

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***ESTUDOS DE RELAÇÕES PREDITIVAS ENTRE A ESTRUTURA E A  
ATIVIDADE PARA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E ANALGESIA***

**Adriano Defini Andricopulo**

Orientador: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes

Co-Orientador: Prof. Dr. Eugene H. Cordes

Tese submetida à Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de "Doutor em Química"

Florianópolis, setembro de 1999

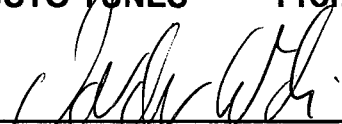
**ESTUDOS DE RELAÇÕES PREDITIVAS ENTRE A ESTRUTURA E A  
ATIVIDADE PARA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E ANALGESIA**

**ADRIANO DEFINI ANDRICOPULO**

Esta Tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca examinadora.


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. EUGENE H. CORDES  
Co-Orientador

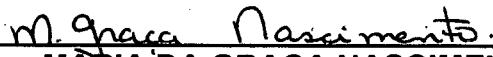
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. VALDIR SOLDI  
Coordenador


**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ROSENDO AUGUSTO YUNES  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. EUGENE H. CORDES  
University of Michigan-USA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ELIEZER BARREIRO  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. MARIA DA GRAÇA NASCIMENTO  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. VALDIR CECHINEL FILHO  
Universidade do Vale do Itajaí

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. RICARDO JOSÉ NUNES  
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais,  
André e Maria Lúcia Andricopulo,  
e a minha esposa,  
Renata Krogh

## **AGRADECIMENTOS**

- ◆ Ao Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, funcionários e estudantes, por toda a colaboração e excelente suporte para realização deste trabalho;
- ◆ Ao *College of Pharmacy e Department of Chemistry*, da *University of Michigan*, pelo excelente suporte oferecido para o desenvolvimento deste trabalho;
- ◆ Ao Dr. John A. Montgomery e seus colaboradores da *BioCryst Pharmaceuticals Inc.*, pela doação da primeira série de inibidores empregada neste trabalho e, pela importante orientação científica;
- ◆ À *Parke-Davis Pharmaceuticals Inc.*, pela doação da série adicional de inibidores empregada neste trabalho;
- ◆ Aos Drs. Jack W. Frazer, Joe Honton e seus companheiros do *Scientific Computing Team*, pela inestimável orientação no desenvolvimento dos modelos de QSAR;
- ◆ Ao Prof. Adair Roberto S. Santos e suas alunas, Luciane A. Müller, Graziela S. Cani e Juliana F. Roos, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), pela realização dos testes farmacológicos apresentados neste trabalho;
- ◆ À estudante Lori Masterson, da *University of Michigan*, pela amizade e auxílio nas medidas cinéticas;
- ◆ À CAPES e ao CNPq, pela concessão das bolsas durante o meu curso de doutoramento, fundamentais para a realização desta Tese;

- ◆ Ao Prof. Dr. Eliezer J. Barreiro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela inestimável contribuição como Relator desta Tese, pelas discussões e sugestões significativas, que contribuíram muito em nosso trabalho de Tese;
- ◆ À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Graça do Nascimento, pelas correções e contribuição significativa em nosso trabalho de Tese;
- ◆ Ao Prof. Dr. Ricardo J. Nunes, pela orientação no meu Curso de Mestrado e pela amizade;
- ◆ Aos amigos Rachel Magnago, Paulo Beck e Fernando Hallwass, por todo incentivo e amizade de muitos anos;
- ◆ Aos amigos Oliver Larson e Joe Bates, de Ann Arbor, pela amizade;
- ◆ À Alvaro Barccellos Onofrio, pela amizade e incentivo;
- ◆ Aos funcionários da Pós-Graduação em Química, Graça e Jadir, por toda colaboração e atenção;
- ◆ Aos meus irmãos Alexandre e Luciano, por todo incentivo e amizade;
- ◆ À Deus.

## ***AGRADECIMENTO ESPECIAL***

**Meus mais sinceros agradecimentos aos Mestres:**

Professores Drs. Gene Cordes e Rosendo Yunes, orientadores exemplares e seres humanos extraordinários, pela paciência, amizade, orientação e pela herança de pequena parte de seus grandes conhecimentos.

## **ÍNDICE GERAL**

### **CAPÍTULO I**

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>02</b>
<b>1. Descoberta de fármacos</b>	<b>02</b>
1.1 A Inovação dirige o crescimento da indústria	02
1.2 O desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica	04
1.3 A questão da inovação e produtividade	07
1.4 Respostas estratégicas	09
1.4.1 Investimentos em novas tecnologias para a descoberta de fármacos	10
1.4.2 Formação de alianças externas	17
1.4.3 Integração na indústria farmacêutica	20
1.5 Inibidores enzimáticos	21
1.5.1 Utilidade dos inibidores enzimáticos na clínica médica	22
1.6 Purina nucleosídeo fosforilase	26
1.6.1 Base bioquímica da inibição da proliferação das células T por inibidores da PNP	28
1.6.2 Caracterização da PNP	31
1.6.3 Mecanismo catalítico	31
1.6.4 Inibidores da PNP	35
1.7 Relações quantitativas estrutura-atividade	40

1.7.1	Técnicas de QSAR	40
1.8	O novo paradigma do QSAR	42
1.8.1	As técnicas de QSAR são úteis para o planejamento molecular	44
1.8.2	Tradicional QSAR	45
1.8.3	Os valores da propriedade de interesse	45
1.8.4	O campo de modelagem molecular	46
1.8.5	O panorama da modelagem	47
1.8.6	Qualificação dos modelos em QSAR	47
1.8.7	Desenvolvimento da nova tecnologia de QSAR	48
1.8.8	Trabalhando com QSAR	48
1.8.9	Antecedentes e procedimento de modelagem	50

## CAPÍTULO II

II.	PARTE EXPERIMENTAL	58
2.	Materiais e métodos	58
2.1	Inibidores da purina nucleosídeo fosforilase	58
2.2	Imidas cíclicas	58
2.3	Reagentes	58
2.4	Medidas cinéticas	59
2.5	Análise farmacológica: Atividade analgésica	60
2.6	Modelagem estatística	62



## CAPÍTULO III

<b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>3. Construção dos conjuntos de dados e desenvolvimento dos modelos preditivos de QSAR</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Inibidores da purina nucleosídeo fosforilase</b>	<b>66</b>
3.1.1 Relações estrutura-atividade de uma classe limitada de inibidores da PNP. Desenvolvimento inicial de modelos preditivos de QSAR para inibidores da PNP	66
3.1.2 Relações estrutura-atividade de uma classe ampla de inibidores da PNP. Desenvolvimento de modelos preditivos de QSAR para inibidores da PNP em geral	96
<b>3.2 Imidas cíclicas</b>	<b>119</b>
3.2.1 Atividade analgésica de uma série de 1,8-naftalimidias e 1,4,5,8-naftalenodiimidias	119
3.2.2 Desenvolvimento de um modelo preditivo de QSAR para a atividade analgésica de uma família de imidas cíclicas	123

## CAPÍTULO IV

<b>IV. CONCLUSÕES</b>	<b>134</b>
-----------------------	------------

## CAPÍTULO V

### V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS

136

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Inibidores enzimáticos utilizados na clínica médica.

Tabela 2. Inibidores da PNP.

Tabela 3. Valores das constantes de inibição para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Tabela 4. Valores dos logaritmos de  $K_i$  medido, estimado e predito para uma série de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Tabela 5. Valores dos logaritmos da  $CI_{50}$  medido, estimado e predito para uma série de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Tabela 6. Valores das constantes de inibição para a classe adicional de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Tabela 7. Valores dos logaritmos de  $K_i$  medido, estimado e predito para um amplo conjunto de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Tabela 8. Valores dos logaritmos de  $CI_{50}$  medido, estimado e predito para um amplo conjunto de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Tabela 9. Efeito analgésico de 1,8-naftalimidaz (IC001-005) e 1,4,5,8-naftalenodiiimidaz (IC006-012) no modelo de contorções abdominais causadas pelo ácido acético 0,6 em camundongos.

Tabela 10. Valores medidos, estimados e preditos da potência analgésica de uma família de imidas.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Etapas no processo de desenvolvimento de novos fármacos. A descoberta de fármacos é o centro deste processo.

Figura 2. Processo de desenvolvimento de novos fármacos nos Estados Unidos: média de custos e tempo das etapas do processo.

Figura 3. Projeção do crescimento nas vendas de medicamentos a nível mundial.

Figura 4. Base bioquímica para a toxicidade seletiva às células T na deficiência da PNP. Racionalidade para o uso de inibidores da PNP.

Figura 5. Degradação dos nucleosídeos purínicos ao ácido úrico.

Figura 6. Reação catalisada pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP). No equilíbrio: síntese de guanosina a partir da guanina e ribose-1-fosfato.

Figura 7. Modelo do sítio ativo da PNP construído a partir das coordenadas atômicas para o complexo PNP-guanosina depositado na proteína.

Figura 8. Mecanismo cinético proposto para a reação da PNP, inosina e fosfato, através da formação de um complexo ternário. Na direção fosforolítica, o mecanismo de reação é o bimolecular ao acaso. Na direção da síntese, é o bimolecular ordenado.

Figura 9. Mecanismo proposto para a reação de inosina com fosfato na presença da PNP.

Figura 10. Distribuição dos valores do  $\log K_i$  para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 11. Distribuição dos valores do  $\log CI_{50}$  para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 12. Diferentes combinações dos sub-conjuntos empregadas em cada um dos quatro modelos de QSAR desenvolvidos. Cada modelo emprega 3 sub-conjuntos como conjunto treino (círculos azuis) e 1 sub-conjunto como conjunto teste (círculos vermelhos).

Figura 13. Relações básicas envolvidas no processo de modelagem de QSAR. Os conjuntos treino, dos quais são obtidos os valores estimados, são empregados para predizer os valores da propriedade para os compostos pertencentes aos conjuntos teste.

Figura 14. Gráfico dos valores medidos do  $\log K_i$  contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 15. Gráfico dos valores medidos do  $\log CI_{50}$  contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 16. Distribuição dos valores do  $\log K_i$  para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 17. Distribuição dos valores do  $\log CI_{50}$  para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 18. Gráfico dos valores medidos do  $\log K_i$  contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 19. Gráfico dos valores medidos do  $\log CI_{50}$  contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Figura 20. Série de 1,8-naftalimidias e 1,4,5,8-naftalenodiimidias estudada.

Figura 21. Distribuição dos valores medidos do  $\log DI_{50}$  para uma família de imidas cíclicas.

Figura 22. Gráfico dos valores medidos do  $\log DI_{50}$  contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma família de imidas cíclicas.

## **ABSTRACT**

The potency of a structurally diverse family of fifty eight inhibitors of calf spleen purine nucleoside phosphorylase (PNP) was determined through measurement of values of  $K_i$  and  $IC_{50}$ , employing inosine as substrate. These values span approximately five orders of magnitude. All inhibitors studied exhibited pure competitive inhibition.

Employing novel quantitative structure-activity relationship (QSAR) technology, QSAR models were created for two sets of inhibitors of calf spleen PNP. The first data set included values of  $K_i$  and  $IC_{50}$  for 34 inhibitors. The great majority of these inhibitors are 9-substituted-9-deazapurines of modest structural diversity and clustered potency; however, the data set also included a small number of structurally distinct inhibitors having markedly less potency. The two QSAR models created, one for values of  $K_i$ , included 29 inhibitors, and one for values of  $IC_{50}$ , included all 34 inhibitors. These models provided a very good characterization for the training sets employed and a generally good sets of predictions of values for inhibitors of test sets. However, the predictions for the structural outliers were not satisfactory.

The second set of QSAR models is based on a data set that includes the 34 inhibitors noted above plus an additional set 24 inhibitors for which values of  $K_i$  and  $IC_{50}$  were determined. Compared to the first data set, this data set is more structurally diverse and the values of  $K_i$  and  $IC_{50}$  span a greater dynamic range

and are more uniformly distributed across the dynamic range. The QSAR models created for values of both  $K_i$  and  $IC_{50}$  provide an excellent set of predictions for compounds in test sets. This QSAR model is robust and has substantial predictive power for novel inhibitors of calf spleen PNP.

Work to create robust, predictive QSAR model was extended to a data set comprised of previously determined values for analgesic potency, determined in a standard murine model of analgesia, for thirty four cyclic imides of moderate structural diversity. An excellent QSAR model was developed, providing excellent characterization of training set and an excellent set of predictions for compounds in test sets. Predictions for the majority of compounds fell within the estimated experimental error.



## RESUMO

A potência de uma série de 58 inibidores, estruturalmente distintos, da purina nucleosídeo fosforilase (PNP) do baço de bezerro, foi determinada experimentalmente através da medida dos valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$ , empregando inosina como substrato. Estes valores estendem-se aproximadamente por cinco ordens de grandeza. Todos os inibidores estudados exibem inibição competitiva.

Modelos de QSAR foram desenvolvidos para dois conjuntos de inibidores da PNP, empregando um novo paradigma do QSAR. O primeiro conjunto de dados inclui valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  para 34 inibidores, sintetizados na *BioCryst Pharmaceuticals*. A maior parte destes inibidores, de modesta diversidade estrutural e distribuição dos valores da propriedade pouco uniforme, é 9-substituído-9-deazapurina. Entretanto, o conjunto de dados inclui um pequeno número de inibidores estruturalmente distintos. Dois modelos foram desenvolvidos, um para os valores de  $K_i$  de 29 inibidores e, outro, para os valores da  $CI_{50}$  do completo conjunto de 34 inibidores. Estes modelos foram capazes de caracterizar adequadamente os conjuntos treino empregados e forneceram, geralmente, bons valores preditos para os compostos pertencentes aos conjuntos teste. Contudo, os valores preditos para os compostos afastados da região de distribuição de maior concentração do conjunto, não foram satisfatórios.

O segundo conjunto inclui os 34 inibidores mencionados anteriormente somado a um conjunto de 24 inibidores da PNP, sintetizados na Parke-Davis Pharmaceuticals. Este novo conjunto de 58 inibidores apresenta maior diversidade estrutural e os valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  encontram-se distribuídos de maneira mais uniforme. Dois modelos de QSAR foram desenvolvidos, para ambos os valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$ , e forneceram excelentes conjuntos de valores preditos para os compostos nos conjuntos teste. Estes modelos de QSAR são robustos e possuem poder preditivo significativo para novos inibidores da PNP do baço de bezerro.

O trabalho para criar um modelo preditivo de QSAR foi estendido para a potência analgésica de uma série de 34 imidas cíclicas de moderada diversidade estrutural. Um modelo excelente de QSAR foi desenvolvido, fornecendo uma caracterização excelente dos conjuntos treino e um notável conjunto de valores preditos para os compostos dos conjuntos teste. Os valores preditos para a maior parte dos compostos estão dentro do erro experimental da medida.

## **OBJETIVOS**

O trabalho de Tese tem dois objetivos fundamentais:

1. Desenvolver um conjunto apropriado de dados para os valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  de uma classe de inibidores competitivos da purina nucleosídeo fosforilase do baço de bezerro, e empregar este conjunto de dados para o desenvolvimento de modelos preditivos de QSAR.
2. Criar um modelo preditivo de QSAR para a atividade analgésica de imidas cíclicas, baseado em um conjunto de dados estrutura/potência de uma família de imidas cíclicas.



## I. INTRODUÇÃO

### **1. Descoberta de fármacos**

#### **1.1 A inovação dirige o crescimento da indústria**

A indústria farmacêutica está direcionada à inovação. A descoberta e o desenvolvimento de fármacos pioneiros de grande importância são a base do crescimento de receitas e do lucro para a indústria a nível mundial.<sup>1</sup>

Muitos exemplos podem ser citados para dar suporte a esta premissa, considerando o impacto da cimetidina (Tagamet<sup>®</sup>), da SmithKline and French (agora SmithKline Beecham); captopril (Capoten<sup>®</sup>), da Squibb (agora Bristol-Myers Squibb); lovastatin (Mevacor<sup>®</sup>), da Merck; omeprazol (Losec<sup>®</sup>), da Astra e Merck; fluoxetina (Prozac<sup>®</sup>), da Eli Lilly; propranolol (Avlocardyl<sup>®</sup>), da Wyeth (agora Wyeth Ayerst); nifedipine (Adalat<sup>®</sup>), da Bayer; sildenafil (Viagra<sup>®</sup>), da Pfizer; fármacos pioneiros que excederam 1 bilhão de dólares ao ano em vendas.<sup>2</sup> A descoberta destes e de outros fármacos notáveis beneficiou pacientes no mundo inteiro e forneceu muitas oportunidades de emprego.

Os fármacos pioneiros são geralmente sucedidos por um ou mais fármacos de segunda geração, os quais apresentam de modestos a significativos avanços para a clínica médica e, freqüentemente, proporcionam as maiores recompensas para as companhias farmacêuticas. Por exemplo, a cimetidina, o primeiro bloqueador H<sub>2</sub> a ser introduzido para o uso clínico no tratamento de úlceras duodenais e outras condições hipersecretoras gástricas,

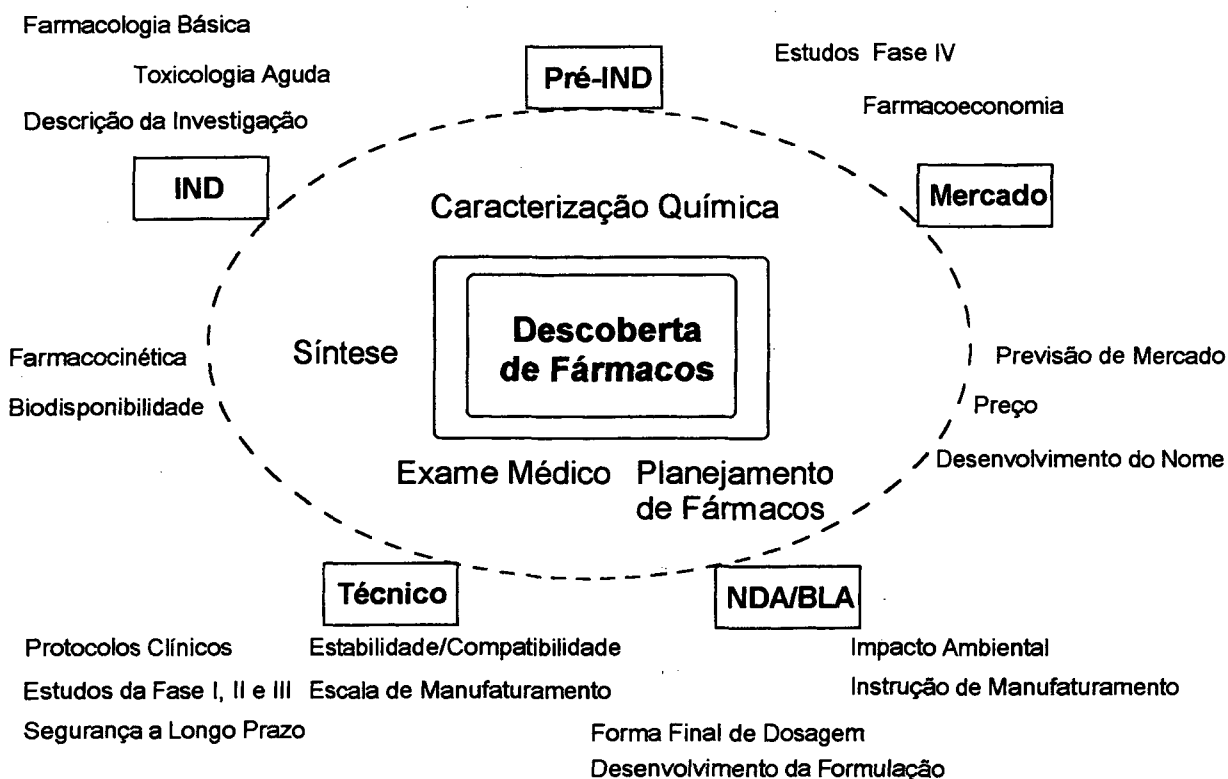
foi sucedida, após um intervalo de aproximadamente uma década, pela ranitidina (Zantac<sup>®</sup>), famotidina (Pepcid<sup>®</sup>) e por outros agentes bloqueadores H<sub>2</sub>. O captopril, primeiro inibidor eficaz da enzima conversora de angiotensina (ECA) por via oral, foi sucedido pelo enalapril (Vasotec<sup>®</sup>), lisinopril (Privilil<sup>®</sup>) e por outros inibidores da ECA. O simvastatin (Zocor<sup>®</sup>) e o pravastatin (Pravachol<sup>®</sup>), entre outros, sucederam lovastatin como inibidores HMG CoA redutase, e assim por diante. Cada um destes fármacos, em particular, e muitos outros, de segunda ou terceira geração, têm sido importantes no direcionamento do crescimento da indústria farmacêutica. Tudo isto deriva da importante descoberta de uma molécula inovativa, que, evidentemente, se apresenta como o maior desafio frente ao processo de descoberta de fármacos.<sup>3</sup>

Embora algumas companhias farmacêuticas adotem estratégias adicionais para sustentar as taxas de crescimento, a inovação permanece como o centro estratégico.<sup>4</sup> É interessante observar que o espetacular crescimento na área biotecnológica, nos últimos 15-20 anos, é dirigido quase que, inteiramente, para a inovação.<sup>3,5-7</sup> A questão central para as companhias farmacêuticas está em como acelerar o índice de inovação.<sup>1,8</sup>

## 1.2 O desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica

A descoberta e o planejamento de fármacos são a base fundamental para o desenvolvimento farmacêutico e, talvez, o mínimo entendimento necessário pela parte médica.

As interrelações para o processo global de desenvolvimento de fármacos estão ilustradas na Figura 1: Esta é uma representação esquemática das principais etapas do desenvolvimento de fármacos e as correspondentes pesquisas que devem ser conduzidas.<sup>9</sup>



**Figura 1.** Etapas no processo de desenvolvimento de novos fármacos. A descoberta de fármacos é o centro deste processo.

O processo de desenvolvimento de fármacos é complexo, consome muito tempo, é de alto risco e extremamente caro. O número abundante de etapas individuais deve ser acompanhado, contemplando-se todos os aspectos das ciências químico-farmacêuticas.<sup>10</sup>

Novas entidades químicas (NCE, do inglês *new chemical entities*) devem ser testadas pré-clinicamente quanto à sua atividade farmacológica e segurança, em animais.

Quando uma proposta de investigação de nova droga (IND, do inglês *investigation new drug*) é aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), são iniciados testes clínicos em humanos, examinando a farmacocinética, dosagem, segurança e eficácia clínica da droga. Paralelamente, pesquisas devem estabelecer a estabilidade, compatibilidade e os processos industriais de fabricação para abastecer o mercado de acordo com as projeções de oferta e procura. Toda esta pesquisa resulta em uma série de dados que podem ser usados como arquivo para a aplicação de uma nova droga (NDA, do inglês *new drug application*). Além disso, questões econômicas e de saúde estabelecem o potencial em relação ao preço e ao nível de reembolso relacionados à droga.<sup>9</sup>

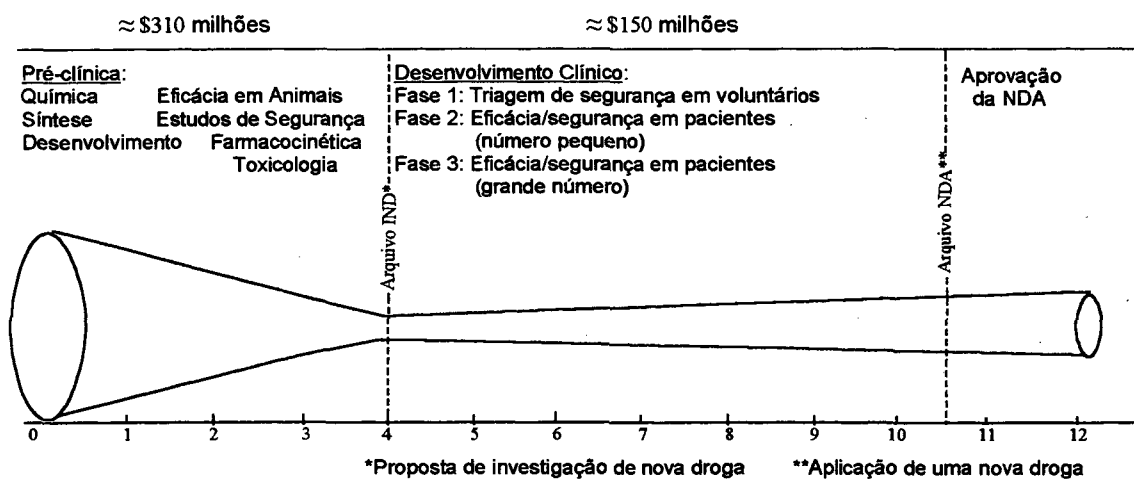
Considerando-se uma NCE a partir da concepção até a sua introdução no mercado farmacêutico, são gastos cerca de 12 anos,<sup>1,11</sup> com custos totais da ordem de 400-500 milhões de dólares<sup>12-14</sup> (incluindo o sucesso e os fracassos do processo). Uma representação destes dados no processo de desenvolvimento de fármacos é mostrada na Figura 2.<sup>15</sup> Pode ser observado o afunilamento no processo, onde apenas um número muito pequeno de moléculas atinge as triagens clínicas.



Somente de 10 a 15 por cento das NCEs alcançam com sucesso os testes pré-IND e continuam no processo de desenvolvimento de fármacos.<sup>15,16</sup> Este é um negócio imperativo no qual apenas as moléculas com a mais alta probabilidade de sucesso deixam o banco de pesquisas para testes adicionais.<sup>17</sup>

A descoberta e o planejamento de fármacos são a base para o aumento de moléculas inovativas de relevante sucesso, que são de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento da indústria farmacêutica.<sup>1,18-</sup>

20



**Figura 2.** Processo de desenvolvimento de novos fármacos nos Estados Unidos: média de custos e tempo das etapas do processo.

### **1.3 A questão da inovação e produtividade**

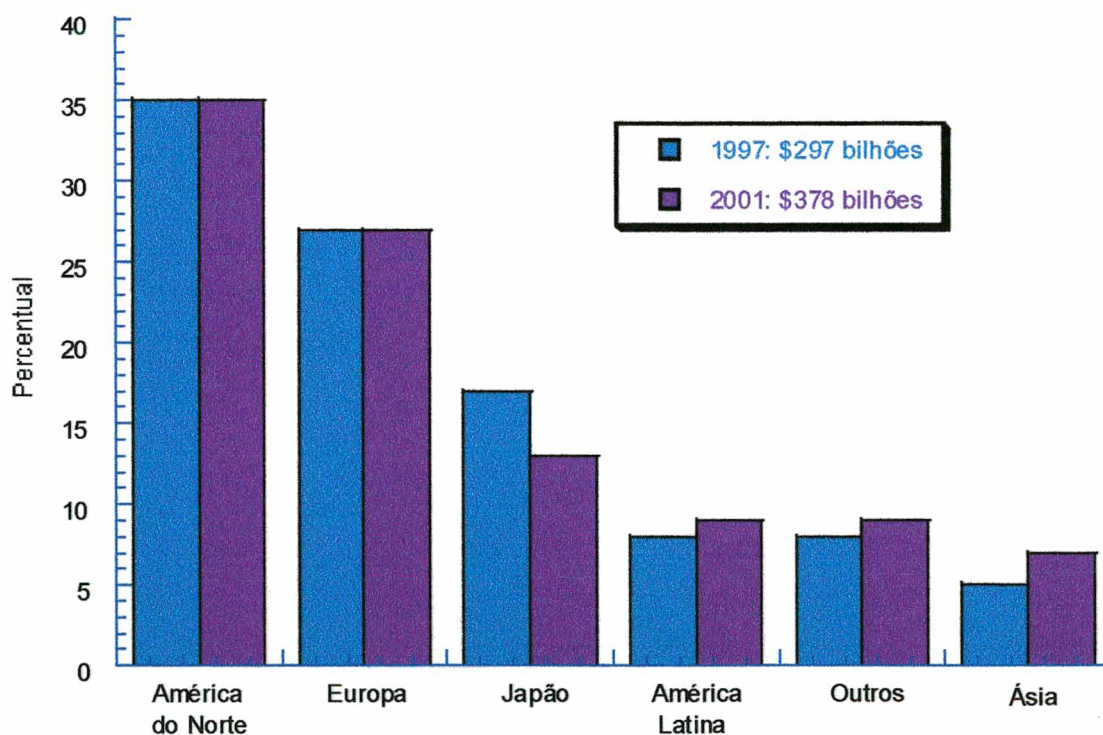
→ Após avaliar as diversas estratégias empregadas nas décadas de 80 e 90, executivos farmacêuticos estão novamente enfatizando a inovação, no descobrimento de fármacos, como a principal estratégia para o crescimento da indústria.<sup>1</sup>

Sustentados pelos avanços, os quais têm racionalizado o processo de descoberta, incluindo avançados genômicos, síntese combinatória, ensaios em massa e informação tecnológica, as companhias farmacêuticas têm como metas reduzir à metade o tempo de seus processos de descoberta e triplicar o número de NCEs a ser entregue para o desenvolvimento em suas organizações.<sup>1,21,22</sup>

A maioria absoluta das companhias farmacêuticas terá que alcançar este nível de performance simplesmente para manter sua receita atual e trajetória de crescimento. Por exemplo, só para manter um crescimento de 10 por cento, as 10 maiores indústrias farmacêuticas do mundo necessitam lançar, ao menos, 5 significativas NCEs por ano, assumindo que cada um destes tenha um potencial de vendas superior a 350 milhões de dólares ao ano (modesto sucesso).<sup>1,23</sup> Companhias de médio porte, com metas de crescimento de 10 por cento, devem conseguir 3 novos produtos ao ano. Contudo, uma avaliação da recente performance sugere que a indústria não está no caminho certo para atingir estas metas de demanda.<sup>1</sup> As 10 maiores companhias lançaram, em média, somente 0,45 NCEs por ano (entre os anos de 1990 e 1994) e somente 8 por cento dos produtos lançados alcançaram um faturamento de 350 milhões de dólares por ano.<sup>23</sup> Além disso, a maioria das companhias operando atualmente em modelos

P&D (Pesquisa & Desenvolvimento) não é capaz de entregar o número de NCEs com a qualidade necessária para que possa cumprir esta visão futura de alta produtividade.<sup>1</sup>

Uma projeção da venda de medicamentos a nível mundial é apresentada na Figura 3. No ano de 1997, a indústria farmacêutica alcançou 297 bilhões de dólares em vendas. Com um crescimento estimado em 6 % ao ano até 2001, é esperado um faturamento da ordem de 378 bilhões de dólares em vendas.<sup>22</sup> Pode ser observado que a distribuição geográfica no crescimento não mudará muito.



**Figura 3.** Projeção do crescimento nas vendas de medicamentos a nível mundial.

Para cumprir suas metas de crescimento na próxima década, a direção de P&D deverá realizar um maior investimento em pessoal e pesquisa, caso contrário, não alcançará as esperadas metas de lucros. De acordo com dados da *Pharmaceutical Research & Manufacturers of America* (PhRMA), foi realizado um investimento total de cerca de 20,6 bilhões de dólares em P&D no ano de 1998, o que representa um aumento de 11% em relação ao ano de 1997.<sup>22</sup> Por exemplo, simplesmente para manter um crescimento de 10% ao ano, aproximadamente 1 bilhão de dólares em novas receitas, o grupo alemão Bayer investiu cerca de 935 milhões de dólares no ano de 1998 em P&D. A Eli Lilly e a Pfizer realizaram investimentos de 1,4 e 1,9 bilhões de dólares em P&D, respectivamente, cerca de 16% de suas vendas, enquanto que a SmithKline Beecham investiu 11% de suas vendas em P&D no ano de 1998, cerca de 1,4 bilhões de dólares.<sup>22</sup>

As direções de P&D, na indústria farmacêutica, precisam fundamentalmente, repensar suas estratégias de descoberta, modelos organizacionais, processos sistemáticos, utilização de tecnologias líderes e capacidade de gerenciamento de informação.

#### **1.4 Respostas estratégicas**

Para encontrar as exigências de produtividade impostas pelos níveis de investimentos em P&D, as maiores companhias farmacêuticas têm adotado três principais estratégias.<sup>1,15</sup>

- investimentos em novas tecnologias para a descoberta de fármacos;
- formação de alianças estratégicas;
- promoção da integração na indústria farmacêutica.

O objetivo das duas primeiras estratégias é o progresso na produtividade P&D. A última estratégia é derivar a receita para o crescimento da indústria, através da incorporação de novos aspectos de negócios na entrega de fármacos aos consumidores.

#### ***1.4.1 Investimentos em novas tecnologias para a descoberta de fármacos***

Existem duas questões fundamentais na descoberta de fármacos:<sup>1</sup>

- selecionar os alvos moleculares certos;
- encontrar as moléculas certas.

##### ***A. Selecionar os alvos moleculares certos***

Existe um grande número de alvos moleculares plausíveis no processo de descoberta de fármacos. O número aumenta regularmente com os avanços nas ciências biomédicas e, em particular, com o rápido progresso e informação em seqüência de ácidos nucleicos. Por exemplo, o completo genoma de diversos microorganismos patogênicos é agora conhecido. Para estes organismos, isto permite diretamente que sejam conhecidos os possíveis alvos moleculares para

a descoberta de antibióticos. Nos próximos anos, serão conhecidos os completos genômas de todos os patógenos humanos importantes e, conseqüentemente, todos os possíveis alvos moleculares para a descoberta de antibióticos.<sup>22,24</sup>

Embora os estudos para a elucidação completa do genoma humano estejam significativamente menos avançados do que aqueles para os microorganismos, o mapeamento físico e a seqüência de estudos vêm revelando um grande número de alvos moleculares para a descoberta de fármacos. Como o Projeto Genoma Humano (com orçamento estimado de US\$ 5 bilhões), coordenado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos, prossegue com grande concentração de esforços envolvendo laboratórios de todo o mundo, o número de potenciais alvos moleculares crescerá consideravelmente. É conhecido, antecipadamente, que o Projeto Genoma Humano deverá ser completado no ano 2005. Em resumo, dentro de 6 anos, serão conhecidos todos os possíveis alvos moleculares para o tratamento de importantes doenças não-infecciosas em seres humanos.<sup>1, 22</sup>

Após serem conhecidos todos os potenciais alvos moleculares para a descoberta de fármacos, a etapa seguinte compreende encontrar quais destes são realmente apropriados para se concentrarem os investimentos. Um alvo apropriado é aquele no qual uma pequena molécula moduladora da atividade específica fornecerá segurança e efetividade no tratamento ou prevenção de algumas desordens ou doenças humanas. O fato é que muitos alvos moleculares plausíveis falham ao não satisfazerem estes critérios, tanto por causa de seus mecanismos de toxicidade como por causa dos mecanismos

fisiológicos contrários de regulação, que evidentemente, tornam estes alvos moleculares ineficazes. Como consequência, um número de tecnologias vem sendo desenvolvido para validar alvos moleculares na descoberta de fármacos. Entre estas estão:

- genética humana e animal;
- genômicos.

Seletivamente, em certas populações, ocorrem incidentes particulares e incomuns de certas doenças. Por exemplo, os índios Pima sofrem de problema de obesidade anormal. Habitantes da Ilha da Cunha apresentam uma alta e incomum frequência de doenças pulmonares. Um exame cuidadoso da herança hereditária destas desordens pode indicar um ou mais genes específicos que estariam associados a elas. Estes genes tornam-se válidos como alvos para a descoberta de fármacos.<sup>25</sup>

A genética dos camundongos pode ser similarmente empregada para identificar e validar alvos moleculares, uma vez que estes se apresentem de forma homóloga em humanos. Os estudos dos mecanismos controladores do peso corporal têm sido relacionados e sustentados com a identificação da leptina, o produto do gene *ob*.<sup>26</sup> A administração de leptina induz à perda de gordura em camundongos *ob/ob*. A demonstração de que a obesidade está relacionada diretamente à perda de leptina vem sendo amplamente discutida e o papel da leptina tem recebido especial atenção em uma série de revisões.<sup>27-32</sup> Por exemplo, os camundongos *ob/ob* apresentam-se deficientes em leptina e os

camundongos db/db são conhecidos por perder o receptor da leptina.<sup>33-35</sup> Desde que é conhecida a existência de leptina e o seu receptor no homem, essa e outras pequenas moléculas agonistas da leptina apresentam-se como razoáveis caminhos para o tratamento da obesidade e diabetes em humanos.<sup>36,37</sup>

Os genômicos trazem junto a informação sobre a sequência de genômas e as ferramentas de informação tecnológica para tentar identificar a função dos novos genes. Uma vez que a função de um novo gene tenha sido estabelecida, pode-se razoavelmente começar a pensar sobre seu potencial como alvo molecular para a descoberta de fármacos. A utilização de genômicos vem sendo bastante proveitosa na identificação e validação dos alvos moleculares em caminhos muito definidos.<sup>22</sup>

Claramente, estas tecnologias são de alta importância e o seu desenvolvimento e utilização criarão valores de bem-estar e saúde humana. Contudo, o foco desta Tese está no segundo tema identificado anteriormente: encontrar as moléculas certas.

### ***B. Encontrar as moléculas certas***

Neste aspecto, também tem sido desenvolvido um número de tecnologias promissoras. Principalmente, entre estas, encontram-se:

- química combinatória e ensaios em massa;
- planejamento racional de fármacos;
- relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR preditivo).



**Química combinatória/Ensaio em massa**

O desenvolvimento da química combinatória tem proporcionado a rápida criação de enormes bibliotecas de novas moléculas. Baseado em uma única molécula, bibliotecas contendo 100.000 compostos podem ser criadas, embora bibliotecas menores contendo cerca de 5.000 a 10.000 compostos sejam as mais comuns. As maiores companhias farmacêuticas do mundo possuem bibliotecas contendo entre 53.500 e 435.000 compostos, sendo esperada a duplicação destes números para o ano 2000.<sup>1</sup> Grupos de química combinatória estão reunindo coleções de milhões de compostos que podem ser examinados para uma atividade biológica desejável.<sup>9,38-40</sup> O objetivo consiste em aumentar a probabilidade de encontrar moléculas interessantes aumentando o número de possibilidades.<sup>41</sup> Contudo, dispor de alguns milhões de moléculas torna evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas para o exame destas enormes bibliotecas quanto à atividade biológica. Ensaio em massa têm sido desenvolvidos para encontrar estas necessidades. A automatização e a robotização dos exames biológicos permitem que um único usuário examine dezenas de milhares de compostos por dia, em casos favoráveis. É desnecessário dizer que, o desenvolvimento e o exame de enormes bibliotecas de moléculas requerem um maior investimento em informação tecnológica. É preciso examinar um número muito grande de moléculas e suas atividades biológicas em um caminho que torne estes dados úteis para o cientista na procura da informação. Corre-se o risco, neste processo, de se exceder a capacidade de memória da estação computacional de trabalho ou de se obter

uma inadequada velocidade de examinação, fatores que implicariam seriamente em altos custos e desperdício de tempo.<sup>1</sup>

A química combinatória está sendo explorada rapidamente em programas de descoberta de fármacos e ainda é muito cedo para avaliar o impacto que esta tecnologia alcançará.<sup>15,25</sup>

### **Planejamento racional de fármacos**

Geralmente, a primeira barreira a ser vencida no processo tradicional de descoberta de fármacos é encontrar moléculas, simples e potentes, que modulem a atividade do alvo macromolecular. Inibidores enzimáticos, agonistas e antagonistas de receptores biológicos, são exemplos típicos. O exame de tradicionais coleções de compostos, produtos naturais ou bibliotecas de química combinatória, é um caminho para encontrar uma série de moléculas que possibilite um ponto de partida para estudos em Química Medicinal. Uma outra alternativa, que pode ser empregada separadamente ou em conjunto com programas de examinação, é o planejamento racional de fármacos.<sup>1,9</sup>

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, entre estas, muitos alvos plausíveis para a descoberta de fármacos. A determinação de estruturas nas quais uma pequena molécula está ligada ao sítio ativo de uma macromolécula, possibilita a identificação deste determinado sítio, assim como, a determinação das interações não-covalentes que determinam as estruturas

dos complexos enzima-inibidor. O estudo de tais complexos, explorados com as ferramentas de química computacional e modelagem molecular, pode fornecer informações essenciais aos químicos medicinais para o planejamento de moléculas mais potentes e específicas para o determinado alvo.<sup>9,15,42,43</sup> Todas as maiores companhias farmacêuticas dos Estados Unidos possuem capacidade para o planejamento racional de fármacos e algumas companhias menores, como a Vertex, BioCryst e Agouron, têm esta como a estratégia fundamental de suas organizações.<sup>25</sup>

O planejamento racional de fármacos tem sido de grande valor na descoberta de fármacos. Por exemplo, a estrutura detalhada da protease codificada pelo vírus HIV-1 foi usada como modelo para a descoberta de muitos inibidores da protease, que, atualmente, são amplamente empregados no tratamento de pacientes com AIDS. Estes incluem, saquinavir, ritonavir, indinavir e nelfinavir.<sup>1,22,25</sup>

### **QSAR preditivo**<sup>1,25</sup>

A habilidade para criar modelos preditivos de QSAR seria extraordinário na descoberta de fármacos. Poderia predizer-se o valor de determinada propriedade para novos compostos e depois sintetizar somente aqueles que encontrassem um padrão pré-determinado de interesse. Considerando-se que o principal tema desta Tese é o desenvolvimento de modelos preditivos de QSAR, detalhes adicionais importantes são apresentados a partir do item 1.7 desta introdução (págs. 40-56).

A tecnologia de QSAR fez história nos últimos 40 anos e uma quantidade substancial de trabalhos foram demonstrados na literatura com sucesso, incluindo um certo número na descoberta de fármacos. Contudo, modelos de QSAR, enquanto preditivos em alguma região do espaço estrutural, têm limitado poder preditivo, que geralmente não é claro, fora destes limites. Conseqüentemente, a proposta preditiva do QSAR tem sido limitada, e, portanto, o maior interesse do QSAR tem sido na área de correlações de dados.

O fato de que a tradicional tecnologia de QSAR não tenha alcançado a grande promessa do QSAR preditivo, não diminui esta promessa. Permanece claro que, modelos preditivos de QSAR, confiáveis para um determinado espaço estrutural, seriam uma revolução no desenvolvimento de fármacos. O objetivo desta Tese é a construção de conjuntos padrões de dados e o desenvolvimento de modelos preditivos empregando um novo paradigma do QSAR.

#### **1.4.2 Formação de alianças externas**

Uma forte tendência que vem ganhando espaço nos últimos anos é o compromisso das maiores companhias farmacêuticas em lançar recursos de P&D em alianças externas. Atualmente, cerca de 20% do investimento de P&D é empregado em alianças envolvendo:<sup>1,22,44</sup>

- companhias biotecnológicas;
- instituições acadêmicas;
- outras companhias farmacêuticas maiores (ocasionalmente).

Os exemplos nesta última categoria são raros e a forma de uma aliança se dá através da compra ou união. Um bom exemplo ocorreu nos últimos anos através de empresas gigantes como a Bristol-Myers Squibb, Glaxo Wellcome, Novartis (Ciba-Geigy/Sandoz) e SmithKline Beecham.<sup>22,25</sup>

#### **A. Alianças com companhias biotecnológicas<sup>1,22,25</sup>**

Durante os últimos 15 anos, o crescimento da indústria biotecnológica fez com que pequenas companhias com potencial de P&D, que concentravam suas pesquisas em pequenas moléculas, tenham crescido espetacularmente, em particular, nos Estados Unidos. Estas companhias freqüentemente se baseiam no desenvolvimento de uma nova tecnologia, às vezes similar àquelas disponíveis. Por exemplo, as primeiras companhias biotecnológicas foram estabelecidas a cerca da tecnologia em biologia molecular. Outras se estabeleceram através da perícia em química combinatória e outras através do planejamento racional de fármacos ou perícia em genômicos, entre outros.

No início de seu desenvolvimento, estas pequenas companhias, dependiam de suas habilidades em fazer acordos com as grandes companhias farmacêuticas, fornecendo tecnologia especializada em troca de suporte para P&D. Um grande número destas alianças foi formado. Por exemplo, a Millennium Pharmaceuticals teve, ao final de 1998, alianças com a Roche, Eli Lilly, Pfizer, Astra, Wyeth-Ayerst, Monsanto e Bayer.

**B. Alianças com instituições acadêmicas**

Estas alianças têm apresentado um crescimento nos Estados Unidos nos últimos anos. A comunidade acadêmica envolvida nestas alianças está mais confortável atualmente com as relações com a indústria que no começo dos anos 80.<sup>45,46</sup> O número de relações entre companhias farmacêuticas e laboratórios acadêmicos continua a aumentar. A criação destas relações em um caminho que particularmente encontre, simultaneamente, os objetivos de ambos os parceiros tem demonstrado ser dificultosa em muitos casos, principalmente na atualização das informações e progressos realizados por ambas as partes envolvidas, que ainda permanecem escassos.<sup>47</sup> Por outro lado, os trabalhos desenvolvidos têm encorajado investimentos adicionais por parte da comunidade farmacêutica, embora as características do relacionamento tenham se mantido extraordinariamente estáveis. Cerca de noventa por cento das companhias conduzindo pesquisas nos EUA tem relações com instituições acadêmicas.<sup>48</sup> Após mais de uma década de contínua interação, universidades e indústrias parecem ter formado parcerias científicas duráveis, embora esta relação possa causar grandes ameaças quanto às restrições das comunicações científicas que as universidades geralmente perseguem. O exemplo mais claro disto está nos acordos nos quais as companhias farmacêuticas incluem cláusulas contratuais, a fim de manter os resultados da pesquisa em sigilo por um tempo além do necessário para a finalização da patente.<sup>49</sup>

Nos países desenvolvidos, a indústria farmacêutica é a grande responsável pela maior parte das pesquisas no desenvolvimento de fármacos,

enquanto no Brasil, a maior responsável por estas pesquisas é a universidade. Portanto, a formação de alianças efetivas entre a universidade e a indústria poderá promover e criar recursos humanos e financeiros que permitam avanços tecnológicos nas pesquisas em Química Medicinal. A riqueza da flora brasileira se apresenta como um alvo ideal para o investimento e geração de recursos em pesquisas.

### **1.4.3 Integração na indústria farmacêutica<sup>25</sup>**

Historicamente, as maiores companhias farmacêuticas têm descoberto, desenvolvido, manufaturado e vendido formulações farmacêuticas a seus consumidores. Estas atividades continuam a formar as partes centrais de suas atividades de negócios. Contudo, muitas indústrias estão envolvidas agora, diretamente ou através de alianças, na venda de fármacos que não necessitam de prescrição médica, como também, no manufaturamento da substância (fármaco) ou produto do fármaco, para a sua própria ou para outras companhias farmacêuticas.

## **1.5 Inibidores Enzimáticos**

A Química Medicinal é a ciência que trata do planejamento e da descoberta de novos compostos químicos com potencial terapêutico, e do seu desenvolvimento até o uso clínico. Os inibidores enzimáticos têm se apresentado extremamente úteis neste contexto.<sup>50,51</sup>

Muitas doenças, ou ao menos indícios de doenças, surgem a partir da deficiência ou excesso de um específico metabólito no corpo, através da infestação de um organismo estranho ou de um crescimento celular anormal. Se a deficiência ou o excesso de determinado metabólito pode ser normalizada e se os corpos estranhos ou células anormais podem ser destruídos, estes estados de doenças serão remediados. Todas estas situações podem ser afetadas por inibição enzimática específica ou seletiva.<sup>50</sup>

Muitas substâncias são capazes de alterar a atividade de uma enzima em um caminho que influencie a sua ligação ao substrato. Substâncias que reduzem a atividade enzimática neste caminho são conhecidas como inibidores. Muitos inibidores são substâncias estruturalmente parecidas com os substratos de suas enzimas. Contudo, não reagem ou então reagem muito lentamente comparado ao substrato natural. Tais inibidores são comumente utilizados para investigar a natureza química e conformacional do sítio ativo ligante ao substrato, como parte das pesquisas para elucidar o mecanismo catalítico enzimático específico. Além disso, muitos inibidores enzimáticos são efetivos agentes quimioterápicos, desde que um substrato análogo não-natural seja capaz de bloquear a ação de uma específica enzima. Em geral, quando a atividade de uma enzima é



bloqueada, os substratos não podem ser metabolizados e, portanto, os produtos metabólitos não são gerados.<sup>50</sup>

### **1.5.1 Utilidade dos inibidores enzimáticos na clínica médica**

Na clínica médica, durante as últimas décadas, encontra-se uma série de inibidores com diversas utilidades terapêuticas, determinado assim, a importância chave desta classe no processo de descoberta de fármacos. Se uma célula apresenta deficiência do substrato para a enzima alvo e esta deficiência resulta em um estado de doença, a inibição da enzima envolvida neste processo previniria a degradação do substrato, aumentando assim, a sua concentração. Um exemplo é o princípio de ataques convulsivos provocados pela diminuição dos níveis de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no cérebro. A inibição da enzima que degrada o GABA, a GABA aminotransferase (4-aminobutirato aminotransferase), produz efeitos anticonvulsivantes.<sup>50</sup> Se o excesso de um específico metabólito produz um estado de doença, a inibição da enzima que catalisa a biossíntese deste metabólito diminuiria, portanto, sua concentração.<sup>50</sup> A superprodução de ácido úrico é um fator marcante nos pacientes com gota e uma característica nos casos de hiperuricemia. A inibição da xantina oxidase, enzima responsável pela conversão de xantina em ácido úrico, reduz a concentração de ácido úrico, resultando em efeitos anti-hiperuricêmicos.<sup>50</sup> A via biossintética do colesterol tem mais do que 20 etapas enzimáticas iniciadas a partir da acetil-CoA. A etapa determinante é a conversão de 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) ao ácido mevalônico,

catalisada pela HMG-CoA redutase. Sendo a hipercolesterolemia o principal risco de doenças coronárias<sup>52</sup> e porque a taxa total da biossíntese do colesterol é uma função desta enzima, a inibição da HMG-CoA redutase é extremamente eficaz em reduzir as concentrações plasmáticas de LDL-colesterol.<sup>50</sup> Vale ressaltar que a doença cardíaca coronariana é a principal causa de mortes nos Estados Unidos. Cerca da metade de todas as mortes ocorridas nos Estados Unidos é atribuída à aterosclerose.<sup>51</sup> O principal componente da placa aterosclerótica (depósitos de gordura no interior da parede das artérias) é o colesterol. Se o produto de uma reação enzimática é necessário para conduzir uma função fisiológica importante (e o inibidor apresenta-se para bloquear este processo), a inibição desta enzima diminui a concentração deste produto e pode interferir no efeito fisiológico. Prostaglandinas, substâncias de vasto interesse nos círculos biológicos, estão envolvidas na patogênese de processos inflamatórios e febris. A inibição da prostaglandina sintetase resulta em efeitos antiinflamatório, antipirético e analgésico.<sup>50</sup>

No caso de organismos estranhos, tais como bactérias e parasitas, ou no caso de células tumorosas, a inibição de suas enzimas essenciais pode prevenir a ocorrência de importantes processos metabólicos, resultando na inibição do crescimento ou replicação de organismos ou células anormais. A inibição da alanina racemase bacteriana, por exemplo, bloqueia a biossíntese da parede celular da bactéria.<sup>53</sup> Tais compostos inibidores possuem atividade antibacteriana. O uso de fármacos para combater organismos estranhos e células anormais é chamado quimioterapia.

A inibição enzimática é uma direção promissora para a descoberta racional de novas moléculas-líderes ou fármacos. Um inibidor enzimático ideal deve ser totalmente específico para a enzima alvo. Como isto é muito raro, procura-se atingir ao máximo a mais alta inibição seletiva, que se constitui como o real objetivo a ser alcançado. Devido a esta afinidade seletiva enzima/receptor, no sítio ativo da enzima, uma analogia pode ser feita entre agonistas, antagonistas e inibidores competitivos.<sup>50,54</sup>

Os principais inibidores enzimáticos empregados na clínica médica são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Inibidores enzimáticos utilizados na clínica médica.<sup>50</sup>

<b>Inibidor</b>	<b>Enzima</b>	<b>Indicação clínica/Us</b>
Ciprofloxacina	DNA-girase	Infecções do trato urinário, antibiótico
Teofilina	Fosfodiesterase	Broncodilatador, estimulante do SNC
Aspirina, Indometacina	Ciclooxigenase	Antiinflamatório, artrite reumatóide
Fluorouracil	Timidilate sintetase	Antineoplásico
Aciclovir	DNA-polimerase	Infecções, vírus da herpes
Zidovudine	Transcritase reversa	AIDS
Captopril	Peptidil dipeptidase, (ECA)	Anti-hipertensivo
Lovastatin	HMGCoA redutase	Hipercolesterolemia
Lítio	Inositol-1-fosfatase	Patologia maníaco-depressiva
Ciclosporina	Peptidil prolil isomerase	Rejeição de órgãos transplantados
Disulfiram	Aldeído desidrogenase	Tratamento do alcoolismo crônico
Alopurinol	Xantina oxidase	Gota, hiperuricemia
Testolactona	Aromatase	Carcinoma mamário
Finasterida	5-alfa-redutase	Hiperplasia benigna prostática
Sildenafil	Fosfodiesterase do tipo 5	Disfunção erétil
Trimetoprin, Metotrexato	Diidrofolato redutase	Antibiótico/antineoplásico, artrite
Clavulanato	Beta-lactamase	Antibiótico
Pargilina	Monoamina oxidase-B	Antidepressivo
Penicilina G	Peptidoglican transpeptidase	Antibiótico
Kanamicina	Peptidil transferase	Antibiótico

### **1.6 Purina nucleosídeo fosforilase**

Purina nucleosídeo fosforilase (PNP; EC 2.4.2.1) é considerada atualmente como um dos principais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. O interesse na PNP como alvo para a descoberta de fármacos deve-se ao seu papel no metabolismo das 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.<sup>58,59</sup> 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 celular severa caracterizada pela perda das funções normais das células T, em crianças que apresentavam deficiência ou completa perda da atividade desta enzima.<sup>60</sup> As manifestações clínicas desta imunodeficiência em vários pacientes foram detalhadas através de estudos posteriores.<sup>61-64</sup> As anormalidades metabólicas não convencionais provenientes da deficiência da PNP tornam esta enzima um importante alvo quimioterápico.<sup>65</sup> A PNP é uma enzima chave na rota de salvamento das purinas, fornecendo uma alternativa para a biossíntese *de novo* de nucleotídeos purinas.<sup>58,66</sup> 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.<sup>67</sup>

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.<sup>68</sup> Este perfil sugere que inibidores da PNP possam ser usados no tratamento de doenças proliferativas das células T, como

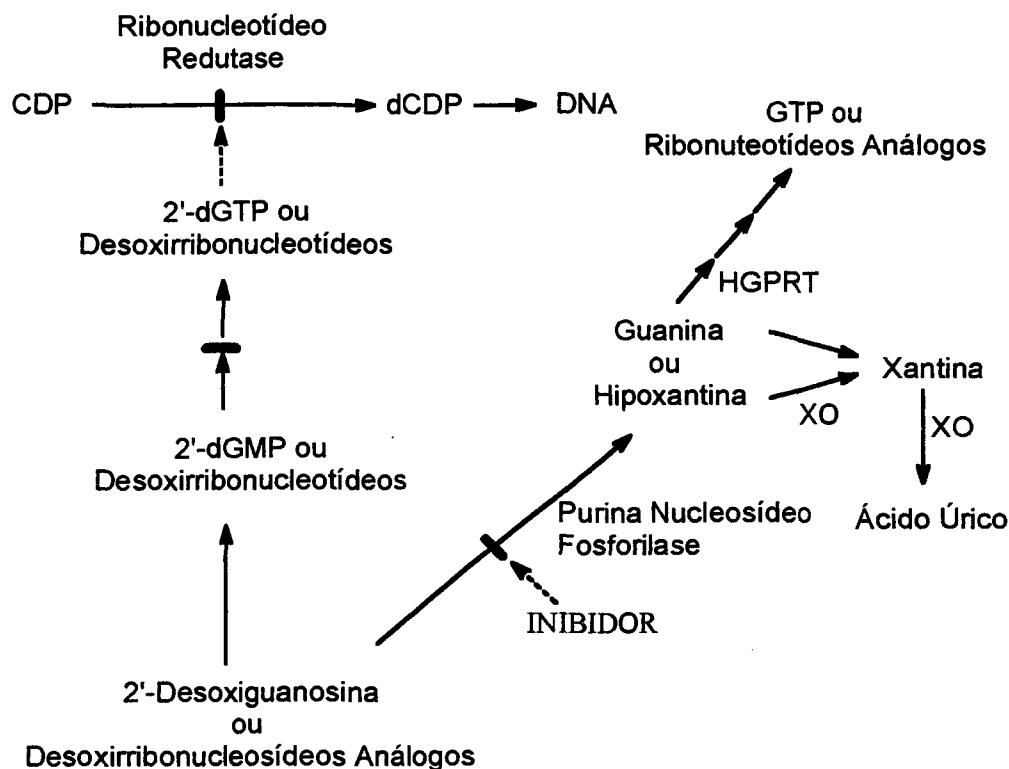
linfoma e leucemia das células T,<sup>66,69,70</sup> no tratamento da rejeição de órgãos transplantados. Apresentam também, uso potencial como agentes imunossupressivos para o tratamento de certas doenças autoimunes mediadas pelas células T, incluindo artrite reumatóide,<sup>71-73</sup> diabetes do tipo 1,<sup>74,75</sup> lúpus e psoríase.<sup>76</sup>

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.<sup>77</sup> 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 potente inibidor da PNP.

Por outro lado, foi demonstrado, recentemente, que o parasita da malária, hospeda derivados purínicos formados via PNP para sintetizar seus próprios nucleosídeos.<sup>78,79</sup> Neste caso, a função da PNP é essencial para a sobrevivência deste parasita no homem, proporcionando assim outra utilização potencial para os inibidores da PNP.

### **1.6.1 Base bioquímica da inibição da proliferação das células T por inibidores da PNP**

A base bioquímica da imunodeficiência da PNP vem sendo profundamente estudada.<sup>65,80-82</sup> Foi demonstrado que em pacientes com deficiência da PNP ocorre a acumulação de quatro substratos nucleosídeos da enzima no plasma e na urina. Contudo, somente o substrato 2'-desoxiguanosina pode ser fosforilado nas células T para formar o correspondente derivado trifosfato (dGTP), que é o principal agente envolvido na toxicidade seletiva das células T (ver Figura 4).<sup>83,84</sup> A dGTP acumulada é responsável pela inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, que catalisa a redução de nucleosídeos difosfatos aos seus correspondentes 2'-desoxi derivados.<sup>85</sup> Tal inibição bloqueia a redução de difosfato citidina (CDP), resultando na deficiência intracelular de dCTP (Figura 4). Esta deficiência afeta as células na síntese do DNA, resultando em defeito e morte celular.<sup>86,87</sup> Acredita-se que a administração de 2'-desoxiguanosina em combinação com um potente inibidor da PNP produziria efeitos sinérgicos.<sup>69</sup> Outro caminho atrativo é o planejamento de análogos de nucleosídeos (substratos pobres da PNP) que apresentam alta reatividade com desoxiguanosina quinase e outras enzimas na síntese do dGTP, tornando possível, portanto, a acumulação intracelular de análogos dGTPs.<sup>65,69</sup>



**Figura 4.** Base bioquímica para a toxicidade seletiva às células T na deficiência da PNP. Racionalidade para o uso de inibidores da PNP.

Por outro lado, um resumo das etapas de formação do ácido úrico é mostrado na Figura 5 (ver também Figura 4). A purina nucleosídeo fosforilase converte inosina e guanosina em suas correspondentes bases purínicas, hipoxantina e guanina. A guanina é desaminada para formar xantina. A hipoxantina é oxidada pela xantina oxidase à xantina, a qual é subsequentemente oxidada pela xantina oxidase em ácido úrico, o produto final do metabolismo das purinas nos seres humanos. O ácido úrico é excretado na urina. A gota primária e outras condições hiperuricêmicas são caracterizadas por crises de inflamação artrítica aguda causada pela deposição de cristais de urato de sódio. A utilização de inibidores da PNP poderia levar à redução nos níveis de



ácido úrico, combinada a níveis aumentados de nucleosídeos e nucleotídeos purínicos.

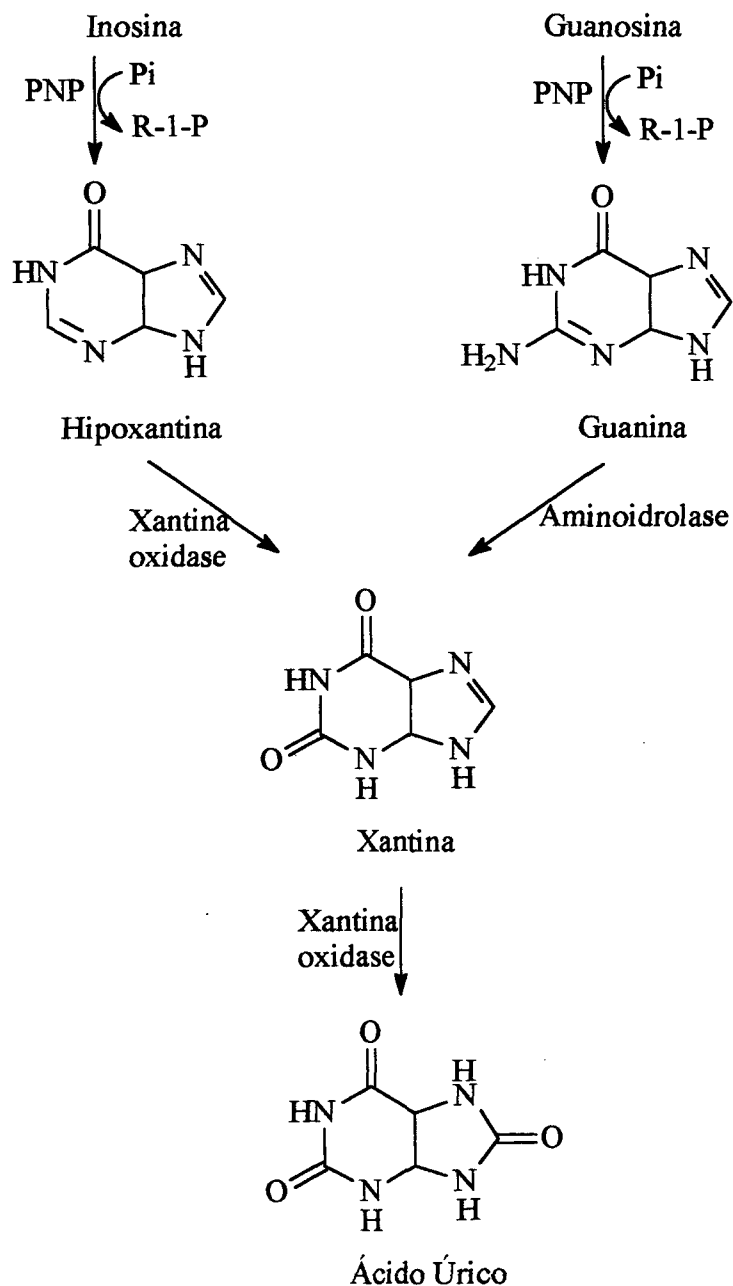


Figura 5. Degradação dos nucleosídeos purínicos ao ácido úrico.

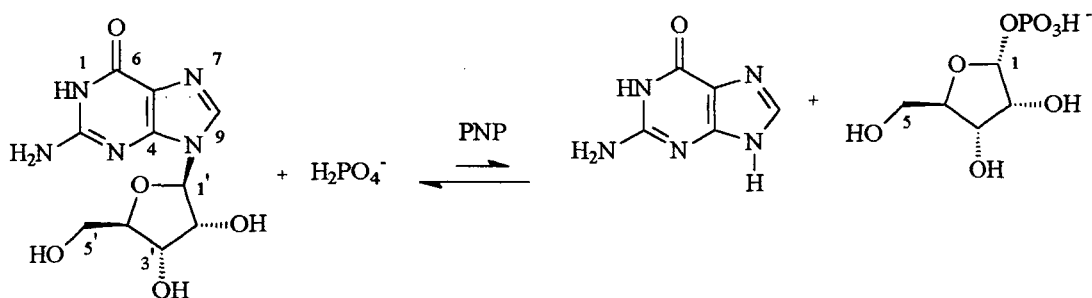
### **1.6.2 Caracterização da PNP**

A partir do grande interesse demonstrado nas funções da PNP, a enzima tem sido purificada de várias fontes, incluindo eritrócitos humanos,<sup>88,89</sup> placenta,<sup>90</sup> granulócitos.<sup>91</sup> Também do baço,<sup>92</sup> cérebro,<sup>93</sup> tireóide<sup>94</sup> e fígado<sup>95</sup> bovino; do fígado de coelho<sup>96</sup> e de galinha,<sup>97,98</sup> de bactérias,<sup>99</sup> de parasitas da malária;<sup>100</sup> entre outras fontes.

A PNP, isolada de ambos, eritrócito humano e baço bovino, apresenta estrutura trimérica com massa molecular de cerca 84.000 Da e sub-unidades com massa molecular estimada em 28.000 Da.<sup>101</sup> A seqüência codificada do DNA para a purina nucleosídeo fosforilase de eritrócitos humanos foi determinada e contém 291 aminoácidos com um massa molecular aproximada de 32.000 Da.<sup>102</sup> A seqüência da PNP bovina é 86% idêntica à do eritrócito humano e todos os resíduos do sítio ativo são conservados. A estrutura cristalina da enzima, a partir do eritrócito humano, indica que cada monômero do trímero contém um sítio ativo e cada sítio liga-se a substratos análogos.<sup>103</sup>

### **1.6.3 Mecanismo catalítico**

Estudos envolvendo o mecanismo catalítico demonstraram que a PNP é específica para nucleosídeos purínicos em configuração- $\beta$ , clivando a ligação glicosídica com a inversão da configuração para produzir a correspondente base purina e  $\alpha$ -ribose-1-fosfato, como mostrado na Figura 6.<sup>104,105</sup>



**Figura 6.** Reação catalisada pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP). No equilíbrio: síntese de guanosina a partir da guanina e ribose-1-fosfato.

Muito foi deduzido sobre o mecanismo catalítico da PNP por estudos químicos antes de ser visualizada sua estrutura tridimensional. Estudos caracterizando a reação por cinética enzimática na direção da liberação da base purínica indicaram que a catálise ocorre através de um complexo ternário entre enzima, nucleosídeo e fosfato,<sup>106</sup> sem o envolvimento de intermediários fosforilados ou ribosilados da enzima.<sup>88</sup> Contudo, estudos cinéticos não foram consistentes na concordância quanto à ordem de ligação dos substratos e liberação dos produtos. Para a PNP da tireóide bovina, fosfato foi demonstrado por ligar-se prioritariamente frente ao nucleosídeo,<sup>94,107</sup> enquanto que a ordem inversa foi encontrada para a PNP do cérebro humano.<sup>93</sup>

Estudos utilizando mudanças de fluorescência demonstraram que a PNP do baço bovino catalisa a cisão fosforolítica de nucleosídeos purinas através de um mecanismo bimolecular ao acaso, enquanto que a síntese dos nucleosídeos ocorre através de um mecanismo bimolecular ordenado.<sup>108</sup> A clivagem da ligação glicosídica é postulada por ocorrer através de um mecanismo tipo-S<sub>N</sub>1 baseado no efeito isotópico cinético 20-30%  $\alpha$ -deutério, observado durante ambas

fosforólise<sup>109,110</sup> e arsenólise<sup>111</sup> da 1'-[<sup>2</sup>H]inosina. Estes estudos demonstraram que a clivagem da ligação glicosídica ocorre distante em relação à ligação que está se formando na direção fosforolítica e que o estado de transição tem considerável característica de íon oxocarbênio. Evidências adicionais para o estado de transição com características de íon oxocarbênio foram fornecidas a partir de estudos de cinética isotópica com PNP na hidrólise e metanólise da inosina catalisada pela PNP.<sup>112</sup>

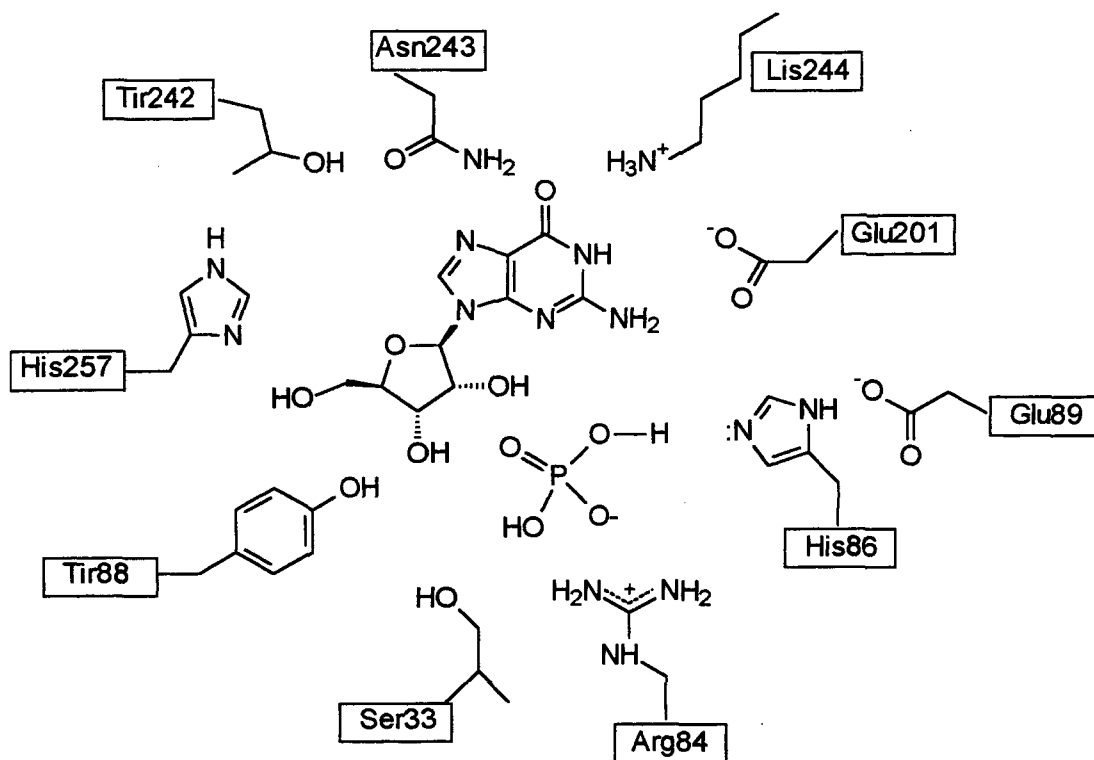
Análises do perfil de pH e da cinética de PNPs, quimicamente modificadas, levaram à postulação da participação das cadeias laterais da histidina 86 e asparagina 243. A primeira na captura de um próton do monoânion fosfato para gerar uma espécie mais nucleofílica e a segunda, por sua vez, na protonação da base purínica, aumentando, assim, a habilidade do grupo de saída<sup>93,107,113,114</sup>

A informação essencial, necessária para identificar o sítio ativo, especificar o modo de ligação do substrato e elucidar o mecanismo enzimático, veio através de estudos cristalográficos de raios-X para a PNP humana e diversos complexos PNP-inibidor, com resoluções de 2.75 e 3.2 Å.<sup>103,115</sup> As estruturas cristalinas forneceram evidências na origem da alta especificidade pelo substrato. A especificidade da PNP por guanina, hipoxantina e por seus análogos estruturais pode ser explicada com base na disposição dos doadores e aceptores de próton no sítio ativo da enzima.<sup>116</sup> Estes substratos fazem uma ponte de hidrogênio (doador) no N1 e outra (aceptor) no O6 da purina. As cadeias laterais da asparagina 243 e lisina 244 estão próximas ao O6, enquanto a do glutamato 201 está próximo ao N1<sup>117,118</sup>. A alta especificidade da PNP por 6-oxopurinas

frente a 6-amino nucleosídeos purinas (com uma eficiência catalítica,  $k_{cat}/K_M$ , 350.000 vezes maior para inosina quando comparada à adenina) ficou clara, desde que a adenina e seus análogos estruturais possuem um grupo doador no N6 e um acceptor no N1. O hidrogênio ligado à base é somente complementar para análogos da guanina e hipoxantina.<sup>119</sup> Além disso, o grupo amino no C2 da guanina está em posição para formar uma ponte de hidrogênio adicional com o grupo carboxilato do glutamato 201. Isto pode explicar a observação que análogos da guanina, geralmente, ligam-se melhor à PNP que os correspondentes análogos da hipoxantina.<sup>103</sup>

O sítio ligante da ribose apresenta o menor número de interações específicas, que comprovadamente não são fundamentais para a catálise. Um pequeno lado da ribose é geralmente hidrofóbico e interage ao menos com 4 resíduos aromáticos da enzima. O lado hidrofílico do açúcar está próximo ao grupo fosfato. Pode ser possível uma ponte de hidrogênio entre o O<sup>3'</sup> da ribose e a hidroxila da tirosina 88 (3'-desoxinosina liga-se muito fracamente à enzima).<sup>120</sup> Embora o O<sup>2'</sup> possa estar próximo à cadeia lateral da metionina, parece não estar suficientemente próximo para formar uma forte ponte de hidrogênio. Esta observação é consistente, pois a PNP aceita ambos ribonucleosídeos e 2'-desoxirribonucleosídeos como substrato.<sup>106</sup>

Os estudos cristalográficos de raios-X foram muito importantes, indicando que todos os contatos diretos entre a PNP e os substratos (nucleosídeo purina e fosfato) ocorrem através das cadeias laterais de aminoácidos da enzima, que são ilustrados na Figura 7.<sup>116</sup>



**Figura 7.** Modelo do sítio ativo da PNP construído a partir das coordenadas atômicas para o complexo PNP-guanosina depositado na proteína. (Banco de dados: Brookhaven National Laboratory).

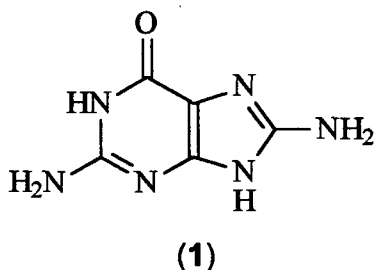
#### 1.6.4 Inibidores da PNP

Apesar do grande potencial terapêutico dos inibidores da PNP estar sendo avaliado durante os últimos 20 anos, a primeira triagem clínica de um destes foi somente completada recentemente.<sup>67,121,122</sup> Desta forma, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas tecnologias com o objetivo de planejar novos

inibidores que possuam alta potência e especificidade para a enzima. No passado, um número promissor de análogos de nucleosídeos purínicos em triagens laboratoriais não ofereceu vantagens claras sobre suas respectivas bases purinas análogas. Isto pode ser prontamente explicado pela alta atividade da PNP em tecidos eritrócitos humanos (10-15 E.U/ml das células). Existe PNP suficiente nos eritrócitos do corpo humano de um adulto para a cisão fosforolítica de cerca de 5 gramas de inosina por minuto,<sup>123</sup> o que requer um inibidor potente e permeável à membrana para atingir 99,9% da atividade da PNP. Baseado nisto, é estimado que um inibidor capaz de possuir efeito significativo sobre as células T do sistema imunológico deve apresentar um  $K_i < 10$  nM.<sup>66,117</sup>

Considerando que muitos análogos de nucleosídeos purínicos são bons substratos para PNP e também são permeáveis ao eritrócito, é provável que estes nucleosídeos sejam rapidamente convertidos às bases livres no sistema vascular antes de alcançarem alvos periféricos, como por exemplo, um tumor. Portanto, a co-administração de um potente inibidor da PNP deverá certamente permitir que estes nucleosídeos purínicos sobrevivam ao trânsito biológico através da corrente sangüínea, alcançando, assim, o desejado sítio de ação.<sup>69</sup>

O primeiro inibidor significativo da PNP a ser identificado foi 8-aminoguanina (**1**), com  $K_i$  aparente de 0,2  $\mu$ M para a enzima do eritrócito humano.<sup>114</sup>

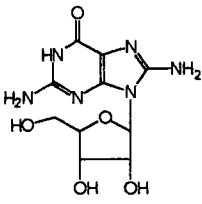
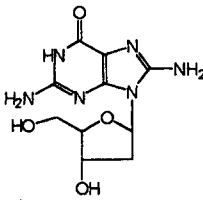
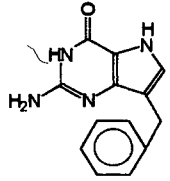
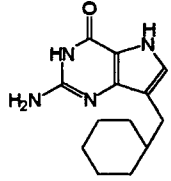
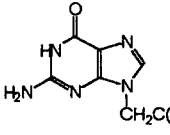
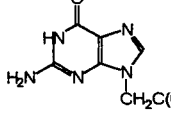
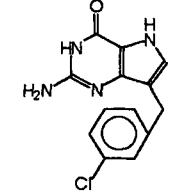
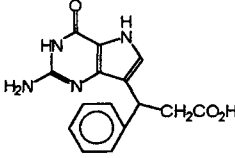
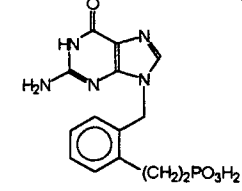
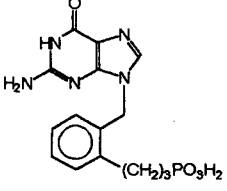
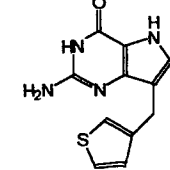
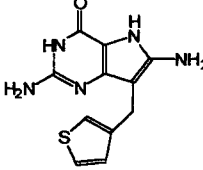
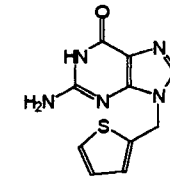
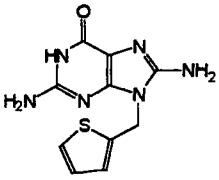


A partir da descoberta deste primeiro inibidor potente da PNP, uma série de investigações foi realizada e muitos outros inibidores foram publicados durante os últimos anos.<sup>122,124</sup> Por exemplo, foi demonstrado que a guanina é cerca de 3 vezes mais potente que a hipoxantina, e que 8-aminoguanina é de 10-50 vezes mais potente que 8-aminohipoxantina.<sup>69,114</sup> Existem muitos outros estudos de estrutura-atividade na literatura que demonstram que o grupo 2-amino das guaninas incrementa significativamente a ligação inibidor-PNP.<sup>10,125-129</sup> Em um caso extremo, o  $K_i$  da 8-amino-9-benzilhipoxantina foi 750 vezes maior do que o da 8-amino-9-benzilguanina.<sup>125</sup>

A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de inibidores da PNP (baço bovino e eritrócito humano) com seus respectivos valores de  $CI_{50}$ . Basicamente, podem ser observadas algumas modificações na estrutura da base purínica, principalmente: 9-substituídas (6, 7, 10, 11, 14); 9-substituídas-9-deaza (4, 5, 8, 9, 12); 8-amino-9-substituídas (2, 3, 15); 8-amino-9-substituída-9-deaza (13). Estas modificações forneceram diversas classes de inibidores derivados da guanina e foram utilizadas em diversos estudos envolvendo o planejamento racional de inibidores da PNP.

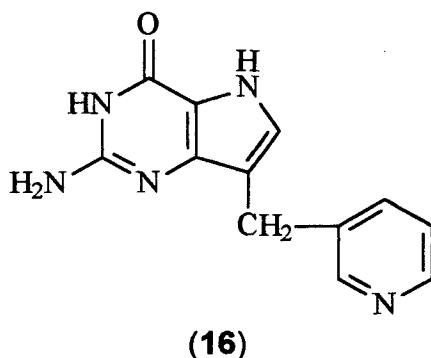


Tabela 2. Inibidores da PNP.

N <sup>o</sup>	Inibidor	Cl <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	Ref	N <sup>o</sup>	Inibidor	Cl <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	Ref
2		1,33 <sup>a</sup>	130	3		4,25 <sup>a</sup>	66
4		0,21 <sup>a</sup>	65	5		2,1 <sup>a</sup>	133
6		0,044 <sup>a</sup>	131	7		50 <sup>a</sup>	131
8		0,150 <sup>a</sup>	65	9		0,187 <sup>a</sup>	132
10		0,450 <sup>a</sup>	132	11		12,5 <sup>a</sup>	132
12		0,067 <sup>b</sup>	65	13		0,63 <sup>b</sup>	65
14		11 <sup>b</sup>	65	15		0,16 <sup>b</sup>	65

<sup>a</sup>Enzima do baço bovino. <sup>b</sup>Enzima do eritrócito humano. <sup>c</sup>Medidas realizadas com inosina 10 μM e fosfato 50 mM.

Em particular, estudos realizados pela BioCryst Pharmaceuticals com diversas classes de inibidores da PNP com potencial permeabilidade pela membrana demonstraram que um destes, 9-(3-piridilmetil)-9-deazaguanina (denominado *BCX-34*) (**16**), escolhido para estudos posteriores, encontra-se na fase III de estudos clínicos.<sup>67,122</sup> O  $K_i$  do *BCX-34* para a PNP do eritrócito humano é 31 nM. A  $CI_{50}$  para a inibição da proliferação das células T (CCRF-CEM) é 0,8  $\mu$ M na presença de 2'-desoxiguanosina, o qual, sozinho, não apresentou efeito nas células. Também, este inibidor não apresentou inibição na proliferação das células B (MGL-8) a 30  $\mu$ M. Estudos clínicos envolvidos nas fases I e II de uma formulação dermal do *BCX-34* indicaram que esta droga pode ser segura e eficaz no tratamento de linfomas cutâneos das células T e da psoríase.<sup>67</sup>



## **1.7 Relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR)**

As relações estrutura-atividade (SAR) e estrutura-propriedade (SPR) estão integradas ao planejamento racional de fármacos. A idéia das relações quantitativas estrutura-atividade ou estrutura propriedade (QSAR/QSPR) foi introduzida por Hansch e colaboradores em 1963 e primeiramente aplicada na análise da importância da lipofilicidade na potência biológica.<sup>134-136</sup> Métodos quantitativos assumem que a atividade biológica está correlacionada com a estrutura química ou com as propriedades da estrutura, e que a consequente atividade pode ser modelada em função de atributos físico-químicos calculáveis.

As técnicas de QSAR vêm provando serem importantes no processo de descoberta de fármacos.<sup>137,138</sup> Um amplo número de revisões sobre QSAR está disponível na literatura.<sup>139,140</sup> O desafio para a próxima década é a geração de tecnologias de QSAR capaz de prever a atividade biológica de compostos ainda não sintetizados. Estas poderosas ferramentas serão importantes no rápido e eficiente progresso da química sintética moderna no planejamento e racionalização de novos e poderosos terapêuticos.

### **1.7.1 Técnicas de QSAR**

As técnicas de QSAR podem ser divididas em dois principais tipos: O clássico Hansch e as técnicas 2D e 3D.<sup>141</sup> Ambas as técnicas têm duas etapas básicas:

- cálculo dos descritores moleculares;
- geração estatística de modelos de QSAR.

### **A. Cálculo dos descritores moleculares**

A maioria dos métodos de QSAR desenvolvidos durante os últimos anos trata de descritores de estruturas moleculares derivadas de representação bi-dimensional (2D), isto é, baseado na conectividade molecular. Um grande número de descritores 2D têm sido demonstrado, incluindo constantes de hidrofobicidade,<sup>140,142</sup> refratividade molar, constantes eletrônicas de Hammett,<sup>143</sup> parâmetros Verloop STERIMOL<sup>144</sup> e índices topológicos.<sup>145</sup> Métodos tradicionais de QSAR têm utilizado diversos destes parâmetros, como também métodos de regressão múltipla linear para desenvolver equações relacionando estrutura e atividade biológica.<sup>139,140</sup>

A rápida acumulação de informações experimentais de estruturas tri-dimensionais (3D) para muitas moléculas orgânicas de interesse biológico<sup>146,147</sup> contribuiu para o desenvolvimento de rápidos e precisos métodos para geração de estruturas 3D (CONCORD)<sup>148-150</sup> e alinhamento (Active Analog Approach),<sup>151,152</sup> mais recentemente conduzindo ao desenvolvimento de descritores estruturais 3D. A razoável simplicidade, o alto grau de automação e o claro senso físico-químico dos descritores estéricos e eletrostáticos têm feito do *Comparative Molecular Field Analysis* (CoMFA), um dos métodos mais populares de QSAR 3D.<sup>153</sup> O emprego deste método tem fornecido modelos

altamente preditivos.<sup>154-157</sup> Contudo, apesar do sucesso destas aplicações, muitos problemas persistem neste método.<sup>258-160</sup>

### ***B. Geração estatística de modelos de QSAR***

Uma característica comum entre os métodos avançados em oposição ao tradicional QSAR/QSPR é o drástico aumento no número de descritores. Muitos métodos estatísticos têm sido empregados para gerar modelos de QSAR a partir das variáveis descritivas. As técnicas mais comumente utilizadas são regressão múltipla linear (RML) e Partial Least Squares (PLS). O clássico QSAR, na grande maioria das vezes, emprega a RML,<sup>161</sup> porém, com o aumento no número de descritores, sua utilização torna-se inadequada. Basicamente, cálculos de QSAR empregando RML falham por duas convincentes razões. Primeiro, a RML realiza um bom trabalho somente quando os descritores utilizados são independentes entre si. De fato, descritores que são comumente usados em cálculos de QSAR não são estritamente independentes entre si, e, em alguns casos, são fortemente correlacionados. Este é certamente o caso do conjunto de descritores empregado no trabalho de modelagem descrito nesta Tese.<sup>25</sup> Segundo, a RML apresenta o melhor desempenho quando o número de observações sendo correlacionado é maior que o número de descritores usado para correlacioná-las. Esta condição também, freqüentemente, falha em cálculos de QSAR e certamente falharia gravemente neste trabalho de Tese. Entretanto, os avanços realizados em quimiometria<sup>141,162-164</sup> e algoritmos<sup>165-169</sup> têm fornecido aos pesquisadores ferramentas adequadas para solucionar este problema.

### **1.8 O novo paradigma do QSAR<sup>25, 170</sup>**

A habilidade para o eficiente planejamento ou descoberta de novas moléculas patenteáveis, potentes e específicos inibidores enzimáticos, agonistas específicos ou antagonistas de receptores biológicos, é de grande importância. Muitas destas moléculas contribuem para a prevenção ou terapia de doenças humanas. A indústria farmacêutica, a nível mundial, continua empregando e procurando por novas tecnologias a fim de proporcionar novas habilidades para rapidamente identificar e caracterizar novas moléculas nestas classes.

Relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) ou estrutura propriedade (QSPR) vêm sendo empregadas e continuam sendo desenvolvidas para correlacionar informações em conjuntos de dados e também como uma ferramenta para facilitar, por exemplo, o planejamento e a descoberta de inibidores enzimáticos. Trabalhos empregando a clássica tecnologia de QSAR provaram ser úteis em várias situações. Contudo, acredita-se que a tecnologia de QSAR tem potencial substancial inexplorado para facilitar o planejamento molecular. Três objetivos específicos incluem: (i) melhorar a habilidade dos modelos de QSAR para predizer o valor da propriedade de interesse para moléculas que não estão incluídas no conjunto treino, (ii) extrapolar o valor da propriedade além daqueles incluídos pelos membros do conjunto treino, (iii) qualificar estes modelos em um caminho que forneça medidas confiáveis para os valores preditos. Com o propósito de construir uma clássica tecnologia em um caminho que alcance estes objetivos, ou seja, buscando uma compreensão do potencial inexplorado do QSAR ao serviço da descoberta de fármacos, uma

equipe de cientistas foi organizada, inicialmente na indústria farmacêutica na *Sterling Winthrop Pharmaceuticals Inc.* Atualmente, estes cientistas trabalham em conjunto nos Estados Unidos, como parte de uma equipe denominada *Scientific Computing Team (SCT)*, a qual é liderada pelos Drs. Eugene H. Cordes e Jack W. Frazer. O maior objetivo do *STC* é criar conjuntos padrões de dados, os quais possam ser empregados: (i) para testar e aperfeiçoar o desenvolvimento da tecnologia de QSAR, e (ii) fornecer a base para a descoberta de novas moléculas que apresentem promessa de utilidade na clínica médica.

### **1.8.1 As técnicas de QSAR são úteis para o planejamento molecular<sup>170, 171</sup>**

Para muitos conjuntos de dados que abrangem limitado espaço estrutura/descritor, modelos tradicionais de QSAR fazem um bom trabalho correlacionando os dados do conjunto treino e podem apresentar significativa capacidade preditiva. Isto quer dizer que o complexo panorama da modelagem apresenta regiões de estrutura e ordem nos quais modelos lineares fornecem uma adequada descrição.

Seria possível descobrir sinergias entre as técnicas de modelagem de QSAR e outras tecnologias de planejamento molecular capazes de criar modelos com maior capacidade preditiva.

QSAR tem um potencial para modelar processos que não podem ser modelados por outras tecnologias. Entre estes, incluem-se, por exemplo, dados de segurança de fármacos, taxas de transporte de fármacos através de

barreiras, entre muitos outros. QSAR apresenta, talvez, unicamente, o potencial para otimizar simultaneamente diversas propriedades moleculares. Preditivos modelos de QSAR podem ser desenvolvidos para cada propriedade e empregados para prever um perfil de propriedades para novas moléculas.

### **1.8.2 Tradicional QSAR<sup>170</sup>**

O tradicional QSAR apresenta substancial potencial inexplorado para o planejamento molecular. Muitos modelos de QSAR falham na caracterização completa do conjunto treino. Tipicamente, os compostos não adequadamente modelados são simplesmente considerados "afastados" e são eliminados para futuras considerações. Além disso, muitos modelos de QSAR parecem ocupar regiões anômalas dentro do espaço de modelagem e não apresentam boa capacidade preditiva para a propriedade "desconhecida". Em geral, é difícil saber se os valores preditos são confiáveis ou não, sem a realização de experimentos para a determinação destas propriedades.

### **1.8.3 Os valores da propriedade de interesse<sup>170-172</sup>**

Os valores da propriedade de interesse são determinados por interações não-covalentes entre as moléculas ou nas próprias moléculas. Dentro de limites muito amplos, os valores da propriedade de interesse refletem a energia e os caminhos com os quais as moléculas interagem umas com as outras não-covalentemente (como também as propriedades inerentes às próprias



moléculas). Desta maneira, valores do ponto de ebulição refletem a espécie e a força das interações não-covalentes entre as moléculas no estado líquido, como também, parâmetros moleculares tais como tamanho e forma. O mesmo é verdadeiro para valores de constante de inibição enzimática, taxa de transporte de fármacos através das membranas, afinidade de ligantes por receptores e assim por diante. Desta forma, os descritores empregados na modelagem de QSAR devem ser estritamente correlacionados com estas forças não-covalentes. Contudo, a grande maioria de descritores empregados na modelagem tradicional de QSAR (clogP, parâmetros derivados de gráficos químicos teóricos, etc.) são fracamente correlacionados com as interações intermoleculares dominantes, as quais determinam os valores da propriedade. Este fato aumenta a complexidade do panorama da modelagem.

#### **1.8.4 O campo de modelagem molecular<sup>170, 172</sup>**

O campo de modelagem, caracterizado pelos descritores de QSAR e o espaço ocupado pela estrutura química no conjunto treino, é amplo e complexo. Em parte, esta complexidade deriva da alta dimensionalidade (amplamente determinada pelo número de descritores) do espaço e das fracas relações entre as forças base dos valores das propriedades, os descritores e a diversidade de todas possíveis estruturas. Imediatamente, esta complexidade implica em que muitos modelos, não um ou dois, serão exigidos para caracterizar um conjunto de dados.

### **1.8.5 O panorama da modelagem<sup>170, 172</sup>**

O panorama da modelagem é globalmente não-linear. Modelos com linearidade local, que caracterizam satisfatoriamente conjuntos de dados, poderiam apresentar melhor poder preditivo. Não-linearidades podem derivar da complexidade mencionada anteriormente e a partir do fato de que o molde das forças intermoleculares não-covalentes, as quais determinam os valores da propriedade, podem variar de composto para composto dentro do conjunto treino. Em muitos casos, mecanismos moleculares, por trás de certos valores da propriedade, podem ser relativamente distintos de caso a caso. Ao mesmo tempo, sabe-se que existem regiões de estrutura e ordem no panorama de modelagem, os quais sugerem fortemente que a caracterização linear por parte, pode ser o caminho apropriado para caracterizar completamente os conjuntos de dados.

### **1.8.6 Qualificação dos modelos de QSAR<sup>170, 172</sup>**

Para serem eficientemente úteis ao design molecular, os modelos de QSAR devem ser qualificados a cerca do seu poder preditivo. Como mencionado anteriormente, os interessantes modelos estatísticos de QSAR para conjuntos de dados podem ser inúteis quando utilizados para prever propriedades desconhecidas. É necessário uma metodologia que qualifique os conjuntos de dados em relação ao seu poder preditivo. Outro ponto crítico está

em fornecer uma medida quantitativa das incertezas (erros) associada aos valores preditos.

### **1.8.7 Desenvolvimento da nova tecnologia de QSAR<sup>172</sup>**

Basicamente, as questões chave diante do desenvolvimento da nova tecnologia de QSAR são:

- desenvolvimento de descritores correlacionados com as forças intermoleculares;
- procurar caminhos para criar uma completa caracterização por parte do conjunto de dados;
- desenvolvimento de metodologias para qualificar os modelos de QSAR;
- encontrar o sentido correto para dar confiabilidade à medida do erro, dos valores preditos.

### **1.8.8 Trabalhando com QSAR<sup>172, 173</sup>**

Os benefícios do QSAR serão percebidos a partir de estudos teóricos e experimentais conduzidos paralelamente: a primeira etapa da modelagem de QSAR é a construção de um conjunto de dados, tipicamente um grupo de compostos para os quais o valor da propriedade de interesse foi medido. O conjunto treino é geralmente obtido experimentalmente. A geração de um ótimo

conjunto treino para a aplicação da tecnologia de QSAR requer principalmente que:

- o usuário esteja razoavelmente familiarizado com a tecnologia de QSAR para otimizar a natureza do conjunto treino (tamanho, diversidade estrutural, alcance dos valores da propriedade);
- os cientistas e químicos computacionais trabalhem efetivamente em conjunto, com o objetivo de obterem um entendimento racional e apropriado sobre as questões relativas às áreas específicas de cada um dos envolvidos.

Deve-se notar que, para um bom uso da tecnologia de QSAR, é obrigatório:

- um bom entendimento da incerteza das medidas das propriedades estimadas;
- o desejado valor das propriedades estimadas de interesse.

Ótima utilização da tecnologia de QSAR requer também que esta tecnologia esteja disponível para uma aplicação útil do grupo de cientistas. Esta realização coloca algumas reservas na natureza do hardware e software que suportam a tecnologia de QSAR. Tem sido deliberado para o desenvolvimento desta tecnologia o acesso de rotina restrito somente a computadores pessoais. A Eastman Kodak é a proprietária desta tecnologia, que vem sendo desenvolvida e gerenciada pelo *Scientific Computing Team*. A utilização desta

tecnologia está associada ao compromisso de preservação das características fundamentais deste novo paradigma, que ainda, não foram publicadas.

O SCT tem empreendido um caminho sistemático com o objetivo de encontrar soluções para as atuais limitações da tecnologia de QSAR. Este trabalho vem sendo desenvolvido por diversos anos, nos quais um grande número de progressos tem sido alcançado. O avanço obtido na tecnologia de QSAR é agora útil para o planejamento molecular. Uma série de modelos com alto interesse no processo de descoberta de fármacos vem sendo desenvolvida com sucesso.

### **1.8.9 Antecedentes e procedimento de modelagem**

O trabalho de modelagem é realizado empregando-se softwares aplicativos baseados em um novo paradigma do QSAR. Diversas características essenciais deste paradigma foram publicadas anteriormente.<sup>174</sup>

O objetivo da nova tecnologia de planejamento molecular é criar modelos preditivos para moléculas, reais ou virtuais, de estruturas conhecidas, mas de propriedades desconhecidas. Os modelos de QSAR são desenvolvidos usando um conjunto treino de dados.<sup>171,172</sup>

#### **A. Conjunto treino de dados<sup>171</sup>**

A tecnologia de QSAR baseia-se em estatística, na qual estruturas moleculares são traçadas de acordo com o valor da propriedade para um

conjunto de descritores. Para isto, precisa-se de um conjunto inicial de dados, denominado conjunto treino, o qual é constituído de um conjunto de moléculas de estruturas e valores da propriedade de interesse conhecidos. O conjunto treino apresenta propriedades variadas, como mostradas a seguir:

### **Tamanho**

Típicos conjuntos treino contêm entre 20-100 moléculas e associados valores das propriedades. Contudo, podem ser construídos modelos de QSAR baseados em conjuntos contendo poucos membros, como por exemplo, entre 10 e 15 estruturas.

### **Diversidade estrutural**

Os conjuntos treino variam enormemente quanto à sua diversidade estrutural. Muitos conjuntos de dados disponíveis na literatura consistem de coleções de homólogos estruturais, os quais perdem muito em sua diversidade estrutural. Os modelos de QSAR baseados em tais conjuntos, geralmente, não apresentam alto poder preditivo além do patamar nos quais estes estão estabelecidos. Expandir seu poder preditivo, isto é, aumentar em parte o espaço estrutural, geralmente requer a inclusão de novas moléculas, as quais aumentarão a diversidade estrutural do conjunto de dados.

**Alcance dos valores da propriedade**

A modelagem de QSAR é facilitada por um conjunto treino no qual os valores da propriedade de interesse estendam-se a um extenso alcance de valores. Isto possibilita prever valores da propriedade além daqueles contidos no conjunto treino. Quanto maior e mais abrangente o vetor criado no espaço de modelagem pelos valores da propriedade do conjunto treino, mais precisas, provavelmente, serão as extrapolações.

**Erro experimental**

Existe dois pontos importantes. Primeiro, a modelagem de QSAR requer que o erro (desvio padrão) das propriedades estimadas do conjunto treino seja conhecido ou estimado. Geralmente, o desvio padrão para os valores das propriedades para cada molécula no conjunto treino será diferente e, em casos altamente favoráveis, será conhecido. Com maior frequência, o trabalho experimental tem sido feito em um caminho que não define bem o desvio padrão e acaba por fazer-se estimativas pouco refinadas. Segundo, a modelagem de QSAR é facilitada por conjuntos de dados para os quais o erro experimental é pequeno. Se o erro é grande, pode-se terminar modelando o ruído antes do sinal. Claramente, quanto maior for a magnitude sinal/ruído, provavelmente maior será o poder preditivo do modelo de QSAR.

### **Número de valores da propriedade**

Até o presente momento, esta tecnologia tem focado principalmente o valor preditivo de uma única propriedade baseada no conjunto treino. Contudo, muitos dos valores da modelagem de QSAR eventualmente serão derivados a partir da habilidade em prever, simultaneamente, o valor de várias propriedades para moléculas desconhecidas. Em tais casos, será necessário que o conjunto treino inclua valores para todas as propriedades de interesse. Os modelos de QSAR seriam separadamente derivados para cada propriedade.

### **Composição**<sup>173</sup>

A composição do conjunto treino pode ser alterada (aumentada) como procedimento de modelagem, que deve ser pensado como uma série de esforços repetitivos para um melhor desenvolvimento do modelo de QSAR. Foi encontrado, em mais de um caso, que a inclusão de moléculas no conjunto treino pode melhorar, ao final, o modelo de QSAR.

### **B. Descritores**<sup>172,173</sup>

Os parâmetros derivados das estruturas das moléculas são empregados para mapear estas estruturas de acordo com os valores das propriedades, sendo essencial que estes descritores sejam calculados. As medidas são muito demoradas e tediosas. O ideal seria o uso de um conjunto de descritores que



represente o contorno das interações intermoleculares não-covalentes. Estes descritores estariam fortemente correlacionados com as propriedades de interesse. Entretanto, descritores empregados em modelos clássicos de QSAR geralmente refletem as propriedades das moléculas inteiras, e são, portanto, fracamente relacionados com o valor da propriedade de interesse. O seu uso faz a modelagem de QSAR mais complexa e tem levado a criação de um grande e novo conjunto de descritores regionais baseado em cálculos mecânico-quânticos. O atual conjunto de descritores utilizado inclui mais do que 3000 destes. Este conjunto de descritores é muito grande para ser o ideal, contudo, com o passar do tempo, serão desenvolvidos novos e melhores descritores e, este número será reduzido substancialmente. Enquanto isto, a inclusão de descritores regionais tem melhorado o poder da modelagem de QSAR e apontado o caminho para uma menor e mais poderosa coleção futura de descritores.

### **Descritores 3D**

O banco de trabalho inclui cerca de 30 descritores 3D, que refletem as propriedades da molécula inteira: massa, área de superfície, número de doadores de próton, sítios aceptores, áreas seccionais-cruzadas, entre outros. Estes descritores continuam a ter grande importância em nosso trabalho de modelagem.

### **Descritores 2D**

O banco de trabalho contém cerca de 60 descritores 2D, os quais usualmente refletem alguns aspectos da conectividade das moléculas. Estes descritores são geralmente derivados de gráficos químicos teóricos e apresentam modesta utilidade para o nosso trabalho de modelagem.

### **S-Keys**

Estes descritores definem o número e o tipo de um grande número de átomos ou grupos nas estruturas (por exemplo: metil, etil, carbonil, átomos de enxofre,...) para cada molécula. Existe mais de 200 S-Keys no banco de trabalho de modelagem.

### **Descritores regionais**

Estes descritores são derivados a partir de cálculos *Transferable Atom Equivalent (TAE)*,<sup>174-176</sup> os quais, por sua vez, são baseados na distribuição da densidade eletrônica e enfocam as propriedades locais (confinado a um átomo ou ligação química ou ainda, a uma pequena coleção deles) derivadas a partir da densidade eletrônica. Existe atualmente cerca de 3000 destes no banco de trabalho. O objetivo é gerar descritores locais, firmemente correlacionados com as interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas,...), que determinam os valores da propriedade.

### **C. Softwares**

Para a realização do trabalho de modelagem estatística, o SCT desenvolveu originalmente uma série de softwares aplicativos, entre estes, principalmente, incluem-se: WinSIMS e PERCOLATOR. Estes softwares são de propriedade privada da Eastman Kodak Company, com sede em Rochester, NY, nos Estados Unidos.



## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 2. Materiais e métodos

#### 2.1 Inibidores da purina nucleosídeo fosforilase

Os inibidores da PNP, **BC001-BC034** (Tabela 3), foram sintetizados na BioCryst Pharmaceuticals, Inc.<sup>177</sup> Os inibidores da PNP, **PD035-PD058** (Tabela 6), foram sintetizados na Parke-Davis Pharmaceuticals, Inc.<sup>178</sup> Estas séries de inibidores foram doados por estas companhias farmacêuticas para nossos estudos. A única exceção, inibidor **PD053**, foi adquirido da Sigma Chemical Co.

#### 2.2 Imidas cíclicas

A síntese e a atividade analgésica das imidas utilizadas em nosso estudo (Figura 18 e Tabela 10) foram publicadas recentemente por nosso grupo de pesquisa.<sup>179-186</sup>

#### 2.3 Reagentes

A enzima purina nucleosídeo fosforilase (do baço de bezerro, isenta de fosfato e com pureza maior que 98%) e xantina oxidase foram adquiridas da Sigma Chemical Co. com o maior grau de pureza disponível e foram usadas sem purificação adicional. HEPES (N-(2-hidróxi-etil)piperazina-N'-(ácido-2-

etanosulfônico) e inosina também foram adquiridas da Sigma com o maior grau de pureza disponível. Ácido acético e Tween 80 foram adquiridos da Merck.

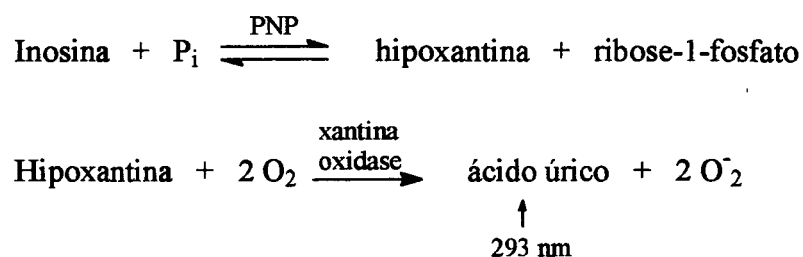
Os demais solventes orgânicos e reagentes foram adquiridos da Aldrich e Sigma.

## **2.4 Medidas cinéticas**

As medidas cinéticas foram realizadas espectrofotometricamente em um espectrofotômetro HP 8453 diode. Os valores de  $K_i$  empregando inosina e fosfato 1 mM como substratos foram determinados manualmente empregando um ensaio "coupled" padrão.<sup>187-189</sup> Todos os valores de  $K_i$  foram determinados para 5 ou 6 concentrações de inibidor para cada uma das 5 diferentes concentrações de inosina. Em todos os casos, os dados cinéticos revelaram, como esperado, uma inibição competitiva.<sup>65, 131-133</sup> Para cada determinação de  $K_i$  foram obtidos 5 valores da  $CI_{50}$ , um para cada concentração de inosina empregada. Como esperado, os valores da  $CI_{50}$  cresceram linearmente com a concentração do substrato e a extrapolação destes valores para a concentração zero do substrato forneceu valores de  $K_i$  consistentes com aqueles baseados na análise estatística de todos os pontos. Os valores da  $CI_{50}$  foram independentemente determinados pela medida das taxas para 5 ou 6 concentrações de inibidor empregando inosina 10  $\mu$ M e fosfato 1 mM como substratos. As medidas foram feitas usualmente a uma concentração 4,2 nM da PNP. Em diversos casos, a concentração da enzima variou entre 2,3 e 4,6 nM. Nesta faixa, os valores de  $K_i$  são independentes da concentração da enzima.

Todas as medidas foram feitas à 25°C e pH 7,4 (mantido com uma solução tampão de HEPES 0,10 M). Valores de pH foram determinados em um pH metro Radiometer PHM240.

As reações empregando inosina como substrato, foram acompanhadas a 293 nm. Este método clássico de ensaio da PNP é baseado no aumento da absorvância até 293 nm, quando a hipoxantina é convertida em ácido úrico, na reação com xantina oxidase:



Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir dos dados coletados utilizando-se o programa estatístico *Leonora*.<sup>190</sup> Os valores obtidos são apresentados nas Tabelas 3 e 6. Os gráficos foram construídos utilizando o programa *KaleidaGraph*.<sup>191</sup>

### 2.5 Análise farmacológica: Atividade analgésica

Os testes farmacológicos foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). O modelo utilizado foi o de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, administrado intraperitonealmente em camundongos.<sup>192</sup>

Camundos "Swiss" fêmeas (25-30 g) foram mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água "ad libitum". A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se o chamado "writhing test", administrando-se ácido acético 0,6% intraperitonealmente (i.p.). Basicamente, as contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores.

Os animais foram pré-tratados, intraperitonealmente, com as imidas (0,1-30 mg/kg; 0,2-97,7  $\mu\text{mol}$ ), 30 minutos antes da administração do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante de uma solução salina (NaCl 0,9%, i.p.). O número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante 20 minutos. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

### **Análise estatística**

Os resultados da  $\text{DI}_{50}$  (dose do composto que reduz a resposta a 50% em relação ao grupo controle) são apresentados como a média geométrica acompanhada de seu respectivo 95% de limite de confiança. A significância estatística foi obtida por análise de variância seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett's, quando apropriado. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. Os valores da  $\text{DI}_{50}$  foram estimados a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica.



## 2.6 Modelagem estatística

Os modelos preditivos de QSAR foram desenvolvidos empregando *softwares* aplicativos baseados em um novo paradigma do QSAR.<sup>170-174,193-195</sup> Diversas características essenciais deste novo paradigma foram publicadas anteriormente.<sup>174</sup> Basicamente, um conjunto de descritores moleculares, incluindo descritores 2D e 3D geralmente empregados em cálculos de QSAR, um conjunto de descritores mecânico quânticos,<sup>176,196,197</sup> e muitos outros descritores baseados na tecnologia *Transferable Atom Equivalent* (TAE),<sup>174,175</sup> foram calculados para uma única conformação otimizada para cada molécula no conjunto treino. A ferramenta computacional empregada na realização deste trabalho é denominada WinSIMS.<sup>198</sup> Um número de *softwares* é disponível em WinSIMS para obter conformações consistentes dentro do conjunto treino.

A nossa rotina de modelagem foi a seguinte: i) derivar preliminarmente conformações empregando CONCORD (através do WINSIMS), ii) refinar as conformações empregando mecânica molecular (SIMS MM) e iii) computar os descritores moleculares empregando SIMS e Mopac. O uso de SIMS/Mopac (mode Batch) dentro de WinSIMS, possibilitou calcular e gravar automaticamente os valores para os descritores 3D, 2D e S-keys. Um conjunto de descritores regionais foi calculado pelo Dr. Curt Breneman (SCT) e incluído neste arquivo. Precisamente, a mesma sequência de operações foi efetuada para cada membro do conjunto de dados. Este trabalho, uma vez completo, forneceu a base para a modelagem estatística.

O primeiro passo da modelagem estatística foi a classificação do conjunto treino em sub-conjuntos de compostos apresentando formas de interação não-covalentes comuns (os quais determinam os valores da propriedade de interesse) empregando uma mistura de modelos de regressão algorítmica. Os modelos de QSAR para cada sub-conjunto foram então qualificados a cerca de sua habilidade em prever os valores da propriedade (conforme o caso,  $K_i$ ,  $Cl_{50}$  ou  $Dl_{50}$ ) para cada molécula no conjunto treino mas fora do sub-conjunto, empregando um dos diversos conjuntos de descritores moleculares. Somente aqueles sub-conjuntos passando por este critério foram conservados. Modelos estatísticos *Partial Least Squares* (PLS) foram desenvolvidos e otimizados para cada sub-conjunto qualificado. Os modelos PLS passando por estas barreiras de qualificação foram então incorporados em um modelo-de-matriz (MOM). O MOM foi então empregado para prever os valores da propriedade para aquelas moléculas fora do conjunto treino, ou seja, aquelas pertencentes ao conjunto teste. As ferramentas computacionais utilizadas na modelagem estatística são disponíveis em um único banco de dados de fácil comunicação. O pacote de *softwares* aplicativos, completamente integrado e funcional, é denominado PERCOLATOR.<sup>199</sup>



### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### **3. Construção dos conjuntos de dados e desenvolvimento dos modelos preditivos de QSAR**

Este capítulo, para uma melhor compreensão, foi dividido em duas partes:

##### **3.1 Inibidores da purina nucleosídeo fosforilase**

3.1.1 Relações estrutura-atividade de uma classe limitada de Inibidores da PNP. Desenvolvimento inicial de modelos preditivos de QSAR para inibidores da PNP.

3.1.2 Relações estrutura-atividade de uma classe ampla de inibidores da PNP. Desenvolvimento de modelos preditivos de QSAR para inibidores da PNP em geral.

##### **3.2 Imidas cíclicas**

3.2.1 Atividade analgésica de uma série de 1,8-naftalimidias e 1,4,5,8-naftalenodiimidias.

3.2.2 Desenvolvimento de um modelo preditivo de QSAR para a atividade analgésica de uma família de imidas cíclicas.

### **3. Construção dos conjuntos de dados e desenvolvimento dos modelos preditivos de QSAR**

#### **3.1 Inibidores da purina nucleosídeo fosforilase**

##### **3.1.1 Relações estrutura-atividade de uma classe limitada de Inibidores da PNP. Desenvolvimento inicial de modelos preditivos de QSAR para inibidores da PNP**

O nosso objetivo imediato é o desenvolvimento inicial de modelos preditivos de QSAR para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase, empregando um novo paradigma do QSAR.

Ao longo das últimas 2 décadas, vários trabalhos foram desenvolvidos na descoberta de novos potentes inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>65-67,69,114,118,122,124,131-133,136,201</sup> Tais inibidores apresentam múltiplas e plausíveis utilidades na terapêutica. Cientistas da *BioCryst Pharmaceuticals* têm empregado o planejamento racional para criar uma base científica forte para a descoberta de diversas classes de inibidores promissores da PNP. Mesmo com o grande número de inibidores da PNP demonstrado na literatura e aqueles de propriedade privada das indústrias farmacêuticas, somente um destes, o *BCX-34 (16)*,<sup>67,122</sup> é atualmente empregado em triagens clínicas avançadas.

No presente trabalho, determinamos valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  para uma classe destes inibidores, empregando PNP do baço de bezerro. Os valores obtidos foram utilizados para a criação de modelos estatísticos de QSAR.

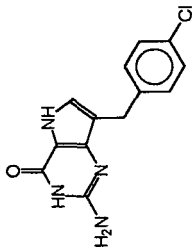
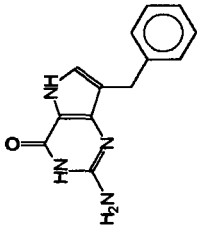
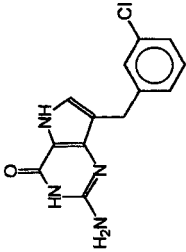
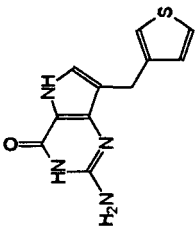
### Determinação das constantes de inibição

As estruturas dos inibidores (**BC001-BC034**) associadas aos correspondentes valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$ , empregando inosina como substrato, são mostradas na Tabela 3. Valores de  $CI_{50}$  para um número destes inibidores, empregando inosina como substrato, foram demonstrados anteriormente.<sup>65,132,133</sup> Nos casos passíveis de comparação, os nossos resultados e aqueles da literatura são bastante concordantes. A razão entre os valores de  $CI_{50}$  e  $K_i$  é mostrada também na Tabela 3.

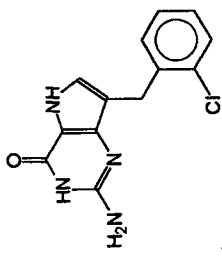
Para 29 dos 34 inibidores da enzima PNP do baço de bezerro, foram determinados valores de  $K_i$  que variam de 4,0 nM a aproximadamente 24.000 nM, um fator de 6.000 vezes. Os valores de  $CI_{50}$  para o completo conjunto de inibidores variam de 14,8 nM a aproximadamente 50.000 nM, um fator de 3.400 vezes.

Esta série de inibidores apresenta diversidade estrutural modesta. Dos 34 inibidores, 27 são 9-substituídos-9-deazaguaninas, um é 9-substituído-8-aminoguanina (**BC018**), um é 8-aminoguanina (**BC029**), um é 9-substituído-8-metil-9-deazaguanina (**BC028**), um é 9-substituído-8-amino-9-deazaguanina (**BC023**), dois são 9-substituídos-9-deazahipoxantinas (**BC024** e **BC031**), e um é N-3-substituído-hipoxatina (**BC027**). Deste modo, a diversidade estrutural deste conjunto de dados é fortemente representada pelos diferentes grupamentos na posição 9 do anel purínico.

Tabela 3. Valores das constantes de inibição para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>a</sup>

Inibidor	Estrutura	$K_i$ (nM)	$CI_{50}^b$ (nM)	$CI_{50}/K_i$
BC001		10,6 ± 0,40 n=2	17,4 ± 0,80 n=2	1,64
BC002		11 ± 1,5 n=2	16,5 ± 1,95 n=2	1,50
BC003		18,9 ± 7,1 n=4	25,8 ± 3,8 n=4	1,36
BC004		15,6 ± 3,4 n=2	22,6 ± 1,30 n=3	1,45

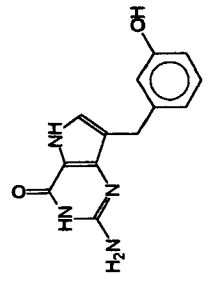
**BC005** 65 ± 11,9 102,6 ± 7,0 1,58



n=3

n=3

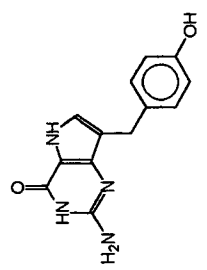
**BC006** 16,5 ± 1,7 36,1 ± 2,9 2,18



n=3

n=4

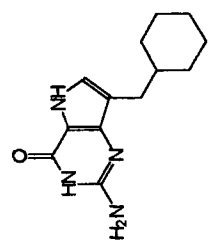
**BC007** 109,1 ± 10,1 238,9 ± 23,6 2,19



n=2

n=3

**BC008** 13,2 ± 4,8 21 ± 0,12 1,60

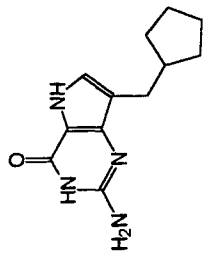


n=3

n=2



**BC009**



9,1 ± 2,1

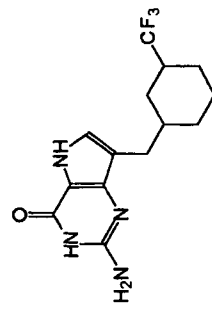
n=3

20,2 ± 1,9

n=3

2,20

**BC010**



9,4 ± 4,1

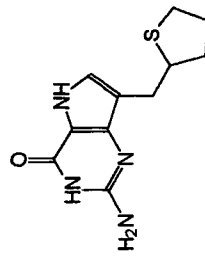
n=3

14,8 ± 3,0

n=4

1,38

**BC011**



8,5 ± 1,6

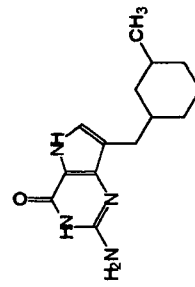
n=3

17,4 ± 0,10

n=2

2,05

**BC012**



11,4 ± 2,4

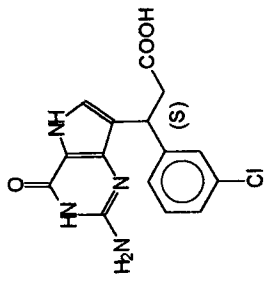
n=3

19,2 ± 3,5

n=3

1,69

**BC013**



4,0

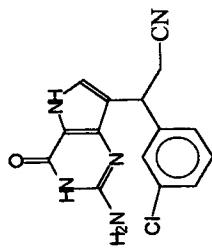
n=1

35,6

n=1

8,92

**BC014**



10,9 ± 2,2

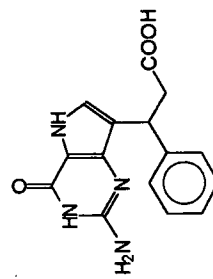
n=3

16,3 ± 0,8

n=2

1,50

**BC015**



9,0

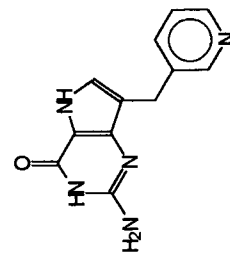
n=1

46,8 ± 4,7

n=2

5,18

**BC016**



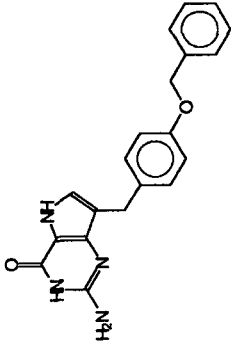
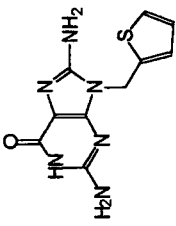
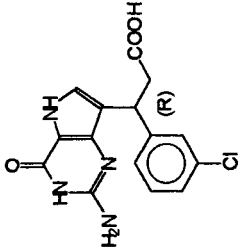
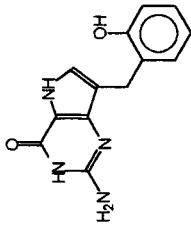
13,5 ± 0,1

n=2

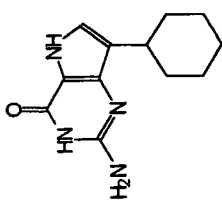
27,0 ± 6,0

n=5

1,63

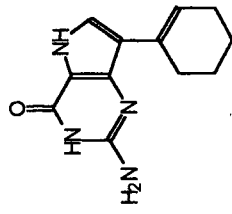
<b>BC017</b>		37,8 ± 6,6 n=3	123,7 ± 4,5 n=4	2,14
<b>BC018</b>		35,7 ± 1,4 n=2	69,4 ± 5,7 n=3	1,95
<b>BC019</b>		148,8 ± 2,3 n=3	245,1 ± 11,9 n=6	1,65
<b>BC020</b>		84 ± 19,3 n=4	182,5 ± 15,9 n=5	2,17

**BC021** 335,3 ± 80,1 640 ± 26 1,91



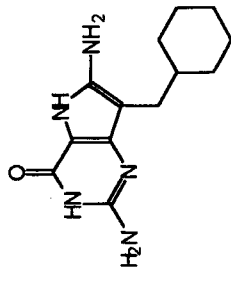
n=3  
n=6

**BC022** 862 ± 151,0 1969 ± 83 2,28



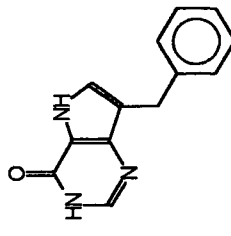
n=4  
n=3

**BC023** 885 ± 110 1471 ± 68 1,66

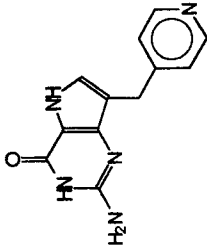
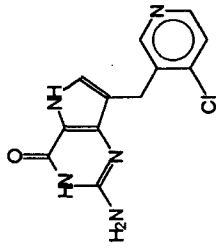
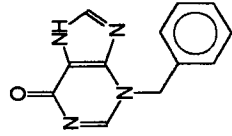
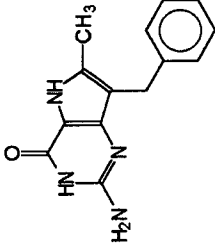


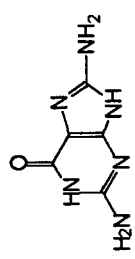
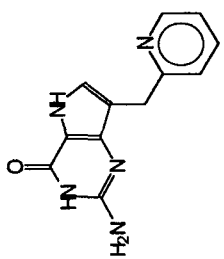
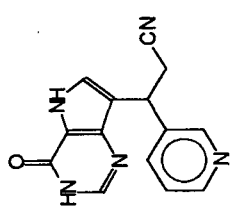
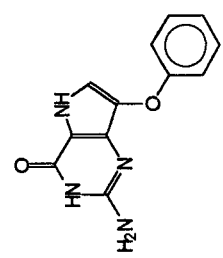
n=3  
n=3

**BC024** 18,7 ± 3,5 24,5 ± 1,6 1,31

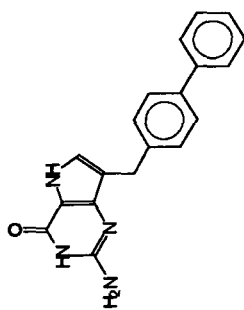


n=2  
n=3

<b>BC025</b>		25,4 ± 1,2 n=3	63,5 ± 4,2 n=4	2,50
<b>BC026</b>		66,7 ± 30,2 n=5	134,9 ± 51 n=10	2,02
<b>BC027</b>		24645 ± 1365 n=2	49646 ± 9962 n=5	2,01
<b>BC028</b>		10321 ± 2249 n=3	20201 ± 2584 n=5	1,96

<b>BC029</b>		982 ± 32 n=2	2299 ± 221 n=2	2,34
<b>BC030</b>		—	15,3 ± 0,2 n=2	—
<b>BC031</b>		—	38,9 ± 3,2 n=2	—
<b>BC032</b>		—	41,5 ± 2,3 n=2	—

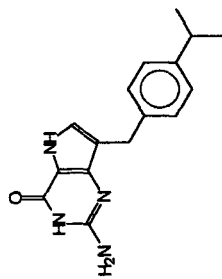
**BC033**



546,4 ± 320

n=2

**BC034**



96,6 ± 39,9

n=2

<sup>a</sup>Enzima do baço do bezerro. Todos os valores de  $K_i$  e  $Cl_{50}$  foram determinados à 25°C, pH 7,4 e fosfato 1 mM. Valores da  $Cl_{50}$  foram determinados com inosina 10 µM. <sup>b</sup>Os valores da  $Cl_{50}$  para os inibidores BC001-024, medidos com 10 µM inosina e fosfato 1 mM, encontram-se geralmente em boa concordância com aqueles publicados pelo grupo da BioCryst,<sup>65, 132, 133</sup> medidos sob condições comparáveis, com a exceção do inibidor BC021, para o qual um valor de 1300 nM foi demonstrado.<sup>132</sup> Ver o texto da discussão para os valores de BC013 e BC015. Valores comparativos não são disponíveis na literatura para os inibidores BC025-034.

Dos 34 inibidores estudados, três (**BC013**, **BC015** e **BC019**) possuem grupamentos que são predominantemente aniônicos em pH 7,4, no qual foram determinadas as constantes de inibição. Dois destes (**BC013** e **BC019**) são enantiômeros. O enantiômero (S) é o mais potente, embora a diferença não seja profunda.

Os inibidores 9-substituídos que apresentam potencial para ligar-se a PNP em uma forma iônica, apresentam substituintes fenólicos e piridínicos. Contudo, estes inibidores existem predominantemente na forma neutra em pH 7,4 e ligam-se à PNP provavelmente nesta forma.

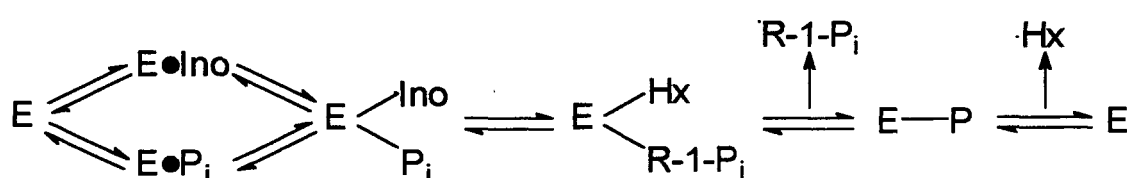
Para 27 dos 29 inibidores, onde são possíveis comparações, a razão  $CI_{50}/K_i$  varia sobre um limite estreito: 1,31 a 2,5, assegurando a consistência dos resultados. As únicas excessões são dois dos três compostos aniônicos, **BC013** e **BC015**, para os quais a razão é 8,92 e 5,19, respectivamente. Foi demonstrado anteriormente que estes dois compostos também são excessões, quando diferentes substratos da PNP foram utilizados para determinar a potência do mesmo conjunto de inibidores.<sup>195</sup>

Tem sido estabelecido através de estudos estruturais, como também através de estudos cinéticos, que estes inibidores são competitivos,<sup>65,104,131-133</sup> como confirmado em nossos experimentos.

Embora a natureza do mecanismo da reação de troca-simples da PNP não tenha alcançado uma clareza total quanto à sequência em que os substratos combinam-se com a enzima, seja ao acaso ou ordenada, o mecanismo mostrado na Figura 8 é o mais vezes proposto e sustentado, para ambas direções, síntese e cisão fosforolítica.<sup>104</sup> Na direção fosforolítica, o



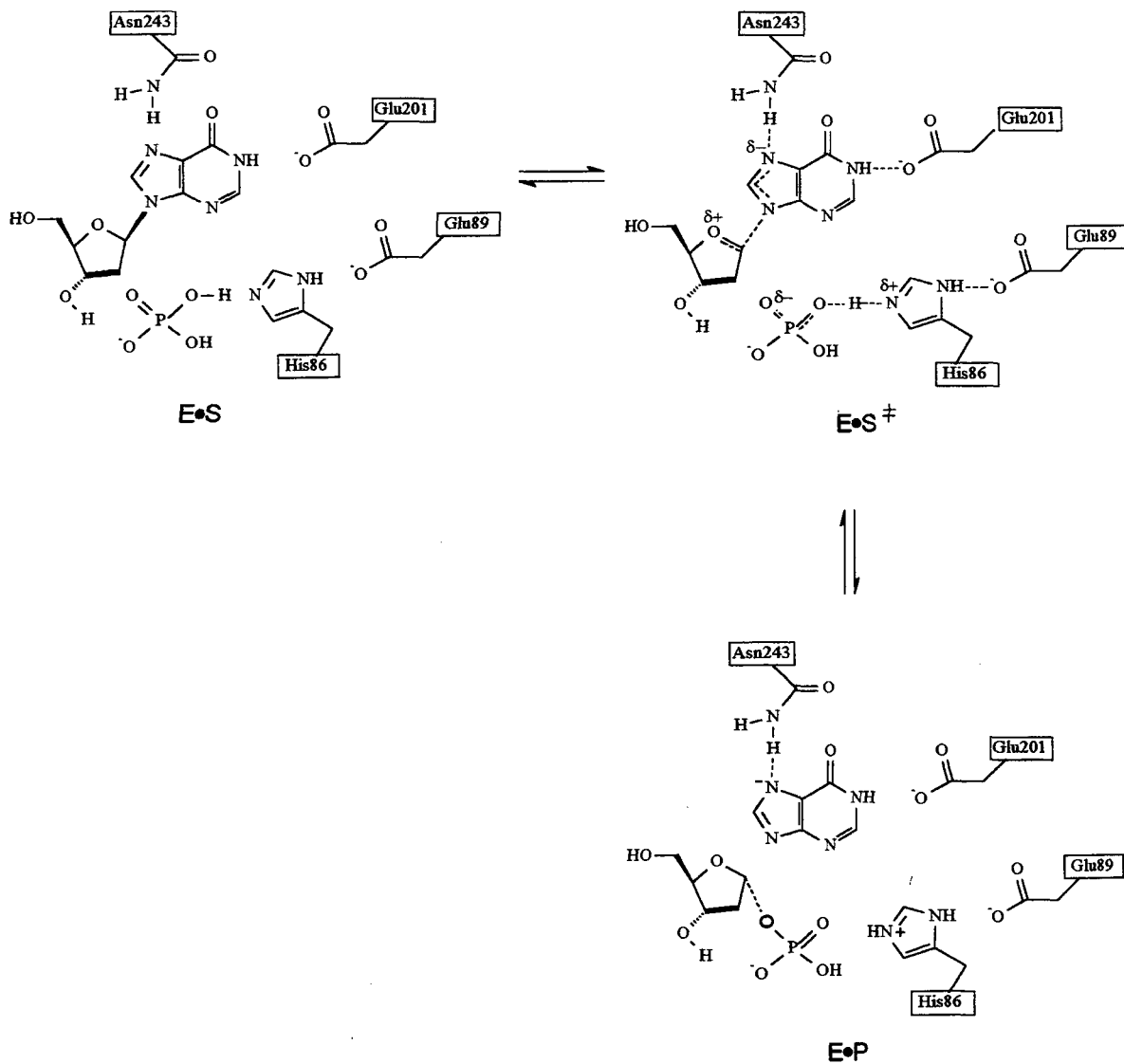
mecanismo é o bimolecular ao acaso para a formação do complexo ternário. Após a clivagem da ligação fosforolítica, a ribose-1-fosfato é liberada do sítio ativo da enzima, seguida da liberação da base purínica hipoxantina. Na direção da síntese do ribonucleosídeo purínico, o mecanismo da reação é o bimolecular ordenado, com inosina ligando-se preferencialmente a enzima, seguida de fosfato.



**Figura 8.** Mecanismo cinético proposto para a reação da PNP, inosina e fosfato, através da formação de um complexo ternário. Na direção fosforolítica, o mecanismo de reação é o bimolecular ao acaso. Na direção da síntese, é o bimolecular ordenado. Onde: E=enzima PNP; Ino=inosina;  $P_i$ =fosfato; Hx=hipoxantina; R-1- $P_i$ =ribose-1-fosfato.

O mecanismo catalítico proposto para a PNP é ilustrado na Figura 9. A PNP, específica para nucleosídeos purínicos em configuração  $\beta$ , cliva a ligação glicosídica com a inversão da configuração, produzindo  $\alpha$ -ribose-1-fosfato.

A reação ocorre via um estado de transição com característica substancial  $S_N1$ . Neste caso, a quebra da ligação glicosídica ocorre suficientemente afastada da ligação que será formada com o diânion fosfato, onde o estado de transição tem considerável característica de íon oxocarbênio.



**Figura 9.** Mecanismo proposto para a reação de inosina com fosfato na presença da PNP.

A PNP catalisa a cisão fosforolítica reversível do nucleosídeo purínico inosina através de um mecanismo catalítico substrato-assistido, deduzido de amplos dados estruturais de raios-X e de modelagem molecular existentes na

literatura.<sup>104,116</sup> Neste mecanismo, uma catálise eficiente é alcançada com a participação das cadeias laterais do sítio ativo da enzima e do co-substrato fosfato na estabilização do estado de transição.

A clivagem da ligação glicosídica é facilitada pela ligação de uma conformação do nucleosídeo de alta energia e pela indução de tensão eletrostática no estado de transição. A tensão eletrostática é desenvolvida durante a dissociação do mono-ânion fosfato à diânion fosfato pela histidina 86. A histidina resultante, carregada positivamente, é estabilizada pelo carboxilato da cadeia lateral do glutamato 89 através de um sistema de transferência de cargas que se assemelha a conformação de uma tríade catalítica. A dissociação do fosfato no complexo ternário gera um ganho em seu poder nucleofílico, o que leva a uma estabilização do estado de transição.

Com a quebra da ligação glicosídica, um intermediário tipo íon oxocarbênio é formado e simultaneamente estabilizado pelo diânion fosfato. Desta maneira, o mecanismo proposto substrato-assistido utiliza o fosfato para iniciar a clivagem da ligação e para estabilizar o intermediário íon oxocarbênio através da formação de um par iônico íntimo. A base purínica hipoxantina liberada, negativamente carregada, é estabilizada pela ponte de hidrogênio formada entre a cadeia lateral da asparagina 243 e o N7. Após a clivagem da ligação glicosídica, ribose-1-fosfato dissocia-se do sítio ativo e a hipoxantina carregada negativamente é reprotonada pela água. A etapa final é a liberação da base purínica neutra.

### **Modelos de QSAR**

Por duas razões, este conjunto de inibidores da PNP não é, particularmente, bem apropriado para a modelagem de QSAR. Primeiro, como exposto anteriormente, a diversidade estrutural é modesta, a maior parte dos compostos é 9-substituído-9-deazaguanina. Deste modo, um pequeno espaço estrutural é coberto por 26 dos 34 compostos do conjunto de dados. Contudo, existem alguns compostos, particularmente **BC024**, **BC027**, **BC028**, **BC029**, **BC031** e os três compostos aniônicos, **BC013**, **BC015** e **BC019**, que são estruturalmente distintos. Segundo, os valores do  $\log K_i$  para 23 dos 29 compostos estão distribuídos no limite:  $-2,40 \leq \log K_i (\mu\text{M}) \leq -0,8$ , um possui valor do  $\log K_i$  de  $-0,475$ , três encontram-se na faixa entre  $-0,2$  e  $0,0$ , enquanto que os dois últimos encontram-se afastados da distribuição dos demais, com valores do  $\log K_i$  de  $1,01$  e  $1,39$ . A distribuição dos valores do  $\log K_i$  é apresentada graficamente na Figura 10. Um conjunto de dados mais apropriado deveria incluir uma maior diversidade estrutural e uma distribuição mais uniforme dos valores do  $\log K_i$ , notadamente, na faixa entre  $0,0$  e  $2,0$ . A distribuição dos valores do  $\log \text{Cl}_{50}$  é apresentada graficamente na Figura 11. Para 28 dos 34 compostos, os valores do  $\log \text{Cl}_{50}$  estão dentro de um pequeno limite:  $-1,83 \leq \log \text{Cl}_{50} (\mu\text{M}) \leq -0,61$ , quatro compostos possuem valores entre  $-0,2$  e  $0,4$ , e os dois últimos, valores de  $1,30$  e  $1,75$ . Neste caso, um conjunto de dados mais apropriado deveria incluir um novo conjunto de inibidores, com valores do  $\log \text{Cl}_{50}$  na faixa entre  $0,0$  e  $2,00$ .

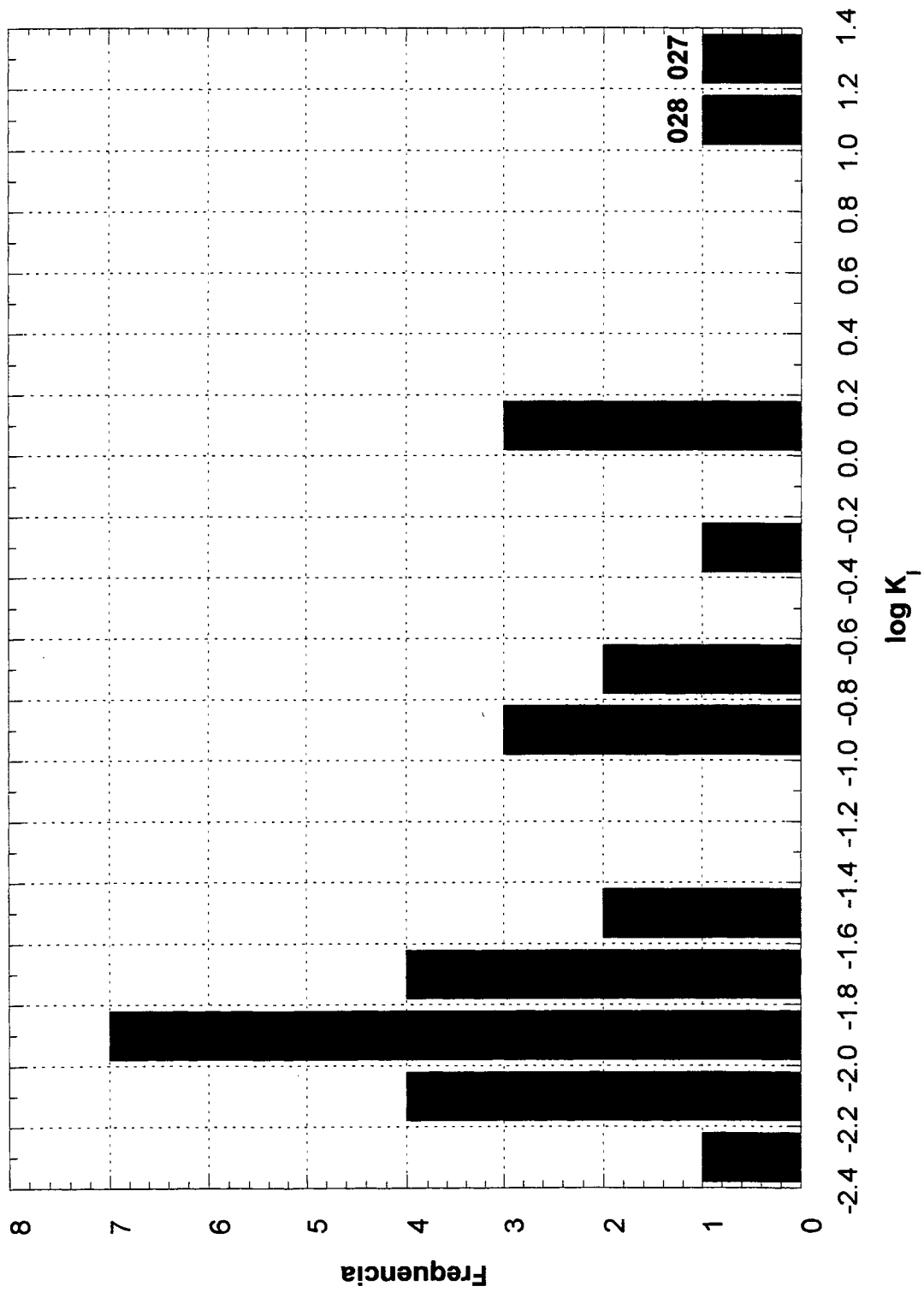


Figura 10. Distribuição dos valores do  $\log K_i$  para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

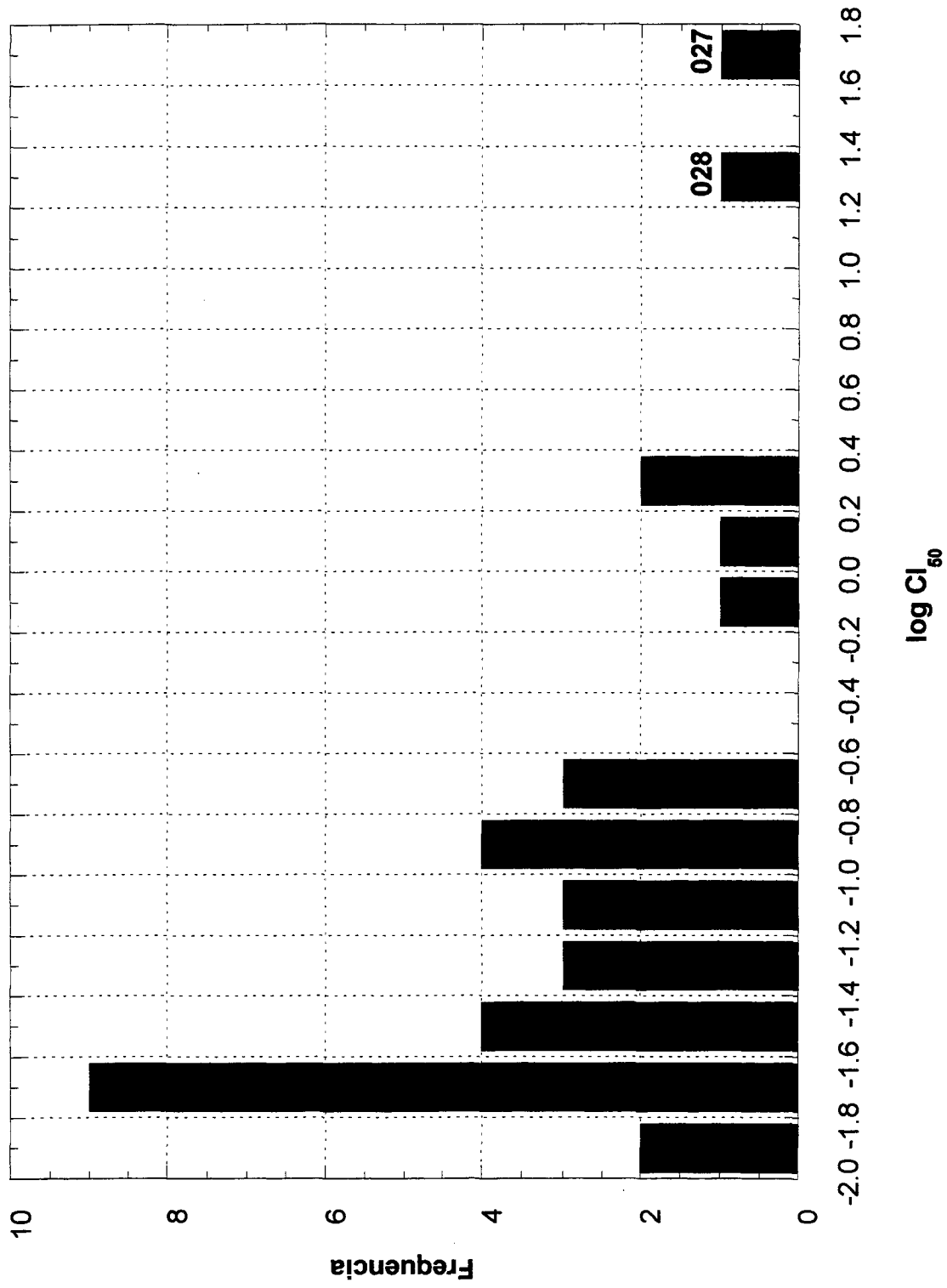
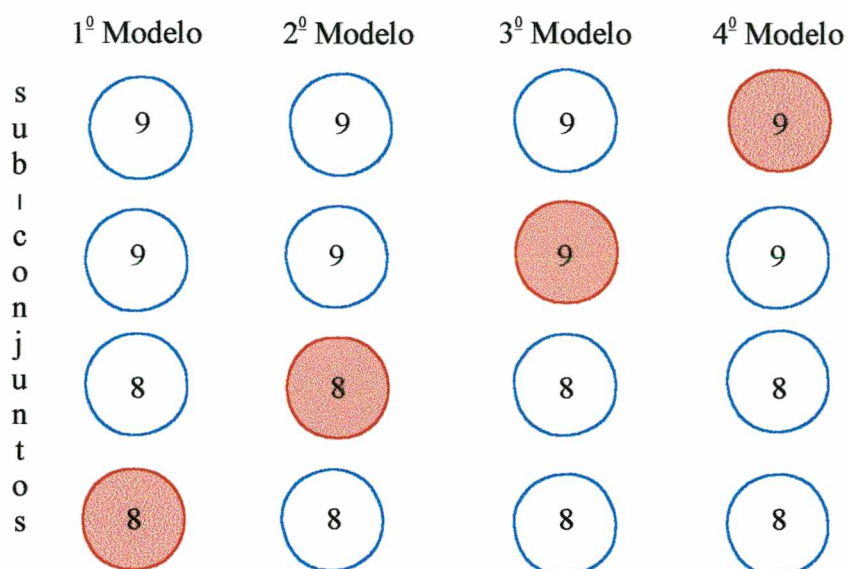


Figura 11. Distribuição dos valores do  $\log CI_{50}$  para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Para a modelagem estatística dos valores do  $\log CI_{50}$ , o conjunto de dados foi dividido em 4 sub-conjuntos arbitrários, dois contendo 8 e dois contendo 9 inibidores. O primeiro sub-conjunto contém aqueles inibidores **BC001, 005 e 009**,... da Tabela 3; o segundo contém aqueles inibidores **BC002, 006 e 010**,... da Tabela 3, o terceiro contém aqueles inibidores **BC003, 007 e 011**,... da Tabela 3, enquanto que, o quarto sub-conjunto contém aqueles inibidores **BC004, 008 e 012**,... da Tabela 3, e assim por diante. Conjuntos de descritores moleculares selecionados pelo *STC* foram usados no trabalho de modelagem. Estes incluem uma série de descritores tradicionais 2D e 3D, e também um grande número de descritores regionais derivados a partir de cálculos *TAE*. Quatro modelos foram executados, usando cada dos sub-conjuntos uma vez como conjunto teste e os outros 3 sub-conjuntos como conjunto treino. A Figura 12 ilustra uma representação das 3 combinações de sub-conjuntos empregadas como conjunto treino (representados pelos círculos azuis) e o sub-conjunto empregado como conjunto teste (círculos vermelhos) para cada um dos quatro modelos de QSAR desenvolvidos.

Portanto, 25 ou 26 compostos foram empregados como conjunto treino para prever valores do  $\log CI_{50}$  para 9 ou 8 compostos, respectivamente. Cada composto apareceu uma única vez no conjunto teste (com um valor predito) e três vezes no conjunto treino (com um valor estimado). Similarmente, conjuntos treino contendo 21 ou 22 compostos foram empregados para prever valores do  $\log K_i$  para 8 ou 7 compostos.

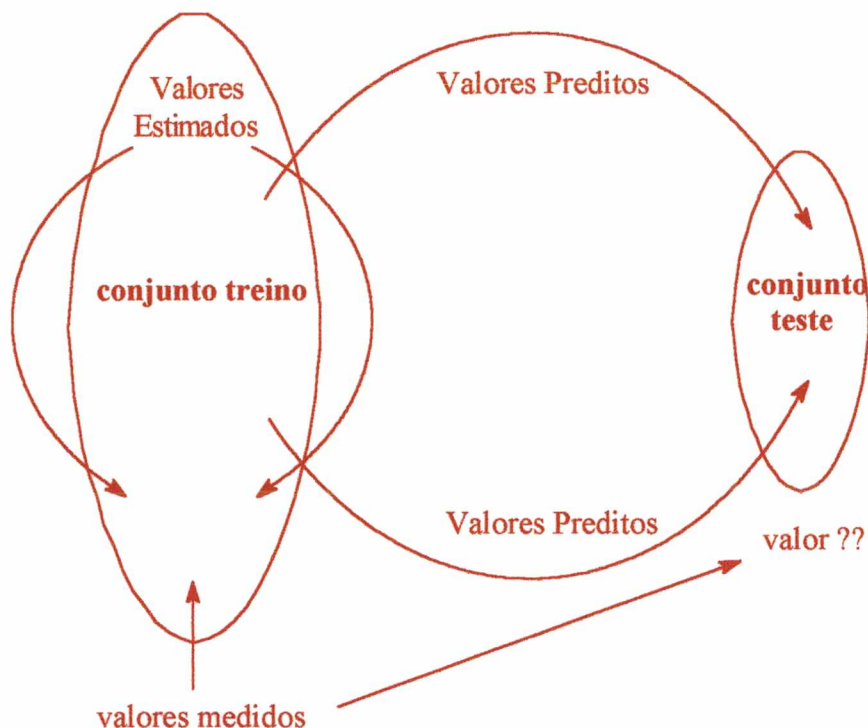


**Figura 12.** Diferentes combinações dos sub-conjuntos empregadas em cada um dos quatro modelos de QSAR desenvolvidos. Cada modelo emprega 3 sub-conjuntos como conjunto treino (círculos azuis) e 1 sub-conjunto como conjunto teste (círculos vermelhos).

Basicamente, os valores estimados são obtidos a partir das correlações realizadas para aqueles compostos pertencentes aos conjuntos treino, nos quais são conhecidos os descritores moleculares, as estruturas químicas e os valores medidos correspondentes da propriedade. Os valores preditos (onde os valores medidos da propriedade não são conhecidos durante o processo de modelagem de QSAR) são obtidos empregando estatística baseando-se em dados dos conjuntos treino, das estruturas químicas e dos descritores moleculares calculados para aqueles compostos pertencentes aos conjuntos teste. A Figura



13 apresenta as relações envolvidas entre os conjuntos treino e teste, no processo de modelagem.



**Figura 13.** Relações básicas envolvidas no processo de modelagem de QSAR.

Os conjuntos treino, dos quais são obtidos os valores estimados, são empregados para prever os valores da propriedade para os compostos pertencentes aos conjuntos teste.

**Caracterização do conjunto treino:** Todos os 8 modelos construídos, 4 para os valores do  $\log K_i$  e 4 para os valores do  $\log Cl_{50}$ , foram capazes de caracterizar adequadamente o conjunto de dados. Os resultados são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4.** Valores dos logaritmos de  $K_i$  medido, estimado e predito para uma série de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>a</sup>

Inibidor	log $K_i$ Estimado e Predito <sup>b</sup>					$\Delta$	$\Delta$
	Medido	1	2	3	4		
<b>BC001</b>	-1,98	-1,82	-1,79	-1,82	-1,70*	-0,16	-0,28
<b>BC002</b>	-1,96	-1,79	-1,82	-1,85*	-1,95	-0,10	-0,11
<b>BC003</b>	-1,72	-1,62	-1,69*	-1,70	-1,64	-0,07	-0,03
<b>BC004</b>	-1,81	-1,84*	-1,79	-1,85	-1,73	-0,02	0,03
<b>BC005</b>	-1,19	-1,20	-1,11	-1,24	-1,28*	0	0,09
<b>BC006</b>	-1,78	-1,73	-1,70	-1,80*	-1,74	-0,06	0,02
<b>BC007</b>	-0,962	-0,999	-0,990*	-1,03	-1,12	0,09	0,03
<b>BC008</b>	-1,88	-1,87*	-1,86	-1,85	-1,85	-0,03	-0,01
<b>BC009</b>	-2,04	-2,03	-1,99	-1,97	-1,90*	-0,04	-0,14
<b>BC010</b>	-2,03	-2,01	-1,96	-1,93*	-1,94	-0,06	-0,10
<b>BC011</b>	-2,07	-2,02	-1,92*	-2,02	-1,99	-0,06	-0,15
<b>BC012</b>	-1,94	-1,95*	-1,85	-1,91	-2,02	-0,02	0,01
<b>BC013</b>	-2,40	-2,32	-2,41	-2,35	-2,24*	-0,04	-0,16
<b>BC014</b>	-1,96	-1,96	-1,94	-1,99*	-1,81	-0,06	0,03
<b>BC015</b>	-2,05	-2,03	-2,03*	-2,07	-2,12	0,03	-0,02
<b>BC016</b>	-1,87	-1,80*	-1,76	-1,71	-1,77	-0,12	-0,07

<b>BC017</b>	-1,42	-1,49	-1,45	-1,41	-1,44*	0,03	0,02
<b>BC018</b>	-1,45	-1,45	-1,52	-1,49*	-1,42	0,02	0,04
<b>BC019</b>	-0,827	-1,44	-1,21*	-1,59	-0,844	0,46	0,38
<b>BC020</b>	-1,08	-1,05*	-1,07	-1,15	-1,08	0,02	-0,03
<b>BC021</b>	-0,475	-0,457	-0,451	-0,457	-0,403*	-0,02	-0,07
<b>BC022</b>	-0,065	-0,251	-0,062	-0,424*	-0,055	0,06	0,36
<b>BC023</b>	-0,053	-0,041	-0,098*	-0,061	-0,052	0	0,04
<b>BC024</b>	-1,73	-1,67*	-1,83	-1,67	-1,82	0,04	-0,06
<b>BC025</b>	-1,60	-1,64	-1,62	-1,62	-1,51*	0,03	-0,09
<b>BC026</b>	-1,18	-1,31	-1,32	-1,29*	-1,32	0,14	0,11
<b>BC027</b>	1,39	1,33	0,720*	1,38	1,28	0,06	0,67
<b>BC028</b>	1,01	0,108*	1,02	0,792	0,914	0,10	0,90
<b>BC029</b>	-0,008	0,017	-0,133	0,031	-0,023*	0,02	0,02

<sup>a</sup>Enzima do baço de bezerro. Todos os valores de  $K_i$  foram determinados à 25°C, pH 7,4 e fosfato 1 mM. <sup>b</sup>Valores preditos são apresentados como único valor obtido para cada inibidor como membro do conjunto teste e são designados por asterisco; valores estimados foram obtidos para cada inibidor como membro do conjunto treino. <sup>c</sup>A diferença entre o logaritmo do valor medido e estimado (média). <sup>d</sup>A diferença entre o logaritmo do valor medido e previsto.

**Tabela 5.** Valores dos logaritmos da  $Cl_{50}$  medido, estimado e predito para uma série de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>a</sup>

Inibidor	log $Cl_{50}$ Medido	log $Cl_{50}$ Estimado ou Predito <sup>b</sup>				$\Delta$	
		1	2	3	4	Estimado <sup>c</sup>	Predito <sup>d</sup>
BC001	-1,76	-1,77	-1,64	-1,63	-1,81*	-0,08	0,05
BC002	-1,78	-1,60	-1,74	-1,72*	-1,76	-0,08	-0,06
BC003	-1,59	-1,54	-1,56*	-1,55	-1,42	-0,09	-0,03
BC004	-1,65	-1,49*	-1,58	-1,60	-1,57	-0,07	-0,16
BC005	-0,99	-0,997	-0,949	-0,970	-0,937*	-0,02	-0,05
BC006	-1,44	-1,46	-1,39	-1,44*	-1,40	-0,02	0
BC007	-0,62	-0,73	-0,695*	-0,797	-0,639	0,10	0,08
BC008	-1,68	-1,54*	-1,62	-1,62	-1,66	-0,05	-0,01
BC009	-1,69	-1,66	-1,66	-1,62	-1,72*	-0,04	0,03
BC010	-1,83	-1,60	-1,62	-1,71*	-1,72	-0,18	-0,12
BC011	-1,76	-1,64	-1,59*	-1,70	-1,67	-0,09	-0,17
BC012	-1,72	-1,58*	-1,75	-1,62	-1,74	-0,02	-0,14
BC013	-1,45	-1,41	-1,44	-1,45	-1,31*	-0,02	-0,14
BC014	-1,79	-1,81	-1,79	-1,78*	-1,70	-0,02	-0,01
BC015	-1,33	-1,26	-1,23*	-1,32	-1,21	-0,07	-0,10
BC016	-1,57	-1,56*	-1,57	-1,43	-1,57	-0,05	-0,01
BC017	-0,91	-0,931	-0,974	-0,989	-0,888*	0,05	-0,02

<b>BC018</b>	-1,16	-1,21	-1,13	-1,23*	-1,11	-0,01	0,07
<b>BC019</b>	-0,61	-0,705	-1,00*	-1,01	-0,564	0,15	0,39
<b>BC020</b>	-0,74	-0,716*	-0,756	-0,808	-0,706	0,02	-0,02
<b>BC021</b>	-0,19	-0,132	-0,138	-0,305	-0,343*	0	0,15
<b>BC022</b>	0,294	0,180	0,319	-0,0483*	0,153	0,08	0,25
<b>BC023</b>	0,168	0,179	0,348*	0,175	0,224	-0,02	-0,18
<b>BC024</b>	-1,61	-1,43*	-1,67	-1,47	-1,72	0,01	-0,18
<b>BC025</b>	-1,20	-1,22	-1,25	-1,21	-1,19*	0,03	-0,01
<b>BC026</b>	-0,87	-0,967	-1,04	-0,882*	-0,957	0,12	0,01
<b>BC027</b>	1,75	1,70	0,814*	1,72	1,73	0,03	0,94
<b>BC028</b>	1,30	0,505*	1,32	1,40	1,30	-0,04	0,80
<b>BC029</b>	0,36	0,326	0,321	0,362	0,59*	0,02	-0,23
<b>BC030</b>	-1,82	-1,77	-1,62	-1,56*	-1,74	-0,11	-0,26
<b>BC031</b>	-1,40	-1,39	-1,45*	-1,32	-1,39	-0,03	0,05
<b>BC032</b>	-1,38	-1,36*	-1,31	-1,40	-1,32	-0,04	-0,02
<b>BC033</b>	-0,82	-0,844	-0,879	-0,751	-0,893*	0,01	0,07
<b>BC034</b>	-1,10	-1,13	-1,38	-1,19*	-1,05	0,09	0,09

<sup>a</sup>Enzima do baço de bezerro. Todos os valores da Cl<sub>50</sub> foram determinados à 25°C, pH 7,4 e fosfato 1 mM.

<sup>b</sup>Valores preditos são apresentados como único valor obtido para cada inibidor como membro do conjunto teste e são designados por asterisco; valores estimados foram obtidos para cada inibidor como membro do conjunto treino. °A diferença entre o logaritmo do valor medido e estimado (média). °A diferença entre o logaritmo do valor medido e predito.

Os valores estimados são apresentados como os 3 valores obtidos para cada molécula como membro do conjunto treino. Para 28 dos 29 inibidores para os quais valores do  $\log K_i$  foram estimados, os três valores são altamente consistentes, com desvio padrão geralmente menor que 0,10 unidades logarítmicas. A única exceção é o composto **BC019**, para o qual o valor estimado do  $\log K_i$  é  $1,29 \pm 0,39$  (Tabela 4). O gráfico dos valores medidos do  $\log K_i$  contra os correspondentes valores estimados e preditos é mostrado na Figura 14. Resultados de comparável qualidade foram obtidos para os valores do  $\log CI_{50}$  (Tabela 5). Novamente, a única exceção para os consistentes valores foi o composto **BC019**, para o qual um valor de  $0,76 \pm 0,23$  foi obtido. O gráfico dos valores medidos do  $\log CI_{50}$  contra os correspondentes valores estimados e preditos é mostrado na Figura 15.

**Conjunto teste (valores preditos):** Comparações dos valores medidos e preditos do  $\log K_i$  e  $CI_{50}$  são mostradas nas Tabelas 4 e 5. Para 24 dos 29 inibidores, os valores preditos do  $\log K_i$  estão dentro do erro experimental da medida ( $\pm 0,20$  unidades logarítmicas). Para outros 3 inibidores, os valores estão dentro de 2 vezes do erro padrão experimental da medida. Os valores preditos para os 2 inibidores mais fracos do conjunto de dados, **BC027** e **BC028**, apresentam um erro substancial. Os valores do  $\log K_i$  para estes inibidores são substancialmente maiores do que aqueles para qualquer outro composto empregado no conjunto treino, requerendo assim, uma extrapolação de mais de uma ordem de grandeza. Os resultados são apresentados graficamente na Figura 14. Similarmente, 28 dos 34 valores preditos do  $\log CI_{50}$  encontram-se

---

dentro do erro experimental da medida, outros 4 compostos estão dentro de 2 vezes o limite padrão do erro experimental da medida (Tabela 5). Também neste caso, os valores preditos para os compostos **BC027** e **BC028** são substancialmente discordantes dos valores medidos. Os resultados são apresentados graficamente na Figura 15.

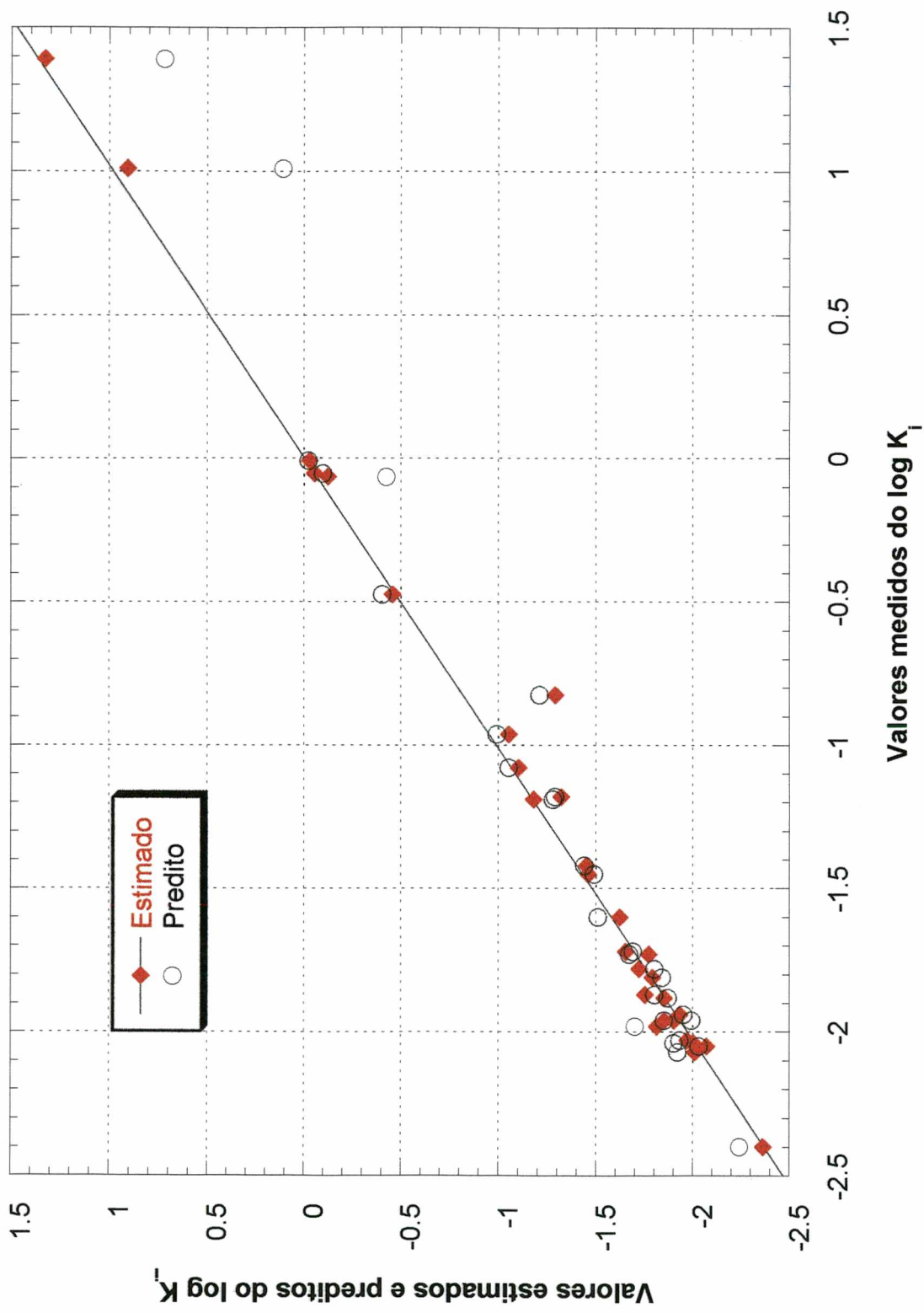
A grande diferença entre os valores medidos e preditos para aqueles inibidores mais fracos, onde uma extrapolação substancial é requerida, não surpreende. Nossos modelos subestimaram os valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  para ambos compostos, **BC027** e **BC028**, ou seja, nossos modelos predisseram estes inibidores por serem mais potentes do que realmente são. Desta maneira, os modelos de QSAR empurraram estes valores na direção da distribuição daqueles compostos pertencentes ao conjunto treino. Além disso, deve ser observado que os nossos modelos foram capazes de prever o valor da propriedade destes compostos na direção correta em relação aos outros compostos, ou seja, estes inibidores foram determinados por serem os mais fracos do conjunto de dados, o que constituiu-se num fator importante.

Entre os compostos que possuem valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  dentro da distribuição daqueles do conjunto treino, o composto **BC019** provou ser o mais problemático, tanto em termos de conjunto treino como de conjunto teste. Nosso valor predito encontra-se dentro de duas vezes o erro experimental de medida. Foi observado anteriormente que o valor medido da  $CI_{50}$  para o inibidor **BC019** varia em mais de uma ordem de grandeza, dependendo se a reação é iniciada pela adição de inosina ou da enzima.<sup>203</sup> O mecanismo base para esta observação não é conhecido. O mesmo comportamento não foi observado para

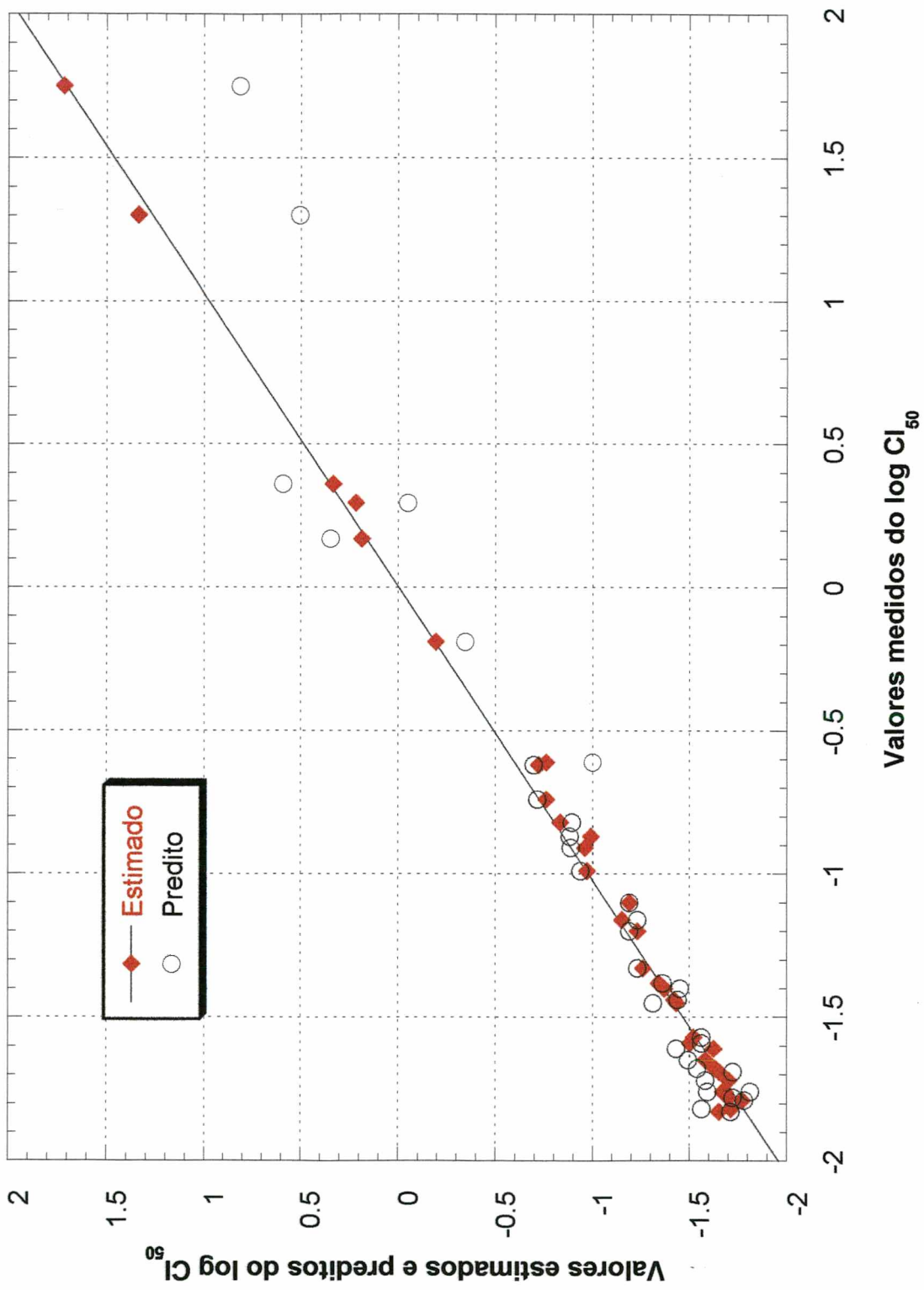
os outros inibidores examinados neste estudo. Não é claro se as nossas dificuldades em prever o valor correto para este inibidor refletem uma deficiência de nosso modelo de QSAR no presente estado de desenvolvimento, ou se uma diferença entre o mecanismo deste inibidor e dos demais no conjunto de treino, conduz a uma pertinente incerteza no valor da medida.

A criação de um modelo robusto de QSAR para os inibidores da purina nucleosídeo fosforilase requer uma maior diversidade estrutural e uma distribuição mais uniforme dos valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  nos conjuntos de treino. O trabalho para alcançar este objetivo é apresentado a seguir, no item 3.1.2.





**Figura 14.** Gráfico dos valores medidos do log K<sub>i</sub> contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.



**Figura 15.** Gráfico dos valores medidos do log CI<sub>50</sub> contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

### **3.1.2 Relações estrutura-atividade de uma classe ampla de inibidores da PNP. Desenvolvimento de modelos preditivos de QSAR para inibidores da PNP em geral.**

Como demonstrado anteriormente, foram determinados valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  para uma série de 34 inibidores da PNP e modelos de QSAR foram criados para estes conjuntos de dados (item 3.1.1). Contudo, tais modelos foram limitados ao que, idealmente, seria o desejado, como consequência da limitada diversidade estrutural e da distribuição não uniforme dos valores da propriedade apresentada pelo conjunto de dados. Estes fatores são comumente observados em grande parte dos projetos envolvidos na descoberta de fármacos.

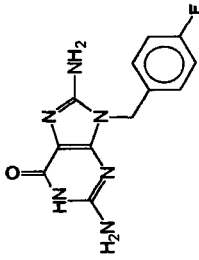
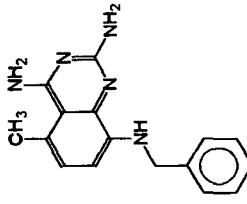
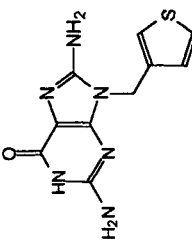
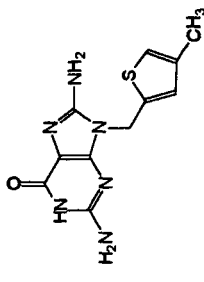
Idealmente, modelos de QSAR deveriam ser preditivos com conhecida confiabilidade para moléculas estruturalmente diversas, as quais possam ter valores da propriedade além daqueles alcançados pelas moléculas pertencentes ao conjunto treino. Assim, tais modelos seriam capazes de prever, extrapolar e fornecer valores preditos qualificados para a propriedade alvo. Para alcançar estes objetivos, o nosso conjunto inicial de dados foi ampliado, através da inclusão de 24 novos inibidores da PNP, que foram sintetizados na *Parke-Davis Pharmaceuticals*. A introdução deste novo conjunto de inibidores proporcionou a desejada diversidade estrutural, assim como uma distribuição mais uniforme dos valores da propriedade. Em suma, o novo conjunto de dados (ampliado) é bastante apropriado para a proposta do desenvolvimento de um modelo robusto de QSAR.

### **Determinação das constantes de inibição**

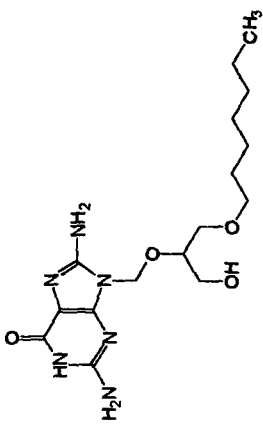
O conjunto ampliado de dados empregado agora, consiste de duas partes: (i) um conjunto de 34 inibidores da *BioCryst*, denominados **BC**; e, (ii) um conjunto de 24 inibidores da *Parke-Davis*, denominados **PD**. As estruturas e os valores associados de  $K_i$  e  $CI_{50}$  dos inibidores **BC** foram demonstrados anteriormente (Tabela 3, item 3.1.1).

Para o novo conjunto de 24 inibidores da PNP, valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  foram determinados empregando inosina como substrato. As estruturas dos inibidores **PD** e os correspondentes valores de  $K_i$ ,  $CI_{50}$  e da razão  $CI_{50}/K_i$  estão coletadas na Tabela 6. Deste novo conjunto de inibidores, nove são 9-substituídos-8-aminoguaninas, um é 8-amino-tioguanina (**PD041**), um é 9-substituído-9-deaza-8-aminoguanina (**PD048**), um é 9-substituído-8-tioguanina (**PD049**), um é 8-bromoguanosina (**PD053**), dois são 3-substituídos-8-aminoguaninas (**PD051** e **PD057**), e uma série de outros nove inibidores é completamente distinta estruturalmente, dos demais inibidores do conjunto. Estes incluem os compostos: **PD036**, **PD040**, **PD042**, **PD046**, **PD052**, **PD054-PD056** e **PD058**.

Table 6. Valores das constantes de inibição para a classe adicional de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>a</sup>

Inibidor	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$Cl_{50}^b$ ( $\mu\text{M}$ )	$Cl_{50}/K_i$
PD035		$2,71 \pm 0,06$ n=3	$4,17 \pm 0,41$ n=3	1,54
PD036		$3,57 \pm 0,20$ n=3	$7,47 \pm 0,18$ n=3	2,09
PD037		$0,0214 \pm 0,0020$ n=3	$0,0360 \pm 0,0027$ n=3	1,68
PD038		$0,187 \pm 0,012$ n=2	$0,362 \pm 0,014$ n=2	1,94

**PD039**

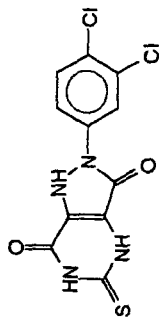


$0,661 \pm 0,029$   
n=2

$1,52 \pm 0,21$   
n=2

2,30

**PD040**

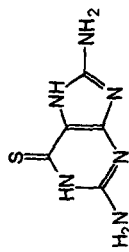


$3,49 \pm 0,18$   
n=2

$7,03 \pm 0,20$   
n=2

2,01

**PD041**

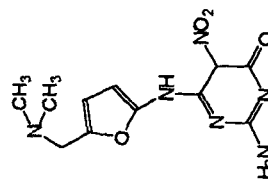


$3,09 \pm 0,25$   
n=3

$8,49 \pm 0,21$   
n=3

2,75

**PD042**

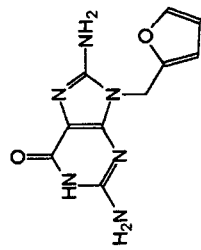


$21,68 \pm 1,99$   
n=2

$39,63 \pm 2,28$   
n=2

1,83

**PD043**

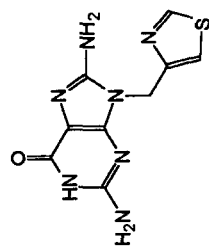


$0,085 \pm 0,015$   
n=2

$0,092 \pm 0,0021$   
n=2

1,10

**PD044**

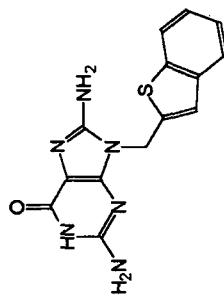


$0,561 \pm 0,025$   
n=2

$1,043 \pm 0,031$   
n=2

1,86

**PD045**

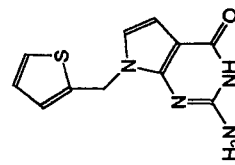


$13,26 \pm 1,63$   
n=3

$19,32 \pm 1,93$   
n=4

1,46

**PD046**

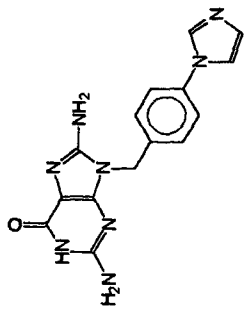


$0,342 \pm 0,038$   
n=2

$0,674 \pm 0,032$   
n=2

1,97

**PD047**

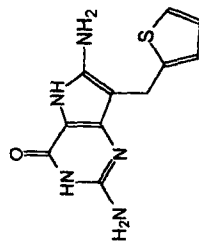


$0,445 \pm 0,030$   
n=2

$0,852 \pm 0,038$   
n=3

1,91

**PD048**

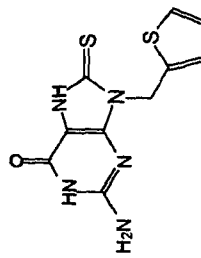


$0,321 \pm 0,018$   
n=2

$0,497 \pm 0,026$   
n=2

1,55

**PD049**

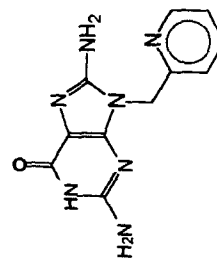


$1,032 \pm 0,18$   
n=2

$2,866 \pm 0,29$   
n=2

2,78

**PD050**



$1,231 \pm 0,13$   
n=2

$1,971 \pm 0,15$   
n=2

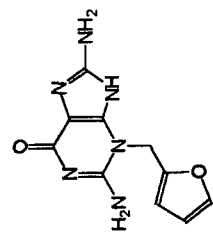
1,69



2,35

2,71 ± 0,22

1,16 ± 0,19



n=2

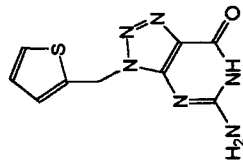
n=2

PD051

2,28

1,839 ± 0,06

0,806 ± 0,02



n=2

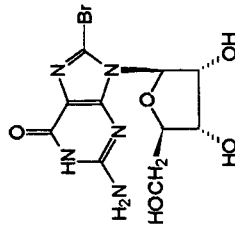
n=2

PD052

2,70

514,96 ± 17,18

190,48 ± 7,85



n=3

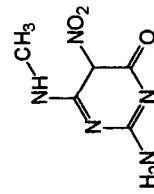
n=2

PD053

2,65

126,18 ± 11,27

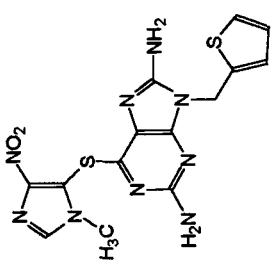
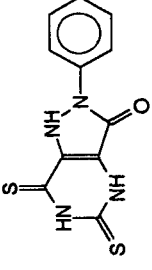
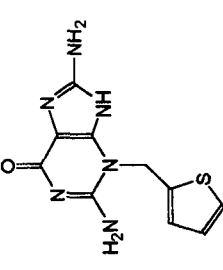
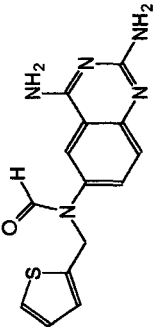
47,53 ± 4,39



n=2

n=2

PD054

<b>PD055</b>		6,01 ± 0,66 n=2	13,30 ± 1,02 n=2	2,21
<b>PD056</b>		7,77 ± 0,43 n=2	22,84 ± 1,82 n=2	2,94
<b>PD057</b>		0,974 ± 0,08 n=2	1,758 ± 0,09 n=2	1,80
<b>PD058</b>		104,23 ± 5,85 n=2	389,04 ± 16,97 n=2	3,73

<sup>a</sup>Enzima do baço de bezerro. Todos os valores de  $K_i$  e  $Cl_{50}$  foram determinados à 25°C, pH 7,4 e fosfato 1mM.

<sup>b</sup>Valores da  $Cl_{50}$  foram determinados com inosina 10 µM.

Através dos estudos cinéticos realizados, foi determinado que estes novos inibidores da PNP (**PD**) são competitivos, como observado anteriormente para o conjunto inicial de inibidores da PNP (**BC**).

### **Modelos de QSAR**

O atual conjunto de inibidores da PNP é bastante apropriado para a modelagem de QSAR. A inclusão da nova série de inibidores (**PD**) levou a um conjunto de dados com maior diversidade estrutural e melhor distribuição dos valores da propriedade.

A distribuição dos valores medidos do  $\log K_i$  e  $CI_{50}$  para o conjunto completo de inibidores é apresentada nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Estes valores estendem-se aproximadamente por cinco ordens de grandeza e estão distribuídos aceitavelmente ao longo dos espectros, embora encontrem-se mais concentrados na região de maior potência dos mesmos.

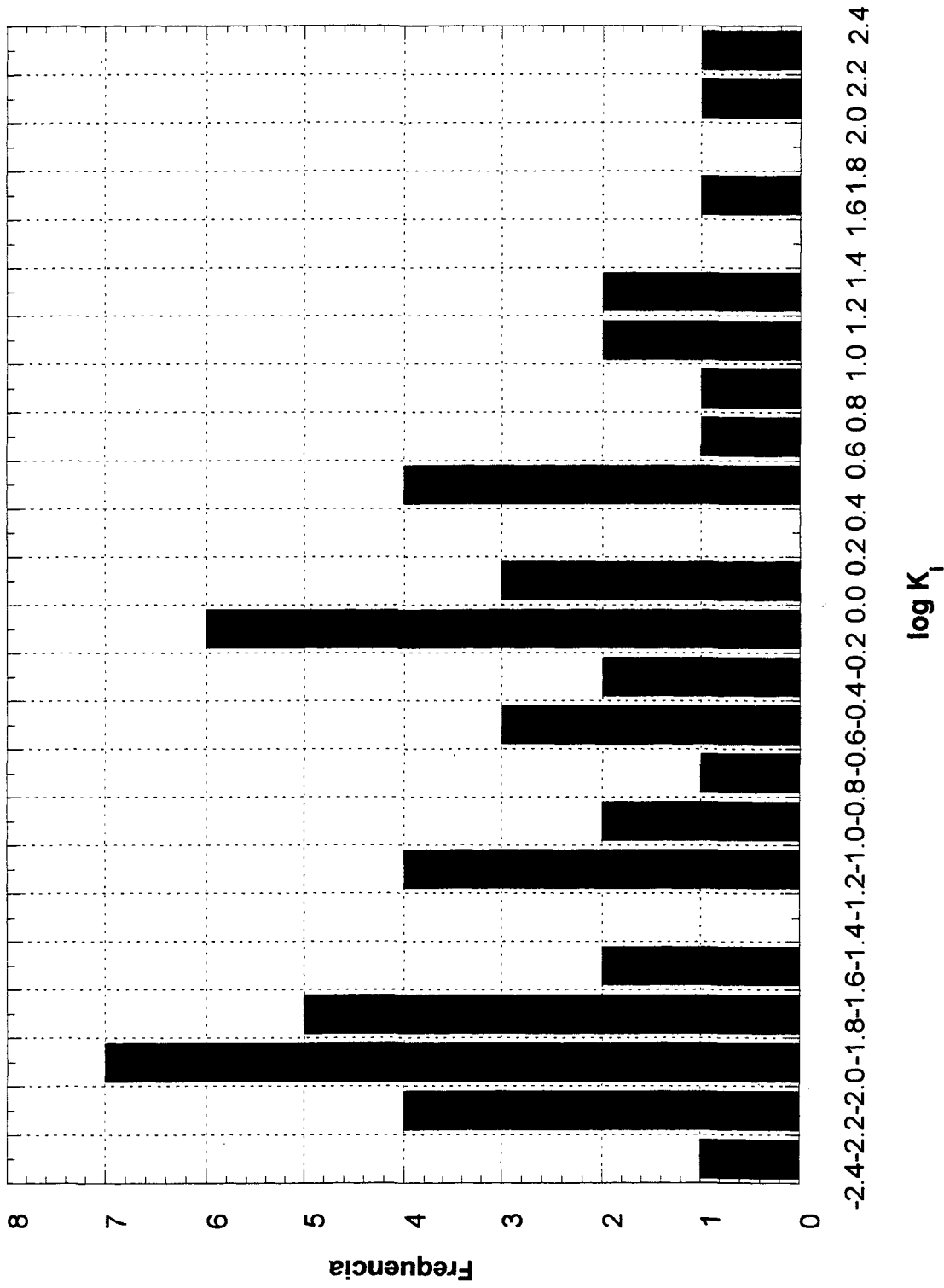
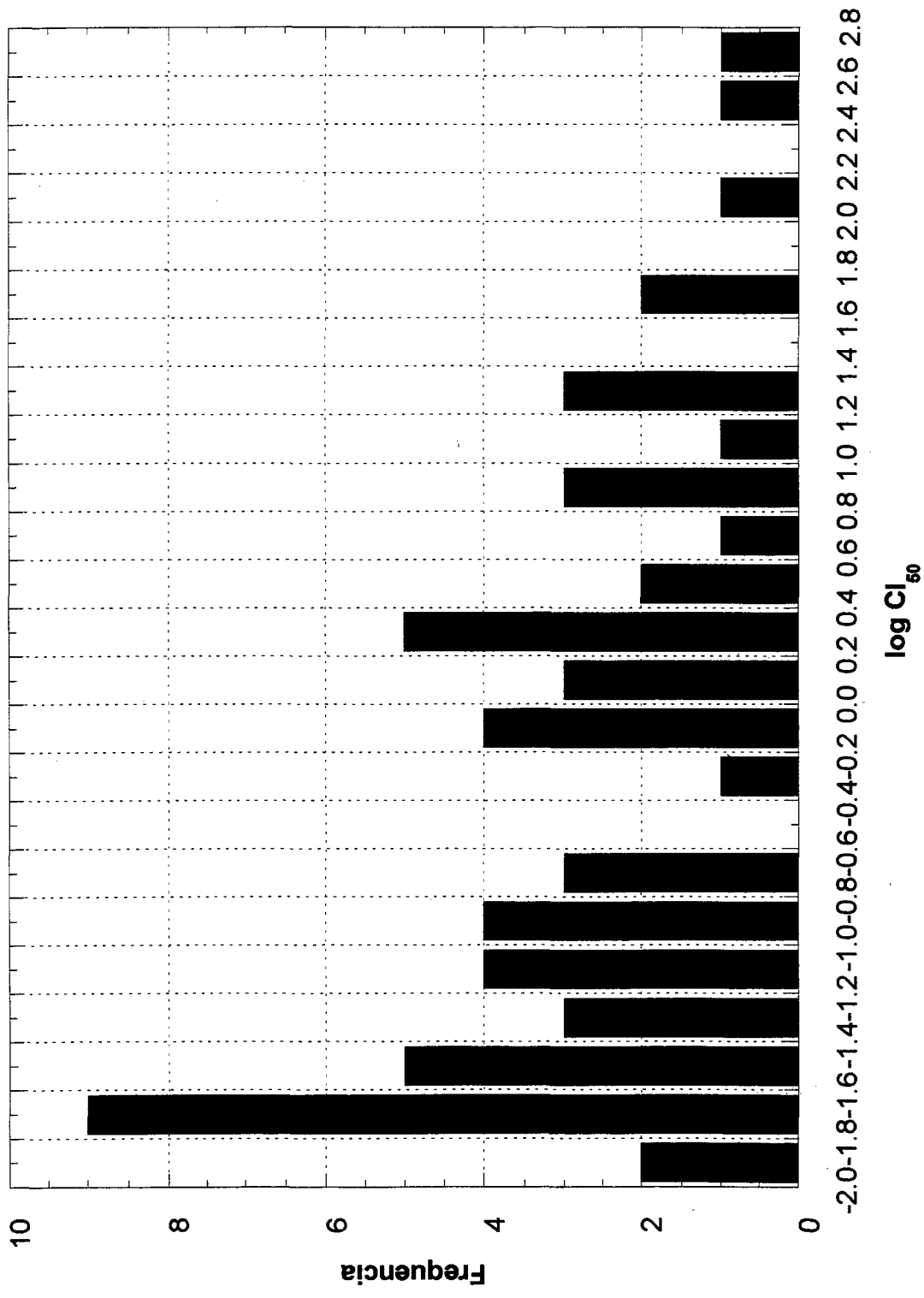


Figura 16. Distribuição dos valores do  $\log K_i$  para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.



**Figura 17.** Distribuição dos valores do log CI<sub>50</sub> para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

Dois modelos de QSAR foram criados, um para o  $\log K_i$  e outro para o  $\log CI_{50}$ . Em cada caso, o conjunto total de 58 inibidores, foi dividido em cinco sub-conjuntos não sobrepostos, cada sub-conjunto com capacidade de estender-se ao longo do alcance dos valores da propriedade quanto possível. Conjuntos de descritores moleculares utilizados nos modelos anteriores foram selecionados para o trabalho de modelagem. Dez modelos foram computados para o conjunto de dados. Em cada caso, três sub-conjuntos foram empregados como conjunto treino e os outros dois foram empregados como conjunto teste. Todas as possíveis combinações dos cinco sub-conjuntos (dez no total) foram empregadas como conjuntos treino. Desta maneira, os conjuntos teste ocupam 67% do espaço estrutural ocupado pelos conjuntos treino. Neste caminho, cada molécula do conjunto de dados aparece seis vezes no conjunto treino e quatro vezes no conjunto teste. Assim, foram geralmente obtidos seis valores estimados da propriedade para cada composto membro do conjunto treino e quatro valores preditos da propriedade para cada composto membro do conjunto teste.

Os valores medidos, estimados e preditos do  $\log K_i$  para o completo conjunto de inibidores são apresentados na Tabela 7. Os valores estimados e preditos são apresentados como a média dos valores qualificados associados ao correspondente desvio padrão. A diferença entre o valor medido e estimado ( $\Delta$  estimado) e entre o valor medido e predito ( $\Delta$  predito) também está incluída na Tabela 7. O correspondente conjunto de valores para o  $\log CI_{50}$  é fornecido na Tabela 8.

Tabela 7. Valores dos logaritmos de  $K_i$  medido, estimado e predito para um amplo conjunto de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>a</sup>

Inibidor	$\log K_i$		$\log K_i$		$\Delta$	
	Medido	Estimado	Predito <sup>b</sup>	Estimado <sup>c</sup>	Predito <sup>d</sup>	$\Delta$
BC001	-1,98	-1,80 ± 0,03	-1,80 ± 0,06	-0,18	-0,18	-0,18
BC002	-1,96	-1,83 ± 0,03	-1,79 ± 0,02	-0,13	-0,17	-0,17
BC003	-1,72	-1,69 ± 0,04	-1,71 ± 0,04	-0,03	-0,01	-0,01
BC004	-1,81	-1,74 ± 0,05	-1,69 ± 0,05	-0,07	-0,12	-0,12
BC005	-1,19	-1,30 ± 0,03	-1,34 ± 0,03	-0,11	-0,15	-0,15
BC006	-1,78	-1,70 ± 0,02	-1,68 ± 0,06	-0,08	-0,10	-0,10
BC007	-0,962	-1,02 ± 0,04	-1,01 ± 0,02	0,06	0,05	0,05
BC008	-1,88	-1,84 ± 0,03	-1,93 ± 0,03	-0,04	0,05	0,05
BC009	-2,04	-1,97 ± 0,03	-1,95 ± 0,07	-0,07	-0,09	-0,09
BC010	-2,03	-1,87 ± 0,03	-1,79 ± 0,09	-0,16	-0,24	-0,24
BC011	-2,07	-1,95 ± 0,04	-1,91 ± 0,08	-0,12	-0,16	-0,16
BC012	-1,94	-1,92 ± 0,05	-1,85 ± 0,06	-0,02	-0,09	-0,09
BC013	-2,40	-2,30 ± 0,15	-2,29 ± 0,02	-0,10	-0,11	-0,11
BC014	-1,96	-1,88 ± 0,05	-1,87 ± 0,04	-0,08	-0,09	-0,09
BC015	-2,05	-1,94 ± 0,05	-1,94 ± 0,09	-0,09	-0,09	-0,09
BC016	-1,87	-1,78 ± 0,02	-1,75 ± 0,02	-0,09	-0,12	-0,12

<b>BC017</b>	-1,42	-1,46 ± 0,03	-1,46 ± 0,08	0,04	0,04
<b>BC018</b>	-1,45	-1,41 ± 0,09	-1,26 ± 0,03	-0,04	-0,19
<b>BC019</b>	-0,827	-0,981 ± 0,01	-0,853 ± 0,21	0,15	0,02
<b>BC020</b>	-1,08	-1,14 ± 0,04	-1,10 ± 0,09	0,06	0,02
<b>BC021</b>	-0,475	-0,513 ± 0,09	-0,594 ± 0,07	0,04	0,11
<b>BC022</b>	-0,065	-0,132 ± 0,08	-0,191 ± 0,04	0,06	0,12
<b>BC023</b>	-0,053	-0,105 ± 0,07	-0,018 ± 0,07	0,05	-0,04
<b>BC024</b>	-1,73	-1,75 ± 0,02	-1,76 ± 0,02	0,02	0,03
<b>BC025</b>	-1,60	-1,59 ± 0,05	-1,61 ± 0,04	0	0,02
<b>BC026</b>	-1,18	-1,24 ± 0,08	-1,22 ± 0,08	0,06	0,04
<b>BC027</b>	1,39	1,34 ± 0,13	1,05 ± 0,15	0,05	0,34
<b>BC028</b>	1,01	0,825 ± 0,14	0,692 ± 0,14	0,19	0,32
<b>BC029</b>	-0,008	-0,021 ± 0,03	-0,10 ± 0,04	0,01	0,09
<b>PD035</b>	0,433	0,366 ± 0,05	0,392 ± 0,09	0,07	0,04
<b>PD036</b>	0,552	0,552 ± 0,07	0,512 ± 0,02	0	0,04
<b>PD037</b>	-1,67	-1,43 ± 0,07	-1,31 ± 0,15	-0,24	-0,36
<b>PD038</b>	-0,73	0,687 ± 0,04	0,681 ± 0,04	-0,04	-0,05
<b>PD039</b>	-0,180	-0,172 ± 0,06	-0,202 ± 0,07	-0,01	0,02
<b>PD040</b>	0,543	0,573 ± 0,04	0,581 ± 0,04	-0,03	-0,04
<b>PD041</b>	0,49	0,48 ± 0,06	0,41 ± 0,04	0,01	0,08



PD042	1,34	1,36 ± 0,03	1,40 ± 0,11	-0,02	-0,06
PD043	-1,07	-0,98 ± 0,04	-0,95 ± 0,08	-0,09	-0,12
PD044	-0,25	-0,23 ± 0,06	-0,20 ± 0,12	-0,02	-0,05
PD045	1,12	1,11 ± 0,13	0,97 ± 0,07	0,01	0,15
PD046	-0,466	-0,555 ± 0,06	-0,562 ± 0,09	0,09	0,10
PD047	-0,352	-0,324 ± 0,10	-0,273 ± 0,05	-0,03	-0,08
PD048	-0,493	-0,487 ± 0,04	-0,506 ± 0,14	-0,01	0,01
PD049	0,0137	0,061 ± 0,04	0,093 ± 0,06	-0,05	-0,08
PD050	0,090	0,10 ± 0,08	0,036 ± 0,09	-0,01	0,05
PD051	0,063	0,05 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,01	-0,01
PD052	-0,094	-0,151 ± 0,07	-0,247 ± 0,05	0,06	0,15
PD053	2,28	2,27 ± 0,05	2,52 ± 0,05	0,01	-0,24
PD054	1,68	1,66 ± 0,04	1,55 ± 0,08	0,02	0,13
PD055	0,779	0,712 ± 0,04	0,689 ± 0,09	0,07	0,09
PD056	0,89	0,89 ± 0,09	0,79 ± 0,09	0	0,10
PD057	-0,011	-0,00114 ± 0,08	0,08 ± 0,02	-0,01	-0,09
PD058	2,018	1,97 ± 0,06	1,81 ± 0,06	0,05	0,21

<sup>a</sup>Enzima do baço de bezerro. Todos os valores de  $K_i$  foram determinados à 25°C, pH 7,4 e fosfato 1 mM. <sup>b</sup>Valores preditos são apresentados como a média dos quatro valores obtidos para cada inibidor como membro dos conjuntos teste; valores estimados são apresentados como a média dos seis valores obtidos para cada inibidor como membro dos conjuntos treino. <sup>c</sup>A diferença entre o logaritmo do valor medido e estimado. <sup>d</sup>A diferença entre o logaritmo do valor medido e previsto.

**Tabela 8.** Valores dos logaritmos da  $Cl_{50}$  medido, estimado e predito para um amplo conjunto de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.<sup>a</sup>

Inibidor	log $Cl_{50}$		log $Cl_{50}$		$\Delta$	
	Medido	Estimado	Predito <sup>b</sup>	Estimado <sup>c</sup>	Predito <sup>d</sup>	$\Delta$
BC001	-1,76	-1,58 ± 0,04	-1,52 ± 0,08	-0,18	-0,24	-0,24
BC002	-1,78	-1,61 ± 0,05	-1,60 ± 0,01	-0,17	-0,18	-0,18
BC003	-1,59	-1,50 ± 0,03	-1,50 ± 0,03	-0,09	-0,09	-0,09
BC004	-1,65	-1,55 ± 0,04	-1,59 ± 0,03	-0,10	-0,06	-0,06
BC005	-0,99	-1,08 ± 0,04	-1,05 ± 0,04	0,09	0,06	0,06
BC006	-1,44	-1,40 ± 0,07	-1,33 ± 0,04	-0,04	-0,11	-0,11
BC007	-0,62	-0,73 ± 0,04	-0,68 ± 0,04	0,11	0,06	0,06
BC008	-1,68	-1,60 ± 0,04	-1,62 ± 0,04	-0,08	-0,06	-0,06
BC009	-1,69	-1,63 ± 0,01	-1,63 ± 0,05	-0,06	-0,06	-0,06
BC010	-1,83	-1,61 ± 0,05	-1,70 ± 0,10	-0,22	-0,13	-0,13
BC011	-1,76	-1,67 ± 0,07	-1,64 ± 0,07	-0,09	-0,12	-0,12
BC012	-1,72	-1,65 ± 0,03	-1,60 ± 0,03	-0,07	-0,12	-0,12
BC013	-1,45	-1,42 ± 0,08	-1,35 ± 0,06	-0,03	-0,10	-0,10
BC014	-1,79	-1,66 ± 0,02	-1,63 ± 0,04	-0,13	-0,16	-0,16
BC015	-1,33	-1,28 ± 0,05	-1,29 ± 0,10	-0,05	-0,04	-0,04

<b>BC016</b>	-1,57	-1,52 ± 0,05	-1,54 ± 0,07	-0,05	-0,03
<b>BC017</b>	-0,91	-0,99 ± 0,07	-1,02 ± 0,05	0,08	0,11
<b>BC018</b>	-1,16	-1,13 ± 0,22	-1,10 ± 0,12	-0,03	-0,06
<b>BC019</b>	-0,61	-0,59 ± 0,05	-0,71 ± 0,09	-0,02	0,10
<b>BC020</b>	-0,74	-0,84 ± 0,05	-0,75 ± 0,07	0,10	0,01
<b>BC021</b>	-0,19	-0,31 ± 0,09	-0,28 ± 0,17	0,12	0,09
<b>BC022</b>	0,294	0,19 ± 0,14	0,12 ± 0,19	0,10	0,17
<b>BC023</b>	0,168	0,25 ± 0,11	0,20 ± 0,09	-0,08	-0,03
<b>BC024</b>	-1,61	-1,54 ± 0,04	-1,54 ± 0,04	-0,07	-0,07
<b>BC025</b>	-1,20	-1,29 ± 0,04	-1,18 ± 0,13	0,09	-0,02
<b>BC026</b>	-0,87	-0,92 ± 0,07	-0,88 ± 0,08	0,05	0,01
<b>BC027</b>	1,75	1,66 ± 0,03	1,40 ± 0,18	0,09	0,35
<b>BC028</b>	1,30	1,16 ± 0,01	1,01 ± 0,19	0,14	0,29
<b>BC029</b>	0,36	0,35 ± 0,06	0,33 ± 0,09	0,01	0,03
<b>BC030</b>	-1,82	-1,64 ± 0,02	-1,64 ± 0,05	-0,18	-0,18
<b>BC031</b>	-1,40	-1,44 ± 0,07	-1,50 ± 0,02	0,04	0,10
<b>BC032</b>	-1,38	-1,34 ± 0,06	-1,30 ± 0,01	-0,04	-0,08
<b>BC033</b>	-0,82	-0,92 ± 0,03	-0,99 ± 0,08	0,10	0,17
<b>BC034</b>	-1,10	-1,16 ± 0,06	-1,16 ± 0,07	0,06	0,06

<b>PD035</b>	0,62	0,55 ± 0,07	0,57 ± 0,12	0,07	0,05
<b>PD036</b>	0,87	0,91 ± 0,09	0,87 ± 0,14	-0,04	0
<b>PD037</b>	-1,43	-1,24 ± 0,04	-1,26 ± 0,05	-0,19	-0,17
<b>PD038</b>	-0,044	-0,08 ± 0,07	-0,00473 ± 0,11	0,04	-0,04
<b>PD039</b>	0,180	0,19 ± 0,03	0,25 ± 0,08	-0,01	-0,07
<b>PD040</b>	0,847	0,91 ± 0,04	0,76 ± 0,11	-0,06	0,09
<b>PD041</b>	0,929	0,92 ± 0,02	0,86 ± 0,09	0,01	0,07
<b>PD042</b>	1,60	1,60 ± 0,04	1,64 ± 0,12	0	-0,04
<b>PD043</b>	-1,04	-0,94 ± 0,09	-0,92 ± 0,05	-0,10	-0,12
<b>PD044</b>	0,018	0,05 ± 0,04	0,07 ± 0,07	-0,03	-0,05
<b>PD045</b>	1,29	1,21 ± 0,08	1,22 ± 0,08	0,08	0,07
<b>PD046</b>	-0,172	-0,25 ± 0,06	-0,10 ± 0,07	0,08	-0,07
<b>PD047</b>	-0,070	-0,06 ± 0,06	-0,08 ± 0,07	-0,01	0,01
<b>PD048</b>	-0,304	-0,39 ± 0,06	-0,25 ± 0,10	0,09	-0,05
<b>PD049</b>	0,457	0,38 ± 0,06	0,41 ± 0,07	0,08	0,05
<b>PD050</b>	0,295	0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,14	0,05	-0,02
<b>PD051</b>	0,433	0,44 ± 0,08	0,38 ± 0,09	-0,01	0,05
<b>PD052</b>	0,264	0,30 ± 0,12	0,29 ± 0,11	-0,04	-0,03
<b>PD053</b>	2,71	2,76 ± 0,04	2,39 ± 0,05	-0,05	0,31

<b>PD054</b>	2,10	2,09 ± 0,04	2,05 ± 0,19	0,01	0,05
<b>PD055</b>	1,12	1,05 ± 0,06	0,99 ± 0,06	0,07	0,13
<b>PD056</b>	1,36	1,29 ± 0,07	1,30 ± 0,14	0,07	0,06
<b>PD057</b>	0,245	0,29 ± 0,04	0,34 ± 0,02	-0,04	-0,09
<b>PD058</b>	2,59	2,62 ± 0,05	2,28 ± 0,18	-0,03	0,30

<sup>a</sup>Enzima do baço de bezerro. Todos os valores de  $Cl_{50}$  foram determinados à 25°C, pH 7,4 e fosfato 1 mM.

<sup>b</sup>Valores preditos são apresentados como a média dos quatro valores obtidos para cada inibidor como membro dos conjuntos teste; valores estimados são apresentados como a média dos seis valores obtidos para cada inibidor como membro dos conjuntos treino. <sup>c</sup>A diferença entre o logaritmo do valor medido e estimado. <sup>d</sup>A diferença entre o logaritmo do valor medido e previsto.

O gráfico dos valores estimados e preditos do  $\log K_i$  contra os correspondentes valores medidos, para o conjunto de 53 inibidores, é mostrado na Figura 18. O correspondente gráfico para o  $\log CI_{50}$  para o completo conjunto inibidores é mostrado na Figura 19. Em ambos os casos, existe uma excelente concordância entre valores estimados e preditos, e por outro lado, com os valores medidos.

O trabalho de modelagem desenvolvido resultou em dois persuasivos modelos de QSAR para os inibidores da purina nucleosídeo fosforilase. As principais características destes modelos incluem:

Primeiro, os modelos realizam um excelente trabalho de caracterização dos conjuntos treino. Deve ser observado, especificamente, a excelente concordância entre os valores medidos e estimados (Tabelas 7 e 8; e Figuras 18 e 19), e os pequenos desvios padrões obtidos por repetidos cálculos destes valores estimados. Em cada caso, o valor estimado está dentro dos limites do erro experimental da medida ( $\pm 0,20$  unidades logarítmicas), com excessão dos compostos **BC010** e **PD037**, para os quais os valores estimados do  $\log CI_{50}$  e  $K_i$ , respectivamente, estão bastante próximos do erro experimental da medida. Não existe compostos afastados da região dos valores medidos, foram obtidas estimativas qualificadas para todos os membros do conjunto treino.

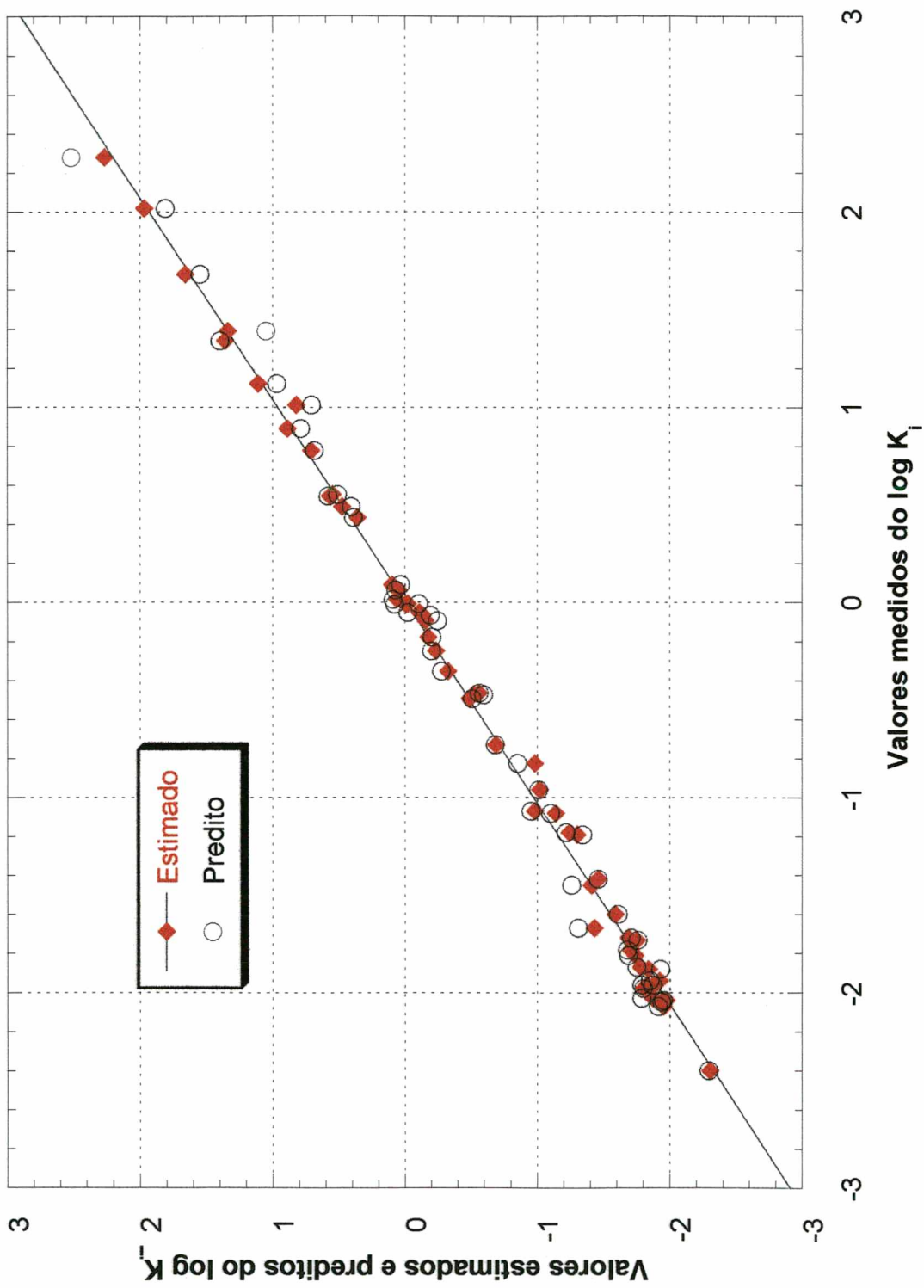
Segundo, os modelos desenvolvidos realizam um trabalho preditivo excelente nos conjuntos teste (Figuras 18 e 19). Em quase todos os casos, os valores preditos estão dentro do erro experimental da medida. As excessões são os compostos: **BC001**, **BC027**, **BC028**, **PD053** e **PD058** para o  $\log CI_{50}$ , e os compostos: **BC010**, **BC027**, **B028**, **PD037**, **PD053** e **PD058** para o  $\log K_i$ , onde

os valores preditos diferem dos medidos dentro de duas vezes o desvio padrão do erro experimental da medida. Vale ressaltar que os valores preditos são independentes da natureza do conjunto treino, como evidenciado pelo pequeno valor do desvio padrão obtido a partir de cálculos repetidos (Tabelas 7 e 8).

Terceiro, os modelos cobrem substancial estrutura/espço (Figuras 16 e 17). Desta maneira, estes modelos deverão ser preditivos para novos compostos dentro, e talvez fora, deste espaço estrutural. Estes modelos são robustos.

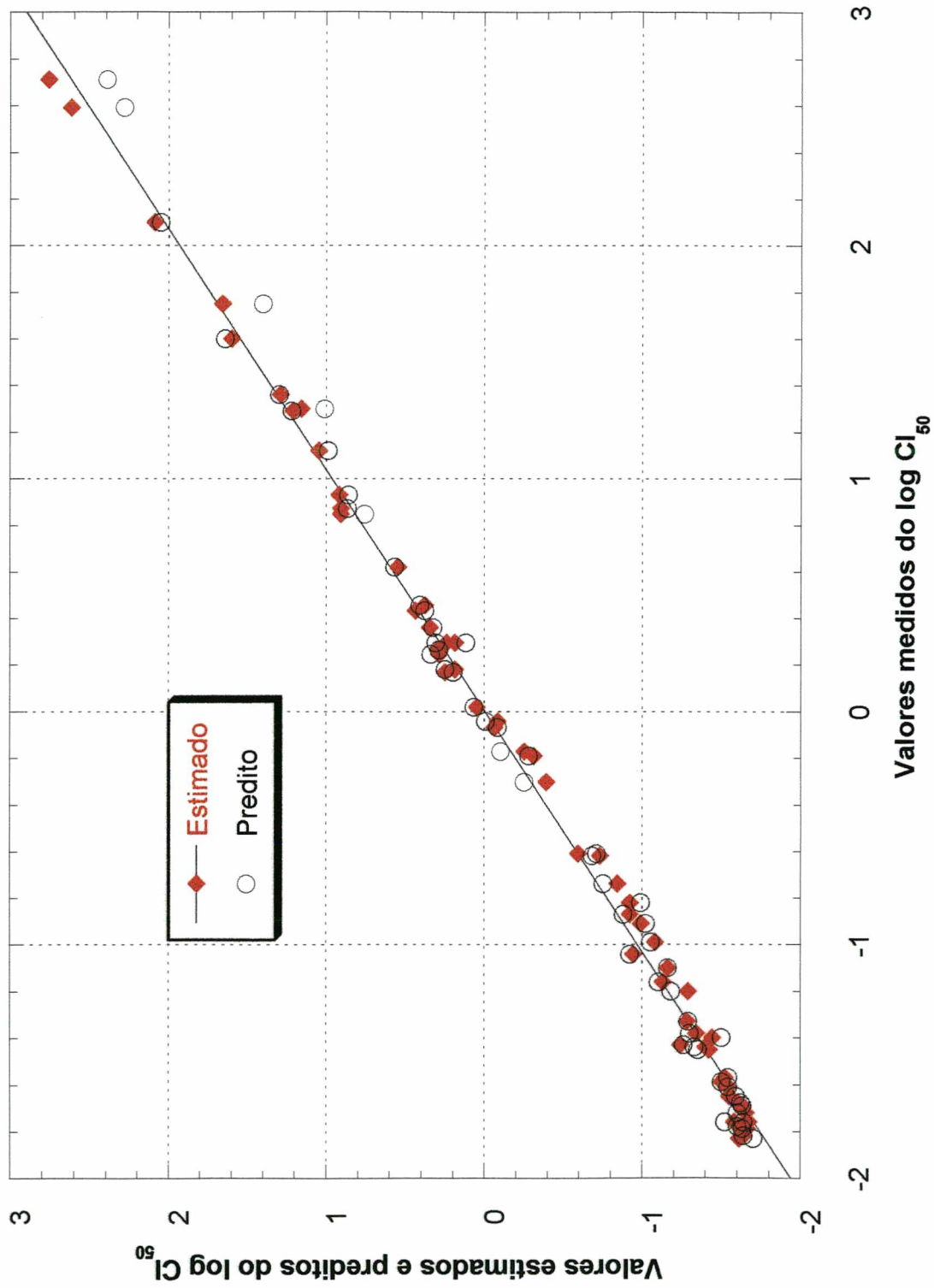
Quarto, têm-se um entendimento substancial da confiabilidade dos valores preditos, baseando-se no desvio padrão dos valores calculados e na concordância entre os valores medidos e calculados (Tabelas 7 e 8).

Como conclusão, os modelos desenvolvidos neste trabalho, para os inibidores da purina nucleosídeo fosforilase, encontram os objetivos e padrões estabelecidos inicialmente para a criação dos mesmos.



**Figura 18.** Gráfico dos valores medidos do log  $K_i$  contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.



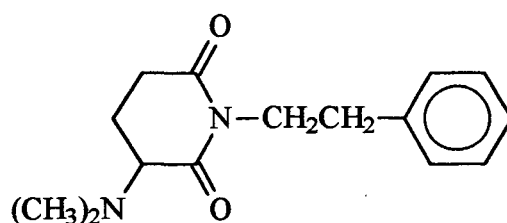


**Figura 19.** Gráfico dos valores medidos do log Cl<sub>50</sub> contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma ampla classe de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase.

### 3.2 Imidas cíclicas

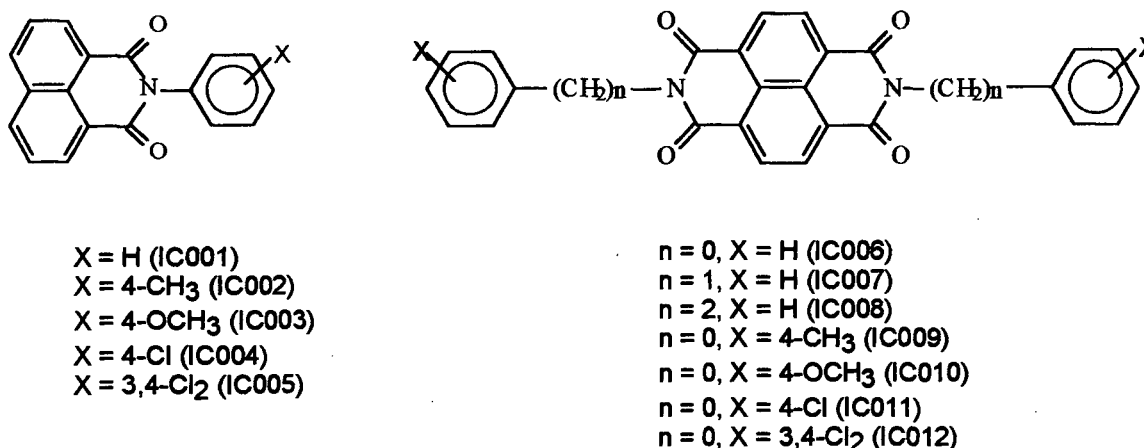
#### 3.2.1 Atividade analgésica de uma série de 1,8-naftalimidias e 1,4,5,8-naftalenodiimidias

Em estudos anteriores realizados em nossos laboratórios, foram sintetizadas várias imidas cíclicas utilizando como modelo o alcalóide natural filantimida (17), isolado de *Phyllanthus sellowianus*.<sup>204</sup> Tais compostos apresentam importantes atividades biológicas, incluindo efeitos antibacterianos,<sup>205-210</sup> antifúngicos,<sup>211,212</sup> antiespasmódicos<sup>213</sup> e analgésicos.<sup>179-186</sup> Particularmente, vários destes compostos exibiram potente ação analgésica em camundongos, sendo diversas vezes mais potentes que a aspirina e o paracetamol, fármacos padrões utilizados para efeito de comparação em nossos estudos.



(17)

Dando continuidade às investigações envolvendo esta classe de compostos, avaliou-se a atividade analgésica de algumas 1,8-naftalimidias e 1,4,5,8-naftalenodiimidias (Figura 20) sintetizadas anteriormente e que apresentaram, em estudos preliminares no mesmo ensaio, ação analgésica promissora.<sup>182</sup>



**Figura 20.** Série de 1,8-naftalimidias e 1,4,5,8-naftalenodiimidias estudada.

O efeito analgésico ( $DI_{50}$ ) desta série de imidas no modelo de dor causado pelo ácido acético em camundongos é apresentado na Tabela 9. O grupo substituinte presente no anel aromático foi selecionado de acordo com o método de Topliss,<sup>214</sup> que torna possível a avaliação dos resultados de poucos análogos com o objetivo de direcionar a síntese de novos compostos mais potentes. Como pode ser notado, todos os compostos apresentam efeito analgésico significativo, sendo várias vezes mais potentes que a aspirina e o paracetamol. O composto mais ativo, **IC010** ( $DI_{50} = 0,46 \mu\text{mol/kg}$ ), é aproximadamente 280 vezes mais ativo que os fármacos padrões.

Além disso, os compostos **IC003** e **IC010**, os mais potentes da série, possuem o grupo metóxi na posição 4 do anel aromático, sugerindo que o significativo efeito farmacológico exercido por estes compostos pode estar associado às propriedades físico-químicas deste substituinte. Investigações adicionais são necessárias para confirmar esta observação.

**Tabela 9.** Efeito analgésico de 1,8-naftalimidias (IC001-005) e 1,4,5,8-naftalenodiimidias (IC006-012), no modelo de contorções abdominais causadas pelo ácido acético 0,6% em camundongos.<sup>a</sup>

<b>Composto</b>	<b>DI<sub>50</sub> (μMol/kg)</b>
IC001	1,72 (1,36-2,13)
IC002	2,19 (1,39-3,14)
IC003	0,69 (0,46-0,99)
IC004	3,25 (2,11-5,30)
IC005	1,0 (0,79-1,37)
IC006	1,0 (0,67-1,48)
IC007	2,13 (1,65-2,73)
IC008	1,85 (1,54-2,53)
IC009	1,2 (0,62-2,42)
IC010	0,46 (0,29-0,69)
IC011	1,68 (0,98-2,84)
IC012	1,18 (0,84-1,67)
<b>Aspirina</b>	133 (73-247)
<b>Paracetamol</b>	125 (104-250)

Valores da DI<sub>50</sub> são apresentados com limite de 95% de confiança. Cada grupo representa a média de seis a oito animais. <sup>a</sup> Administração intraperitoneal.

Os resultados demonstraram que os derivados simétricos 1,4,5,8-naftalenodiimídicos são, geralmente, mais potentes que os respectivos derivados 1,8-naftalimídicos, por um fator que varia entre 1,5 e 1,9, indicando que a existência de dois grupos imídicos pode ser uma característica importante relacionada com a atividade analgésica deste compostos. Contudo, uma excessão a esta ordem foi observada para os compostos contendo dois átomos de cloro no anel aromático.

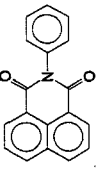
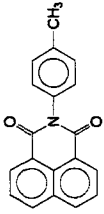
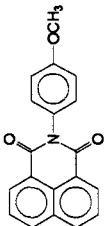
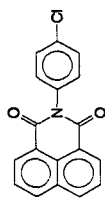
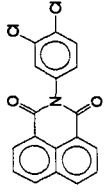
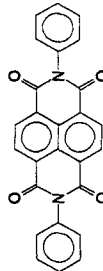
A distância entre o anel aromático e o imídico parece ser outro fator importante relacionado com a atividade das 1,4,5,8-naftalenodiimidas. Baseando-se nas estruturas **IC006**, **IC007** e **IC008**, pode ser notado que o composto mais potente é aquele no qual o anel aromático está ligado diretamente aos grupos imídicos (**IC006**). Desta forma, este composto foi selecionado para investigações adicionais na busca de compostos mais ativos, como por exemplo, o composto *N-N'*-di-(4-metóxfenil)-1,4,5,8-naftalenodiimida (**IC010**), a imida cíclica de maior potência analgésica sintetizada por nosso grupo até o presente momento.

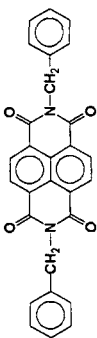
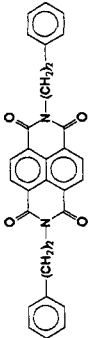
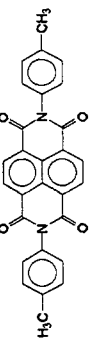
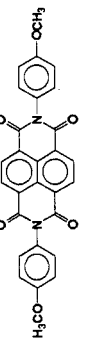
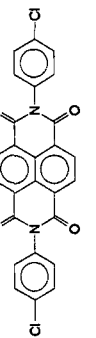
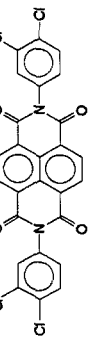
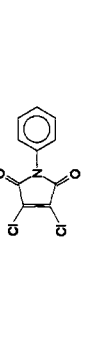
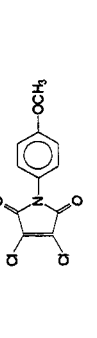
Finalmente, os efeitos analgésicos promissores demonstrados por estas imidas indicam a viabilidade do uso desta classe de compostos orgânicos para encontrar outros compostos mais ativos, os quais poderão apresentar novas possibilidades terapêuticas.

### **3.2.2 Desenvolvimento de um modelo preditivo de QSAR para a atividade analgésica de uma família de imidas**

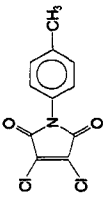
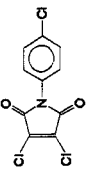
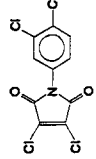
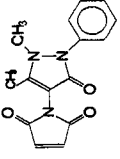
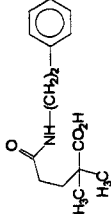
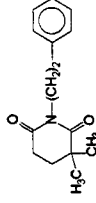
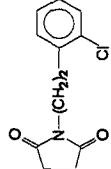
Nosso grupo de pesquisa demonstrou a síntese e a atividade analgésica de uma série de imidas cíclicas como discutido anteriormente (item 3.2.1). Entre estes, encontram-se compostos apresentando potência analgésica comparável ou maior do que aquela apresentada por aspirina e paracetamol, fármacos padrões amplamente utilizados na terapêutica. Dentro desta família de imidas, foram coletados dados suficientes de estrutura/potência para o desenvolvimento de um modelo quantitativo relacionando estrutura e atividade (QSAR). Um modelo de QSAR com poder preditivo substancial seria extremamente útil para o planejamento de novas imidas cíclicas apresentando maior potência analgésica. Neste contexto, foi desenvolvido um modelo promissor de QSAR. As estruturas das imidas examinadas neste estudo e as medidas da correspondente atividade analgésica ( $DI_{50}$ ) são mostradas na Tabela 10. O conjunto de dados a ser modelado inclui 34 imidas cíclicas de moderada diversidade estrutural, incluindo uma série de 3,4-dicloromaleimidias; maleimidias; succinimidias; glutarimidias; naftalimidias e bis-naftalimidias. Esta família de imidas apresenta valores da  $DI_{50}$  que variam de 0,46 a 300  $\mu\text{mol/kg}$ , um fator de potência de 650 vezes.

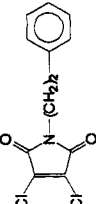
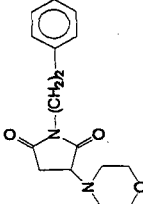
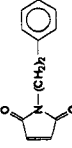
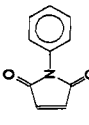
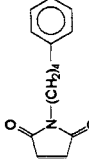

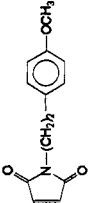
**Tabela 10.** Valores medidos, estimados e preditos da potência analgésica de uma família de imidas.

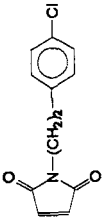
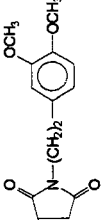
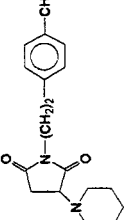
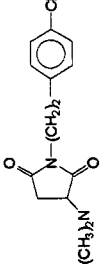
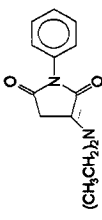
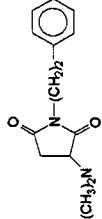
Imida	Estrutura	DI <sub>50</sub> (μmol/Kg)	log DI <sub>50</sub> Medido	log DI <sub>50</sub> <sup>a</sup> Estimado	log DI <sub>50</sub> <sup>b</sup> Predito	Δ Estimado <sup>c</sup>	Δ Predito <sup>d</sup>
IC001		1,72	0,236	0,301 ± 0,04	0,245 ± 0,04	-0,065	-0,009
IC002		2,19	0,340	0,340 ± 0,06	0,358 ± 0,04	0	-0,018
IC003		0,69	-0,1612	0,002 ± 0,04	0,032 ± 0,07	-0,163	-0,193
IC004		3,25	0,512	0,494 ± 0,04	0,455 ± 0,05	0,018	0,057
IC005		1,0	0,001	0,147 ± 0,02	0,135 ± 0,09	-0,146	-0,134
IC006		1,0	0,001	0,051 ± 0,04	0,017 ± 0,01	-0,050	-0,016

<b>IC007</b>		2,13	0,328	0,335 ± 0,02	0,317 ± 0,05	-0,007	0,011
<b>IC008</b>		1,85	0,267	0,237 ± 0,02	0,218 ± 0,05	0,030	0,049
<b>IC009</b>		1,2	0,079	0,042 ± 0,05	0,064 ± 0,02	0,037	0,015
<b>IC010</b>		0,46	-0,337	-0,287 ± 0,07	-0,156 ± 0,01	-0,050	-0,181
<b>IC011</b>		1,68	0,225	0,098 ± 0,05	0,134 ± 0,04	0,127	0,091
<b>IC012</b>		1,18	0,072	0,014 ± 0,05	-0,013 ± 0,05	0,058	0,085
<b>IC013</b>		2,78	0,444	0,478 ± 0,04	0,519 ± 0,04	-0,034	-0,075
<b>IC014</b>		11,81	1,072	0,926 ± 0,05	0,940 ± 0,04	0,146	0,132



<b>IC015</b>		10,67	1,028	1,009 ± 0,03	0,961 ± 0,05	0,019	0,067
<b>IC016</b>		9,31	0,969	0,881 ± 0,04	0,885 ± 0,07	0,088	0,084
<b>IC017</b>		3,14	0,497	0,509 ± 0,04	0,610 ± 0,04	-0,012	-0,113
<b>IC018</b>		2,5	0,398	0,457 ± 0,04	0,443 ± 0,03	-0,059	-0,045
<b>IC019</b>		11	1,041	1,066 ± 0,06	1,040 ± 0,05	-0,025	0,001
<b>IC020</b>		123	2,081	2,112 ± 0,06	2,095 ± 0,03	-0,031	-0,014
<b>IC021</b>		13	1,114	1,122 ± 0,03	1,100 ± 0,07	-0,008	0,014

<b>IC022</b>		4	0,602	0,693 ± 0,04	0,760 ± 0,02	-0,091	-0,158
<b>IC023</b>		35	1,544	1,595 ± 0,07	1,695 ± 0,11	-0,051	-0,151
<b>IC024</b>		13,4	1,127	1,120 ± 0,04	1,073 ± 0,05	0,007	0,054
<b>IC025</b>		19	1,279	1,219 ± 0,02	1,123 ± 0,03	0,060	0,156
<b>IC026</b>		7,5	0,875	0,959 ± 0,04	0,970 ± 0,04	-0,084	-0,095
<b>IC027</b>		5,1	0,709	0,884 ± 0,04	0,874 ± 0,06	-0,175	-0,165
<b>IC028</b>		9,9	0,996	0,988 ± 0,03	0,971 ± 0,04	0,008	0,025

<b>IC029</b>		19,5	1,290	1,177 ± 0,03	1,348 ± 0,40	0,113	-0,058
<b>IC030</b>		11,4	1,057	1,029 ± 0,04	1,055 ± 0,03	0,028	0,002
<b>IC031</b>		210	2,322	2,315 ± 0,04	2,300 ± 0,07	0,007	0,022
<b>IC032</b>		220	2,342	2,255 ± 0,05	2,205 ± 0,02	0,087	0,137
<b>IC033</b>		300	2,477	2,372 ± 0,04	2,385 ± 0,06	0,105	0,092
<b>IC034</b>		300	2,477	2,450 ± 0,05	2,408 ± 0,03	0,027	0,069

<sup>a</sup>Média dos seis valores estimados. <sup>b</sup>Média dos quatro valores preditos. <sup>c</sup>A diferença entre o valor medido e estimado.  
<sup>d</sup>A diferença entre o valor medido e predito.

A propriedade usada na modelagem foi o logaritmo da atividade analgésica ( $\log DI_{50}$ ), com valores dentro do limite:  $-0,337 \leq \log DI_{50} (\mu\text{mol/kg}) \leq 2,477$ , estendendo-se aproximadamente por três ordens de grandeza. A distribuição dos valores do  $\log DI_{50}$  é mostrada na Figura 21. O erro padrão da medida da potência analgésica é tomado por ser  $\pm 0,2$  unidades logarítmicas.

Para o propósito de modelagem, o conjunto de dados foi dividido em cinco sub-conjuntos arbitrários, quatro destes contendo 7 imidas e o quinto contendo 6. Dez frações de modelos de QSAR foram desenvolvidos, cada uma empregando como conjunto treino uma das dez possíveis combinações de três dos cinco sub-conjuntos. Os dois sub-conjuntos remanescentes foram, em cada caso, empregados como conjunto teste. Desta forma, para cada fração do modelo, 20 ou 21 compostos pertencentes ao conjunto treino foram empregados para prever a atividade analgésica de 13 ou 14 compostos no conjunto teste. Quando os dez modelos foram completados, os valores do  $\log DI_{50}$  foram estimados seis vezes para cada composto membro do conjunto treino, e preditos quatro vezes para cada composto membro do conjunto teste.

Para cada composto do conjunto de dados, os valores medidos, estimados e preditos do  $\log DI_{50}$  estão coletados na Tabela 10, e são apresentados como a média de seis valores estimados e de quatro valores preditos, juntamente com o correspondente desvio padrão. A diferença entre os valores medidos e estimados ou preditos está incluída também na Tabela 10. O gráfico do logaritmo dos valores estimados e preditos da  $DI_{50}$  contra os correspondentes valores medidos é mostrado na Figura 22.

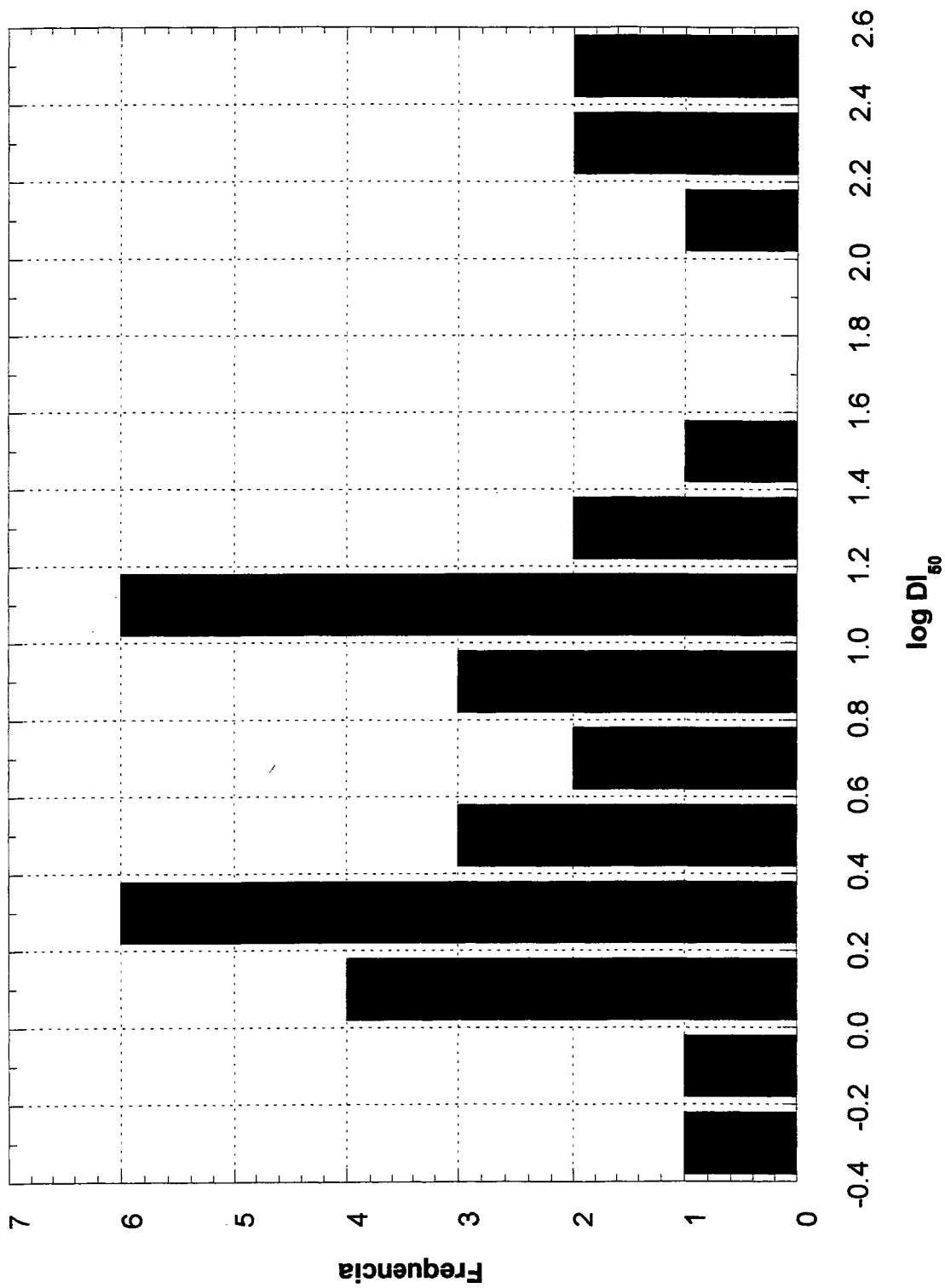


Figura 21. Distribuição dos valores medidos do log DI<sub>50</sub> para uma família de imidas cíclicas.

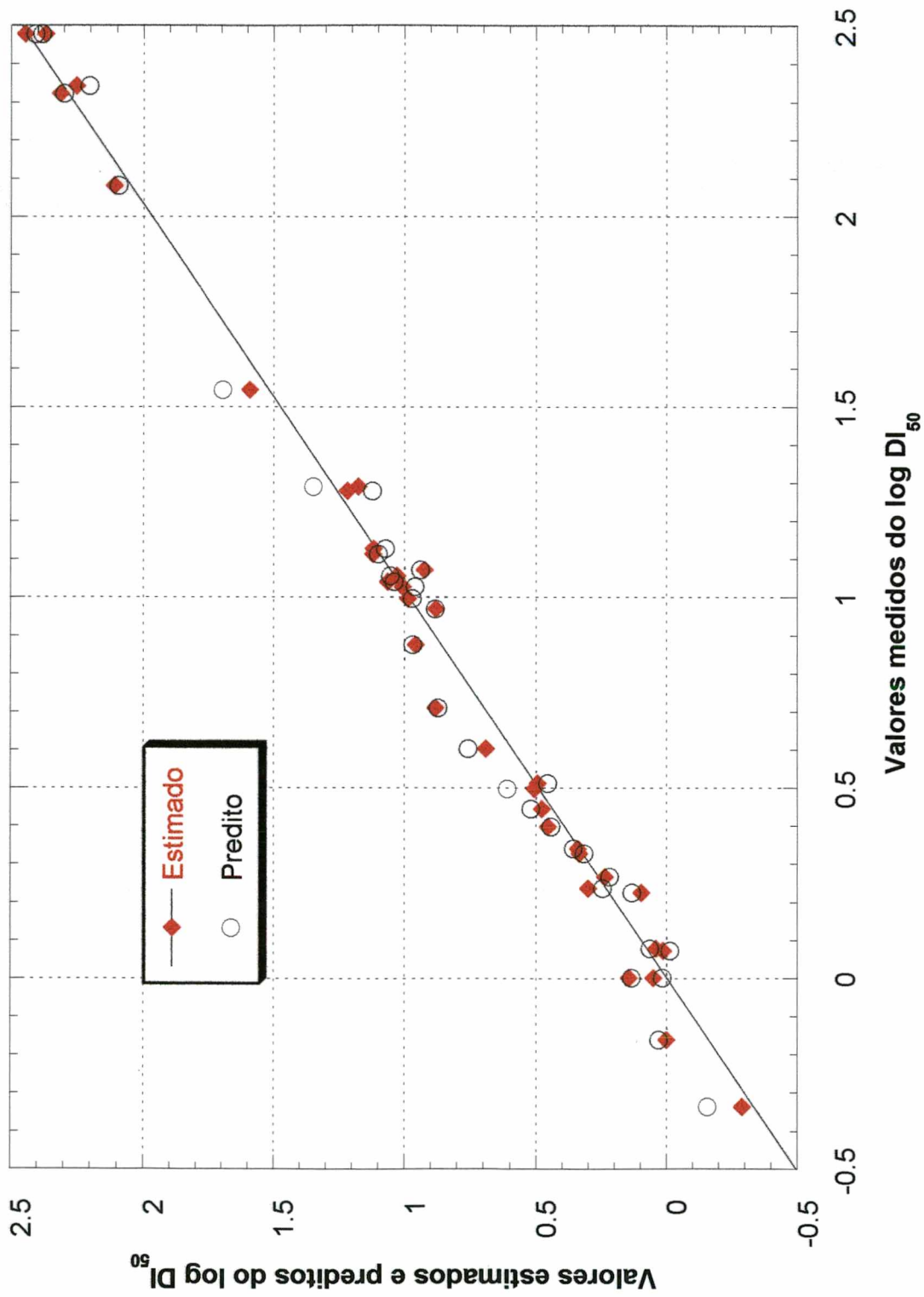


Figura 22. Gráfico dos valores medidos do log DI<sub>50</sub> contra os correspondentes valores estimados e preditos para uma família de imidas cíclicas.

Os dados apresentados na Tabela 10 e na Figura 22 estabelecem três pontos. Primeiro, o modelo de QSAR desenvolvido neste trabalho realiza um excelente trabalho na caracterização do conjunto treino. Os valores estimados da potência analgésica reproduzem os valores medidos dentro do erro experimental da medida para absolutamente todos os compostos no conjunto treino. Além disto, a diferença entre o valores medidos e estimados é menor que a metade do erro padrão da medida para 27 dos 34 compostos. Segundo, estes modelos de QSAR realizam um excelente trabalho preditivo para os compostos no conjunto teste. Novamente, pode ser observado que absolutamente todos os valores preditos refletem, dentro do erro experimental, os valores medidos no conjunto de dados. Para 24 dos 34 compostos, a diferença entre os valores medidos e preditos é menor que a metade do erro experimental. Terceiro, os valores estimados e preditos são profundamente independentes da natureza dos conjuntos treino, como evidenciado pelo modesto desvio padrão apresentado na Tabela 10.

Finalmente, a estratégia de criar modelos de QSAR baseados em diferentes sub-conjuntos (do conjunto treino de dados) como conjunto teste, apresenta o mérito de fornecer uma sensível estimativa do erro para os valores preditos.





## IV. CONCLUSÕES

- ◆ Os conjuntos de dados e os modelos de QSAR desenvolvidos neste trabalho, tanto para os inibidores da purina nucleosídeo fosforilase (PNP) quanto para a atividade analgésica de imídicas cíclicas, encontram os objetivos e padrões estabelecidos inicialmente para a criação dos mesmos;
- ◆ O emprego da nova tecnologia de QSAR provou ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos;
- ◆ O excelente modelo de QSAR desenvolvido para os inibidores da PNP é promissor para o planejamento racional de novos inibidores potentes da enzima. Este exemplo importante pode ser aplicado em diversos outros projetos envolvidos na descoberta de inibidores enzimáticos;
- ◆ O modelo de QSAR desenvolvido para as imidas cíclicas, é promissor como guia para futuras pesquisas envolvendo o planejamento e a síntese de novas imidas cíclicas apresentando potente ação analgésica.



## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS

1. Andersen Consulting, Pharmaceutical & Medical Products, Drug Discovery: The Quest for Innovation and Productivity, **1997**.
2. Redwood, H., The Pharmaceutical Industry: Trends, Problems and Achievements, Oldwicks, United Kingdom, **1988**.
3. Williams, M., Giordano, T., Elder, R.A., Reiser, H.J., Neil, G.L., Biotechnology in the Drug Discovery Process: Strategic and Management Issues, *Med. Res. Reviews*, **13**, 399-448, **1993**.
4. Spilker, B., Multinational Drug Companies. Issues in Drug Discovery and Development, Raven, New York, **1998**.
5. Gibbons, A., Biotech's Second Generation, *Science*, **256**, 766-768, **1992**.
6. Brugge, J.S., New Intracellular Targets for Therapeutic Drug Design, *Science*, **260**, 918-919, **1993**.
7. Biotechnology Medicines in Development, Pharmaceutical Researchers and Manufacturers of America, PhMRA, Washington, D.C., **1996**.
8. Udvarhelyi, I.S., Finding a Lasting Cure for U.S. Health Care, *Harvard Business Review*, September-October, 46-47, **1994**.
9. Wanke, L.A.; DuBose, R.F., Designer Drugs: The Evolving Science of Drug Discovery, *Pharm. Pract. Manage Q.*, **18**, 13-22, **1998**.
10. Bendis, I., What it Takes to Have a Career in Industry, *Pharmacy Times*, November, 86-90, **1997**.
11. DiMasi, J., Hansen, R.W., Grabowski, H.G., Lasagna, L., Cost of Innovation in the Pharmaceutical-Industry, *J. Health Econ.*, **10**, 107-142, **1991**.

12. Engel, S., Jalkiewicz, J.F., What's Happening to R&D?, *Medical Advertising News*, 12, 10-16, **1993**.
13. Nichols, N.A.; The New Pharmaceutical Paradigm, *Harvard Business Review*, January-February, 89-99, **1994**.
14. Binder, G.M., Finding a Lasting Cure for Health Care, *Harvard Business Review*, September–October, 47-50, **1994**.
15. The Pharmaceutical Industry, *The Economist*, February, 1-17, **1998**.
16. DiMasi, J.A.; Bryant, N.R., Lasagna, L., New Drug Development in the United States from 1963-1990, *Clin. Pharmacol. and Ther.*, 50, 471-486, **1991**.
17. Pharmaceutical Researchers and Manufacturers of America, PhRMA, Industry Profile, Washington DC, March, **1997**.
18. Kleinberg, M.L. & Wanke, L.A.; New Approaches and Technologies in Drug Design and Discovery, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 52, 1323-1336, **1995**.
19. Roussel, P.A., Soad, K.N., Erickson, T.J., Third Generation R&D Harvard Business School Press, Cambridge, MA, **1991**.
20. Klimstra, P.D., Raphael, A.T., Integrating Research and Development in Business Strategy, *Res. Technol. Mang.*, 35, 22-28, **1992**.
21. Piaski, P., Biotechnology: An Overview of the Tools, Therapeutic Agents, and Applications to Pharmacy Practice, *Pharm. Pract. Manage Q.*, 18, 1-12, **1998**.
22. Thayer, A.M., Pharmaceuticals: Redesigning R&D, *C&EN*, February, 25-37, **1998**.
23. Lehman Brothers, Winners & Losers in R&D Productivity, **1996**.

24. Silverman, E., *Biotechnology: Genomics, An Investor's Guide*, Punk, Ziegel & Knoell, New York, USA, págs. 7-37, **1996**.
25. Cordes, E.H., *Drug Discovery: Innovation, Consulting Documents*, **1999**.
26. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and its Human Homologue, *Nature*, **372**, 425-432, **1994**.
27. Flier, J.S., The Adipocyte-storage Depot or Node on the Energy Information Superhighway, *Cell*, **80**, 15-18, **1995**.
28. Barinaga, M., Obesity Research: Researchers Nail Down Leptin Receptor, *Science*, **271**, 913-913, **1996**.
29. Chehab, F.F., A Broader Role for Leptin, *Nat. Med.*, **2**, 723-724, **1996**.
30. Lönnqvist, F., The Obese (ob) Gene and its Product Leptin Toward a Obesity Treatment in Man, *Q. J. Med. Mon. J. Assoc. Phys.*, **89**, 327-332, **1996**.
31. Meier, C.A., Leptin Secretion and Action: An Update, *Eur. J. Endocrinol.*, **134**, 543-545, **1996**.
32. Wurtman, R.J., What is Leptin for, and does it act on the brain?, *Nat. Med.*, **2**, 492-493, **1996**.
33. Funahashi, T., Shimomura, I., Hiraoka, H., Arai, T., Takahashi, M., Nakamura, T., Nozaki, S., Yamashita, S., Takemura, R., Tokunaga, K., Matsuzawa, Y., Enhanced Expression of Rat Obese (ob) Gene in Adipose Tissues of Ventromedial Hypothalamus (VMH)-lesioned Rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 469-475, **1995**.

- 
34. Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y.M., Deitel, M., Increased Obese Messenger-RNA Expression in Omental Fat Cells from Massively Obese Humans, *Nat. Med.*, **1**, 953-956, **1995**.
35. Lönnqvist, F., Arner, P., Nordfors, L., Schalling, M., Overexpression of the Obese (ob) Gene in Adipose-tissue of Human Obese Subjects, *Nat. Med.*, **1**, 950-953, **1995**.
36. Friedman, J.M., Leibel, R.L., Tackling a Weighty Problem, *Cell*, **69**, 217-220 **1992**.
37. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffesi, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Robinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M., Weight-reducing Effects on the Plasma Protein Encoded by the Obese Gene, *Science*, **269**, 543-546, **1995**.
38. Wilson, S.R., Czarnik, A.W., Combinatorial Chemistry: Synthesis and Application, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., **1997**.
39. Terrett, N.K., Gardner, M., Gordon, D.W., Kobylecki, R.J., Steele, J., Combinatorial Synthesis - The Design of Compound Libraries and Their Application to Drug Discovery, *Tetrahedron*, **51**, 8135-8173, **1995**.
40. Thompson, L.A., Ellman, J.A., Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries, *Chem. Rev.*, **96**, 555-600, **1996**.
41. Kubinyi, H., Combinatorial and Computational Approaches in Structure-Based Drug Design, *Cur. Opin. Drug. Discov. Dev.*, **1**, 16-27, **1998**.
42. Ziai, M.R., Beer, B., Making Business Sense of Science with Rational Drug Design, *Pharmaceutical Executive*, **10**, 40-46, **1990**.

43. Loew, H.G., Strategies for Indirect Computer-Aided Drug Design. *Pharm. Res.*, 10, 475-486, **1993**.
44. The Boston Consulting Group, The Changing Environment for U.S. Pharmaceuticals, The Role of Pharmaceutical Companies in a Systems Approach to Health Care, **1993**.
45. Webster, A., University-corporate Ties and the Construction of Research Agendas, *Sociology*, 28, 123-142, **1992**.
46. Etzkowitz, H., Peters, L.S., Profiting from Knowledge: Organizational Innovation and the Revolution of Academic Norms, *Minerva*, 29, 133-166, **1991**.
47. Blumenthal, D., Academic-Industry Relationships in the Life Sciences: Extent, Consequences, and Management, *JAMA*, 268, 3344-3349, **1992**.
48. Blumenthal, D., Causino, N., Campbell, E., Louis, K.S., Relationships Between Academic Institutions and Industry in the Life Sciences: An Industry Survey, *N. Engl. J. Med.*, 334, 368-373, **1996**.
49. Rosenberg, S.A., Secrecy in Medicinal Research, *N. Engl. J. Med.*, 334, 392-394, **1996**.
50. Silverman, R.B., The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Academic Press, Inc, California, USA, págs. 147-161, **1992**.
51. Brown, M.S., Goldstein, J.L., Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics, Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rail, T.W., Murad, F., 7<sup>a</sup> Ed., Macmillan, New York, USA, pág. 827, **1985**.
52. Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Metabolic Control and Disease, Bundy, P.K., Rosenberg, L.E., Ed., Saunders, Philadelphia, USA, **1980**.

53. Patrick, G.L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 1<sup>a</sup> Ed., Oxford University Press Inc., New York, USA, págs. 154-204, **1995**.
54. Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>a</sup> Ed., W.H. Freeman and Company, New York, USA, págs. 107-113, **1985**.
55. Abeles, R.H., Frey, P.A., Jencks, W.P., *Biochemistry*, Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA, págs. 71-94, **1992**.
56. Mahler, H.R., Cordes, E.H., *Basic Biological Chemistry*, Harper & Row Publishers, Inc., New York, USA, págs. 174-191, **1968**.
57. Stryer, L., *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, USA, págs. 181-201, **1995**.
58. 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**.
59. Bennett, L.L., Jr., Allan, P.W., Noker, P.E., Rose, L.M., Niwas, S., Montgomery, J.A., Erion, M.D., Purine Nucleoside Phosphorylase - Biochemical and Pharmacological Studies with 9-Benzyl-9-Deazaguanine and Related-Compounds, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266, 707-714, **1993**.
60. Giblett, E.R., Ammann, A.J., Wara, D.W., Sandman, R., Diamond, L.K., Nucleoside-Phosphorylase Deficiency in a Child with Severely Defective T Cell Immunity and Normal B Cell Immunity, *Lancet*, i, 1010-1013, **1975**.
61. Cohen, A., Doyle, D., Martin, D.W., Jr., Ammann, A.J., Abnormal Purine Metabolism and Purine Overproduction in a Patient Deficient in Purine Nucleoside Phosphorylase, *N. Engl. J. Med.*, 295, 1449-1454, **1976**.



- 
62. Siegenbeek van Heukelom, L.H., Staal, G.E.J., Stoop, J.W., Zegers, B.J.M.,  
An Abnormal Form of a Purine Nucleoside Phosphorylase in a Family with  
a Child with Severe Defective T-Cell and Normal B-Cell Immunity, *Clin.  
Chim. Acta*, 72, 117-124, 1976.
63. Stoop, J.W., Zegeirs, B.J.M., Hendrickx, G.F.M., Siegenbeek van Heukelom,  
L.H., Staal, G.E.J., de Bree, P.K., Wadman, S.K., Ballieux, R.E., Purine  
Nucleoside Phosphorylase Deficiency Associated with Selective Cellular  
Immunodeficiency, *N. Engl. J. Med.*, 296, 651-655, 1977.
64. Ammann, A.J., Immunological Aberrations in Purine Nucleoside Deficiencies,  
*Ciba Found. Symp.*, 68, 55-75, 1978.
65. 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.
66. Sircar, J.C., Gilbertsen, R.B., Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP)  
Inhibitors: Potentially Selective Immunosuppressive Agents, *Drugs Future*,  
13, 653-668, 1988.
67. Montgomery, J.A., Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase, *Exp. Opin.  
Invest. Drugs*, 3, 1303-1313, 1994.
68. Markert, M.L., Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency, *Immun. Rev.*, 3,  
45-81, 1991.
69. Stoeckler, J.D., Cambor, C., Kuhns, V., Chu, S.H., Parks Jr., R.E., Inhibitors  
of Purine Nucleoside Phosphorylase, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 163-171,  
1982.

- 
70. Kazmers, I.S., Mitchell, B.S., Dadonna, P.E., Wotring, L.L., Townsend, L.B., Kelley, W.N., Inhibition of Purine Nucleoside Phosphorylase by 8-Aminoguanosine: Selective Toxicity for T Lymphoblasts, *Science*, 214 1137-1139, **1981**.
71. 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, *Arthritis Rheum.*, 30, 11-17, **1987**.
72. Dougados, M., Amor, B., Cyclosporin A in Rheumatoid Arthritis: Preliminary Clinical Results of a Open Trial, *Arthritis Rheum.*, 30, 83-87, **1987**.
73. Førre, Ø., Bjerkhoel, F., Salvesen, C.F., Berg, K.J., Rugstad, H.E., Saelid, G., Mellbye, O.J., Kass, E., An Open Controlled, Randomized Comparison of Cyclosporine and Azathioprine in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Preliminary Report, *Arthritis Rheum.*, 30, 88-92, **1987**.
74. Stiller, C.R., Dupre, J., Gent, M., Jenner, M.R., Keown, P.A., Laupacis, A., Martell, R., Rodger, N.W., Graffenried, B.V., Wolfe, B.M.J., Effects of Cyclosporine Immunosuppression in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus of Recent Onset, *Science*, 223, 1362-1367, **1984**.
75. Assan, R., Feutren, G., Debray-Sachs, M., Quiniou-Debrie, M.C., Laborie, C., Thomas, G., Chatenoud, L., Bach, J.F., Metabolic and Immunologic Effects of Cyclosporin in Recently Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus, *Lancet.*, 1, 67-71, **1985**.
76. 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 in a Double-Blind Study, *JAMA*, 256, 3110-3116, **1986**.
77. Fox, I.H., Pallella, T.D., Kelley, W.N., Hyperuricemia: A Marker for Energy Crisis, *N. Engl. J. Med.*, 317, 111-112, **1987**.
78. Daddona, P.E., Wiesmann, W.P., Milhouse, W., Cherm, J.W., Townsend, L.B., Hershfield, M.S., Webster, H.K., Expression of the Human Malaria Parasite Purine Nucleoside Phosphorylase in Host Enzyme-Deficient Erythrocyte Culture, *J. Biol. Chem.*, 261, 11667-11673, **1986**.
79. Wolfberg, G., Antipurines and Purine Metabolism, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 85, 517-533, **1998**.
80. Mitchell, B.S., Kelley, W.N., Purinogenic Immunodeficiency Diseases: Clinical Features and Molecular Mechanisms, *Ann. Intern. Med.*, 92, 826-831, **1980**.
81. Carson, D.A., Lakow, E., Wasson, D.B., Kamatani, N., Lymphocyte Dysfunction Caused by Deficiencies in Purine Metabolism, *Immunol. Today*, 2, 234-238, **1981**.
82. Martin, D.W., Jr., Gelfand, E.W., Biochemistry of Diseases of Immunodevelopment, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 845-877, **1981**.
83. Cohen, A., Lee, J.W.W., Dosch, H.M., Gelfand, E.W., The Expression of Deoxyguanosine Toxicity in T Lymphocytes at Different Stages of Maturation, *J. Immunol.*, 125, 1578-1582, **1980**.
84. Carson, D.A., Kaye, J., Seegmiller, J.E., Lymphospecific Toxicity in Adenosine Deaminase Deficiency and Purine Nucleoside Phosphorylase

- Deficiency: Possible Role of Nucleoside Kinase(s). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5677-5681, 1977.
85. Moore, E.C., Hurlbert, J., Regulation of Mammalian Deoxyribonucleotide Biosynthesis by Nucleotides as Activators and Inhibitors, *J. Biol. Chem.*, 241, 4802-4809, 1966.
86. Carson, D.A., Wasson, D.B., Lakow, E., Kamatani, N., Possible Metabolic Basis for the Different Immunodeficient States Associated with Genetic Deficiencies of Adenosine Deaminase and Purine Nucleoside Phosphorylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3848-3852, 1982.
87. Osborne, W.R.A., Scott, C.R., The Metabolism of Deoxyguanosine and Guanosine in Human B and T Lymphoblasts. A Role for Deoxyguanosine Kinase Activity in the Selective T Cell Defect Associated with Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency, *Biochemistry*, 214, 711-718, 1983.
88. Kim, B.K., Cha, S., Parks, R.E., Jr., Purine Nucleoside Phosphorylase from Human Erythrocytes. II. Kinetic Analysis and Substrate-binding Studies, *J. Biol. Chem.*, 243, 1771-1776, 1968.
89. Zannis, V., Doyle, D., Martin, D.W., Jr., Purification and Characterization of Human Erythrocyte Purine Nucleoside Phosphorylase and its Subunits, *J. Biol. Chem.*, 253, 504-510, 1978.
90. Changas, G., Reem, G.H., Characterization of the Subunit Structure of Human Placental Nucleoside Phosphorylase by Immunochemistry, *J. Biol. Chem.*, 254, 4233-4237, 1979.

- 
91. Wiginton, D.A., Coleman, M.S., Hutton, J.J., Characterization of Purine Nucleoside Phosphorylase from Human Granulocytes and its Metabolism of Deoxyribonucleosides, *J. Biol. Chem.*, 255, 6663-6669, **1980**.
92. Edwards, Y.H., Edwards, P.A., Hopkinson, D.A., A Trimeric Structure for Mammalian Purine Nucleoside Phosphorylase, *FEBS Lett.*, 32, 235-248, **1973**.
93. Lewis, A.S., Glantz, M.D., Bovine Brain Purine Nucleoside Phosphorylase Purification, Characterization, and Catalytic Mechanism, *Biochemistry*, 15, 4451-4457, **1976**.
94. Carlson, J.D., Fischer, A.G., Thyroid Purine Nucleoside Phosphorylase. II. Kinetic Model by Alternate Substrate and Inhibition Studies, *Biochim. Biophys. Acta*, 566, 259-265, **1979**.
95. Ikezawa, Z., Nishino, T., Murakami, K., Tsushima, K., Purine Nucleoside Phosphorylase from Bovine Liver, *Comp. Biochem. Physiol.*, 60, 111-116, **1978**.
96. Lewis, A.S., Glantz, M.D., Monomeric Purine Nucleoside Phosphorylase from Rabbit Liver. Purification and Characterization, *J. Biol. Chem.*, 251, 407-413, **1976**.
97. Murakami, K., Mitsui, A., Tsushima, K., Molecular Properties and a Nonidentical Trimeric Structure of Purine Nucleoside Phosphorylase from Chicken Liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 205, **1976**.
98. Murakami, K., Tsushima, K., Crystallization and Some Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase from Chicken Liver, *Biochem. Biophys. Acta*, 384, 390-398, **1975**.

- 
99. Jensen, K.F., Nygaard, P., Purine Nucleoside Phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Purification and Some Properties, *Eur. J. Biochem.*, 51, 253-265, 1975.
  100. Schimandle, C.M., Tanigoshi, L., Mole, L.A., Sherman, I.W., Purine Nucleoside Phosphorylase of the Malarial Parasite, *Plasmodium lophurae*, *J. Biol. Chem.*, 260, 4455-4460, 1985.
  101. Stoeckler, J.D., Agarwal, R.P., Agarwal, K.C., Schmid, K., Parks, R.E., Jr., Purine Nucleoside Phosphorylase from Human Erythrocytes: Physicochemical Properties of the Crystalline Enzyme, *Biochemistry*, 17, 278-283, 1978.
  102. Williams, S.R., Goddard, J.M., Martin, D.W., Jr., Human Purine Nucleoside Phosphorylase cDNA Sequence and Genomic Clone Characterization, *Nucleic Acids Res.*, 12, 5779-5787, 1984.
  103. Ealick, S.E., Rule, S.A., Carter, D.C., Greenhough, T.J., Babu, Y.S., Cook, W.J., Habash, J., Helliwell, J.R., Stoeckler, J.D., Parks, R.E., Jr., Chen, S.F., Bugg, C.E., Three-Dimensional Structure of Human Erythrocytic Purine Nucleoside Phosphorylase at 3.2 Å Resolution, *J. Biol. Chem.*, 265, 1812-1820, 1990.
  104. Erion, M.D., Stoeckler, J.D., Guida, W.C., Walter, R.L., Ealick, S.E., Purine Nucleoside Phosphorylase. 2. Catalytic Mechanism, *Biochemistry*, 36, 11735-11748, 1997.
  105. Parks Jr., R.E., Agarwal, R.P., Purine Nucleoside Phosphorylase, *The Enzymes*, Vol. 7, 3<sup>rd</sup> Ed., Boyer, P.D., Ed., Academic Press, New York, USA, 483-514, 1972.

- 
106. Krenitsky, T., Purine Nucleoside Phosphorylase: Kinetics, Mechanisms and Specificity, *Mol. Pharmacol.*, **3**, 526-536, **1967**.
107. Carlson, J.D., Fischer, A.G., Characterization of the Active Site of Homogeneous Thyroid Purine Nucleoside Phosphorylase, *Biochim. Biophys. Acta*, **571**, 21-34, **1979**.
108. Porter, D.J.T., Purine Nucleoside Phosphorylase - Kinetic Mechanism of the Enzyme from Calf Spleen, *J. Biol. Chem.*, **267**, 7342-7351, **1992**.
109. Stein, R.L., Cordes, E.H., Kinetic Alpha-deuterium Isotope Effects for *Escherichia coli* Purine Nucleoside Phosphorylase-catalyzed Phosphorolysis of Adenosine and Inosine, *J. Biol. Chem.*, **256**, 767-772, **1981**.
110. Lehikoinen, P.K., Sinnott, M.L., Krenitsky, T.A., Investigation of Alpha-deuterium Kinetic Isotope Effects on the Purine Nucleoside Phosphorylase Reaction by the Equilibrium-perturbation Technique, *Biochem. J.*, **257**, 355-359, **1989**.
111. Kline, P.C., Schramm, V.L., Purine Nucleoside Phosphorylase. Catalytic Mechanism and Transition-state Analysis of the Arsenolysis Reaction, *Biochemistry*, **32**, 13212-13219, **1993**.
112. Kline, P.C., Schramm, V.L., Pre-Steady-State Transition-State Analysis of the Hydrolytic Reaction Catalyzed by Purine Nucleoside Phosphorylase, *Biochemistry*, **34**, 1153-1162, **1995**.
113. Lewis, A.S., Rabbit Brain Purine Nucleoside Phosphorylase. Physical and Chemical Properties. Inhibition Studies with Aminopterin, Folic Acid and Structurally-related compounds, *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 662, **1978**.

- 
114. Stoeckler, J.D., Purine Nucleoside Phosphorylase: A Target for Chemotherapy, *Developments in Cancer Chemotherapy*, Glazer RJ (Ed), CRC Press, Boca Raton, USA, págs. 35-60, **1984**.
115. Ealick, S.E., Babu, Y.S., Bugg, C.E., Erion, M.D., Guida, W.C., Montgomery, J.A., Secrist, J.A., III, Application of Crystallographic and Modeling Methods in the Design of Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11540-11544, **1991**.
116. Erion, M.D., Takabayashi, K., Smith, H.B., Kessi, J., Wagner, S., Hönger, S., Shames, S.L., Ealick, S.E., Purine Nucleoside Phosphorylase. 1. Structure Function Studies, *Biochemistry*, **36**, 11725-11734, **1997**.
117. Stoeckler, J.D., Ealick, S.E., Bugg, C.E., Parks Jr, R.E., Design of Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors, *Fed. Prod.*, **45**, 2773-2778, **1986**.
118. Montgomery, J.A., Structure-Based Drug Design: Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase, *Drug Des. Discov.*, **11**, 289-305, **1994**.
119. Stoeckler, J.D., Poirot, A.F., Smith, R.M., Parks, R.E., Jr., Ealick, S.E., Takabayashi, K., Erion, M.D., Purine Nucleoside Phosphorylase. 3. Reversal of Purine Base Specificity by Site-Directed Mutagenesis, *Biochemistry*, **36**, 11749-11756, **1997**.
120. Stoeckler, J.D., Cambor, C., Parks Jr., R.E., Human Erythrocyte Purine Nucleoside Phosphorylase: Reaction with Sugar-Modified Nucleoside Substrates, *Biochemistry*, **19**, 102-107, **1980**.
121. Montgomery, J.A., Purine Nucleoside Phosphorylase - A Target for Drug Design, *Med. Res. Rev.*, **13**, 209-228, **1993**.



- 
122. Morris, P.E., Montgomery, J.A., Inhibitors of the Enzyme Purine Nucleoside Phosphorylase, *Exp. Opin. Ther. Pat.*, **8**, 283-299, **1998**.
123. Parks Jr, R.E., Crabtree, G.W., Kong, C.M., Agarwal, R.P., Agarwal, K.C., Scholar, E.M., Incorporation of Analog Purine Nucleosides into the Formed Elements of Human Blood: Erythrocytes, Platelets, and Lymphocytes, *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **255**, 412-418, **1975**.
124. Niwas, S., Chand, P., Pathak, C.V., Montgomery, J.A., Structure-based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. 5. 9-Deazahypoxanthines, *J. Med. Chem.*, **37**, 2477-2480, **1994**.
125. Shewach, D.S., Chern, J.W., Pillote, K.E., Townsend, L.B., Daddona, P.E., Potentiation of 2'-Deoxyguanosine Cytotoxicity by a Novel Inhibitor of Purine Nucleoside Phosphorylase 8-Amino-9-Benzylguanine, *Cancer Res.*, **46**, 519-523, **1986**.
126. Nakamura, C.E., Chu, S.H., Stoeckler, J.D., Parks Jr., R.E., Inhibition of Purine Nucleoside Phosphorylase by Phosphonoalkyl Purines, *Nucleosides Nucleotides*, **8**, 1039-1040, **1989**.
127. Shcherbo, S.N., Ananiev, A.V., Akopyan, Z.I., Relationship Between the Electronic Structure and Biological Activity of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase: 1. Acyclonucleosides of Guanine and Hypoxanthine, *Biomed. Sci. (London)*, **1**, 613-616, **1990**.
128. Bzowska, A., Kulikowska, E., Shugar, D., Bing-yi, C., Lindborg, B., Johansson, N.G., Acyclonucleoside Analog Inhibitors of Mammalian Purine Nucleoside Phosphorylase, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1791-1803, **1991**.

- 
129. Sircar, J.C., Kostlan, C.R., Gilbertsen, R.B., Bennett, M.K., Dong, M.K., Cetenko, W.J., Inhibitors of Human Purine Nucleoside Phosphorylase - Synthesis of Pyrrolo [3,2-D] Pyrimidines, A New Class of Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitors as Potentially T-Cell Selective Immunosuppressive Agents - Description of 2,6-Diamino-3,5-Dihydro-7-(3-thienylmethyl)-4H-Pyrrolo-[3,2-D]-Pyrimidin-4-one, *J. Med. Chem.*, **35**, 1605-1609, **1992**.
130. Sircar, J.C., Suto, M.J., Scott, M.E., Dong, M.K., Gilbertsen, R.B., Inhibitors of Human Purine Nucleoside Phosphorylase. Synthesis, Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibition and T-Cell Cytotoxicity of 2,5-Diaminothiazolo [5,4-d] Pyrimidin-7 (6H)-one and 2,5-Diaminothiazolo [4,5-d] Pyrimidin-7 (6H)-one. Two Thio Isosteres of 8-Aminoguanine, *J. Med. Chem.*, **29**, 1804-1806, **1986**.
131. Guida, W.C., Elliott, R.D., Thomas, H.J., Secrist III, J.A., Babu, Y.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**.
132. Erion, M.D., Niwas, S., Rose, J.D., Ananthan, S., Allen, M., Secrist III, J.A., Babu, Y.S., Bugg, C.E., Guida, W.C., Ealick, S.E., Montgomery, J.A., Structure-based Design of Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. 3. 9-Arylmethyl Derivatives of 9-Deazaguanine Substituted on the Methylene Group, *J. Med. Chem.*, **36**, 3771-3783, **1993**.
133. Secrist III, J.A., 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**.
134. Hansch, C., Muir, R.M., Fujita, T., Maloney, P.P., Geiger, E., Streich, M., The Correlations of Biological Activity of Plant Growth Regulators and Chloromycetin Derivatives with Hammett Constants and Partition Coefficients, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2817-2824, **1963**.
135. Hansch, C., Fujita, T., Pi-Sigma-Rho Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1616-1626, **1964**.
136. Hansch, C., On the Structure of Medicinal Chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **19**, 1-6, **1976**.
137. van de Waterbeemd, H., The History of Drug Research: from Hansch to the Present, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **11**, 200, **1992**.
138. van de Waterbeemd, H., Recent Progress in QSAR Technology, *Drug Discov.*, **9**, 277, **1993**.
139. Hansch, C., Hoekman, D., Gao, H., Comparative QSAR: Toward a Deeper Understanding of Chemicobiological Interactions, *Chem. Rev.*, **96**, 1045-1075, **1996**.
140. Hansch, C., Leo, A., Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, Heller, S.R., Ed., American Chemical Society, Washington, DC, USA, **1995**.

- 
141. Cramer III, R.D., Patterson, D.E., Bunce, J.D., Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, *110*, 5959-5967, **1988**.
142. Rekker, R.F., The Hydrophobic Fragmental Constant. Its Derivation and Application. A Means of Characterizing Membrane Systems, In *Pharmacochimistry Library*, Nauta, W.T., Rekker, R.F., Eds., Vol. 1, Elsevier, New York, USA, **1977**.
143. Exner, O., *Advances in Free Energy Relationships*, Chapman, N.B., Shorter, J., Eds., Plenum, New York, USA, pág.1, **1972**.
144. Verloop, A., Hoogenstraaten, W., Tipker, J., *Drug Design*, Ariens, E.J., Ed., Vol. VII, Academic Press, New York, pág. 176, **1976**.
145. Hall, L.H., Kier, L.B., The Molecular Connectivity Chi Indexes and Kappa Shape Indexes in Structure-Property Modeling. *Reviews in Computational Chemistry II*, Lipkowitz, K.B., Boyd, D.B., Eds., VCH Publishers, págs. 367-422, **1991**.
146. Allen, F.H., Davies, J.E., Galloy, J.J., Johnson, O., Kennard, O., Macrae, C.F., Mitchell, E.M., Mitchell, G.F., Smith, J.M., Watson, D.G., The Development of Versions 3 and 4 of the Cambridge Structural Database System, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, *31*, 187-204, **1991**.
147. Allen, F.H., Bellard, S., Brice, M.D., Cartwright, B.A., Doubleday, A., Higgs, H., Hummelink, T., Hummelink-Peters, B.G., Kennard, O., Motherwell, W.D.S., Rodgers, J.R., Watson, D.G., The Cambridge Crystal Data Centre: Computer-Based Search, Retrieval, Analysis, and Display of

- 
- Information, *Acta-Crystallogr. Sect. B: Struct., Crystallogr. Cryst. Chem.*, **B35**, 2331-2339, **1979**.
148. Pearlman, R.S., CONCORD: Rapid Generation of High Quality Approximate 3D Molecular Structures, *Chem. Des. Aut. News*, **2**, 1-6, **1987**.
149. Rusinko III, A., Skell, J.M., Balducci, R., McGarity, C.M., Pearlman, R.S., *CONCORD: A Program for the Rapid Generation of High Quality Approximate 3-Dimensional Molecular Structures*, The University of Texas at Austin and Tripos Associates: ST. Louis, MO, **1988**.
150. Pearlman, R.S., 3D Molecular Structures: Generation and Use in 3D-Searching, 3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods, and Applications, Ed. by H. Kubing, ESCOM Science Publishers, Leiden, págs. 21-58, **1993**.
151. Marshall, G.R., Cramer III, R.D., Three-dimensional Structure-activity Relationships, *TIPS Reviews*, **9**, 285-289, **1998**.
152. Marshall, G.R., Barry, C.D., Bosshard, H.E., Dammkoehler, R.A., Dunn, D.A., The Conformational Parameter in Drug Design: The Active Analog Approach, Computer-Assisted Drug Design, Olson, E.C., Christoffersen, R.E., Eds., Vol. 112, American Chemical Society, Washington, DC, USA págs. 205-226, **1979**.
153. Cramer III, R.D., DePriest, S.A., Patterson, D.E., Hecht, P., The Developing Practice of Comparative Molecular Field Analysis, 3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods, and Applications, Kubinyi, H., Ed., ESCOM: Leiden, págs. 443-485, **1993**.
154. Wong, G., Koehler, K.F., Skolnick, P., Gu, Z., Ananthan, S., Schonholzer, P., Humkeler, W., Zhang, W., Cook, J.M., Synthetic and Computer-

- 
- Assisted Analysis of the Structural Requirements for Selective, High Affinity Ligand Binding to Diazepam Insensitive Benzodiazepine Receptors. *J. Med. Chem.*, **36**, 1820-1830, **1993**.
155. Oprea, T.I., García, A.E., Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships of Steroid Aromatase Inhibitors, *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **10**, 186-200, **1996**.
156. Belvisi, L., Bravi, G., Catalane, G., Mabilia, M., Salimbeni, A., Scolastico, C., A 3D QSAR CoMFA Study of Non-peptide Angiotensin II Receptor Antagonists, *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **10**, 567-582, **1996**.
157. Kellogg, G.E., Kier, L.B., Gaillard, P., Hall, L.H., E-State Fields: Applications to 3D QSAR, *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **10**, 513-520, **1996**.
158. Cho, S.J., Tropsha, A., Cross-Validated  $R^2$  Guided Region Selection for Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA): A Simple Method to Achieve Consistent Results, *J. Med. Chem.*, **38**, 1060-1066, **1995**.
159. Cho, S.J., Tropsha, A., Suffness, M., Cheng, Y.C., Lee, K.H., Antitumor Agents, **163**. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study of 4'-O-Demethylepipodophyllotoxin Analogs Using the Modified CoMFA/ $q^2$ -GRS Approach, *J. Med. Chem.*, **39**, 1383-1395, **1996**.
160. Ablordeppey, S.Y., El-Ashmawy, M., Fischer, J.B., Glennon, R.A., A CoMFA Investigation of Sigma Receptor Binding Affinity: Reexamination of a Spurious Sigma Ligand, *Eur. J. Med. Chem.*, **33**, 625-633, **1998**.
161. van de Waterbeemd, H., Structure Property Correlations in Drug Research, Chapter 3, 81<sup>a</sup> Ed., Han van de Waterbeemd, R.G., Landes Company, Austin, **1996**.

- 
162. Geladi, P., Kowalski, B.R., Partial Least Squares Regression: A Tutorial, *Anal. Chim. Acta*, 185, 1-17, 1986.
163. Höskuldsson, A., PLS Regression Methods, *J. Chemometr.*, 2, 211-228, 1988.
164. Geladi, P., Notes on the History and Nature of Partial Least Squares (PLS) Modelling, *J. Chemometr.*, 2, 231-246, 1988.
165. Jansson, P.A., Neural Networks: An Overview, *Anal. Chem.*, 63, 357A-362A, 1991.
166. Gasteiger, J., Zupan, J. Neural Networks in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 503-527, 1993.
167. Tetko, I.V., Luik, A.I., Poda, G.I., Application of Neural Networks in Structure- Activity Relationships of a Small Number of Molecules. *J. Med. Chem.*, 36, 811-814, 1993.
168. Ajay, A., Unified Framework for Using Neural Nets to Build QSARs, *J. Med. Chem.*, 36, 3565-3571, 1993.
169. So, S.S., Richards, W.G., Application of Neural Networks: Quantitative Structure-Activity Relationships of the Derivatives of 2,4-Diamino-5-(substituted-benzyl) pyrimidines as DHFR Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 35, 3201-3207, 1992.
170. Cordes, E.H., Frazer, J.W., The QSAR Paradigm, Kodak Scientific Computing Team (SCT), USA, 1998.
171. Cordes, E.H., Frazer, J.W., Creating Predictive QSAR Models: The Beginnings of an Algorithm, Kodak Scientific Computing Team, USA, 1998.

172. Frazer, J.W., Cordes, E.H., A New QSAR Modeling Paradigm, Kodak Scientific Computing Team, USA, 1997.
173. Cordes, E.H., Frazer, J.W., The Scientific Computing Team, Making QSAR Work, Kodak Scientific Computing Team (SCT), USA, 1997.
174. Breneman, C.M., Rhem, M., QSPR Analysis of HPLC Column Capacity Factors for a Set of High-Energy Materials Using Electronic van der Waals Surface Property Descriptors Computed by the Transferable Atom Equivalent Method, *J. Comp. Chem.*, 18, 182-197, 1997.
175. Breneman, C.R., Thompson, T., Rhem, M., Dung, M., Electron Density Modeling of Large Systems Using the Transferable Atom Equivalent Method, *Computers Chem.*, 19, 161-179, 1995.
176. Breneman, C.R., Martinov, M., The Use of Electrostatic Potential Fields in QSAR and QSPR, Molecular Electrostatic Potentials: Concepts and Applications, Murray, J.S., Sen, K. Eds., Elsevier Science B.V. Amsterdam, 1996.
177. Indústria Farmacêutica com sede nos Estados Unidos, 2190 Parkway Lake Drive, Birmingham, AL 35244.
178. Indústria Farmacêutica com sede nos Estados Unidos, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105.
179. Cechinel Filho, V., Vaz, V., Nunes, R.J., Calixto, J.B., Yunes, R.A., Antinociceptive Activity of Phyllanthimide Analogues: Structure-Activity Relationships, *Pharm. Sci.*, 2, 199-201, 1996.



- 
180. Cechinel Filho, Corrêa, R., Calixto, J.B., Nunes, R.J., Pinheiro, T.R., Andricopulo, A.D., Yunes, R.A., Further Studies on Analgesic Activity of Cyclic Imides, *II Farmaco*, 53, 55-57, 1998.
181. Andricopulo, A.D., Síntese de Compostos N-Aril e N-Alquilarilimídicos Cíclicos. Correlação Estrutura Química-Atividade Biológica. Dissertação de Mestrado, Florianópolis-SC, 1996.
182. Andricopulo, A.D., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Corrêa, R., Filho, A.W., Santos, A.R.S., Nunes, R.J., Synthesis and Analgesic Properties of Cyclic Imides: Naphthalimide and Bis-Naphthalimide Derivatives, *Acta Farm. Bon.*, 17, 219-224, 1998.
183. Andricopulo, A.D., Filho, A.W., Corrêa, R., Santos, A.R.S., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Analgesic Activity of 3,4-dichloromaleimides: Structure-Activity Relationships, *Pharmazie*, 53, 493-494, 1998.
184. Andricopulo, A.D., Cechinel Filho, V., Corrêa, R., Santos, A.R.S., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Analgesic Activity of Cyclic Imides: 1,8-Naphthalimide and 1,4,5,8-Naphthalenediimide Derivatives, *II Farmaco*, 1999: submetido.
185. Cechinel Filho, V., Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Produtos Naturais. Correlação Estrutura Química-Atividade Biológica, Tese de Doutorado, Florianópolis-SC, 1995.
186. Andricopulo, A.D., Cechinel Filho, V., Santos, A.R.S., Corrêa, R., Yunes, R.A., Nunes, R.J., Síntese e Atividade Analgésica de Imidas Cíclicas, *Catálogo de Produção Científica - UNIVALI*, 181-182, 1998.

- 
187. Kalckar, I.S., Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by Means of Specific Ezymes. 1. Determination of Hydroxypurines, *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443, **1947**.
188. Tuttle, J.V., Krenitsky, T.A., Effects of Acyclovir and its Metabolites on Purine Nucleoside Phosphorylase, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4085-4089, **1984**.
189. Stoecker, J.D., Parks Jr., R.E., Purine Nucleoside Phosphorylase, *Methods Pharmacol.*, **6**, 147-162, **1985**.
190. Leonora: Enzyme Kinetics on IBM PC and Compatibles, Version 1.0, Athel Cornish-Bowden **1994**. Este programa é distribuído com o software Analysis of Enzyme Kinetic Data, Oxford University Press, **1995**.
191. KaleidaGraph 3.0: Graphing & Analysis, Synergy Software, **1998**.
192. Collier, R.F., Dinnen, H.O.J., Johnson, C.A., Schneider, C., The Abdominal Response and its Supression by Analgesic Drugs, *Br. J. Pharmacol.*, **32**, 295-310, **1968**.
193. Frazer, J.W., Heckler, C.E., Honton, J., Mattes K., A New Modeling Paradigm, *Abstr. Am. Chem. Soc.*, **210: 48-Comp**, Part 1, Agosto, **1995**.
194. Andricopulo, A.D., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Nunes, R.J., Frazer, J.W., Cordes, E.H., Development of a Predictive Model for the Analgesic Activity of a Family of Imides, *Pharmazie*, **54**, **1999**: in press.
195. 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**.

- 
196. Karleson, M., Labanov, V.S., Katritsky, A.R., Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR, *Chem. Rev.*, **96**, 1027-1043, **1996**.
197. Wilson, L.Y., Famini, G.R., Using Theoretical Descriptors in Quantitative Structure-Activity Relationships: Some Toxicological Indices, *J. Med. Chem.*, **34**, 1668-1674, **1991**.
198. WinSIMS 3.1: Copyright by Eastman Kodak Company, 1997.
199. PERCOLATOR 39: A Macro Sequencing Program for the Generation of Qualified Matrices of Models (MOMs) for Property Prediction and Optimization. Copyright by Eastman Kodak Company, 1997.
200. *Scientific Computing Team*: Database for Drug Discovery (não publicado).
201. Miles, R.W., Peter, C.T., Furneaux, R.H., Bagdassarian, Schramm, V.L., One-Third-the-Sites Transition-State Inhibitors for Purine Nucleoside Phosphorylase, *Biochemistry*, **37**, 8615-8621, **1998**.
202. Onuffer, J.J., Kirsch, J.F., Characterization of the Apparent Negative Cooperativity induced in *Escherichia coli* Aspartate for a Extremely Slow Conformation Change, *Protein Engin.*, **7**, 413-424, **1994**.
203. Montgomery, J.A., comunicação pessoal.
204. Tempesta, M.S., Corley, J.A., Beutler, C.J., Metral, R.A., Giacomozzi, C.A., Calixto, J.B., Phyllantimide, a New Alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*, *J. Nat. Prod.*, **3**, 617-618, **1988**.
205. Cechinel Filho, V., Pinheiro, T.R., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Cruz, A.B., Moretto, E., Antibacterial Activity of N-Phenylmaleimides, N-Phenylsuccinimides and Related Compounds. Structure-Activity Relationships, *Il Farmaco*, **49**, 675-677, **1994**.

- 
206. Cechinel Filho, V., Cruz, A.B., Corrêa, R., Gonzaga, L., Atividade Antimicrobiana de Análogos da Filantimida, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **23**, 116, **1994**.
207. Corrêa, R., Rosa, P.W., Cruz, A.B., Savi, A.O., Cechinel Filho, V., Nunes, R.J., Synthesis and Antibacterial Activity of Citraconimides, *Pharm. Sci.*, **2**, 353-355, **1996**.
208. Cruz, A.B., Cruz, R.C.B., Cechinel Filho, Júnior, D.A., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Avaliação dos Efeitos Antibacterianos de N-Arildicloromaleimidas e N-Ariltalimidas. Relação Estrutura Atividade, *Rev. Latinoamer. Quím.*, **25**, 10, **1996**.
209. Andricopulo, A.D., Yunes, R.A., Nunes, R.J., Savi, A.O., Corrêa, R., Cruz, A.B., Cechinel Filho, V., Síntese e Atividade Antibacteriana de Imidas Cíclicas: 3,4-dicloromaleimidas e 3-Cloro-4-Substituída-Maleimidas, *Quím. Nova*, **21**, 573-577, **1998**.
210. Corrêa, R., Rosa, P.W., Andricopulo, A.D., Cechinel Filho, V., Schlemper, C.I., Pereira, Nunes, R.J., Síntese e Atividade Biológica de Novos Compostos Imídicos Cíclicos Sulfonados, *Alcance*, **5**, 5-9, **1998**.
211. Cechinel Filho, V., Pinheiro, T.R., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Queiroz, E.F., Lima, E.O., Síntese de N-Alquilfenilmaleimidas e N-Alquilarilmaleimidas com Atividade Antifúngica, *Quím. Nova*, **19**, 590-594, **1996**.
212. Lima, E.O., Queiroz, E.F., Andricopulo, A.D., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Corrêa, R., Cechinel Filho, V., Evaluation of Antifungal Activity of N-Aryl-Maleimides and N-Phenylalkyl-3,4-Dichloro-Maleimides, *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **44**, 185-189, **1999**.

213. Cechinel Filho, V., Nunes, R.J., Calixto, J.B., Yunes, R.A., Inhibition of Guinea-Pig Ileum Contraction by Phyllantymide Analogues: Structure-Activity Relationships, *Pharm. Sci.*, 1, 399-401, 1995.
214. Topliss, J. G., A Manual Method for Applying the Hansch Approach to Drug Design, *J. Med. Chem.*, 20, 463-469, 1977.