

## Inibidores Promíscuos na Busca de Inibidores da Cruzaina

Alberto Malvezzi<sup>1</sup> (PG), Leandro de Rezende<sup>1</sup> (TQ), Antonia Tavares-do Amaral<sup>1</sup> (PQ)\*

<sup>1</sup>Depto de Química Fundamental, Instituto de Química, USP, SP, C.P. 06077;  
05513-970 São Paulo, Brasil.

\*atdamara@iq.usp.br

Palavras Chave: Inibidores Promíscuos, Cruzaina, Virtual Screening,

### Introdução

Evitar resultados falso-positivos é uma crescente preocupação em qualquer programa atual de *Virtual Screening* (VS) ou *High Throughput Screening* (HTS). Uma das razões para este problema é a presença de inibidores promíscuos entre os compostos testados<sup>1</sup>. Moléculas orgânicas que são capazes de formar agregados moleculares micromolares em tampões aquosos, são classificados como inibidores promíscuos<sup>2</sup> devido a capacidade destes agregados de sequestrar as enzimas e portanto inibir inespecificamente ensaios enzimáticos *in vitro*. Moléculas desse tipo raramente são capazes de evoluir para um fármaco e sua detecção nos primeiros estágios do desenvolvimento pode evitar muito trabalho inútil<sup>3</sup>. A identificação de inibidores promíscuos baseado nas propriedades físico-químicas dos compostos já foi tentada anteriormente com algum sucesso<sup>4</sup>, mas o tamanho pequeno das series amostrais usadas ainda limitam a aplicação desses modelos como filtros confiáveis para bancos de dados com alguns milhões de compostos. Sendo assim, observa-se que existe a necessidade de mais dados experimentais de qualidade para alimentar estes modelos empíricos e para torná-los mais robustos na identificação confiável de compostos que promovem resultados falso-positivos indesejáveis.

Em nossa tentativa de encontrar inibidores específicos para a Cruzaina (a forma recombinante da Cruzipaina, uma protease do *T.cruzi*), nós encontramos compostos com propriedades tipicamente de inibidores promíscuos. Neste trabalho nós descrevemos como estes compostos foram selecionados e como a atividade promíscua foi identificada

### Resultados e Discussão

A Cruzaina é uma enzima cuja estrutura molecular foi elucidada em pelo menos 13 PDBs (resoluções de 1,2Å to 2,2Å), todos covalentemente ligados a um inibidor peptídico. Usando a informação estrutural disponível nestes PDBs, foram aplicadas estratégias de VS para filtrar um banco de dados de moléculas (ZINC<sup>5</sup>) e selecionar compostos candidatos para serem submetidos ao teste enzimático *in vitro*

O banco de dados ZINC (3.294.741 compostos) foi inicialmente filtrado usando filtros físico-químicos (programa DBFilter<sup>6</sup>) para a seleção de compostos *drug-like*. A aplicação desse filtro reduziu a série inicial de compostos para apenas 10% de seu valor inicial. Os compostos selecionados foram então filtrados com um modelo farmacofórico gerado pelo programa Catalyst<sup>7</sup> a partir da estrutura dos inibidores conhecidos da Cruzaina alinhados pelo sítio ativo. A aplicação deste filtro farmacofórico excluiu aproximadamente 99.9% os compostos previamente selecionados, elegendo 308 compostos. Finalmente os compostos selecionados foram docados na cavidade de ligação da Cruzaina, usando o programa Gold<sup>8</sup>. Após o procedimento de docking a qualidade do ajuste entre os compostos e a enzima foi estimada com uma função de ajuste do programa e os 50 melhores resultados foram inspecionados visualmente. Foram selecionados seis compostos apresentando as características desejadas e estes compostos foram comprados e testados como inibidores da Cruzaina. Dos seis compostos testados três não mostraram atividade inibidora da Cruzaina enquanto que os outros três apresentaram atividade promíscua. A atividade promíscua foi evidenciada após a observação de que os compostos perdiam atividade na presença de 10% de Triton-X100 no ensaio.

### Conclusões

Observou-se que dos seis compostos testados como inibidores da Cruzaina, três apresentaram atividade promíscua. Esta grande proporção de resultados falso-positivos mostra que a ocorrência deste tipo de artefato experimental pode ser muito comum e deve ser uma constante preocupação em programas de VS e HTS

### Agradecimentos

FAPESP; Pró-Reitoria de Pesquisa-USP

- 1 McGovern, SL et al *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1712-1722.
- 2 McGovern, SL et al *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4265-4272.
- 3 Shoichet, BK *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 607-615.
- 4 Seidler, J. et al *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4477-4486.
- 5 Irwin, JJ.; Shoichet, BK. *J Chem. Inf. Mod.* **2005**, *45*, 177-182.
- 6 Sheng-Hung Wang. Comunicação pessoal. **2003**.
- 7 Catalyst. © Accelrys Software Inc. CA, USA. 2005.

*Sociedade Brasileira de Química ( SBQ)*

8 Verdonk, ML. et al *Prot.Struc. Func.Gen.* **2003**, 52, 609-623.