

Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas

RAFAEL V. C. GUIDO, ADRIANO D. ANDRICOPULO

e GLAUCIUS OLIVA

Introdução

DOENÇAS INFECCIOSAS são causadas por micro-organismos patogênicos (por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução. Essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo. A relação entre essas enfermidades e a baixa renda das populações mais carentes fica evidente ao se constatar que as doenças infecciosas ocupam a primeira posição entre as principais causas de morte e incapacidade permanente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (Guido et al., 2008a). Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo.

A química medicinal, de reconhecido papel central no processo de P&D de fármacos, caracteriza-se por seu relevante caráter multidisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (da sigla inglesa Iupac – International Union of Pure and Applied Chemistry), a química medicinal é uma disciplina com base em química, envolvendo a invenção, a descoberta, o plane-

jamento, a identificação, a preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos. Além da descoberta de moléculas bioativas, a química medicinal também incorpora os estudos do metabolismo e das relações entre a estrutura química e atividade (Wermuth, 2003). Assim, fica claro o estabelecimento de interfaces fundamentais entre as ciências químicas, biológicas, farmacêuticas, médicas, físicas e computacionais.

Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica.

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, conforme ilustrado na Figura 1, é dividido em duas grandes fases: (i) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (ii) desenvolvimento (ou clínica) (Lombardino & Lowe, 2004). Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo molecular selecionado é fundamental por uma série de razões que envolvem desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos.

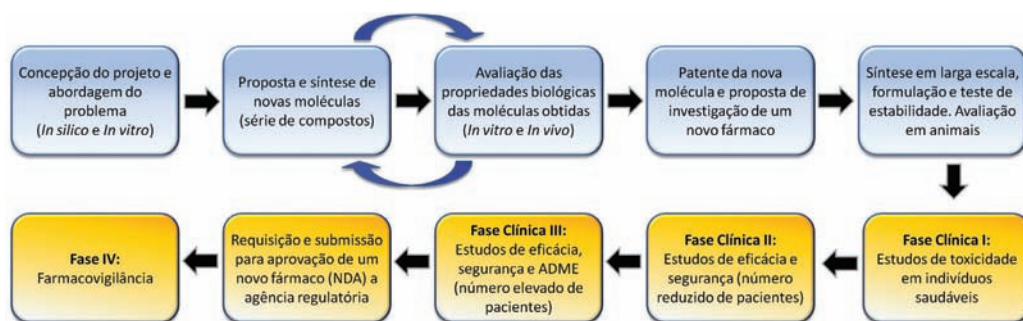


Figura 1 – Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação para um novo fármaco, do inglês *new drug application*).

O alvo biológico selecionado (por exemplo, proteína, DNA ou RNA) pode ter a sua estrutura tridimensional (3D) conhecida ou não, fato que determina a priorização de estratégias de planejamento (Andricopulo et al., 2009). Os grandes avanços da genômica e proteômica, aliados à evolução das técnicas

de cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN) proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares com estruturas 3D disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês Protein Data Bank).

As moléculas bioativas (ou ligantes, do inglês *hits*) podem ser identificadas a partir de triagens reais (por exemplo, biológicas, bioquímicas) ou virtuais (por exemplo, computacionais) de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias, ou ainda mediante planejamento racional. Ressalta-se, contudo, que, em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente, sendo necessário o desenvolvimento de ensaios padronizados e validados de alta qualidade. Em geral, nas fases iniciais de planejamento, são identificadas moléculas de baixa potência e afinidade que devem ser otimizadas em relação a uma série de propriedades farmacodinâmicas (por exemplo, potência, afinidade, seletividade) e farmacocinéticas (por exemplo, absorção, metabolismo, biodisponibilidade). Os compostos otimizados são selecionados como compostos líderes (do inglês *lead compounds*) para posterior desenvolvimento de NCE candidatas a fármacos (Guido & Andricopulo, 2008).

Com o auxílio de métodos de química medicinal, é possível explorar o imenso espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (por exemplo, enzima, receptor), o qual representa o espaço biológico. Várias estratégias podem ser empregadas para a investigação do espaço químico-biológico, tais como: a organização de bases de dados, a aplicação de filtros moleculares, o emprego de triagens biológicas automatizadas em alta escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*) e o uso da triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*).

O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*). Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos. Em muitos casos, o uso integrado de estratégias de SBDD e LBDD pode gerar informações úteis no planejamento de NCE, por meio da sinergia e complementaridade de conhecimentos entre as estratégias (Guido et al., 2008a; Andricopulo et al., 2009). O gerenciamento qualificado da informação é um fator muito importante nos dias atuais, possibilitando a organização e análise do vasto volume de dados disponível.

Biotecnologia e descoberta de fármacos

A revolução biotecnológica (por exemplo, genômica, genômica funcional, proteômica, metabolômica e citômica) tem fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. O sufixo “ômica” indica uma série

de novas disciplinas e procedimentos que visam à identificação funcional e/ou estrutural de tecidos, células, padrões de expressão gênicos e características metabólicas (Bhogal & Balls, 2008). Essas estratégias encontram uma variedade de aplicações por meio do monitoramento de indicadores celulares ou bioquímicos (por exemplo, transcrição de um gene específico ou variação da expressão/função de uma determinada proteína), desde as etapas de identificação de alterações fisiológicas e/ou metabólicas induzidas pelo estado de doença até a avaliação dos efeitos dos fármacos sobre o organismo humano (Tabela 1). Apesar de promissoras, essas tecnologias apresentam algumas limitações, incluindo (i) a necessidade de métodos capazes de interpretar e correlacionar de forma otimizada a imensa quantidade de informações geradas e (ii) a aplicação dos dados biológicos de forma racional e efetiva no planejamento de fármacos.

A genômica funcional (ou transcrito) visa ao conhecimento completo do conjunto de transcritos (RNA mensageiros, RNA ribossômicos, RNA transportadores e os microRNA) de um dado organismo, tecido ou linhagem celular. Os estudos do genoma funcional são baseados em técnicas de microarranjos capazes de identificar e determinar os transcritos de RNAm em células. As análises de microarranjos de RNA de interferência (RNAi) têm contribuído de forma significativa para a avaliação da função gênica através do silenciamento genético ou da diminuição da expressão de proteínas (Mousses et al., 2003). Entretanto, eventos pós-traducionais importantes para a regulação e sinalização celular, tais como fosforilação, glicosilação, ancoramento em membranas e enovelamento, são raramente detectados através dessa técnica. Os métodos proteômicos (Blackstock & Weir, 1999) são alternativas úteis nesses casos e, apesar de serem menos apropriados para ensaios em alta escala, fornecem dados mais precisos e detalhados, uma vez que as estratégias envolvidas (por exemplo, espectroscopia de massa) são fundamentadas na capacidade de resolução e detecção de proteínas específicas isoladas de diversas fontes.

Os estudos em metabolômica permitem a identificação de metabólitos de baixa massa molecular mediante técnicas muito sensíveis como a RMN (Nicholson & Lindon, 2008), que necessita de apenas 20 mg de tecido ou fluidos biológicos (Bollard et al., 2005). Além disso, os procedimentos envolvidos podem ser amplamente aplicados em estudos de avaliação de propriedades farmacocinéticas de candidatos a fármacos, tanto na fase pré-clínica em modelos animais quanto nos ensaios clínicos em humanos (Figura 2). O uso da Base de Dados do Metaboloma Humano (do inglês Human Metabolome Database) (Wishart et al., 2007) auxilia no trabalho de avaliação do impacto das doenças sobre o metabolismo de diferentes organismos.

A citômica, caracterizada pelo estudo dos sistemas celulares, baseia-se em uma premissa menos reducionista que integra os dados da genômica funcional e metabolômica para elucidar os eventos genéticos e bioquímicos em uma célula isolada (Valet, 2006). Técnicas anteriormente exclusivas dos estudos celulares,

tais como a citometria de fluxo, microscopia confocal, bioimagem e fluorescência, estão sendo aplicadas em P&D de fármacos, pois permitem a aquisição de dados em tempo real, evidenciando um cenário realístico dos fenômenos biológicos.

Tabela 1 – Estratégias e métodos biotecnológicos

Estratégia	Amostra	Tecnologia	Informação	Vantagens	Limitações
Genômica	DNA	Sequenciamento de DNA	Sequência de nucleotídeos	Eficiência na geração de dados	Geração excessiva de dados
Genômica funcional	RNA	Determinação de transcritos – RNAm	Padrões de hibridização de RNAm	Eficiência na geração de dados	Extrapolação da transcrição do RNAm para a expressão de proteínas
Proteômica	Proteínas	Espectroscopia de massa, eletroforese em gel, chips de proteínas, arranjos de anticorpos	Sequenciamento de aminoácidos, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas	Dados gerados em média-escala; relevantes indicações para a descoberta de novos alvos	Baixa eficiência na geração de dados, ruído associado
Metabômica	Metabólitos	Espectroscopia de massa, RMN, CLAE	Moléculas que constituem os metabólitos	Triagem em alta escala com significativa capacidade de transferência para estudos	Misturas complexas, ruído associado, reprodutibilidade
Citômica	Células	Imagem digital, fluorescência, imunohistoquímica	Fótons	Otimização da visualização temporal e espacial dos efeitos celulares dos fármacos	Dificuldade em obter biomarcadores relevantes

Em geral, as diferentes estratégias biotecnológicas discutidas produzem grandes quantidades de dados que devem ser analisados de forma rápida e eficaz. Nesse contexto, os métodos em bioinformática têm papel fundamental, possibilitando a organização, o gerenciamento, a visualização e interpretação da informação gerada. O objetivo é o estabelecimento de padrões de correlação entre os diversos eventos bioquímicos e celulares envolvidos no estado de doença (ou durante o tratamento com um candidato a fármaco). Da análise integrada desses dados, origina-se a interatômica (Cusick et al., 2005), caracterizada pelo mapeamento das redes de interação entre os diversos fenômenos biológicos (por exemplo, moleculares, bioquímicos, celulares). Um número expressivo de dados contendo os mapas de interação de diversos sistemas biológicos encontra-se

disponível em bases de dados de acesso público, como: (i) Mapa do Interatoma de Proteínas Estruturais (PSI-MAP – do inglês Protein Structural Interactome Map) (Gong et al., 2005); (ii) Base de Dados de Interação de Proteínas (DIP – do inglês Database of Interacting Proteins) (Xenarios et al., 2000); (iii) Base de Dados de Redes de Interação Biomolecular (Bind – do inglês Biomolecular Interaction Network Database) (Bader et al., 2003); e (iv) Base de Dados de Interação Molecular (Mint – do inglês Molecular INTeraction database) (Zanzoni et al., 2002).

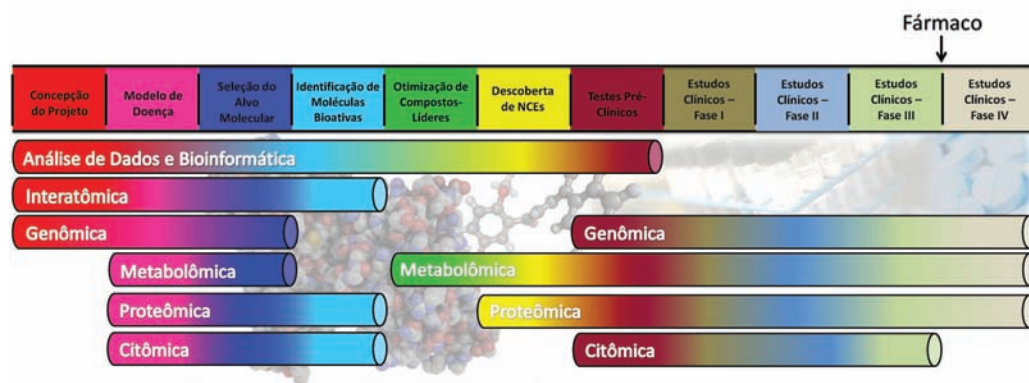


Figura 2 – Integração da biotecnologia no processo de P&D de fármacos.

Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são consequências marcantes do subdesenvolvimento social, retratando com minúcia a situação das regiões mais pobres e desfavorecidas do planeta (Beyrer et al., 2007). As DTN são endêmicas em várias regiões geográficas importantes (Dias et al., 2009), afetando milhões de pessoas e determinando altos índices de morbidade e mortalidade. Para a maioria das DTN prioritárias nos programas especiais da OMS (por exemplo, malária, tripanossomíase africana (doença do sono), tripanossomíase americana (doença de Chagas), dengue, lepra, leishmaniose, esquistossomose, oncocercose, entre outras), as opções terapêuticas são insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes (Guido & Oliva, 2009). Esse cenário é agravado pelo número limitado e pela falta de inovação nos programas de P&D de fármacos na área de DTN (Nwaka & Hudson, 2006; Nwaka et al., 2008). Dessa forma, é essencial a concentração de esforços globais (governo – academia – indústria) para a criação e manutenção de programas de P&D para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o controle e tratamento dessas doenças (Guido & Oliva, 2009).

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR, do inglês Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) da OMS, o Programa de Medicamentos para Malária (MMV, do inglês Medicines for Malaria Venture) e a Iniciativa de Medicamentos para Doenças

Negligenciadas (DNDi, do inglês Drugs for Neglected Diseases Initiative) são exemplos de parcerias público-privadas que têm como objetivo criar, estimular e investir em P&D de fármacos contra uma variedade de DTN (Dias et al., 2009). Alguns exemplos de fármacos que chegaram ao mercado por meio de parcerias público-privadas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Fármacos contra DTN desenvolvidos através de parcerias público-privadas

Fármaco	Registro	Indicação terapêutica	Parcerias público-privadas
Praziquantel	1976	Esquistossomose	Bayer / TDR
Mefloquina	1984	Malária	Hoffman La Roche / Wrair* / TDR
Ivermectina	1987	Oncocercose	Merck / TDR
Halofantrina	1988	Malária	Smith Kline Beecham, Wrair* / TDR
Eflornitina	1991	Doença do Sono	Marion Merrel Dow / TDR
Anfotericina B Liposomal	1994	Leishmaniose	NeXstar / TDR
Artemisinina	1997	Malária	Rhone Poulenc Rorer / Kunming / TDR
Artemisinina-lumefantrina	1999	Malária	Novartis / governo chinês
Artemotila	2000	Malária	Artecef / WRAIR / TDR
Miltefosina	2002	Leishmaniose	Zentaris, Indian CMR / TDR
Artesunato-amodiaquina	2007	Malária	Sanofi-Aventis / DNDi
Artesunato-mefloquina	2008	Malária	Farmaguinhos / DNDi

* Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed (Wrair, do inglês Walter Reed Army Institute of Research).

Iniciativas nacionais de P&D na área de DTN

Iniciativas de extrema importância vêm sendo executadas com sucesso para inserir o Brasil em um panorama cada vez mais expressivo no campo da ciência e tecnologia. Três exemplos são apresentados para ilustrar a abrangência e a diversidade de redes e parcerias que têm proporcionado grandes oportunidades e desafios na área de DTN.

O Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME) é fruto de colaborações sólidas estabelecidas em projetos de P&D de fármacos que envolvem: (i) os Laboratórios de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural, e de Química Medicinal e Computacional (LQMC) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), (ii) o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) de Campinas, e (iii) os Departamentos de Química (DQ), de Genética e Evolução (DGE) e de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O CBME é um dos dez Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (Cepid) apoiados pela Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) (CBME, 2010). Entre os principais objetivos do CBME, destacam-se a realização de pesquisa básica e aplicada, a geração de inovação científica e tecnológica, a disseminação de conhecimento e difusão da educação em todas as áreas da biotecnologia. Para cumprir seus objetivos, o CBME adotou uma abordagem multidisciplinar integrada, que inclui a aplicação de métodos de biologia molecular, bioquímica, química orgânica, biologia estrutural e química medicinal.

Os projetos de pesquisa do CBME possuem como elo comum uma abordagem molecular, explorando sistemas biológicos complexos de grande importância para áreas sensíveis de nossa sociedade, como a de fármacos e medicamentos, agronegócios e biotecnologia. Um dos grandes objetivos do CBME é alcançar a máxima integração com o setor produtivo, particularmente com indústrias farmacêuticas nacionais e multinacionais, indústrias biotecnológicas, instituições de pesquisa em saúde humana, entre outros, para o estabelecimento de parcerias e/ou outras formas de cooperação na área de P&D de fármacos. Em resumo, nos últimos dez anos, o CBME tem conduzido projetos inovadores em biotecnologia estrutural e química medicinal, incluindo o desenvolvimento de patentes e transferência de tecnologia. A disseminação da ciência e a difusão do conhecimento, alcançadas por meio de programas dedicados a alunos e professores do ensino médio, bem como à população em geral, também merecem especial destaque.

O Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) é outro exemplo bem-sucedido de iniciativa multidisciplinar integrada com foco no desenvolvimento de candidatos a novos fármacos empregando alvos moleculares específicos em micro-organismos associados a doenças infecciosas. O INBEQMeDI foi criado no programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) do MCT/CNPq/MS/Fapesp. Esse programa tem metas ambiciosas e abrangentes em termos nacionais como possibilidade de mobilizar e agregar, de forma articulada, os melhores grupos de pesquisa em áreas de fronteira da ciência e em áreas estratégicas para o desenvolvimento sustentável do país; impulsionar a pesquisa científica básica e fundamental competitiva internacionalmente; estimular o desenvolvimento de pesquisa científica e tecnológica de ponta associada a aplicações para promover a inovação e o espírito empreendedor, em estreita articulação com empresas inovadoras, entre outras (INBEQMeDI, 2010a).

O INBEQMeDI é um desdobramento da iniciativa bem-sucedida do “CBME-Cepid-Fapesp” e tem como sede o Instituto de Física de São Carlos da USP. Além disso, fazem parte grupos associados do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar), do Instituto de Biociências (IB-USP), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-USP), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), além de dois grupos de jovens pesquisadores da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As abordagens empregadas são fundamen-

tadas em biotecnologia estrutural e química medicinal moderna. A estratégia de ação do INBEQMeDI é realizar tanto pesquisa básica quanto aplicada, bem como promover o desenvolvimento tecnológico e a disseminação da educação na área de DTN. Para alcançar esses objetivos, o INBEQMeDI vem promovendo uma abordagem multidisciplinar, incluindo a utilização de métodos de biologia molecular, bioquímica, biologia estrutural (cristalografia de proteínas, RMN multidimensional, modelagem molecular e bioinformática), química medicinal baseada em produtos de origem natural e sintética, planejamento de fármacos, imunologia molecular, biologia celular e farmacologia (INBEQMeDI, 2010b).

Como último exemplo, vale destacar que o nosso grupo foi selecionado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em seu Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases – TDR/WHO-Unicef/UNDP/World Bank – Business Line on Lead Discovery for Infectious Tropical Diseases – New Medicinal Chemistry Centers to Join Drug Discovery Networks), como Centro de Referência em Química Medicinal para Doença de Chagas. O nosso Centro da OMS tem como objetivo fundamental avançar no desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. As atividades de pesquisa envolvem uma integração efetiva com laboratórios parceiros da rede de química medicinal da OMS, incluindo grandes empresas farmacêuticas como a Pfizer, Merck, Chemtura e Pharmacopeia (WHO, 2010).

Alvos moleculares para a descoberta de fármacos

As enzimas são alvos biológicos extremamente importantes para o planejamento de novos fármacos, em razão do seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções em humanos. Outros atrativos são a sua fácil obtenção, adequação para ensaios biológicos e versatilidade na aplicação de técnicas de SBDD e LBDD (Mestres, 2005). Os inibidores enzimáticos do tipo reversível são os candidatos a fármacos mais estudados e podem ser classificados em competitivos, não competitivos e incompetitivos. Existem ainda os inativadores enzimáticos irreversíveis, que atuam especialmente como agentes marcadores de afinidade (do inglês *affinity labels*) ou como inativadores enzimáticos com base no mecanismo (do inglês *mechanism-based inactivators*), levando a modificações covalentes da enzima (Copeland, 2005).

De acordo com dados da FDA (sigla inglesa para U.S. Food and Drug Administration), aproximadamente 25% das NCE registradas (317 em 1.278 NCE) tinham como alvo 71 enzimas provenientes de cinco fontes distintas (Figura 3) (Robertson, 2005).

Exemplos de aplicação de métodos de planejamento de fármacos

Um dos grandes desafios da química medicinal no processo de planejamento de fármacos é contribuir para o aumento da taxa de sucesso na descoberta de NCE. A integração de métodos experimentais e computacionais tem enorme importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas

bioativas a partir de coleções de compostos reais ou virtuais. Nesse âmbito, as estratégias de SBDD e LBDD assumem natural destaque (Andricopulo et al., 2009). Os métodos de SBDD se baseiam no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo, utilizam como pré-requisito dados 3D detalhados da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de estruturas cristalográficas, de RMN ou de modelagem por homologia. A docagem molecular (do inglês *molecular docking*) é uma das principais estratégias de SBDD, que consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (proteína-alvo), seguido da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto. A triagem virtual baseada na estrutura do receptor (SBVS, do inglês *structure-based virtual screening*) emprega métodos de docagem molecular na análise de grandes bases de dados de compostos com o objetivo de caracterizar um espaço químico-biológico privilegiado e permitir a seleção de compostos para testes bioquímicos e/ou biológicos (Guido et al., 2008a; Andricopulo et al., 2009).

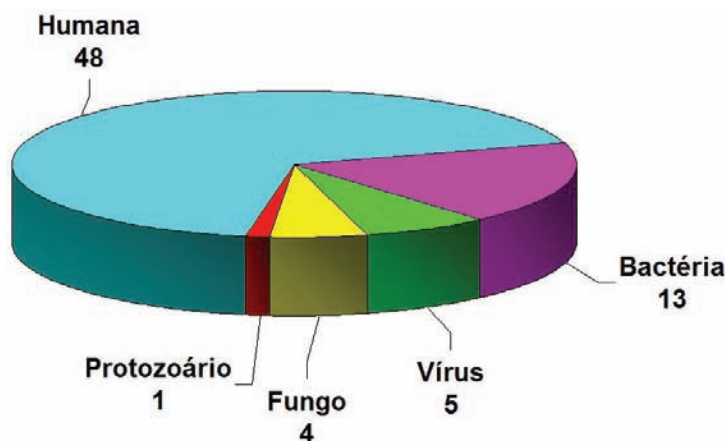


Figura 3 – Enzimas como alvos moleculares de fármacos aprovados pelo FDA (Robertson, 2005).

O planejamento de fármacos antiparasitários se baseia, especialmente, na investigação de vias bioquímicas do parasita e, quando apropriado, na comparação dessas com a do hospedeiro, com o objetivo de identificar possíveis alvos para modulação seletiva por moléculas pequenas (Verlinde et al., 2001). A aplicação de estratégias modernas de química medicinal pode ser observada no exemplo da purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni* (*SmPNP*), uma enzima-chave da via de salvação de purinas (Postigo et al., 2010). Nesse trabalho, o sítio ativo da *SmPNP* foi selecionado como alvo para o desenvolvimento de um modelo farmacofórico 3D, que foi empregado na triagem virtual de uma grande base de dados, levando à identificação de três derivados tioxtiazolidinonas com atividade *in vitro* ante a enzima-alvo (Figura 4A). Posteriormente, a integração entre planejamento molecular, síntese orgânica e avaliação

biológica foi fundamental no processo que resultou na identificação de uma série de vinte derivados tioxotiazolidinonas, proporcionando o estabelecimento de relações entre a estrutura e atividade (SAR, do inglês *structure-activity relationships*). Vale enfatizar que o processo de otimização molecular resultou na descoberta de um composto-líder (figuras 4B e 4C) com potência aproximada vinte vezes superior aos seus precursores.

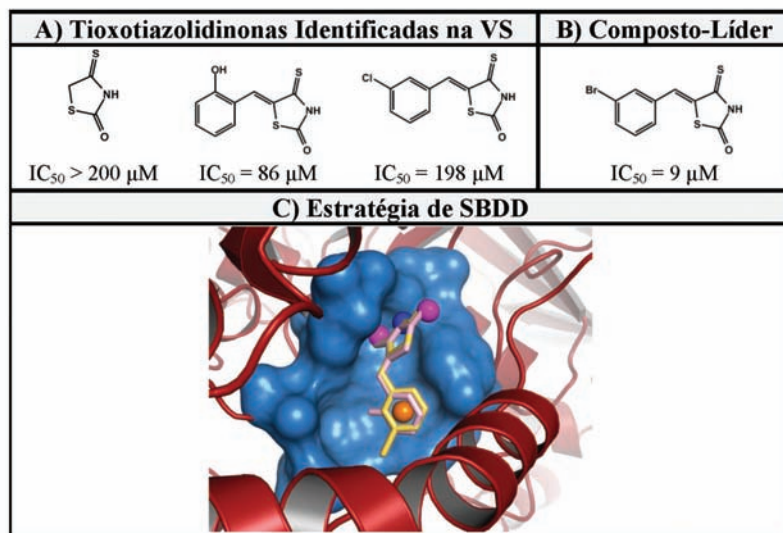


Figura 4 – (A) Estrutura molecular dos compostos selecionados na VS. (B) Composto-líder identificado. (C) Modo de ligação dos inibidores da *SmpNP* identificados por meio de estratégias de SBDD. A enzima está representada pelo modelo de fitas e o sítio ativo é indicado pela superfície acessível ao solvente. O modelo farmacofórico está indicado por esferas que delimitam as áreas favoráveis para grupos aceptores/doadores de ligação de hidrogênio (magenta), grupos doadores de ligação de hidrogênio (azul) e grupos hidrofóbicos (laranja). O composto-líder (amarelo) e uma das tioxotiazolidinonas (rosa) estão representados como modelos de bastões.

Além de sua importância na identificação de novos moduladores (isto é, ligantes de receptores ou moléculas pequenas com atividade biológica), os estudos em química medicinal são úteis no desenvolvimento de NCE candidatas a fármacos. Nesse sentido, destacam-se os métodos de QSAR (do inglês, *quantitative structure-activity relationships*) que têm como objetivos relacionar a informação em conjuntos de dados (estrutura química e atividade biológica) e criar modelos estatísticos com capacidade preditiva externa. Assim, são extremamente valiosos no planejamento de moléculas com propriedades (farmacodinâmicas e farmacocinéticas) superiores em relação àquelas do conjunto de dados original empregado na modelagem molecular (Salum & Andricopulo, 2009, 2010; Moda et al., 2007). Contudo, deve ser observado que os estudos de QSAR requerem cuidadosa padronização em aspectos cruciais, tais como: (i) as moléculas do conjunto de dados devem ser quimicamente relacionadas; (ii)

o parâmetro biológico deve ser quantitativo e obtido sob as mesmas condições experimentais para todos os membros do conjunto de dados; (iii) todos os compostos da série devem atuar em um único alvo molecular, na mesma cavidade de ligação e por meio do mesmo mecanismo de ação (Farutin et al., 1999); (iv) o método estatístico deve ser apropriado para o nível de informação disponível, de modo que o modelo gerado possa fornecer informações úteis para o planejamento molecular (Salum & Andricopulo, 2009, 2010). O processo cíclico de geração de dados, construção de modelos de QSAR e predição de propriedades evolui para a síntese e avaliação biológica de novas moléculas, culminando na descoberta de NCE candidatas a estudos clínicos.

Outra opção amplamente explorada, quando estruturas 3D dos alvos macromoleculares são disponíveis, é a integração dos métodos de QSAR e de SBDD. Por exemplo, uma vez que as características químicas e estruturais associadas à propriedade biológica sejam identificadas na modelagem de QSAR, essas podem ser comparadas com as informações obtidas da topologia 3D do receptor em questão. Nisso reside a essência complementar dos métodos e a sua importância como estratégia de planejamento de fármacos (Trossini et al., 2009).

A integração dos métodos de QSAR e SBDD pode ser verificada nos estudos realizados com uma série de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de tripanossomíases (Guido et al., 2008b). O conjunto de dados utilizado na geração dos modelos de QSAR 3D preditivos era constituído de 70 derivados de adenosina (Figura 5A), que foram planejados com base nas diferenças estruturais significativas entre os sítios ativos das enzimas do parasita *Leishmania mexicana* e do seu homólogo humano. As propriedades moleculares foram quantitativamente relacionadas à potência inibitória, empregando os métodos de análise comparativa dos campos moleculares (CoMFA, do inglês *comparative molecular field analysis*) (Cramer et al., 1988) e análise comparativa dos índices de similaridades moleculares (CoMSIA, do inglês *comparative molecular similarity indices analysis*) (Klebe et al., 1994). Esses métodos consideram que a atividade biológica das moléculas de um conjunto de dados está diretamente relacionada com as interações intermoleculares predominantes no processo de reconhecimento molecular e afinidade de ligação, ou seja, as interações estereo-eletrônicas (não covalentes) envolvidas na formação de complexos do tipo fármaco-receptor. Em razão do seu caráter 3D, campos moleculares de interação (MIFs, do inglês *molecular interaction fields*) são usados como descritores. Outra característica marcante é o estudo das conformações bioativas e o alinhamento estrutural 3D (orientação no espaço cartesiano) das moléculas do conjunto de dados. Para isso, foi utilizado neste trabalho o método de docagem molecular para obtenção do alinhamento molecular dos inibidores no sítio de ligação da enzima *LmGAPDH* (Figura 5B). Modelos CoMFA e CoMSIA com elevada consistência interna (correlação) e externa (predição) foram gerados, indicando sua utilidade no planejamento

de novos inibidores mais potentes e seletivos (Figura 5C). Uma característica adicional dos métodos de QSAR 3D é a de proporcionar a visualização de regiões no espaço que possam estar diretamente relacionadas com a propriedade biológica (Figura 5D). A análise detalhada dos mapas de contorno possibilitou a elucidação das bases estruturais envolvidas no processo de reconhecimento molecular, bem como na potência e seletividade dos inibidores investigados. Evidenciam-se, assim, a natureza complementar e a sinergia entre os métodos de QSAR e SBDD.

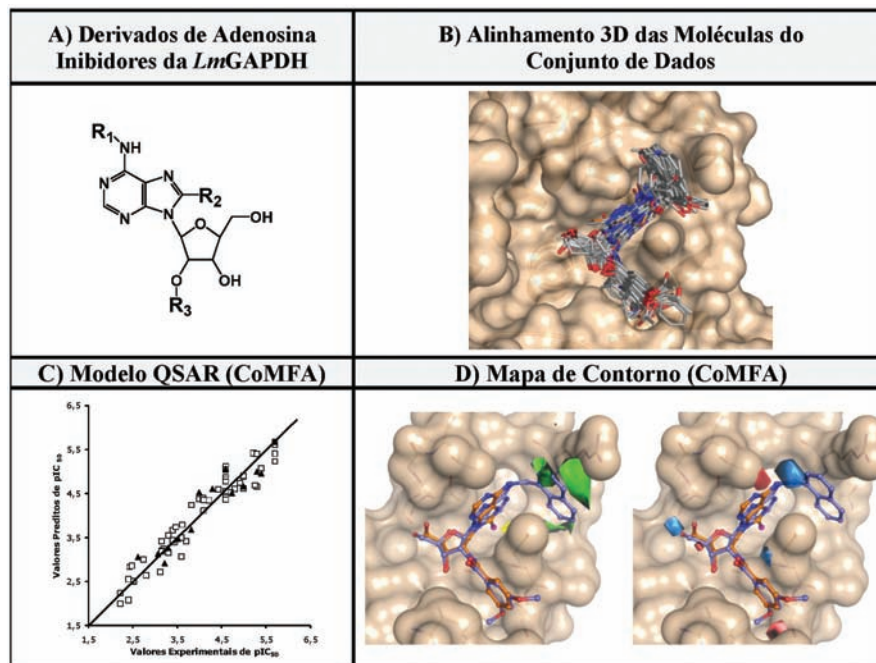


Figura 5 – (A) Estrutura geral da série de inibidores da *Lm*GAPDH, derivados de adenosina. (B) Alinhamento estrutural dos 70 inibidores empregados na modelagem de QSAR. Os compostos estão representados como modelos de bastões no sítio ativo da *Lm*GAPDH, indicado pela superfície acessível ao solvente. (C) Geração de modelos CoMFA com elevada consistência interna e externa. (D) Mapas de contorno das principais características estéreo-eletrônicas do conjunto de dados. O inibidor mais potente (azul-claro) e o menos potente (laranja) são mostrados na cavidade de ligação da proteína. Mapas de contornos (i) estéreo: favorável em verde, desfavorável em amarelo; e (ii) eletrostático: favorável em azul, desfavorável em vermelho.

Outro exemplo interessante da integração de métodos experimentais e computacionais, em particular, da cinética enzimática e modelagem molecular, pode ser apreciado no estudo de uma série de chalconas com atividade ante a proteína tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*PtpA) (Figura 6A), uma biomolécula que desempenha função central nos processos de sinalização e invasão celular em micobactérias (Mascarello et al., 2010). Nesse tra-

balho, parâmetros quantitativos como potência (IC_{50} , concentração de inibidor requerida para reduzir em 50% a atividade enzimática) e afinidade (K_i , constante de inibição) foram determinados experimentalmente, bem como a elucidação do mecanismo de ação. Resumidamente, os estudos de cinética enzimática indicaram um mecanismo reversível do tipo competitivo para as chalconas, com valores de K_i na faixa do baixo micromolar (Figura 6B). Com base nessas informações, estudos de modelagem molecular foram conduzidos para avaliar o modo de interação dos inibidores ante a enzima alvo e identificar as bases estruturais responsáveis pelo processo de reconhecimento molecular. Os modelos indicaram o papel fundamental de ligações de hidrogênio e interações de elétrons- π entre funcionalidades químicas dos ligantes (substituintes do grupo fenila e o sistema aromático naftila) e dos resíduos de aminoácido do sítio ativo da *MtPtpA* (Thr12, Arg17, His49 e Trp48, Figura 6C). Posteriormente, estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram tanto a baixa toxicidade das chalconas sintéticas quanto a sua capacidade de inviabilizar a sobrevivência e proliferação intracelular de micobactérias, sugerindo o potencial dessa classe para o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para o tratamento da tuberculose.

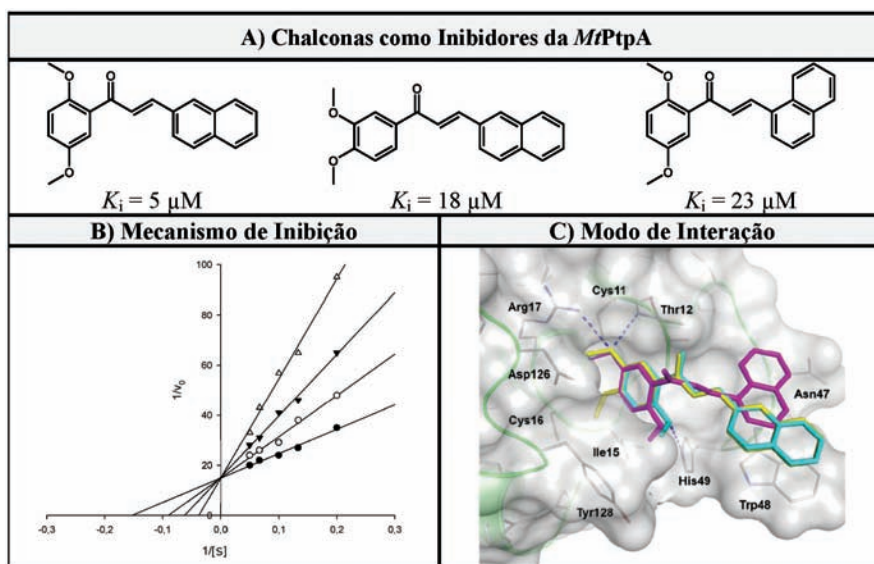


Figura 6 – (A) Série de chalconas com potente inibição contra a *MtPtpA*. (B) Gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o mecanismo de inibição competitivo. (C) Modelagem molecular e estudos do modo de interação dos inibidores. O sítio ativo da *MtPtpA* está indicado pela superfície acessível ao solvente, os inibidores como modelos de bastões e as ligações de hidrogênio como linhas pontilhadas.

Conclusão

Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área de P&D de

fármacos, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna. A área de P&D de fármacos vem crescendo de forma acentuada no Brasil. Essa tendência deve ser ampliada cada vez mais, mediante investimentos em infraestrutura, qualificação de pessoal e em pesquisa, incentivando um desenvolvimento regional mais equilibrado e a consolidação de parcerias entre universidade, governo e indústria. Olhar para o futuro requer uma visão estratégica numa perspectiva de continuidade. São fundamentais criatividade e ousadia para perceber e antecipar novas oportunidades. O compromisso comum é integrar ações, participar e contribuir da melhor maneira possível para o avanço do conhecimento científico e do domínio tecnológico. É essencial somar esforços de forma organizada, articular estratégias de captação de recursos financeiros, materiais e humanos, consolidar ideias e encontrar novas soluções para que possamos evoluir, nas próximas décadas, de uma nação emergente para uma potência mundial na área de fármacos e medicamentos.

Referências

- ANDRICOPULO, A. D. et al. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.9, n.9, p.771-90, 2009.
- BADER, G. D. et al. BIND: the biomolecular interaction network database. *Nucleic Acids Res.*, v.31, n.1, p.248-50, 2003.
- BEYRER, C. et al. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet*, v.370, n.9587, p.619-27, 2007.
- BHOGAL, N.; BALLS, M. Translation of new technologies: from basic research to drug discovery and development. *Curr. Drug Discov. Technol.*, v.5, n.3, p.250-62, 2008.
- BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.*, v.17, n.3, p.121-7, 1999.
- BOLLARD, M. E. et al. NMR-based metabolomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.*, v.18, n.3, p.143-62, 2005.
- CBME. Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural. 2010. Disponível em: <<http://cbme.ifsc.usp.br/>>. 2010. Acesso em: 8 set. 2010.
- COPELAND, R. A. *Reversible modes of inhibitor interactions with enzymes*. New Jersey: Wiley Interscience, 2005. p.48-81, 2005 (Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery).
- CRAMER, R. D. et al. Comparative molecular-field analysis (Comfa). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, v.110, n.18, p.5959-67, 1988.
- CUSICK, M. E. et al. Interactome: gateway into systems biology. *Hum. Mol. Genet.*, v.14, n.2, p.R171-81, 2005.
- DIAS, L. C. et al. Chemotherapy of chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quimica Nova*, v.32, n.9, p.2444-57, 2009.

- FARUTIN, V. et al. Structure-activity relationships for a class of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *J. Med. Chem.*, v.42, n.13, p.2422-31, 1999.
- GONG, S. et al. PSIbase: a database of protein structural interactome map (PSIMAP). *Bioinformatics*, v.21, n.10, p.2541-3, 2005.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. *Rev. Proc. Quim.*, v.2, n.4, p.24-26, 2008.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Structure-based drug design for tropical diseases. *Curr. Top. Med. Chem.*, v.9, n.9, p.824-43, 2009.
- GUIDO, R. V. C. et al. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Curr. Med. Chem.*, v.15, n.1, p.37-46, 2008a.
- _____. Structural basis for selective inhibition of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: molecular docking and 3D QSAR studies. *J. Chem. Inf. Model.*, v.48, n.4, p.918-29, 2008b.
- INBEQMeDI. Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas. S. d. Disponível em: <<http://www.inbeqmedi.ifsc.usp.br/>>. Acesso em: 8 set. 2010a.
- _____. *INBEQMeDI: Activity Report 2009*. Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas São Carlos, 2010b. p.1-64.
- KLEBE, G. et al. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J. Med. Chem.*, v.37, n.24, p.4130-46, 1994.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.3, n.10, p.853-62, 2004.
- MASCARELLO, A. et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorg. Med. Chem.*, v.18, n.11, p.3783-9, 2010.
- MESTRES, J. Representativity of target families in the Protein Data Bank: impact for family-directed structure-based drug discovery. *Drug Discov. Today*, v.10, n.23-4, p.1629-37, 2005.
- MODA, T. L. et al. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. *Bioorg. Med. Chem.*, v.15, n.24, p.7738-45, 2007.
- MOUSSES, S. et al. RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells. *Genome Res.*, v.13, n.10, p.2341-7, 2003.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: metabonomics. *Nature*, v.455, n.7216, p.1054-6, 2008.
- NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.5, n.11, p.941-55, 2006.
- NWAKA, S. et al. Advancing drug innovation for neglected diseases-criteria for lead progression. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.3, n.8, e440, p.1-13, 2008.
- POSTIGO, M. P. et al. Discovery of new inhibitors of *Schistosoma mansoni* PNP by pharmacophore-based virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.*, DOI: 10.1021/ci100128k, 2010.

- ROBERTSON, J. G. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry*, v.44, n.15, p.5561-71, 2005.
- SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR: perspectives in drug design. *Mol. Divers.*, v.13, n.3, p.277-85, 2009.
- _____. Fragment-based QSAR strategies in drug design. *Expert Opin. Drug Discov.*, v.5, p.405-12, 2010.
- TROSSINI, G. H. et al. Quantitative structure activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. *J. Mol. Graph. Model.*, v.28, p.3-11, 2009.
- VALET, G. Cytomics as a new potential for drug discovery. *Drug Discov. Today*, v.11, n.17-18, p.785-91, 2006.
- VERLINDE, C. L. et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist. Updat.*, v.4, n.1, p.50-65, 2001.
- WERMUTH, C. G. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic Press. 2003
- WHO. *The global burden of disease: 2004 update*. Geneva: World Health Organization, 2008. p.1-146.
- _____. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/research/lead-discovery-drugs/partnerships-network>>. Acesso em: 8 set. 2010.
- WISHART, D. S. et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res.*, v.35, n.Database Issue, p.D521-6, 2007.
- XENARIOS, I. et al. DIP: the database of interacting proteins. *Nucleic Acids Res.*, v.28, n.1, p.289-91, 2000.
- ZANZONI, A. et al. MINT: a Molecular INTERaction database. *FEBS Lett.*, v.513, n.1, p.135-40, 2002.

RESUMO – Estratégias modernas de planejamento de fármacos se fundamentam no conhecimento da fisiopatologia das doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares. As ferramentas biotecnológicas modernas têm fornecido informações valiosas para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos. A química medicinal possui papel central em vários processos que visam à identificação de substâncias bioativas e ao desenvolvimento de compostos-líderes com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas. O presente artigo apresenta uma abordagem de alguns aspectos fundamentais da biotecnologia e da química medicinal como ferramentas úteis para o planejamento de candidatos a novos fármacos para a terapia de doenças infecciosas.

PALAVRAS-CHAVE: Planejamento de fármacos, Química medicinal, Doenças infecciosas, Modelagem molecular, Enzimas, inibidores.

ABSTRACT – Current drug design strategies are based on the understanding of the physiopathology of diseases, biochemical pathways and selection of molecular targets. Modern biotechnological tools have provided valuable information to facilitate the discovery of new drug candidates. Medicinal chemistry has a vital role in a variety of processes aimed

at the identification of bioactive substances and the development of lead-compounds with optimized pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. The present paper presents some fundamental aspects of biotechnology and medicinal chemistry as useful tools in the design of new chemical entities for the therapy of infectious diseases.

KEYWORDS: Drug design, Medicinal chemistry, Infectious diseases, Molecular modeling, Enzymes, Inhibitors.

Rafael V. C. Guido é graduado em Farmácia-Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) e doutor pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) com estágio de doutorado-sanduíche em Química Medicinal pela Universidade Philipps – Alemanha. Possui pós-doutorado em Física Biomolecular pelo IFSC-USP. Atualmente é professor do Instituto de Física de São Carlos, pesquisador associado do Centro de Referência Mundial em Doença de Chagas (OMS), pesquisador do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME, Cepid-Fapesp) e pesquisador do Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) do Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) do MCT/CNPq/MS/Fapesp. @ – rvcguido@ifsc.usp.br

Adriano D. Andricopulo é graduado em Química Industrial pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), mestre e doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com estágio de doutorado-sanduíche em Química Medicinal pela Universidade de Michigan. Possui pós-doutorado em Química Medicinal e Planejamento de Fármacos pela Universidade de Michigan. Atualmente é professor associado do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) e coordenador do Centro de Referência em Química Medicinal para Doença de Chagas da Organização Mundial de Saúde. É pesquisador principal do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME, Cepid-Fapesp) e do Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) do Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) do MCT/CNPq/MS/Fapesp. É secretário Geral da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) e membro afiliado da Academia Brasileira de Ciências (ABC). @ – aandrico@ifsc.usp.br

Glaucius Oliva é graduado em Engenharia Elétrica pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), mestre em Física pelo Instituto de Física e Química de São Carlos (IFQSC-USP) e doutor em Cristalografia de Proteínas pela Universidade de Londres. Atualmente é professor titular do Instituto de Física de São Carlos, coordenador do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME, Cepid-Fapesp) e do Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) do Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) do MCT/CNPq/MS/Fapesp. É diretor do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na área de Engenharias, Ciências Exatas e Humanas e Sociais. É membro titular da Academia Brasileira de Ciências (ABC) e comendador da Ordem Nacional do Mérito Científico. @ – oliva@ifsc.usp.br

Recebido em 20.9.2010 e aceito em 27.9.2010.