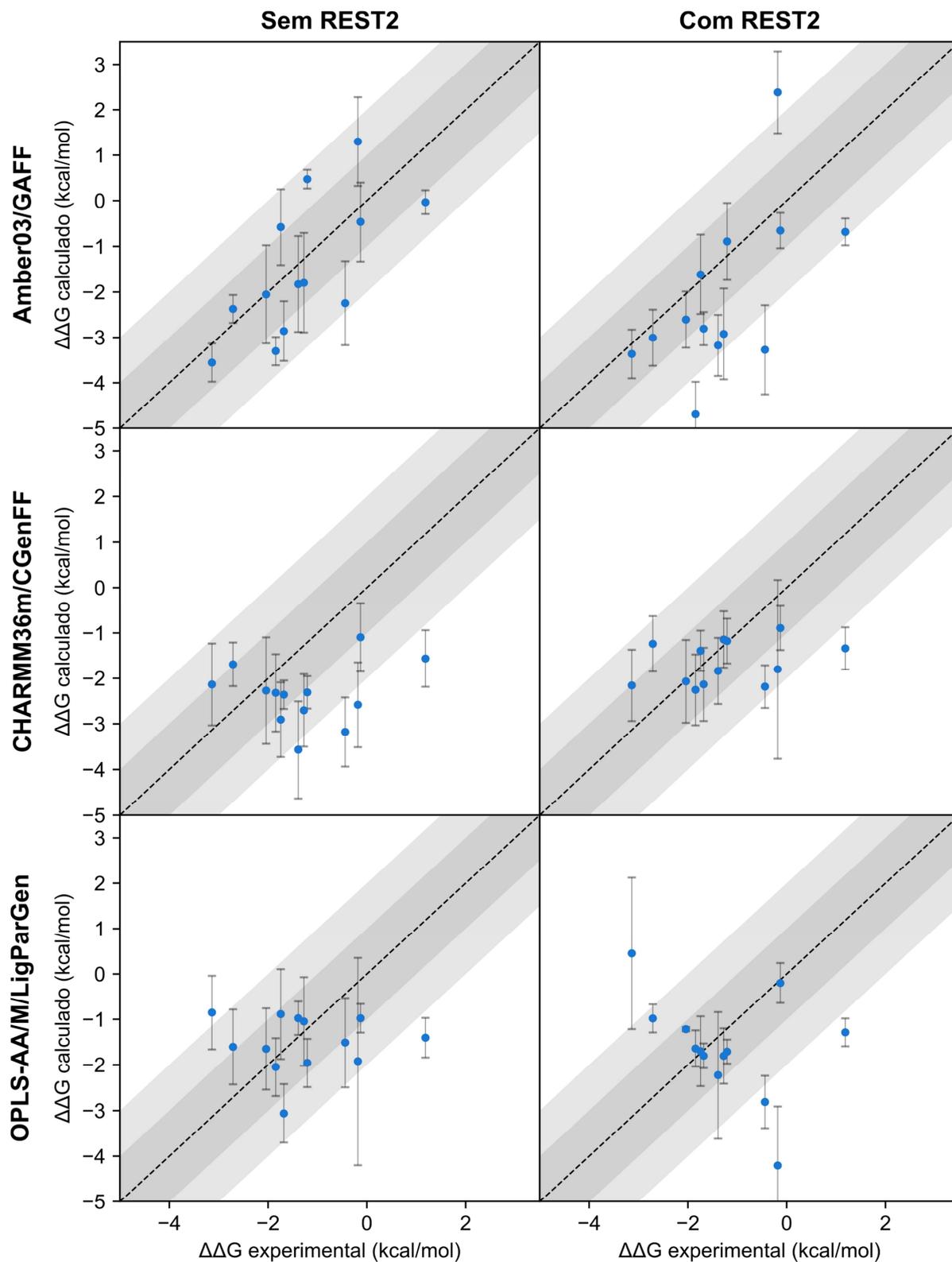


Figura 20 - Correlação entre energias de Gibbs experimentais e energias de Gibbs médias previstas em relação ao ligante **FXR_10** utilizando os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen. A região cinza clara delimita a região de erro de 2 kcal/mol, a região cinza escura, a região de erro de 1 kcal/mol. A linha preta tracejada marca a correlação teórica $Y = X$.

Tabela 8 - Dados estatísticos das predições médias obtidas com os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, com ou sem aplicação da técnica de amostragem estendida REST2.

Campo de força	REST2	τ de Kendall ^a	r de Spearman ^a	r de Pearson ^a	RMSEc (kcal/mol) ^a	Erro médio absoluto ± Desvio padrão (kcal/mol)	Predições com sinal correto
Amber03 GAFF	Não	0,59 ± 0,12	0,77 ± 0,13	0,71 ± 0,13	1,03 ± 0,17	0,86 ± 0,62	77%
	Sim	0,49 ± 0,15	0,69 ± 0,17	0,63 ± 0,12	1,37 ± 0,12	1,21 ± 1,05	85%
CHARMM36m CGenFF	Não	0,07 ± 0,23	0,19 ± 0,31	0,30 ± 0,27	1,20 ± 0,19	1,31 ± 0,90	85%
	Sim	0,38 ± 0,19	0,51 ± 0,23	0,43 ± 0,21	1,03 ± 0,19	0,78 ± 0,78	92%
OPLS-AA/M LigParGen	Não	0,50 ± 0,19	0,65 ± 0,22	0,66 ± 0,20	0,86 ± 0,17	0,68 ± 0,57	85%
	Sim	0,49 ± 0,15	0,70 ± 0,18	0,52 ± 0,14	1,46 ± 0,44	0,91 ± 1,25	100%

^a: valores calculados utilizando script disponibilizado junto ao desafio GC2.

Para os campos de força Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen, os altos r de Spearman indicam uma correlação monotônica entre os dados calculados e experimentais, e, adicionalmente, os altos r de Pearson indicam uma correlação linear (**Tabela 8**). O τ de Kendall, também utilizado para avaliar correlações monotônicas, é uma medida que não assume normalidade dos dados e pode ser aplicada em conjuntos de dados pequenos, onde o r de Spearman pode não ser confiável. Os τ de Kendall observados foram de $0,59 \pm 0,12$, $0,07 \pm 0,23$ e $0,50 \pm 0,19$ para os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, respectivamente. Analisando combinadamente os valores destas três medidas de correlação, pode-se afirmar que ambos os campos de força Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen foram capazes de capturar a tendência dos dados experimentais, enquanto os resultados utilizando o CHARMM36m/CGenFF apresentaram correlação inferior.

Em relação aos erros em relação aos dados experimentais, calculou-se o RMSEc, uma medida do erro médio, corrigido para desvios sistemáticos. Valores de $1,03 \pm 0,17$ kcal/mol, $1,20 \pm 0,19$ kcal/mol e $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol foram observados para o Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, respectivamente. Estes valores indicam baixos erros, especialmente para o campo de força OPLS-AA/M/LigParGen (RMSEc = $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol). Isto também pode ser observado na dispersão dos pontos ao longo do eixo Y na **Figura 20**, já que a maior parte dos pontos estão próximos da linha diagonal $Y = X$. Seguindo a mesma tendência, o erro médio absoluto foi de $0,86 \pm 0,62$ kcal/mol, $1,31 \pm 0,90$ kcal/mol e $0,68 \pm 0,57$ kcal/mol, para os mesmos campos de força, respectivamente. É interessante observar que, embora as estatísticas de correlação obtidas com o campo de força Amber03/GAFF tenham sido levemente superiores àquelas obtidas com o OPLS-AA/M/LigParGen, as medidas de erro deste último foram levemente melhores. Finalmente, observa-se que, 11 das 13 predições (85%) obtidas utilizando o os campos de força CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen e 10 de 13 predições (77%) utilizando o Amber03/GAFF tiveram seus sinais corretamente preditos.

A aplicação da técnica de amostragem estendida REST2 afetou em pequena extensão os resultados utilizando os campos de força Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen, aumentando levemente os erros em relação aos valores experimentais, medidos pelo RMSEc de $1,03 \pm 0,17$ kcal/mol para $1,37 \pm 0,12$ kcal/mol para o primeiro e de $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol para $1,46 \pm 0,44$ kcal/mol para o segundo. A mesma tendência foi captada pela MAE, com um aumento de $0,86 \pm 0,62$ kcal/mol para $1,21 \pm 1,05$ kcal/mol para o Amber03/GAFF e de $0,68 \pm 0,57$ para $0,91 \pm 1,25$ para o OPLS-AA/M/LigParGen. Os efeitos nas estatísticas de correlação em relação aos dados experimentais foram também pouco pronunciados, porém, diferentes tendências foram observadas (**Tabela 8**), com discretos aumentos de valores, como para o r de Spearman para o campo de força OPLS-AA/M/LigParGen, que foi de $0,65 \pm 0,22$ para $0,70 \pm 0,18$ com a aplicação de REST2, ou pequena redução, como para o τ de Kendall observado com o campo de força Amber03/GAFF, que foi de $0,59 \pm 0,12$ para $0,49 \pm 0,15$.

A aplicação da REST2, por outro lado, melhorou de forma consistente os resultados com o campo de força CHARMM36m/CGenFF (**Tabela 8**). Todas as medidas de correlação com dados experimentais, τ de Kendall e o r de Spearman e Pearson, aumentaram, de $0,07 \pm 0,23$, $0,19 \pm 0,31$ e $0,30 \pm 0,27$, para $0,38 \pm 0,19$, $0,51 \pm 0,23$ e $0,43 \pm 0,21$, respectivamente. Ao mesmo tempo, os erros em relação aos dados experimentais foram levemente reduzidos de um RMSEc de $1,20 \pm 0,19$ para $1,03 \pm 0,19$. Em relação à MAE, foi observada uma redução de $1,31 \pm 0,90$ kcal/mol sem REST2 para $0,78 \pm 0,78$

kcal/mol com REST2, embora esta redução não tenha sido estatisticamente significativa (p-valor do teste T de Welch = 0,1296 para igualdade da média). O número de predições com sinal correto se manteve em 92%, ou seja, 12 das 13 predições tiveram sinal correto com ou sem REST2.

Dois campos de força derivados do CHARMM36 foram estudados, especificamente o CHARMM36-YF e CHARMM36-WYF. O campo de força CHARMM36-YF/CGenFF teve resultados similares aos do campo de força CHARMM36m/CGenFF (**Tabela 9**), como, por exemplo, τ de Kendall e RMSEc de $0,07 \pm 0,23$ e $1,20 \pm 0,19$ kcal/mol contra $0,05 \pm 0,20$ e $1,23 \pm 0,22$ kcal/mol para o CHARMM36m/CGenFF. Mesmo a diminuição do r de Pearson, de $0,30 \pm 0,27$ com o CHARMM36-YF para $0,16 \pm 0,23$ com o CHARMM36m, pode não ser significativo, dado os erros associados. Por outro lado, a modificação CHARMM36-WYF levou a uma degradação dos resultados, com piora de todas as estatísticas de correlação, que passaram a ser negativas (τ de Kendall de $-0,27 \pm 0,25$ e r de Spearman e Pearson de $-0,21 \pm 0,33$ e $-0,24 \pm 0,31$, respectivamente), e um aumento nos erros, medidos pelo RMSEc, de $1,20 \pm 0,19$ kcal/mol com o CHARMM36m para $1,79 \pm 0,38$ kcal/mol com o CHARMM36-WYF.

Tabela 9 - Dados estatísticos das predições médias obtidas com variantes do campo de força CHARMM36: CHARMM36m/CGenFF, CHARMM36-YF/CGenFF e CHARMM36-WYF/CGenFF.

Campo de força	τ de Kendall ^a	r de Spearman ^a	r de Pearson ^a	RMSEc (kcal/mol) ^a	Erro médio absoluto \pm desvio padrão (kcal/mol)	Predições com sinal correto
CHARMM36m/CGenFF	$0,07 \pm 0,23$	$0,19 \pm 0,31$	$0,30 \pm 0,27$	$1,20 \pm 0,19$	$1,01 \pm 1,24$	85%
CHARMM36-YF/CGenFF	$0,05 \pm 0,20$	$0,13 \pm 0,27$	$0,16 \pm 0,23$	$1,23 \pm 0,22$	$0,99 \pm 0,78$	92%
CHARMM36-WYF/CGenFF	$-0,27 \pm 0,25$	$-0,21 \pm 0,33$	$-0,24 \pm 0,31$	$1,79 \pm 0,38$	$1,24 \pm 1,37$	85%

^a: valores calculados utilizando *script* disponibilizado junto ao desafio GC2.

A utilização de um sistema modelo alvo de um desafio de comunidade para predição de RFEB permite, além de comparar os resultados com dados experimentais de qualidade, compará-los também com outros métodos de predição. Comparando os resultados obtidos com o PyAutoFEP aos resultados das submissões originais ao desafio GC2 (**Tabela 10**), observa-se que os resultados obtidos com o

Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen foram comparáveis às melhores submissões originais. Especificamente, classificando pelo erro em relação aos dados experimentais dado pelo valor de RMSEc, os resultados utilizando o OPLS-AA/M/LigParGen teriam sido os primeiros colocados (RMSEc = $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol), enquanto que os resultados utilizando o Amber03/GAFF teriam sido os segundos (RMSEc = $1,03 \pm 0,17$ kcal/mol), superados somente pela submissão código xk67c, que utilizou *Jarzinsky umbrella sampling* e não FEP. Classificando os resultados pela correlação com os dados experimentais, medido pelo τ de Kendall, os resultados com Amber03/GAFF seriam classificadas em segundo, superados pela submissão xk67c, e os resultados com OPLS-AA/M/LigParGen dividiriam a terceiro posição com a submissão x2j7p, que utilizou o programa FEP+.

Tabela 10 - Dados das submissões originais ao *Grand Challenge 2* extraídos do *site* do consórcio *Drug Discovery Data* e adaptados

Código da submissão	Investigador principal / responsável pela submissão	Número de ligantes	τ de Kendall	RMSEc (kcal/mol)	Protocolo	Lista de programas utilizados
xk67c	Steve Jones / Oleksandr Yakovenko	18	$0,62 \pm 0,12$	$0,94 \pm 0,12$	Jarzinsky umbrella sampling, fset0	Jarzinsky umbrella sampling
81n55		18	$0,55 \pm 0,12$	$1,31 \pm 0,20$	free energy perturbation with Schrodinger fep/rest	Schrodinger r-FEP
jzrt5	Julien Michel / Julien Michel	18	$0,37 \pm 0,14$	$1,45 \pm 0,23$	alchemical free energy protocol with average network analysis and mixed scaling of partial charges	FESetup, NetworkX
adx8	Ulf Ryde, Alfonso Garcia-Sosa / Martin Olsson	18	$0,48 \pm 0,13$	$1,46 \pm 0,20$	amber pmemd free energy perturbation with charge correction	Amber
x2j7p	Zoe Cournia / Christina Athanasiou	18	$0,50 \pm 0,10$	$1,49 \pm 0,19$	Free energy perturbation calculations	Schrodinger r-FEP
izhdb	Charles L. Brooks III / Xinqiang Ding	18	$0,28 \pm 0,17$	$1,61 \pm 0,28$	multi site lambda dynamics	CHARMM
qt771	Julien Michel / Julien Michel	18	$-0,14 \pm 0,20$	$4,11 \pm 0,74$	alchemical free energy protocol with average network analysis	FESetup, NetworkX
2ytv8	Bogdan Iorga / Bogdan Iorga	18	$-0,15 \pm 0,23$	$4,37 \pm 1,35$	Alchemical Free Energy Calculation	GROMACS

Duas submissões utilizaram o programa FEP+, da Schrödinger, possivelmente o sistema de automação mais utilizado para cálculos de FEP. As submissões 81n55 e x2j7p obtiveram τ de Kendall e RMSEc de $0,55 \pm 0,12$ e $1,31 \pm 0,20$ kcal/mol e $0,50 \pm 0,10$ e $1,49 \pm 0,19$ kcal/mol, respectivamente. Estes valores são similares aos obtidos com o campo de força Amber03/GAFF (τ de Kendall = $0,59 \pm 0,12$ e RMSEc

= $1,03 \pm 0,17$ kcal/mol) e OPLS-AA/M/LigParGen (τ de Kendall = $0,50 \pm 0,19$ e RMSEc = $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol).

Estatísticas de correlação e erros em relação aos dados experimentais medidos pelo RMSEc foram também calculados para as predições individuais de cada réplica (**Tabela 11**). Observou-se que as médias das correlações são similares, embora ligeiramente inferiores, àquelas obtidas utilizando os $\Delta\Delta G$ médios entre as três réplicas (**Tabela 8**). Por exemplo, os r de Pearson médios para as réplicas utilizando os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, todos sem REST2, foram de $0,66 \pm 0,05$, $0,24 \pm 0,26$ e $0,51 \pm 0,09$, comparáveis aos valores obtidos utilizando os $\Delta\Delta G$ médios das três réplicas, $0,71 \pm 0,13$, $0,30 \pm 0,27$ e $0,66 \pm 0,20$, respectivamente. O mesmo padrão foi observado para os erros em relação aos dados experimentais, por exemplo, os RMSEc médios para as réplicas observados para o Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, sem REST2, foram de $1,16 \pm 0,01$ kcal/mol, $1,31 \pm 0,25$ kcal/mol e $1,12 \pm 0,14$ kcal/mol, enquanto os RMSEc obtidos com os $\Delta\Delta G$ médios das três réplicas foram de $1,03 \pm 0,17$ kcal/mol, $1,20 \pm 0,19$ kcal/mol e $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol, respectivamente.

Tabela 11 - Dados estatísticos das predições obtidas por réplicas individuais obtidas com os campos de força Amber03/GAFF, CHARMM36m/CGenFF e OPLS-AA/M/LigParGen, com ou sem aplicação da técnica de amostragem estendida REST2. (continua)

Campo de força	REST2	Réplica	τ de Kendall ^b	r de Spearman ^b	r de Pearson ^b	RMSEc (kcal/mol) ^b	Erro médio ^c \pm desvio padrão (kcal/mol)	Erro absoluto médio \pm desvio padrão (kcal/mol)	
Amber03/GAFF	No	1	0,52 \pm 0,14	0,70 \pm 0,16	0,67 \pm 0,13	1,15 \pm 0,16	0,20 \pm 1,20	1,05 \pm 0,61	
		2	0,56 \pm 0,12	0,74 \pm 0,13	0,69 \pm 0,11	1,17 \pm 0,19	-0,18 \pm 1,21	1,04 \pm 0,64	
		3	0,34 \pm 0,16	0,56 \pm 0,20	0,61 \pm 0,16	1,16 \pm 0,22	0,62 \pm 1,19	1,11 \pm 0,75	
		<i>Média^a</i>	0,47 \pm 0,12	0,67 \pm 0,10	0,66 \pm 0,05	1,16 \pm 0,01	0,21 \pm 1,24	1,06 \pm 0,67 ^d	
	Yes	1	0,30 \pm 0,18	0,50 \pm 0,23	0,53 \pm 0,17	1,52 \pm 0,25	1,03 \pm 1,55	1,49 \pm 1,12	
		2	0,47 \pm 0,14	0,66 \pm 0,16	0,60 \pm 0,12	1,54 \pm 0,36	0,45 \pm 1,60	1,28 \pm 1,06	
		3	0,65 \pm 0,12	0,82 \pm 0,12	0,68 \pm 0,10	1,29 \pm 0,30	0,99 \pm 1,31	1,43 \pm 0,82	
		<i>Média^a</i>	0,47 \pm 0,18	0,66 \pm 0,16	0,61 \pm 0,08	1,45 \pm 0,14	0,83 \pm 1,52	1,40 \pm 1,01 ^d	
	CHARMM36m /CGenFF	No	1	-0,01 \pm 0,25	0,00 \pm 0,32	-0,01 \pm 0,30	1,58 \pm 0,30	1,22 \pm 1,60	1,77 \pm 0,96
			2	0,10 \pm 0,23	0,24 \pm 0,31	0,23 \pm 0,30	1,29 \pm 0,25	0,56 \pm 1,33	1,13 \pm 0,90
3			0,41 \pm 0,18	0,60 \pm 0,22	0,52 \pm 0,18	1,07 \pm 0,17	1,43 \pm 1,04	1,52 \pm 0,90	
<i>Média^a</i>			0,16 \pm 0,22	0,28 \pm 0,30	0,24 \pm 0,26	1,31 \pm 0,25	1,07 \pm 1,39	1,47 \pm 0,96 ^d	
Yes		1	0,36 \pm 0,19	0,45 \pm 0,24	0,38 \pm 0,21	1,13 \pm 0,23	0,30 \pm 1,16	0,92 \pm 0,77	
		2	0,12 \pm 0,23	0,20 \pm 0,30	0,26 \pm 0,29	1,20 \pm 0,22	0,38 \pm 1,24	1,00 \pm 0,82	
		3	0,32 \pm 0,20	0,44 \pm 0,25	0,38 \pm 0,26	1,28 \pm 0,22	0,57 \pm 1,32	1,18 \pm 0,82	
		<i>Média^a</i>	0,27 \pm 0,13	0,37 \pm 0,14	0,34 \pm 0,07	1,20 \pm 0,08	0,41 \pm 1,25	1,03 \pm 0,81 ^d	

Campo de força	REST2	Réplica	τ de Kendall ^b	r de Spearman ^b	r de Pearson ^b	RMSEc (kcal/mol) ^b	Erro médio ^c \pm desvio padrão (kcal/mol)	Erro absoluto médio \pm desvio padrão (kcal/mol)
CHARMM36-YF/CGenFF	No	1	0,14 \pm 0,22	0,26 \pm 0,29	0,26 \pm 0,29	1,37 \pm 0,34	0,18 \pm 1,42	1,06 \pm 0,96
		2	0,10 \pm 0,19	0,23 \pm 0,26	-0,02 \pm 0,26	1,53 \pm 0,34	0,52 \pm 1,62	1,39 \pm 0,98
		3	-0,12 \pm 0,23	-0,16 \pm 0,31	-0,15 \pm 0,3	1,57 \pm 0,32	-0,10 \pm 1,59	1,27 \pm 0,95
		<i>Média^a</i>	0,04 \pm 0,14	0,11 \pm 0,24	0,03 \pm 0,21	1,49 \pm 0,11	0,20 \pm 1,56	1,24 \pm 0,97 ^d
CHARMM36-WYF/CGenFF	No	1	-0,05 \pm 0,23	-0,01 \pm 0,31	-0,28 \pm 0,31	1,97 \pm 0,49	-0,11 \pm 1,85	1,31 \pm 1,31
		2	-0,19 \pm 0,25	-0,17 \pm 0,32	-0,34 \pm 0,33	1,90 \pm 0,52	0,02 \pm 1,84	1,21 \pm 1,39
		3	-0,05 \pm 0,25	0,06 \pm 0,33	-0,08 \pm 0,29	1,82 \pm 0,34	0,54 \pm 1,56	1,39 \pm 0,88
		<i>Média^a</i>	-0,10 \pm 0,08	-0,04 \pm 0,12	-0,23 \pm 0,13	1,90 \pm 0,07	0,15 \pm 1,78	1,30 \pm 1,22 ^d
OPLS-AA/M/LigParGen	No	1	0,41 \pm 0,19	0,55 \pm 0,23	0,50 \pm 0,22	1,18 \pm 0,23	0,50 \pm 1,21	1,02 \pm 0,83
		2	0,27 \pm 0,24	0,47 \pm 0,29	0,43 \pm 0,28	1,21 \pm 0,26	-0,22 \pm 1,25	0,92 \pm 0,88
		3	0,41 \pm 0,16	0,59 \pm 0,20	0,60 \pm 0,18	0,96 \pm 0,16	-0,72 \pm 0,98	0,98 \pm 0,72
		<i>Média^a</i>	0,36 \pm 0,08	0,54 \pm 0,06	0,51 \pm 0,09	1,12 \pm 0,14	-0,15 \pm 1,26	0,97 \pm 0,81 ^d
OPLS-AA/M/LigParGen	Yes	1	0,65 \pm 0,17	0,75 \pm 0,19	0,71 \pm 0,17	0,92 \pm 0,20	0,50 \pm 0,94	0,78 \pm 0,73
		2	0,41 \pm 0,17	0,57 \pm 0,23	0,34 \pm 0,18	3,21 \pm 1,41	-1,15 \pm 3,32	1,68 \pm 3,08
		3	0,52 \pm 0,16	0,70 \pm 0,19	0,59 \pm 0,15	0,99 \pm 0,18	-0,50 \pm 1,01	0,79 \pm 0,81
		<i>Média^a</i>	0,52 \pm 0,12	0,67 \pm 0,09	0,55 \pm 0,19	1,71 \pm 1,30	-0,39 \pm 2,18	1,08 \pm 1,94 ^d

^a: média entre as três réplicas \pm desvio padrão. ^b: valores calculados utilizando script disponibilizado junto ao desafio GC2. ^c: Erros calculados como $\Delta\Delta G_{\text{exp}} - \Delta\Delta G_{\text{calc}}$, médias calculadas utilizando erros individuais das predições de cada réplica. ^d: Erro absoluto médio das predições individuais de cada réplica.

Observaram-se adicionalmente baixos desvios padrão entre as métricas de correlação das três réplicas.

Os desvios variaram entre 0,08, 0,06 e 0,09 utilizando o campo de força OPLS-AA/M/LigParGen e

0,22, 0,30 e 0,26 utilizando o campo de força CHARMM36m/CGenFF, ambos sem REST2. Um valor maior de RMSEc foi observado utilizando o campo de força OPLS-AA/M/LigParGen e a técnica de amostragem estendida REST2, de 1,30 kcal/mol. Este foi influenciado pelo alto RMSEc da réplica número 2 ($3,21 \pm 1,41$ kcal/mol), comparativamente maior do os RMSEc das outras réplicas utilizando o OPLS-AA/M/LigParGen com REST2, de $0,92 \pm 0,20$ kcal/mol e $0,99 \pm 0,18$ kcal/mol. Esta réplica foi a que apresentou também o maior erro em relação aos dados experimentais entre todas as réplicas, de todos os campos de força, com ou sem REST2, com RMSEc de $3,21 \pm 1,41$ kcal/mol e MAE de $1,68 \pm 3,08$ kcal/mol.

Partindo-se do fato de que foram utilizadas três réplicas de cada predição, estudou-se a reprodutibilidade dos cálculos com o PyAutoFEP. Inicialmente, observando as correlações calculadas com as predições individuais (**Tabela 11**), observa-se que os desvios padrão associados às correlações médias foi baixo. Por exemplo, os desvios padrão dos τ de Kendall variaram de 0,08 a 0,22, com média de $0,13 \pm 0,04$, e os dos r de Pearson variaram de 0,05 a 0,26, com média de $0,14 \pm 0,07$, o que sugere que houve uma pequena dispersão entre as correlações das diferentes réplicas. Isto também é verdade para os erros, afora a réplica 2 do campo de força OPLS-AA/M/LigParGen que apresentou um RMSEc de $3,21 \pm 1,41$ kcal/mol. Sem esse *outlier*, os desvios padrão dos RMSEc variaram entre 0,01 kcal/mol e 0,25 kcal/mol, com média $0,11 \pm 0,07$ kcal/mol, o que também indica uma baixa dispersão. Estes resultados sugerem uma boa reprodutibilidade entre as réplicas. Adicionalmente, o desvio padrão médio de todas as predições, com ou sem REST2 (N=104) foi de 0,80 kcal/mol, sendo que 84 (81%) dos desvios foram menores do que 1,0 kcal/mol e 98 (94%), menores do que 1,5 kcal/mol, o que também indica alta precisão entre as réplicas. Comparando as estatísticas de correlação e erros cálculos utilizando a predição média dos $\Delta\Delta G$ (**Tabela 8**) às médias das estatísticas de correlação e erro das réplicas (

Tabela 11), observa-se uma leve melhora com a utilização das médias dos $\Delta\Delta G$. Isto sugere que o aumento da amostragem de 10 ns em cada réplica para 3 x 10 ns utilizando os $\Delta\Delta G$ médios melhora as predições, porém em extensão limitada.

Para avaliar o possível efeito do uso de uma ferramenta como o PyAutoFEP em uma campanha de otimização de um protótipo em um contexto de descoberta de fármacos, aplicou-se uma simulação estatística proposta por Shirts e colaboradores (SHIRTS; MOBLEY; BROWN, 2010). Esta simulação se baseia nos dados reportados por Hajduk and Sauer analisando dados experimentais de mais de 84 mil compostos sintetizados como parte de esforços de otimização contra 30 diferentes alvos na farmacêutica Abbot (HAJDUK; SAUER, 2008). A análise destes dados mostra que (a) a afinidade relativa de um composto análogo em relação a um protótipo segue uma distribuição normal com média 0,0 kcal/mol (ou seja, centrada na afinidade do protótipo) e desvio padrão de 1,02 kcal/mol. Isto significa que a seleção de análogos por químicos medicinais gera compostos mais ou menos potentes aproximadamente com a mesma probabilidade, o que mostra um grande potencial de uma técnica que possa subsidiar esta seleção. Utilizando estes dados, Shirts e colaboradores sugeriram uma simulação estatística que simula a utilização de uma ferramenta que seleciona o melhor entre N análogos de um protótipo hipotético (SHIRTS; MOBLEY; BROWN, 2010). Tal ferramenta tem um certo erro associado com distribuição normal e desvio padrão σ e é utilizado para ordenar os possíveis análogos por potência calculada, sendo que um análogo mais potente por 1 unidade de pK_i (1,4 kcal/mol) é buscado. Esta simulação foi executada 1.000.000 de vezes e as probabilidades associadas, estimadas.

Os resultados mostram que, ao se triarem 10 análogos, uma ferramenta com o mesmo desvio padrão observado para o PyAutoFEP ($\sigma = 1,35$ kcal/mol), a probabilidade p de encontrar um análogo 1 pK_i mais potente é de 30%, o que representa um aumento de cerca de 4x em relação a uma seleção aleatória ($p = 8\%$) (**Figura 21**). Neste caso, mesmo um método teórico livre de erros – ou seja, um método que permitisse saber com precisão absoluta a potência experimental de cada análogo – traria uma probabilidade de 59% de encontrar um análogo com o referido aumento de potência (**Figura 21A**). Isto ocorre porque em uma amostra de 10 análogos, em 41% dos casos não há nenhum mais potente do que o protótipo ao menos 1 pK_i , logo 59% é o valor máximo para probabilidade com $N = 10$. O efeito de uma técnica preditiva é potencializado ao se triarem mais análogos ($N = 100$), o que eleva a probabilidade de encontrar um análogo mais potente por 1 pK_i para 57% quando uma técnica com σ igual ao do PyAutoFEP é aplicada (**Figura 21B**), um aumento de cerca de 7 vezes em relação à seleção aleatória. A necessidade de triar mais compostos foi reportada por Schindler e colaboradores, que

sugerem triar ao menos 50-100 possíveis moléculas, e no geral, triar entre 5 e 10 vezes do que se pretende testar experimentalmente (SCHINDLER et al., 2020). Isto também foi sugerido no trabalho de Abel e colaboradores, analisando efeitos dos desvios padrão e distribuições de erros de técnicas de predição de energia livre (ABEL et al., 2018). Os resultados dessa simulação estatística sugerem que uma ferramenta como o PyAutoFEP pode ser útil na otimização de um ou mais protótipos.

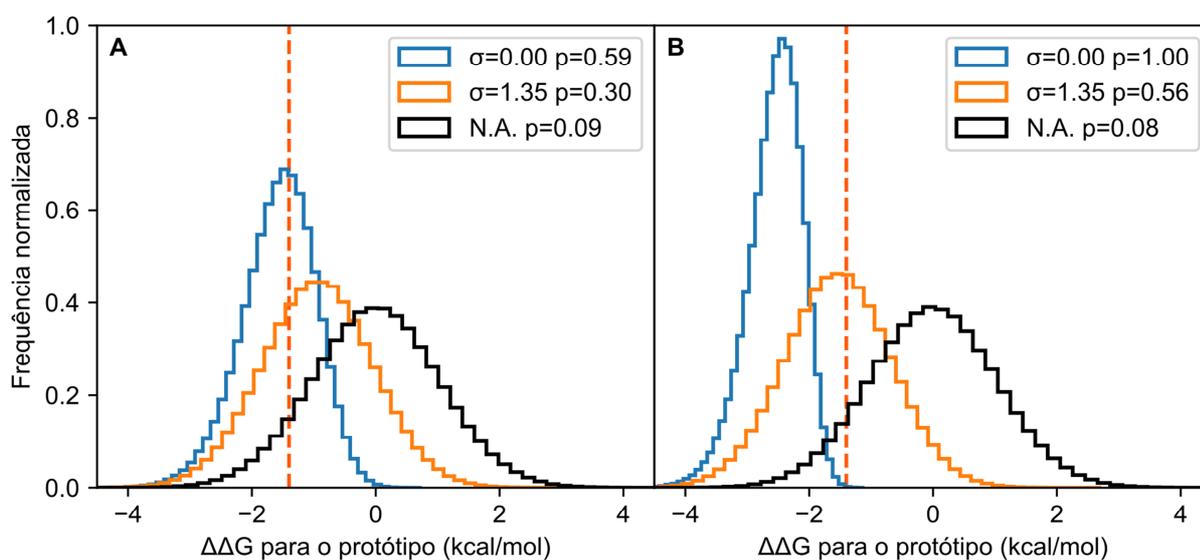


Figura 21 - Resultados da simulação estatística avaliando o efeito de métodos de triagem sobre uma campanha de otimização hipotética triando $N=10$ (a) e $N=100$ (b). A distribuição preta representa o $\Delta\Delta G$ relativo de análogos selecionados aleatoriamente. A distribuição azul representa o $\Delta\Delta G$ relativo de análogos selecionados por um método teórico perfeito, com desvio padrão nulo. A distribuição laranja representa o $\Delta\Delta G$ relativo de análogos selecionados por um método com desvio padrão de 1,35 kcal/mol.

5 DISCUSSÃO

A aplicação da FEP para otimização de protótipos está bem estabelecida. Para que uma ferramenta seja capaz de acelerar este tipo de campanha, é necessário que ela combine automatização do processo, velocidade de cálculos, precisão e acurácia. Neste projeto de doutorado, reportamos o desenvolvimento de uma nova ferramenta para automatizar cálculos de FEP, o PyAutoFEP. O PyAutoFEP é um programa de código aberto, que auxilia em todo o processo de cálculos de RFEB e integra técnicas de amostragem estendida. Utilizando o programa PyAutoFEP, foram executados cálculos de FEP utilizando cinco campos de força e utilizando ou não a técnica de amostragem estendida REST2. Algumas tendências gerais aos dados foram observadas, como a alta taxa de predição de sinais corretos com todos os campos de força, os baixos erros em relação às afinidades experimentais e as altas correlações com os campos de força Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen. Finalmente, a distribuição normal dos erros, com um desvio padrão comparável ao descrito na literatura para o FEP+ mostra que implementações de FEP aplicando programas de código aberto podem ser capazes atingir níveis de precisão e acurácia similar às implementação no estado da arte. Esta última observação é condizente com as observações de Gapsys e colaboradores, que utilizaram a ferramenta de automação para cálculos de TI (GAPSYS et al., 2020). É interessante observar que, mesmo que o PyAutoFEP permita grande grau de controle sobre a preparação dos cálculos, as opções padrão de simulação aplicadas neste trabalho tiveram boa performance, o que é mais um indicativo que usuários não especialistas podem se beneficiar deste programa.

Os cálculos de RFEB de ligantes da série spiro do Farnesóide X utilizaram como referência a molécula **FXR_10**, foi cocristalizado com o receptor Farnesóide X, de forma que uma pose experimentalmente determinada foi utilizada como referência para as simulações. Isto é especialmente relevante, já que a pose dos ligantes é de condição crítica para uma boa reprodução das energias de Gibbs relativas no contexto de cálculos de RFEB (MATRICON et al., 2017; SCHINDLER et al., 2020). Considerando as perturbações relativamente pequenas (**Figura 16**) em relação ao tamanho das moléculas e a relativa rigidez estrutural da série, é provável que a pose adotada pelos análogos seja similar àquela do ligante **FXR_10**. O ligante **FXR_12**, por exemplo, foi cocristalizado no escopo do desafio de comunidade GC2 (PDBID 5Q0W (GAIEB et al., 2018, p. 2)), se ligando ao receptor com uma pose similar ao **FXR_10**. Uma vez que perturbações relativamente pequenas foram realizadas, o algoritmo de sobreposição estrutural foi utilizado para gerar poses iniciais, o que simplificou ainda mais a preparação. É importante ressaltar que esta estratégia só é factível em séries onde as transformações são

pequenas e rígidas e o modo de ligação da região transformada é muito conservado. Isto ocorre porque o algoritmo de sobreposição molecular implementado no PyAutoFEP seleciona confôrmeros baseado, exclusivamente, na similaridade das formas em relação à molécula de referência, sem utilizar nenhuma informação sobre o receptor biomolecular. Assim, se houverem grupos grandes ou flexíveis na região perturbada haverá uma influência relevante das interações com o receptor para o modo de ligação destes ligantes, de forma que a drástica aproximação de utilizar somente a forma do ligante de referência não é mais aceitável. Em um caso assim, idealmente, uma ancoragem molecular utilizando restrições de posição derivadas do núcleo comum das moléculas, dito *core-constrained docking*, seria a alternativa ideal. Schindler e colaboradores, por exemplo, relatam terem aplicado o *core-constrained docking*, utilizando o programa Glide, para preparação de poses iniciais para cálculos com o FEP+ (SCHINDLER et al., 2020). Neste trabalho, os autores reportam que após testes iniciais utilizando alinhamento flexível ao ligante de referência (ou seja, um método similar ao que aplicamos aqui), o *core-constrained docking* se mostrou capaz de gerar poses melhores. Em um trabalho comparando o efeito de diferentes métodos de geração de poses para aplicação de FEP, Cappel e colaboradores propõe um workflow otimizado para gerar poses utilizando *core-constrained docking* iterativo e demonstram a performance superior desta nova implementação sobre o algoritmo clássico de *core-constrained docking* (CAPPEL et al., 2020). Interessantemente, os autores também testaram um alinhamento baseado somente na pose do ligante de referência – similar ao que executamos no presente trabalho – e observaram bons resultados. Finalmente, o *core-constrained docking* não está presente em alguns dos programas de ancoragem molecular amplamente utilizados, como o Autodock4 (MORRIS et al., 2009), Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010) (embora existam alternativas indiretas (KADUKOVA; CHUPIN; GRUDININ, 2020)) e DOCK3.7 (COLEMAN et al., 2013).

Considerando, em conjunto, o número de átomos perturbados, a existência de uma pose experimental e a relativa rigidez da série, espera-se que seja possível obter boas predições de RFEB para a série utilizando métodos de energia de Gibbs relativa. Em geral, a complexidade das perturbações cresce com o número de átomos perturbados, e na série spiro aplicada neste trabalho a maior parte das perturbações envolveu halogênios ou grupos pequenos sendo perturbados em um anel aromático. A maior perturbação, **FXR_10**→**FXR_76**, envolve o desaparecimento de 5 átomos pesados (grupo tiofenil) e o aparecimento de 6 (grupo fenil), e foi aquela onde mais campos de força predisseram incorretamente o sinal. Outros grupos relatando o uso de FEP também discutiram o impacto do número de átomos na qualidade das predições. Por exemplo, Jaspers e colaboradores, trabalhando com a ferramenta de automação QLigFEP propõe que transformações que envolvam mais de seis átomos

pesados podem apresentar problemas de convergência (JESPERS et al., 2019). Wang e colaboradores, no trabalho que introduziu o FEP+, afirmam que a metodologia apresentada por eles é robusta para transformações de até 10 átomos pesados (WANG et al., 2015). Os desenvolvedores do FEP+ reafirmam em um trabalho mais recente que ainda que a metodologia tenha se mostrado robusta para perturbações de até 10 átomos pesados, perturbações maiores são rotineiramente simuladas com o FEP+ e um RMSE na faixa de 1 kcal/mol é tipicamente observado (ABEL et al., 2017). Isto sugere que em séries onde a similaridade estrutural é menor, especialmente em relação ao tamanho dos grupos fora do núcleo comum, as metodologias atuais de FEP podem não ser factíveis. Em casos mais extremos, pode não haver núcleos comuns grandes o suficiente – ou mesmo nenhum núcleo em comum – de forma que, além de uma convergência muito lenta, poderá haver problemas de reorganização do sítio de ligação ou modos de ligação dissimilares. Neste caso, técnicas que estimam a afinidade absoluta da ligação, ou seja, o ΔG e não o $\Delta\Delta G$ podem ser mais indicadas. Isto é um problema, por exemplo, nas etapas muito iniciais da otimização de protótipos, onde grandes modificações em qualquer dos grupos da molécula podem ser potencialmente interessantes – e não há informação de Relação Estrutura Atividade disponível.

Perturbações que afetam o posicionamento de uma carga localizada e, especialmente, a carga total de um sistema são sabidamente desafiadoras, assim como observamos para a perturbação **FXR_10**→**FXR_79**. Em relação ao primeiro caso, a carga total do sistema é igual nos dois estados A e B, enquanto um grupo carregado muda de posição ou é transformado em outro grupo carregado. Assim, nas janelas intermediárias onde os termos de Coulomb dos átomos das topologias A e B são nulos (**Figura 14** e **Figura 15**), haverá uma carga total não nula no sistema. No segundo caso, uma carga é adicionada ou removida, de forma que pode haver, em um dos estados finais, uma carga total do sistema não nula. Poucos autores, entretanto, discutiram particularidades de perturbações afetando o posicionamento de cargas, possivelmente porque a maior fonte de artefatos de simulação em perturbação que envolvam a carga do sistema é a presença de um soluto não neutro, de forma que a perturbação da carga total é mais desafiadora. Assim, há diversos estudos sobre métodos aplicáveis em perturbações da carga total. Chen e colaboradores estudaram três tipos de métodos que podem ser aplicados em transformações que perturbam a carga (CHEN et al., 2018). Os autores observaram que métodos utilizando íons alquímicos – ou seja, um íon especial que tem a carga alterada para contrabalancear a mudança de carga do sistema – são mais amplamente utilizáveis que métodos que estimam a uma correção para a variação de carga após a simulação. Adicionalmente, aplicando estas correções e 24 janelas de λ os autores observaram bons resultados das predições, com RMSE entre 0,99

e 1,05 kcal/mol para os diferentes métodos. O mesmo grupo também utilizou pequenas moléculas se ligando a receptores artificiais para comparar métodos que utilizam íons alquímicos, amostragem direta da dissociação (com Umbrella Sampling), e métodos de correção após a trajetória (ÖHLKNECHT et al., 2020). Interessantemente, os autores observam que nem íons alquímicos nem amostragem da dissociação é capaz de anular os artefatos da simulação e recomendam o uso de métodos de correção à *posteriori*. Atualmente, o PyAutoFEP não é capaz de realizar simulações onde haja perturbação de carga total nem utilizando íons alquímicos, nem aplicando correções à *posteriori*. Por este motivo trabalhamos apenas com os ligantes da série spiro com carga -1 conservada, enquanto que as submissões originais trabalharam com os 18 ligantes. Olsson e colaboradores, por exemplo, o fizeram aplicando uma correção após a simulação que utiliza as equações de Poisson–Boltzmann (OLSSON; GARCÍA-SOSA; RYDE, 2018). Schindler e colaboradores modelaram todos os ligantes da série spiro como moléculas neutras, ou seja, todos os ácidos carboxílicos (**Figura 16**) foram assumidos como protonados nas simulações (SCHINDLER; RIPPMANN; KUHN, 2018). É interessante observar que Schindler e colaboradores reportam terem avaliado os resultados somente dos 14 ligantes ionizáveis, quando modelados em seu estado neutro, e observaram uma variação de somente 0,1 kcal/mol na RMSE (SCHINDLER; RIPPMANN; KUHN, 2018). Embora fosse permitido submeter predições para parte do conjunto de ligantes, o fato de que não executamos predições para toda a série pode limitar a comparação com os dados das submissões originais. Ainda assim, resta claro que observamos baixos erros e altas correlações.

A performance superior dos campos de força Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen quando comparados ao campo de força CHARMM36m/CGenFF é consistente com resultados previamente reportados na literatura (JESPERS et al., 2019; ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2016) e, possivelmente podem ser causados por viés na parametrização. Diferente do Amber03/GAFF e do OPLS-AA/M/LigParGen, o CHARMM36m/CGenFF possui termos para interações de halogênio utilizando uma carga pontual adicionada à átomos de flúor, bromo e iodo ligados à anéis aromáticos (SOTERAS GUTIÉRREZ et al., 2016; VANOMMESLAEGHE et al., 2010), o que poderia ter levado a resultados de maior qualidade, considerando a presença de aril-halogênios em moléculas da série spiro (**Figura 16**). Outros estudos compararam o CGenFF com outros campos de força para pequenas moléculas no escopo de cálculos de RFEB. Jaspers e colaboradores compararam o OPLS-AA/M, Amber ff14S/GAFF e CHAMM36/CGenFF para cálculos de FEP utilizando o programa Q e a ferramenta de automação QLigFEP (JESPERS et al., 2019). Um MAE de 1,54 kcal/mol foi observada com o CHARMM36/CGenFF, contra 1,11 kcal/mol utilizando o Amber ff14SB/GAFF. O

CHARMM36/CGenFF também teve performance inferior aos campos de força OPLS-AA/M/OPLS/CM5 e OPLS-AA/M/OPLS/CM1A, mas superior ao OPLS-AA//OPLS/CM1A, em um estudo que utilizou FEP para comparar a RFEB de dois nucleotídeos de flavina que se ligam a flavoxidina (ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2016). O CGenFF foi parametrizado para reproduzir cargas de Merz-Kollman obtidas com o método *ab initio* MP2/6-31G(d), e refinadas para reproduzir a distância e a entalpia de ligação com moléculas de água (VANOMMESLAEGHE et al., 2010). É possível que esta abordagem capture melhor a interação de pequenas moléculas orgânicas com água e líquidos puros, ambos utilizados extensivamente durante a parametrização do CGenFF, do que interações entre estas pequenas moléculas com receptores biomoleculares. Um viés na parametrização pode ser a causa da performance relativamente mais baixa do CGenFF neste e em outros trabalhos.

Um trabalho recente estudando energias de Gibbs de solvatação para avaliar campos de força pode também ser coerente com esta hipótese. Kashefolgheta e colaboradores observaram que as energias de solvatação obtidas com o CHARMM/CGenFF para a N,N-dimetilacetamida em 22 diferentes solventes teve o maior erro em relação aos dados experimentais (RMSE = 2,75 kcal/mol) (KASHEFOLGHETA et al., 2020). Este erro é substancialmente maior do que a média dos RMSE dos 22 compostos utilizando o CHARMM/CGenFF, $0,74 \pm 0,61$ kcal/mol e maior do que a média dos RMSE utilizando todos os campos de força (GROMOS-2016H66, OPLS-AA, AMBER/GAFF e CHARMM/CGenFF), de $0,71 \pm 0,40$ kcal/mol. Um grande erro nas energias de solvatação de uma amida pode sugerir problemas nos parâmetros deste grupo químico, que pode também afetar átomos da cadeia principal em proteínas. Desta forma, é possível que parâmetros dos átomos da cadeia principal de proteínas seja responsável pela performance do CHARMM36m neste trabalho.

Intrigados pelos resultados obtidos utilizando o campo de força CHARMM36m/CGenFF, estudamos duas variantes do CHARMM36m recentemente introduzidas: o CHARMM36-YF e o CHARMM36-WYF. O CHARMM36-YF refina parâmetros de Lennard-Jones para resíduos de fenilalanina e tirosina para reproduzir a superfície de energia potencial de interações cátion- π obtidas com cálculos *ab initio* com SAPT2+/aug-cc-pVDZ (KHAN et al., 2016). O CHARMM36-WYF estende a mesma ideia e metodologia de refinamento para triptofanos (KHAN; MACKERELL; REUTER, 2019). Embora nenhuma interação cátion- π com a carga positiva no ligante seja possível entre os ligante da série spiro e o FXR, é possível que os parâmetros modificados de LJ dos resíduos aromáticos do sítio de ligação Fen333, Tir365 e Trp473 (**Figura 22**) afetassem a interação dos ligantes. Adicionalmente, uma melhor

representação da interação cátion- π entre Arg335 e Tir264 na região do sítio de ligação poderia afetar a dinâmica do complexo, afetando a RFEB estimada. Entretanto, nossos resultados com o CHARMM36-YF/CGenFF e CHARMM36-WYF/CGenFF não mostraram uma melhor correlação em relação aos dados experimentais (**Tabela 9**), o que sugere que os parâmetros refinados de LJ podem não melhorar ou mesmo levar a uma degradação da modelo das interações proteína-ligante das variantes do CHARMM36 quando interações cátion- π não estão diretamente envolvidas. Adicionalmente, as variantes -YF e -WYF diferem exclusivamente pelos parâmetros da proteína – parâmetros dos ligantes e solvente são idênticos. Isto é coerente com a hipótese de que parametrização da proteína pode ser parcialmente responsável pela performance observada.

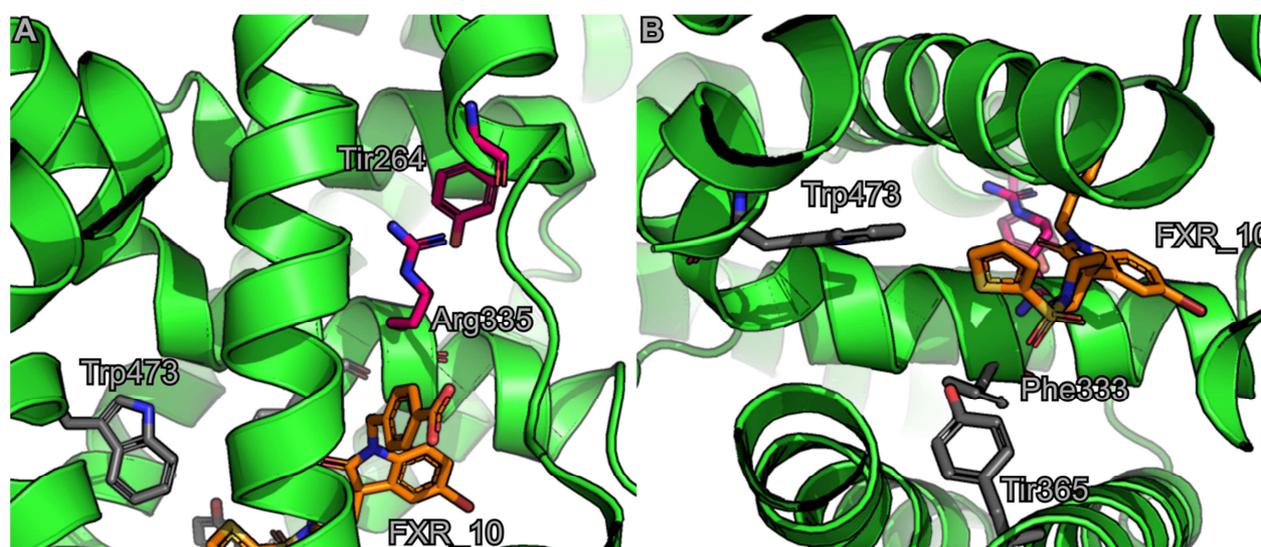


Figura 22 - Resíduos próximos do sítio de ligação afetados pelos parâmetros refinados de Lennard-Jones das variantes CHARMM36-YF e CHARMM36-WYF do CHARMM36. Estrutura da proteína em *cartoon* verde, ligante cristalográfico **FXR_10** com carbonos em laranja. (A) Tir264 e Arg335, com carbonos em rosa, resíduos entre os quais é possível haver interação cátion- π . (B) Phe333, Tir365 e Trp473, com átomos de carbonos em cinza, resíduos aromáticos próximos ao ligante cristalográfico.

Resultados reportados desta mesma série utilizando o programa FEP+ e simulações de 5ns, 10ns e 20ns não mostraram melhora no RMSD ou no τ de Kendall, o que sugere que um aumento da amostragem do espaço conformacional não melhora de forma relevante os resultados (SCHINDLER; RIPPMANN; KUHN, 2018). Em certa extensão, isto também é condizente com a melhora discreta observada com a utilização das médias das predições (

Tabela 11) em relação às médias das previsões individuais (**Tabela 8**). A série spiro do FXR é particularmente rígida e as transformações simuladas são pequenas, de forma que o aumento de amostragem conformacional, tanto via prolongamento das simulações quanto pela REST2 pode não ter impacto relevante na qualidade das simulações. A REST2 é especialmente útil quando barreiras relevantes na hipersuperfície de energia de Gibbs impedem amostragem de conformações biologicamente relevantes (WANG; FRIESNER; BERNE, 2011), o que, aparentemente, não é o caso no sistema estudado. Isto sugere que a utilidade da REST2 é fortemente dependente do sistema no qual ela é aplicada. Especificamente para o campo de força CHARMM36m/CGenFF, mais estudos serão necessários para avaliar a interação as janelas de λ , a região escalonada (todo o ligante) e a constante de escalonamento (0,5) e seu efeito sobre as previsões. De toda forma, a possibilidade de aplicar técnicas de amostragem estendida para acelerar a convergência de cálculos de FEP é de grande utilidade, já que, frequentemente, limitações na amostragem são a fonte mais relevante de erros nas previsões. A integração destas técnicas ao PyAutoFEP pode permitir atacar problemas mais complexos em termos do número de átomos, movimentos do ligante e reorganização do sítio ativo. Até onde sabemos, o PyAutoFEP é a única ferramenta que integra este tipo de técnica, além do próprio FEP+.

Mais do que comparar campos de força de biomoléculas, nossos resultados permitem comparar métodos de parametrização de pequenas moléculas orgânicas, possivelmente uma das áreas mais intensamente investigadas para a otimização das previsões de RFEB. O programa FEP+, por exemplo, utiliza o campo de força OPLS3e (ROOS et al., 2019) e o código de DM Desmond (BOWERS et al., 2006; WANG et al., 2015). O campo de força OPLS3e é derivado proprietário do OPLS, com refinamentos para melhorar a reprodutibilidade de energias torcionais em nível *ab initio* e cargas pontuais especificamente para pequenas moléculas com o intuito de melhor representar o espaço químico de interesse em química medicinal (ROOS et al., 2019). Embora haja considerável diferença nos parâmetros dos ligantes em relação àqueles do servidor LigParGen, os cálculos utilizando OPLS-AA/M/LigParGen utilizam um campo de força com a mesma origem daquele empregado no FEP+. É interessante observar que os resultados com este campo de força apresentaram os menores erros (RMSEc = $0,86 \pm 0,17$ kcal/mol, MAE = $0,68 \pm 0,57$ kcal/mol) entre todos os utilizados neste estudo, e, inclusive menores do que os reportados para as submissões 81n55 (RMSEc = $1,31 \pm 0,20$ kcal/mol) e x2j7p (RMSEc = $1,49 \pm 0,19$ kcal/mol). O constante aperfeiçoamento de parâmetros e métodos de parametrização para pequenas moléculas no escopo do desenvolvimento dos cálculos de RFEB sugerem que futuros usuários do PyAutoFEP devem ser especialmente cautelosos quanto aos parâmetros das pequenas moléculas orgânicas.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, reportamos o desenvolvimento do PyAutoFEP, uma ferramenta de automação de cálculos de FEP utilizando o programa GROMACS. Embora outras ferramentas de automação existam, acreditamos que o PyAutoFEP seja de interesse para a comunidade por ser um programa: de código aberto; capaz de automatizar desde a geração dos mapas de perturbação até a análise dos resultados; que aplica um programa de DM altamente eficiente e amplamente utilizado; suporta múltiplos campos de força; e integra métodos de amostragem estendida. O PyAutoFEP busca ser o mais flexível quanto possível, de forma que o usuário tem total controle sobre todo o processo. Ao mesmo tempo, as opções padrão apresentaram bons resultados no sistema modelo.

Como teste de implementação do PyAutoFEP, o aplicamos para a predição de RFEB de uma série de ligantes do FXR, apresentados como parte do desafio para a comunidade Grand Challenge 2, organizado pelo grupo Drug Design Data Resources. Três campos de força, Amber03/GAFF, OPLS-AA/M/LigParGen e CHARMM36m/CGenFF foram avaliados e comparados com e sem a aplicação da técnica de amostragem estendida REST2. Todos os campos de força apresentaram baixos erros, especialmente o campo de força OPLS-AA/M/LigParGen. Boas correlações foram observadas com os campos de força Amber03/GAFF e OPLS-AA/M/LigParGen, e correlações mais baixas com o CHARMM36m/CGenFF. A aplicação da técnica de amostragem estendida REST2 melhorou os resultados observados com o CHARMM36m/CGenFF, embora efeitos discretos tenham sido observados para os outros campos de força. Duas variantes do CHARMM36 com termos de LJ otimizados para reproduzir energias de interação cátion- π , CHARMM36-YF e CHARMM36-WYF, não apresentaram resultados melhores do que o CHARMM36m. De uma forma geral, o programa PyAutoFEP foi capaz de produzir resultados de alta qualidade para a série spiro de ligantes do FXR. Estes resultados foram comparáveis às melhores submissões originais ao desafio GC2, que originou este conjunto de dados. Adicionalmente, os resultados do PyAutoFEP foram reprodutíveis entre as réplicas e apresentaram uma distribuição normal de erro com baixa variância. Uma simulação estatística realizada para avaliar a utilidade do PyAutoFEP em uma campanha de descoberta de fármacos hipotética mostrou que a aplicação desta ferramenta poderia levar a um aumento significativo na probabilidade de encontrar ligantes mais potentes, se utilizada para triar moléculas durante a otimização de um protótipo.

Analisando todos estes resultados em conjunto, quais sejam, alta correlação, baixos erros, boa reprodutibilidade, e a capacidade de automação do PyAutoFEP, nós acreditamos que ele possa se mostrar útil para a comunidade para atacar problemas na área de descobrimento de fármacos.

7 PERSPECTIVAS

Três tipos principais de perspectivas emergem deste trabalho: desenvolvimento metodológico, futuros desenvolvimentos da ferramenta PyAutoFEP, e sua aplicação para problemas de otimização. Especificamente dentro das perspectivas de desenvolvimento do PyAutoFEP, pode-se ainda elencar otimização de rotinas existentes, investimento em usabilidade e implementação de novos métodos.

Do ponto de vista de desenvolvimento metodológico, algumas direções foram apontadas pelos resultados que obtivemos. A observação da sobreposição pobre entre estados adjacentes, embora com predições com boa reprodutibilidade e baixo erro, sugerem o escrutínio dos esquemas de janelas de λ aqui aplicados. Estes esquemas foram extraídos da ferramenta FEP+ e, hipoteticamente, otimizados para o campo de força OPLS3e ou algum de seus antecessores. Uma vez que outros campos de força têm cargas e parâmetros de LJ diferentes, é possível de outro esquema de transformação, com um balanceamento diferente do escalonamento de cada termo seja mais eficiente. Assim, futuros trabalhos que busquem otimizar este esquema pode ser de grande interesse para a comunidade. Nossos resultados também mostram que a melhora na correlação advinda da aplicação da REST2 é dependente do sistema e do campo de força empregados. Entretanto, existem diversas técnicas de amostragem estendida fundamentadas na troca de réplicas. É possível que haja técnicas que provejam uma aceleração da amostragem ainda maior do que a REST2. Assim, futuras pesquisas comparando diversos métodos de amostragem estendida pode prover ainda mais aceleração de convergência para cálculos de FEP.

Do ponto de vista dos desenvolvimentos do programa PyAutoFEP, há ainda componentes importantes ausentes de nossa implementação. Primeiramente, não há uma forma simples de executar *core-constrained docking*, o que pode complicar o uso do programa, já que esta metodologia não está amplamente difundida entre os programas de ancoragem molecular. A automação de um algoritmo de *core-constrained docking* utilizando uma biblioteca ou uma interface com códigos de ancoragem bem estabelecido é um dos objetivos futuros de implementação. Em outra direção, a impossibilidade de executar perturbações de carga limita a aplicação do PyAutoFEP, uma vez que séries de análogos podem ter cargas variadas, como inclusive é o caso da série spiro. Incorporar algum método de perturbação de carga total ampliaria o escopo da ferramenta. Terceiro, seria conveniente que o PyAutoFEP fosse capaz de lidar com ligantes peptídicos de forma simples – atualmente realizar FEP com esta classe de moléculas requereria um esforço manual grande por parte do usuário. Finalmente, a análise de histerese de ciclos fechados é de grande utilidade para estimar problemas de convergência.

Neste momento, o PyAutoFEP é capaz de gerar mapas com ciclos, porém não é capaz de analisá-los. Esta é, possivelmente, a implementação mais relevante a ser executada.

Além de novas rotinas, há algumas otimizações de código que melhorariam a eficiência computacional do PyAutoFEP. Uma delas é a substituição da biblioteca de grafos por uma mais eficiente no *script generate_perturbation_map.py*. Uma candidata para isto é a biblioteca graph-tool, que utiliza rotinas em C e C++ em vez de Python (“The graph-tool python library”, 2014). Outra otimização que aceleraria o processo de geração de entradas para a simulação seria paralelizar a construção de sistemas, que atualmente é feita em série. Isto poderia reduzir o tempo de execução do *script prepare_dual_topology.py* e seria de grande valor especialmente em mapas grandes. Finalmente, atualmente as etapas de equilíbrio de cada sistema (complexo ou água) de cada perturbação são executadas serialmente para cada janela de λ , embora a paralelização do GROMACS esteja sempre presente. É provável que seja possível obter ganhos de velocidade equilibrando paralelamente todas as janelas de cada sistema.

Por último, em relação ao desenvolvimento do PyAutoFEP, a usabilidade é um ponto de atenção. Trabalhar com mapas de perturbação é complexo e, frequentemente, o usuário precisa executar ajustes, incluir ou remover perturbações. Para tal, uma interface gráfica para o gerador de mapas de perturbação seria de extrema utilidade. Neste momento, a única alternativa é editar arquivos de texto para obter ajuste fino no mapa de perturbação, o que certamente não é viável para mapas grandes. Assim, uma direção de desenvolvimento é a adição de uma interface gráfica, inicialmente para analisar e editar o mapa de perturbações, mas que futuramente pode vir a integrar a análise dos resultados, especialmente após a análise de ciclos fechados estar disponível.

Finalmente, do ponto de vista das aplicações, estamos ativamente buscando colaborações para aplicar o PyAutoFEP para problemas prospectivos de desenvolvimento fármacos. Paralelamente, acreditamos que a disponibilidade desta ferramenta para a comunidade pode levar à aplicação do PyAutoFEP por outros grupos em campanhas de otimização.

8 REFERÊNCIAS

- ABEL, R. et al. Advancing Drug Discovery through Enhanced Free Energy Calculations. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 7, p. 1625–1632, 18 jul. 2017.
- ABEL, R. et al. Modeling the value of predictive affinity scoring in preclinical drug discovery. **Current Opinion in Structural Biology**, Cryo electron microscopy: the impact of the cryo-EM revolution in biology • Biophysical and computational methods - Part A. v. 52, p. 103–110, 1 out. 2018.
- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.
- ALBANESE, S. K. et al. Is Structure-Based Drug Design Ready for Selectivity Optimization? **J. Chem. Inf. Model.**, p. 17, 2020.
- ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 31, n. 2, p. 459–466, 6 ago. 1959.
- AQVIST, J.; MARELIUS, J. The Linear Interaction Energy Method for Predicting Ligand Binding Free Energies. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 4, n. 8, p. 613–626, 1 dez. 2001.
- ÅQVIST, J.; MEDINA, C.; SAMUELSSON, J.-E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 7, n. 3, p. 385–391, 1994.
- BAILLIE, T. A.; MACCOSS, M. Organic Chemistry in Drug Discovery. **Science**, v. 303, n. March, p. 1810–1813, 19 mar. 2004.
- BAKER, C. M. Polarizable force fields for molecular dynamics simulations of biomolecules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 5, n. 2, p. 241–254, mar. 2015.
- BARNOUD, J.; MONTICELLI, L. Coarse-Grained Force Fields for Molecular Simulations. In: KUKOL, A. (Ed.). **Molecular Modeling of Proteins**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2015. p. 125–149.
- BAUMKETNER, A.; SHEA, J.-E. The Structure of the Alzheimer Amyloid β 10–35 Peptide Probed through Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations in Explicit Solvent. **Journal of Molecular Biology**, v. 366, n. 1, p. 275–285, 9 fev. 2007.
- BEN-SHALOM, I. Y. et al. Efficient Approximation of Ligand Rotational and Translational Entropy Changes upon Binding for Use in MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 2, p. 170–189, 27 fev. 2017.
- BOCHICCHIO, D.; PAVAN, G. M. From Cooperative Self-Assembly to Water-Soluble Supramolecular Polymers Using Coarse-Grained Simulations. **ACS Nano**, v. 11, n. 1, p. 1000–1011, 24 jan. 2017.
- BORESCH, S.; KARPLUS, M. The Role of Bonded Terms in Free Energy Simulations: 1. Theoretical Analysis. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 1, p. 103–118, jan. 1999.
- BOUVIGNIES, G. et al. Solution structure of a minor and transiently formed state of a T4 lysozyme mutant. **Nature**, v. 477, n. 7362, p. 111–117, 2011.

- BOWERS, K. J. et al. **Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters**. SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing. **Anais...** In: SC '06: PROCEEDINGS OF THE 2006 ACM/IEEE CONFERENCE ON SUPERCOMPUTING. nov. 2006.
- BRAGA, S. F. P. et al. Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1889–1900, mar. 2017.
- BROWN, D. 1.07 - Overview of Sources of New Drugs. In: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. (Eds.). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Oxford: Elsevier, 2007. p. 321–353.
- BROWN, S. P.; MUCHMORE, S. W.; HAJDUK, P. J. Healthy skepticism: assessing realistic model performance. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 7–8, p. 420–427, abr. 2009.
- CAO, Y.; JIANG, T.; GIRKE, T. A maximum common substructure-based algorithm for searching and predicting drug-like compounds. **Bioinformatics**, v. 24, n. 13, p. i366–i374, 1 jul. 2008.
- CAPPEL, D. et al. Impact of Different Automated Binding Pose Generation Approaches on Relative Binding Free Energy Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 3, p. 1432–1444, 23 mar. 2020.
- CARLI, M. et al. Candidate Binding Sites for Allosteric Inhibition of the SARS-CoV-2 Main Protease from the Analysis of Large-Scale Molecular Dynamics Simulations. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 65–72, 14 jan. 2021.
- CASE, D. A. et al. **AMBER 2018**. San Francisco, United States of America: University of California, 2018.
- CHEN, W. et al. Accurate Calculation of Relative Binding Free Energies between Ligands with Different Net Charges. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 12, p. 6346–6358, 11 dez. 2018.
- CLAUDEL THIERRY; STAELS BART; KUIPERS FOLKERT. The Farnesoid X Receptor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2020–2030, 1 out. 2005.
- COLEMAN, R. G. et al. Ligand Pose and Orientational Sampling in Molecular Docking. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75992, 1 out. 2013.
- COMER, J. et al. The Adaptive Biasing Force Method: Everything You Always Wanted To Know but Were Afraid To Ask. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 3, p. 1129–1151, 22 jan. 2015.
- CUI, D. et al. Ligand Binding Thermodynamic Cycles: Hysteresis, LWHAM, and the Overlapping States Matrix. **Journal of chemical theory and computation**, v. 16, n. 1, p. 67–79, 14 jan. 2020.
- DANISHUDDIN; KHAN, A. U. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 8, p. 1291–1302, 1 ago. 2016.
- DAWSON, P. A. Role of the Intestinal Bile Acid Transporters in Bile Acid and Drug Disposition. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 201, p. 169–203, 2011.

- DENSCHLAG, R.; LINGENHEIL, M.; TAVAN, P. Efficiency reduction and pseudo-convergence in replica exchange sampling of peptide folding–unfolding equilibria. **Chemical Physics Letters**, v. 458, n. 1–3, p. 244–248, jun. 2008.
- DODDA, L. S. et al. LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W331–W336, 3 jul. 2017.
- DOMINGUEZ, C.; BOELEN, R.; BONVIN, A. M. J. HADDOCK: A protein–protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1731–1737, 2003.
- DORIGO, M.; GAMBARDELLA, L. M. Ant colony system: a cooperative learning approach to the traveling salesman problem. **IEEE Transactions on Evolutionary Computation**, v. 1, n. 1, p. 53–66, abr. 1997.
- ERIKSSON, A. et al. Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. **Science**, v. 255, n. 5041, p. 178–183, 10 jan. 1992.
- FRATEV, F.; SIRIMULLA, S. An Improved Free Energy Perturbation FEP+ Sampling Protocol for Flexible Ligand–Binding Domains. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 14 nov. 2019.
- FRIESNER, R. A. et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177–6196, out. 2006.
- GAIEB, Z. et al. D3R Grand Challenge 2: blind prediction of protein–ligand poses, affinity rankings, and relative binding free energies. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 32, n. 1, p. 1–20, jan. 2018.
- GAPSYS, V. et al. Large scale relative protein ligand binding affinities using non-equilibrium alchemy. **Chemical Science**, v. 11, n. 4, p. 1140–1152, 2020.
- GARDÈS, C. et al. Studies in mice, hamsters, and rats demonstrate that repression of hepatic apoA-I expression by taurocholic acid in mice is not mediated by the farnesoid-X-receptor. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 6, p. 1188–1199, 1 jun. 2011.
- GENHEDEN, S. MM/GBSA and LIE estimates of host–guest affinities: dependence on charges and solvation model. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 11, p. 1085–1093, nov. 2011.
- GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 4 maio 2015.
- GHASEMI, F. et al. Neural network and deep-learning algorithms used in QSAR studies: merits and drawbacks. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 10, p. 1784–1790, 1 out. 2018.
- GIBSON, D. A.; IONOVA, I. V.; CARTER, E. A. A comparison of Car–Parrinello and Born–Oppenheimer generalized valence bond molecular dynamics. **Chemical Physics Letters**, v. 240, n. 4, p. 261–267, 30 jun. 1995.

- GUTIÉRREZ-DE-TERÁN, H.; ÅQVIST, J. Linear interaction energy: Method and applications in drug design. **Methods in Molecular Biology**, v. 819, p. 305–323, 2012.
- HAJDUK, P. J.; SAUER, D. R. Statistical Analysis of the Effects of Common Chemical Substituents on Ligand Potency Statistical Analysis of the Effects of Common Chemical Substituents on Ligand Potency. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 553–564, 2008.
- HANSSON, T.; MARELIUS, J.; ÅQVIST, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 12, n. 1, p. 27–35, 1998.
- HIRSCHFIELD, G. M. et al. Efficacy of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. **Gastroenterology**, v. 148, n. 4, p. 751–761.e8, 1 abr. 2015.
- HOMEYER, N. et al. Binding Free Energy Calculations for Lead Optimization: Assessment of Their Accuracy in an Industrial Drug Design Context. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, n. 8, p. 3331–3344, 12 ago. 2014.
- HOU, T. et al. Assessing the Performance of the MM / PBSA and MM / GBSA Methods . 1 . The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 1, p. 69–82, 2011.
- HUANG, J. et al. Recent advances in polarizable force fields for macromolecules: Microsecond simulations of proteins using the classical drude oscillator model. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 5, n. 18, p. 3144–3150, 18 set. 2014.
- HUANG, J. et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, jan. 2017.
- HUANG, K. et al. An accurate free energy estimator: based on MM/PBSA combined with interaction entropy for protein–ligand binding affinity. **Nanoscale**, v. 12, n. 19, p. 10737–10750, 21 maio 2020.
- HUEY, R. et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1145–1152, 2007.
- JAKALIAN, A.; JACK, D. B.; BAYLY, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 1623–1641, 1 dez. 2002.
- JARIN, Z.; NEWHOUSE, J.; VOTH, G. A. Coarse-Grained Force Fields from the Perspective of Statistical Mechanics: Better Understanding of the Origins of a MARTINI Hangover. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 2, p. 1170–1180, 9 fev. 2021.
- JAYARAM, B.; SPROUS, D.; BEVERIDGE, D. L. Solvation Free Energy of Biomacromolecules: Parameters for a Modified Generalized Born Model Consistent with the AMBER Force Field. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 47, p. 9571–9576, 1998.
- JESPER, W. et al. QligFEP: an automated workflow for small molecule free energy calculations in Q. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 26, 2 abr. 2019.

JIANG, W.; CHIPOT, C.; ROUX, B. Computing Relative Binding Affinity of Ligands to Receptor: An Effective Hybrid Single-Dual-Topology Free-Energy Perturbation Approach in NAMD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 9, p. 3794–3802, 23 set. 2019.

JO, S. et al. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 2008.

JORGENSEN, W. L. Computer-aided discovery of anti-HIV agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 20, p. 4768–4778, 2016.

JORGENSEN, W. L.; THOMAS, L. L. Perspective on Free-Energy Perturbation Calculations for Chemical Equilibria. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 6, p. 869–876, jun. 2008.

JUNG, D. et al. Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 1954–1966, jun. 2002.

JUNG, J. et al. Scaling molecular dynamics beyond 100,000 processor cores for large-scale biophysical simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 40, n. 21, p. 1919–1930, 5 ago. 2019.

KADUKOVA, M.; CHUPIN, V.; GRUDININ, S. Docking rigid macrocycles using Convex-PL, AutoDock Vina, and RDKit in the D3R Grand Challenge 4. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 34, n. 2, p. 191–200, 1 fev. 2020.

KARLOV, D. S. et al. graphDelta: MPNN Scoring Function for the Affinity Prediction of Protein–Ligand Complexes. **ACS Omega**, v. 5, n. 10, p. 5150–5159, 17 mar. 2020.

KASHEFOLGHETA, S. et al. Evaluating Classical Force Fields against Experimental Cross-Solvation Free Energies. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 12, p. 7556–7580, 8 dez. 2020.

KE, Y.; JIN, H.; SUN, L. Revealing conformational dynamics of 2'-O-methyl-RNA guanine modified G-quadruplex by replica exchange molecular dynamics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 520, n. 1, p. 14–19, nov. 2019.

KEMPFER, K. et al. Development of Coarse-Grained Models for Polymers by Trajectory Matching. **ACS Omega**, v. 4, n. 3, p. 5955–5967, 31 mar. 2019.

KESERŰ, G. M.; MAKARA, G. M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 15, p. 741–748, 1 ago. 2006.

KHAN, H. M. et al. Improving the Force Field Description of Tyrosine–Choline Cation– π Interactions: QM Investigation of Phenol–N(Me)₄⁺ Interactions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 11, p. 5585–5595, 8 nov. 2016.

KHAN, H. M.; MACKERELL, A. D.; REUTER, N. Cation- π Interactions between Methylated Ammonium Groups and Tryptophan in the CHARMM36 Additive Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 1, p. 7–12, 8 jan. 2019.

KIM, S. et al. CHARMM-GUI Free Energy Calculator for Absolute and Relative Ligand Solvation and Binding Free Energy Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 11, p. 7207–7218, 10 nov. 2020.

KLIMOVICH, P. V.; SHIRTS, M. R.; MOBLEY, D. L. Guidelines for the analysis of free energy calculations. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 29, n. 5, p. 397–411, 2015.

KOBAYASHI, C. et al. GENESIS 1.1: A hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms. **Journal of Computational Chemistry**, v. 38, n. 25, p. 2193–2206, 30 set. 2017.

KOLLMAN, P. A. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 889–897, 2000.

KONZE, K. D. et al. Reaction-Based Enumeration, Active Learning, and Free Energy Calculations To Rapidly Explore Synthetically Tractable Chemical Space and Optimize Potency of Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 9, p. 3782–3793, 23 set. 2019.

KUHN, B. et al. Prospective Evaluation of Free Energy Calculations for the Prioritization of Cathepsin L Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 2485–2497, 23 mar. 2017.

KUHN, M. et al. Assessment of Binding Affinity via Alchemical Free-Energy Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 6, p. 3120–3130, 22 jun. 2020.

LE GRAND, S.; GÖTZ, A. W.; WALKER, R. C. SPFP: Speed without compromise - A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. **Computer Physics Communications**, v. 184, n. 2, p. 374–380, 2013.

LEFEBVRE, P. et al. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 147–191, 1 jan. 2009.

LEGER, P. R. et al. Discovery of Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitors of USP7 with In Vivo Antitumor Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 5398–5420, 28 maio 2020.

LENSELINK, E. B. et al. Predicting Binding Affinities for GPCR Ligands Using Free-Energy Perturbation. **ACS Omega**, v. 1, n. 2, p. 293–304, 2016.

LEVITT, M.; LIFSON, S. Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure. **Journal of Molecular Biology**, v. 46, n. 2, p. 269–279, 1969.

LILL, M. A. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23–24, p. 1013–1017, 1 dez. 2007.

LINDAHL, V.; LIDMAR, J.; HESS, B. Accelerated weight histogram method for exploring free energy landscapes. **Journal of Chemical Physics**, v. 141, n. 4, p. 044110, 28 jul. 2014.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. NA-NA, jun. 2010.

- LIU, P. et al. Replica exchange with solute tempering: A method for sampling biological systems in explicit water. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 39, p. 13749–13754, 2005.
- LIU, S. et al. Lead optimization mapper: Automating free energy calculations for lead optimization. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 9, p. 755–770, 26 set. 2013.
- LOEFFLER, H. H. et al. Reproducibility of Free Energy Calculations across Different Molecular Simulation Software Packages. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 14, n. 11, p. 5567–5582, 13 nov. 2018.
- LOEFFLER, H. H.; MICHEL, J.; WOODS, C. FESetup: Automating Setup for Alchemical Free Energy Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 12, p. 2485–2490, 2015.
- LYBRAND, T. P.; MCCAMMON, J. A. Computer simulation study of the binding of an antiviral agent to a sensitive and a resistant human rhinovirus. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 2, n. 4, p. 259–266, 1989.
- MACHADO, M. R. et al. The SIRAH 2.0 Force Field: Altius, Fortius, Citius. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 4, p. 2719–2733, 9 abr. 2019.
- MACKERELL, A. D. et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, abr. 1998.
- MAKISHIMA, M. et al. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1362–1362, 21 maio 1999.
- MARELIUS, J. et al. Q: a molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 16, n. 4–6, p. 213–225, ago. 1998.
- MATRICON, P. et al. Fragment optimization for GPCRs by molecular dynamics free energy calculations: Probing druggable subpockets of the A2A adenosine receptor binding site. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6398, 25 dez. 2017.
- MERZLIKINE, A. et al. Development of machine learning models of β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin complexation free energies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 2, p. 207–216, 14 out. 2011.
- MEY, A. S. J. S. et al. Best Practices for Alchemical Free Energy Calculations [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 18378, 16 dez. 2020.
- MOBLEY, D. L. et al. Predicting Absolute Ligand Binding Free Energies to a Simple Model Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 371, n. 4, p. 1118–1134, 2007.
- MOITESSIER, N. et al. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **British journal of pharmacology**, v. 153 Suppl, p. S7–S26, 2008.

- Molecular Dynamics Simulations Related to SARS-CoV-2**. : D. E. Shaw Research Technical Data. [s.l.] D. E. Shaw Research, 2020. Disponível em: <http://www.deshawresearch.com/resources_sarscov2.html>.
- MONTAÑO, J. et al. Blind testing of shoreline evolution models. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2137, 7 fev. 2020.
- MORRIS, G. M. et al. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- MUDALIAR, S. et al. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 145, n. 3, p. 574–582.e1, 1 set. 2013.
- NAWAE, W. et al. Defining the membrane disruption mechanism of kalata B1 via coarse-grained molecular dynamics simulations. **Scientific Reports**, v. 4, p. e1000964, 3 fev. 2014.
- NISHIKAWA, N. et al. Comparison of the umbrella sampling and the double decoupling method in binding free energy predictions for SAMPL6 octa-acid host-guest challenges. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 32, n. 10, p. 1075–1086, out. 2018.
- O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, 2011.
- ÖHLKNECHT, C. et al. Charge-Changing Perturbations and Path Sampling via Classical Molecular Dynamic Simulations of Simple Guest–Host Systems. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 12, p. 7721–7734, 8 dez. 2020.
- OLSSON, M. A.; GARCÍA-SOSA, A. T.; RYDE, U. Binding affinities of the farnesoid X receptor in the D3R Grand Challenge 2 estimated by free-energy perturbation and docking. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 32, n. 1, p. 211–224, jan. 2018.
- OLSSON, M. H. M. et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 2, p. 525–537, 8 fev. 2011.
- PÁLL, S.; HESS, B. A flexible algorithm for calculating pair interactions on SIMD architectures. **Computer Physics Communications**, v. 184, n. 12, p. 2641–2650, 2013.
- PÉREZ-BENITO, L. et al. Predicting Binding Free Energies of PDE2 Inhibitors. The Difficulties of Protein Conformation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4883, dez. 2018.
- PERILLA, J. R.; SCHULTEN, K. Physical properties of the HIV-1 capsid from all-atom molecular dynamics simulations. **Nature Communications**, v. 8, p. 15959, 19 jul. 2017.
- PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, 2005.

PIANA, S.; LINDORFF-LARSEN, K.; SHAW, D. E. Atomic-level description of ubiquitin folding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 15 mar. 2013.

PIETRUCCI, F. Strategies for the exploration of free energy landscapes: Unity in diversity and challenges ahead. **Reviews in Physics**, v. 2, p. 32–45, nov. 2017.

PIRIYAKUMAR, D. A. L.; LEVI, P. **A new approach to exploiting parallelism in ant colony optimization**. Proceedings of 2002 International Symposium on Micromechatronics and Human Science. **Anais...** In: MHS2002. OF 2002 INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROMECHATRONICS AND HUMAN SCIENCE. Nagoya, Japan: IEEE, 2002. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/1058041/>>. Acesso em: 26 fev. 2020

PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force Fields for Protein Simulations. In: **Advances in Protein Chemistry**. Protein Simulations. [s.l.] Academic Press, 2003. v. 66p. 27–85.

PUZYN, T.; LESZCZYŃSKI, J.; CRONIN, M. **Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications**. [s.l.: s.n.].

RAHMAN, A.; STILLINGER, F. H. Molecular Dynamics Study of Liquid Water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 55, n. 7, p. 3336–3359, 9 out. 1971.

RDKit: Open-source cheminformatics. [s.l.: s.n.].

ROBERTSON, M. J.; TIRADO-RIVES, J.; JORGENSEN, W. L. Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 7, p. 3499–3509, 14 jul. 2015.

ROBERTSON, M. J.; TIRADO-RIVES, J.; JORGENSEN, W. L. Performance of Protein-Ligand Force Fields for the Flavodoxin - Flavin Mononucleotide System. **The journal of physical chemistry letters**, v. 7, n. 15, p. 3032–3036, 4 ago. 2016.

ROOS, K. et al. OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 3, p. 1863–1874, 12 mar. 2019.

SCHIFFER, J. M. et al. Capturing Invisible Motions in the Transition from Ground to Rare Excited States of T4 Lysozyme L99A. **Biophysical Journal**, v. 111, n. 8, p. 1631–1640, 18 out. 2016.

SCHINDLER, C. E. M. et al. Large-Scale Assessment of Binding Free Energy Calculations in Active Drug Discovery Projects. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 3 set. 2020.

SCHINDLER, C.; RIPPMANN, F.; KUHN, D. Relative binding affinity prediction of farnesoid X receptor in the D3R Grand Challenge 2 using FEP+. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 32, n. 1, p. 265–272, 2018.

SENFTLE, T. P. et al. The ReaxFF reactive force-field: development, applications and future directions. **npj Computational Materials**, v. 2, n. 1, p. 15011, nov. 2016.

SHAW, D. E. et al. Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 341–346, 15 out. 2010.

- SHIMOJO, F. et al. QXMD: An open-source program for nonadiabatic quantum molecular dynamics. **SoftwareX**, v. 10, p. 100307, 1 jul. 2019.
- SHIRTS, M. R.; CHODERA, J. D. Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. **The Journal of Chemical Physics**, v. 129, n. 12, p. 124105, 28 set. 2008.
- SHIRTS, M. R.; MOBLEY, D. L.; BROWN, S. P. Free-energy calculations in structure-based drug design. In: MERZ, K. M.; RINGE, D.; REYNOLDS, C. H. (Eds.). **Drug Design**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 61–86.
- SHIVAKUMAR, D. et al. Improving the Prediction of Absolute Solvation Free Energies Using the Next Generation OPLS Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 8, p. 2553–2558, 14 ago. 2012.
- SIDLER, D.; CRISTÒFOL-CLOUGH, M.; RINIKER, S. Efficient Round-Trip Time Optimization for Replica-Exchange Enveloping Distribution Sampling (RE-EDS). **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 6, p. 3020–3030, 13 jun. 2017.
- SÖDERHJELM, P.; RYDE, U. How accurate can a force field become? A polarizable multipole model combined with fragment-wise quantum-mechanical calculations. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 3, p. 617–627, 2009.
- SOTERAS GUTIÉRREZ, I. et al. Parametrization of halogen bonds in the CHARMM general force field: Improved treatment of ligand–protein interactions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 20, p. 4812–4825, out. 2016.
- SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 367, 2012.
- STEINBRECHER, T.; JOUNG, I.; CASE, D. A. Soft-core potentials in thermodynamic integration: Comparing one- and two-step transformations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 15, p. 3253–3263, 2011.
- STEPNIEWSKA-DZIUBINSKA, M. M.; ZIELENKIEWICZ, P.; SIEDLECKI, P. Development and evaluation of a deep learning model for protein–ligand binding affinity prediction. **Bioinformatics**, v. 34, n. 21, p. 3666–3674, 1 nov. 2018.
- STERNBERG, U.; WITTER, R.; ULRICH, A. S. All-atom molecular dynamics simulations using orientational constraints from anisotropic NMR samples. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 38, n. 1, p. 23–39, 4 maio 2007.
- STONE, J. E. et al. Accelerating molecular modeling applications with graphics processors. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 16, p. 2618–2640, dez. 2007.
- SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. **Chemical Physics Letters**, v. 314, n. 1–2, p. 141–151, 1999.
- SUN, H. et al. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy calculation approaches. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 21, p. 14450–14460, 30 maio 2018.

TERAKAWA, T.; KAMEDA, T.; TAKADA, S. On easy implementation of a variant of the replica exchange with solute tempering in GROMACS. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1228–1234, maio 2011.

The graph-tool python library. , 10 set. 2014. Disponível em: </articles/dataset/graph_tool/1164194/14>. Acesso em: 14 mar. 2021

TRIBELLO, G. A. et al. PLUMED 2: New feathers for an old bird. **Computer Physics Communications**, v. 185, n. 2, p. 604–613, 2014.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

VAN DE WIEL, S. M. W. et al. Identification of FDA-approved drugs targeting the Farnesoid X Receptor. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2193, 18 fev. 2019.

VAN DIJK, T. H. et al. An increased flux through the glucose 6-phosphate pool in enterocytes delays glucose absorption in Fxr^{-/-} mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 16, p. 10315–10323, 17 abr. 2009.

VANOMMESLAEGHE, K. et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671–690, 1 mar. 2010.

VIVO, M. D. et al. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 12 maio 2016.

WANG, E. et al. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 16, p. 9478–9508, 28 ago. 2019.

WANG, L. et al. Modeling local structural rearrangements using FEP/REST: Application to relative binding affinity predictions of CDK2 inhibitors. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 2, p. 1282–1293, 2013.

WANG, L. et al. Accurate and Reliable Prediction of Relative Ligand Binding Potency in Prospective Drug Discovery by Way of a Modern Free-Energy Calculation Protocol and Force Field. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 7, p. 2695–2703, 25 fev. 2015.

WANG, L.; BERNE, B. J.; FRIESNER, R. A. On achieving high accuracy and reliability in the calculation of relative protein-ligand binding affinities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 6, p. 1937–1942, 2012.

WANG, L.; FRIESNER, R. A.; BERNE, B. J. Replica exchange with solute scaling: A more efficient version of replica exchange with solute tempering (REST2). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 30, p. 9431–9438, 2011.

WARR, W. A. A CADD-alog of strategies in pharma. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 31, n. 3, p. 245–247, 18 mar. 2017.

WARREN, G. L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. Capelli, A. LaLonde, J. Semus, S. F. Head, M. S. **J. Med. Chem.**, n. 49, p. 5912–5931, 2006.

WONG, C. F.; MCCAMMON, J. A. Dynamics and Design of Enzymes and Inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 13, p. 3830–3832, 1986.

WOODS, C. J.; ESSEX, J. W.; KING, M. A. The Development of Replica-Exchange-Based Free-Energy Methods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 49, p. 13703–13710, dez. 2003.

WU, E. L. et al. CHARMM-GUI membrane builder toward realistic biological membrane simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 35, n. 27, p. 1997–2004, 2014.

WUNBERG, T. et al. Improving the hit-to-lead process: data-driven assessment of drug-like and lead-like screening hits. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 3, p. 175–180, 1 fev. 2006.

YAMAGATA, K. et al. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23158–23165, 28 maio 2004.

ZHOU, Y. et al. Born–Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations of Enzyme Reactions. In: [s.l: s.n.]. p. 105–118.

ZUCKERMAN, D. M.; LYMAN, E. A Second Look at Canonical Sampling of Biomolecules using Replica Exchange Simulation. p. 6, 2008.

ANEXO I – OUTROS PROJETOS DESENVOLVIDOS AO LONGO DO DOUTORADO NÃO DIRETAMENTE CONECTADOS AO PROJETO PRINCIPAL

Durante o desenvolvimento deste doutorado, outros projetos experimentais e computacionais foram desenvolvidos em colaborações com outros grupos ou não. No total foram desenvolvidos dez outros projetos de variadas complexidades, dos quais um envolveu somente experimentos, dois combinaram técnicas computacionais e experimentos e outros sete foram totalmente computacionais. Dois destes projetos foram realizados durante estágio sanduíche, com bolsa do programa CAPES-PrInt, em San Francisco, EUA, na University of California San Francisco (UCSF) no Schoichet Laboratory, sob a supervisão do Prof. Brian K. Shoichet. Além de apresentações em congressos e resumos publicados em anais de eventos, resultados derivados destes trabalhos foram reportados como cinco artigos científicos em revistas indexadas, sendo que em um deles o autor desta tese é primeiro autor do artigo. Outros cinco manuscritos derivados destes trabalhos estão em diferentes fases de redação, sendo que em dois deles o autor desta tese é co-primeiro autor.

Investigação computacional do modo de ligação de um inibidor da cruzaina

Um inibidor de cruzaina com propriedades interessantes foi obtido por nosso grupo aplicando simplificação molecular de um protótipo descoberto por triagem de larga escala (BRAGA et al., 2017). Este inibidor, o composto **5a (Figura A1)**, apresentou um CI_{50} de $15 \pm 2 \mu\text{M}$, K_i de $9.7 \mu\text{M}$ e um mecanismo de inibição competitivo, mantendo a eficiência do ligante em relação ao protótipo, mas com uma síntese muito mais simples. Estes resultados instigaram a investigação do modo de ligação desta molécula, para o quê foi aplicada ancoragem molecular, DM, cálculos *ab initio* e MM/PBSA. Cálculos *ab initio* de pKa e dinâmicas moleculares sugeriram o estado de protonação do composto durante a ligação. A análise combinada de DM partindo de diferentes possíveis poses, das estimativas de energia de Gibbs de ligação das trajetórias destas DM, e de uma análise da energia tensional do ligante permitiu propor uma pose de ligação. Esta pose putativa ajuda a racionalizar a relação estrutura atividade relativamente plana que observada para esta série e sugere implicações para o desenvolvimento de futuros inibidores.

Luan Carvalho Martins, Pedro Henrique Monteiro Torres, Renata Barbosa de Oliveira, Pedro Geraldo Pascutti, Elio A. Cino, Rafaela Salgado Ferreira. Investigation of the binding mode of a novel cruzain inhibitor by docking, molecular dynamics, ab initio and MM/PBSA calculations. *Journa of Computer Aided Molecular Design*. **32**, 591–605 (2018).

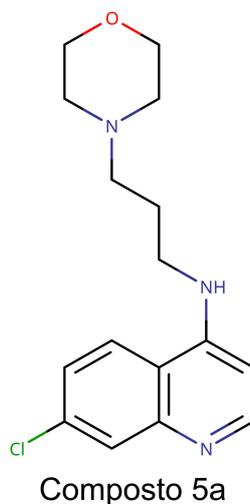


Figura A1 - Estrutura química do composto 5a, inibidor competitivo da cruzaina (CI_{50} de $15 \pm 2 \mu\text{M}$, K_i de $9.7 \mu\text{M}$) previamente descoberto por nosso grupo.

Aplicação de técnicas de quimiinformática para avaliação do grau de inovação de moléculas

Em campanhas de descoberta de fármacos contra alvos já explorados por diversas séries de ligantes, é interessante avaliar em que extensão as novas moléculas descobertas são de fato inovadoras ou tem características similares às séries descritas. Técnicas de quimiinformática foram aplicadas para atacar este problema no contexto da descoberta de inibidores das cisteíno-proteases cruzaina e rodesaina. Para tal, uma biblioteca de inibidores relatados foi construída por uma busca sistemática da literatura, que resultou em 750 inibidores da cruzaina vindos de 64 estudos e 516 inibidores da rodesaina vindos de 46 estudos. *Fingerprints* foram utilizados para construir matrizes e histogramas de similaridade, buscando avaliar a similaridade média no conjunto de dados. Algoritmos de clusterização e redução de dimensionalidade foram aplicados para permitir observação de relações de similaridade estrutural. Aplicações destas técnicas foram publicadas em dois trabalhos descrevendo a descoberta de inibidores efetivamente inovadores da cruzaina e da rodesaina.

Glaécia A. N. Pereira, Lucianna H. Santos, Steven C. Wang, Luan Carvalho Martins, Filipe S. Villela, Weiting Liao, Marco A. Desso, Luiz C. Dias, Adriano D. Andricopulo, Mariana A. F. Costa, Ronaldo A. P. Nagem, Conor R. Caffrey, Klaus R. Liedl, Ernesto R. Caffarena, Rafaela S. Ferreira. Benzimidazole inhibitors of the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. *Future Medicinal Chemistry*. **11**, 1537–1551 (2019).

Glaécia A. N. Pereira, Elany B. da Silva, Saulo F. P. Braga, Paulo Gaio Leite, Luan Carvalho Martins, Rafael P. Vieira, Wai Tuck Soh, Filipe S. Villela, Francielly M. R. Costa, Debalina Ray, Saulo F. de Andrade, Hans Brandstetter, Renata B. Oliveira, Conor R. Caffrey, Fabiana S. Machado, Rafaela S. Ferreira. Discovery and characterization of trypanocidal cysteine protease inhibitors from the ‘malaria box’. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **179**, 765–778 (2019).

Ensaio enzimático para avaliação da atividade e mecanismo de inibição de possíveis inibidores das cisteíno proteases parasitárias cruzaina e rodesaina

As tripanossomíases doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi*, e tripanossomíase africana humana, causada pelo *T. brucei*, são doenças negligenciadas com relevante impacto na saúde pública, especialmente em populações dos países mais pobres. Atualmente, os tratamentos disponíveis para tais doenças têm eficácia limitada e alta toxicidade, de forma que novos fármacos são uma necessidade urgente. As cisteíno proteases parasitárias cruzaina e rodesaina são alvos terapêuticos validados para o *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente. Como parte dos esforços para identificação de novos inibidores de interesse destas enzimas, diferentes séries de ligantes em potencial foram triadas contra estas enzimas. A primeira série foi baseada no composto **5a (Figura A1)** e explora diversos conectores entre a cadeia e o núcleo quinolínico e variações também nesta cadeia. Este trabalho encontrou cinco novos inibidores da cruzaina e rodesaina, um deles uma hidrazino-quinolina, uma nova possível classe de inibidores. Adicionalmente, uma análise computacional do pKa sugere uma relação entre a basicidade do anel quinolínico e potência. Uma segunda série avaliada é um conjunto de tiosemicarbazonas que apresentaram interessante atividade contra ambas as enzimas e um mecanismo não-competitivo. Estes resultados ainda não foram publicados.

Marina M. S. Andrade, Luan Carvalho Martins, Gabriel V. L. Marques, Carla A. Silva, Gilson Faria, Sérgio Caldas, Janete S. C. dos Santos, Sophie Y. Leclercq, Vinícius G. Maltarollo, Rafaela S. Ferreira, Renata B. Oliveira. Synthesis of quinoline derivatives as potential cysteine protease inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*. **12**, 571–581 (2020).

Ainda em relação à triagem contra as enzimas cruzaina e rodesaina, a série de 400 compostos *Pathogens box*, disponibilizada pelo consórcio *Medicines for Malaria Venture* foi triada experimentalmente contra ambas as enzimas e, em paralelo, estas moléculas foram estudadas por ancoragem molecular. Os 10 compostos mais ativos foram ressupridos em forma sólida pelo mesmo consórcio e ensaios

confirmatórios de inibição, determinação de CI_{50} e do mecanismo de inibição estão em andamento. Os resultados preliminares mostram que classes inovadoras de inibidores foram descobertos, com CI_{50} de até $3,42 \pm 0,03 \mu\text{M}$ contra a cruzaina e $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ contra a rodesaina. Adicionalmente, um possível ativador da enzima pode ter sido identificado, embora mais estudos serão necessários para caracterizar este composto. Este trabalho ainda está em andamento e não foi publicado. De toda forma o autor desta tese será co-primeiro autor do manuscrito.

Thales do V. Moreira, Luan C. Martins, Rafaela S. Ferreira. Screening the Pathogen box to discover new cruzain and rhodesain inhibitors. *Em conclusão e redação.*

Estudo da dinâmica conformacional da tetracenomicina aromatase/ciclase (TcmN) por DM

A tetracenomicina aromatase/ciclase (TcmN) é uma enzima presente em *Streptomyces glaucescens* envolvida na ciclização, aromatização e enovelamento de policetídeos, de forma que esta enzima tem interesse biotecnológico. Estudos de DM foram executados para estudar a dinâmica conformacional desta proteína, especificamente no que tange o controle de abertura e fechamento da cavidade catalítica. Seis simulações de 1 μs da TcmN em seu estado apo foram executadas, o que permitiu observar o evento de abertura e fechamento da cavidade. Análises das probabilidades relativas dos estados abertos e fechados, combinados a análise de componente principal e de hidratação da cavidade foram executados. Estas análises, aliado a resultados de RMN, permitiram propor um mecanismo de controle conformacional da TcmN com consequências para a hidratação da cavidade e agregação. As descobertas deste estudo apresentam um primeiro passo para avaliar a TcmN como um alvo para aplicações biotecnológicas. Este trabalho foi submetido para a revista *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* está em revisão por pares.

Veronica S. Valadares, Luan C. Martins, Ernestro A. Roman, Ana Paula Valente, Elio A. Cino, Adolfo Henrique Moraes. Conformational dynamics of Tetracenomycin Aromatase/Cyclase regulate polyketide binding and enzyme aggregation propensity. *Em revisão.*

Descoberta de ligantes do macrodomínio do SARS-CoV-2 por ancoragem molecular de larga escala

A emergência da pandemia do SARS-CoV-2 instou inúmeras pesquisas na área de desenvolvimento de fármacos buscando moléculas com potencial terapêutico. Um dos alvos de interesse deste vírus é o macrodomínio, enzima que catalisa a hidrólise de grupos ADP-ribose em modificações pós-

transcricionais de proteínas, com implicações para a evasão do sistema imune do hospedeiro. A inibição do macrodomínio leva à incapacidade do SARS-CoV-2 de infectar células imunocompetentes (dados não publicados). Para buscar inibidores desta enzima, ancoragem molecular em larga escala (*large scale docking*, *LSD*) foi aplicado. Três bibliotecas foram utilizadas: compostos testados em seres humanos (~100 mil moléculas); fragmentos, com massa molar entre 200 g/mol e 250 g/mol (~20 milhões de moléculas); e moléculas *lead-like*, com massa molar entre 300 g/mol e 350 g/mol e $\log P < 3,5$ (~220 milhões de moléculas). Estas bibliotecas foram ancoradas e as poses mais bem pontuadas foram inspecionadas visualmente, resultando em 20 fragmentos e 60 moléculas do conjunto *lead-like* sendo confirmadas como ligantes por cristalografia de raios X. Parte deste trabalho, especificamente a descoberta de fragmentos ligadores do macrodomínio, foi publicado na revista *Science Advances*. Este trabalho foi desenvolvido durante estágio sanduíche no Shoichet Laboratory, na UCSF.

Marion Schuller, Galen J Correy, Stefan Gahbauer, Daren Fearon, Taiasean Wu, Roberto Efraín Díaz, Iris D Young, Luan Carvalho Martins, Dominique H Smith, Ursula Schulze-Gahmen, Tristan W Owens, Ishan Deshpande, Gregory E Merz, Aye C Thwin, Justin T Biel, Jessica K Peters, Michelle Moritz, Nadia Herrera, Huong T Kratochvil, Anthony Aimon, James M Bennett, Jose Brandao Neto, Aina E Cohen, Alexandre Dias, Alice Douangamath, Louise Dunnett, Oleg Fedorov, Matteo P Ferla, Martin Fuchs, Tyler J Gorrie-Stone, James M Holton, Michael G Johnson, Tobias Krojer, George Meigs, Ailsa J Powell, Johannes Gregor Matthias Rack, Victor L Rangel, Silvia Russi, Rachael E Skyner, Clyde A Smith, Alexei S Soares, Jennifer L Wierman, Kang Zhu, Natalia Jura, Alan Ashworth, John Irwin, Michael C Thompson, Jason E Gestwicki, Frank von Delft, Brian K Shoichet, James S Fraser, Ivan Ahel, QCRG Structural Biology Consortium. Fragment binding to the Nsp3 macrodomain of SARS-CoV-2 identified through crystallographic screening and computational docking. *Science Advances*. **7**, eabf8711 (2021).

Aplicação de FEP a uma série inovadora de ligantes do receptor 5HT_{2A}

O receptor 5HT_{2A} está recebendo importante atenção como alvo terapêutico para possíveis fármacos para tratar doenças psiquiátricas, distúrbios alimentares e Parkinson. Novos ligantes do receptor 5HT_{2A} foram recentemente descobertos por LSD e uma campanha de otimização utilizando estes protótipos foi iniciada (resultados não publicados). Aplicando DM e FEP, foram estudados dois conjuntos de ligantes do 5HT_{2A}, um grupo de análogos propostos utilizando a estratégia *analogue-by-catalogue* e um conjunto proposto por química medicinal clássica. A aplicação conjunta destas duas técnicas permitiu prever o modo de ligação dos ligantes desta série e propor determinantes de atividade para o

composto mais potente. Interessantemente, estas predições foram confirmadas posteriormente pela determinação experimental do modo de ligação de um dos agonistas da série por CryoEM. Estes resultados estão em fase final de redação e provavelmente serão submetidos para publicação na revista *Nature*. Este trabalho foi desenvolvido durante estágio sanduíche no Shoichet Laboratory, na UCSF.

Triagem virtual baseada em ligantes utilizando algoritmo Milky-Way

A triagem virtual baseada em ligantes (*ligand based virtual screening*, LBVS) é uma opção de alta velocidade para sistemas onde haja informações sobre séries de ligantes, especialmente quando não há informação suficiente sobre o alvo biomolecular. Novos métodos de triagem virtual utilizando avanços nos algoritmos da área de aprendizagem de máquina estão atraindo interesse por apresentar boa performance. Recentemente, o algoritmo Milky-Way foi desenvolvido e patenteado por Dr. Carmelina Figueiredo Vieira Leite, pelo Prof. Marcos Augusto dos Santos e outros pesquisadores do grupo dele, com o qual nosso grupo tem colaborações. Os resultados interessantes deste método, sua grande velocidade e a possibilidade de mapear descritores que contribuem positiva e negativamente para uma predição sugerem que ele pode ser de interesse em LBVS. Para avaliar esta possibilidade, um conjunto desafiador de ligantes e não ligantes chamado MUV foi estudado em colaboração com a Dr. Carmelina Leite e Prof. Marcos Santos. Os resultados mostram que o método Milky-Way e outros métodos clássicos de classificação tiveram performance ruim para este conjunto de dados utilizando diferentes *fingerprints* estruturais. A aplicação de um método de seleção de características, no qual características menos relevantes para um modelo são removidas, aumentou significativamente a qualidade dos modelos e permitiu classificar corretamente ligantes e não ligantes, mesmo em um conjunto de dados desafiador e fortemente desbalanceado. Estes resultados sugerem que a aplicação de métodos de seleção de características e, em especial, sua combinação com a Milky-Way, podem ser capazes de obter bons resultados em campanhas de LBVS. O manuscrito referente a este trabalho está em fase de redação e provavelmente serão submetidos para publicação na revista *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, sendo que o autor desta tese é co-primeiro autor do manuscrito.

Carmelina Figueiredo Vieira Leite, Luan Carvalho Martins, Larissa Fernandes Leijôto, Pedro Magalhães Martins, Lucianna Helene Silva Santos, Marcos Augusto dos Santos, Rafaela Salgado Ferreira. Stratified feature selection with Milk-Way algorithm applied in the MUV database: a study case. *Em redação*.