

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Planejamento de novos inibidores da ecto-5' nucleotidase (CD73), como potenciais antitumorais**

Luciano Porto Kagami

Porto Alegre, 2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Planejamento de novos inibidores da ecto-5' nucleotidase (CD73), como potenciais antitumorais**

**Tese de doutorado apresentada por**  
**Luciano Porto Kagami para obtenção do GRAU DE**  
**TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador (a): Profa. Dr. Vera Lucia Eifler-Lima**

**Porto Alegre, 2022**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 04.03.2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann (UFRGS) – Suplente

Profa. Dra. Aline Rigon Zimmer (UFRGS)

Prof. Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna (UFRRJ)

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula (Unipampa)

### CIP - Catalogação na Publicação

Kagami, Luciano Porto  
Planejamento de novos inibidores da  
ecto-5' nucleotidase (CD73), como potenciais  
antitumorais / Luciano Porto Kagami. -- 2022.  
199 f.  
Orientador: Vera Lucia Eifler-Lima.

Coorientador: Liliana Rockenbach.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2022.

1. Câncer de bexiga. 2. Ecto-5' nucleotidase. 3.  
Triagem virtual. 4. Cumarinas. 5.  
Dihidropirimidinonas. I. Eifler-Lima, Vera Lucia,  
orient. II. Rockenbach, Liliana, coorient. III.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal – LaSOM® (UFRGS), no Laboratório 22 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, no Laboratório K-206 do Instituto de Química (UFRGS) e no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (UNIPAMPA).



*" Imparare non stanca mai la mente,  
non rende timorosi e non crea rimpianti. "*

**Leonardo da Vinci**



## DEDICATÓRIA

---

À minha esposa Liangela, a minha mãe Sonia e ao meu Pai Michio (*In memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

---

À Deus, por me conceder esta oportunidade que sempre desejei;

À minha esposa Liangela e minha mãe Sonia, por tudo que fizeram e fazem por mim;

Ao meu amigo, colega e professor Gustavo, por dividir seus mais diversos conhecimentos e oportunidades de crescimento comigo;

À minha orientadora Vera Lucia Eifler-Lima pela oportunidade, recepção e entendimento à minha disponibilidade de tempo, assim como pela orientação ao presente trabalho;

À minha coorientadora Professora Dra. Ana Maria Oliveira Battastini, que sem hesitar aceitou mais uma vez co-orientar o meu trabalho. Além de dividir o seu vasto conhecimento na enzima alvo deste trabalho;

Aos meus colegas Guilherme e Adriano, pois sem eles os compostos não sairiam do papel e não teríamos muitas das avaliações *in vitro*;

Aos colegas do Laboratório 22 Alisson e a Amanda os quais foram fundamentais para os testes biológicos;

Ao meu colega Itamar por dividir os seus conhecimentos e seus compostos;

Ao professor Rômulo Faria Santos Canto da UFCSPA por suas avaliações e sugestões sempre pertinentes;

Ao professor Fabrício Figueiró e seus alunos, pela colaboração no presente trabalho, bem como as relevantes discussões. À professora Solange Garcia e seus alunos, pela colaboração nos ensaios envolvendo a avaliação da atividade toxicológicas em células dos compostos sintetizados. À professora Daiana Avila da UNIPAMPA e a sua aluna Aline pelos ensaios no modelo *C.elegans* e discussão dos resultados;

À nossa grande pós-doc Gabriela Goethel, por sempre estar presente e ajudar nos mais diversos contextos;

Aos meus colegas de laboratório João, Maristela, Felipe e Pablo pela disponibilidade a novos desafios e pelos momentos de descontração;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilização de infraestrutura, acesso às bases de dados de periódicos, e profissionais qualificados com os quais tive contato durante a pós-graduação;

## RESUMO

---

No Brasil, o câncer de bexiga é a oitava neoplasia mais incidente entre os homens. Estudos anteriores mostraram que a inibição da ecto-5'-nucleotidase (CD73), levou a uma redução significativa da proliferação de células de câncer de bexiga T24, além disso, outros estudos em células uroteliais de camundongo mostraram que a enzima CD73 é superexpressa somente em células malignas, tornando-se também um possível alvo seletivo. Nesta tese foram utilizadas uma série de ferramentas virtuais para elucidar os mecanismos envolvidos na captação de ligantes, bem como os bolsões disponíveis para interação na ecto-5'-nucleotidase. Os movimentos de abertura de fechamento, além do posicionamento peculiar de duas fenilalaninas (Phe500 e Phe417) fazem desta enzima uma máquina de capturar AMP. A quimioteca do LaSOM forneceu duas coleções de compostos para o estudo: cumarinas e dihidropirimidinonas (DHPMs). Desta forma, uma série de 152 cumarinas foram triadas virtualmente por métodos previamente validados onde foram selecionados o LaSOM 366 e o LaSOM 191 como ligantes, o que não foi confirmado no ensaio enzimático nas condições empregadas. A coleção de DHPMs investigada revelou o LaSOM 335 com inibição *in vitro* contra células de câncer de bexiga T24 ( $IC_{50}=10,7\mu M$ ). A análise *in silico* mostrou afinidade com a CD73 e as principais interações foram entre os fragmentos 3-nitrobenzeno e o resíduo Arg395, anel dihiropirimidinona com as fenilalaninas Phe500 e Phe417, e o anel aromático em N1 com o bolsão hidrofóbico do sítio ortostérico, que estabiliza o complexo formado. Estes estudos *in silico* foram ratificados com o ensaio enzimático, no qual o LaSOM 335 apresentou  $IC_{50}=136,5\mu M$ . Soma-se que esta DHPM apresentou inibição do gene *let-60* na cepa MT4244 de *Caenorhabditis elegans*, este gene é associado à codificação do gene *Ras* e a sua inibição diminui a adesão e migração do tumor. A análise do perfil toxicológico através de modelos *in vivo* (*C. elegans*) e *in silico* mostrou um composto com baixa toxicidade, concordando com dados anteriores do nosso grupo de pesquisa com as DHPMs. O conjunto de dados revelam que o LaSOM 335 é um candidato a potencial protótipo antitumoral. A possibilidade de atuar por no mínimo dois mecanismos de ação distintos devem ser investigados, principalmente a ação inibitória sobre a CD73.

**Palavras-chave:** Câncer de bexiga; Ecto-5'-nucleotidase; CD73; Triagem virtual; Dinâmica molecular, *Structure Based Virtual Screening*, Cumarinas; Dihidropirimidinonas; LaSOM 335; *Caenorhabditis elegans*;



## ABSTRACT

---

### Design of new ecto-5'-nucleotidase (cd73) inhibitors as potential antitumor

In Brazil, bladder cancer is the eighth most frequent neoplasm among men. Previous studies showed that the ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibition led to a significant reduction in the T24 bladder cancer cells proliferation, furthermore, other studies in mouse urothelial cells showed that the CD73 enzyme is overexpressed only in malignant cells, becoming also a possible selective target. In this work, a series of virtual tools were used to elucidate the mechanisms involved in the ligands uptake, as well as the available pockets for interaction in the ecto-5'-nucleotidase. The opening and closing movements, and the peculiar positioning of two phenylalanines (Phe500 and Phe417) make this enzyme a perfect machine to catch AMP molecules. The LaSOM library provided two scaffold of compounds for the study: coumarins and dihydropyrimidinones (DHPMs). Thus, a series of 152 coumarins were virtually screened by previously validated methods where LaSOM 366 and LaSOM 191 were selected as ligands. On the other hand, the activity was not confirmed in the enzymatic assay, under the used conditions. The investigated DHPMs collection revealed LaSOM 335 with *in vitro* inhibition against T24 bladder cancer cells ( $IC_{50}=10.7\mu M$ ). The *in silico* analysis showed affinity with CD73 and the LaSOM 335. The LaSOM 335 main interactions were between the 3-nitrobenzene fragments and the Arg395 residue, the dihydropyrimidinone ring and the phenylalanines Phe500 and Phe417, and the aromatic ring in N1 and the hydrophobic orthosteric site pocket, which stabilizes the complex formed. These *in silico* studies were confirmed with the enzymatic assay, in which LaSOM 335 presented  $IC_{50}=136.5\mu M$ . In addition, this DHPM showed inhibition of the *let-60* gene in the MT4244 strain of *C. elegans*. The *let-60* gene is associated with the *Ras* gene coding. The *Ras* gene sinalization inhibition decreases tumor adhesion and migration. Analysis of the toxicological profile through *in vivo* (*C. elegans*) and *in silico* models showed a compound with low toxicity, corroborating previous data from our research group with DHPMs. The dataset reveals that LaSOM 335 is a candidate for a potential antitumor prototype. The possibility of acting by at least two distinct mechanisms of action should be investigated, mainly the inhibitory action on CD73.

**Keywords:** Bladder cancer; Ecto-5'nucleotidase; CD73; Virtual screening; molecular dynamics, Structure Based Virtual Screening, coumarins; dihydropyrimidinones; LaSOM 335; *Caenorhabditis elegans*;

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Fármacos de escolha para o tratamento do câncer de bexiga. ....	32
<b>Figura 2.</b> Modelo tridimensional da CD73. ....	34
<b>Figura 3.</b> Esquema do reconhecimento do AMP na conformação aberta da CD73. ....	35
<b>Figura 4.</b> Rota do mecanismo da CD73 (PERROT et al., 2019). ....	36
<b>Figura 5.</b> Derivados do AMPCP ligantes da CD73. ....	38
<b>Figura 6.</b> Scaffolds publicados com atividade de inibição da CD73. ....	39
<b>Figura 7.</b> Cumarinas com atividade antitumoral. ....	40
<b>Figura 8.</b> Cumarinas da literatura com atividade inibitória da CD73, com valores de IC50 inferior a 2µM. ....	41
<b>Figura 9.</b> Estrutura da varfarina <b>28</b> . ....	41
<b>Figura 10.</b> Esquema da síntese de 4-metilcumarinas <i>via</i> Pechmann otimizada no LaSOM. ....	42
<b>Figura 11.</b> Representação da sobreposição entre os anéis da adenina <b>29</b> e da cumarina <b>30</b> . ....	42
<b>Figura 12.</b> Estrutura do Monastrol <b>31</b> e do LaSOM 63 <b>32</b> . ....	43
<b>Figura 13.</b> DHPMs com atividade em linhagens T24 (câncer de bexiga). LaSOM 299 <b>33</b> , LaSOM 302 <b>34</b> e LaSOM 307 <b>35</b> . ....	44
<b>Figura 14.</b> Esquema da síntese das DHPMs N1-arilas. ....	44
<b>Figura 15.</b> Compostos inibidores da CD73 com sistema bicíclico aromático em vermelho. ....	93
<b>Figura 16.</b> Diversidade química das cumarinas do LaSOM. ....	94
<b>Figura 17.</b> Cluster de ligação do anel cumarina, mostrando que o sítio ortostérico é o favorito para a interação. ....	97
<b>Figura 18.</b> Compostos <b>26</b> e <b>27</b> . ....	98
<b>Figura 19.</b> Sobreposição da conformação do AMPCP após docking, com a sua conformação obtida pela cristalografia do complexo - estrutura PDB-ID: 4h2i. ....	99
<b>Figura 20. A)</b> Hot spots da imagem negativa do sítio catalítico da CD73 gerada pelo programa Phanter sobre a superfície da enzima. <b>B)</b> Superfície eletrostática dos hot spots gerado pelo programa Visual Studio Visualizer. ....	101
<b>Figura 21.</b> Gráfico da sensibilidade por 1-especificidade. A linha tracejada limita a recuperação dos compostos ativos obtidos ao acaso. ....	102
<b>Figura 22.</b> Esquema de obtenção do híbrido ácido sulfanílico-cumarina. ....	109

<b>Figura 23.</b> Resultado do blind docking para o ácido sulfanílico. A região circulada mostra a localização do principal cluster. Em vermelho, as fenilalaninas 500 e 417.....	110
<b>Figura 24.</b> Esquema de obtenção do híbrido taurina-cumarina .....	110
<b>Figura 25.</b> Resultado do blind docking. A região circulada mostra a localização do cluster. Em vermelho, as fenilalaninas 500 e 417. ....	111
<b>Figura 26.</b> Pose obtida pelo Autodock Vina para o LaSOM 372 no receptor PDB-ID 4H2I	111
<b>Figura 27.</b> Distância entre os centroides calculados, utilizando o programa Discovery Studio Visualizer, para os átomos do grupo fosfato e do anel purina em <b>A</b> e para os átomos do grupo ácido sulfônico e do anel cumarina em <b>B</b> . ....	112
<b>Figura 28.</b> Gráfico dos estados de protonação da taurina para diferentes valores de pH ..	114
<b>Figura 29.</b> Pose do LaSOM 366 no sítio ortostérico da CD73 (PDB-ID: 4h2i) .....	115
<b>Figura 30.</b> Pose do LaSOM 191 no sítio ortostérico da CD73 (PDB-ID: 4h2i) .....	116
<b>Figura 31.</b> Gráfico dos estados de protonação do LaSOM 372 para diferentes valores de pH .....	117
<b>Figura 32.</b> Cluster de ligação do LaSOM 372, mostrando os bolsões de predileção para este composto. ....	118
<b>Figura 33.</b> LaSOM 65 <b>162</b> .....	120
<b>Figura 34.</b> DHPMs ligantes da cinesina Eg5.....	121
<b>Figura 35.</b> Estrutura do LaSOM 63 <b>30</b> .....	121
<b>Figura 36.</b> DHPMs selecionadas para investigação nesta Tese. ....	123
<b>Figura 37.</b> Instantâneos retirados da trajetória do AMP na CD73 para os tempos 0ps (A), 100ps (B), 300ps (C) e 400ps (D).....	126
<b>Figura 38.</b> Pose dos compostos (isômeros R e S) e principais interações com os resíduos do bolsão catalítico na conformação aberta (PDB-ID 4h2g).....	127
<b>Figura 39.</b> Pose dos compostos (isômeros R e S) e principais interações com os resíduos do bolsão catalítico na conformação fechada (PDB-ID 4h2i) .....	129
<b>Figura 40.</b> Composto AB680 <b>172</b> .....	132
<b>Figura 41. A)</b> Em destaque o bolsão hidrofóbico alcançado pela porção orto-fluorobenzeno de AB680. <b>B)</b> a sobreposição do anel fenila do (S)-LaSOM 335 com anel orto-fluorobenzeno de AB680 obtido utilizando o programa Discovery Studio Visualizer.....	132
<b>Figura 42.</b> Pose do (S)-LaSOM335 <b>167</b> no sítio ortostérico no tempo 1590ps.....	133
<b>Figura 43.</b> Decomposição da energia de interação (S)-LaSOM 335 / CD73. ....	135

<b>Figura 44.</b> Estrutura do LaSOM 335 <b>167</b> .....	135
<b>Figura 45.</b> Em laranja pontos em comum entre LaSOM 335 <b>167</b> e o LaSOM 65 <b>162</b> . .....	136
<b>Figura 46.</b> Viabilidade Celular sobre a linhagem T24 de câncer de bexiga. Os resultados estão representados em percentual obtido pelo teste de MTT do LaSOM 335. ....	137
<b>Figura 47.</b> Gráficos da viabilidade celular do LaSOM 335 (teste de MTT) nas células <b>A)</b> MRC-5 e <b>B)</b> 3T3 .....	138
<b>Figura 48.</b> Representação do C. elegans de fenótipo normal (N2) e multivulval (MT4244). .....	139
<b>Figura 49.</b> Número de multivulvas na adição do LaSOM 65 <b>A)</b> e LaSOM 335 <b>B)</b> .....	140
<b>Figura 50.</b> Gráfico do percentual de sobrevivência das cepas N2 ( <b>a</b> ) e MT4244 ( <b>b</b> ) em contato com diferentes concentrações de LaSOM 335 e LaSOM 65. ....	141
<b>Figura 51.</b> Estrutura do LaSOM 335 <b>167</b> e LaSOM 339 <b>170</b> .....	145
<b>Figura 52.</b> Fragmentos do (S)-LaSOM 335 e suas relações com a CD73. ....	145



## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Valores de pontuação e de RMSD para o ensaio de re-docking utilizando os programas Autodock Vina e DOCK6. ....	98
<b>Tabela 2.</b> RMSD em angstroms (Å) para o ensaio de cross-docking.....	100
<b>Tabela 3.</b> Valores de fator de enriquecimento e de área acumulada sobre a curva ROC para o ensaio de recuperação de compostos ativos.....	103
<b>Tabela 4.</b> Ranking dos 8 primeiros compostos (Função de pontuação ESP_Sim) .....	105
<b>Tabela 5.</b> Ranking dos oito primeiros compostos (Função de pontuação GB_SA).....	107
<b>Tabela 6.</b> Ensaio de inibição enzimática para o ácido sulfanílico e para a taurina.....	113
<b>Tabela 7.</b> Ensaio de inibição enzimática para LaSOM 366 <b>139</b> e LaSOM 191 <b>150</b> . ....	114
<b>Tabela 8.</b> Ensaio de inibição enzimática para o LaSOM 372 <b>161</b> . Os valores apresentados referem-se à atividade enzimática relativa em (%). ....	116
<b>Tabela 9.</b> Ensaio de inibição enzimática para o LaSOM 282 <b>166</b> . Os valores apresentados referem-se à atividade enzimática relativa em (%). O controle (100% de atividade em DMSO) equivale a 36,09 µmol Pi/min/mg.....	122
<b>Tabela 10.</b> Valores de IC <sub>50</sub> para a atividade de inibição da CD73 das DHPMs testadas...	124
<b>Tabela 11.</b> Principais interações do LaSOM 335 nas conformações aberta e fechada da CD73 .....	131
<b>Tabela 12.</b> Valores Energia de interação média do (S)-LaSOM335 <b>167</b> e AMPCP <b>8</b> com a CD73 pelo método MM/PBSA. ....	134
<b>Tabela 13.</b> IC <sub>50</sub> e IS do LaSOM 335.....	139
<b>Tabela 14.</b> Valores de ADMETox preditos para LaSOM 335 e LaSOM 65 .....	142



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**ADP** – Adenosina Difosfato;

**AMP** – Adenosina Monofosfato;

**APCP** –  $\alpha$ ,  $\beta$ -metilenadenosina-5'-difosfato;

**Arg** – Arginina;

**Asn** – Asparagina;

**CD73** – *Cluster of Differentiation 73*;

**DHPM** – Dihidropirimidinona;

**DM** – Dinâmica Molecular;

**DMSO** – Dimetilsulfóxido;

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico;

**EC** – *Enzyme Commission Number*;

**EF** – *Enrichment Factor*;

**Gly** – Glicina;

**GPI** – Glicosilfosfatidilinositol;

**IC<sub>50</sub>** – Concentração Inibitória média;

**IS** – Índice de Seletividade;

**ki** – Constante de inibição;

**LogP** – Coeficiente de Partição octanol – água;

**PDB** – *Protein Data Bank*;

**Phe** – Fenilalanina;

**Pi** – Fosfato inorgânico;

**Rg** – Raio de Giração;

**RMSD** – *Root-mean-square deviation*;

**RNA** – ácido ribonucleico;

**ROC** – *Receiver Operating Characteristic C*

**SBVS** – *Structure-based Virtual Screening*;

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
3.1 O câncer de bexiga.....	31
3.2. A ecto-5` nucleotidase (CD73).....	33
3.3. Inibidores da CD73.....	37
3.4. Cumarinas, câncer de bexiga e potenciais inibidores da CD73.....	39
3.4.1. Síntese de Cumarinas.....	41
3.5. Diidropirimidinonas, câncer de bexiga e potenciais inibidores da CD73.....	42
3.5.1. Síntese de diidropirimidinas - DHPMs.....	44
4. ASPECTOS DA FUNÇÃO CATALÍTICA DA CD73 ATRAVÉS DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	45
5. AVALIAÇÃO DAS CUMARINAS E DIHIDROPIRIMIDINONAS COMO POSSÍVEIS INIBIDORES DA CD73.....	79
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
5.1.1 <i>Estudos de docking molecular e triagem virtual</i> .....	81
5.1.1.1 <i>Programa DOCK 6</i> .....	81
5.1.1.2 <i>Programa Autodock Vina</i> .....	81
5.1.1.3 <i>Programa GOLD 5.0</i> .....	82
5.1.1.4 <i>Cálculo do Re-docking</i> .....	82
5.1.1.5 <i>Cálculo do Cross-docking</i> .....	82
5.1.1.6 <i>Automação no processo de docking para a triagem virtual utilizando o programa Autodock Vina</i> .....	83
5.1.1.7 <i>Obtenção da quimioteca de ativos e inativos da quimioteca virtual do LaSOM</i> .....	83
5.1.1.8 <i>Funções de Re-pontuação</i> .....	83
5.1.1.9 <i>Métricas de avaliação estatística do processo de triagem virtual</i> .....	84
5.1.2 <i>Triagem da probabilidade de agregação molecular</i> .....	85
5.1.3 <i>Mapeamento das interações proteína-ligante</i> .....	85
5.1.4 <i>Dinâmica Molecular</i> .....	86
5.1.5 <i>Ensaio de Inibição da atividade enzimática</i> .....	86

5.1.6	<i>Ensaaios in vitro</i>	87
5.1.6.1	<i>Manutenção de linhagens celulares</i>	87
5.1.6.2	<i>Tratamentos</i>	88
5.1.6.3	<i>Ensaio de Viabilidade Celular</i>	88
5.1.7	<i>Ensaaios de atividade antitumoral e de toxicidade in vivo com C. elegans</i>	88
5.1.7.1	<i>Ensaio utilizando o fenótipo multivulval de C. elegans</i>	88
5.1.7.2	<i>Manutenção e tratamento do modelo C. elegans</i>	89
5.1.7.3	<i>Taxa de sobrevivência C. elegans</i>	89
5.1.8	<i>Predição ADMETox e estados de protonação</i>	89
5.1.9	<i>Síntese dos compostos</i>	90
5.1.9.1	<i>Cumarinas</i>	90
5.1.9.2	<i>Dihidropirimidinonas</i>	91
5.2.	<i>Cumarinas</i>	92
5.2.1	<i>Triagem Virtual da quimioteca do LaSOM</i>	93
5.2.2.	<i>Validações da triagem virtual baseada na estrutura do receptor (Structure Based Virtual Screening - SBVS)</i>	95
5.2.2.1	<i>Escolha da estrutura cristalográfica da CD73</i>	95
5.2.2.2	<i>Docagem explorativa (blind docking) do anel cumarina</i>	97
5.2.2.3	<i>Redocking</i>	98
5.2.2.4	<i>Cross-docking</i>	99
5.2.2.5	<i>Avaliação da capacidade de recuperação dos compostos ativos</i>	100
5.2.2.6.	<i>Triagem Virtual da quimioteca do LaSOM baseada na estrutura da CD73</i>	104
5.2.2.	<i>Desenho de novas cumarinas</i>	108
5.2.2.1.	<i>Híbrido cumarina-ácido sulfanílico</i>	109
5.2.2.2.	<i>Híbrido Cumarina-aurina</i>	110
5.2.3.	<i>Ensaio de inibição enzimática</i>	112
5.2.4.	<i>Conclusões</i>	118
5.3.	<i>Dihidropirimidinonas</i>	119
5.3.1.	<i>Ensaaios enzimáticos com a CD73</i>	123
5.3.2.	<i>Estudos de Modelagem Molecular aplicado ao complexo AMP-CD73</i>	125
5.3.3.	<i>Dinâmica Molecular do complexo (S)-LaSOM335 / CD73 e estudos da energia de interação</i>	133
5.3.4.	<i>Avaliação da Atividade Antitumoral e Toxicidade</i>	136

5.3.4.1. Estudos <i>in vitro</i> - células de câncer de bexiga T24, células sadias MRC-5 e 3T3136	
5.3.4.2.2. Análise de sobrevivência de <i>C. elegans</i> .....	140
5.3.5. Farmacocinética <i>in silico</i> - Estudos ADMETox .....	141
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	149
REFERENCIAS .....	151
ANEXO 1: Geo-Measures: A PyMOL plugin for protein structure ensembles analysis....	161
ANEXO 2: Cumarinas e Dihidropirimidinonas utilizadas na tese .....	183



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

O conteúdo das páginas 27 a 28 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo Geral

Esta tese tem como objetivo principal estudar e caracterizar a enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73) humana utilizando ferramentas computacionais e após, planejar e identificar novos compostos antitumorais que atuem pela inibição CD73 humana. Para este estudo empregou-se cumarinas e dihidropirimidinonas (DHPMs) como *scaffolds* constituintes da Quimioteca do LaSOM.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Elucidar o maquinário de catálise da enzima CD73, empregando diversas ferramentas *in silico*;
- Triar virtualmente as DHPMs e cumarinas (sintetizadas ou extraídas de produtos naturais) da Quimioteca do LaSOM, propondo novos compostos baseados nestes *scaffolds*;
- Investigar a inibição enzimática (CD73), a atividade antitumoral e a toxicidade, ambas *in vitro* e *in vivo* dos hits selecionados;
- Realizadas análises *in silico* das propriedades ADME e toxicológicas, a fim de analisar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos triados (*hits*);
- Propor características essenciais para uma pequena molécula inibir a atividade desta enzima;



### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

---

O conteúdo das páginas 30 até 44 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

#### **4. ASPECTOS DA FUNÇÃO CATALÍTICA DA CD73 ATRAVÉS DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS**

---

O conteúdo das páginas 45 até 77 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

## **5. AVALIAÇÃO DAS CUMARINAS E DIHIDROPIRIMIDINONAS COMO POSSÍVEIS INIBIDORES DA CD73**

---

O conteúdo das páginas 79 até 147 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

---

O conteúdo das páginas 149 até 150 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

## REFERENCIAS

---

ALEXANDRINO, C. A. F. *et al.* Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 29, p. 449–456, 2019.

ALLARD, D. *et al.* Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. **Immunology letters**, [s. l.], v. 205, p. 31–39, 2019.

ANTONIOLI, L. *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends Mol. Med.**, [s. l.], v. 19, p. 355, 2013.

BAQI, Y. *et al.* Development of potent and selective inhibitors of ecto-5'-nucleotidase based on an anthraquinone scaffold. **J. Med. Chem.**, [s. l.], v. 53, p. 2076, 2010.

BATTASTINI, A. M. O. *et al.* CD39 and CD73 as Promising Therapeutic Targets: What Could Be the Limitations?. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, 2021.

BHATTARAI, S. *et al.* 2-Substituted  $\alpha,\beta$ -Methylene-ADP Derivatives: Potent Competitive Ecto-5'-nucleotidase (CD73) Inhibitors with Variable Binding Modes. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], p. 2941–2957, 2020a.

BHATTARAI, S. *et al.* 2-Substituted  $\alpha,\beta$ -Methylene-ADP Derivatives: Potent Competitive Ecto-5'-nucleotidase (CD73) Inhibitors with Variable Binding Modes. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2020b.

BHATTARAI, S. *et al.*  $\alpha,\beta$ -Methylene-ADP derivatives and analogs: development of potent and selective ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitors. **J. Med. Chem.**, [s. l.], v. 58, p. 6248, 2015.

BOWMAN, C. E. *et al.* An exceptionally potent inhibitor of human CD73. **Biochemistry**, [s. l.], v. 58, p. 3331, 2019.

CALDWELL, G. W. *et al.* Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: Can human CL, V<sub>ss</sub> and t<sub>1/2</sub> be predicted from in-vivo rat data?. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 133–143, 2004.

CANTO, R. F. *et al.* Synthesis of dihydropyrimidin-2-one/thione library and cytotoxic activity against the human U138-MG and Rat C6 glioma cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1379–1388, 2011.

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], n. 2, p. 375–380, 1986.

CHANNAR, P. A. *et al.* Isonicotinohydrazones as inhibitors of alkaline phosphatase and ecto-5'-nucleotidase. **Chemical biology & drug design**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 365–370, 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 740, p. 364–378, 2014.

DEBONIS, S. *et al.* Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. **Biochemistry**, United States, v. 42, n. 2, p. 338–349, 2003.

DIAS, A. de F. *et al.* New insights into cytotoxic mechanisms of bozepinib against glioblastoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 162, p. 105823, 2021.

DUMONTET, C. *et al.* CD73 inhibition by purine cytotoxic nucleoside analogue-based diphosphonates. **Eur. J. Med. Chem.**, [s. l.], v. 157, p. 1051, 2018.

DYHL-POLK, A. *et al.* Incidence and risk markers of 5-fluorouracil and capecitabine cardiotoxicity in patients with colorectal cancer. **Acta Oncologica**, [s. l.], p. 1–9, 2020.

ESTATÍSTICAS DE CÂNCER. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 8 fev. 2020.

FIGUEIRO, F. *et al.* A monastrol-derived compound, LaSOM 63, inhibits ecto-5'-Nucleotidase/CD73 activity and induces apoptotic cell death of glioma cell lines. **Anticancer research**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 1837–1842, 2014.

GHOSHAL, K.; JACOB, S. T. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. **Biochemical pharmacology**, [s. l.], v. 53, n. 11, p. 1569–1575, 1997.

GONÇALVES, Itamar Luís *et al.* Effect of N-1 arylation of monastrol on kinesin Eg5 inhibition in glioma cell lines. **MedChemComm**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 995–1010, 2018.

GONÇALVES, Itamar L. *et al.* Ethyl 4-(2-fluorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1-(p-tolyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate. **Molbank**, [s. l.], v. 2018, n. 4, 2018.

GONÇALVES, L. I. *et al.* Exploring the N1 Position of Biginelli Compounds: New Insights and Trends for Chemical Diversity Generation of Bioactive Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, p. 1–1, 2021.

GONÇALVES, I. L. *et al.* New pharmacological findings linked to biphenyl DHPMs, kinesin Eg5 ligands: anticancer and antioxidant effects. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1137–1154, 2020.

GONÇALVES, I. *et al.* Versatility of the Biginelli reaction: Synthesis of new biphenyl dihydropyrimidin-2-thiones using different ketones as building blocks. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], 2018.

HEUTS, D. P. H. M. *et al.* Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. **ChemBioChem**, [s. l.], v. 13, p. 2384, 2012.

IQBAL, J. *et al.* Identification of sulfonic acids as efficient ecto-5'-nucleotidase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 70, p. 685–691, 2013.

IRWIN, J. J. *et al.* An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 17, p. 7076–7087, 2015.

JIANG, T. *et al.* Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. **BMC cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 267, 2018.

JUNIOR, N. R. N. **Urologia prática**. [S. l.]: Editora Roca, 2008.

JUNKER, A. *et al.* Structure-activity relationship of purine and pyrimidine nucleotides as ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitors. **J. Med. Chem.**, [s. l.], v. 62, p. 3677, 2019.

KARPF, M. From milligrams to tons: the importance of synthesis and process research in the development of new drugs. **Pharmaceutical Process Chemistry (eds Shiori, T.; Izawa, K.; Konoike, T.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi**, [s. l.], v. 10, n. 9783527633678, 2011.

KEY STATISTICS FOR BLADDER CANCER. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em: 8 fev. 2020.

KIRCHMAIR, J. *et al.* Predicting drug metabolism: experiment and/or computation?. **Nature reviews Drug discovery**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 387–404, 2015.

KNAPP, K. *et al.* Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. **Structure**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 2161–2173, 2012.

KNÖFEL, T.; STRÄTER, N. Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v. 309, n. 1, p. 239–254, 2001.

LAPLANTE, S. R. *et al.* Compound Aggregation in Drug Discovery: Implementing a Practical NMR Assay for Medicinal Chemists. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 5142–5150, 2013.

LAWSON, K. V. *et al.* Discovery of AB680: A potent and selective inhibitor of CD73. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 20, p. 11448–11468, 2020.

LEONARDO L.G. FERREIRA AND ADRIANO D. ANDRICOPULO\*. Cancer Estimates in Brazil Reveal Progress for the Most Lethal Malignancies. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 22, p. 1962–1966, 2020.

M. MOHAMMADIAN, A. SAFARI, K. ALLAH BAKESHEI, F. ALLAH BAKESHEI, A. A.; A. MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI, H. SALEHINIYA, M. EMAMIYAN, H. K. RECENT

PATTERNS OF BLADDER CANCER INCIDENCE AND MORTALITY: A GLOBAL OVERVIEW. **Word Cancer Research Journal**, [s. l.], v. 7, n. 1464, p. 1–12, 2020.

MAHDAVIFAR, N. *et al.* Epidemiology, incidence and mortality of bladder cancer and their relationship with the development index in the world. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 381–386, 2016.

MAHESWARA, M. *et al.* A solvent-free synthesis of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, [s. l.], v. 255, n. 1–2, p. 49–52, 2006.

MANJI, G. A. *et al.* ARC-8: Phase I/Ib study to evaluate safety and tolerability of AB680+ chemotherapy+ zimberelimab (AB122) in patients with treatment-naive metastatic pancreatic adenocarcinoma (mPDAC). [s. l.], 2021.

MATOS, L. H. S. *et al.* Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 143, p. 1779–1789, 2018.

MILIUTINA, M. *et al.* A domino reaction of 3-chlorochromones with aminoheterocycles. Synthesis of pyrazolopyridines and benzofuopyridines and their optical and ecto-5'-nucleotidase inhibitory effects. **Organic & biomolecular chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 717–732, 2018.

NEWHOUSE, K. E. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. **The Yale journal of biology and medicine**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 71, 1986.

NOOSHABADI, V. T.; ARAB, S. Targeting tumor-derived exosomes expressing CD73: new opportunities in the pathogenesis and treatment of cancer. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], 2021.

NORMAN, R. A.; TOADER, D.; FERGUSON, A. D. Structural approaches to obtain kinase selectivity. **Trends in pharmacological sciences**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 273–278, 2012.

PAZ, M. M. *et al.* A New Mechanism of Action for the Anticancer Drug Mitomycin C: Mechanism-Based Inhibition of Thioredoxin Reductase. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1502–1511, 2012.

PENG, X.-M.; L.V. DAMU, G.; HE ZHOU, C.-. Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 19, n. 21, p. 3884–3930, 2013.

PERROT, I. *et al.* Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies. **Cell reports**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2411–2425, 2019.

QIAO, Z. *et al.* A novel specific anti-CD73 antibody inhibits triple-negative breast cancer cell motility by regulating autophagy. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 20, p. 1057, 2019.

RAHIMOVA, R. *et al.* Identification of allosteric inhibitors of the ecto-5'-nucleotidase (CD73) targeting the dimer interface. **PLoS computational biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e1005943, 2018.

RIPPHAUSEN, P. *et al.* Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of ecto-5'-nucleotidase. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 14, p. 6576–6581, 2012.

RIPPS, H.; SHEN, W. Review: taurine: a “very essential” amino acid. **Molecular vision**, [s. l.], v. 18, p. 2673–2686, 2012.

RIVERA, R. P. *et al.* Chemoselective Synthesis and Human Ecto-5'-nucleotidase Inhibitory Activity of 2-Trifluoromethyl-4, 6-diarylquinolines. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 3, n. 30, p. 8587–8592, 2018.

ROCKENBACH, L. *et al.* Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. *Em: UROLOGIC ONCOLOGY: SEMINARS AND ORIGINAL INVESTIGATIONS*, 2013. **Anais [...]**. [S. l.]: Elsevier, 2013. p. 1204–1211.

ROCKENBACH, L. *et al.* NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. **Purinergic signalling**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 421–430, 2014.

ROMAGNOLO, B. *et al.* Downstream targets of let-60 Ras in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental biology**, [s. l.], v. 247, n. 1, p. 127–136, 2002.

SAEED, A. *et al.* 3-(5-(Benzylideneamino) thiazol-3-yl)-2 H-chromen-2-ones: a new class of alkaline phosphatase and ecto-5'-nucleotidase inhibitors. **RSC advances**, [s. l.], n. 25, p. 21026–21036, 2016.

SAGINALA, K. *et al.* Epidemiology of Bladder Cancer. **Medical Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2020.

SANKARI DURAIRAJAN *et al.* Selective Susceptibility of Human Bladder Transitional Cell Carcinoma T24 Cells towards NBD Peptide. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 2, 2020. Disponível em: <https://thescipub.com/abstract/ajbbbsp.2020.184.198>. Acesso em: 7 jan. 2022.

STEFANACHI, A. *et al.* Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 250, 2018.

STELLA, J. *et al.* Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Em:* , 2010. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. [S. l.]: Elsevier, 2010. p. 260–267.

STUEPP, C. S. *et al.* Activity of LaSOM 65, a Monastrol-derived Compound, Against Glioblastoma Multiforme Cell Lines. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 4463, 2013.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TORRES, F. C. *et al.* New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins. **Curr Top Med Chem**, [s. l.], v. 14, n. 22, p. 2600–2623, 2014.

TORRES, B. G. *et al.* Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. **Xenobiotica**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 254–263, 2014.

TRUCHON, J.-F.; BAYLY, C. I. Evaluating virtual screening methods: good and bad metrics for the “early recognition” problem. **Journal of chemical information and modeling**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 488–508, 2007.

TYAGI, P. *et al.* Recent advances in intravesical drug/gene delivery. **Molecular pharmaceuticals**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 369–379, 2006.

VAINIO, M. J.; PURANEN, J. S.; JOHNSON, M. S. **ShaEP: molecular overlay based on shape and electrostatic potential**. [S. l.]: ACS Publications, 2009.

VIANNA, D. R. *et al.* 4-Methylcoumarins with cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. **Medicinal Chemical Communications**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 905–911, 2015.

VIANNA, D. R. *et al.* Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 57, p. 268–274, 2012.

VIVIANI, L. G. *et al.* Be Aware of Aggregators in the Search for Potential Human ecto-5'-Nucleotidase Inhibitors. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 8, 2018.

WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 46, n. 12, p. 2287–2303, 2003.

WÓJCIKOWSKI, M.; BALLESTER, P. J.; SIEDLECKI, P. Performance of machine-learning scoring functions in structure-based virtual screening. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, p. 46710, 2017.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

YU, W.; ROBSON, S. C.; HILL, W. G. Expression and distribution of ectonucleotidases in mouse urinary bladder. **PLoS One**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2011.

## **ANEXOS**

O conteúdo das páginas 160 até 197 encontra-se suprimido, em função da proteção de dados, os quais encontram-se submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.