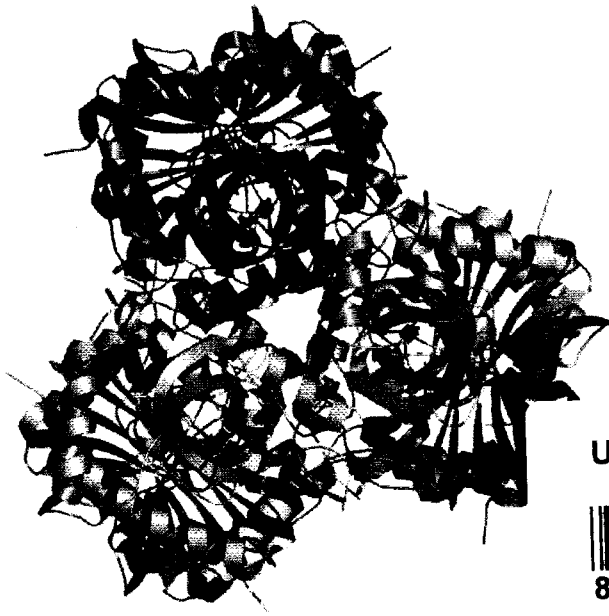


**ESTUDOS CINÉTICOS E DAS RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE A ESTRUTURA E
ATIVIDADE DE INIBIDORES DA PURINA NUCLEOSÍDEO FOSFORILASE BOVINA E
DE *Schistosoma mansoni***



OK

USP/IFSC/SBI



8-2-001699

Caroline Barros Valadão de Paula

Dissertação apresentada ao Instituto
de Física de São Carlos, da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências: Física Aplicada-Opção
Física Biomolecular

**Orientador: Dr. Adriano Defini
Andricopulo**

São Carlos, setembro de 2005

de Paula, Caroline Barros Valadão,

Estudos Cinéticos e das Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade de Inibidores da Purina Nucleosídeo Fosforilase bovina e de *Schistosoma mansoni*. Caroline Barros Valadão de Paula, São Carlos, 2005. 76 p.

Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada da Universidade de São Paulo. São Carlos. 2005.



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE **CAROLINE BARROS VALADÃO DE PAULA**,
APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS,
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 23/09/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Adriano Defini Andricopulo

Dr. Adriano Defini Andricopulo (Orientador e Presidente)

Glaucius Oliva

Prof. Dr. Glaucius Oliva - IFSC / USP

Carlos Alberto Montanari

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari - IQSC / USP

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

À minha família pelo amor, incentivo e paciência

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Adriano D. Andricopulo, meu orientador, pela incansável e valiosa orientação, sem a qual esse trabalho não teria sido realizado.
- Ao Professor Carlos Montanari, pela confiança transmitida.
- Aos docentes de meu curso de bacharelado em Farmácia, em especial aos Professores Antônio Taranto Goulart e Valdir Peres.
- À minha mãe, Magali, professora, que sempre me incentivou muito.
- À minha irmã, Flávia, que esteve sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.
- Ao meu irmão, Guilherme, que sempre foi referência de personalidade em minha vida.
- Aos amigos que deixei em Patos de Minas.
- Aos amigos: Aderson, Lívia, Nádia, Káthia e Rodrigol, que sempre colocaram os meus problemas a frente dos seus, me proporcionando um melhor ambiente de trabalho.
- Ao aluno de iniciação científica Matheus Pereira Postigo, pelo auxílio nas medidas cinéticas.
- Aos Drs. Marcelo Castilho e Káthia Honório, pelo auxílio no desenvolvimento dos modelos de QSAR.
- Ao Instituto de Física de São Carlos – IFSC-USP, aos professores, funcionários e estudantes, pela colaboração e excelente suporte para a realização deste trabalho.
- Aos Professores e amigos do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CEPID-FAPESP, que contribuíram positivamente para a realização deste trabalho.
- Ao CNPq, pela concessão da bolsa que propiciou a realização de meu mestrado.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO	2
1. Química Medicinal e a Descoberta de Novos Fármacos	2
2. Inovação e Desenvolvimento da Indústria Farmacêutica	2
3. Desenvolvimento de Fármacos na Indústria Farmacêutica	4
4. Planejamento de Novos Fármacos	4
5. A Seleção de Alvos Moleculares	6
6. A Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase Humana	7
7. Doenças Parasitárias Tropicais	9
8. A Esquistossomose	10
9. A Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de <i>Schistosoma mansoni</i>	14
10. Química Medicinal e as Técnicas de QSAR	16
11. Holograma QSAR	17

CAPÍTULO II

II. OBJETIVOS	22
----------------------	----

CAPÍTULO III

III. PARTE EXPERIMENTAL	24
1. Inibidores	24
2. Expressão e Purificação da PNP de <i>S. mansoni</i>	24
3. Ensaio Cinéticos: Determinação de Valores de K_m e IC_{50}	24
4. Análises de QSAR	26
5. Conjunto de Dados	26
6. Modelos de Holograma QSAR	26

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1. Determinação da Constante de Michaelis-Menten para a Enzima PNP de <i>S. mansoni</i>	30
2. Padronização e Validação dos Ensaio Biológicos	33
3. Cinética Enzimática e Determinação de Valores de IC_{50}	34
4. Estudo das Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade de uma Série de inibidores da PNP bovina	36
5. Estudos das Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade de Inibidores da PNP de <i>S. mansoni</i>	53

CAPÍTULO V

V. CONCLUSÃO	67
---------------------	----

CAPÍTULO VI

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
---------------------------------------	----

ANEXO I	77
----------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
CEPID	Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão
CoMFA	Análise Comparativa dos Campos Moleculares
CRC	Algoritmo Cíclico da Verificação de Redundância
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
HQSAR	Holograma QSAR
IC ₅₀	Concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IMP	Inosina 5-monofosfato
IND	Investigação de Novos Fármacos
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LBDD	Planejamento Baseado na Estrutura do Ligante
NCE	Nova Entidade Química
NDA	Aplicação de Novos Fármacos
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PLS	Regressões Multivariadas por Mínimos Quadrados Parciais
PNP	Purina Nucleosídeo Fosforilase
QSAR	Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade
QSAR 2D	Relações Quantitativas Bidimensionais entre a Estrutura e Atividade
QSAR 3D	Relações Quantitativas Tridimensionais entre a Estrutura e Atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Relações entre a Estrutura e Atividade
SBDD	Planejamento Baseado em Estruturas
TDR	<i>Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases</i>
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação catalisada pela PNP	8
Figura 2	Esquema proposto para a via de salvação de purinas nos eritrócitos infectados por <i>S. mansoni</i>	15
Figura 3	Esquema ilustrativo do processo de obtenção do holograma molecular	18
Figura 4	Etapas envolvidas no método HQSAR	20
Figura 5	Método de ensaio espectrofotométrico da PNP de <i>S. mansoni</i>	25
Figura 6	Gráfico de Michaelis-Menten para os dados cinéticos da PNP de <i>S. mansoni</i> coletados na Tabela 3	32
Figura 7	Equação de Michaelis-Menten	32
Figura 8	Curva dose-resposta utilizada na determinação de IC ₅₀ do inibidor 27 do conjunto de dados (Tabela 9)	35
Figura 9	Relação entre os valores experimentais e preditos de pIC ₅₀ para os 68 inibidores da PNP (conjuntos treinamento e teste)	51
Figura 10	Mapa de contribuição de HQSAR para o composto 28	52
Figura 11	Relação entre os valores experimentais e preditos de pIC ₅₀ para os 32 inibidores da PNP de <i>S. mansoni</i> (conjuntos treinamento e teste)	64
Figura 12	Mapa de contribuição de HQSAR para o composto 9	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais características da esquistossomose	13
Tabela 2	Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR	19
Tabela 3	Velocidade inicial em função da concentração de inosina para a reação enzimática catalisada pela enzima PNP de <i>S. mansoni</i>	31
Tabela 4	Estimativa dos valores da constante cinética de Michaelis-Menten	33
Tabela 5	Estruturas químicas e os correspondentes valores de IC ₅₀ para a série de inibidores da enzima PNP bovina	36
Tabela 6	Análise de HQSAR para as várias combinações de distinção de fragmento empregando o tamanho padrão do fragmento (4-7)	47
Tabela 7	Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos utilizando a melhor distinção observada (A/B/C/Ch)	48
Tabela 8	Valores experimentais e preditos de pIC ₅₀ , associados aos resíduos para os compostos do conjunto teste.	50
Tabela 9	Valores de IC ₅₀ para o conjunto de inibidores da PNP de <i>S. mansoni</i>	54
Tabela 10	Efeito da distinção dos fragmentos sobre o modelo de HQSAR de inibidores da PNP de <i>S. mansoni</i> , utilizando o tamanho padrão de fragmento (4-7)	60
Tabela 11	Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos dos modelos de HQSAR da PNP de <i>S. mansoni</i> utilizando as distinções de fragmento A/B/C/H e A/B/C/H/Ch	62
Tabela 12	Valores experimentais e preditos de pIC ₅₀ , associados aos resíduos para os compostos do conjunto teste	63

RESUMO

As ferramentas computacionais de modelagem molecular e de QSAR estão integradas ao processo de planejamento de fármacos na busca inesgotável por novas moléculas bioativas de elevado interesse terapêutico. O trabalho em Química Medicinal realizado nesta dissertação de mestrado envolveu o estudo das relações entre a estrutura e atividade de inibidores da enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) bovina e de *Schistosoma mansoni*.

A potência de uma série de inibidores da PNP de *S. mansoni* foi determinada experimentalmente através da medida de valores de IC_{50} , empregando um ensaio cinético padronizado e validado. Conjuntos de dados padrões para inibidores da enzima PNP bovina e de *S. mansoni* foram organizados, contendo os dados de estrutura e atividade correspondentes. Estes conjuntos formaram a base científica para o desenvolvimento dos modelos preditivos de QSAR 2D, empregando o método holograma QSAR.

Os modelos finais de HQSAR desenvolvidos possuem alta consistência interna e externa, apresentando bom poder preditivo. Estes modelos, em conjunto com as informações obtidas dos mapas de contribuição de HQSAR, são guias químico-medicinais importantes no planejamento de inibidores mais potentes e seletivos, candidatos a protótipos de novos fármacos na quimioterapia segura das doenças alvo deste trabalho.

ABSTRACT

Computational tools for molecular modeling and QSAR are well-integrated into the drug design process in the search for new bioactive molecules of significant therapeutic interest. The Medicinal Chemistry work done in this dissertation involved structure-activity studies of inhibitors of bovine and *Schistosoma mansoni* purine nucleoside phosphorylase (PNP).

The potency of a series of *S. mansoni* inhibitors was experimentally determined through measurements of IC_{50} values, employing a standard validated kinetic assay. Data sets for bovine and *S. mansoni* PNP were organized, encompassing the structural information and corresponding biological data. These data sets established the scientific basis for the development of the predictive QSAR models using the hologram QSAR method.

The final HQSAR models generated possess both good internal and external consistency with good correlative and predictive power. These models and the information obtained from the HQSAR contribution maps should be useful in guiding future medicinal chemistry efforts designed to discover novel potent and selective inhibitors as drug candidates for the chemotherapy of the target diseases of this work.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Química Medicinal e a Descoberta de Novos Fármacos

A Química Medicinal, de caráter trans-, inter-e multidisciplinar, tem evoluído significativamente nas últimas duas décadas como resultado dos avanços científicos e tecnológicos notáveis no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.¹ A fantástica evolução da Química Medicinal moderna, com a descoberta de inúmeras substâncias bioativas, tem permitido inovações terapêuticas significativas. A descoberta de fármacos de notável importância (do inglês *blockbuster drugs*; termo usado para designar os fármacos com vendas anuais superiores a US\$ 1 billhão) é a base do desenvolvimento da indústria a nível mundial.^{1,2}

Os métodos em quimio- e bioinformática usados nos estudos em Química Medicinal são fontes de valor inesgotável na busca por novas moléculas bioativas.³ O uso destas ferramentas inovativas, associado ao trabalho biológico experimental, fornece os subsídios necessários para os estudos das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR) e para o estudo das interações fármaco-receptor, resultando no planejamento de novas substâncias bioativas com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas, capazes de originarem novos fármacos ou aprimorarem os já existentes.^{1,2,4}

2. Inovação e Desenvolvimento da Indústria Farmacêutica

O processo de descoberta de novos fármacos é longo, complexo, de alto custo e elevado risco.⁵ Considerando-se desde o projeto inicial até o lançamento

de um novo fármaco no mercado, são investidos em média entre 12 e 15 anos em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento), com custos totais estimados na ordem de US\$ 880 milhões, embora custos de até US\$ 1,4 bilhões também venham sendo divulgados.^{6,7}

Os freqüentes avanços significativos nas interfaces das ciências químico-biológicas têm refletido em mudanças profundas nas possibilidades de tratamento das mais diversas doenças, propiciando melhorias na qualidade de vida da população do planeta.

A indústria farmacêutica tem ampliado enormemente seus investimentos em P&D nos últimos anos, sendo que a inovação, dentro de um contexto pluridisciplinar efetivo, tem sido o centro deste processo. Os debates a respeito do crescimento no cuidado da saúde humana e o desenvolvimento de novas tecnologias focalizaram-se principalmente na indústria farmacêutica, que é a grande responsável pelos avanços tecnológicos relacionados ao cuidado da saúde humana.^{7,8}

A inovação tornou-se uma constante na indústria farmacêutica. O crescimento e o desenvolvimento da indústria estão ligados diretamente a sua capacidade de introduzir novos fármacos no mercado, sejam estes pioneiros, inovativos, de primeira, segunda, ou terceira gerações, mas, sobretudo, capazes de proporcionar grandes lucros. Os fármacos pioneiros dão origem geralmente a um ou mais fármacos de segunda e terceira gerações, os quais apresentam de modestos a significativos resultados terapêuticos, proporcionando maiores e contínuas recompensas financeiras para as companhias farmacêuticas. O avanço significativo no processo de desenvolvimento de fármacos evidencia o enorme empenho que os maiores laboratórios farmacêuticos têm despendido em ampliar o índice de inovação.^{5,9}

3. Desenvolvimento de Fármacos na Indústria Farmacêutica

Uma nova entidade química (NCE, do inglês *new chemical entity*), quando aprovada nas fases pré-clínicas, é submetida a proposta de investigação de um novo fármaco (IND, do inglês *investigational new drug*). Após aprovação da IND pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), são realizados testes clínicos em humanos, examinando entre outras, a farmacocinética, dosagem, segurança e eficácia clínica do fármaco, gerando uma série de dados que servem como documentos de suporte para a requisição de aprovação de um novo fármaco (NDA, do inglês *new drug application*). Além disso, questões econômicas e de mercado estabelecem o potencial em relação ao custo-benefício do novo fármaco.^{7,9,10}

Atualmente, a indústria farmacêutica está entre os setores produtivos mais lucrativos, indicando que os altos investimentos em P&D não impedem um retorno financeiro significativo.^{7,8,11} A indústria farmacêutica multinacional sobrevive e se desenvolve com base nas inovações que levam a descoberta de novos fármacos. O potencial de mercado para cada novo fármaco lançado é estimado entre US\$ 250 milhões e US\$ 1 bilhão.⁷

4. Planejamento de Novos Fármacos

O processo de descoberta de novos fármacos é caracterizado pela alta incidência de insucessos, representando cerca de 76% do número de moléculas até a IND, podendo chegar a um número superior a 90% até o final das triagens clínicas.^{1,2,7,9} Para alcançar as exigências de produtividade impostas pelos elevados níveis de investimentos em P&D, as maiores companhias farmacêuticas

do mundo têm adotado como estratégia principal o investimento em novas tecnologias para a descoberta de novos fármacos, procurando a integração mais efetiva possível entre as áreas do conhecimento. A Química Medicinal possui papel fundamental neste contexto, sendo o centro deste processo complexo.^{1,4,6}

A indústria farmacêutica enfrenta o constante desafio de alcançar suas ambiciosas metas de produtividade. Nos últimos anos, as metas de crescimento não tem sido atingidas como pode ser observado na queda no número de NCEs que estão em desenvolvimento clínico, com conseqüente reflexo direto no número de novos fármacos que chegam ao mercado farmacêutico.^{1,5,6,7}

Diversas estratégias vêm sendo exploradas com o objetivo de melhorar os níveis de produtividade em P&D, visando, portanto, reduzir os custos e o tempo das etapas do processo. Uma estratégia moderna envolve a redução no número de compostos químicos a serem testados em ensaios biológicos de relevância contra um alvo determinado. Dessa forma, a geração de coleções dirigidas de compostos e a síntese guiada por estudos de SAR/QSAR são bastante promissores na minimização do universo de moléculas a serem consideradas nos programas de P&D.^{1,2,7} O emprego da biologia molecular, bioquímica, biologia estrutural, farmacologia e química medicinal e computacional são extremamente importantes para o sucesso das pesquisas e para o melhor entendimento das interfaces entre química e biologia na pesquisa por novas moléculas bioativas.

A estratégia de planejamento de substâncias químicas bioativas fundamenta-se no conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos no mecanismo fisiopatológico do processo evolutivo da doença ou desordem, possibilitando assim, a escolha de um alvo terapêutico apropriado.^{1,7,8} Este alvo, representado por uma biomacromolécula (e.g., enzimas, receptores), pode ter sua estrutura molecular conhecida ou não. No primeiro caso, o conhecimento da

topografia molecular tridimensional do receptor (sítio ativo) permite o planejamento de fármacos baseado em estruturas (SBDD, do inglês, *structure-based drug design*). Neste processo podem ser identificados novos ligantes com propriedades estruturais complementares aquelas do receptor biológico, refletindo a interação fármaco-receptor, ou seja, a fase farmacodinâmica do processo. Entretanto, vale ser ressaltado que estes ligantes geralmente apresentam uma série de propriedades que devem ser otimizadas, para que possa ser atingido o perfil farmacodinâmico e farmacocinético apropriado das NCEs com futuro emprego terapêutico.¹

Em contraste, a estrutura do bioreceptor eleito como alvo terapêutico pode não ser conhecida. Neste caso, o planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês, *ligand-based drug design*), seja este o substrato natural do receptor, ou outros ligantes bioativos conhecidos (e.g, inibidores, agonistas, antagonistas). Uma outra estratégia importante envolve o emprego destas duas estratégias em conjunto, permitindo explorar características do alvo e de moléculas bioativas. As técnicas cristalográficas de raios-X, empregadas conjuntamente com as técnicas de RMN multidimensional, tem proporcionado a elucidação estrutural, com alta resolução, de muitas proteínas, incluindo muitos alvos biológicos interessantes.^{1,2,4}

5. A Seleção de Alvos Moleculares

A identificação, caracterização e validação de alvos moleculares plausíveis são de fundamental importância. Enzimas-chave podem ser selecionadas como alvos moleculares para o planejamento racional de NCEs candidatas a protótipos de novos fármacos.^{1,12,13}

Após a seleção dos alvos moleculares apropriados, a etapa seguinte é encontrar moléculas pequenas capazes de modular a atividade do alvo macromolecular em um caminho que fornecerá segurança e efetividade no tratamento ou prevenção de desordens ou doenças humanas. Historicamente, a inibição enzimática tem se apresentado como um caminho promissor para a descoberta de fármacos muito importantes na clínica médica.^{1,12,13}

As enzimas purina nucleosídeo fosforilase bovina e de *Schistosoma mansoni* foram selecionadas no Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - CBME-IFSC-CEPID/FAPESP como os alvos moleculares de interesse neste projeto de mestrado.

Os dados estrutura e atividade provenientes de projetos bem estabelecidos de planejamento de fármacos são muito apropriados para a criação de conjuntos padrões de dados e o desenvolvimento de modelos de QSAR. Estes modelos, por sua vez, são úteis no planejamento de novas moléculas com propriedades farmacoterapêuticas otimizadas, candidatas a protótipos de novos fármacos.

6. A Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase Humana

Purina nucleosídeo fosforilase (PNP; EC 2.4.2.1) é considerada um alvo muito atrativo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. O interesse na PNP como alvo para a descoberta de fármacos deve-se ao seu importante papel no metabolismo de purinas, e também à observação que a deficiência genética desta enzima está associada à disfunção seletiva das células T, sem o envolvimento na função das células B.^{14,15} Uma Figura da estrutura cristalográfica da PNP pode ser visualizada na capa desta dissertação.⁵⁶

A enzima PNP catalisa a clivagem da ligação glicosídica de (desoxi) ribonucleosídeos para produzir a correspondente base purina e (desoxi) ribose-1-fosfato,^{15,16,17} de acordo com a Figura 1.

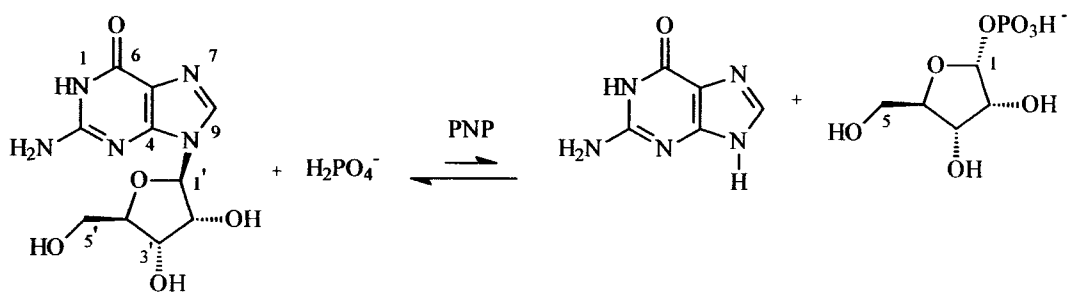


Figura 1. Reação catalisada pela PNP.

A importância da PNP para a integridade do sistema imunológico tornou-se evidente com a descrição em 1975, de uma rara e única forma de imunodeficiência severa caracterizada pela perda das funções normais das células T, em crianças que apresentavam deficiência ou completa perda da atividade desta enzima.¹⁸ As manifestações clínicas desta imunodeficiência em vários pacientes foram detalhadas através de estudos posteriores.^{19,20} As anormalidades metabólicas não convencionais provenientes da deficiência da PNP tornam esta enzima um importante alvo quimioterápico.²¹ A PNP é uma enzima chave na rota de salvamento de purinas, fornecendo uma alternativa para a biossíntese de novo de nucleotídeos purinas.^{14,15,22} A deficiência da PNP resulta no aumento da biossíntese *de novo* de purinas e na acentuada elevação de nucleosídeos da guanina e hipoxantina no plasma e na urina.²³

A PNP é essencial às funções normais das células T. Em particular, indivíduos com deficiência genética desta enzima apresentam diversas combinações de doenças imunodeficientes nas quais as funções das células T

estão comprometidas ou ausentes.²⁴ Este perfil sugere que inibidores da PNP possam ser usados no tratamento de doenças proliferativas das células T, como linfoma e leucemia das células T,^{22,24} e no tratamento da rejeição de órgãos transplantados. Apresentam também, uso potencial como agentes imunossupressivos para o tratamento de certas doenças auto-imunes mediadas pelas células T, incluindo artrite reumatóide,²⁵ diabetes do tipo 1, lúpus e psoríase.²⁶

Outras possibilidades para o uso de inibidores da PNP, não relacionadas com a resposta imune, são os estados hiperuricêmicos, como o tratamento da gota primária.²⁷ Manifestações clínicas em crianças deficientes da PNP incluem estados hipouricêmicos, aumento na biossíntese *de novo* e notável elevação de nucleosídeos da guanina e hipoxantina no plasma e na urina. Pelo fato destes nucleosídeos serem mais solúveis que a xantina ou o ácido úrico, a excreção dos produtos dos ácidos nucleicos degradados pode ser facilitada, e o perigo da cristalização do ácido úrico prevenido pela administração de um inibidor potente da PNP.¹⁵

7. Doenças Parasitárias Tropicais

As doenças endêmicas parasitárias têm recebido grande atenção nos programas especiais do chamado *TDR (Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases)* da Organização Mundial de Saúde (OMS).²⁸ Para várias das doenças infecto-parasitárias consideradas prioritárias nestes programas, como a malária, esquistossomose, doença de Chagas, tripanossomíase-africana e leishmaniose, não existem vacinas disponíveis e os fármacos permanecem o centro do controle destas doenças. Contudo, o

repertório de fármacos disponível é limitado e/ou inadequado, e o quadro é bastante agravado pela emergência de cepas de parasitas resistentes. Novos fármacos são necessários imediatamente e continuarão a ser no futuro, uma vez que os parasitas acabam desenvolvendo, através de mecanismos diversos, resistência aos quimioterápicos mais freqüentemente usados.^{28,29}

O aumento considerável nos custos do desenvolvimento de novos fármacos, combinado com as perspectivas de retornos financeiros inadequados, tem como resultado a quase total inexistência de investimentos em P&D na área de doenças tropicais pelas companhias farmacêuticas e biotecnológicas do primeiro mundo.^{28,29} Desta forma, os programas de pesquisa em doenças tropicais devem ser conduzidos pelas universidades e institutos de pesquisa governamentais em parcerias com as companhias farmacêuticas dos países em desenvolvimento.^{28,30} O Brasil, assim como outros países nesta categoria, possuem recursos humanos qualificados, centros de pesquisa e agências de fomento capazes de associar a experiência e as estratégias da indústria internacional para enfrentar estes desafios de forma eficaz. Os resultados destas iniciativas seriam percebidos no fortalecimento da política científica e tecnológica destes países, no desenvolvimento da ciência e educação, na formação contínua de recursos humanos qualificados, e, sobretudo, na sua benfeitoria mais nobre, no melhoramento das condições de saúde pública e bem-estar social das populações que sofrem com as doenças infecto-parasitárias.^{29,30}

8. A Esquistossomose

As doenças tropicais têm relação intrínseca não só com o ecossistema, mas também com a condição social da população decorrente da pobreza. Além

dos fatores sociais e geográficos, existem os problemas técnicos, políticos e administrativos, que são comuns a quaisquer programas de saúde pública. Resolver ou minimizar estes problemas implicam em ações como uso de tecnologias apropriadas, melhoria na infra-estrutura sanitária básica, enfoque epidemiológico, decisões políticas e participação mais ativa da sociedade. Novos paradigmas têm que ser estabelecidos para o combate às doenças tropicais.

A esquistossomose é uma doença endêmica que afeta 300 milhões de indivíduos em 76 países.^{31,32} Segundo dados da OMS, esta é a segunda doença tropical mais importante em termos sócio-econômicos e de saúde pública, antecedida pela malária.³²

Dentre as diversas espécies do gênero *Schistosoma*, a única encontrada no Brasil é o *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansoni. A transmissão é mais comum no nordeste e no norte de Minas Gerais, mas todos os estados têm áreas afetadas. O *S. mansoni* é um trematódeo da família Schistosomatidae que vive nos vasos sanguíneos do sistema hepático do hospedeiro definitivo, que pode agir de forma devastadora sobre o sistema digestivo e urinário e levar até a morte. A infecção é difundida com uma taxa de mortalidade relativamente baixa, mas, por outro lado, com uma taxa de morbidade alta. A debilidade causada em milhões de indivíduos por essa doença está associada freqüentemente à propostas de desenvolvimento de recursos de água, como represas e esquemas da irrigação, onde o hospedeiro intermediário (molusco aquático, do gênero *Biomphalaria*) do parasita se reproduz.^{30,32}

Mesmo sendo de simples diagnóstico e tratamento, a esquistossomose continua sendo um sério problema de saúde pública. Não basta o controle da morbidade, isto é, impedir o aparecimento das formas hepato-esplênicas da esquistossomose, é necessário que haja também um controle da transmissão,

que visa interromper o ciclo evolutivo do parasita e, conseqüentemente, o surgimento de novos casos.²⁹ No entanto, o controle da transmissão vai além da capacidade dos médicos e especialistas e deve ser feito com ações governamentais direcionadas, além de concentrar esforços também no diagnóstico e tratamento apropriado dos indivíduos infectados com fármacos eficazes.³³

As principais estratégias para o controle da doença se fundamentam no tratamento quimioterápico dos indivíduos infectados, saneamento básico, educação sanitária e combate aos caramujos vetores.³⁴ O programa da OMS para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose, não indica a viabilidade de emprego clínico a curto ou médio prazo de nenhum dos antígenos selecionados.

Os fármacos de escolha para o tratamento da esquistossomose, a oxamniquina (Mansil®), praziquantel (Biltricide®) e metrifonato (MemoBay®), produzem alguns efeitos colaterais sérios e deparam-se com a emergência de cepas de *Schistosoma* resistentes.^{14,29}

Esse cenário torna evidente a necessidade de novos agentes para a quimioterapia da esquistossomose, que sejam eficazes, não tóxicos e de baixo custo.¹⁵

A Tabela 1 apresenta de forma resumida as principais características associadas à esquistossomose.

Tabela 1. Principais características da esquistossomose.**Aspectos Clínicos**

▶ **Descrição:** Pode permanecer assintomática ou sintomatológica podendo ser dividida em:

- ▶ Dermatite cercariana
- ▶ Esquistossomose aguda
- ▶ Esquistossomose crônica

▶ **Manifestações clínicas:** Variam, dependendo da localização e intensidade do parasitismo:

- ▶ Tipo I ou forma intestinal
- ▶ Tipo II ou forma hepatointestinal
- ▶ Tipo III ou forma hepatoesplênica compensada
- ▶ Tipo IV ou forma hepatoesplênica descompensada

▶ **Tratamento:** Fármacos de escolha: oxamniquina, praziquantel, metrifonato

Aspectos Epidemiológicos

▶ **Descrição:** Requer caramujos (hospedeiros intermediários) de água doce, parada ou com pouca correnteza

▶ **Agente Etiológico:** *Schistosoma mansoni*, trematódeo, da família Schistosomatidae, gênero *Schistosoma*

▶ **Reservatório:** O homem é o reservatório principal, mas também roedores, marsupiais, carnívoros silvestres e ruminantes são infectados

▶ **Hospedeiros Intermediários:** Caramujos do gênero *Biomphalaria*. A *B. glabrata* é o vetor mais importante

Medidas de Controle

▶ **Descrição:** Controle dos portadores, hospedeiros e intermediários

- ▶ Modificação permanente das condições de transmissão
- ▶ Ações de educação em saúde e mobilização comunitária incluem
- ▶ Coleta e tratamento de dejetos
- ▶ Abastecimento de água potável
- ▶ Eliminação de coleções hídricas que sejam criadouros de moluscos

9. A Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*

É amplamente conhecida que a maior diferença entre o metabolismo de parasitas e do homem é a via de síntese de purinas. Em contraste com seu hospedeiro definitivo, o *S. mansoni* não possui a via *de novo* para a síntese de purinas, dependendo exclusivamente da via de salvação para a síntese de RNA e DNA durante a sua replicação nos eritrócitos humanos. A via de salvação de purinas, essencial para o crescimento do parasita, tem sido identificada como um potencial alvo para quimioterapia.^{17,22-24}

A adenosina é o principal nucleosídeo purina nos eritrócitos humanos, mas a atividade da adenosina quinase de *S. mansoni* é muito baixa. Por outro lado, adenosina desaminase é bastante ativa nos eritrócitos e no *S. mansoni*. Portanto, a desaminação e subsequente fosforólise da inosina, reação catalisada pela PNP, produz hipoxantina, principal precursor na via de salvação de purinas.^{15,21-23} No homem, não existe atividade de adenosina fosforilase e adenina é presente em concentrações muito baixas. A hipoxantina é convertida em inosina 5'-monofosfato (IMP) pela ação da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT), presente em grandes quantidades em *S. mansoni*. Este caminho faz da hipoxantina o precursor comum para todos os nucleotídeos purina no parasita.^{34,35} No homem, a hipoxantina é formada a partir de nucleosídeos através da fosforólise da inosina, reação catalisada pela PNP. Estas características únicas do metabolismo de purinas do homem e do parasita, fazem da PNP de *S. mansoni* um alvo importante para o planejamento racional de novos fármacos.³⁴⁻³⁶ O esquema ilustrativo é apresentado na Figura 2.

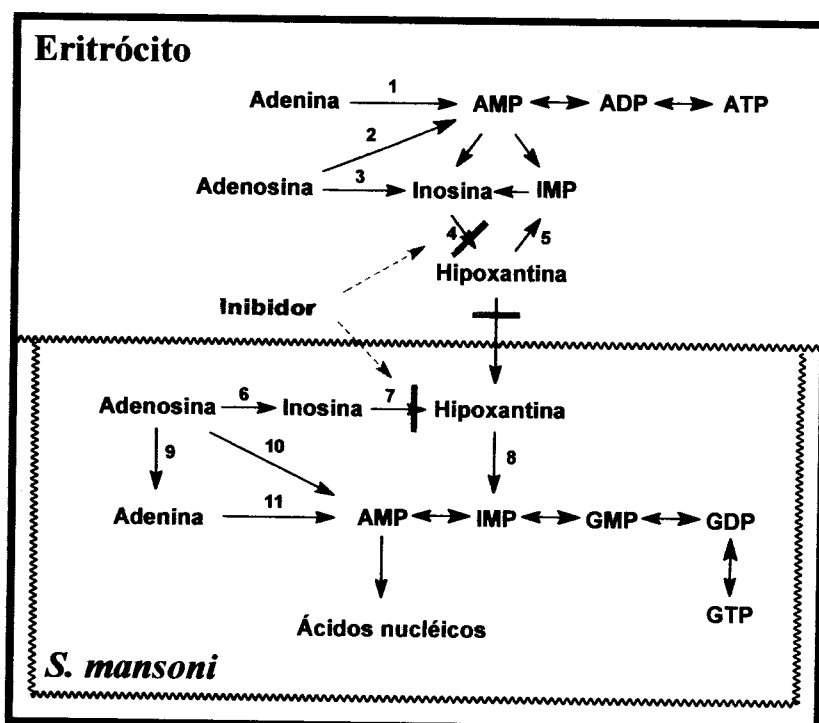


Figura 2. Esquema proposto para a via de salvaguarda de purinas nos eritrócitos infectados por *S. mansoni*. Racionalidade para o uso de inibidores da PNP. As enzimas do eritrócito (1-5) são: 1, APRTase; 2, adenosina quinase; 3, adenosina desaminase; 4, PNP; 5, HGPRTase. As enzimas correspondentes para *S. mansoni* (6-11) são: 6, adenosina desaminase; 7, PNP; 8, HGPRTase; 9, adenosina fosforilase; 10, adenosina quinase; 11, APRTase.

O uso de inibidores potentes da PNP impediria a produção de hipoxantina a partir de inosina, levando a uma condição metabólica potencialmente letal para o parasita em seu hospedeiro definitivo (Figura 2). Contudo, o transporte de nucleosídeos e bases entre o eritrócito e *S. mansoni* sugere a necessidade da inibição da PNP humana também, para induzir a morte do parasita por escassez de fontes de purinas, sem efeito em seu hospedeiro. Tal hipótese faz dos inibidores da PNP de *S. mansoni* candidatos a protótipos de novos fármacos na quimioterapia da esquistossomose.

10. Química Medicinal e as Técnicas de QSAR

As ferramentas computacionais de quimioinformática e bioinformática, em particular de QSAR bidimensional (2D) e QSAR tridimensional (3D), usadas nos estudos em Química Medicinal, são fontes de valor inesgotável na busca por novas moléculas bioativas. Vários artigos de revisão cobrindo diferentes aspectos na área de QSAR tem sido publicados.³⁷⁻³⁹ Os métodos de QSAR buscam identificar e quantificar as relações predominantes no amplo campo de modelagem, representadas pelas propriedades da estrutura química e a atividade biológica correspondente.³⁷⁻³⁹ O maior desafio do QSAR é a criação de modelos capazes de prever a atividade biológica de NCEs ainda não sintetizadas.^{1,39,40}

O método de QSAR 3D mais empregado, a análise comparativa entre campos moleculares (CoMFA, *Comparative Molecular Field Analysis*),⁴¹ tem permitido a criação de modelos de QSAR altamente eficientes para um amplo conjunto de aplicações.⁴²⁻⁴⁴ A análise com o método CoMFA requer o conhecimento das conformações bioativas dos compostos em estudo para o alinhamento tridimensional, assumindo que a resposta biológica está associada diretamente às interações entre a molécula bioativa e o receptor biológico, sendo estas descritas e representadas por seus campos estéreos, eletrostáticos e outros campos tridimensionais, bem como por suas propriedades. A seleção ou geração de confôrmeros para o alinhamento estrutural é facilitada imensamente pelo emprego de estruturas cristalográficas de raios-X, nas quais um inibidor está ligado ao sítio ativo de uma enzima, modelo no qual os demais análogos possuindo modo de ligação comum podem ser sobrepostos. O método de regressões multivariadas por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*) é usado para relacionar os campos CoMFA e a atividade biológica.

As técnicas de QSAR 2D, por outro lado, utilizam apenas estruturas 2D e os valores da atividade biológica como requisito para o trabalho de modelagem, eliminando as dificuldades do QSAR 3D associadas à determinação das conformações ativas e ao alinhamento molecular tridimensional.⁴²

Holograma QSAR (HQSAR) é uma técnica relativamente nova que tem sido empregada na criação de modelos de QSAR altamente preditivos.^{42,45-47} HQSAR emprega hologramas moleculares originários da fragmentação molecular 2D. Os hologramas definem a dimensionalidade do espaço ocupado pelos descritores. Os descritores codificam todos os fragmentos moleculares possíveis: lineares, ramificados e sobrepostos. Informações 3D adicionais como hibridização e quiralidade são também codificadas nos hologramas moleculares. Os modelos de QSAR são desenvolvidos empregando-se o método PLS e técnicas de validação cruzada.^{42,45-47}

Os modelos preditivos de QSAR são guias químico-medicinais importantes para o planejamento racional de novas moléculas bioativas com padrões pré-determinados de interesse.^{42,43,46,48,49}

11. Holograma QSAR

HQSAR é uma técnica moderna que evita alguns dos problemas associados aos estudos de QSAR clássico e de QSAR 3D, como por exemplo, seleção de descritores físico-químicos, alinhamento molecular tridimensional, determinação da conformação bioativa. Somente a estrutura 2D e o valor da propriedade biológica são requisitos para a aplicação deste método.^{42,45-47}

Primeiramente, as moléculas da base de dados são convertidas em fragmentos estruturais, utilizando para isso uma forma expandida da impressão

digital (do inglês, *fingerprint*), conhecida como holograma molecular.⁴⁵ Essa técnica permite contabilizar quantas vezes um dado fragmento foi alocado em uma determinada caixa (do inglês, *bin*). Dessa maneira, o holograma molecular é capaz de codificar mais informações sobre os fragmentos (e.g., ramificados, cíclicos, sobrepostos, a estereoquímica), que a impressão digital 2D tradicional.

Durante o processo de obtenção do holograma molecular (Figura 3), pode-se determinar o número de caixas do holograma (tamanho). A alteração dessa variável leva a um padrão de ocupação específico. Como na maioria das vezes o tamanho do holograma é menor que o número total de fragmentos gerados, ocorre à colisão de fragmentos, ou seja, fragmentos diferentes ocupam a mesma caixa do holograma. A maneira como os fragmentos se distribui nas caixas tem influência na qualidade dos modelo.^{42,45-47}

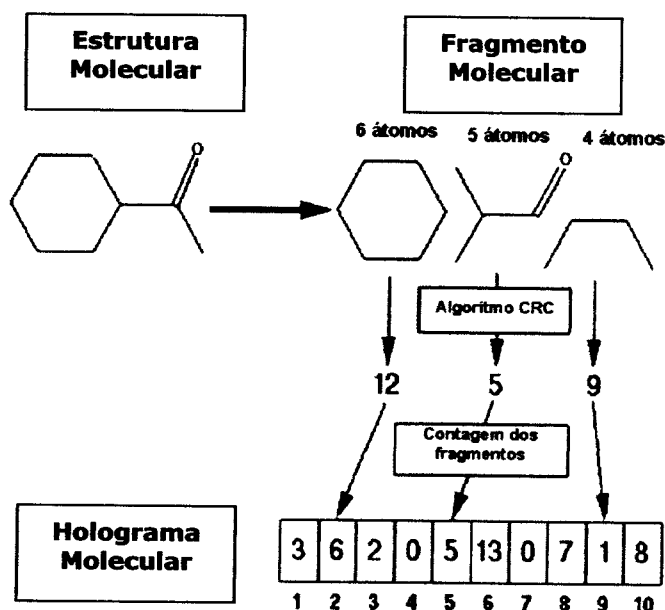


Figura 3. Esquema ilustrativo do processo de obtenção do holograma molecular.

Outros parâmetros que podem ser alterados pelo usuário na análise de HQSAR são o tamanho e a distinção do fragmento.⁴⁵⁻⁴⁷ A variável tamanho do fragmento pode ser determinada através do tamanho mínimo (M) e máximo (N) que os fragmentos gerados irão apresentar. A distinção dos fragmentos, por sua vez, é baseada nos parâmetros apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR.

Parâmetro de distinção do fragmento	Definição
Átomos (A)	Esse parâmetro permite que fragmentos sejam obtidos com base nos tipos de átomos, permitindo que um N seja distinguido de um P e assim por diante
Ligações (B)	Esse parâmetro permite que fragmentos obtidos sejam baseados na ordem de ligação. Por exemplo, na ausência de um H, permite que butano seja distinguido de 2-buteno
Conectividade (C)	Esse parâmetro leva em consideração o estado de hibridização atômica dos fragmentos
Hidrogênios (H)	Durante a obtenção dos fragmentos, o HQSAR ignora os átomos de H, esse parâmetro faz com que os átomos sejam considerados nos fragmentos gerados
Quiralidade (Ch)	Esse parâmetro permite que fragmentos sejam obtidos com base na estereoquímica dos átomos e das ligações, dessa forma, ligações do tipo <i>cis</i> são distinguidas das <i>trans</i> , e enantiômeros <i>R</i> distinguidos dos <i>S</i>
Doador e Receptor (DA)	Esse parâmetro permite que fragmentos sejam diferenciados com base na sua propriedade de doar ou aceitar ligações de hidrogênio

Os fragmentos gerados são relacionados com a atividade biológica observada através da análise estatística por PLS. Dessa forma, o módulo de HQSAR identifica nas moléculas bioativas padrões sub-estruturais dos fragmentos que são relevantes para a atividade biológica. A razão para se empregar fragmentos padrões é que cada átomo da molécula será encontrado em diferentes fragmentos. Além disso, a incorporação progressiva de informações sobre cada fragmento e cada um dos constituintes dos subfragmentos, implicitamente codifica informações da estrutura tridimensional. Um esquema geral das etapas envolvidas no método de HQSAR pode ser observado na Figura 4.

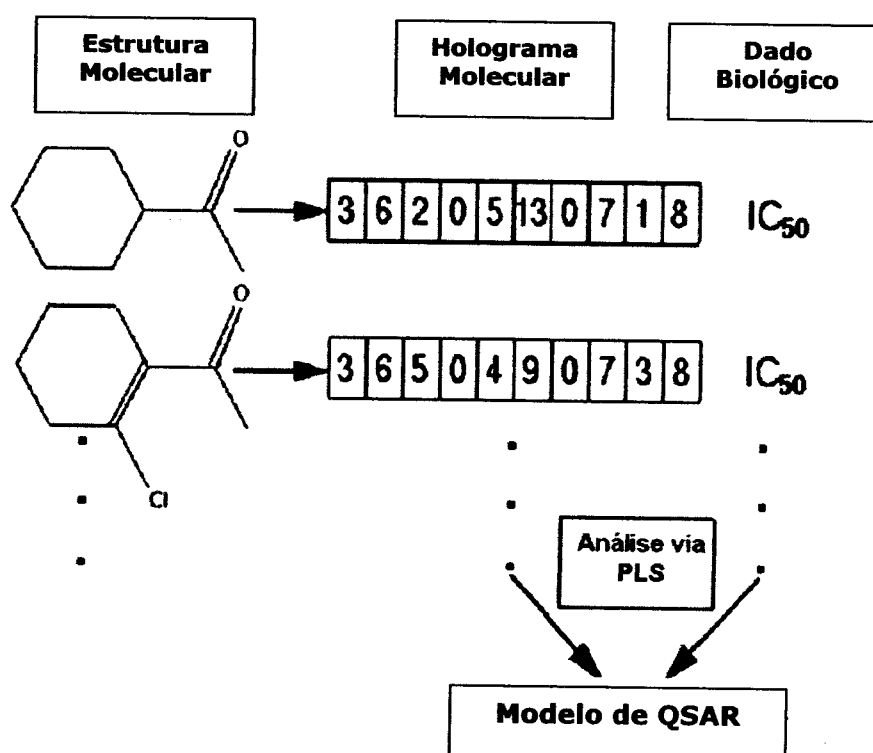


Figura 4. Etapas envolvidas no método HQSAR.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Os objetivos fundamentais desta dissertação de mestrado são:

- i. Organização de um conjunto de dados padrão e o estudo das relações quantitativas bidimensionais entre a estrutura e atividade de inibidores da enzima PNP bovina, compostos candidatos a protótipos de novos fármacos na quimioterapia de doenças imunodeficientes mediadas pelas células T.
- ii. Geração de um conjunto de dados padrão e o estudo das relações quantitativas bidimensionais entre a estrutura e atividade de inibidores da enzima PNP de *S. mansoni*, compostos candidatos a protótipos de novos fármacos na quimioterapia da esquistossomose mansoni.

Os conjuntos de dados, descrevendo a estrutura química e a atividade biológica, hierarquizando as diferentes contribuições funcionais e organizados de forma a atender os requisitos de diversidade estrutural e distribuição dos valores da atividade biológica, serão a base científica para o trabalho de modelagem molecular e o desenvolvimento dos modelos preditivos de QSAR 2D, empregando a metodologia Holograma QSAR.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. Inibidores

Os inibidores da PNP empregados em nossos estudos foram sintetizados nas companhias farmacêuticas BioCryst Pharmaceuticals (Birmingham, Alabama, EUA) e Pfizer (Ann Arbor, Michigan, EUA).

2. Expressão e Purificação da PNP de *S. mansoni*

Os ensaios cinéticos foram realizados nos laboratórios do CBME de acordo com protocolos estabelecidos pelo bolsista de iniciação científica Matheus Pereira Postigo (Processo FAPESP N° 04/07327-6),⁵⁰ sob a orientação do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo. A expressão e purificação da enzima foram conduzidas seguindo como protocolo previamente descrito.³⁶ A enzima foi obtida rotineiramente em quantidades apropriadas e com elevada pureza para os ensaios cinéticos. Os demais reagentes e solventes orgânicos foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich Co.

3. Ensaios Cinéticos: Determinação de Valores de K_m e IC_{50}

Os ensaios cinéticos com a enzima PNP de *S. mansoni* e para um conjunto de inibidores foram realizados em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650, utilizando-se um procedimento padronizado e validado em nossos laboratórios do CBME.⁵⁰

Os valores de IC_{50} foram determinados independentemente usando-se 5 ou 6 concentrações diferentes de cada inibidor, empregando-se inosina $10 \mu M$ e fosfato 50 mM como substratos. As medidas foram feitas usualmente a concentrações entre $5,0$ e $9,0 \text{ nM}$ da enzima. Todas as medidas foram feitas à $25^\circ C$ e $pH 7,4$ (mantido com Tris-HCl 100 mM). Valores de pH foram medidos em um pH -metro Denver UB-10.

As reações empregando inosina como substrato foram monitorados a 293 nm . Este método de ensaio da PNP é baseado no aumento da absorbância até 293 nm , acompanhando a conversão de hipoxantina em ácido úrico, na reação combinada com xantina oxidase de acordo com a Figura 5.

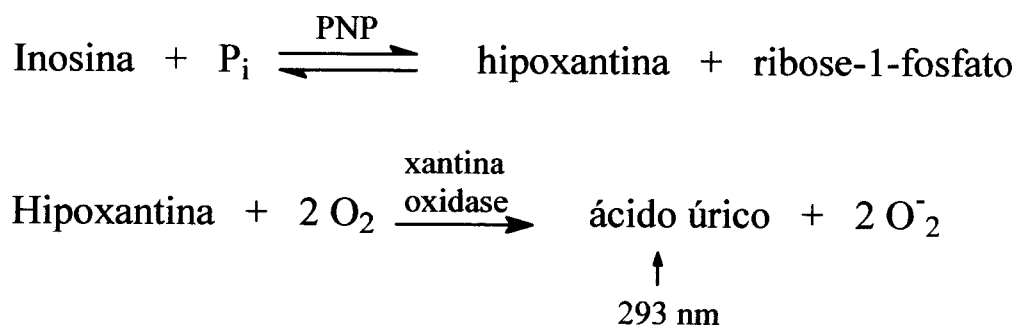


Figura 5. Método de ensaio espectrofotométrico da PNP de *S. mansoni*.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) foi determinada para a enzima PNP de *S. Mansoni* através de medidas da velocidade inicial obtidas variando-se a concentração de substrato. Os dados experimentais coletados cobriram uma faixa de concentração de cerca de 50 vezes, entre $0,0625$ e $30 \mu M$ (Tabela 3, capítulo IV). O valor de K_m foi determinado a partir dos dados cinéticos coletados utilizando-se o programa estatístico para cinética enzimática SigmaPlot 2001 7.0

(SPSS inc), que contém um sistema integrado para desempenhar a análise gráfica não-linear de melhor ajuste.

4. Análises de QSAR

O trabalho de modelagem molecular e as análises estatísticas para o método HQSAR foram realizados em estações computacionais operando no sistema operacional Linux Enterprise, usando-se a interface integrada operacional SYBYL 7.0 (Tripos, St. Louis-MO, EUA).

5. Conjunto de Dados

Os conjuntos de dados da PNP bovina e de *S. mansoni* empregados nos estudos de HQSAR, consistem de inibidores congêneres e estruturalmente diversos, incluindo a medida experimental da propriedade biológica correspondente. Os valores de IC_{50} da PNP de *S. mansoni* empregados em nossos estudos foram determinados experimentalmente neste trabalho, enquanto que os valores de IC_{50} da PNP bovina foram determinados em nosso laboratório em trabalhos anteriores e também selecionados da literatura.^{21,40,48,51-}

⁵⁵ As estruturas das moléculas empregadas neste trabalho foram construídas usando-se o programa SYBYL 7.0.

6. Modelos de Holograma QSAR

A primeira etapa de modelagem é a geração de hologramas moleculares originários de fragmentos subestruturais 2D das moléculas do conjunto

treinamento. As estruturas são convertidas em todos os fragmentos moleculares possíveis: lineares, ramificados e sobrepostos. O holograma molecular é constituído por um conjunto de caixas contendo todos os fragmentos moleculares, os quais são designados por um algoritmo cíclico da verificação de redundância (CRC).⁴⁵⁻⁴⁷ O holograma contém informações sobre o número e o tipo de cada fragmento de cada molécula. O comprimento L do holograma define a dimensionalidade do espaço ocupado pelo descritor, a qual será determinada a partir de uma série de hologramas de diferentes comprimentos pré-definidos, usando uma abordagem de "triagem-erro". O processamento dos hologramas moleculares cria uma matriz de dimensão R x L, onde R é o número de compostos membros do conjunto treino e L é o comprimento do holograma molecular. Para a proposta de QSAR, uma matriz da variável-alvo (e.g., atividade biológica) é criada. O método PLS identifica um conjunto de variáveis explicativas ortogonais (componentes), que são combinações lineares das variáveis originais L. Técnicas de validação cruzada determinam o número de componentes que produzirão um modelo preditivo otimizado. O método PLS é usado para relacionar os hologramas e a atividade biológica correspondente do conjunto de dados.⁴⁵⁻⁴⁷ Diversos parâmetros relacionados à geração dos hologramas podem ser ajustados para otimizar o modelo de HQSAR. Os parâmetros são: comprimento do holograma, tamanho dos fragmentos, número de fragmentos e distinção fragmentária.⁴⁵

O módulo de HQSAR da plataforma SYBYL 7.0 foi usado, convertendo as moléculas do conjunto de dados nos seus respectivos constituintes estruturais. Todos os fragmentos estruturais lineares, ramificados e sobrepostos foram gerados nos tamanhos definidos (e.g., 2-6, 3-6, 4-7, e 5-8) para cada molécula no conjunto de dados. Os modelos produzidos pelo método HQSAR são

dependentes do comprimento do holograma molecular (entre 53 e 401), sendo consideradas também as informações contidas nos fragmentos gerados. Tanto a natureza particular dos fragmentos subestruturais gerados por HQSAR, como a informação contida nos hologramas moleculares resultantes, devem ser avaliadas individualmente na construção dos modelos.

Nos estudos de HQSAR descritos nesta dissertação, fragmentos foram atribuídos para dois conjuntos de inibidores da PNP, variando-se os parâmetros de tamanho e distinção de fragmentos em todas as combinações possíveis. Várias análises PLS foram conduzidas, usando-se as várias combinações de distinção e tamanho de fragmentos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Determinação da Constante de Michaelis-Menten para a Enzima PNP de *S. mansoni*

A determinação experimental da constante de Michaelis-Menten (K_m) para a enzima PNP de *S. Mansoni* foi realizada através de medidas da velocidade inicial obtidas variando-se a concentração de inosina. A qualidade das estimativas de K_m depende do emprego de uma faixa de concentrações de substrato capaz de estender-se por uma porção significativa da isoterma de ligação. Uma série de diluições foi feita a partir de uma solução estoque de inosina produzindo uma variedade de concentrações decrescentes de substrato, até atingir a menor concentração em que foi possível efetuar a medida experimental (inosina = 0,625 μM). A maior concentração de substrato empregada foi de 30 μM . A Tabela 3 apresenta os resultados dos ensaios e as concentrações finais de substrato empregadas.

Tabela 3. Velocidade inicial em função da concentração de inosina para a reação enzimática catalisada pela enzima PNP de *S. mansoni*.

Inosina (μM)	Absorbância
30,0	12,90
25,0	12,50
22,5	12,00
20,0	11,75
17,5	11,25
15,0	10,85
12,5	10,22
10,0	9,45
7,5	8,40
5,0	7,00
3,5	5,30
2,5	4,50
1,25	2,60
0,625	1,60

A Figura 6 apresenta o gráfico dos dados cinéticos coletados na Tabela 3. A linha curvilínea sólida percorrendo os pontos do gráfico representa a análise não-linear de melhor ajuste de acordo com a equação de Michaelis-Menten representada na Figura 7.

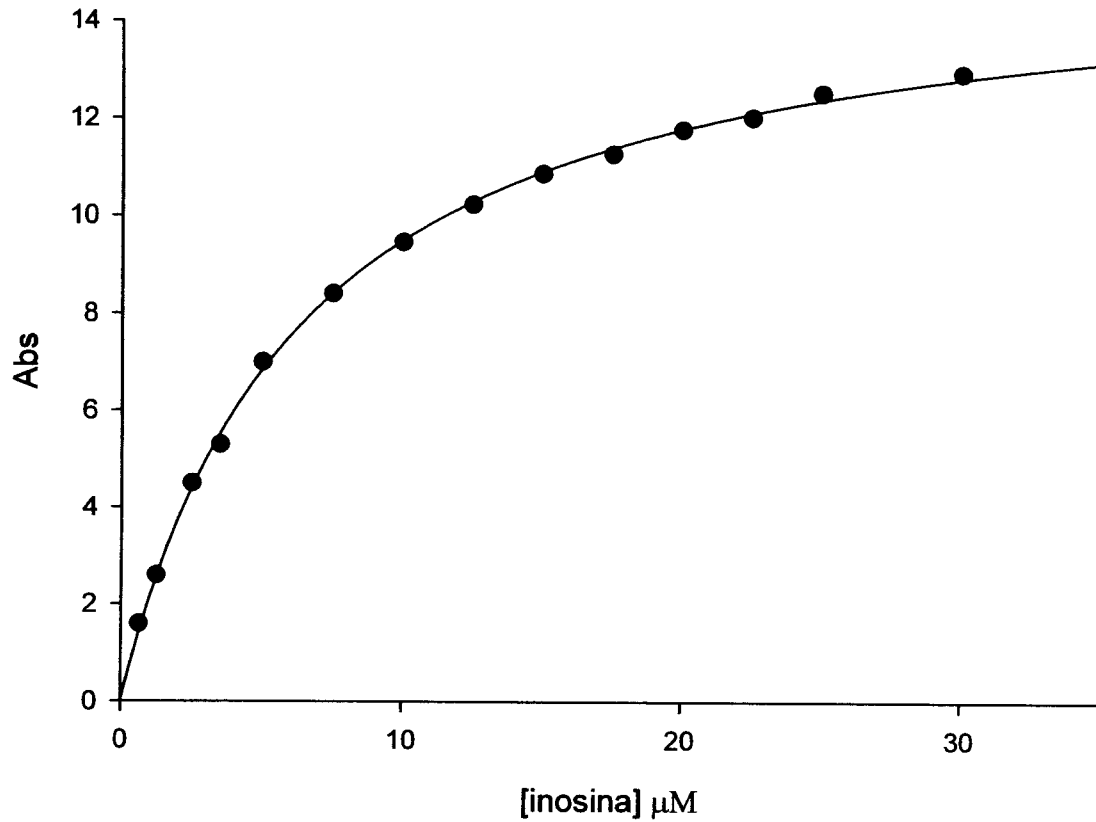


Figura 6. Gráfico de Michaelis-Menten para os dados cinéticos da PNP de *S. mansoni* coletados na Tabela 3.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

Figura 7. Equação de Michaelis-Menten.

Pode ser notado na Tabela 3 e na Figura 6 que as concentrações de substrato utilizadas abrangem uma faixa da ordem de grandeza de cerca de 50 vezes. A partir destas medidas experimentais, o valor estimado de K_m foi de 6

μM , obtido a partir da análise não-linear de melhor ajuste dos dados, usando-se o programa de análise de cinética enzimática SigmaPlot 2001 7.0. O resultado é apresentado na Tabela 4. Este valor de K_m foi comprovado a partir de três experimentos independentes, inclusive com amostras de diferentes purificações da enzima.

Tabela 4. Estimativa do valor da constante cinética de Michaelis-Menten.

Método	K_m (μM)
Ajuste não-linear (SigmaPlot 2001)	$6,0 \pm 0,3$

Os dados mostrados são representativos de três medidas independentes (média \pm desvio padrão).

2. Padronização e Validação dos Ensaio Biológicos

A padronização e a validação dos ensaios biológicos são etapas fundamentais na determinação do valor da propriedade biológica para um conjunto de moléculas. O estabelecimento destas bases é essencial para a determinação de valores com alto grau de confiança e reprodutibilidade. Valores de IC_{50} foram determinados com um ensaio padronizado e validado em nosso laboratório, realizado sempre em triplicata, a partir dos dados cinéticos coletados usando-se o módulo estatístico de análise cinética enzimática do programa SigmaPlot 2001 7.0.

A padronização e validação dos testes foram fundamentais para a coleta de valores de IC_{50} comparáveis e reprodutivos, que são ideais para os estudos

das relações quantitativas entre a estrutura e atividade propostos nesta dissertação.

3. Cinética Enzimática e Determinação de Valores de IC_{50}

A medida da atividade da enzima PNP de *S. mansoni* seria possível pela medida da taxa de formação de hipoxantina ao longo do tempo, não fosse o fato de a hipoxantina absorver radiação ultravioleta num comprimento de onda muito próximo ao da inosina e da maioria dos inibidores da PNP avaliados (na região de 260 nm). Sendo assim, utilizou-se um ensaio combinado, onde, numa reação subsequente, a hipoxantina formada é convertida quantitativamente em ácido úrico (que absorve em 293 nm) pela ação da enzima xantina oxidase. Logo, é possível medir a atividade da PNP pela taxa de formação de ácido úrico.

A constante de Michaelis-Menten (K_m), determinada no item 1 deste Capítulo, consiste na concentração de substrato (no presente caso, a inosina) necessária para que a velocidade de reação seja igual à metade da velocidade máxima. É de grande importância, em se tratando de ensaios para a determinação de parâmetros de inibição, sobretudo de um conjunto de inibidores competitivos, a determinação desta constante cinética. Durante a reação enzimática, há competição mútua-exclusiva reversível entre o substrato e o inibidor competitivo pelo sítio ativo da enzima. A IC_{50} é definida como a concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática. As medidas de IC_{50} dos inibidores contra a enzima PNP de *S. mansoni* foram feitas através da realização de medidas cinéticas, primeiro sem a presença de inibidor, a fim de se ter um valor de atividade de referência, e depois variando-se no mínimo 5 concentrações de inibidor, com valores de inibição na faixa entre

15 e 90%. A inibição percentual é determinada através da seguinte relação: $I (\%) = [1 - (A/A_0)] \times 100$, onde A é a atividade na presença de inibidor e A_0 a atividade enzimática de referência.

Com esses dados coletados experimentalmente, os valores de IC_{50} foram obtidos por tratamento matemático, através do método de regressão não-linear com o auxílio do módulo de cinética enzimática do programa SigmaPlot 2001 7.0.

A Figura 8 mostra o gráfico de uma curva dose-resposta típica de um dos inibidores estudados, onde é possível ver 6 valores de concentração de inibidor empregados na análise estatística para a determinação da IC_{50} .

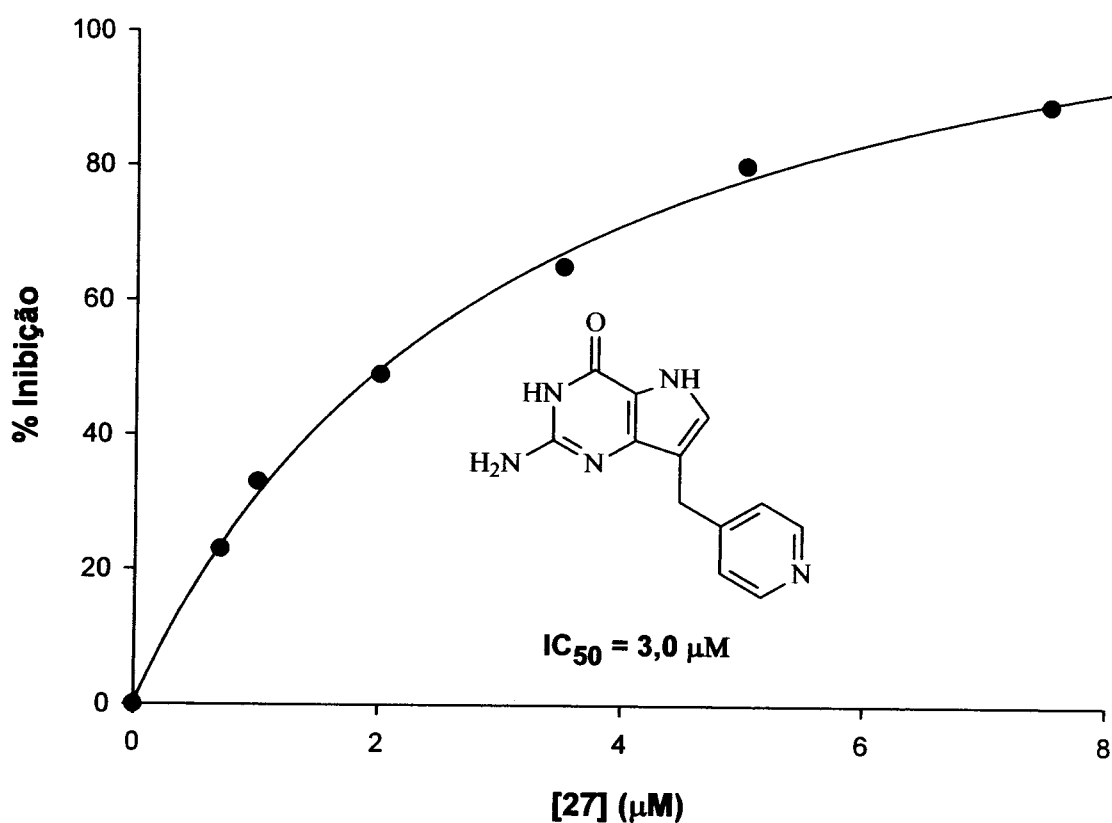
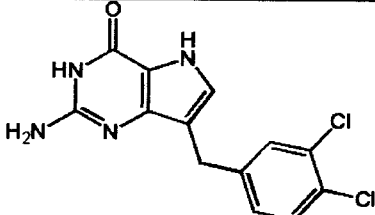
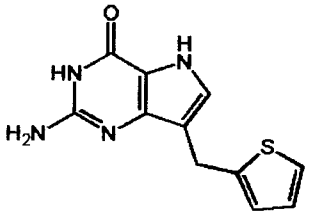


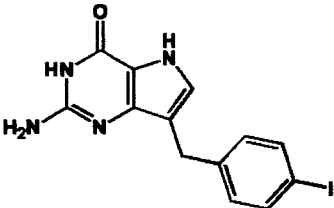
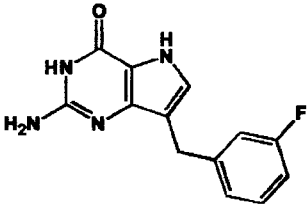
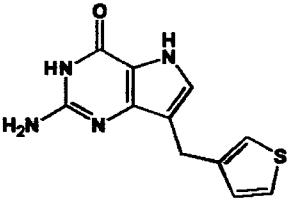
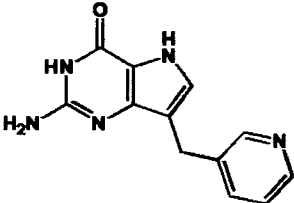
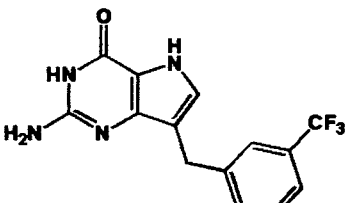
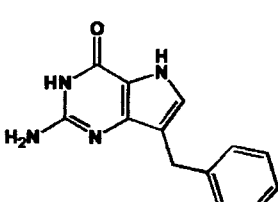
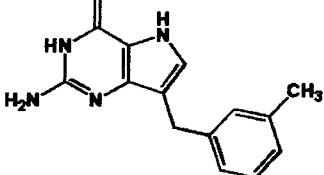
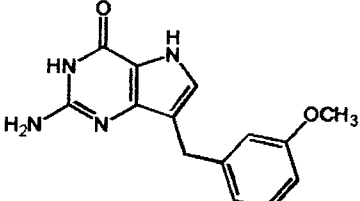
Figura 8. Curva dose-resposta utilizada na determinação de IC_{50} do inibidor **27** do conjunto de dados (Tabela 9).

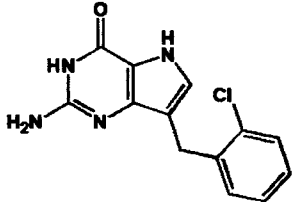
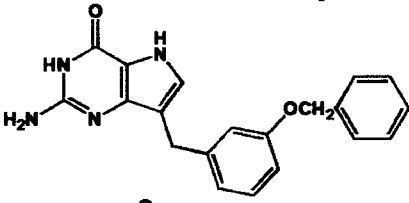
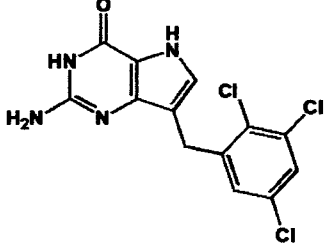
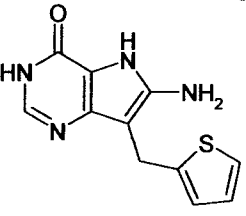
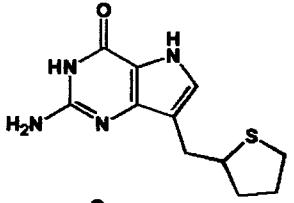
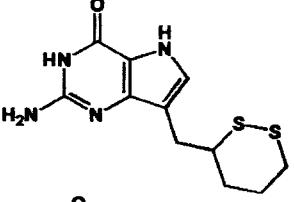
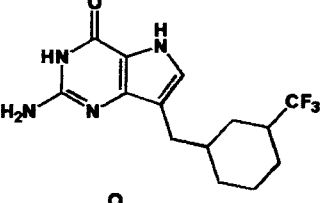
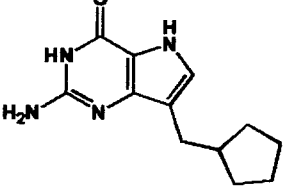
4. Estudo das Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade de uma Série de inibidores da PNP bovina

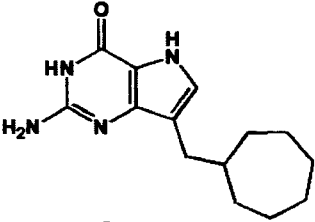
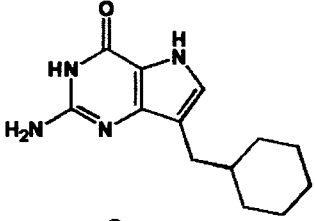
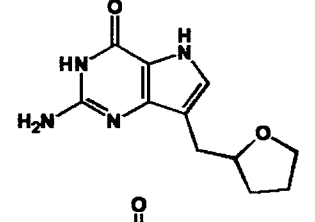
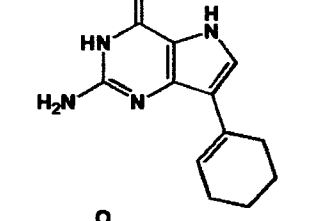
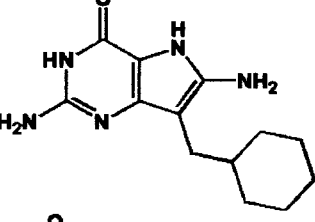
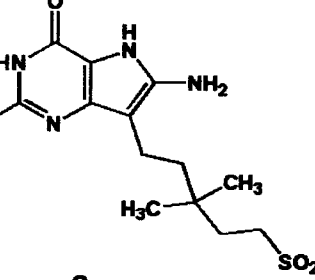
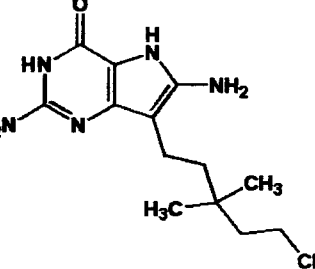
O conjunto de dados utilizado nas análises de HQSAR apresenta 68 inibidores da enzima PNP bovina, os quais foram selecionados a partir de dados próprios do nosso laboratório, associados com dados disponíveis na literatura.^{21,40,48,52-55} As estruturas e os valores correspondentes de IC₅₀ para o conjunto total de compostos são apresentados na Tabela 5. O conjunto treinamento é formado pelos compostos **1-52**, enquanto que o conjunto teste é formado pelos compostos **53-68**.

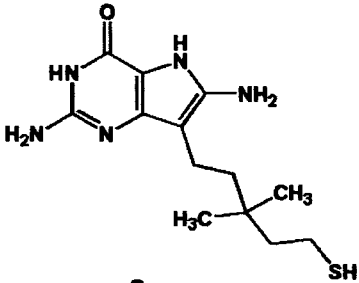
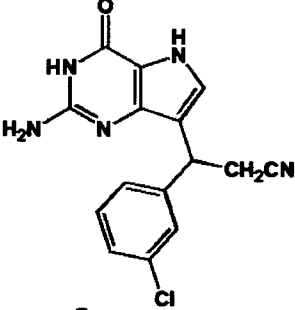
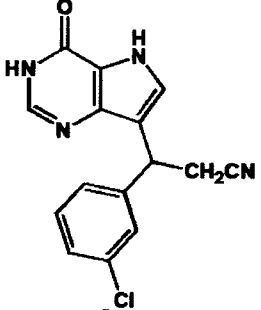
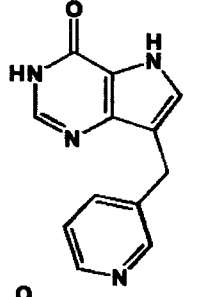
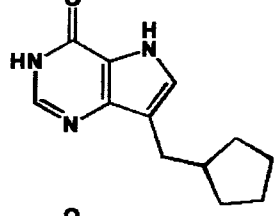
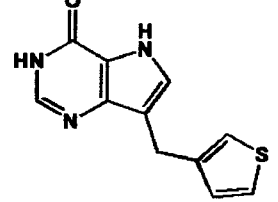
Tabela 5. Estruturas químicas e os correspondentes valores de IC₅₀ para a série de inibidores da enzima PNP bovina.

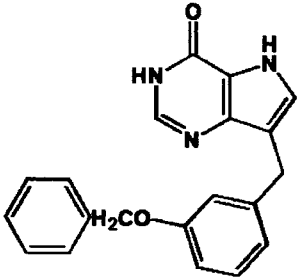
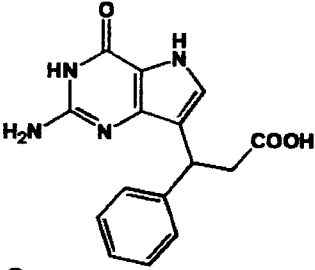
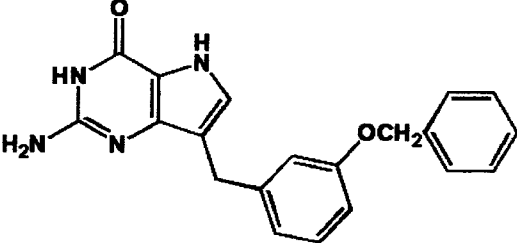
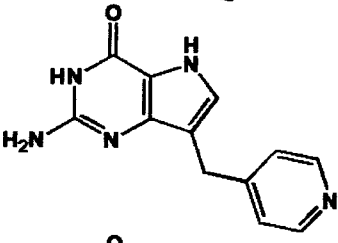
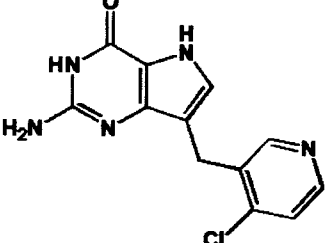
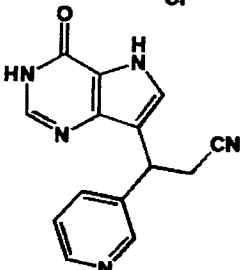
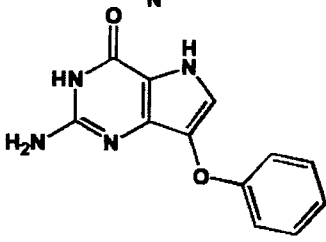
Conjunto Treinamento		
Composto Nº	Estrutura	IC ₅₀ (µM)
1		0,017 ± 0,007
2		0,021 ± 0,004

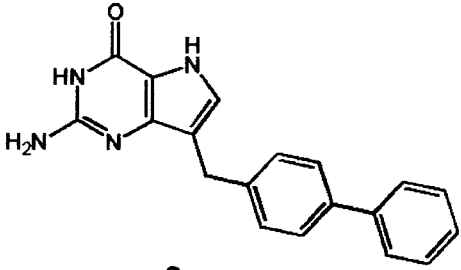
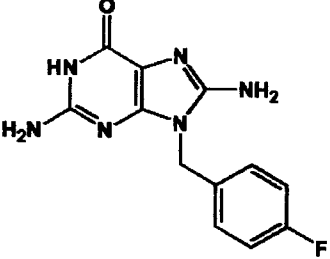
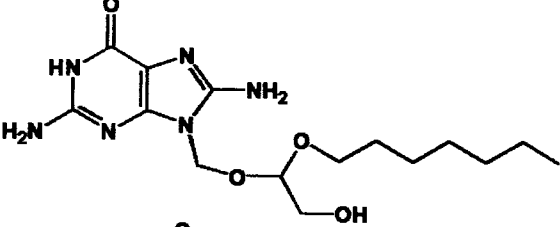
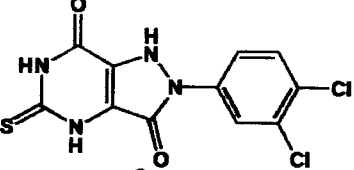
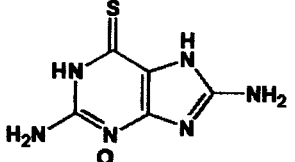
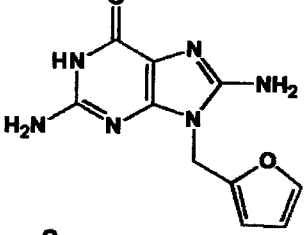
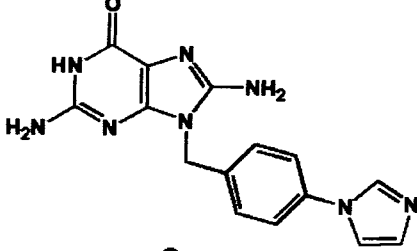
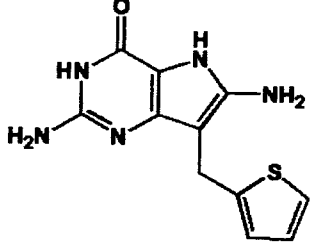
3		$0,023 \pm 0,006$
4		$0,024 \pm 0,007$
5		$0,025 \pm 0,013$
6		$0,025 \pm 0,003$
7		$0,036 \pm 0,012$
8		$0,051 \pm 0,012$
9		$0,057 \pm 0,011$
10		$0,082 \pm 0,025$

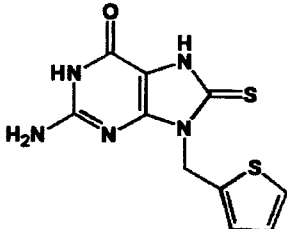
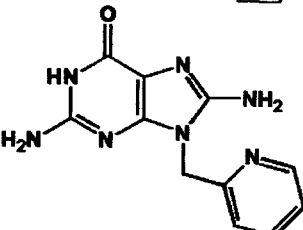
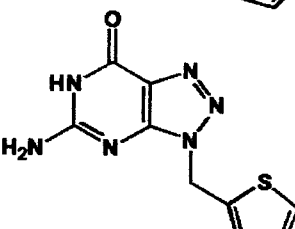
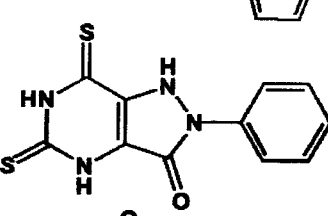
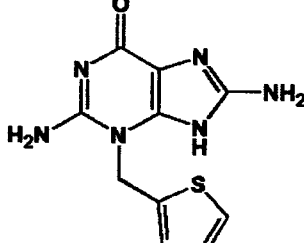
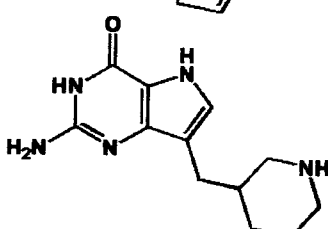
11		$0,120 \pm 0,040$
12		$0,147 \pm 0,070$
13		$0,240 \pm 0,020$
14		$0,160 \pm 0,013$
15		$0,011 \pm 0,009$
16		$0,018 \pm 0,010$
17		$0,025 \pm 0,006$
18		$0,029 \pm 0,0019$

19		$0,030 \pm 0,017$
20		$0,047 \pm 0,014$
21		$0,070 \pm 0,020$
22		$1,900 \pm 0,033$
23		$6,600 \pm 0,700$
24		$100,0 \pm 8,0$
25		$260,0 \pm 21,0$

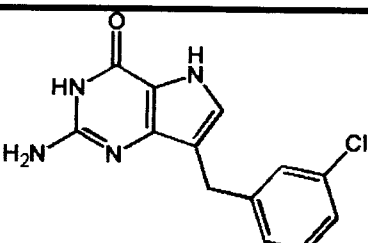
26		$50,0 \pm 5,0$
27		$0,011 \pm 0,001$
28		$0,010 \pm 0,01$
29		$0,040 \pm 0,004$
30		$0,029 \pm 0,003$
31		$0,028 \pm 0,003$

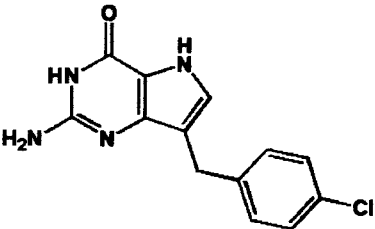
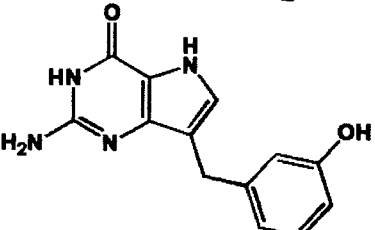
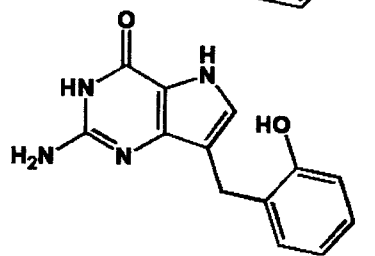
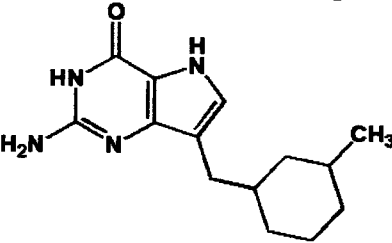
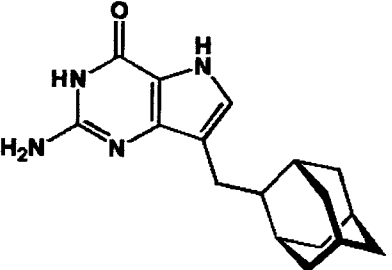
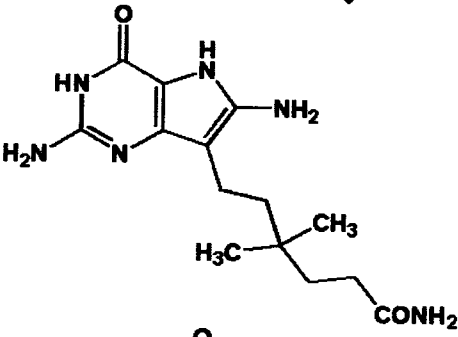
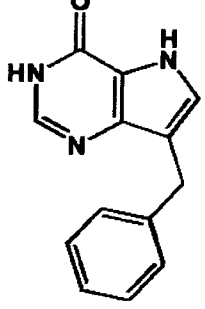
32		$0,190 \pm 0,015$
33		$0,047 \pm 0,004$
34		$0,124 \pm 0,018$
35		$0,064 \pm 0,004$
36		$0,135 \pm 0,051$
37		$0,039 \pm 0,003$
38		$0,042 \pm 0,002$

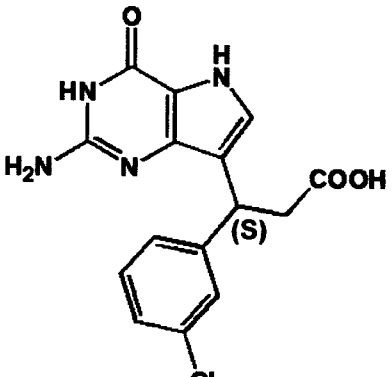
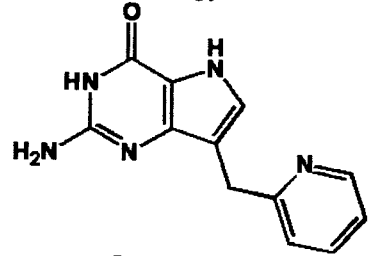
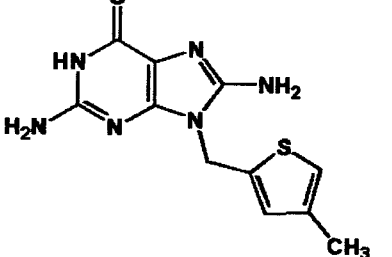
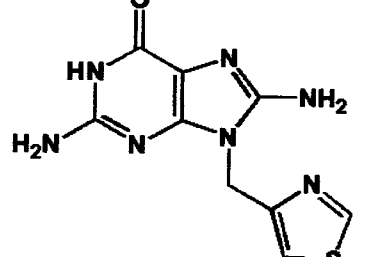
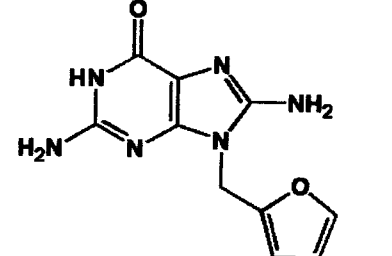
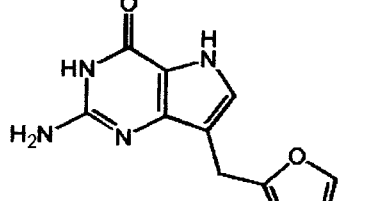
39		$0,546 \pm 0,320$
40		$4,170 \pm 0,410$
41		$1,520 \pm 0,210$
42		$7,030 \pm 0,200$
43		$8,490 \pm 0,210$
44		$0,092 \pm 0,004$
45		$0,852 \pm 0,038$
46		$0,497 \pm 0,026$

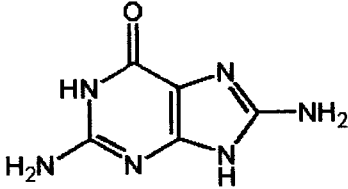
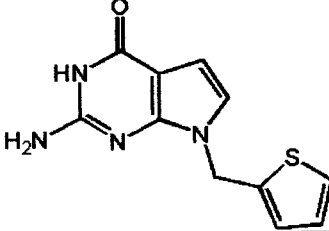
47		2,866 ± 0,290
48		1,971 ± 0,150
49		1,839 ± 0,060
50		22,840 ± 1,820
51		1,758 ± 0,090
52		1,000 ± 0,099

Conjunto Teste

Composto N°	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
53		0,020 ± 0,007

54		$0,025 \pm 0,001$
55		$0,070 \pm 0,004$
56		$0,270 \pm 0,016$
57		$0,025 \pm 0,003$
58		$0,090 \pm 0,005$
59		$200,0 \pm 25,0$
60		$0,035 \pm 0,002$

61	 <chem>NC1=NC(=O)C2=C(N1)C=CN2C(C(=O)O)C3=CC=C(Cl)C3</chem>	$0,036 \pm 0,003$
62	 <chem>NC1=NC(=O)C2=C(N1)C=CN2CC3=CC=NC=C3</chem>	$0,015 \pm 0,001$
63	 <chem>NC1=NC(=O)C2=C(N1)N(C2)CN3C=CC=C3C</chem>	$0,362 \pm 0,014$
64	 <chem>NC1=NC(=O)C2=C(N1)N(C2)CN3C=NC=S3</chem>	$1,043 \pm 0,003$
65	 <chem>NC1=NC(=O)C2=C(N1)N(C2)CO3C=CC=O3</chem>	$2,710 \pm 0,002$
66	 <chem>NC1=NC(=O)C2=C(N1)C=CN2CO3C=CC=O3</chem>	$0,083 \pm 0,005$

67		2,299 ± 0,221
68		0,674 ± 0,032

Os valores de IC_{50} do conjunto de dados variam entre 0,01 e 260 μM , um fator de potência de 26.000 vezes. Os valores de IC_{50} foram convertidos nos valores correspondentes de pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) para o trabalho de modelagem de QSAR. A análise de HQSAR requer a seleção de valores para os parâmetros que especificam o comprimento do holograma, bem como o tamanho e tipo de fragmento que estão sendo utilizados. Neste estudo, os hologramas foram gerados empregando os parâmetros implementados no pacote computacional SYBYL 7.0. A obtenção dos fragmentos moleculares foi realizada utilizando as seguintes distinções de fragmentos: átomos (A), ligações (B), conectividade (C), átomos de hidrogênio (H), quiralidade (Ch) e doadores e receptores (DA). Várias combinações destes parâmetros foram consideradas para o tamanho padrão de fragmento (4-7), como seguem: A/B, A/B/C, A/B/C/H, A/B/C/Ch, A/B/C/H/Ch e A/C/DA. A análise de HQSAR foi realizada considerando os 12 comprimentos de hologramas disponíveis entre 53 e 401 (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353 e 401). Os resultados estatísticos obtidos a partir das análises de PLS para os 52 compostos do conjunto de treinamento, empregando as várias combinações de distinção de fragmento, são mostrados na Tabela 6. Os melhores resultados estatísticos foram obtidos usando as combinações A/B ($q^2 = 0,67$, e $r^2 = 0,86$ com $SEE = 0,42$) ou A/B/C/Ch ($q^2 = 0,68$ e $r^2 = 0,85$, com SEE

= 0,42), com 3 componentes como sendo o número ótimo em ambos os casos. O uso de outras distinções de fragmento não melhora a qualidade dos modelos, como pode ser observado pelos parâmetros estatísticos apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise de HQSAR para as várias combinações de distinção de fragmento empregando o tamanho padrão do fragmento (4-7)

Distinção do Fragmento	Parâmetros Estatísticos				
	q^2	r^2	SEE	HL	<i>N</i>
A/B	0,67	0,86	0,42	71	3
A/B/C	0,65	0,84	0,46	307	3
A/B/C/H	0,59	0,72	0,60	257	3
A/B/C/Ch	0,68	0,85	0,42	97	3
A/B/C/H/Ch	0,57	0,70	0,62	257	3
A/C/DA	0,59	0,76	0,56	61	3

q^2 , coeficiente de correlação com validação cruzada; r^2 , coeficiente de correlação sem validação cruzada; SEE, erro padrão sem validação cruzada; HL, comprimento do holograma; *N*, número ótimo de componentes. Distinção do fragmento: A, átomos; B, ligação; C, conexão; H, átomos de hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, doador e receptor.

A influência de diferentes tamanhos de fragmento também foi investigada, empregando-se o melhor modelo de HQSAR obtido anteriormente (A/B/C/Ch). Os parâmetros referentes ao tamanho do fragmento controlam o comprimento mínimo e máximo dos fragmentos a serem incluídos no holograma. Estes parâmetros podem ser modificados de forma a incluir fragmentos moleculares

maiores ou menores. Como mencionado anteriormente, os fragmentos de tamanho padrão (entre 4 e 7 átomos) foram utilizados para a obtenção do melhor modelo de HQSAR. Os resultados estatísticos utilizando os diferentes tamanhos de fragmento (2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9, 7-10) são sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos utilizando a melhor distinção observada (A/B/C/Ch).

Tamanho do Fragmento	Parâmetros Estatísticos				
	q^2	r^2	SEE	HL	<i>N</i>
2-5	0,66	0,80	0,50	151	3
3-6	0,66	0,85	0,44	151	3
4-7	0,68	0,84	0,46	97	3
5-8	0,66	0,85	0,45	401	3
6-9	0,70	0,90	0,38	401	3
7-10	0,64	0,79	0,52	401	3

Como pode ser observado, a variação do tamanho do fragmento forneceu um modelo de HQSAR melhor quando comparado com o modelo obtido utilizando o tamanho padrão de fragmento (4-7). O melhor resultado estatístico ($q^2 = 0,70$, $r^2 = 0,90$ e $SEE = 0,38$) dentre todos os modelos testados foi obtido com o tamanho de fragmento 6-9, com 3 componentes. Estes resultados confirmam a importância da influência do tamanho do fragmento na geração do holograma molecular. Além disso, os resultados ilustrados nas Tabelas 6 e 7 mostram que não há uma relação entre o poder preditivo dos modelos de HQSAR e o

comprimento do holograma, o que pode ser visto sem surpresa, pois o padrão de ocupação no holograma molecular mudará de forma não trivial com relação às mudanças no comprimento do holograma.

Para a validação de um modelo de QSAR, uma medida da consistência deste modelo é expressa pelo valor de q^2 . Entretanto, o teste mais importante para a avaliação da qualidade de um modelo de QSAR é sua habilidade em prever o valor da propriedade biológica de novos compostos.

Como a estrutura molecular codificada em uma "impressão digital" bidimensional está diretamente relacionada com a atividade biológica de uma série de moléculas, os modelos de HQSAR são capazes de prever a atividade de novos inibidores da PNP, estruturalmente relacionados, a partir de suas "impressões digitais". Assim, o poder preditivo do melhor modelo de HQSAR obtido para o conjunto treinamento de 52 moléculas, utilizando a distinção de fragmento A/B/C/Ch, e fragmento contendo de 6 a 9 átomos, foi avaliado por meio de um conjunto teste contendo 16 moléculas (compostos **53-68**, Tabela 5), que foram completamente excluídas durante o treinamento do modelo. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Vale ressaltar a relação de 3,25:1 para os compostos membros dos conjuntos treinamento e teste, chegando a cerca de 24%, um número apropriado para o processo de validação externa. Além disso, uma análise de cluster realizada com o programa Tsar 3D 3.3 (Accelrys, San Diego-CA, USA), confirmou a boa distribuição representativa da propriedade biológica e informação estrutural nos conjuntos treinamento e teste.

Tabela 8. Valores experimentais e preditos de pIC_{50} , associados aos resíduos para os compostos do conjunto teste.

Composto	pIC_{50}	pIC_{50}	Resíduo
	Experimental	Predito	
53	7,70	7,34	0,36
54	7,60	7,34	0,26
55	7,15	7,27	-0,12
56	6,57	7,23	-0,60
57	7,60	7,05	0,35
58	7,05	7,75	-0,55
59	3,70	3,97	-0,27
60	7,46	7,56	-0,10
61	7,45	7,37	0,08
62	7,82	7,13	0,58
63	6,44	5,87	0,57
64	5,98	5,99	-0,01
65	5,57	5,56	0,01
66	7,08	7,26	-0,18
67	5,64	6,07	-0,40
68	6,17	6,07	0,10

O gráfico das relações entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} dos compostos dos conjuntos treinamento e teste é apresentado na Figura 9. Os valores preditos se aproximam dos experimentais, desviando-se em não mais que 0,4 unidades logarítmicas. As únicas exceções são os compostos **56**, **58**, **62**

e **63**, para os quais os valores preditos apresentam maior erro (entre 0,55 e 0,60 unidades logarítmicas), respectivamente. A boa concordância entre os valores de pIC_{50} experimental e predito para os compostos do conjunto teste indica a robustez do modelo preditivo de HQSAR obtido.

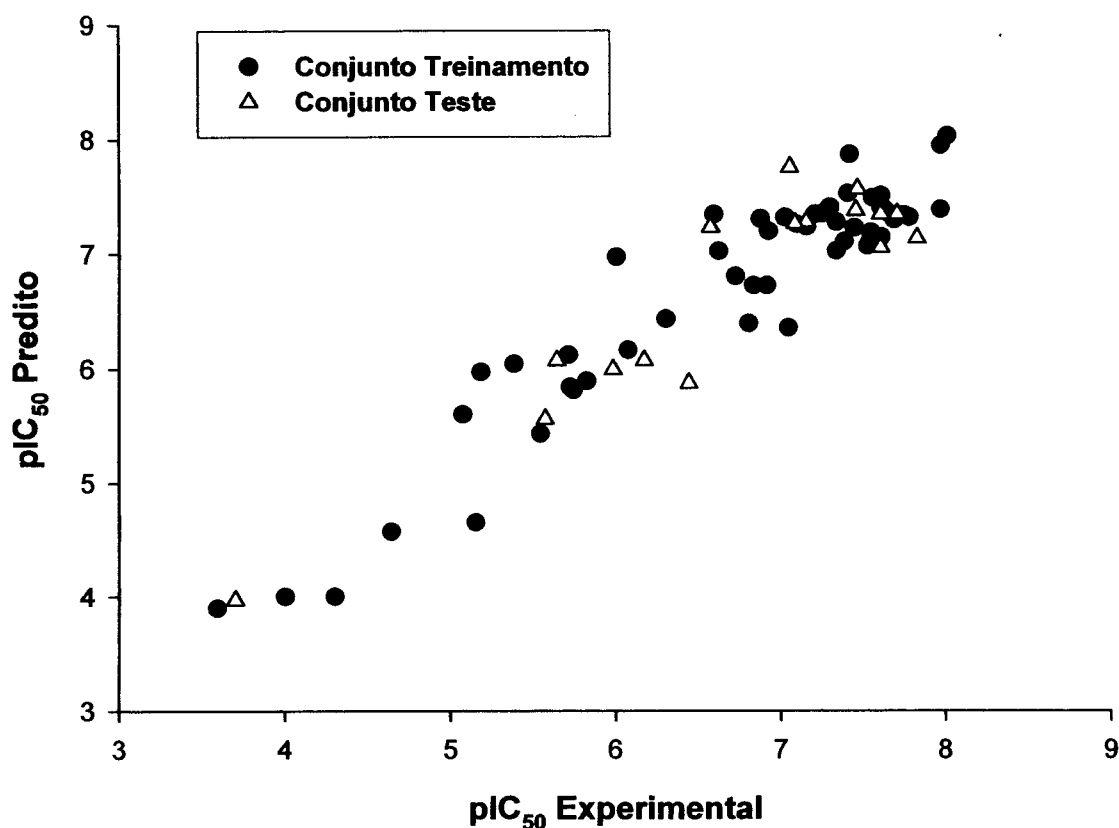


Figura 9. Relação entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} para os 68 inibidores da PNP (conjuntos treinamento e teste).

Além de prever a potência de novos inibidores, um modelo de HQSAR fornece importantes indicativos sobre quais fragmentos moleculares estão diretamente relacionados com a atividade biológica. Esta informação, combinada com o conhecimento em química sintética, pode levar a síntese de novas moléculas com propriedades otimizadas. Para melhor entender este princípio, os

fragmentos mais importantes do composto **28** (o inibidor mais potente do conjunto de dados) são mostrados na Figura 10. O módulo de HQSAR implementado no pacote SYBYL 7.0 utiliza um código de cores para discriminar as principais contribuições atômicas relevantes para a atividade biológica. As cores no final vermelho do espectro (vermelho, laranja avermelhado e laranja) representam as contribuições desfavoráveis, enquanto que as cores no final verde do espectro (amarelo, azul esverdeado e verde) representam as contribuições favoráveis. Átomos com contribuições intermediárias são coloridos de branco.

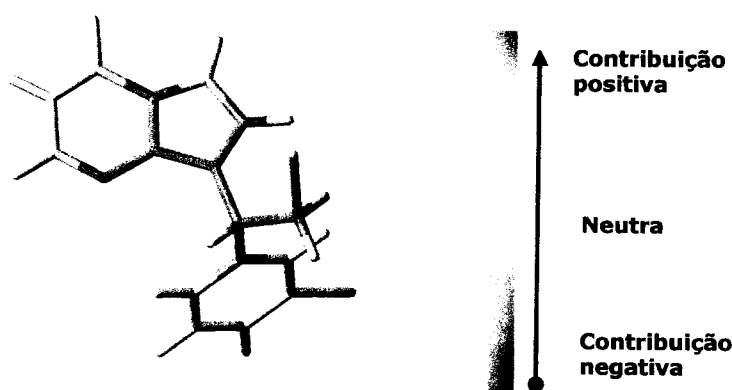


Figura 10. Mapa de contribuição de HQSAR para o composto **28**.

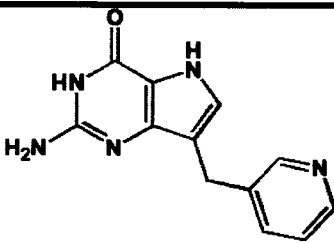
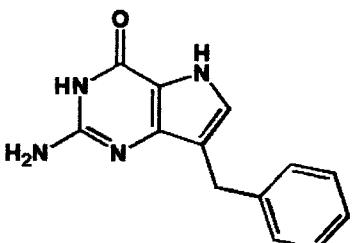
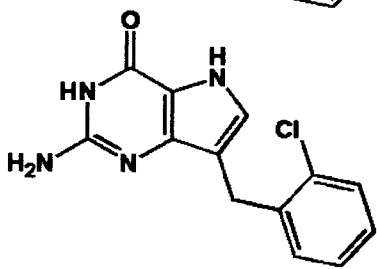
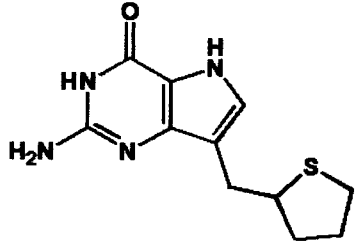
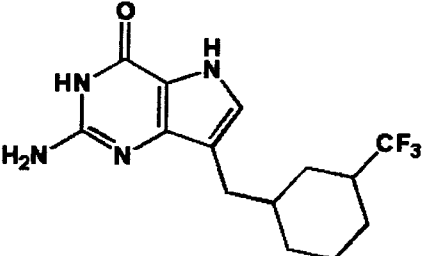
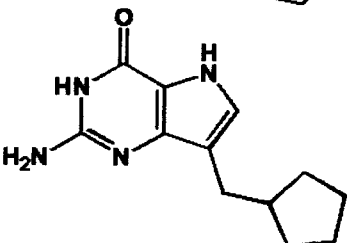
Como pode ser visto na Figura 10, o fragmento molecular representado pelo anel de purina está fortemente relacionado com a atividade biológica deste composto. O mesmo pode ser observado para o grupo cianil presente no grupo ligado na posição 9 do anel de purina. Entretanto, em qualquer molécula do conjunto de dados, regiões que apresentam contribuições desfavoráveis e intermediárias podem ser identificadas como potenciais alvos para síntese dirigida e estudos de SAR.

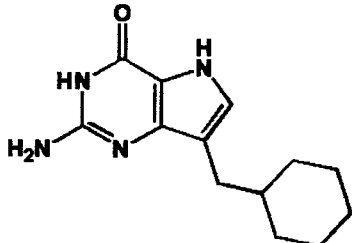
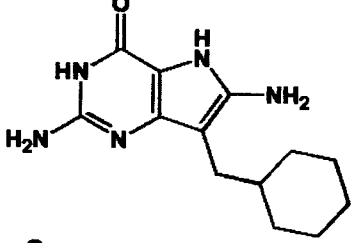
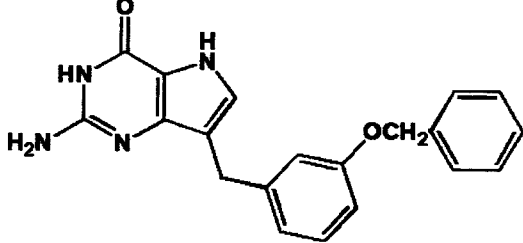
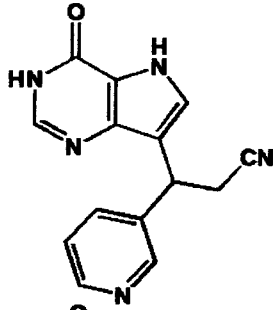
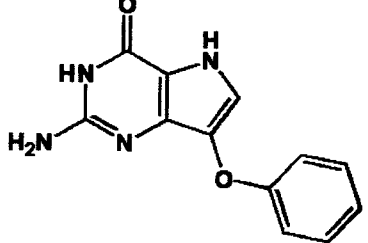
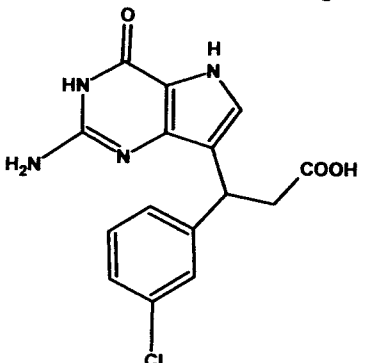
5. Estudos das Relações Quantitativas entre a Estrutura e Atividade de Inibidores da PNP de *S. mansoni*

Com o objetivo de melhor entender as relações quantitativas entre a estrutura e atividade, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos de QSAR empregando a enzima PNP bovina e de *S. mansoni*. Conforme demonstrado no Capítulo de Introdução desta dissertação (itens 7, 8 e 9), a PNP de *S. mansoni* é um importante alvo biológico que foi selecionado neste trabalho para o planejamento de inibidores candidatos a novos agentes quimioterápicos contra a esquistossomose. A enzima do parasita foi identificada e caracterizada originalmente nos laboratórios do CBME em um projeto coordenado pelo Prof. Richard C. Garratt.³⁶

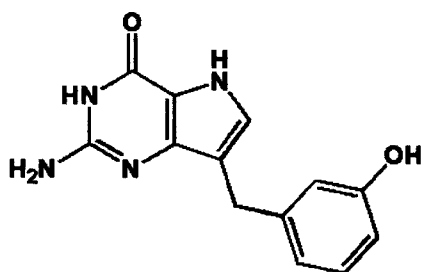
Ensaio biológicos para a determinação de valores de IC₅₀ para uma série de inibidores da PNP de *S. mansoni* foram realizados de acordo com um protocolo padronizado e validado, e os resultados estão coletados na Tabela 9. Deve ser notada a relevância destes estudos, já que não existe na literatura qualquer relato de inibidores da enzima PNP de *S. mansoni*, sendo estes, portanto, os pioneiros.

Tabela 9. Valores de IC₅₀ para o conjunto de inibidores da PNP de *S. mansoni*.

Conjunto Treinamento		
Composto N°	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
1		0,797 + 0,002
2		1,410 + 0,015
3		0,869 ± 0,010
4		12,380 + 1,032
5		18,356 ± 1,970
6		27,960 ± 4,660

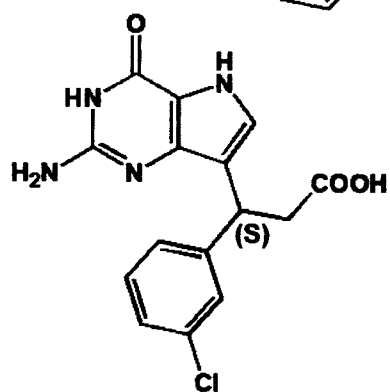
7		$16,0 \pm 2,10$
8		$6,400 + 1,432$
9		$0,499 + 0,009$
10		$4,200 + 1,090$
11		$4,336 \pm 0,552$
12		≥ 200

13



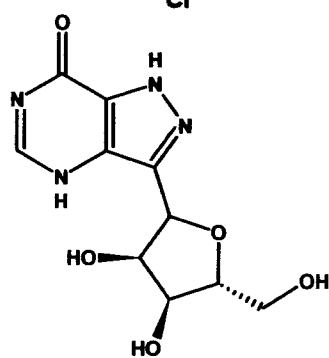
0,794 + 0,013

14



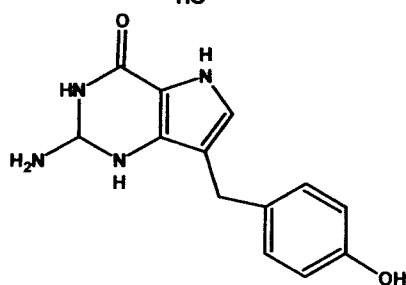
72,750 + 6,846

15



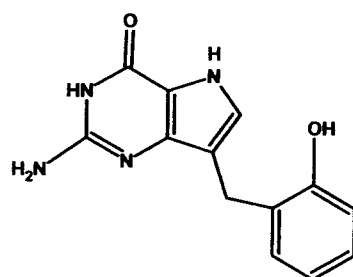
47,0 + 4,076

16



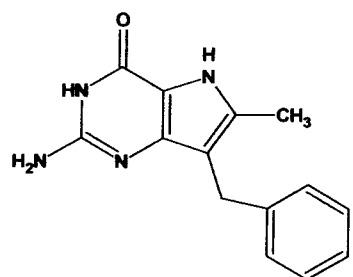
25,300 ± 4,050

17



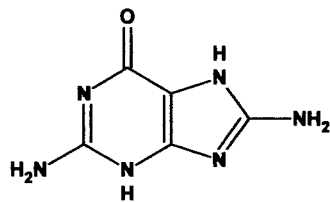
2,080 + 0,099

18



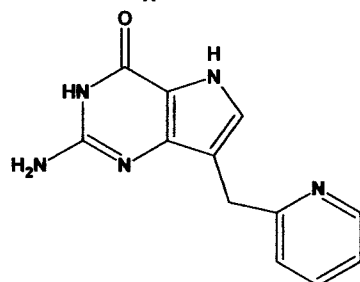
≥ 200

19



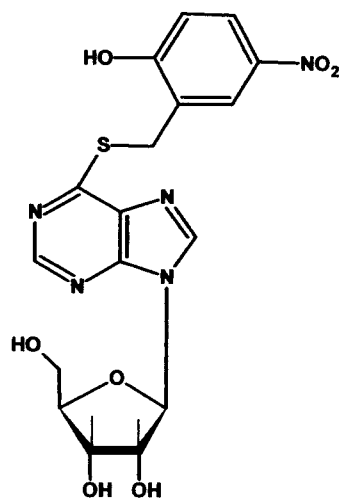
23,320 + 3,421

20



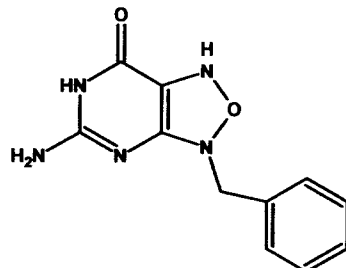
7,262 ± 0,737

21



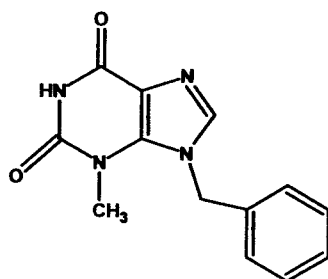
≥ 300

22



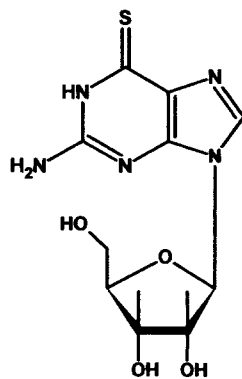
39,123 ± 7,396

23

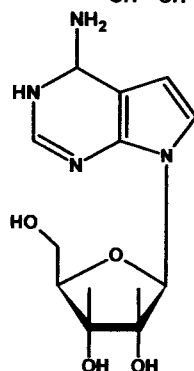


≥ 200

24

95,424 \pm 17,460

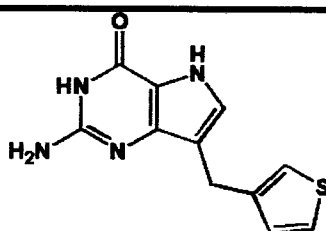
25

131,896 \pm 19,920

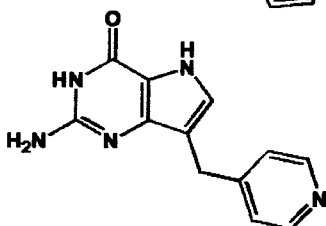
Conjunto Teste

Composto N°**Estrutura****IC₅₀ (μM)**

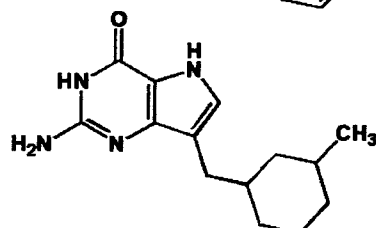
26

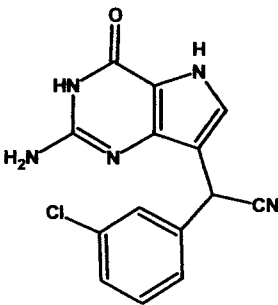
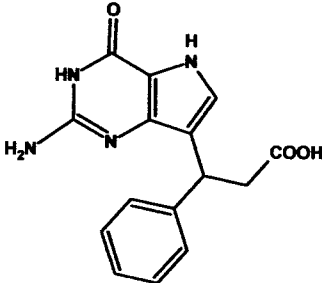
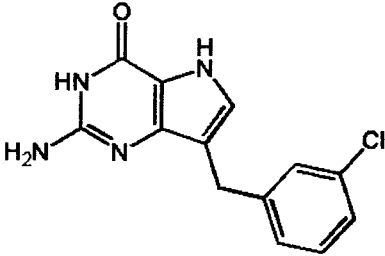
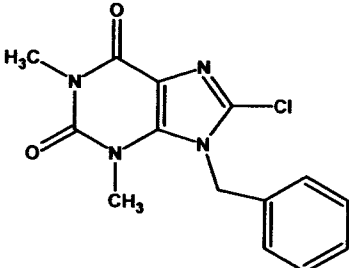
0,767 \pm 0,175

27

3,049 \pm 0,259

28

18,280 \pm

29		39,150
30		≥ 350
31		0,498 ± 0,037
32		≥ 250

Os inibidores foram sintetizados pelas empresas BioCryst Pharmaceuticals e Pfizer dos Estados Unidos. O conjunto treinamento é formado pelos compostos **1-25**, enquanto que os compostos **26-32** constituem o conjunto teste (Tabela 9). Os valores de IC_{50} variam de 0,498 a 350 μM , um fator de potência de aproximadamente 700 vezes. Estes valores foram convertidos nos respectivos valores de pIC_{50} , que foram usados no trabalho de modelagem de HQSAR. Todas as moléculas foram geradas e otimizadas no pacote computacional SYBYL 7.0, sendo que o processo de modelagem de QSAR foi conduzido no módulo HQSAR disponível nesta plataforma.

A distinção do fragmento deve ser avaliada quando da geração de modelos de HQSAR por apresentar efeito significativo na qualidade dos modelos finais. O tamanho do holograma também deve ser avaliado já que não existe uma forma direta de estabelecer a relação entre o poder preditivo dos modelos de HQSAR e estes parâmetros. Por essa razão, modelos foram gerados com várias combinações de descrição do fragmento, variando-se o tamanho de holograma entre 53 e 401, de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10. Efeito da distinção dos fragmentos sobre o modelo de HQSAR de inibidores da PNP de *S. mansoni*, utilizando o tamanho padrão de fragmento (4-7).

Distinção do Fragmento	Parâmetros Estatísticos				
	q^2	r^2	SEE	HL	<i>N</i>
A/B/C	0,48	0,81	0,39	307	3
A/B/C/H	0,55	0,90	0,21	71	6
A/B/C/Ch	0,50	0,81	0,39	307	3
A/B/C/H/Ch	0,55	0,91	0,20	71	6
A/C/DA	0,30	0,59	0,66	401	3

q^2 , coeficiente de correlação com validação cruzada; r^2 , coeficiente de correlação sem validação cruzada; SEE, erro padrão sem validação cruzada; HL, comprimento do holograma; *N*, numero ótimo de componentes. Distinção do fragmento: A, átomos; B, ligação; C, conexão; H, átomos de hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, doador e receptor.

Como pode ser observado na Tabela 10, os melhores resultados estatísticos foram obtidos para as combinações de distinção de fragmento A/B/C/H ($q^2 = 0,55$, $r^2 = 0,90$ e SEE 0,21) e A/B/C/H/Ch ($q^2 = 0,55$, $r^2 = 0,91$ e SEE = 0,20). Contudo, estes modelos não apresentam a robustez desejada para o processo de validação externa. Desta forma, fez-se um estudo sistemático variando o tamanho de fragmento (de 2-5 até 7-10) para as combinações de distinção do fragmento A/B/C/H e A/B/C/H/Ch, que apresentaram os melhores resultados preliminares.

A Tabela 11 mostra os resultados desta avaliação. Nos dois casos, o melhor modelo foi escolhido com base no melhor valor de q^2 . Pode ser verificado na Tabela 11 que a combinação A/B/C/H/Ch, com tamanho de fragmento 5-8, forneceu o melhor modelo de HQSAR, com bons parâmetros estatísticos ($q^2 = 0,68$, $r^2 = 0,94$ e SEE = 0,18).

Para a validação externa do modelo de HQSAR obtido com a distinção de fragmento A/B/C/H/Ch e tamanho de fragmento 5-8, foi empregado um conjunto teste de 7 moléculas (Tabela 9), que foram completamente excluídas durante o treinamento do modelo. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 11. Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos dos modelos de HQSAR da PNP de *S.mansoni* utilizando as distinções de fragmento A/B/C/H e A/B/C/H/Ch.

Tamanho do Fragmento	Parâmetros Estatísticos				
	q^2	r^2	SEE	HL	<i>N</i>
Fragmento A/B/C/H					
2-5	0,12	0,35	0,81	71	2
3-6	0,33	0,82	0,34	401	5
4-7	0,55	0,90	0,17	71	6
5-8	0,59	0,91	0,30	83	6
6-9	0,37	0,67	0,60	83	3
7-10	0,36	0,82	0,45	401	4
Fragmento A/B/C/H/Ch					
2-5	0,42	0,76	0,45	61	4
3-6	0,50	0,87	0,25	401	5
4-7	0,55	0,91	0,16	71	6
5-8	0,68	0,94	0,18	61	6
6-9	0,47	0,80	0,20	61	6
7-10	0,32	0,74	0,38	401	4

Tabela 12. Valores experimentais e preditos de pIC_{50} , associados aos resíduos para os compostos do conjunto teste.

Composto	pIC_{50} experimental	pIC_{50} predito	Resíduo
26	6,11	5,58	-0,53
27	5,51	5,83	0,32
28	4,73	4,95	0,22
29	4,40	4,63	0,23
30	3,80	4,30	0,50
31	6,30	5,67	-0,63
32	3,60	3,93	0,33

A relação de 3,57:1 para os membros dos conjuntos treinamento e teste estabelece um percentual de 28% de moléculas no conjunto teste, um número apropriado para o processo de validação externa. Além disso, foi observada uma boa distribuição da propriedade biológica e da informação estrutural dos compostos do conjunto teste.

O gráfico das relações entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} dos compostos dos conjuntos treinamento e teste são apresentados na Figura 11. Os resultados mostram que os valores preditos se aproximam dos valores experimentais, desviando em não mais que 0,33 unidades logarítmicas para os compostos **27**, **28**, **29** e **32**. Para os compostos **26**, **30** e **31**, os valores preditos apresentam um erro um pouco maior (entre 0,50 e 0,63 unidades logarítmicas). A boa concordância entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} para os compostos do conjunto teste indica a robustez do modelo de HQSAR obtido e a

sua utilidade no planejamento de novos inibidores potentes e seletivos dentro dos limites estabelecidos no espaço químico-biológico investigado.

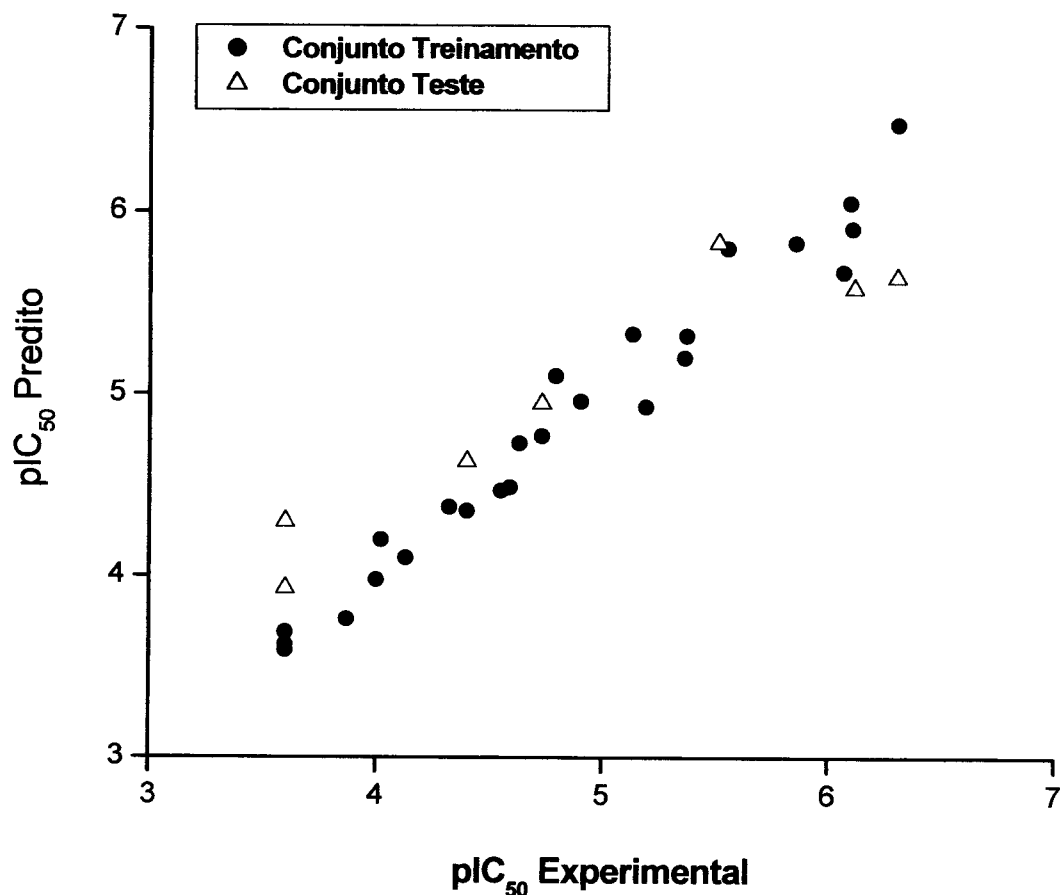


Figura 11. Relação entre os valores experimentais e preditos de pIC₅₀ para os 32 inibidores da PNP de *S. mansoni* (conjuntos treinamento e teste).

Uma característica importante dos modelos de HQSAR é fornecer informações sobre os fragmentos moleculares e sua relação direta com a atividade biológica. A partir dos mapas de contribuição para qualquer composto da série, é possível propor modificações moleculares pontuais capazes de levar a síntese de novas moléculas com propriedades otimizadas. Os fragmentos mais

importantes do composto **9** (o inibidor mais potente do conjunto de dados) são mostrados na Figura 12. De acordo com o módulo de HQSAR implementado no pacote SYBYL 7.0, um código de cores é utilizado para discriminar as principais contribuições atômicas relevantes para a atividade biológica (como já descrito anteriormente no item 4 deste Capítulo). Como pode ser visto na Figura 12, o fragmento molecular representado pelo anel de purina do composto está fortemente relacionado com a atividade biológica do mesmo, com ênfase em sua substituição na posição 9 do anel. Entretanto, em qualquer molécula do conjunto de dados, regiões que apresentam contribuições positivas, negativas ou intermediárias podem ser alvos para modificação molecular, síntese dirigida e estudos de SAR.

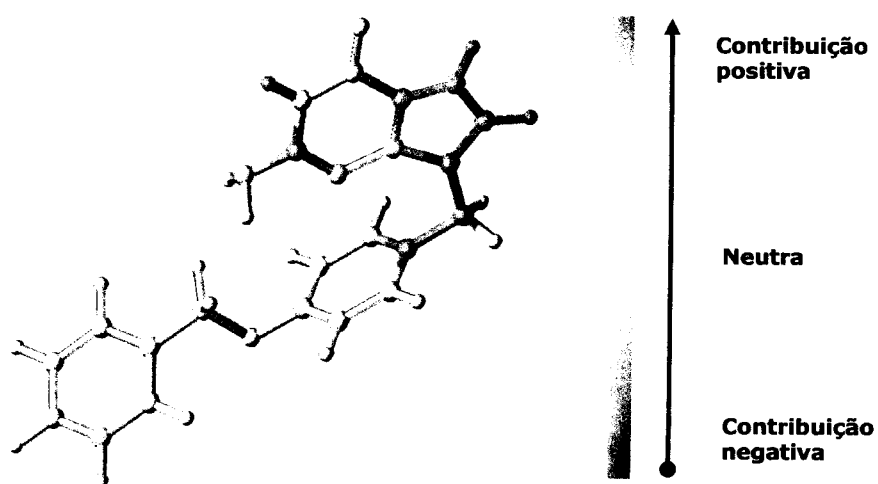


Figura 12. Mapa de contribuição de HQSAR para o composto **9**.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

- ✓ Os conjuntos de dados gerados neste trabalho, tanto para os inibidores da PNP bovina quanto para a PNP de *S. mansoni*, encontram os objetivos e padrões estabelecidos inicialmente. Os inibidores da PNP de *S. mansoni* são os primeiros a serem reportados para a enzima do parasita.
- ✓ A técnica de HQSAR empregada em nossos estudos possui certas qualidades fundamentais para o planejamento de inibidores enzimáticos, encontrando aplicação ampla também no planejamento de moléculas bioativas candidatas a novos fármacos. Estas qualidades incluem: velocidade, robustez computacional, reprodutibilidade, alto poder preditivo e pode ser aplicado em grandes conjuntos de dados de compostos, bem como em conjuntos tradicionais em P&D, com um número menor de moléculas. Além disso, fornece informações estruturais úteis para guiar o trabalho sintético em Química Medicinal.
- ✓ Os modelos finais de HQSAR desenvolvidos neste trabalho possuem consistência interna e externa significativa, associados a um alto poder preditivo. O modelo de HQSAR da PNP bovina apresentou maior robustez geral em função da melhor diversidade química e distribuição dos valores da propriedade biológica, com resultado natural do número de moléculas do conjunto de dados. O desenvolvimento de modelos de comparável qualidade para os inibidores da enzima do parasita demandará a introdução de um conjunto adicional de moléculas capaz de ampliar a diversidade química e a distribuição da propriedade biológica.

- ✓ Os modelos de QSAR gerados, em conjunto com as informações obtidas dos mapas de contribuição de HQSAR, são guias químico-medicinais importantes no planejamento de inibidores mais potentes e seletivos, candidatos a protótipos de novos fármacos.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS

VI. REFERÊNCIAS

1. Andricopulo, A.D.; Montanari, C.A. Structure-Activity Relationships for the Design of Small-Molecule Inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*, 5, 585-593, 2005.
2. Bunin, A.B. Increasing the Efficiency of Small-Molecule Drug Discovery. *Drug Discov. Today*, 18, 823-826, 2003.
3. Merlot, C.; Domine, D.; Church, D.J. Fragment Analysis in Small Molecule Discovery. *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.*, 5, 391-399, 2002.
4. Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M. Química Medicinal As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. Artmed Editora, Porto Alegre, 2001.
5. Bernd, E.R.; Gottschalk, A.H.B.; Philipson, T.J.; Strobeck, M.W. Industry Funding of the FDA: Effects of PDUFA on Approval Times and Withdrawal Rates. *Nature Rev. Drug Discov.*, 4, 545-554, 2005
6. Lombardino, J.G.; Lowe III, J.A. The Role of the Medicinal Chemist in Drug Discovery-Then and Now. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, 853-862, 2004.
7. Dimasi, J.A.; Hnasen, R.W.; Grabowski, H.G. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Cost. *J. Health Econom.*, 22, 151-185, 2003.
8. Yu, H.; Adedoyin, A. ADME-TOX in Drug Discovery: Integration of Experimental and Computational Technologies. *Drug Discov. Today*, 18, 852-861, 2003.
9. Andersen Consulting. Pharmaceutical & Medical Products, Drug Discovery: The Quest for Innovation and Productivity. Roseville, CA, EUA, 1997.
10. Wanke, L.A.; Dubose, R.F. The Evolving Science of Drug Discovery. *Pharm. Pract. Manage Q.*, 18, 13-22, 1998.

11. Cohen, F.J. Macro Trends in Pharmaceutical Innovation. *Nature Rev. Drug Discov.*, 4, 78-84, 2005.
12. Copeland, R.A. Enzymes, a Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Wiley-VCH, New York, págs. 291-303, 2000.
13. Silverman, R.B. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Academic Press Inc., San Diego, págs. 147-161, 1992.
14. Mao, C.; Cook, W.J.; Zhou, M.; Federov, A.A.; Almo, S.C.; Ealick, S.E. Calf Spleen Purine Nucleoside Phosphorylase Complexed with Substrates and Substrate Analogues. *Biochemistry*, 37, 7135-7146, 1998.
15. Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D. Purine Nucleoside Phosphorylases: Properties, Functions, and Clinical Aspects. *Pharm. Ther.*, 88, 349-425, 2000
16. Erion, M.D.; Stoeckler, J.D.; Guida, W.C.; Waltera, R.L.; Ealick, S.E. Purine Nucleoside Phosphorylase. 2. Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, 36, 11735-11748, 1997.
17. Parks, R.E.; Argawal, R.P. The Enzymes, 3.ed. New York, Academic Press, 7, págs 483-514, 1972.
18. Giblett, E.R; Ammann, A.J.; Wara, D.W.; Sandman, R.; Diamond, L.K. Purine Nucleoside-Phosphorylase Deficiency in a Child with Severely Defective T Cell Immunity and Normal B Cell Immunity. *Lancet*, I, 1010-1013, 1975.
19. Cohen, A.; Doyle, D.; Martin, D.W., Jr.; Amman, A.J. Abnormal Purine Metabolism and Purine Overproduction in a Patient Deficient in Purine Nucleoside Phosphorylase. *N. Engl. J. Med.*, 295, 1449-1454, 1976.
20. Amman, A.J. Immunological Aberration in Purine Nucleoside Deficiencies. *Ciba Found. Symp.*, 68, 55-75, 1978.

21. Montgomery, J.A.; Niwas, S.; Rose, J.D.; Secrist III, J.A.; Babu, S.; Bugg, C.E.; Erion, M.D.; Guida, W.C.; Ealick, S.E. Structure-Based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. 1. 9-(Arylmethyl) Derivatives of 9-Deazaguanine. *J. Med. Chem.*, *36*, 55-69, 1993.
22. Sircar, J.C., Gilbertsen, R.B. Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) Inhibitors: Potentially Selective Immunosuppressive Agents. *Drugs Future*, *13*, 653-668, 1988.
23. Montgomery, J.A. Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, *3*, 1303-1313, 1994.
24. Market, M.L. Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency. *Immun. Rev.*, *3*, 45-81, 1991.
25. Weinblatt, M.E.; Coblyn, J.S.; Fraser, P.A., Anderson, R.J.; Spragg, J.; Tretham, D.E.; Austen, K.F. Cyclosporin A. Treatment of Refractory Rheumatoid. *Arthritis Rheum.*, *30*, 11-17, 1987.
26. Ellis, C.N.; Gorsulowsky, D.C.; Hamilton, T.A.; Billings, J.K.; Brown, M.D.; Headington, J.T.; Cooper, K.D.; Baadsgaard, O.; Duell, E.A.; Annesley, T.M.; Turcotte, J.G.; Voorhees, J.J. Cyclosporine Improves Psoriasis Double-Blind Study. *JAMA*, *256*, 3110-3116, 1986.
27. Fox, I.H.; Pallella, T.D.; Kelley, W.N. Hyperuricemia: A Marker for Energy Crisis. *N. Engl. J. Med.*, *317*, 3110-3116, 1986.
28. World Health Organization. Tropical Disease Research, Drug Discovery Research (DDR), UNDP/World Bank/WHO: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), WHO, Geneva, 2001.
29. Kindhauser, M.K. Communicable Diseases 2002: Global Defense Against the Infections Disease Threat. World Health Organization (WHO/CDS/2003-15), WHO, Geneva, 2003.

30. Fairlamb, A.H.; Ridley, R.G.; Vial, H.J. *Drugs Against Parasitic Diseases, R&D Methodologies and Issues. Discoveries and Drug Development.* World Health Organization: Special Programme for Research and Training on Tropical Diseases (TDR), WHO, Geneva, 2003.
31. Freebern, W.J., Osman, A.; Niles, E.G.; Christen, L.; LoVerde, P.T. Identification of a cDNA Encoding a Retinoid X Receptor Homologue from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **19**, 4577-4585, 1999.
32. World Health Organization. *The Control of Schistosomiasis. Second Report of the WHO Expert Committee, WHO technical report series 830.* WHO, Geneva, 1993.
33. Katz, N.; Almeida, K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. *Cienc. Cult.*, **55**, 38-41, 2003.
34. El Kouni, M.H.; Messier, N.J.; Cha, S. Treatment of Schistosomiasis by Purine Nucleoside analogues in Combination with Nucleoside Transport Inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3815-3821, 1987.
35. Senft, A.W.; Miech, R.P.; Brown, P.R.; Senft, D.G. Purine Metabolism in *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.*, **2**, 249-260, 1972.
36. Pereira, H.M. Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*: Estruturas cristalográficas, Estudos Cinéticos e Descoberta de Novos Ligantes. Dissertação de Doutorado - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.
37. Hansch, C.; Kurup, A.; Garg, R.; Gao, H. Chem-Bioinformatics and QSAR: A Review of QSAR Lacking Positive Hydrophobic Terms. *Chem. Rev.* **2001**, **101**, 619-672.

38. Hansch, C.; Leo, A. Exploring QSAR: Fundamental and Applications in Chemistry and Biology; American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1995.
39. Hansch, C.; Hoekman, D.; Gao, H. Comparative QSAR: Toward a Deeper Understanding of Chemicobiological Interactions. *Chem. Rev.* 1996, 96, 1045-1075.
40. Farutin, V.; Masterson, L.; Andricopulo, A.D.; Cheng, J.; Riley, B.; Hakimi, R.; Frazer, J.W.; Cordes, E.H. Structure-Activity Relationships for a Class of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *J. Med. Chem.*, 42, 2422-2431, 1999.
41. Cramer, R.D., III; Patterson, D.E.; Bunce, J.D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5959-5967, 1988.
42. Avery, M.A.; Alvim-Gaston, M.; Rodrigues, C.R.; Barreiro, E.J.; Cohen, F.E.; Sabnis, Y.A.; Woolfrey, J.R. Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisin. 6. The Developing of Predictive *in vitro* Potency Models using CoMFA and HQSAR Methodologies. *J. Med. Chem.*, 45, 292-303, 2002.
43. Silber, K.; Heidler, P.; Kurz, T.; Klebe, G. AFMoC Enhances Predictivity of 3D QSAR: A Case Study with DOXP-reductoisomerase. *J. Med. Chem.*, 48, 3547-3563, 2005.
44. Gangjee, A.; Lin, X. CoMFA and CoMSIA Analyses of *Pneumocystis carinii* Dihydrofolate Reductase, *Toxoplasma gondii* Dihydrofolate Reductase, and Rat Liver Dihydrofolate Reductase. *J. Med. Chem.*, 48, 1448-1469, 2005.
45. HQSAR™, User's Manual, Tripos Inc., St. Louis, 2004.

46. Honorio, K.M.; Garratt, R.C.; Andricopulo, A.D. Hologram Quantitative Structure-Activity Relationships for a Series of Farnesoid X Receptor Activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *15*, 3119-3125, 2005.
47. Lowis, D.R. HQSAR: A new, Highly Predictive QSAR Technique. Tripos Technical Notes, *1*, 1997.
48. Andricopulo, A.D.; Yunes, R.A. Structure-Activity Relationships for a Collection of Structurally Diverse Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *Chem. Pharm. Bull.*, *49*, 10-17, 2001.
49. Golbraikh, A.; Shen, M.; Xiao, Z.; Xiao, Y.; Lee, K.; Tropsha, A. Rational Selection of Training and Test Sets for the Development of Validated QSAR Models. *J. Comp.-Aided Mol. Des.*, *17*, 241-253, 2003.
50. Postigo, M.P.; de Paula, C.B.V.; Krogh, R.; Oliva, G.; Garratt, R.C.; Andricopulo, A.D. Estudos Cinéticos e Avaliação Biológica de Inibidores da Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*. *CETEPE/EESC-USP*, São Carlos, no prelo: 2005.
51. Castilho, M.A.; Postigo, M.P.; de Paula, C.B.V.; Montanari, C.A.; Oliva, G.; Andricopulo, A.D. Two- and Three-dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships for a Series of Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, no prelo: 2005.
52. Secrist III, J.D.; Niwas, S.; Rose, J.D.; Babu, S.; Bugg, C.E.; Erion, M.D.; Guida, W.C.; Ealick, S.E.; Montgomery, J.A. Structure-Based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. 2. 9-Alicyclic And 9-Heteroalicyclic Derivatives of 9-Deazaguanine. *J. Med. Chem.* *36*, 1847-1854, 1993.
53. Guida, W.C.; Elliott, R.D.; Thomas, H.J.; Secrist III, J.A.; Babu, S.; Bugg, C.E.; Erion, M.D.; Ealick, S.E.; Montgomery, J.A. Structure-Based Design

- of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase .4. A Study of Phosphate Mimics. *J. Med. Chem.*, 37, 1109-1114, 1994.
54. Niwas, S.; Cahnd, P.; Pathak, V.P.; Montgomery, J.A. Structure-Based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase .5. 9-Deazahypoxanthines. *J. Med. Chem.*, 37, 2477-2480, 1994.
55. Halazy, S.; Eharhard, A.; Eggenspiller, A.; Berges-Gross, V.; Danzin, C. Fluorophosphonate Derivatives of N-9-Benzylguanine as Potent, Slow-Binding Multisubstrate Analogue Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *Tetrahedron*, 52, 177-184, 1996.
56. Bzowska, A., Koellner, G., Wielgus-Kutrowska, B., Stroh, A., Raszewski, G., Holy, A., Steiner, T., Frank, J.: Crystal Structure of Calf Spleen Purine Nucleoside Phosphorylase with Two Full Trimers in the Asymmetric Unit: Important Implications for the Mechanism of Catalysis *J.Mol.Biol.* 342, 1015, 2004.

ANEXO I

►► Produção científica durante o período de 18 meses de bolsa de mestrado

► Quatro trabalhos em congressos científicos, sendo que dois destes em nível internacional:

1. PAULA, C.B.V.; CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; OLIVA, G.; GARRATT, R.; MONTANARI, C.A.; ANDRICOPULO, A.D. Estudo das Relações Quantitativas Entre a Estrutura e Atividade de Novos Inibidores da Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG. Livro de Resumos, 2005. p. MD035.
2. POSTIGO, M.P.; PAULA, C.B.V.; KROGH, R.; OLIVA, G.; GARRATT, R.; ANDRICOPULO, A. D. Identificação e Avaliação Bioquímica de Novos Inibidores da Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Schistosoma mansoni*. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG. Livro de Resumos, 2005. p. MD036.
3. POSTIGO, M.P.; PAULA, C.B.V.; KROGH, R.; OLIVA, G.; GARRATT, R.; ANDRICOPULO, A.D. Biological Evaluation and Structure-Activity Relationships of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. 2nd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2004, Rio de Janeiro - RJ. Abstract Book, 2004. v. S3-101. p. 65.
4. PAULA, C.B.V.; CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; OLIVA, G.; MONTANARI, C.A.; ANDRICOPULO, A.D. Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. 2nd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2004, Rio de Janeiro - RJ. Abstract Book, 2004. v. S3-102. p. 66.

► Um artigo científico em revista especializada:

1. CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; PAULA, C.B.V.; MONTANARI, C.A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Two- and Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships for a Series of Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, no prelo: 2005.

MD-036

Identificação e avaliação bioquímica de novos inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*

Matheus P. Postigo (IC),* Caroline B. V. de Paula (PG), Renata Krogh (PQ), Glaucius Oliva (PQ), Richard C. Garratt, Adriano D. Andricopulo (PQ)
*m_postigo@yahoo.com.br
Laboratório de Química Medicinal e Computacional - Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - CBME, IFSC - USP

Palavras Chave: PNP, doenças Tropicais, inibidores

Dentre todas as doenças tropicais das quais se tem conhecimento, a esquistossomose situa-se, em termos sócio-econômicos, em segundo lugar, superada apenas pela malária, no que diz respeito ao número de indivíduos afetados (cerca de 300 milhões em 76 países); não possuindo qualquer tratamento efetivo. A enzima purina nucleosídeo fosforilase de *S. mansoni* foi selecionada como alvo biológico para o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de agentes quimioterápicos. No presente estudo, uma série de inibidores da PNP de *S. mansoni* foi estudada e valores de IC_{50} determinados (variando entre 0,101 e 200 μ M, um fator de potência de cerca de 2.000 vezes) em um ensaio padrão combinado. Esses dados constituem um conjunto pioneiro para a enzima de *S. mansoni*, e serão muito úteis nos estudos de SAR e QSAR futuros, no planejamento de novos inibidores mais potentes e seletivos.

MD-037

Avaliação da atividade citotóxica do ion complexo $[Ru(NH_3)_4(C_2O_4)]^+$ sobre macrófagos peritonias murinos

Sandra F. Calixto¹ (IC)*, Yara L. M. Ciloni¹ (IC), Carlos E. S. Barbosa² (PG), Elisângela de P. S. Lacerda² (PQ), Luiz A. Pavanin¹ (PQ).
¹Laboratório de Química Supramolecular, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. ²Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Universidade Federal de Goiás.

Palavras Chave: Rutênio, Câncer.

O estudo de drogas antitumorais vem sendo realizado para se obter novas drogas mais eficientes para o processo quimioterápico. Tem sido verificado que complexos de Ru(II), análogos da cisplatina, têm demonstrado atividade antitumoral sobre diversas linhagens mostrando baixa citotoxicidade sistêmica quando comparados com composto de Pt(II). Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a utilização do ion $[Ru(NH_3)_4(C_2O_4)]^+$ em doses inferiores a 0,08mg/mL podem ser analisadas em relação ao potencial antineoplásico para uso terapêutico.

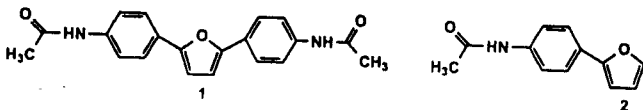
MD-038

Estudos de superposição molecular de acetamidofenilfuranos com a tripanotona redutase

Rafaela S. Ferreira¹ (IC), Renata B. de Oliveira¹ (PQ), Carlos L. Zani¹ (PQ), Thais H. A. da Silva^{2*} (PQ). *e-mail: thais@farmacia.ufmg
¹Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte - MG.
²Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia - UFMG, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte - MG.

Palavras Chave: tripanotona redutase, superposição molecular, acetamidofenilfuranos.

Descrevem-se estudos de superposição molecular entre a tripanotona redutase e a diacetamida 1 ($IC_{50} = 48 \mu$ M)¹ e a acetamida 2 (inativa), com o objetivo de se compreender as interações e obter subsídios para o planejamento de novos inibidores da TR. Com os dados obtidos foi possível explicar a diferença de atividade entre as acetamidas 1 e 2.

**MD-039**

Síntese e avaliação antimicrobiana do derivado tiazolidínico 5-(4-bromobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona

Ivanildo Manguera da Silva,* (PG), Frederico Leite Gouveia¹ (IC), Alda de Andrade Chiappeta¹ (PQ), Késia Xisto da Fonseca R. de Sena¹ (PQ), Julianna Ferreira Cavalcante de Albuquerque¹ (PQ). ivanmanguera@hotmail.com
¹Departamento de Antibióticos, CCB, UFPE, Rua professor Moraes Rego, 1235, CEP 50670-901, Recife-PE, Fone: (81)2126-8347.

Palavras Chave: tiazolidina-2,4-diona, 4-tioxi-tiazolidina, atividade antimicrobiana

Derivados tiazolidínicos têm sido sintetizados e testados contra bactérias, obtendo resultados satisfatórios para grande quantidade de produtos. A obtenção do derivado tiazolidínico 5-(4-bromobenzilideno)-4-tioxi-tiazolidina-2-ona ocorreu a partir da tionação da tiazolidina-2,4-diona, condensada por benzaldeído na posição 5. A estrutura química foi determinada através de métodos espectroscópicos. A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em disco frente a bactérias, levedura e fungo filamentosos. Como padrão foram utilizados cetoconazol, e cefalexina. O composto apresentou halo de inibição para a grande maioria dos microrganismos, determinando assim, o critério de escolha para determinação da CMI (Concentração Mínima Inibitória). Os resultados demonstram significativa atividade antimicrobiana e baixa concentração bacteriostática e bactericida para *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*.

MD-040

Estudos de QSAR 3D CoMFA e CoMSIA de inibidores da enzima purina nucleosídeo fosforilase

Marcelo S. Castilho (PG),¹ Carlos A. Montanari (PQ),² Glaucius Oliva (PQ),¹ Adriano D. Andricopulo (PQ)^{1*} aandrico@if.sc.usp.br
¹Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - CBME, Instituto de Física de São Carlos - USP; ²Núcleo de Estudos em Química Medicinal - NEQUIM, Departamento de Química - UFMG

Palavras Chave: PNP, Inibidores, QSAR 3D

A enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) é um alvo bastante explorado para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. O presente estudo descreve a geração de modelos de QSAR 3D CoMFA e CoMSIA para uma série de inibidores da PNP. O conjunto de dados consiste de 65 inibidores da PNP bovina associados aos correspondentes valores de IC_{50} , que variam entre 260 μ M e 10 nM. Três estratégias de alinhamento 3D foram aplicadas. Os modelos CoMFA gerados apresentam boa capacidade preditiva (e.g., CoMFA-1, $q^2 = 0,68$; $r^2 = 0,88$). A validação externa dos modelos foi conduzida através da criação de um conjunto teste com 13 moléculas. A inclusão do campo hidrofóbico resultou em parâmetros estatísticos levemente superiores quando comparado aos dos modelos CoMFA. Os modelos de QSAR 3D gerados neste estudo são úteis no planejamento de novos inibidores mais seletivos e potentes da PNP.

MD-031**Intese e atividade antimicobacteriana de pró-fármaco do ácido pirazinóico**

São Paulo dos Santos Fernandes^{1*}, Carlos Alberto Brandt², Clarice Queico Fujimura Leite³, Veni Maria Andres Felli⁴
¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, Depto. de Farmácia – Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B.13, São Paulo-SP; ²Instituto Butantan – Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo-SP; ³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, Depto. de Ciências Biológicas – Rod. Araraquara-Jaú, km 01, Araraquara-SP; *jpsfer@usp.br

Palavras Chave: tuberculostático, ácido pirazinóico, *Mycobacterium tuberculosis*.

Tuberculose é uma infecção causada por bacilos do gênero *Mycobacterium*, sendo o *M. tuberculosis* o principal agente patológico. Afeta mais de 1 bilhão de pessoas no mundo e, embora já tenha sido considerada controlada, tem voltado a preocupar por atingir indivíduos portadores do HIV e de baixas condições sócio-econômicas. A pirazinamida, um dos fármacos de primeira escolha no esquema de tratamento da doença, é considerada pró-fármaco do ácido pirazinóico (POA), sendo esta ativada por pirazinamidases bacterianas, e a ausência da enzima confere resistência. Sintetizou-se, neste trabalho, um éster do POA que mostrou atividade antimicobacteriana frente à cepa de *M. tuberculosis* H37Rv cerca de 4 vezes maior que o POA, e comparável ao ciprofloxacino, fármaco utilizado em tuberculose multi-resistente.

MD-032**Atividade antiproliferativa do monastrol e do oxo-monastrol sobre sete linhagens tumorais humanas**

Dennis Russowsky (PQ)¹, Rômulo F. S. Canto (IC)¹, Ângelo de Fátima (PG)², Ronaldo A. Pilli (PQ)², Luciana K. Kohn (PG)³, Márcia A. Antônio (PQ)³, João Ernesto de Carvalho (PQ)³
¹Inst. Química, UFRGS, Porto Alegre, RS. 2. Inst. Química, UNICAMP, Campinas, SP. 3. CPQBA, UNICAMP, Paulínia, SP.

Palavras Chave: Monastrol, Oxo-monastrol, Atividade antiproliferativa.

A atividade antiproliferativa do monastrol e do seu derivado oxo-monastrol foi avaliada nas linhagens de células tumorais humanas. O monastrol mostrou ser cerca de duas vezes mais potente do que a doxorubicina (controle) para as linhagens de mama (MCF-7) e próstata (PC-3). O monastrol foi mais potente do que o oxo-monastrol para todas as linhagens tumorais. Estes resultados indicam que o átomo de enxofre no monastrol é importante para esta atividade.

MD-033**Estrutura cristalográfica da enzima purina nucleosídeo fosforilase de *Shistosoma mansoni* (SmPNP) em complexo com 8-amino guanina**

Marcelo S. Castilho¹ (PG)*, Humberto P. Muniz¹ (PG), Richard C. Garratt¹ (PQ), Adriano D. Andricopulo¹ (PQ)
¹Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural – CBME, Instituto de Física de São Carlos – USP

Palavras Chave: PNP, esquistossomose, cristalografia.

A esquistossomose é uma doença tropical encontrada em 74 países. Os fármacos disponíveis para seu tratamento (praziquantel e mebendazol) mostram uma tendência a reinfeção e aumento da carga parasitária em tratamentos prolongados. A enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) tem papel fundamental nessa via de salvação de purino nucleosídeos, razão pela qual ela é considerada um alvo biológico potencial para o planejamento de moléculas bioativas contra a esquistossomose. Um importante avanço para esse propósito foi a determinação da estrutura cristalográfica da SmPNP em complexo com 8-amino guanina (8-AG). O modelo cristalográfico apresenta $R_{int} = 23,33$ e $R_{free} = 29,92$. A partir das informações estruturais obtidas, iniciamos estudos de relação estrutura atividade (SAR) para inibidores já conhecidos da enzima SmPNP. Agradecimentos: FAPESP, LNLS

MD-034**Transporte do pesticida dichlorvos através do canal do sítio ativo da acetilcolinaesterase: um estudo semi-empírico**

Matheus Monteiro do Nascimento Junior¹ (IC) e Carlos Mauricio R. Sant'Anna^{1*} (PQ)
¹Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ. santanna@ufrrj.br

Palavras Chave: acetilcolinaesterase de insetos, organofosforado, método semiempírico

O objetivo deste trabalho é avaliar, através da modelagem molecular, o transporte do pesticida organofosforado (OP) dichlorvos através do canal que conduz ao sítio ativo da acetilcolinaesterase (AChE). O modelo enzimático foi construído com os 33 aminoácidos da estrutura cristalográfica da AChE de *D. melanogaster*, localizados desde a entrada do canal até seu fundo. Os cálculos foram feitos com o programa Jmol 2002, usando-se o método PM3, com a aproximação LSMO. Observa-se que a entalpia varia pouco no início da travessia do canal, mas sobe fortemente na distância entre 4 e 2,5 Å entre o átomo P do OP e o átomo O da cadeia lateral da serina do sítio ativo. Esta elevação está aparentemente associada com a passagem do OP próximo a resíduos volumosos do canal. A partir daí, a entalpia se reduz continuamente até a distância de 1,7 Å, quando os átomos O e P se tornam covalentemente ligados.

MD-035**Estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade de novos inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Shistosoma mansoni***

Caroline B. V. de Paula (PG),^{1*} Marcelo S. Castilho (PQ),¹ Matheus P. Postigo (IC),¹ Glaucius Oliva (PQ),¹ Richard C. Garratt (PQ),¹ Carlos A. Montanari (PQ),² Adriano D. Andricopulo (PQ)¹ (carol@if.sc.usp.br)
¹Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos – IFSC, Universidade de São Paulo; ²NEQUIM – Núcleo de Estudos em Química Medicinal, Departamento de Química – UFMG

Palavras Chave: PNP, HQSAR, doenças tropicais

A enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) de *Shistosoma mansoni* foi identificada em nossos laboratórios no CBME como um alvo potencial para o planejamento de novos agentes quimioterápicos. Um conjunto de dados com 31 inibidores da PNP de *S. mansoni* correlacionados aos correspondentes valores de IC_{50} foi criado. Este conjunto foi alvo de estudos de QSAR 2D empregando o método HQSAR. O melhor modelo de HQSAR foi gerado usando átomo (A), ligação (B), conectividade (C), quiralidade (Q) e hidrogênio (H) como distinção de fragmento e tamanho de fragmento de 5-8, com $q^2 = 0,813$ e $r^2 = 0,965$. Este modelo de HQSAR é útil no planejamento de novos inibidores mais potentes e seletivos da PNP de *S. mansoni*.

S3-102 Hologram Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase

Caroline B.V. de Paula^{1,*}, Marcelo S. Castilho¹, Matheus P. Postigo¹, Glaucius Oliva¹, Carlos A. Montanari², Adriano D. Andricopulo¹.
*carol@if.sc.usp.br

¹Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos; ²NEQUIM – Núcleo de Estudos em Química Medicinal, Departamento de Química-UFMG

Key words: PNP, enzyme inhibitors, HQSAR

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) deficiency in human produces a relatively selective depletion of T-cells. Inhibitors of PNP are therefore of interest as potential T-cell selective immunosuppressive agents. Predictive hologram quantitative structure-activity relationship (HQSAR) models were developed for a series of PNP inhibitors. A training set containing 65 compounds were used to derive the models. The best HQSAR model was generated using atoms, connection, and donor-acceptor as fragment distinction and 6-9 as fragment size, with cross-validated correlation coefficient q^2 value of 0.902 and conventional r^2 value of 0.987. The predictive ability of the model was validated by an external test set of 10 compounds. The contribution maps obtained from these models were used to explain the individual atomic contributions to the overall activity. This QSAR model should be useful in guiding future medicinal chemistry efforts designed to discover PNP inhibitors with increased potency.

Financial Support: FAPESP, CNPq

S3-103 Homology Modeling of the T₄-Binding Globulin (TBG)

Lucas Bleicher^{1,*}, Igor Polikarpov¹, Danielle M. Andreoni², Gustavo S. Guimaraes², Gisah A. Carvalho, Janete M. Cerutti, Rui M.B. Maciel

*lbleicher@yahoo.com

¹Instituto de Física de São Carlos – USP; ²Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; ³Departamento de Medicina, Universidade Federal do Paraná

Key words: TBG, homology modeling, TBG-CD

The Thyroxine-Binding Globulin (TBG) is the major thyroid hormone transport protein in human serum. It is a glycoprotein of 54 kDa, consisting of a single polypeptide chain of 395 aminoacids and four heterosaccharide units. Some mutations in the TBG gene, located on the X-chromosome, cause the complete thyroxine-binding globulin deficiency (TBG-CD). Two novel mutations have been detected in three different Brazilian families. In this work, we construct homology models for the wild-type TBG and three mutated forms occurring in Brazil, including these two previously unreported forms. The possible viability of these proteins is analyzed in the light of the structure validation softwares and a possible binding site for T₄ is shown.

S3-104 Identification and Biological Evaluation of a New Series of Inhibitors of Adenine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania major*

Ricardo Nicoluci^{1,*}, Adriano D. Andricopulo¹, Waldireny Rocha², Paulo Cezar Vieira², Glaucius Oliva¹, Otavio H. Thiemann².
*nicoluci@ime.usp.br

¹Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - CBME, Instituto de Física de São Carlos – USP; ²Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Key words: APRT, Leishmania, alkaloids

The enzyme adenine phosphoribosyl transferase (APRT) from the parasite *Leishmania major* is an attractive target for drug design. Inhibitors of the parasite APRT are potential agents for the treatment of leishmania. From our program of biological screening of natural products, four new inhibitors of *L. major* APRT were identified and values of IC₅₀ were measured. These inhibitors were employed as templates for the computational searches using the software SciFinder and UNITY. We performed 2D substructure and similarity, and 3D shape searches in order to find potential new hits and leads by searching in-house and commercially available database collections. Upon completion of searches, the hit list of structures was used to select a series of promising compounds for biological evaluation. This valuable approach complements experimental results with structural information by revealing potentially new molecular scaffolds that meet desirable shape and pharmacophore criteria, thereby providing new directions and ideas for compound synthesis and screening.

Financial Support: FAPESP, CNPq

S3-99 Database Mining using Pharmacophore Model to Discover HIV-1 PI and NNRTI

Andrei Leitão*, Lívia de Barros Salum, Irwin Rose Alencar de Menezes, Carlos Alberto Montanari. *andrei@dedalus.lcc.ufmg.br
NEQUIM – Núcleo de Estudos em Química Medicinal – Depto. de Química-UFMG

Key words: database clustering, scaffold generation, chemometrics

The NIH/HIV database was studied for patterns and to identify the most effective hits in describing the protease (PI) and reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). We investigated the feasibility of using a pre-filter to cluster 44.000 molecules. PCA was imposed on dataset to capture the cluster structure prior to cluster analysis that produced two smaller PI-like and NNRTI-like datasets. Some 1D molecular descriptors were generated: number of hydrogen bond acceptors and donors, molecular mass, 5- and 6-membered aliphatic rings and 6-membered aromatic rings. One filter for each target was developed based on the pharmacophore concept by using the UNITY program running under the Sybyl6.8 package. Three-point models were constructed by the inclusion of stereochemical restrictions. Hit lists were generated after employing UNITY search and the 100 most favorable ones were listed by the automated hit rank generation procedure, then these hits were saved on a Sybyl database. This procedure provided new NNRTI and PI scaffolds to be optimized, in an effort to identify new lead molecules.

S3-100 A DFT Study for the Inhibition Mechanism of Carbonic Anhydrase by N-acylhydrazones Derivatives

Anna M. Canavarro Benite^{1,3,*}, Sérgio de P. Machado¹, Carlos Maurício R. de Sant'Anna², Eliezer J. Barreiro³. *anna@iq.ufrj.br
¹LQIC, Instituto de Química, UFRJ; ²Dequim, ICE, UFRJ; ³LASSBio, Faculdade de Farmácia, UFRJ

Key words: carbonic anhydrase, N-acylhydrazone, DFT

A series of N-acylhydrazones (NAH's), which might be relatively nontoxic enzymatic inhibitors, was studied by three-dimensional qualitative structure-properties relationships (SPR) using the Density Functional Theory (DFT) in order to predict information's concerning its interaction with carbonic anhydrase active site (CA). The obtained results helped us to rationalize electronics and geometrics factors that modulate the binding of NAH's with CA and showed that these derivatives are able to coordinate selectively the tetrahedral ion Zn²⁺ of the enzymatic active site modifying these coordination sphere by the formation of a five-membered chelate state. For comparison, the inhibition of CA by coxibs, which are potent and knowledge inhibitor of CA by mobilization of the catalytic zinc, was theoretically studied, suggesting similarities on the molecular mechanism of inhibition. The DFT models presented useful predictive information for the design of new selective NAH's ligands that could be useful in the treatment of glaucoma and macular edema.

S3-101 Biological Evaluation and Structure-activity Relationships of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni*

Matheus P. Postigo*, Caroline B.V. de Paula, Renata Krogh, Glaucius Oliva, Richard C. Garratt, Adriano D. Andricopulo
*m_postigo@yahoo.com.br

¹Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - CBME, Instituto de Física de São Carlos - USP, São Carlos-SP

Key words: PNP, enzyme inhibitors, SAR

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) from the parasite *Schistosoma mansoni* is an emerging target for drug discovery and development. PNP inhibitors are potential agents for the treatment of schistosomiasis. Values of concentrations required for 50% inhibition (IC₅₀) for a family of structurally related, competitive inhibitors of *S. mansoni* PNP have been determined employing inosine as substrate and a manual spectrophotometric assay. In the present study, we report the results of the biochemical evaluation and structure-activity relationships of the first promising family of *S. mansoni* PNP inhibitors.

Financial Support: FAPESP, CNPq

Two- and three-dimensional quantitative structure–activity relationships for a series of purine nucleoside phosphorylase inhibitors

Marcelo S. Castilho,^a Matheus P. Postigo,^a Caroline B. V. de Paula,^a
Carlos A. Montanari,^{b,†} Glaucius Oliva^a and Adriano D. Andricopulo^{a,*}

^aLaboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, 13560-970, São Carlos-SP, Brazil

^bNúcleo de Estudos em Química Medicinal—NEQUIM, Universidade Federal de Minas Gerais, Campus da Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

Received 3 May 2005; revised 16 August 2005; accepted 17 August 2005

Abstract—Comparative molecular field analysis (CoMFA), comparative molecular similarity indices analysis, and hologram quantitative structure–activity relationship (HQSAR) studies were conducted on a series of 52 training set inhibitors of calf spleen purine nucleoside phosphorylase (PNP). Significant cross-validated correlation coefficients (CoMFA, $q^2 = 0.68$; CoMSIA, $q^2 = 0.66$; and HQSAR, $q^2 = 0.70$) were obtained, indicating the potential of the models for untested compounds. The models were then used to predict the inhibitory potency of 16 test set compounds that were not included in the training set, and the predicted values were in good agreement with the experimental results. The final QSAR models along with the information gathered from 3D contour and 2D contribution maps should be useful for the design of novel inhibitors of PNP having improved potency.
© 2005 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Purine nucleoside phosphorylase (PNP, EC 2.4.2.1) is a key enzyme in the purine salvage pathway. PNP catalyzes the reversible phosphorolysis of 2'-deoxypurine ribonucleosides to the corresponding bases and 2-deoxyribose 1-phosphate.^{1–3} Inhibitors of PNP have received special attention because they possess a wide spectrum of plausible utilities in clinical medicine, including the treatment of T-cell proliferative diseases such as T-cell leukemias or lymphomas, for the prevention of transplant rejection, and in the treatment of T-cell autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and lupus.^{4–6} Despite the significant therapeutic potential of PNP inhibitors, which has been recognized for more than twenty years, only two small-molecule inhib-

itors from BioCryst Pharmaceuticals, forodesine hydrochloride (BCX-1777) and BCX-4208, are currently in clinical trials for the control of T-cell malignancies.^{7,8}

Quantitative structure–activity relationships (QSAR) have been successfully employed to create predictive models as a valuable tool to facilitate the discovery of enzyme inhibitors.^{9–11} In the literature, there are only few studies on the quantitative relationship between the chemical structure information and the inhibitory potency of PNP inhibitors,^{12,13} and to the best of our knowledge, no three-dimensional QSAR investigation has been reported to date.

In the present study, we have collected values of IC_{50} for a series of ground-state inhibitors of calf spleen PNP and used the data to create 3D and 2D QSAR models which show substantial predictive promise. The QSAR studies were carried out using comparative molecular field analysis (CoMFA),¹⁴ comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA),¹⁵ and hologram QSAR (HQSAR).¹⁶ The results of modeling this data set are reported herein.

Keywords: QSAR; CoMFA; CoMSIA; HQSAR; PNP; Inhibitors.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3373 8095; fax: +55 16 3373 9881; e-mail: aandrico@ifsc.usp.br

† Present address: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, 13560-970, São Carlos-SP, Brazil.

60 2. Materials and methods

2.1. Computational approach

The QSAR modeling analyses, calculations, and visualizations for CoMFA, CoMSIA, and HQSAR were performed using the SYBYL 6.9.2 package (Tripos Inc., St. Louis, USA) running on Red Hat Linux 7.3 workstations. Docking protocol as implemented in GOLD 2.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK) was employed to search the possible binding conformations of ligands into the PNP active site. The X-ray crystallographic data for PNP in complex with 1,4-dideoxy-4-aza-1-(*S*)-(9-deazahypoxanthin-9-yl)-*D*-ribose (PDB code: 1B8O) used in docking simulations were retrieved from the Protein Data Bank (PDB).

2.2. Kinetic measurements

Calf spleen PNP (phosphate-free, purity greater than 98%) and xanthine oxidase were of the best grades available from Sigma Chemicals and were used without further purification. Other reagents were obtained commercially from either Sigma or Aldrich and were of the best grade available. Kinetic measurements were carried out spectrophotometrically with the aid of a Shimadzu UV–vis spectrophotometer, using a standard coupled assay as previously described.^{12,13} All measurements were made at 25 °C and pH 7.4, employing 10 μM inosine and 1 mM phosphate as substrates. Kinetic parameters were estimated from the collected data employing the Sigma-Plot enzyme kinetics module. Values of IC₅₀ were independently determined by making rate measurements for at least five inhibitor concentrations. The values represent means of at least three individual experiments.

2.3. Data sets

The data set used for the 3D and 2D QSAR analyses contains 68 inhibitors of calf spleen PNP, which were selected from our own data and literature data.^{12,13,17–21} Values of IC₅₀ for a number of literature inhibitors, employing inosine as substrate, were determined in our laboratory and the results are in good agreement with those previously reported. The structures and corresponding IC₅₀ values for the complete set of compounds are included in Table 1. The 3D structures of the PNP inhibitors were constructed using CONCORD and standard geometric parameters of molecular modeling software package SYBYL 6.9.2. Each single optimized conformation of each molecule in the data set was energetically minimized employing the atom-centered partial charge MNDO-ESP calculations implemented in MOPAC 6.0.

2.4. Molecular modeling

The advanced molecular docking program GOLD 2.1 uses a genetic algorithm as the conformational search tool and different scoring functions (e.g., GOLDScore, CHEMScore) to rank the pose thus obtained. All docking simulations were carried out with the X-ray coordinates of the calf spleen PNP structure to which hydrogen atoms were added in standard geometry, after

removal of the ligand and water molecules. The active site was centered on C1 atom of the 1,4-dideoxy-4-aza-1-(*S*)-(9-deazahypoxanthin-9-yl)-*D*-ribose and a radius of 12 Å was considered during the docking procedure. His, Gln, and Asn were manually checked for possible flipped orientation, protonation, and tautomeric states with Pymol (DeLano Scientific, San Carlos, USA) side-chain wizard script. Minimized inhibitor structures were used in the docking protocol, which was repeated 10 times for each inhibitor due to the stochastic nature of the search algorithm. Default parameters and GOLDScore function were employed in all runs, and only the best ranked conformation of each inhibitor was considered for 3D QSAR studies.

2.5. Molecular alignment

Alignment is a crucial component in 3D QSAR studies, and a variety of useful approaches have been described in the literature.^{14,15,22–25} Three alignment approaches were used in the present study:

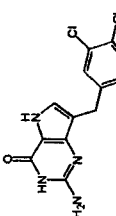
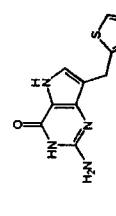
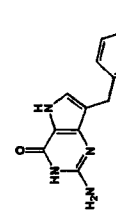
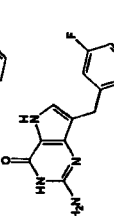
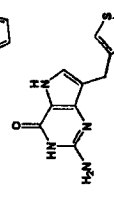
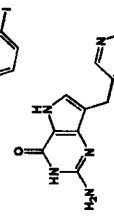
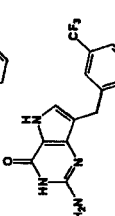
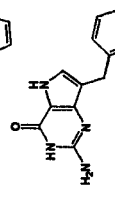
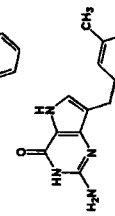
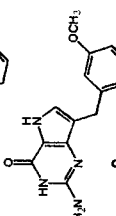
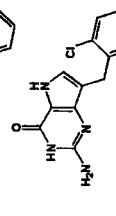
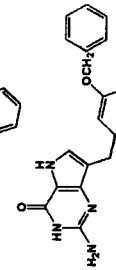
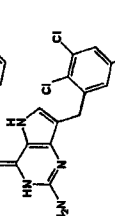
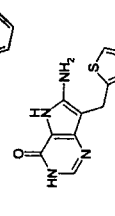
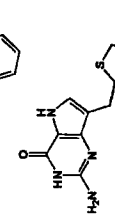
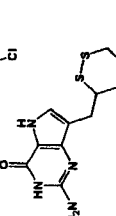
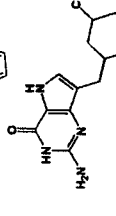
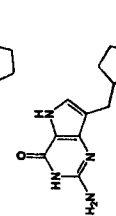
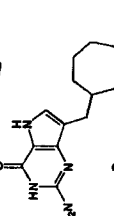
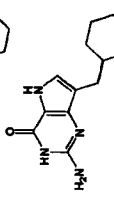
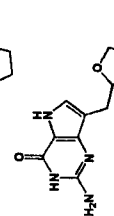
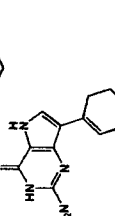
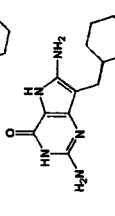
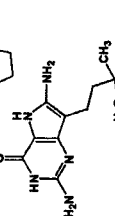
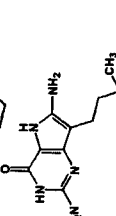
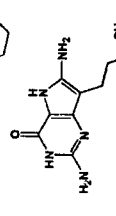
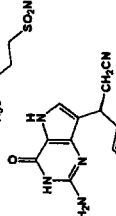
1. Alignment 1. The lowest energy conformer of compound **28** (the most potent inhibitor of the data set) was used as template structure for the molecular alignment. All molecules were aligned by using simple align database (rigid fit) option in SYBYL 6.9.2. Alignment and common purine base atoms used for superimposition are shown in Figure 1.
2. Alignment 2. This alignment was generated by the docking protocol implemented in GOLD 2.1.^{15,26,27} The aligned molecules were then exported to SYBYL and MOPAC charges were assigned before CoMFA and CoMSIA field calculations. The aligned data set is depicted in Figure 2A.
3. Alignment 3. Conformations generated by the docking program GOLD 2.1 were aligned on template molecule **28** according to the same protocol used in alignment 1. The aligned molecules of the data set are depicted in Figure 2B.

2.6. 3D QSAR studies

To better understand and explore the contributions of electrostatic, steric, and hydrophobic fields in the binding of the data set inhibitors to PNP, and to build predictive 3D QSAR models, CoMFA and CoMSIA studies were performed based on the three molecular alignments described. CoMFA calculates steric and electrostatic properties according to Lennard-Jones and Coulomb potentials, respectively, whereas, CoMSIA calculates similarity indices in the space surrounding each of the molecules in the data set.

2.6.1. CoMFA. The aligned training set molecules were placed in a 3D grid box such that the entire set was included in it. CoMFA steric and electrostatic fields were generated at each grid point with Tripos force field using an sp³ carbon atom probe carrying a +1 net charge. The CoMFA grid spacing of 2.0 Å in the *x*, *y*, and *z* directions, and the grid region were automatically generated by the CoMFA routine to encompass all molecules with an extension of 4.0 Å in each direction. CoMFA

Table 1. Chemical structures and corresponding IC₅₀ values (μM) for a series of inhibitors of calf spleen purine nucleoside phosphorylase

Compound	Structure	IC ₅₀	Compound	Structure	IC ₅₀	Compound	Structure	IC ₅₀
Training set molecules								
1			2		0.017 ± 0.007	3		0.021 ± 0.004
4			5		0.024 ± 0.007	6		0.025 ± 0.013
7			8		0.036 ± 0.012	9		0.051 ± 0.012
10			11		0.082 ± 0.025	12		0.120 ± 0.040
13			14		0.240 ± 0.020	15		0.160 ± 0.013
16			17		0.018 ± 0.010	18		0.025 ± 0.006
19			20		0.030 ± 0.017	21		0.047 ± 0.014
22			23		1.900 ± 0.033	24		6.600 ± 0.700
25			26		260.0 ± 21.0	27		50.0 ± 5.0
								0.011 ± 0.001

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compound	Structure	IC ₅₀	Compound	Structure	IC ₅₀	Compound	Structure	IC ₅₀
28		0.010 ± 0.01	29		0.040 ± 0.004	30		0.029 ± 0.003
31		0.028 ± 0.003	32		0.190 ± 0.015	33		0.047 ± 0.004
34		0.124 ± 0.018	35		0.064 ± 0.004	36		0.135 ± 0.051
37		0.039 ± 0.003	38		0.042 ± 0.002	39		0.546 ± 0.320
40		4.170 ± 0.410	41		1.520 ± 0.210	42		7.030 ± 0.200
43		8.490 ± 0.210	44		0.092 ± 0.004	45		0.852 ± 0.038
46		0.497 ± 0.026	47		2.866 ± 0.290	48		1.971 ± 0.150
49		1.839 ± 0.060	50		22.840 ± 1.820	51		1.758 ± 0.090
			52		1.000 ± 0.099			

(continued on next page)

Compound	Structure	IC ₅₀	Compound	Structure	IC ₅₀	Compound	Structure	IC ₅₀
Test set molecules								
53		0.020 ± 0.007	54		0.025 ± 0.001	55		0.070 ± 0.004
56		0.270 ± 0.016	57		0.025 ± 0.003	58		0.090 ± 0.005
59		200.0 ± 25.0	60		0.035 ± 0.002	61		0.036 ± 0.003
62		0.015 ± 0.001	63		0.362 ± 0.014	64		1.043 ± 0.003
65		2.710 ± 0.002	66		0.083 ± 0.005	67		2.299 ± 0.221
			68		0.674 ± 0.032			

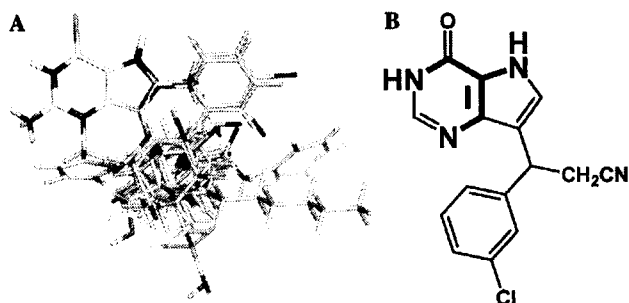


Figure 1. Three-dimensional data set alignment. (A) Alignment 1. (B) Template molecule (inhibitor 28) used for the molecular alignment (reference atoms in the purine ring are shown in bold).

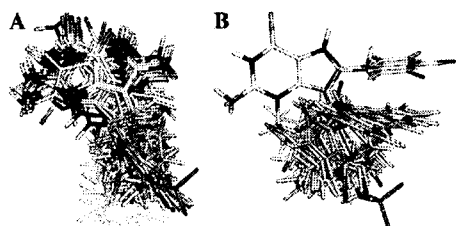


Figure 2. Alignment of the data set molecules for conformations generated by GOLD 2.1. (A) Alignment 2. (B) Alignment 3.

region focusing method was applied to increase the resolution of CoMFA models. The default value of 30 kcal mol^{-1} was set as the maximum steric and electrostatic energy cutoff. Minimum-sigma (column filtering) was set to be $2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ to improve the signal-to-noise ratio by omitting those lattice points where energy variation is below the threshold. All models were investigated using full cross-validated (q^2), partial least squares (PLS), leave-one-out (LOO), and leave-many-out (LMO) methods with CoMFA standard options for scaling of variables. Progressive scrambling method was applied to determine the sensitivity of the QSAR models to chance correlations.

2.6.2. CoMSIA. The same training set was adopted for CoMSIA investigations. Electrostatic, steric, and hydrophobic fields were evaluated using the standard parameters implemented in SYBYL 6.9.2. The lattice dimensions were selected with a sufficiently large margin (4.0 \AA) to enclose all molecules as in the CoMFA analysis. Any singularities were avoided at atomic positions in CoMSIA fields because a Gaussian-type distance dependence of the physicochemical properties was adopted; thus, no arbitrary cutoffs were required. Similarity indices were computed using a probe with a charge of +1, a radius of $+1.0 \text{ \AA}$, a hydrophobicity of +1, and 0.3 as attenuation factor for the Gaussian-type distance. The statistical evaluation for the CoMSIA analyses was performed in the same way as described for CoMFA.

2.7. 2D QSAR studies

The necessity of structural alignment and descriptor calculation makes use of 3D QSAR non-trivial. A powerful strategy is to search for synergies in combining 2D and

3D methods in the development of predictive QSAR models.²⁸ In this context, predictive 2D QSAR models were constructed for this series of PNP inhibitors using the HQSAR technique, which requires only 2D structures and biological activity as input.

2.7.1. HQSAR. In this method, each molecule in the data set is broken down into several unique structural fragments, which are arranged to form a molecular hologram. HQSAR encodes all possible molecular fragments (i.e., linear, branched, and overlapping). With the transformation of the chemical representation of a molecule into its corresponding molecular hologram, this method requires no explicit 3D information for the ligands (e.g., determination of 3D structure, putative binding conformations, and molecular alignment). HQSAR models can be affected by a number of parameters concerning hologram generation: hologram length, fragment size, and fragment distinction. Several combinations of fragment distinction were considered during the QSAR modeling runs. Holograms were generated using 6 distinct fragment sizes. HQSAR analysis was performed by screening the 12 default series of hologram lengths. The patterns of fragment counts from the training set inhibitors were then related to the experimental biological data using PLS analysis.

3. Results and discussion

3.1. Chemical and biological data

3D QSAR CoMFA and CoMSIA, and 2D HQSAR models were derived for a series of 68 ground-state inhibitors of calf spleen PNP. The corresponding values of IC_{50} vary from 0.01 to $260 \mu\text{M}$, a factor of 26,000 (Table 1). The in vitro IC_{50} values were converted into the corresponding pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) values. It is worth noting that the IC_{50} values used in this work were measured under the same experimental conditions, a fundamental requirement for QSAR studies. Thus, the data set is appropriate for the purposes of QSAR model development. The generation of reliable models is dependent on the creation of appropriate training and test sets. The data set of 68 inhibitors was divided into training (52 compounds, 1–52, Table 1) and test (16 compounds, 53–68, Table 1) sets in the ratio of 3.25:1. A statistical cluster analysis was carried out with Tsar 3D version 3.3 (Accelrys, San Diego, USA) using the complete linkage clustering method (Euclidean distances) with no data standardization. The cluster analysis grouped the compounds into 2 major clusters (amalgamation distance of 0.6). The test set contains 9 compounds in cluster 1 and 7 compounds in cluster 2. The training set contains 33 compounds in cluster 1 and 19 in cluster 2. Another important point addressed in the analysis was the similarity between molecules. Considering that the structural diversity of the data set is modest with the bulk of the compounds being 9-substituted-9-deazaguanines (or 9-guanines), the composition of the QSAR training and test sets is necessarily representative of the whole data set in terms of similarity. Thus, these results show the appropriate chemical diversity and

distribution of biological property across the range of IC_{50} values for both training and test set compounds.

The pIC_{50} values employed in this study span approximately five orders of magnitude and property values, although weighted toward the high-potency end of the spectrum, are acceptably distributed across the range of values. The PLS method was used for all 3D and 2D QSAR analyses. CoMFA, CoMSIA, and HQSAR descriptors were used as independent variables, whereas pIC_{50} values were used as dependent variables in the PLS regression analyses to derive QSAR models. The predictive ability of the models was assessed by their q^2 values.

3.2. 3D QSAR analyses

3.2.1. CoMFA and CoMSIA models. CoMFA and CoMSIA methods are based on the assumption that changes in binding affinities of ligands are related to changes in molecular properties represented by molecular fields. The alignment rule and the bioactive conformation are crucial variables as both will affect the outcome of the 3D statistical analysis. In the present study, three different molecular alignments (alignments 1, 2, and 3) were submitted to CoMFA and CoMSIA analyses, and the statistical results are presented in Table 2. As it can be seen, the best statistical results among all models were obtained for CoMFA 1 (alignment 1), which produced a cross-validated correlation coefficient q^2 of 0.68 with 2 components, and CoMFA 2 (alignment 2), which produced a q^2 of 0.68 with 3 components. Hence, these two models were chosen for further investigations. A conventional non-cross-validated correlation coefficient r^2 of 0.89 was obtained for CoMFA 1 with a standard error of estimate (SEE) of 0.40, while an r^2 of 0.90 with a SEE of 0.40 for CoMFA 2. In all cases, no significant differences were observed using the LMO method. Progressive scrambling of the data set was also carried out to check for possible chance correlations and test the stability of the models. The results of progressive scrambling further confirmed consistency of the models as defined by the critical slope, and optimum statistics for cSDEP and Q^2 obtained at the end of different runs. The r^2 expresses the quality of the data fit rather than the quality of prediction, which is assessed by q^2 . Additional components produced no significant increase in the q^2 values and were then discarded of the final models. On the other hand, the best statistical result among all the CoMSIA models was generated employing align-

ment 1 (CoMSIA 1). The region focusing was weighted by $SD \times$ coefficient values ranging from 0.3 to 1.5 and grid spacing ranging from 0.5 to 2.0. This strategy not only increased q^2 values during the process of model generation, but also resulted in the refinement of 3D contour maps. CoMFA 1 steric field descriptor explains 53% of the total variance, while the electrostatic descriptor explains the rest 47% (Table 2). CoMFA 2, steric field descriptor, explains 43% of the variance, while the electrostatic descriptor accounts for the rest 57%. CoMSIA 1 steric and hydrophobic fields explain 30% of the variance each, with the electrostatic field being responsible for the other 40%. The CoMFA 2 contour maps for the steric field are shown in Figure 3A and those for the electrostatic field in Figure 3B, both with compound **28** represented as PLS $SD \times$ coefficient plots.

CoMFA 2 contour maps show regions in 3D space where changes of steric and electrostatic fields for 9-substituted purines correlate strongly with concomitant changes in inhibitory potencies.

The CoMFA electrostatic contour map shows several red contours surrounding the group attached at the 9-position of the purine ring in the template molecule, encompassing the aromatic ring and the cyanil moiety, representing regions where electronegative environment would enhance activity. Another red contour, located near the oxygen atom at the 6-position of the purine ring, indicates that high electron density may play a favorable role in inhibitory potency. Two small blue-colored contours represent regions where electropositive groups would contribute to increase inhibitory potency. The steric contour map of the final CoMFA 2 model shows a green region forming a cavity near the cyanil moiety present in the group attached at the 9-position of the purine ring indicating the preference for bulkier substituents in that region. There is also a small green contour near O6 and N7 in the purine ring of the template molecule indicating a sterically favorable region. The disfavored steric yellow region seen above the plane of the aromatic ring in the group attached at the 9-position of the purine ring suggests that bulkier substituents may decrease the PNP inhibitory potency.

The q^2 LOO procedure used may give a suitable representation of the real predictive power of the models for novel inhibitors of PNP. However, the predictive ability of CoMFA 1 and CoMFA 2 models, derived with the 52 training set molecules, was assessed by

Table 2. CoMFA and CoMSIA results (alignments 1, 2, and 3)

Model	q^2	N	r^2	SEE	F	Fraction (%)		
						S	E	H
CoMFA 1	0.68	2	0.89	0.40	89.51	53	47	—
CoMFA 2	0.68	3	0.90	0.40	88.22	43	57	—
CoMFA 3	0.66	3	0.82	0.48	72.89	50	50	—
CoMSIA 1	0.66	3	0.85	0.45	86.64	30	40	30
CoMSIA 2	0.53	3	0.78	0.53	57.73	29	43	28
CoMSIA 3	0.60	2	0.78	0.70	89.46	30	34	36

q^2 , Leave-one-out (LOO) cross-validated correlation coefficient; N , optimum number of components; r^2 , non-cross-validated correlation coefficient; SEE, standard error of estimate; F , F test value; S, steric field; E, electrostatic field; H, hydrophobic field.

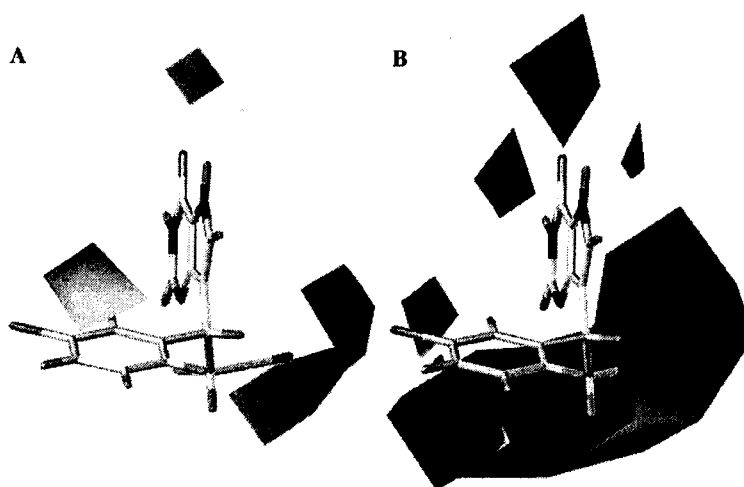


Figure 3. Representation of the 3D contour maps ($SD \times coefficient$) for CoMFA 2. (A) steric field, (B) electrostatic field (see text for further explanation). The most potent PNP inhibitor (**28**) is displayed in the background for reference.

Table 3. Experimental and predictive activities (pIC_{50}) with residual values for the test set compounds for CoMFA 1, CoMFA 2, and HQSAR models

Test set compounds	Experimental ^a	Predicted CoMFA 1 ^a	CoMFA 1 residuals ^b	Predicted CoMFA 2 ^a	CoMFA 2 residuals ^b	Predicted HQSAR ^{a,c}	HQSAR residuals ^b
53	7.70	7.50	0.20	7.24	0.40	7.34	0.36
54	7.60	7.39	0.21	7.14	0.45	7.34	0.26
55	7.15	7.56	-0.38	7.72	-0.57	7.27	-0.12
56	6.57	7.05	-0.58	7.07	-0.39	7.23	-0.60
57	7.60	7.00	0.48	7.56	0.04	7.05	0.35
58	7.05	7.18	-0.13	7.09	-0.04	7.75	-0.55
59	3.70	3.89	-0.19	3.90	0.20	3.97	-0.27
60	7.46	7.57	-0.11	7.51	-0.05	7.56	-0.10
61	7.45	7.09	0.36	7.39	0.06	7.37	0.08
62	7.82	7.69	0.13	7.33	0.49	7.13	0.58
63	6.44	5.81	0.63	6.20	0.24	5.87	0.57
64	5.98	6.26	-0.28	6.28	-0.30	5.99	-0.01
65	5.57	5.54	0.03	5.64	0.10	5.56	0.01
66	7.08	7.68	-0.60	7.10	-0.11	7.26	-0.18
67	5.64	5.38	0.26	5.56	0.08	6.07	-0.40
68	6.17	6.84	-0.62	6.33	-0.16	6.07	0.10

^a pIC_{50} values.

^b The difference between experimental and predicted values.

^c Fragment distinction: atoms, bonds, connections, and chirality.

360 predicting biological activities of an external test set of 16 molecules (compounds **53–68**, Table 1). Prior to prediction, the test set compounds were processed identically to the training set compounds, as previously described. The external validation process can be considered the most valuable validation method, as these compounds were completely excluded during the training of the model. The results are listed in Table 3, and the graphic results simultaneously displayed in Figure 4.

370 The good agreement between experimental and predicted pIC_{50} values for both models indicates the reliability of the constructed 3D QSAR models. The predicted values fall close to the experimental pIC_{50} values, not deviating by more than 0.4 log units. The only exceptions are compounds **56**, **57**, **63**, **66**, and **68** for CoMFA 1, and compounds **54**, **55**, and **62** for CoMFA 2, for which the predicted values are more substantially in error (be-

tween 0.45 and 0.63 log units). None of the inhibitors were detected as outliers, the predictions for all compounds are within 2 standard deviations of the estimated error. The good agreement between experimental and predicted pIC_{50} values for the test set compounds suggests that the models are of sufficient quality and can be used in the design of new inhibitors with improved potency.

3.3. Structure-based docking and 3D QSAR studies

380 The understanding of protein–ligand interactions is essential for the design of novel synthetic inhibitors when appropriate information is available. In the present study, we used an approach that combines 3D QSAR and structure-based molecular docking to investigate the detailed interactions between PNP active site and small-molecule inhibitors. The crystal structure of

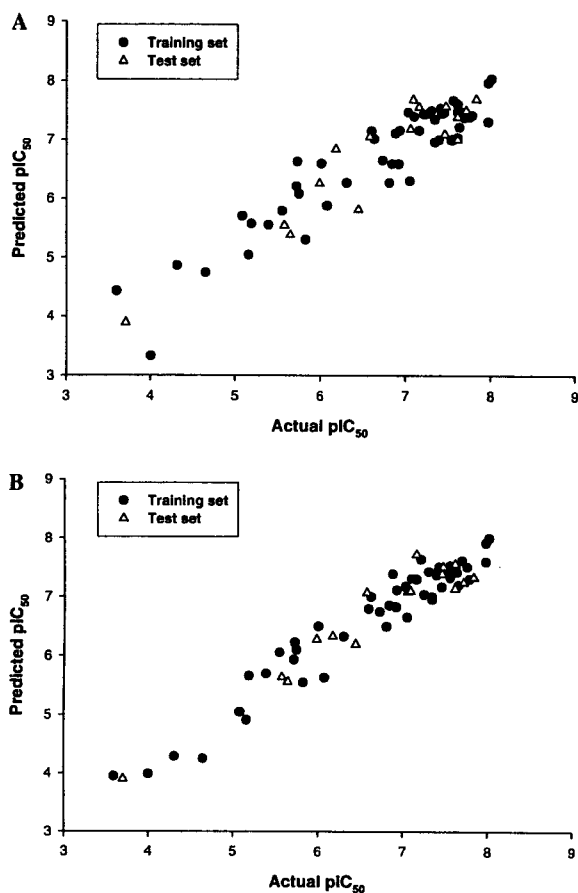


Figure 4. Plot of predicted values of pIC_{50} versus the corresponding experimental values for the training (solid circle) and test (open triangles) set compounds for CoMFA 1 (A) and CoMFA 2 (B) models.

390 calf spleen PNP (PDB code: 1B8O) was used for the docking studies. The bovine structure of PNP corresponds closely to that of human erythrocytes, with high identity and conservation of all amino acid residues in the catalytic region. The 68 data set inhibitors were docked into the PNP putative binding site using the

docking program GOLD 2.1, as shown in Figure 5A. The final 3D aligned molecules produced a statistically significant 3D QSAR model (CoMFA 2) with good correlation and predictive power.

Crystallographic studies of PNP-inhibitor complexes have identified Asn243 and Glu201 as the key residues in PNP catalytic mechanism. The proposed binding modes of the molecules generated with GOLD 2.1 are in good agreement with the crystallographic data. To illustrate the intermolecular interactions implicated in purine base binding, the most potent inhibitor (28) of the series is shown in Figure 5B for further analysis. As it can be seen, the carboxamide group of the Asn243 side chain forms a hydrogen bond with O6 of the purine ring, while the side-chain carboxylate of Glu201 is close to accepting a hydrogen bond from N1 (3.42 Å). Similar interactions are observed in other PNP crystallographic structures. The proposed binding mode also suggests additional interactions with residues Thr242 and Tyr192. In particular, N7 may hydrogen bond to Thr242 (2.49 Å), thus fulfilling the inhibitor hydrogen bonding network.

According to the proposed binding model, there is still room for bulkier groups at the 9-position of the purine ring. This observation is in good agreement with the CoMFA 2 steric contour map (Fig. 3A), which shows a large green region surrounding the cyanil moiety. The same trend could be observed near O6, which interacts with Asn243 (Fig. 5). However, the small green area in Figure 3A does not suggest any favorable structural variations in this region. The disfavored yellow contour located near the PO_4^{2-} binding site in the steric contour map suggests that bulkier groups would be in conflict with PO_4^{2-} . It is possible that electrostatic interactions with PO_4^{2-} would have some influence on activity in this situation, but the CoMFA 2 electrostatic contour map does not support this hypothesis (Fig. 3B). According to docking studies and the electrostatic contour map, the most important region, where additional positive groups would enhance activity, is located near Glu201.

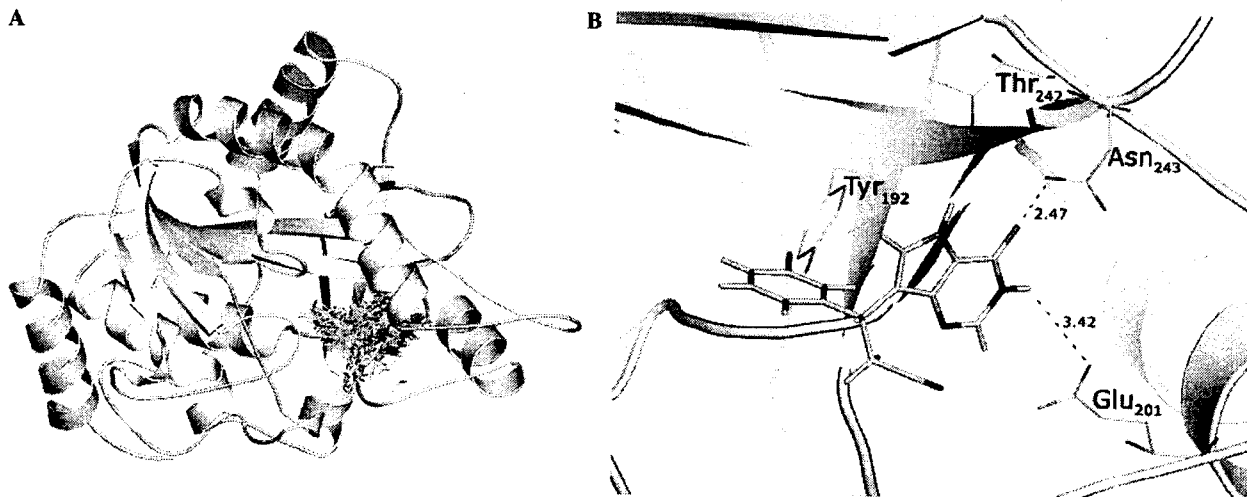


Figure 5. (A) Three-dimensional alignment of the 68 inhibitors in the active site of calf spleen PNP (alignment 2) generated by the docking program GOLD 2.1. (B) Representation of the intermolecular interactions implicated in purine base binding of inhibitor 28.

3.4. 2D QSAR analyses

3.4.1. HQSAR models. HQSAR investigation requires selecting values for parameters that specify the length of the hologram, as well as the size and type of fragment that are to be encoded. In this study, holograms were generated using the standard parameters implemented in SYBYL 6.9.2. The generation of molecular fragments was carried out using the following fragment distinctions: atoms (A), bonds (B), connections (C), hydrogen atoms (H), chirality (Ch), and donor and acceptor (DA). Several combinations of these parameters were considered using the fragment size default (4–7), as follows: A/B, A/B/C, A/B/C/H, A/B/C/Ch, A/B/C/H/Ch, and A/C/DA. HQSAR analysis was performed over the 12 default series of hologram lengths of 53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, and 401 bins. The statistical results from the PLS analyses for the 52 training set compounds using several fragment distinction combinations are summarized in Table 4. The best statistical results were obtained using either A/B ($q^2 = 0.67$, and $r^2 = 0.86$ with a SEE of 0.42) or A/B/C/Ch as distinction information ($q^2 = 0.68$, and $r^2 = 0.85$ with a SEE of 0.42), with 3 components being optimum in both cases. The use of other fragment distinction into molecular hologram does not improve the quality of the model as measured by the statistical parameters shown in Table 4.

The influence of different fragment sizes in the statistical parameters was further investigated for the HQSAR model generated using A/B/C/Ch. Fragment size parameters control the minimum and maximum lengths of fragments to be included in the hologram fingerprint. These parameters can be changed to include larger or smaller fragments in the holograms. As mentioned previously, default fragments between 4 and 7 were used to derive the best HQSAR model. These default values had proved useful in a number of situations. The statistical results for the different fragment sizes evaluated (2–5, 3–6, 4–7, 5–8, 6–9, and 7–10) are summarized in Table 5. As it can be seen, the variation of the fragment size led to the generation of a better HQSAR model compared to that derived using the fragment size default (4–7). The best statistical result ($q^2 = 0.70$, and $r^2 = 0.90$ with a SEE of 0.38) among all models was ob-

Table 4. HQSAR analysis for various fragment distinction on the key statistical parameters using fragment size (4–7)

Fragment distinction	Statistical parameters				
	q^2	r^2	SEE	HL	N
A/B	0.67	0.86	0.42	71	3
A/B/C	0.65	0.84	0.46	307	3
A/B/C/H	0.59	0.72	0.60	257	3
A/B/C/Ch	0.68	0.85	0.42	97	3
A/B/C/H/Ch	0.57	0.70	0.62	257	3
A/C/DA	0.59	0.76	0.56	61	3

q^2 , cross-validated correlation coefficient; r^2 , non-cross-validated correlation coefficient; SEE, non-cross-validated standard error; HL, hologram length; N , optimal number of components. Fragment distinction: A, atoms; B, bonds; C, connections; H, hydrogen atoms; Ch, chirality; DA, donor and acceptor.

Table 5. HQSAR analysis for the influence of various fragment sizes on the key statistical parameters using the best fragment distinction (A/B/C/Ch)

Fragment size	Statistical parameters				
	q^2	r^2	SEE	HL	N
2–5	0.66	0.80	0.50	151	3
3–6	0.66	0.85	0.44	151	3
4–7	0.68	0.84	0.46	97	3
5–8	0.66	0.85	0.45	401	3
6–9	0.70	0.90	0.38	401	3
7–10	0.64	0.79	0.52	401	3

tained with the fragment size 6–9, with 3 being the optimum number of PLS components. These results confirm the importance of testing the influence of different fragment sizes in the resultant molecular hologram. Moreover, the data in Tables 4 and 5 show that there is no correlation between predictive power of the HQSAR models and hologram length, which may be expected as the pattern of bin occupancies in the molecular hologram will change in a non-trivial manner with respect to changes in hologram length.

In terms of validation of a QSAR model, a measure of internal consistency is available in the form of q^2 . However, the most important test of a QSAR model is its ability to predict the property value for new compounds. As the structure encoded in a 2D fingerprint is directly related to the biological activity of series of molecules, HQSAR models should be able to predict the activity of new structurally related PNP inhibitors from its fingerprint. Thus, the predictive power of the best HQSAR model derived using the 52 training set molecules (fragment distinction: A/B/C/Ch; fragment size: 6–9, Table 5) was assessed by predicting pIC_{50} values for 16 test set molecules (compounds 53–68, Table 1), which were completely excluded during the training of the model. For simplification, the results are also listed in Table 3. The graphic results for the experimental versus predicted pIC_{50} values of both training and test sets are displayed in Figure 6. The results show that the test set

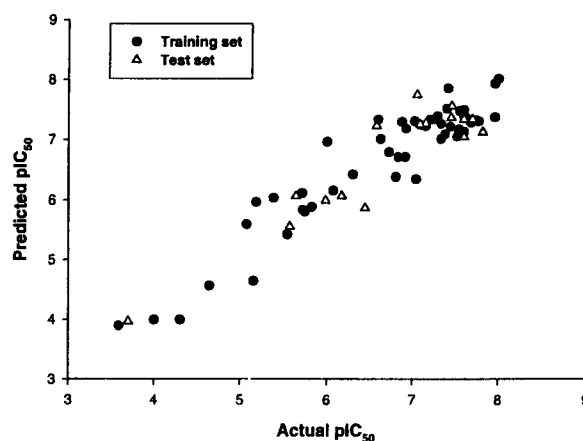


Figure 6. Plot of predicted versus experimental values of pIC_{50} for the 68 PNP inhibitors (training and test set compounds are discriminated).

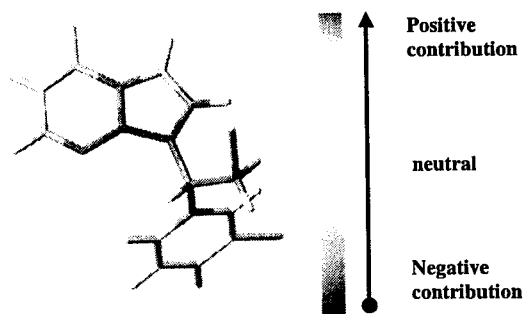


Figure 7. HQSAR contribution map for compound 28.

compounds, which represent the different structural properties incorporated within the training set, are well predicted without any outliers (residual values are less than 2 standard deviations of the estimated error). The predicted values fall close to the experimental pIC₅₀ values, deviating by no more than 0.4 log units. The only exceptions are compounds 56, 58, 62, and 63, for which the predicted values are more in error (between 0.55 and 0.60 log units), respectively. The good agreement between experimental and predicted pIC₅₀ values for the test set compounds indicates the robustness of the HQSAR model (Fig. 6). Besides predicting the potency of untested inhibitors, an HQSAR analysis provides important hints about what molecular fragments are directly related to biological activity.

This information, combined with knowledge of synthetic chemistry, could lead to the synthesis of new molecules with improved properties. To better visualize this principle, the most important fragments of the compound 28 (the most potent inhibitor of the data set) are shown in Figure 7. The HQSAR module implemented in SYBYL 6.9.2 uses a color code to discriminate the main atomic contributions to activity. The colors at the red end of the spectrum (red, red orange, and orange) reflect poor contributions, whereas colors at the green end (yellow, green blue, and green) reflect favorable contributions. Atoms with intermediate contributions are colored white. As it can be seen in Figure 7, the molecular fragment represented by the purine ring of 28 was found to be strongly related to the biological activity of this compound. The same can be suggested for the cyanil moiety present in the group attached at the 9-position of the purine ring. It is important to note that the CoMFA steric counter map also reveals this region as potential target for molecular modification and further SAR studies aimed at increasing selectivity and potency. Moreover, in any molecule of the data set, regions with intermediate or poor contributions can be identified as potential targets for synthesis and SAR studies.

4. Conclusions

The 3D and 2D QSAR models described herein show both good internal and external consistency. The good correlation between experimental and predicted pIC₅₀ values for the test set compounds further proved the reliability of the constructed QSAR models (CoMFA 1,

CoMFA 2, and HQSAR). It is worth noting that we have employed the same training and test sets for all QSAR analyses, and the results showed that investigations can be carried out concomitantly to search for synergies between 3D and 2D QSAR technologies. Moreover, the 3D QSAR models generated are compatible with the 3D protein environment in the PNP binding site. These results suggest that the 3D model of PNP can be used in structure-based drug design and the QSAR models should be useful for the design of novel structurally related PNP inhibitors.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support from FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation) and CNPq (The National Council for Scientific and Technological Development), Brazil.

References and notes

- Mao, C.; Cook, W. J.; Zhou, M.; Federov, A. A.; Almo, S. C.; Ealick, S. E. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7135.
- Beauchamp, L. M.; Tuttle, J. V.; Rodriguez, M. E.; Sznajdman, M. L. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 949.
- Kicska, G. A.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Kim, K.; Schramm, V. L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3219.
- Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *88*, 349.
- Kelley, J. L.; McLean, E. W.; Crouch, R. C.; Averett, D. R.; Tuttle, J. V. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1005.
- Montgomery, J. A. *Med. Chem. Rev.* **1993**, *13*, 209.
- Bantia, S.; Kilpatrick, J. M. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2004**, *7*, 243.
- BCX-4208, a second generation PNP inhibitor, has entered Phase I trial as a drug candidate for the treatment of T-cell mediated autoimmune diseases. Further information is available in the ByoCryst Pharmaceuticals website at www.biocryst.com.
- Ragno, R.; Artico, M.; De Martino, G.; La Regina, G.; Coluccia, A.; Di Pasquali, A.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 213.
- Murias, M.; Handler, N.; Erker, T.; Pleban, K.; Ecker, G.; Saiko, P.; Szekeres, T.; Jager, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5571.
- Purushottamachar, P.; Kulkarni, V. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3487.
- Farutin, V.; Masterson, L.; Andricopulo, A. D.; Cheng, J.; Riley, B.; Hakimi, R.; Frazer, J. W.; Cordes, E. H. *J. Med. Chem.* **2000**, *42*, 2422.
- Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 10-17.
- Jayatileke, P. R. N.; Nair, A. C.; Zauhar, R.; Welsh, W. J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4446.
- Söderholm, A. A.; Lehtovuori, P. T.; Nyrönen, T. H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 917.
- Avery, M. A.; Alvim-Gaston, M.; Rodrigues, C. R.; Barreiro, E. J.; Cohen, F. E.; Sabnis, Y. A.; Woolfrey, J. R. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 292.
- Montgomery, J. A.; Niwas, S.; Rose, J. D.; Secrist, J. A., III; Babu, S.; Bugg, C. E.; Erion, M. D.; Guida, W. C.; Ealick, S. E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 55.
- Secrist, J. D., III; Niwas, S.; Rose, J. D.; Babu, S.; Bugg, C. E.; Erion, M. D.; Guida, W. C.; Ealick, S. E.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1847.

19. Guida, W. C.; Elliott, R. D.; Thomas, H. J.; Secrist, J. A., III; Babu, S.; Bugg, C. E.; Erion, M. D.; Ealick, S. E.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1114.
20. Niwas, S.; Cahnd, P.; Pathak, V. P.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2477.
21. Halazy, S.; Eharhard, A.; Eggenpiller, A.; Berges-Gross, V.; Danzin, C. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 177.
22. Anu, J. T.; Tommi, H. N.; Toni, R.; Antti, P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 807.
23. Masamoto, A.; Kiyoshi, H.; Kimito, F. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 1390.
24. Nicholas, E. J.; David, B. T.; Peter, W.; Graham, J. S. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, *20*, 111.
25. Lemmen, C.; Lengauer, T. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 215.
26. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. D. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727.
27. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. *Proteins* **2003**, *52*, 609.
28. Zhu, W. L.; Gang, C.; Hu, L. H.; Luo, X. M.; Gui, C. S.; Cheng, L.; Puah, C. M.; Chen, K. X.; Jiang, H. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 313.