

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Guilherme Oliveira Petersen

Desidroquinato desidratase (EC 4.2.1.10) e chiquimato desidrogenase (EC 1.1.1.25)  
de *Mycobacterium tuberculosis* como alvos para o desenvolvimento de novos  
fármacos contra a Tuberculose

Porto Alegre  
2015

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Desidroquinato desidratase (EC 4.2.1.10) e chiquimato desidrogenase (EC 1.1.1.25)  
de *Mycobacterium tuberculosis* como alvos para o desenvolvimento de novos  
fármacos contra a Tuberculose

Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Molecular da  
Faculdade de Biociências da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Guilherme Oliveira Petersen

Orientador:

Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Co-Orientador:

Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Orientador no exterior

Prof. Dr. Dharmarajan Sriram

Porto Alegre  
2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Diógenes Santiago Santos, pela oportunidade de fazer parte do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (CPBMF/INCT-TB), bem como pela confiança e pelo apoio ao longo destes anos. Agradeço também ao meu orientador, Professor Cristiano Valim Bizarro, pelo apoio durante os anos em que trabalhamos juntos, sempre incentivando e orientando em busca do conhecimento científico e em minha formação como pesquisador e como pessoa.

Eu gostaria de fazer um agradecimento especial aos Professores Luiz Augusto Basso e Pablo Machado, por todos os ensinamentos que me ajudaram desde o início da nossa amizade, com muita sabedoria, conhecimento, ética e paixão pela ciência. Ao Professor Dharmarajam Sriram e a todos os meus colegas na Índia que me ajudaram muito no período em que morei nesse incrível país.

Eu gostaria de agradecer a todos os meus colegas de laboratório pela ajuda, incentivo, amizade, companheirismo, pela disponibilidade constante em ajudar, pelos ensinamentos, pelas correções e revisões de resultados, que foram essenciais para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas e amigos da Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento, pelos ensinamentos e pelo companheirismo do começo ao fim.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**WHO / OMS**, Organização Mundial da Saúde;

**TB**, Tuberculose;

**Mtb**, *Mycobacterium tuberculosis*;

**LAM**, Lipoarabinomanam;

**PNF**, Polimorfonucleares;

**EUA**, Estados Unidos da América;

**DOTS**, Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração;

**INH**, Isoniazida;

**RIF**, Rifampicina;

**MDR-TB**, Tuberculose causada por cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes;

**HIV**, Vírus da imunodeficiência humana;

**XDR-TB**, Tuberculose causada por cepas de *M. tuberculosis* extremamente resistentes;

**CDC**, Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Estados Unidos);

**NCE**, Novas entidades químicas;

**DNA**, Ácido desoxirribonucleico;

**ATP**, Adenosina trifosfato;

**FDA**, Food and Drug Administration (Órgão regulatório de alimentos e medicamentos dos EUA);

**PEP**, Fosfenolpiruvato;

**E4P**, Eritrose-4-fosfato;

**PABA**, Ácido p-aminobenzóico;

**DHQase**, 3-desidroquinase-desitratase;

**DHQ**, 3-desidroquinato

**DHS**, 3-desidrochiquimato

**SD**, chiquimato desidrogenase;

**K<sub>m</sub>**, Constante de Michaelis;

**SHK**, Chiquimato;

**NADP**, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;

**NADPH**, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase;

**MIC**, Concentração inibitória mínima;

**BCG**, Bacillus Calmette-Guérin;

**GOLD**, do inglês *Genetic Optimization for Ligand Docking* (software de docagem).

**IC<sub>50</sub>**, Concentração de inibidor necessária para atingir 50% da atividade enzimática

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** *Mycobacterium tuberculosis*. A) Microfotografia do bacilo B) Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen (CDC, 2007). 14
- Figura 2.** Estrutura da parede celular da *M. tuberculosis* (Adaptado de MAXMEN, 2013). 15
- Figura 3.** Estádios de infecção do *Mycobacterium tuberculosis* (PARISH *et al.*, 1998). 16
- Figura 4.** Estrutura e constituintes celulares do granuloma formado após a infecção com *M. tuberculosis* (RAMAKRISHNAN, 2012). 17
- Figura 5.** Estimativa da prevalência de HIV em novos casos de TB em 2012 (WHO, 2013). 19
- Figura 6.** Estimativa da ocorrência de novos casos de TB em 2012 no mundo (WHO, 2013). 20
- Figura 7.** Fármacos anti-TB de primeira e segunda linha (Adaptado de DORMAN; CHAISON, 2007). 24
- Figura 8.** A via do ácido chiquímico (rota principal) (Adaptado de DUCATI *et al.*, 2007). 27

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
	1.1. A TUBERCULOSE.....	13
	1.2. A INFECÇÃO.....	15
	1.3. A TUBERCULOSE NO MUNDO.....	18
	1.4. A NECESSIDADE DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	23
	1.5. NOVAS ENTIDADES QUÍMICAS.....	24
	1.6. DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	25
	1.6.1. A VIA DO CHIQUIMATO.....	26
	1.6.2. 3-desidroquinato desidratase (EC 4.2.1.10).....	28
	1.6.3. Chiquimato 5-desidrogenase (EC 1.1.1.25).....	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
	3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4</b>	<b>Structure-based virtual screening as tool for the identification of novel inhibitors against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 3- dehydroquinase dehydratase</b> .....	36
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
	<b>ANEXO I</b> .....	70
	<b>ANEXO II</b> .....	81
	<b>ANEXO III</b> .....	83
	<b>ANEXO IV</b> .....	85

## RESUMO

A Tuberculose (TB) é a principal causa de mortalidade devido a infecções bacterianas. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) foi responsável por 1,5 milhões de mortes e por 9 milhões de pessoas infectadas em 2013. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial está infectada com a forma latente do Mtb. Assim, há uma contínua necessidade de buscar alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de agentes anti-TB. A via do chiquimato produz um importante precursor de compostos aromáticos em bactérias, fungos, plantas e parasitas do filo Apicomplexa, o corismato. A via é composta por sete enzimas, as quais convertem eritrose-4-fosfato e fosfenolpiruvato em corismato, o precursor para a síntese de aminoácidos aromáticos, ácido fólico, ubiquinonas e muitos outros compostos aromáticos. Esta via é essencial para o crescimento do Mtb. O gene *aroD*, que codifica a enzima 3-desidroquinato desidratase (DHQase), catalisa a reação reversível do 3-desidroquinato em 3-desidrochiquimato e o gene *aroE*, que codifica a enzima dependente de NADP(H) chiquimato-5-desidrogenase (SD), catalisa a redução do 3-desidrochiquimato em chiquimato. O objetivo do presente estudo foi identificar novas moléculas como inibidores para a MtbDHQase e MtbSD utilizando modelagem baseada em estrutura e triagem virtual. A disponibilidade da estrutura cristalográfica ligada a um inibidor da MtbDHQase foi explorada utilizando modelos farmacóforos baseados na energia de interação e docagem para gerar diversos protótipos. Para a MtbSD, devido à ausência de estrutura cristalográfica e de inibidores, foi realizado através de modelagem molecular, um modelo da estrutura. A abordagem do farmacofórico baseado na estrutura, juntamente com a triagem virtual da base de dados *in house* contendo 3000 estruturas inéditas geraram compostos escolhidos com bom valor de docagem e padrão de interação com aminoácidos do sítio ativo. Para a MtbSD, foi utilizada a base de dados *Asinex*, que contém 500000 moléculas. Dezessete compostos foram encontrados baseados nos seus valores de docagem, no padrão de interação com os aminoácidos do sítio ativo, no número de interações de hidrogênio e no valor de GOLD. Os inibidores da MtbDHQase foram testados e, após os ensaios de inibição, foram realizadas diversas derivações químicas no composto protótipo. Os dois melhores compostos derivados apresentaram um valor de IC<sub>50</sub> de 17,1 e 31,5 µM, um valor de MIC de 25 e 6,25 µg/mL e citotoxicidade



abaixo de 15% a 100 $\mu$ M, respectivamente. Os compostos selecionados como possíveis inibidores para a MtbSD serão futuramente testados quanto a sua inibição, valor de CIM e citotoxicidade.

Palavras-chave: Modelagem molecular, Chiquimato, *E-pharmacophore*, *docagem*.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the leading cause of bacterial infectious disease mortality. The etiological agent, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is responsible for 1.5 million deaths and 9 million people infected in 2013. The World Health Organization (WHO) estimates that one-third of the world's population is infected with latent form of Mtb. Thus, there is a continuous need to find promising molecular targets for the development of anti-TB agents. The shikimate pathway produces an important precursor of aromatic compounds in bacteria, fungi, plants and apicomplexan parasites, chorismate. The pathway comprises seven enzymes, which convert erythrose-4-phosphate and phosphoenolpyruvate into chorismate, the precursor for the synthesis of aromatic amino acids, folic acid, ubiquinone, and many other aromatic compounds. This pathway is essential for growth of Mtb. The *aroD* gene, that codes for 3-dehydroquinate dehydratase (DHQase), catalyzes the reversible reaction of 3-dehydroquinate into 3-dehydroshikimate and the *aroE* gene, that codes for the NADP(H) dependent shikimate-5-dehydrogenase (SD), catalyzes the reduction of 3-dehydroshikimate into shikimate. The aim of the present study was to identify new drug-like molecules as inhibitors for MtbDHQase and MtbSD using structure-based modeling and virtual screening. The availability of the crystal structure bound with an inhibitor of MtbDHQase was explored using pharmacophore models based on interaction energy and docking to yield diverse leads. For MtbSD, due to the absence of crystal structure and reported inhibitors, the tridimensional structure was achieved by molecular modelling. Structure-based pharmacophore and virtual screening of the *in house* database containing 3000 unique molecules retrieved twelve hit compounds with good docking score and interaction pattern for MtbDHQase. For MtbSD, the commercially available database Asinex, with 500,000 molecules, were used and seventeen compounds were selected based on its docking score, interaction pattern with amino acids in the active site, number of hydrogen bonds and GOLD score. MtbDHQase inhibitors were tested and, after inhibition assay, series of chemical modifications were made in the lead compound. The top two derivatives presented  $IC_{50}$  values of 17.1 and 31.5  $\mu$ M as well as MIC values of 25 and 6.25  $\mu$ g/mL and cytotoxicity below 15% at 100  $\mu$ M respectively. The MtbSD compounds selected as possible inhibitors will be tested for inhibition, MIC value and cytotoxicity.

Keywords: Molecular modelling, Shikimate, *e-pharmacophore*, docking.

---

# Capítulo 1

---

Introdução

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A TUBERCULOSE

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), dentre as doenças infectocontagiosas que afligem o homem, a tuberculose (TB) é uma das mais preocupantes devido a sua alta taxa de incidência, prevalência e mortalidade (WHO, 2012).

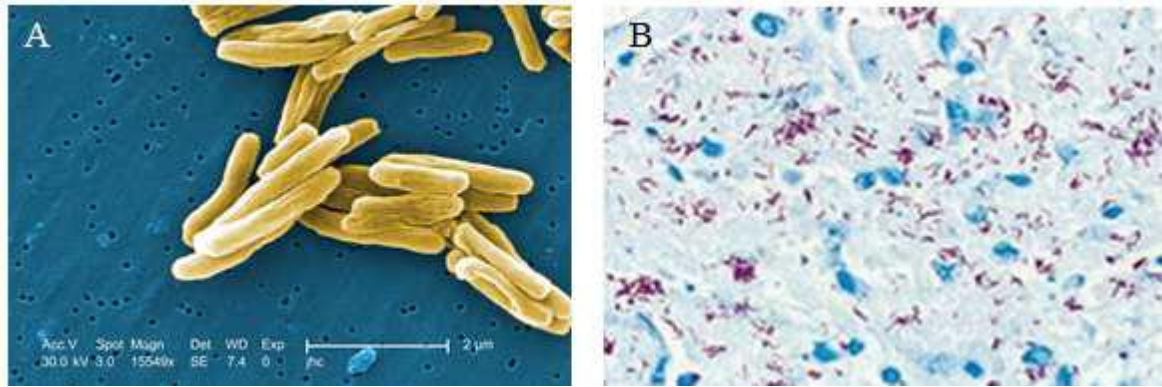
A primeira referência à natureza infecciosa da TB apareceu somente no século XVI, quando Girolamo Fracastoro, médico, poeta, filósofo e professor da Universidade de Pádua, descreveu em seu livro, *De Contagione et Contagiosis Morbis*, como a tísica (phthisis), maneira como a doença era chamada então, era transmitida por partículas invisíveis, chamadas seminaria que poderiam sobreviver fora do corpo humano por vários anos e ainda assim serem infecciosas (COLE *et al.*, 2005). Devido à variedade de seus sintomas, a TB não era identificada como uma única doença até 1820. Em 1839, J. L. Schonlein, em Zurique, sugeriu que a palavra tuberculose deveria ser usada como o nome genérico de todas as manifestações da tísica, devido ao tubérculo ser a unidade patológica fundamental (DORMANDY, 2000).

A identificação do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) por Robert Koch, em 1882, como o agente etiológico da TB foi um marco fundamental para o conhecimento da doença e significou também uma importante contribuição para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade das doenças infectocontagiosas, assim como estabeleceu alguns postulados aplicados não só à tuberculose, mas também a todas as doenças infectocontagiosas, conhecidos como Postulados de Koch. Essa descoberta estimulou novas tentativas na direção do controle e tratamento específico da TB, que se tornou possível na década de 1940 com a introdução da estreptomicina, que trouxe esperanças para o controle da doença (COLE *et al.*, 2005).

O *M. tuberculosis*, principal agente causador da TB, é uma bactéria com alto conteúdo genômico de G+C. Essa bactéria apresenta-se em forma de bacilo, mostrando dimensões que variam de 0,3 a 0,6 µm de largura e de 1 a 4 µm de altura

(Figura 1), possuindo alta complexidade em seu envelope celular, bem como crescimento lento (ROSADO, 2013).

**Figura 1.** *Mycobacterium tuberculosis*. A) Microfotografia do bacilo B) Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen.



**Fonte:** Extraído do *Center of Disease Control and Prevention* (CDC, 2007).

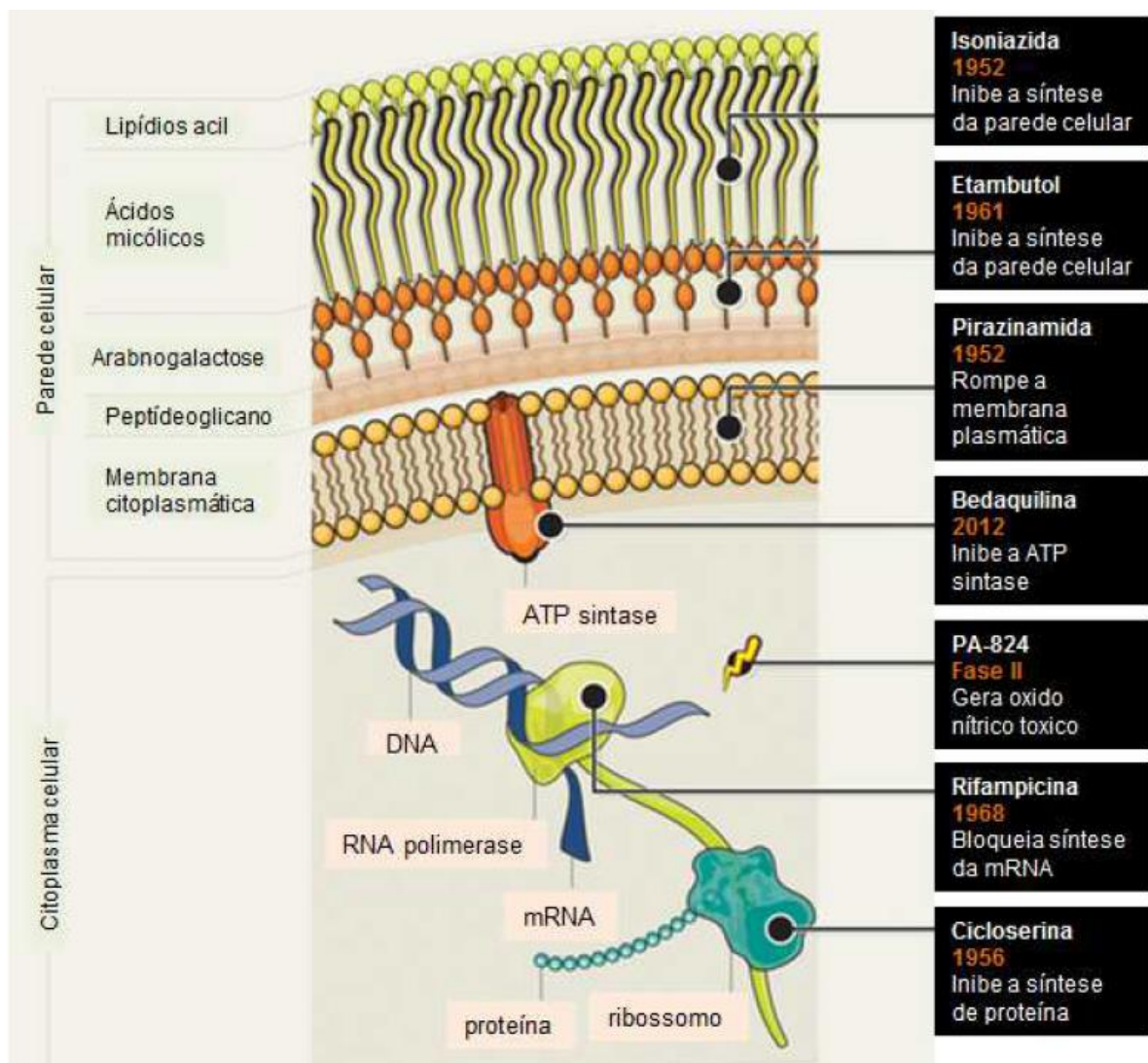
Um componente do envelope do *M. tuberculosis*, o lipoarabinomanam (LAM), é o fator de virulência mais importante dessa bactéria. O envelope celular contém um peptidoglicano diferente do presente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, associado a lipídios complexos, os quais compõem cerca de 60% da estrutura total do envelope. Três dos componentes principais são: ácidos micólicos, fator corda e cera-D (BRENNAN, 2003).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa compostos de uma cadeia beta-hidróxi mais curta com uma cadeia lateral alfa-álquil mais longa. Cada molécula contém entre 60 e 90 átomos de carbono. Os ácidos micólicos criam uma camada que protege o bacilo contra as proteínas catiônicas, lisozima, e os radicais peróxido durante a fagocitose, e também são os responsáveis pela ácido-resistência (BRENNAN, 2003).

O dimicolato de trealose, conhecido como fator corda, é um componente lipídico tóxico, capaz de inibir a migração de polimorfonucleares (PMN), correlacionado à virulência do bacilo. Esse fator confere ao bacilo crescimento em um padrão característico, similar a uma corda com aspecto de serpentina (BRENNAN, 2003; GAO, 2004). A cera-D é um glicolípido que tem papel importante na produção da hipersensibilidade tardia e é um componente importante na reação de Manteaux. (BRENNAN, 2003).

A característica hidrofóbica do envelope de *M. tuberculosis* lhe confere a capacidade de sobreviver por muito tempo de exposição a substâncias como ácidos, detergentes, e, principalmente, antibióticos. Por isso, muitas pesquisas para o desenvolvimento racional de fármacos escolhem componentes do envelope celular como alvo atrativo para novos fármacos ativos contra a TB. (Figura 2).

**Figura 2.** Estrutura da parede celular da *M. tuberculosis* e o mecanismo de ação dos fármacos mais utilizados.



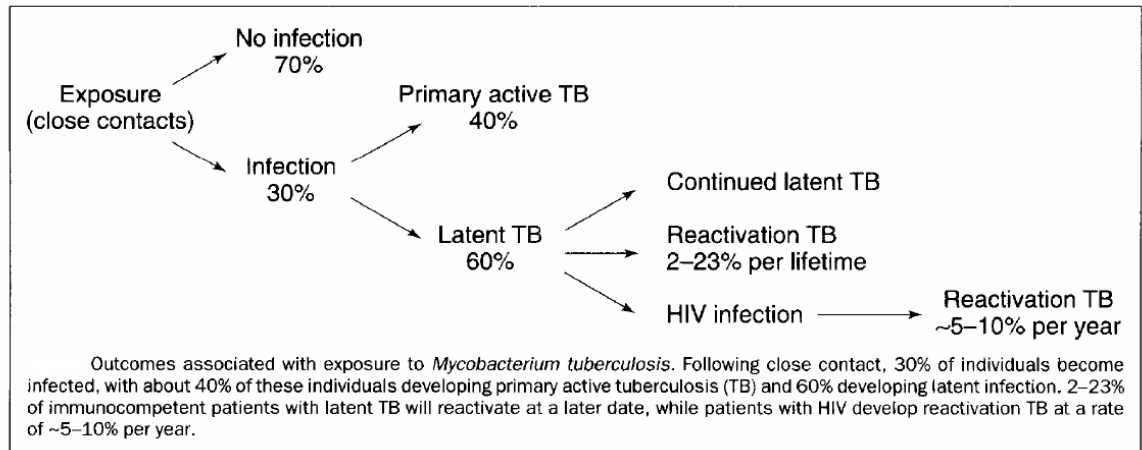
**Fonte:** Adaptado de Maxmen (2013).

## 2.1 A INFECÇÃO

A infecção se inicia por meio da inalação de aerossóis contendo *M. tuberculosis*, que ocorre quando uma pessoa infectada e com tuberculose pulmonar ativa tosse

ou espirra (Figura 3). Esses pacientes constituem a principal fonte de disseminação do organismo para novos hospedeiros. Sabe-se que uma pessoa com TB ativa pode infectar, em média, entre 10 e 15 pessoas por ano devido, principalmente, ao baixo número de bacilos necessários à infecção (< 10 bacilos) (COLE *et al.*, 2005).

**Figura 3.** Estádios de infecção do *Mycobacterium tuberculosis*



**Fonte:** Parrish *et al.*, (1998).

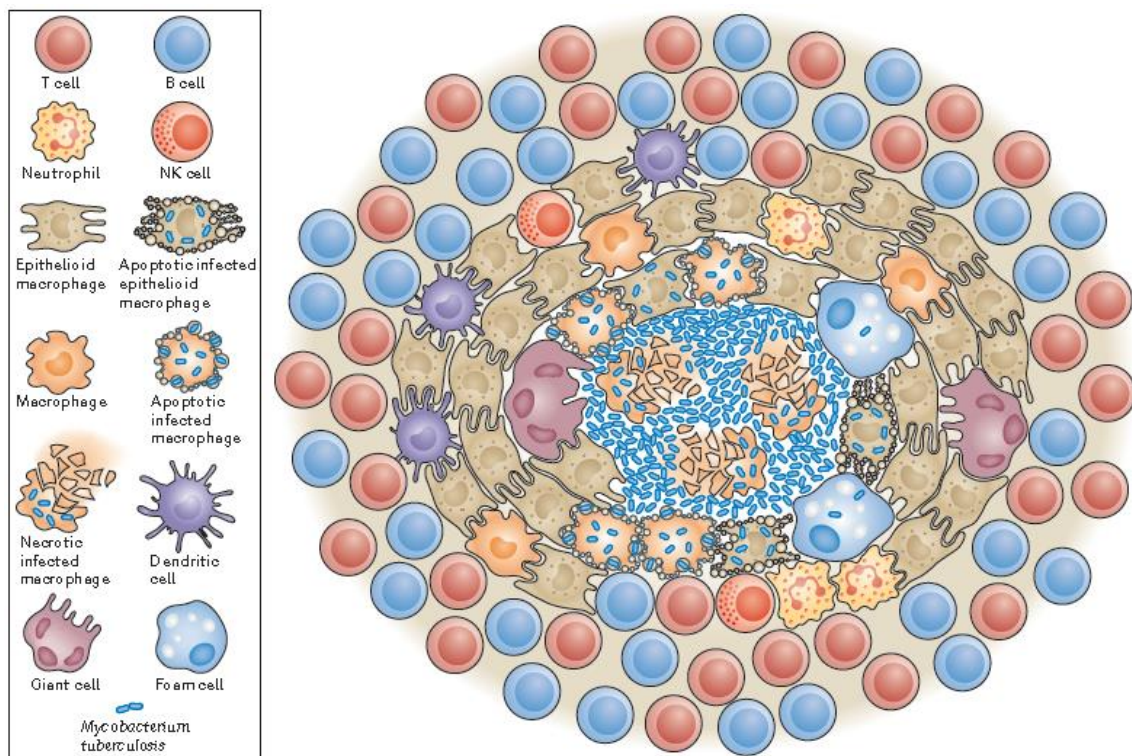
No primeiro estágio da doença, o bacilo alcança os alvéolos pulmonares, entra em contato com macrófagos e células dendríticas, dando início à infecção (PIETERS, 2008). Uma vez no interior do macrófago, o bacilo inicia um processo lento de multiplicação, devido à inibição da formação do fagolisossoma. Os macrófagos infectados são detectados por linfócitos T, que recrutam e ativam outros macrófagos que migram para o local da infecção, dando origem ao granuloma (DAVIS; RAMAKRISHNAN, 2009). O granuloma ou tubérculo é a característica patológica clássica da TB, e funciona tanto como um nicho no qual o bacilo pode crescer ou persistir, quanto em um microambiente imunológico em que as células com funções antimicobacterianas interagem para controlar e prevenir a disseminação da infecção. A formação do granuloma é o principal mecanismo utilizado pelo hospedeiro para conter a disseminação do bacilo a outros órgãos.

O granuloma consiste em um núcleo de macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, cercados por macrófagos, células gigantes derivadas de macrófagos e uma camada de linfócitos na periferia (Figura 4) (RUSSEL, 2001; PIETERS, 2008). Inicialmente, apenas células T CD4+ e CD8+ ocorrem no granuloma, mas, à medida



que a resposta imune celular se desenvolve, outros tipos de linfócitos também são recrutados (FLYNN *et al.* 2011). Por vezes, a resposta celular falha e o granuloma se rompe, disseminando a doença para outros órgãos (tuberculose miliar). No caso de a resposta imune adaptativa ser eficiente, a replicação bacteriana diminui drasticamente, mas as bactérias viáveis permanecem no hospedeiro de forma latente, podendo ser reativadas meses, anos ou décadas após a infecção primária. (HUYNH *et al.*, 2011). Os macrófagos infectados, contidos pela formação do granuloma, sofrem necrose, deixando os granulomas com centros necróticos caseosos (Figura 4) (HUYNH *et al.*, 2011).

**Figura 4.** Estrutura e constituintes celulares do granuloma formado após a infecção com *M. tuberculosis*.



**Fonte:** Ramakrishnan, 2012.

No último estágio, a doença desenvolve-se tardiamente e pode ser causada tanto pela reativação de bacilos latentes da infecção inicial como pela impossibilidade de controlar uma reinfecção subsequente. No caso de indivíduos com TB latente, células viáveis de *M. tuberculosis* saem dos granulomas e se espalham pelos pulmões (TB pulmonar), bem como por outros órgãos do corpo via sistema linfático e circulação sanguínea (TB extrapulmonar). Com a formação das cavernas

pulmonares, o indivíduo torna-se transmissor e passa a apresentar os sintomas típicos da TB ativa (tosse persistente, febre, sudorese noturna e emagrecimento) (COLE *et al.*, 2005).

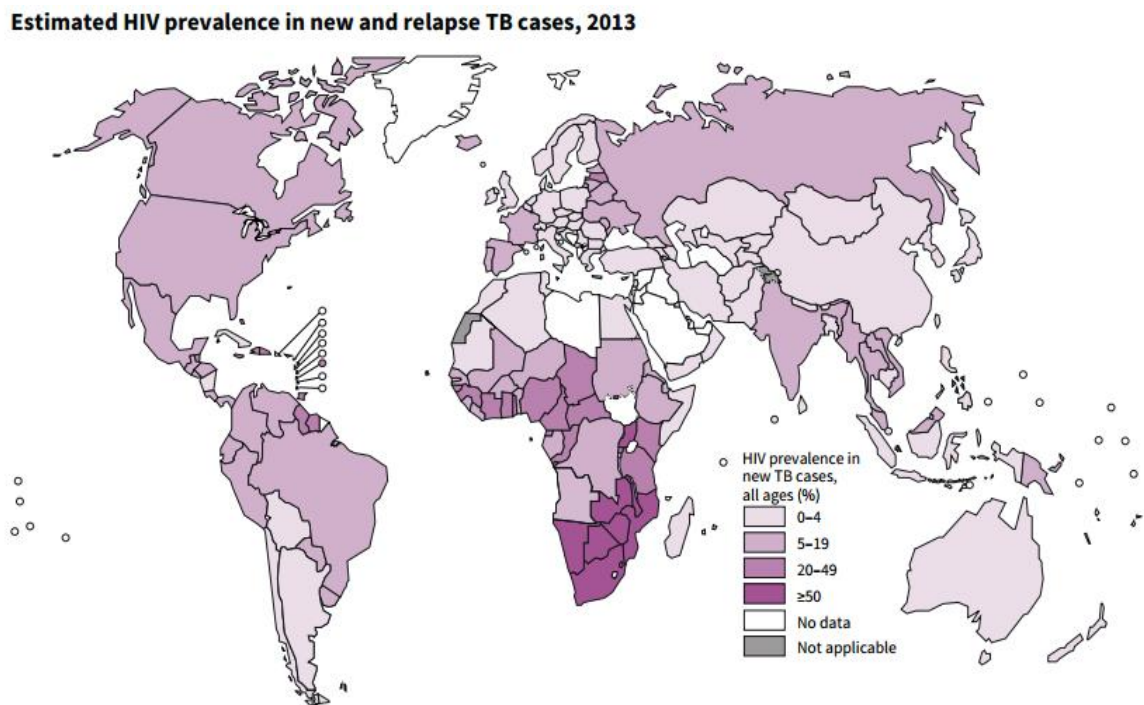
### 3.1 A TUBERCULOSE NO MUNDO

Atualmente, a TB continua sendo a principal causa de mortalidade devido a um único patógeno bacteriano, o *M. tuberculosis* (HARRIES; DYE, 2006). A interrupção do declínio da taxa de casos de TB ocorreu, na maioria dos casos, no fim dos anos 80, envolvendo os EUA e alguns países europeus devido ao aumento da pobreza em ambientes urbanos e à imigração oriunda de países com elevada incidência de TB (RAVIGLIONE, 2003). O programa de Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (DOTS), proclamado como “um dos principais sucessos na história da saúde pública na década passada”, consiste em uma associação de fármacos de primeira linha – isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida e etambutol - durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RIF (KOUL *et al.*, 2011; RAMASWAMY; MUSSER, 1998; WHO, 2003), podendo curar até 95% dos casos de TB (KOUL *et al.*, 2011). Além disso, a estratégia do DOTS inclui outros cinco componentes: I) estabelecer uma rede de indivíduos treinados a administrar e supervisionar o DOTS; II) criar laboratórios e profissionais habilitados para o diagnóstico da TB; III) implementar um sistema de fornecimento confiável de medicamentos de alta qualidade (preferencialmente, sem custo aos pacientes); IV) compromisso governamental e V) sistema de monitoramento de casos, tratamento e resultados (PALOMINO *et al.*, 2007; YEW; LEUNG, 2008; WHO, 2003). Entre os anos de 1998 e 1999, 127 países haviam adotado essas estratégias, incluindo os 22 países responsáveis por 80% da mortalidade global causada pela TB. Ademais, até o ano de 2005, 89% da população mundial vivia em áreas onde os serviços preconizados pelo DOTS estavam disponíveis (LIENHARDT *et al.*, 2012). Essas estratégias preveniram a ocorrência de novas infecções e, principalmente, dificultaram o surgimento de casos de TB resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) (DUCATI *et al.*, 2006). No entanto, diversos fatores, como o aumento da prevalência de coinfeção com o HIV, especialmente em áreas mais pobres, associado ao surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes ao tratamento, levaram ao questionamento da efetividade do DOTS (DUCATI *et al.*, 2006). A falha do tratamento - definida como a presença de culturas positivas após quatro meses de

terapia apropriada (ZUMLA *et al.*, 2013) - pode ser resultado da falta de adesão a esse pelo paciente, devido a sua duração, complexidade, custos, possíveis efeitos adversos ou resistência do bacilo às drogas (ELSTON; THAKER, 2008; RAMASWAMY; MUSSER, 1998). Tais circunstâncias favoreceram o surgimento de organismos resistentes aos medicamentos utilizados no esquema terapêutico (BLOOM; MURRAY, 1992, RAMASWAMY; MUSSER, 1998).

De acordo com os dados da OMS (WHO, 2014), em 2013 foram reportados 9 milhões de novos casos de TB e 1,5 milhão de óbitos, incluindo 300.000 coinfectedos com HIV. Destes 9 milhões de casos, estima-se que 1,1 milhões corresponde a pessoas infectadas com o HIV (Figura 5). O continente africano é o que apresenta maior número de casos de coinfecção TB/HIV (75%) (WHO, 2014; CORBETT *et al.*, 2003).

**Figura 5.** Estimativa da prevalência de HIV em novos casos de TB em 2013

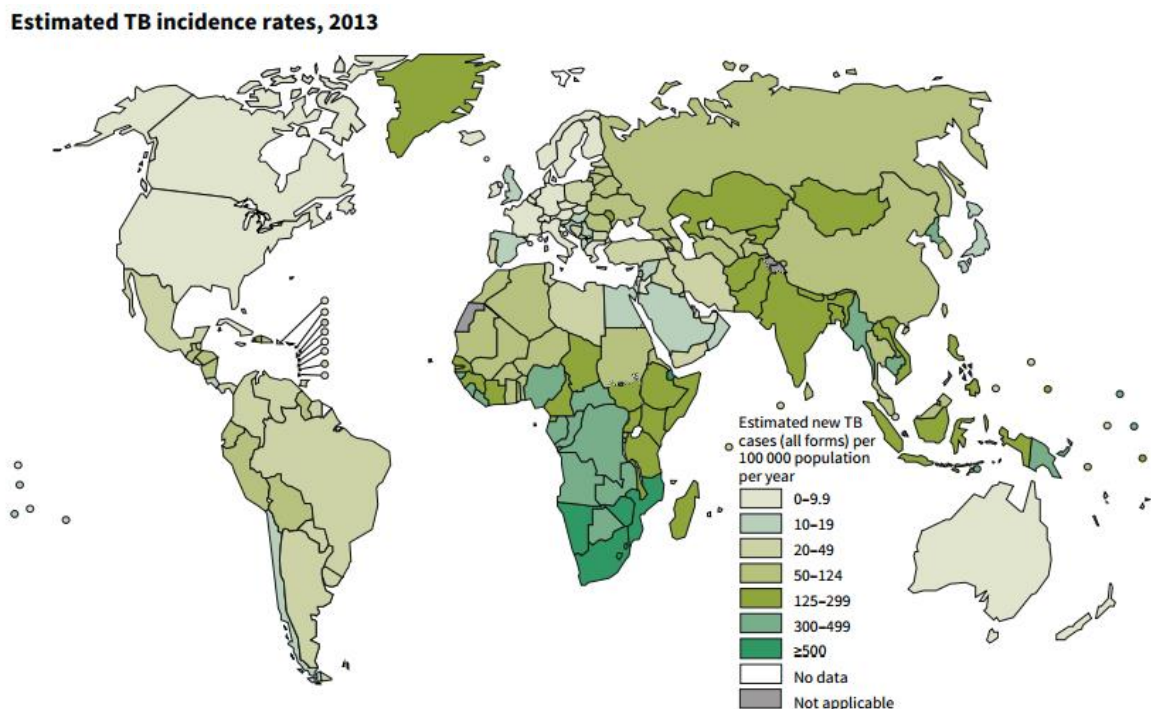


**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2014).

O controle sustentável da epidemia de TB não pode ser alcançado em um país sem que se leve em conta a epidemia global (Figura 6), incluindo a pesquisa como componente-chave. Aproximadamente 15 milhões de pessoas vivem com a doença crônica ativa, e, dentre esses, 500 mil são casos de MDR-TB, definidos como cepas

resistentes ao menos à INH e à RIF, os fármacos mais potentes e mais utilizados (WHO, 2011). Existem amplas diferenças geográficas na incidência e na prevalência de TB, com o maior número de casos de TB na Índia e na China, e a mais alta incidência de TB na África Sub-Saariana (WHO, 2008). Na América, o Brasil tem a maior incidência de TB, com 111050 casos e uma taxa de incidência na ordem de 50 por 100000 habitantes, em 2005.

**Figura 6.** Estimativa da ocorrência de novos casos de TB em 2013 no mundo.



**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2014)

Acredita-se que aproximadamente dois bilhões de indivíduos possuem TB latente, tomando como base a análise do teste da tuberculina (DYE *et al.*, 1999), o que representa um considerável reservatório de bacilos. Estimou-se que 3,2% de novos casos de TB no mundo, no ano de 2000, foram de MDR-TB (ESPINAL, 2003). De acordo com o Relatório de Controle da TB Global da OMS de 2004, ocorreram 300.000 novos casos por ano de MDR-TB em todo o mundo, e 79% dos casos de MDR-TB eram de “supercepas”, resistentes, no mínimo, a três dos quatro principais fármacos usados para o tratamento de TB (WHO, 2004). Altas taxas de incidência de MDR-TB têm sido encontradas em regiões específicas, as quais têm sido definidas como zonas “ardentes”, baseadas tanto em áreas onde a prevalência de casos de MDR-TB é maior que 5% (ou seja, onde >5% dos casos atuais são MDR-

TB), quanto em áreas onde a incidência de casos primários de MDR-TB é maior que 5% (ou seja, onde >5% de novos casos são MDR-TB) (ESPINAL, 2003).

A MDR-TB é uma bactéria existente no ar e que é espalhada tão facilmente quanto a TB sensível a fármacos. Um indivíduo que está doente com alguma cepa de TB infectará de 10 a 20 pessoas por ano com a mesma cepa (NUNN, 1997), tornando as zonas “ardentes” de particular preocupação para as autoridades de saúde pública.

Modelos matemáticos têm sugerido que, a cada ano, ao menos 70% dos casos de infecção por MDR-TB prevalentes devam ser detectados e tratados e 80% curados, com o objetivo de interromper a transmissão de MDR-TB na comunidade (DYE *et al.*, 2000). O desenvolvimento e a implementação de métodos rápidos para diagnóstico de TB resistente a fármacos são essenciais para o controle efetivo de TB em longo prazo. Nos últimos anos, abordagens epidemiológicas moleculares têm mostrado outra grande preocupação: certas cepas emergentes de *M. tuberculosis* induzem formas mais severas de TB e/ou manifestam maiores falhas/recaídas que outras. Cepas das famílias de cepas de Beijing/W e Haarlem de *M. tuberculosis* estão emergindo em diferentes regiões e estão associadas com a resistência a fármacos (EUROPEAN CONCERTED ACTION, 2006; MARAIS *et al.* 2006).

Na América Latina, mutações específicas foram descritas em genes de *M. tuberculosis* que estão associados com resistência a INH e maior aquisição de doenças cavitárias, respectivamente nas famílias de cepas Haarlem e RdRio/Latin-American & Mediterranean (LAM) (DALLA COSTA *et al.*, 2009; LAZZARINI *et al.*, 2008). Por muitos anos, importantes marcadores genéticos foram identificados, que dizem respeito à resistência a fármacos (por ex., *rpoB*, *katG*, *inhA*, *embB*). Vários ensaios rápidos foram desenvolvidos onde a resistência à RIF é usada como suspeita de diagnóstico para MDR-TB. Testes rápidos têm diminuído o tempo de diagnóstico de MDR-TB de 2-3 meses (em cultura em meio de Löwenstein-Jensen) ou semanas em MGIT (um sistema automatizado considerado atualmente o padrão-ouro para teste de susceptibilidade a droga), para oito horas ou menos com a tecnologia da amplificação de ácidos nucleicos (GenoType® MDRTB plus ou INNO-LIPA Rif.TB) (HILLEMANN *et al.*, 2007). Esses “kits” comerciais são caros, mas capazes de detectar TB resistente aos fármacos rifampicina e isoniazida, e foram

oficialmente incluídos pela OMS como técnica de diagnóstico para controle de TB em 30 de junho de 2008. Não há teste molecular disponível que seja capaz de determinar a resistência de TB aos fármacos de primeira e segunda linha, respectivamente, para diagnóstico de MDR-TB e também detectar famílias de cepas de *M. tuberculosis* associadas à falência e/ou recidiva em um único ensaio molecular. Essa técnica poderia ser vantajosa para estudos de transmissão, pesquisa em biologia molecular e também seleção para regimes de tratamento ótimos.

Um modelo matemático usando método de amostragem de Monte Carlo tem sido empregado para determinar os principais fatores causais na criação de zonas “ardentes” (BLOWER; CHOU, 2004). Paradoxalmente, áreas com programas que reduziram com sucesso cepas tipo selvagem pan-sensíveis (como resultado da alta detecção de casos e taxas de tratamento) frequentemente evoluem para zonas “ardentes”. Portanto, tem-se sugerido que fármacos de segunda linha sejam rapidamente introduzidos para interromper a ampliação da resistência. Entretanto, fármacos de segunda linha bacteriostáticos (amicacina, canamicina, capreomicina, ciclosserina, ácido para-aminossalicílico, etionamida e fluoroquinolonas) são mais tóxicos e menos efetivos e são administrados por, ao menos, três vezes mais tempo e com custo 100 vezes maior que os regimes básicos de quimioterapia de tempo curto (PABLOS-MÉNDEZ *et al.*, 2002). Mais recentemente, tem sido relatado pelos Centros de Controle e Prevenção da Doença dos EUA (CDC) o surgimento de casos de TB extensivamente resistente (XDR), definidos como casos em cujas amostras isoladas são resistentes à INH e RIF (MDR-TB), bem como resistentes a qualquer um dos fármacos fluoroquinolônicos e ao menos a um dos três fármacos de segunda linha injetáveis: amicacina, canamicina ou capreomicina (CDC, 2007). A XDR-TB está elevando amplamente a perspectiva de casos de TB virtualmente incuráveis mundialmente (DORMAN; CHAISSON, 2007). Em 2005, dos 544 pacientes estudados na Tugela Ferry, Província de KwaZulu-Natal (África do Sul), 221 foram diagnosticados com MDR-TB e 53 desses eram XDR-TB. Dos 53 pacientes, 44 foram testados para HIV e todos estavam infectados com o vírus. A sobrevivência-média após a coleta da amostra de escarro foi de 16 dias (SINGH *et al.*, 2007). Mais recentemente, em um estudo realizado na Rússia entre indivíduos HIV soro negativo, a falha do tratamento foi mais comum em pacientes com tuberculose XDR

do que naqueles com tuberculose não XDR (31% vs 8.5%,  $p=0.0008$ ): 48,3% dos pacientes com tuberculose XDR e 66,7% dos pacientes com tuberculose não XDR tiveram tratamento com cura completa ( $p=0.04$ ) (KESHAVJEE *et al.*, 2008). Os fatores que mais influenciam no surgimento de cepas resistentes incluem regimes de tratamento inapropriados, a não adesão do paciente para concluir o tratamento prescrito - devido ao longo tratamento padrão - ou quando os efeitos colaterais se tornam insuportáveis (DUNCAN, 2003). O *M. tuberculosis* tem sido considerado o agente patogênico mais bem sucedido no mundo e isso é em grande parte devido à capacidade do bacilo em persistir nos tecidos do hospedeiro, onde os fármacos que são velozmente bactericidas *in vitro* requerem administração prolongada para alcançar efeitos comparáveis *in vivo*. Portanto, agentes antituberculares mais efetivos e menos tóxicos são urgentemente necessários para diminuir a duração dos tratamentos atuais, melhorar o tratamento de MDR-TB e fornecer tratamento efetivo para a infecção de TB latente.

#### **4.1 A NECESSIDADE DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Quimioterapias efetivas que diminuem a taxa de mortalidade por TB por todo o mundo levaram à descoberta de propriedades antibacterianas e antituberculares da estreptomicina em 1944 (SCHATZ *et al.*, 1944), e tanto da INH quanto da pirazinamida em 1952 (MIDDLEBROOK, 1952; KUSHNER *et al.*, 1952). A introdução posterior de etionamida, RIF, etambutol e ciprofloxacina ao arsenal usado para tratar tuberculose pareceu fornecer um número adequado de agentes antimicrobianos efetivos (BASSO; BLACHARD, 1998) (Figura 7). A quimioterapia efetiva para tuberculose deve incluir, primeiramente, a ação bactericida contra organismos crescendo rapidamente e, subseqüentemente, a esterilização de populações de bacilos semidormentes e dormentes (MITCHISON, 1985). Drogas de primeira linha, como INH, RIF, pirazinamida e etambutol exibem atividade bactericida precoce contra bacilos com metabolismo ativo (HEIFETS, 1994). Pirazinamida é ativa contra bacilos semidormentes em ambiente intracelular ácido. A terapia moderna padrão para TB deve ser estritamente seguida para prevenir a resistência e recidiva a drogas, motivo pelo qual a observação direta da adesão do paciente é a maneira mais confiável para assegurar um tratamento efetivo e impedir a aquisição da resistência.

Recentemente, estudos com diarilquinolinas propuseram que esses compostos são capazes de inibir eficientemente a ATP sintase de *M. tuberculosis* e, como consequência, são hábeis para inibir o crescimento de cepas MDR-TB (DIACON *et al.*, 2009). Esses fatos, combinados com propriedades farmacocinéticas adequadas, conduziram o Food and Drug Administration (FDA) a aprovar o SIRTURO™, uma diarilquinolina indicada para tratamento de adultos infectados por MDR-TB (FDA, 2012). O SIRTURO™ foi o primeiro fármaco inovador aprovado para o tratamento da TB desde os anos 60.

**Figura 7.** Fármacos anti-TB em relação a sua potência e confiabilidade com decréscimo de tolerabilidade



**Fonte:** Adaptado de Dorman (2007).

## 5.1 NOVAS ENTIDADES QUÍMICAS

A abordagem moderna no desenvolvimento de novas entidades químicas (NCE) contra a tuberculose está baseada no uso de alvos moleculares definidos. Isso envolve (I) a busca e a identificação de compostos líder, com mecanismos



moleculares definidos, contra um alvo definido (por ex., enzimas de rotas definidas); (II) a análise de compostos com taxa de custo/benefício favorável (III) desenvolvimento, em estágios iniciais, de compostos com toxicidade seletiva (princípio fundamental de quimioterapia); (IV) avaliação pré-clínica de compostos líder; (V) execução de testes clínicos e (VI) geração de patentes e possibilidade de transferência de tecnologia. O atual uso de tais tecnologias, infelizmente, está concentrado em países desenvolvidos, especialmente nas grandes companhias farmacêuticas.

O desenvolvimento de novos fármacos necessita de maiores investimentos de capital, recursos humanos, bem como experiência e conhecimentos tecnológicos. Também requer estrito comprometimento com regulações em testes e produção de padrões antes que um novo composto seja utilizado pela população em geral. Todos esses requerimentos contribuem para o aumento dos custos para pesquisa e desenvolvimento de uma NCE. Devido ao longo tempo desde o começo do trabalho com um composto promissor até sua aprovação para o mercado, existem muitos eventos que podem interferir para reduzir seu valor econômico. Em resumo, o desenvolvimento de fármacos é arriscado, consome tempo e apresenta elevado custo. Têm-se estimado que o custo de desenvolvimento de NCE por indústrias farmacêuticas dos EUA é de aproximadamente 802 milhões de dólares (DICKSON; GAGNON, 2004).

Entretanto, estima-se que companhias precisam visualizar um mercado de três bilhões de dólares antes de começarem a incentivar o desenvolvimento de um novo medicamento. Carlos Morel e colaboradores têm ressaltado que muitos países em desenvolvimento possuem ciência e capacidade tecnológicas locais, além de uma força econômica relativamente baixa (Índia, China, Brasil e África do Sul). Em função disso, esses países deveriam assumir a liderança no desenvolvimento de novos fármacos, visto que estão próximos daqueles que são os mais necessitados por produtos efetivos na saúde (MOREL *et al.*, 2005).

## **6.1 DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS**

O desenho racional de fármacos é uma estratégia a partir da qual são desenvolvidas moléculas baseadas no conhecimento das proteínas alvo ou de ligantes. Esse conhecimento depende do modo de ação e da estrutura

tridimensional da proteína alvo. Além do mais, o sucesso no desenvolvimento de fármacos requer que o alvo da doença desempenhe um papel vital na causa e/ou progressão da doença e que possa ser modulada por um fármaco.

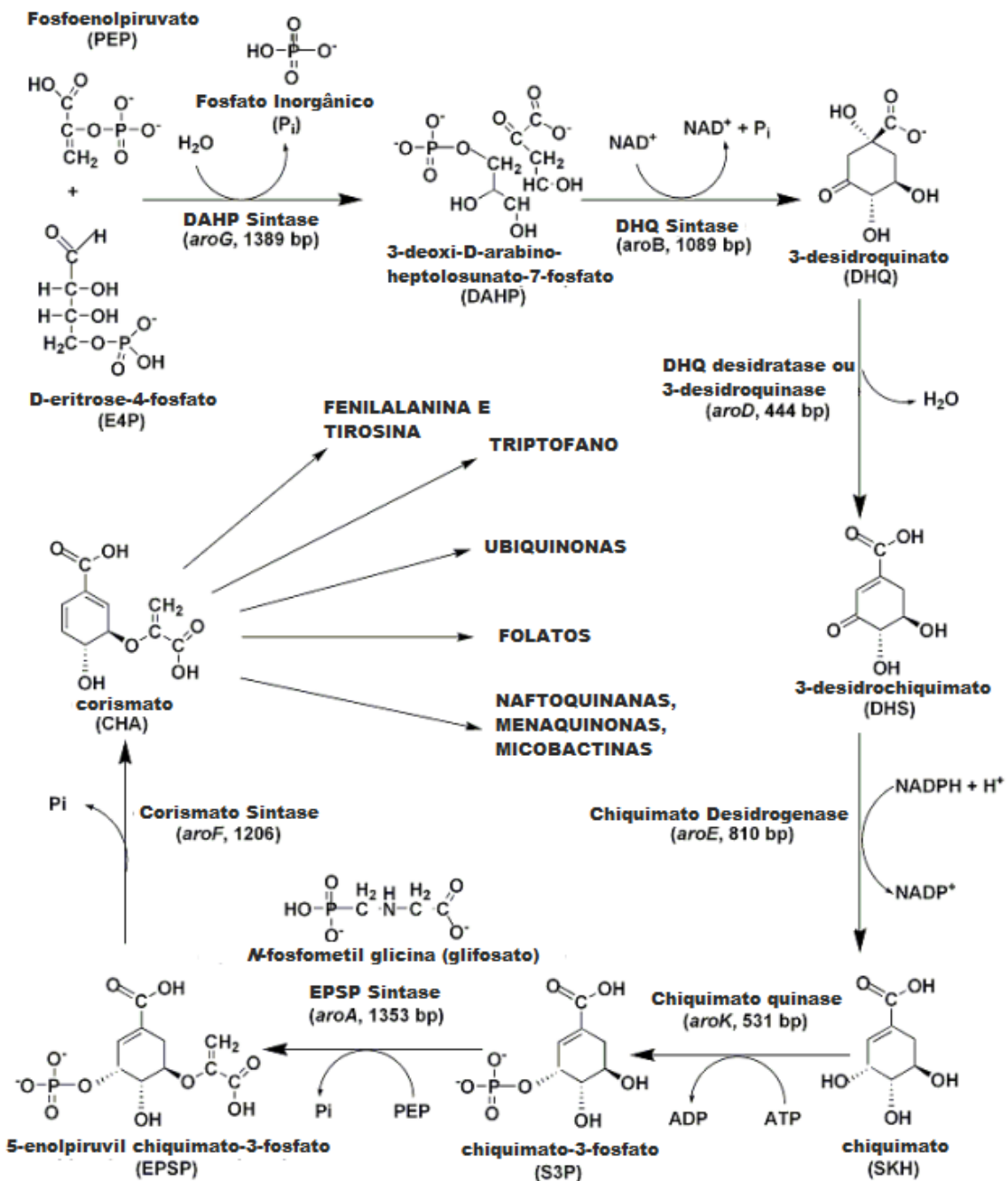
Um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos deve ser essencial à sobrevivência do patógeno e estar ausente no hospedeiro humano, o que deve auspiciosamente resultar no desenvolvimento de agentes terapêuticos não tóxicos para o tratamento de doenças infecciosas. Os inibidores de enzimas constituem aproximadamente 25% dos fármacos comercializados nos EUA (ROBERTSON, 2005). Conseqüentemente, as enzimas devem ser consideradas alvos macromoleculares promissores e potencialmente lucrativos. Um levantamento mostrou que todas os fármacos atuais com modo de ação conhecido funcionam por meio de 324 diferentes alvos moleculares de fármacos, sendo que 266 destes são proteínas derivadas do genoma humano e o restante é oriundo de alvos de organismos bacterianos, virais, fúngicos e de outros patógenos (OVERINGTON *et al.*, 2006). Esses dados enfatizam a necessidade de descoberta de mais alvos macromoleculares e compostos químicos com ação farmacológica útil em uma área terapêutica que possui carência de novas alternativas. Abaixo, estão descritos brevemente alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos anti-TB de uma via biosintética presente em *M. tuberculosis* e ausente em mamíferos – **A via do Chiquimato.**

#### 1.6.1. VIA DO CHIQUIMATO

A biossíntese de anéis aromáticos a partir de carboidratos precursores, nos micro-organismos e nas plantas, envolve uma gama de transformações químicas extraordinárias que, juntas, constituem a via do ácido chiquímico, ou chiquimato. Por meio de sete reações enzimáticas (Figura 8), fosfoenolpiruvato (PEP) e D-eritrose 4-fosfato (E4P) são condensados em corismato (produto final), ponto em que a via se ramifica, dando origem a diversas vias terminais adicionais (BENTLEY, 1990). A via do ácido chiquímico é um alvo atrativo para o desenvolvimento de herbicidas e agentes antimicrobianos, pois é uma via essencial em algas, plantas superiores, fungos, bactérias e parasitas do filo Apicomplexa, estando ausente nos mamíferos (COGGINS *et al.*, 2003; HERRMANN; WEAVER, 1999; ROBERTS *et al.*, 1998). A via do ácido chiquímico de micobactérias (sua rota principal) leva à síntese de

corismato, que é então convertido, através de cinco enzimas distintas, em prefenato (precursor de fenilalanina e de tirosina), antranilato (precursor de triptofano), aminodeoxicorismato (precursor do ácido *para*-aminobenzóico – PABA – que, por sua vez, leva à síntese de tetrahydrofolato), ácido *para*-hidroxibenzóico (precursor de ubiquinona ou Coenzima Q) e isocorismato (precursor comum de naftoquinonas, menaquinonas e micobactinas).

**Figura 8.** A via do ácido chiquímico (rota principal).



Fonte: Adaptado de Ducati *et al.*, (2007).

### 1.6.2. 3-desidroquinato desidratase (EC 4.2.1.10)

A terceira reação da via é a desidratação do 3-desidroquinato (DHQ) em 3-desidrochiquimato (DHS), reação catalisada pela enzima 3-desidroquinato desidratase (DHQase), iniciando, portanto, o processo de aromatização pela introdução da primeira das três ligações duplas. A DHQase é parte integral de duas rotas metabólicas que são caracterizadas por duas classes de enzimas – do tipo I e do tipo II. A DHQase do tipo I (*aroD*), que exemplifica a forma biossintética, está associada exclusivamente à biossíntese de corismato em fungos, plantas, e em algumas bactérias; catalisando a desidratação *cis* (*syn*) do DHQ, com a perda de um hidrogênio pro-*R* do C-2, através de um intermediário covalente imina (mecanismo de base de Schiff) (GOURLEY *et al.*, 1999); e é geralmente um dímero. A DHQase do tipo II (*aroQ*), que é observada na via de catabolismo do quinato em fungos e na via do ácido chiquímico de diversas bactérias, catalisa a desidratação *trans* (*anti*) do DHQ com a perda do hidrogênio pro-*S* axial mais ácido do C-2, através de um intermediário enolato; e são geralmente proteínas dodecaméricas (GOURLEY *et al.*, 1999). Os dois tipos de DHQase são atípicas, uma vez que utilizam mecanismos completamente distintos para catalisar a mesma reação química geral, empregando, portanto, diferentes estados de transição e mecanismos catalíticos.

Já foi proposto que a primeira DHQase do tipo II pode ter sido utilizada inicialmente por um ancestral comum não identificado, para permitir a adaptação saprofítica ao surgimento de um composto de armazenamento abundante em plantas (GOURLEY *et al.*, 1999). Foi sugerido que *M. tuberculosis* apresente uma única enzima DHQase, do tipo II, que pode estar envolvida tanto na via biossintética do ácido chiquímico quanto no metabolismo do quinato. A cristalização da DHQase do tipo II do *M. tuberculosis* (gene *aroQ* de acordo com o artigo original) foi reportada e a sua estrutura tridimensional foi determinada (GOURLEY *et al.*, 1999). No entanto, a classificação da DHQase de *M. tuberculosis* como sendo do tipo II foi baseada no baixo valor de  $K_M$  aparente para o DHQ (64  $\mu$ M), pois, em geral, as DHQase do tipo I apresentam valores mais elevados de  $K_m$  e as DHQase do tipo II apresentam valores mais baixos de  $K_m$  (MOORE *et al.*, 1992). Consequentemente, a classificação da DHQase de *M. tuberculosis*, codificada pelo gene *aroD*, como sendo do tipo II não se baseia em evidências experimentais, que devem ser fornecidas

para demonstrar que o mecanismo catalítico é consistente com as enzimas do tipo I ou do tipo II.

### **1.6.3. Chiquimato 5-Desidrogenase (EC 1.1.1.25)**

A quarta reação da via do ácido chiquímico é a redução do DHS a chiquimato (SHK), reação catalisada pela enzima chiquimato desidrogenase (SD) codificada pelo gene *aroE*, e dependente de NADP(H) (FONSECA *et al.*, 2007). A determinação dos parâmetros cinéticos reais em estado estacionário, do padrão de inibição pelos produtos e dos efeitos isotópicos cinéticos concordam com um mecanismo ordenado bi-bi em estado estacionário, onde o DHS liga-se primeiro à SD seguido pelo NADPH (FONSECA *et al.*, 2007). O efeito isotópico cinético primário do deutério indica que o hidreto C4-*proS* (lado B) é transferido para o chiquimato na reação de oxirredução e que essa transferência do hidreto é apenas parcialmente limitante para a catálise enzimática. Os efeitos isotópicos cinéticos do solvente mostraram que a troca de prótons com o solvente durante a catálise é apenas parcialmente limitante na reação geral. O inventário de prótons do solvente mostrou que um único próton é transferido na etapa da reação que apresenta efeito isotópico do solvente (FONSECA *et al.*, 2007). Esses dados estruturais e funcionais irão facilitar o desenho racional de inibidores da SD de *M. tuberculosis*.

---

# Capítulo 2

---

Justificativa

---

## 2. JUSTIFICATIVA

A Tuberculose é uma doença que demonstra índices preocupantes em relação à incidência, à prevalência e à mortalidade em todos os continentes do mundo, o que a torna uma preocupação mundial.

A rifampicina e a isoniazida, descobertas em 1966 e 1952, respectivamente, são os antibióticos mais poderosos utilizados atualmente contra a TB, entretanto, o surgimento de novas cepas resistentes ao tratamento atual e as altas taxas de incidência indicam a necessidade do desenvolvimento de novos agentes contra a TB, a fim de impedir a proliferação dessas cepas resistentes, o que tornaria ainda mais difícil a luta contra essa doença.

Utilizando a estratégia combinada de estudos estruturais e funcionais, aliando ferramentas computacionais e de biologia molecular para o desenho racional de agentes quimioterápicos, onde os alvos moleculares são duas enzimas importantes no metabolismo do bacilo, busca-se obter novos compostos com ação inibitória frente a essas enzimas, com potencial para tornarem-se novos medicamentos para o tratamento da TB.

---

# Capítulo 3

---

Objetivos

---



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Identificar novos compostos com ação inibitória contra as enzimas Desidroquinato desidratase (MtbDhqase) e Chiquimato desidrogenase (MtbSD) de *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Utilizar a abordagem *e-pharmacophore* para determinar novos compostos com possível atividade inibitória contra a enzima MtbDhqase;
- Construir um modelo molecular da enzima MtbSD;
- Realizar estudos de *docking* para as enzimas MtbDhqase e MtbSD;
- Medir a atividade e realizar estudos de cinética enzimática para as enzimas MtbDhqase e MtbSD;
- Caracterizar a atividade inibitória dos compostos selecionados;
- Realizar ensaios de inibição contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
- Determinar a citotoxicidade dos compostos utilizando células HEK293.

---

# Capítulo 4

---

Structure-based virtual  
screening as tool for the  
identification of novel inhibitors  
against *Mycobacterium*  
*tuberculosis* 3-dehydroquinate  
dehydratase

---

**Submissão do manuscrito:**

Dear Dr. Guilherme Petersen,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Molecular Graphics and Modelling

Corresponding Author: Sriram Dharmarajan

Co-Authors: Guilherme O Petersen; Shalini Saxena; Janupally Renuka ; Vijay Soni; Yogeeswari Perumal; Diogenes S Santos; Cristiano V Bizarro;

Title: Structure-based virtual screening as a tool for the identification of novel inhibitors against Mycobacterium tuberculosis 3-dehydroquinase dehydratase

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [drdsriram@yahoo.com](mailto:drdsriram@yahoo.com); [dsriram@hyderabad.bits-pilani.ac.in](mailto:dsriram@hyderabad.bits-pilani.ac.in); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/jmglm/l.asp?i=25944&l=M082JHDV>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Journal of Molecular Graphics and Modelling

**Structure-based virtual screening as a tool for the identification of novel inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis***

**3-dehydroquinate dehydratase**

**Guilherme O Petersen<sup>[a][b][c]</sup>, Shalini Saxena<sup>[c]</sup>, Janupally Renuka<sup>[c]</sup>, Vijay Soni<sup>[c]</sup>, Perumal Yogeeswari<sup>[c]</sup>, Diogenes S Santos<sup>[a][b]</sup>, Cristiano V Bizarro<sup>\*[a][b]</sup>, Dharmarajan Sriram<sup>\*[c]</sup>.**

[a] Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, 90619-900 Porto Alegre, Brazil

[b] Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre 90619-900, Brazil

[c] Department of Pharmacy, Birla Institute of Technology & Science-Pilani, Hyderabad Campus, Hyderabad 500078, India

\*For correspondence:

D. Sriram, Telephone: +91-4066303506; Fax: +91-4066303998;

Email: [dsriram@hyderabad.bits-pilani.ac.in](mailto:dsriram@hyderabad.bits-pilani.ac.in)

Cristiano V. Bizarro, Telephone: +5551333203629

Email: [cristiano.bizarro@pucrs.br](mailto:cristiano.bizarro@pucrs.br)

**Abstract**

3-Dehydroquinate dehydratase (DHQase), the third enzyme of the shikimate pathway, catalyzes the reversible reaction of 3-dehydroquinate into 3-dehydroshikimate. The aim of the present study was to identify new drug-like molecules as inhibitors for *M. tuberculosis* DHQase using structure-based pharmacophore modeling from an *in house* database consisting of about 2500 small molecules. Further the pharmacophore models were validated using enrichment calculations, and finally three models were employed for high-throughput virtual screening and docking to identify novel small molecules as DHQase inhibitors. Five compounds were identified, out of which, one molecule (Lead 1) showed 58% inhibition at 50  $\mu\text{M}$  concentration in the Mtb DHQase assay. Chemical derivatives of the lead 1 when tested evolved top two hits with  $\text{IC}_{50}$ s of 17.1 and 31.5  $\mu\text{M}$  as well as MIC values of 25 and 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively and no cytotoxicity up to 100  $\mu\text{M}$  concentration.

**Keywords:** Tuberculosis, Drug discovery, Shikimate pathway, DHQase, virtual screening.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is the second greatest killer worldwide due to a single infectious agent being responsible for 1.3 million deaths and 8.6 million people infected in 2012 [1]. According to WHO (World Health Organization), approximately 2 billion people are latently infected and about 10% of those persons could develop active disease during their lifetime. Moreover, 95% of TB deaths occur in low- and middle-income countries, and it is among the top three causes of death for women aged between 15 and 44. It was estimated that 530,000 children became ill and 74,000 HIV-negative children died of TB in 2012. Also, TB is a leading killer of people living with HIV, causing one fifth of all deaths of HIV-infected people. *M. tuberculosis* is the main causative agent of TB in humans and the dissemination of multi-drug-resistant strains challenges the existing treatments for TB [1].

Targeting essential metabolic pathways of micro-organisms absent in humans is an attractive strategy for the development of new therapies. The shikimate pathway produces an important precursor of aromatic compounds in bacteria, fungi, plants and apicomplexan parasites [2-5]. The pathway comprises of seven enzymes each catalyzing a separate step that converts erythrose-4-phosphate and phosphoenolpyruvate into chorismate, the precursor for the synthesis of aromatic amino acids, folic acid, ubiquinone, and many other aromatic compounds [2, 6-7]. As reported from gene disruption studies, enzymes from the shikimate pathway were found to be essential for *M. tuberculosis* survival [8].

3-Dehydroquinate dehydratase (DHQase) is the third enzyme of the shikimate pathway catalyzing the reversible dehydration of 3-dehydroquinate into 3-dehydroshikimate. There are two forms of DHQase (type I and type II), with distinct structures, but both catalyze the same overall reaction [9]. *M. tuberculosis* uses type II DHQase (Mtb DHQase), a 17.79 kDa protein containing 147 amino acids. Crystallographic data revealed Mtb DHQase as a homododecamer formed from a tetramer of trimers with the active site found near the C-terminal region of strands  $\beta 1$  and  $\beta 3$  of the parallel  $\beta$ -sheet [9,10].

The present study involved structure based design of Mtb DHQase inhibitors using energy optimized pharmacophore as a query to small molecule database searching and retrieved suitable hits based on pharmacophore fitness, followed by docking in the active site of DHQase protein. Finally, five compounds were short-listed and further evaluated for their *in vitro* DHQase assay.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Computational details

All the computational studies were carried out on an Intel Core 2 Duo E7400 2.80 GHz capacity processor with memory of 2 GB RAM running with RHEL 5.2 operating system. PHASE 3.3 implemented in the Maestro 9.3 software package (Schrodinger, LLC) was used to generate e-pharmacophore models [11]. Glide energy grid was generated for the prepared protein complex. Binding site was defined by a rectangular box surrounding the x-ray ligand. Ligand was refined using the “Refine” option in Glide, and the option to output Glide XP descriptor information was chosen (Glide v5.7, Schrodinger, LLC, New York, NY). For refinement and docking calculations, the default settings as available in the software package were used.

### 2.2 Protein and ligand preparation

The crystal structure of Mtb DHQase bound to inhibitor (PDB ID: 2Y71) with a resolution of 2.0 Å was retrieved from PDB (protein data bank) and was prepared using the Protein Preparation Wizard of Schrödinger Suite 9.3 [12]. The protein was subjected to many steps such as addition of hydrogens, bond order and formal charge corrections, adjustment of tautomerization and ionization states of protein etc. The water molecules were removed from the protein and the hydrogen bonding network was optimized by reorienting the hydroxyl and thiol groups in the protein residues. Finally the protein was subjected to energy minimization using OPLS\_2005 (Optimized Potential for Liquid Simulations) force field. The reference ligand was also retrieved from PDB which had a reported  $K_i$  value of approximately 45 nM [13] and was subjected to energy minimization using impact of Schrodinger suite version 9.3. The ligand was minimized using 500 cycles each of SD (Steepest

Descent) and CG (Conjugate Gradient). The interactions of the ligand with the protein residues in the active site were visualized using ligand interaction diagrams in Schrodinger suite version 9.3

### ***2.3 Glide XP (extra-precision) docking***

The prepared crystal structure of protein was used for grid generation, specifying the refined x-ray ligand as a reference to identify the active site. The generated grid file from the prepared Mtb DHQase was used for the Glide XP docking calculations. The minimized conjugate gradient output of the ligand was used. The “Write XP descriptor information” option and “Compute RMSD” option was enabled and the settings were kept default for the rest of the parameters. The XP Glide scoring function was used to order the best ranked compounds and the specific interactions like  $\pi$ -cation and  $\pi$ - $\pi$  stacking were analyzed using XP visualizer in Glide module. The input RMSD of the ligand was also ascertained.

### ***2.4 E-pharmacophore generation***

The e-pharmacophore hypothesis was created for the ligand by using the xpdes results of the Glide XP output in the docking post processing tool of the scripts module. Starting with the refined crystal ligand, pharmacophore sites were automatically generated with Phase (Phase, v3.0, Schrodinger, LLC, New York, NY) [14-15] using the default set of six chemical features: hydrogen bond acceptor (A), hydrogen bond donor (D), hydrophobic (H), negative ionizable (N), positive ionizable (P), and aromatic ring (R). Hydrogen bond acceptor sites were represented as vectors along the hydrogen bond axis in accordance with the hybridization of the acceptor atom. Hydrogen bond donors were represented as projected points located at the corresponding hydrogen bond acceptor positions in the binding site. The ligand was docked with Glide XP and the pose was refined. The Glide XP scoring terms were computed, and the energies were mapped onto atoms. The pharmacophore sites were generated, and the Glide XP energies from the atoms that comprised each pharmacophore sites were summed up. These sites were then ranked based on the individual energies, and the most favorable sites were selected for the pharmacophore hypothesis [16]. This pharmacophore model was then used as query for virtual screening.



## 2.5 Dataset preparation

BITS-Pilani *in house* database containing 2500 compounds was considered for the e-pharmacophore based screening. All the compounds were prepared using LigPrep module [17] of Schrodinger 9.3 so as to generate high quality structures with appropriate ionization states, tautomers, and ring conformations and stereochemistry. Epik was employed for adjustment of tautomerization and ionization states of molecules at pH 7.0±2.0. Ligand conformers were generated for all the database molecules using ConfGen [17]. All the molecules were energy minimized and filtered using the OPLS\_2005 force field, by means of a distance dependent dielectric constant with a prefactor of 4. A maximum of 32 conformations for every ligand were generated and carried forward for virtual screening.

## 2.6 E-Pharmacophore validation

For the fraction of known actives recovered when the database was screened, enrichment factor (EF) was employed. In this study, decoy set consisted of 1000 molecules with an average molecular weight of 400 kDa which were available for download (<http://www.schrodinger.com/glidedecoyset>). In decoy set further 15 known active molecules of DHQase inhibitors were included for validation. For this, we focused primarily on EF (1%), the enrichment in the top 1% of the decoys, and along with goodness of fit (GH), % actives, % yield were calculated using the following equations,

$$EF = \frac{(H_a \times D)}{(H_t \times A)} \quad (1)$$

$$GH = \left( \left( \frac{H_a}{4H_t A} \right) \times (3A + H_t) \right) \times \left( 1 - \left( \frac{H_t - H_a}{D - A} \right) \right) \quad (2)$$

$$\% \text{ Yield} = \left[ \left( \frac{H_a}{H_b} \right) \times 100 \right] \quad (3)$$

$$\%A = \left[ \left( \frac{H_a}{A} \right) \times 100 \right] \quad (4)$$

Where

'H<sub>t</sub>' was total number of compounds in the hit list

'H<sub>a</sub>' was the total number of active molecules in the hit list

'A' was the total number of actives in the decoy set

'D' was the total number of molecules in the decoy set

### **2.7 E-pharmacophore based screening and docking**

For the e-pharmacophore approach, explicit matching was required for the most energetically favorable site (scoring better than  $-1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). For filtering the database molecules, a minimum of 4 sites were required to match for hypotheses with 5 or more sites [18]. The above criterion was followed in the present work to screen the *in house* database. In order of their fitness score, database hits were ranked to measure how well the aligned ligand conformer matched the hypothesis based on RMSD, site matching, vector alignments and volume terms [19]. Database ligands after e-pharmacophore filter were docked into the binding sites of the protein with Glide 5.7 (Glide, version 5.7, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2011), utilizing the high-throughput virtual screening (HTVS) scoring function to estimate protein-ligand binding affinities. Ligands filtered from HTVS were subjected to Glide SP (standard precision) docking. Compounds with best docking and Glide scores were then finally subjected to Glide XP (extra precision) docking.

### **2.8 Cloning and purification of *Mtb* DHQase**

All enzymes were purchased from New England Biolabs. Oligos and other chemicals were procured from Sigma. pQEII vector was obtained from Qiagen. 3-Dehydroquinate dehydratase (AroD) was PCR amplified, using specific forward primer (5'CACCCATATGAGCGAACTGATCGTGAACGTG3') and reverse primer (5'AGCTAAGCTTTCACGTCCCGACATGCTCAGCTAG3'), from *M. tuberculosis* genomic DNA. Pfu polymerase (NEB) was used with 60°C of primer annealing temperature. PCR products were digested with NdeI and HindIII followed by cloning into NdeI and HindIII sites of pQEII vector. Sequence confirmed clones were further transformed into BL21 (DE3) CODON PLUS cells for expression and purification. Transformants were grown in LB broth at 37°C with constant aeration in the presence of 100 µg/mL ampicilin. Exponentially growing cultures ( $A_{600}$

of 0.6) were induced with 1.0 mM IPTG and further grown for 4–6 h at 37°C. Cells were then harvested and lysed by sonication in lysis buffer. The cell lysate containing His6-fusion proteins were mixed with equilibrated Ni-NTA affinity resins and the tagged proteins were eluted with buffer containing 750 mM imidazole.

### **2.9 *In vitro* Mtb DHQase enzyme assay**

Enzymatic assay for Mtb DHQase was performed using Molecular Devices® SpectraMax M4 Multiplate and Cuvette reader. Photometric determination of DHQase activity was accomplished by measuring the rate of production of 3-dehydroshikimate at 234 nm in a 1 mL quartz cuvette. The assays were performed in duplicate at 25°C in 50 mM Tris/HCl (pH 7.0). A final concentration of 50 nM of Mtb DHQase was used. The assay was initiated by adding the enzyme after incubation of buffer and substrate (3-dehydroquinone) at 25°C. The values for  $K_m$  and  $V_{max}$  were obtained by measuring the reaction over a range of different substrate concentrations. The data was processed using GraphPad Prism® (GraphPad Software).

### **2.10 Antibacterial activity**

The compounds were further screened for their *in vitro* antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv strain by microplate alamar blue assay method. Briefly, the inoculum was prepared from fresh LJ medium, re-suspended in 7H9-S medium (7H9 broth, 0.1% casitone, 0.5% glycerol) supplemented with OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase), adjusted in a McFarland tube number 1, and diluted 1:20 and 100  $\mu$ l was used as inoculum [20]. Each drug stock solution was thawed and diluted in 7H9-S at four-fold the final highest concentration tested. Serial two-fold dilutions of each drug were prepared directly in a sterile 96-well microtiter plate using 100  $\mu$ l 7H9-S. A growth control containing no antibiotic and a sterile control were also prepared for each plate. In order to avoid evaporation during incubation for 7 days, sterile water was added to all perimeter wells. The plate was covered, sealed in plastic bags and incubated at 37°C in normal atmosphere. After 7 days of incubation, 30  $\mu$ l of alamar blue solution was added to each well, and the plate was further re-incubated overnight. A change in color from blue (oxidized state) to pink

(reduced) indicated the growth of bacteria, and the minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of drug that prevented this change in color.

### ***2.11 Cytotoxicity assay***

The cytotoxic activity against HEK293 (human embryonic kidney cells) cells was measured by incubating the test compounds in 96-well plate containing  $5 \times 10^5$  cells at different concentrations at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> atmosphere for 48 h [21]. About 4 h before the end of incubation period, 10 µL of MTT reagent (10 mg mL<sup>-1</sup>) was added and the 96-well plate was centrifuged at 1200 rcf for about 3 min and the supernatants were removed. Subsequently to each well, 200 µL of DMSO was added. The absorbance was measured at a wavelength of 560 nm on Perkin Elmer Victor X3 microplate reader against the blank. The assay was performed in triplicates for each concentration of drug to minimize the error rate. The cytotoxicity of each compound was expressed as % inhibition.

### ***2.12 Biophysical characterization***

Differential scanning fluorimetry (DSF) is a screening method used to identify ligands that bind and stabilize purified proteins. The ability of the compound to stabilize Mtb DHQase was assessed by measuring the fluorescence of the native protein and the protein-ligand complex in the presence of a fluorescent dye whose fluorescence increased when exposed to non-polar residues of the protein and reached a maximum when the protein denatured [22,23]. Native Mtb DHQase was compared to Mtb DHQase in the presence of ligand by heating from 25 to 95°C in steps of 0.1 °C in the presence of the fluorescent dye sypro orange. As the protein denatures, non-polar residues are exposed to the dye, increasing its fluorescence. A right side positive shift of melting temperature ( $T_m$ ) in comparison to native protein indicated higher stabilization of the protein-ligand complexes, which was a consequence of the inhibitor binding.

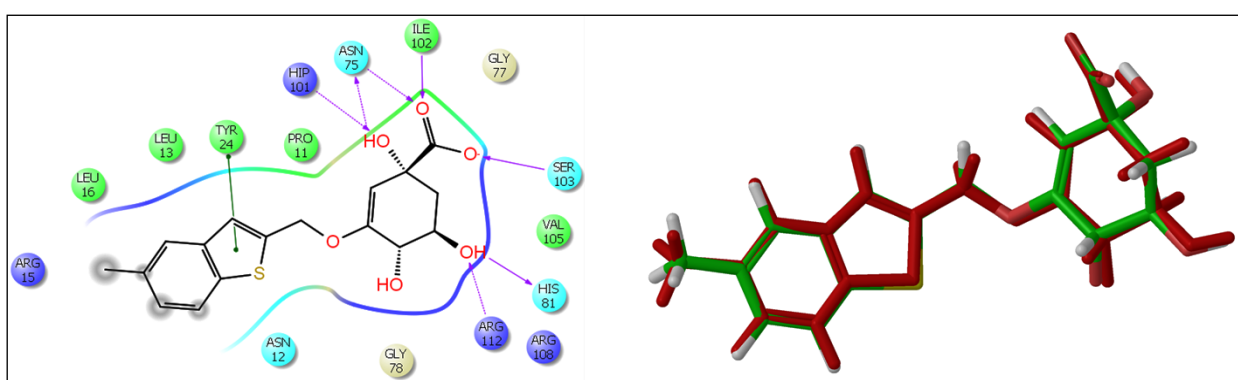
## **3. Results and discussion**

A major goal of rational drug design would be to identify and develop new ligands with high inhibitory activity towards a cellular target. The characterization of the binding groups involved in protein-ligand interactions is crucial for understanding an inhibitor's binding mechanism, a

prerequisite to further improve the inhibitory activity in a rational way. A very useful technique for achieving this goal was reported to be the structure-based pharmacophore modeling [24]. In the present study, the reference ligand bound to the protein was re-docked with Mtb DHQase to generate a pharmacophore hypothesis to screen the *in house* database compounds. The identified compounds were further evaluated for *in vitro* enzymatic inhibition and antimycobacterial potential.

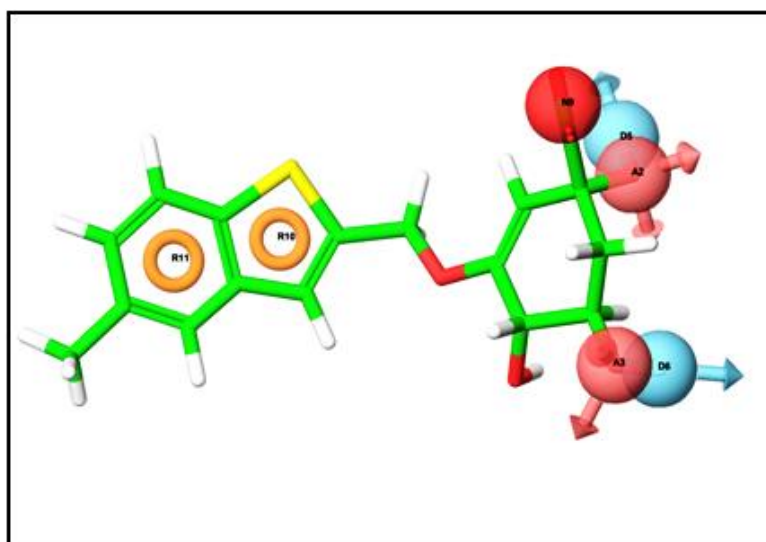
### 3.1 *e*-pharmacophore generation of crystal ligand

The crystal structure of Mtb DHQase (PDB: 2Y71) bound with inhibitor was used for structure-based pharmacophore modeling. The protein was considered for grid generation using crystal ligand as a reference to identify the active site. The ligand was optimized for hydrogen network and refined using OPLS\_2005 force field. This reference ligand was re-docked with the active site residues of the Mtb DHQase protein to validate the active site cavity. The ligand exhibited a Glide score of -11.12 kcal mol<sup>-1</sup> and was found in the vicinity of important amino acids like Arg112, His81, Ser103, Ile102, Asn75, His101 and Tyr24. Re-docking results showed that the compound exhibited interactions similar to the ones found in the original crystal structure and the RMSD was found to be 0.340 Å (Fig. 1). The result of this docking was used to ascertain pharmacophoric features for Mtb DHQase inhibition.



**Fig. 1.** Interactions of reference inhibitor with the active site residues of Mtb DHQase protein and superimposition of docked pose of the reference inhibitor to the original pose of the inhibitor.

The initial number of pharmacophore sites was set up to 10 for the crystal structure. The pharmacophore generation protocol applied for the ligand yielded in a hypothesis with seven features as shown in Fig 2. The e-pharmacophore features consisted of two hydrogen donor (D) moieties, two hydrogen acceptor (A) groups, two aromatic ring (R) interactions and one negatively (N) charged group. The results of the e-pharmacophore features of the reference ligand with their respective energetics are given in Table 1. The energy contribution for binding of ligand to the protein was the key to derive pharmacophoric features in structure-based design.



**Fig. 2.** Energy based pharmacophoric features of inhibitor bound to Mtb DHQase protein.

The A3 and D6 features corresponded to the third hydroxyl group of ligand which was involved in H-bond with His81 and Arg112. A2 and D5 corresponded to carboxylic group of ligand which was involved in H-bond interactions with Ser103, Asn75 and Ile102; while the N9 feature was found interacting with Asn75 and HIP101 amino acid residues. The two aromatic ring features (R10 and R11) were mapped to the two aromatic rings in the ligand which were mainly involved in  $\pi$ - $\pi$  interactions.

**Table 1.** Scores of hypothesis in e-pharmacophore.

Rank	Feature label	Score	Type
1	D5	-1.60	D
2	D6	-1.60	D
3	N9	-1.32	N
4	A2	-0.80	A
5	A3	-0.80	A
6	R10	-1.41	R
7	R11	-1.07	R

To validate the pharmacophore model, we made combinations of pharmacophores having 6, 5, 4 and 3 point features totaling 36 combinations on the basis of their energy scores as represented in Table 2.

### 3.2 Validation of constructed pharmacophore models

The enrichment results for all the 36 pharmacophoric hypotheses were compared based on enrichment factor (EF) and % of actives based on recovery rate against the ranked a decoy database. This helped us to eliminate the pharmacophore models that lacked significant interactions as well as allowed to prioritize the sites for further virtual screening, leading to good enrichment as well as diversity in hits. The EF reflected the capability of a screening application to detect active ligands (true positives) compared to random selection. Thus, the value was expected always to be greater than 1 and the higher it was, the better the enrichment performance for virtual screening [25]. The recovery rate of actives was performed against the total 1015 compounds in which 15 were known inhibitors of Mtb DHQase and 1000 were the decoy set which represented inactives. The 6 point (A2, A3, D5, D6, N9, and R11), 5 point (D5, D6, N9, R10, R11) and 4 point (D5, N9, A2, R11) pharmacophore models showed the highest enrichment at 1% (EF1%) values (Fig.3). Also, the overall % active, and % yield and GH were found to be better for all these selected pharmacophore models. The overall results indicated that the three pharmacophore models generated from the crystal structure of Mtb DHQase could differentiate effectively the actives from the inactives. The validated e-pharmacophore hypothesis was then utilized for the virtual screening of *in house* database following a protocol as summarized in Fig 4.

**Table 2.** Validation of e-pharmacophore models.

E-pharm features	EF(manual) <sup>[a]</sup>	GH <sup>[b]</sup>	%yield <sup>[c]</sup>	%A <sup>[d]</sup>
D5,D6,N9,A2,A3,R10,R11	50	0.7103	75	60
D5,D6,N9,A2,R10,R11	28.57	0.4656	42.85	60
D5,D6,N9,A3,R10,R11	21.42	0.3835	32.14	60
D5,D6,N9,A2,A3,R10	10.72	0.3277	16.09	93.33
D5,D6,N9,A2,A3,R11	18.30	0.4227	27.45	93.33
D5,N9,A2,A3,R10,R11	14.63	0.3044	21.95	60

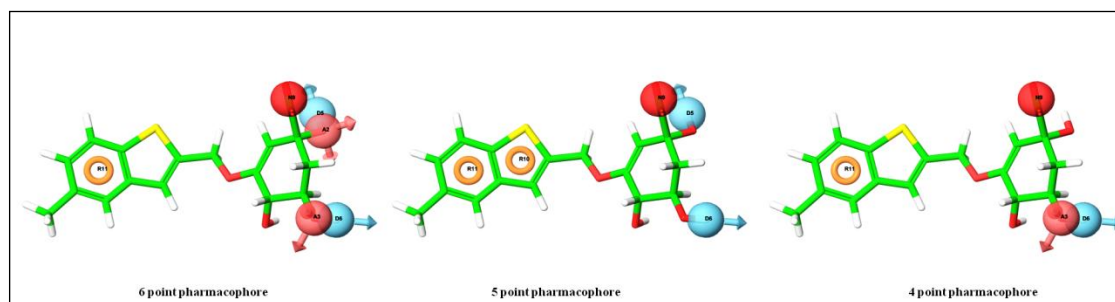
D6,N9,A2,A3,R10,R11	14.81	0.3214	22.22	66.66
D5,D6,A2,A3,R10,R11	6.80	0.2214	10.20	66.66
D5,N9,A2,R10,R11	5.37	0.2008	8.06	66.66
D6,N9,A3,R10,R11	6.00	0.2102	9.0	66.66
D5,D6,N9,R10,R11	13.63	0.2926	20.45	60
D5,N9,A3,R10,R11	5.12	0.1849	7.69	60
D6,N9,A2,R10,R11	6.60	0.21	9.90	66.66
D5,D6,N9,A2,A3	3.66	0.20	5.49	93.33
D5,D6,A2,A3,R10	2.61	0.17	3.92	93.33
D5,D6,A2,A3,R11	3.35	0.19	5.03	93.33
D5,N9,A2,R10	1.83	0.12	2.75	93.33
D5,N9,A3,R10	1.70	0.116	2.56	93.33
D6,N9,A2,R10	1.70	0.11	2.56	93.33
D6,N9,A3,R10	1.82	0.12	2.73	93.33
D5,N9,A2,R11	2.76	0.17	4.14	93.33
D5,N9,A3,R11	2.55	0.16	3.82	93.33
D6,N9,A2,R11	2.80	0.17	4.20	93.33
D6,N9,A3,R11	3.05	0.19	4.58	100
D5,D6,A2,A3	1.68	0.11	2.53	100
D5,A2,R10,R11	1.17	0.07	1.76	66.66
D6,A3,R10,R11	1.26	0.08	1.89	66.66
D5,N9,A2	1.32	0.06	1.99	100
D5,N9,A3	1.16	0.037	1.74	100
D6,N9,A2	1.17	0.04	1.76	100
D6,N9,A3	1.30	0.062	1.95	100
D5,A3,R11	1.06	0.03	1.60	93.33
D6,A2,R10	1.08	0.02	1.63	100
D6,A3,R11	2.21	0.12	3.31	53.33
D5,N9,R10	1.14	0.04	1.71	93.33
D6,N9,R11	1.87	0.12	2.80	100

---

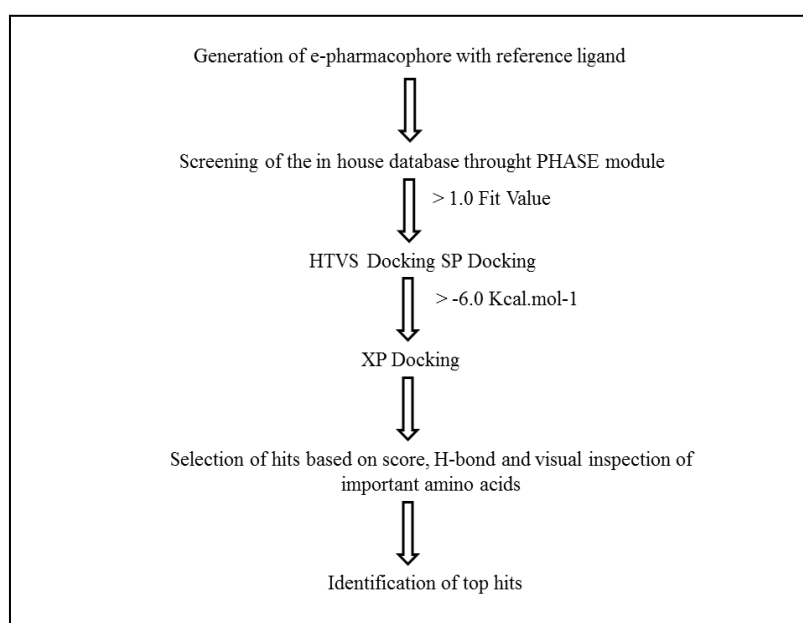
[a] Enrichment Factor

[b] Goodness of hit





**Fig. 3. E-pharmacophore models of reference inhibitor after validations.**



**Fig.4. Virtual screening workflow.**

### 3.3 Virtual screening of database compounds

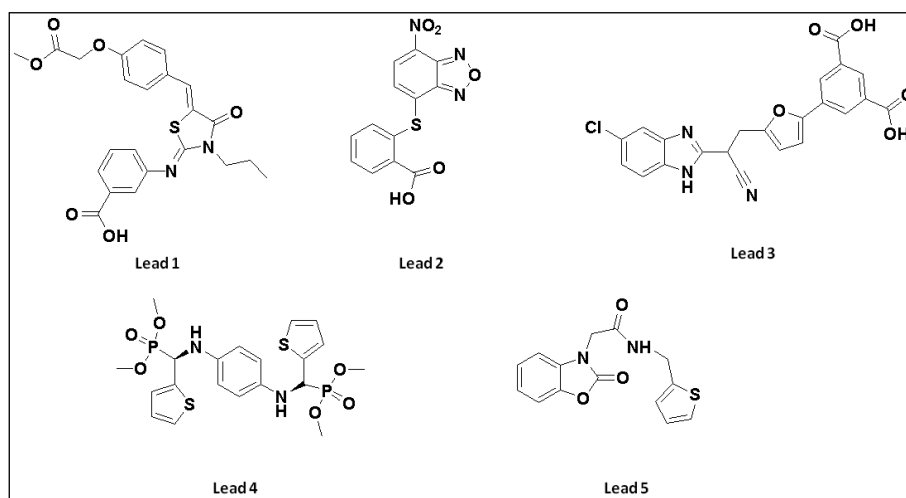
The basic goal of any virtual screening protocol would be to reduce the enormous virtual chemical space of small organic molecules to a manageable number of compounds that could inhibit the protein with a higher chance so as to identify a candidate drug [26]. The virtual screening workflow option was performed with the e-pharmacophore filtered ligands.

High throughput virtual screening (HTVS), standard precision (SP) and extra precision (XP) Glide docking were performed in a sequence as exemplified in Fig 4. A fit value was a measure of how well the ligand matched the e-pharmacophore model. In this study, the hits retrieved by the e-

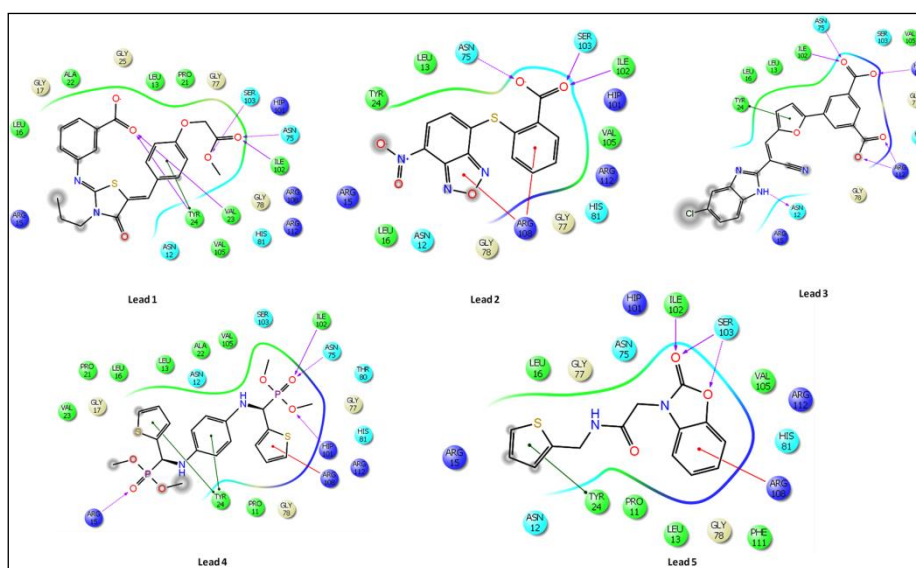
pharmacophore model with a fit value above 1.0 were carried forward for HTVS. Glide HTVS was faster and more tolerant to suboptimal fits compared to other modes. Top hits from HTVS resulting in a score of  $\geq -6.0$  kcal mol<sup>-1</sup> were subjected to another round of docking by Glide SP. The survivors of these preliminary screening steps were taken up to Glide XP docking. The XP Glide combines accurate, physics-based scoring terms and thorough sampling and the results showed scores ranging from -8.14 to -6 kcal mol<sup>-1</sup>. The results of the virtually screened ligands using Glide XP docking showed the hydrogen-bond interactions, electrostatic interaction, hydrophobic enclosure, and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions.

### ***3.4 Molecular docking studies***

Hit molecules obtained from Glide SP were further evaluated with Glide XP and GOLD 4.1.2 (genetic algorithm based ligand docking) [27] to understand how these ligands bind to the enzyme and also to confirm their potency. Compounds selected from the SP were subjected to Glide XP and GOLD docking. The results showed scores ranging from -6.011 to -9.118 kcal mol<sup>-1</sup>. In addition to the docking scores, the selection of hit compounds was based on visual inspection of the important amino acid residue interaction that included hydrogen bonding with Arg112, His81, Ser103, Ile102, Asn75, His101 and Tyr24. Thus we selected top five compounds from the Glide XP docking study with the best Glide scores (-7.03 to -8.14 kcal.mol<sup>-1</sup>) and GOLD scores (56.89 to 76.12), suggesting strong protein-ligand interactions. The chemical structures of these lead compounds (Lead 1 to Lead 5) are illustrated in Fig. 5. All these top hits showed good docking scores and interactions with important amino acids such as Arg112, His81, Ser103, Ile102, Asn75, His101 and Tyr24. Fig. 6 presents the binding modes of all five lead molecules and their interacting pattern in the active site of the protein using ligand interaction diagram in Schrodinger suite version 9.3. All the compounds were found well fit in the active site cavity of the protein.



**Fig.5. 2D chemical structures of top five compounds.**



**Fig. 6. Ligand-protein interactions of top five lead compounds with the active site residues of Mtb DHQase protein.**

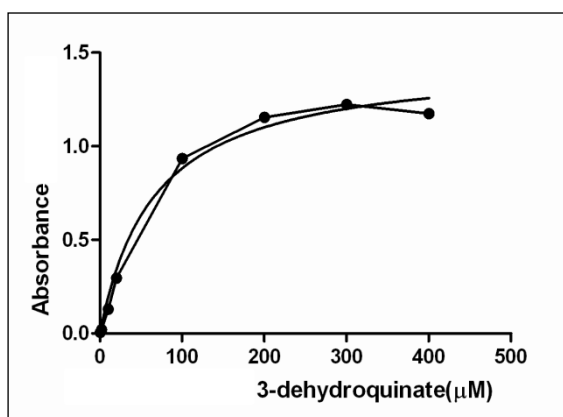
Further to prove the design concept, the final hits were subjected to biological assays. The docking score, H-bond and important interactions of these hits are presented in Table 3.

**Table 3:** HTVS and docking results of top five leads.

Ligand	Fitness	Docking score	H-Bond	GOLD score	Interaction
Lead 1	1.34	-8.14	5	72.17	Tyr24, Val23, Ser103, Asn75, Ile102
Lead 2	1.56	-7.18	3	60.41	Asn75, Ile102, Ser103
Lead 3	1.67	-7.03	6	62.57	Asn75, Asn12, Ile102, Hip101, Arg112
Lead 4	1.23	-7.09	4	76.12	Asn75, Ile102, Arg15, Hip101
Lead 5	1.43	-7.50	3	56.89	2Ser103, Ile102

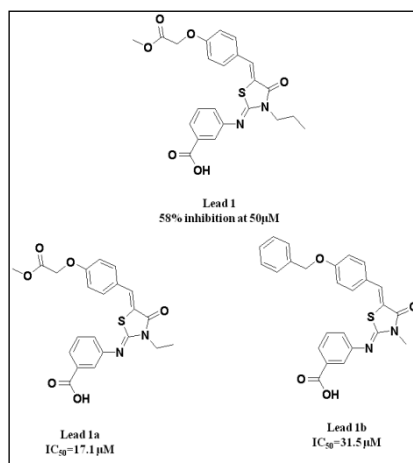
### 3.5 Enzyme kinetics of Mtb DHQase and *in vitro* enzyme inhibition studies.

The activity of enzyme concentration followed first order kinetics. The apparent constants  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_{cat}$  were determined and their values were found to be 66.08  $\mu\text{M}$ , 0.156 U/mg and 0.041  $\text{s}^{-1}$  respectively which were determined using GraphPad (GraphPad Prism software, San Diego, CA) (Fig. 7).

**Fig. 7. Kinetics of Mtb DHQase.**

Enzymatic inhibition assays for Mtb DHQase were performed by measuring the rate of production of 3-dehydroshikimate at 234 nm. The top five hits were screened initially at 50  $\mu\text{M}$  concentration. The **Lead 1** showed 58% inhibition at 50  $\mu\text{M}$ , presenting the highest inhibition percentage of all hit molecules and was chosen as lead compound (Fig. 8). Sixty five chemical derivatives of the lead obtained from our *in house* chemical library were screened at 50  $\mu\text{M}$ . Top two lead derivatives

(**lead1a** and **lead1b**) (Fig. 8) were found very promising and hence were tested at lower concentrations to estimate  $IC_{50}$  and found to be 17.1 and 31.5  $\mu\text{M}$  for lead1a and lead1b respectively (Table 4).



**Fig.8.** 2D Chemical structures of lead molecule as well as the top two lead-derivatives.

### 3.6 Antibacterial activity and cytotoxicity assay

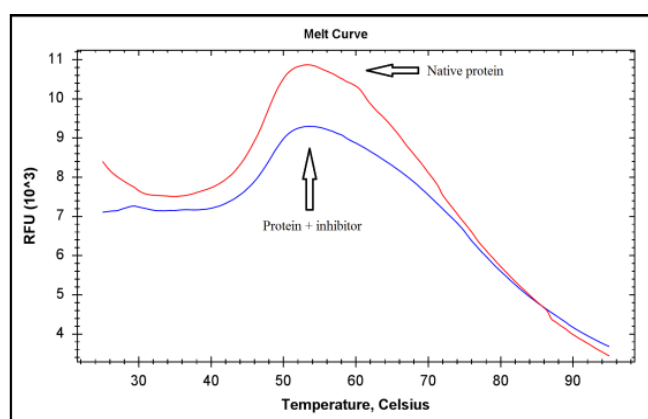
The top two leads were evaluated for both antibacterial and cytotoxic activities (Table 4). The antibacterial activity of both the compounds was evaluated against *M. tuberculosis* H37Rv while cytotoxicity was evaluated using HEK293 cells. MIC values of 25  $\mu\text{g/mL}$  and 6.25  $\mu\text{g/mL}$  were obtained for **lead1a** and **lead1b** respectively. Both compounds presented low cytotoxicity, with 14.3% of cell death at 100  $\mu\text{M}$  for lead1a and 11.9% for lead1b (Table 4).

**Table 4.** Activity table showing  $IC_{50}$  value, MIC and cytotoxicity.

Compounds	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cytotoxicity (% at 100 $\mu\text{M}$ )
Lead1a	17.1	25.0	14.3
Lead1b	31.5	6.25	11.9

### 3.7 Biophysical characterization

The top active inhibitor against Mtb DHQase (**lead1a**) was evaluated for its stabilization of the protein using DSF. This was measured by comparing the thermal stability of native Mtb DHQase over gradual increase in temperature with that of the protein-ligand complex. The positive shift in melting temperature ( $T_m$ ) over the native Mtb DHQase  $T_m$  accounted to the increased stability of protein due to ligand binding which implied the stabilization of target protein Mtb DHQase by the inhibitor. Fig 9 shows the melting temperature of active compound lead1a. The protein Mtb DHQase  $T_m$  was found to be 45.1°C whereas melting temperature for protein with **lead1a** was 48.3°C. This observation explained the stabilization effect of active inhibitor (**lead1a**) over Mtb DHQase accounting for their activity. The lead derivative, lead1a, displayed a  $T_m$  shift of 3.2°C, showing affinity with the protein and correlating with its  $IC_{50}$  value of 17.1 $\mu$ M.



**Fig. 9. DSF experiment for top active compound showing an increase in thermal stability between the native Mtb DHQase (red) and Mtb DHQase+compound complex (blue).**

## 4. Conclusion

The primary aim of the present study was to identify new drug like molecules as inhibitors for Mtb DHQase using structure-based modeling. The crystal structure of Mtb DHQase bound with an inhibitor was used to construct pharmacophore models based on interaction energies and docking to yield diverse leads. Five compounds were identified, out of which, one molecule (Lead 1) showed 58% inhibition at 50  $\mu$ M concentration in Mtb DHQase assay. Chemical derivatives of the lead

compound were tested and top two hits presented  $IC_{50}$ s of 17.1 and 31.5  $\mu$ M for **lead1a** and **lead1b** respectively. Further the tight binding with the protein was biophysically confirmed by DSF. It was satisfying to see that the best inhibitory compound lead1a also showed a positive shift in DSF, indicating an increase in thermal stability of the inhibitor-protein complex that matched with its *in vitro* Mtb DHQase enzyme activity as well. These compounds were tested for antibacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv and for cytotoxicity against HEK293 cells. The MIC values for lead1a and lead1b were found to be 25  $\mu$ g/mL and 6.25  $\mu$ g/mL, respectively. Both compounds presented low cytotoxicity, with less than 15% of cell death at 100  $\mu$ M. Therefore, the structure-based pharmacophore modeling provided useful information required for proper understanding of the important structural and binding features for designing novel Mtb DHQase inhibitors. The present study thus reported two new molecules as prototypical leads uses against TB.

### **Acknowledgement**

This project was financially supported by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Ministry of Science, Technology and Innovation of Brazil.

## References

- [1] World Health Organization, Global Tuberculosis Control: Surveillance and Financing, WHO Report, 2012.
- [2] C. Abell in Enzymology and molecular biology of the shikimate pathway. In Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1 (Ed. Sankawa, U.), Elsevier, Amsterdam, 1999 pp. 573-607.
- [3] J. R. Coggins, C. Abell, L. B. Evans, M. Frederickson, D. A. Robinson, A. W. Roszak, A. P. Laphorn, Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design, *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31, 548-552.
- [4] F. Dosselaere, J. Vanderleyden, A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms, *Crit. Rev. Microbiol.* 2001, 27, 75-131.
- [5] F. Roberts, C. W. Roberts, J. J. Johnson, D. E. Kyle, T. Krell, J. R. Coggins, G. H. Coombs, W. K. Milhous, S. Tzipori, D. J. Ferguson, D. Chakrabarti, R. McLeod, Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites, *Nature* 1998, 393, 801-805.
- [6] J. Harris, C. Kleanthous, J. R. Coggins, A. R. Hawkins, C. Abell, Different mechanistic and stereochemical courses for the reactions catalysed by type II dehydroquinases, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1993, 13, 1080-1081.
- [7] E. Haslam in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, (Ed. Wiley and Sons) Chichester, UK, 1993
- [8] T. Parish, N. G. Stoker, The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiology* 2002, 48, 3069-3077.
- [9] D. G. Gourley, A. K. Shrive, I. Polikarpov, T. Krell, J. R. Coggins, A. R. Hawkins, N. W. Isaacs, L. Sawyer, The two types of 3-dehydroquinase have distinct structures but catalyze the same overall reaction, *Nat. Struct. Biol.* 1999, 6, 521-525.



- [10] M.V.B. Dias, W.C. Snee, K.M. Bromfield, R.J. Payne, S.K. Palaninathan, A. Ciulli, N.I. Howard, C. Abell, J.C. Sacchettini, T.L. Blundell. Structural investigation of inhibitor designs targeting 3-dehydroquinate dehydratase from the shikimate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*, *Biochem. J.* 2011, 436, 729-739.
- [11] Phase, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; ConfGen, version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012
- [12] Schrödinger Suite 2012 Protein Preparation Wizard; Epik version 2.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Impact version 5.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- [13] L. Tizón, J.M. Otero, V.F. Prazeres, A.L. Llamas-Saiz, G.C. Fox, M.J. van Raaij, H. Lamb, A.R. Hawkins, J.A. Ainsa, L. Castedo, C. González-Bello, A Prodrug Approach for Improving Antituberculosis Activity of Potent *Mycobacterium tuberculosis* Type II Dehydroquinase Inhibitors, *J. Med. Chem.* 2011, 54, 6063-6084.
- [14] S.L. Dixon, A.M. Smondyrev, E.H. Knoll, S.N. Rao, D.E. Shaw, R.A. Friesner, PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: methodology and preliminary results, *Comput. Aided Mol. Des.* 2006, 20, 647-671.
- [15] S.L. Dixon, A.M. Smondyrev, S.N. Rao, A novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching, *Chem. Biol. Drug Des.* 2006, 67, 370-372.
- [16] N.K. Salam, R. Nuti, W. Sherman, Novel method for generating structurebased pharmacophores using energetic analysis, *J. Chem. Inf. Model.* 2009, 49, 2356-2368.
- [17] LigPrep, version 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012 and ConfGen, version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- [18] R. Palakurti, D. Sriram, P. Yogeewari, R. Vadrevu1, Multiple e-pharmacophore modeling combined with high-throughput virtual screening and docking to identify potential inhibitors of  $\beta$ -secretase, *Mol. Inf.* 2013, 32, 385-398.

- [19] S. Nagamani, C. Kesavan, K. Muthusam, e-Pharmacophore mapping and docking studies on Vitamin D receptor (VDR), *Bioinformation*. 2012, 15, 705-710.
- [20] S.G. Franzblau, R.S. Witzig, J.C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M.T. Degnan, M.B. Cook, V.K. Quenzer, R.M. Ferguson, R.H. Gilman, Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay, *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 362.
- [21] D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. Immunol. Methods*. 1986, 94, 57-63.
- [22] V.U. Jeankumar, J. Renuka, P Santosh, V. Soni, J. P. Sridevi, P. Suryadevra. P. Yogeewari, D. Sriram, Thiazole-aminopiperidine hybrid analogues: design and synthesis of novel *Mycobacterium tuberculosis* GyrB inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 70, 140-153.
- [23] F.H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability, *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2212-2221.
- [24] V. Aparna, N. Mohanalakshmi, W. Hopper, Structure-based pharmacophore and virtual screening for bacterial MexB EffluxPump Inhibitors, International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics ( ICBBB 2011). 2011, 458-461.
- [25] O. Dror, D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, H.J.Wolfson, Novel approach for efficient pharmacophore-based virtual screening: method and applications, *J. Chem. Inf. Model*, 2009, 49, 2333-2343
- [26] V. Vyas, A. Jain, A. Jain, A. Gupta, Virtual screening a fast tool for drug design, *Sci. Pharm.* 2008, 76, 333-360.
- [27] Gold, Version 4.1.2, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK.

---

# Capítulo 5

---

Considerações finais

---

Apesar da vacina BCG e de todos os medicamentos disponíveis atualmente, a tuberculose ainda é um problema de saúde pública mundial. A tuberculose, ocasionada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, representa um grande problema de saúde global devido a sua alta taxa de incidência e prevalência. Apesar da diminuição de novos casos nos últimos anos, o surgimento de novas cepas resistentes tem tornado o quadro preocupante, haja vista que 3,7% (320.000) dos novos casos e 20% de casos tratados em 2011 foram diagnosticados como MDR (WHO, 2012) em contraste aos 30.000 casos de MDR diagnosticados em 2008 (WHO, 2010).

A pesquisa e o desenvolvimento de compostos mais efetivos contra a TB representam uma urgente necessidade à saúde pública mundial. O desenvolvimento de novos compostos mais efetivos contra a TB e que diminuam o período do tratamento é um campo de pesquisa extremamente importante para a saúde global a curto e longo prazo. O desenvolvimento racional de novas drogas tem como base o estudo dos mecanismos relacionados às enzimas candidatas a alvo molecular. Nesse contexto, as rotas metabólicas envolvidas em processos bioquímicos essenciais à viabilidade do bacilo compartilham inúmeros alvos potenciais para drogas.

Enzimas indispensáveis para a sobrevivência do bacilo, mas que são ausentes ou não se assemelham às enzimas presentes em humanos são alvos promissores para o desenho racional de inibidores. Na busca por uma enzima alvo, a via metabólica do chiquimato foi escolhida devido a sua essencialidade para a viabilidade do bacilo e a sua ausência no hospedeiro humano, sendo assim um promissor alvo seletivo (PARISH; STOKER, 2002). Essa via é utilizada na biossíntese de anéis aromáticos a partir de carboidratos precursores nos micro-organismos e nas plantas e envolve uma gama de transformações químicas, que, por meio de sete reações enzimáticas, fosfoenolpiruvato (PEP) e D-eritrose 4-fosfato (E4P) são condensadas em corismato (produto final), ponto em que a via se ramifica, dando origem a diversas vias terminais adicionais (BENTLEY, 1990).

Neste trabalho, foram estudadas duas enzimas da via metabólica do chiquimato, a 3-desidroquinato desidratase (DHQase) e a chiquimato 5-desidrogenase (SD). A DHQase é a terceira reação da via onde ocorre a

desidratação do desidroquinato (DHQ) em 3-desidrochiquimato (DHS), iniciando o processo de aromatização pela introdução da primeira das três ligações duplas. Os resultados obtidos nos estudos da DHQase, apresentados no **Capítulo 4**, foram reunidos em um manuscrito submetido à revista internacional *Journal of Molecular Graphics and Modelling* que possui um fator de impacto de 2,022.

Esses dados permitem que características exclusivas da enzima DHQase de *Mycobacterium tuberculosis* sejam exploradas no desenvolvimento de inibidores de ação seletiva. Utilizando recursos computacionais, com uma abordagem *e-pharmacophore* foi gerada uma lista de compostos potencialmente inibidores chamados *hits*. Além disso, foi realizada a clonagem, expressão e purificação dessa enzima, que posteriormente foi testada contra os inibidores encontrados. O composto com melhores resultados foi considerado o composto *lead*. Derivados químicos do composto *lead* foram testados quanto as suas atividades inibitórias frente à DHQase. Foram encontrados dois inibidores derivados químicos do composto *lead* com boa atividade inibitória contra essa enzima, além de valores de MIC e de citotoxicidade promissores.

A chiquimato desidrogenase é a quarta reação da via do ácido chiquímico realizando a redução do 3-desidrochiquimato (DHS) a chiquimato (SHK). Neste estudo, foi necessária a realização de uma abordagem diferente a da utilizada nos estudos com a DHQase. Devido à ausência de estrutura tridimensional depositada e à ausência de inibidores para a enzima de *Mycobacterium tuberculosis*, foi necessária a utilização de ferramentas computacionais para realizar a modelagem molecular antes dos ensaios de docagem.

Os resultados preliminares obtidos nos estudos da SD são apresentados no **Anexo I** e serão posteriormente submetidos para publicação. A modelagem molecular foi realizada e aprovada em diversos testes de validação, como o Ramachandram plot, ERRAT, Z-score e docagem com seus substratos. Após a obtenção do modelo, foram realizados estudos de docagem com uma biblioteca contendo 500.000 compostos. Essa análise gerou dezessete *hits* com possível atividade inibitória, com base em seus docagem scores, número de interações de hidrogênio, perfil de interação com aminoácidos no sitio ativo e GOLD score. Esses

compostos serão testados posteriormente na enzima, no bacilo e quanto a sua toxicidade.

Os resultados produzidos nesta tese permitiram a identificação de inibidores com ação seletiva tendo como alvo as enzimas MtbDhQase e MtbSD. Essas moléculas devem ser mais estudadas para determinar seu potencial como possíveis novos medicamentos contra a tuberculose.

Utilizando os compostos selecionados neste trabalho, devem ser realizados ensaios pré-clínicos e estudos farmacocinéticos para a identificação dos compostos ativos em modelos *in vivo* que serão submetidos a ensaios clínicos. Estes ensaios são necessários para a aprovação de um novo medicamento para o uso humano.

---

# Referências

---

Basso LA, Blanchard JS. Resistance to antitubercular drugs. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 456:115-144.

Bentley R. The shikimate pathway – A metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1990;25:307-84.

Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science.* 1992;257(5073):1055-64.

Blower SM, Chou T. Modelling the emergence of the 'hot zones': tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance. *Nat Med.* 2004;10:1111-1116.

Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83(1-3):91-97.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Reported tuberculosis in the United States, 2006. Atlanta. 2007.

Coggins JR, Abell C, Evans LB, Frederickson M, Robinson DA, Roszak AW, *et al.* Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:548-51.

Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WRJr. Tuberculosis and the tubercle bacillus. Washington, DC: ASM Press; 2005.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, *et al.* The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med.* 2003;163(9):1009-1021.

Dalla Costa ER, Osorio M, Cafrune P, Calderon R, Palaci P, Telles MA, *et al.* Analysis of Mutations in Genes Related to Isoniazid (INH) Resistance and spoligotyping in *M. tuberculosis* Isolates from different regions in South America. *BMC Microbiol.* 2009;19:1.

Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell.* 2009;136(1):37-49.

Diacon AH, Pym A, Grobusch M, Patientia R, Rustomjee R, Page-Shipp L, *et al.* The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med.* 2009; 360:2397–2405.

Dickson M, Gagnon JP. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:417-429.

Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the Magic Mountain: The rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med.* 2007;13:295-298.

Dormandy T. The White Death - A history of tuberculosis. New York: NY University Press; 2000.



Ducati RG, Basso LA, Santos DS. Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design. *Curr Drug Targets*. 2007;3:423-435.

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.

Duncan K. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83:201-207.

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*. 1999;282:677-686.

Dye C, Williams BG. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *National Academy of Sciences (US)*. 2000;97:8180-8185.

Elston JW, Thaker HK. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008;74(3):194-9.

Espinal MA. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83:44-51.

European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing *W* genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:736-743.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. Press Announcements. FDA approves first drug to treat multi-drug resistant tuberculosis. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333695.htm> (accessed 29/10/2014). 2012

Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):271-8.

Fonseca IO, Silva RG, Fernandes CL, Souza ON, Basso LA, Santos DS. Kinetic and chemical mechanisms of shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys*. 2007;457:123-133.

Gao Q, Kripke K, Arinc Z, Voskuil M, Small P. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004;84(3-4):188-96.

Gourley DG, Shrive AK, Polikarpov I, Krell T, Coggins JR, Hawkins AR, Isaacs NW, Sawyer L. The two types of 3-dehydroquinase gave distinct structures but catalyze the same overall reaction. *Nat Struct Biol*. 1999;6:521-525.

Harries AD, Dye C. Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100:415-431.

Heifets LB. Antimycobacterial drugs. *Semin Respir Infect*. 1994;9:84-103.

Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999;50:473-503.

Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1202–1205.

Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. A delicate dance: Host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(4):464-72.

Keshavjee S, Gelmanova IY, Pasechnikov AD, Mishustin SP, Andreev YG, Yedilbayev A, *et al.* Treating multidrug-resistant tuberculosis in Tomsk, Russia. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1136:1–11.

Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature.* 2011;469:483-90.

Kushner S, Dalalian H, Sanjurjo JL, Bach FL, Safir SR, Smith VK Jr, *et al.* Experimental chemotherapy of tuberculosis. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J Am Chem Soc.* 1952;74:3617-3621.

Lazzarini LCO, Spindola S, Bang H, Gibson AL, Weisenberg S, da Silva Carvalho W, *et al.* RDRio *Mycobacterium tuberculosis* is associated with higher frequency of cavitary pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2175-2183.

Lienhardt C, Glaziou P, Uplekar M, Lonnroth K, Getahun H, Raviglione M. Global tuberculosis control: Lessons learnt and future prospects. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:407-16.

Marais BJ, Victor TC, Hesselink AC, Barnard M, Jordaan A, Brittle W, *et al.* Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3539-3543.

Maxmen A. Drug development: A combined effort. *Nature.* 2013;502(7470):S4-6.

Middlebrook G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. *Am Rev Tuberc.* 1952;65:765-767.

Mitchison DA. Mechanism of drug action in short-course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis.* 1985;65:30-37.

Moore JD, Lamb HK, Garbe T, Servos S, Dougan G, Charles IG, *et al.* Inducible overproduction of the *Aspergillus nidulans* pentafunctional AROM protein and the type-I and -II 3-dehydroquinases from *Salmonella thyphi* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* 1992;287:173-181.

Morel CM, Acharya T, Broun D, Dangi A, Elias C, Ganguly NK, *et al.* Health innovation networks to help developing countries address neglected diseases. *Science.* 2005;309:401-404.

Nunn P. WHO Global TB Programme, Tuberculosis Research and Surveillance Unit of the WHO Global TB Programme; Press Release WHO/74 ([www.who.int/gtb/press/who74.htm](http://www.who.int/gtb/press/who74.htm)). 1997.

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:993-996.

Pablos-Méndez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bull World Health Organ.* 2002;80:489-495.

Palomino J, Leão S, Ritacco V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. Available from: <http://www.pneumo-iasi.ro/student/tuberculosis2007.pdf>.

Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 1998;6:107-112.

Parish T, Stoker NG. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 2002;148:3069–3077.

Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: Maintaining a balance. *Cell Host Microbe.* 2008;3(6):399-407.

Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:352-66.

Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79(1):3-29.

Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83:4-14.

Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, Kyle DE, Krell T, Coggins JR, *et al.* Evidence for shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature.* 1998;393:801-805.

Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry.* 2005;44:5561-5571.

Rosado LA. A enzima chiquimato quinase (EC 2.7.1.71) de *Mycobacterium tuberculosis* como alvo para o desenvolvimento de drogas [tese de doutorado]. Porto Alegre. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2013.

Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(8):569-77.

Schatz A, Bugie E, Waksman SA Streptomycin, a substrate exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1944;55:66.

Singh JA, Upshur R, Padayatchi N. XDR-TB in South Africa: No time for denial or complacency. *PLoS Med.* 2007;4(1):e50.

WHO - World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: Third Global Report. Geneva. 2004.

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report. Geneva. 2011.

WHO - World Health Organization, Global Tuberculosis Control: WHO Report. Geneva. 2013.

WHO - World Health Organization, Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing. WHO Report. Geneva. 2008.

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control: A short update to the 2009 Report. Geneva; 2010.

WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva; 2012.

WHO - World Health Organization. Treatment of Tuberculosis: Guidelines for national programmes. Geneva. 2003.

Yew WW, Leung CC. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. *Respirology.* 2008;13(1):21-46.

Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(5):388-404.

---

# Anexo I

---

Resultados preliminares obtidos  
com a enzima MtbSD

---

## Introdução

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) o agente etiológico da tuberculose (TB) sobrevive no hospedeiro humano durante décadas iludindo o sistema imunológico em um estado latente ou persistente. (SAXENA, 2014, 1) O Mtb ressurgiu sob uma forma mais virulenta resistente a medicamentos; com as cepas recentemente identificadas como extensivamente resistente (XDR-TB), tornando-se resistente a maior parte do regime atualmente disponíveis drogas anti-tuberculose. (SAXENA, 2014, 2) De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), cerca de dois bilhões de pessoas estão infectadas de forma latente e cerca de 10% dessas pessoas poderão desenvolver a doença ativa durante a sua vida. Devido ao aparecimento de tuberculose multirresistente (MDR-TB) e XDR-TB, alta incidência de HIV/TB e falta de novas drogas anti-tuberculose, a OMS declarou a tuberculose como uma emergência de saúde global (WHO, 2012).

Novos agentes farmacêuticos são necessários para controlar a tuberculose devido ao aumento da incidência de MDR-TB e XDR-TB, que representam um importante problema de saúde pública em todo o mundo. (SAXENA, 2014, 2) Utilizar, como alvo, vias metabólicas essenciais de microrganismos e ausentes em seres humanos é uma estratégia atrativa para o desenvolvimento de novas terapias. A via do chiquimato produz um precursor importante de compostos aromáticos em bactérias, fungos, plantas e parasitas Apicomplexa (ABELL, 1999; COGGINS, 2003; DOSSELAIRE, 2001; ROBERTS, 1998).

A via compreende sete enzimas que catalisam, separadamente, passos que convertem eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato em corismato, o precursor para a síntese de aminoácidos aromáticos, ácido fólico, ubiquinonas, e muitos outros compostos aromáticos (ABELL, 1999; HARRIS, 1993; HASLAM, 1993). A via do chiquimato mostrou-se essencial para a sobrevivência Mtb como relatado a partir de estudos de interrupção gênica. (PARISH; STOKER, 2002)

A quarta reação da via do chiquimato é a enzima chiquimato desidrogenase (SD), (EC 1.1.1.25) codificada pelo gene *aroE* em Mtb, catalisando a redução reversível de 3-desidrochiquimato (DHS) em chiquimato (SHK) na presença de NADPH como o doador de hidreto (BENTLEY, 1990) O presente estudo envolveu modelagem molecular de MtbSD, triagem virtual de um banco de dados de

pequenas moléculas para a descoberta de potenciais inibidores para esta enzima, assim como a clonagem, expressão e purificação da enzima recombinante para ensaios in vitro.

## **Métodos**

### **Detalhes Computacionais**

Todos os estudos computacionais foram realizados em um processador Intel Core 2 Duo E7400 2.80 GHz, com memória de 2 GB RAM rodando com sistema operacional RHEL 5.2. O ligante foi refinado utilizando a opção "refine" em Glide, e a opção de saída Glide XP (v. 5.7 Glide, Schrodinger, LLC, New York, NY). Para os cálculos de refinamento e de docagem, foram utilizadas as configurações padrão disponíveis no pacote de software.

### **Superexpressão e liberação de MtbSD**

O plasmídeo recombinante pET23a(+):*aroE* foi transformado em células hospedeiras *E. coli* BL21 (DE3) através de eletroporação, e selecionados em placas de ágar LB contendo 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  carbenicilina. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular 14 L de meio LB contendo 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  carbenicilina sem adição de isopropil-BD-tiogalactopiranosídeo (IPTG), e cultivadas durante 24 h a 37° C a 180 rpm, como descrito por MAGALHÃES et al. (MAGALHAES, 2002). As células (49 g) foram colhidas por centrifugação a 14,900g durante 30 min a 4° C, e armazenadas a -20° C. As células que expressaram MtbSD recombinante foram colocados em recipientes de metal para permitir o rápido equilíbrio de temperatura necessário para aumentar a eficiência de ruptura celular pelo método de congelamento/descongelamento (MAGALHAES, 2002). A pasta celular foi colocada num banho de gelo seco e etanol durante 2 min e imediatamente transferido para um banho de água gelada por não mais do que 8 minutos; este ciclo foi repetido 10 vezes. As células foram dissolvidas em 196 mL de 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 (tampão A). Após incubação da mistura durante 30 min em gelo, os restos celulares foram removidos por centrifugação (48,000g durante 1 hora) e o sobrenadante contendo MtbSD solúvel foi recolhido (FONSECA, 2007).

## Purificação da MtbSD recombinante

O protocolo de purificação foi estabelecido por FONSECA et al. (FONSECA, 2007). Todos os passos do protocolo de purificação da MtbSD recombinante foram realizadas em gelo ou a 4° C. O sobrenadante contendo MtbSD solúvel foi incubado com 1% de sulfato de estreptomicina, durante 30 min e centrifugado a 48,000g durante 30 min. O sobrenadante foi dialisado duas vezes contra o tampão A, utilizando um tubo de diálise com limite de exclusão de peso molecular de 6000-8000 Da. A amostra foi clarificada por centrifugação (48,000g durante 30 min) e carregado em uma coluna Q-Sepharose Fast Flow (26 centímetros x 9,5 cm) (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão A e o material absorvido foi eluído com um gradiente linear (0-100%) com 20 volumes de 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,5 M de NaCl (tampão B) na coluna 1 mL.min<sup>-1</sup>.

As frações contendo MtbSD foram reunidas (55 ml), sulfato de amônio foi adicionado em uma concentração final de 1 M e clarificadas por centrifugação (48,000g durante 30 min). O sobrenadante foi carregado em uma coluna Phenil-Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (tampão C). A coluna foi lavada com 5 volumes de coluna de tampão C e as proteínas ligadas foram eluídas em um gradiente linear de 20 volumes de coluna (0-100%) de tampão A, a 1 mL.min<sup>-1</sup>. As frações contendo MtbSD foram reunidas (43 ml), concentradas a menos de 4 ml usando ultrafiltração (Amicon MWCO 10000 Da), e carregado em uma coluna Sephacryl S-200 (26 x 60 cm) (Amersham Biosciences) equilibrada previamente com tampão A.

A proteína MtbSD recombinante foi eluída num volume total de 29 ml a uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, e carregado em uma coluna de troca aniônica Mono-Q (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A e o material adsorvido pela coluna foi eluído com um gradiente linear de 20 volumes de coluna (0-100%) de tampão B a 1 mL.min<sup>-1</sup>. Perfis de eluição foram seguidos a 280 e 215 nm. MtbSD homogênea foi eluída num volume total de 12,5 ml e armazenada a -20° C. A purificação da proteína foi monitorizada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), e a concentração de proteína foi



determinada pelo método de Bradford et al. (BRADFORD, 1976) utilizando o kit de Bio-Rad de ensaio proteico (Bio-Rad) e albumina de soro bovino como padrão.

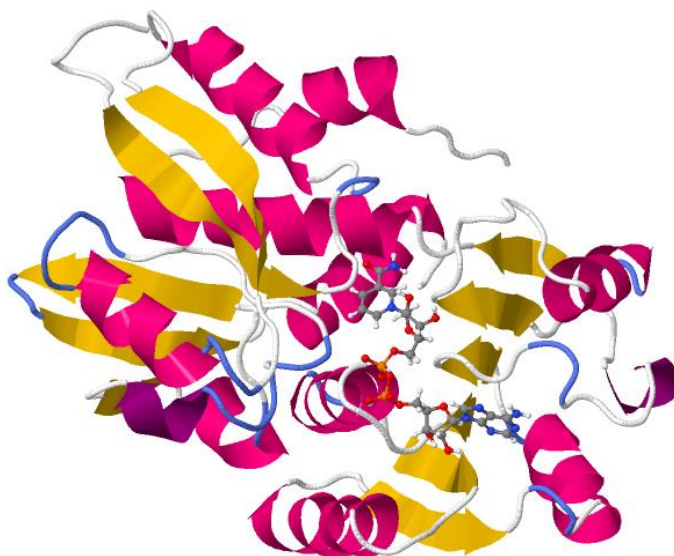
### **Modelagem molecular**

Uma vez que nenhuma estrutura de MtbSD estava disponível no PDB, foi realizado a modelagem molecular usando chiquimato desidrogenase de *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* como molde (código PDB: 3T4E). A proteína apresentou 30% de identidade e 92% de *query cover*. Todos os dados foram processados no pacote de software Maestro 9,3 (Schrodinger, LLC). Após o alinhamento, a proteína foi preparada e validada usando Ramachandram Plot (LOVEL, 2002), z-score (WIEDERSTEIN, 2007; SIPPL, 1993) e ERRAT (COLOVOS 1993). Pesquisa por cavidades foi realizada para encontrar o sítio ativo para SKM e NADH seguido da docagem com os compostos em cada cavidade encontrada. A cavidade que apresentou maior pontuação de docagem para SKM e NADH foi utilizada para o HTVS (High Throughput Screening Virtual), SP (standard precision) e Glide XP (extra precision). As moléculas obtidas a partir da análise por Glide XP foram ainda avaliadas pelo GOLD 4.1.2 (genetic algorithm based ligand docking) (GOLD). A base de dados Asinex contendo 500000 moléculas únicas foi utilizado neste estudo.

## **Resultados**

### **Modelagem molecular**

O modelo proposto apresentou resultados satisfatórios em todos os estudos de validação. A análise de Ramachandram Plot mostrou 94,3% na região favorável, 4,2% na região permitida e 1,5% de *outliers* (HIS 36, HIS 19 e HIS 99). O valor de ERRAT foi de 90,94 e o z-score -7,54, mostrando boa qualidade no modelo gerado.



**Figura 1.** Estrutura proposta de MtbSD depois de modelagem molecular e validação.

### **Validação de cavidade**

A pesquisa de cavidade revelou quatro cavidades que poderiam representar o sítio ativo da proteína. SKM e NADH foram docados em todas as quatro cavidades. O sítio que apresentou melhor valor de docagem (-9,518 para SKM e -6,075 para NADH) foi escolhido para estudos de docagem com a base de dados Asinex.

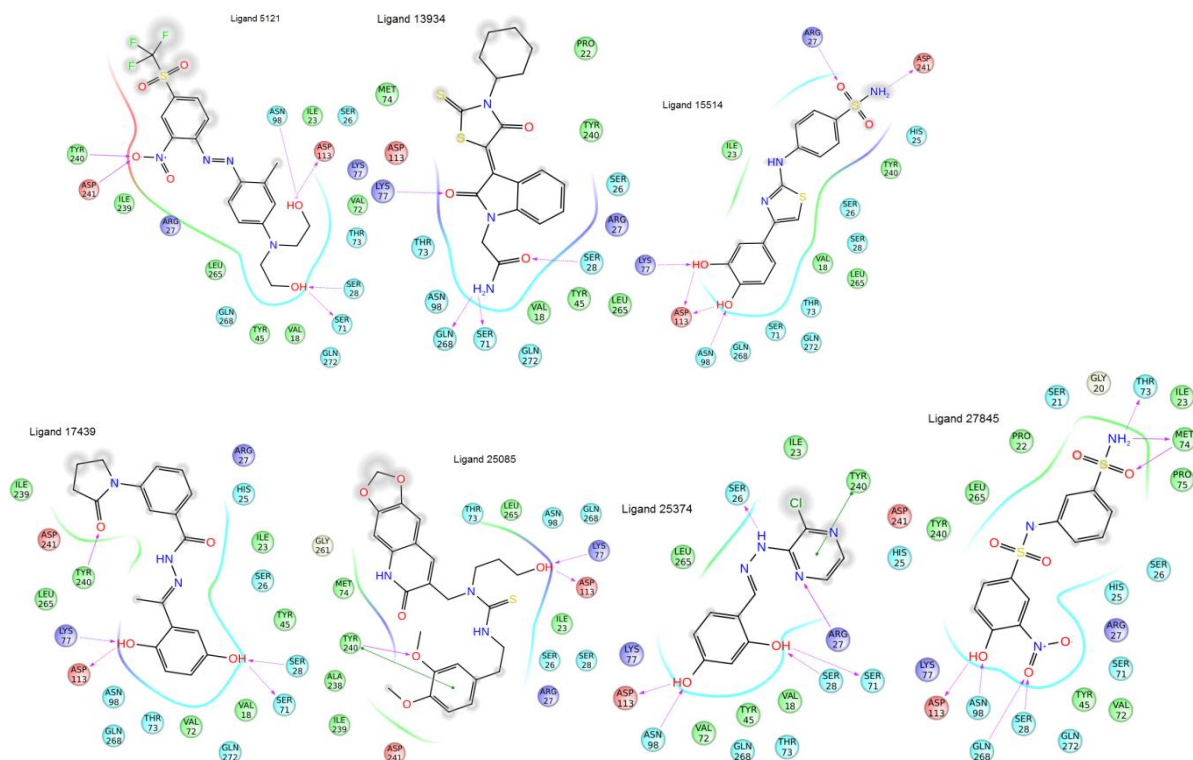
### **Estudos de docagem**

O objetivo básico de qualquer protocolo de triagem virtual é reduzir a enorme quantidade de moléculas para um número gerenciável de compostos que possam inibir a proteína com maior chance, de modo a identificar uma droga candidata (VYAS 2008). As opções de triagem virtuais, HTVS (High Throughput Screening Virtual), SP (standard precision) e Glide XP (extra precision) foram executadas. Os Principais sucessos de HTVS, resultando em uma pontuação de  $\geq -6,0 \text{ kcal mol}^{-1}$  foram submetidos a uma nova rodada de docagem por Glide SP. Os remanescentes destas etapas preliminares de triagem foram testados com a docagem em Glide XP. Os resultados dos ligantes após a triagem virtual ajudaram a encontrar exatamente as interações de hidrogênio, interação eletrostática, interações hidrofóbicas, e interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking*.

Dezessete compostos foram selecionados com base na pontuação de docagem, o número de ligações de hidrogênio, GOLD score e interação com os resíduos de aminoácidos apresentados no sítio ativo.

Tabela 1. Melhores compostos encontrados como possíveis inibidores para MtbSD após ensaios de docagem

Ligand	Docking score	Interactions	HBond	GoldScore
25374	-7,514	ASN 98, ASP 113, SER 28, SER 71, ARG 27, TYR 240, SER 26	7	48,26
17439	-7,382	SER 71, SER 28, ASP 113, LYS 77, TYR 240	5	60,34
98665	-7,238	SER 28, LYS 77, ASP 113, ARG 27, SER 26	5	48,69
49548	-6,764	LYS 77, SER 71, GLN 268, ARG 27, ASP 241, TYR 240	6	55,5
5121	-6,742	ASP 113, ASN 98, SER 28, SER 71, ASP 241, TYR 240	6	62,86
27845	-6,642	ASN 98, ASP 113, GLN 268, SER 28, THR 73, MET 74	6	61,85
65740	-7,048	SER 26, SER 71, SER 28, ASN 98, ASP 113	5	51,88
84402	-6,829	ASP 113, LYS 77, SER 28, TYR 240	4	48,27
88244	-6,786	SER 28, LYS 77, ASP 113, ASP 241, TYR 240	5	54,64
74467	-6,533	TYR 240, ARG 27, ASN 98, HIS 25	5	61,58
13934	-6,501	SER 28, LYS 77, SER 71, GLN 268	5	56,15
15514	-9,584	LYS 77, ASP 113, ASN 98, ARG 27, ASP 241	6	46,95
72028	-7,488	SER 28, SER 26, ARG 27, LYS 77, TYR 240, ASP 241	4	52,29
49457	-7,006	ASP 113, ASN 98, TYR 240, ASP 241	4	59,35
56005	-6,550	TYR 240, ASP 241, LYS 77, ASP 113	5	54,62
25085	-7,347	ASN 98, ASP 113,	4	72,05
89147	-7,173	GLN 268, ASN 98, ASP 113, LYS 77, SER 26	5	71,89



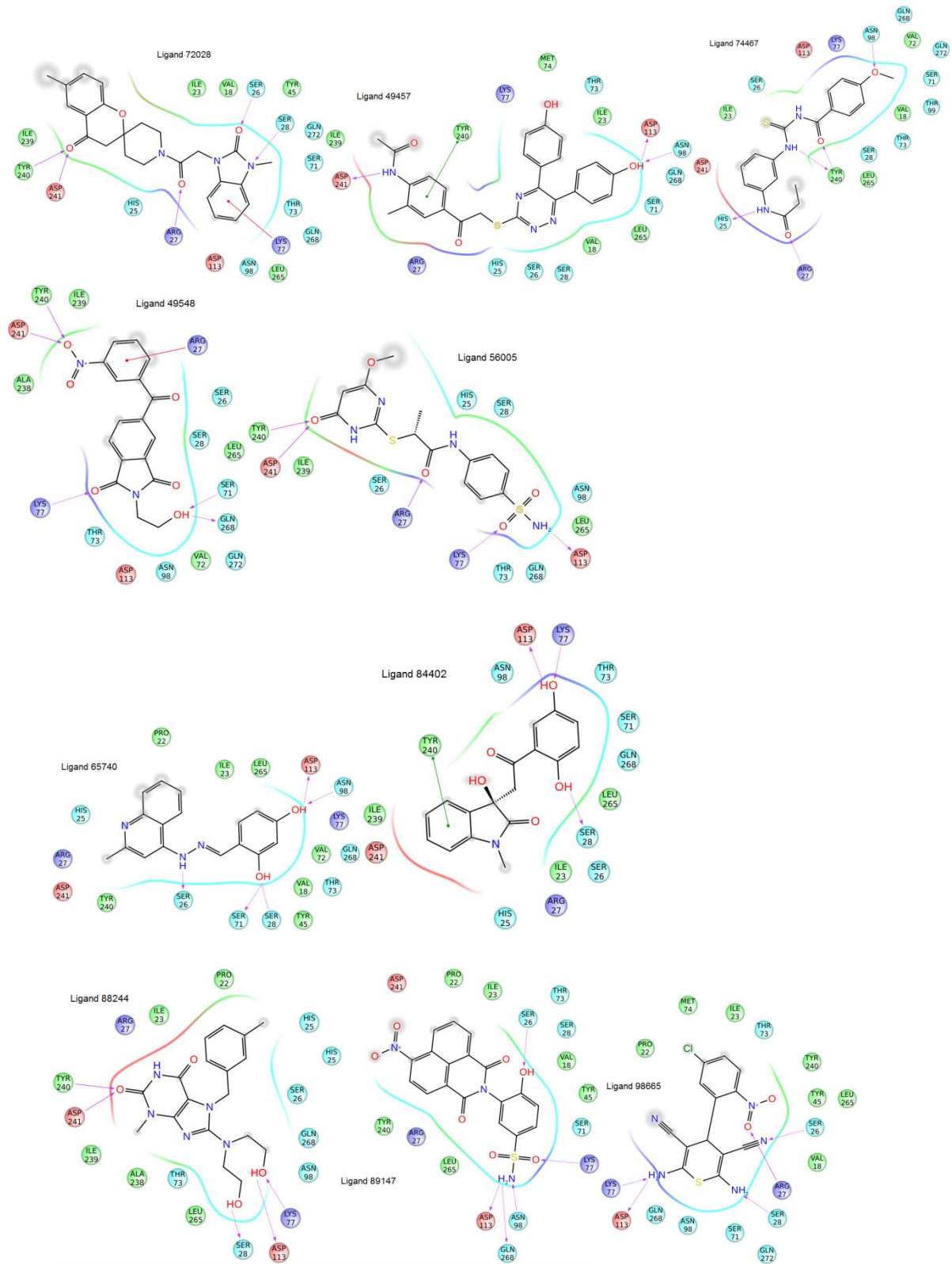


Figura 2. Estrutura química e padrão de interação de ligantes selecionados.

## Conclusão

O modelo 3D proposto para a chiquimato desidrogenase de Mtb necessário para os estudos de docagem foi atingido com grandes pontuações em todos os testes de validação realizados. O estudo de docagem apresentou dezessete possíveis inibidores para chiquimato desidrogenase de *Mycobacterium tuberculosis*. Todos os compostos apresentaram boa pontuação de docagem ( $\geq -6,0$  kcal mol<sup>-1</sup>), mais de quatro ligações de hidrogênio e uma boa pontuação GOLD ( $\geq 45,0$ ). Todos os dezessete compostos apresentaram boa interação com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo, que mostra que estes podem ser considerados como possíveis novos inibidores para esta enzima.

## References

- S. Saxena, J.Renuka, P. Yogeewari, D. Sriram. Discovery of Novel Mycobacterial DNA Gyrase B Inhibitors: *In Silico* and *In Vitro* Biological Evaluation. *Mol. Inf.* 33 (2014) 597 – 609. (1)
- S. Saxena, P.B. Devi, V. Soni, P. Yogeewari, D. Sriram. Identification of novel inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* l-alanine dehydrogenase (MTB-AlaDH) through structure-based virtual screening. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 47 (2014) 37-43. (2)
- World Health Organization, Global Tuberculosis Control: Surveillance and Financing, WHO Report, 2012.
- C. Abell in *Enzymology and molecular biology of the shikimate pathway*. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1 (Ed. Sankawa, U.), Elsevier, Amsterdam, 1999. 573-607.
- J.R. Coggins, C.Abell, L. B. Evans, M. Frederickson, D.A. Robinson, A.W. Roszak, A.P. Laphorn. Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 548-552.
- F. Dosselaere, J. Vanderleyden. A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 27 (2001) 75-131.
- F. Roberts, C.W. Roberts, J.J. Johnson, D.E. Kyle, T. Krell, J.R. Coggins, G.H. Coombs, W.K. Milhous, S. Tzipori, D.J. Ferguson, D. Chakrabarti, R. McLeod. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature.* 393 (1998) 801-805.
- J. Harris, C. Kleanthous, J.R. Coggins, A.R. Hawkins, C. Abell. Different mechanistic and stereochemical courses for the reactions catalysed by type II dehydroquinases, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 13 (1993) 1080-1081.
- E. Haslam in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, (Ed. Wiley and Sons) Chichester, UK, 1993
- T. Parish, N.G. Stoker, The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiology.* 48 (2002) 3069-3077.
- R. Bentley. The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (1990) 307–384.
- M.L. Magalhães, C.P. Pereira, L.A. Basso, D.S. Santos. Cloning and overexpression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expr Purif.* 26 (2002) 59–64.
- I.O. Fonseca, M.L.B. Magalhães, J.S. Oliveira, R.G. Silva, M.A. Mendes, M.S. Palma, D.S. Santos, L.A. Basso. Functional shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Purification and characterization. *Protein Expr Purif.* 46 (2006) 429–437.

U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (1970) 680–685.

M.M. Bradford, R.A. McRorie, W.L. Williams. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.

S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson and D.C. Richardson. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. 50 (2002) 437-450.

M. Wiederstein, M.J. Sippl. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*. 35 (2007) W407-W410.

M.J. Sippl. Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Proteins*. 17 (1993) 355-362.

C. Colovos, T.O. Yeates. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2(9) (1993) 1511-9.

Gold, Version 4.1.2, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK.

V. Vyas, A. Jain, A. Jain, A. Gupta Virtual screening a fast tool for drug design. *Sci Pharm.* 76 (2008) 333–360.

---

# Anexo II

---

Biochemical characterization  
of recombinant nucleoside  
hydrolase from *Mycobacterium  
tuberculosis* H37Rv

---





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabbi](http://www.elsevier.com/locate/yabbi)

## Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv



Priscila Lamb Wink<sup>a,b</sup>, Zilpa Adriana Sanchez Quitian<sup>a,b</sup>, Leonardo Astolfi Rosado<sup>a,b</sup>,  
Valnes da Silva Rodrigues Júnior<sup>a</sup>, Guilherme Oliveira Petersen<sup>a,b</sup>, Daniel Macedo Lorenzini<sup>a</sup>,  
Thiago Lipinski-Paes<sup>c</sup>, Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers<sup>a,c</sup>, Osmar Norberto de Souza<sup>b,c</sup>,  
Luiz Augusto Basso<sup>a,b,\*</sup>, Diogenes Santiago Santos<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92-A Av. Ipiranga, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Faculdade de Informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

---

# Anexo III

---

Production of recombinant  
human annexin V by fed-batch  
cultivation

---

**RESEARCH ARTICLE****Open Access**

# Production of recombinant human annexin V by fed-batch cultivation

Laura S Marder<sup>1,2†</sup>, Juleane Lunardi<sup>2,4†</sup>, Gaby Renard<sup>4</sup>, Diana C Rostirolla<sup>1,3</sup>, Guilherme O Petersen<sup>1,2,4</sup>, José E S Nunes<sup>4</sup>, Ana Paula D de Souza<sup>5</sup>, Ana Christina de O Dias<sup>4</sup>, Joicelei M Chies<sup>4</sup>, Luiz A Basso<sup>1,2,3</sup>, Diógenes S Santos<sup>1,2,3</sup> and Cristiano V Bizarro<sup>1,2\*</sup>

---

# Anexo IV

---

Human uridine phosphorylase-1 inhibitors: a new approach to ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis

---

## **Human uridine phosphorylase-1 inhibitors: a new approach to ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis**

**Daiana Renck · André A. Santos Jr · Pablo Machado ·  
Guilherme O. Petersen · Tiago G. Lopes ·  
Diógenes S. Santos · Maria M. Campos · Luiz A. Basso**

Received: 20 May 2014 / Accepted: 11 July 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014