

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Estudo *in silico* de novas diidropirimidin-2-tionas com ação inibitória da enzima ecto-  
5'-nucleotidase

LUCIANO PORTO KAGAMI

PORTO ALEGRE, 2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Estudo *in silico* de novas diidropirimidin-2-onas com ação inibitória da enzima  
ecto-5'-nucleotidase

Dissertação apresentada por Luciano Porto Kagami para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Eifler-Lima  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31/07/2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Rafael Andrade Caceres

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Romulo Faria Santos Canto

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

#### CIP - Catalogação na Publicação

Kagami, Luciano Porto

Estudo in silico de novas diidropirimidin-2-tionas com ação inibitória da enzima ecto-5'-Nucleotidase / Luciano Porto Kagami. -- 2017. 129 f.

Orientador: Vera Lucia Eifler-Lima.

Coorientador: Ana Maria Oliveira Battastini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Planejamento de novos fármacos. I. Eifler-Lima, Vera Lucia, orient. II. Oliveira Battastini, Ana Maria, coorient. III. Título.

Agradeço à minha esposa e a meus pais pela compreensão, amor e educação.



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me conceder esta oportunidade que sempre desejei;

À minha esposa e pais, por tudo que fizeram e fazem por mim;

Ao professor Daniel, pelos ensinamentos e por 'plantar a semente' da modelagem molecular;

Ao meu amigo, colega e 'professor' Gustavo, por dividir seus mais diversos conhecimentos comigo;

Às professoras Vera Lucia Eifler-Lima e Ana Maria Oliveira Battastini pela oportunidade, recepção e pela colaboração ao presente trabalho;

Ao Itamar, o grande farmacêutico sintético, a qual a sua ajuda foi fundamental para que os testes de atividade fossem realizados;

À Liliana, pela sua essencial colaboração nos testes biológicos e por dividir os seus conhecimentos.

Aos meus colegas de laboratório Gabriel, Guilherme, Thomas, Anna, Fabiana, Thaís, Maristela e Isabel, pela receptividade e descontração;

Ao grupo do Laboratório 22, por esta e futuras colaborações;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilização de infraestrutura, acesso às bases de dados de periódicos, e profissionais qualificados com os quais tive contato durante a pós-graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS;

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem em participar deste momento, e contribuir com o presente trabalho;

A todos que de alguma forma colaboram para a execução do presente trabalho, e anteriormente não foram mencionados;

## RESUMO

Os tumores cerebrais primários mais comuns são os gliomas. Os gliomas representam 31% de todos os tumores cerebrais diagnosticados nos Estados Unidos sendo 81% destes tumores malignos. O glioblastoma (GBM) é o tumor mais comum entre os gliomas, sua taxa de incidência varia de 0,59 a 3,69 a cada 100.000 pessoas, dependendo da idade e do país. A ecto-5'-nucleotidase regula os níveis extracelulares de AMP e adenosina, a qual tem sido amplamente descrita como fator indutor de proliferação celular. Estudos demonstraram que a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase foi aumentada em linhagens de células de glioma, quando comparada aos astrócitos. Também, o tratamento com 1  $\mu$ M de APCP, um inibidor competitivo da ecto-5'-nucleotidase, causou uma redução significativa de 30% na proliferação das células de glioma. Através de estudos de modelagem molecular foi possível planejar três compostos com perfil farmacológico adaptado para o tratamento do glioblastoma. As moléculas LaSOM 281, LaSOM 282 e LaSOM 287, apresentaram um baixo risco toxicológico, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e afinidade ao alvo pela predição realizada. Os compostos planejados foram sintetizados com bom rendimento e grau de pureza. No entanto os testes de atividade enzimática realizados para a enzima ecto-5'-nucleotidase das células de glioma, mostraram que os três compostos sintetizados não apresentaram ação inibitória, possivelmente por sua pouca solubilidade em meio aquoso.

**Palavras-chave:** glioblastoma, ecto-5'-nucleotidase, modelagem molecular.



## ABSTRACT

The most common primary brain tumors are gliomas. Gliomas represent 31% of all brain tumors diagnosed in the United States and 81% of these tumors are malignant. Glioblastoma (GBM) is the most common tumor among gliomas, with an incidence rate ranging from 0.59 to 3.69 per 100,000 people, depending on the age and country. The ecto-5'-nucleotidase regulates the extracellular levels of AMP and adenosine, which has been widely described as a cell proliferation inducing factor. Studies have shown that the activity of the enzyme ecto-5'-nucleotidase was increased in glioma cell lines when compared to astrocytes. Also, treatment with 1  $\mu$ M APCP, a competitive inhibitor of ecto-5'-nucleotidase, caused a significant 30% reduction in glioma cell proliferation. Through molecular modeling studies it was possible to plan three compounds with pharmacological profile adapted for the treatment of glioblastoma. The molecules LaSOM 281, LaSOM 282 and LaSOM 287 showed a low toxicological risk, ability to cross the blood brain barrier and affinity to the target by the prediction. The planned compounds were synthesized in good yield and purity. However, the enzymatic activity tests performed for the ecto-5'-nucleotidase enzyme of glioma cells showed that the three compounds did not present an inhibitory action, possibly due to their low solubility in aqueous medium.

**Keywords:** glioblastoma, ecto-5'-nucleotidase, molecular modeling.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura dos fármacos de escolha para o tratamento do GBM. ....	25
<b>Figura 2.</b> LaSOM 63. ....	27
<b>Figura3.</b> Ectonucleotidases (Burnstock, 2014; Purinergic signalling: from discovery to current developments.).....	33
<b>Figura 4.</b> Estrutura da adenosina-5'-(alfa,beta-metileno)difosfato. ....	35
<b>Figura 5.</b> Ligantes dos complexos utilizados na dinâmica molecular. ....	55
<b>Figura 6.</b> Superfície dos campos de interação molecular (MIF), para a Ecto-5'-nucleotidase, gerada pelo servidor SiteHound. Os números <b>1-10</b> são os <i>clusters</i> dos bolsões hidrofóbicos; As letras <b>A, B e C</b> indicam os bolsões hidrofóbicos localizados no sítio do ligante nativo, a adenosina. ....	58
<b>Figura 7.</b> Gráficos das curvas ROC para os programas GOLD, SHAFTS e do consenso entre eles. ....	61
<b>Figura 8.</b> Estruturas da baicalina e PSB11552. ....	63
<b>Figura 9.</b> <i>Scaffold</i> de uma diidropirimidinona. O substituinte R1 corresponde à variedade dos aldeídos e R2 à variedade das tiouréias. ....	65
<b>Figura 10.</b> Substituintes em R1. ....	65
<b>Figura 11.</b> Substituintes em R2. ....	66
<b>Figura 12.</b> Vias de biotransformação propostas para os compostos LaSOM 281 <b>6 (A)</b> , LaSOM 282 <b>7 (B)</b> , LaSOM 287 <b>8 (C)</b> e LaSOM 63 <b>3 (D)</b> com seus respectivos fatores de probabilidade de ocorrência. ....	68
<b>Figura 13.</b> Avaliação da variação de RMSD pelo tempo, para os compostos LaSOM 287, LaSOM 281, LaSOM 282, LaSOM 63 e para a adenosina. ....	71
<b>Figura 14.</b> Gráfico da variação do raio de giro da proteína para os diferentes complexos. ....	72
<b>Figura 15.</b> Gráfico da flutuação dos resíduos envolvidos no docking. ....	73
<b>Figura 16.</b> Gráfico dos valores de deslocamento das médias ao quadrado pelo tempo ....	74
<b>Figura 17.</b> Gráfico da superfície acessível ao solvente hidrofóbico, hidrofílico e total para os compostos analisados. ....	75
<b>Figura 18.</b> Pose dos compostos LaSOM 287 <b>8 (A)</b> , LaSOM 281 <b>6 (B)</b> , LaSOM 282 <b>7 (C)</b> e LaSOM 63 <b>3 (D)</b> , no sítio ativo da ecto-5'-NT.....	77

<b>Figura 19.</b> Principais interações dos compostos LaSOM 281 <b>6</b> (A), LaSOM 282 <b>7</b> (B), LaSOM 287 <b>8</b> (C) e LaSOM 63 <b>3</b> (D), com os resíduos do sítio ativo da ecto-5'-NT.....	78
<b>Figura 20.</b> Síntese das diidropirimidinonas.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise de qualidade de estrutural da enzima ecto-5'-NT.....	57
<b>Tabela 2.</b> Top 10 dos <i>clusters</i> de bolsões hidrofóbicos para a enzima ecto-5'-NT dispostos em ordem crescente de energia. A posição central dos <i>clusters</i> estão descritas pelas coordenadas cartesianas (x, y, z). .....	59
<b>Tabela 3.</b> Relação da média das energias de interação da sonda hidrofóbica e o volume dos bolsões hidrofóbicos <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> identificados no <b>cluster 9</b> . .....	60
<b>Tabela 4.</b> Área sob as curvas ROC e Fator de Enriquecimento para as funções de escore do método SBVS. ....	62
<b>Tabela 5.</b> Área sob a curva ROC e Factor de Enriquecimento para as funções de escore do método LBVS.....	62
<b>Tabela 6.</b> Área sob a curva ROC e Fator de Enriquecimento para o método de consenso <i>rank-by-rank</i> e para as funções de escore GOLD e ShapeSim independentes.....	63
<b>Tabela 7.</b> Valores RMSD resultante dos processos de <i>re-docking</i> e <i>cross-docking</i> .....	63
<b>Tabela 8.</b> <i>Ranking</i> para os ensaios SBVS, LBVS e rescore consensual .....	67
<b>Tabela 9.</b> Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas para os compostos LaSOM 282 <b>7</b> , LaSOM 287 <b>8</b> , LaSOM 281 <b>6</b> e LaSOM 63 <b>3</b> . .....	69
<b>Tabela 10.</b> Valores máximos e médios de RMSD da proteína resultantes da análise de 50 ns de dinâmica molecular.....	71
<b>Tabela 11.</b> Valores máximos e médios do Raio de Giro para a proteína resultante da análise de 50 ns de dinâmica molecular. ....	72
<b>Tabela 12.</b> Valores da raiz média quadrada da flutuação para os principais resíduos de aminoácido envolvidos no processo de <i>docking</i> .....	73
<b>Tabela 13.</b> Energias de curto alcance totais de Lennard-Jones e Coulomb e suas diferenças (Eint).....	76
<b>Tabela 14.</b> Valores de $\Delta G$ da energia de ligação entre os compostos e a enzima ecto-5'-NT, para os diferentes métodos de avaliação.....	80
<b>Tabela 17.</b> Quantificação de fosfato inorgânico no meio de incubação. As células de glioma U138 foram tratadas com 50, 100 e 200 $\mu$ M de LaSOM 281, LaSOM 282 e LaSOM 287 durante 10 minutos.....	95



## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Cálculo do Fator de Enriquecimento.....	43
<b>Equação 2 e 3.</b> Cálculo para obtenção da sensibilidade e da especificidade	43
<b>Equação 4.</b> Cálculo da energia livre de Gibbs.....	46
<b>Equação 5-9.</b> Cálculo da energia de ligação pelo método PBSA/GBSA.....	47
<b>Equação 10.</b> Cálculo da energia de ligação pelo Autodock.....	47
<b>Equação 11-13.</b> Parciais para o cálculo do X-score.....	48
<b>Equação 14.</b> Cálculo do X-score.....	48
<b>Equação 15.</b> Cálculo da energia de ligação para o X-score.....	49
<b>Equação 16.</b> Cálculo do rescore rank-by-rank.....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADME - Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção;

ADP – Adenosina Difosfato;

AMP – Adenosina Monofosfato;

ATP – Adenosina Trifosfato;

DHPM – Diidropirimidinona;

ecto-5'-NT – Ecto-5'-nucleotidase;

EF – *Enrichment Factor*(Fator de Enriquecimento);

GBM – Glioblastoma;

LBVS – *Ligand Based Virtual Screening* (Ensaio Virtuais Baseados no Ligante);

log P - Coeficiente de Partição;

MIF - *Molecular Interaction Fields* (Campo de Interações Moleculares)

MM – Mecânica Molecular;

MM/GBSA - *Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*(Mecânica Molecular / Área de Superfície Generalizada de Born);

MM/PBSA - *Molecular Mechanic/ Poisson-Boltzmann Surface Area*(Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann);

MSD - *Mean Square Displacement* (Deslocamento das Médias Quadradas)

PAINS - *Pan Assay Interference Compounds* (Compostos interferentes aos ensaios bioquímicos);

PDB – Protein Data Base (Base de Dados de Proteínas);

PSA – *Polar Surface Area* (Área de Superfície Polar);

Rg – Raio de Giro;

RMN - Ressonância Magnética Nuclear;

RMSD - *Root-mean-square deviation* (Desvio Padrão Médio Quadrático);

RMSF – *Root Mean Square Fluctuation*(Flutuação da Raiz Média Quadrática);

SAS - *Solvent Accessible Surface Area*(Superfície Acessível ao Solvente);

SBVS – *Structure Based Virtual Screening* (Triagem Virtual Baseada na Estrutura);

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>31</b>
1.1 Os gliomas .....	31
1.3 A família das ectonucleotidases.....	33
1.4 A ecto 5'-nucleotidase .....	33
1.5 A ecto 5'-nucleotidase e os tumores .....	34
1.6 Diidropirimidinonas como potenciais inibidores da ecto-5'-NT .....	34
1.7. Estrutura 3D da ecto-5'-NT .....	35
1.8. Qualidade das estruturas cristalográficas .....	36
1.9 Banco de dados de pequenas moléculas .....	37
1.11 Campos de interação molecular.....	39
1.12 Ensaio <i>in silico</i> baseados na estrutura do ligante (LBVS) .....	40
1.13 Ensaio <i>in silico</i> baseados na estrutura do receptor (SBVS) .....	41
1.14 O programa GOLD.....	41
1.16 Funções Consensuais ( <i>Rescoring</i> ) .....	42
1.17 Métodos de validação dos ensaios virtual.....	43
1.18 Predição de metabólitos e propriedades farmacocinéticas .....	44
1.19 Dinâmica molecular.....	45
1.20 Análise da Energia dos Complexos Ligante-Proteína .....	46
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>49</b>
2.1 Avaliação da Qualidade da Estrutura Cristalográfica .....	49
2.2 Campos de Interação molecular - Estudo do Sítio Ativo .....	49
2.3 Avaliação da Qualidade dos Métodos de Ensaio <i>in silico</i> .....	49
2.4 Preparação dos Ligantes .....	50
2.5 <i>Glidedocking</i> .....	51
2.6 GOLD docking.....	51
2.7 Preparação das estruturas alvo e da estrutura de referência.....	51
2.8 LiSiCA (Ligand Similarity using Clique Algorithm) .....	52
2.9 SHAFTS (SHApe-FeaTure Similarity) .....	52
2.10 Estratégia de consenso SBVS/LBVS .....	52

2.12 Farmacocinética e propriedades toxicológicas.....	53
2.14 Predição de metabólitos e propriedades farmacocinéticas .....	54
2.15 Simulações de dinâmica molecular .....	54
2.16 Estudo do modo de ligação.....	56
2.17 Análise da energia dos complexos ligante-proteína.....	56
2.18 Análise do tempo de residência dos ligantes .....	56
3.1 Avaliação da qualidade da estrutura cristalográfica .....	57
3.2 Campos de Interação molecular - Estudo do sítio ativo .....	58
3.3 Avaliação da qualidade dos métodos de ensaio <i>in silico</i> .....	60
3.4. Construção da biblioteca de pequena moléculas.....	65
3.5 Filtragem por propriedades farmacocinéticas e toxicológicas.....	66
5.6 Ensaio SBVS, LBVS e Rescore consensual .....	67
5.9. Avaliação das propriedades farmacocinéticas .....	68
3.10 Dinâmica Molecular – Avaliação da estabilidade do complexo Ligante-Proteína .....	70
3.11 Dinâmica Molecular – Avaliação das características físico-químicas dos ligantes.....	74
3.13 Estudo do modo de ligação.....	77
3.14 Análise da energia dos complexos ligante-proteína.....	79
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>81</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>90</b>
1.1 Síntese de diidropirimidinonas (DHPMs).....	90
1.2 Avaliação da atividade da Ecto-5'-NT .....	91
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>91</b>
2.1 Protocolo geral para síntese de diidropirimidinonas N-1 aril substituídas.....	91
2.2 Cultura de células .....	92
2.3 Ensaio da atividade enzimática.....	92
<b>3. Resultados e Discussões .....</b>	<b>93</b>
3.1 Síntese das diidropirimidinonas N-1 aril substituídas.....	93
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>97</b>
Algoritmos de Busca Conformacional .....	98
Funções de escore (pontuação) .....	98
<i>Re-docking e cross-docking</i> .....	99

<b>ANEXO I – Espectros de RMN para os compostos LaSOM 281, LaSOM 282 e LaSOM 287 .....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO II – Manuscrito enviado ao periódico <i>Journal of Molecular Modeling</i>.....</b>	<b>117</b>



## **INTRODUÇÃO GERAL**

As páginas 25 a 28 foram excluídas em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.



## OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo racionalizar a síntese de novas diidropirimidinonas com ação inibitória à enzima ecto-5'-NT utilizando técnicas *in silico*. Como resultado espera-se selecionar compostos cujas características farmacocinéticas e toxicológicas, atendam a um perfil de fármaco de uso oral, não tóxico e que consiga ultrapassar a barreira hematoencefálica, além de serem mais potentes que o LaSOM 63 **3**.



## **PARTE I - Planejamento *in silico***

As páginas 31 a 88 foram excluídas em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.



**Parte II - Síntese das diidropirimidinonas e avaliação da inibição da enzima  
ecto-5'-NT.**

As páginas 89 a 129 foram excluídas em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

