

## Artigo

## Estudos de Modelagem Molecular em Derivados de Acrilamida como Inibidores de Serino Protease Viral NS3/NS2B do Vírus da Dengue

da Costa, A. A. F.; Alves, C. N.; Cardoso, F. J. C.; Molfetta, F. A.\*

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (6), 2272-2287. Data de publicação na Web: 18 de dezembro de 2017

<http://rvq.sbg.org.br>

### Molecular Modeling Study of Acrylamides Derivatives as Inhibitors of the NS3/NS2B Serine Proteases of the Dengue Virus

**Abstract:** Dengue fever is an acute viral infection caused by the *mosquito of the Aedes genus*, with the largest incidence in tropical and sub-tropical regions of the world. There are no specific treatments against the dengue virus, and only the symptoms resulting from the disease are treated. The NS3/NS2B serine protease enzyme is essential for the life cycle of the virus and a promising target for drug development against the virus. In this work, acrylamide derivatives obtained from the literature data were submitted to molecular modeling studies. According to the results of the molecular docking calculations and subsequent consensual analysis, which consists of a statistical treatment used to assign the same importance to the results from different programs, and visual inspection we selected three compounds, which make hydrogen bonds with the amino acid residues His51, Asp75, Ser135, Gly151 and Gly153. Thus, Molecular Dynamics simulations were performed with three selected ligands using the hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) method, which the semiempirical AM1 Hamiltonian was used to describe the QM part and the OPLS-AA force field as method of Molecular Mechanics. The Root Mean Square Deviation (RMSD) graphs showed that systems were stabilized in 10 ns. Also, through the contribution of individual residues we observed that key residues, such as Ser34, Trp50, Lys73 and Gly151, were responsible for stabilization of the complex in the active site of the dengue enzyme.


**Keywords:** Dengue; acrylamides derivatives; NS3/NS2B serine protease enzyme; molecular docking; molecular dynamics.

### Resumo

A dengue é uma doença infecciosa aguda transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes*, sendo que as áreas de maior incidência no mundo são regiões tropicais e subtropicais. Não existem tratamentos específicos contra o vírus da dengue, sendo apenas tratados os sintomas decorrentes da doença. A enzima serino protease NS3/NS2B é essencial para o ciclo de vida do vírus e um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos contra o vírus. Neste trabalho foram estudados compostos derivados da acrilamida obtidos da literatura, no qual foram submetidos a estudos de modelagem molecular. De acordo com os resultados da docagem molecular e subsequente análise consensual, que consiste em um tratamento estatístico usado para atribuir a mesma importância para os valores de energia em diferentes programas de docagem, e visual foram selecionados três compostos que fizeram ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos His51, Asp75, Ser135, Gly151 e Gly153. Deste modo, simulações de dinâmica molecular foram realizadas com os três ligantes usando o método híbrido Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM - *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*), no qual o método semiempírico AM1 foi utilizado para descrever a parte de Química Quântica e o campo de força OPLS-AA como método de Mecânica Molecular. Através dos resultados obtidos pelo gráfico do RMSD (Raiz do Desvio Médio Quadrático - *Root Mean Square Deviation*) observou-se que o sistema se estabilizou no tempo de 10ns. Além disso, através dos gráficos de interação por resíduo foi observado que os resíduos chaves para a estabilização no sítio de ligação da enzima da dengue foram os resíduos de Ser34, Trp50, Lys73 e Gly151.

**Palavras-chave:** Dengue; Derivados de acrilamida; enzima serino protease NS3/NS2B; Docagem molecular; Dinâmica molecular.

\* Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Modelagem Molecular, CEP 60075-110, Belém-PA, Brasil.

 [fabioam@ufpa.br](mailto:fabioam@ufpa.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20170135](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170135)

## Estudos de Modelagem Molecular em Derivados de Acrilamida como Inibidores de Serino Protease Viral NS3/NS2B do Vírus da Dengue

Ana A. F. da Costa,<sup>a,\*</sup> Cláudio N. Alves,<sup>b</sup> Fábio J. B. Cardoso,<sup>a</sup> Fábio A. Molfetta<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Modelagem Molecular, CEP 60075-110, Belém-PA, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, CEP 60075-110, Belém-PA, Brasil.

\* [fabioam@ufpa.br](mailto:fabioam@ufpa.br)

*Recebido em 22 de fevereiro de 2017. Aceito para publicação em 9 de dezembro de 2017*

### 1. Introdução

### 2. Métodos

#### 2.1. CASTp (*Computed Atlas of Surface Topograph of Proteins*)

#### 2.2. Docagem Molecular

#### 2.3. Dinâmica molecular

### 3. Resultados e discussão

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

A Dengue é uma doença infecciosa aguda causada por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus da dengue (DENV 1-4), pertencentes à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, o qual reúne 53 espécies de vírus.<sup>1,2</sup> A dengue é transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde a doença atinge anualmente cerca de 50-100 milhões de pessoas e 2,5 bilhões (40% da população mundial) estão em situação de

risco de contrair a doença em mais de cem países.<sup>3-6</sup> A maioria das mortes ocorre após a evolução da doença em febre hemorrágica e síndrome de choque da dengue.<sup>7</sup>

O RNA genômico do vírus apresenta três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que causam a produção de novos vírus ao infectar as células.<sup>8</sup> Sua tradução gera uma poliproteína, a qual é clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira e a interação do RNA no complexo de replicação.<sup>9,10</sup> A atividade proteolítica da enzima requer a presença simultânea dos domínios NS3 e NS2B, no qual

a sequência hidrofílica de 40 resíduos de aminoácidos da região central da NS2B é suficiente para a ativação da NS3 *in vitro*.<sup>9</sup> A NS3 é uma serino protease do tipo tripsina, sendo uma poliproteína multifuncional composta por um domínio helicase e um domínio protease, onde o domínio protease está na região N-terminal e o helicase na C-terminal.<sup>7</sup> A NS3 apresenta uma tríade catalítica constituída de His51, Asp75 e Ser135. Embora a tríade esteja inteiramente constituída dentro dos subsítios da NS3, a protease funcional requer a presença do cofator NS2B, visto que reações que contêm a NS3 protease sem o cofator são incapazes de promover atividade.<sup>11-13</sup>

A serino protease viral NS3/NS2B é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas terapias contra o DENV e outras infecções flavivirais, tais como a Febre do Nilo Ocidental e a Febre Amarela. Devido ao seu papel no processamento pós-tradução da poliproteína viral, a NS3/NS2B é essencial para o ciclo de vida e mecanismo de replicação viral. Portanto, é esperado que a inibição desta enzima bloqueie a replicação do vírus nas células hospedeiras humanas.<sup>1</sup> Apesar de sua alta incidência, severidade e impacto econômico, atualmente não há nenhuma vacina ou medicamento específico contra DENV, apenas são tratados os sintomas, o que torna necessária a busca por um fármaco capaz de tratar a doença.<sup>14-16</sup> Dessa forma, o bloqueio da atividade da serino protease NS3/NS2B proporciona um modo eficaz para projetar moléculas terapêuticas contra o vírus.

Inibidores peptídicos são considerados como uma classe de agentes terapêuticos com diversas propriedades químicas e atividades biológicas, sendo que esses inibidores apresentam uma vantagem no fato de possuírem menor toxicidade quando comparados com compostos sintéticos.<sup>17</sup> Estudos de inibidores peptídicos derivados de acrilamida mostram que estes compostos apresentam inibição contra as proteases do DENV e a Febre do Nilo.<sup>18,19</sup> Nitsche e colaboradores estudaram uma série de 86 compostos derivados da acrilamida como

inibidores da enzima serino protease NS3/NS2B do vírus da dengue (Apêndice 1), no qual foram determinados os valores de porcentagem de inibição, sendo que os resultados do ensaio de competição pelo inibidor aprotinina demonstraram uma interação direta dos inibidores com o centro catalítico da protease do vírus da Dengue.<sup>1</sup>

Deste modo, neste estudo foi realizado um cálculo virtual com os inibidores derivados da acrilamida para avaliar a conformação e as interações destas moléculas na serino protease NS3/NS2B do DENV. Através do programa Castp<sup>20</sup> e da docagem molecular foi possível caracterizar as regiões e as interações do sítio ativo da enzima. Posteriormente, foi aplicada uma análise consensual aos valores de energias de interação oriundas do cálculo virtual, uma inspeção visual levando em consideração as ligações de hidrogênio por resíduo e os valores de porcentagem de inibição, para selecionar estruturas mais promissoras em inibir a enzima alvo, sendo estas selecionadas para estudos de dinâmica molecular (DM). Desta forma, através dos resultados da DM pode-se verificar a estabilidade dos compostos pelo gráfico da raiz do desvio quadrático médio (RMSD) em função do tempo de simulação e as interações dos resíduos de aminoácidos no complexo receptor-ligante no meio biológico.

## 2. Métodos

### 2.1. CASTp (*Computed Atlas of Surface Topograph of Proteins*)

Como a serino protease NS3/NS2B não possui ligante cocrystalizado que permita a identificação direta do sítio ativo da enzima, foi usado o servidor on-line CASTp para verificar os possíveis sítios de ligação e os resíduos importantes.<sup>20</sup> O servidor fornece a identificação e a dimensão das superfícies acessíveis, bem como cavidades inacessíveis para proteínas e outras moléculas.<sup>21</sup>

## 2.2. Docagem Molecular

A docagem molecular é um método utilizado para prever o modo de ligação de pequenas moléculas na cavidade de interação de macromoléculas, sendo capaz de determinar as mudanças de conformação do ligante por meio de interação no alvo de maneira a formar um complexo receptor-ligante.<sup>22</sup> O processo de docagem compreende duas etapas principais: o algoritmo de busca e a função de pontuação, que estão relacionadas à predição do posicionamento (conformação e orientação) no interior da alvo molecular, além de avaliação da afinidade de ligação.<sup>23-25</sup> Esta técnica é comumente empregada para selecionar estruturas promissoras para a avaliação experimental por meio de procedimento de uma triagem virtual.<sup>22</sup>

Os cálculos de docagem molecular foram realizados com o modelo cristalográfico da enzima serino protease NS3/NS2B, obtida do PDB (*Protein Data Bank*) com o código 2FOM, utilizando os programas DOCK 6.5,<sup>26</sup> que usa o algoritmo incremental para a realização dos cálculos; o Molegro Virtual Docker (MVD 5.0)<sup>27</sup> e o AutoDock Vina 1.1.1,<sup>28</sup> utilizam o algoritmo genético, sendo que o MVD usa a predição de cavidades. Como a enzima de dengue não possui ligante cocristalizado no sítio ativo, a utilização de diferentes programas de docagem molecular contribui para determinação do sítio ativo da enzima.<sup>29</sup> Dessa maneira, foi necessário usar o ligante cocristalizado da enzima homóloga obtida do banco de dados PDB com o código 2FP7, pertencente à mesma classe da enzima da dengue, porém referente à doença do Nilo Ocidental.<sup>30</sup> Todas as simulações utilizaram o cofator NS2B que é necessário para a ativação da NS3 serino protease.<sup>7</sup>

Para a realização da docagem no programa DOCK 6.5,<sup>26</sup> a todos os ligantes foram adicionados átomos de hidrogênio e calculadas as cargas atômicas pelo método AM1-BCC<sup>31</sup> no programa Chimera 1.5.2.<sup>32</sup> Para o alvo macromolecular, usando o

programa dms,<sup>33</sup> foi gerada uma superfície molecular de Connolly,<sup>34</sup> e o módulo SPHGEN<sup>35</sup> foi usado para criar as esferas complementares à superfície da proteína em um raio de 8,0 Å do ligante. Em seguida, o módulo grid<sup>36</sup> do programa DOCK 6.5 foi usado para gerar uma caixa cúbica com o tamanho de 60 Å<sup>3</sup> para englobar as esferas selecionadas, localizada sobre o sítio ativo da enzima. Finalizada a etapa de preparação do sítio e dos ligantes, iniciou-se a docagem flexível com os resíduos His51, Asp75, Glu86, Asp129, Phe130, Ser135, Gly151, Asn152, Gly153 e Tyr161 que foram salvos separadamente do restante da estrutura que foi considerada rígida. Após isso, foi realizada a subsequente minimização dos ligantes no sítio ativo da enzima.

No programa *Molegro Virtual Docking* (MVD) 5.0,<sup>27</sup> o alvo e os ligantes foram preparados através do módulo de preparação padrão do MVD. Para cada complexo, foram adicionados átomos de hidrogênio e as cargas atômicas parciais padrões do programa. Os cálculos de docagem foram efetuados através da função de pontuação *MolDock*, com uma resolução de grade de 0,3 Å. A região do sítio ativo da enzima foi definida como uma região esférica de 15 Å, abrangendo todos os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, e com os valores das coordenadas cartesianas  $x = 19,60$ ,  $y = 44,81$  e  $z = -3,14$ . Para cada complexo, foram executados 10 cálculos, gerando 10 conformações com o algoritmo *MolDock optimizer*.<sup>37</sup>

Para a docagem molecular utilizando o programa AutoDock Vina 1.1.1,<sup>28</sup> foram adicionados átomos de hidrogênio, e em seguida, foi realizada a adição de cargas de Gasteiger no AutoDockTools (ADT) 1.5.6. A macromolécula foi preparada através do ADT com adição de hidrogênios polares e cargas de Kollman. O receptor foi docado como parcialmente rígido com os mesmos resíduos flexíveis utilizados no programa Dock 6.5 e o ligante como flexível. A grade de energia utilizada consiste em pré-calcular as contribuições energéticas do receptor, pela

avaliação das interações de van der Waals e eletrostáticas entre os átomos do ligante e do receptor, em uma grade de pontos, que são lidas durante a avaliação do complexo ligante-receptor.<sup>38</sup> Essa caixa cúbica de 60 Å foi centrada no ligante cristalográfico da enzima homóloga 2FP7 usado como referência, e os valores de coordenadas cartesianas do centro  $x = 19,575$ ,  $y = 43,851$  e  $z = -2,448$ . Para cada complexo, foram executados 10 cálculos, gerando 10 conformações.

As energias de interação obtidas da docagem molecular foram pontuadas usando o método do escalonamento pela amplitude<sup>39,40</sup> e com as dez estruturas mais bem pontuadas foram feitas as análises das interações e os valores da constante de inibição.<sup>1</sup> Posteriormente, foram selecionadas três estruturas para serem submetidas à dinâmica molecular na biblioteca computacional fDynamo.<sup>41</sup>

### 2.3. Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica molecular com o método híbrido QM/MM permitem a modelagem de reações e verifica as interações em sistemas biomoleculares a um esforço computacional razoável para fornecer à precisão necessária aos cálculos.<sup>42</sup> Neste trabalho, as coordenadas iniciais usadas para os cálculos de dinâmica molecular foram obtidas da estrutura da serino protease NS3/NS2B do DENV oriundas do PDB com o código 2FOM. Assim, como os valores padrão de pKa dos grupos ionizáveis podem ser deslocado nas proteínas, uma atribuição dos estados de protonação a pH 7 de todos esses resíduos foram estimados utilizando cálculos de pKa usando o servidor PropKa.<sup>38,43</sup> Após diferentes análises, foram selecionados três compostos, no qual foram submetidos a DM usando o método híbrido QM/MM, onde os átomos de hidrogênio foram adicionados a cada estrutura usando a biblioteca fDynamo<sup>41</sup> e ao receptor foram feitos cálculos usando algoritmos de otimização (*steepest descent*, gradiente

conjugado e L-BFGS-B).<sup>41</sup> Durante este processo, para evitar uma desnaturação da estrutura da proteína todos os átomos pesados na proteína e o ligante foram contidos usando um oscilador cartesiano harmônico do tipo guarda-chuva com uma constante de força de  $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ .<sup>38,44</sup>

Para a etapa de dinâmica molecular, foram escolhidos os complexos enzima-ligantes obtidos com o programa AutoDock Vina. Dessa forma, foi utilizada uma caixa cúbica de  $80 \text{ \AA}^3$  de água, sendo que essas moléculas de água foram relaxadas usando os mesmos algoritmos de otimização.<sup>41,45</sup> Depois, foram calculados 100 ps de simulação no método híbrido QM/MM Langevin-Verlet a 300 K em um conjunto termodinâmico canônico (NVT) usado para equilibrar o modelo.<sup>45,46</sup>

Foram calculados 10 ns de DM para equilibrar cada sistema, sendo utilizado o método híbrido QM/MM com o Hamiltoniano semi-empírico AM1.<sup>47</sup> No total foram 89 átomos na região de QM, que incluem o inibidor e os resíduos de aminoácido His51, Asp75 e Ser135. O resto do sistema (enzima e moléculas de água) foi descrito usando o campo de força OPLS-AA (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*)<sup>48</sup> para a enzima e uma caixa composta de moléculas de água do tipo TIP3P<sup>49</sup> implantado na biblioteca fDynamo.<sup>41</sup>

## 3. Resultados e discussão

Inicialmente, os valores da energia de interação obtidos com diferentes programas de docagem molecular para as 86 estruturas<sup>1</sup> (Apêndice A) foram escalonados pela amplitude e ranqueados (ordenados pelos valores de energia).<sup>40</sup> Este procedimento é utilizado para minimizar possíveis erros, como a seleção de “falsos positivos”.<sup>50</sup> Em seguida, as dez estruturas melhor pontuadas foram selecionadas e submetidas a uma inspeção visual. No presente trabalho os critérios adotados na seleção dos compostos através da inspeção visual foram: (a)

consideração das ligações de hidrogênio entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da macromolécula; (b) análise dos valores de  $K_i$ . Posteriormente, estas análises possibilitaram a seleção de três estruturas que foram submetidas à dinâmica molecular na biblioteca computacional fDynamo.<sup>41</sup>

Através do programa Ligplot<sup>+</sup>,<sup>51</sup> analisaram-se as interações das estruturas selecionadas com o receptor. Na Tabela 1 são mostrados os valores de energia obtidos na

docagem, o ranque final de energia, os valores de porcentagem de inibição<sup>1</sup> e as principais ligações de hidrogênio obtidas com os resíduos de aminoácidos nos diferentes programas para cada uma das estruturas selecionadas. Na Tabela 1 do Apêndice B são mostrados os valores de energia para os 86 compostos estudados nos programas Autodock Vina 1.1.1, MVD 5.0 e Dock 6.5 com seus respectivos valores escalonados e o ranque final dado pela soma dos valores escalonados.

**Tabela 1.** Valores de energia de interação, ranque final, porcentagem de inibição determinada experimentalmente<sup>1</sup> e as ligações de hidrogênio encontradas para cada composto selecionado na docagem da serino protease NS3/NS2B do DENV

Estrutura	EI <sup>a</sup> (kJ/mol)			RF <sup>b</sup>	% DENV <sup>c</sup> ( $\mu$ M)	Ligações de hidrogênios com os resíduos de aminoácidos		
	Vina	MVD	DOCK			Vina	MVD	DOCK
17	-7,70	-93,33	-42,26	2,20	23,0	His51, Asp75, Ser135, Gly151	Asp167	Asn152
25	-8,20	-98,97	-38,27	2,24	46,6	His51, Phe130, Tyr150, Gly153	Thr120, Asn167	Val147 Ile165
68	-8,00	-95,71	-38,12	2,12	36,8	His51, Ser135	Gly153	Asn167

<sup>a</sup>Energia de interação da docagem de molecular, <sup>b</sup>Ranqueamento final, <sup>c</sup>Percentual de inibição

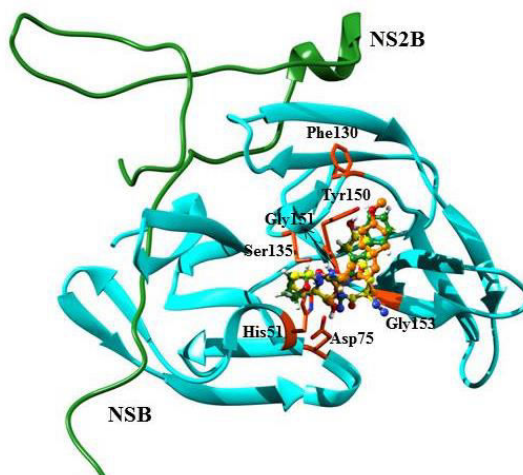
A serino protease NS3/NS2B do vírus da dengue apresenta um sítio catalítico composto de quatro subsítios (S1, S1', S2 e S3).<sup>7</sup> Na Tabela 1 observa-se que as interações mais frequentes e significativas foram feitas com resíduos de aminoácidos polares, tais como His51, Asp75 e Ser135, que fazem parte dos subsítios S1' e S2 e que compõem a tríade catalítica.<sup>7</sup>

Os resultados da docagem molecular com o programa AutoDock Vina, mostraram que os ligantes realizaram um maior número de ligações de hidrogênios com os resíduos de aminoácidos da serino protease NS3/NS2B. A Figura 1 mostra os três ligantes selecionados e os resíduos envolvidos na docagem molecular através do programa Autodock Vina. Conforme os valores de ranqueamento

(Tabela 1) observa-se que o ligante 25 foi o composto que apresentou o maior valor no ranqueamento final, considerando os três programas de docagem utilizados. Esse resultado corrobora com os valores experimentais do valor no percentual de inibição obtidos por Nitsche e colaboradores que mostrou que dentre os ligantes selecionados o composto 25 apresentou maior valor de inibição para a enzima NS3/NS2B serino protease do vírus da dengue.<sup>1</sup> Destarte, conforme a Tabela 1 pode-se verificar que o ligante 17 apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Asp75 e Gly151 do subsítio S<sub>2</sub> e com os resíduos His51 e Ser135 do subsítio S<sub>1</sub>'. Já o ligante 25 fez interação por ligação de hidrogênio com a Gly153, que pertence ao subsítio S<sub>3</sub>, e com a His51, que faz parte da

tríade catalítica; além dos resíduos de Phe130 e Tyr150 que fazem parte do subsítio S1 da NS3.<sup>30</sup> A estrutura 68 apresentou ligação de hidrogênio com os resíduos His51 e Ser135. A presença da ligação de

hidrogênio com esses resíduos é necessária para estabilizar a histidina protonada.<sup>52</sup> Cabe salientar que no programa MVD o composto 68 apresentou uma interação com a Gly153, que faz parte do sítio catalítico da enzima.<sup>30</sup>



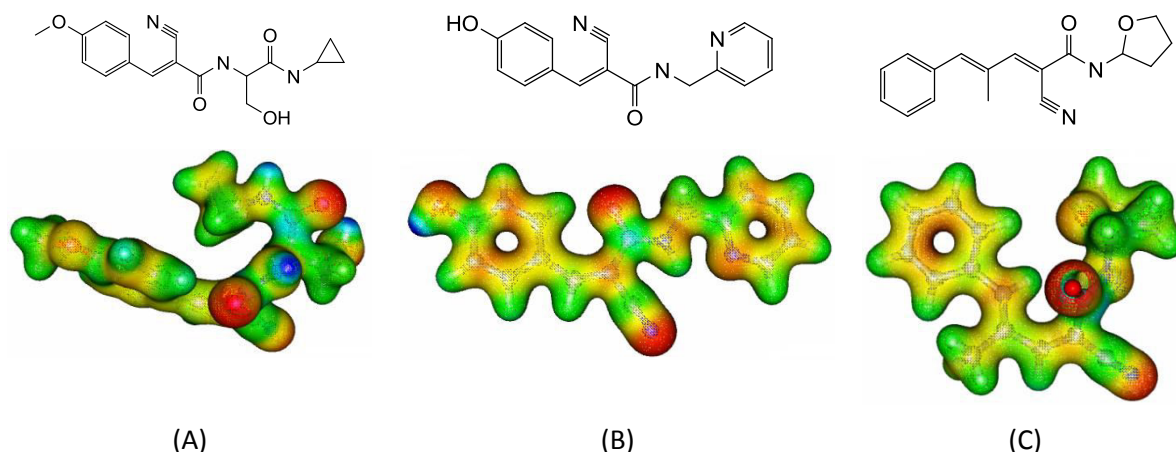
**Figura 1.** Resultado da docagem molecular obtida pelo programa Autodock Vina na estrutura da enzima serino protease NS3/NS2B. Os ligantes 25, 17 e 68 são representados em amarelo, laranja e verde, respectivamente. A figura foi gerada com o programa Chimera<sup>32</sup>

As principais interações hidrofóbicas foram semelhantes para cada ligante, independente do programa de docagem. As interações hidrofóbicas em conjunto com as ligações de hidrogênios são essenciais na estabilização do ligante no sítio da enzima e podem aumentar a complementaridade entre o alvo e as interfaces da molécula.<sup>53</sup> No programa AutoDock Vina as principais interações hidrofóbicas foram com os resíduos Phe130, Ser131, Ser135, Tyr150, Gly151 e Gly153. No programa MVD Lys73, Lys74, Asp75, Thr120, Asn152 e Gly153 foram as principais interações e para o programa Dock foram Lys73, Lys74, Val147, Asn152, Asn167 e Ile165.

Os compostos derivados da acrilamida são peptídeos inibidores de serino proteases, sendo que o grupo nitrila pode agir como um nucleófilo para a serina catalítica e induzir uma interação dipolo-dipolo ou criar uma

ligação covalente reversível entre o inibidor e a enzima.<sup>1</sup> Em geral, o sistema aromático dos derivados de acrilamida que apresentam um grupo receptor de elétrons resulta em baixa atividade. Já os derivados que apresentam grupos doadores de elétrons, tais como o grupo hidróxi ou amida melhoram a atividade contra as proteases do DENV.<sup>54</sup>

Na Figura 2 é mostrado o mapa do potencial eletrostático dos ligantes 17, 25 e 68, e de forma a obter informações adicionais quanto a distribuição eletrônica dos compostos foram calculadas as cargas atômicas derivadas do potencial eletrostático (representadas através do pacote computacional Molekel 5.4),<sup>55</sup> onde as regiões mais nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) são mostrados em vermelho, enquanto que as regiões mais eletrofílicas (potencial eletrostático positivo) são mostradas em azul.



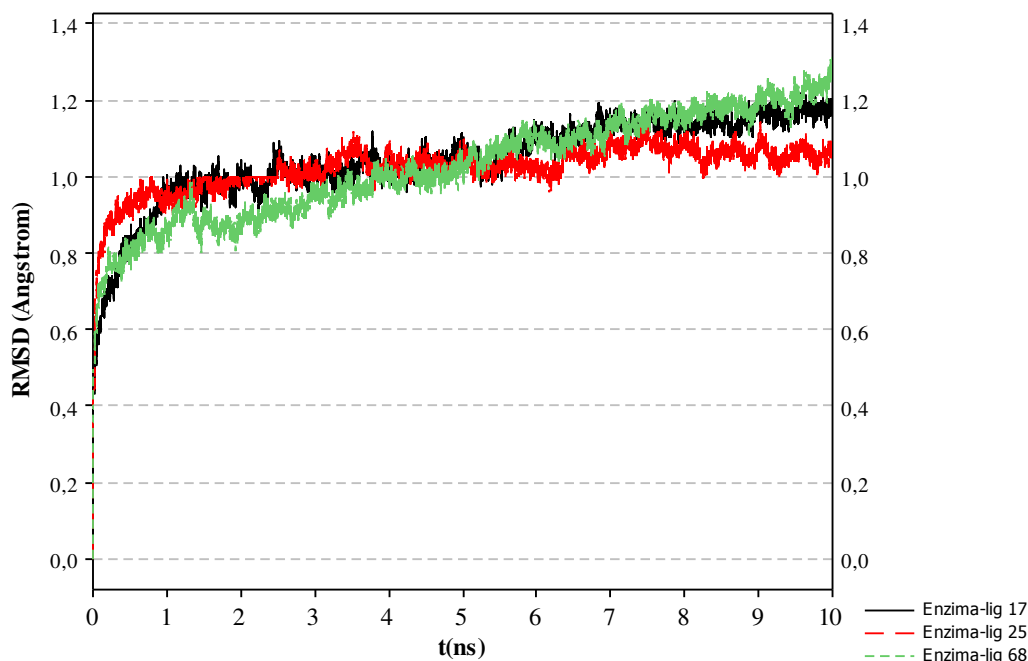
**Figura 2.** Estruturas e o Mapa do potencial eletrostático dos ligantes **17** (A), **25** (B) e **68** (C)

As interações por ligação de hidrogênio com a enzima ocorrem nas regiões nucleofílicas dos ligantes, onde estão presentes os átomos de nitrogênio e oxigênio. Estudo de Nitsche e colaboradores<sup>1</sup> mostrou que compostos derivados de 3-aryl-2-ciano-acrilamidas que apresentam sistemas com uma alta densidade de elétrons apresentam maior atividade como inibidores do vírus da dengue e Febre do Nilo. Assim, através dos resultados da docagem e da análise do mapa do potencial eletrostático pode-se inferir que os três ligantes fazem interação através das regiões nucleofílicas presentes na porção amida das estruturas, no qual o carbono da carbonila da ligação peptídica pode ser atacado pelo nucleófilo.<sup>56</sup>

Os subsítios S1 e S2 da enzima NS3/NS2B são importantes para o reconhecimento molecular em proteases de vírus da dengue e os resultados obtidos através da docagem molecular mostraram que a porção arila dos derivados de acrilamida interagiram com o subsítio S1 da enzima, haja vista a interação do grupo nitrila com a serina catalítica.<sup>1</sup>

Através dos cálculos da DM com o método híbrido QM/MM foi gerado um gráfico de RMSD (Figura 3) para um tempo de 10 ns de simulação, no qual as análises das estruturas foram realizadas sobre os complexos enzima-ligante. Por meio da comparação dos dados de RMSD pode-se observar o comportamento estável do sistema durante o tempo de simulação gerado pela trajetória.<sup>57</sup>





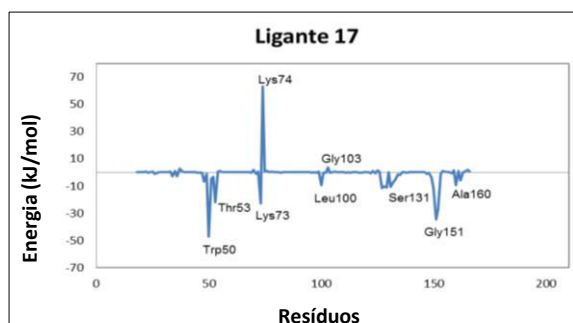
**Figura 3.** Gráfico do RMSD da simulação de dinâmica molecular para os três ligantes

O gráfico de RMSD (Å) versus tempo (ns) de simulação (Figura 3) mostrou que as três estruturas submetidas a DM tendem a se estabilizar durante o período de tempo de simulação, sofrendo apenas suaves flutuações estruturais, com valores de RMSD permanecendo próximo de 1,0 Å. Assim, ao fim do tempo de simulação os sistemas tornaram-se estáveis e foi possível identificar os resíduos de aminoácidos da serino protease NS3/NS2B que fizeram interações com esses compostos.

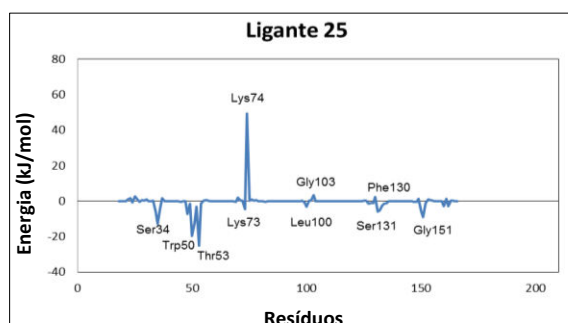
A técnica de decomposição da energia de interação por resíduos pode revelar a contribuição de resíduos chaves responsáveis pelas interações do complexo ligante-receptor. Assim, na Figura 4 são mostrados os gráficos da decomposição da energia de interação por resíduos para os ligantes 17, 25 e 68 com o tempo simulação de 10 ns.<sup>58</sup>

Os resultados da análise de decomposição de energia de interação por resíduo para os compostos 17, 25 e 68 mostram que estes ligantes complexados com a enzima interagem fortemente com os resíduos Ser34, Trp50, Lys73, Lys74 e Gly151, presentes em alças flexíveis da NS3/NS2B serino protease do DENV,<sup>59</sup> sendo que o resíduo de Lys74 tem uma interação fortemente repulsiva.

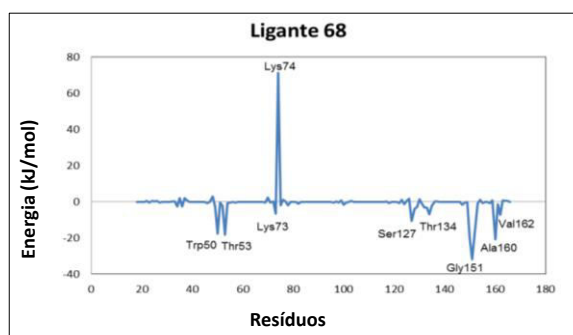
As serino proteases em geral apresentam um sítio ativo circundado por duas alças flexíveis em forma de um bolsão que permite o acesso de substratos ou inibidores com formas complementares.<sup>7,60</sup> A conformação da alça de inibição complementar ao sítio ativo da enzima a ser inibida permite uma ligação bastante forte entre a enzima e o inibidor.<sup>60,61</sup>



(A)



(B)



(C)

**Figura 4.** Gráficos de interação por resíduos após o tempo de 10 ns de simulação de DM para os ligantes (A) 17, (B) 25 e (C) 68

A forte interação repulsiva do resíduo de Lys74 observada nas Figuras 4A a 4C também foi encontrada por Othman e colaboradores,<sup>62</sup> no estudo de inibidores de pinostrobin, no qual a Lys74 está diretamente ligada ao resíduo de Asp75, e a formação de uma ligação de hidrogênio entre a Lys74 e o inibidor pode induzir uma mudança conformacional do Asp75 na região da tríade catalítica. A interação entre dos

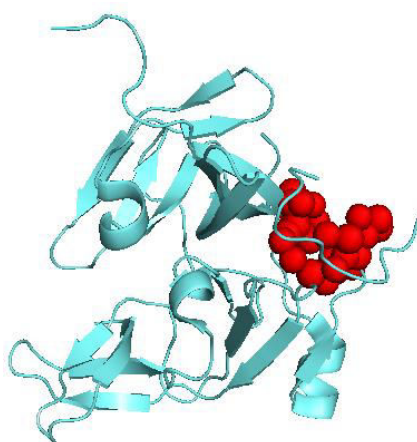
ligantes 17, 25 e 68 e o resíduo de Lys73 pode contribuir diretamente para a mudança conformacional do sítio ativo, porém de uma forma menos intensa que o resíduo Lys74.<sup>62</sup>

As interações atrativas por resíduo encontradas na DM entre os ligantes e a enzima da DENV foram identificadas para os resíduos de Ser34 (Figura 4A), Ser127 (Figura 4C), Ser131 (Figuras 4A e 4B) e o resíduo de Gly151 (Figuras 4A-4C) e são importantes

para a estabilidade do inibidor no sítio alostérico,<sup>62</sup> sendo que a interação com o resíduo de Gly151 corrobora com os resultados obtidos na docagem molecular. Desta forma, a identificação de um sítio diferente do sítio catalítico da enzima pode ser devido ao fato de a NS3/NS2B do vírus da dengue apresentar alças flexíveis que mudam sua conformação na presença de determinado tipo de inibidor, o que faz com que haja uma mudança do sítio de ligação desta enzima (sítio alostérico). Além disso,

um estudo de Erbel e colaboradores<sup>30</sup> também mostrou a importância do resíduo de Gly151 para o reconhecimento pelo substrato na enzima do DENV e da Febre do Nilo.

Como a serino protease do vírus da dengue apresenta outros sítios de ligação, além do sítio ativo da enzima, a fim de identificá-la foi utilizado o servidor on-line CASTp.<sup>20</sup> Na cavidade identificada na Figura 5, foi observada uma região correspondente ao sítio ativo (região em vermelho).

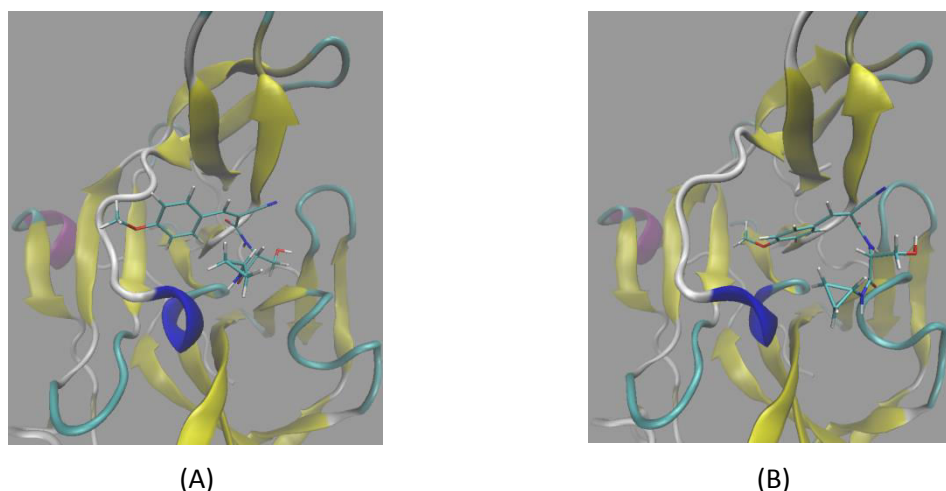


**Figura 5.** Cavidade para a serino protease NS3/NS2B do vírus da dengue obtidas no servidor on-line CASTp. Figura gerada pelo Pymol

Na Figura 5 pode-se identificar o sítio ativo da enzima (região vermelha), posição na qual as estruturas dos ligantes realizaram as ligações de hidrogênios na docagem molecular. Além disso, os resultados de dinâmica molecular mostraram que os ligantes permaneceram estáveis nessa cavidade, região no qual está presente a tríade catalítica da serino protease NS3/NS2B.<sup>63</sup> Como resultado os ligantes realizaram interações favoráveis com importantes resíduos de aminoácidos, como pode ser visto no gráfico de interação por

resíduos (Figura 4). Assim, foi possível observar também que ocorre uma mudança conformacional tanto do ligante como na macromolécula (Figuras 6 A e B), sendo que no alvo essa característica é devida à alta flexibilidade de suas alças, conforme corrobora os estudos de Piccirillo e colaboradores<sup>13</sup> e Almeida e colaboradores.<sup>7</sup>

Assim, os resultados de modelagem molecular foram capazes de propor e entender o modo de interação entre os compostos derivados de acrilamida e a enzima serino protease NS3/NS2B do DENV.



**Figura 6.** (A) Conformação inicial e (B) Conformação final para a estrutura 17 do ligante submetido à dinâmica molecular

#### 4. Conclusão

Através dos resultados da docagem molecular e a consecutiva análise consensual e visual foi possível selecionar os ligantes 17, 25 e 68 derivados da acrilamida que fizeram interação com resíduos importantes da serino protease NS3/NS2B e que pertencem à tríade catalítica, como os resíduos de His51, Ser135, Asp75. O pós-processamento das conformações obtidas na docagem molecular foi feita com a simulação de DM acoplada ao método híbrido QM/MM com um tempo de simulação de 10 ns, sendo que os ligantes permaneceram na cavidade da enzima que contém importantes resíduos de aminoácidos.

A análise dos valores do gráfico de RMSD mostrou que os sistemas enzima-ligantes permaneceram estáveis ao longo da simulação. Os gráficos de interação por resíduo mostrou um maior número de interações favoráveis, no qual os compostos 17, 25 e 68 fizeram importantes interações com os resíduos de Ser34, Trp50, Thr53, Lys73, Ala160 e Gly151, resíduos esses que apresentam uma contribuição mais favorável para a estabilização dos ligantes na enzima.

Além disso, os resultados de DM revelaram que os compostos selecionados

realizaram importantes ligações de hidrogênios com as regiões da alça flexível na enzima, já que, em geral, esse tipo de enzima apresenta um sítio ativo circundado por duas alças flexíveis em forma de um bolsão que permite o acesso de substratos. Desta forma, os resultados encontrados fornecem uma contribuição significativa no processo de planejamento de novos compostos derivados de acrilamida que apresentem maiores complementaridades com o sítio ativo da enzima NS3/NS2B serino protease do DENV.

#### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Nitsche, C.; Steuer, C.; Klein, C. D. Arylcianoacrylamides as inhibitors of the dengue and West Nile virus proteases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 7318. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Rothan, H. A.; Zulqarnain, M.; Ammar, Y. A.; Tan, E. C.; Rahman, N. A.; Yusof, R. Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay. *Tropical Biomedicine* **2014**, *31*, 286. [PubMed]
- <sup>3</sup> Incicco, J. J.; Gebhard, L. G.; Gonzalez-Lebrero, R. M.; Gamarnik, A. V.; Kaufman, S. B. Steady-state NTPase activity of Dengue virus NS3: number of catalytic sites,

- nucleotide specificity and activation by ssRNA. *Plos One* **2013**, *8*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>4</sup> Da Silva, J. B. P.; Navarro, D.; Da Silva, A. G.; Santos, G. K. N.; Dutra, K. A.; Moreira, D. R.; Ramos, M. N.; Espindola, J. W. P.; De Oliveira, A. D. T.; Brondani, D. J.; Leite, A. C. L.; Hernandez, M. Z.; Pereira, V. R. A.; DA Rocha, L. F.; De Castro, M.; De Oliveira, B. C.; Lan, Q.; Merz, K. M. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *100*, 162. [[CrossRef](#)]
- <sup>5</sup> Beatty, M. E.; Stone, A.; Fitzsimons, D. W.; Hanna, J. N.; Lam, S. K.; Vong, S.; Guzman, M. G.; Mendez-Galvan, J. F.; Halstead, S. B.; Letson, G. W.; Kuritsky, J.; Mahoney, R.; Margolis, H. S. Best practices in dengue surveillance: A report from the Asia-Pacific and Americas dengue prevention boards. *Plos Neglected Tropical Diseases* **2010**, *4*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>6</sup> Ul Qamar, M. T.; Kiran, S.; Ashfaq, U. A.; Javed, M. R.; Anwar, F.; Ali, M. A.; Gilani, A. U. Discovery of novel dengue NS2B/NS3 protease inhibitors using pharmacophore modeling and molecular docking based virtual screening of the ZINC database. *International Journal of Pharmacology* **2016**, *12*, 621. [[CrossRef](#)]
- <sup>7</sup> Almeida, H.; Bastos, I. M. D.; Ribeiro, B. M.; Maignet, B.; Santana, J. M. New binding site conformations of the dengue virus NS3 protease accessed by molecular dynamics simulation. *Plos One* **2013**, *8*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>8</sup> Mirza, S. B.; Salmas, R. E.; Fatmi, M. Q.; Durdagi, S. Virtual screening of eighteen million compounds against dengue virus: Combined molecular docking and molecular dynamics simulations study. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2016**, *66*, 997. [[CrossRef](#)]
- <sup>9</sup> Knox, J. E.; Ma, N. L.; Yin, Z.; Patel, S. J.; Wang, W. L.; Chan, W. L.; Rao, K. R. R.; Wang, G.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Lim, S. P.; Vasudevan, S. G.; Keller, T. H. Peptide inhibitors of West Nile NS3 protease: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 6585. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Li, L.F., Basavannacharya, C.; Chan, K. W. K.; Shang, L.; Vasudevan, S. G.; Yin, Z. Structure-guided discovery of a novel non-peptide inhibitor of dengue virus NS2B-NS3 protease. *Chemical Biology & Drug Design* **2015**, *86*, 255. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Qi, R. F.; Zhang, L.; Chi, C. W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2008**, *40*, 911. [[CrossRef](#)]
- <sup>12</sup> Doan, D. N. P.; Li, K. Q.; Basavannacharya, C.; Vasudevan, S. G.; Madhusudhan, M. S., Transplantation of a hydrogen bonding network from West Nile virus protease onto dengue-2 protease improves catalytic efficiency and sheds light on substrate specificity. *Protein Engineering Design & Selection* **2012**, *25*, 843. [[CrossRef](#)]
- <sup>13</sup> Piccirillo, E.; Merget, B.; Sottriffer, C. A.; Do Amaral, A. T. Conformational flexibility of DENV NS2B/NS3pro: from the inhibitor effect to the serotype influence. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2016**, *30*, 251. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Raut, R.; Beesetti, H.; Tyagi, P.; Khanna, I.; Jain, S. K.; Jeankumar, V. U.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Swaminathan, S. A small molecule inhibitor of dengue virus type 2 protease inhibits the replication of all four dengue virus serotypes in cell culture. *Virology Journal* **2015**, *12*, 1 [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Schwartz, L. M.; Halloran, M. E.; Durbin, A. P.; Longini, I. M. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* **2015**, *33*, 3293. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Brecher, M.; Chen, H.; Liu, B. B.; Banavali, N. K.; Jones, S. A.; Zhang, J.; Li, Z.; Kramer, L. D.; Li, H. M. Novel broad spectrum inhibitors targeting the flavivirus methyltransferase. *Plos One* **2015**, *10*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Panya, A.; Bangphoomi, K.; Choowongkamon, K.; Yenchitsomanus, P. T. Peptide inhibitors against dengue virus infection. *Chemical Biology & Drug Design* **2014**, *84*, 148. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Nitsche, C.; Schreier, V. N.; Behnam, M. A. M.; Kumar, A.; Bartenschlager, R.; Klein, C. D. Thiazolidinone-Peptide Hybrids as Dengue Virus Protease Inhibitors with Antiviral Activity in Cell Culture. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 8389. [[CrossRef](#)]
- <sup>19</sup> Panya, A.; Bangphoomi, K.; Choowongkamon, K.; Yenchitsomanus, P. T.

- Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 11348. [CrossRef]
- <sup>20</sup> Liang, J.; Edelsbrunner, H.; Woodward, C. Anatomy of protein pockets and cavities: Measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Science* **1998**, *7*, 1884. [PubMed]
- <sup>21</sup> Balamurugan, R.; Stalin, A.; Aravinthan, A.; Kim, J. H. Gamma-sitosterol a potent hypolipidemic agent: In silico docking analysis. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24*, 124. [CrossRef]
- <sup>22</sup> Santos, R. N.; Andricopulo, A. D. Physics and its interfaces with medicinal chemistry and drug design. *Brazilian Journal of Physics* **2013**, *43*, 268. [CrossRef]
- <sup>23</sup> Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design* **2011**, *7*, 146. [PubMed]
- <sup>24</sup> Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. *Journal of Molecular Modeling* **2003**, *9*, 47. [CrossRef]
- <sup>25</sup> Morris, G.M., Lim-Wilby, M, Molecular docking. *Molecular Modeling of Proteins* **2008**, *443*, 365. [PubMed]
- <sup>26</sup> Lang, P. T.; Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Pettersen, E. F.; Meng, E. C.; Thomas, V.; Rizzo, R. C.; Case, D. A.; James, T. L.; Kuntz, I. D. DOCK 6: Combining techniques to model RNA-small molecule complexes. *RNA-A Publication of the RNA Society* **2009**, *15*, 1219. [CrossRef]
- <sup>27</sup> Thomsen, R.; M.H. Christensen, MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 3315. [CrossRef]
- <sup>28</sup> Trott, O.; Olson, A. J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 455. [CrossRef]
- <sup>29</sup> Bissantz, C., G. Folkers, D. Rognan, Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 4759. [CrossRef]
- <sup>30</sup> Erbel, P.; Schiering, N.; D'Arcy, A.; Renatus, M.; Kroemer, M.; Lim, S. P.; Yin, Z.; Keller, T. H.; Vasudevan, S. G.; Hommel, U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nature Structural & Molecular Biology* **2006**, *13*, 372. [CrossRef]
- <sup>31</sup> Jakalian, A.; Bush, B. L.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic Charges. AM1-BCC model: I. Method. *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 132. [CrossRef]
- <sup>32</sup> Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605. [CrossRef]
- <sup>33</sup> Lang, P.T., *Generating Spheres*. 2012. [Link]
- <sup>34</sup> Connolly, M.L., The molecular-surface package. *Journal of Molecular Graphics* **1993**, *11*, 139. [PubMed]
- <sup>35</sup> Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **1982**, *161*, 269. [PubMed]
- <sup>36</sup> Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 505. [CrossRef]
- <sup>37</sup> Mesmoudi, M. D., I; Ghalem, S. Molecular docking studies on the interactions of human farnesyl pyrophosphate synthase with  $\alpha$ -aminobisphosphonates compounds. *International Journal of Chemical and Analytical Science* **2012**, *3*, 1560. [Link]
- <sup>38</sup> Silva, N.D., J. Lameira, and C.N. Alves, Computational analysis of aspartic protease plasmepsin II complexed with EH58 inhibitor: a QM/MM MD study. *Journal of Molecular Modeling* **2011**, *17*, 2631. [CrossRef]
- <sup>39</sup> Oda, A.; Tsuchida, K.; Takakura, T.; Yamaotsu, N.; Hirono, S. Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein Ligand

Complexes. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2006**, *46*, 380. [CrossRef]

<sup>40</sup> Pinheiro, A. S.; Duarte, J. B. C.; Alves, C. N.; De Molfetta, F. A. Virtual screening and molecular dynamics simulations from a bank of molecules of the Amazon region against functional NS3-4A protease-helicase enzyme of hepatitis c virus. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2015**, *176*, 1709. [CrossRef]

<sup>41</sup> Field, M. J.; Albe, M.; Bret, C.; Proust-De Martin, F.; Thomas, A. The Dynamo library for molecular simulations using hybrid quantum mechanical and molecular mechanical potentials. *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 1088. [CrossRef]

<sup>42</sup> Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 1198. [CrossRef]

<sup>43</sup> Sondergaard, C. R.; Olsson, M. H. M.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pK(a) values. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2011**, *7*, 2284. [CrossRef]

<sup>44</sup> Ruiz-Pernia, J. J.; Alves, C. N.; Moliner, V.; Silla, E.; Tunon, I. A QM/MM study of the reaction mechanism for the 3'-processing step catalyzed by HIV-1 integrase. *Journal of Molecular Structure-Theochem* **2009**, *898*, 115. [CrossRef]

<sup>45</sup> Lima, A. H.; Souza, P. R. M.; Alencar, N.; Lameira, J.; Govender, T.; Kruger, H. G.; Maguire, G. E. M.; Alves, C. N. Molecular modeling of *T. rangeli*, *T. brucei gambiense*, and *T. evansi sialidases* in complex with the DANA inhibitor. *Chemical Biology & Drug Design* **2012**, *80*, 114. [CrossRef]

<sup>46</sup> Silva, N. D.; Lameira, J.; Alves, C. N.; Marti, S. Computational study of the mechanism of half-reactions in class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 18863. [CrossRef]

<sup>47</sup> Dewar, M. J. S.; Zebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 - A new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 3902. [CrossRef]

<sup>48</sup> Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tiradorives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 11225. [CrossRef]

<sup>49</sup> Jorgensen, W. L.; Madura, J. D. Quantum and statistical studies of liquids.25. Solvation and conformation of methanol in water. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 1407. [CrossRef]

<sup>50</sup> Perola, E., Minimizing false positives in kinase virtual screens. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2006**, *64*, 422. [CrossRef]

<sup>51</sup> Laskowski, R. A.; Swindells, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51*, 2778. [CrossRef]

<sup>52</sup> Kondo, M.Y.; Okamoto, D. N.; Santos, J. A. N.; Juliano, M. A.; Oda, K.; Pillai, B.; James, M. N. G.; Juliano L.; Gouvea, I. E. Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 21437. [CrossRef]

<sup>53</sup> Patil, R.; Das, S.; Stanley, A.; Yadav, L.; Sudhakar, A.; Varma, A. K. Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *Plos One* **2010**, *5*, 1. [CrossRef]

<sup>54</sup> Steuer, C.; Gege, C.; Fischl, W.; Heinonen, K. H.; Bartenschlager, R.; Klein, C. D. Synthesis and biological evaluation of alpha-ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 4067. [PubMed]

<sup>55</sup> MOLEKEL references in [Link]

<sup>56</sup> Muri, E.M.F., Viral proteases: Important targets of peptidemimetic compounds. *Quimica Nova* **2014**, *37*, 308. [CrossRef]

<sup>57</sup> Sangachini, E. D.; Hasannia, S.; Taghdir, M.; Pirooznia, N.; Ghadicholaei, K. K. Construction of an engineered alpha 1-antitrypsin with inhibitory activity based on theoretical studies. *Electronic Journal of Biotechnology* **2012**, *15*, 1. [CrossRef]

- <sup>58</sup> Moonrin, N.; Songtawee, N.; Rattanabunyong, S.; Chunsriviro, S.; Mokmak, W.; Tongtima, S.; Choowongkamon, K. Understanding the molecular basis of EGFR kinase domain/MIG-6 peptide recognition complex using computational analyses. *BMC Bioinformatics* **2015**, *16*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>59</sup> Bode, W.; Huber, R. Natural protein proteinase-inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry* **1992**, *204*, 433. [[CrossRef](#)]
- <sup>60</sup> Esteves, G. F.; Lima Teles, R. C.; Cavalcante, N. S.; Neves, D.; Ventura, M. M.; Ribeiro, J. A.; Barbosa, G.; De Freitas, S. M. Crystallization, data collection and processing of the chymotrypsin-BTCI-trypsin ternary complex. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **2007**, *63*, 1087. [[CrossRef](#)]
- <sup>61</sup> Lin, G. D.; Bode, W.; Huber, R.; Chi, C. W.; Engh, R. A. The 0.25-nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. *European Journal of Biochemistry* **1993**, *212*, 549. [[CrossRef](#)]
- <sup>62</sup> Othman, R.; Kiat, T. S.; Khalid, N.; Yusof, R.; Newhouse, E. I.; Newhouse, J. S.; Alam, M.; Rahman, N. A. Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: Understanding the interactions with allosteric binding sites. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2008**, *48*, 1582. [[CrossRef](#)]
- <sup>63</sup> Khalid, S.; Paul, S. Identifying a C-terminal ATP binding sites-based novel Hsp90-inhibitor *in silico*: A plausible therapeutic approach in Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses* **2014**, *83*, 39. [[PubMed](#)]