



Grupo de Pesquisa em Estrutura
de Sistemas Biomoleculares – GPESB

Planejamento Racional de Fármacos: aplicações na interface seco-molhado

Floriano Paes Silva-Jr, Dsc.

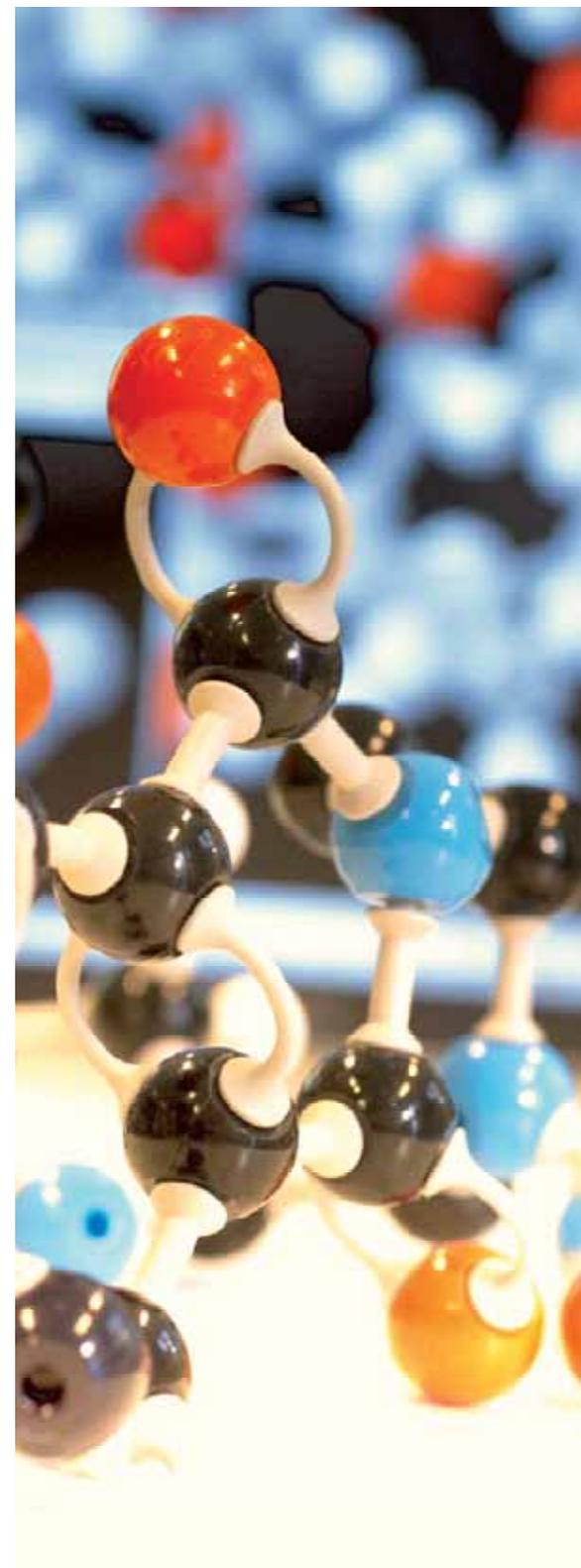
Laboratório de Bioquímica de Proteínas e
Peptídeos, IOC/FIOCRUZ



Roteiro da Palestra

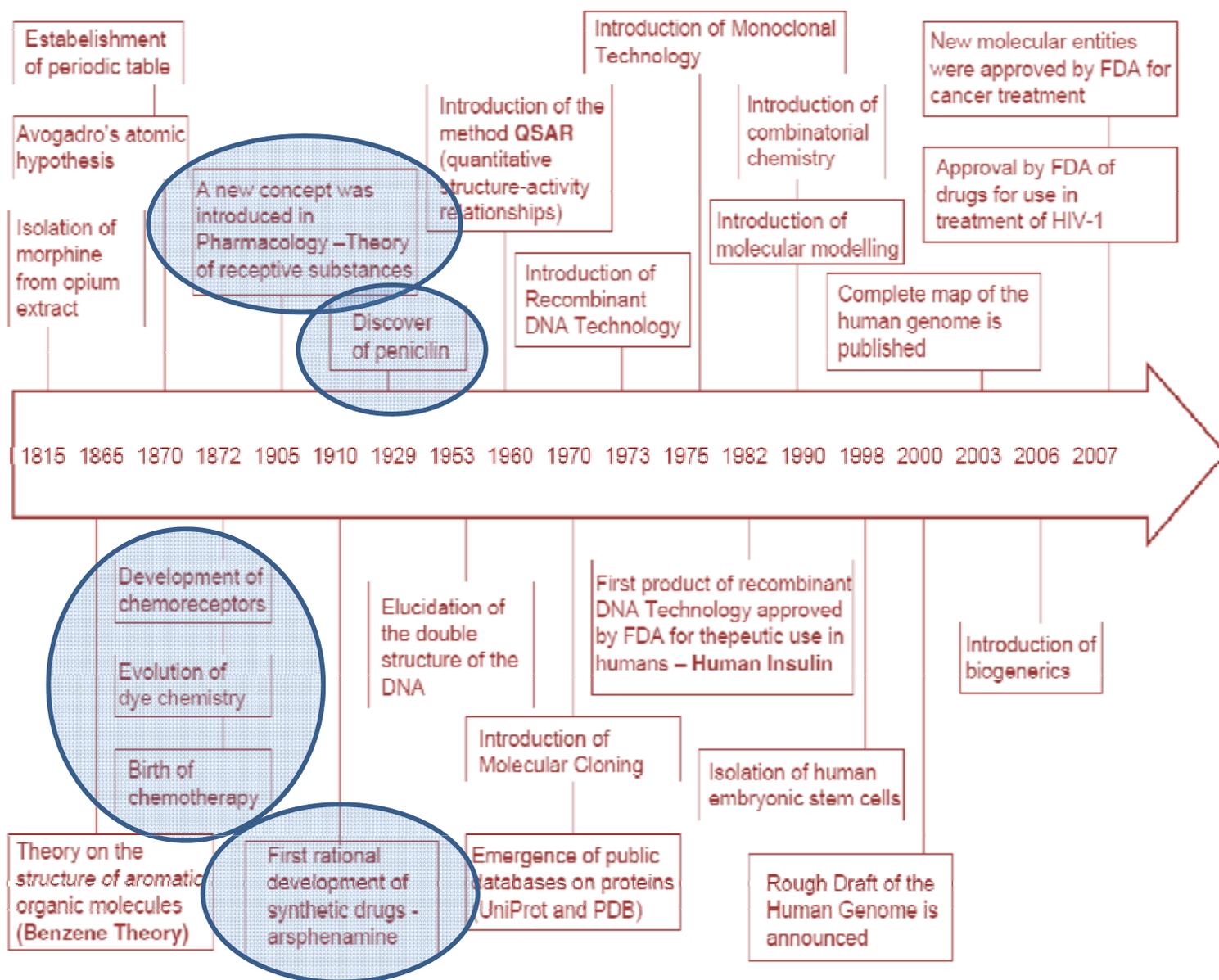
- Introdução
 - Do serendipismo ao planejamento racional (PR)
 - PR na era pós-genômica
 - PR ao nível de sistemas
- Aplicações
 - PR *in silico*: Ligante Vs Estrutura do Alvo
 - O que faz um bom alvo molecular?
 - Exemplo: Inibidores de glicosidases GH13

INTRODUÇÃO



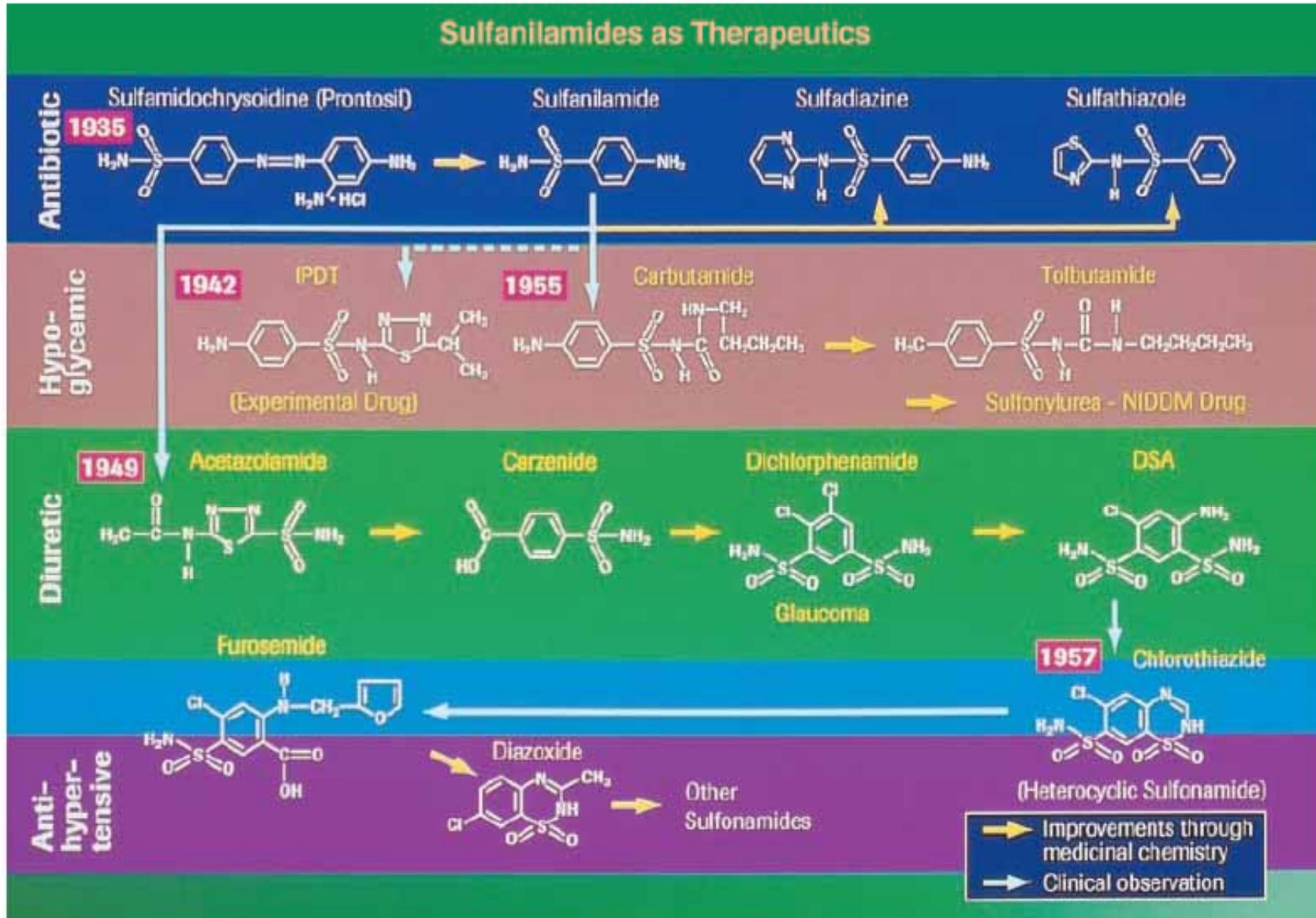


Do serendipismo ao planejamento racional



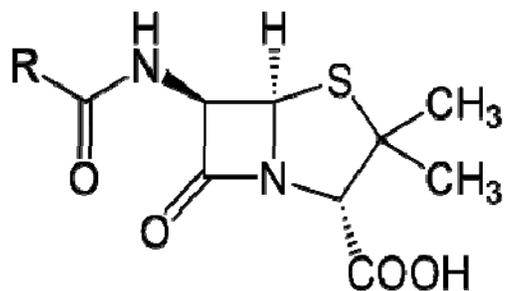
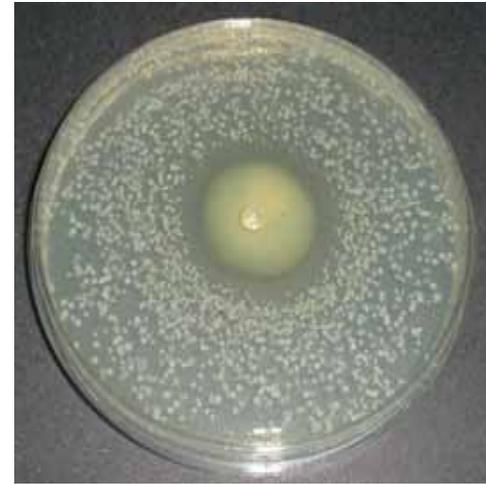
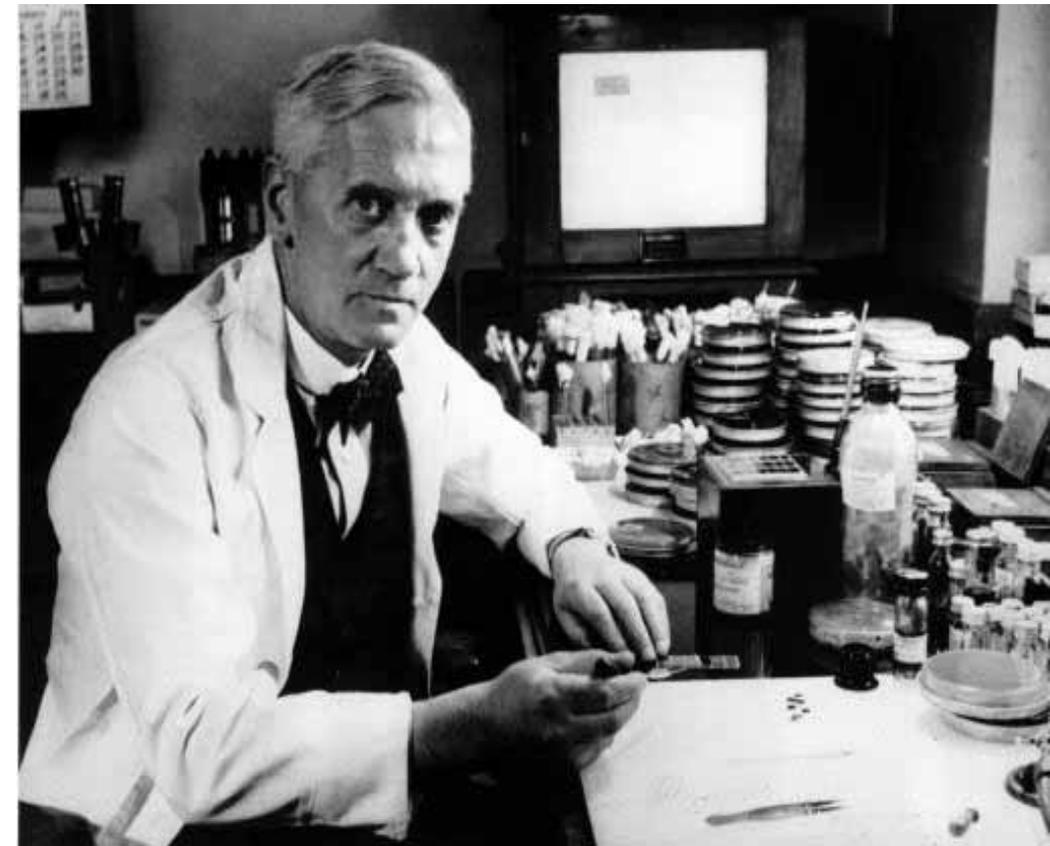


Primeiros antibióticos: sulfanilamidas





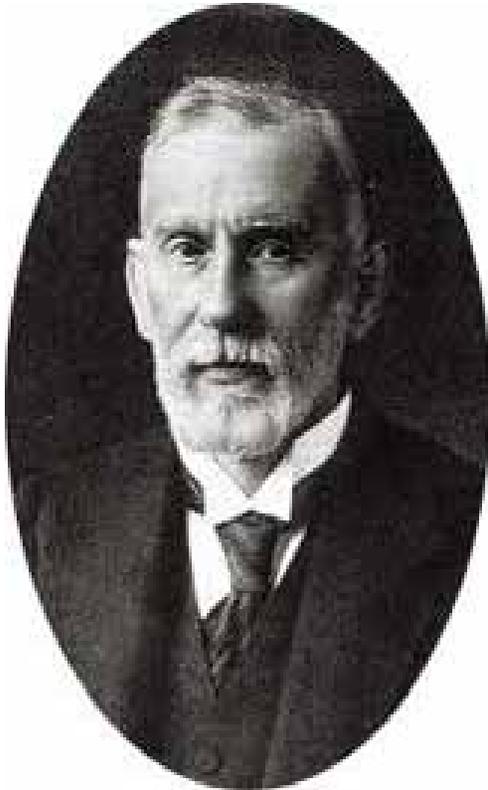
A. Fleming e a Penicilina



[VÍdeo descoberta da penicilina](#)

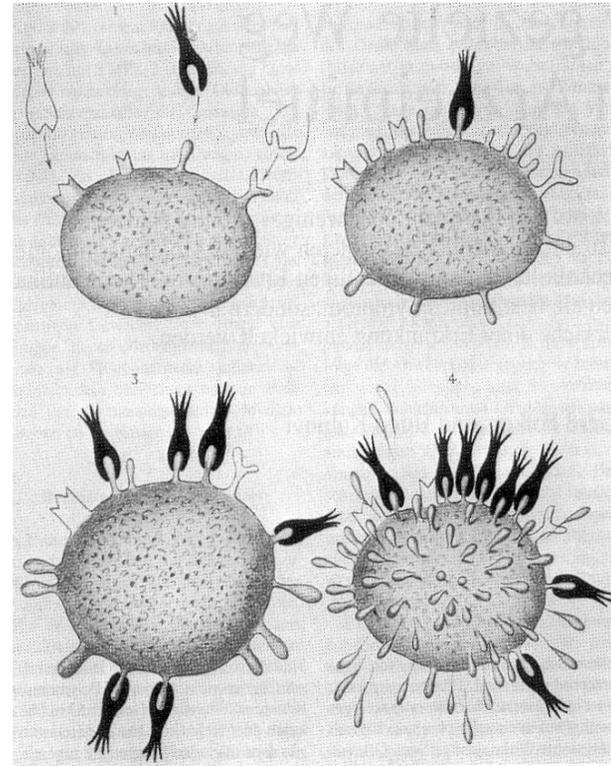


O nascimento do paradigma do alvo molecular



Paul Ehrlich (1854-1915)

Teoria do Receptor ,1900

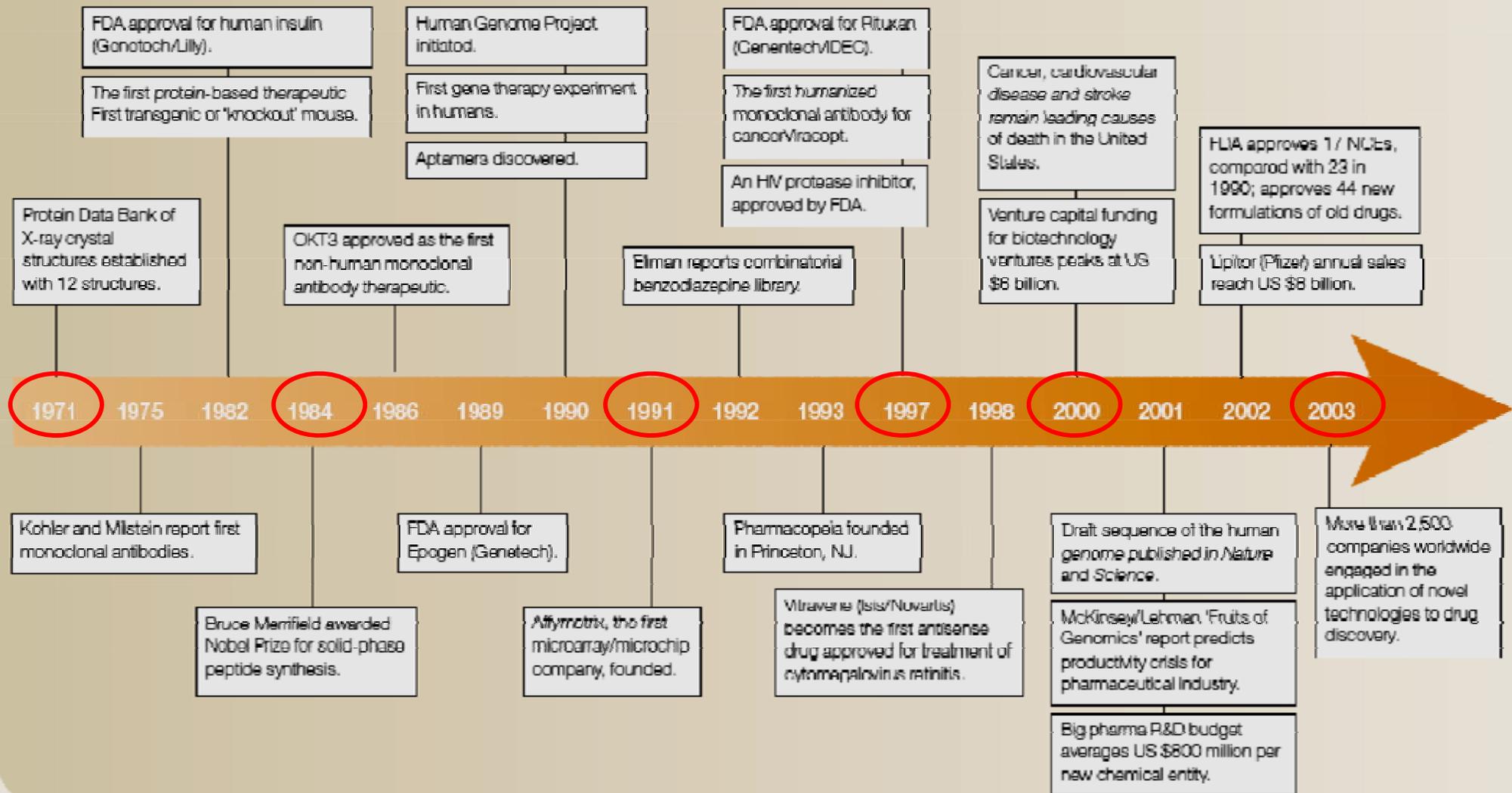


A interação específica entre receptores da superfície celular e seus ligantes



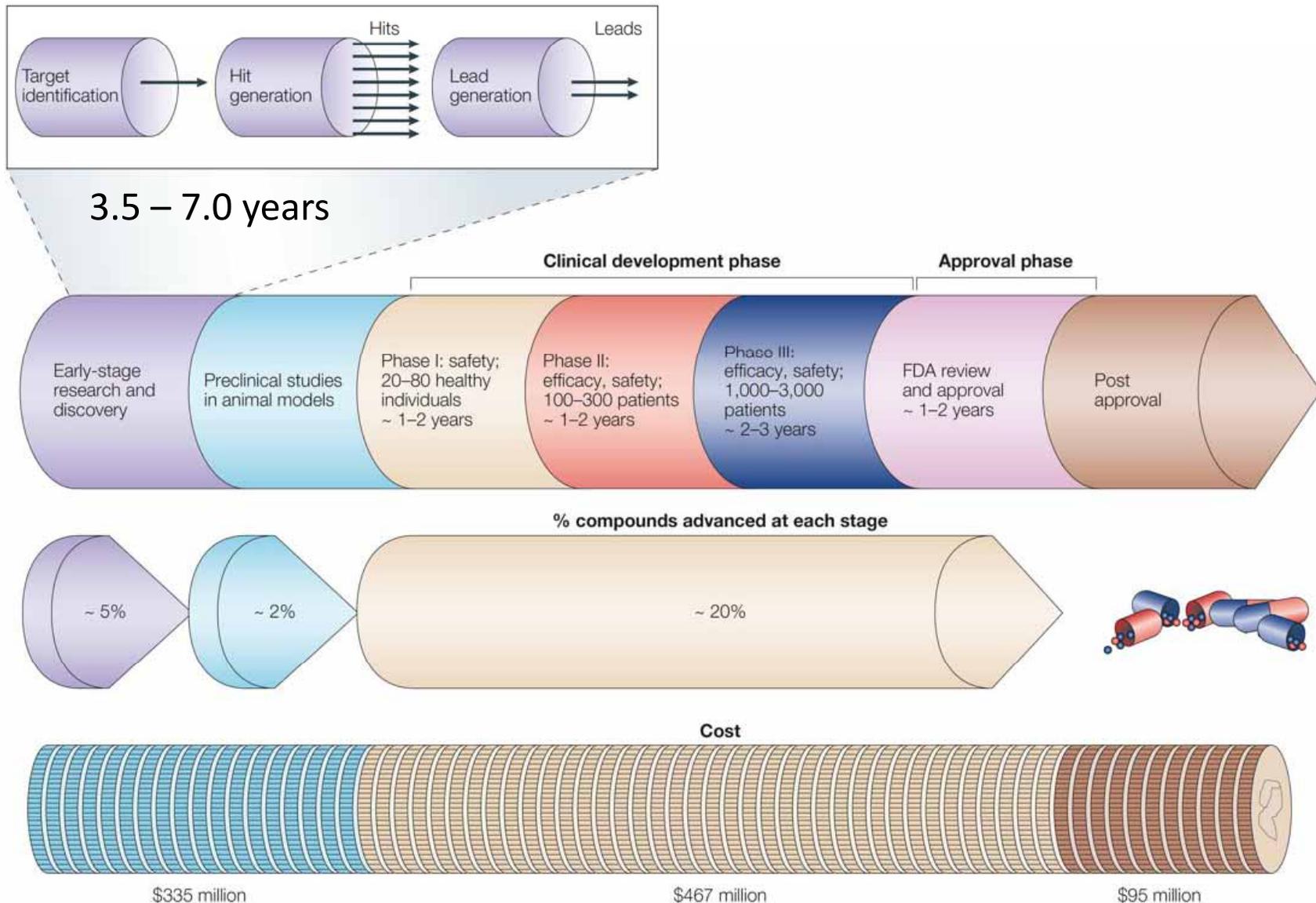
Marcos no desenvolvimento de fármacos baseado no alvo molecular

Timeline | Selected evolutionary landmarks in drug discovery



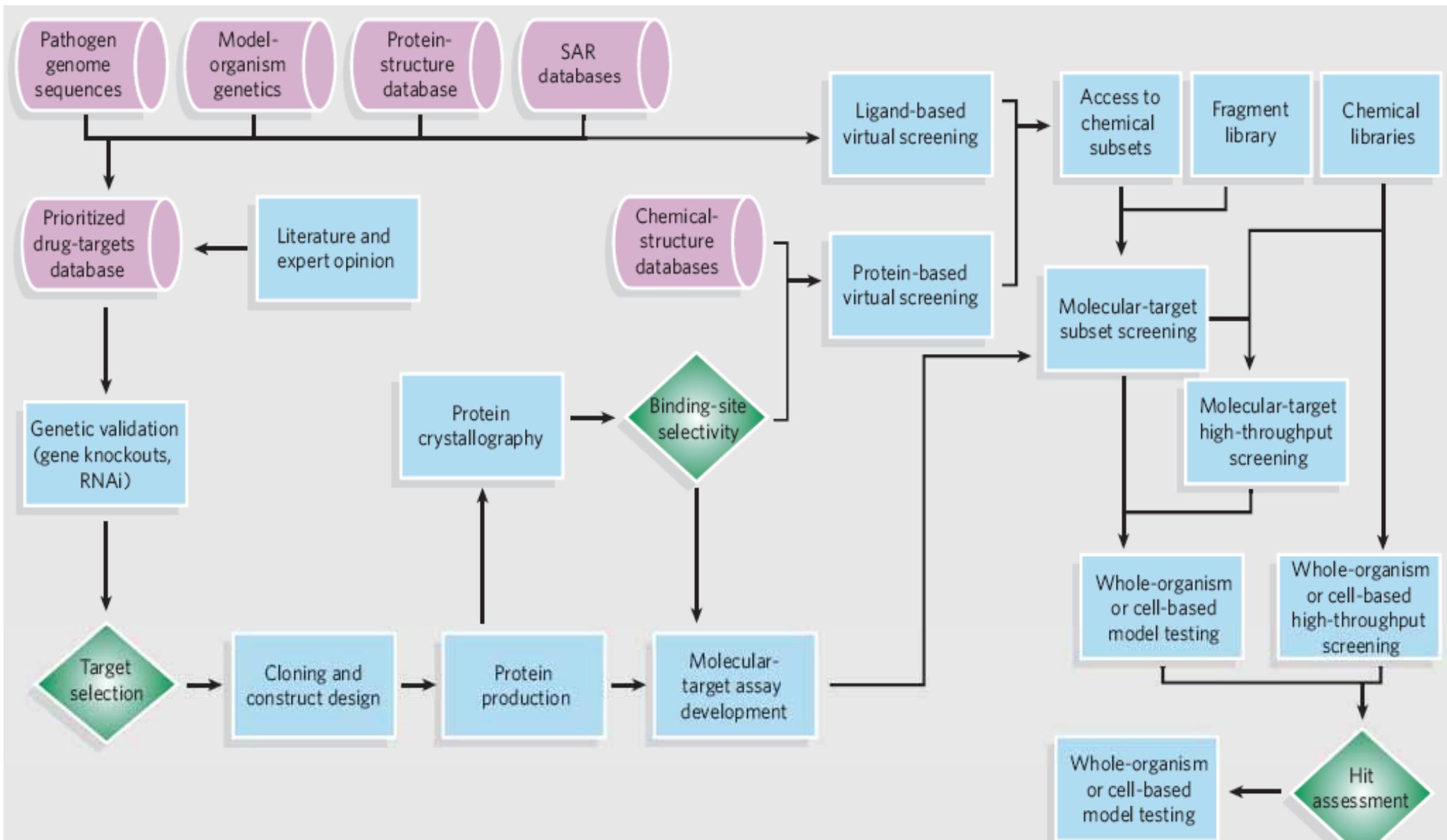


Fases do Processo Atual de Descoberta de Fármacos e seus custos



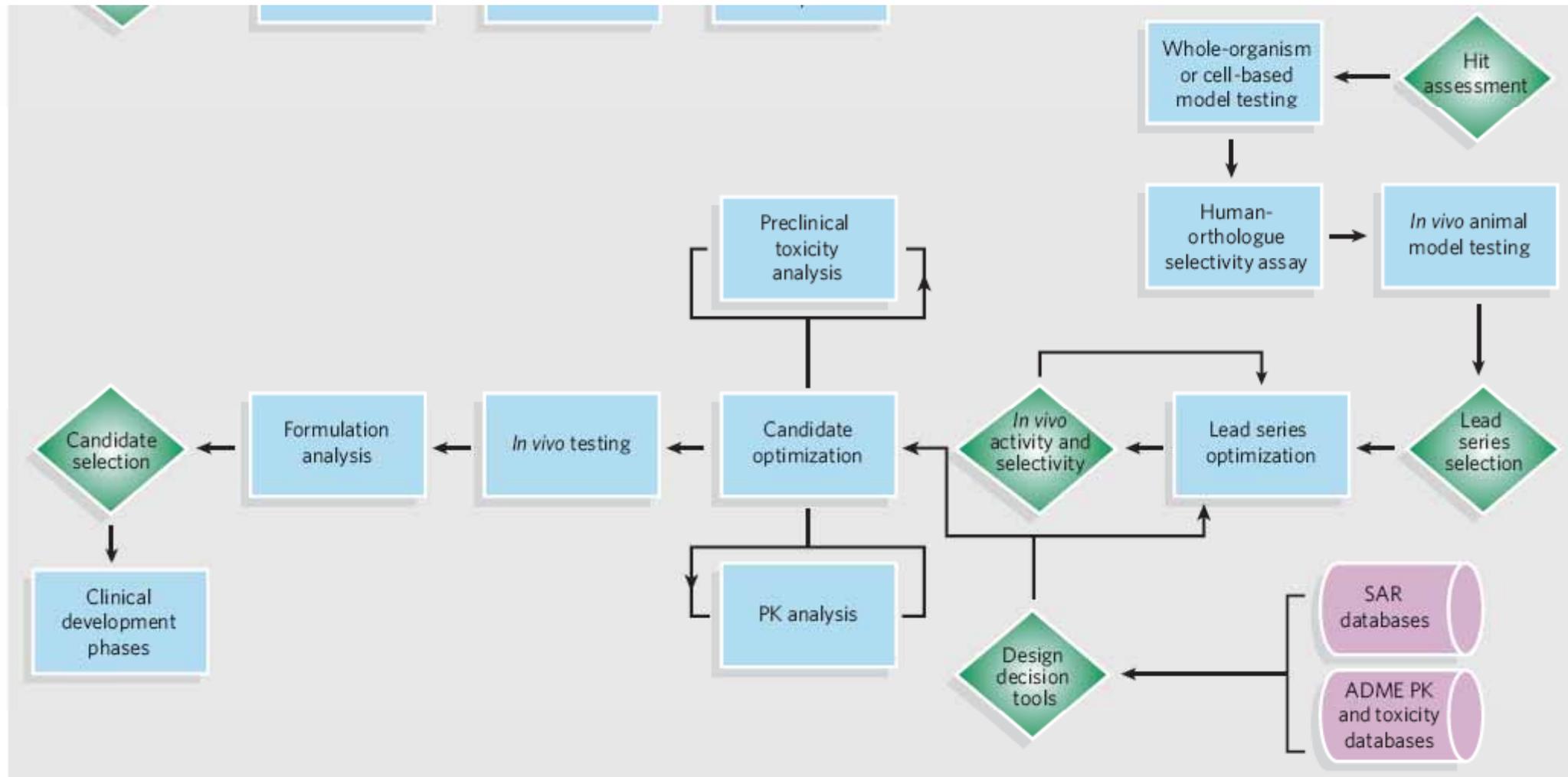


Do genoma para a clinica



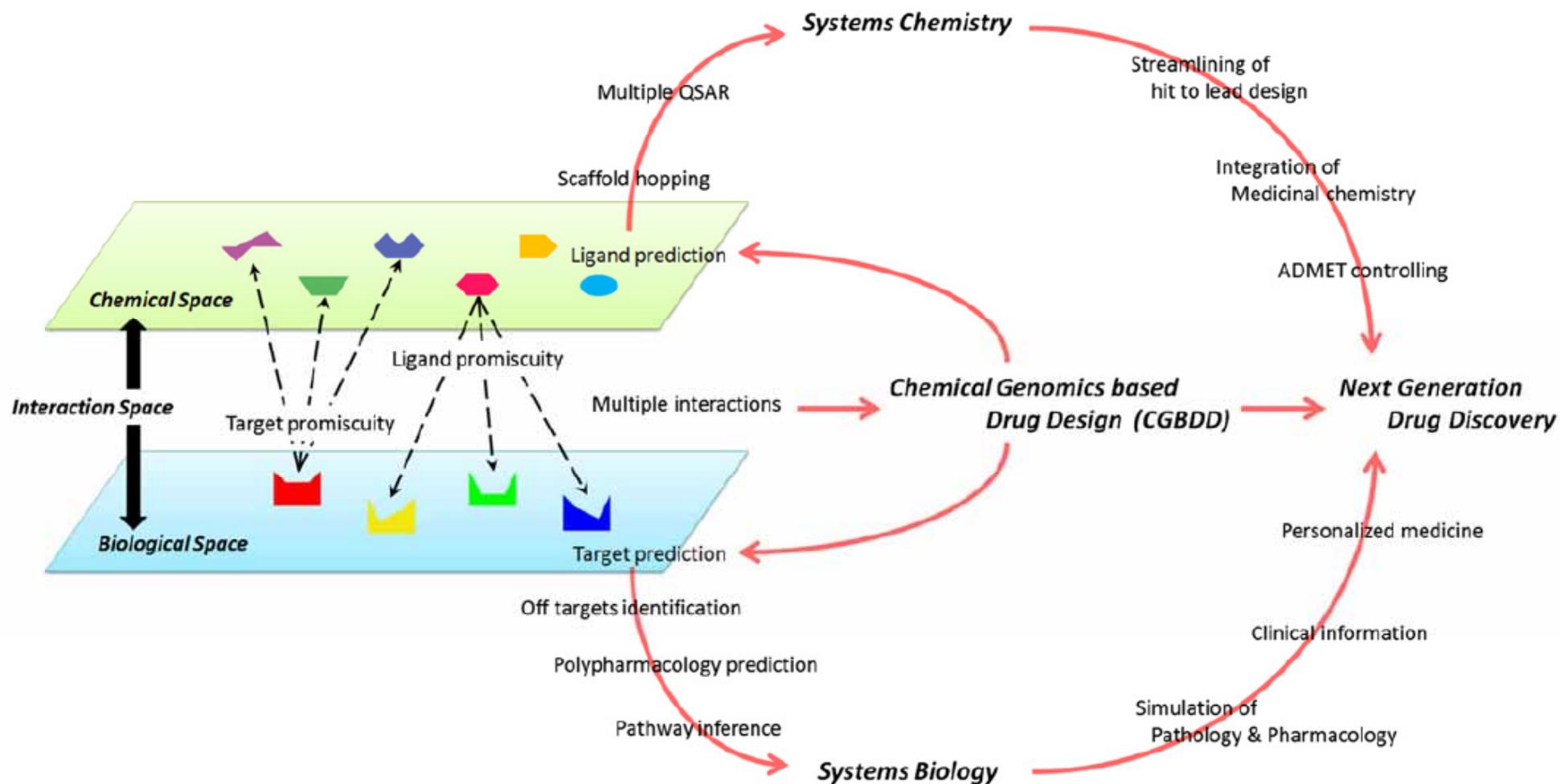


Do genoma para a clinica





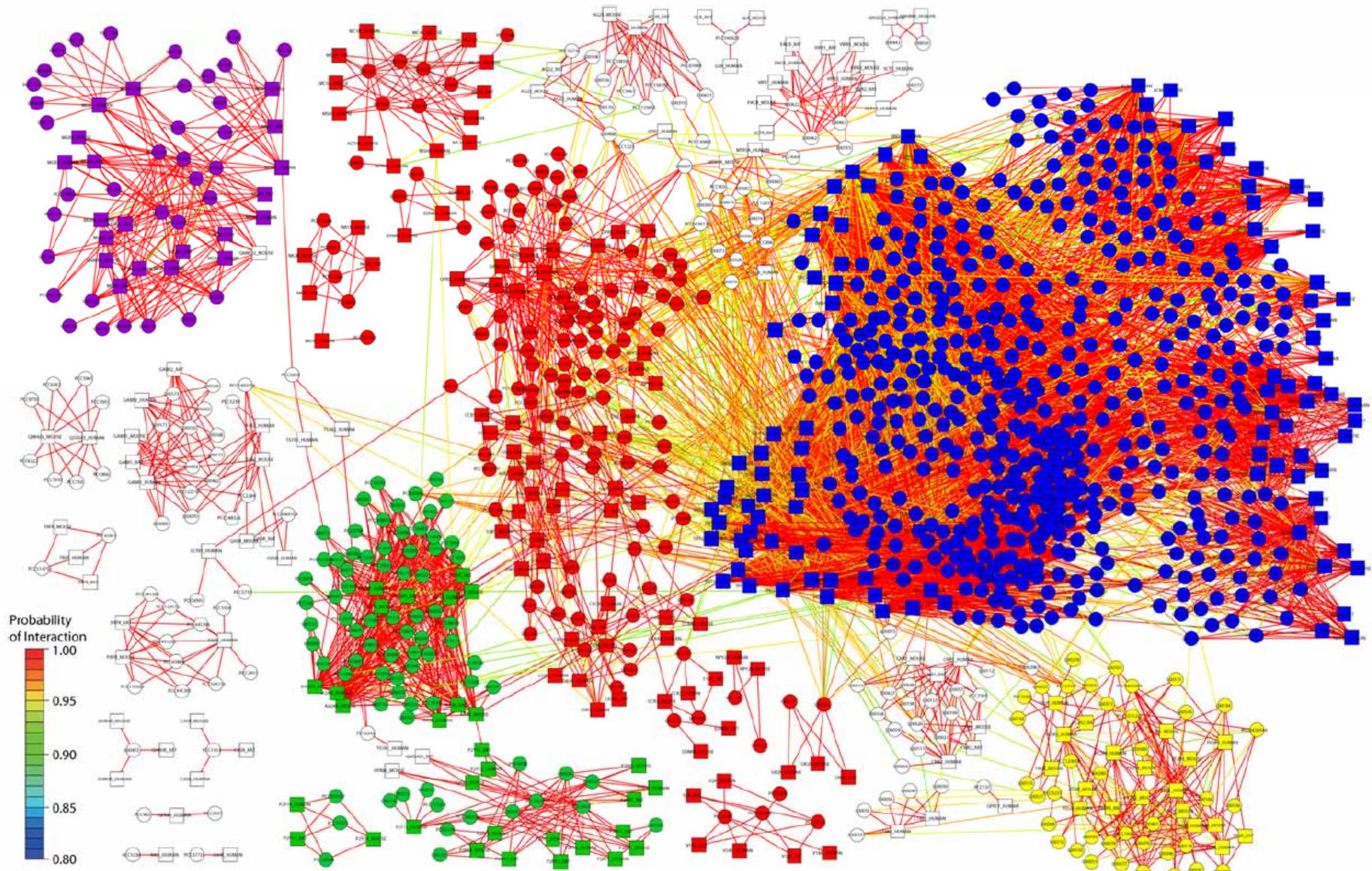
Mapa para Planejamento de Fármacos ao Nível de Sistemas



Brown, J. B., & Okuno, Y. (2012). Systems biology and systems chemistry: new directions for drug discovery. *Chemistry & Biology*, 19(1), 23–8.



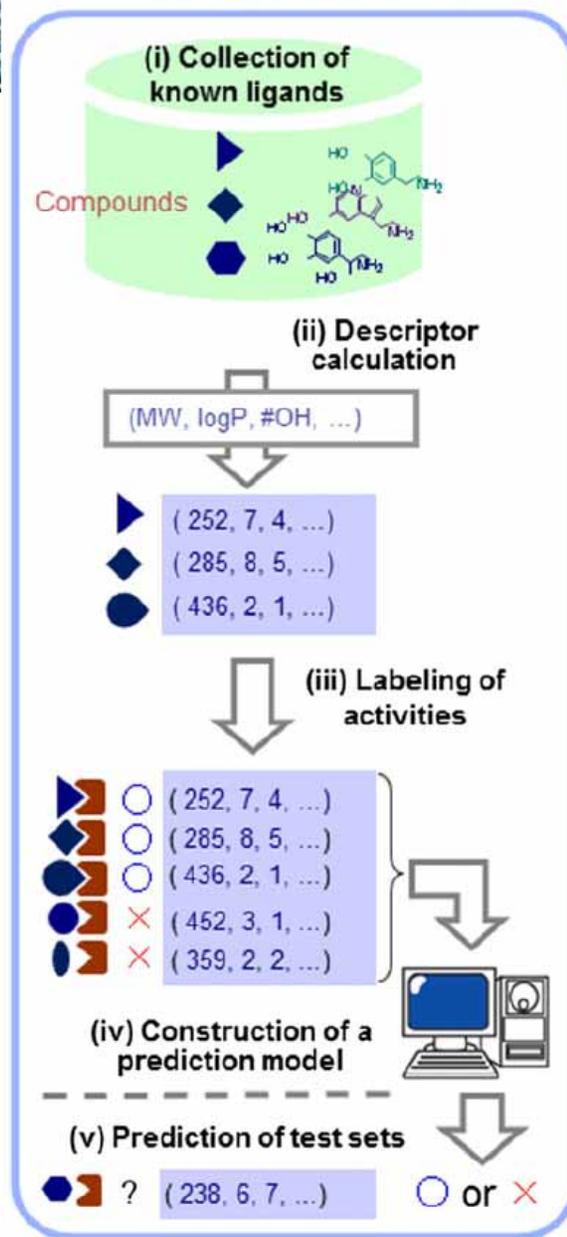
Redes de Interação Proteína-Ligante



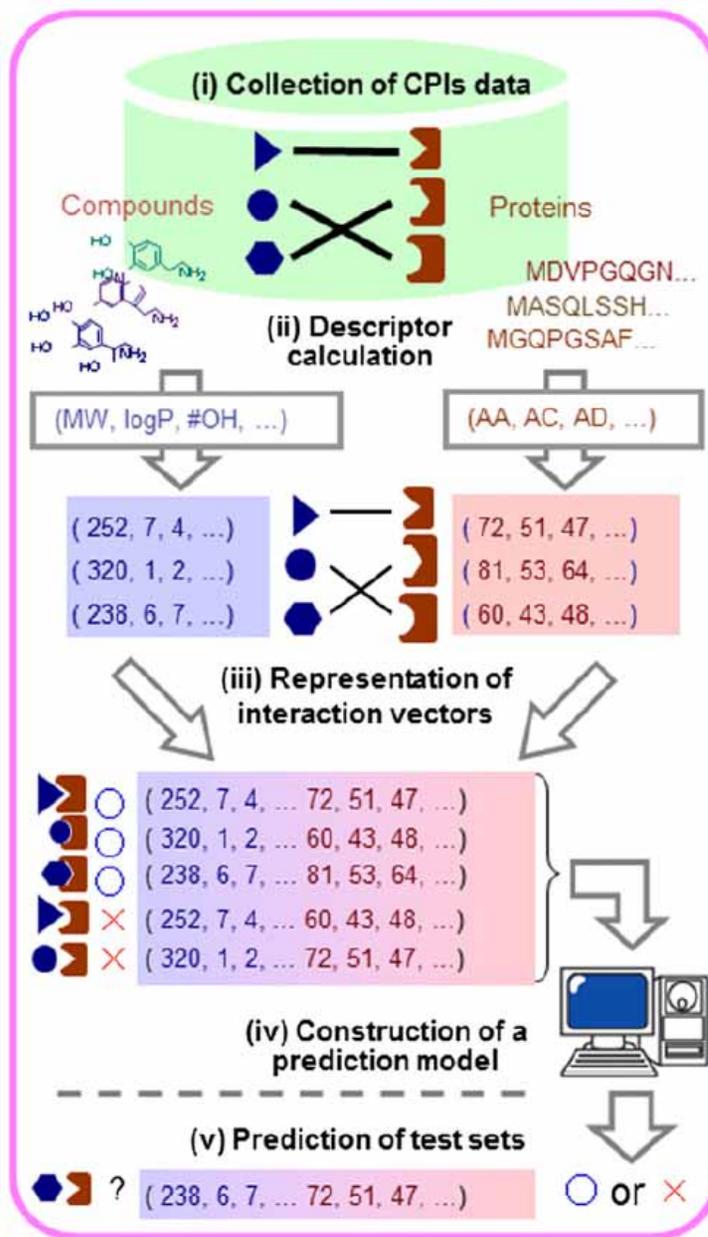
Brown, J. B., & Okuno, Y. (2012). Systems biology and systems chemistry: new directions for drug discovery. *Chemistry & Biology*, 19(1), 23–8.



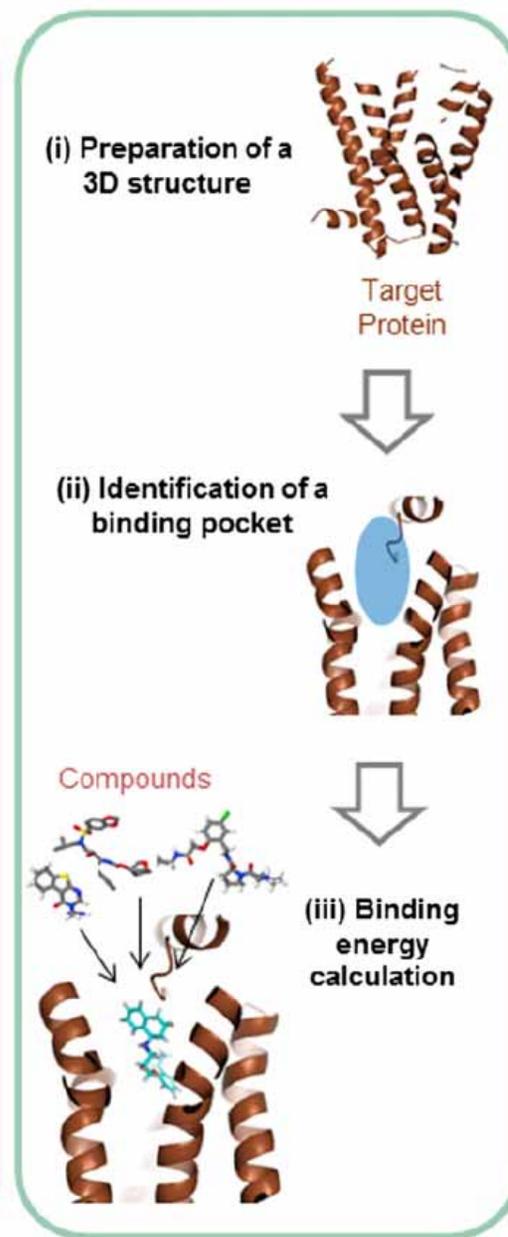
Ligand-based VS



Chemical genomics-based VS

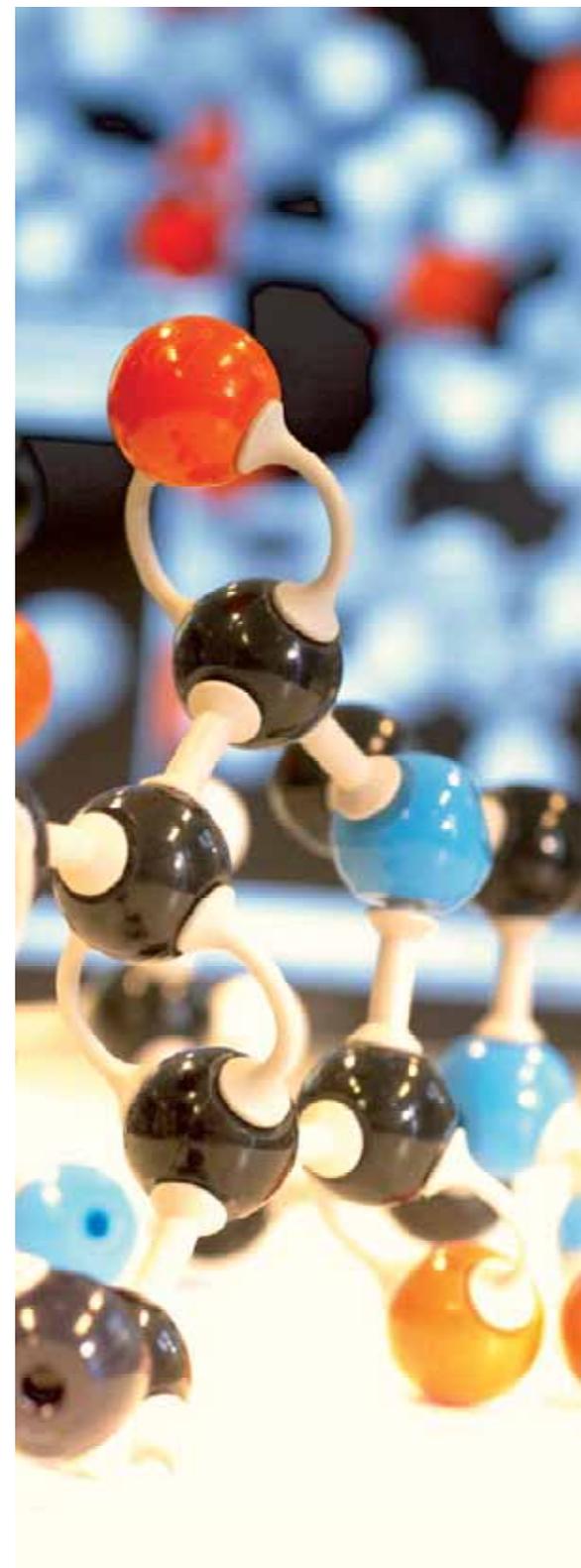


Structure-based VS



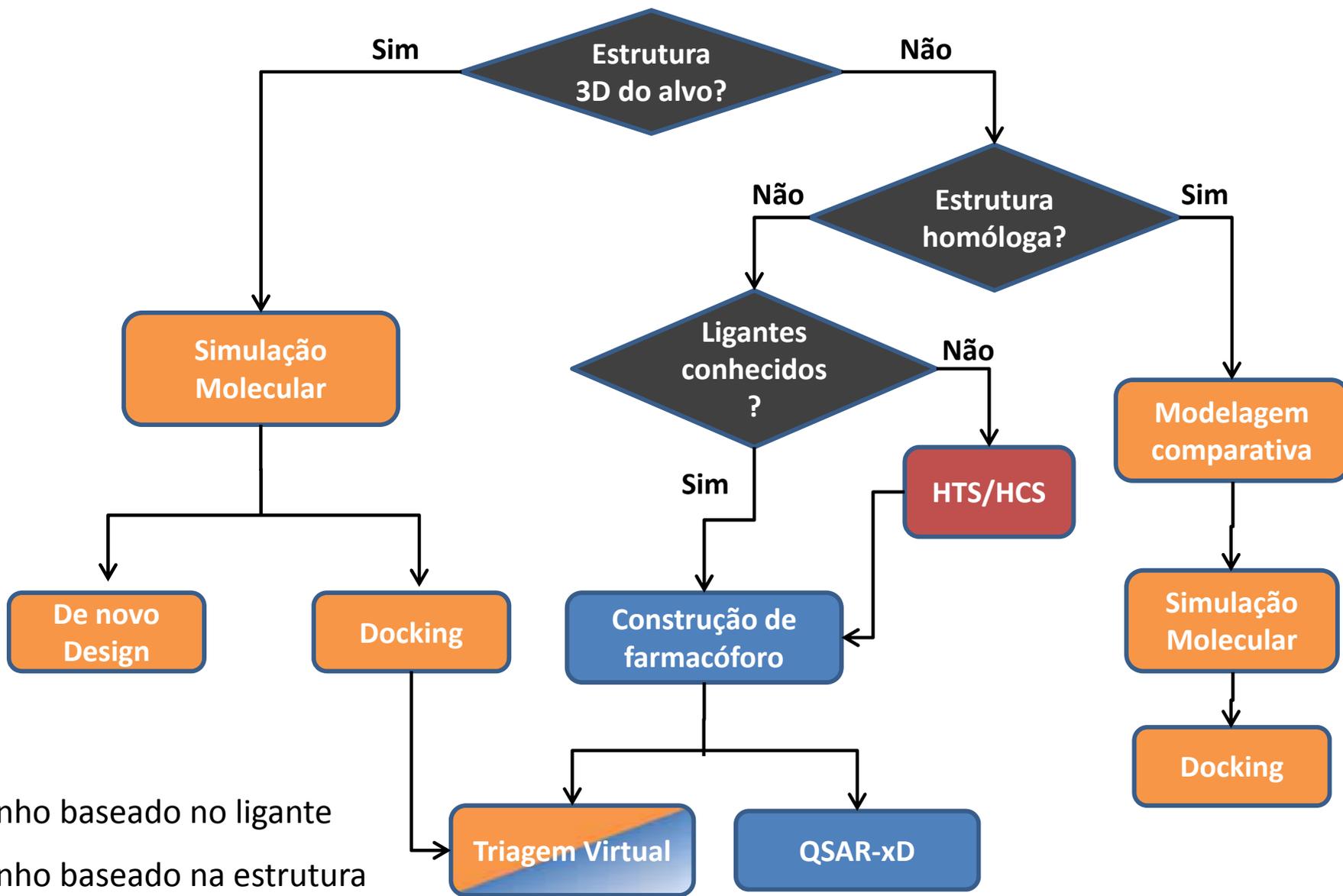
Brown, J. B., & Okuno, Y. (2012). Systems biology and systems chemistry: new directions for drug discovery. *Chemistry & Biology*, 19(1), 23–8.

APLICAÇÕES





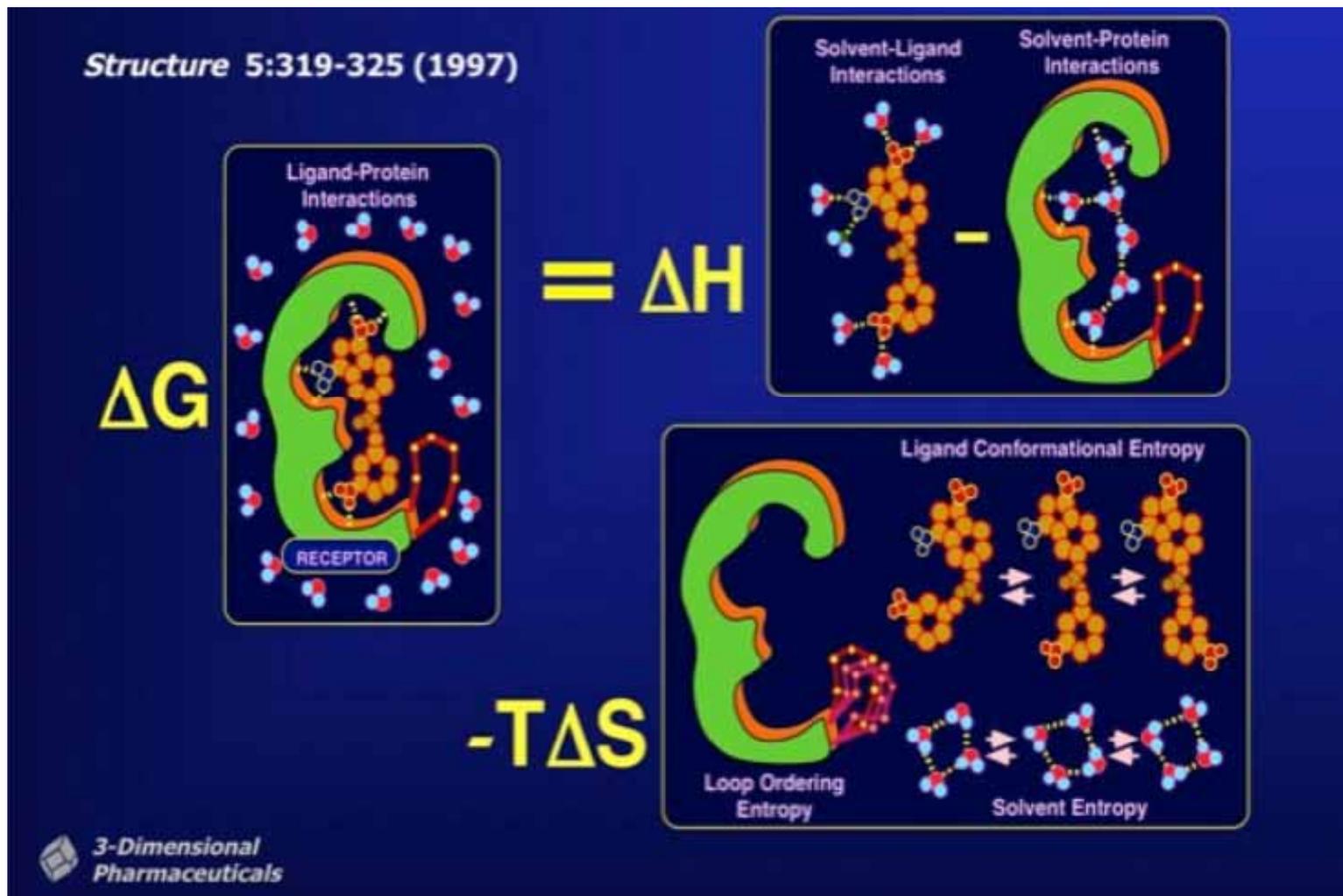
Guia para PR *in silico*





Desenho Baseado na estrutura

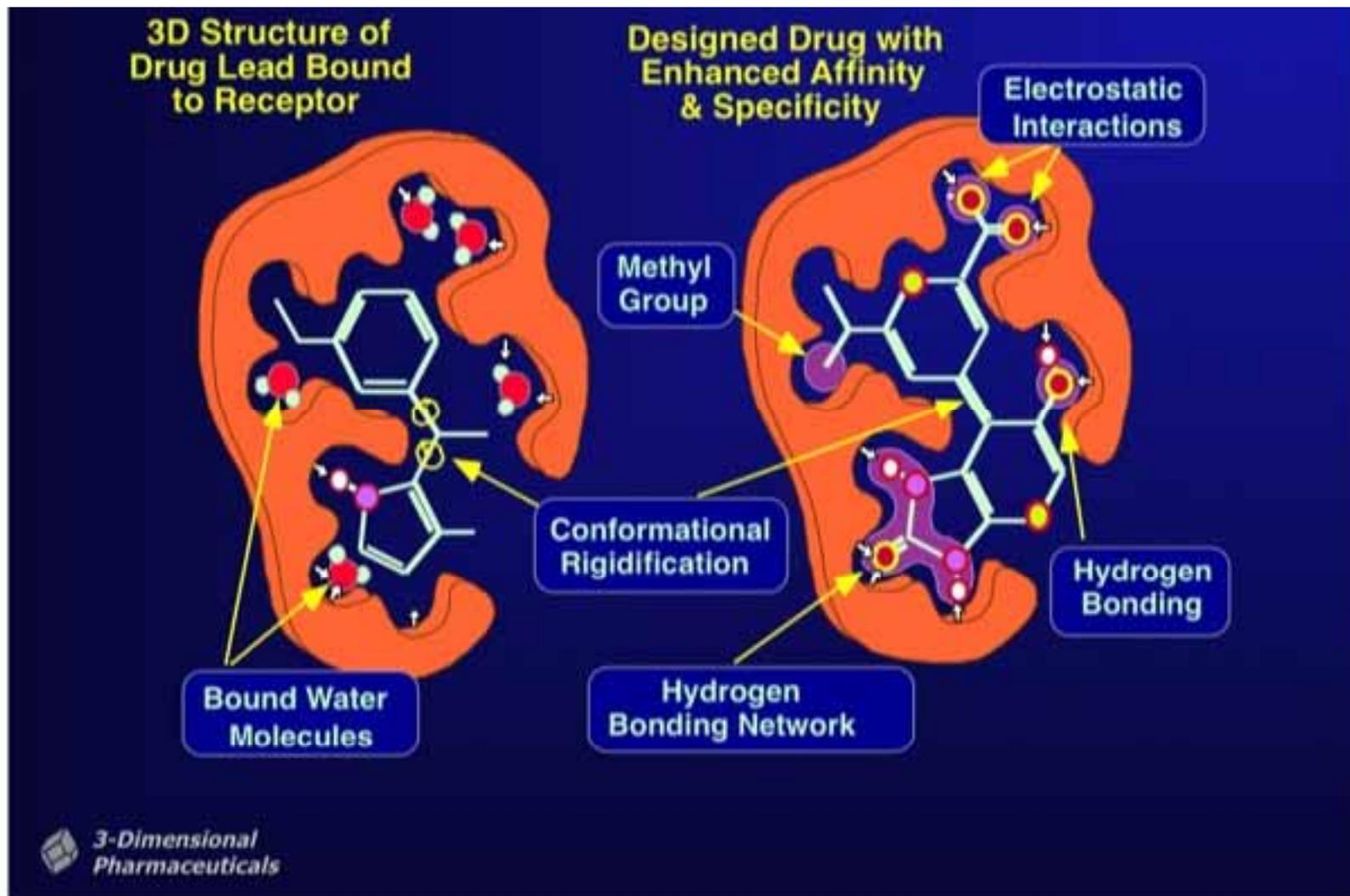
- Termodinâmica da afinidade de ligação





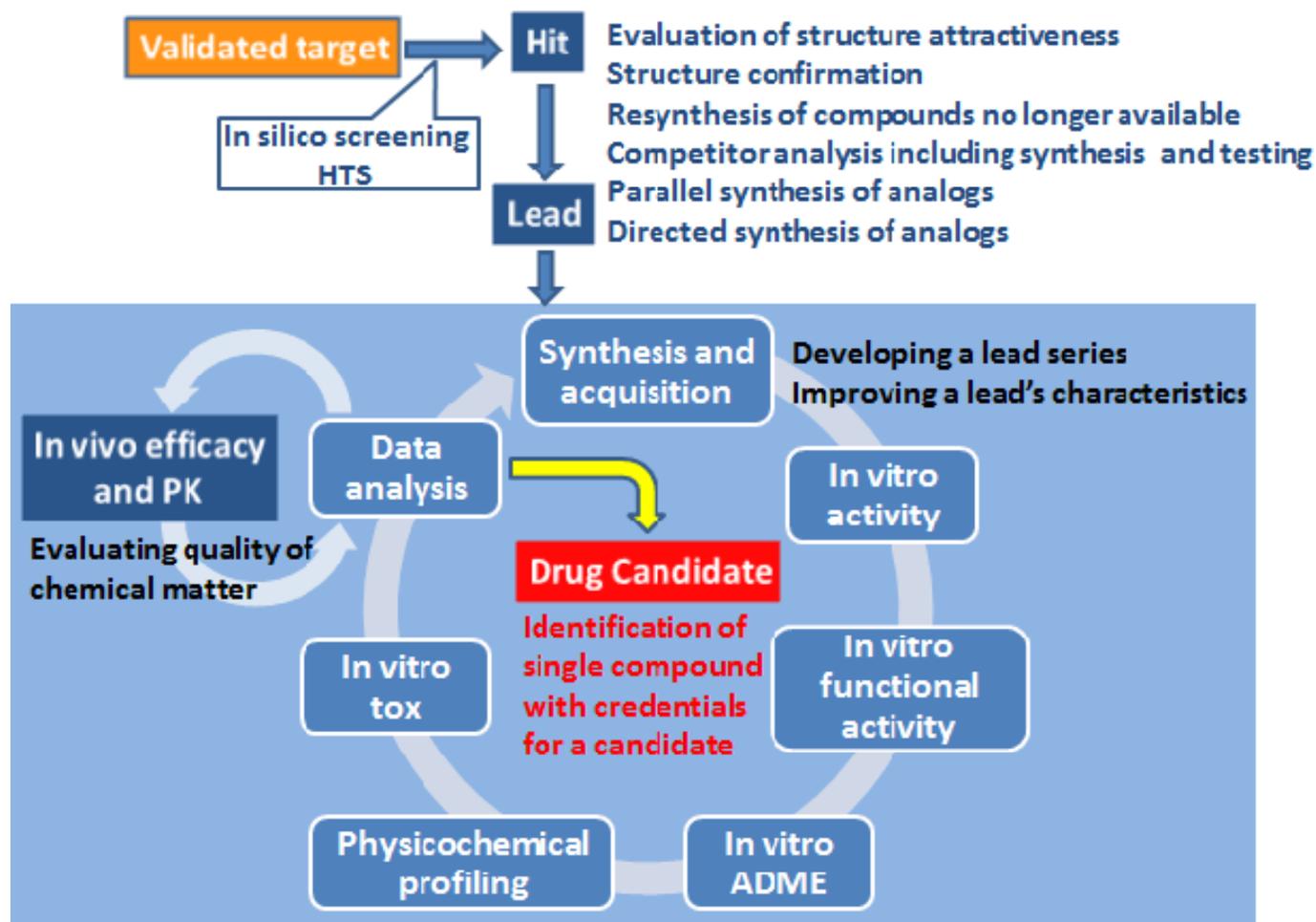
Desenho Baseado na estrutura

- Diretrizes gerais para otimização da afinidade



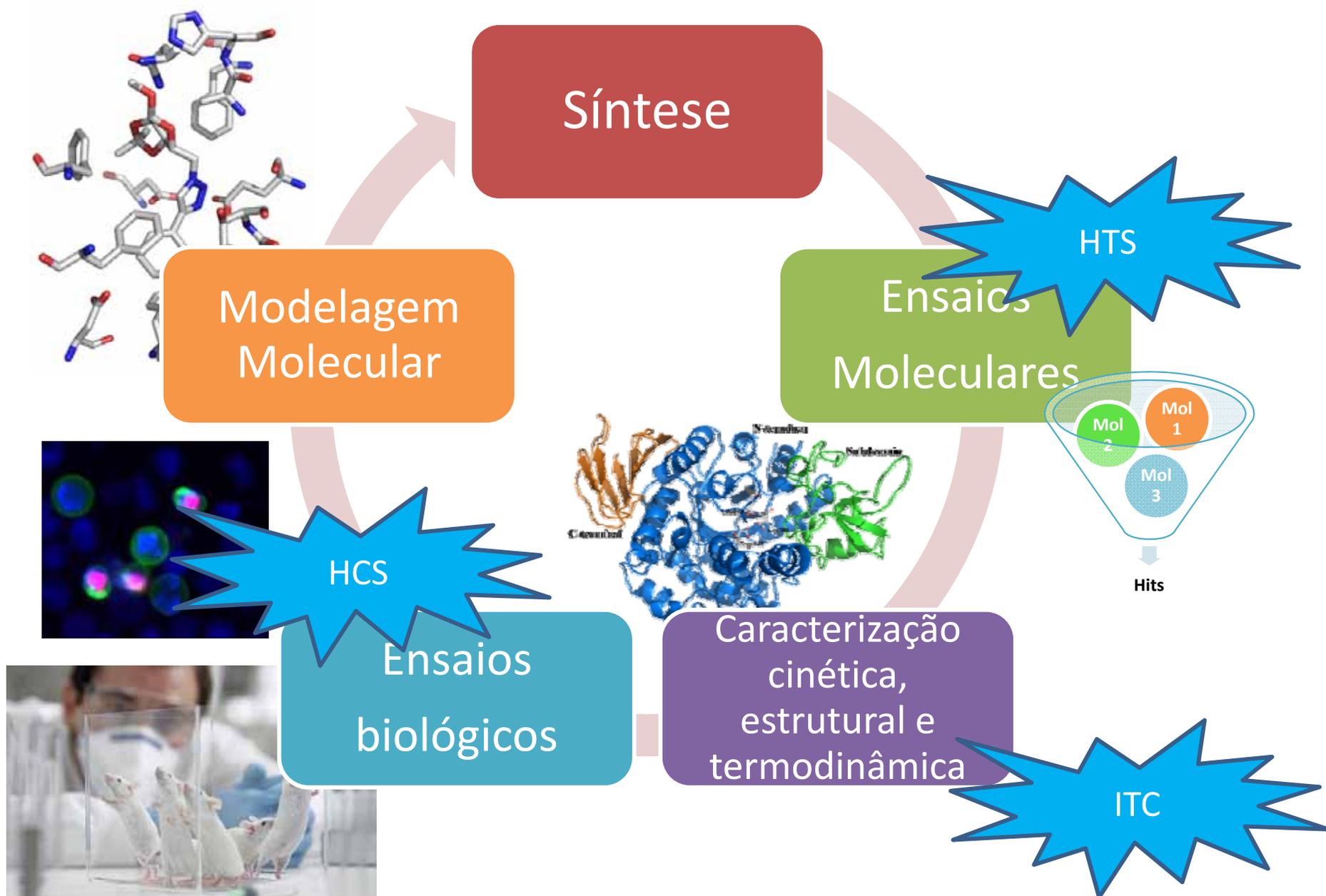


Ciclo de Otimização de Compostos Líderes



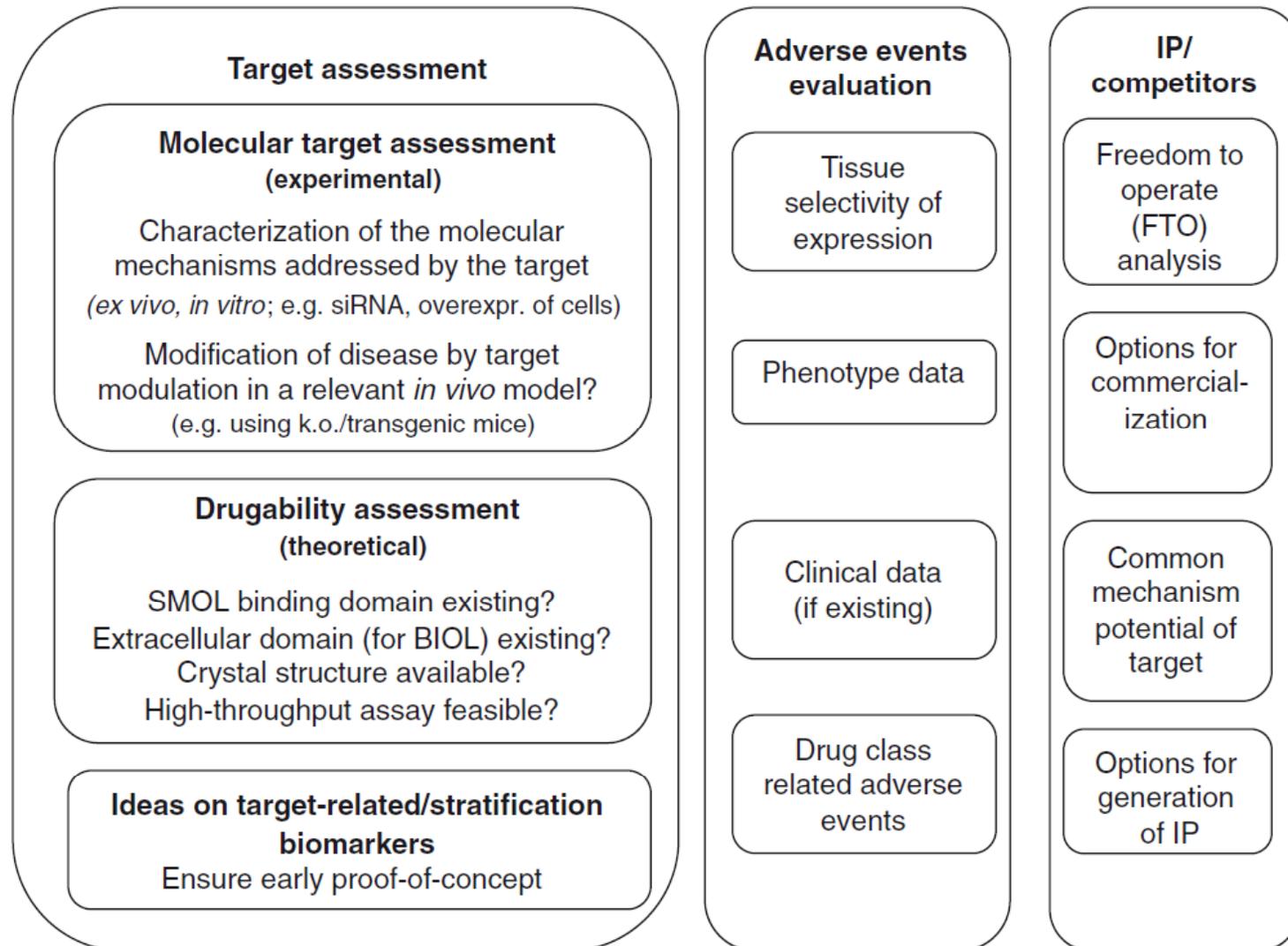


Ciclo do PR no GPESB





O que faz um bom alvo molecular?



Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A., & Asadullah, K. (2011). What makes a good drug target? *Drug Discovery Today*, 16(December), 1037–1043.



O que faz um bom alvo molecular?

TABLE 1

Target classes addressed by SMOLs, BIOLs and nucleic acids and their modes of action

Drug	Covered target classes	Mode of action
Small molecular weight chemical compound (SMOL)	Enzymes	Inhibitors, activators ^a
	Receptors	Agonists, antagonists, modulators, allosteric activators, sensitizers
	Transcription factors	Inhibitors, activators
	Ion channels	Inhibitors, openers
	Transport proteins	Inhibitors
	Protein–protein interface	Inhibitors of protein–protein interaction ^a
	Nucleic acids	Alkylation, complexation, intercalation
Biologics (BIOL)	(Extracellular) proteins	Antibodies
	Transmembrane receptors, extracellular proteins	Recombinant proteins
	Cell surface receptors	Antibody–drug conjugates (ADCs)
	Substrates and metabolites	Enzymatic cleavage
Nucleic acids	RNA	RNA interference

^a Novel approaches.

Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A., & Asadullah, K. (2011). What makes a good drug target? *Drug Discovery Today*, 16(December), 1037–1043.

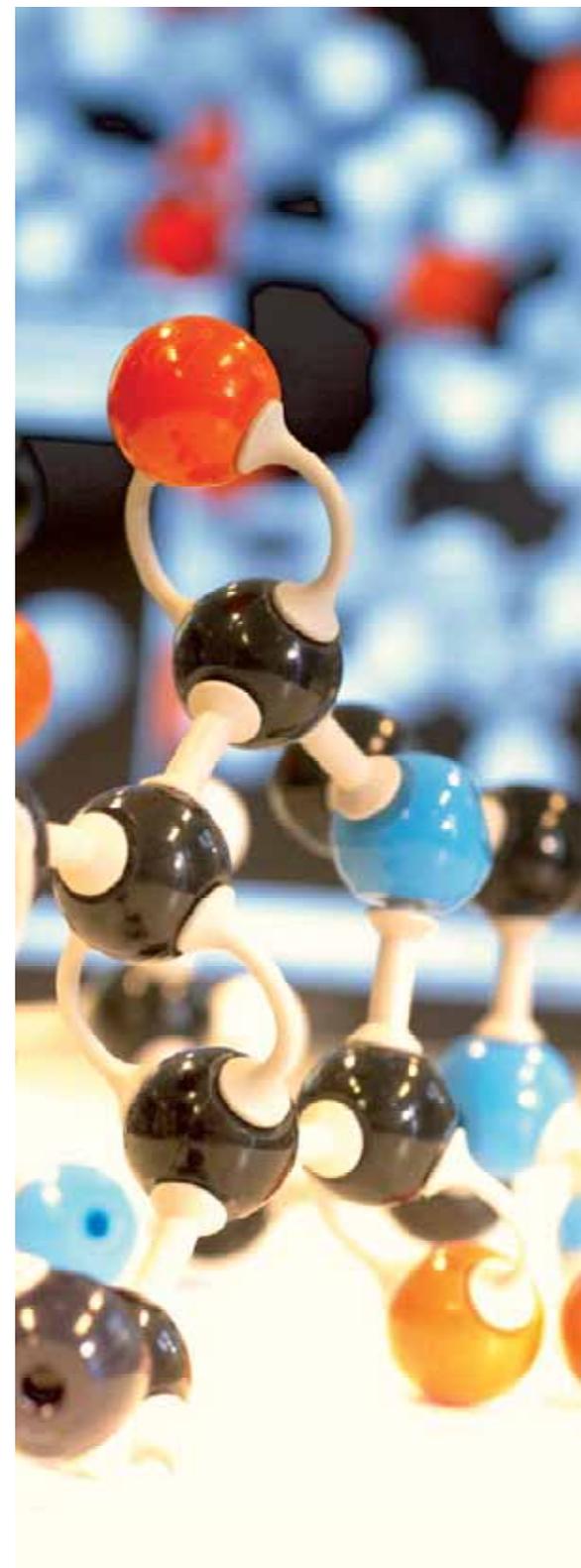


Alguns alvos do GPESB

- Aspartil Proteases de *S. mansoni*
 - Antiparasitários
- Topoisomerasas I e/ou II humanas
 - Anticancerígenos
- Glicosidasas
 - Antidiabéticos
 - Antiinfectivos
 - Anticancerígenos
 - Gaucher e outras DAL's

Antidiabéticos

GLICOSIDASES DIGESTIVAS HUMANAS





Glicosidases

- Hidrolisam ligações glicosídicas em di-, oligo- e polissacarídeos
- São encontradas em todos os organismos vivos
- Envolvidas em vários processos biológicos importantes:
 - Digestão → Diabetes tipo II
 - Biossíntese de glicoproteínas → antivirais / anticancerígenos
 - Catabolismo lisossomal de glicoconjugados → anticancerígenos / D.A.L. (e.g., Gaucher's)



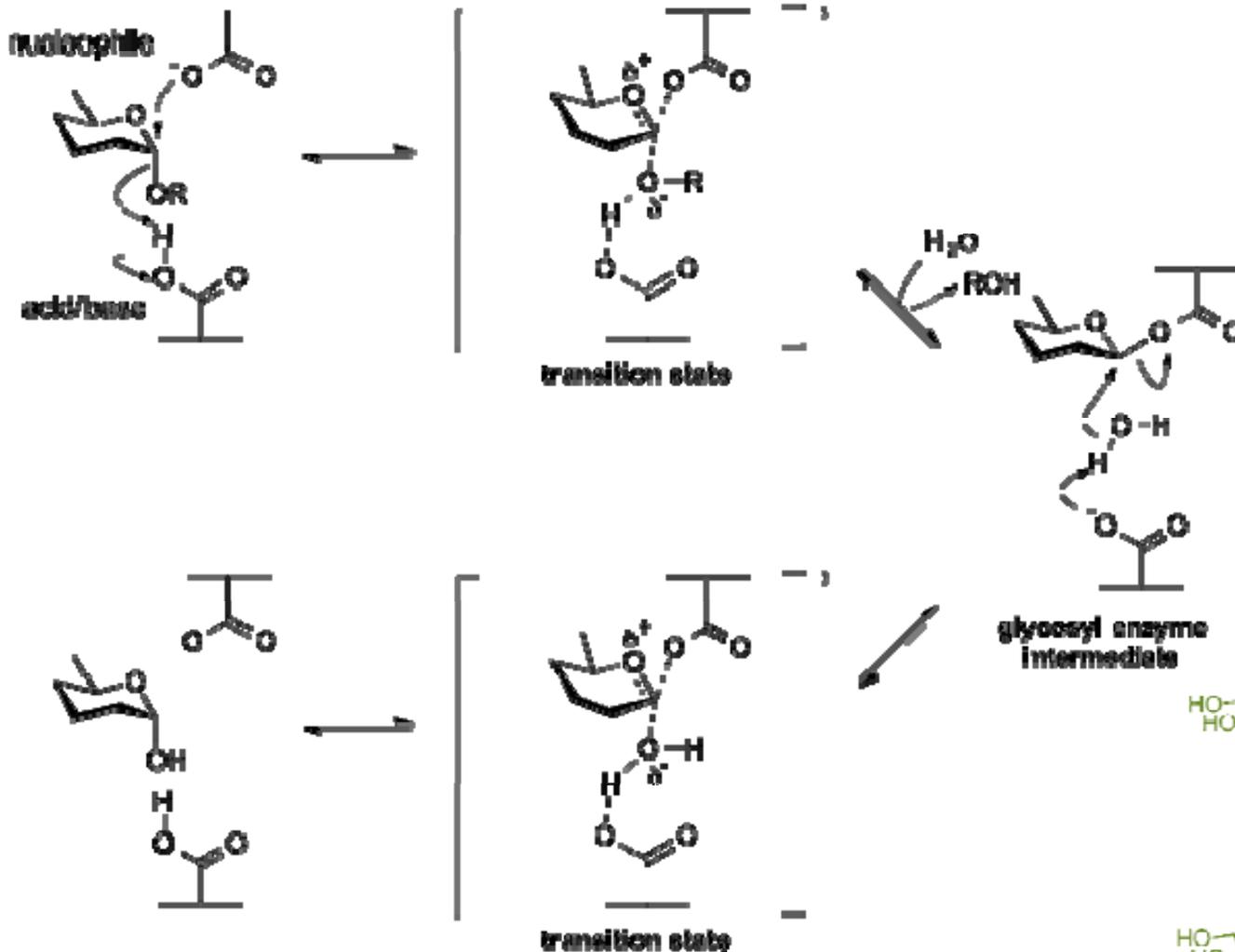
Glicosidases

- Classificação: EC x CAZy (Carbohydrate-Active enZyme) database
 - CAZy divide em classes de atividade e famílias de proteínas (similaridade sequencia):
 - Glycoside hydrolases (GH):
 - Inclui glicosidases e transglicosidases em 115 famílias
 - EC: 3.2.1.x; 2.4.1.x (glycosyltransf.); 4.2.2.x; 5.4.99.x
 - Família GH13: maltase (3.2.1.20), amilase pancreática (3.2.1.20)
 - Família GH31: maltase-glucoamilase (3.2.1.20), sucrase-isomaltase (3.2.1.10/3.2.1.48)
 - Família GH63: α -glicosidase processadora do RE (3.2.1.106)
 - 46 famílias organizadas em 14 clans (folding comum):
 - GH-D (β/α)₈: famílias 27, 31 e 36
 - GH-G (α/α)₆: famílias 37 e 63
 - GH-H (β/α)₈: famílias 13, 70 e 77

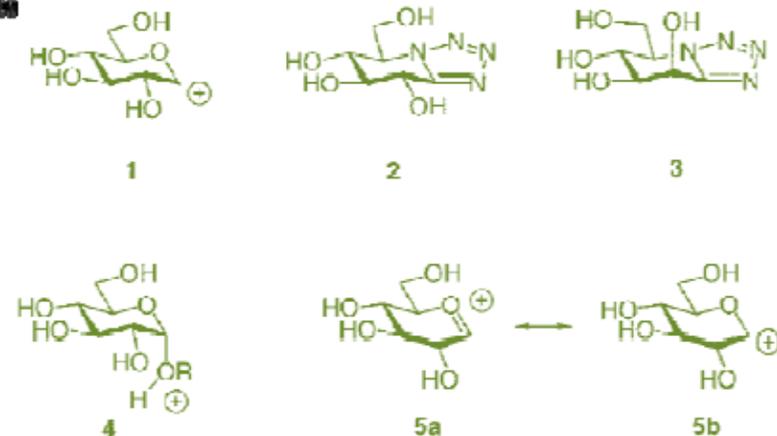


Busca por inibidores

Retaining mechanism for an α -glycosidase:



- Várias classes de glicosidases são eficientemente inibidas por análogos de substratos que imitam a carga e/ou a geometria do estado de transição

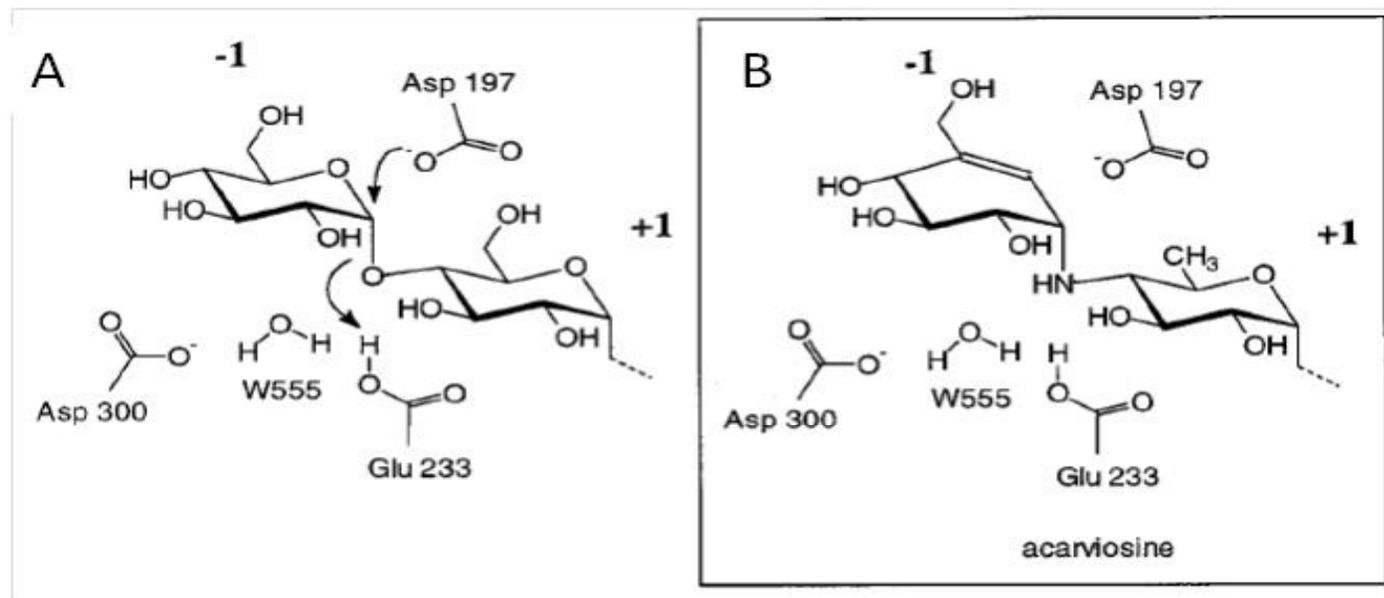


(Sinnot, 1990; McCarter & Withers, 1994; Svensson & Sogaard, 1993).



Busca por inibidores

- Inibidores mecanísticos ou análogos de substrato
 - Amino carboaçúcares
 - Glicosidases são frequentemente inibidas por análogos possuindo uma conformação meia-cadeira ou por açúcares contendo um nitrogênio básico (Lillelund et al., 2002).
 - Interações eletrostáticas entre os inibidores protonados e as cadeias laterais carregadas negativamente na fenda do sítio ativo



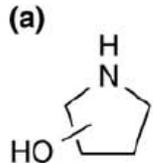


Busca por inibidores

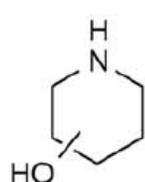
- Inibidores mecânicos ou análogos de substrato

- Iminoaçúcares

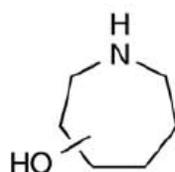
(a)



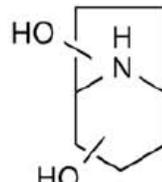
Pyrrolidine



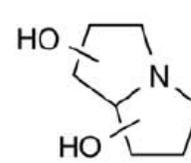
Piperidine



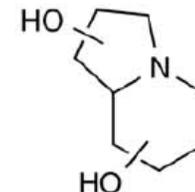
Azepane



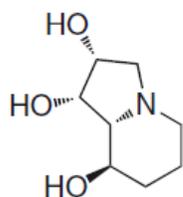
Nortropane



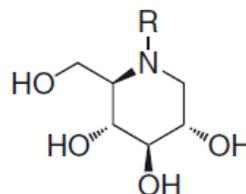
Pyrrolizidine



Indolizidine



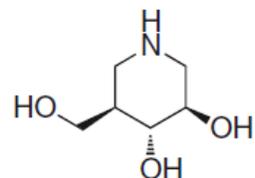
1 Swainsonine (GD0039)



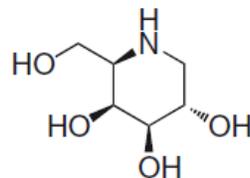
2 R = H, DNJ (AT2220)

3 R = CH₂CH₂OH, Glyset (Miglitol)

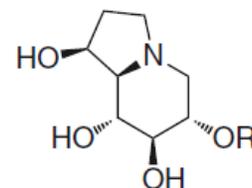
4 R = *n*-Bu, Zavesca (Miglustat)



5 *iso*Fagomine (Plicera)



6 Migalastat (Amigal)



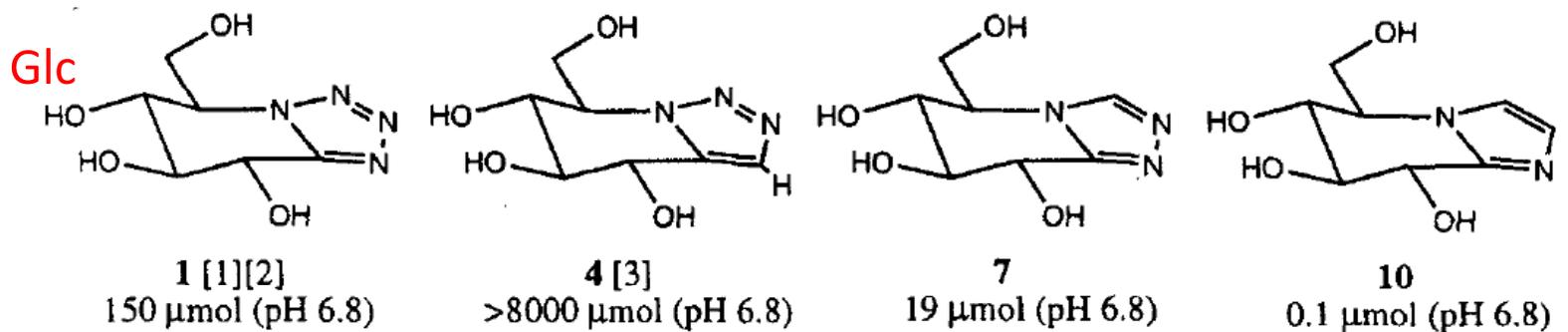
7 R = Butyryl, Celgosivir (MX-3253)

8 R = H, Castanospermine



Busca por inibidores

- Inibidores mecanísticos ou análogos de substrato
 - Triazóis fusionados



K_i contra β -glicosidase de amendoas [Granier et al., Helvetica Chimica Acta 80, 979–987 (1997).]

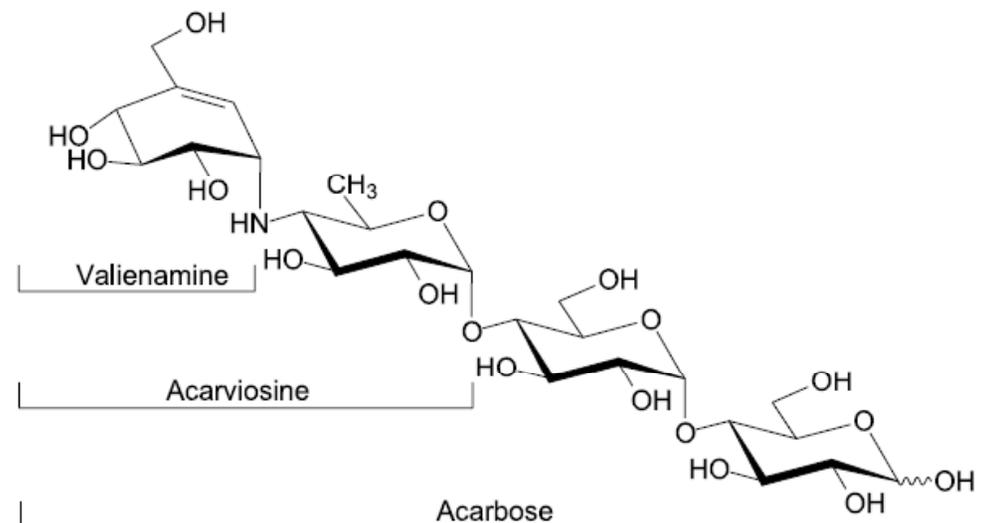
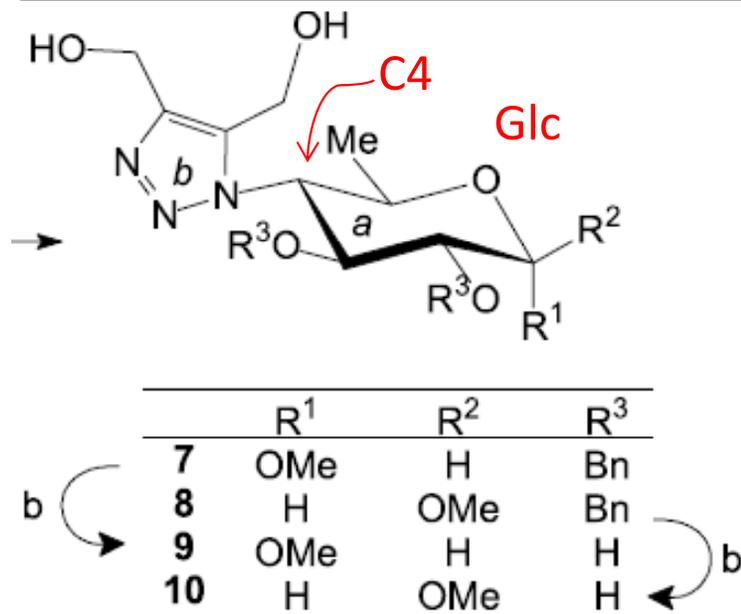


Busca por inibidores

- Inibidores mecanísticos ou análogos de substrato
 - Triazóis não-fusionados

K_i (μM) Périon et al., *Tetrahedron* 61, 9118–9128 (2005).

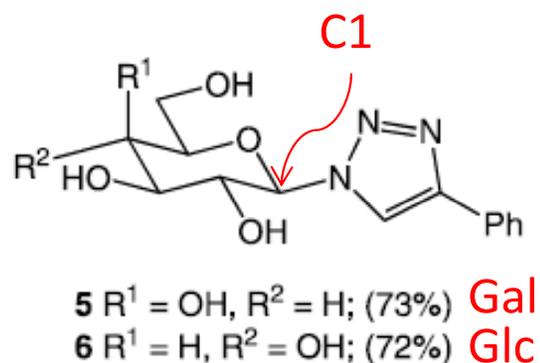
	Acarbose	9	10
α -Glucosidase (yeast) ^b	148	73	n.i. ^c
Isomaltase (yeast) ^a	n.i.	1925	n.i.
Amyloglucosidase (<i>A. niger</i>) ^d	<20	n.i.	n.i.
β -Glucosidase (almonds) ^e	n.i.	534	n.i.
β -Glucosidase/ β -Galactosidase (bovine liver) ^f	n.i.	597	n.i.





Busca por inibidores

- Inibidores mecanísticos ou análogos de substrato
 - Triazóis



% inib. 0,24mM contra β -glicosidasas

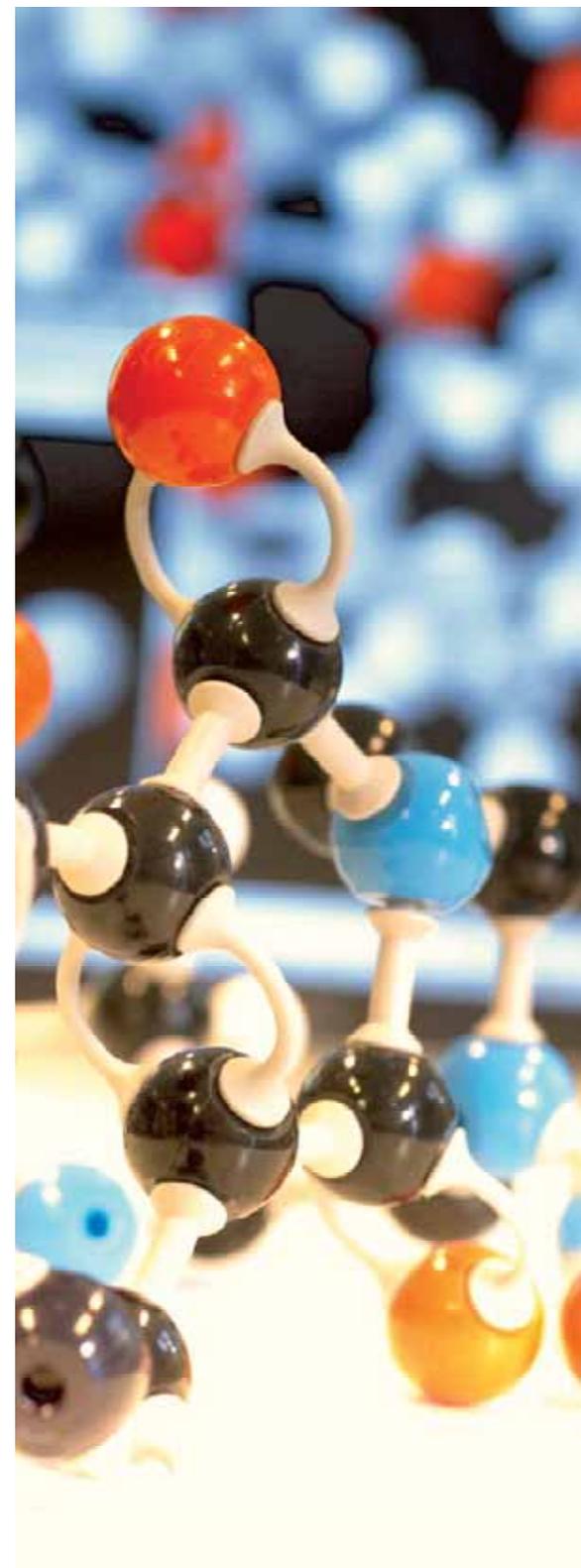
Compound ^b	Enzymes		
	SAG (%)	ECG (%)	BLG (%)
5	<20	30 ± 11	<20
6	<20	<20	48 ± 11
DNJGal	<20	91 ± 1	<20
DNJGlu	50 ± 8	<20	<20

Rossi & Basu *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3596–9 (2005).

- O forte caráter de dipolo e rigidez do anel triazol pode potencialmente imitar o desenvolvimento da carga e planificação do anel do carboidrato, que são normalmente associados com o íon oxocarbenium do estado de transição.

Potencial Terapêutico em Diabetes Tipo 2

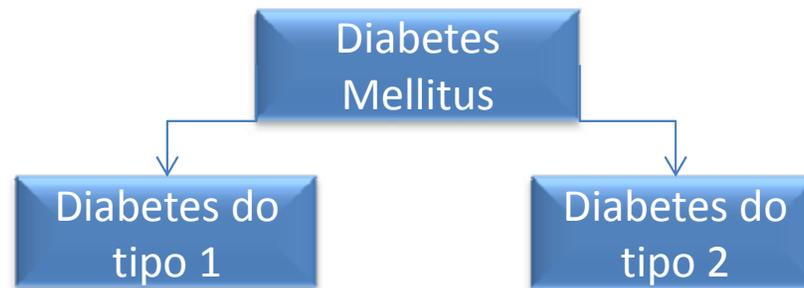
NOVOS DERIVADOS TRIAZÓLICOS INIBIDORES DE GLICOSIDASES



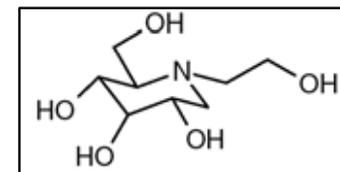
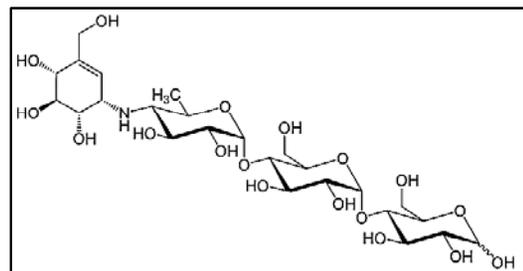


Diabetes

- O diabetes melito é um distúrbio metabólico crônico que se caracteriza pela alta concentração da glicose sanguínea, devido a defeitos na secreção de insulina, na sua ação ou, que é mais frequente, nas duas.

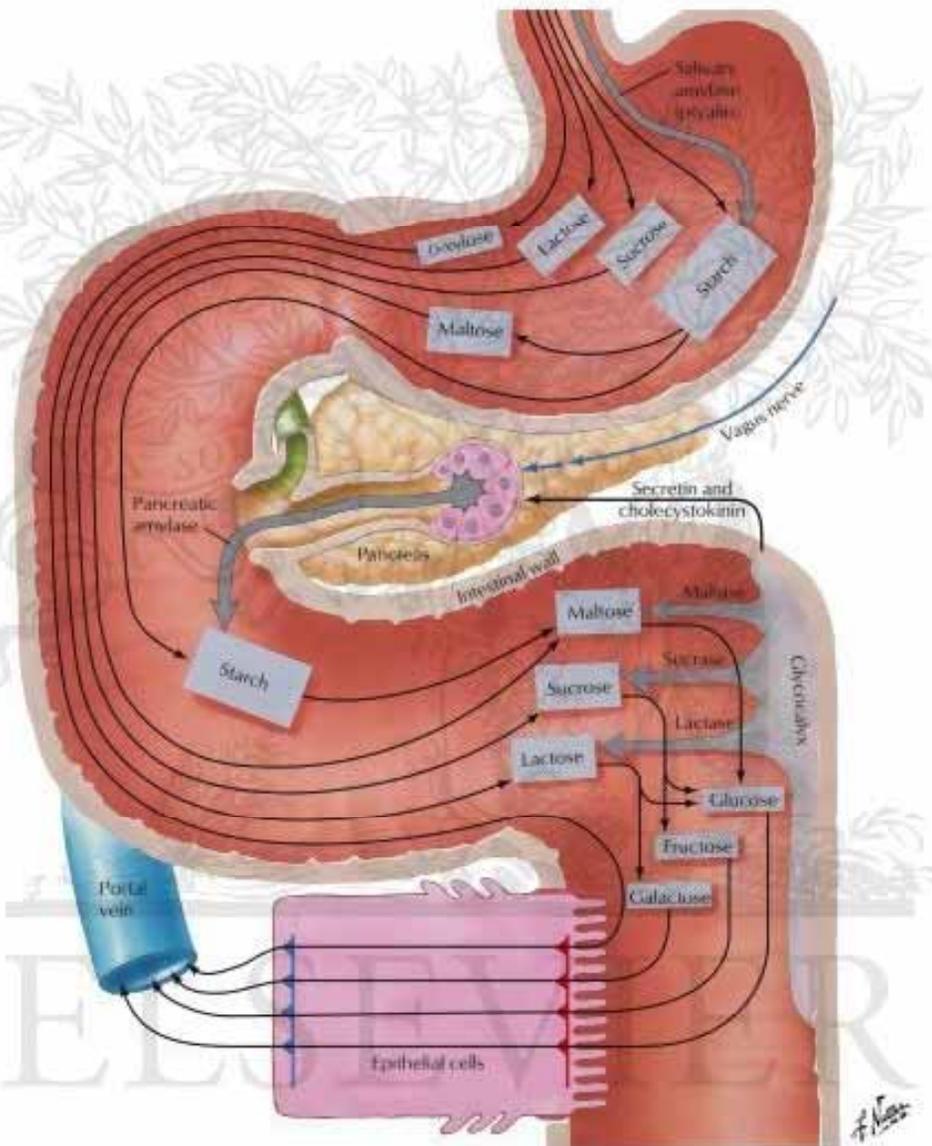


- Mais de 90 milhões de pessoas afetadas no mundo, com o Brasil em 5o lugar
- Há fármacos comerciais que atuam como inibidores de glicosidases, tais como: a acarbose (Precose e Glucobay) e o miglitol (Glyset).





Digestão de carboidratos



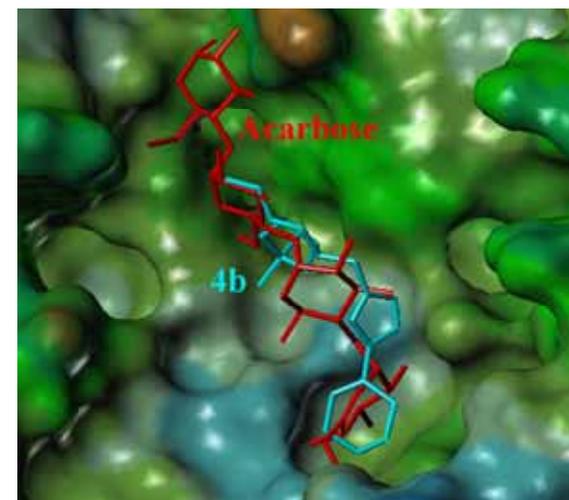
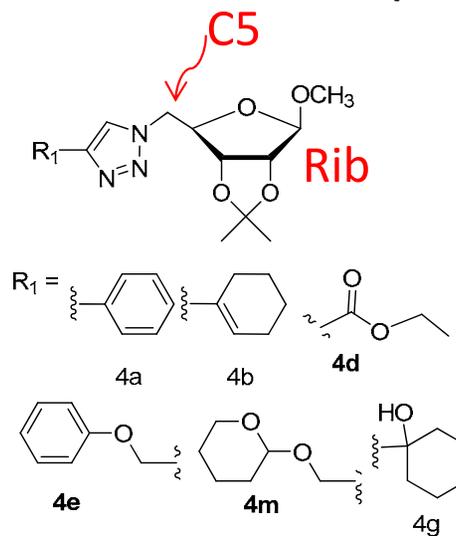
- α -amilase salivar inicia a digestão do amido na boca
- Continuada pela α -amilase pancreática (GH 13) secretada no duodeno
- Na borda em escova do intestino delgado, dissacarídeos são hidrolizados por α -glicosidases (EC 3.2.1.20): a maltose é clivada em glicose pela maltoglucoamilase (MGAM) e sacarose é hidrolizada em glicose e frutose pela sucrase-isomaltase (SI), ambas enzimas da família GH 31.



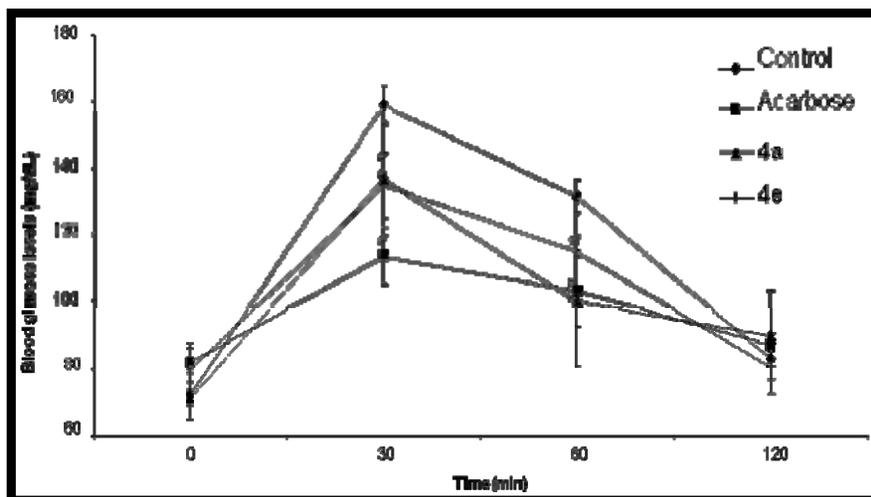
Triagem sobre MAL12, modelagem molecular e testes *in vivo*

- Inibição da α -glicosidase Mal12 levedura (MAL12)

Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
Acarbose	108.8 \pm 12.3
4a	14.9 \pm 4.2
4b	3.8 \pm 0.5
4d	15.1 \pm 0.9
4e	5.7 \pm 0.3
4g	5.2 \pm 0.9
4m	24.7 \pm 11.8



- Redução [glicose] pós-prandial em ratos

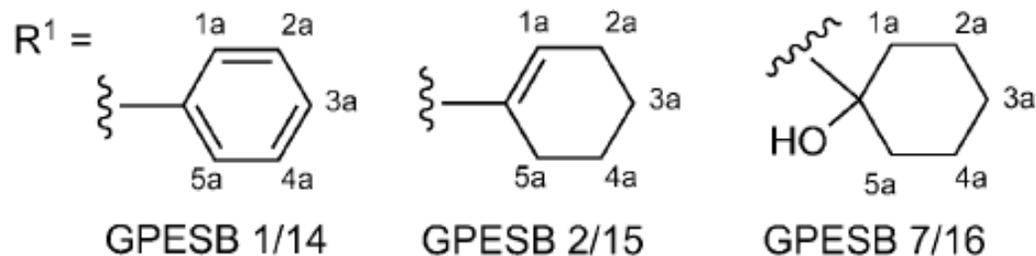
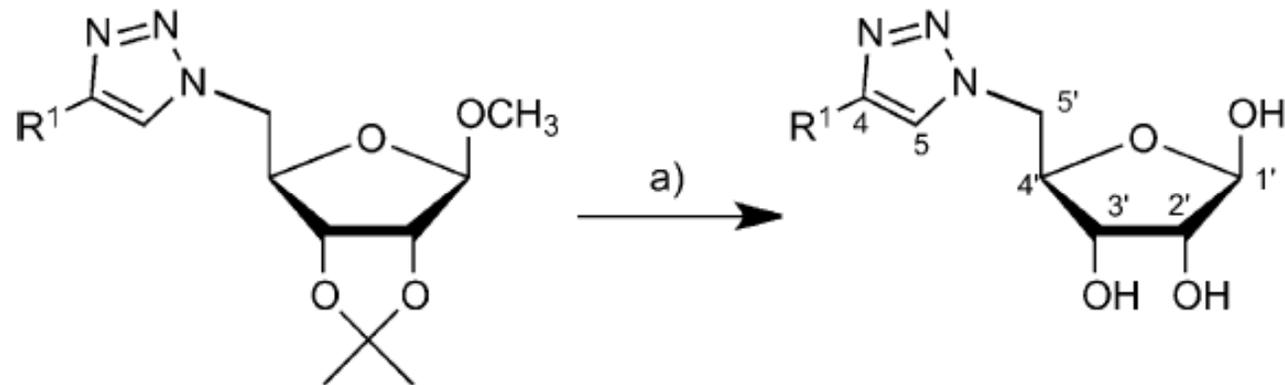


Ferreira et al. *J. Med. Chem.* 53, 2364–75. (2010)



Síntese de novos análogos

- Desproteção da porção ribose dos TGCP





Triagem sobre α -PA suína

- Ensaio cinético sobre substrato CNPG3 a 1 mM.

Table 2. Screening for porcine pancreatic α -amylase inhibition at 100 μ M GCT.

Compounds	$V_0 \pm SD$ [mAU min ⁻¹]	Inhibition [%]	Compounds	$V_0 \pm SD$ [mAU min ⁻¹]	Inhibition [%]
control	830 \pm 72	–	GPESB05	755 \pm 15	9.0
GPESB15	164 \pm 14	80.0	GPESB09	756 \pm 11	8.9
GPESB14	275 \pm 9.5	67.0	GPESB18	756 \pm 6.5	8.9
GPESB02	368 \pm 14	56.0	GPESB17	759 \pm 42	8.5
GPESB11	514 \pm 10	38.0	GPESB08	779 \pm 16	6.2
GPESB01	595 \pm 12	28.0	GPESB10	787 \pm 3.9	5.2
GPESB07	624 \pm 36	25.0	GPESB24	776 \pm 53	4.7
GPESB06	700 \pm 8.7	16.0	GPESB20	793 \pm 13	4.5
GPESB22	461 \pm 25	15.2	GPESB16	794 \pm 6.7	4.4
GPESB16	707 \pm 35	15.0	GPESB19	799 \pm 15	3.8
GPESB04	714 \pm 23	14.0	GPESB23	790 \pm 13	3.5
GPESB25	701 \pm 15	11.6	GPESB21	823 \pm 9.7	0.8
GPESB26	708 \pm 21	10.8	GPESB13	831 \pm 7.3	0.0
GPESB03	743 \pm 7	10.0			



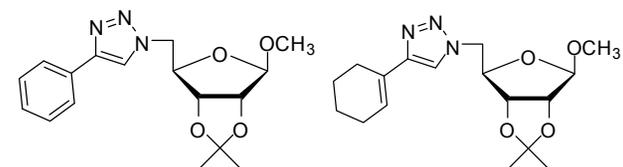
Potência inibitória e eficiência de ligação

- Determinação de IC_{50} e BEI sobre α -PA suína

Table 3. Inhibition potency and ligand binding efficiency of ribofuranosyl-derived triazoles with porcine pancreatic α -amylase.

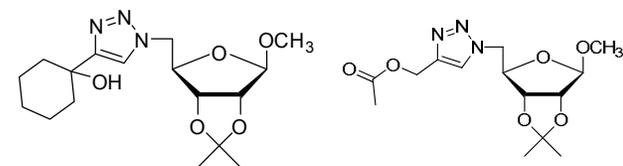
Inhibitor	M_w [Da]	IC_{50} [μM] ^[a]	Hill slope	BEI ^[ba]
acarbose	645.61	4.18 ± 0.4	1.09 ± 0.11	8.33
GPESB15	281.31	35.8 ± 1.9	2.03 ± 0.19	15.8
GPESB14	277.28	88.9 ± 6.0	2.01 ± 0.26	14.6
GPESB11	327.33	125 ± 8.1	1.64 ± 0.15	11.9
GPESB02	335.40	150 ± 8.1	1.57 ± 0.21	10.8
GPESB07	353.41	356 ± 19	1.59 ± 0.12	9.76
GPESB01	331.37	361 ± 44	1.49 ± 0.18	10.4

[a] Concentration of CNPG3 (substrate) was 1 mM; assay conditions were as described in Experimental Section. [b] BEI: binding efficiency index = pIC_{50}/M_w [kDa].^[25]



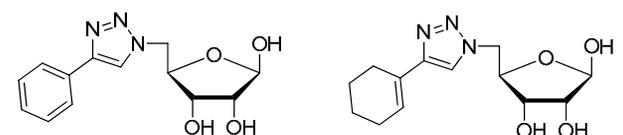
GPESB 01

GPESB 02



GPESB 07

GPESB 11



GPESB 14

GPESB 15

Determinação IC_{50} (sigmaplot):
9 [inibidor] , [substrato] (1mM)



Mecanismo de inibição da α -PA suína

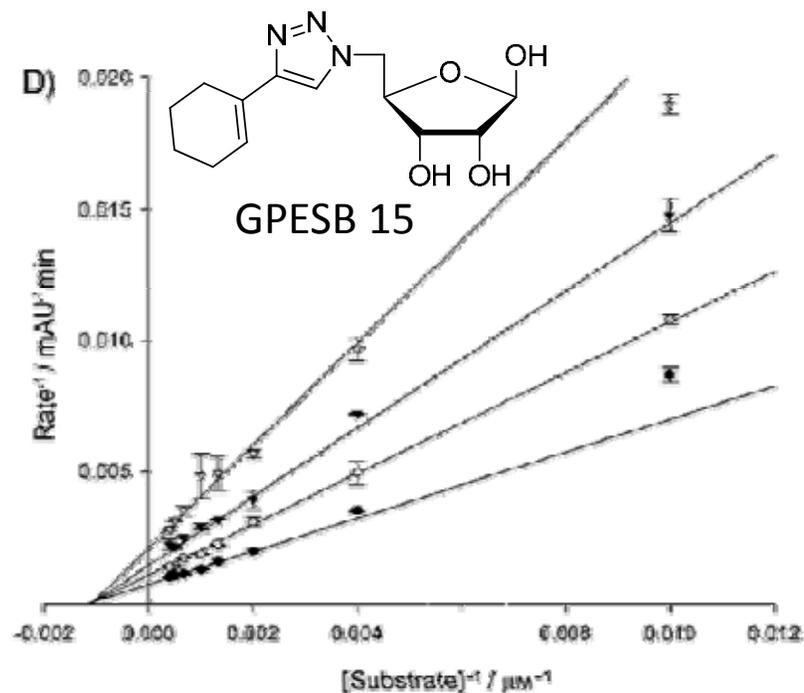
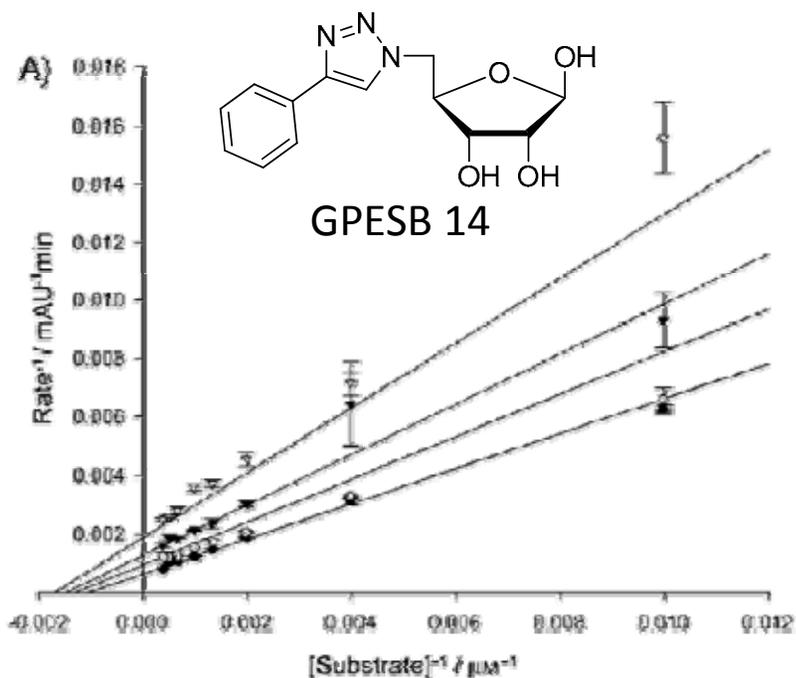


Table 4. Inhibition constants and α values for GCTs showing mixed non-competitive inhibition of PPA.

Inhibitor	K_i	$\alpha^{[a]}$	$R^{2[b]}$
GPESB15	33.6 ± 5.0	1.13 ± 0.27	0.98263
GPESB14	204 ± 72	0.44 ± 0.20	0.95916
GPESB11	234 ± 61	1.14 ± 0.49	0.96531
GPESB02	342 ± 71	0.46 ± 0.14	0.98636
GPESB07	1009 ± 467	0.50 ± 0.19	0.97935
GPESB01	780 ± 354	0.30 ± 0.17	0.97935

[a] K_i -ESI = αK_i -EI. [b] Correlation coefficient for noncompetitive inhibition:
 $V_o = V_{max} / ((K_m/S) \cdot (1 + I/K_i) + (1 + I/\alpha K_i))$.

Determinação do K_i (sigmaplot):
6 [substrato] = 0,2 a 5 x K_m (17% a 83% de saturação)
4 [inibidores] = 0-80% inibição

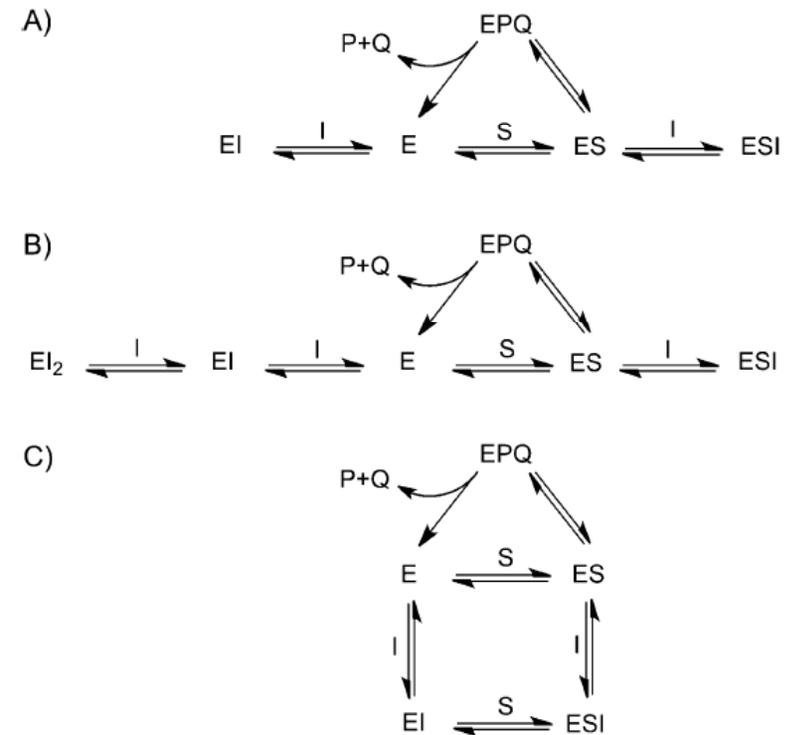
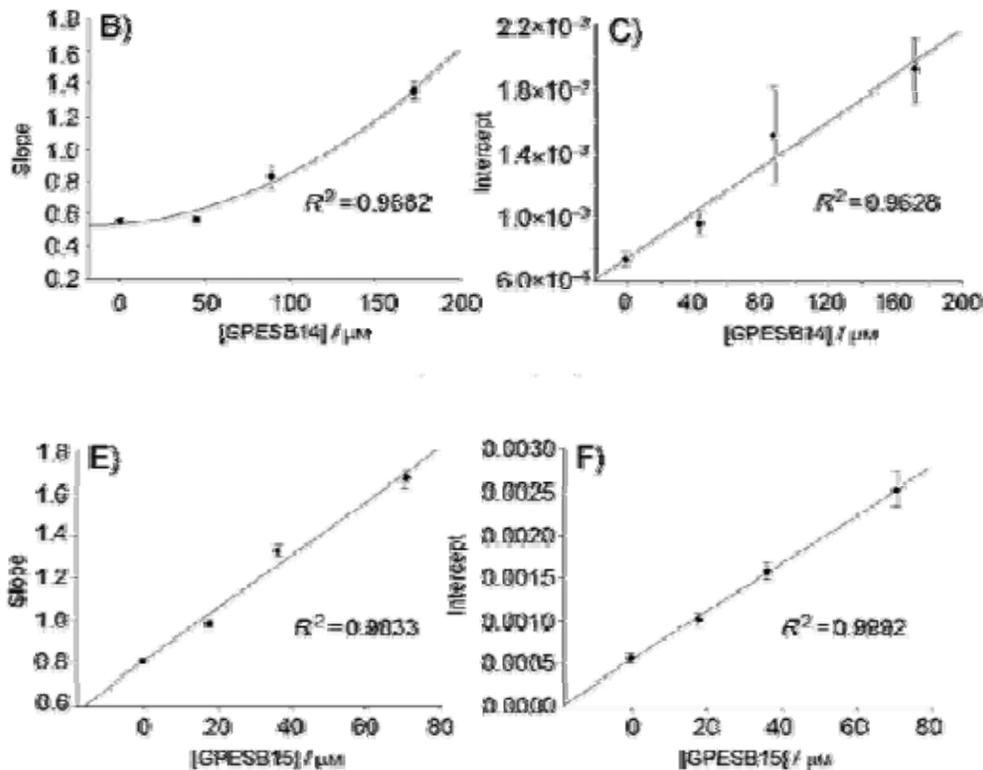
Senger et al., Chembiochem 13, 1584–93 (2012)



Mecanismo de inibição da α -PA suína

- Plots secundários

- Mecanismos de inibição não competitiva distintos para GPESB 14 (b) e GPESB15 (a ou c)

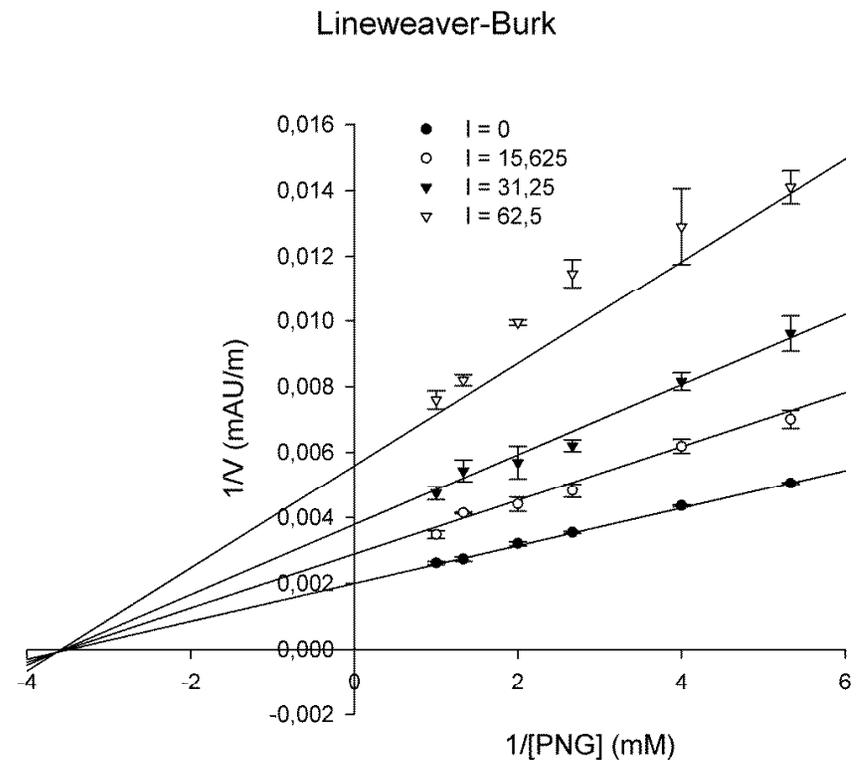
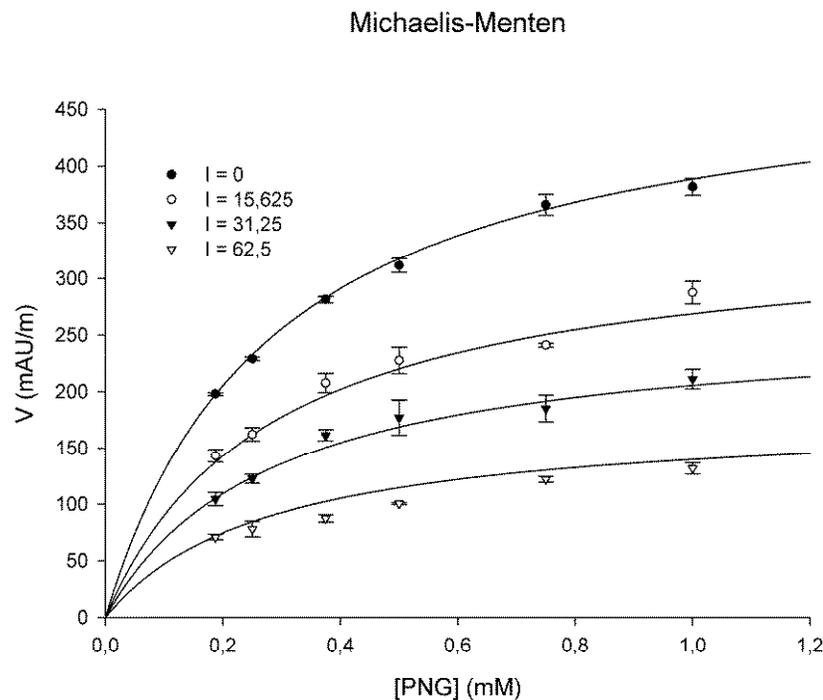


Scheme 2. Inhibition models for ribofuranosyl GCT's on PPA. A) and B) Abortive complexes, C) random type.



Mecanismo de inibição da MAL12

- GEPESB15



Determinação do K_i (sigmaplot):
6 [substrato] = 0,2 a 5 x K_m (17% a 83% de saturação)
4 [inibidores] = 0-80% inibição



Mecanismo de inibição da MAL12

- Todos os compostos são inibidores não competitivos

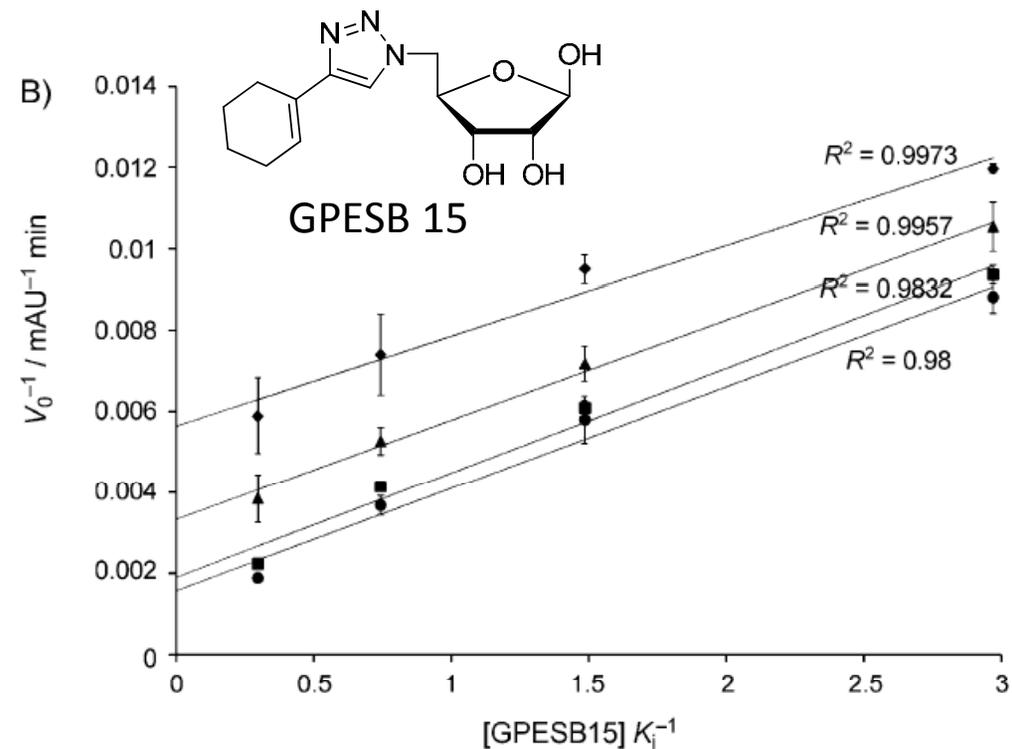
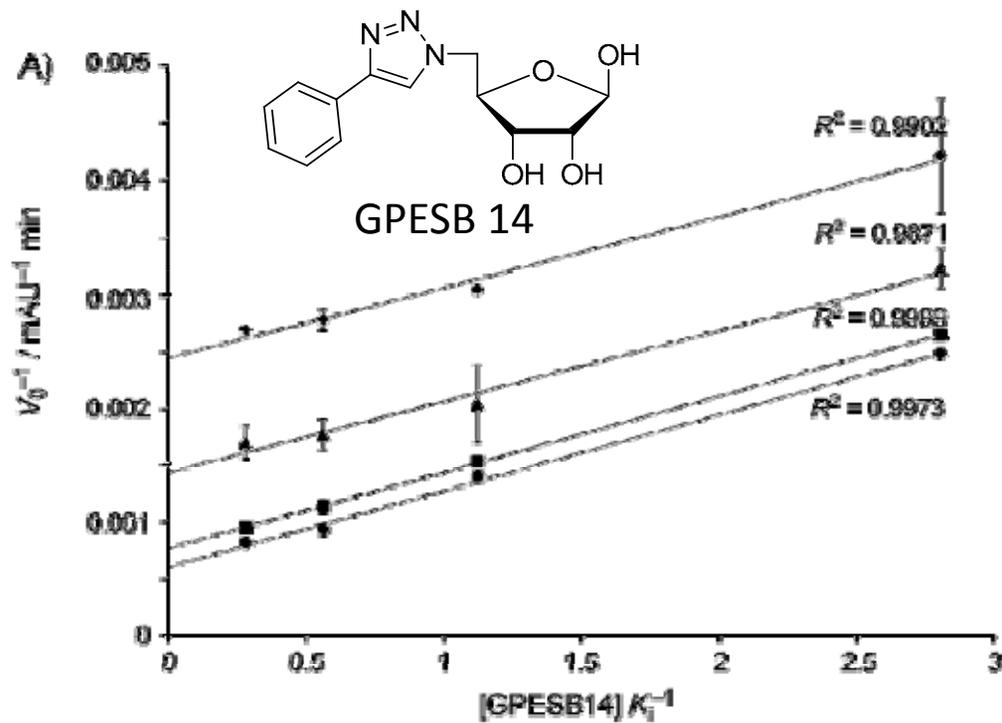
Inibidor	K_i (μM)	α [a]	R^2 [b]
GPESB16	$31,3 \pm 8,4$	$1,01 \pm 0,21$	0,96
GPESB15	$49,6 \pm 15,6$	$0,66 \pm 0,29$	0,96
GPESB11	$50,6 \pm 10,9$	$6,55 \pm 4,53$	0,95
GPESB01	$74,3 \pm 28,0$	$3,26 \pm 0,30$	0,86
GPESB14	$99,5 \pm 39,2$	$0,57 \pm 0,29$	0,95
GPESB02	$120 \pm 46,6$	$1,57 \pm 0,94$	0,92
GPESB06	$173 \pm 29,8$	$2,45 \pm 0,89$	0,97
GPESB05	456 ± 178	$0,73 \pm 0,27$	0,97
GPESB04	530 ± 346	$0,53 \pm 0,26$	0,96

[a] $K_i\text{-ESI} = \alpha \cdot K_i\text{-EI}$. [b] Coeficiente de correlação para a equação de inibição não-competitiva: $V_0 = V_{max} / ((K_m/S) \cdot (1 + I/K_i) + (1 + I/(\alpha \cdot K_i)))$.



Proposta do modo de ligação em α -PA

- Estudos de competição com acarbose
 - A ligação dos 2 inibidores é mutuamente excludente



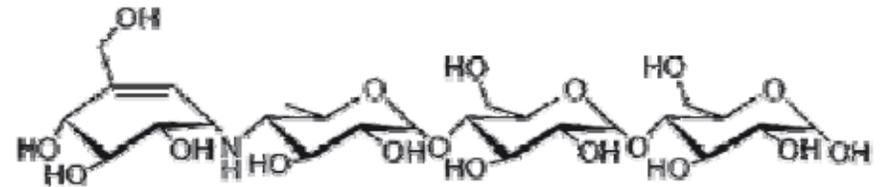


Proposta do modo de ligação em α -PA

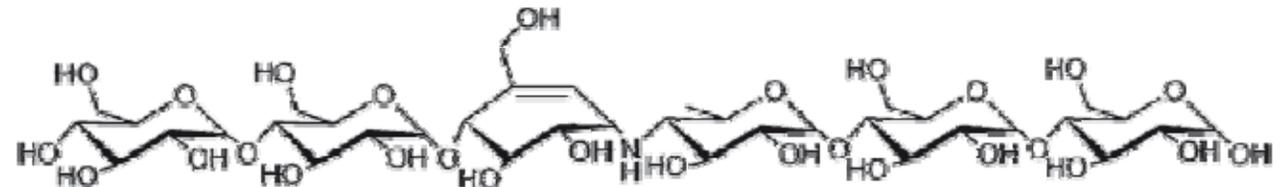
- Baseado no mecanismo cinético e ensaios de competição

A)

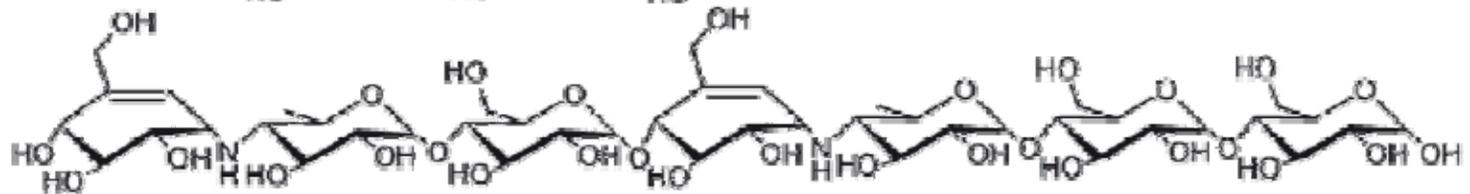
Acarbose



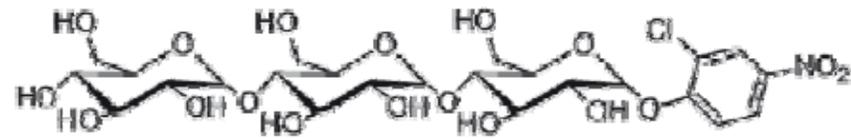
Modified acarbose
(bound to E)



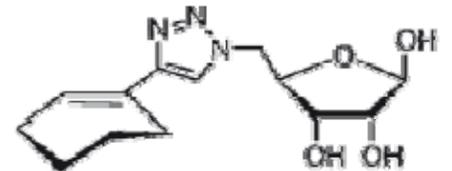
Acarviostatín
(bound to E)



CNPG3
(subs. bound to E)



GPESB15
(bound to ES)

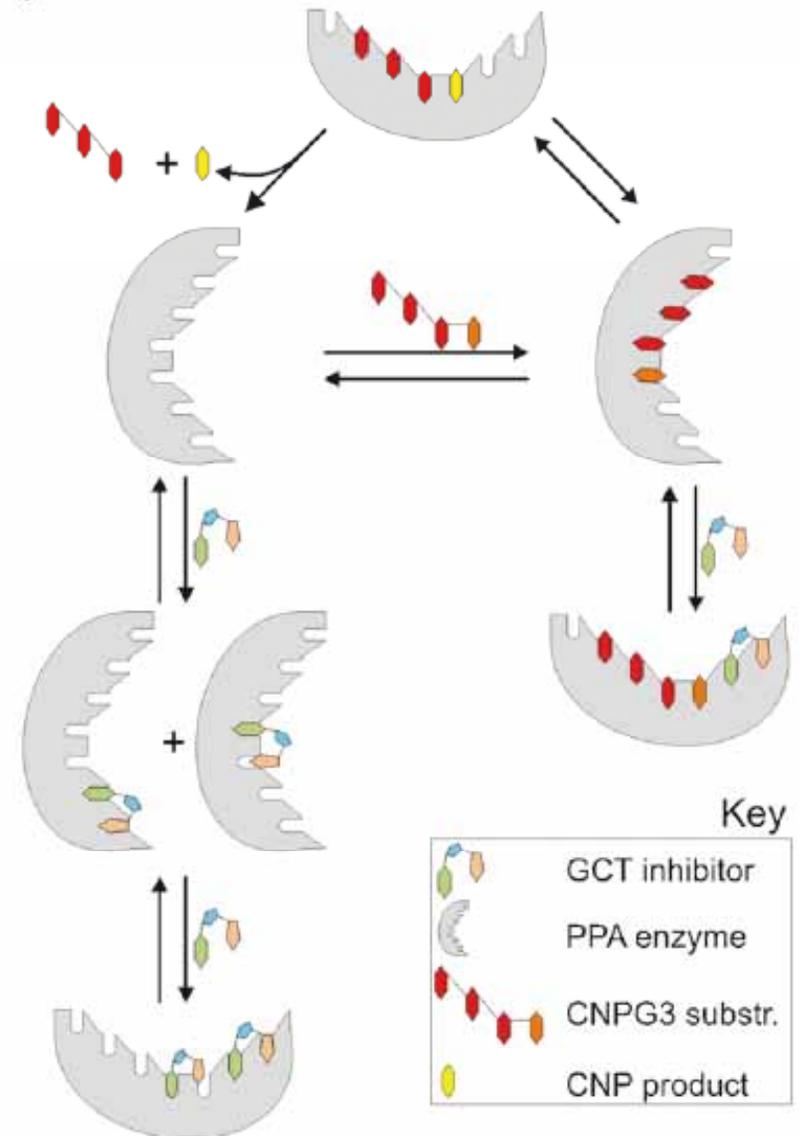
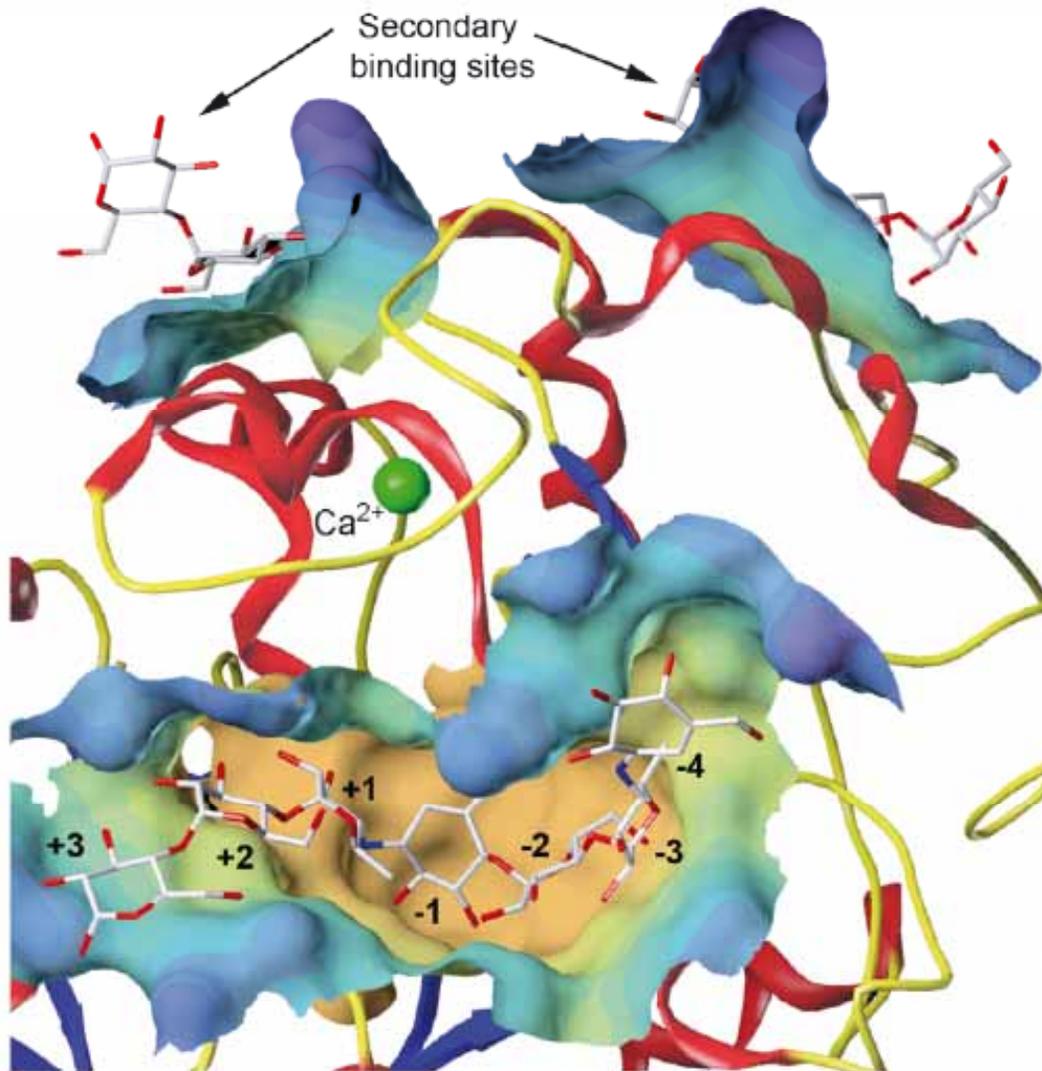


PPA subsites





Proposta do modo de ligação em α -PA



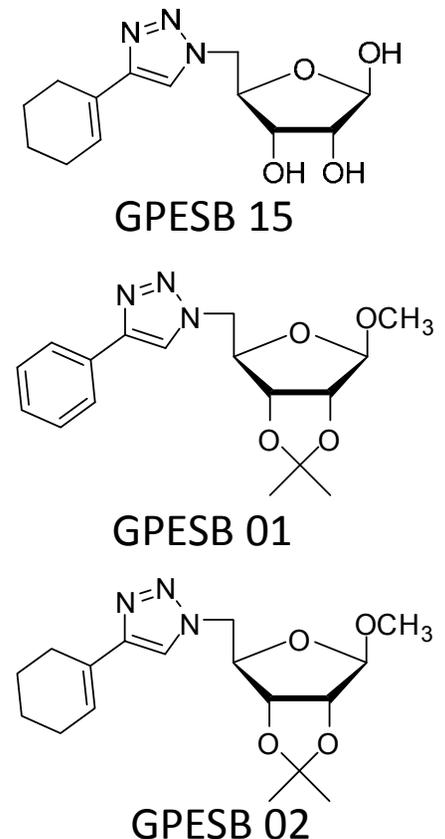


Comparação da afinidade de ligação pelo ES e E_{livre} MAL12 Vs PPA

- GPESB15 é um bom inibidor para ambas as enzimas com afinidades semelhantes para ES e E_{livre}

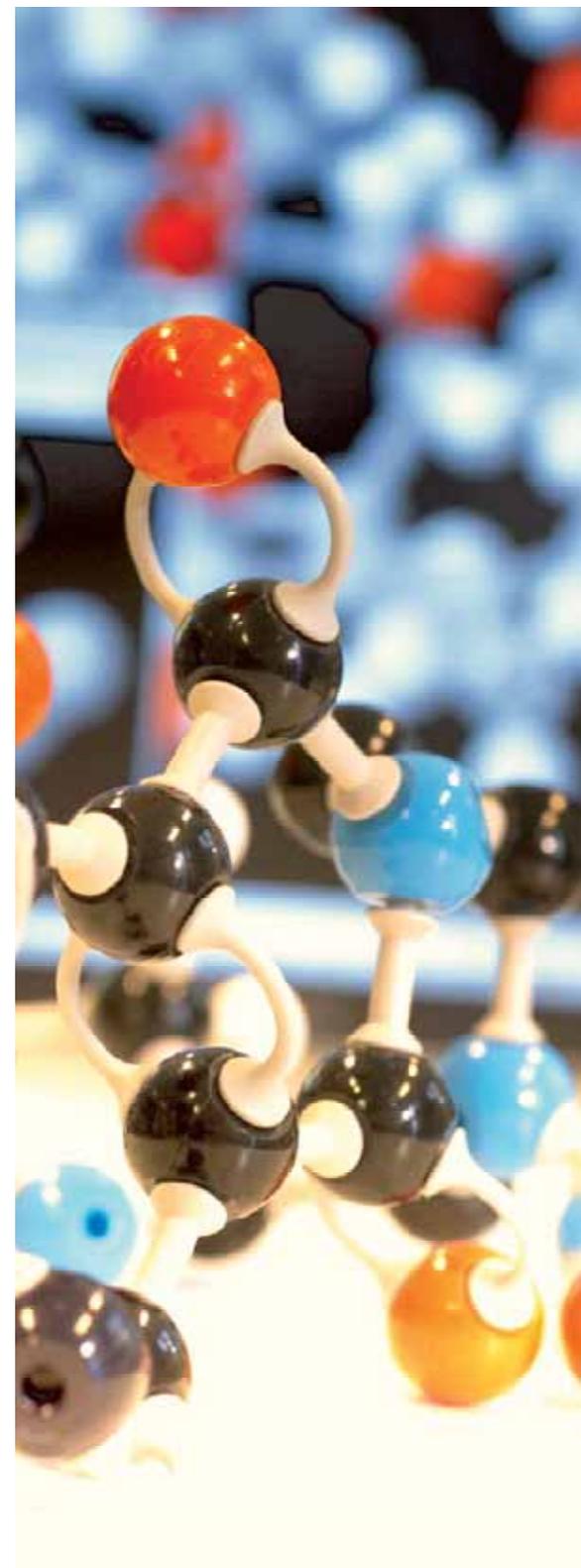
Enzima Inibidor	MAL12		PPA	
	K_i EI (μ M)	K_i ESI (μ M) ^[a]	K_i EI (μ M)	K_i ESI (μ M) ^[a]
GPESB16	31,3	31,6	-	-
GPESB15	49,6	32,7	33,6	38,0
GPESB11	50,6	331	234	267
GPESB01	74,3	242	780	234
GPESB14	99,5	56,7	-	-
GPESB02	120	188	342	157
GPESB06	173	424	-	-
GPESB05	456	333	-	-
GPESB04	530	281	-	-
GPESB07	-	-	1009	504

[a] K_i -ESI = α . K_i -EI.



modelagem molecular

ESTUDO COMPARATIVO DA INIBIÇÃO DA MAL12, AAP SUÍNA E AAP HUMANA POR



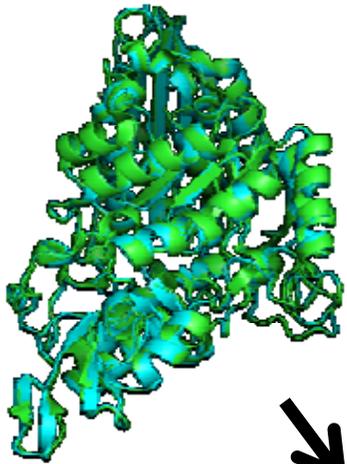


Metodologia Geral

Determinação do K_i

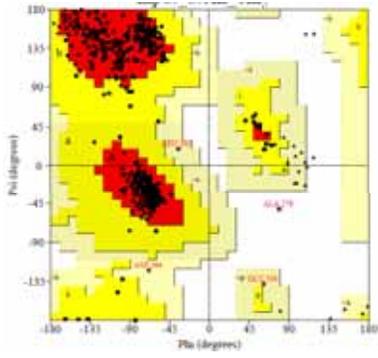
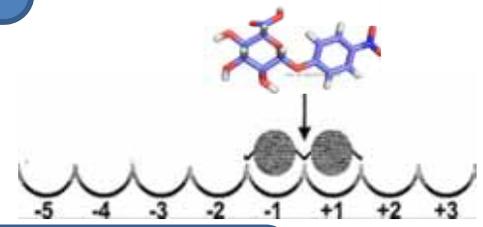
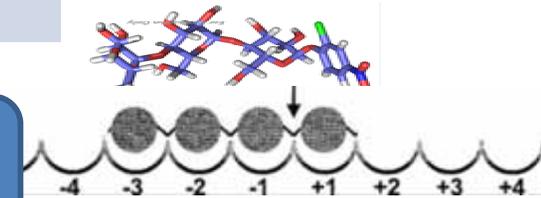
Modelagem Comparativa MAL12 (Modeller)

PDB	E-value	Id%	Cobertura	Organismo
3AJ7	0.0	72	99%	<i>S. Cerevisiae</i>
1UOK	1e-132	39	98%	<i>B. Cereus</i>
2ZE0	6e-116	40	97%	<i>Geobacillus sp</i>

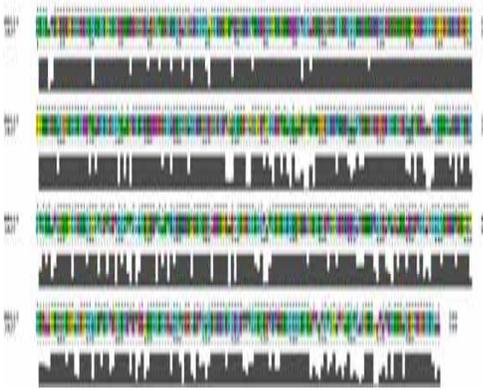


Comparação Estruturas 3D α -AP Suína e Humana

Modelagem dos Complexos ES (SYBYL)



Validação do modelo (PROCHECK)



Docking Triazóis

Análise comparativa Interações



• Construção dos Receptores para o Docking

➤ Total de 6 estruturas

Enzimas livres (E)

- ✓ Maltase livre
- ✓ α -amilase pancreática humana
- ✓ α -amilase pancreática suína

Complexos Enzima-Substrato (ES)

- ✓ **Maltase-pNPG**
- ✓ **α -amilase pancreática humana -CNPG3**
- ✓ **α -amilase pancreática suína -CNPG3**

Preparação dos
receptores com o
“*Preparation Wizard*”
Maestro 9.3

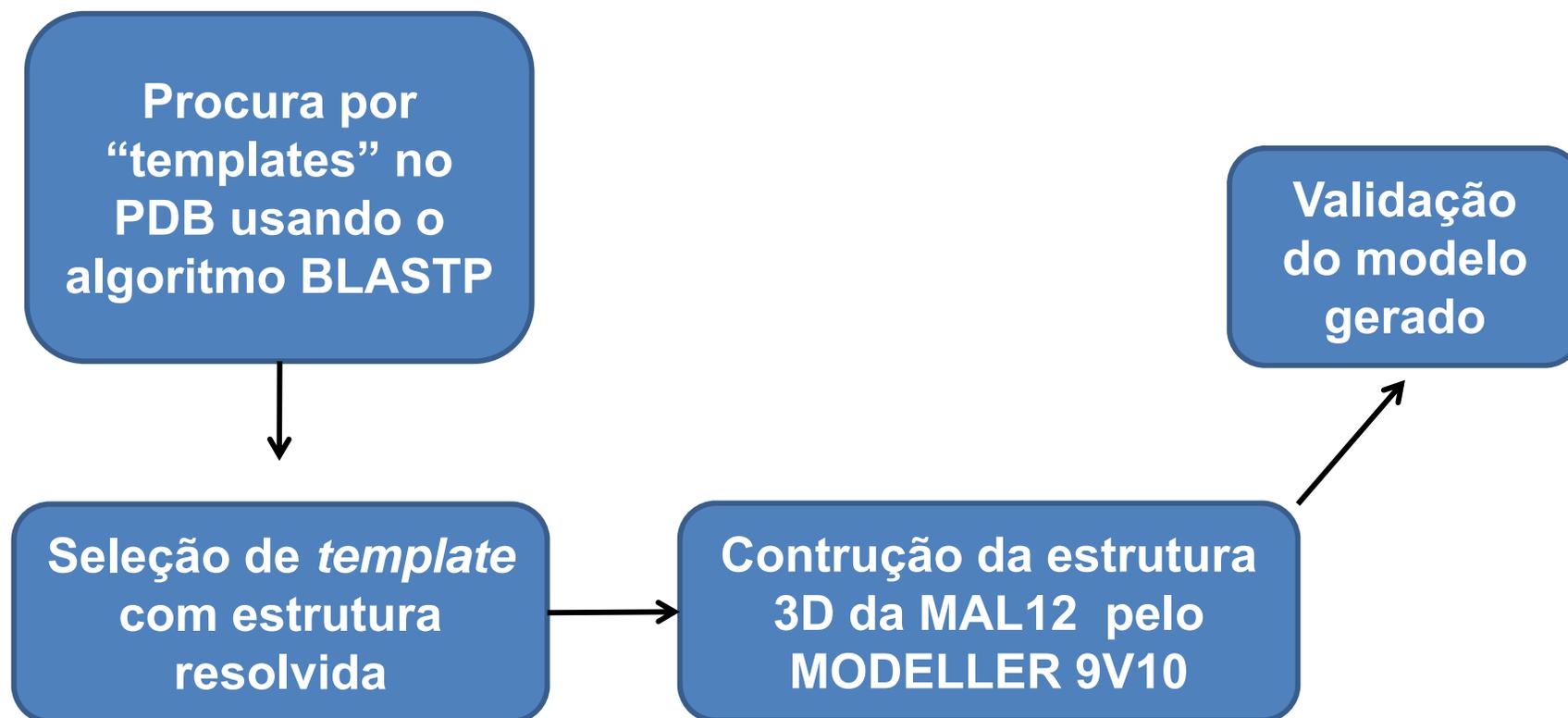
✓ Checagem de possíveis erros na
proteína

✓ Adição de átomos de hidrogênio

✓ Otimização da geometria utilizando
o campo de força OPLS2005

Modelagem das Enzimas Livres (E)

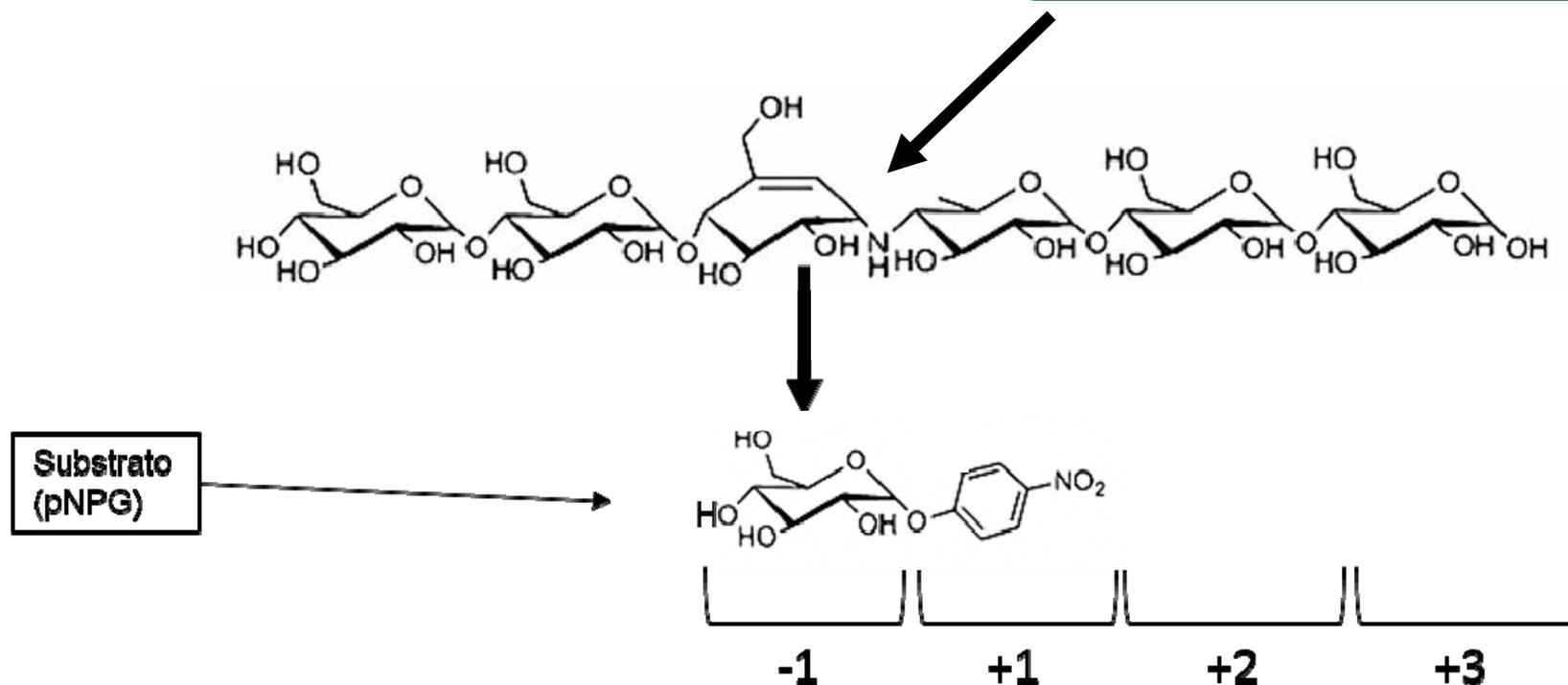
- ✓ Estruturas das α -amilases pancreáticas humana (1HNY) e suína (1HX0) presentes no PDB;
- ✓ Modelagem da estrutura da Maltase de Levedura



Modelagem dos Complexos Enzima-Substrato (ES)

- ✓ Construção da estrutura 3D do complexo MAL12-pNPG

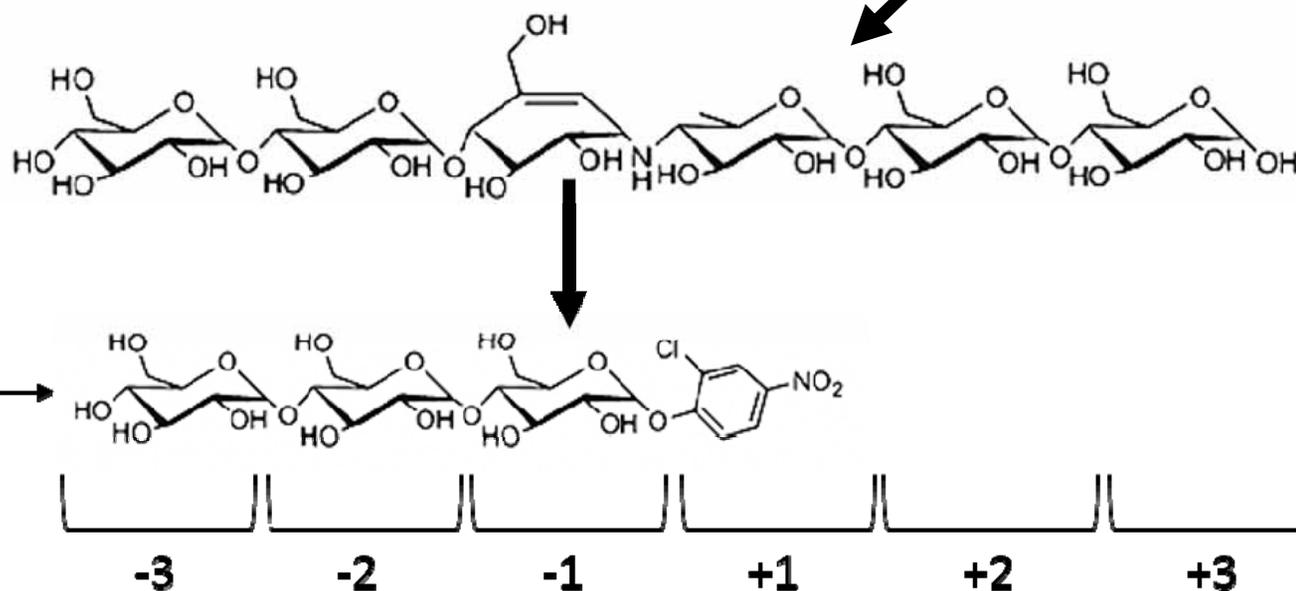
Arcabose Modificada (Código PDB: ABC)
complexada com α -amilase *Aspergillus oryzae* (Código PDB: 7TAA).



Modelagem dos Complexos Enzima-Substrato (ES)

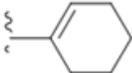
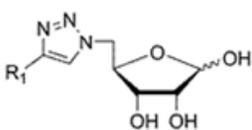
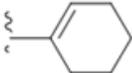
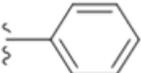
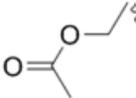
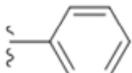
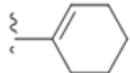
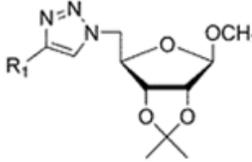
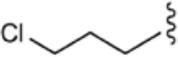
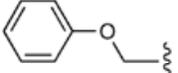
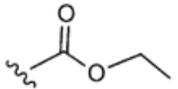
- ✓ Construção da estrutura 3D do complexo α -amilase-CNPG3

Arcabose Modificada (Código PDB: ABC)
complexada com α -amilase *Aspergillus oryzae* (Código PDB: 7TAA).



Substrato
(CNPG3)

- Preparação dos ligantes para o Docking
 - Programa Avogadro

Cód. Inibidor	R1	<u>Triazol</u> - R2
GPESB16		
GPESB15		
GPESB14		
GPESB11		
GPESB01		
GPESB02		
GPESB06		
GPESB05		
GPESB04		



• Parâmetros utilizados para o Docking

Induced Fit Docking
(IFD)

→ Glide

→ Prime

- **Ma12** (maltase de *Saccharomyces cerevisiae*): His111, Phe165, Gln181, Arg212, Asp214, Leu218, Glu276, His348, Asp349;
- **AAPS** (α - amilase pancreática suína): Tyr62, His101, Tyr151, Val163, Leu165, Arg195, Asp197, Lys200, His201, Glu233, Ile235, Asp236, Leu237, Gly259, His299, Asp300;
- **AAPH** (α - amilase pancreática humana): Tyr62, His101, Tyr151, Thr163, Leu165, Arg195, Asp197, Lys200, His201, Glu233, Ile235, Asp236, Leu237, Gly259, His299, Asp300.

- **Parâmetros utilizados para o Docking**

**Induced Fit Docking
(IFD)**



Caixa 1 (Menor-verde claro): 5Å

Caixa 2 (Maior-verde claro): 26Å



- Modelagem comparativa da MAL12

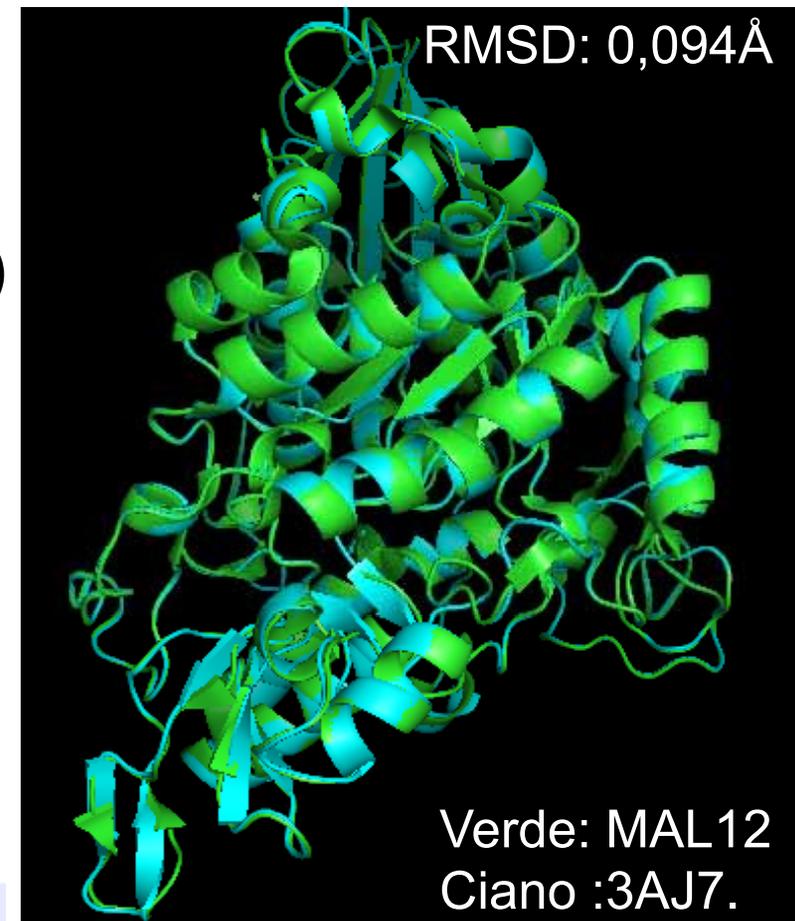
Código de acesso PDB (Moldes)	E-valor	Identidad e com MAL12	Cobertura em relação a MAL12	EC Number	Nome	<u>Organismo</u>
3AJ7	0.0	72%	99%	3.2.1.10	<u>Isomaltase</u>	<u>Saccharomyces Cerevisiae</u>
1UOK	1e-132	39%	98%	3.2.1.10	Oligo-1,6-glicosidase	<i>Bacillus cereus</i>
2ZE0	6e-116	40%	97%	3.2.1.20	<u>α-glicosidase</u>	<u>Geobacillus sp</u>



→ **Template** selecionado como molde para predição da estrutura 3D da MAL12

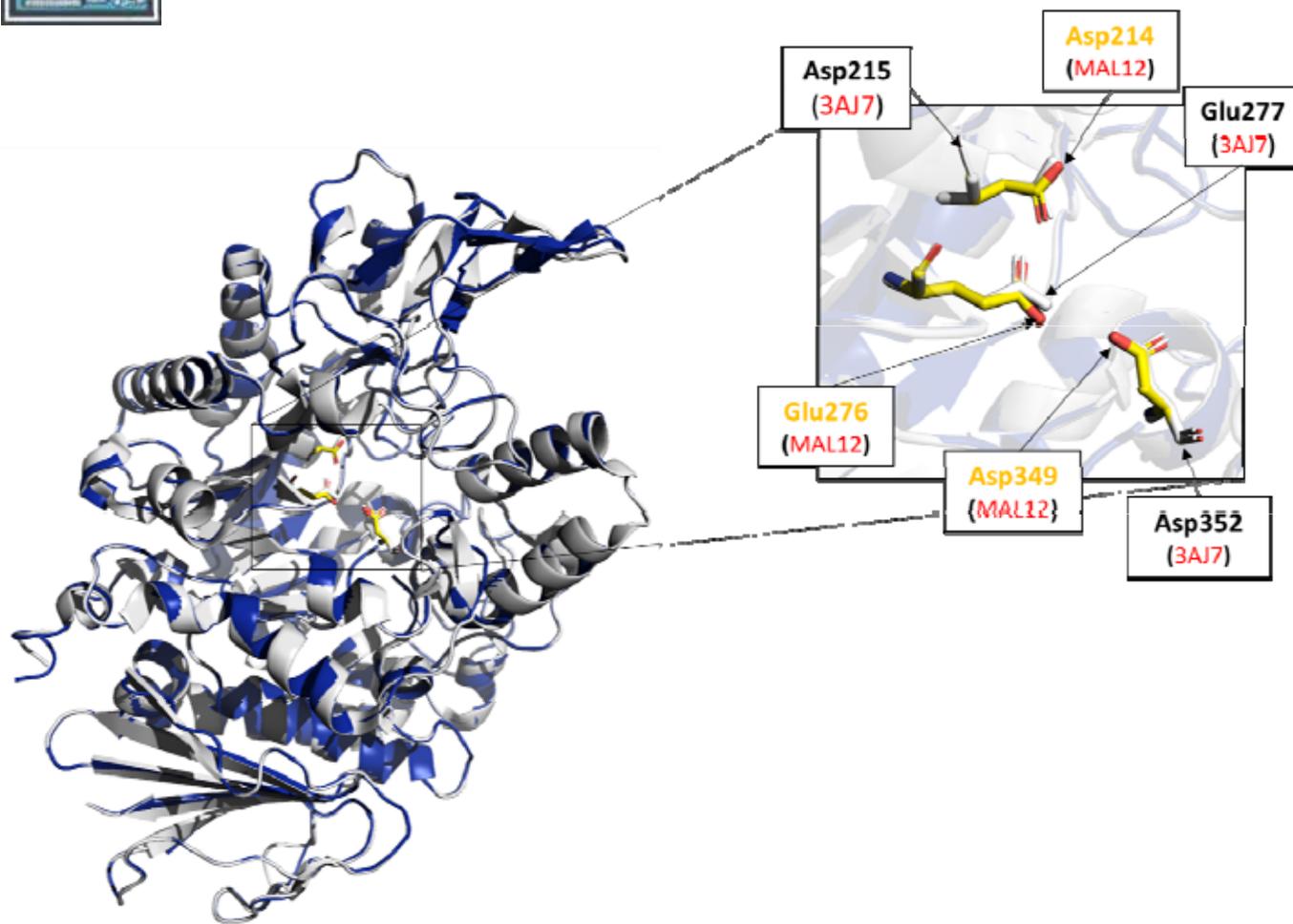
- . Sequência alvo: MAL12 (584 aa)
 - . Sequência Molde: 3AJ7_A (589 aa)
- Resolução: 1.3 Å**

```
>> Top model results:  
molpdf: 3223.6171875 (file: MAL12.B99990083.pdb )  
DOPE score: -73616.4140625 (file: MAL12.B99990026.pdb )  
GA341 score: 1.0 (file: MAL12.B99990081.pdb )  
Normalized DOPE score: -1.78776244685 (file: MAL12.B99990026.pdb )
```

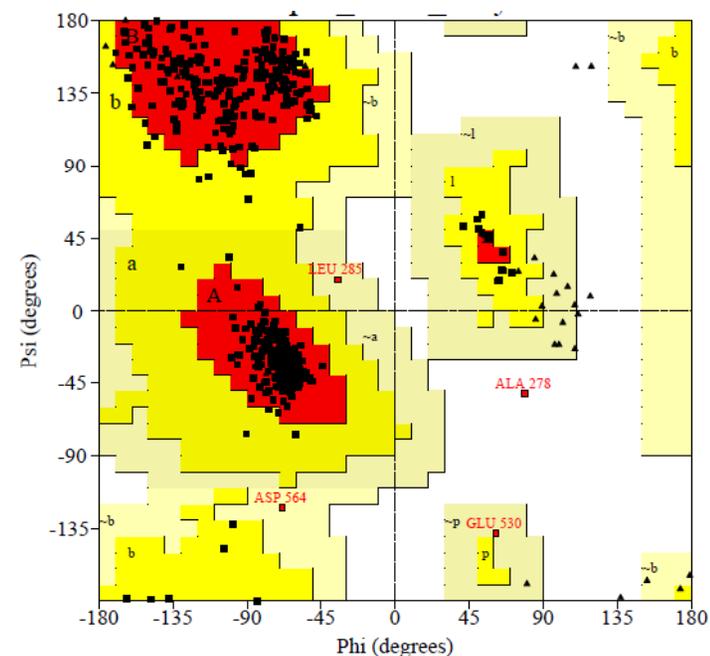




Validação do Modelo



Mapa de Ramachandran para a estrutura 3D da MAL12 gerada, obtida pelo programa PROCHECK



RMSD (Mal12 - 3AJ7) = 0,094 Å

QMEAN6

(Mal12): 0,73 x (3AJ7): 0,70

Resíduos em regiões mais favoráveis: 92,3% (477)

Resíduos em regiões favoráveis: 7,0% (36)

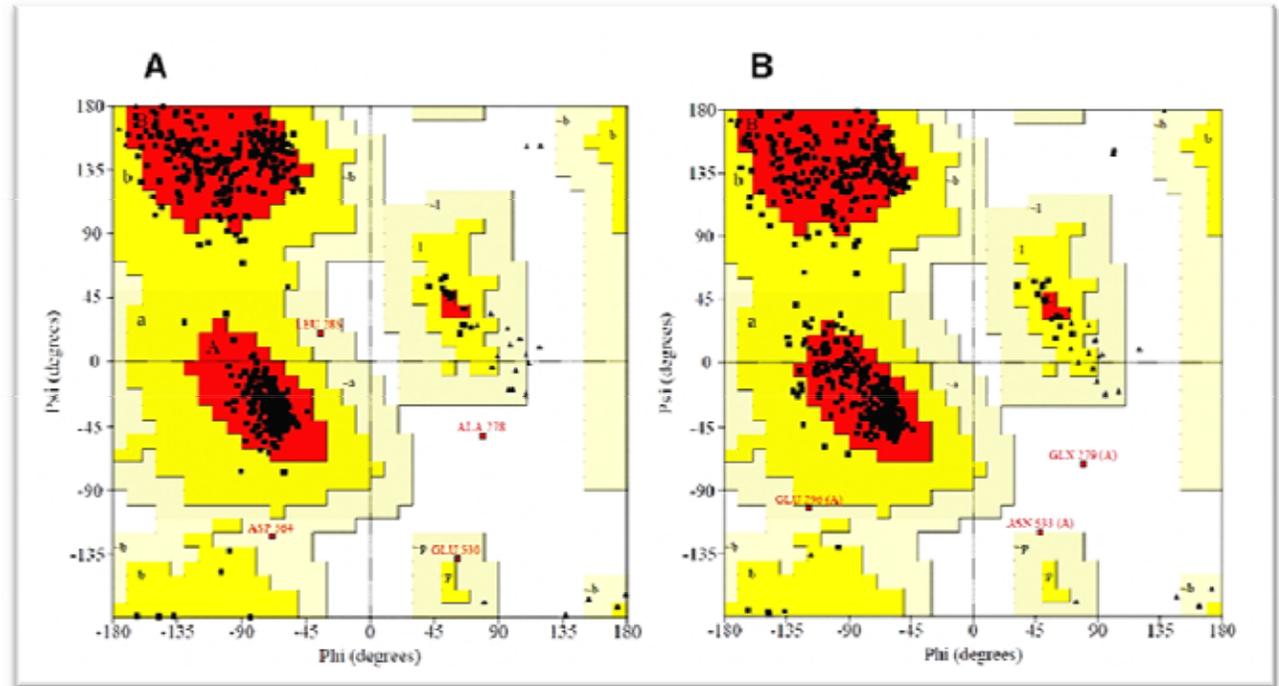
Resíduos em região aceitáveis: 0,6% (3)

Resíduo em região não permitida: 0,2% (1)



Validação do Modelo

- Ala278

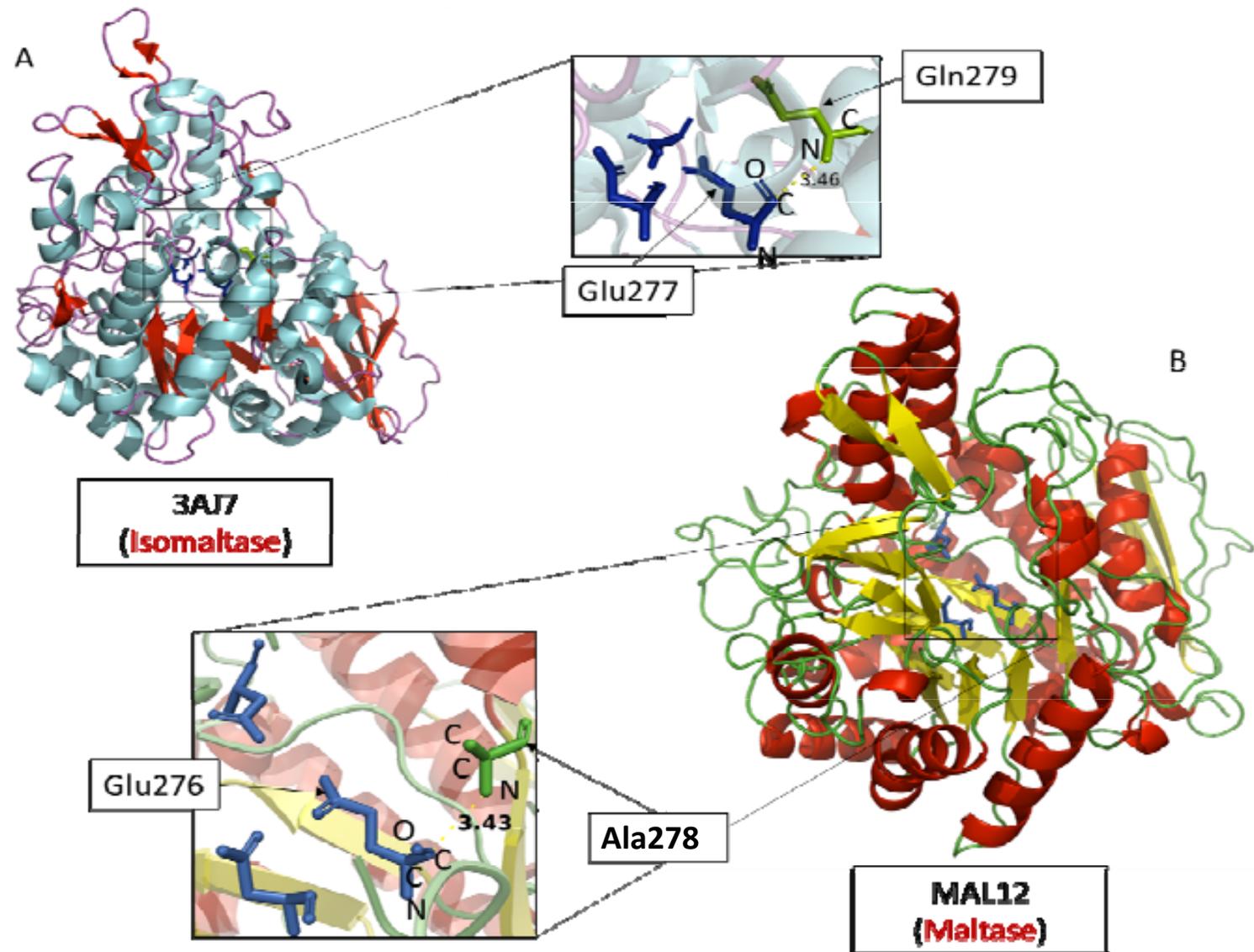


		210	220	230	240	250	
3AJ7	199	GYWLDHGVDG	FRIDVGSLYS	KVVGLPDAPV	VDKNSTWQSS	DPYTLNGPRI	248
MAL12	201	GFWLDHGVDG	FRIDTAGLYS	KRPGLPDSP I	FDKTSKLQHP	NWGSHNGPRI	250
		*****	***#####	#####*	#####	#####*	
		260	270	280	290	300	
3AJ7	249	HEFHQEMNQF	IRNRVKDGRE	IMTVGEMQHA	SDETKRLYTS	ASRHELSELF	298
MAL12	251	HEYHQELHRF	MKNRVKDGRE	IMTVGEVAHG	SDNA - LYTS	AARYEVSEVF	298
		#####	#####	#####	#####	#####	



Validação do Modelo

- Ala278



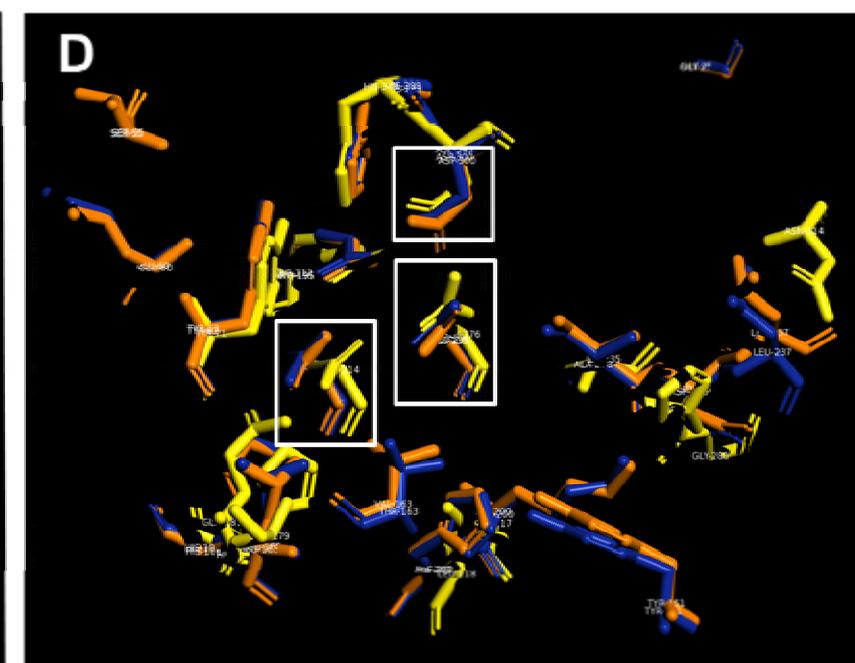
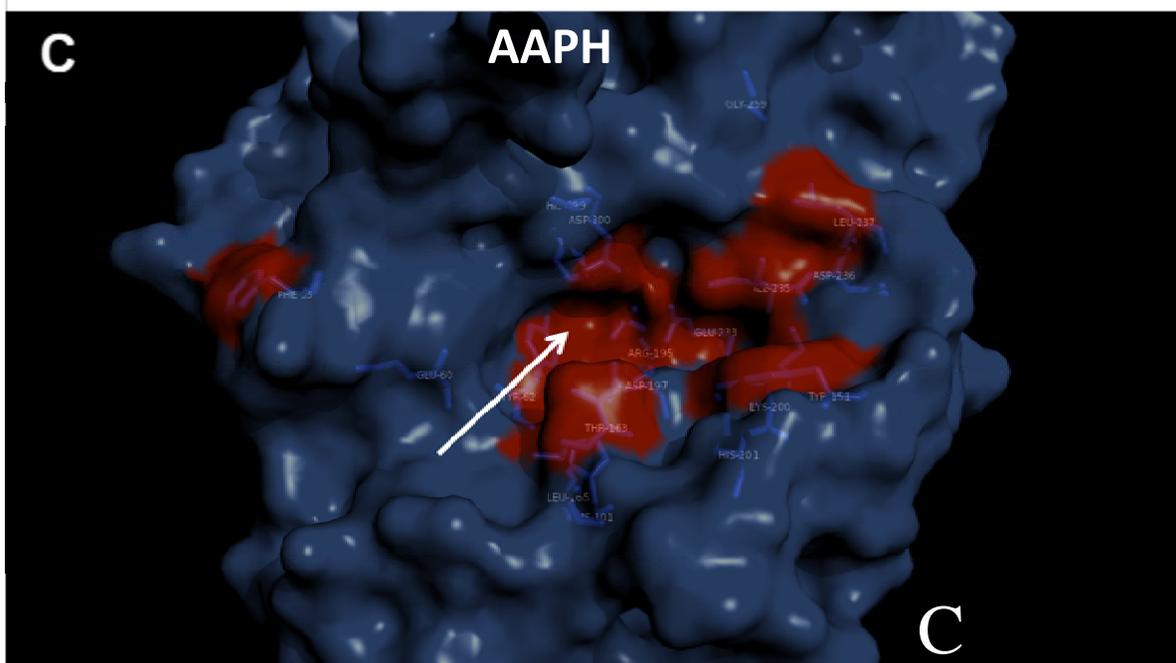
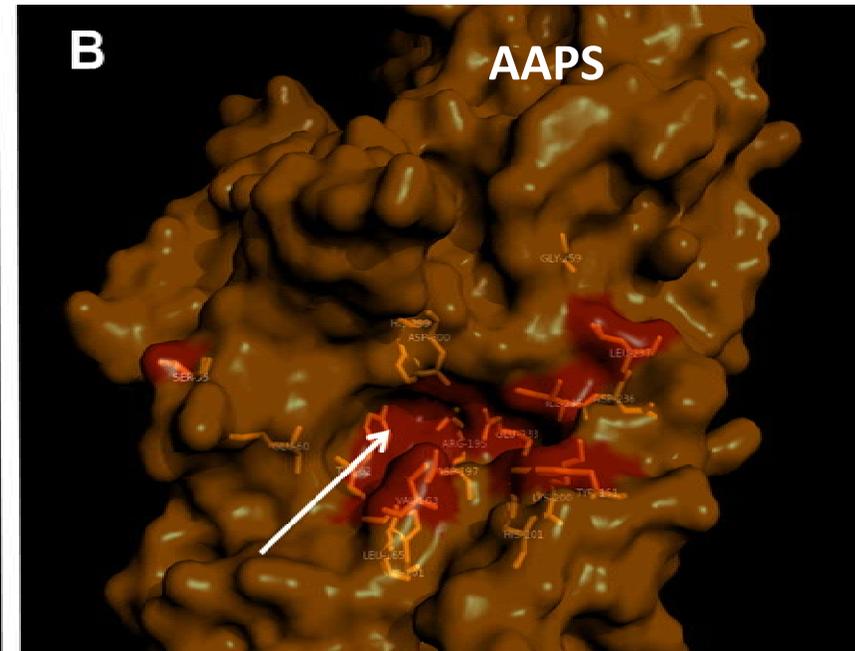
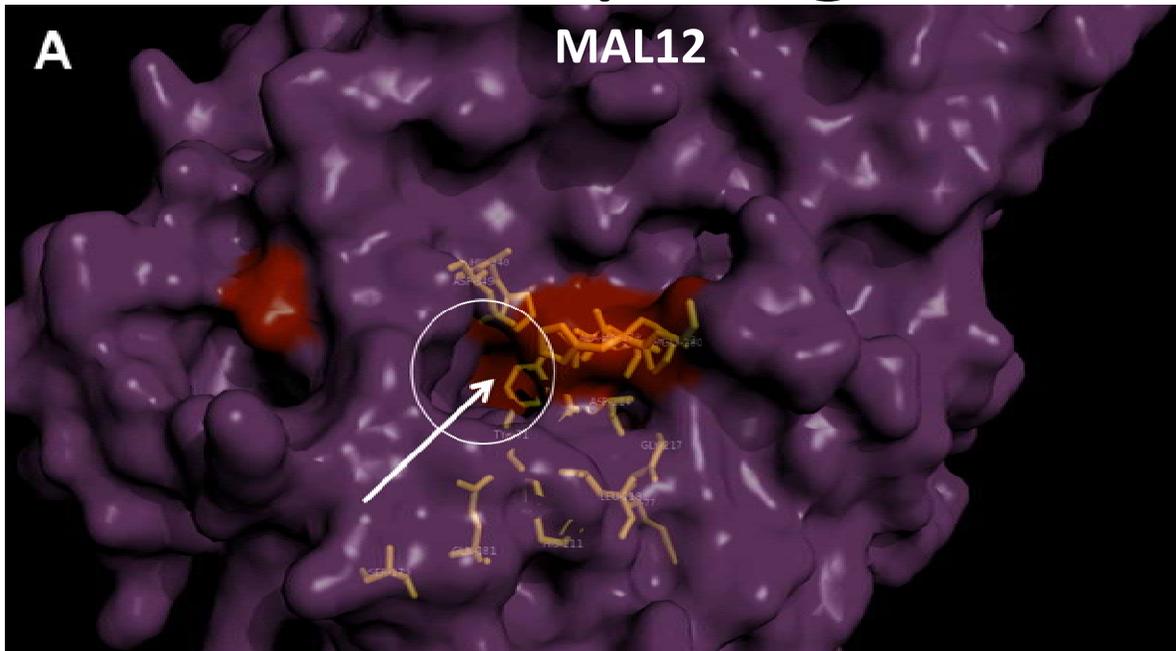


• Determinação da composição dos subsítios

	<u>Subsítio (-3)</u>		<u>Subsítio (-2)</u>		<u>Subsítio (-1)</u>			<u>Subsítio (+1)</u>		<u>Subsítio (+2)</u>		<u>Subsítio (+3)</u>	
Mal12^a					Asp68	Tyr 71	His111	Phe157	Arg212	Phe157	Gly217	Lys155	Ser156
					Phe158	Phe177	Gln181	Glu276	Phe300	Leu218	His239	Phe157	Ser179
	---		---		Arg212	Asp214	Thr215	Arg312	Asp349	Ala278	Phe300	His239	Pro240
					Glu276	His348	Asp349	Gln350	Arg439	Glu304	Arg312	Asn241	His245
					Arg439								
AAPS^b	Trp59	His305	Trp58	Trp59	Trp58	Tyr62	His101	Arg195	Glu233	Tyr151	Lys200	Tyr151	Leu162
	Asp356		Tyr62	Gln63	Leu162	Leu165	Asp197	Ile235	Phe256	His201	Ile235	Val163	
			Leu165	His305	Leu165	Asp197	Glu233	Asp300	His305	Gly306	Ala307		
					HIS299	ASP300		Gly306	Ala307				
AAPH^c	Trp59	His305	Pro57	Trp58	Tyr62	His101	Leu165	Leu162	Arg195	Tyr151	Leu162	Tyr151	Leu162
	Asp356		Trp59	Tyr62	Asp197	Ala198	Glu233	Glu233	Ile235	Lys200	His201	Thr163	
			Gln63	Thr163	His299	Asp300		Asp300	Ala307	Ile235	Ala307		
			Leu165										

^a Código de identificação para a estrutura de maltase de levedura predita por modelagem por homologia. ^b α-amilase pancreática suína: AAPS. ^c α-amilase pancreática humana: AAPH.

Topologia do sítio ativo



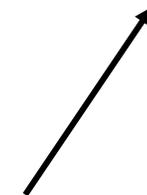
• Simulações de ancoramento molecular (*docking*)

Inibidores (I)	Enzima Livre (E)	Enzima – Substrato (ES) ‡	Razão entre os valores de EI/ESI †
	Glide gscore* (Kcal/mol)	Glide gscore* (Kcal/mol)	
GPESB16	- 7,169	- 8,924	0,80
GPESB02	- 5,576	- 8,731	0,64
GPESB05	- 6,700	- 8,437	0,79
GPESB01	- 5,630	- 8,180	0,69
GPESB14	- 6,810	- 7,433	0,92
GPESB11	- 6,163	- 7,888	0,78
GPESB15	- 5,487	- 7,382	0,74
GPESB06	- 5,496	- 6,926	0,79
GPESB04	- 5,522	- 6,514	0,85

→ P/ Maltase de Levedura

Inibidor	K _i	α [a]
GPESB16	31,3±8,4	1,01±0,21
GPESB15	49,6±15,6	0,66±0,29
GPESB11	50,6±10,9	6,55±4,53
GPESB01	74,3±28,0	3,26±0,30
GPESB14	99,5±39,2	0,57±0,29
GPESB02	120±46,6	1,57±0,94
GPESB06	173±29,8	2,45±0,89
GPESB05	456±178	0,73±0,27
GPESB04	530±346	0,53±0,26

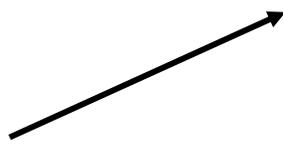
Dados experimentais



• Simulações de ancoramento molecular (*docking*)

Inibidores	Enzima Livre (E)	Enzima – Substrato (ES) ‡	Razão entre os valores de EI/ESI †	→ P/ α -amilase pancreática suína		
	Glide <u>gscore</u> * (Kcal/mol)	Glide <u>gscore</u> * (Kcal/mol)		Inibidores	Ki (μ M)	α
GPESB15	-6,495	-7,161	0,91	GPESB15	33,6 ± 5	1,13 ± 0,27
GPESB14	-6,762	-6,829	0,99	GPESB14	204 ± 72	0,44 ± 0,20
GPESB11	-6,694	-6,757	0,99	GPESB11	234 ± 61	1,14 ± 0,49
GPESB07	-7,536	-6,277	1,20	GPESB02	342 ± 71	0,46 ± 0,14
GPESB02	-6,282	-5,201	1,21	GPESB07	1009 ± 467	0,50 ± 0,19
GPESB01	-7,494	-4,837	1,55	GPESB01	780 ± 354	0,30 ± 0,17

Dados experimentais



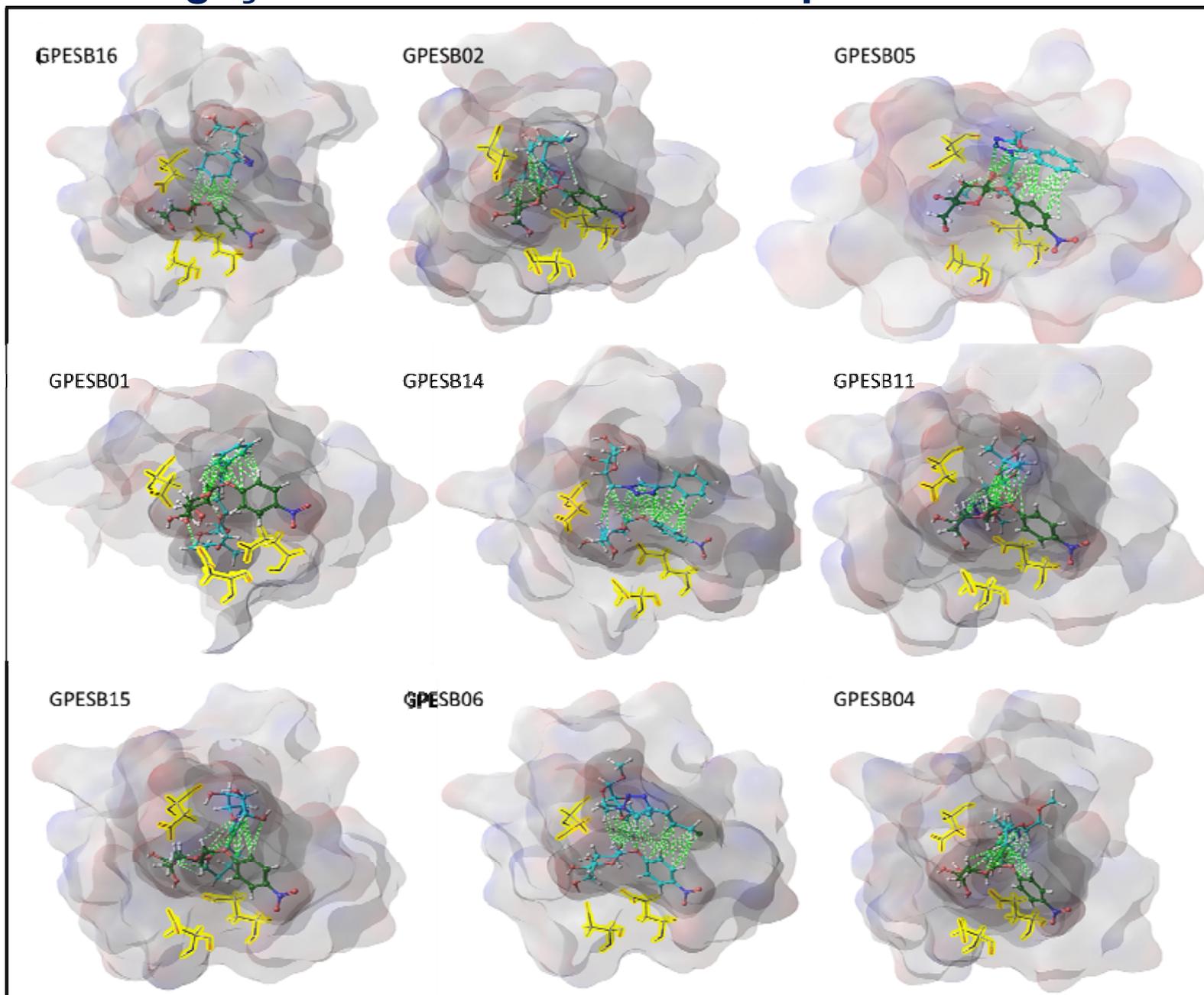
- Simulações de ancoramento molecular (*docking*)

→ P/ α -amilase pancreática humana

Inibidores	Enzima Livre (E)	Enzima – Substrato (ES) ‡	Razão entre os valores de EI/ESI †
	Glide <u>gscore</u> (Kcal/mol)	Glide <u>gscore*</u> (Kcal/mol)	
GPESB14	-6,269	-6,246	1
GPESB15	-6,349	-5,929	1,1

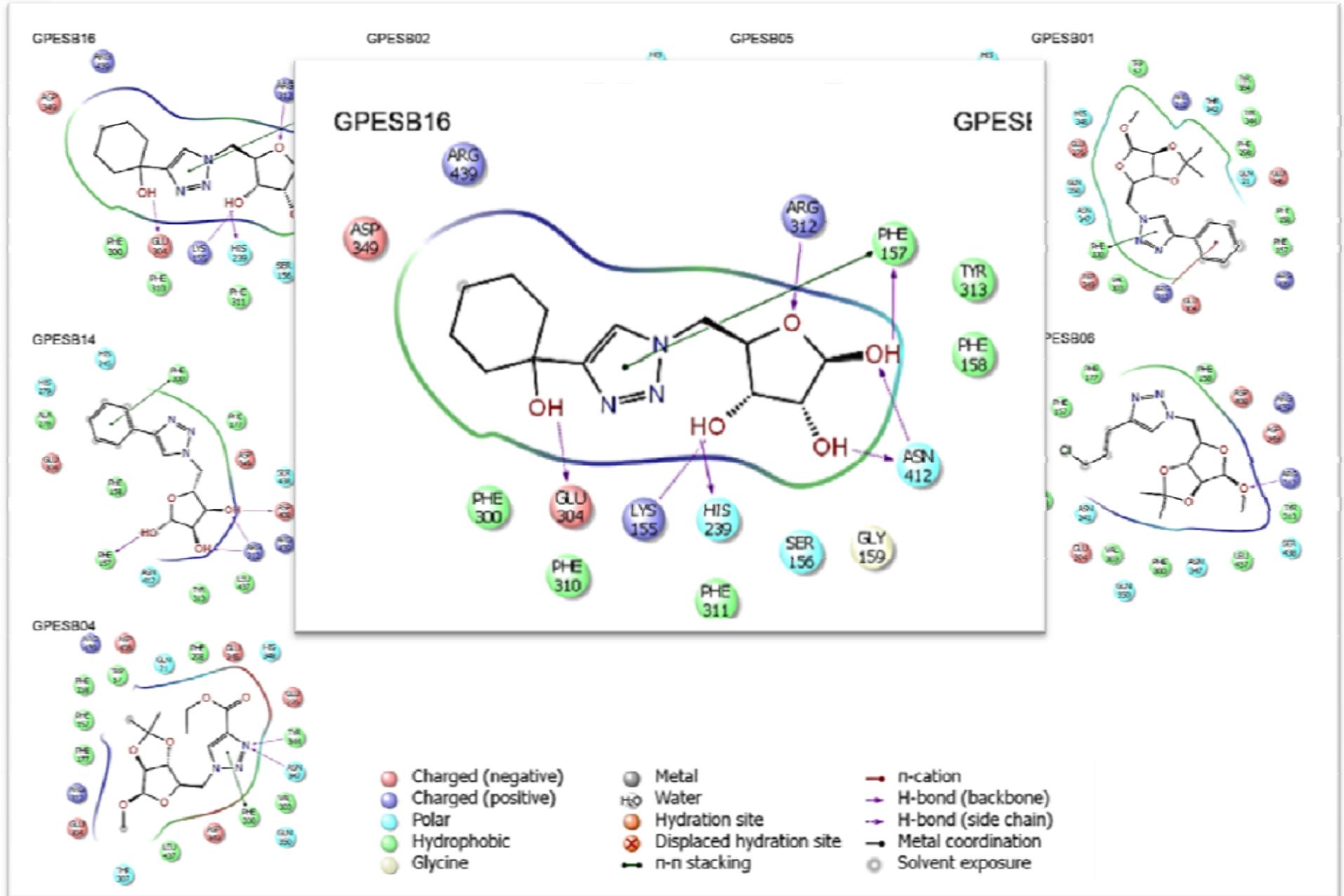


• Modo de ligação dos inibidores no complexo ES de MAL12



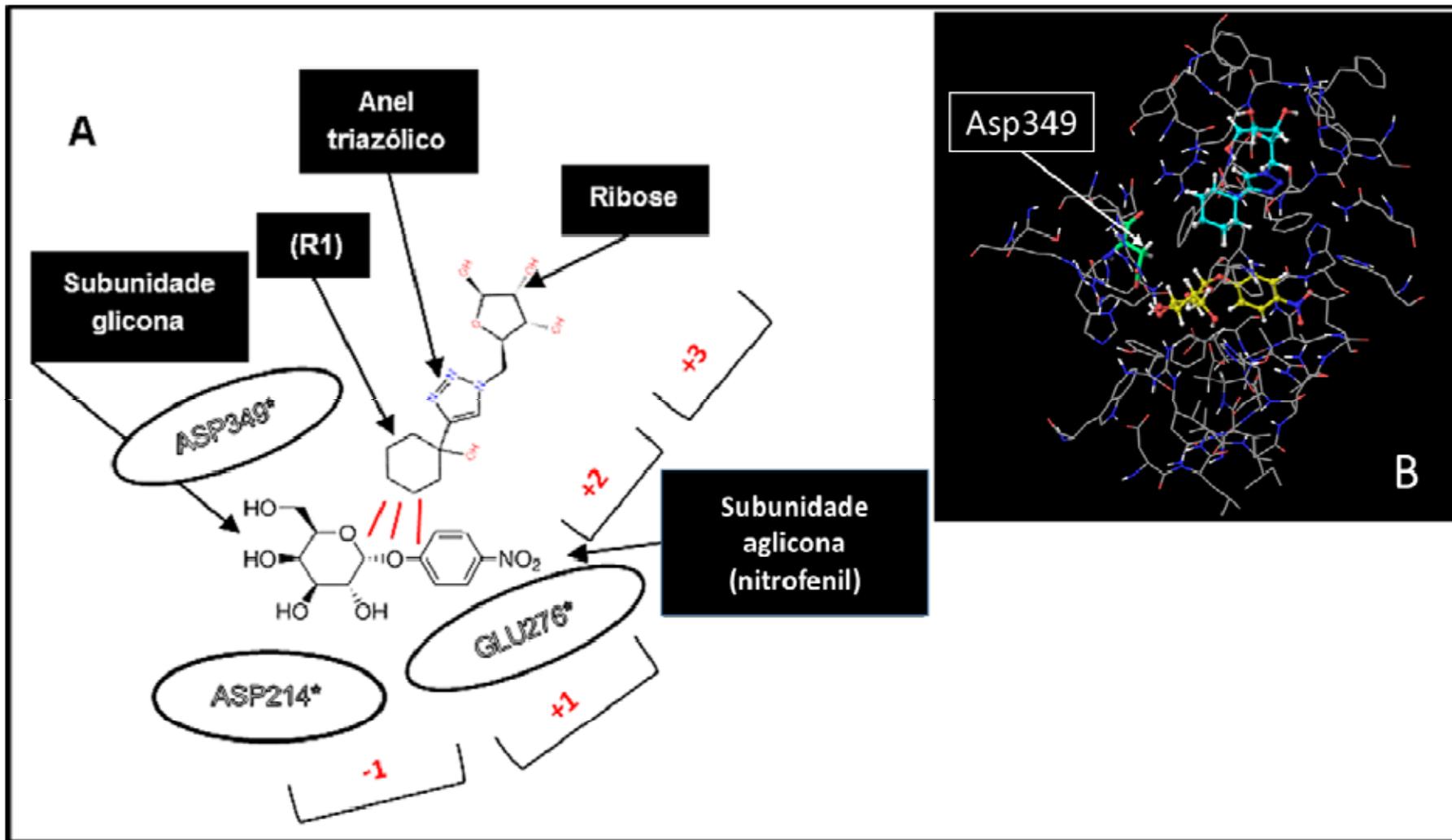


Modo de ligação dos inibidores no complexo ES de MAL12

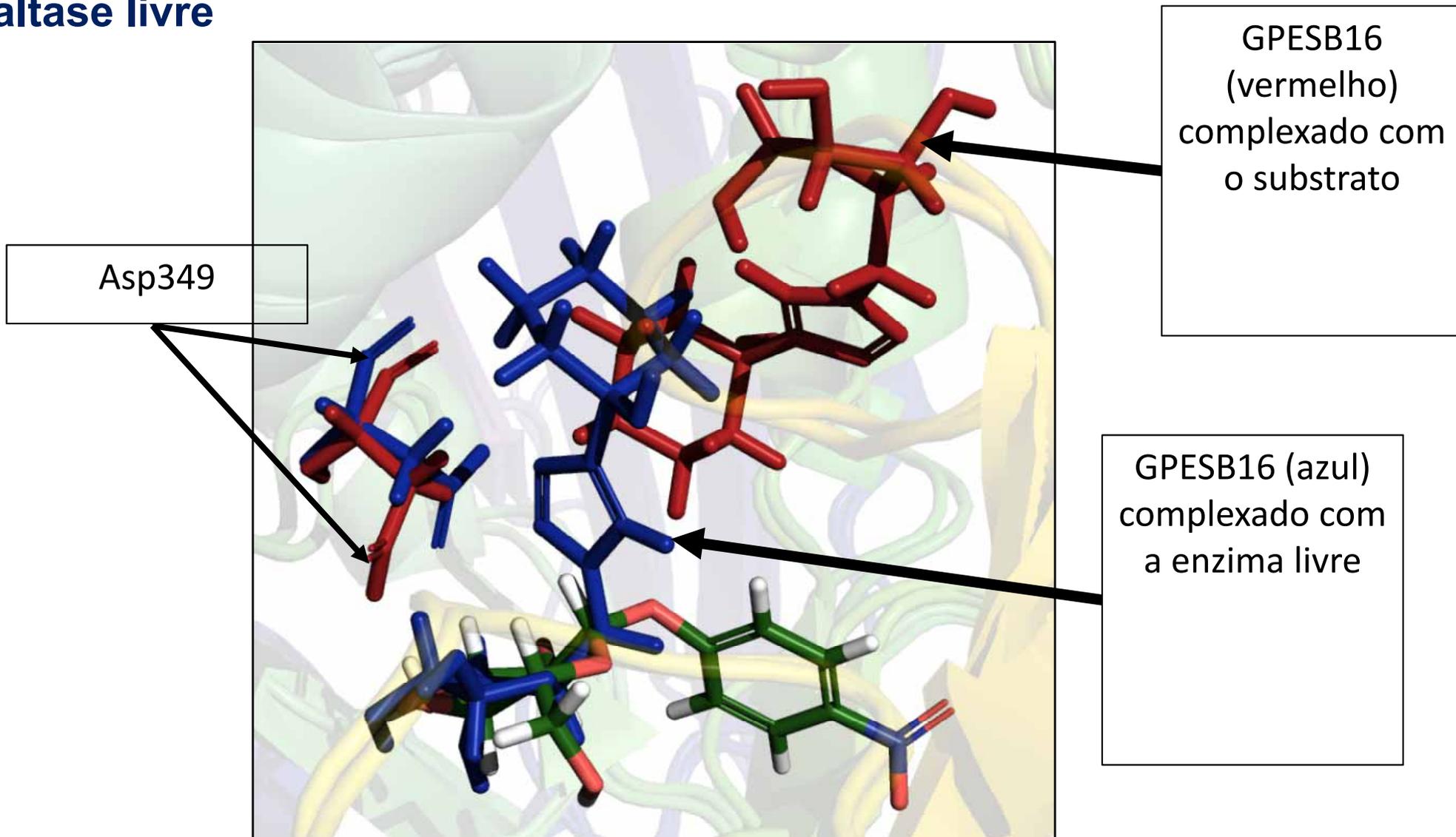


• **Análise estrutural do modo de ligação dos inibidores**

→ P/ **Maltase de Levedura e o inibidor melhor ranqueado (GPESB16)**



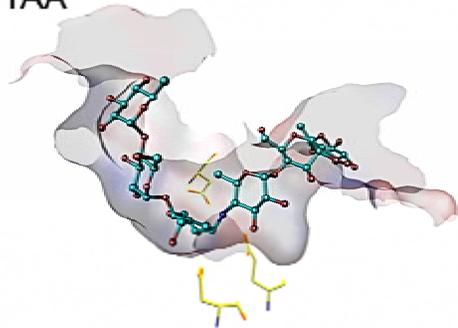
. Deslocamento do inibidor GPESB16 para o centro catalítico da maltase livre



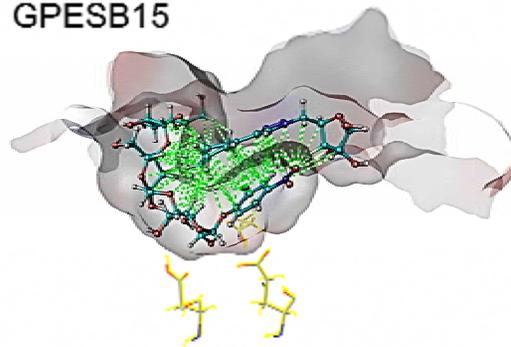


- Modo de ligação dos inibidores no complexo ES de AAPS

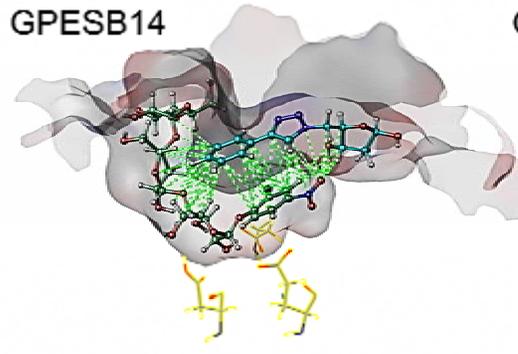
7TAA



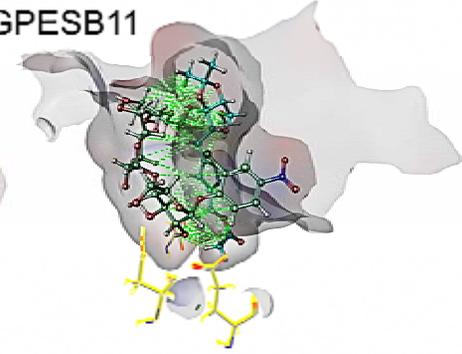
GPESB15



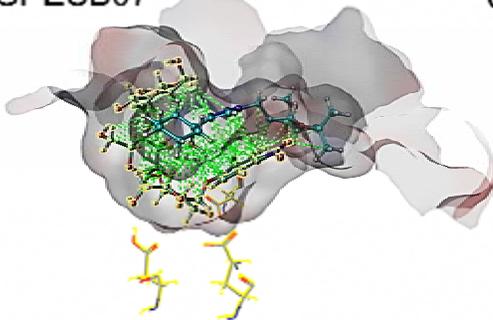
GPESB14



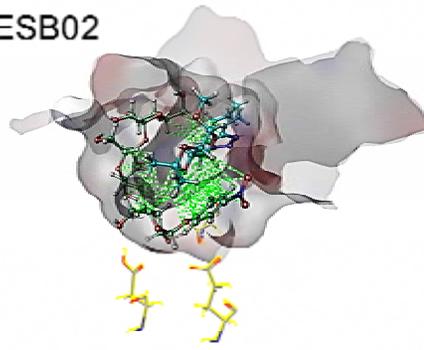
GPESB11



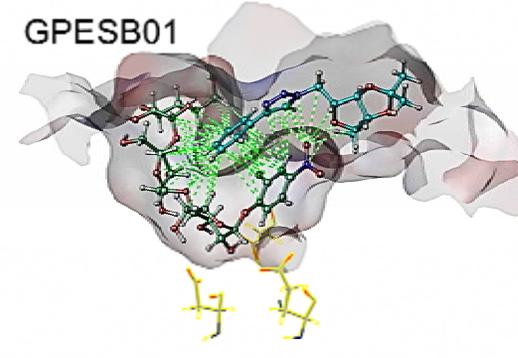
GPESB07



GPESB02

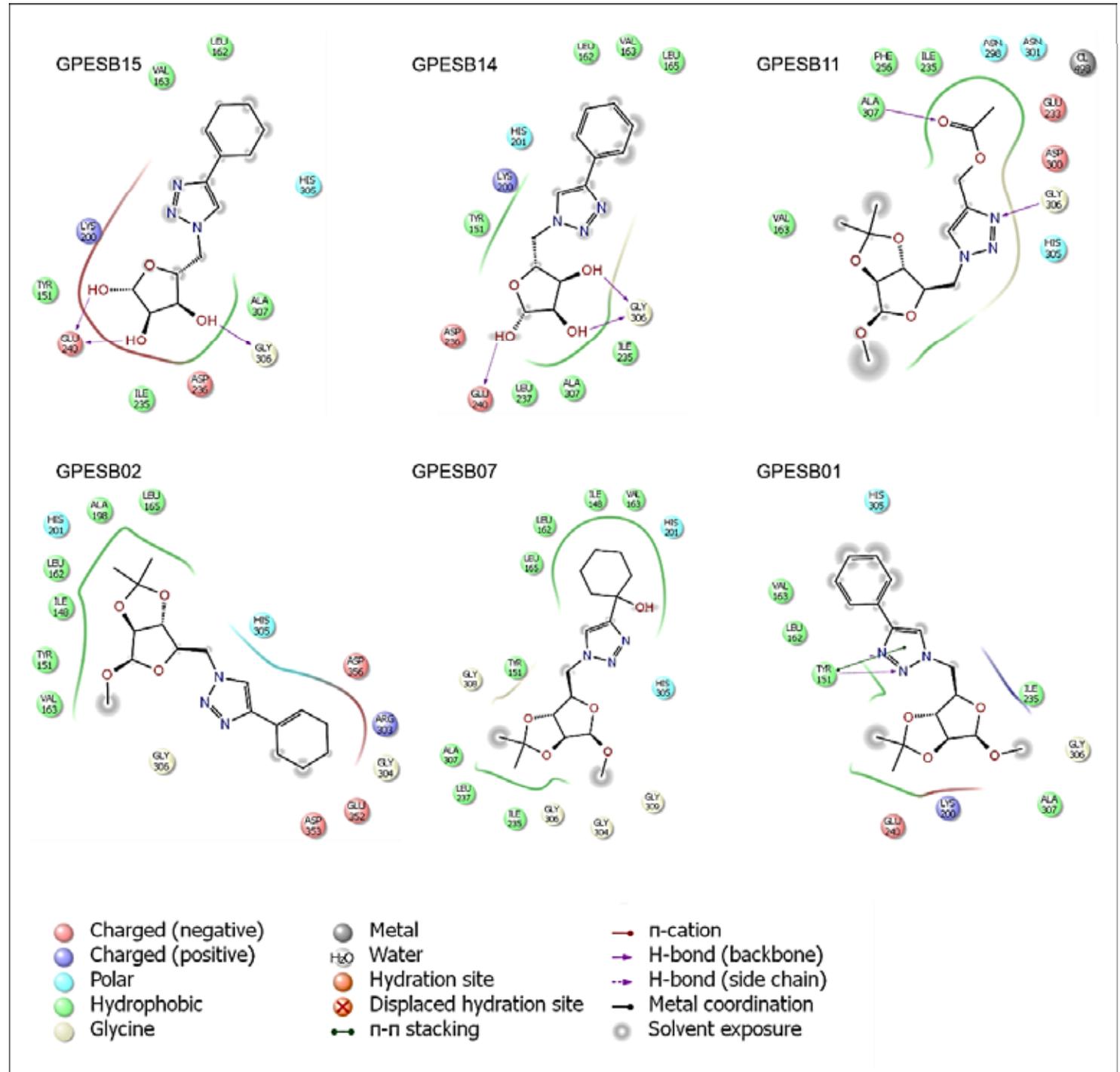


GPESB01



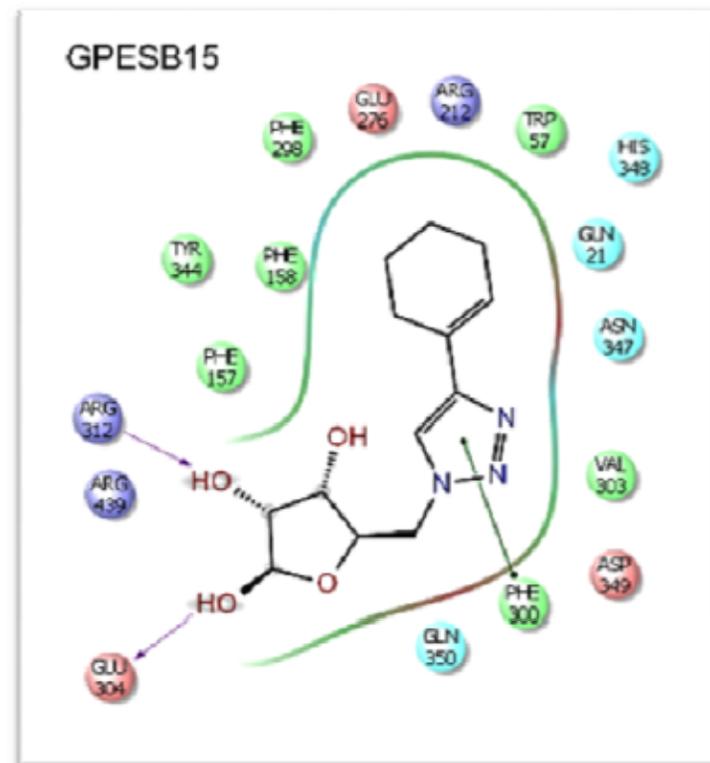
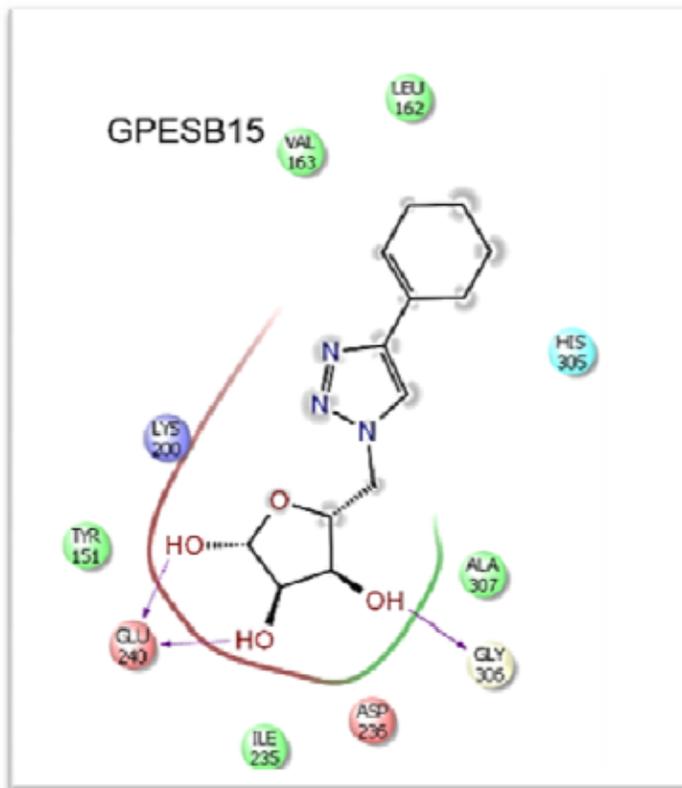


- Modo de ligação dos inibidores no complexo ES de AAPS

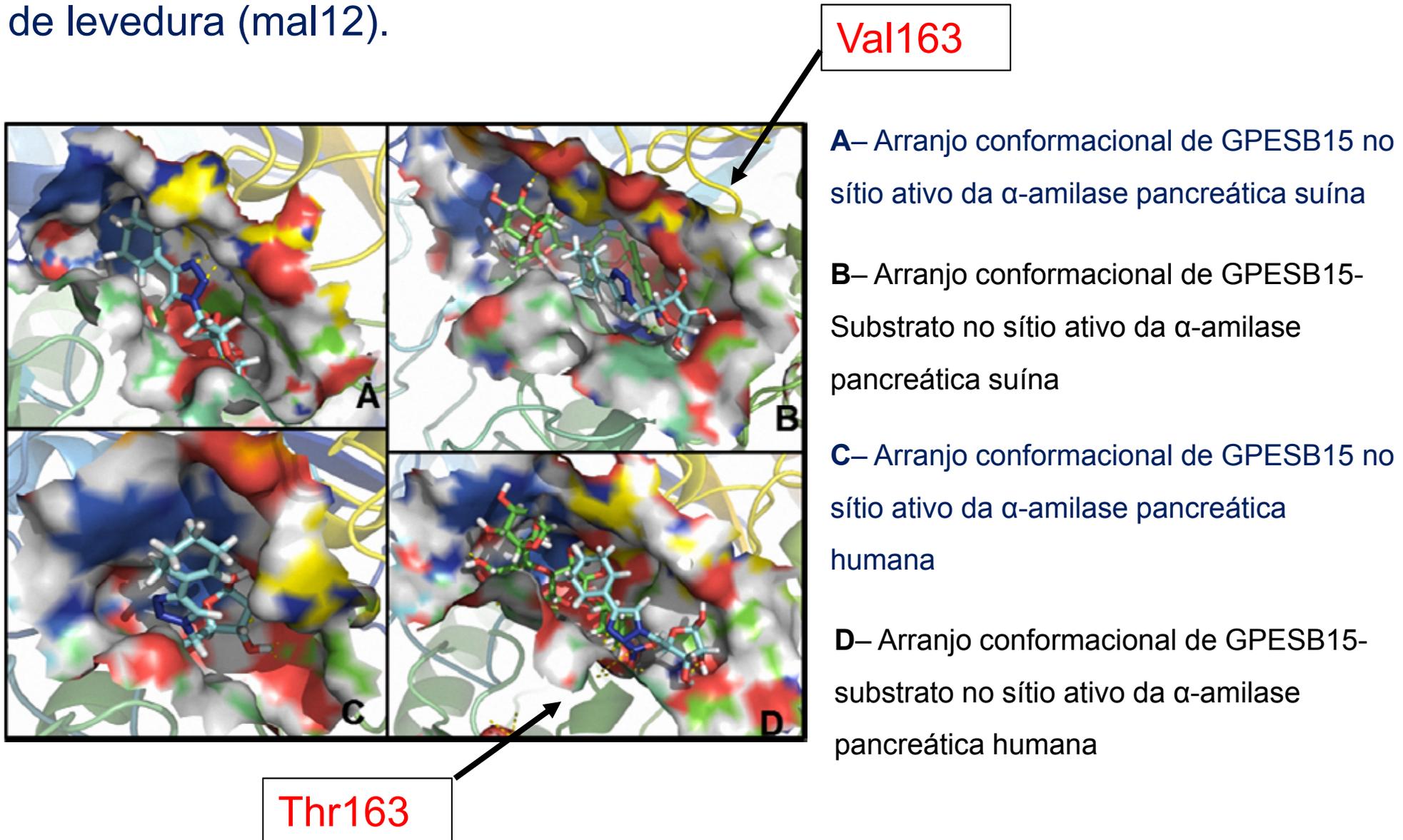




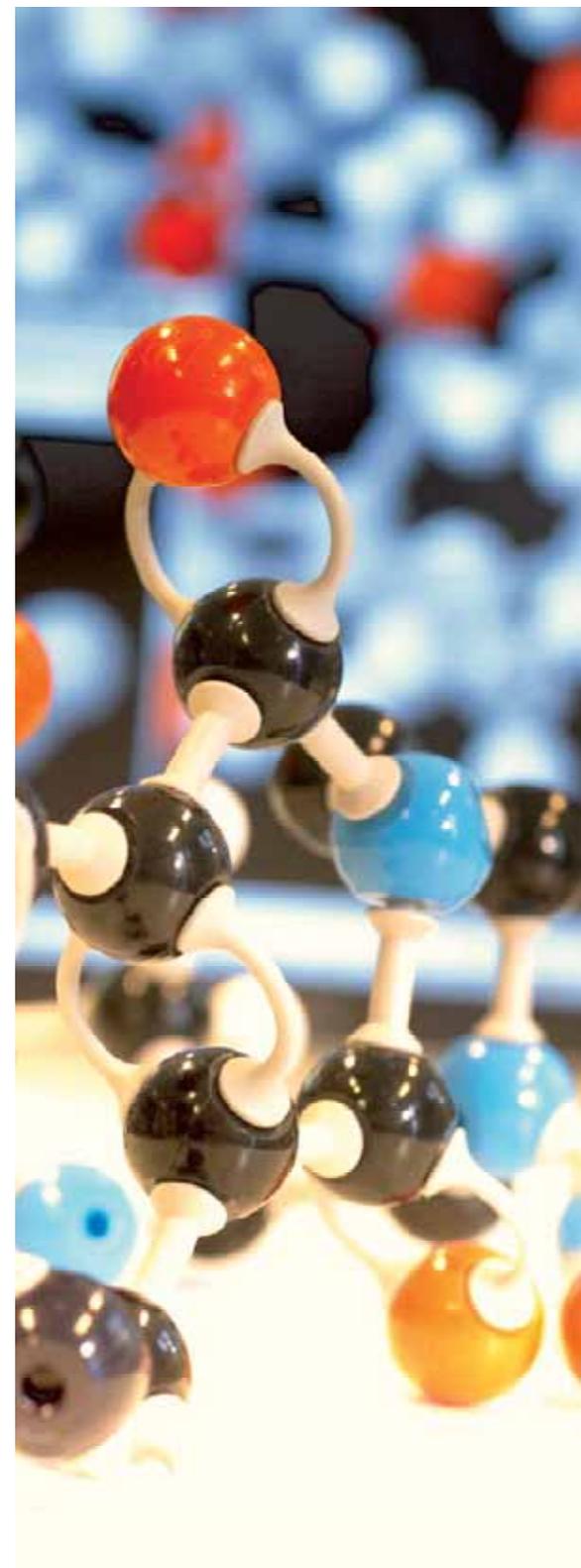
- Comparação AAPS Vs MAL12



- **Análise da correlação e diferenças estruturais entre as glicosidases: α -amilase pancreática (suína e humana) e a maltase de levedura (mal12).**



CONCLUSÕES & PERSPECTIVAS





Conclusão

- Triazóis conjugados a ribose são inibidores não-competitivos de α -glicosidases da família GH13
- Grupos volumosos em C4 do anel triazólico fornecem inibidores mais potentes
- Em geral, a metodologia de docking empregada foi capaz de ranquear os inibidores em concordância com os resultados experimentais.
- Em particular, os compostos mais ativos experimentalmente também foram os de maior afinidade de ligação predita computacionalmente;
- Em alguns casos, também foi possível encontrar computacionalmente uma preferência de ligação à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato compatível com os fatores a medidos experimentalmente



Conclusão

- Inibidores ligam-se preferencialmente na região compreendida pelos subsítios +2 e +3, tanto na maltase quanto nas amilases AAPS e AAPH;
- Quando interagindo com a forma livre, os inibidores tendem a se ligar mais próximos do sítio catalítico, i.e. nos subsítios (-1) e (+1), podendo assim impedir a ligação do substrato.
- Nossos resultados também permitiram fazer previsões sobre o comportamento dos inibidores GPESBs ao inibir a AAPH ao indicar que inibidores com grupos polares para interagir com o subsítio (+3) da enzima podem alcançar maior potência inibitória.



Perspectivas

- A realização de testes complementares, de inibição da α -amilase pancreática humana pelos inibidores GPESBs
- Clonagem e Expressão de MAL12 e HPA para estudos estruturais e termodinâmicos (ITC)
- Realizar novos testes sobre SI e MGAM
- Otimizar a estrutura dos compostos
- Dessa maneira, poderemos desenvolver um inibidor com potência inibitória satisfatória contra maltase (presentes nas bordas em escovas das vilosidades intestinais) e contra a α -amilase pancreática e assim obter um controle glicêmico pós-prandial, em pessoas diabéticas, mais eficiente.

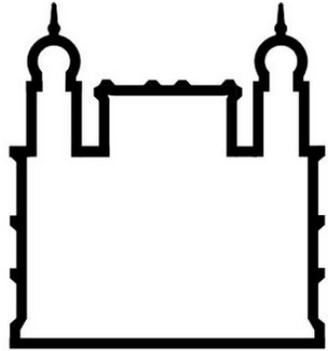


Grupo de Pesquisa em Estrutura de Sistemas Biomoleculares – GPESB

- **Pesquisadores**
 - Rafael Dantas, Dsc
 - [Mário R. Senger, Dsc](#)
 - Bogar Montoya, Dsc
- **Ex-alunos**
 - [Ana Sodero, Dsc \(UFRJ\)](#)
 - [Paulo Daltro, Msc \(PG-BCS\)](#)
- **Doutorandos**
 - Jorge Pina, Msc (PG-BCS)
 - Marlon Teixeira (PG-BCS)
- **Mestrandos**
 - Maria Eduarda, Bsc (PG-BCM)
 - Gisele Rocha, Bsc (PG-BCS)
- **Técnicos**
 - João Neto
 - Walter Valente
- **Iniciação Científica**
 - Ana Carolina Marqui
 - Victor Rodriguez
 - Nicolas Villarinho
- **Colaboradores**
 - Dr. Vitor F. Ferreira (UFF)
 - Dr. Sabrina B. Ferreira (UFRJ)
 - Dr. Carlos R. Kaiser (UFRJ)
 - Dr. Fernando Carvalho (UFF)
 - Dr. Álvaro Souza (Biomanguinhos)



Agradecimentos



FIOCRUZ



CAPES

