

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**“Avaliação de complexos proteína-ligantes e docking molecular na
busca por anticoagulantes cumarínicos inibidores do Fator X da
coagulação sanguínea”**

ELIANE MARI DE OLIVEIRA

Bauru - SP
2010

ELIANE MARI DE OLIVEIRA

“Avaliação de complexos proteína-ligantes e docking molecular na busca por anticoagulantes cumarínicos inibidores do Fator X da coagulação sanguínea”

Tese apresentada como requisito à obtenção do Título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob a orientação da Profa. Dra. Ignez Caracelli.

Bauru - SP
2010

de Oliveira, Eliane Mari.

Avaliação de complexos proteína-ligantes e docking molecular na busca por anticoagulantes cumarínicos inibidores do Fator X da coagulação sanguínea / Eliane Mari de Oliveira, 2010.

195 f. il.

Orientador: Ignez Caracelli

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2010

1. Fator X. 2. Docking. 3. Cumarinas. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ELIANE MARI DE OLIVEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 28 dias do mês de outubro do ano de 2010, às 10:00 horas, no(a) Núcleo de Estudos e Práticas Pedagógicas - UNESP - Bauru, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. IGNEZ CARACELLI do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DE SIMONE do(a) Instituto de Química e Biotecnologia / Universidade Federal de Alagoas, Profa. Dra. MARIA TERESA DO PRADO GAMBARDELLA do(a) Departamento de Química e Física Molecular / Universidade de São Paulo, Prof. Dr. CARLOS DE OLIVEIRA P SANTOS do(a) Departamento de Físico-Química / Instituto de Química de Araraquara, Prof. Dr. MARCIO WEBER PAIXAO do(a) Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de ELIANE MARI DE OLIVEIRA, intitulada "AVALIAÇÃO DE COMPLEXOS PROTEÍNA-LIGANTES E DOCKING MOLECULAR NA BUSCA POR ANTICOAGULANTES CUMARÍNICOS INIBIDORES DO FATOR X DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA". Após a exposição, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. IGNEZ CARACELLI


Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DE SIMONE


Profa. Dra. MARIA TERESA DO PRADO GAMBARDELLA


Prof. Dr. CARLOS DE OLIVEIRA P SANTOS


Prof. Dr. MARCIO WEBER PAIXAO

Dedico....

À minha mãe, suporte para todas as minhas conquistas.

A meu filho que tem sido meu companheiro em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família, em especial a minha mãe e avós maravilhosas suporte para todas as minhas realizações.

Ao meu filho, continuo agradecendo seu olhar apaixonado por estes 12 anos de sua existência mesmo em minha ausência que se tornou cada vez maior pelas atribuições da profissão.

À minha orientadora que dividiu comigo sua experiência docente, capacidade e profissionalismo além de momentos maravilhosos de amizade, preocupação e carinho que jamais esquecerei.

Ao Prof. Julio Zukerman-Schpector pela colaboração valiosa no decorrer deste trabalho.

Aos professores do POSMAT, os ensinamentos e amizade valiosos.

O auxílio financeiro da Secretaria de Estado da Educação e preocupação com a formação continuada de seus docentes.

Ao meu amigo e irmão científico Sergio Ricardo Pizano Rodrigues, pelas risadas, companhia, aprendizado e confiança na nossa capacidade para realizar este grande desafio.

Aos amigos, Denis da Silva Corrêa, Natalia Baptistini e Andrew Albert de Oliveira pela convivência e amizade ao longo desses anos.

Aos amigos do LaCrEMM da Universidade Federal de São Carlos pela acolhida especial.

A todos os meus alunos que permitem com que eu possa compartilhar os conhecimentos que adquiri nesses anos de estudo.

A todos meu obrigada!

Oliveira, Eliane Mari de. **Avaliação de complexos proteína-ligantes e docking molecular na busca por anticoagulantes cumarínicos inibidores do Fator X da coagulação sanguínea.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2010.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de buscar inibidores para o Fator X, fator comum da cascata de coagulação sanguínea. O primeiro passo para isso foi o de buscar conhecimento nos complexos cristalográficos entre o Fator X e pequenas moléculas. Após extensiva análise dos complexos obtidos de bancos de dados, onde foram avaliadas as interações e o posicionamento dos ligantes cristalográficos utilizando para isso a visualização molecular, os dados foram organizados e a informação transformada em conhecimento, principalmente sobre regiões de ocupação dos ligantes dentro do sítio ativo da serino-protease Fator X e a relação entre as atividades inibitórias extraídas da literatura. Em seguida foi estudada uma família de compostos cumarínicos onde a informação disponível era a das atividades dos compostos, e a formação de complexos foi realizada com estudos de docking e de visualização gráfica. Baseados no fato de que um dos anticoagulantes em uso é a varfarina, uma cumarina, que apresenta vantagens em alguns aspectos de sua utilização, como baixo custo e alta solubilidade, e desvantagens por sua ação não específica, optou-se por estudar análogos da cumarina como inibidores do Fator X. Na terceira parte do trabalho, foram estudados complexos cumarínicos para os quais não se possuía conhecimento prévio sobre os complexos com o Fator X, nem dados de atividade inibitória. Os resultados da formação de complexos do Fator X e os análogos da cumarina obtidos com estudos de docking foram analisados com base nos conhecimentos adquiridos na primeira e segunda partes deste trabalho; isto levou à possibilidade de sugerir um composto que se encaixa nas características de um bom inibidor do Fator X.

Palavras-chave: docking, data mining, Fator X, varfarina, anticoagulantes.

Oliveira, Eliane Mari de. **Avaliação de complexos proteína-ligantes e docking molecular na busca por anticoagulantes cumarínicos inibidores do Fator X da coagulação sanguínea.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia dos Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2010.

ABSTRACT

The main aim of this work was to seek inhibitors of Factor X, the common factor of the cascade of blood coagulation. The first step was to gain enough insight in the understanding of the crystallographic complexes between the X-factor and small molecules. After extensive analysis of the complexes obtained from databases, using molecular visualization, data, namely the interactions of the ligands and their crystallographic pose, were organized and the information transformed into knowledge mainly on the regions where the ligands were located, specially within the active site of serine protease Factor X and its relationship between the inhibitory activities drawn from the literature. Then we studied a family of coumarin compounds, for which information of their activities was available, building their complexes using molecular docking and graphical display analysis. Based on the fact that one of these compounds is in regular use as anticoagulant, namely warfarin, a coumarin, which has certain advantages as its low cost and high solubility, and disadvantages due to the fact that its action is not specific, we decided to examine analogues of coumarin as inhibitors of Factor X. In the third part of the study a series of coumarins, for which there was no data on their complex formation with Factor X nor on their activity, were studied. The results of the docking studies between Factor X and the coumarin analogues were thoroughly analyzed based on the knowledge acquired in the first and second parts of this work, this allows us to suggest a compound that fits all the characteristics of a good Factor X inhibitor.

Keywords: docking, data mining, Factor X, warfarin, anticoagulants

LISTA DE FIGURAS

	página
Capítulo 1 – Introdução	
Figura 1. 1 Cascata de coagulação (Adaptado de Farias et al.,2006).	18
Figura 1. 2 Os anticoagulantes na literatura internacional.	20
Figura 1. 3 Heparina (a) Modelo bidimensional mostrando os grupos sulfatos carregados; (b) unidade de repetição; (b) (c) estrutura tridimensional.	22
Figura 1. 4 Estrutura da varfarina com a porção cumarina que a caracteriza em destaque.	23
Figura 1. 5 Ciclo da vitamina K (Adaptado de Hirsh et al.,1998).	24
Figura 1. 6 Tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195) das serino-proteases e o resíduo de glicina coadjuvante da catálise no FXa, a Gly193.	29
Figura 1. 7 Mecanismo catalítico das serino-proteases; (a) ataque nucleofílico da Ser195 na carbonila do peptídeo; (b) formação do tetraedro intermediário envolvendo o esqueleto principal e a cadeia lateral da Ser195, o esqueleto principal da Gly193 e o oxigênio carbonila do peptídeo que está sendo clivado, (adaptado de Voet & Voet, 2004).	30
Figura 1. 8 Relação entre resíduos do substrato e os resíduos da proteína (adaptado de Schechter e Berger, 1967).	31
Figura 1. 9 Estruturas de cumarinas (extraído de Ribeiro e Kaplan, 2002).	33
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	
Figura 2. 1 Fluxograma do processo de Docking Molecular.	45
Capítulo 3 – Data Mining	
Figura 3. 1 Códigos pdb dos complexos cristalográficos extraídos do PDB e PDBSum. Em destaque está a estrutura da proteína utilizada no estudo de docking descrito no Capítulo 4	54
Figura 3. 2 Representação do sítio com seus subsítios coloridos diferencialmente para a serino-protease Fator X: S1 (verde), S1' (verde-claro), S2 (azul escuro), S2' (azul claro), S3 (roxo), S3' (roxo-claro) e S4 (laranja). Na figura também são apontadas regiões que foram denominadas C (cavidade profunda), AI (engloba subsítios S2 e S4) e AII (S1 e S3)	55
Figura 3. 3 Representação do sítio com seus subsítios coloridos diferencialmente na enzima FX. S1 (verde), S1' (verde-claro), S2 (azul escuro), S2' (azul claro), S3 (roxo), S3' (roxo-claro) e S4 (laranja). (a) Na parte de cima o ligante está sob a superfície, e os aminoácidos estão coloridos de acordo com os subsítios ao qual pertencem. (b) Na parte de baixo, a proteína está representada na forma de superfície	57
Figura 3. 4 Esquema do sítio de ligação do Fator X, com as três regiões C, AI e AII. Os nomes dos aminoácidos estão coloridos de acordo com os subsítios	61
Figura 3. 5 Gráfico mostrando as atividades de cada ligante que possui um grupo sulfona na região AII quando complexado no Fator X. Os valores são apresentados em nmol/L para Ki ou IC50. (a) 534 < Ki < 15 nmol/L; (b) 6 < Ki < 0,2 nmol/L; (c) 830 < IC50 < 2,5 nmol/L.	64
Figura 3. 6 Regiões do Fator X para interação com os ligantes	67

LISTA DE FIGURAS (continuação)

Capítulo 4 – Docking

Figura 4. 1 Soluções do redocking do ligante cristalográfico da estrutura 2pr3. A pose cristalográfica está indicada (em destaque, representada em <i>stick</i>). As soluções do redocking estão sobrepostas (representadas em <i>line</i>).	125
Figura 4. 2 Representação do posicionamento do ligante (A) obtido com redocking no sítio do FX e (B) na estrutura cristalográfica original.	126
Figura 4. 3 Interações do ligante cristalográfico na solução obtida com redocking no sítio do FX.	126
Figura 4. 4 Soluções do docking para os ligantes menos ativos (10 e 13) e mais ativos (15 e 30).	128
Figura 4. 5 Relação posicionamento no sítio ativo × atividade obtida a partir da análise dos ligantes 15 e 30 (mais ativos) e 10 e 13 (menos ativos). As regiões do sítio ativo estão esquematizadas e a porção cumarina do ligante está em destaque.	130
Figura 4. 6 Esquema para a (a) WRR-Ideal, (b) WRS-ideal e (c) p-Cl-WAR; (d) WRR (azul) e WRS (rosa) sobrepostas, no sítio da 2pr3 (Fator X).	133
Figura 4. 7 Posicionamento no sítio ativo e soluções dos ligantes WARFIN (azul), VAWTIW (verde) e VAWTOC (amarelo) sobrepostas.	135
Figura 4. 8 Interações do ligante 15097 no sítio da 2pr3 (Fator X).	137
Figura 4. 9 Estrutura do ligante 15097. A flecha indica a posição da inserção do CH ₂ Cl.	138
Figura 4. 10 Pose do ligante 15097-CH ₂ Cl no sítio ativo do Fator X (2pr3).	138
Figura 4. 11 Ligante 15097-CH ₂ Cl-Cl-Benz modelado.	139
Figura 4. 12 Interações do ligante 15097-CH ₂ Cl-Cl-Benz no sítio ativo do Fator X (2pr3).	140
Figura 4. 13 Sobreposição de 15097 (rosa), 15097-CH ₂ Cl (azul) e 15097-CH ₂ Cl-Cl-Benz (cinza).	141

Capítulo 5 – Conclusões

Figura 5. 1 Estrutura do composto 15097-CH ₂ Cl-Cl-Benz sugerido como um composto promissor para atuar como inibidor do Fator X.	184
--	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3 – Data Mining

Tabela 3. 1	Aminoácidos componentes dos subsítios segundo nomenclatura das serino-proteases	55
Tabela 3. 2	Exceções de ocupação da Região AI	60
Tabela 3. 3	Grupo de exceções I: ligantes ocupam três regiões	63
Tabela 3. 4	Interações entre ligantes com grupos sulfona e aminoácidos	65
Tabela 3. 5	Ocupação da posição de interação (IP) do ligante para interagir com Gln192	66

Capítulo 4 – Docking

Tabela 4. 1	Escore do redocking (kcal/mol) para o Fator X (estrutura 2pr3)	124
Tabela 4. 2	Ligantes com atividade relatada na literatura para o Fator X e trombina (Frederick et al., 2005)	126
Tabela 4. 3	Relação entre posição no sítio e escores	130

Lista de Abreviações

Lista de Aminoácidos:

Asp	Ácido aspártico	Leu	Leucina
Glu	Ácido glutâmico	Lys	Lisina
Ala	Alanina	Met	Metionina
Arg	Arginina	Pro	Prolina
Asn	Asparagina	Ser	Serina
Cys	Cisteína	Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina	Thr	Treonina
Gly	Glicina	Trp	Triptofano
Gln	Glutamina	Val	Valina
His	Histidina	Sec	Selenocisteína
Ile	Isoleucina	Pyl	Pirrolisina

CSD Cambridge Structural Database

PDB Protein Data Bank

PDBSum Protein Data Base summary

SUMÁRIO

	página
Apresentação	14
Capítulo 1 – Introdução	16
1.1 Coagulação: uma visão geral e anticoagulantes	16
1.1.1 A coagulação sanguínea	16
1.1.2 Cascata de coagulação sanguínea e fatores de coagulação	17
1.1.3 Os problemas no sistema de coagulação	18
1.1.4 Os inibidores da coagulação – anticoagulantes	19
1.1.5 Anticoagulantes usados na prática médica	20
A heparina	21
A varfarina – derivado cumarínico anti-vitamina K (AVK)	22
1.2 Ferramenta Computacionais, Alvos e Busca de Novos Fármacos	25
1.2.1 Estudo de proteínas e inibidores	25
1.2.2 O alvo na cascata de coagulação	27
1.2.3 O mecanismo de ação das serino-proteases	28
1.2.4 Subsítios de ligação e nomenclatura de Schechter e Berger	30
1.2.5 A proteína estudada neste trabalho	31
Fator X – o Fator Stuart-Prower	31
1.3 Ligantes: o interesse pelos derivados do composto natural cumarina	33
1.4 Os Objetivos do Estudo Presente	34
Referências.	36
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	40
2.1 Data Mining	40
2.1.1 Bancos de dados	41
2.1.1a Bancos de dados de proteínas	41
2.1.1b Bancos de dados de pequenas moléculas	41
2.2 Análise dos complexos cristalográficos e Visualização Molecular	42
2.3 Docking Molecular	43
2.3.1 Docking: a formação dos complexos receptor-ligante	45
2.3.2 Análise dos resultados obtidos a partir dos caçulos	47
2.3.3 Validação do Experimento: Redocking	47
2.3.4 Formação de complexos com outros ligantes.	48
Referências	49

SUMÁRIO (continuação)

	página
Capítulo 3 – Data Mining	52
3. 1 Estruturas Cristalográficas da Serino-Protease Fator X	53
3.1.1 Coleta de dados	53
3.1.2 Visualização Gráfica e Posicionamento do Ligante Cristalográfico no Sítio Ativo	54
3.1.3 Visualização Gráfica, Posicionamento e Interações no Sítio Ativo	55
3. 2 Ligantes	68
Anexo 3. 1 Estruturas Cristalográficas para o Fator X	70
Anexo 3. 2 Posições dos Ligantes nos Subsítios do Fator X	84
Anexo 3. 3 Atividade e Ocupação dos Ligantes Cristalográficos no Sítio Ativo do Fator X	91
Anexo 3. 4 Ligantes Obtidos de Bancos de Dados	110
Referências	116
Capítulo 4 – Docking	123
4. 1 Seleção da Proteína-Alvo para o Docking	123
4. 2 Validação da metodologia – redocking	124
4.2.1 Redocking para o Fator X	124
4. 3 Docking de ligantes com atividade conhecida no Fator X	126
4.3.1 Atividades para o Fator X	126
4.3.2 Análises: modos de ligação e interações	127
4.3.3 Correlação: resultados de docking e atividades da literatura	129
4. 4 Docking de ligantes com atividade desconhecida no Fator X	130
4.4.1 Varfarinas: R, S e p-Cl-WAR	131
4.4.2 Varfarinas cícicas: WARFIN e WARFAR10	134
4.4.3 Varfarinas cícicas: VAWTOC e VAWTIW	134
4. 5 Comparação dos resultados de docking	135
4. 6 Desenho racional de um ligante derivado do 15097	138
4.6.1 Adição de CH ₂ Cl na porção cumarínica	138
4.6.2 Adição de Cl no anel fenila	139
Anexo 4. 1 Interações entre os Ligantes Cumarínicos e o Fator X	142
Anexo 4. 2 Escore e Ocupação dos Ligantes Cumarínicos no Sítio Ativo do Fator X	174
Referências	181
Capítulo 5 – Conclusões	182
5. 1 Data Mining	182
5. 1 Comparação com o docking de cumarinas com atividade conhecida	182
5. 3 Comparação com o docking de cumarinas com atividade desconhecida	183
5. 4 Desenho racional de um ligante derivado do 15097	183

APRESENTAÇÃO

Este trabalho apresenta o estudo da formação de complexos entre pequenas moléculas e a serino-protease Fator X da Cascata de Coagulação. Este é um tema que tem merecido atenção crescente pela sua importância dentro da pesquisa acadêmica interdisciplinar, onde se procura alcançar o entendimento da importância das estruturas tridimensionais, de seu arranjo, refletido nas interações que as moléculas realizam para se acomodarem umas em relação às outras.

O resultado deste trabalho pode ajudar a organizar os conhecimentos sobre o tema e talvez atingir o papel de sugerir possíveis caminhos no desenvolvimento de novas moléculas. As pequenas moléculas estudadas foram as cumarinas, partindo da idéia de que um dos anticoagulantes em uso é a varfarina, que é barata, fácil de ser sintetizada, mas que ainda apresenta alguns resultados não desejáveis e que podem ser minimizados.

No Capítulo 1, o texto inicia abordando o Fator X (lê-se: Fator dez) e sua importância na Cascata de Coagulação. No Capítulo 2, são apresentados os materiais e métodos. O Capítulo 3, por sua vez, é o resultado de extenso trabalho de mineração de dados em vários bancos de dados de referências bibliográficas, de proteínas, de pequenas moléculas. Foram levantados dados de estrutura dos complexos cristalográficos e a partir da análise destas estruturas, tem início a extração de dados, apoiados pelas referências da literatura. Para tabular estes dados e organizá-los de forma que fizesse algum sentido, foi necessário o uso de programas gráficos, sem os quais não seria possível acrescentar significado aos dados. A parte de dados deste capítulo foi organizada em forma de anexos para facilitar a leitura do texto.

No Capítulo 4, são apresentados os resultados dos cálculos de docking e análise dos mesmos. Na primeira parte do capítulo há o estudo feito com um grupo de ligantes cumarínicos dos quais não há informação cristalográfica, mas há dados de atividade. O trabalho foi o de avaliar se havia correlação entre os resultados do experimento *in silico* com os dados de atividade. Esta parte do trabalho foi importante porque na parte descrita no Capítulo 3, nenhuma das pequenas moléculas estudadas pertencia à família das cumarinas. Na parte final do Capítulo são apresentados os resultados do docking dos ligantes obtidos por busca em bancos de dados, conforme descrito no Capítulo 3 (Anexo 3.4).

É necessário ressaltar que as referências de cada capítulo são apresentadas ao final dos mesmos, porque os assuntos tratados são diversificados, motivo pelo qual optou-se por mantê-los de forma separada.

Finalmente, o capítulo final apresenta as conclusões do trabalho.

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

1.1 COAGULAÇÃO: UMA VISÃO GERAL E ANTICOAGULANTES

1.1.1 A coagulação sanguínea

A coagulação é o processo pelo qual se forma um coágulo sanguíneo. Começa como resposta a uma lesão em um vaso sanguíneo. A habilidade do corpo para controlar o fluxo de sangue de uma lesão vascular é um componente indispensável da sobrevivência. O processo da coagulação sanguínea e, portanto, a dissolução do coágulo seguido por uma reparação do tecido lesionado é chamada de hemostasia. A hemostasia consta de quatro eventos principais que ocorrem em uma ordem determinada, assim que ocorre a perda de integridade vascular (Souza & Elias, 2006):

- (a) a fase inicial do processo é denominado de constrição vascular. Isto limita o fluxo sanguíneo para a área lesionada;
- (b) em seguida, as plaquetas são ativadas pela trombina e se agregam no sítio da lesão, formando um tampão temporário e débil. A proteína fibrinogênio é a principal responsável por estimular a agregação plaquetária;
- (c) para assegurar a estabilidade do tampão débil inicial, se forma uma malha de fibrina (também chamada de coágulo) que recobre o tampão;
- (d) finalmente, o coágulo deve se dissolver para que o fluxo sanguíneo normal possa ocorrer assim que seja reparado o tecido.

Dois vias levam à formação de um coágulo de fibrina: a via intrínseca (interior de um vaso sanguíneo) e a via extrínseca (fora do vaso sanguíneo) da cascata de coagulação. Ainda que as duas sejam iniciadas por mecanismos diferentes, ambas convergem para a via comum onde ocorre a ativação do fator X (FXa) que transforma a protrombina em

trombina. No passo seguinte a trombina gera fibrina (formação do coágulo) a partir do fibrinogênio (Franco, 2001).

O sistema de coagulação humano atua através de proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes com objetivo de manter a hemostasia, processo que mantém a fluidez do sangue. Seus componentes devem atuar de forma a evitar perda excessiva de sangue e formação de trombos intravasculares, garantindo o equilíbrio funcional e regulação do fluxo sanguíneo. Os mecanismos hemostáticos estão associados com três complexos enzimáticos pró-coagulantes que envolvem serino-proteases dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX, X) associadas à cofatores (V e VIII), todos localizados em uma superfície de membrana contendo fosfolipídios (Sena et al., 2010).

1.1.2 Cascata de coagulação sanguínea e fatores de coagulação

A coagulação sanguínea ocorre por duas vias (Figura 1.1). O ponto comum entre as duas vias é a ativação do Fator X, o qual forma com o Fator VII um complexo (complexo protrombinase) cuja função é converter a protrombina (PT) em trombina (THR). Esta última tem várias funções, sendo a principal a conversão do fibrinogênio em fibrina. Esta conversão também ativa fator XIII que se liga à fibrina e ao colágeno estabilizando as ligações e consolidando o tampão hemostático (Bozzini e Molinas, 2004). A partir do entendimento da cascata de coagulação, da função dos fatores de coagulação e dos prováveis anticoagulantes, estudos apontam interesse no Fator X como alvo de inibidores. Tal fato ocorre, segundo a literatura, pelo posicionamento do Fator X na via comum da coagulação, posição considerada estratégica na cascata de coagulação. Outra evidência da melhora na inibição do Fator X em detrimento da inibição da trombina reside na não ocorrência de sangramentos indesejados, diferentemente do que ocorre

com inibidores diretos de trombina (Mann, Butenas e Brummel, 2003). Um esquema simplificado da cascata de coagulação é apresentado na Figura 1.1.

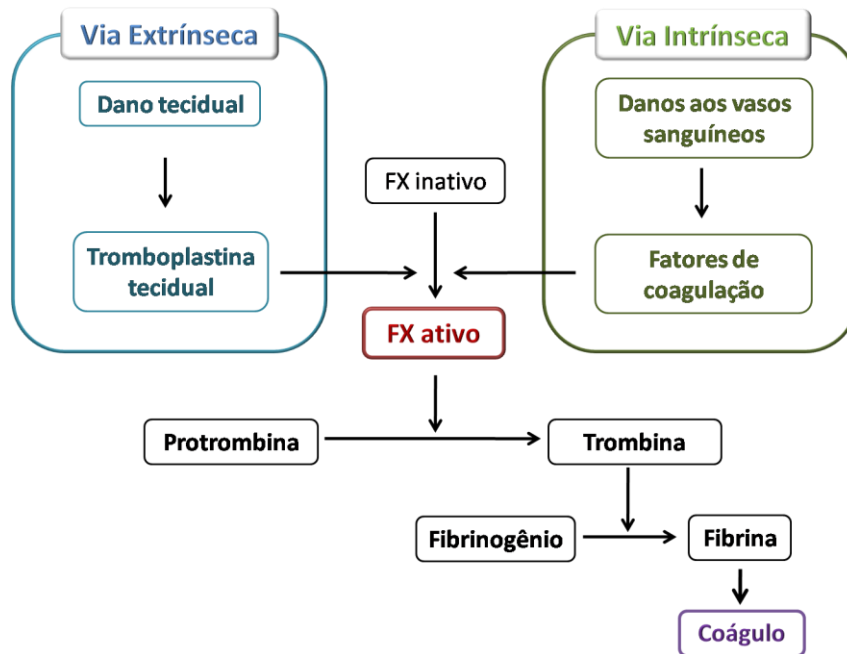


Figura 1.1 Cascata de coagulação (adaptado de Farias et al., 2006).

1.1.3 Os problemas no sistema de coagulação

As disfunções no processo de hemostasia podem causar diversas anomalias no sistema de coagulação sanguínea produzindo altas concentrações de trombina e gerando fibrina em grandes quantidades aumentando o risco de doenças cardiovasculares.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares serão, em 2015, as principais causas de óbitos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Diversas possibilidades de alvos terapêuticos, bem como as limitações relacionadas a alguns fármacos em uso clínico, incentivam a busca de novas substâncias que apresentem ação anticoagulante e/ou antiplaquetária (Chaves et al., 2010).

Apesar dos grandes avanços alcançados, o sangramento continua sendo uma das principais morbidades em cirurgia cardíaca, particularmente com o advento de procedimentos mais complexos, com períodos prolongados de circulação extracorpórea e intervenções em pacientes agudamente descompensados. Além da elevação dos custos hospitalares, a transfusão de sangue e hemoderivados e a revisão cirúrgica de hemostasia incrementam significativamente a morbidade e a mortalidade (Miana et al., 2004).

No tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares (DCV), que representam a primeira causa de mortalidade no Brasil, a manutenção da hemostasia, principalmente quanto à agregação plaquetária é de importância fundamental, uma vez que seu descontrole é fator crítico na trombose arterial, fato esse que pode causar desordens com risco de vida, tais como ataques cardíacos, angina instável e reoclusão após angioplastia (de Carvalho et al., 2010).

1.1.4 Os inibidores da coagulação - anticoagulantes

Os fármacos que atuam sobre a hemostasia têm mecanismos de ação muito distintos entre si, mas todos visam atingir o mesmo objetivo: alterar o equilíbrio entre as reações pró-coagulantes e anticoagulantes. A eficácia e a toxicidade dessas drogas estão necessariamente interligadas. O efeito terapêutico desejado da anticoagulação pode, por exemplo, ser contraposto pelo efeito tóxico da hemorragia secundária à dosagem excessiva do anticoagulante. Os agentes predominantemente utilizados para preservar a hemostasia são divididos em cinco grupos: 1) agentes antiplaquetários, em especial a aspirina; 2) os anticoagulantes orais, como a varfarina, que bloqueiam múltiplas etapas da cascata de coagulação; 3) a heparina e seus derivados, que estimulam os inibidores naturais da coagulação; 4) os agentes fibrinolíticos, que clivam trombos patológicos e 5)

os anticoagulantes sintéticos que mesclam as ações mencionadas (Goldman e Gilman et al., 1996).

As diversas possibilidades de alvos terapêuticos, bem como as limitações relacionadas a alguns fármacos em uso clínico, incentivam a busca de novas substâncias que apresentem ação anticoagulante e/ou antiplaquetária. No *ISI Web of Science*, em consulta realizada em 07 de setembro de 2010, foram encontradas, apenas para os últimos 5 anos, mais de 2.500 artigos publicados e cerca de 16.000 citações (Figura 1.2) relacionados com anticoagulantes.

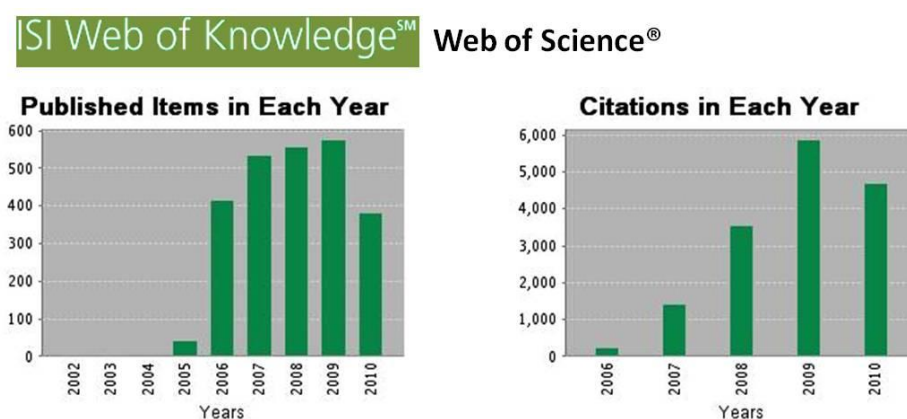


Figura 1.2 Os anticoagulantes na literatura internacional.

Devido ao interesse e por ser problema de saúde mundial, vários novos anticoagulantes estão em desenvolvimento (Samama & Gerotziafas, 2010).

1.1.5 Anticoagulantes usados na prática médica

Os anticoagulantes são um grupo de substâncias de natureza química distinta, relacionados por seu efeito biológico. São divididos em:

(a) de ação direta: os que por si mesmo são capazes de inibir a cascata de coagulação.

Exemplos: inibidores diretos de trombina (hirudina, argatroban).

(b) de ação indireta: aqueles que mediante sua interação com outras proteínas ou atuando em outras vias metabólicas alteram o funcionamento da cascata de coagulação. Exemplos: inibidores mediados pela antitrombina III (heparina não fracionada, heparinas de baixo peso molecular); inibidores da síntese de fatores de coagulação (derivados do dicumarol) (Trejo I., 2004).

Podem ser administrados por via parenteral para induzir um estado hipocoagulante em forma rápida. Geralmente este tipo de administração é utilizado por curtos períodos de tempo. Quando administrados por via oral, o efeito anticoagulante ocorre lentamente. Esta via é utilizada em tratamentos de manutenção.

A Heparina

A heparina (Figura 1.3) é um dos anticoagulantes mais antigos em uso clínico. Foi descoberta em 1916 a partir de células hepáticas caninas, que em grego é hepar ("ήπαρ"), por Jay McLean e Guillermo Henry Howell (McLean, 1959).

A heparina é um polímero com peso molecular que pode variar entre 3 a 40 kDa, sendo que nas preparações comerciais, o peso molecular médio está entre 12 e 15 kDa. É um membro da família das glicosaminoglicanas e consiste de uma unidade de repetição sulfatada do dissacarídeo.

Estima-se que, no mundo, aproximadamente 20 milhões de pacientes recebam heparina para tratamento ou profilaxia de trombooses venosas ou arteriais e, para isto, é estimada a necessidade de aproximadamente 200 milhões de porcos para produzir as heparinas necessárias para esse consumo. Hoje a heparina utilizada em grande parte é produzida na China, pela grande criação de suínos e pela política de rebaixamento dos custos de sua produção (Melo et al., 2008).

Muitos tratamentos são iniciados com a heparina e, após um curto período, deve ser associados um anticoagulante oral. Essa utilização concomitante (heparina + anticoagulante oral) se faz necessária até o momento que o anticoagulante oral atinge seu pleno efeito. (Kishimoto et al., 2008, 2010).

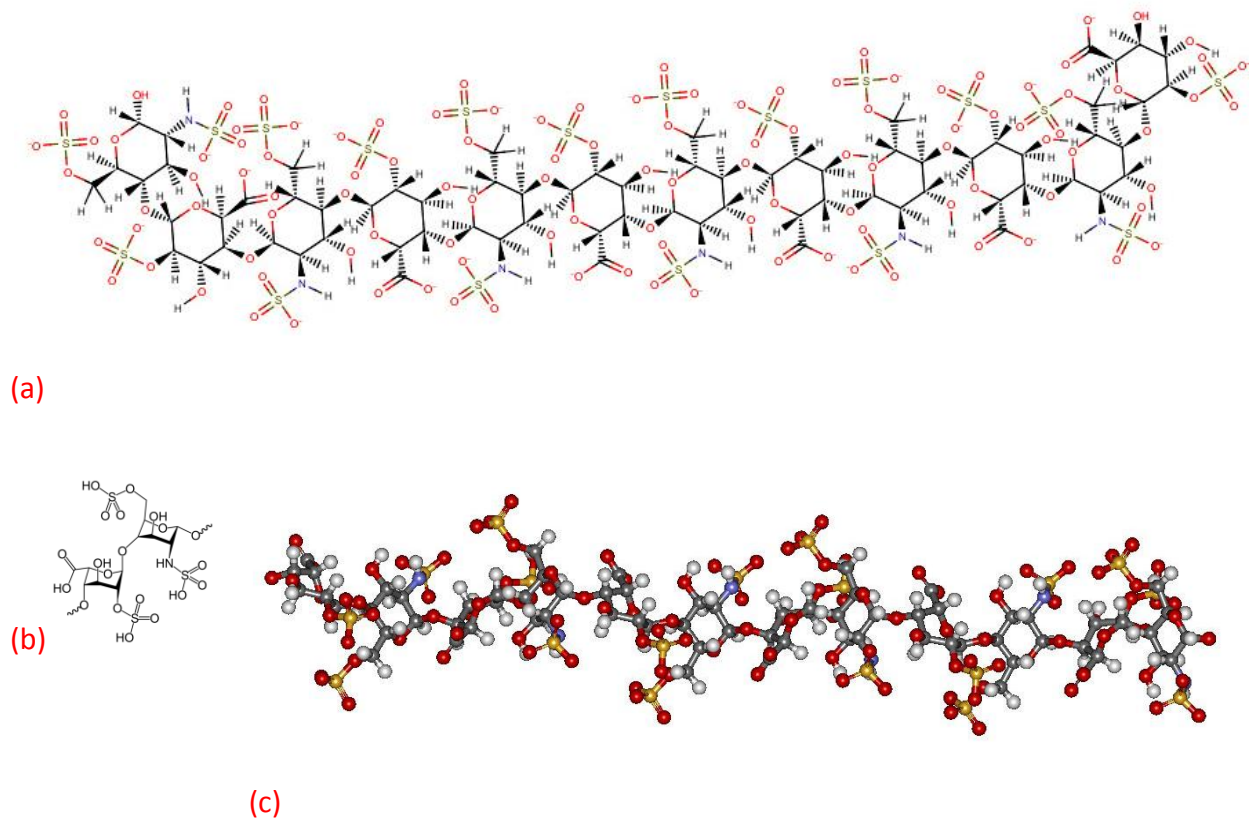


Figura 1.3 Heparina: (a) Modelo bidimensional mostrando os grupos sulfato carregados; (b) unidade de repetição; (c) estrutura tridimensional.

A varfarina – derivado cumarínico anti-vitamina K (AVK)

A varfarina (Figura 1.4) pertence à família das cumarinas, que são derivadas do metabolismo da fenilalanina e, estruturalmente, são lactonas de ácido cumarínico.

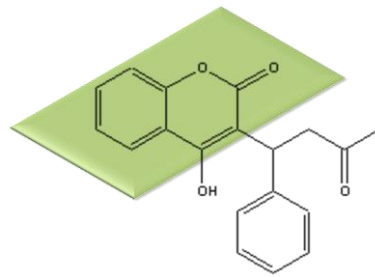


Figura 1.4 Estrutura da varfarina com a porção cumarina que a caracteriza em destaque.

Estas substâncias são absorvidas por via oral e tem ação anticoagulante, inibindo a formação da protrombina, promovendo hemorragias em diversos órgãos, com distúrbios digestivos, vômitos, cólicas, diarréia e posteriormente manifestações hemorrágicas como aumento do tempo de protrombina e coagulação (Hirsh et al., 1998).

Os anticoagulantes da família das cumarinas são todos derivados da 4-hidroxicumarina ou indan-1,3-diona (compostos indandionicos). São anticoagulantes orais e lipossolúveis ativos *in vivo* e que exercem sua ação bloqueando o ciclo da enzima vitamina K epóxi-redutase (VKER) pela da vitamina K (Figura 1.5). A vitamina K em forma reduzida (KH₂) atua como co-fator essencial para o processo da gama carboxilação dos fatores de coagulação. Neste processo, a KH₂ é oxidada a epóxi-vitamina K e a seguir retorna a KH₂ pela ação de duas redutases, completando o ciclo da vitamina K. A varfarina inibe a ação das duas redutases, reduzindo a quantidade de vitamina KH₂ disponível, limitando o processo de carboxilação dos fatores da coagulação (Fatores II, VII, IX e X), cuja síntese depende da vitamina K.

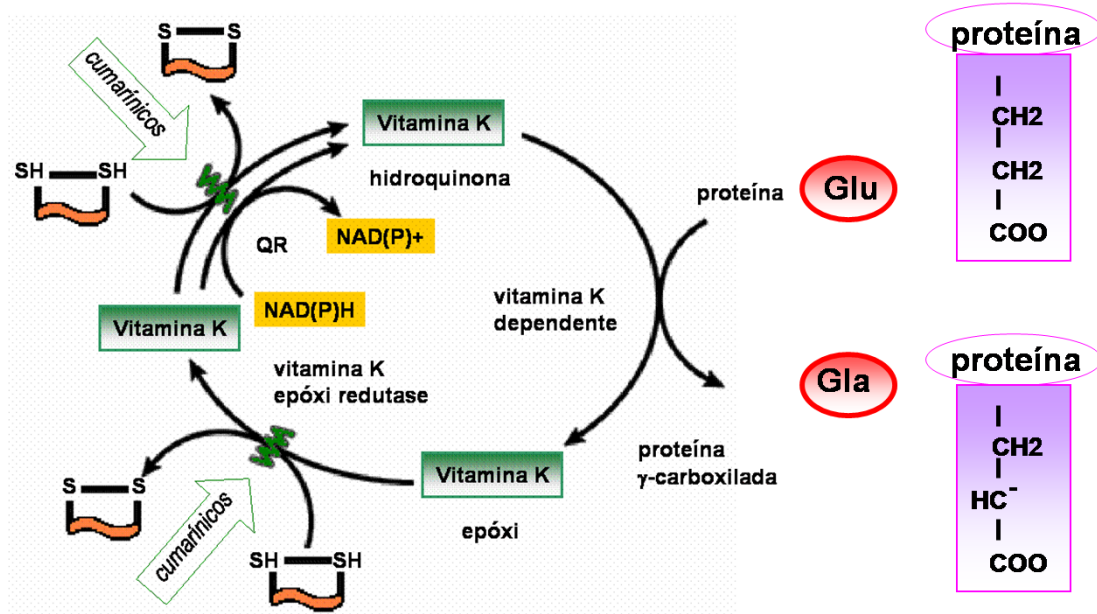


Figura 1.5 Ciclo da Vitamina K. (adaptado de Hirsch et al., 1998).

Na atualidade, o anticoagulante Marevan® tem como substância ativa a varfarina, sendo o anticoagulante oral mais amplamente usado devido ao seu início de ação previsível, duração da ação e excelente biodisponibilidade. O seu mecanismo de ação ocorre através da interferência na interconversão ácida da vitamina K e sua forma 2,3 epóxido, essencial para a carboxilação de alguns fatores de coagulação. O fármaco consiste em mistura racêmica de quantidades aproximadamente iguais de dois isômeros opticamente ativos, as formas R e S, e tem a absorção praticamente completa quando a administração é por via oral. Aproximadamente 97% da substância ligam-se à albumina plasmática, distribuindo-se amplamente em todos os tecidos. Este medicamento em sua forma comercial é indicado na prevenção do tromboembolismo venoso, do embolismo sistêmico em pacientes com prótese de válvulas cardíacas ou fibrilação atrial, do acidente vascular cerebral, do infarto agudo do miocárdio e da recorrência do infarto. Os

anticoagulantes orais também estão indicados na prevenção do embolismo sistêmico em pacientes com doença valvular cardíaca (Bula Marevan®).

Há na literatura inúmeros problemas relacionados ao uso da varfarina, entre eles estão disfunção hepática, distúrbio da coagulação, estados de demência, neoplasias e sangramentos de órgãos em pacientes alcoólatras. Os determinantes de sangramento ligados à exposição da varfarina estão relacionados às condições próprias do paciente tais como: idade, antecedentes de hemorragia, uso concomitante de drogas que interferem na hemostasia, doenças hepáticas, duração do tratamento, insuficiência cardíaca, congestão hepática, além de efeitos abortivos e de má formação congênita em grávidas (Smith et al., 2010; Verheugt, 2010).

Embora apresente problemas, a varfarina está em uso há seis décadas, tendo sido aprovada para utilização em seres humanos em 08 de junho de 1954 e continua a ser o único anticoagulante oral, aprovado pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), atualmente disponível para a prevenção e tratamento de problemas tromboembólicos a longo prazo. Seu *status* original entre os anticoagulantes orais, para uso a longo prazo, muitas vezes leva a varfarina a ser mencionada como o "padrão ouro" para os anticoagulantes orais (Stromich et al., 2010).

1.2 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS, ALVOS E BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS

1.2.1 Estudo de proteínas e inibidores

Na atualidade muitos têm sido os esforços para encontrar inibidores efetivos, conhecidos (Figura 1.2) como fármacos ou drogas que atuem nas proteínas da cascata de

coagulação, bem como em outros mecanismos biológicos (de Candia, Lopopolo & Altomare, 2009; Samama & Gerotziafas, 2010; Verheugt, 2010).

O desenvolvimento de melhores fármacos depende essencialmente de uma boa compreensão dos princípios que regem o reconhecimento molecular em que um alvo, molécula receptora, é capaz de formar um complexo, geralmente não-covalente, com outra molécula, o ligante. Esse evento geralmente é conhecido como sendo uma reação de química supramolecular, pois ocorre através de interações não-covalentes entre as duas moléculas, alvo e ligante (Ermondi & Caron, 2006).

Também têm aumentado os dados gerados em pesquisas biológicas e biomédicos, principalmente pelo emprego de ferramentas da bioinformática. Outra parte importante vem do *data mining* (extração de dados de bancos de dados, dados da literatura, etc.) e da visualização molecular (Mack e Hehenberger, 2002; Brooijman e Kuntz, 2003; Agarwal e Searls, 2008).

Seguindo essa tendência do planejamento de fármacos guiado por conhecimento estrutural, o trabalho foi desenvolvido no BioMat, onde o docking molecular tem sido uma técnica muito útil no entendimento de mecanismos de reação aplicado a proteínas e DNA, e ao planejamento de novos fármacos (Paulino et al., 2002; Cunha et al., 2006; Vega-Teijido, Caracelli & Zukerman-Schpector, 2006; Seng et al. 2008, 2010). A importância destes estudos teve destaque no DrugBank, banco de dados que é uma fonte única de pesquisa para bioinformática e quimioinformática que combina detalhes farmacológicos do composto fármaco, com dados do alvo (seqüência, estrutura tridimensional, mecanismos). Estes estudos começam com a análise das estruturas tridimensionais de macromoléculas, e seus complexos, obtidas por cristalografia,

disponíveis no PDB e PDBSum. O uso de programas de simulação aplicados aos sistemas biológicos auxilia no entendimento de processos e no desenho de moléculas terapêuticas que possam adequar-se a sítios de ligação específicos na proteína. Com essa abordagem, os estudos são iniciados selecionando um alvo ou **receptor** e analisando-se os seus possíveis sítios de ligação, e os prováveis inibidores desta proteína, chamados de **ligantes**. Estes conceitos são fundamentais nas simulações, como é o caso dos experimentos computacionais de docking molecular que foram utilizados no presente trabalho, onde o objetivo inicial é o de formar complexos proteína-inibidor. Como objetivos posteriores, estão o de comparar os complexos formados e fornecer subsídios para entender os mecanismos de reação, verificar o tipo de interações entre o ligante e a proteína e quais são essenciais para a interação e atividade do ligante no sítio de ligação do receptor.

1.2.2 O Alvo na Cascata de Coagulação

Os fatores de coagulação (da cascata de coagulação, Figura 1.1) envolvidos no processo de formação do tampão hemostático são geralmente enzimas da classe das serino-proteases, com exceção dos fatores V e VIII que são glicoproteínas e do fator XIII que é uma transglutaminase. As serino-proteases agem clivando outras proteínas. As vias de coagulação culminam na ativação do Fator X (FX), também conhecido como Fator Stuart-Prower, o qual forma com o fator VII um complexo (complexo protrombinase). Este complexo tem a função de converter a protrombina (PT) em trombina (THR) que ativa os demais componentes da coagulação (Franco, 2001).

O Fator X (lê-se: Fator dez) e a Trombina são serino-proteases da coagulação, assim como a maioria dos fatores envolvidos no processo de formação do coágulo. O Fator X, a via comum da cascata de coagulação, tem sido encarado como um alvo

promissor no desenvolvimento de novos anticoagulantes orais (de Candia, Lopopolo & Altomare, 2009; Samana & Gerotziafas, 2010; Verheugt, 2010). Assim, neste trabalho, este foi o alvo principal. A trombina foi considerada como alvo secundário, uma vez que apresenta similaridade estrutural com o Fator X. Dessa forma foi possível avaliar os complexos dos ligantes estudados com o Fator X e a Trombina, avaliando também a seletividade dos compostos quanto as estas proteínas.

1.2.3 O mecanismo de ação das serino-proteases

A proteína estudada é uma serino-protease e têm como característica a presença de uma serina reativa no sítio ativo cuja catálise envolve um mecanismo de ação em que o substrato e o resíduo de serina ligam-se covalentemente. Essas proteínas estão presentes em alguns grânulos secretores com reações específicas, exibindo ação quando secretadas (Wong et al., 2002).

Estas proteínas apresentam uma tríade catalítica (Figura 1.6) formada por três resíduos de aminoácidos: a serina, a histidina e o ácido aspártico e ainda um resíduo de glicina atuando como um coadjuvante no processo (Davie, Fujikawa e Kisiel, 1991). Estes resíduos são numerados como Ser195, His57, Asp102 e Gly193 no FX e em outras proteases da coagulação, como na trombina.

Os aminoácidos da tríade interagem por meio de ligações de hidrogênio. Em seu estado nativo, há duas ligações de hidrogênio: uma entre os átomos OD2 do resíduo Asp102 (carregado negativamente) e ND1 protonado da histidina His57 (carregado positivamente) e outra entre o NE2 da His57 e o OH da Ser195. Durante a reação, a cadeia lateral do resíduo Ser195 deixa de interagir com a da His57 e ataca nucleofilicamente a carbonila da cadeia polipeptídica que será clivada. Este ataque

propicia a formação de uma região negativamente carregada, o bolso do oxiânion, com formação de um tetraedro intermediário envolvendo enzima e substrato.

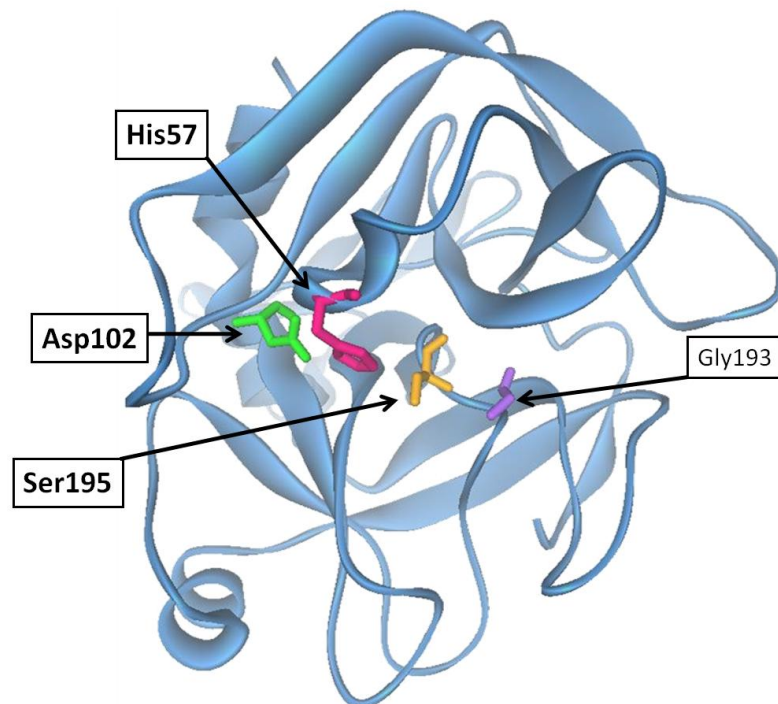


Figura 1.6 Triade catalítica (His57, Asp102 e Ser195) das serino-proteases e o resíduo de glicina coadjuvante da catálise no FXa, a Gly193.

Neste momento, a glicina Gly193 atua como coadjuvante do processo, ajudando a manter este estado intermediário. A seguir, o substrato faz uma ligação de hidrogênio N-H...N com a His57, ocorrendo em seguida a quebra da cadeia em dois grupos: um N-terminal e um C-terminal. O grupo C-terminal permanece ligado a serina reativa e o grupo N-terminal é liberado da His57 que volta ao seu estado aceitador com dois elétrons livres no nitrogênio NE2. A amina formada é liberada e o OH da Ser195 liga-se novamente com elétrons livres do NE2 da cadeia lateral da His57, enquanto a Gly193 liga-se ao O do grupo ácido formando novamente o tetraedro intermediário. O grupo amina da His57 é restabelecido por uma molécula de água e ocorre a hidrólise do grupo éster pela acil-

enzima (Figura 1.7) (Nelson e Cox, 2002; Voet, Voet & Pratt, 2000). O tetraedro intermediário é quebrado pelas interações entre a Gly193 e a His57, formando o produto carboxilado que interage com um próton formando o grupo C-terminal.

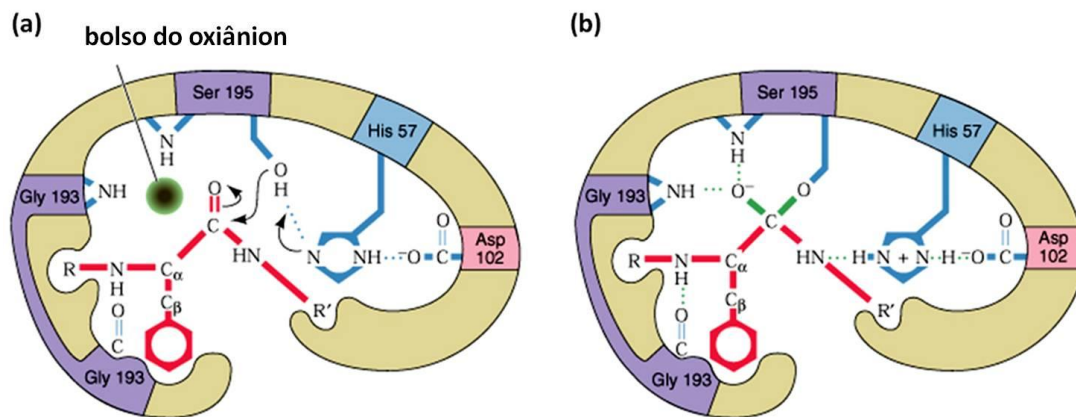


Figura 1.7 Mecanismo catalítico das serino-proteases; (a) ataque nucleofílico da Ser195 na carbonila do peptídeo; (b) formação do tetraedro intermediário envolvendo o esqueleto principal e a cadeia lateral da Ser195, o esqueleto principal da Gly193 e o oxigênio carbonila do peptídeo que está sendo clivado, (adaptado de Voet & Voet, 2004).

1.2.4 Subsítios de ligação e a nomenclatura de Schechter e Berger

As proteases em geral são nomeadas de acordo com o trabalho de Schechter e Berger que mostraram que o tamanho do sítio ativo das enzimas proteolíticas pode ser medido pela comparação das taxas de hidrólise de uma série de pares de peptídeos, cuja composição foi sistematicamente variada. O sítio de ligação foi dividido em subsítios ou bolsos. Assumiu-se que a cadeia polipeptídica ou proteína (substrato) é alinhada no sítio da protease, para que cada um dos seus resíduos de aminoácidos ocupe um subsítio. Estes resíduos foram nomeados por Schechter (Figura 1.8) como P_n, ..., P₃, P₂, P₁, P₁', P₂', P₃',... ,P_n' (contando a partir das ligações da porção N-terminal para a porção C-terminal), e os correspondentes subsítios foram designados como S_n, ..., S₃, S₂, S₁, S₁', S₂', S₃'... S_n' (Schechter e Berger, 1967).

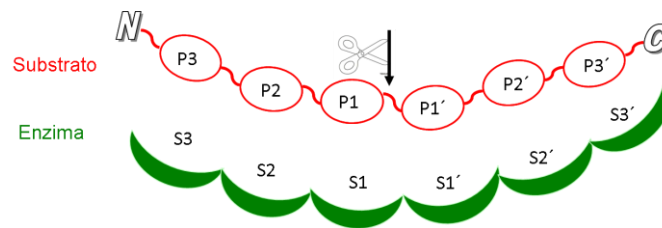


Figura 1.8 Relação entre resíduos do substrato e os resíduos da proteína (adaptado de Schechter e Berger, 1967).

1.2.5 A proteína estudada neste trabalho

Fator X – o Fator Stuart-Prower

O Fator X ativado (FXa) é uma serino-protease chave na cascata de coagulação e essencial na formação de trombina, mediadora de formação de fibrina e ativação plaquetária. Ele desempenha um papel importante na coagulação na via comum que liga o fator tecidual (FT) da via extrínseca e os fatores de coagulação (serino-proteases) da via intrínseca. A inativação do FXa por inibidores específicos não influencia a pré-formação de trombina, mas previne a geração de trombina. Pesquisas extensas com dados pré-clínicos e clínicos mostram que a inibição do FXa é eficaz tanto em distúrbios de trombose venosos quanto arteriais (Bozzini e Molinas, 2004).

Em alguns testes com modelos animais foram realizadas terapias com relação à eficácia antitrombótica e efeitos hemostáticos (sangramentos) mostrando a comparação de inibidores diretos de FXa, inibidores diretos de trombina e varfarina (Perzborn et al., 2005). Os dados foram mais consistentes e claros com os inibidores diretos de FXa do que com os inibidores diretos de trombina mostrando melhoras nos quadros clínicos dos pacientes tratados com inibidores do FXa (Yasuhiro et al., 2008a, 2008b).

O intenso esforço de investigação para encontrar inibidores de FXa com boa biodisponibilidade tem sido alvo de recentes publicações. As análises da literatura tentam estabelecer quais os resíduos de aminoácidos são importantes para a interação do ligante no sítio, de forma que possa haver a interação e outros tentam relacionar com a posição dos ligantes nos subsítios. Uma classe de inibidores é a das amidinas em que alguns trabalhos mostram a importância da interação no bolso S1. Eles se ligam ao subsítio de especificidade S1 formando uma ponte salina entre o ligante e o resíduo Asp189, mimetizando esta interação que também ocorre entre uma arginina da protrombina e o FXa (van Huis et al., 2007). Estes compostos apresentam um grupo fenila com substituinte amidina altamente carregado (Ries e Priepke, 2000). A interação com o S1 é um alvo potencial devido à permeabilidade a fármacos contendo moléculas com caráter básico (van Huis et al., 2007). Outro grupo de compostos liga-se ao subsítio S1 interagindo com resíduos naturalmente hidrofóbicos, à exceção do Asp189. Nessa classe estão compostos que contêm cloreto de arila em interação com a Tyr228 localizada no fundo do bolso S1 (Eriksson, 2006a, 2006b).

Além do bolso de especificidade, o S1, em outros trabalhos, é considerado o bolso S4 como importante para a inibição do FXa. Este bolso é formado pelo arranjo dos resíduos de aminoácidos aromáticos Trp215, Phe174, e Tyr99. Amidinas, piridinas, e aminas terciárias têm sido descritas como inibidoras vinculadas à ligação ao bolso S4. Em contrapartida, vários grupos têm relatos de que grupos aryl se ligam dentro deste bolso. A ligação de grupos sulfonas e sulfonamidas ao bolso de especificidade S4 também é descrita (Pinto et al., 2001).

1.3 Ligantes: o interesse pelos derivados do composto natural cumarina

As cumarinas constituem uma classe química, sendo o primeiro representante isolado por Vogel, em 1820, da espécie *Coumarona odorata*. Esses metabólitos estão presentes em diferentes partes das plantas tanto nas raízes como nas flores e frutos e podem estar distribuídas em diferentes famílias de *Angiospermae*, tais como *Apiaceae*, *Rutaceae* e *Asteraceae* nas quais são encontradas com ampla ocorrência (Ribeiro e Kaplan, 2002).

As cumarinas são de origem natural e esses produtos têm sido investigados mundialmente quanto à sua ação anticoagulante e/ou antiplaquetária através de ensaios *in vitro*. Os estudos baseados em substâncias do reino vegetal já contribuiu com diversas moléculas em uso na profilaxia e tratamento de diversas patologias, vêm sendo as mais analisadas dentre os produtos naturais, sob este enfoque (Chaves et al., 2010).

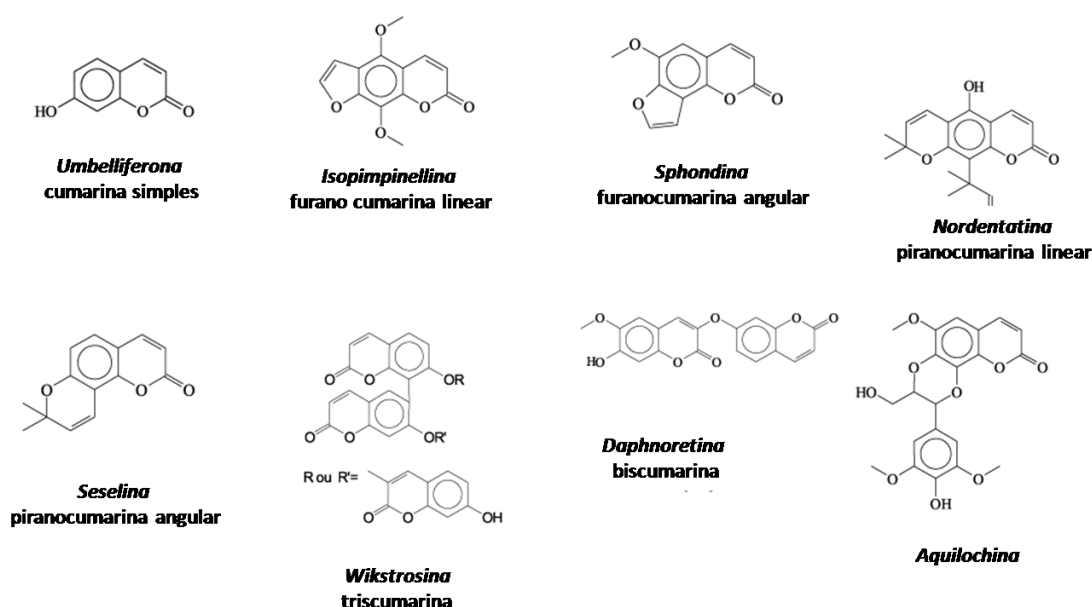


Figura 10 Estruturas de cumarinas (extraído de Ribeiro e Kaplan, 2002).

Outras moléculas com o esqueleto químico das cumarinas, como acenocumarol, femprocumona e dicumarol, apresentam atividade anticoagulante e são muito utilizadas na clínica. No entanto, estes fármacos anticoagulantes possuem algumas limitações. No caso da terapia com varfarina, a janela terapêutica estreita faz com que a administração da droga seja problemática (Chaves et al., 2010).

A complicação mais comum relacionada à utilização da varfarina é a hemorragia que pode ser agravada pela administração concomitante de aspirina® e de outros fármacos anti-inflamatórios não esteroidais. Outro potente efeito adverso resultante da administração de varfarina é a necrose da pele. O uso concomitante da varfarina com extrato de *Ginkgo biloba* pode potencializar o efeito anticoagulante resultando em uma hemorragia significativa (Chaves et al., 2010).

Em busca realizada no dia 08 de setembro de 2010 no banco de dados de patentes o Derwent World Patents havia depósito de 617 patentes relacionadas à varfarina. Além disso, na base de artigos científicos ISI Knowledge o Web of Science havia na mesma data 14.319 publicações com o tema varfarina (warfarin OR varfarin OR varfarina OR warfarina).

1.4 OS OBJETIVOS DO ESTUDO PRESENTE

A problemática envolvendo o uso de anticoagulantes e principalmente o uso da varfarina motivou o estudo da família das cumarinas, que são compostos mais baratos, viáveis e de administração oral, visando propor estruturas de ligantes que tenham preferência e especificidade pelo FXa, uma vez que a inibição deste fator produz menos efeitos colaterais na terapia anticoagulante, como descrito ao longo dessa introdução.

Com estes objetivos, foi proposto o uso de uma abordagem de simulação computacional, o docking molecular, de levantamento de dados estruturais e de análise em tela gráfica para avaliar a formação de complexos entre a proteína FXa e os ligantes cumarínicos. Os resultados produzidos foram relacionados com atividade inibitória descrita da literatura para compostos cumarínicos e não cumarínicos. Ao final, propõe-se um mecanismo de inibição dos ligantes em relação às proteínas FX.

Referências – Capítulo 1

- AGARWAL, P.; SEARLS, D. B. Literature mining in support of drug discovery. *Briefings in Bioinformatics* [S.l.], v. 9, n. 6, p. 479-492, 2008.
- ANSELL, J.; HIRSH, J.; POLLER, L.; BUSSEY, H.; JACOBSON, A.; HYLEK, E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists. *Chest* [S.l.], v. 126, n. 3, p. 204S-233S, Sep 2004.
- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* [S.l.], v. 32, p. 335-373, 2003.
- BOZZINI, C. E.; MOLINAS F. 2004. Hemostasia. In: Houssay A.B., Cingolani H.E. *Fisiologia Humana de Houssay*, 7 ed. Artmed, Porto Alegre.
- CHAVES, D. S. D.; COSTA, S. S.; DE ALMEIDA, A. P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R. B. Secondary Metabolites from Vegetal Origin: A Potential Source of Antithrombotic Drugs. *Quimica Nova* [S.l.], v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.
- CUNHA, R.L.O.R.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; COMASSETO, J.V. Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. *Journal of Organometallic Chemistry* [S.l.], v. 691, n. 23, p. 4807-4815, 2006.
- DAVIE, E. W. ; FUJIKAWA, K. ; KISIEL, W. The Coagulation Cascade - Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry* [S.l.], v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.
- DE CARVALHO, M. J.; PEDROSA, T. N.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; NUNEZ, C. M.; OHANA, D. T.; PEREIRA, M. A. P; LIMA, E. S. Estudo Farmacognóstico e Atividade in Vitro Sobre a coagulação Sanguínea e Agregação Plaquetária das folhas de *Passiflora nitida Kunth* (Passifloraceae). *Acta Amazonica* [S.l.], v. 40, n. 1, p. 199 - 206, 2010.
- DE CANDIA, M; LOPOPOLO, G.; ALTOMARE, C. Novel factor Xa inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [S.l.], v. 19, n. 11, p. 1535-1580, 2009.
- DERWENT WORLD PATENTS - http://apps.isiknowledge.com/DIIDW_GeneralSearch_input.do?highlighted_tab=DIIDW&product=DIIDW&last_prod=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&SID=4AEGAlgiBEKieJBEBEP, 08 de setembro de 2010.
- DRUGBANK - <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00336>
- ERIKSSON, B. I., K. A. BAUER, K.A.; LASSEN, M.R.; TURPIE, A. G. G.; STEERING COMM PENTASACCHARIDE, HIP. Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after hip-fracture surgery. *New England Journal of Medicine* [S.l.], v. 345, n. 18, p. 1298-1304, 2001.
- ERIKSSON, B. I.; BORRIS, L. C.; DAHL, O. E.; HAAS, S.; HUISMAN, M. V.; KAKKAR, A. K.; MUEHLHOFER, E.; DIERIG, C.; MISSELWITZ, F.; KALEBO, P.; O. DIXA-HIP STUDY INVEST. A once-daily, oral, direct Factor Xa inhibitor, rivaroxaban (BAY 59-7939), for thromboprophylaxis after total hip replacement. *Circulation* [S.l.], v. 114, n. 22, p. 2374-2381, 2006.
- ERIKSSON, B. I.; BORRIS, L. C.; DAHL, O. E.; HAAS, S.; HUISMAN, M. V.; KAKKAR, A. K.; MUEHLHOFER, E.; DIERIG, C.; MISSELWITZ, F.; KALEBO, P.; O. DIXA-HIP STUDY INVEST. Oral, direct Factor Xa inhibition with BAY 59-7939 for the prevention of venous thromboembolism after total hip replacement. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*

- [S.l.], v. 4, n. 1, p. 121-128, 2006.
- ERMONDI, G.; CARON, G. Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. *Biochemical Pharmacology* [S.l.], v. 72, n. 12, p. 1633-1645, 2006.
- FARIAS, M., L. CRUZ, L.; CLAPAUCH, R.; SIQUEIRA, C. Efeitos da Terapia Estrogênica Transdérmica Isolada ou Associada à Progesterona Micronizada nos Fatores de Coagulação em Mulheres Menopausadas Com e Sem Sobrepeso. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. v. 50, n. 3, p. 505-514, 2006.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto* [S.l.], v. 34, n. 3/4, p. 229-237, 2001.
- GILMAN, ALFRED, EDS - *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.
- HIRSH, J.; DALEN, J. E.; ANDERSON, D. R.; POLLER, L.; BUSSEY, H.; ANSELL, J.; DEYKIN, D.; BRANDT, J. T., 'Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range', *CHEST*, v. 114, No. 5 Suppl, 445S-469S, 1998.
- HIRSH, J.; DALEN, J. E.; DEYKIN, D.; POLLER, L.; BUSSEY, H., 'Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range', *Chest*, v. 108, No. 4, S231-S246, 1995.
- IMAEDA, Y.; KAWAMOTO, T.; TOBISU, M.; KONISHI, N.; HIROE, K.; KAWAMURA, M.; TANAKA, T.; KUBO, K., 'Discovery of Piperazinylimidazo 1,2-a Pyridines as Novel S4 Binding Elements for Orally Active Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, No. 6, 3125-3140, 2008.
- IMAEDA, Y.; KUROIITA, T.; SAKAMOTO, H.; KAWAMOTO, T.; TOBISU, M.; KONISHI, N.; HIROE, K.; KAWAMURA, M.; TANAKA, T.; KUBO, K., 'Discovery of Imidazo 1,5-C Imidazol-3-Ones: Weakly Basic, Orally Active Factor Xa Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, No. 12, 3422-3436, 2008.
- KISHIMOTO, T. K.; VISWANATHAN, K.; GANGULY, T.; ELANKUMARAN, S.; SMITH, S.; PELZER, K.; LANSING, J. C.; SRIRANGANATHAN, N.; ZHAO, G. L.; GALCHEVA-GARGOVA, Z.; AL-HAKIM, A.; BAILEY, G. S.; FRASER, B.; ROY, S.; ROGERS-COTRONE, T.; BUHSE, L.; WHARY, M.; FOX, J.; NASR, M.; DAL PAN, G. J.; SHRIVER, Z.; LANGER, R. S.; VENKATARAMAN, G.; AUSTEN, K. F.; WOODCOCK, J.; SASISEKHARAN, R., 'Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System', *New England Journal of Medicine*, v. 358, No. 23, 2457-2467, 2008.
- KISHIMOTO, T. K.; VISWANATHAN, K.; GANGULY, T.; ELANKUMARAN, S.; SMITH, S.; PELZER, K.; LANSING, J. C.; SRIRANGANATHAN, N.; ZHAO, G. L.; GALCHEVA-GARGOVA, Z.; AL-HAKIM, A.; BAILEY, G. S.; FRASER, B.; ROY, S.; ROGERS-COTRONE, T.; BUHSE, L.; WHARY, M.; FOX, J.; NASR, M.; DAL PAN, G. J.; SHRIVER, Z.; LANGER, R. S.; VENKATARAMAN, G.; AUSTEN, K. F.; WOODCOCK, J.; SASISEKHARAN, R., 'Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System (Vol 358, Pg 2457, 2008)', *New England Journal of Medicine*, v. 362, No. 11, 1056-1056, 2010.
- MACK, R.; HEHENBERGER, M., 'Text-Based Knowledge Discovery: Search and Mining of Life-Sciences Documents', *Drug Discovery Today*, v. 7, No. 11, S89-S98, 2002.
- MACK, R.; HEHENBERGER, M., 'Text-Based Knowledge Discovery: Search and Mining of Life-Sciences Documents (Vol 7, Pg S89, 2002)', *Drug Discovery Today*, v. 7, No. 17, 889-889, 2002.

- MANN, K. G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K., 'The Dynamics of Thrombin Formation', *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 23, No. 1, 17-25, 2003.
- MCLEAN, J. 'Discovery of Heparin', *Circulation* **Vol. 19, No. 1**, 75-78, 1959
- MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; DE SA, M. P. L.; MOURAO, P. A. S., 'Heparin Quality Control in the Brazilian Market: Implications in the Cardiovascular Surgery', *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 23, No. 2, 169-174, 2008.
- MIANA, L. A.; ATIK, F. A.; MOREIRA, L. F.; HUEB, A. C.; JATENE, F. B.; AULER JUNIOR, J. O.; OLIVEIRA, S. A., 'Risk Factors for Postoperative Bleeding after Adult cardiac Surgery', v. 19, No. 3, 280-286, 2004.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER. Principios de Bioquímica. 3a. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2002. 975p.
- PAULINO, M.; IRIBARNE, F.; HANSZ, M.; VEGA, M.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; OLEA, C.; STOPPANI, A.; BERRIMAN, M.; FAIRLAMB, A.; TAPIA, O. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, v. 584, p. 95-105, 2002
- PERZBORN, E.; STRASSBURGER, J.; WILMEN, A.; POHLMANN, J.; ROEHRIG, S.; SCHLEMMER, K. H.; STRAUB, A., 'In Vitro and in Vivo Studies of the Novel Antithrombotic Agent Bay 59-7939 - an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, No. 3, 514-521, 2005.
- PDB - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- PDB - Protein Data Bank Contents Guide: Atomic Coordinate Entry Format Description. Version 2.3 (1998). <http://www.wwpdb.org/documentation/format2.3-0108-us.pdf>.
- PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- POORT, S. R.; ROSENDAAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M., 'A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated with Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis', *Blood*, v. 88, No. 10, 3698-3703, 1996.
- RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C., 'Evolutionary Tendency of Coumarin-Bearing Families in Angiospermae', *Química Nova*, v. 25, No. 4, 533-538, 2002.
- RIES, U. J.; PRIEPKE, H. W. M., 'Factor Xa Inhibitors – a Review of the Recent Patent Literature', *IDrugs*, v. 3, No. 12, 1509–1524, 2000.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; DE ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. 'Extraction and Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from the Red Marine Alga *Halymenia Pseudofloresia*', *Revista Ciencia Agronomica*, v. 40, No. 2, 224-231, 2009.
- SAMAMA, M. M.; GEROTZIAFAS, G. T. 'Newer Anticoagulants in 2009', *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 29, No. 1, 92-104, 2010.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. "On Size of Active Site in Proteases .I. Papain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27, no. 2, 157-62, 1967.
- SENA, T. S.; PINHEIRO FILHO, S. R.; ISA M. LYRA, I. M. 'Distúrbios Da Hemostasia Em Crianças Portadoras De Cardiopatias Congênitas', *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, No. 2, 149-154, 2010.

- SENG, H.; ONG, H.; ABD RAHMAN, R.; YAMIN, B.; TIEKINK, ER.T.; TAN, K.; MAAH, M.; CARACELLI, I.; NG, C. 'Factors Affecting Nucleolytic Efficiency of Some Ternary Metal Complexes with DNA Binding and Recognition Domains. Crystal and Molecular Structure of Zn(Phen)(Edda)', *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 102, No. 11, 1997-2011, 2008.
- SENG, H.; VON, S.; TAN, K.; MAAH, M.; NG, S.; RAHMAN, R.; CARACELLI, I.; NG, C.H., Crystal structure, DNA binding studies, nucleolytic property and topoisomerase I inhibition of zinc complex with 1,10-phenanthroline and 3-methyl-picolinic acid. *Biometals*, v. 23, n. 1, p. 99-118, 2010
- SMITH, M. B.; CHRISTENSEN, N.; WANG, S. Q.; STROHECKER, J.; DAY, J. D.; WEISS, J. P.; CRANDALL, B. G.; OSBORN, J. S.; ANDERSON, J. L.; HORNE, B. D.; MUHLESTEIN, J. B.; LAPPE, D. L.; MOSS, H.; OLIVER, J.; VIAU, K.; BUNCH, T. J. 'Warfarin Knowledge in Patients with Atrial Fibrillation: Implications for Safety, Efficacy, and Education Strategies', *Cardiology*, v. 116, No. 1,
- SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 2006.
- STROMICH, J. J.; WEBER, A. K.; MIRZAEI, Y. R.; CALDWELL, M. D.; LEWIS, D. E. 'New Adjuvants to Enhance Anticoagulant Activity of Warfarin', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, No. 6, 1928-1932, 2010.
- TREJO I., C. 'Anticoagulantes: Farmacología, Mecanismos De Acción Y Usos Clínicos / Anticoagulants: Pharmacology, Mechanisms of Action and Clinical Uses', *Cuadernos de cirugía - Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, Instituto de Cirugía.*, v. 18, No. 1, 83-90, 2004.
- VAN HUIS, C. A.; BIGGE, C. F.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; NARASIMHAN, L. S.; SCHAUM, R. P.; ZHANG, E.; BRYANT, J. W.; HAARER, S.; JANICZEK, N.; LEADLEY, R. J.; MCCLANAHAN, T.; PETERSON, J. T.; WELCH, K. M.; EDMUNDS, J. J. 'Structure-Based Drug Design of Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as a Novel Series of Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors', *Chemical Biology & Drug Design*, v. 69, No. 6, 444-450, 2007.
- Vega-Tejido, M.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J. Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuranyl- and 5-nitrothiophenyl-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 24, 349-355, 2006.
- Verheugt, F. W. A. 'The New Oral Anticoagulants', *Netherlands Heart Journal*, v. 18, No. 6, 314-318, 2010.
- Voet, D., and J. G. Voet. *Biochemistry*. 3rd ed: John Wiley & Sons, 2004. 1616 p.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Fundamentos de bioquímica*. Artmed: Porto Alegre, 2000; 931 p.
- WONG, P. C.; PINTO, D. J. P.; KNABB, R. M. 'Nonpeptide Factor Xa Inhibitors: Dpc423, a Highly Potent and Orally Bioavailable Pyrazole Antithrombotic Agent', *Cardiovascular Drug Reviews*, v. 20, No. 2, 137-152, 2002.

Capítulo 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DATA MINING

Grande parte do trabalho desenvolvido envolveu o *data mining*. Não é objetivo deste trabalho descrever toda a discussão sobre este processo, portanto será feita apenas uma descrição do procedimento adotado para transformar os dados disponíveis em padrões e novos conhecimentos.

Dentro da área de estruturas tridimensionais de macromoléculas, a informação tem crescido de forma exponencial e os bancos de dados relativos a esta classe de moléculas estão disponíveis livremente, sem qualquer restrição.

Normalmente este processo vale-se de diversos algoritmos que processam os dados e encontram esses "padrões válidos, novos e valiosos", mas é preciso ressaltar que embora os algoritmos atuais sejam capazes de descobrir padrões "válidos e novos" ainda não há uma solução eficaz para determinar padrões *valiosos*. Por essa razão, o *data mining* requer uma interação muito forte com analistas humanos, que são, em última instância, os principais responsáveis pela determinação do valor dos padrões encontrados. Além disso, a condução (direcionamento) da exploração de dados é também tarefa fundamentalmente confiada a analistas humanos, um aspecto que não pode ser desprezado em nenhum projeto que queira ser bem sucedido (Navega, 2002).

No presente estudo, ainda não há algoritmos que permitam detectar certo tipo de padrões, e toda a busca de padrões foi feita via análise humana utilizando para isso a

informação disponível em bancos de dados, na literatura, e a obtida por visualização gráfica.

2.1.1 Bancos de dados

Seguindo a discussão do Capítulo 1, o alvo primário para o presente estudo, foi a proteína da via comum da cascata de coagulação, o Fator X (FX). As informações sobre estruturas tridimensionais encontram-se nos dois bancos de estruturas tridimensionais de macromoléculas: PDB e PDBSum.

2.1.1.a Bancos de dados de proteínas

As informações extraídas do PDB e PDBSum foram as coordenadas atômicas dos complexos cristalográficos (Fator Xa e ligantes) e os artigos relacionados com estas estruturas tridimensionais citados nestes bancos de dados. Na maioria dos casos, nos artigos também foram encontrados dados de atividade de inibição dos ligantes em relação à proteína.

2.1.1.b Bancos de dados de pequenas moléculas

Definiu-se, conforme discutido no Capítulo 1, que os ligantes a serem estudados como possíveis inibidores da proteína FX seriam da família das cumarinas. Para tal foram utilizados os seguintes bancos de dados de pequenas moléculas:

(a) Super Hapten Database, uma base de dados que contem atualmente 7257 haptenos (Guenther et al., 2007). Haptenos são pequenas moléculas que não induzem por si mesmas a formação de anticorpos, mas ao unirem-se a uma proteína, podem estimular uma resposta.

(b) Cambridge Structural Database (CSD) utilizado por gentileza do Prof. Julio Zukerman Schpector da Universidade Federal de São Carlos, pois se trata de uma base de dados

paga. O Cambridge Structural Database (CSD) é um banco de dados que dispõe de uma coleção de estruturas de pequenas moléculas orgânicas e organometálicas (Allen, 2002; Allen & Motherwell, 2002), obtidas por difração de raio X ou difração de nêutrons. Esta base de dados contém hoje mais de 500.000 estruturas depositadas, sendo atualizada a cada dois meses.

- (c) **SuperDrug Database**, uma base de dados que contém atualmente 2.396 compostos com 108.198 confômeros (Goede et al., 2005)
- (d) **PDBSum**, conforme descrito acima uma base de dados de proteínas e as moléculas que foram utilizadas eram parte de complexos cristalográficos com outras proteínas.

2.2 ANÁLISE DOS COMPLEXOS CRISTALOGRÁFICOS E VISUALIZAÇÃO MOLECULAR

Para cada um dos complexos encontrados no PDB e PDBSum, foram analisadas as interações entre os ligantes e as proteínas utilizando programas gráficos que permitem a visualização das estruturas tridimensionais. A visualização gráfica foi utilizada em todas as etapas do trabalho:

- (e) na inspeção dos complexos cristalográficos, tendo como resultado o estudo das interações entre os ligantes e as proteínas, medida de distâncias entre átomos e verificação do tipo de interações;
- (f) no estudo preparatório para a definição do sítio de ligação das proteínas e escolha dos parâmetros de cálculos de docking;
- (g) na análise dos resultados dos cálculos de docking;
- (h) na comparação de resultados entre diferentes complexos formados;
- (i) na confecção de figuras para apresentação dos resultados.

Os programas gráficos utilizados foram DSVisualizer, Mercury (Bruno et al, 2002), Hermes (parte do Programa GOLD) e Marvin.

2.3 DOCKING MOLECULAR

O docking molecular pode ser tratado como um experimento *in silico*, onde o objetivo é o de formar complexos entre uma macromolécula (receptor) e um ligante. O estudo de docking pode ter diferentes objetivos:

- (a) virtual screening, em que um grande número de compostos (da ordem de milhares) são testados em algum receptor e podem abreviar a série de experimentos úmidos, reduzindo o número de compostos a serem estudados em relação ao tempo e custo;
- (b) estudos de mecanismos de reação;
- (c) reconhecimento de sítios de ligação;
- (d) estudos de interações determinantes para o modo de ligação;
- (e) modelar dados experimentais.

No presente trabalho, foram abordados vários destes aspectos, inclusive o de *virtual screening*, embora a base de dados fosse bastante reduzida.

Na Figura 2.1 são apresentados os principais passos do experimento de docking. As coordenadas cristalográficas dos receptores para os estudos de docking molecular foram obtidas do PDB e PDBSum. A proteína selecionada (receptor), após o estudo inicial de todos os complexos cristalográficos do Fator Xa (existentes em 2008) e análise de todos os complexos, foi a proteína de código pdb 2pr3 para o Fator Xa (van Huis et al., 2007).

Os ligantes utilizados neste estudo podem ser divididos em três grupos:

Grupo 1 ou grupo de aprendizagem: ligantes dos complexos cristalográficos obtidos do PDB ou PDBSum em número de 82, nenhum pertencente à família das cumarinas. Não foi feito estudo de docking com estes ligantes, apenas a análise de interações e

posicionamento nos subsítios conforme descrição de Schchter & Berger, 1967 (Capítulo 1). A análise deste grupo de ligantes forneceu subsídios para um entendimento das interações e posicionamento dos ligantes e sua correlação com atividades. Este grupo de aprendizagem fez parte do *data mining*.

Grupo 2 ou grupo teste: ligantes obtidos do trabalho de Frederick et al., 2005, que tiveram que ser modelados pois não havia a estrutura tridimensional correspondente. Este grupo de moléculas pertence à família das cumarinas. Serviu como grupo teste, pois não havia a estrutura cristalográfica, mas sim as atividades. Serviu como teste para verificar se os resultados dos cálculos e das escolhas feitas pelo pesquisador se correlacionavam com os dados de atividade.

Grupo 3 ou de estudo: Neste caso não havia nem a estrutura cristalográfica nem dados de atividade. Baseados em:

(a) ligantes cristalográficos obtidos do CSD. Foi feita uma busca no CSD utilizando a palavra-chave **warfarin**. Foram selecionados e obtidas as coordenadas cristalográficas de 22 estruturas.

(b) ligantes obtidos do SuperHapten Database utilizando a palavra-chave **warfarin**. Foram selecionadas 7 estruturas tridimensionais.

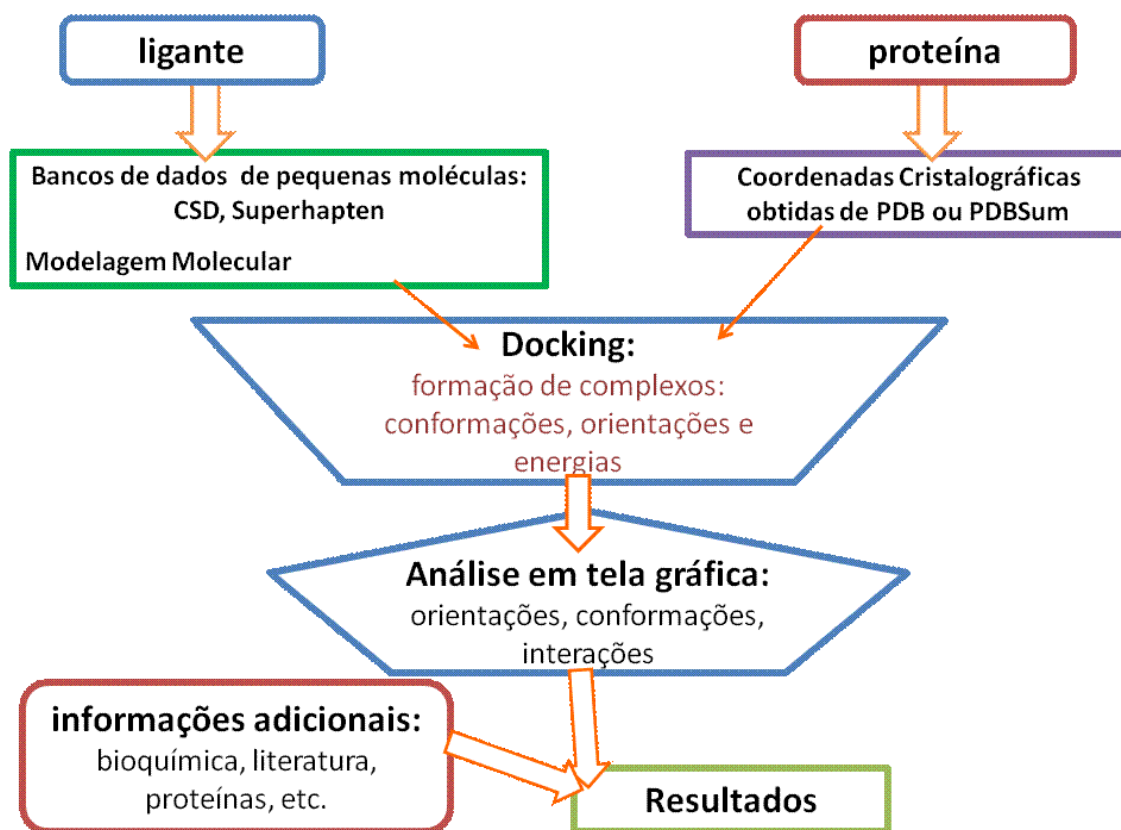


Figura 2.1 Fluxograma do processo de Docking Molecular

2.3.1. Docking: a formação dos complexos receptor-ligante

Para promover a formação do complexo, foi utilizado um programa computacional que utiliza um algoritmo genético e uma função escore. O Programa utilizado foi o GOLD 4.0.1 (*Genetic Optimization for Ligand Docking*). A versão atual do Programa GOLD, adiciona os átomos de H à proteína, às moléculas de água e aos ligantes automaticamente.

O programa apresenta várias possibilidades para escolha do centro da esfera de trabalho: pode ser um ponto do espaço (coordenadas x, y e z), um resíduo de aminoácido, ou no ligante cristalográfico. Depois deve ser escolhido o raio dessa esfera.

A flexibilização dos ligantes é feita permitindo a rotação dos ângulos torcionais, já nas proteínas é possível rotar as cadeias laterais dos aminoácidos dentro dos valores contidos em uma biblioteca interna, ou ainda utilizar a opção “flip” que faz rotações de 180° de grupos terminais CO-NH₂ dos resíduos Asn e Gln. Também a protonação das His (ND ou NE) deve ser decidida pelo pesquisador, com base na visualização gráfica do sítio de ligação.

A informação proporcionada pelo programa GOLD são as poses (orientação e conformação) do ligante em relação ao sítio receptor, uma pontuação que depende da função de ajuste escolhida. O programa trabalha com um método de ajuste do ligante ao sítio, considerando os aspectos conformacional e de energia do ligante e da macromolécula. A função de ajuste mais utilizada é a GoldScore (Jones, Willett, Glen, 1995a, 1995b, Jones et al., 1997, Verdonk et al. 2003), que compreende quatro componentes:

$$\text{GoldScore Fitness} = S(\text{hb_ext}) + 1,3750 * S(\text{vdw_ext}) + S(\text{hb_int}) + S(\text{vdw_int}) \quad (1)$$

$S(\text{hb_ext})$: energia de ligação de hidrogênio do complexo proteína-ligante;

$S(\text{vdw_ext})$: energia de van der Waals entre proteína-ligante;

$S(\text{vdw_int})$: energia de van der Waals no ligante;

$S(\text{hb_int})$: energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante.

O escore vdw_ext é multiplicado por um fator de 1,375 quando o escore total é calculado. Isto é uma correção empírica para encorajar a proteína-ligante ao contato hidrofóbico. O resultado total é multiplicado por -1. O campo de força (mecânica

molecular) utilizado no programa GOLD é o Tripos 5.2 Force Field (Clark, Cramer, van Opdenbosch, 1989).

2.3.2. Análise dos resultados obtidos a partir dos cálculos

O programa gera 10 saídas (ou outro número estipulado pelo pesquisador), que são analisadas em relação a existência ou não de um padrão de orientações. Se existe o padrão, então procede-se à análise das interações entre os átomos do ligante e do receptor. Esta análise inicia-se com a visualização gráfica. O programa DSVisualizer, utilizado nesta etapa, permite a medida de ângulos e distâncias, determinação de centróides em anéis e interações com vizinhos.

As interações analisadas envolvem as ligações de hidrogênio, as interações de van der Waals, as pontes salinas, as interações pi ($\pi \cdots \pi$, $\text{CH} \cdots \pi$, ou outras). Uma boa descrição de todas as possíveis interações se encontra em Ermondi & Caron (2006). Todas estas interações são tabeladas para fins de conhecimento e de comparações entre os complexos estudados.

São também avaliados os escores de saída fornecidos pelo Programa GOLD para todas as orientações/conformações e também o escore médio do conjunto de saídas. Uma boa saída apresenta escores homogêneos, dados pela Equação 1, isto é, variações de cerca de 10% em relação ao escore médio.

2.3.3. Validação do Experimento: Redocking

Antes de proceder com os cálculos de docking, é realizado o redocking que permite a validação do método computacional de escolha. O procedimento consiste em separar o complexo cristalográfico em duas moléculas isoladas (receptor e ligante). As

estruturas cristalográficas selecionadas no PDB foram para o FX a de código 2pr3, um complexo entre FX (Fator X da coagulação) e (2R,4R)-N-(4-chlorophenyl)-N'-[2-fluoro-4-(2-methylsulfonylphenyl)phenyl]-4-methoxy-pyrrolidine-1,2-dicarboxamide de fórmula molecular $C_{26}H_{25}ClFN_3O_5S$ e para a Trombina a de código 1a3b, trombina complexada com o inibidor bifuncional boronato de fórmula molecular $C_{22}H_{34}BN_5O_5S$.

Após a separação dos complexos, são selecionados todos os parâmetros: raio da esfera de trabalho, centro da esfera de trabalho, flexibilidade ou não do ligante, acessibilidade ou não do solvente, rotâmeros a serem flexibilizados e quais rotâmeros serão considerados, se há moléculas de água a serem consideradas, parâmetros do algoritmo. Se é possível reproduzir o complexo cristalográfico com os parâmetros selecionados o cálculo está parametrizado e pode-se partir então para os cálculos de docking com os ligantes de interesse e que serão utilizados nos cálculos posteriores.

2.3.4. Formação de complexos com outros ligantes

Após a validação, os cálculos de docking foram feitos estudos com os ligantes do **Grupo 2 ou grupo teste**: ligantes obtidos do trabalho de Frederick et al., 2005 e do **Grupo 3 ou de estudo**: os obtidos do banco de dados *Super Hapten*, *Super Drug* e *PDBSum* e do banco de dados *Cambridge Structural Database*.

Referências – Capítulo 2

- ALLEN, F. H. 'The Cambridge Structural Database: A Quarter of a Million Crystal Structures and Rising', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v. 58, 380-388, 2002.
- ALLEN, F. H.; MOTHERWELL, W. D. S. 'Applications of the Cambridge Structural Database in Organic Chemistry and Crystal Chemistry', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v. 58, 407-422, 2002.
- BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; EDINGTON, P. R.; KESSLER, M.; MACRAE, C. F.; MCCABE, P.; PEARSON, J.; TAYLOR, R. 'New Software for Searching the Cambridge Structural Database and Visualizing Crystal Structures', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v. 58, 389-397, 2002.
- CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE - CSD: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>
- CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VANOPDENBOSCH, N. 'Validation of the General-Purpose Tripos 5.2 Force-Field', *Journal of Computational Chemistry* Vol. 10, No. 8, 982-1012, 1989.
- DSVISUALIZER™ - Accelrys Software Inc. Discovery Studio Visualizer 2.0, 2.5
<http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization/discovery-studio-visualizer-registration-25.php>
- ERMONDI, G.; CARON, G. 'Recognition Forces in Ligand-Protein Complexes: Blending Information from Different Sources', *Biochemical Pharmacology*, v. 72, No. 12, 1633-1645, 2006.
- FREDERICK, R.; ROBERT, S.; CHARLIER, C.; DE RUYCK, J.; WOUTERS, J.; PIROTTE, B.; MASEREEL, B.; POCHET, L. '3,6-Disubstituted Coumarins as Mechanism-Based Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, No. 24, 7592-7603, 2005.
- GOEDE, A.; DUNKEL, M.; MESTER, N.; FROMMEL, C.; PREISSNER, R. 'Superdrug: A Conformational Drug Database', *Bioinformatics*, v. 21, No. 9, 1751-1753, 2005.
- GUENTHER, S.; HEMPEL, D.; DUNKEL, M.; ROTHER, K.; PREISSNER, R. 'Superhaptin: A Comprehensive Database for Small Immunogenic Compounds', *Nucleic Acids Research*, v. 35, D906-D910, 2007.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. 'A Genetic Algorithm for Flexible Molecular Overlay and Pharmacophore Elucidation', *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 9, No. 6, 532-549, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. 'Molecular Recognition of Receptor-Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation', *Journal of Molecular Biology*, v. 245, No. 1, 43-53, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. 'Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking', *Journal of Molecular Biology*, v. 267, No. 3, 727-748, 1997.
- KOCHANNY, M. J.; ADLER, M.; EWING, J.; GRIEDEL, B. D.; HO, E.; KARANJAWALA, R.; LEE, W.; LENTZ, D.; LIANG, A. M.; MORRISSEY, M. M.; PHILLIPS, G. B.; POST, J.; SACCHI, K. L.; SAKATA, S. T.; SUBRAMANYAM, B.; VERGONA, R.; WALTERS, J.; WHITE, K. A.; WHITLOW, M.; YE, B.; ZHAO, Z. C.; SHAW, K. J. 'Substituted Thiophene-Anthranilamides as Potent Inhibitors of Human Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, No. 5, 2127-2146, 2007.
- KOVRT, J. T.; BIGGE, C. F.; BRYANT, J. W.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CHI, L.; CODY, W. L.; DAHRING, T.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HAARER, S.; HEEMSTRA, R.; JANICZEK, N.; NARASIMHAN, L.;

- MCCLANAHAN, J.; PETERSON, J. T.; SAHASRABUDHE, V.; SCHAUM, R.; VAN HUIS, C. A.; WELCH, K. M.; ZHANG, E.; LEADLEY, R. J.; EDMUNDS, J. J. 'The Discovery of (2r,4r)-N-(4-Chlorophenyl)-N-(2-Fluoro-4-(2-Oxopyridin-1(2h)-Yl)Phenyl)-4-Methoxyproline-1,2-Dicarboxamide (Pd 0348292), an Orally Efficacious Factor Xa Inhibitor', *Chemical Biology & Drug Design*, v. 70, No. 2, 100-112, 2007.
- KOVRT, J. T.; FILIPSKI, K. J.; CODY, W. L.; BIGGE, C. F.; LA, F.; WELCH, K.; DAHRING, T.; BRYANT, J. W.; LEONARD, D.; BOLTON, G.; NARASIMHAN, L.; ZHANG, E.; PETERSON, J. T.; HAARER, S.; SAHASRABUDHE, V.; JANICZEK, N.; DESIRAJU, S.; HENA, M.; FIAKPUI, C.; SARASWAT, N.; SHARMA, R.; SUN, S. Y.; MAITI, S. N.; LEADLEY, R.; EDMUNDS, J. J. 'The Discovery of Glycine and Related Amino Acid-Based Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, No. 13, 4379-4392, 2006.
- LEE, Y. K.; PARKS, D. J.; LU, T.; THIEU, T. V.; MARKOTAN, T.; PAN, W.; MCCOMSEY, D. F.; MILKIEWICZ, K. L.; CRYSLER, C. S.; NINAN, N.; ABAD, M. C.; GIARDINO, E. C.; MARYANOFF, B. E.; DAMIANO, B. P.; PLAYER, M. R. '7-Fluoroindazoles as Potent and Selective Inhibitors of Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, No. 2, 282-297, 2008.
- MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; POUZIEUX, S.; CHOI-SLEDESKI, Y. M.; BECKER, M. R.; KLEIN, S. I.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V. 'Crystal Structures of Human Factor Xa Complexed with Potent Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, No. 17, 3226-3232, 2000.
- MARVIN - <http://www.chemaxon.com/>
- MERCURY CSD - <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/mercury/>
- NAVEGA, S. 'Princípios Essenciais do Data Mining', *Anais do Infoimagem*, 1-9. 2002
- PDB - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- PDB - Protein Data Bank Contents Guide: Atomic Coordinate Entry Format Description. Version 2.3 (1998). <http://www wwpdb.org/documentation/format2.3-0108-us.pdf>.
- PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- PINTO, D. J. P.; ORWAT, M. J.; KOCH, S.; ROSSI, K. A.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; HE, K.; XIN, B. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Discovery of 1-(4-Methoxyphenyl)-7-Oxo-6-(4-(2-Oxopiperidin-1-Yl)Phenyl)-4,5,6,7-Tetrahydro-1h-Pyrazolo 3,4-C Pyridine-3-Carboxamide (Apixaban, Bms-562247), a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, No. 22, 5339-5356, 2007.
- QLAO, J. X.; CHANG, C. H.; CHENEY, D. L.; MORIN, P. E.; WANG, G. Z.; KING, S. R.; WANG, T. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'SAR and X-Ray Structures of Enantiopure 1,2-Cis-(1r,2s)-Cyclopentylidiamine and Cyclohexylidiamine Derivatives as Inhibitors of Coagulation Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, No. 16, 4419-4427, 2007.
- RIOS-STEINER, J. L.; MURAKAMI, M. T.; TULINSKY, A.; ARNI, R. K. 'Active and Exo-Site Inhibition of Human Factor Xa: Structure of Des-Gla Factor Xa Inhibited by Nap5, a Potent Nematode Anticoagulant Protein from Ancylostoma Caninum', *Journal of Molecular Biology*, v. 371, No. 3, 774-786, 2007.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. "On Size of Active Site in Proteases .I. Papain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27, no. 2, 157-62, 1967.

SUPER DRUG DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superdrug/>

SUPER HAPTEN DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superhaptent/>

VAN HUIS, C. A.; BIGGE, C. F.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; NARASIMHAN, L. S.; SCHAUM, R. P.; ZHANG, E.; BRYANT, J. W.; HAARER, S.; JANICZEK, N.; LEADLEY, R. J.; MCCLANAHAN, T.; PETERSON, J. T.; WELCH, K. M.; EDMUNDS, J. J. 'Structure-Based Drug Design of Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as a Novel Series of Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors', *Chemical Biology & Drug Design*, v. 69, No. 6, 444-450, 2007.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. 'Improved Protein-Ligand Docking Using Gold', *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 52, No. 4, 609-623, 2003.

YE, B.; ARNAIZ, D. O.; CHOU, Y. L.; GRIEDEL, B. D.; KARANJAWALA, R.; LEE, W.; MORRISSEY, M. M.; SACCHI, K. L.; SAKATA, S. T.; SHAW, K. J.; WU, S. C.; ZHAO, Z. C.; ADLER, M.; CHEESEMAN, S.; DOLE, W. P.; EWING, J.; FITCH, R.; LENTZ, D.; LIANG, A.; LIGHT, D.; MORSER, J.; POST, J.; RUMENNIK, G.; SUBRAMANYAM, B.; SULLIVAN, M. E.; VERGONA, R.; WALTERS, J.; WANG, Y. X.; WHITE, K. A.; WHITLOW, M.; KOCHANNY, M. J. 'Thiophene-Anthranilamides as Highly Potent and Orally Available Factor Xa Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, No. 13, 2967-2980, 2007.

SUPER HAPTEN DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superhaptent/>

YOUNG, R. J.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CHAN, C.; CONVERY, M. A.; HUBBARD, J. A.; KELLY, H. A.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; ZHOU, P. 'Selective and Dual Action Orally Active Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, No. 10, 2927-2930, 2007.

Capítulo 3. DATA MINING

Uma parte importante deste trabalho foi a realização da busca em bancos de dados de estruturas de proteínas e as referências bibliográficas relacionadas com estas estruturas e também com as atividades de inibição. A consulta ao banco de dados foi realizada em abril de 2008. Como o número de dados é bastante significativo, e a extração de informações muito trabalhosa, mantivemos os dados obtidos até essa data, embora continuem sendo depositadas mais estruturas cristalográficas de complexos com o Fator X. Se os dados continuassem sendo atualizados, não seria possível concluir este trabalho. Este capítulo mostra a coleta de dados e as informações que foram extraídas e como foram se transformando em conhecimento acerca dos complexos formados entre os ligantes e a proteína da cascata de coagulação e a inibição da mesma. São apresentados os resultados obtidos para o Fator X totalizando a análise de 76 complexos cristalográficos, 70 deles com atividade inibitória descrita. A análise destes complexos encontra-se no desenvolvimento do presente capítulo, e com os dados que apóiam a discussão apresentados em forma de anexos. Também há uma seção onde são apresentados os dados dos ligantes do Grupo 3, conforme descrito no Capítulo 2 referentes a busca de ligantes realizada em bancos de dados.

Para não dificultar a leitura do texto, os dados, as informações e alguns dos resultados obtidos são apresentados em forma de anexos deste capítulo:

Anexo 3.1 Estruturas Cristalográficas para o Fator X

Anexo 3.2 Posicionamento do Ligante Cristalográfico no Sítio Ativo do Fator X

Anexo 3.3 Atividade e Ocupação dos Ligantes Cristalográficos no Sítio Ativo do Fator X

Anexo 3.4 Estruturas Tridimensionais dos Ligantes

3.1 ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DA SERINO-PROTEASE FATOR X

3.1.1 Coleta de dados

A busca foi realizada nos bancos de dados PDB e PDBSum. Para a serino-protease Fator X, a busca resultou em 88 estruturas cristalográficas, sendo que foram descartadas uma por não ser um complexo, 6 por serem estruturas resultantes de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear, 4 por não serem complexos com pequenas moléculas, uma porque era bovina. Dessa forma, a amostra de estudo tratou de 76 complexos cristalográficos de Fator X com pequenas moléculas que atuam como inibidores de potência variada. No Anexo 3.1 são apresentados na Tabela 3.1 os códigos pdb das estruturas, os ligantes cristalográficos em forma plana e a referência relacionada com a estrutura. Em cada caso, também foram obtidas do banco de dados as coordenadas cristalográficas dos complexos “Fator X-ligante” que foram utilizadas nas etapas posteriores, para extração de mais dados acerca do posicionamento e interações realizadas entre a proteína e o ligante (Anexos 3.2) e relação com a atividade de inibição (Anexo 3.3).

A Figura 3.1 mostra os códigos pdb das estruturas cristalográficas analisadas para o Fator X .

Fator X: códigos pdb dos complexos cristalográficos									
1ezq	1f0r	1f0s	1fax	1fjs	1g2m	1ioe	1iqe	1iqf	1iqg
1iqh	1iqi	1igj	1iqk	1iql	1iqm	1iqn	1ksn	1kye	1lpg
1lpk	1lpz	1lpd	1mq5	1mq6	1msx	1nfu	1nfw	1nfx	1nfy
1v3x	1wu1	1xka	1xkb	1z6e	2bmg	2boh	2bok	2bq6	2bq7
2bqw	2cji	2d1j	2ei6	2ei7	2ei8	2fzz	2g00	2h9e	2j2u
2j4i	2j34	2j38	2j94	2j95	2jkh	2p3t	2p3u	2p16	2p93
2p94	2p95	2phb	2pr3	2q1j	2ra0	2uwi	2uwo	2uwp	2vh0
2vh6	2w3i	2w3k	2w26	3cen	3cs7				

Figura 3.1 Códigos pdb dos complexos cristalográficos extraídos do PDB e PDBSum. Em destaque está a estrutura da proteína utilizada no estudo de docking descrito no Capítulo 4.

3.1.2 Visualização Gráfica e Posicionamento do Ligante Cristalográfico no Sítio Ativo

Utilizando as coordenadas cristalográficas obtidas nos bancos de dados, foi possível a visualização gráfica dos complexos. Com o auxílio dos programas gráficos, foi possível observar o posicionamento do ligante cristalográfico dentro do sítio ativo. O procedimento foi realizado com todas as 76 estruturas do Fator X. Para facilitar a visualização do posicionamento do ligante, foram preparadas figuras mostrando a proteína em representação tipo superfície. A superfície foi colorida de forma a mostrar os subsítios Sn e Sn' da proteína de acordo com a nomenclatura de Schechter & Berger (1967), conforme exemplificado na Figura 3.2. Esta representação gráfica foi feita para todas as estruturas, utilizando a mesma convenção de cores dos subsítios: S1 (verde), S1' (verde-claro), S2 (azul escuro), S2' (azul claro), S3 (roxo), S3' (roxo-claro) e S4 (laranja).

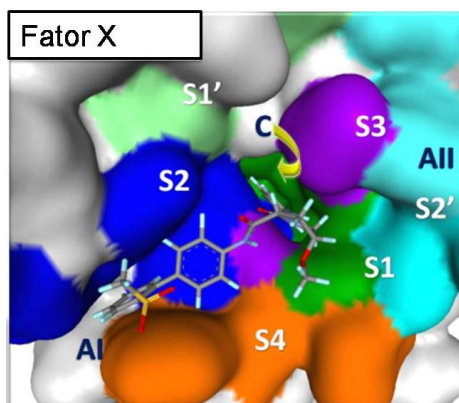


Figura 3.2 Representação do sítio com seus subsítios coloridos diferencialmente para a serino-protease Fator X: S1 (verde), S1' (verde-claro), S2 (azul escuro), S2' (azul claro), S3 (roxo), S3' (roxo-claro) e S4 (laranja). Na figura também são apontadas regiões que foram denominadas C (cavidade profunda), AI (engloba subsítios S2 e S4) e AII (S1 e S3).

Na Tabela 3.1 são apresentados os aminoácidos que fazem parte de cada subsítio do Fator X.

Tabela 3.1 Aminoácidos componentes dos subsítios segundo nomenclatura das serino-proteases

S1	S1'	S2	S2'	S3	S3'	S4
Asp189	Phe41	Glu97	Arg143	Gln192	Asn35	Phe174
Ala190	Cys42	Thr98	Glu147	Gly216	Lys62	Glu217
Cys191	His57	Tyr99	Lys148			Arg222
Val213	Cys58	Ser214	Phe151			Lys224
Gly219		Trp215				
Cys220		Gly226				
Ala221		Ile227				
Tyr228						

As figuras para todos os complexos cristalográficos do Fator X mostrando a posição do ligante em relação aos subsítios são apresentados no Anexo 3.2 e descritas na próxima seção.

3.1.3 Visualização Gráfica, Posicionamento e Interações no Sítio Ativo

Os programas gráficos utilizados permitiram estabelecer quais aminoácidos estavam próximos do ligante e os átomos do ligante que interagem com os átomos da proteína. Foi possível medir distâncias, ângulos, centróides e tipo de interação (ligação de

hidrogênio, de van der Waals, interações tipo π). Com todo este trabalho de visualização foi possível estabelecer um padrão de posicionamento no sítio bem como as interações entre o ligante e a proteína. Todos os ligantes estão posicionados no sítio ativo do Fator X e fazem interações esperadas com os aminoácidos da tríade catalítica desta protease. Além disso, foi constatado que olhando de frente para o sítio ativo, com a região S2 à esquerda e S2' à direita, aparece um padrão para o modo de ligação dos ligantes cristalográficos no sítio ativo. A Figura 3.3 apresenta um exemplo resultante desta observação na tela gráfica, onde foram monitoradas a posição do ligante e suas interações. Na parte (a) dessa figura, está representada a superfície sobre o ligante e alguns aminoácidos do sítio ativo e na parte (b) aparece a representação da superfície da proteína, colorida de acordo com os subsítios, e o ligante está posicionado da mesma forma que em (a). Na Figura 3.3 (a) o ligante cristalográfico se encontra dentro do sítio ativo com uma parte que fica inserida dentro de uma região da proteína que é uma cavidade (C), ao fundo da qual está o aminoácido Tyr228. Este aminoácido desempenha um papel importante nas interações com o ligante, principalmente nos casos em que o ligante apresenta um átomo de cloro que faz interações π com este aminoácido. Na Figura 3.3 (b) esta região não fica visível, mas aparece a entrada da cavidade que está marcada pela legenda. Outra região que merece destaque é a que foi denominada AI, onde é possível observar na parte (a) o aminoácido Y99 por cima do ligante e a F174 embaixo. Na Figura 3.3 (b) observa-se esta mesma região e pode-se perceber que o ligante fica inserido dentro de uma reentrância com uma orientação perpendicular à cavidade. Do outro lado, a região que foi chamada de AII, apresenta certa diversidade, uma vez que dependendo da orientação das cadeias laterais dos aminoácidos, pode

sofrer algumas variações, mas aparece uma reentrância mais rasa que a da região AI, e com uma orientação quase paralela à da cavidade.

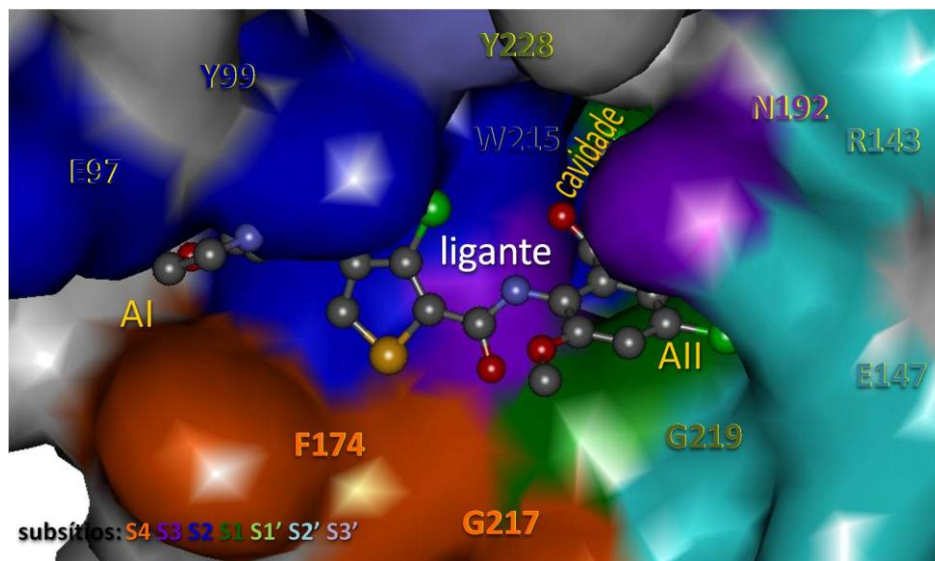
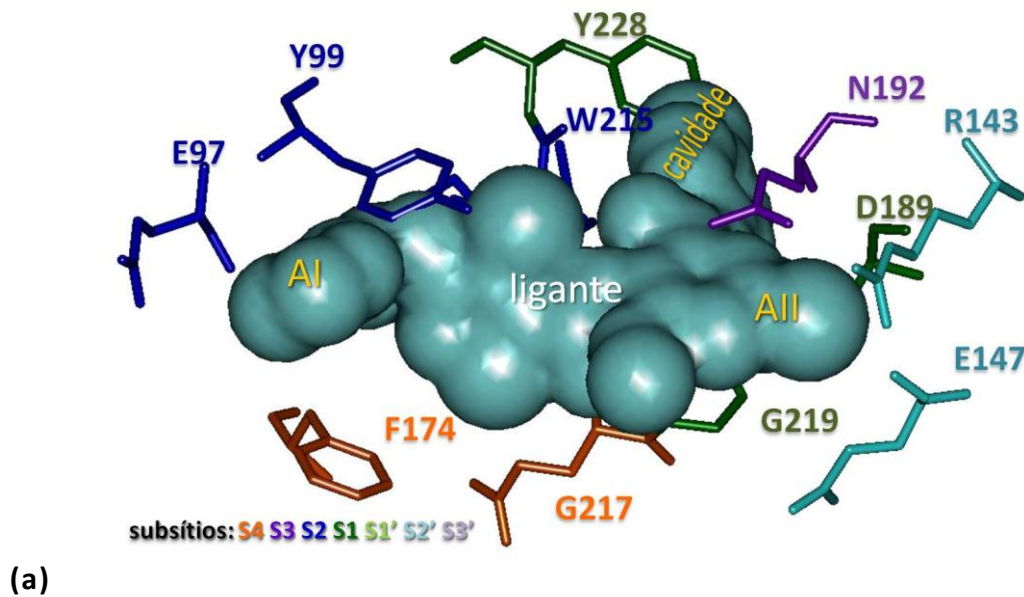


Figura 3.3 Representação do sítio com seus subsítios coloridos diferencialmente na enzima FX. S1 (verde), S1' (verde-claro), S2 (azul escuro), S2' (azul claro), S3 (roxo), S3' (roxo-claro) e S4 (laranja). **(a)** Na parte de cima o ligante está sob a superfície, e os aminoácidos estão coloridos de acordo com os subsítios ao qual pertencem. **(b)** Na parte de baixo, a proteína está representada na forma de superfície.

No Anexo 3.2, estão representados todos os 75 complexos cristalográficos, com a idéia de colocar os ligantes em posição equivalente, e os subsítios estão coloridos conforme apresentado na Tabela 3.1. No topo de cada figura da Tabela 3.2.a (Anexo 3.2) está indicado o código pdb do complexo cristalográfico. Segundo a análise decorrente da observação em tela gráfica, verifica-se que os ligantes ocupam uma região em que há uma cavidade (C) conforme apresentado na Figura 3.3, ao fundo da qual se encontra o aminoácido Tyr 228 que, na maioria dos casos, realiza interações com o ligante. Os ligantes também ocupam a região que foi denominada de AI (que envolve os subsítios S2 e S4). Nessa região a presença dos aminoácidos Tyr99 e Trp 215 (S2) e Phe174, favorece as interações π com os ligantes. A região que foi denominada de AII, com a presença da Gln192, é a que se apresenta com maior diversidade, pela presença de aminoácidos com cadeias alifáticas longas (Arg143, Gln192) que podem adotar uma variedade de conformações. Esta diversidade faz com que a reentrância que aparece na Figura 3.3 na região AII, possa aparecer de forma mais ou menos profunda.

Quando se trata de proteases, sempre se relaciona a posição do ligante com a posição nos subsítios e a atividade inibitória com a ocupação dos subsítios. Ludeman e cols. (2003) destacam que na maioria dos casos, o inibidor ocupa os subsítios Sn que também estão relacionados com a especificidade e pouco se sabe do papel dos subsítios Sn'. Na Figura 3.3, por exemplo, entre os aminoácidos que estão a distâncias menores que 4 Å do ligante somente aparecem os Sn (S1 em verde, S2 em azul escuro, S3 em roxo escuro e S4 em laranja) e apenas o S2' (azul claro).

Na busca de trazer maior entendimento sobre o posicionamento do ligante \times atividade, todos os dados de posição, interações e atividade, foram colocados na Tabela

3.2 onde são apresentados os resultados da análise gráfica realizada para todos os 75 complexos cristalográficos. Os dados de atividade estão listados no Anexo 3.3 cujos dados foram extraídos da literatura e apresentados como K_i e/ou IC_{50} . As referências são colocadas porque nem sempre são as mesmas que tratam das estruturas cristalográficas.

Para cada complexo cristalográfico, cujo código é apresentado na primeira coluna, foi feita a observação em programa de visualização e construída uma figura mostrando a posição relativa do ligante dentro das regiões C (cavidade), A1 (à esquerda na figura) e A2 (à direita na figura). Nas colunas seguintes, são apresentados (quando encontrados), os dados de atividade em K_i ou IC_{50} , na última coluna.

Em todos os casos, os ligantes ocupam a região da cavidade (C). Quando o ligante apresenta um átomo de Cl em sua extremidade, interage com a Tyr228, na maioria dos casos fazendo interações π . Este é o caso dos complexos **1ioe, 1iqe, 1iqf, 1iqg, 1iqh, 1iqi, 1iqj, 1iqk, 1iql, 1iqm, 1iqn, 1mq5, 1mq6, 1nfu, 1nfw, 1nfx, 1nfy, 1v3x, 1wu1, 2boh, 2bq6, 2bqw, 2cji, 2d1j, 2ei6, 2ei7, 2ei8, 2j2u, 2j4i, 2j34, 2j38, 2j94, 2j95, 2jkh, 2p3t, 2p3u, 2p93, 2p94, 2p95, 2phb, 2pr3, 2q1j, 2uwl, 2uwo, 2uwp, 2vh0, 2vh6, 2w3i, 2w26, 2w3k, 3cen, 3ens**, em um total de 52 estruturas. Quando o grupo que aparece na extremidade do ligante é uma amidina ou NH_2 , a interação com a proteína ocorre por meio do Asp189, como ocorre com os complexos **1ezq, 1f0r, 1fax, 1fjs, 1g2m, 1ksn, 1lpg, 1lpk, 1lpz, 1lqd, 1msx, 1xka/1xkb, 1z6e, 2bmg, 2bok, 2fzz, 2ra0, 3liw (1kye)** em um total de 22 estruturas. Outros não tem cloro nem amidina/ NH_2 : **1f0s, 2bq7, 2g00, 3cs7**, mas interagem também com Asp189 ou Tyr228 e **2p16**, que interage com os dois aminoácidos, Asp189 e Tyr228. Maiores detalhes sobre as interações são apresentados na Tabela 3.3.a.4 do Anexo 3.3.

Para a região AI, de forma geral, todos os compostos fazem interações tipo π com os aminoácidos Tyr99 e Trp215 do subsítio S2 e com a Phe174, do subsítio S4. As exceções são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Exceções de ocupação da Região AI

Código	Y99	W215	F174	E97	
1f0r		x	x		interagem nos subsítios S2 e S4
1f0s		x	x		
1lqd		x	x		
2uwl		x	x		
2uwo		x	x		
2uwp		x	x		
2vh0		x	x		
2vh6		x	x		
2ei7	x		x		
2ei8	x		x		
1nfu			x		interagem nos subsítios S2 ou S4
2w26	x	x			
2w3k	x	x			
3cen	x	x			interagem nos subsítios S2 e S4 mas com E97
1fax	x	x	x	x	
1msx	x	x	x	x	

Quando o foco está na região AI é difícil estabelecer um padrão. Na Tabela 3.3.a.4 do Anexo 3.3 há uma breve descrição das interações. O principal aminoácido nesta região é a Gln192, que junto com a Arg143 e o Glu147, formam a reentrância que se observa na Figura 3.3. Na maioria dos casos a Gln192 fica paralela ao ligante quando em uma posição esticada. Para poder fazer uma análise da posição e interações dos ligantes neste sítio, os ligantes foram sendo separados em grupos por algumas características, que serão discutidas mais adiante nesta mesma seção.

Uma vez analisado o posicionamento e as interações, o próximo passo foi o de tentar verificar a existência ou não de correlação entre o posicionamento e a capacidade inibitória dos ligantes. Os dados de inibição são apresentados na Tabela 3.3.a.1, 3.3.a.2 e

3.3.a.3 do Anexo 3.3. Na Tabela 3.3.a.3, são apresentados o modo de ligação dos 76 ligantes cristalográficos no sítio do Fator X com um desenho mostrando seu posicionamento no sítio, acompanhado de uma breve descrição dos aminoácidos da proteína que interagem com o ligante, a atividade inibitória, extraída de dados da literatura bem como as referências de onde foram extraídas as informações. Na confecção das figuras procurou-se manter posição similar dos ligantes para facilitar comparações.

O sítio de ligação dos compostos no Fator X apresenta algumas características que podem estar relacionadas com a sua estrutura tridimensional. A Figura 3.4 mostra um esquema deste sítio.

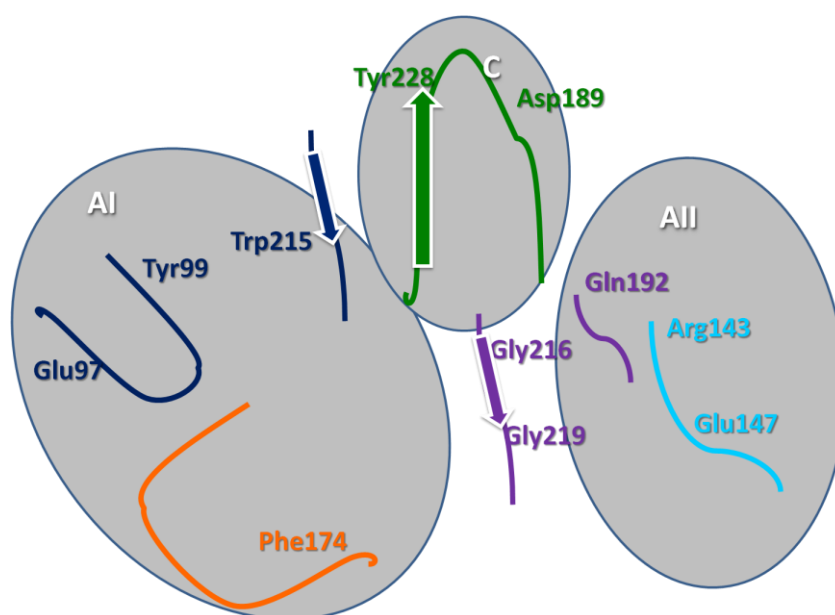


Figura 3.4 Esquema do sítio de ligação do Fator X, com as três regiões C, AI e AII. Os nomes dos aminoácidos estão coloridos de acordo com os subsítios.

Na Figura 3.4 o sítio de ligação foi dividido em 3 partes, apresentando a região C da cavidade, que contém aminoácidos do subsítio S1. Quando foi feita a análise dos

ligantes em relação à cavidade, observou-se que na maioria dos casos, os ligantes ou interagem com a Tyr228 ou com Asp189. Nesse caso é importante ressaltar que a Tyr228 pertence a uma fita β enquanto que o Asp189 pertence a uma região de loop. A parede da cavidade da qual faz parte a Tyr228 é mais rígida que o outro lado da cavidade.

Quando se olha para a Figura 3.3 pode se perceber que a região AI tem uma reentrância. Na figura a parte de cima está pintada de azul (S2) e a debaixo em laranja (S4). Na Figura 3.4 o esquema desta região mostra que o Trp215 (S2), pertence a uma fita β , enquanto que os outros aminoácidos pertencem a regiões de loop. A Tyr99 e o Glu97 pertencem ao mesmo loop, enquanto que a região onde está a Phe174 pertence a outro loop.

Apesar de AI ser constituído de regiões flexíveis, o fato de contar com aminoácidos Tyr99, Trp215 e Phe174, faz com que seja uma área propensa a realizar interações π com os ligantes, o que fortalece a possibilidade de um ligante ocupar esta região.

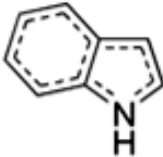
Já a região AII, é formada exclusivamente por estruturas de loop, o que a torna muito variável. Além disso, soma-se o fato de que, os aminoácidos que fazem interações com os ligantes, pertencem a loops diferentes, um onde está a Gln192 (S3) e outro onde estão a Arg143 e o Glu147 (S2'). As cadeias laterais destes aminoácidos também são flexíveis, o que torna esta região AII, a mais variável entre as três.

Aparece ainda na Figura 3.4, as Gly216 e Gly219. As duas estão posicionadas sobre uma fita (Gly219 na extremidade da fita), e alinhadas quase paralelamente com Gln 192. Parece que a interação do ligante com estes dois aminoácidos ajuda a direcionar o ligante para se colocar paralelo à Gln192 e atingir a entrada da cavidade.

Com uma variabilidade grande o papel da região All quanto ao posicionamento e a atividade inibitória do ligante exigiu estudar também um grande leque de possíveis explicações.

Como comentado anteriormente, o grupo de ligantes cristalográficos foi separado conforme a existência de certos grupos funcionais. Para iniciar, os grupos que continham um anel indol, foram agrupados. A Tabela 3.4, apresenta este grupo de ligantes com sua atividade inibitória.

Tabela 3.3 Grupo de exceções I: ligantes ocupam três regiões

Código pdb	Ki(nmol/L)	Grupos	Estrutura que ocupa All
2bq7	89.000	OCH3	
1lpg	82.000	amidina	
1lpk	28.000	amidina	
1lpz	25.000	amidina	
1lqd	9.000	amidina	
2boh	3.000	Cl	
2bqw	3.000	Cl	
2bq6	0.070	Cl	

Os ligantes **1lpg**, **1lpk**, **1lpz** e **1lqd** apresentam um anel indol que ocupa a região All e na região da cavidade estas moléculas apresentam amidinas interagindo com o Asp189, e isso parece não resultar em uma contribuição favorável para a inibição. Quando comparados os ligantes que contém dois anéis conjugados, além destes, encontram-se também **2bq6**, **2bq7**, **2boh** e **2bqw**.

Comparando agora os ligantes **2bq6** e **2bq7** que possuem estruturas similares, mas com atividades de inibição bem diferentes, percebe-se que a diferença crucial ocorre na cavidade pois **2bq6**, que é um inibidor potente, tem um cloro interagindo com a Tyr228, o que não acontece com **2bq7**. Quando se faz uma comparação desse grupo como um todo, verifica-se que os que têm atividade mais favorável são os que têm um cloro interagindo

com a Tyr228 na cavidade (Tabela 3.4). A interação com a Tyr228 (que pertence a uma fita β) parece ser mais favorável que a interação com Asp189 (que pertence a uma região flexível de loop).

Outro grupo estudado foi o dos ligantes que continham grupos sulfona. Dentre os 76 complexos estudados, 28 continham grupo sulfona. A Figura 3.5 mostra a atividade de inibição de cada composto. Observa-se que a grande maioria não tem boa atividade. Somente 4 destes compostos tem boa atividade: **1nfy**, **1nfw**, **2j4i** e **2vh6** o que representa menos de 15% de compostos com boa atividade inibitória. Quando foi feita a análise do subgrupo **1iqm**, **1iqi**, **1iqj**, **1iqk**, **1iqi** (Figura 3.5.c) e **1iqf** (Figura 3.5.b), não foi possível encontrar com clareza uma relação entre posicionamento, interações e atividade.

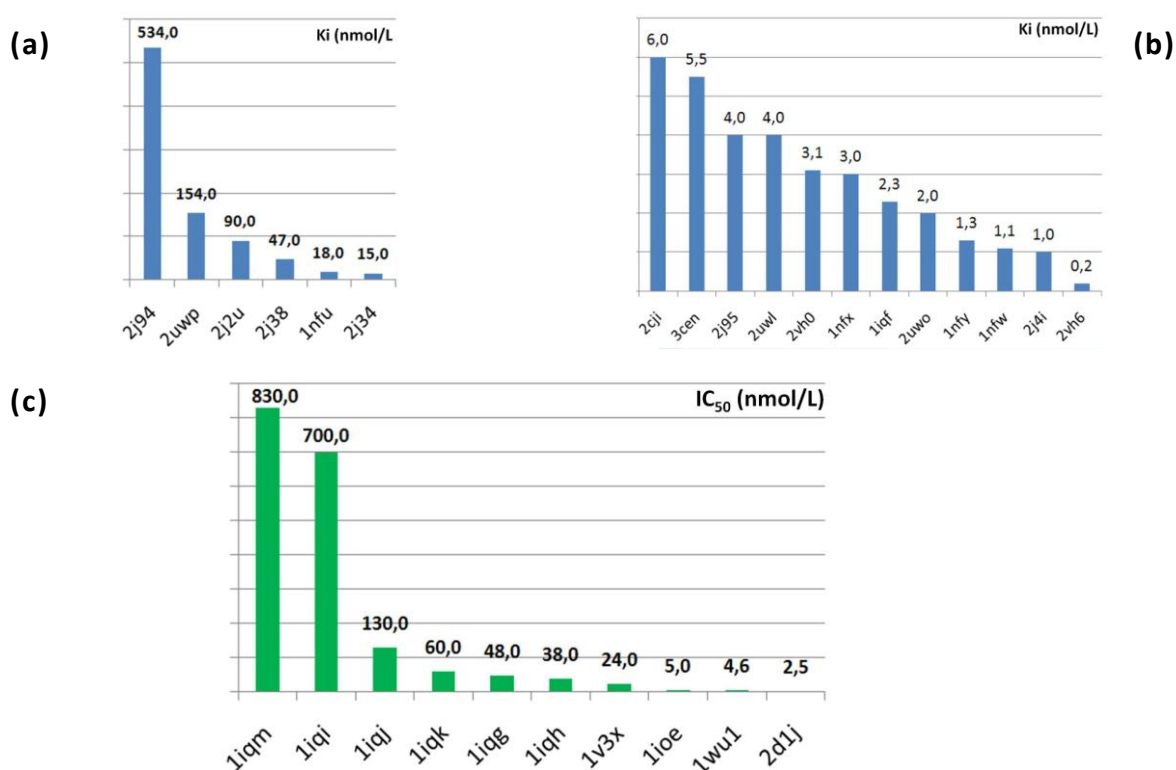


Figura 3.5 Gráfico mostrando as atividades de cada ligante que possui um grupo sulfona na região All quando complexado no Fator X. Os valores são apresentados em nmol/L para Ki ou IC₅₀. **(a)** 534 < Ki < 15 nmol/L; **(b)** 6 < Ki < 0,2 nmol/L; **(c)** 830 < IC₅₀ < 2,5 nmol/L.

A Tabela 3.5 mostra um quadro de interações entre os ligantes do subgrupo mencionado. A única sugestão que aparece no momento é que há uma tendência de os compostos mais ativos desta família se aproximarem mais da Tyr228, mas que não pode ser tomado como regra pois quando se faz o mesmo tipo de análise com **2uwo**, **2uwl** e **2uwp** ocorre exatamente o oposto. Quando se considera da mais ativa para a menos ativa as distâncias são 3,881 Å (2,0 nmol/L, **2uwo**), 3,932 Å (4,0 nmol/L, **2uwl**), 3,867 Å (154,0 nmol/L, **2uwp**).

Tabela 3.4 Interações entre ligantes com grupos sulfona e aminoácidos.

código pdb	IC50 (nmol/L)	Glu97	Thr98	Tyr99	Phe174	Asp189	Ala190	Cys191	Gln192	Ser195	Val213	Ser214	Trp215	Gly216	Glu217	Gly219	Cys220	Arg222	Gly226	Ile227	Tyr228	
1iqf	2,3*																					3.47
1ioe	5																					3.48
1iqh	38																					3.57
1iqg	48																					3.58
1iqk	60																					3.45
1iqj	130																					3.58
1iqi	700																					3.84
1iqm	830																					3.83

Os quadrados pintados significam que há interação e os mais escuros que há ligação de hidrogênio. Na última coluna está apresentada a distância entre a centróide da Tyr228 e o átomo de cloro da extremidade do ligante posicionada na cavidade.

Considerando o número de compostos com grupo sulfona próximos à Gln192, é possível sugerir que a presença deste grupo, nessa posição, não contribui para uma melhor resposta inibitória.

O estudo para os demais ligantes para os quais havia na literatura o dado da atividade de inibição (Tabela 3.6) permite sugerir fortemente que se Cl, O ou F ocupam a posição de interação (IP) com Gln192, isto induz a uma boa atividade inibitória do ligante, se o O não pertence a um grupo SO₂. Observa-se que os de menor atividade não possuem nessa posição um átomo de Cl, F ou O para interagir com a Gln192. Para os que

apresentavam Cl, F ou O a atividade é muito boa, porém em três casos (**2p94**, **2p95**, **2w26**) a regra não se aplicou.

Tabela 3.5 Ocupação da posição de interação (IP) do ligante para interagir com Gln192

código pdb	Ki (nmol/L)	presença de Cl, O ou F para interagir com Gln 192	código pdb	Ki (nmol/L)	presença de Cl, O ou F para interagir com Gln 192
1msx	1400.000	tem F mas nao interage com	2p94	0.670	
2bok	280.000		2p95	0.430	
1fax	41.000		2w26	0.40	
1g2m	40.000		1ksn	0.400	O
2bmj	18.000	carga blindada pelo metil	1z6e	0.190	F
2ra0	15.90	CO e NH ₂ (que interage com E147)	2g00	0.18	F
2jkh	9.00		1fjs	0.110	O
2p93	1.50		2p16	0.08	O
1mq5	1.000	Cl	2fzz	0.030	F
1ezq	0.900	O	3cs7	0.021	F
1mq6	0.900	Cl	2p3u	0.01	Cl
			2p3t	0.005	Cl

O destaque em cinza é para os compostos de baixa atividade, em amarelo o destaque é para os que não seguem a regra.

De toda esta análise é possível constatar algumas características sobre os complexos cristalográficos analisados. Na região da cavidade foi observado que a extremidade da molécula deve fazer interação com Tyr228 ou Asp189. Como a Tyr 228 está posicionada em uma região mais rígida de fita β , parece existir em alguns casos uma preferência para uma atividade inibitória melhor. O ligante também interage com os aminoácidos da região AI (formada por aminoácidos do subsítio S2-azul e S4-laranja), pela ampla possibilidade de realizar interações π . Na cavidade (verde), as principais interações observadas foram com a Tyr228. A presença de átomos de Cl na extremidade do ligante parece facilitar o posicionamento do ligante em C e em alguns casos uma distância mais curta na interação Cl-centróide Tyr228, pareceu favorecer a atividade inibitória. De uma forma geral parece que, se o tamanho do ligante permitir, ele interage com estas duas regiões de maneira padrão. Já para a região All, formada por aminoácidos de cadeias

longas (Gln192, Arg143, Glu147), com muitas possibilidades de variação de ângulos torsionais, e ainda mais, em regiões de loop da proteína, não foi possível observar um padrão, mas sim extrair algumas informações quando a posição e correlação com capacidade de inibição. O “caminho” do ligante (linha tracejada na Figura 3.6) parece determinado por duas posições de interações definidas (C e AI). Conforme discutido anteriormente (Figura 3.4), as duas glicinas (216 e 219) alinhadas com a Gln192, formam um túnel pelo qual passa o ligante. Os aminoácidos dos subsítios Sn' parecem não interferir na atividade nem em uma definição de padrão ou modo de ligação.

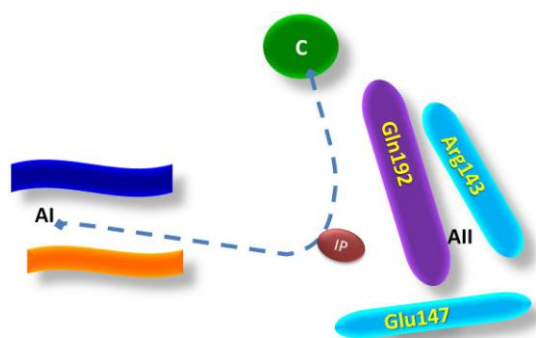


Figura 3.6 Regiões do Fator X para interação com os ligantes.

Sobre a região AII, ainda não é possível estabelecer um padrão geral para o melhor inibidor. Pode-se por outro lado, tendo como base as observações deste trabalho, sugerir alguns pontos para obter melhores resultados. A região IP da Figura 3.6, indica um ponto em que a presença de certos átomos ou grupos funcionais podem interferir no potencial de inibição. Os resultados mais desfavoráveis foram observados quando IP é ocupada por anéis indol ou grupo SO_2 , embora tenha sido observado algum ligante de boa capacidade de inibição. No caso do anel indol a relação foi de 1/8, e no de SO_2 , 4/28. Já a presença de átomos de Cl, O ou F nesta posição, parece estar relacionada com boas atividades de inibição (12/15).

3.2 LIGANTES

No Capítulo 1 foi feita uma descrição sobre o uso de anticoagulantes e principalmente o uso da varfarina, um composto da família das cumarinas que são compostos mais baratos, viáveis e de administração oral. Um dos objetivos do trabalho foi estudar como estes compostos cumarínicos inibem o FXa, uma vez que a inibição deste fator produz menos efeitos colaterais na terapia anticoagulante.

Dessa forma optou-se por estudar ligantes cumarínicos para formarem compostos com o Fator Xa (alvo preferencial). Para conseguir uma base de compostos para este estudo foram consultados dois bancos de dados resultando em um grupo que no Capítulo 2 foi chamado de Grupo 3 ou Grupo de estudo. Este grupo também poderia ser chamado de grupo cego, pois a única informação disponível sobre estes ligantes era sua estrutura tridimensional. Não havia informações sobre atividade ou modo de ligação nas proteínas estudadas.

Grupo 3 ou de estudo: Neste caso não havia nem a estrutura cristalográfica do complexo nem dados de atividade. Baseados em buscas utilizando a palavra-chave **warfarin** no CSD (banco de estruturas cristalográficas), no SuperHapten Database, SuperDrug e PDBSum foram selecionadas estruturas tridimensionais apresentadas no Anexo 3.4.

Grupo 2 ou de teste: Neste caso, foram utilizados alguns dos ligantes do trabalho de Frederick et al. (2005), em que foram sintetizados compostos cumarínicos e apresentadas as atividades de inibição no Fator X. Esse grupo permitiu obter subsídios para o entendimento de posicionamento, interações e requisitos para a atividade de inibição desta família de ligantes.

Com base no aprendizado sobre o Fator X e interações dos ligantes, passou-se ao estudo de docking, de ligantes cumarínicos, descritos no Capítulo 4.

Anexo 3.1. ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS PARA O FATOR X

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína Fator X

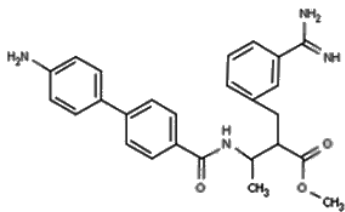
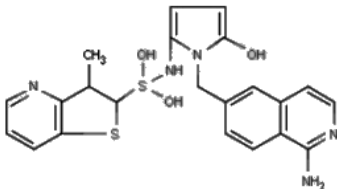
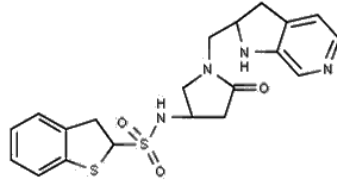
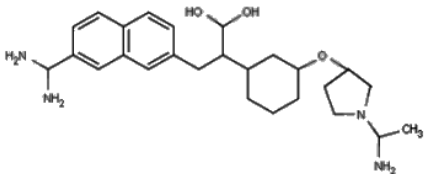
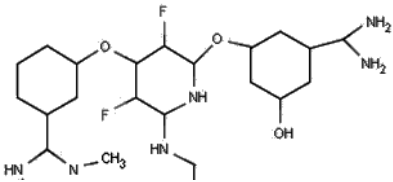
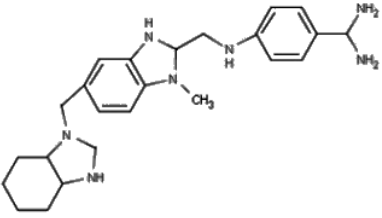
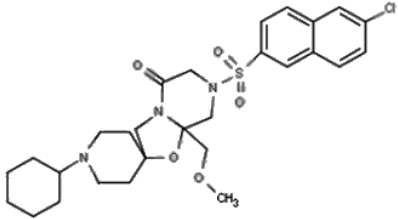
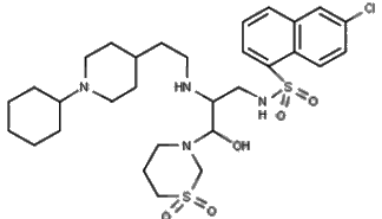
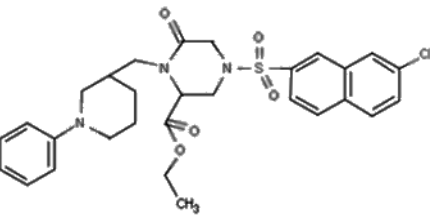
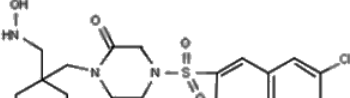
Código	Ligante do complexo cristalográfico FX	Estrutura
	Referência	
1ezq	3-[(3'-aminomethyl-biphenyl-4-carbonil)-amino]-2-(3-carbamimidoyl-benzyl)-butyric acid methyl Ester	
	Maignan et al. (2000)	
1f0r	thieno[3,2-b]pyridine-2-sulfonic acid[1-(1-amino-isoquinolin-7-ylmethyl)-2-oxo-pyrrolidin-3-yl]-amide	
	Maignan et al. (2000)	
1f0s	thieno[3,2-b]pyridine-2-sulfonic acid [2-oxo-1-(1h-pyrrolo[2,3-c]pyridin-2-ylmethyl)-pyrrolidin-3-yl]-amide	
	Maignan et al. (2000)	
1fax	(2S)-3-(7-carbamimidoylnaphthalen-2-yl)-2-[4-(((3R)-1-[(1Z)-ethanimidoyl]pyrrolidin-3-yl)oxy)phenyl]propanoic acid	
	Brandstetter et al. (1996)	
1fjs	n-[2-[5-[amino(imino)methyl]-2-hydroxyphenoxy]-3,5-difluoro-6-[3-(4,5-dihydro-1-methyl-1h-imidazol-2-yl)phenoxy]pyridin-4-yl]-n-methylglycine	
	Adler et al. (2000)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (*continuação*)

1g2m	4-[[1-methyl-5-(2-methyl-benzoimidazol-1-ylmethyl)-1H-benzoimidazol-2-ylmethyl]-amino]-benzamide Nar et al. (2001)	
1hcg	FX sem ligante Padmanabhan et al. (1993)	Sem ligante
1ioe	(-)-7-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]tetrahydro-8a-(methoxymethyl)-1'-(4-pyridinyl)-spiro[5h-oxazolo[3,2-a]pyrazine-2(3h),4'-piperidin]-5-one Schultz-Heienbrok, et al. (2004)	
1iqe	4-[(2r)-3-[[[6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]amino]-1-oxo-2-[[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]amino]propyl]-thiomorpholine-1,1-dioxide A ser publicado, Matsusue et al.	
1iqf	(2r)-4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-6-oxo-1-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]-2-piperazinecarboxylic acid ethyl ester A ser publicado, Matsusue et al.	
1iqg	4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-1-[[4-hidroxyiminomethyl-1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]piperazinone	

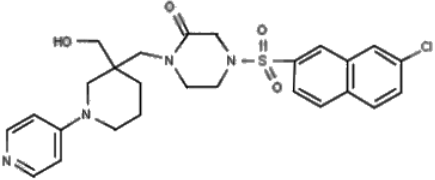
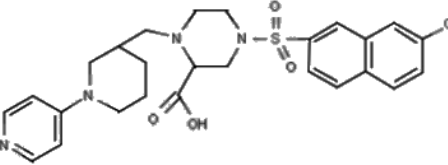
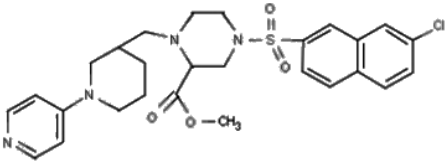
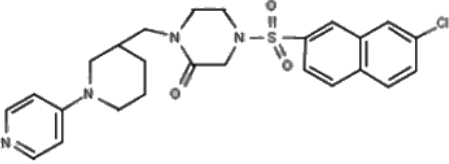
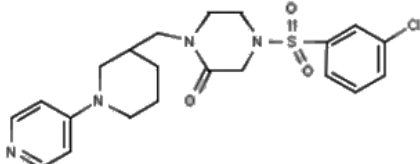
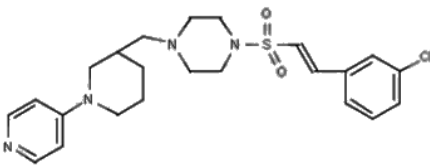
	A ser publicado, Matsusue et al.	
Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (<i>continuação</i>)		
1iqh	4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-1-[[4-hydroxymethyl-1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]piperazinone	
	A ser publicado, Matsusue et al.	
1iqi	4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-1-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]-2-piperazinecarboxylic acid	
	A ser publicado, Matsusue et al.	
1iqj	4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-1-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]-2-piperazinecarboxylic acid ethyl ester	
	A ser publicado, Matsusue et al.	
1iqk	4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-1-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl] piperazinone	
	A ser publicado, Matsusue et al.	
1iql	4-[[[(1e)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]sulfonyl]-1-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]piperazinone	
	A ser publicado, Matsusue et al.	
1iqm	1-[[[(1e)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]sulfonyl]-4-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]piperazine	
	A ser publicado, Matsusue et al.	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (*continuação*)

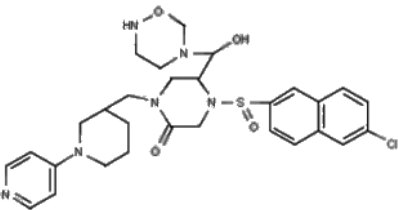
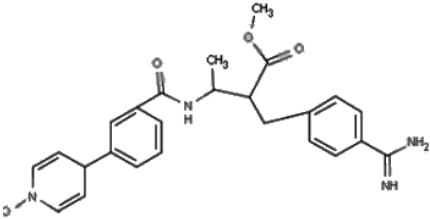
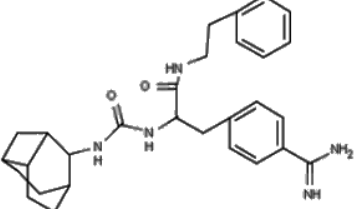
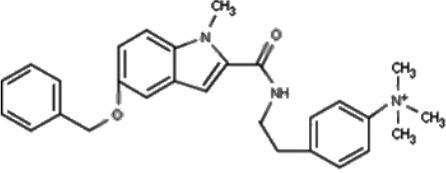
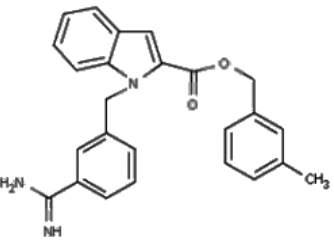
1iqn	4-[[4-[(6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl]-6-oxo-1-[[1-(4-pyridinyl)-4-piperidinyl]methyl]-2-piperazinyl]carbonyl]morpholine	
	A ser publicado, Matsusue et al.	
1kig	rTAP(peptide recombinante anticoagulante) - FX Bovino	
	Wei et al. (1998)	TAP (ligante polipeptídico)
1ksn	methyl-3-(4'-n-oxopyridylphenoyl)-3-methyl-2-(m-amidinobenzyl) – propionate	
	Guertin et al. (2002)	
1kye (3liw)	(R)-2-(3-adamantan-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-n-phenethyl-propionamide	
	Mueller et al.. (2003)	
1lpg	[4-({[5-benzyloxy-1-(3-carbamimidoyl-benzyl)-1h-indole-2-carbonyl]-amino}-methyl)-phenyl]- trimethyl-ammonium	
	Matter et al. (2002)	
1lpk	1-(3-carbamimidoyl-benzyl)-1h-indole-2-carboxylic acid 3- carbamimidoyl-benzylester	
	Matter et al. (2002)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (*continuação*)

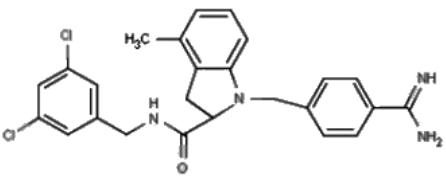
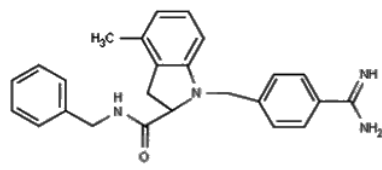
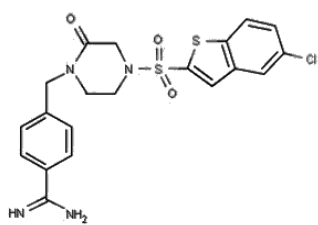
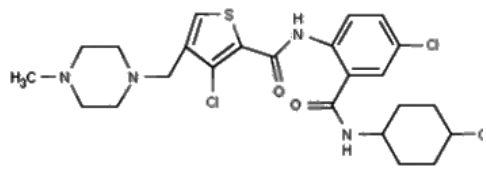
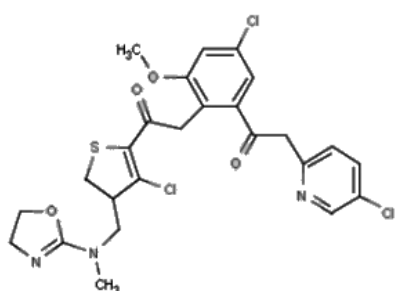
1lpz	1-(3-carbamimidoylbenzyl)-N-(3,5-dichlorobenzyl)-4-methyl-1H-indole-2-carboxamide	
	Matter et al. (2002)	
1lqd	1-(3-carbamimidoyl-benzyl)-4-methyl-1h-indole-2-carboxylic acid 3,5-dimethyl-benzylamide	
	Matter et al. (2002)	
1nfy	4-({4-[(6-chloro-1-benzothien-2-yl)sulfonyl]-2-oxopiperazin-1-yl)methyl}benzenecarboximidamide	
	Maignan et al. (2003)	
1p0s	gamma-carboxy-glutamic acid	Dominio GLA da proteína
	Wang et al. (2003)	
1mq5	3-chloro-n-[4-chloro-2-[[[4-chlorophenyl)amino]carbonyl]phenyl]-4-[[4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-2-thiophenecarboxamide	
	Adler et al. (2002)	
1mq6	3-chloro-N-[4-chloro-2-[[[5-chloro-2-pyridinyl)amino]carbonyl]-6-methoxyphenyl]-4-[[[4,5-dihydro-2-oxazolyl)methylamino]methyl]-2-thiophenecarboxamide	
	Adler et al. (2002)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (*continuação*)

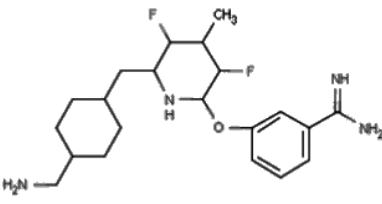
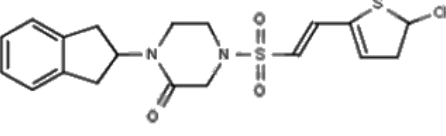
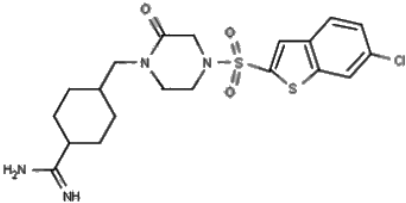
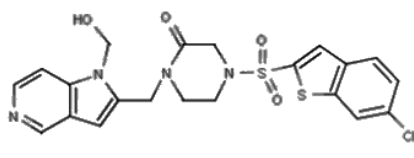
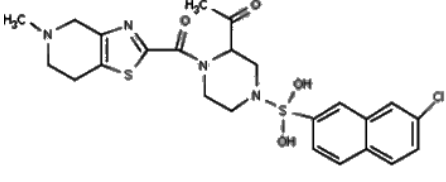
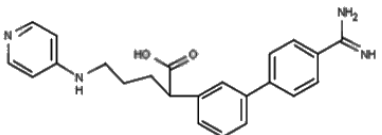
1msx	2-[3-(15N-amino-15N-imino-13C-methyl)Phenoxy]-6-[3-(15N-amino-13C-methyl)Phenoxy]-3,5-difluoro-4-methylpyridine (ZK-806299)	
	McDowell et al. (2003)	
1nfw	4-[[[2-(5-chlorothiophen-2-yl)vinyl]sulfonyl]-1-(1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)methyl]piperazin-2-one	
	Maignan et al. (2003)	
1nfu	3-[[4-[[6-chloro-1-benzothien-2-yl)sulfonyl]-2-oxopiperazin-1-yl)methyl]benzenecarboximidamide	
	Maignan et al. (2003)	
1nfx	4-[[6-chloro-1-benzothien-2-yl)sulfonyl]-1-[[1-(2-hydroxyethyl)-1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)methyl]piperazin-2-one	
	Maignan et al. (2003)	
1wu1	5-chloro-2-[[3-isobutyl-4-[(5-pyridin-4-yl)pyrimidin-2-yl]carbonyl]piperazin-1-yl)sulfonyl]-1H-indole	Sem ligante
	Komoriya et al. (2005)	
1v3x	(2r)-4-[[6-chloro-2-naphthyl)sulfonyl]-1-[[5-methyl-4,5,6,7-tetrahydro[1,3]thiazolo[5,4-c]pyridin-2-yl]carbonyl]piperazine-2-carboxamide	
	Haginoya et al. (2004)	
1xka	(2s)-(3'-amidino-3-biphenyl)-5-(4-pyridylamino)pentanoic acid	
	Kamata et al. (1998)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

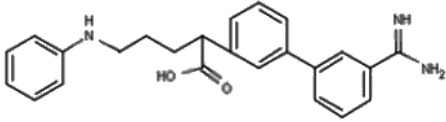
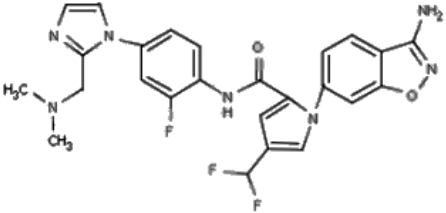
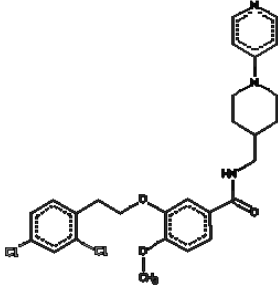
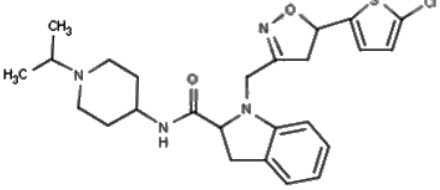
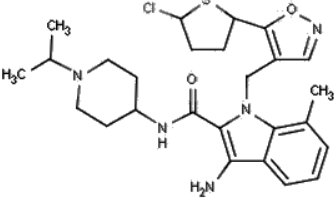
1xkb	(2s)-(3'-amidino-3-biphenyl)-5-(4-pyridylamino)pentanoic acid	
	Kamata et al. (1998)	
1z6e	1-(3-amino-1,2-benzisoxazol-5-yl)-n-(4-{2-[(dimethylamino)methyl]-1h-imidazol-1-yl}-2-fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1h-pyrazole-5-carboxamide	
	Quan et al. (2005)	
2bmg	3-[2-(2,4-dichlorophenyl)ethoxy]-4-methoxy-n-[(1-pyridin-4-yl)piperidin-4-yl)methyl]benzamide	
	Matter et al. (2005)	
2boh	1-[[5-(5-chloro-2-thienyl)isoxazol-3-yl]methyl]-n-(1-isopropylpiperidin-4-yl)-1h-indole-2-carboxamide	
	Nazare et al. (2005)	
1bok	[amino (4-{{3as,4r,8as,8br}-1,3-dioxo-2-[3-(trimethylammonio)propyl]decahydropyrrolo[3,4-a]pyrrolizin-4-yl}phenyl) methylene]ammonium	Modelo teórico
	Scharer et al. (2005)	
2bq6	1-[[5-(5-chloro-2-thienyl)isoxazol-3-yl]methyl]-3-cyano-n-(1-isopropylpiperidin-4-yl)-7-methyl-1h-indole-2-carboxamide	
	Nazare et al. (2005)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

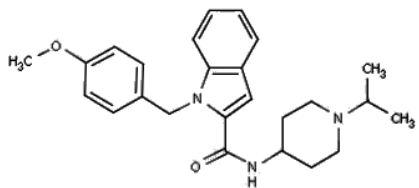
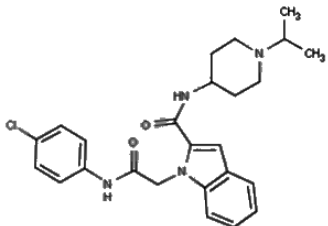
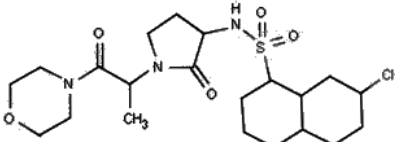
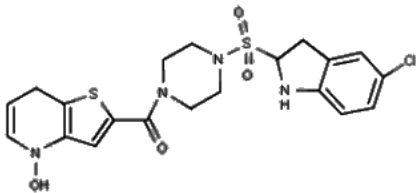
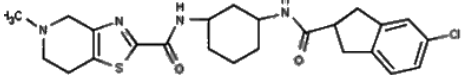
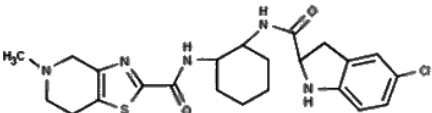
2bq7	n-(1-isopropylpiperidin-4-yl)-1-(3-methoxybenzyl)-1h-indole-2-carboxamide	
	Nazare et al. (2005)	
2bqw	1-{2-[(4-chlorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-n-(1-isopropylpiperidin-4-yl)-1h-indole-2-carboxamide	
	Nazare et al. (2005)	
2cji	6-chloro-n-[(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-(4-morpholinyl)-2-oxoethyl]-2-oxo-3-pyrrolidinyl]-2-naphthalenesulfonamide	
	Watson et al. (2006)	
2d1j	2-[[4-[(5-chloro-1h-indol-2-yl)sulfonyl]piperazin-1-yl]carbonyl]thieno[3,2-b]pyridine 4-oxide	
	Komoriya et al. (2005)	
2ei6	n-((1r,2s)-2-(5-chloro-1h-indole-2-carboxamido)cyclohexyl)-5-methyl-4,5,6,7-tetrahydrothiazolo[5,4-c]pyridine-2-carboxamide	
	Nagata et al. (2007)	
2ei7	n-((1r,2r)-2-(5-chloro-1h-indole-2-carboxamido)cyclohexyl)-5-methyl-4,5,6,7-tetrahydrothiazolo[5,4-c]pyridine-2-carboxamide	
	To be published! Nagata et al.	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

2ei8	n-((1r,2s,5s)-2-(5-chloro-1h-indole-2-carboxamido)- 5-(dimethylcarbamoyl)cyclohexyl)-5-methyl-4,5,6,7-tetrahydrothiazolo[5,4-c]pyridine- 2-carboxamide	
	To be published! Nagata et al.	
2fzz	1-(3-amino-1,2-benzisoxazol-5-yl)-6-(2'-[[[(3r)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl]methyl]biphenyl- 4-yl]-3-(trifluoromethyl)-1,4,5,6-tetrahydro- 7h-pyrazolo[3,4-c]pyridin-7-one	
	Pinto et al. (2006)	
2gd4	ATII	
	Johnson et al. (2006)	
2h9e	L-prolinamide	Sem ligante
	D-tyrosine	
	Murakami et al. (2007)	
2j2u	5-chloro-n-((3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin- 4-yl]-2-5-chloro-n-((3s)-1-[(1s)-1-methyl- 2-morpholin-4-yl]-2-sulfonamide	
	Senger et al. (2006)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

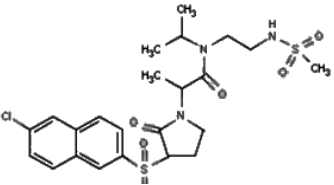
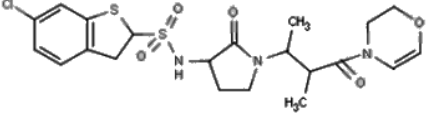
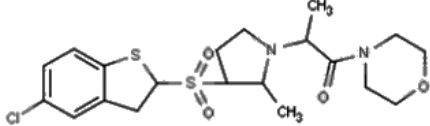
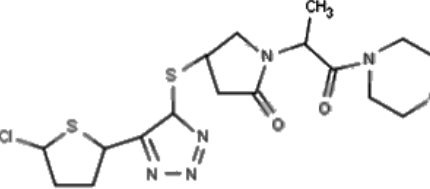
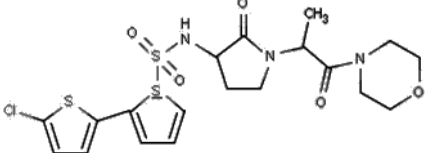
2j4i	1-pyrrolidineacetamide, 3-[[[6-chloro-2-naphthalenyl)sulfonyl] amino]- alpha-methyl-n-(1-methylethyl)-n-[2-[(methylsulfonyl) amino]ethyl]- 2-oxo-, (alphas,3s)-	
Young et al. (2006)		
2j34	6-chloro-n-{{(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin- 4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl}-1- benzothiophene-2-sulfonamide	
Senger et al. (2006)		
2j38	5-chloro-n-{{(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin- 4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl}-1- benzothiophene-2-sulfonamide	
Senger et al. (2006)		
2j94	5-(5-chloro-2-thienyl)-n-{{(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin-4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin- 3-yl}-1h-1,2,4-triazole-3-sulfonamide	
Chan et al. (2007)		
2j95	5'-chloro-n-{{(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin- 4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl}-2,2'- bithiophene-5-sulfonamide	
Chan et al. (2007)		

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

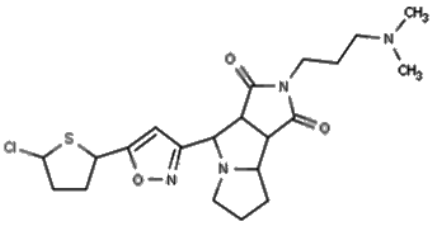
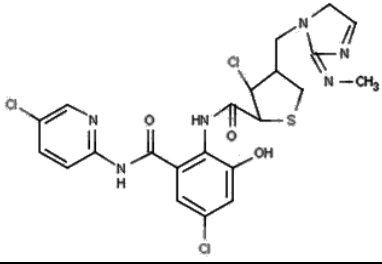
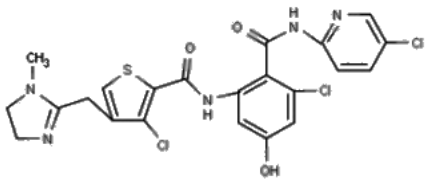
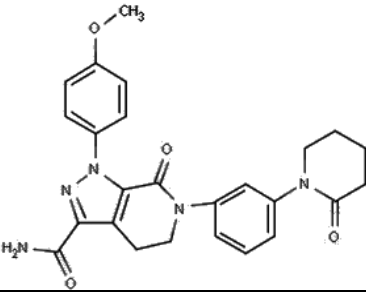
2jkh	3-[(3as,4r,8as,8br)-4-[5-(5-chloro-2-thienyl)isoxazol-3-yl]-1,3-dioxooctahydropyrrolo[3,4-a]pyrrolizin-2(3h)-yl]-n,n,n-trimethylpropan-1-aminium	
	Salonen et al. (2009)	
2p3f	Íon sódio	sódio
	Rios-Steiner et al. (2007)	
2p3t	3-chloro-4-(2-methylamino-imidazol-1-ylmethyl)-thiophene-2-carboxylic acid [4-chloro-2-(5-chloro-pyridin-2-ylcarbamoyl)-6-methoxy-phenyl]-amide	
	Ye et al. (2007)	
2p3u	3-chloro-n-(4-chloro-2-[(5-chloropyridin-2-yl)amino]carbonyl)-6-methoxyphenyl)-4-[(1-methyl-1h-imidazol-2-yl)methyl]thiophene-2-carboxamide	
	A ser publicado	
2p16	1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1h-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide	
	Pinto et al. (2007)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (*continuação*)

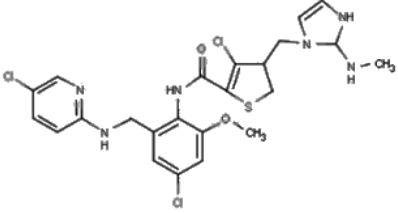
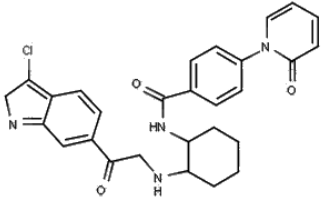
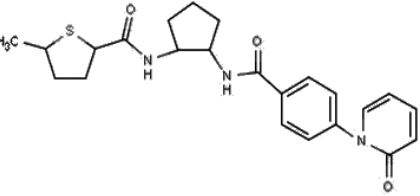
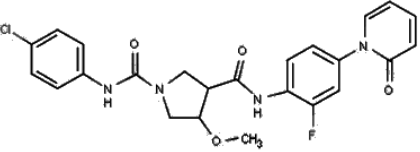
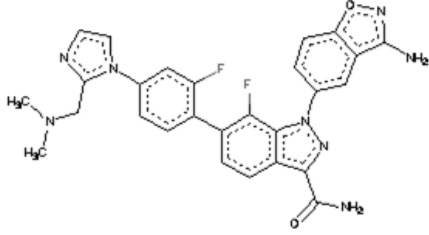
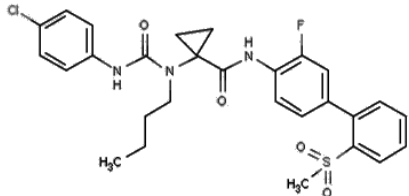
2p93	5-chloro-n-(2-(4-(2-oxopyridin-1(2h)-yl)benzamido)ethyl)thiophene-2-carboxamide	
	Qiao et al. (2007)	
2p94	3-chloro-n-((1r,2s)-2-(4-(2-oxopyridin-1(2h)-yl)benzamido)cyclohexyl)-1h-indole-6-carboxamide	
	Qiao et al. (2007)	
2p95	5-chloro-n-((1r,2s)-2-(4-(2-oxopyridin-1(2h)-yl)benzamido)cyclopentyl)thiophene-2-carboxamide	
	Qiao et al. (2007)	
2phb	(2r,4r)-n~1~-(4-chlorophenyl)-n~2~- [2-fluoro-4-(2-oxopyridin-1(2h)-yl)phenyl]-4-methoxypyrrolidine-1,2-dicarboxamide	
	Kohrt et al. (2007)	
2pr3	(2r,4r)-n~1~-(4-chlorophenyl)-n~2~- [3-fluoro-2'-methylsulfonylbiphenyl-4-yl]-4-methoxypyrrolidine-1,2-dicarboxamide	
	Van Huis et al. (2007)	
2q1j	1-(butyl[[(4-chlorophenyl)amino]carbonyl]amino)-n-[3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)biphenyl-4-yl]cyclopropanecarboxamide	
	Kohrt et al. (2006)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

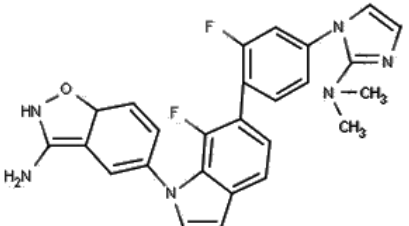
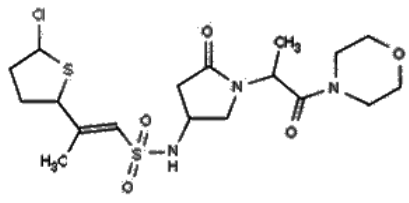
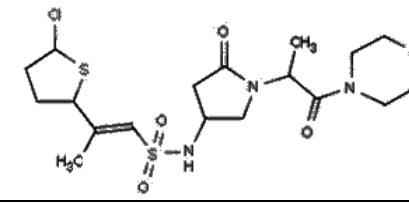
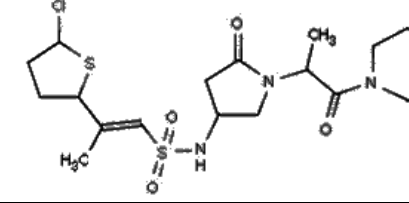
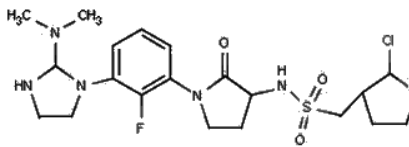
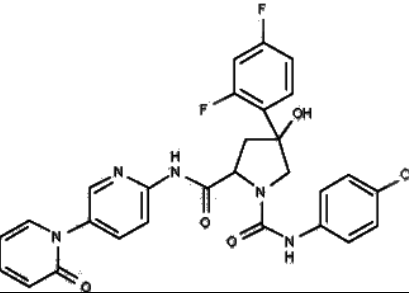
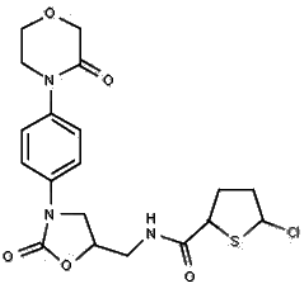
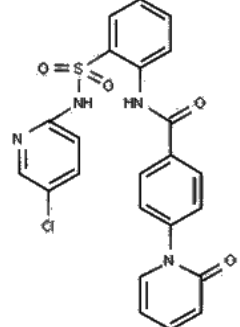
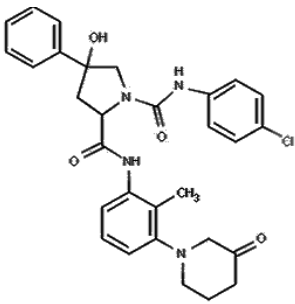
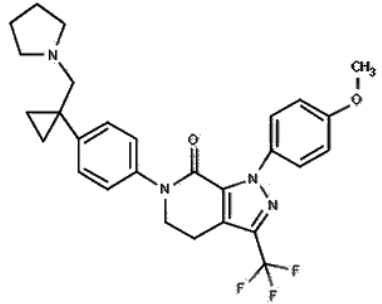
2ra0	1-(3-amino-1,2-benzisoxazol-5-yl)-6-(4-{2-[(dimethylamino) methyl]-1H-imidazol-1-yl}-2-fluorophenyl)-7-fluoro-1H-indazole-3-carboxamide	
	Lee et al. (2008)	
2uwl	2-(5-chloro-2-thienyl)-n-[(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin-4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl]ethenesulfonamide	
	Young et al. (2007)	
2uwo	(2r)-2-(5-chloro-2-thienyl)-n-[(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin-4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl]propene-1-sulfonamide	
	Young et al. (2007)	
2uwp	2-(5-chloro-2-thienyl)-n-[(3s)-1-[(1s)-1-methyl-2-morpholin-4-yl-2-oxoethyl]-2-oxopyrrolidin-3-yl]ethanesulfonamide	
	Young et al. (2007)	
2vho	2-(5-chlorothiophen-2-yl)-N-[(3S)-1-(4-{2-[(dimethylamino)methyl]-1H-imidazol-1-yl}-2-fluorophenyl)-2-oxopyrrolidin-3-yl]ethanesulfonamide	
	Young et al. (2008)	
2w3i	(2R,4S)-N^1-(4-chlorophenyl)-4-(2,4-difluorophenyl)-4-hydroxy-N^2-(2-oxo-2H-1,3'-bipyridin-6'-yl)pyrrolidine-1,2-dicarboxamide	
	van Huis et al. (2009)	

Tabela 3.1.a Estruturas extraídas do PDB para a proteína FX (continuação)

<p>2w26</p>	<p>5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide</p>	
<p>3cen</p>	<p>n-(2-(((5-chloro-2-pyridinyl)amino)sulfonyl)phenyl)-4-(2-oxo-1(2h)-pyridinyl)benzamide</p>	
<p>2w3k</p>	<p>(2R,4S)-N¹-(4-chlorophenyl)-N²-[2-fluoro-4-(2-oxopyridin-1(2H)-yl)phenyl]-4-hydroxy-4-phenylpyrrolidine-1,2-dicarboxamide</p>	
<p>3cs7</p>	<p>1-(4-methoxyphenyl)-6-(4-(1-(pyrrolidin-1-ylmethyl)cyclopropyl)phenyl)-3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridin-7(4H)-one</p>	

Anexo 3.2. POSIÇÕES DOS LIGANTES NOS SUBSÍTIOS DO FATOR X

Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB. São apresentados os ligantes dando destaques ao posicionamento nos bolsos Sn e Sn' e nas regiões C (cavidade profunda), AI (entre S2 e S4) e AII (entre S3 e S2'). O código PDB das estruturas aparece no canto superior direito de cada figura.

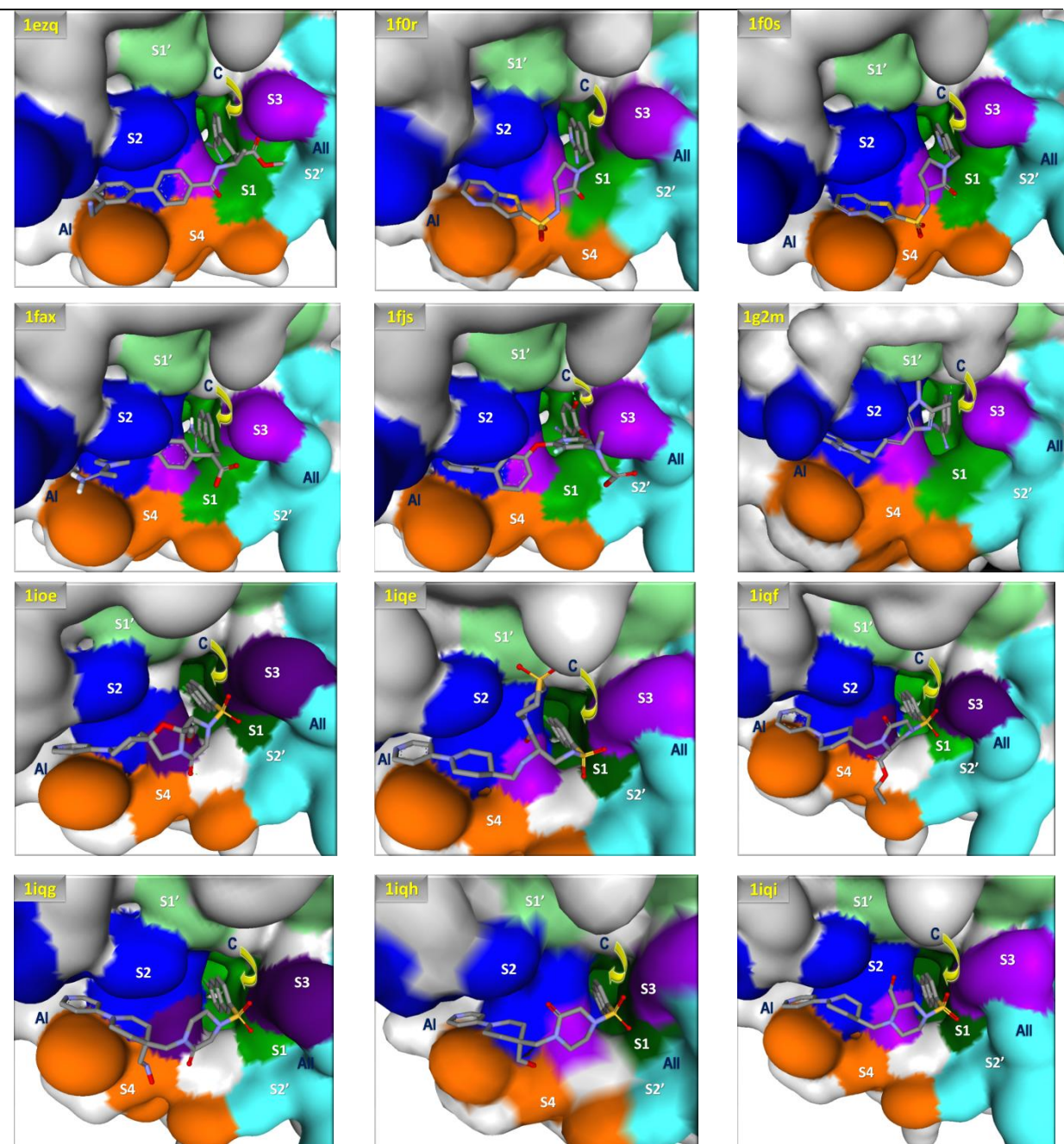


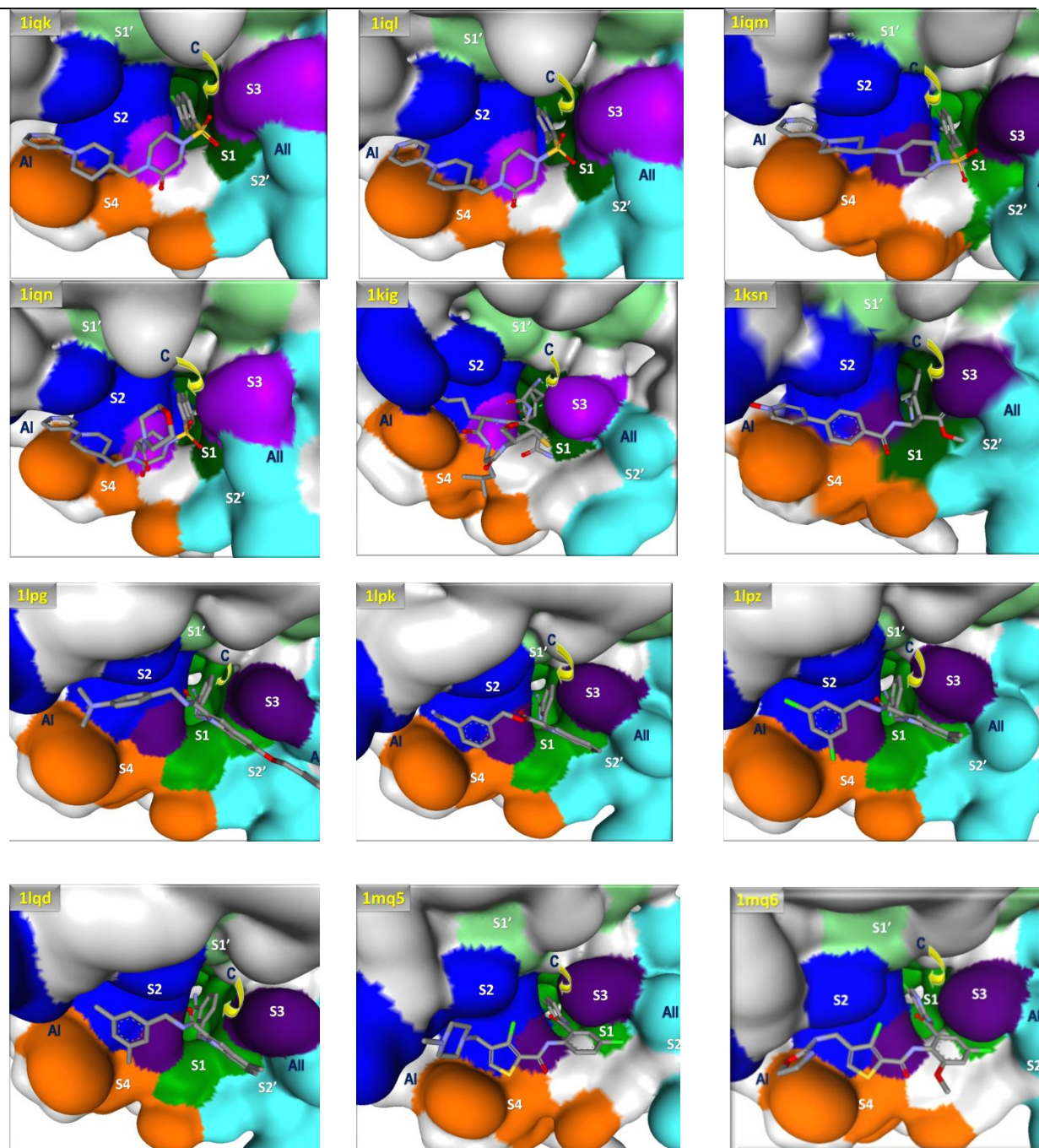
Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB (*continuação*)

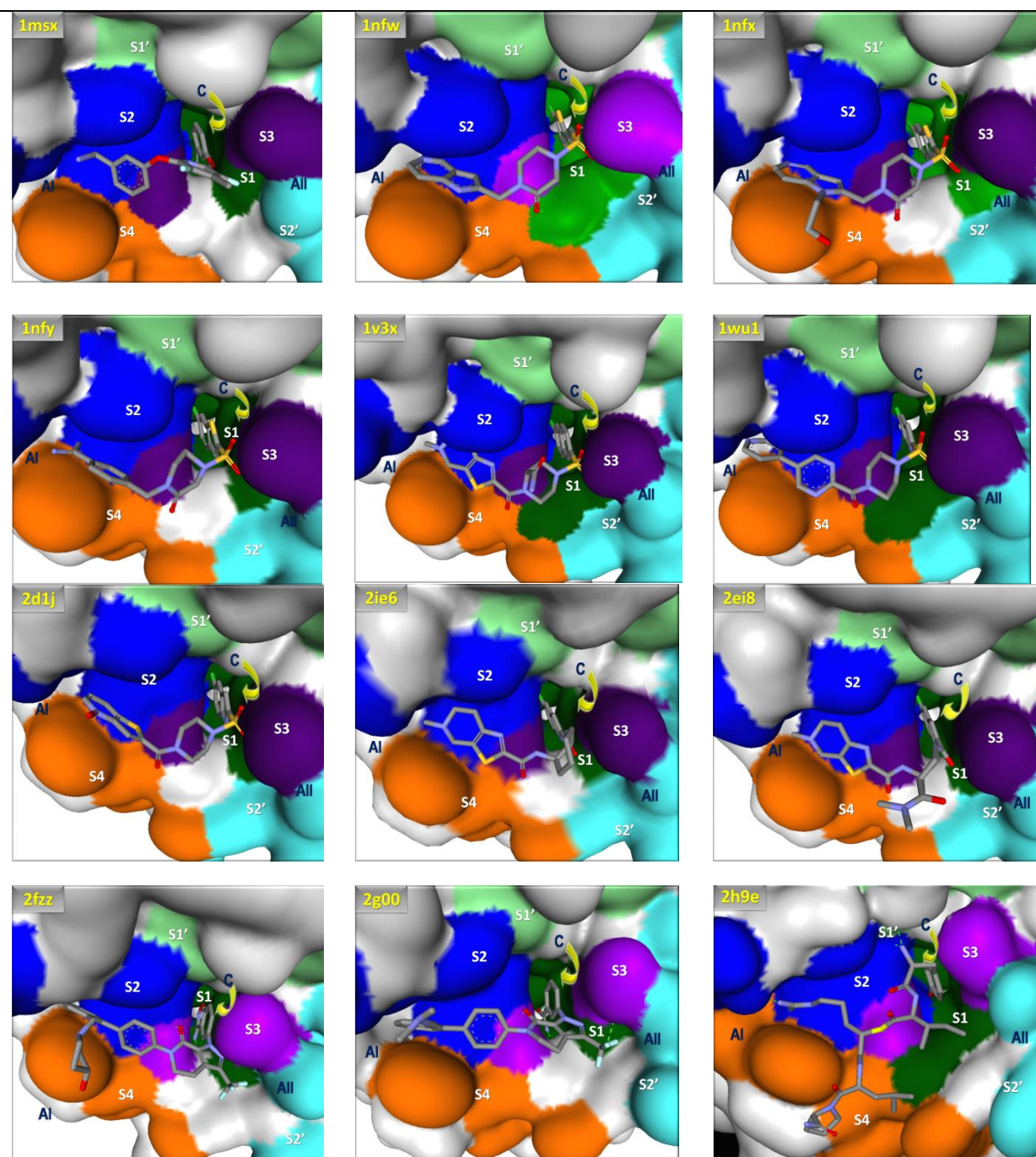
Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB (*continuação*)

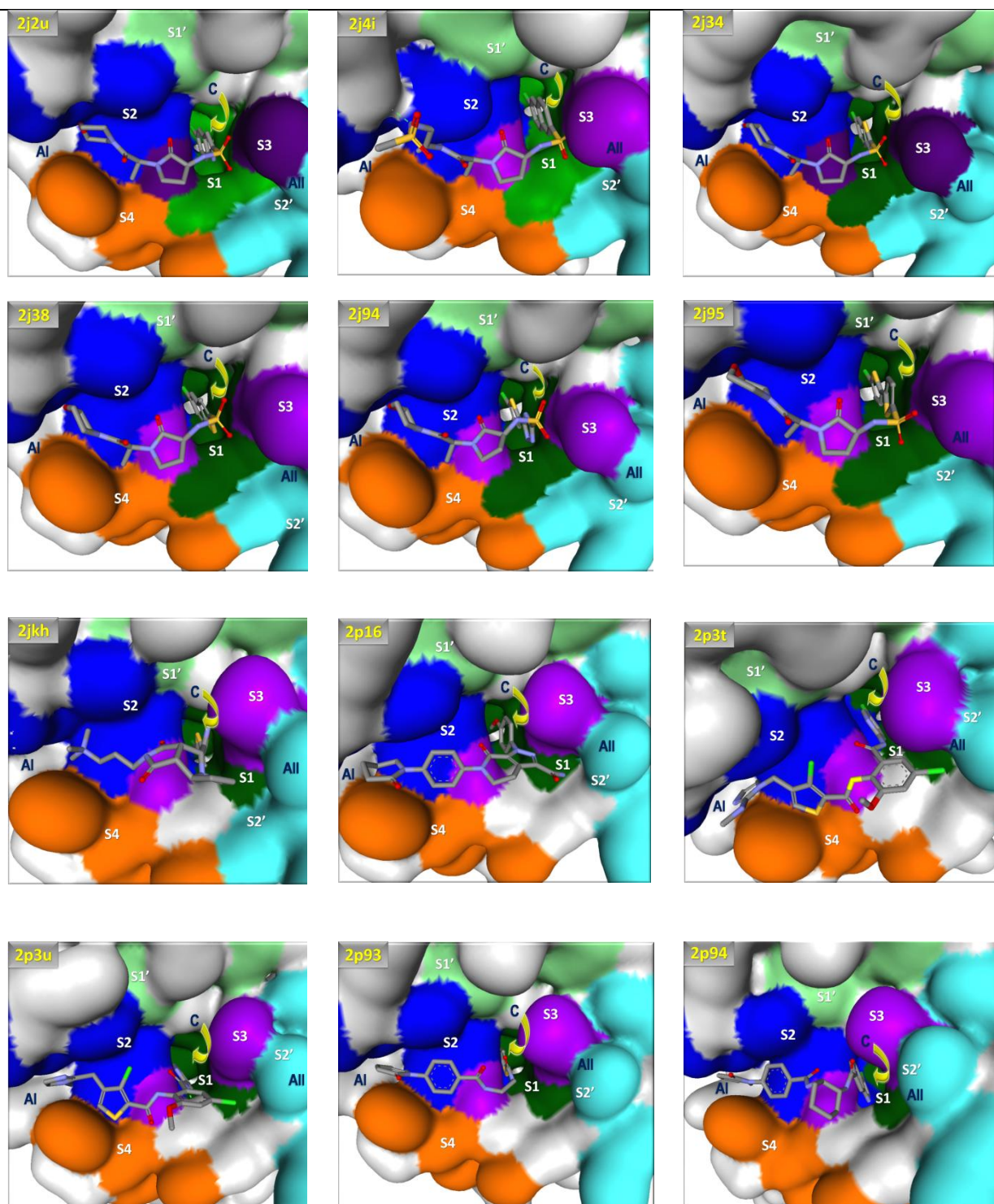
Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB (*continuação*)

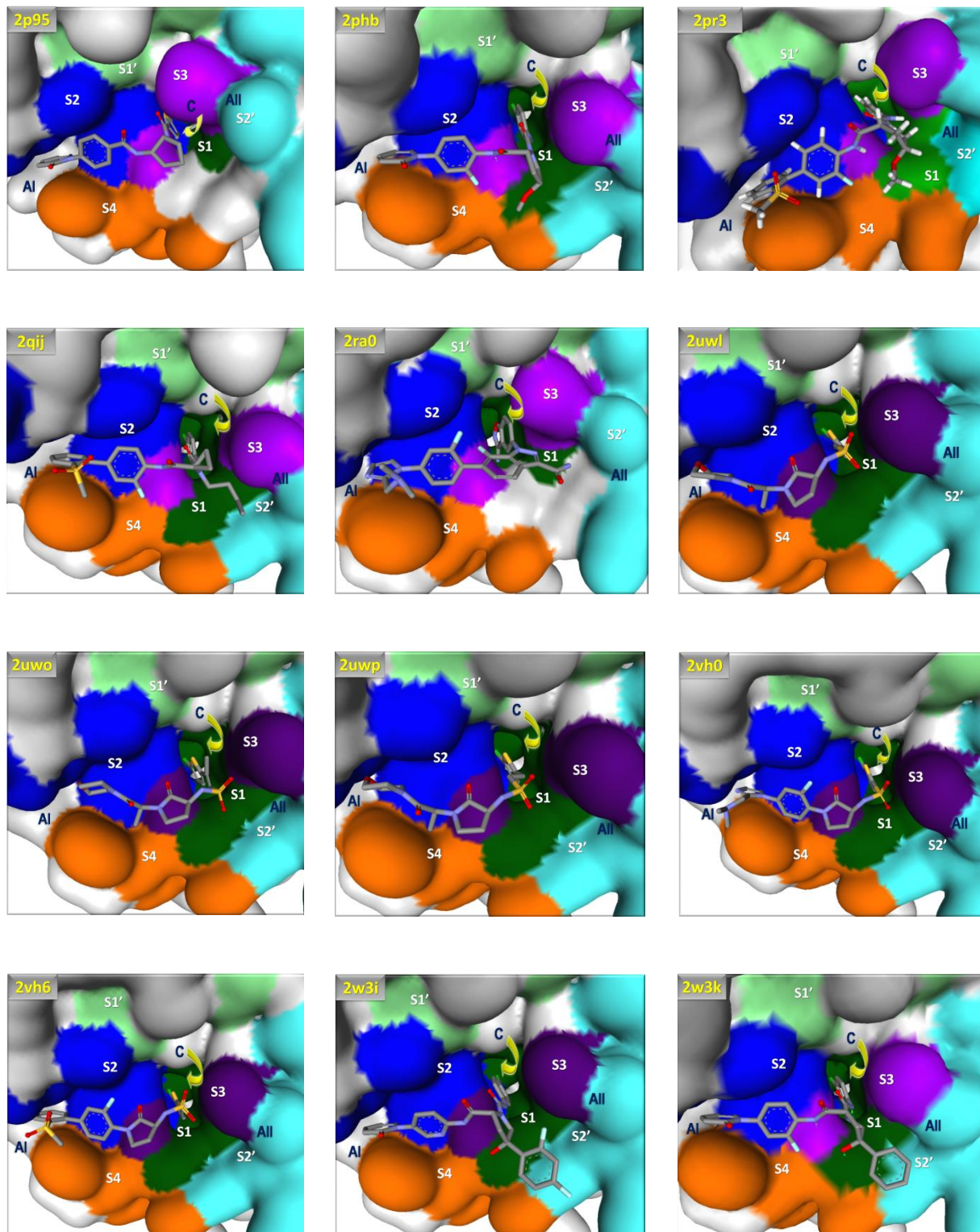
Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB (*continuação*)

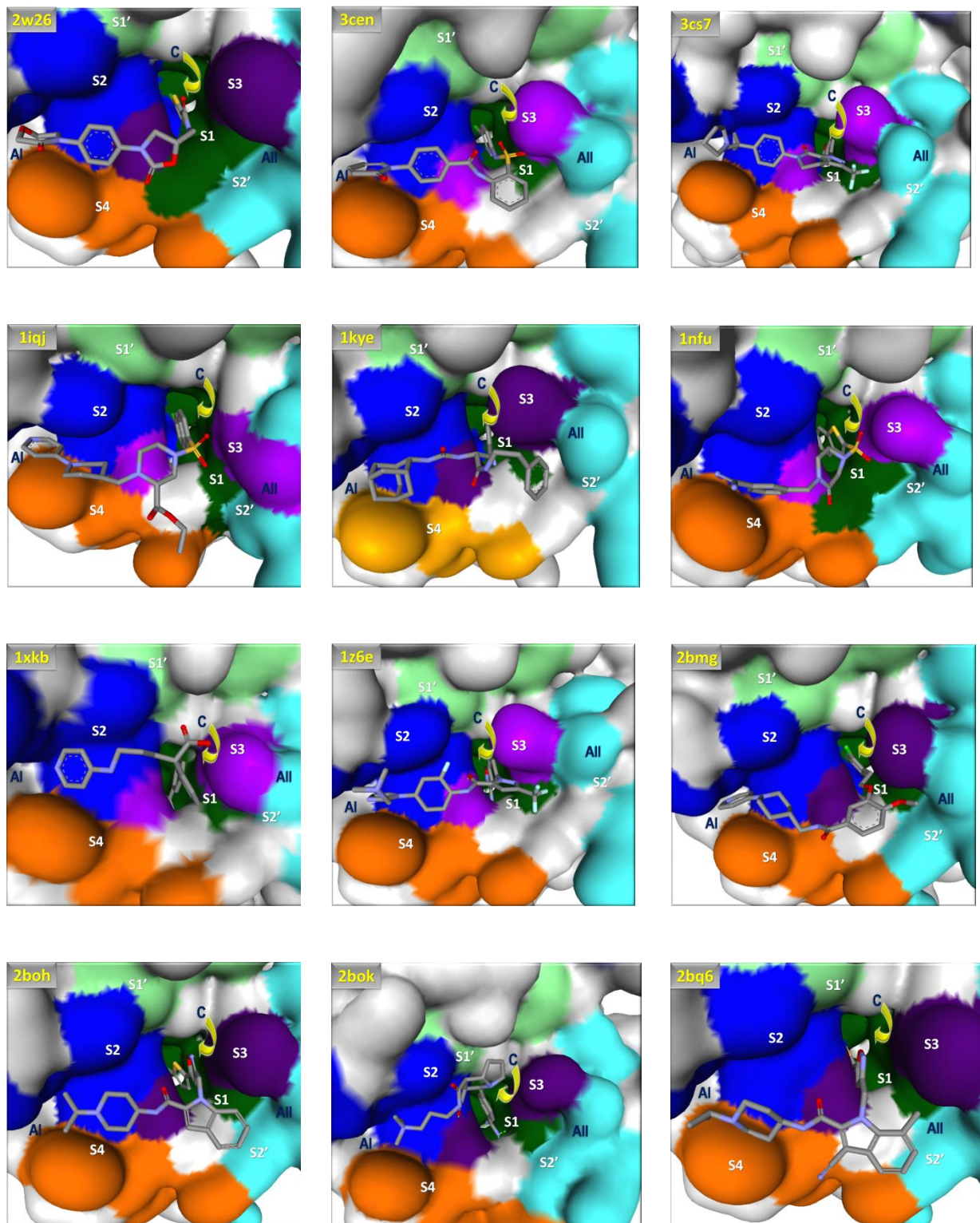
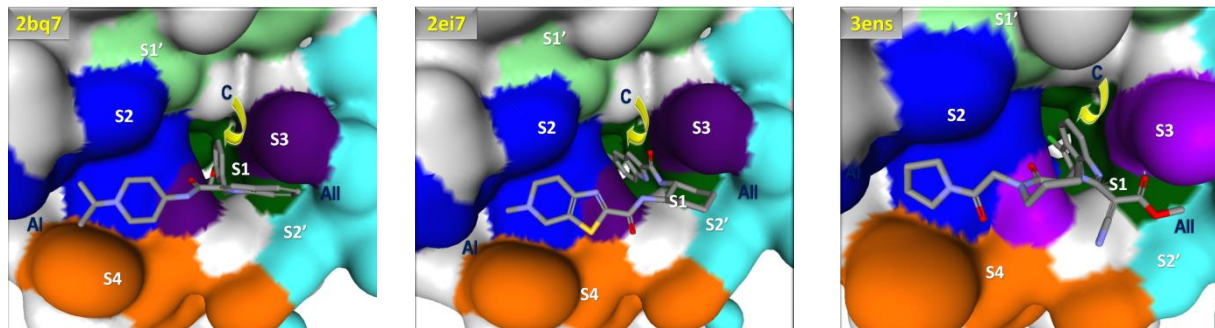
Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB (*continuação*)

Tabela 3.2.a Estruturas dos complexos cristalográficos entre FXa e pequenas moléculas depositados no PDB (*continuação*)



Anexo 3.3. ATIVIDADE E OCUPAÇÃO DOS LIGANTES CRISTALOGRAFICOS NO SÍTIO ATIVO DO FATOR X

Tabela 3.3.a.1 Valores de Ki (nm/L) obtidos da literatura		
código pdb	Ki (nmol/L)	Referência
1ezq	0,9	Maignan et al. , 2000
1f0r	22,0	Maignan et al. , 2000
1f0s	18,0	Maignan et al. , 2000
1fax	41,0	Brandstetter et al. , 1996
1fjs	0,11	Adler et al. , 2000
1g2m	40,0	Nar et al. , 2001
1hcg	Sem ligante	Padmanabhan et al. , 1993
1iqe	Não encontrado	Matsusue et al., a ser publicado
1iqf	2,3	Hosaka et al. , 2006
1iql	Não encontrado	Matsusue et al., a ser publicado
1iqn	Não encontrado	Matsusue et al., a ser publicado
1ksn	0,4	Guertin et al. , 2002
1kye (mudou para 3liw)	Não disponível	Mueller et al. , 2002
1lpg	82,0	Matter et al. , 2002
1lpk	28,0	Matter et al. , 2002
1lpz	25,0	Matter et al. , 2002
1lqd	9,0	Matter et al. , 2002
1mq5	1,0	Adler et al. , 2002
1mq6	< 1,0	Adler et al. , 2002
1nfu	18,0	Maignan et al. , 2003
1msx	1.400,0	McDowell et al. , 2003
1nfw	1,1	Maignan et al. , 2003
1nfx	3,0	Maignan et al. , 2003
1nfy	1,3	Maignan et al. , 2003
1z6e	0,19	Quan et al. , 2005
2bmg	18,0	Matter et al. , 2005
2boh	3,0	Nazare et al. , 2005
2bok	280,0	Scharer et al. , 2005
2bq6	0,07	Nazare et al. , 2005
2bq7	89,0	Nazare et al. , 2005
2bqw	3,0	Nazare et al. , 2005
2cji	6,0	Watson et al. , 2006
2ei8	Não encontrado	Nagata et al., a ser publicado
2fzz	0,03	Pinto et al. , 2006a
2g00	0,18	Pinto et al. , 2006b
2h9e	43,0	Murakami et al. , 2007
2j2u	90,0	Senger et al. , 2006

Tabela 3.3.a.1 Valores de K_i (nm/L) obtidos da literatura (continuação)

código pdb	K_i (nmol/L)	Referência
2j4i	1,0	Young et al. , 2006
2j34	15,0	Senger et al., 2006
2j38	47,0	Senger et al. , 2006
2j94	534,0	Chan et al. , 2007
2j95	4,0	Chan et al. , 2007
2jkh	9,0	Salonen et al. , 2009
2p3t	0,005	Ye et al. , 2007
2p3u	0,01	Ye et al. , 2007
2p16	0,08	Pinto et al. , 2007
2p93	1,5	Qiao et al. , 2007
2p94	0,67	Qiao et al. , 2007
2p95	0,43	Qiao et al. , 2007
2ra0	15,9	Lee et al. , 2008
2uwl	4,0	Young et al. , 2007
2uwo	2,0	Young et al. , 2007
2uwp	154,0	Young et al. , 2007
2vh0	3,1	Young et al. , 2008 a
2vh6	0,2	Young et al. , 2008 b
2w26	0,4	Roehriget al. , 2005
3cen	5,5	Corte et al. , 2008
3cs7	0,021	Qiao et al. , 2008

Tabela 3.3.a.2 Valores de IC50(nm/L) obtidos da literatura

código pdb	IC50 (nmol/L)	Referência
1ioe	5,0	Saitoh et al., 2007
1iqg	48,0	Nishida et al., 2002
1iqh	38,0	Nishida et al., 2002
1iqi	700,0	Nishida et al., 2002
1iqj	130,0	Nishida et al., 2002
1iqk	60,0	Nishida et al., 2004
1iqm	830	Nishida et al., 2001
1v3x	24,0	Haginoya et al., 2004
1wu1	4,6	Komoriya et al., 2005
1xka	272,0	Kamata et al, 1998
1xkb	(igual a 1xka) 272,0	Kamata et al, 1998
2d1j	2,5	Komoriya et al., 2005
2ei6	41,0	Nagata t al., 2007
2ei7	13,0	Nagata t al., 2007
2phb	0,32	Kohrt et al., 2007
2pr3	0,16	Van Huis et al., 2007
2q1j	0,8	Kohrt et al., 2006
2w3i	0,1	Van Huis et al., 2009
2w3k	0,08	Van Huis et al., 2009

Tabela 3.3.a.3 Valores de Atividade decrescente e presença (x) do ligante nas regiões AI e AII do sítio ativo do Fator X

código pdb	AI	AII	Ki(nmol/L) ¹	código pdb	AI	AII	IC50(nmol/L) ²
2p3t	x	x	0,005	2w3k	x	x	0,08
2p3u	x	x	0,01	2w3i	x	x	0,10
3cs7	x	x	0,021	2pr3	x	x	0,16
2fzz	x	x	0,03	2phb	x		0,32
2bq6	x	x	0,07	2w26	x		0,70
2p16	x	x	0,08	2q1j	x	x	0,80
1fjs	x	x	0,11	3ens	x	x	2,40
2g00	x	x	0,18	2d1j	x		2,50
1z6e	x	x	0,19	1wu1	x		4,60
2vh6	x		0,2	1ioe	x		5,00
2w26	x	x	0,4	2ei7	x		13,00
1ksn	x	x	0,4	1v3x	x		24,00
2p95	x	x	0,43	1iqh	x		38,00
2p94	x		0,67	2ei6	x		41,00
1ezq	x	x	0,90	1iqg	x		48,00
1mq6	x	x	0,90	1iqk	x		60,00
1mq5	x	x	1,00	1iqj	x		130,00
2j4i	x		1,00	1xka e 1xkb	x		272,00
1nfw	x		1,10	1iqi	x		700,00
1nfy	x		1,30	1iqm	x		830,00
2p93	x		1,50				
2uwo	x		2,00				
1iqf	x		2,30				
1nfx	x		3,00				
2boh	x	x	3,00				
2bqw	x		3,00				
2vh0	x		3,10				
2j95	x		4,00				
2uwl	x		4,00				
3cen	x		5,50				
2cji	x		6,00				
1lqd	x	x	9,00				
2jkh	x		9,00				
2j34	x		15,00				
2ra0	x		15,90				
1f0s	x		18,00				
1nfu	x		18,00				
2bmg	x	x	18,00				
1f0r	x		22,00				
1lpz	x	x	25,00				
1lpk	x	x	28,00				
1g2m	x		40,00				
1fax	x		41,00				
2j38	x		47,00				
1lpg	x	x	82,00				
2bq7	x	x	89,00				
2j2u	x		90,00				
2uwp	x		154,00				
2bok	x		280,00				
2j94	x		534,00				
1msx	x		1400,00				

¹ Ki é a constante de inibição,² IC50 é a concentração na qual a droga alcança 50% da máxima inibição da enzima,

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X

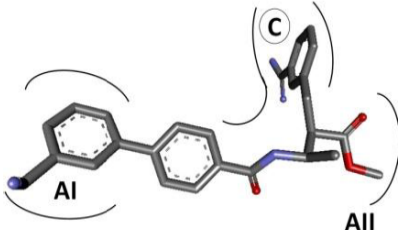
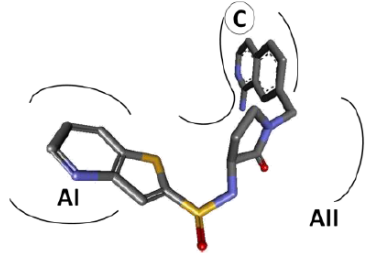
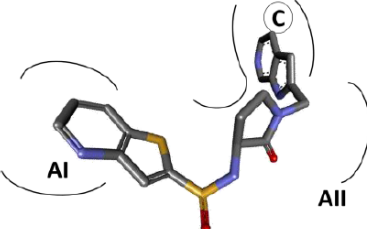
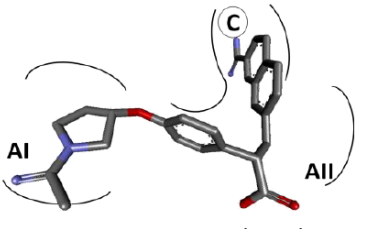
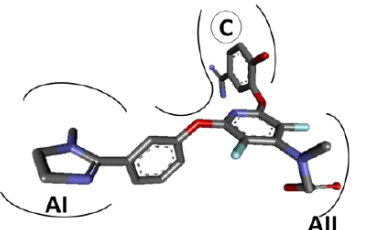
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1ezq	 <p>Maignan et al. (2000)</p>	<p>C: ocupada por anel fenil, com substituinte m-amidina - ponte salina com D189.</p> <p>AI: ocupada por anéis aromáticos – interações tipo C-H...π com Y99 e W215 e tipo π...π com F174.</p> <p>AII: ocupada por pequena cadeia alifática – interação C-H...O entre O carbonila e grupos CH₂ da cadeia R da Q192.</p>	0,90	
1f0r	 <p>Maignan et al. (2000)</p>	<p>C: anéis conjugados, tendo um N na composição e substituinte NH₂ – ligações de H com D189.</p> <p>AI: anéis conjugados, tendo S e N na composição. Interações π... π com F174 e C-H... π W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	22,00	
1f0s	 <p>Maignan et al. (2000)</p>	<p>C: anéis conjugados, tendo N na composição, sem substituintes. Interação O-H...N com água HOH59 no fundo.</p> <p>AI: anéis conjugados, tendo S e N na composição. Interações π...π com F174 e C-H...π W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	18,00	
1fax	 <p>Brandstetter et al. (1996)</p>	<p>C: ocupada por anel naftil, com substituinte m-amidina - ponte salina com D189.</p> <p>AI: anel pirrol, interações do tipo C-H... π com F174, Y99 e W215. Ligações de H tipo N-H...O com E97.</p> <p>AII: não ocupa</p>	41,00	
1fjs	 <p>Adler et al. (2000)</p>	<p>C: ocupada por um anel aromático com substituintes OH - interage com S195 - e amidina - ponte saline com DAsp189.</p> <p>AI: anel imidazol – interações π...π com F174 e Y99 – tendo um substituinte CH₃ - interação C-H...π com W215.</p> <p>AII: cadeia alifática – interação O-H...O com: OE1 da Q192 e águas HOH712 e 723</p>	0,11	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1g2m		C: um anel aromático com substituinte p-amidina - ponte salina com D189. AI: anéis conugados tendo N composição - interações $\pi\cdots\pi$ com F174 e C-H... π com Y99 e W215. AII: não ocupa	40,00	
1ioe		C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático tendo um N na composição - interações $\pi\cdots\pi$ com Y99 e F174 e C-H... π com W215. AII: não ocupa		5,00
1iqe		C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático tendo um N na composição - interações $\pi\cdots\pi$ com Y99 e F174 e C-H... π com W215. AII: não ocupa.	-	-
1iqf		C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático com 1 N na composição. Interações pi-pi com Tyr99 e Phe174 e C-H...pi com Trp215. AII: não ocupa	2,30	
1iqg		C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático tendo um N na composição - interações $\pi\cdots\pi$ com Y99 e F174 e C-H... π com W215. AII: não ocupa		48,00

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1iqh		<p>C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228.</p> <p>AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π...π com Y99 e F174 e C-H...π com W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>		38,00
	Nishida et al. (2002)			
1iqi		<p>C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228.</p> <p>AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π...π com Y99 e F174 e C-H...π com W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>		700,00
	Nishida et al. (2002)			
1iqj		<p>C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228.</p> <p>AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π...π com Y99 e F174 e C-H...π com W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>		130,00
	Nishida et al. (2002)			
1iqk		<p>C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228.</p> <p>AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π...π com Y99 e F174 e C-H...π com W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>		60,00
	Nishida et al. (2004)			
1iql		<p>C: anel aromático com um substituinte <i>p</i>-Cl (posição para) – interação Cl... π com Y228.</p> <p>AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π...π com Y99 e F174 e C-H...π com W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	-	-

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

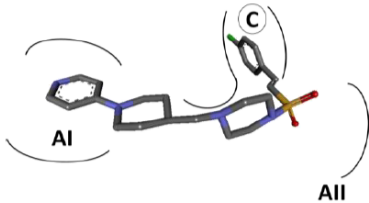
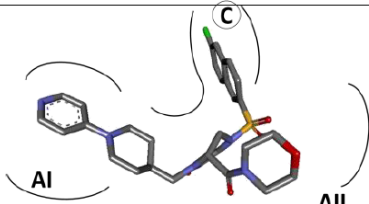
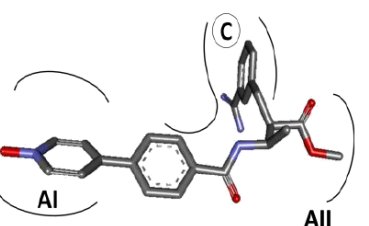
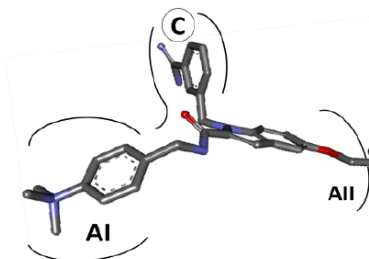
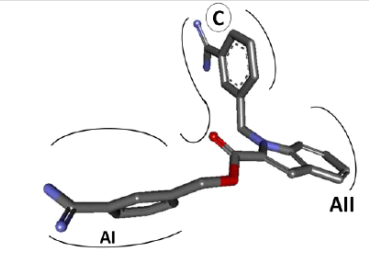
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1iqm	 Nishida et al. (2001)	C: anel aromático com um substituinte <i>p</i> -Cl (posição para) – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π ... π com Y99 e F174 e C-H... π com W215. AII: não ocupa.		830,00
1iqn	 -	C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático tendo um N na composição - interações π ... π com Y99 e F174 e C-H... π com W215. AII: não ocupa.	-	-
1ksn	 Guertin et al. (2002)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático com N na composição e substituinte <i>p</i> -OH - interação π ... π com F174 e C-H... π com Y99 e W215. AII: cadeia alifática COOCH3 – interação N-H...O com N (backbone) da Q192 e C-H...O com OE1/ Q192.	0,40	
1lpg	 Matter et al. (2002)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático - interação π ... π com Y99 – tendo substituinte <i>p</i> -trimetil-amônia - interação C-H... π com F174 e W215 AII: anel indol – interações C-H... π com CH ₂ da Q192 e C-H...O com O (backbone) E147 – anel fenil da extremidade do substituinte - interações cátion- π com R143 e C-H...O com O (backbone) E147.	82,00	
1lpk	 Matter et al. (2002)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático – interações C-H... π com o F174 e Y99 – tendo substituinte <i>m</i> -amidina – interação N-H... π com W215. AII: anel indol – interações C-H... π com CH ₂ da Q192 e C-H...O com O (backbone) E147.	28,0	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

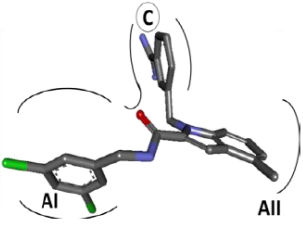
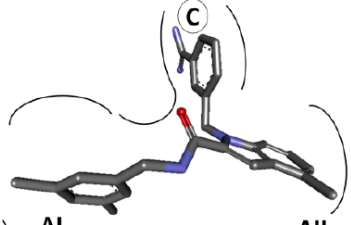
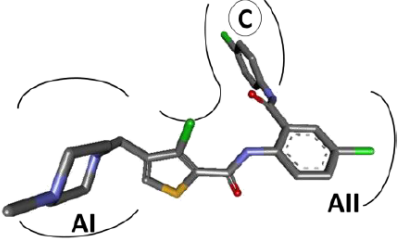
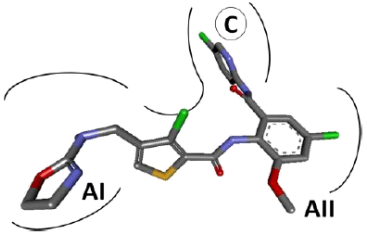
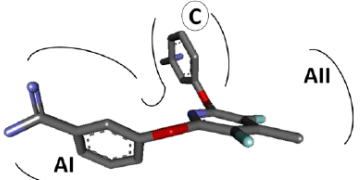
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1lpz	 Matter et al. (2002)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático – interações $\pi\cdots\pi$ com W215 e C-H... π com F174 e Y99 - dois substituintes <i>m</i> -Cl. AII: ocupada pelo anel indol – abaixo da cadeia lateral da Q192 – interação C-H... π com CH ₂ da Q192.	25,00	
1lqd	 Matter et al. (2002)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático – interação C-H... π com F174 – e dois substituintes <i>m</i> -CH ₃ – interação C-H... π com W215. AII: ocupada pelo anel indol abaixo da cadeia lateral da Q192 – interações C-H... π com CH ₂ da Q192.	9,00	
1mq5	 Adler et al. (2002)	C: anel aromático com um substituinte <i>p</i> -Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel tiofeno - interação C-H... π com F174. Grupos CH ₂ do substituinte - interações C-H... π com Y99 e Trp215. AII: anel aromático com substituinte <i>m</i> -Cl a 3,6 Å da R143. Localiza-se abaixo da cadeia lateral da Q192.	1,0	
1mq6	 Adler et al. (2002)	C: anel aromático com um substituinte <i>p</i> -Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel tiofeno - interação C-H... π com F174. Grupos CH ₂ do substituinte - interações C-H... π com Y99 e Trp215. AII: anel aromático com substituinte <i>m</i> -Cl a 4,3 Å da R143. Localiza-se abaixo da cadeia lateral da Q192.	< 1,0	
1msx	 McDowell et al. (2003)	C: anel aromático com substituinte <i>p</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático com substituinte CH ₂ NH ₃ com interações C-H... π com W215 e Y99 e N-H...O com O do E97. AII: não ocupa.	1400,00	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (*continuação*)

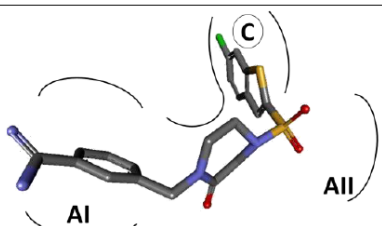
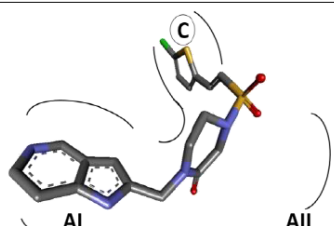
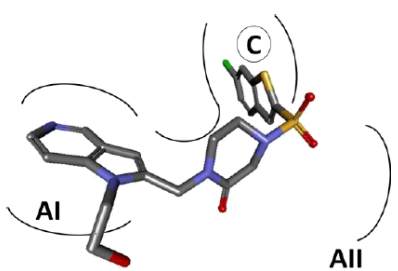
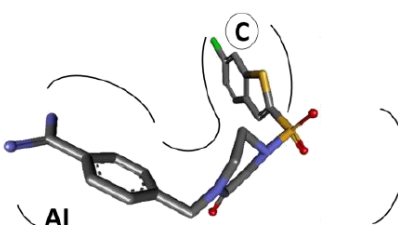
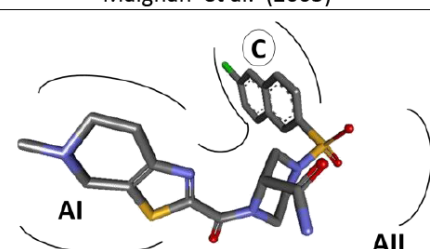
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1nfu	 Maignan et al. (2003)	C: anéis conjugados, contendo S na composição e um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina – uma interação com F174. AII: não ocupa.	18,00	
1nfw	 Maignan et al. (2003)	C: anel tiofenocome um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: dois anéis conjugados, contendo N na composição - interações C-H... π com W215 e Y99 e π ... π com F174. AII: não ocupa.	1,1	
1nfx	 Maignan et al. (2003)	C: anéis conjugados, contendo S na composição e um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: dois anéis conjugados, contendo N na composição - interações C-H... π com W215 e Y99 e π ... π com F174. Substituinte (CH ₂) ₂ OH sem interação. AII: não ocupa.	3,0	
1nfy	 Maignan et al. (2003)	C: anéis conjugados, contendo S na composição e um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel aromático - interações C-H... π com W215 e Y99 e π ... π com F174. Substituinte <i>p</i> -amidina. AII: não ocupa.	1,3	
1v3x	 Haginoya et al. (2004)	C: anéis conjugados, com substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: Interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.		24,00

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (*continuação*)

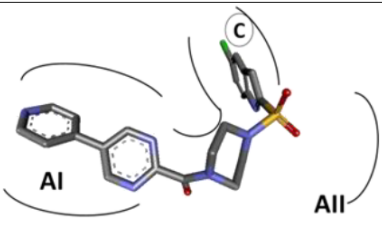
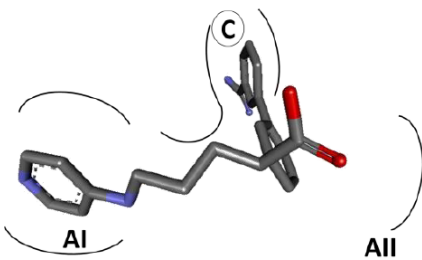
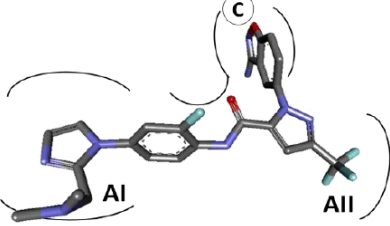
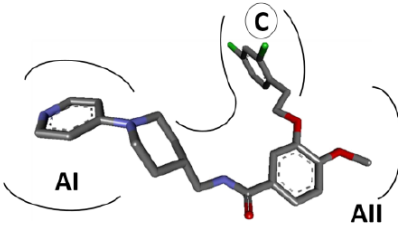
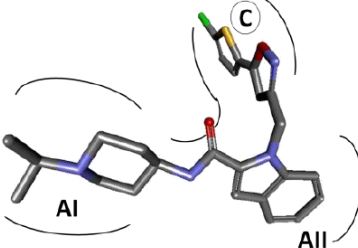
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
1wu1	 Komoriya et al. (2005)	C: anéis conjugados, tendo N na composição, com substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anéis aromáticos com N na composição - interações C-H... π com W215 e Y99. Interação π ... π com F174. AII: não ocupa.		4,60
1xka/ 1xkb	 Kamata et al. (1998)	C: anel aromático com um substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: anel aromático com N na composição - interações C-H... π com Y99 e F174 e π ... π com Trp215. AII: não ocupa.		272,00
1z6e	 Quan et al. (2005)	C: anéis conjugados, com O e N na composição. Substituinte NH ₂ - ponte salina com D189. AI: anel fenil com substituinte F - interação C-H... π com Y99 - e anel imidazol - interação C-H... π com W215 e π ... π com F174. AII: anel de cinco átomos com dois N na composição, com substituinte CF ₃ – interação C-H...F com CH ₂ da Q192.	0,19	
2bmg	 Matter et al. (2005)	C: anel aromático com dois substituintes Cl - interação Cl... π com Y228. Anel com ligação de H tipo C-H...O com D189. AI: anel aromático com N na composição, interação π ... π com Y99 e F174 e C-H... π com W215. AII: anel fenil com substituinte OCH ₃ – interação C-H...O com E147.	18,00	
2boh	 Nazare et al. (2005)	C: anel tiofeno com um substituinte Cl - interação Cl... π com Y228 – e anel contendo O e N. AI: anel faz interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: anel indol - interação O-H... π com água HOH2141 que também interage com Q192.	3,00	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2bok	 Scharer et al. (2005)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -amidina - ponte salina com D189. AI: porção trimetil-amônia com interações C-H... π com Y99, W215 e F174. AII: não ocupa.	280,00	
2bq6	 Nazare et al. (2005)	C: anel tiofeno com um substituinte Cl - interação Cl... π com Y228 – e anel contendo O e N. AI: anel com N na composição e substituinte C ₃ H ₇ – interações C-H... π com Y99, W215 e F174. AII: anel indol – interação O-H... π com HOH2057.	0,07	
2bq7	 Nazare et al. (2005)	C: anel aromático com substituinte <i>m</i> -OCH ₃ que interage com D189. AI: anel com N na composição e substituinte C ₃ H ₇ – interações C-H... π com Y99, W215 e F174. AII: anel indol – interação C-H... π com CH ₂ da Q192 e C-H...O com O (backbone) do E147.	89,00	
2bqw	 Nazare et al. (2005)	C: anel aromático com um substituinte <i>p</i> -Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel com N na composição e substituinte C ₃ H ₇ – interações C-H... π com Y99, W215 e F174. AII: anel indol – interação O... π e C-H... π com Q192 e C-H...O com O (backbone) E147.	3,00	
2cji	 Watson et al. (2006)	C: anel naftil com substituinte Cl – interação Cl... π com Y228. AI: anel com O e N na composição - C-H... π com Y99, W15 e F74. AII: não ocupa.	6,00	
2d1j	 Komoriya et al. (2005)	C: anéis conjugados contendo N na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anéis conjugados – tendo N e S na composição e um substituinte OH - interações C-H... π com Y99 e W215 e π ... π com F174. AII: não ocupa.		2,50

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

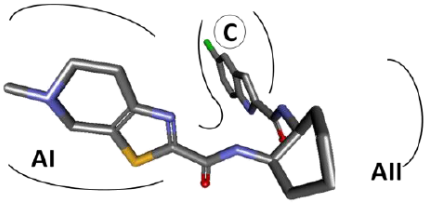
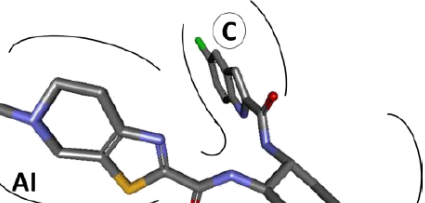
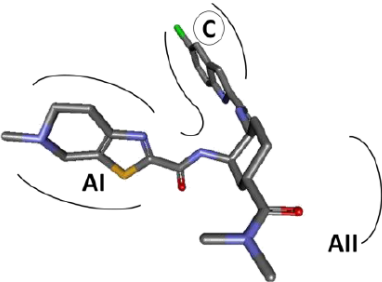
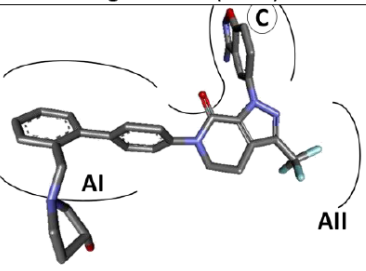
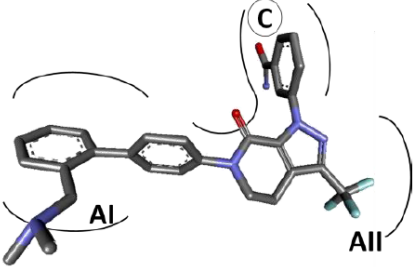
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2ei6	 Nagata et al. (2007)	C: anéis conjugados contendo N na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anéis conjugados – contendo N e S na composição e um substituinte CH ₃ - interações C-H... π com Y99 e F174. AII: não ocupa.		41,00
2ei7	 Nagata et al. (2007)	C: anéis conjugados contendo N na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anéis conjugados – contendo N e S na composição e um substituinte CH ₃ - interações C-H... π com Y99 e F174. AII: não ocupa.		13,00
2ei8	 Nagata et al. (2007)	C: anéis conjugados contendo N na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anéis conjugados – contendo N e S na composição e um substituinte CH ₃ - interações C-H... π com Y99 e F174. AII: não ocupa.		-
2fzz	 Nagata et al. (2007)	C: anéis conjugados tendo O e N na composição, com substituinte NH ₂ – ligações de H tipo N-H...O com D189. AI: dois anéis tipo fenil – interações C-H... π com Y99 e W215 e π ... π com F174. AII: substituinte CF ₃ – interação C-H...F com Q192.		0,03
2g00	 Pinto et al. (2006)	C: anel aromático com substituinte CONH ₂ - ligações de H tipo N-H...O com D189. AI: dois anéis tipo fenil – interações C-H... π com Y99 e W215 e π ... π com F174. AII: substituinte CF ₃ – interação C-H...F com Q192.		0,18

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (*continuação*)

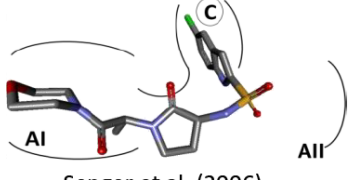
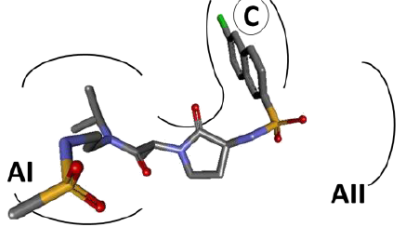
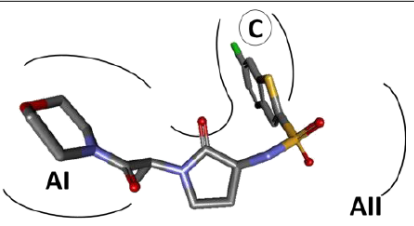
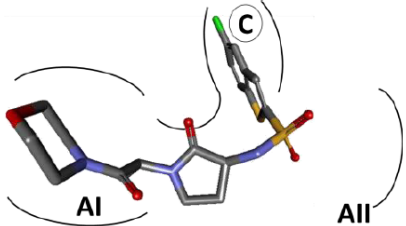
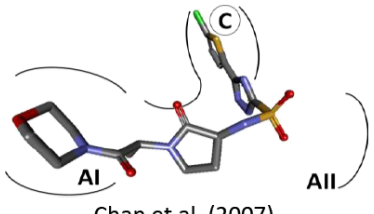
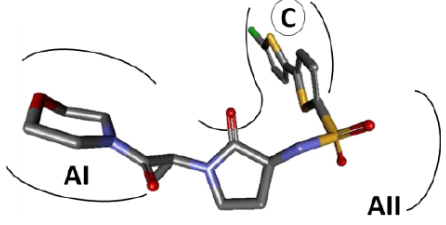
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2j2u	 Senger et al. (2006)	C: anéis conjugados contendo um N na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel contendo N e O - interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.	90,00	
2j4i	 Young et al. (2006)	C: anel naftil com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: substituinte não cíclico - interações CH... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.	1,00	
2j34	 Senger et al. (2006)	C: anéis conjugados contendo um S na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel contendo N e O - interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.	15,00	
2j38	 Senger et al. (2006)	C: anéis conjugados contendo um S na composição, com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel contendo N e O - interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.	47,00	
2j94	 Chan et al. (2007)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228 – e anel de cinco átomo, três deles sendo N. AI: anel contendo N e O - interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.	534,00	
2j95	 Chan et al. (2007)	C: dois anéis tipo tiofeno, o mais ao fundo tem o substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel contendo N e O - interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: não ocupa.	4,00	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (*continuação*)

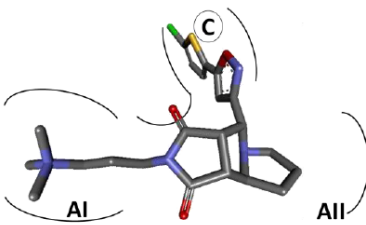
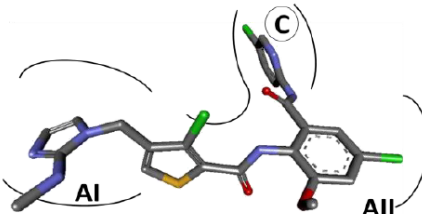
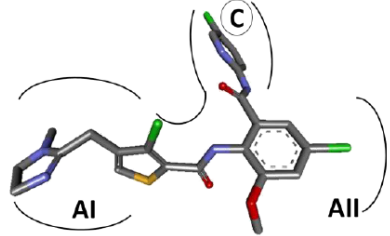
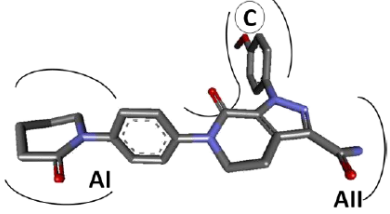
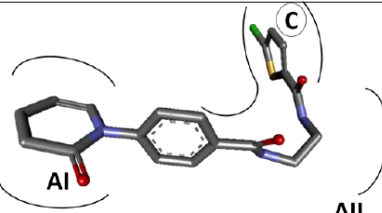
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2jkh	 Salonen et al. (2009)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228 – e anel de cinco átomos, sendo um O e um N. AI: cadeia alifática com trimetil-amonia na extremidade, realizando interações C-H... π com Trp215, Tyr99 e Phe174 AII: anel pirrol se aproxima, posicionando-se abaixo da cadeia lateral da Q192.	9,00	
2p3t	 Ye et al. (2007)	C: anel aromático, com um N na composição e um substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel imidazol – interação π ... π com Y99 e C-H... π com W215 - e anel tiofeno - interação C-H... π com F174. AII: anel aromático com substituinte <i>m</i> -Cl, que está a 3,7 Å da R143, e substituinte <i>m</i> -metoxila.	0,005	
2p3u	 Ye et al. (2007)	C: anel aromático, com um N na composição e um substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel imidazol – interação π ... π com Y99 e C-H... π com W215 - e anel tiofeno - interação C-H... π com F174. AII: anel aromático com substituinte <i>m</i> -Cl, que está a 3,8 Å da R143, e substituinte <i>m</i> -metoxila.	0,01	
2p16	 Pinto et al (2007)	C: anel aromático com substituinte <i>p</i> -OCH ₃ - interação C-H... π com Y228 e C-H...O com D189. AI: anel não-aromático contendo N – interações C-H... π com W215 e F174. AII: substituinte CONH ₂ - interação N-H...O com E146.	0,08	
2p93	 Qiao et al. (2007)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel com um N na composição - interação C-H... π com W215 e π ... π com F174. AII: não ocupa.	1,50	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2p94	<p>Qiao et al. (2007)</p>	<p>C: anéis conjugados com substituinte Cl - interação Cl...π com Y228.</p> <p>AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel com um N na composição - interação C-H...π com W215 e π...π com F174.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	0,67	
2p95	<p>Qiao et al. (2007)</p>	<p>C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl...π com Y228.</p> <p>AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel com um N na composição - interação C-H...π com W215 e π...π com F174.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	0,43	
2phb	<p>Kohrt et al. (2007)</p>	<p>C: anel aromático com substituinte Cl - interação Cl...π com Y228.</p> <p>AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel com um N na composição - interação C-H...π com W215 e π...π com F174.</p> <p>AII: não ocupa.</p>		0,32
2pr3	<p>Van Huis et al. (2007)</p>	<p>C: anel aromático com substituinte Cl - interação Cl...π com Y228.</p> <p>AI: anel fenil - interação C-H...π com Y99 - e anel fenil com substituinte SO₂CH₃ - interação C-H...π com W215 e π...π com F174.</p> <p>AII: interação C-H...O com Q192.</p>		0,16
2q1j	<p>Kohrt et al. (2007)</p>	<p>C: anel aromático com substituinte Cl - interação Cl...π com Y228.</p> <p>AI: anel fenil - interação C-H...π com Y99 - e anel fenil com substituinte SO₂CH₃ - interação C-H...π com W215 e π...π com F174.</p> <p>AII: substituinte (CH₂)₃CH₃ - interação C-H...O com Q192.</p>		0,80

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

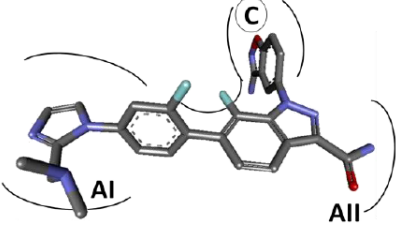
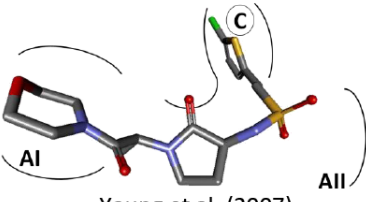
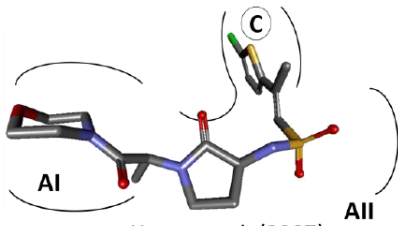
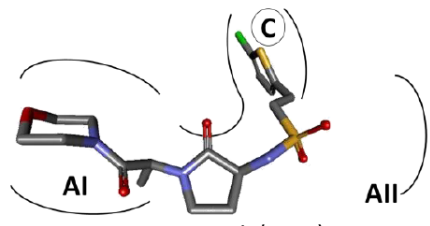
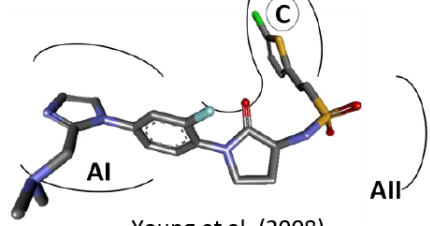
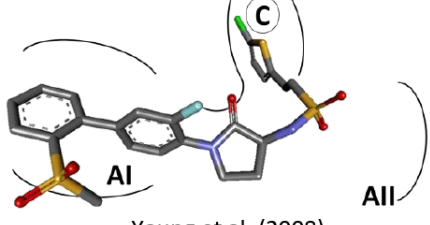
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2ra0	 Lee et al. (2008)	C: anéis conjugados com O e N na composição e substituinte NH ₂ – ligações de H tipo N-H...O com D189. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel imidazol com interação C-H... π com W215 e π ... π com F174. AII: substituinte CONH2 – ligação de H tipo N-H...O com E146.	15,90	
2uwl	 Young et al. (2007)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel não-aromático contendo N e O – interações C-H... π com W215 e F174. AII: não ocupa.	4,00	
2uwo	 Young et al. (2007)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel não-aromático contendo N e O – interações C-H... π com W215 e F174. AII: não ocupa.	2,00	
2uwp	 Young et al. (2007)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel não-aromático contendo N e O – interações C-H... π com W215 e F174. AII: não ocupa.	154,00	
2vh0	 Young et al. (2008)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel imidazol com interação C-H... π com W215 e π ... π com F174. AII: não ocupa.	3,10	
2vh6	 Young et al. (2008)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel fenil com substituinte SO ₂ CH ₃ - interação C-H... π com W215 e π ... π com F174. AII: não ocupa.	0,20	

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (continuação)

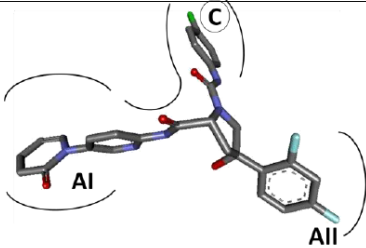
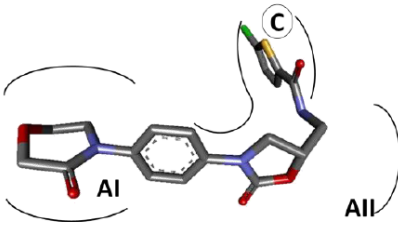
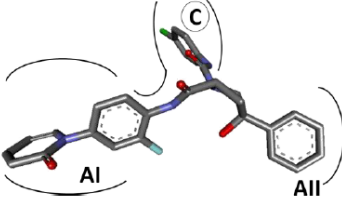
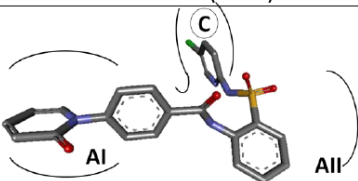
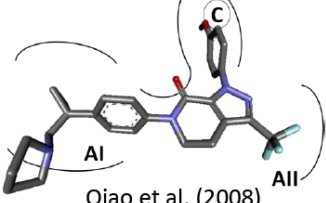
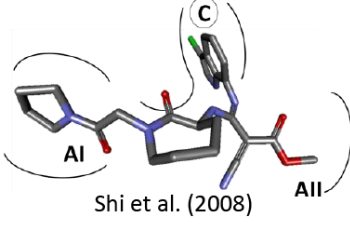
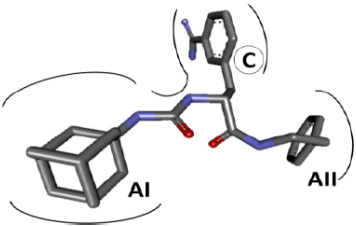
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
2w3i	 Van Huis et al. (2009)	C: anel fenil com substituinte <i>p</i> -Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel da extremidade contendo N - interação π ... π com F174 - e anel aromático do meio da cadeia - interação C-H... π com W215 e Y99. AII: anel difluor-fenil, com F a 4,0 Å da R143.		0,10
2w26	 Roehrig et al. (2005)	C: anel tiofeno com substituinte Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel não aromático - interação C-H... π com W215. AII: não ocupa.	0,40	
2w3k	 Van Huis et al. (2009)	C: anel fenil com substituinte <i>p</i> -Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel não aromática extremidade - interação C-H... π com W215. AII: anel aromático		0,08
3cen	 Corte et al. (2008)	C: anel com um N na composição e substituinte <i>p</i> -Cl - interação Cl... π com Y228. AI: anel fenil - interação C-H... π com Y99 - e anel não aromática extremidade - interação C-H... π com W215. AII: não ocupa.	5,50	
3cs7	 Qiao et al. (2008)	C: anel fenil com substituinte <i>p</i> -OCH ₃ - interação C-H...O com D189. AI: interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: substituinte CF ₃ a 3,2 Å da R143.	0,02	
3ens	 Shi et al. (2008)	C: anéis conjugados tendo N na composição e substituinte Cl - sem interação. AI: interações C-H... π com Y99, F174 e W215. AII: substituinte faz interações C-H...O com carbonos da cadeia R da Gln192 e com O do Glu147.		2,4

Tabela 3.3.a.4 Posição, interações e atividade do ligante no sítio ativo do Fator X (*continuação*)

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Ki (nmol/L)	IC50 (nmol/L)
3liw (1kye)	 <p>Mueller et al. (2003)</p>	<p>C: anel fenil com substituinte <i>m</i>-amidina - ponte salina com D189.</p> <p>AI: interações C-H...π com Y99, F174 e W215.</p> <p>AII: substituinte CON(CH₂)₂Ph - interações C-H...O com OE1 da Gln192.</p>	-	

Anexo 3.4. LIGANTES OBTIDOS DE BANCOS DE DADOS

Tabela 3.4 Ligantes obtidos do Cambridge Structural Database (CSD), SuperHapten Data Base (SH), SuperDrug Database (SD) e PDBSum

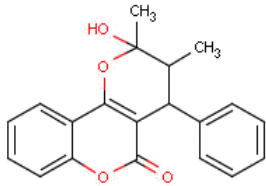
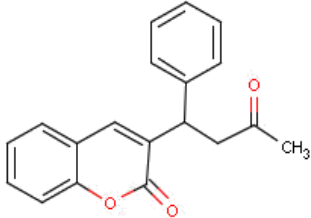
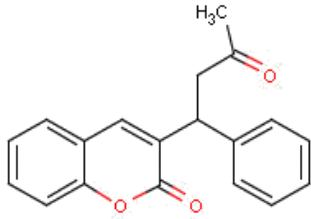
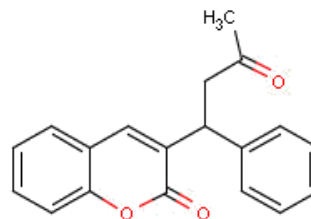
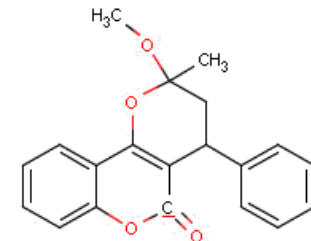
Código	Ligante do Grupo 3	Estrutura
	Banco de Dados/Referência	
BEFZES	- rac-4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenyl-butyl)chromen-2-one	
	CSD; Halland, Hansen & Jorgensen (2003)	
EFIWIZ1	sodium rac-4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenyl-butyl)-2H-1-benzopyran-2-one-2-propanol solvate	
	CSD; Sheth, Young Junior & Grant (2002)	
EFIWIZ2	sodium rac-4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenyl-butyl)-2H-1-benzopyran-2-one-2-propanol solvate	
	CSD; Sheth et al. (2004)	
EFIWIZ11	sodium rac-4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenyl-butyl)-2H-1-benzopyran-2-one-2-propanol solvate	
	CSD; Sheth et al. (2004)	
FAXMAS	rac-trans-2-methoxy-2-methyl-4-phenyl-3,4-dihydro-2H,5H-pyranol (3,2-c) (1) benzopyran-5-one	
	CSD; Valente, Eggleston & Schomaker (1986)	

Tabela 3.4 Ligantes obtidos do Cambridge Structural Database (CSD), SuperHapten Data Base (SH), SuperDrug Database (SD) e PDBSum (*continuação*)

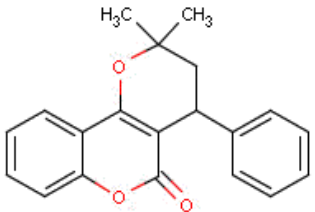
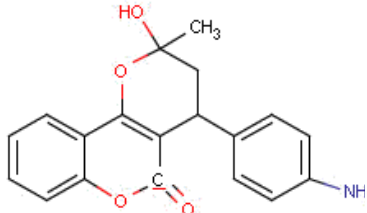
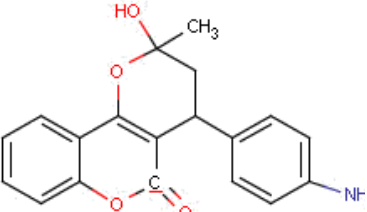
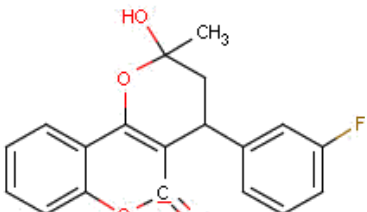
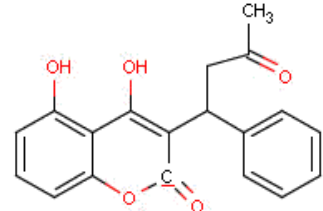
Código	Ligante do Grupo 3	Estrutura
	Banco de Dados/Referência	
FAXMEW	trans-(2R,4R)-2-methoxy-2-methyl-4-phenyl-3,4-dihydro-2H,5H-pyranol (3,2-c) benzopyran-5-one	
	CSD; Valente, Eggleston & Schomaker (1986)	
JAWBUE1	rac-(2R,4R);(2R,4S)-2-hidroxy-2-methyl-3,4-dihydro-trans-4-(3-nitrophenyl) - 2H,5H-pyranol (3,2-c) benzopyran-5-one	
	CSD; Savell Junior, Valente & Eggleston (1989)	
JAWBUE2	rac-(2R,4R);(2R,4S)-2-hidroxy-2-methyl-3,4-dihydro-trans-4-(3-nitrophenyl) - 2H,5H-pyranol (3,2-c) benzopyran-5-one	
	CSD; Savell Junior, Valente & Eggleston (1989)	
JAWCAL	(+)-trans-4-(fluorophenyl)-2-hidroxy-2-methyl-3,4-dihydro - 2H,5H-pyranol (3,2-c) benzopyran-5-one	
	CSD; Savell Junior, Valente & Eggleston (1989)	
JOGLUM	rac-3-(1-phenyl-3-oxobutyl)-4,5- dihidroxy benzopyran-2-one	
	CSD; Castleberry, Valente & Eggleston (1990)	

Tabela 3.4 Ligantes obtidos do Cambridge Structural Database (CSD), SuperHapten Data Base (SH), SuperDrug Database (SD) e PDBSum (*continuação*)

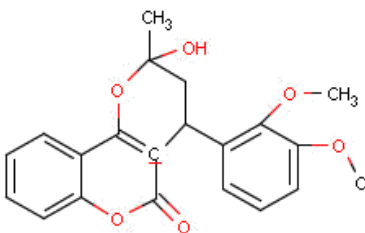
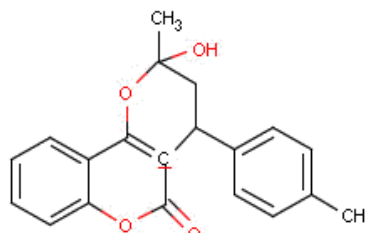
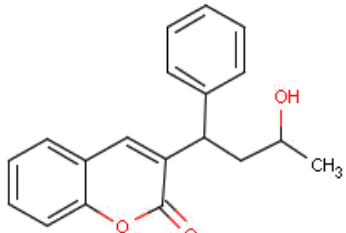
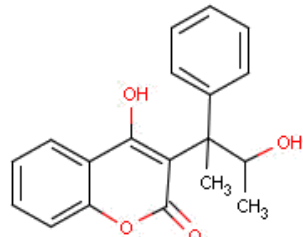
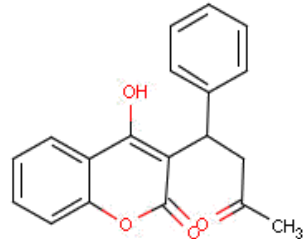
Código	Ligante do Grupo 3	Estrutura
	Banco de Dados/Referência	
VAWTIW	(+,-)-trans-4-(2,3-dimethoxyphenyl)-2-hidroxy-2-methyl-3,4-dihydro - 2H,5H-pyranol (3,2-c)(1) benzopyran-5-one	
	CSD; Ruggiero et al. (1989)	
VAWTOC	(+)-trans-4-(4-methylphenyl)-2-hidroxy-2-methyl-3,4-dihydro - 2H,5H-pyrano (3,2-c)(1) benzopyran-5-one	
	CSD; Ruggiero et al. (1989)	
WRR-IDEAL	4-hydroxy-3-[(1s,3r)-3-hydroxy-1-phenylbutyl] -2h-chromen-2-one	
	PDBSum; Petitpas et al. (2001)	
WRS-IDEAL	4-hydroxy-3-[(1s,3s)-3-hydroxy-1-phenylbutyl] -2h-chromen-2-one	
	PDBSum; Petitpas et al. (2001)	
RWF-IDEAL	R-warfarin	
	PDBSum; Ghuman et al. (2005)	

Tabela 3.4 Ligantes obtidos do Cambridge Structural Database (CSD), SuperHapten Data Base (SH), SuperDrug Database (SD) e PDBSum (continuação)

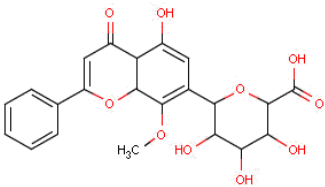
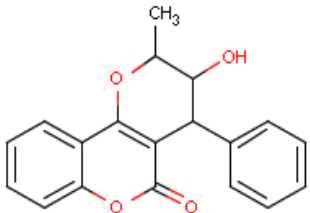
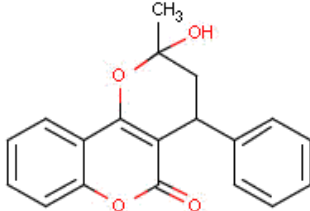
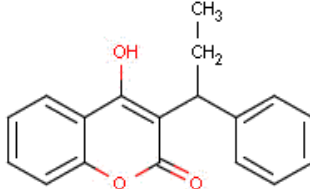
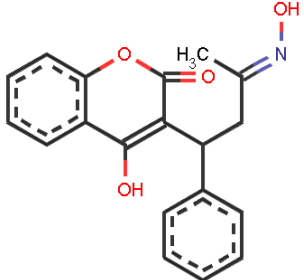
Código	Ligante do Grupo 3	Estrutura
	Banco de Dados/Referência	
WOGONINE	wogonine-7-o-beta-glucuronide	
	Super Hapten; Kim et al. (2003)	
WARFAR10	S-Varfarin	
	CSD; Valente, Trager & Jensen (1975)	
WARFIN	Warfarin methanol solvate	
	CSD; Bravic, Gaultier & Hauw (1973)	
B01AA04	Phenprocoumon	
	SuperDrug	
10346	4-hydroxy-3-(3-hydroxyimino-1-phenylbutyl)-2h-chromen-2-one	
	Super Hapten	

Tabela 3.4 Ligantes obtidos do Cambridge Structural Database (CSD), SuperHapten Data Base (SH), SuperDrug Database (SD) e PDBSum (*continuação*)

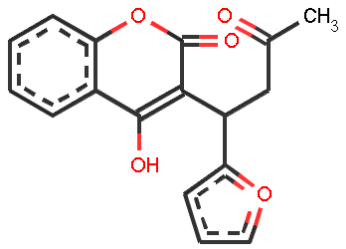
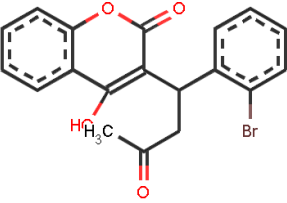
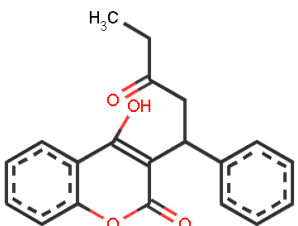
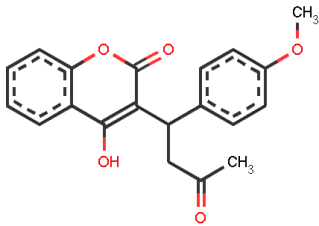
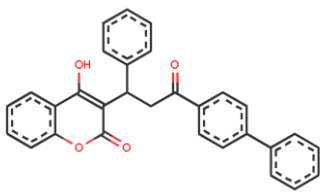
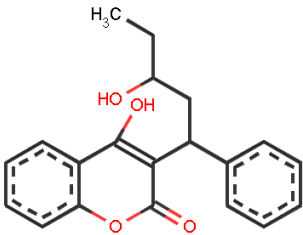
Código	Ligante do Grupo 3	Estrutura
	Banco de Dados/Referência	
12895	Coumafuril	
	Super Hapten	
14692	bas 0349309	
	Super Hapten	
14693	bas 0349314	
	Super Hapten	

Tabela 3.4 Ligantes obtidos do Cambridge Structural Database (CSD), SuperHapten Data Base (SH), SuperDrug Database (SD) e PDBSum (*continuação*)

Código	Ligante do complexo cristalográfico FX	Estrutura
	Banco de Dados/Referência	
15096	chs 0002594	
	Super Hapten	
15097	5102894	
	Super Hapten	
16493	4-hydroxy-3-(3-hydroxy-1-phenylpentyl)-2h-chromen-2-one	
	Super Hapten	

Referências – Capítulo 3

- ADLER, M.; DAVEY, D. D.; PHILLIPS, G. B.; KIM, S. H.; JANCARIK, J.; RUMENNIK, G.; LIGHT, D. R.; WHITLOW, M. 'Preparation, Characterization, and the Crystal Structure of the Inhibitor Zk-807834 (Ci-1031) Complexed with Factor Xa', *Biochemistry*, v.39, No. 41, 12534-12542, 2000.
- ADLER, M.; KOCHANNY, M. J.; YE, B.; RUMENNIK, G.; LIGHT, D. R.; BIANCALANA, S.; WHITLOW, M. 'Crystal Structures of Two Potent Nonamidine Inhibitors Bound to Factor Xa', *Biochemistry*, v.41, No. 52, 15514-15523, 2002.
- BRANDSTETTER, H.; KUHNE, A.; BODE, W.; HUBER, R.; VONDERSAAL, W.; WIRTHENSOHN, K.; ENGH, R. A. 'X-Ray Structure of Active Site-Inhibited Clotting Factor Xa - Implications for Drug Design and Substrate Recognition', *Journal of Biological Chemistry*, v.271, No. 47, 29988-29992, 1996.
- BRAVIC, G.; GAULTIER, J.; HAUW, C. 'Crystal-Structure of Antivitamin-K Warfarin', *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie C*, v.277, No. 22, 1215-1218, 1973.
- CASTLEBERRY, B.; VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S. 'Open-Cyclic Warfarin Isomerism - 5-Hydroxywarfarin', *Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research*, v.20, No. 6, 583-593, 1990.
- CHAN, C.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CAMPBELL, M.; CHAUDRY, L.; CHUNG, C. W.; CONVERY, M. A.; HAMBLIN, J. N.; JOHNSTONE, L.; KELLY, H. A.; KLEANTHOS, S.; PATIKIS, A.; PATEL, C.; PATEMAN, A. J.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E.; WHITWORTH, C.; YOUNG, R. J.; ZHOU, P. 'Factor Xa Inhibitors: S1 Binding Interactions of a Series of N-((3s)-1-(1s)-1-Methyl-2-Morpholin-4-Yl-2-Oxoethyl -2-Oxopyrrolidin-3-Yl)Sulfonamides', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, No. 7, 1546-1557, 2007.
- CORTE, J. R.; FANG, T.; PINTO, D. J. P.; HAN, W.; HU, Z. L.; JIANG, X. J.; LI, Y. L.; GAUJUAN, J. F.; HADDEN, M.; ORTON, D.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; WONG, P. C.; HE, K.; MORIN, P. E.; CHANG, C. H.; CHENEY, D. L.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Structure-Activity Relationships of Anthranilamide-Based Factor Xa Inhibitors Containing Piperidinone and Pyridinone P4 Moieties', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 9, 2845-2849, 2008.
- CSD: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>
- FREDERICK, R.; ROBERT, S.; CHARLIER, C.; DE RUYCK, J.; WOUTERS, J.; PIROTTE, B.; MASEREEL, B.; POCHET, L. '3,6-Disubstituted Coumarins as Mechanism-Based Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 24, 7592-7603, 2005.
- GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. 'Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of Human Serum Albumin', *Journal of Molecular Biology*, v.353, No. 1, 38-52, 2005.
- GUERTIN, K. R.; GARDNER, C. J.; KLEIN, S. I.; ZULLI, A. L.; CZEKAJ, M.; GONG, Y.; SPADA, A. P.; CHENEY, D. L.; MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; BROWN, K. D.; COLUSSI, D. J.; CHU, V.; HERAN, C. L.; MORGAN, S. R.; BENTLEY, R. G.; DUNWIDDIE, C. T.; LEADLEY, R. J.; PAULS, H. W. 'Optimization of the Beta-Aminoester Class of Factor Xa Inhibitors. Part 2: Identification of Fxv673 as a Potent and Selective Inhibitor with Excellent in Vivo Anticoagulant Activity', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.12, No. 12, 1671-1674, 2002.
- HAGINOYA, N.; KOBAYASHI, S.; KOMORIYA, S.; YOSHINO, T.; NAGATA, T.; HIROKAWA, Y.; NAGAHARA, T. 'Design, Synthesis, and Biological Activity of Non-Amidine Factor Xa Inhibitors Containing Pyridine N-Oxide and 2-Carbamoylthiazole Units', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.12, No. 21, 5579-5586, 2004.

- HAGINOYA, N.; KOBAYASHI, S.; KOMORIYA, S.; YOSHINO, T.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T.; WATANABE, K.; HIROKAWA, Y.; FURUGORI, T.; NAGAHARA, T. 'Synthesis and Conformational Analysis of a Non-Amidine Factor Xa Inhibitor That Incorporates 5-Methyl-4,5,6,7-Tetrahydrothiazolo 5,4-C Pyridine as S4 Binding Element', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, No. 21, 5167-5182, 2004.
- HALLAND, N.; HANSEN, T.; JORGENSEN, K. A. 'Organocatalytic Asymmetric Michael Reaction of Cyclic 1,3-Dicarbonyl Compounds and Alpha,Beta-Unsaturated Ketones - a Highly Atom-Economic Catalytic One-Step Formation of Optically Active Warfarin Anticoagulant', *Angewandte Chemie-International Edition*, v.42, No. 40, 4955-4957, 2003.
- HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; SHINOZAKI, M.; OHNO, T.; YATAGAI, Y.; KAMIYA, M.; KUROKAWA, M.; NISHIDA, H.; MATSUSUE, T.; MIZUGUCHI, K.; ISHII, H. 'Pharmacological Characterization of the Active Synthetic Factor Xa Inhibitors M55551 and M55165', *European Journal of Pharmacology*, v.529, No. 1-3, 164-171, 2006.
- JOHNSON, D. J. D.; LI, W.; ADAMS, T. E.; HUNTINGTON, J. A. 'Antithrombin-S195a Factor Xa-Heparin Structure Reveals the Allosteric Mechanism of Antithrombin Activation', *Embo Journal*, v.25, No. 9, 2029-2037, 2006.
- KAMATA, K.; KAWAMOTO, H.; HONMA, T.; IWAMA, T.; KIM, S. H. 'Structural Basis for Chemical Inhibition of Human Blood Coagulation Factor Xa', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, No. 12, 6630-6635, 1998.
- KIM, M. J.; LEE, H. S.; CHUNG, D. H.; LEE, Y. T. 'Synthesis of Haptens of Organophosphorus Pesticides and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Parathion-Methyl', *Analytica Chimica Acta*, v.493, No. 1, 47-62, 2003.
- KOCHANNY, M. J.; ADLER, M.; EWING, J.; GRIEDEL, B. D.; HO, E.; KARANJAWALA, R.; LEE, W.; LENTZ, D.; LIANG, A. M.; MORRISSEY, M. M.; PHILLIPS, G. B.; POST, J.; SACCHI, K. L.; SAKATA, S. T.; SUBRAMANYAM, B.; VERGONA, R.; WALTERS, J.; WHITE, K. A.; WHITLOW, M.; YE, B.; ZHAO, Z. C.; SHAW, K. J. 'Substituted Thiophene-Anthranilamides as Potent Inhibitors of Human Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.15, No. 5, 2127-2146, 2007.
- KOVRT, J. T.; BIGGE, C. F.; BRYANT, J. W.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CHI, L.; CODY, W. L.; DAHRING, T.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HAARER, S.; HEEMSTRA, R.; JANICZEK, N.; NARASIMHAN, L.; MCCLANAHAN, J.; PETERSON, J. T.; SAHASRABUDHE, V.; SCHAUM, R.; VAN HUIS, C. A.; WELCH, K. M.; ZHANG, E.; LEADLEY, R. J.; EDMUNDS, J. J. 'The Discovery of (2r,4r)-N-(4-Chlorophenyl)-N-(2-Fluoro-4-(2-Oxopyridin-1(2h)-Yl)Phenyl)- 4-Methoxypyrrolidine-1,2-Dicarboxamide (Pd 0348292), an Orally Efficacious Factor Xa Inhibitor', *Chemical Biology & Drug Design*, v.70, No. 2, 100-112, 2007.
- KOVRT, J. T.; FILIPSKI, K. J.; CODY, W. L.; BIGGE, C. F.; LA, F.; WELCH, K.; DAHRING, T.; BRYANT, J. W.; LEONARD, D.; BOLTON, G.; NARASIMHAN, L.; ZHANG, E.; PETERSON, J. T.; HAARER, S.; SAHASRABUDHE, V.; JANICZEK, N.; DESIRAJU, S.; HENA, M.; FIAKPUI, C.; SARASWAT, N.; SHARMA, R.; SUN, S. Y.; MAITI, S. N.; LEADLEY, R.; EDMUNDS, J. J. 'The Discovery of Glycine and Related Amino Acid-Based Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.14, No. 13, 4379-4392, 2006.
- KOMORIYA, S.; HAGINOYA, N.; KOBAYASHI, S.; NAGATA, T.; MOCHIZUKI, A.; SUZUKI, M.; YOSHINO, T.; HORINO, H.; NAGAHARA, T.; ISOBE, Y.; FURUGOORI, T. 'Design, Synthesis, and Biological as Factor Xa Inhibitors: Sar Study of S1 Activity of Non-Basic Compounds and Aryl Binding Sites', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, No. 12, 3927-3954, 2005.
- LEE, Y. K.; PARKS, D. J.; LU, T.; THIEU, T. V.; MARKOTAN, T.; PAN, W.; MCCOMSEY, D. F.; MILKIEWICZ, K. L.; CRYSLER, C. S.; NINAN, N.; ABAD, M. C.; GIARDINO, E. C.; MARYANOFF, B. E.; DAMIANO, B. P.;

- PLAYER, M. R. '7-Fluoroindazoles as Potent and Selective Inhibitors of Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.51, No. 2, 282-297, 2008.
- LUDEMAN, J. P.; PIKE, R. N.; BROMFIELD, K. M.; DUGGAN, P. J.; CIANCI, J.; LE BONNIEC, B.; WHISSTOCK, J. C.; BOTTOMLEY, S. P. 'Determination of the P '(1), P '(2) and P '(3) Subsite-Specificity of Factor Xa', *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.35, No. 2, 221-225, 2003.
- MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; CHOI-SLEDSKI, Y. M.; BECKER, M. R.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V. 'Molecular Structures of Human Factor Xa Complexed with Ketopiperazine Inhibitors: Preference for a Neutral Group in the S1 Pocket', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, No. 5, 685-690, 2003.
- MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; POUZIEUX, S.; CHOI-SLEDESKI, Y. M.; BECKER, M. R.; KLEIN, S. I.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V. 'Crystal Structures of Human Factor Xa Complexed with Potent Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.43, No. 17, 3226-3232, 2000.
- MATTER, H.; DEFOSSA, E.; HEINELT, U.; BLOHM, P. M.; SCHNEIDER, D.; MULLER, A.; HEROK, S.; SCHREUDER, H.; LIESUM, A.; BRACHVOGEL, V.; LONZE, P.; WALSER, A.; AL-OBEIDI, F.; WILDGOOSE, P. 'Design and Quantitative Structure-Activity Relationship of 3-Amidinobenzyl-1h-Indole-2-Carboxamides as Potent, Nonchiral, and Selective Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, No. 13, 2749-2769, 2002.
- MATTER, H.; WILL, D. W.; NAZARE, M.; SCHREUDER, H.; LAUX, V.; WEHNER, V. 'Structural Requirements for Factor Xa Inhibition by 3-Oxybenzamides with Neutral P1 Substituents: Combining X-Ray Crystallography, 3d-Qsar, and Tailored Scoring Functions', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 9, 3290-3312, 2005.
- MCDOWELL, L. M.; MCCARRICK, M. A.; STUDELSKA, D. R.; O'CONNOR, R. D.; LIGHT, D. R.; GUILFORD, W. J.; ARNAIZ, D.; ADLER, M.; DALLAS, J. L.; POLIKS, B.; SCHAEFER, J. 'Human Factor Xa Bound Amidine Inhibitor Conformation by Double Rotational-Echo Double Resonance Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Dynamics Simulations', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, No. 3, 359-363, 2003.
- MUELLER, M. M.; SPERL, S.; STURZEBECKER, J.; BODE, W.; MORODER, L. '(R)-3-Amidinophenylalanine-Derived Inhibitors of Factor Xa with a Novel Active-Site Binding Mode', *Biological Chemistry*, v.383, No. 7-8, 1185-1191, 2002.
- MURAKAMI, M. T.; RIOS-STEINER, J.; WEAVER, S. E.; TULINSKY, A.; GEIGER, J. H.; ARNI, R. K. 'Intermolecular Interactions and Characterization of the Novel Factor Xa Exosite Involved in Macromolecular Recognition and Inhibition: Crystal Structure of Human Gla-Domainless Factor Xa Complexed with the Anticoagulant Protein Napc2 from the Hematophagous Nematode *Ancylostoma Caninum*', *Journal of Molecular Biology*, v.366, No. 2, 602-610, 2007.
- NAGATA, T.; YOSHINO, T.; HAGINOYA, N.; YOSHIKAWA, K.; ISOBE, Y.; FURUGOHRI, T.; KANNO, H. 'Cycloalkanediamine Derivatives as Novel Blood Coagulation Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, No. 16, 4683-4688, 2007.
- NAR, H.; BAUER, M.; SCHMID, A.; STASSEN, J. M.; WIENEN, W.; PRIEPKE, H. W. M.; KAUFFMANN, I. K.; RIES, U. J.; HAUDEL, N. H. 'Structural Basis for Inhibition Promiscuity of Dual Specific Thrombin and Factor Xa Blood Coagulation Inhibitors', *Structure*, v.9, No. 1, 29-37, 2001.
- NAZARE, M.; WILL, D. W.; MATTER, H.; SCHREUDER, H.; RITTER, K.; URMANN, M.; ESSRICH, M.; BAUER, A.; WAGNER, M.; CZECH, J.; LORENZ, M.; LAUX, V.; WEHNER, V. 'Probing the Subpockets of Factor Xa Reveals Two Binding Modes for Inhibitors Based on a 2-Carboxyindole Scaffold: A Study Combining Structure-Activity Relationship and X-Ray Crystallography', *Journal of Medicinal*

Chemistry, v.48, No. 14, 4511-4525, 2005.

- NISHIDA, H.; MIYAZAKI, Y.; KITAMURA, Y.; OHASHI, M.; MATSUSUE, T.; OKAMOTO, A.; HOSAKA, Y.; OHNISHI, S.; MOCHIZUKI, H. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as Factor Xa Inhibitor', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.49, No. 10, 1237-1244, 2001.
- NISHIDA, H.; MIYAZAKI, Y.; MUKAIHIRA, T.; SAITOH, F.; FUKUI, M.; HARADA, K.; ITOH, M.; MURAOKA, A.; MATSUSUE, T.; OKAMOTO, A.; HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; OHNISHI, S.; MOCHIZUKI, H. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as a Factor Xa Inhibitor - Ii. Substituent Effect on Biological Activities', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.50, No. 9, 1187-1194, 2002.
- NISHIDA, H.; MIYAZAKI, Y.; MUKAIHIRA, T.; SHIMADA, H.; SUZUKI, K.; SAITOH, F.; MIZUNO, M.; MATSUSUE, T.; OKAMOTO, A.; HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; OHNISHI, S.; MOCHIZUKI, H. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as Factor Xa Inhibitors Iii. Effect of Ring Opening of Piperazinone Moiety on Inhibition', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.52, No. 4, 459-462, 2004.
- NORLEDGE, B. V.; PETROVAN, R. J.; RUF, W.; OLSON, A. J. 'The Tissue Factor/Factor Viii/Factor Xa Complex: A Model Built by Docking and Site-Directed Mutagenesis', *Proteins-Structure Function and Genetics*, v.53, No. 3, 640-648, 2003.
- PADMANABHAN, K.; PADMANABHAN, K. P.; TULINSKY, A.; PARK, C. H.; BODE, W.; HUBER, R.; BLANKENSHIP, D. T.; CARDIN, A. D.; KISIEL, W. 'Structure of Human Des(1-45) Factor-Xa at 2.2-Angstrom Resolution', *Journal of Molecular Biology*, v.232, No. 3, 947-966, 1993.
- PDB - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; TWINE, S.; EAST, M.; CURRY, S. 'Crystal Structure Analysis of Warfarin Binding to Human Serum Albumin - Anatomy of Drug Site I', *Journal of Biological Chemistry*, v.276, No. 25, 22804-22809, 2001.
- PINTO, D. J. P.; GALEMMO, R. A.; QUAN, M. L.; ORWAT, M. J.; CLARK, C.; LI, R. H.; WELLS, B.; WOERNER, F.; ALEXANDER, R. S.; ROSSI, K. A.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; LUETTGEN, J. M.; RENDINA, A. R.; KNABB, R. M.; HE, K.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Discovery of Potent, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa with Neutral P1 Moieties', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 21, 5584-5589, 2006.
- PINTO, D. J. P.; ORWAT, M. J.; KOCH, S.; ROSSI, K. A.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; HE, K.; XIN, B. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Discovery of 1-(4-Methoxyphenyl)-7-Oxo-6-(4-(2-Oxopiperidin-1-Yl)Phenyl)-4,5,6,7-Tetrahydro-1h-Pyrazolo 3,4-C Pyridine-3-Carboxamide (Apixaban, Bms-562247), a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, No. 22, 5339-5356, 2007.
- PINTO, D. J. P.; ORWAT, M. J.; QUAN, M. L.; HAN, Q.; GALEMMO, R. A.; AMPARO, E.; WELLS, B.; ELLIS, C.; HE, M. Y.; ALEXANDER, R. S.; ROSSI, K. A.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; LUETTGEN, J. M.; RENDINA, A. R.; KNABB, R. M.; MERSINGER, L.; KETTNER, C.; BAL, S.; HE, K.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. '1- 3-Aminobenzisoxazol-5 '-Yl -3-Trifluoromethyl-6-12 '-(3-(R)-Hydroxy-N-Pyrrolidiny)Methyl-1,1 '-Biphen-4-Yl -1,4,5,6-Tetrahydropyrazolo-13,4-C -Pyridin-7-One (Bms-740808) a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa 10.1016/J.Bmel.2006.02.069', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 15, 4141-4147, 2006.

- QIAO, J. X.; CHENEY, D. L.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A. M.; KING, S. R.; HE, K.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Achieving Structural Diversity Using the Perpendicular Conformation of Alpha-Substituted Phenylcyclopropanes to Mimic the Bioactive Conformation of Ortho-Substituted Biphenyl P4 Moieties: Discovery of Novel, Highly Potent Inhibitors of Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 14, 4118-4123, 2008.
- QLAO, J. X.; CHANG, C. H.; CHENEY, D. L.; MORIN, P. E.; WANG, G. Z.; KING, S. R.; WANG, T. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'SAR and X-Ray Structures of Enantiopure 1,2-Cis-(1r,2s)-Cyclopentylidiamine and Cyclohexylidiamine Derivatives as Inhibitors of Coagulation Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, No. 16, 4419-4427, 2007.
- QUAN, M. L.; LAM, P. Y. S.; HAN, Q.; PINTO, D. J. P.; HE, M. Y.; LI, R. H.; ELLIS, C. D.; CLARK, C. G.; TELEHA, C. A.; SUN, J. H.; ALEXANDER, R. S.; BAI, S.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WONG, P. C.; WEXLER, R. R. 'Discovery of 1-(3'-Aminobenzisoxazol-5'-Yl)-3-Trifluoromethyl-N- 2-Fluoro-4- (2'-Dime Thylaminomethyl)Imidazol-1-Yl Phenyl -1h-Pyrazole-5-Carboxamide Hydrochloride (Razaxaban), a Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitor', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 6, 1729-1744, 2005.
- RIOS-STEINER, J. L.; MURAKAMI, M. T.; TULINSKY, A.; ARNI, R. K. 'Active and Exo-Site Inhibition of Human Factor Xa: Structure of Des-Gla Factor Xa Inhibited by Nap5, a Potent Nematode Anticoagulant Protein from Ancylostoma Caninum', *Journal of Molecular Biology*, v.371, No. 3, 774-786, 2007.
- ROEHRIG, S.; STRAUB, A.; POHLMANN, J.; LAMPE, T.; PERNERSTORFER, J.; SCHLEMMER, K. H.; REINEMER, P.; PERZBORN, E. 'Discovery of the Novel Antithrombotic Agent 5-Chloro-N-((5s)-2-Oxo-3 4-(3-Oxomorpholin-4-Yl)Phenyl -1,3-Oxazolidin- 5-Yl)Methyl)Thiophene-2-Carboxamide (Bay 59-7939): An Oral, Direct Factor Xa Inhibitor', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 19, 5900-5908, 2005.
- RUGGIERO, G.; PLATT, O.; VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S. 'Structures of (+/-)-Trans-4-(2,3-Dimethoxyphenyl)-(I) and (+)-Trans-4-(4-Methylphenyl)-2-Hydroxy-2-Methyl-3,4-Dihydro-2h,5h-Pyrano 3,2-C - 1 Benzopyran-5-One (II)', *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.45, 1740-1743, 1989.
- SAITOH, F.; NISHIDA, H.; MUKAIHIRA, T.; KOSUGA, N.; OHKOUCHI, M.; MATSUSUE, T.; SHIROMIZU, I.; HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; YAMAMOTO, I. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as Factor Xa Inhibitors Vi. A Series of New Derivatives Containing N,S- and N,So2-Spiro Acetal Scaffolds', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.55, No. 2, 317-323, 2007.
- SALONEN, L. M.; BUCHER, C.; BANNER, D. W.; HAAP, W.; MARY, J. L.; BENZ, J.; KUSTER, O.; SEILER, P.; SCHWEIZER, W. B.; DIEDERICH, F. 'Cation-Pi Interactions at the Active Site of Factor Xa: Dramatic Enhancement Upon Stepwise N-Alkylation of Ammonium Ions', *Angewandte Chemie-International Edition*, v.48, No. 4, 811-814, 2009.
- SAVELL, V. H.; VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S. 'Structures of (+/-)-Trans-4-(3-Nitrophenyl)- (I) and (+)-Trans-4-(4-Fluorophenyl)-2-Hydroxy-2-Methyl-3,4-Dihydro-2h,5h-Pyrano 3,2-C 1 Benzopyran-5-One(II)', *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.45, 1908-1911, 1989.
- SCHARER, K.; MORGENTHALER, M.; PAULINI, R.; OBST-SANDER, U.; BANNER, D. W.; SCHLATTER, D.; BENZ, J.; STIHLE, M.; DIEDERICH, F. 'Quantification of Cation-Pi Interactions in Protein-Ligand Complexes: Crystal-Structure Analysis of Factor Xa Bound to a Quaternary Ammonium Ion

- Ligand', *Angewandte Chemie-International Edition*, v.44, No. 28, 4400-4404, 2005.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. 'On Size of Active Site in Proteases .I. Papain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.27, No. 2, 157-162, 1967.
- SENGER, S.; CONVERY, M. A.; CHAN, C. E.; WATSON, N. S. 'Arylsulfonamides: A Study of the Relationship between Activity and Conformational Preferences for a Series of Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 22, 5731-5735, 2006.
- SHETH, A. R.; BRENNESSEL, W. W.; YOUNG, V. G.; MULLER, F. X.; GRANT, D. J. W. 'Solid-State Properties of Warfarin Sodium 2-Propanol Solvate', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, No. 11, 2669-2680, 2004.
- SHETH, A. R.; YOUNG, V. G.; GRANT, D. J. W. 'Warfarin Sodium 2-Propanol Solvate', *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online*, v.58, m197-m199, 2002.
- SUPER DRUG DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superdrug/>
- SUPER HAPTEN DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superhaptent/>
- VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S.; SCHOMAKER, V. 'Structures of 5 Trans-2-Hydroxy and Trans-2-Methoxy-2-Methyl-3,4-Dihydro-4-Aryl-2h,5h-Pyrano 3,2-C Benzopyra N-5-Ones', *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.42, 1809-1813, 1986.
- VALENTE, E. J.; TRAGER, W. F.; JENSEN, L. H. 'Crystal and Molecular-Structure and Absolute-Configuration of (-)-(S)-Warfarin', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v.B 31, 954-960, 1975.
- VAN HUIS, C. A.; BIGGE, C. F.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; NARASIMHAN, L. S.; SCHAUM, R. P.; ZHANG, E.; BRYANT, J. W.; HAARER, S.; JANICZEK, N.; LEADLEY, R. J.; MCCLANAHAN, T.; PETERSON, J. T.; WELCH, K. M.; EDMUNDS, J. J. 'Structure-Based Drug Design of Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as a Novel Series of Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors', *Chemical Biology & Drug Design*, v.69, No. 6, 444-450, 2007.
- VAN HUIS, C. A.; CASIMIRO-GARCIA, A.; BIGGE, C. F.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; LEADLEY, R. J.; NARASIMHAN, L. S.; MCCLANAHAN, T.; MOCHALKIN, I.; PAMMENT, M.; PETERSON, J. T.; SAHASRABUDHE, V.; SCHAUM, R. P.; EDMUNDS, J. J. 'Exploration of 4,4-Disubstituted Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as Potent, Orally Active Factor Xa Inhibitors with Extended Duration of Action', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.17, No. 6, 2501-2511, 2009.
- WANG, S. X.; HUR, E.; SOUSA, C. A.; BRINEN, L.; SLIVKA, E. J.; FLETTERICK, R. J. 'The Extended Interactions and Gla Domain of Blood Coagulation Factor Xa', *Biochemistry*, v.42, No. 26, 7959-7966, 2003.
- WATSON, N. S.; BROWN, D.; CAMPBELL, M.; CHAN, C.; CHAUDRY, L.; CONVERY, W. A.; FENWICK, R.; HAMBLIN, J. N.; HASLAM, C.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KURTIS, C. L.; LEACH, A. R.; MANCHEE, G. R.; MASON, A. M.; MITCHELL, C.; PATEL, C.; PATEL, V. K.; SENGHER, S.; SHAH, G. P.; WESTON, H. E.; WHITWORTH, C.; YOUNG, R. J. 'Design and Synthesis of Orally Active Pyrrolidin-2-One-Based Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 14, 3784-3788, 2006.
- WEI, A. Z.; ALEXANDER, R. S.; DUKE, J.; ROSS, H.; ROSENFELD, S. A.; CHANG, C. H. 'Unexpected Binding Mode of Tick Anticoagulant Peptide Complexed to Bovine Factor Xa', *Journal of Molecular Biology*, v.283, No. 1, 147-154, 1998.
- YE, B.; ARNAIZ, D. O.; CHOU, Y. L.; GRIEDEL, B. D.; KARANJAWALA, R.; LEE, W.; MORRISSEY, M. M.; SACCHI, K. L.; SAKATA, S. T.; SHAW, K. J.; WU, S. C.; ZHAO, Z. C.; ADLER, M.; CHEESEMAN, S.; DOLE, W. P.; EWING, J.; FITCH, R.; LENTZ, D.; LIANG, A.; LIGHT, D.; MORSER, J.; POST, J. J.

- RUMENNIK, G.; SUBRAMANYAM, B.; SULLIVAN, M. E.; VERGONA, R.; WALTERS, J.; WANG, Y. X.; WHITE, K. A.; WHITLOW, M.; KOCHANNY, M. J. 'Thiophene-Anthranilamides as Highly Potent and Orally Available Factor Xa Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, No. 13, 2967-2980, 2007.
- YOUNG, R. J.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CAMPBELL, M.; CHAN, C.; CHARBAUT, M.; CHUNG, C. W.; CONVERY, M. A.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KLEANTHOS, S.; MASON, A. M.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A. N.; PINTO, I. L.; POLLARD, D. R.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E. 'Structure and Property Based Design of Factor Xa Inhibitors: Pyrrolidin-2-Ones with Biaryl P4 Motifs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 1, 23-27, 2008.
- YOUNG, R. J.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CAMPBELL, M.; CHAN, C.; CHARBAUT, M.; CONVERY, M. A.; DIALLO, H.; HORTENSE, E.; IRVING, W. R.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KLEANTHOS, S.; MASON, A. M.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A. N.; PINTO, I. L.; POLLARD, D. R.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E.; ZHOU, P. 'Structure and Property Based Design of Factor Xa Inhibitors: Biaryl Pyrrolidin-2-Ones Incorporating Basic Heterocyclic Motifs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 1, 28-33, 2008.
- YOUNG, R. J.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CHAN, C.; CONVERY, M. A.; HUBBARD, J. A.; KELLY, H. A.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; ZHOU, P. 'Selective and Dual Action Orally Active Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, No. 10, 2927-2930, 2007.
- YOUNG, R. J.; CAMPBELL, M.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CHAN, C.; CONVERY, M. A.; CROWE, M. C.; DAYAL, S.; DIALLO, H.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KLEANTHOS, S.; MASON, A. M.; MORDAUNT, J. E.; PATEL, C.; PATEMAN, A. J.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; SMITH, P. W.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E.; ZHOU, P. 'Structure- and Property-Based Design of Factor Xa Inhibitors: Pyrrolidin-2-Ones with Acyclic Alanyl Amides as P4 Motifs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 23, 5953-5957, 2006.

Capítulo 4. DOCKING

Neste capítulo são apresentados os resultados dos cálculos de docking. Foi selecionada uma estrutura cristalográfica obtida dos bancos de dados, a 2pr3, que é um complexo entre o Fator X e um ligante. A parte protéica deste desse complexo serviu como receptor em todos os cálculos. Depois é apresentada a etapa de validação da metodologia, seguida dos estudos de docking para ligantes cumarínicos com atividade conhecida contra o Fator X e depois para os ligantes obtidos de bancos de dados. As interações e figuras das interações são apresentadas no Anexo 4.1 (Interações entre os Ligantes Cumarínicos e o Fator X) e Anexo 4.2 (Score e Ocupação dos Ligantes Cumarínicos no Sítio Ativo do Fator X). Ao final do capítulo utilizando todo o conhecimento adquirido previamente, são feitas sugestões no sentido de melhorar a atividade de um dos compostos.

4.1 SELEÇÃO DA PROTEÍNA-ALVO PARA O DOCKING

Dentre todas as entradas obtidas, uma estrutura do Fator X foi escolhida como o receptor-alvo. A estrutura do Fator X selecionada como estrutura de trabalho foi a 2pr3, um complexo cristalográfico do Fator X com um ligante da família das dicarboxamidas de fórmula molecular $C_{26}H_{25}ClFN_3O_5S$ e nomenclatura IUPAC: (2R, 4R)-N-(4-chlorophenyl)-N'-[2-fluoro-4-(2-methyl-sulfonylphenyl) phenyl]-4-methoxy-pyrrolidine-1,2-dicarboxamide (van Huis et al., 2007). Esta estrutura apresenta a melhor resolução entre os complexos obtidos (1.50 Å).

4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA - REDOCKING

O procedimento consiste em separar as coordenadas da proteína e do ligante do complexo cristalográfico. Após a separação das coordenadas da proteína e do ligante, são testados os parâmetros de entrada relevantes para o programa realizar os cálculos. Estes parâmetros são: centro e raio da área de busca, protonação ou não dos aminoácidos (histidina, asparagina e glutamina) que estejam incluídos na área de busca, flexibilidade ou não do ligante, presença de águas cristalográficas na cavidade e números de soluções desejadas. A cada variação dos parâmetros procede-se um cálculo de docking ajustando-se assim os parâmetros para reproduzir o complexo cristalográfico (um complexo real). O resultado do cálculo é dado em soluções (conformações e/ou orientações – ou poses – do ligante dentro do sítio) com um valor de escore associado a cada solução. Na avaliação das soluções em tela gráfica, um bom resultado no redocking significa que todas as soluções estão em concordância com a pose do ligante na estrutura cristalográfica, aparecendo sobrepostas umas às outras.

4.2.1 Redocking para o Fator X.

A estrutura de Fator X selecionada para o estudo foi a 2pr3. Os parâmetros utilizados na entrada foram: área de buscas centrada no ligante, raio 10 Å, ligante flexível, 20 soluções de saída, convergência dos resultados quando encontrado um RMSD de 1,5 Å entre as soluções. O redocking da 2pr3 foi bem sucedido validando as escolhas. A Tabela 4.1 apresenta o escore da saída selecionada e o escore médio e a Figura 4.1 o a pose selecionada.

Tabela 4.1 Escores do redocking (kcal/mol) para o Fator X (estrutura 2pr3).

Escore da solução selecionada	77,34
Escore médio	71,99

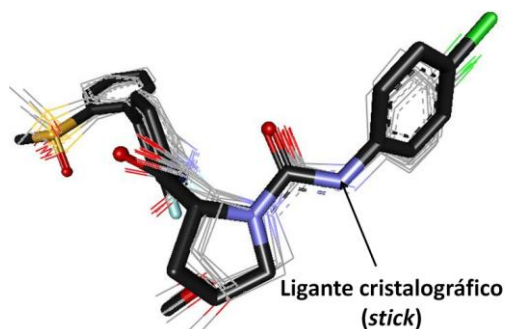


Figura 4.1 Soluções do redocking do ligante cristalográfico da estrutura 2pr3. A pose cristalográfica está indicada (em destaque, representada em *stick*). As soluções do redocking estão sobrepostas (representadas em *line*).

O bom padrão de orientações/conformações permite dizer que o redocking foi bem sucedido. Este escore será utilizado para comparações com os escores obtidos nos cálculos com as moléculas em estudo.

A seguir, a Figura 4.2 e a Figura 4.3 apresentam o posicionamento relativo aos subsítios da proteína 2pr3 e as interações do ligante obtido no redocking, respectivamente.

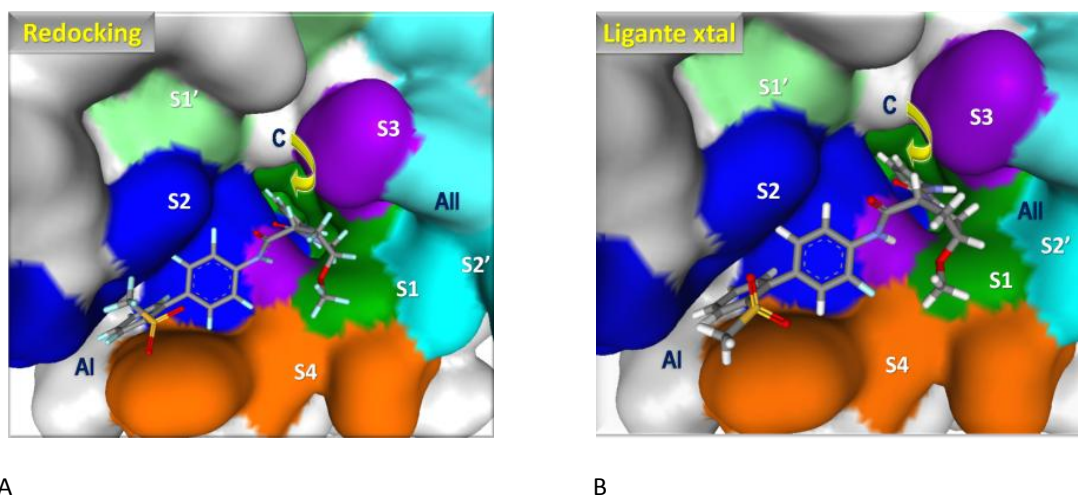


Figura 4.2 Representação do posicionamento do ligante (A) obtido com redocking no sítio do Fator X e (B) na estrutura cristalográfica original.

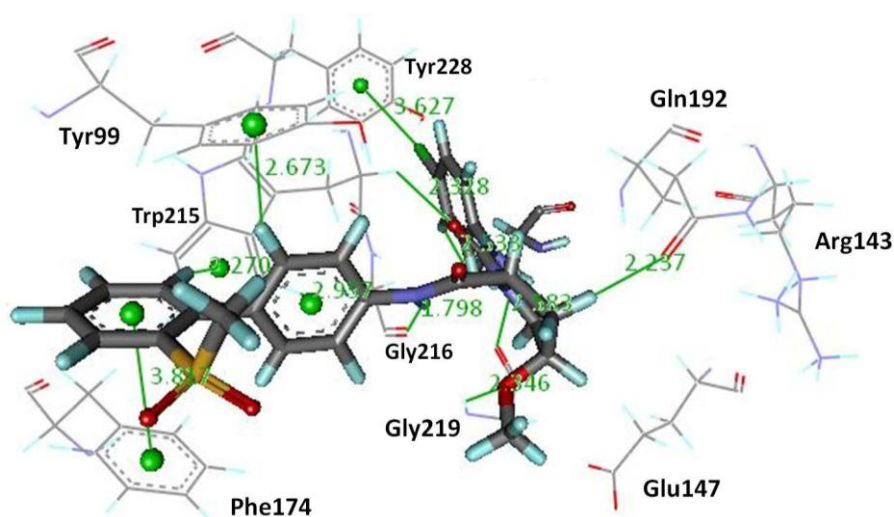


Figura 4.3 Interações do ligante cristalográfico na solução obtida com redocking no sítio do Fator X.

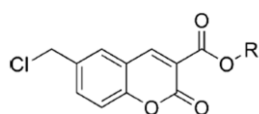
4.3 DOCKING DE LIGANTES COM ATIVIDADE CONHECIDA NO FATOR X.

4.3.1 Atividades para o Fator X.

Motivados pelas mesmas vantagens dos compostos da família das cumarinas já discutidas na introdução deste trabalho, Frederick e colaboradores (2005) testaram uma série de compostos desta família visando à inibição da trombina, comparando sua

inibição no Fator X. Os valores de inibição obtidos nessa referência foram utilizados para comparações no presente trabalho. A atividade residual para trombina e Fator X quando testados com os compostos de medida por Frederick e colaboradores (2005) está apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Ligantes com atividade relatada na literatura para o Fator X e trombina (Frederick et al., 2005)



Ligante	R	Trombina		Fator X	
		Ki (μmol/L)	Atividade residual (%)	Ki (μmol/L)	Atividade residual (%)
10	1-naftil	-	115,0 ± 18	-	109 ± 12
13	8-quinolil	-	107,0 ± 14	-	114 ± 11
15	m-cloro-fenil	0,424	10,0 ± 2	-	29 ± 3
30	2,5-diclorofenil	1,865	1,0 ± 0,1	-	39 ± 6

4.3.2 Análises: modos de ligação e interações

Os ligantes 10 e 13 apresentam baixa atividade no Fator X (Frederick et al., 2005), como indicado pela medida de atividade residual na enzima. Os valores de Ki estavam disponíveis apenas para os ligantes 15 e 30 que apresentaram melhores resultados nas medidas de atividade residual com relação a trombina. Os escores e as interações para os complexos com estes ligantes estão apresentados no Anexo 4.1.

Foi possível relacionar as poses calculadas com o docking com a ocupação das regiões do sítio ativo, do modo como foi feito com os ligantes cristalográficos (Capítulo 3). Deste modo, com relação ao posicionamento, verificou-se que os quatro ligantes ocupam as regiões C e All. Este foi o padrão obtido para eles. Contudo, a região que o anel cumarínico ocupa, variou. Os ligantes 10 e 13 ficam posicionados com a parte cumarínica

fora da cavidade C, ou seja, na região All, enquanto que no caso dos ligantes 15 e 30 a cumarina fica dentro da cavidade C. Este resultado permite sugerir uma correlação entre atividade e o modo de ligação ao sítio.

Com relação aos escores, foram obtidos valores ligeiramente mais altos para os ligantes menos ativos 10 e 13. No entanto, ao verificar o padrão exibido pelas saídas de docking (Figura 4.4), nota-se que ele é mais bem definido para os compostos 15 e 30, o que reforça o peso da análise das orientações/conformações para se estabelecer uma correlação com as atividades relatadas.

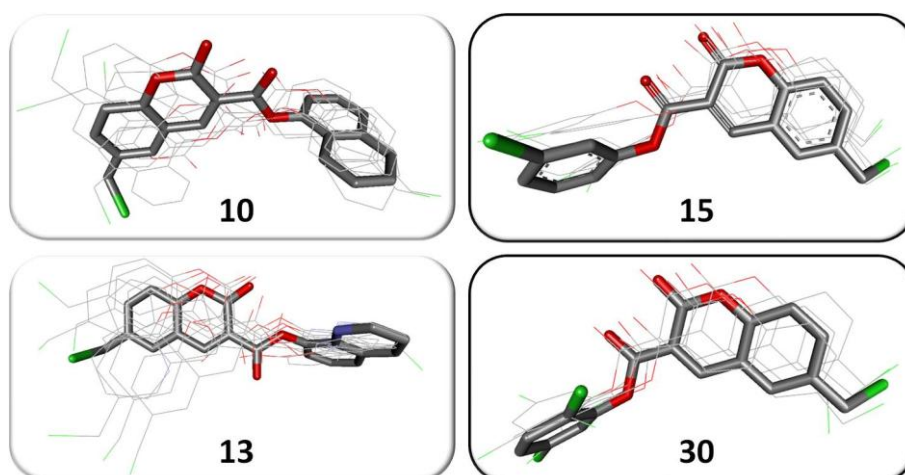


Figura 4.4 Soluções do docking para os ligantes menos ativos (10 e 13) e mais ativos (15 e 30).

Para o ligante 15, destaca-se a ocorrência de interações envolvendo o átomo de cloro na posição meta: interação N-H...Cl com Arg143, C-H...Cl com Lys148 e C=O...Cl com Glu147. Esta última, apesar de incomum, foi recentemente verificada (Baumli, Endicott & Johnson, 2010) por contribuir na ligação de compostos a proteínas da família das CDK (proteínas conhecidas por cinases cíclicas dependentes). Este tipo de interação tem comportamento semelhante à de ligações de hidrogênio típicas, com o átomo de halogênio (no caso, o Cl) agindo como aceitador de elétrons e o oxigênio como doador. A presença de dois átomos de cloro no anel fenil (orto e meta) não pareceu melhorar

significativamente os resultados para o ligante 30, o qual apresenta escores da mesma ordem do ligante 15 e o mesmo padrão para o modo de ligação. A interação tipo **C=O...Cl** não foi verificada para o ligante 30.

4.3.5 Correlação: resultados de docking e atividades da literatura

Embora os quatro ligantes apresentados tenham sido estudados visando inibidores de trombina, sua atividade está comparada ao Fator X. Frederick e seus colaboradores (2005) relatam que tais compostos são mais ativos na trombina do que no Fator X. Contudo, eles seguem o mesmo padrão de atividade para as duas enzimas, sendo 10 e 13 os de menor inibição (menos ativos) e 15 e 30, os de maior inibição (mais ativos) em ambas.

Os resultados da presente simulação de docking e das análises dos complexos formados permitem diferir dois modos de ligação claros entre os ligantes ditos menos ativos e mais ativos. Os primeiros (10 e 13) posicionam-se com o anel substituinte dentro da cavidade e a porção cumarina para fora, na região All. Os mais ativos, por sua vez, têm a cumarina dentro da cavidade, enquanto o anel aromático substituinte posiciona-se em All, de maneira oposta aos menos ativos (Figura 4.5). As interações, listadas no Anexo 4.1, também apresentaram um padrão.

Portanto, o modo como o ligante entra no sítio, ou seja, qual porção de sua estrutura ocupa a cavidade parece estar relacionado à ocorrência de inibição ou não. Assim, destes quatro ligantes, aqueles que possuem o anel cumarina no interior da cavidade são os mais ativos.

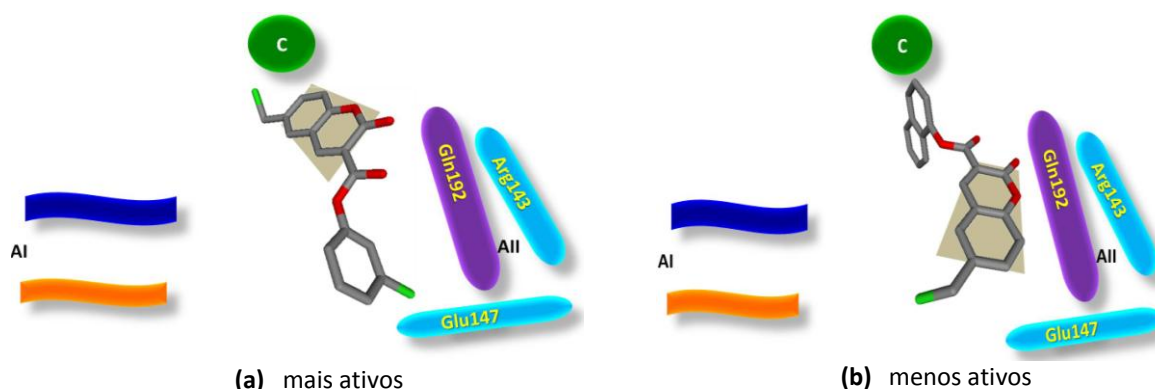


Figura 4.5 Relação posicionamento no sítio ativo \times atividade obtida a partir da análise dos ligantes 15 e 30 (mais ativos) e 10 e 13 (menos ativos). As regiões do sítio ativo estão esquematizadas e a porção cumarina do ligante está em destaque.

4.4 DOCKING DE LIGANTES COM ATIVIDADE DESCONHECIDA NO FATOR X.

O Anexo 4.1 apresenta, para cada ligante cumarínico estudado, uma tabela de interações e uma figura do complexo proteína-ligante no sítio ativo do Fator X. O Anexo 4.2 relaciona a ocupação das regiões do sítio pelos ligantes, o escore e uma descrição das interações verificadas.

A Tabela 4.3 deste capítulo relaciona resumidamente o modo de ligação no sítio ativo e os escores para cada ligante cumarínico. Um maior detalhamento pode ser obtido nos Anexos 4.1 e 4.2.

Como pode ser verificado na seção anterior, as estruturas dos compostos obtidos dos bancos de dados e estudados neste trabalho são derivados da varfarina R e S, com alterações de substituintes. A descrição dos resultados se inicia com as varfarinas R e S (WRR e WRS, respectivamente).

Tabela 4.3 Relação entre posição no sítio e escores

Ligante	C	AI	All	Escore
Ligante da Estrutura Cristalográfica 2pr3				
Redocking		X	X	77,34
Ligantes Cumarínicos do Grupo 2 (Frederick et al. 2005)				
10			X	60,70
13			X	60,68
15	Anel cumarina em C		X	57,15
30	Anel cumarina em C		X	58,58
Ligantes Cumarínicos do Grupo 3				
15097	Anel cumarina em C	X	X	74,62
14693	Anel cumarina em C		X	64,24
JAWBUE1			X	56,39
JAWBUE2	Anel cumarina em C		X	55,80
VAWTOC	Anel cumarina em C		X	55,72
WOGONINE		X	X	55,27
WARFIN	Anel cumarina em C		X	53,11
15096		X	X	52,51
10346	Anel cumarina em C		X	52,43
EFIWIZ02	Anel cumarina em C		X	51,21
JAWCAL	Anel cumarina em C		X	51,19
VAWTIW	Anel cumarina em C		X	51,06
FAXMEW			X	50,41
14692		X	X	50,24
BEFZES	Anel cumarina em C		X	50,22
FAXMAS			X	50,00
16493		X	X	49,17
WARFAR10			X	48,68
EFIWIZ01			X	48,54
12895	Anel cumarina em C		X	47,59
PCLWAR		X	X	46,70
JOGLUM	Anel cumarina em C		X	41,47
B01AA04		X	X	40,07
RWF	Anel cumarina em C		X	33,02
WRS			X	31,75
WRR		X	X	21,40

4.4.1 Varfarinas: R, S e p-CI-WAR

Os enantiômeros R e S das varfarinas estudadas são os ligantes identificados como WRR e WRS (identificação do banco de dados PDBsum do qual foram obtidas).

Verificou-se diferença de posicionamento na análise dos complexos com estes dois enantiômeros. Em nenhum dos dois casos o anel cumarina fica posicionado dentro da cavidade, a qual é ocupada pelo anel fenila do composto. Este anel faz uma interação C-H...O com Asp189 no enantiômero S, mas não no R. Isto deve representar uma ligação

mais forte para WRS do que para WRR e também explica o valor de escore mais favorável para o enantiômero S.

A ocupação da cumarina é o fator variável: no enantiômero R ela se aproxima da região AI e no enantiômero S ocupa a região AII. As Figuras 4.1.a.28 e 4.1.a.29 do Anexo 4.1 mostram este posicionamento e também as interações ligante-receptor aparecem em detalhes nas tabelas que acompanham as figuras. Um esquema do posicionamento está apresentado na Figura 4.6.

Apesar de se aproximar da região AI, o enantiômero R consegue interagir apenas com o resíduo Trp215. Na região AII, ocupada pelo substituinte alifático C_3H_7O , ocorre interação com a extremidade da cadeia lateral da Gln192, a qual é uma região flexível. No caso do enantiômero S, a cumarina ocupa a região AII, fazendo uma interação C-H...O com o CB da Gln192, átomo que tem menor flexibilidade por estar no início da cadeia ligado diretamente ao CA do resíduo.

Comparando os resultados para os dois enantiômeros da varfarina, pode-se sugerir que este sítio apresenta enantio-seletividade para as varfarinas, sendo mais favorável para S em comparação com R.

Com relação ao escore geral, os dois enantiômeros da varfarina apresentam valores menores, sobretudo o R, do que os obtidos para os outros ligantes do conjunto.

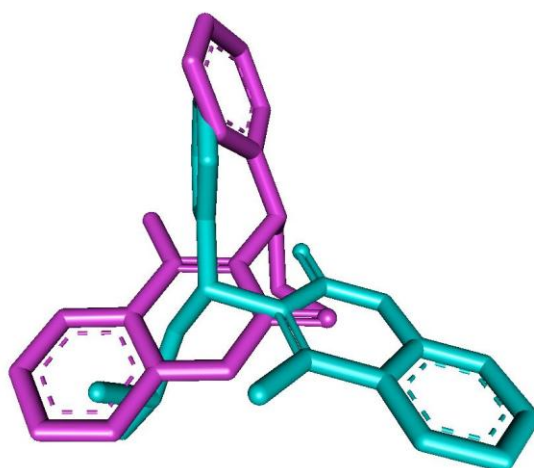
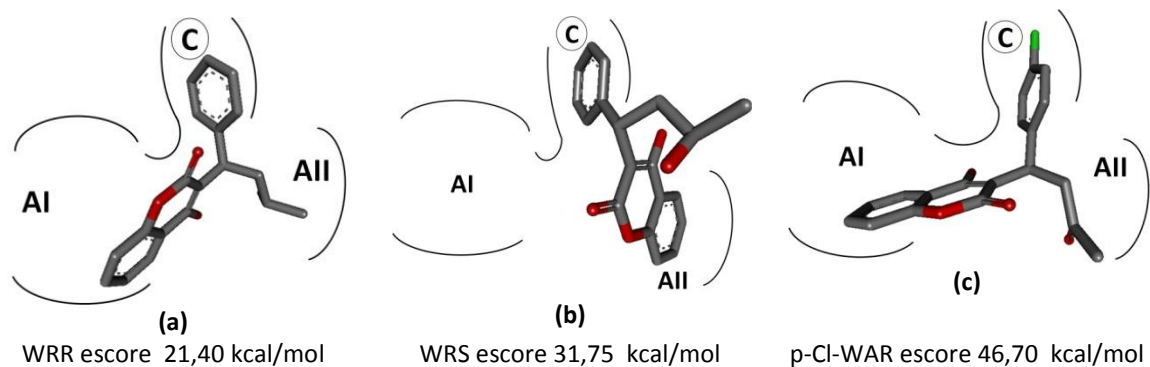


Figura 4.6 Esquema para a **(a)** WRR-Ideal, **(b)** WRS-ideal e **(c)** p-Cl-WAR; **(d)** WRR (azul) e WRS (rosa) sobrepostas, no sítio da 2pr3 (Fator X).

A para-cloro-varfarina (p-Cl-WAR) corresponde ao enantiômero R da varfarina com a adição de um substituinte Cl no anel fenila. No complexo com o Fator X, a p-Cl-WAR fica posicionada no sítio ativo com a cumarina ocupando a região AI e com o anel fenila ocupando a cavidade; o átomo de cloro aponta para o fundo da cavidade e interage apenas com a cadeia lateral da Val190 (C-H...Cl). Na região AII, o substituinte faz uma interação C-H...O com a Gln192. Portanto, este composto ocupa C e AI e faz apenas uma interação em AII. Neste caso, o escore também foi mais favorável do que para as WRR e WRS.

4.4.2 Varfarinas cíclicas: WARFIN e WARFAR10

No conjunto de cumarinas estudadas encontram-se as formas cíclicas dos enantiômeros R e S da varfarina, os ligantes de nome WARFIN e WARFAR10, respectivamente.

Para os dois casos, o escore e o padrão do posicionamento são mais favoráveis do que a forma não cíclica da varfarina descritas anteriormente. Apenas para o ligante WARFIN, a porção cumarina ocupa a cavidade C. Neste complexo, o anel cumarina realiza uma interação C-H...O com Asp189 no fundo da cavidade, situação que não foi possível no complexo com WRR. A região AII é ocupada pelo anel fenil que faz interações C-H...O e C-H... π com Gln192.

O ligante WARFAR10 faz apenas uma interação O-H...O com a extremidade da cadeia lateral da Gln192. O menor número de interações nessa região está ligado à diminuição do grau de liberdade quando da ciclização do substituinte alifático.

A ciclização da varfarina parece favorecer a ligação do enantiômero R ao Fator X. Para os dois casos, não houve ocupação da região AI.

4.4.3 Varfarinas cíclicas: VAWTOC e VAWTIW

O ligante VAWTOC deriva da estrutura do WARFIN, diferindo deste apenas pela presença de um substituinte p-CH₃. Esta substituição exerce pouca influência sobre o modo de ligação. As poses de VAWTIW e WARFIN ficam sobrepostas (Figura 4.7). O ligante VAWTIW também deriva da estrutura do WARFIN, diferindo deste por dois

substituintes, *o*-*m*-2-OCH₃. Tal substituinte também não altera o modo de ligação da R-varfarina cíclica (Figura 4.7).

Os escores também foram da mesma ordem para os três ligantes: WARFIN, VAWTOC e VAWTIW (Anexo 4.1).

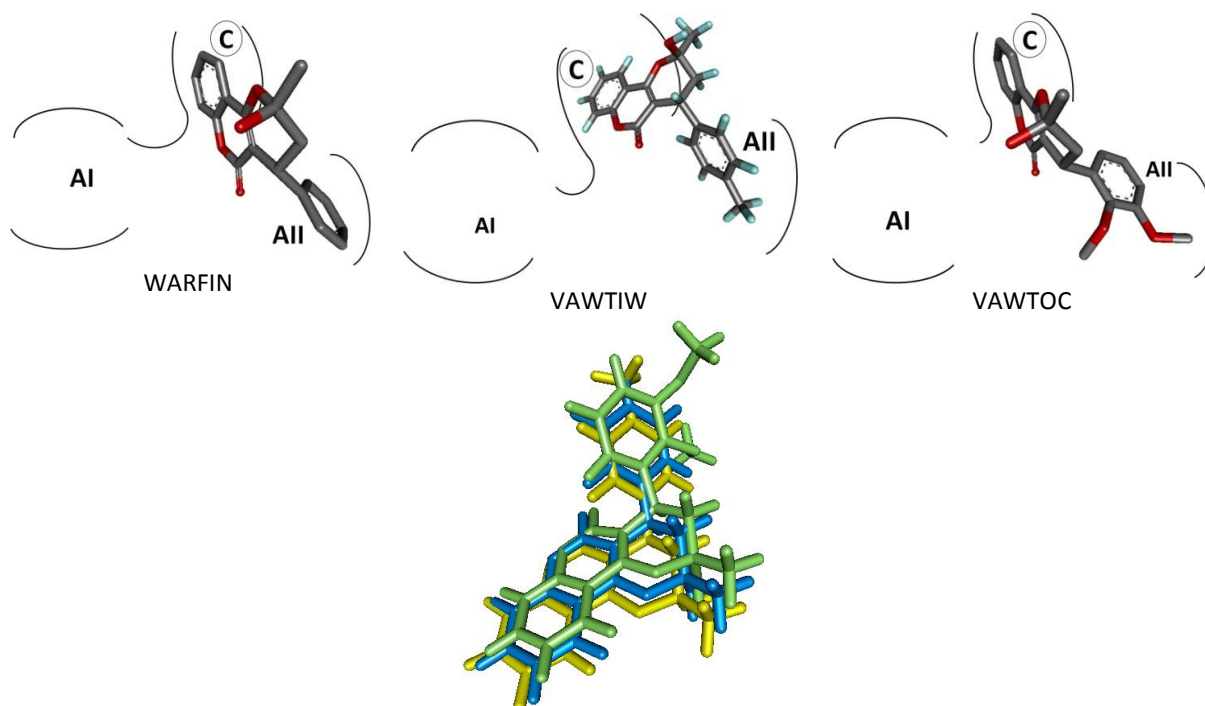


Figura 4.7 Posicionamento no sítio ativo e soluções dos ligantes WARFIN (azul), VAWTIW (verde) e VAWTOC (amarelo) sobrepostas.

4.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE DOCKING

Foram estudados 31 ligantes, dentre os quais apenas 4 apresentam atividade relatada (ligantes 10, 13, 15 e 30 de Frederick e colaboradores, 2005). Dos 31 ligantes, todos ocupam a cavidade C e fazem interação Gln192 na região AII, conforme pode ser observado na Tabela 4.3. Dentre eles, 9 (29%) ocupam a região AI interagindo com pelo menos um dos resíduos de aminoácidos aromáticos (Tyr99 ou Phe174). A porção

cumarina se posiciona dentro da cavidade C em 15 das 31 estruturas (48,4%) e entre elas apenas 3 têm escore abaixo de 50 kcal/mol (20%).

Entre os ligantes que possuem a porção cumarina na cavidade C, apenas o ligante 15097 ocupa a região A1 e faz interações π com os três resíduos que possuem anéis, Tyr99, Phe174, Trp215.

Estas informações estão sintetizadas na Tabela 4.3 junto ao escore. Analisando esta tabela, pode-se afirmar que os ligantes que apresentam a cumarina na cavidade C podem ter um comportamento esperado semelhante ao dos ligantes 15 e 30 de Frederick et al. (2005). Além disso, o único ligante que obteve um escore da ordem do redocking (ativo) apresentou posicionamento semelhante ao do ligante cristalográfico, indicando existência da correlação entre a atividade observada e os resultados de docking.

Para os complexos em que a porção cumarina do ligante se encontra dentro da cavidade, são verificadas interações do tipo C-H... π e C-H...O com a cumarina. Dos ligantes com atividade desconhecida, os ligantes 14693 e 15097 são aqueles que possuem o valor de escore mais próximo do encontrado para o redocking, sendo 15097 o mais favorável deles. Nos dois casos a cumarina entra na cavidade.

O ligante 14693 possui um anel menos volumoso (apenas um anel fenila) que 15097 (dois anéis fenila). Isto permite que o anel cumarina aprofunde-se na cavidade, permitindo a interação verificada com Tyr228 (C-H... π). Por outro lado, apenas o ligante 15097 interage com todos os resíduos de aminoácidos aromáticos de A1 (Tyr99, Phe174 e Trp215) por meio de interações π - π e C-H... π . Este é o composto com o melhor padrão de posicionamento e cujo escore (74,63) mais se aproxima do valor obtido no caso do

redocking (77,34). O ligante 15097 ocupa as três regiões do sítio (C, AI e All). A Figura 4.8 apresenta o complexo com as interações deste ligante.

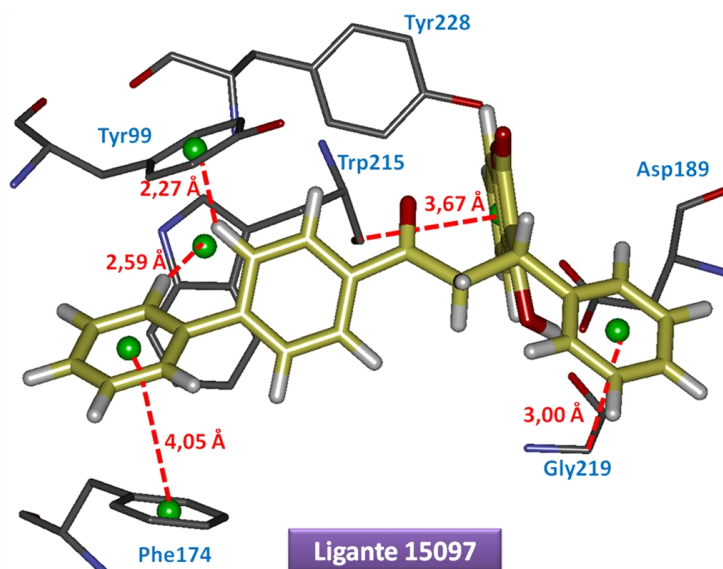


Figura 4.8 Interações do ligante 15097 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Outro composto que se deve destacar é o ligante WOGONINE, com escore de 55,72. Apesar de ser uma cumarina, este ligante tem sua estrutura diferente da varfarina. Não há carbonos quirais como se verifica para varfarina na constituição da porção funcional, isto é, o anel cumarínico. WOGONINE ainda é o único do conjunto testado que possui um açúcar como substituinte. Neste caso, o açúcar ocupa a cavidade C e o anel cumarínico e seu substituinte aromático ocupam AI. Como pode ser verificado nos Anexos 4.1 e 4.2, o açúcar faz duas interações O-H...O, uma delas com Asp189, e uma C-H...O dentro da cavidade. Isto parece estar de acordo com o padrão verificado e o escore obtido.

4.6 DESENHO RACIONAL DE UM LIGANTE DERIVADO DO 15097

4.6.1 Adição de CH₂Cl na porção cumarínica.

Considerando que uma grande parte dos ligantes cristalográficos e os ligantes sintetizados e testados por Frederick et al. (2005), que possuem atividade inibitória favorável, apresentam cloro na porção que ocupa o fundo da cavidade C e o presente resultado de docking para o ligante 15097, decidiu-se modelar uma inserção de um substituinte CH₂Cl na cumarina deste composto para testar seu comportamento na simulação (Figura 4.9).

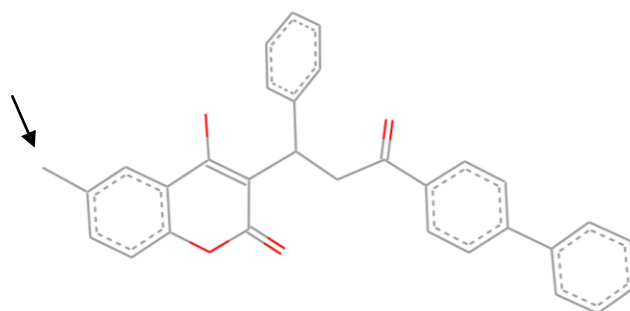


Figura 4.9 Estrutura do ligante 15097. A flecha indica a posição da inserção do CH₂Cl.

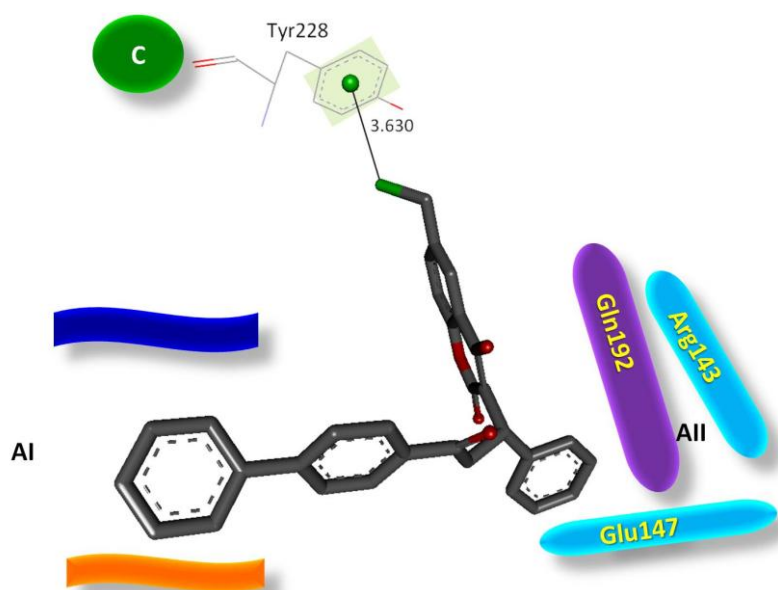


Figura 4.10 Pose do ligante 15097-CH₂Cl no sítio ativo do Fator X (2pr3).

O resultado global do posicionamento do ligante não foi alterado como pode ser verificado na Figura 4.10. No entanto, surge uma interação Cl... π com a cadeia lateral da Tyr228. O escore obtido para este complexo foi de 77,77, ou seja, melhor que o ligante 15097 (74,62) e mais próximo ao composto cristalográfico da 2pr3. Este resultado corrobora com a hipótese de que possuir um átomo de Cl na ponta do anel cumarina, de modo semelhante aos ligantes de Frederick et al. (2005), e preservar a ocupação dos sítios como sugerido a partir do data mining, permite sugerir um inibidor mais promissor para o Fator X.

4.6.2 Adição de Cl no anel fenila.

No Capítulo 3 foram apresentados indícios de que a presença de um substituinte carregado, tal como Cl, O ou F, na região IP do ligante deve melhorar a ligação do composto ao sítio ativo do Fator X. Levando esta informação em conta, tomou-se o composto 15097-CH₂Cl, que já havia apresentado melhora no resultado em relação ao composto inicial, e modelou-se um átomo de cloro na posição meta do anel fenila. Este anel corresponde à porção IP do ligante e tem ocupado a região All tanto para 15097 quanto para 15097-CH₂Cl. Com esta ultima modelagem, chamou-se o ligante de 15097-CH₂Cl-Cl-Benz (Figura 4.11).

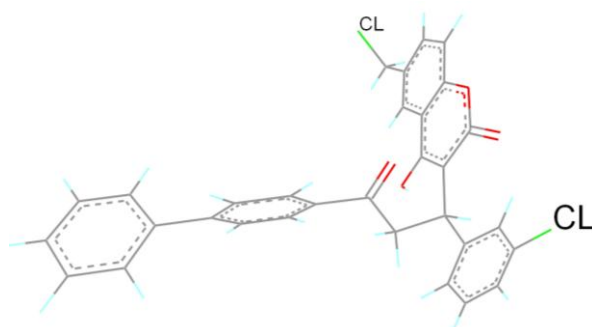


Figura 4.11 Ligante 15097-CH₂Cl-Cl-Benz modelado.

Para este novo composto, o padrão de saídas gerado pelos cálculos de docking foi bom. A interação Cl... π com a Tyr228 no fundo da cavidade também foi verificada, além das interações C-H...Cl com Ala190 e Gly226 (Figura 4.12). Adicionalmente, o átomo de cloro adicionado na porção IP faz uma ligação de hidrogênio tipo N-H...Cl com Arg143 e uma interação C=O...Cl com Glu147, ambos da região AII. O escore obtido para tal ligante é de 92,37 kcal/mol, ou ΔG_{lig} de -12,20 kcal/mol, o que é um valor consideravelmente mais favorável em comparação ao obtido para os outros ligantes ou até mesmo para o redocking.

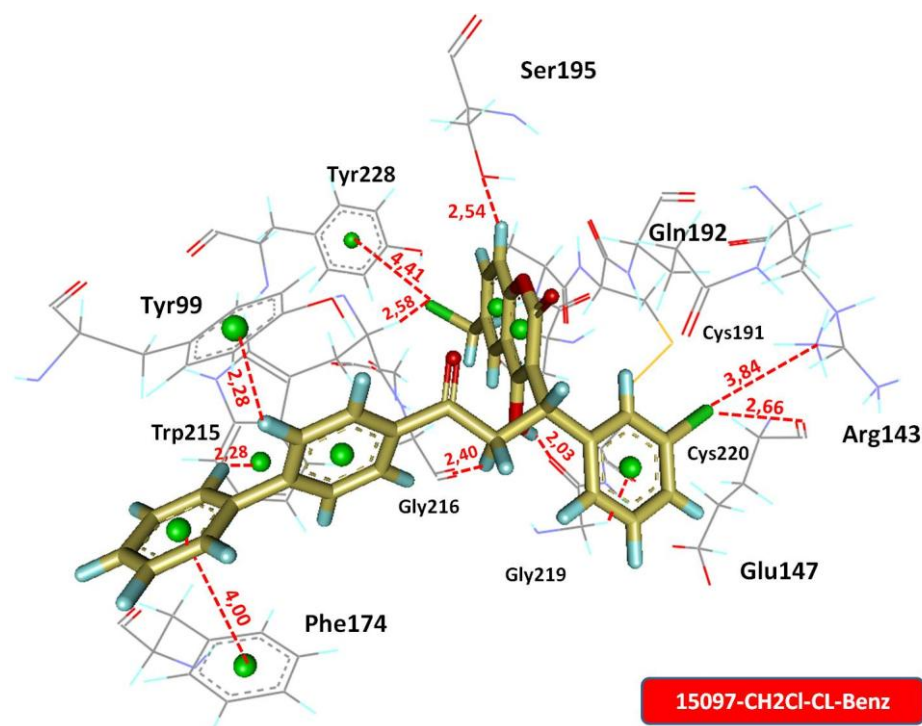


Figura 4.12 Interações do ligante 15097-CH₂Cl-Cl-Benz no sítio ativo do Fator X (2pr3).

Com relação a 15097 e 15097-CH₂Cl o posicionamento geral não foi alterado, continuando a ocupar as regiões C, AI e All com o mesmo padrão, o que mostra que a estrutura do 15097 é ideal como estrutura de partida ou composto-líder, conforme pode ser observado na Figura 4.13.

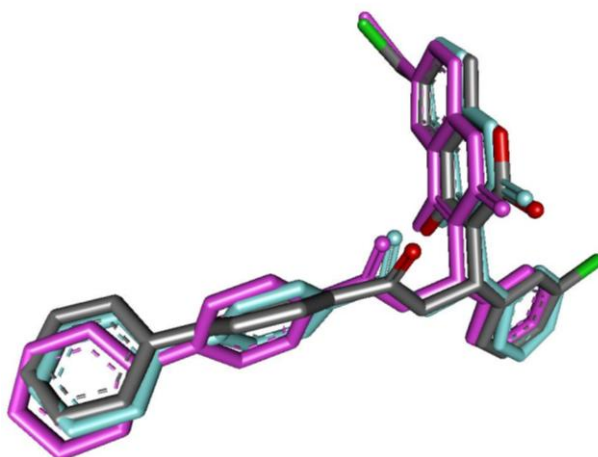


Figura 4.13 Sobreposição de 15097 (rosa), 15097-CH₂Cl (azul) e 15097-CH₂Cl-Cl-Benz (cinza) .

Os resultados apresentados para o último ligante modelado, portanto, apóiam e estão de acordo com todas as características dos complexos descritas neste trabalho, tanto para os ligantes cristalográficos quanto para os ligantes cumarínicos testados com docking.

Anexo 4.1 INTERAÇÕES ENTRE OS LIGANTES CUMARÍNICOS E O FATOR X

Tabela 4.1.a.1 Ligante 10 - Ligantes com atividade conhecida (Frederick et al., 2005)

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Score (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Cys191/SG	3,14	O		
Gln192/N	2,19	O		
Gln192/CA	2,86	O		
Gln192/CB	2,82	O		
Gln192/HB2	2,03	O		
Gln192/H	1,55	O		
Cys220/SG	2,90	O		
Arg143/HH21	2,53	O		
Arg143/HZ	2,77	O		
Cys191/SG	3,26	O	60,70	-8,79
Gln192/HB2	2,67	O		
Arg222/NH2	2,73	CL		
Arg222/HH21	2,68	CL		
Arg222/HH22	1,96	CL		
Glu147/HG2	2,84	O		
Gly219/O	2,22	H		
Ser214/O	2,73	H		
Ser195/OG	2,06	H		
Ser214/O	2,65	H		
Asp189/OD2	2,35	H		

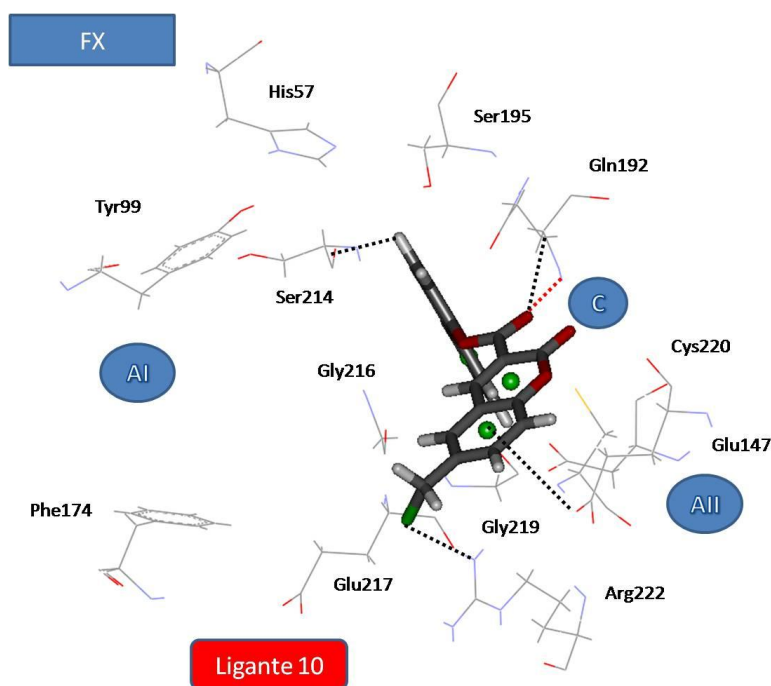


Figura 4.1.a.1 Interações do ligante 10 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.2 Ligante 13 - Ligantes com atividade conhecida (Frederick et al., 2005)

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Arg143/NH2	3,21	O		
Arg143/HH21	2,54	O		
Gln192/N	3,46	O		
Gln192/N	3,27	O		
Gln192/HB2	2,30	O		
Gln192/H	2,36	O		
Ala190/O	2,96	C		
Asp189/OD2	3,33	C	58,16	-8,52
Asp189/OD2	2,33	H		
Asp189/OD1	2,61	H		
Ser214/O	3,30	C		
Ser195/OG	2,22	H		
Ser214/O	2,66	H		
Trp215/HA	2,82	centróide		
Gly216/HA1	3,21	centróide		
Gln192/OE1	2,54	centróide cumarina		

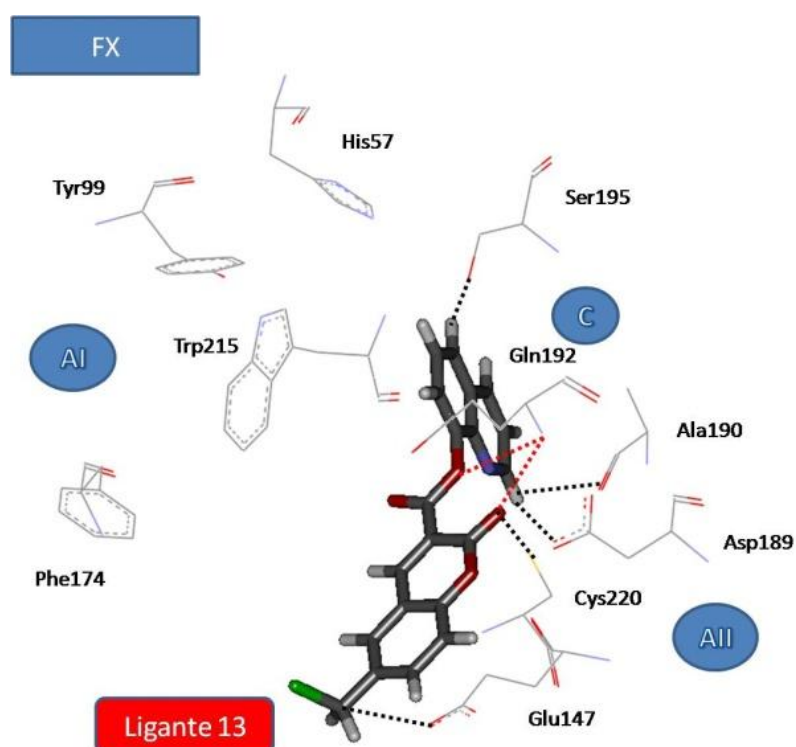
**Figura 4.1.a.2** Interações do ligante 13 no sítio da 2pr3 (Fator X)

Tabela 4.1.3 Ligante 15 - Ligantes com atividade conhecida (Frederick et al., 2005)

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly219/O	3,06	C4		
Gly219/O	3,36	C5		
Ser195/OG	3,47	C8		
Gly219/O	2,50	H1		
Ser195/OG	2,48	H3		
Ser214/O	3,28	H3		
Gly219/O	2,09	H4		
Trp215/O	2,96	Cl1		
Gly226/CA	3,07	Cl1		
Gly226/HA1	2,77	Cl1	56,06	-8,29
Gly226/HA2	2,69	Cl1		
ILE227/N	3,15	Cl1		
ILE227/H	2,51	Cl1		
Gly219/HA2	2,33	O4		
Arg143/NH1	3,26	Cl2		
Arg143/HH12	2,71	Cl2		
Glu147/O	2,76	Cl2		
LYS148/HG2	2,86	Cl2		
LYS148/HA	2,67	Cl2		

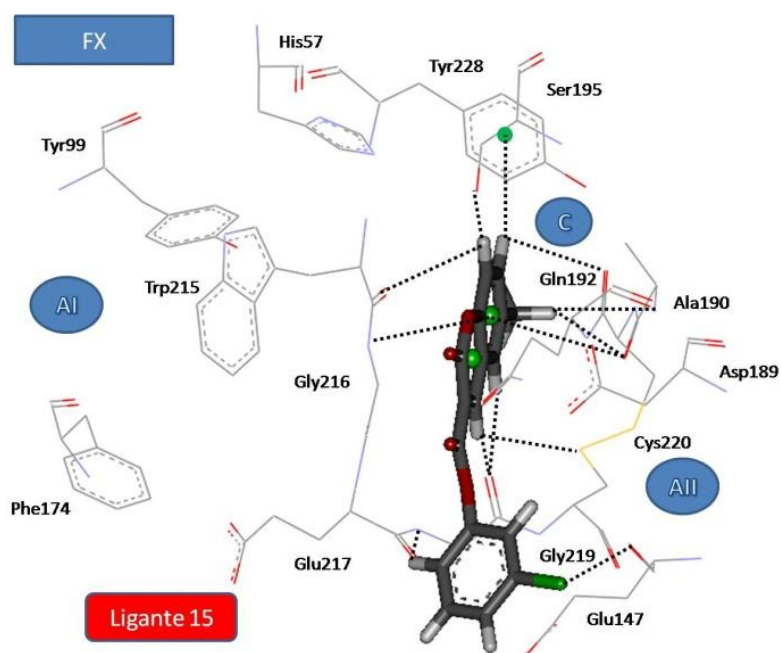
**Figura 4.1.a.3** Interações do ligante 15 no sítio da 2pr3 (Fator X)

Tabela 4.1.4 Ligante 30 - Ligantes com atividade conhecida (Frederick et al., 2005)

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly219/O	3,49	C4		
Ser195/OG	3,16	C8		
Gly219/O	2,73	H1		
Ser195/OG	2,25	H3		
Gly219/O	2,54	H4		
Ala190/HB1	2,69	Cl1		
Gly226/CA	3,47	Cl1		
Asp189/OD1	3,42	H5	55,63	-8,25
Ala190/O	2,50	H5		
Gly219/HA2	2,77	O4		
Glu147/O	3,00	C16		
Glu147/O	2,41	H9		
Arg143/NH2	2,85	Cl3		
Arg143/HH21	2,02	Cl3		
Gln192/CB	3,43	Cl3		
Gln192/HB2	2,68	Cl3		

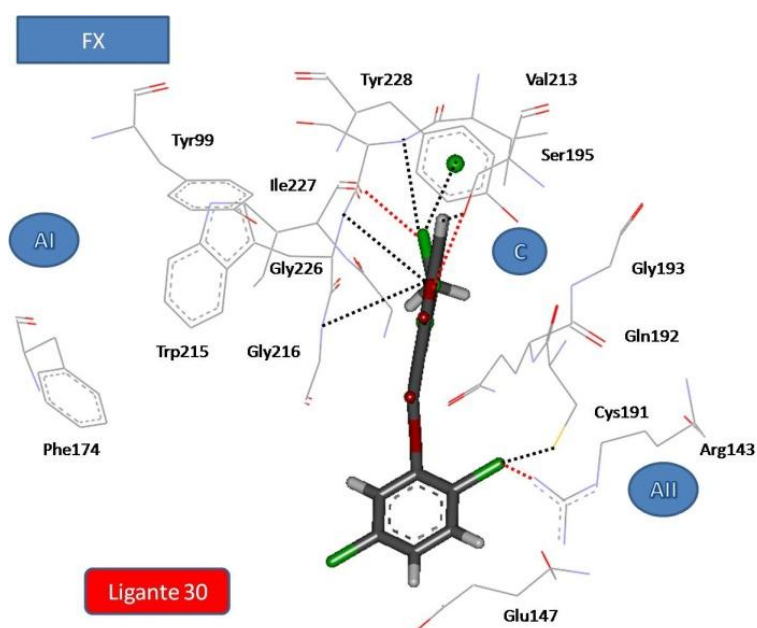
**Figura 4.4.a.4** Posicionamento e interações do Ligante 30 no sítio da 2pr3 (Fator X)

Tabela 4.1.5 Ligante 10346 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gln192/HA	2,62	O1		
Ser195/OG	2,87	O1		
Ser195/HG	2,74	O1		
Gly219/O	3,50	C6		
Asp189/OD1	3,34	C7		
Asp189/OD2	3,25	C7		
Gly216/O	2,59	O11		
Gly219/C	3,14	O11		
Gly219/O	2,16	O11		
Trp215/CB	3,16	O18	47,77	-7,40
Trp215/HB1	2,62	O18		
Cys220/SG	3,27	C23		
Gly219/O	2,59	H25		
Asp189/OD1	2,44	H26		
Asp189/OD2	2,45	H26		
Gly216/O	2,58	H29		
Gly219/O	2,51	H29		
Cys191/SG	2,69	H40		
Cys220/SG	2,88	H40		

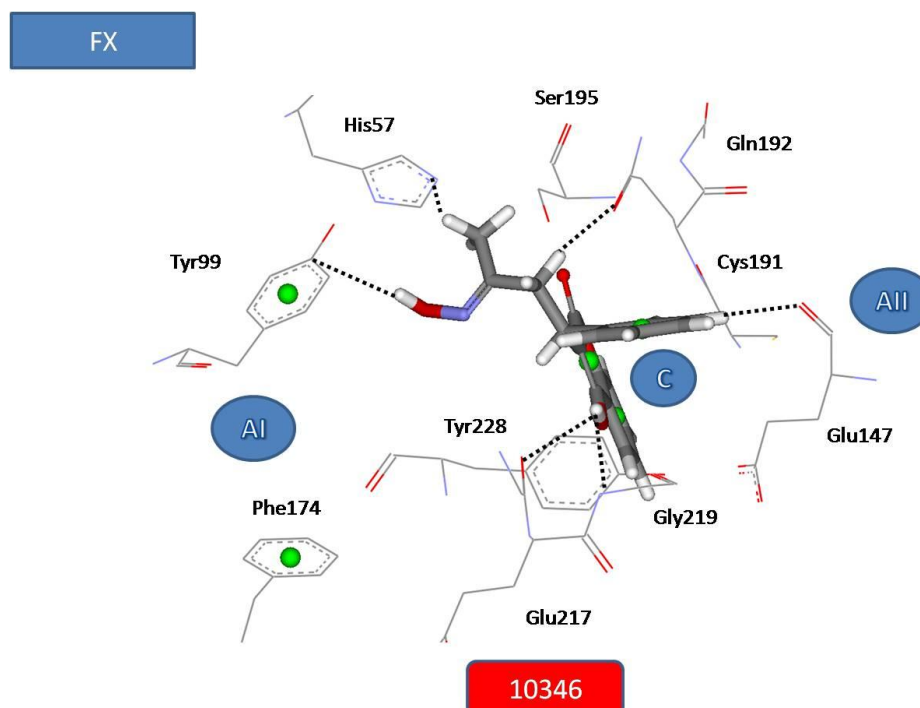
**Figura 4.1.a.5** Interações do ligante 10346 no sítio da 2pr3 (Fator X)

Tabela 4.1.6 Ligante 12895 - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gln192/CA	3,45	O1		
Gln192/HA	2,60	O1		
Ser195/OG	3,39	O1		
Cys220/SG	2,79	C4		
Gly219/C	3,38	O5		
Gly219/O	2,36	O5		
Cys220/SG	2,84	O5		
Gly219/CA	2,99	O12		
Gly219/HA2	2,66	O12		
Cys220/SG	2,62	O12		
Gln192/OE1	2,90	C13		
Gln192/OE1	3,21	C14		
Gly216/O	2,42	C17	48,98	-7,53
Glu147/O	3,30	C21		
Arg143/NH2	3,16	O22		
Arg143/HH21	2,36	O22		
Gln192/CB	3,44	O22		
Gln192/HB2	2,60	O22		
Ser195/OG	2,61	H24		
Gln192/OE1	2,12	H28		
Gln192/OE1	2,63	H29		
Gly216/O	2,17	H31		
Gly216/O	2,45	H32		
Gly216/O	2,28	H33		
Glu147/O	2,72	H36		
Cys191/HA	3,03	centróide cumarina		

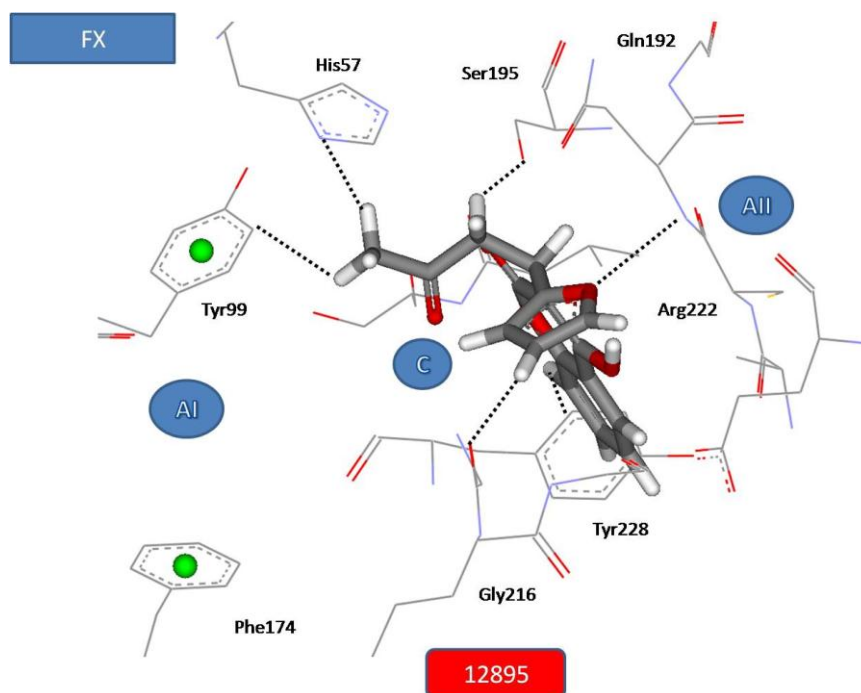


Figura 4.1.a.6 Interações do ligante 12895 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.7 Ligante 14692 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/CB	3,31	O1		
Trp215/HB2	2,52	O1		
Glu217/HA	2,54	O5		
Glu217/CA	3,37	O12		
Glu217/HA	2,52	O12		
Gly219/N	2,70	O12		
Gly219/H	1,78	O12		
Cys220/SG	3,00	C16		
Gln192/HG1	2,70	Br20	52,66	-7,93
Gly219/O	3,09	C24		
Gly219/HA2	3,18	H33		
Cys220/SG	2,54	H33		
Cys220/SG	2,59	H35		
Ser195/OG	2,64	H36		
Gly219/O	2,21	H39		
Gly219/O	2,60	Centróide C3-C2 (cumarina)		
Trp215/CHE3	2,98	Centróide C6-C11 (cumarina)		
Centróide CG-CD2	2,46	H27		

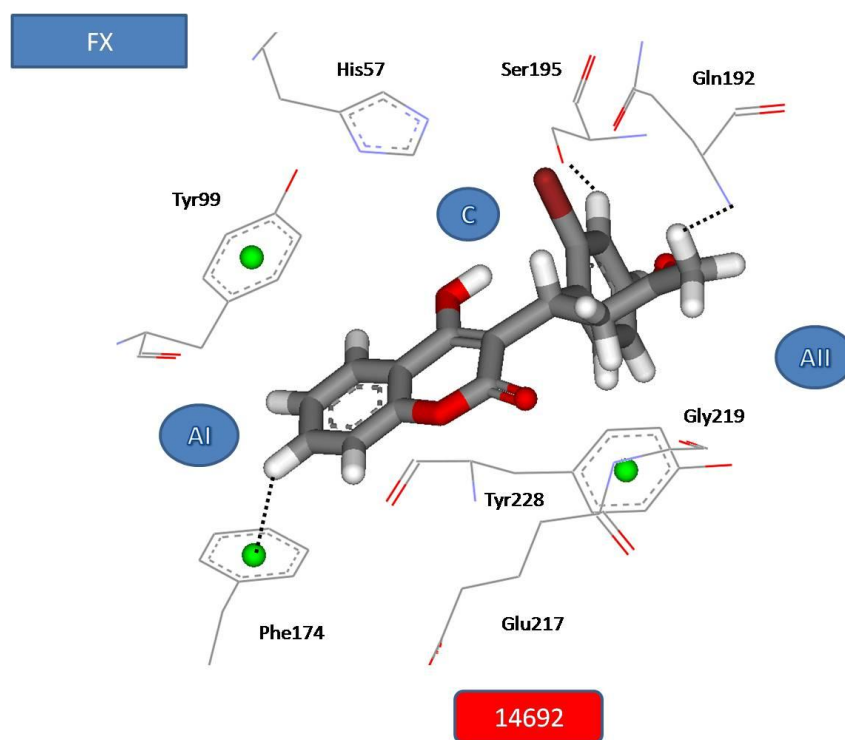


Figura 4.1.a.7 Interações do ligante 14692 no sítio da 2pr3 (Fator X)

Tabela 4.1.8 Ligante 14693 - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Cys220/SG	2,62	O1		
Gln192/OE1	3,43	C11		
Glu147/O	3,03	C14		
Cys191/SG	3,23	O15		
Gln192/N	2,87	O15		
Gln192/H	2,09	O15		
Cys220/SG	2,85	O15		
Ser195/OG	2,98	O17		
Trp215/CA	3,43	O17		
Trp215/HA	2,46	O17		
Asp189/OD1	3,20	C21		
Asp189/OD1	3,14	C22	56,24	-8,31
Asp189/OD2	3,12	C22		
Ala190/O	3,44	C23		
Ala190/O	3,48	O24		
Cys191/HA	2,67	O24		
Gln192/OE1	2,62	H31		
Glu147/O	3,43	H36		
Ser195/OG	3,03	H38		
Asp189/OD1	3,23	H41		
Asp189/OD1	2,87	H42		
Asp189/OD2	2,09	H42		

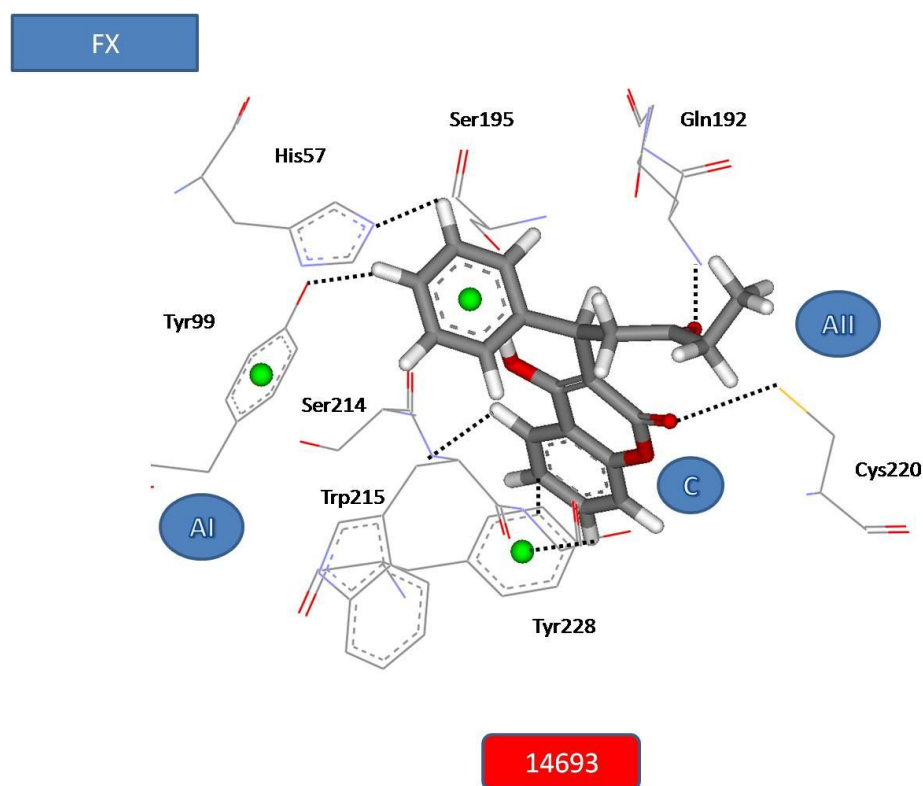


Figura 4.1.a.8 Interações do ligante 14693 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.9 Ligante 15096 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/O	3,05	C1		
Ser195/OG	3,37	C4		
Trp215/CB	2,83	O20		
Trp215/HB1	2,67	O20		
Trp215/HB2	2,24	O20		
Glu217/HA	2,75	O21		
Gly219/N	3,17	O21		
Gly219/H	2,18	O21		
Gln192/N	2,99	O25		
Gln192/CB	3,30	O25	49,17	-7,55
Gln192/HB2	2,36	O25		
Gln192/H	2,45	O25		
Trp215/O	2,17	H27		
Ser195/OG	2,40	H29		
Gly216/O	2,24	H31		
Gly219/O	2,67	H31		
Phe174/centróide CG-CD2	3,16	H35		
Trp215/HE3	3,28	Centróide C17-C18		
Gly216/O	3,05	Centroide C10-C19 (cumarina)		
Gly216/H	3,37	Centroide C10-C19 (cumarina)		

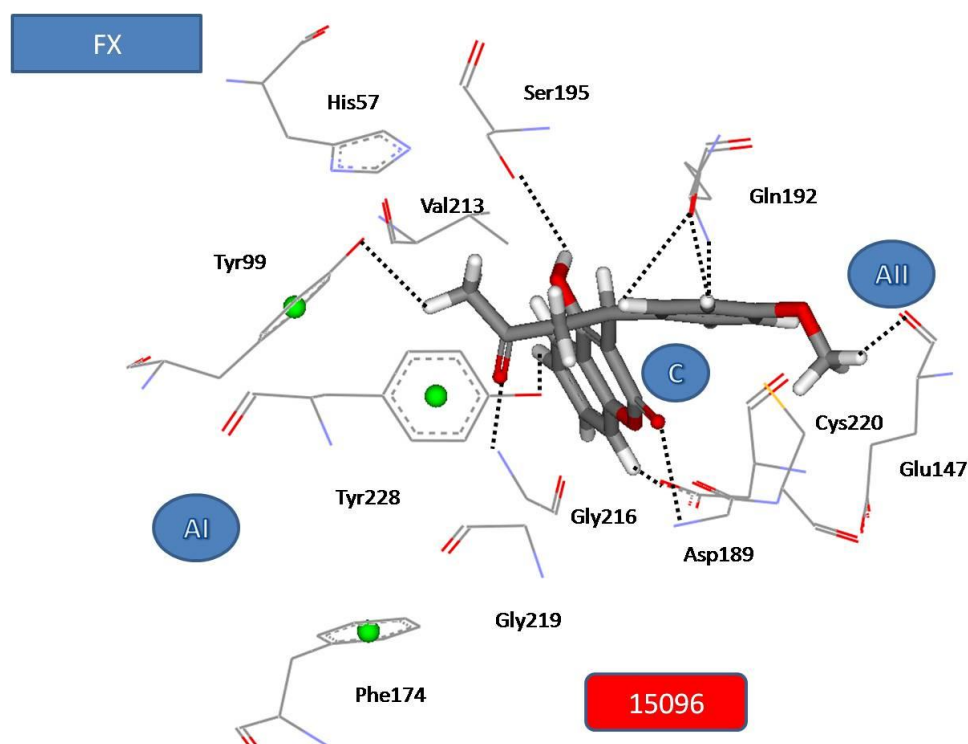
**Figura 4.1.a.9** Interações do ligante 15096 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.10 Ligante 15097 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/CB	3,46	O1		
Trp215/HB2	2,78	O1		
Gly216/O	3,24	C3		
Gly216/O	2,77	O13		
Gly219/O	2,40	O13		
Cys191/O	3,22	C18		
Gln192/CA	3,49	O20		
Gln192/HA	2,62	O20		
Ser195/OG	3,00	O20	74,62	-10,29
Ser195/HG	2,78	O20		
Gly216/O	2,46	H36		
Gly216/O	2,50	H43		
Gly219/O	2,75	H43		
Ser195/OG	2,71	H47		
Phe174/centróide CG-CD2	3,82	Centróide C29-C34		
Trp215/HE3	3,46	Centróide C23-C28		
Tyr99/centróide CG-CD2	2,78	H50		
Trp215/centróide CD2-CE2	3,24	H52		

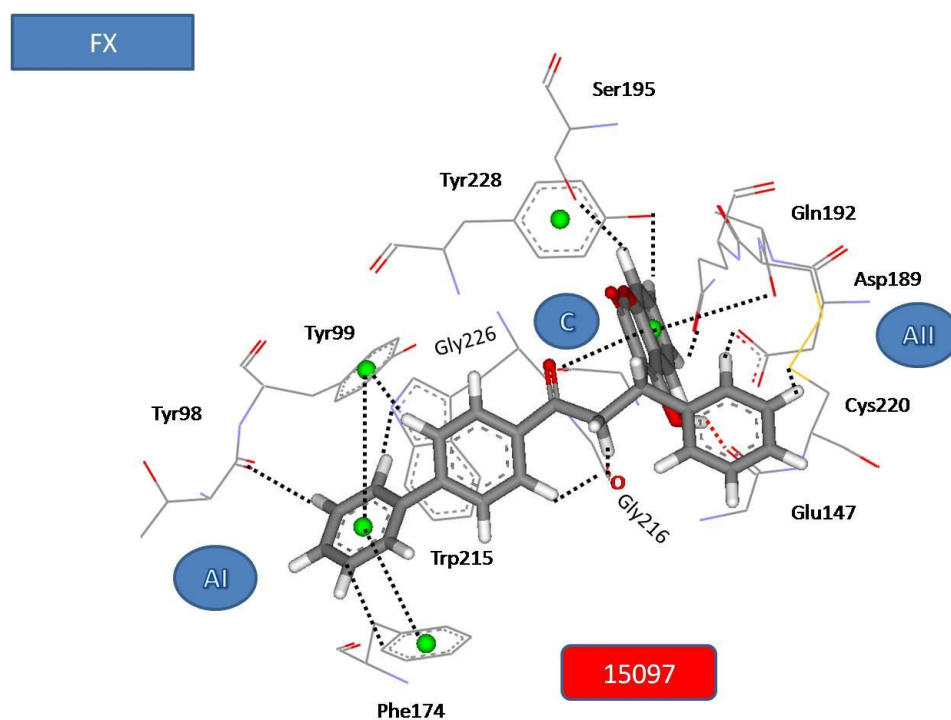
**Figura 4.1.a.10** Interações do ligante 15097 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.11 Ligante 16493 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Glu217/HA	2,69	O1		
Gly219/N	2,92	O1		
Gly219/H	1,94	O1		
Gln192/OE1	3,10	C6		
Glu147/O	2,74	C8		
Gln192/N	3,01	O9		
Gln192/CB	3,12	O9		
Gln192/HB2	2,14	O9		
Gln192/H	2,34	O9		
Cys220/SG	3,10	O9		
Gly216/O	3,17	C15		
Trp215/CB	2,92	O17	47,50	-7,32
Trp215/HB2	2,23	O17		
Gly216/H	2,70	O17		
Glu217/HA	2,64	O24		
Gln192/OE1	2,03	H28		
Glu147/O	2,01	H31		
Cys220/SG	2,34	H34		
Gly216/O	2,30	H39		
Gly219/O	2,79	H39		
Phe174/centróide CG-CD2	2,88	H43		
Trp215/HE3	3,13	Centroide C18-C23		
Gly216/O	2,61	Centroide C3-C16 (cumarina)		

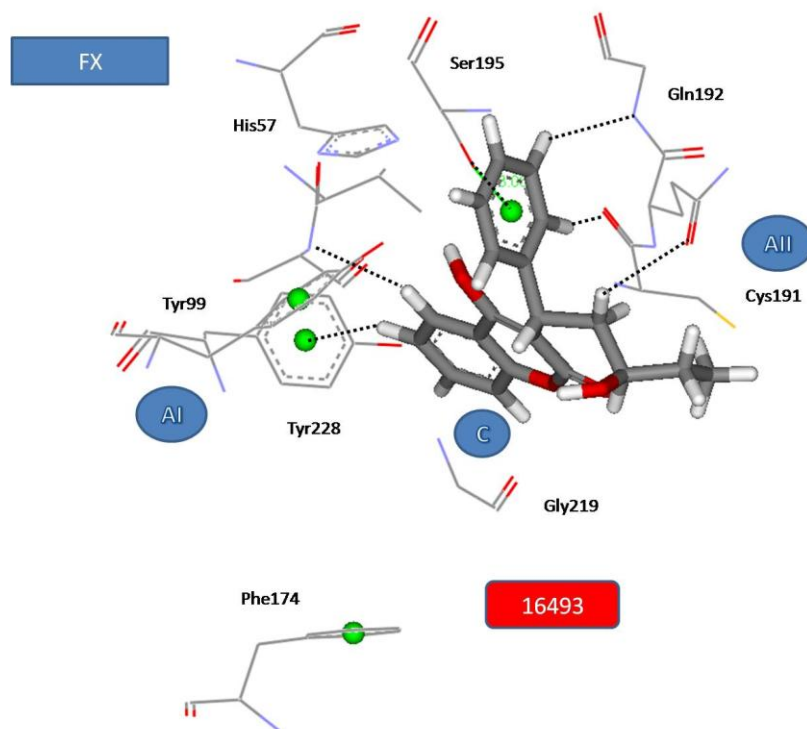
**Figura 4.1.a.11** Interações do ligante 16493 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.12 Ligante B01AA04 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gln192/OE1	3,23	C6		
Gly216/O	2,48	O8		
Gly216/O	3,42	C11		
Gly219/O	3,49	C11		
Ser195/OG	3,45	C12		
Gln192/OE1	2,83	C13		
Gly219/O	3,44	C16		
Gln192/OE1	2,63	H24		
Gly216/O	2,46	H25		
Gly219/O	2,79	H26	47,07	-7,33
Ser195/OG	2,65	H27		
Gln192/OE1	2,52	H28		
Gln192/OE1	2,50	H29		
Gly219/O	2,71	H32		
Trp215/HE3	3,36	Centroide C7-C14 (cumarina)		
Phe174/centróide CG-CD2	3,39	H35		
Tyr99/centróide CG-CD2	2,52	H34		
Trp215/HA	3,31	Centroide C5-C12		
Gly216/H	3,01	Centroide C1-C4 (cumarina)		

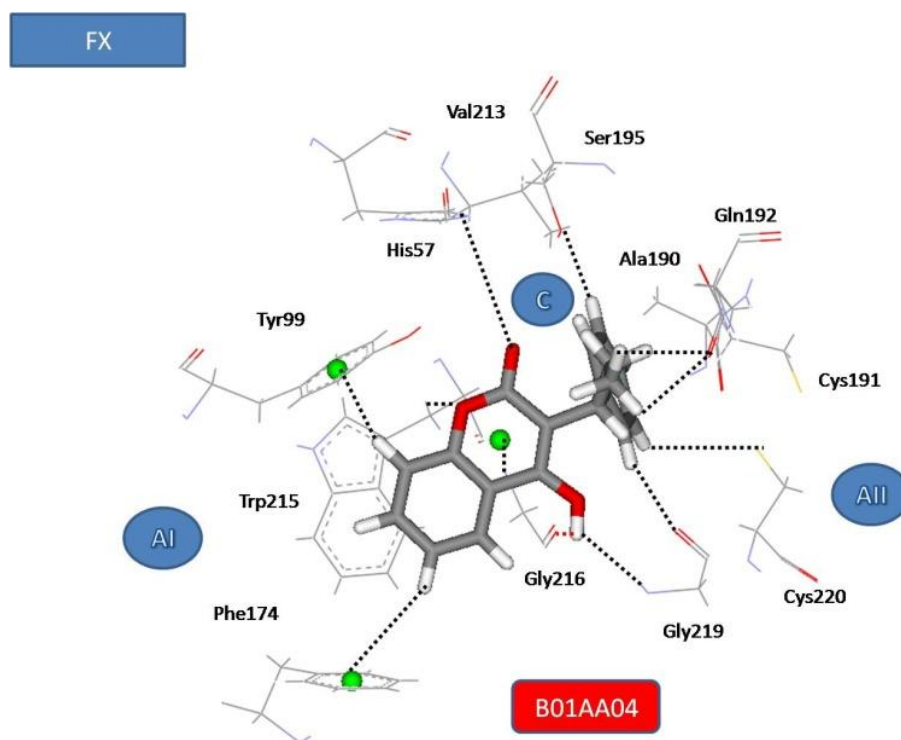
**Figura 4.1.a.12** Interações do ligante B01AA04 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.13 Ligante BEFZES - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Score (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/CA	3,16	O1		
Trp215/HA	2,08	O1		
Gln192/CA	3,27	O2		
Gln192/HA	2,28	O2		
Ser195/OG	2,81	O2		
Cys191/HA	2,58	O3		
Cys220/SG	2,87	O3		
Gly219/C	3,18	O4		
Cys220/SG	2,47	O4		
His57/NE2	3,16	C1		
Ser195/OG	3,08	C1		
Ser214/O	2,98	C1	47,02	-7,32
Asp189/OD2	3,37	C11		
His57/NE2	2,76	H1		
Ser195/OG	2,22	H1		
Ser214/O	2,41	H1		
Ser214/O	2,67	H3		
Asp189/OD1	2,76	H9		
Asp189/OD2	2,36	H10		
Gly216/O	2,01	H11		
Gly216/O	2,45	H12		
Ser195/OG	1,92	H16		
Gly219/H	2,89	Centróide C14-C19		

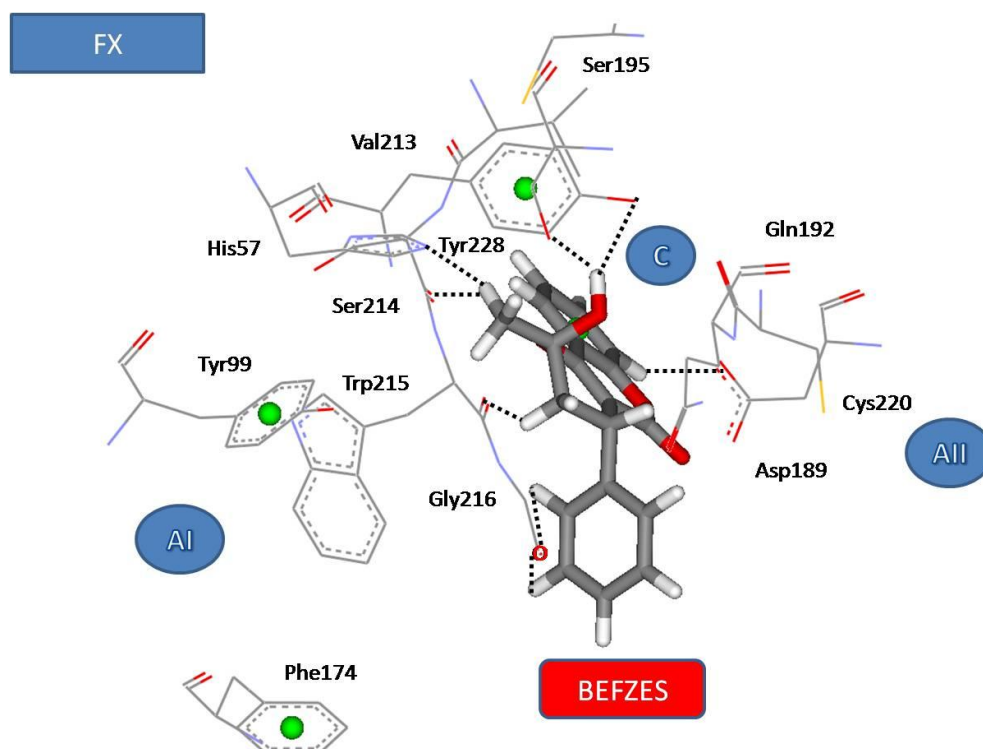


Figura 4.1.a.13 Interações do ligante BEFZES no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.14 Ligante EFIWIZ011 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly219/N	3,07	O2		
Gly219/H	2,07	O2		
Trp215/CB	2,89	O5		
Trp215/HB2	2,22	O5		
Trp215/CA	3,36	O6	50,13	-7,66
Trp215/HA	2,35	O6		
Gly219/O	2,26	H28		
Centróide CG-CD2	3,16	Centroide C11-C21 (cumarina)		
Gly216/H	2,44	Centróide C5-C23 (cumarina)		

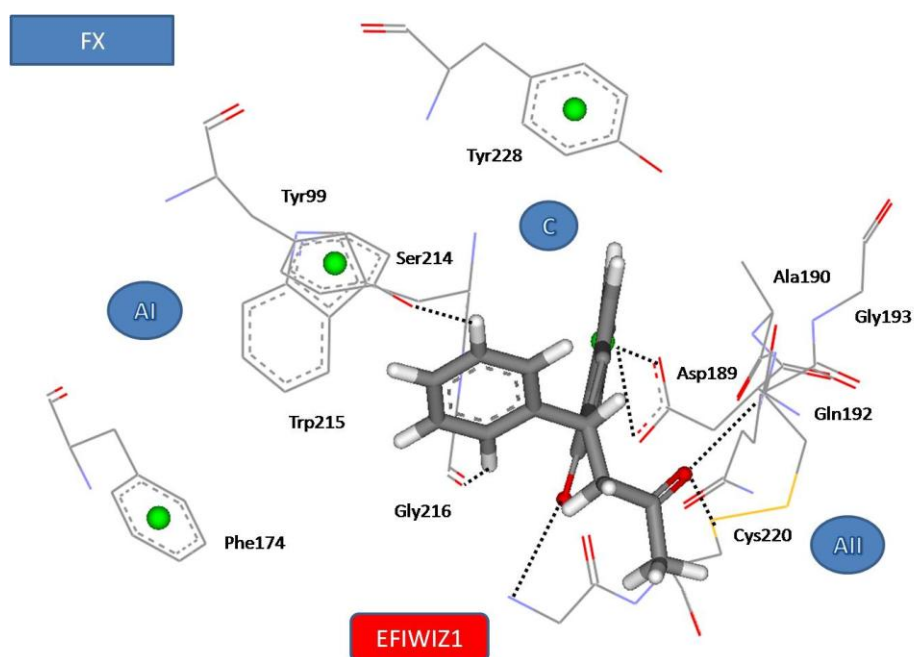
**Figura 4.1.a.14** Interações do ligante EFIWIZ01 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.15 Ligante EFIWIZ012 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Cys220/SG	2,63	O7		
Trp215/CB	3,30	O8		
Trp215/HB2	2,61	O8		
Gly216/N	2,86	O8	45,88	-7,20
Gly216/H	1,97	O8		
Trp215/O	3,41	C18		
Asp189/OD2	2,65	H17		
Ser214/O	2,72	H34		

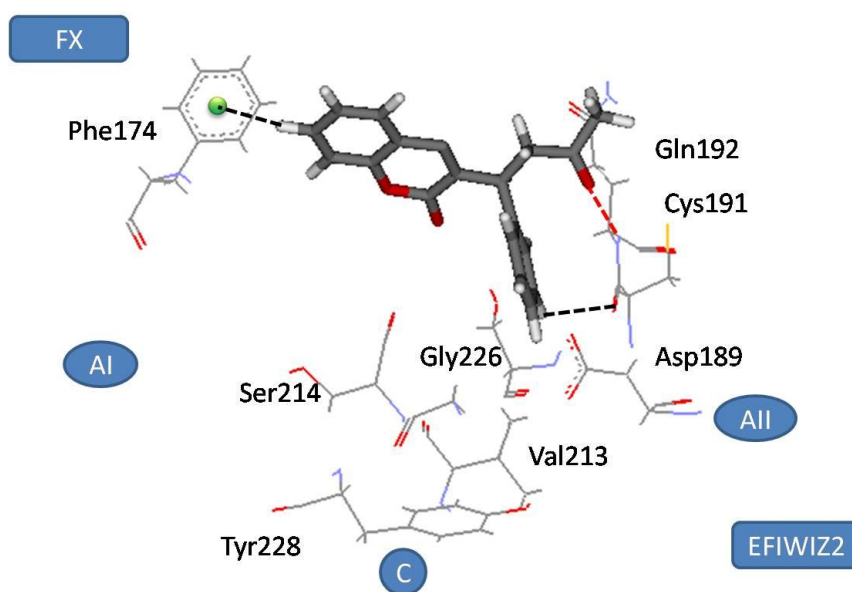


Figura 4.1.a.15 Interações do ligante EFIWIZ02 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.16 Ligante FAXMAS - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/CB	3,47	O1		
Trp215/HB2	2,45	O1		
Gly216/N	3,19	O1		
Gly216/O	2,58	O1		
Gly216/H	2,19	O1		
Trp215/CA	2,97	O2		
Trp215/CB	3,17	O2		
Trp215/HB2	2,70	O2		
Trp215/HA	2,19	O2		
Gly219/N	3,21	O3		
Gly219/H	2,40	O3	50,00	-7,64
Cys220/SG	3,30	C11		
Gln192/OE1	3,22	C14		
Gly219/O	2,99	C20		
Cys191/O	2,51	H7		
Gly219/O	2,16	H10		
Cys220/SG	2,63	H14		
Gln192/OE1	2,75	H18		
Cys191/HA	2,55	Centroide C15-C20		
Gly216/O	2,07	Centroide O1-C8 (cumarina)		
Glu217/HA	2,63	Centroide C4-C9 (cumarina)		

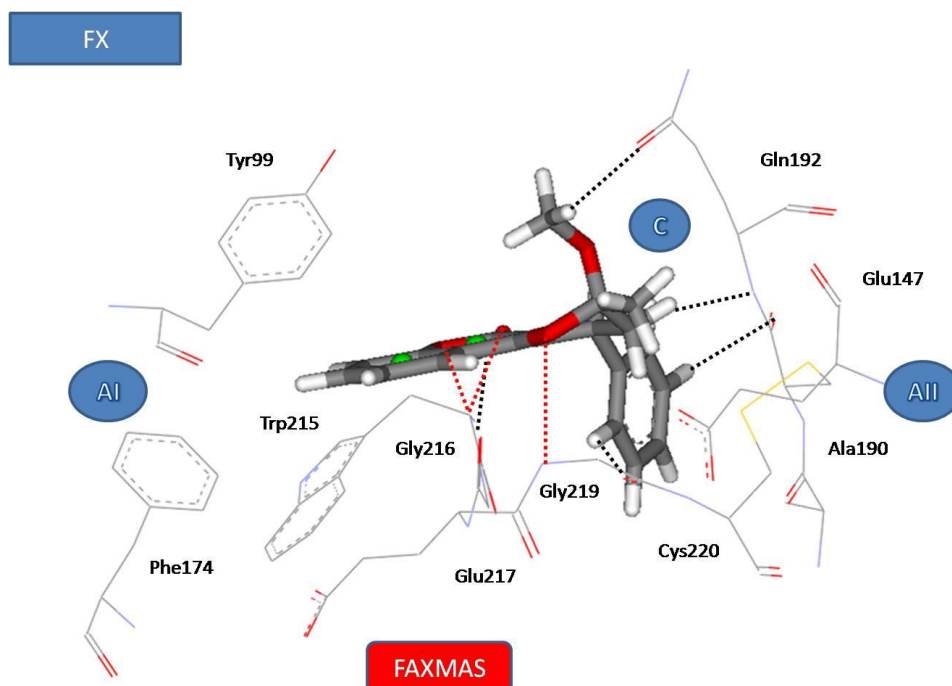


Figura 4.1.a.16 Interações do ligante FAXMAS no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.17 Ligante FAXMEW - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/HB2	2,70	O1		
Gly216/N	3,42	O1		
Gly216/H	2,42	O1		
Trp215/CA	3,20	O2		
Trp215/HA	2,43	O2		
Gly219/N	3,31	O4		
Gly219/H	2,57	O4		
Cys220/SG	3,19	C11		
Gln192/OE1	2,85	C14	50,42	-7,67
Gly219/O	2,70	H6		
Cys220/SG	2,50	H6		
Gln192/OE1	2,39	H13		
Gly219/O	2,30	H14		
Cys191/HA	2,69	Centroide C15-C20		
Gly216/O	2,20	Centroide O1-C8 (cumarina)		
Glu217/HA	2,65	Centroide C4-C9 (cumarina)		

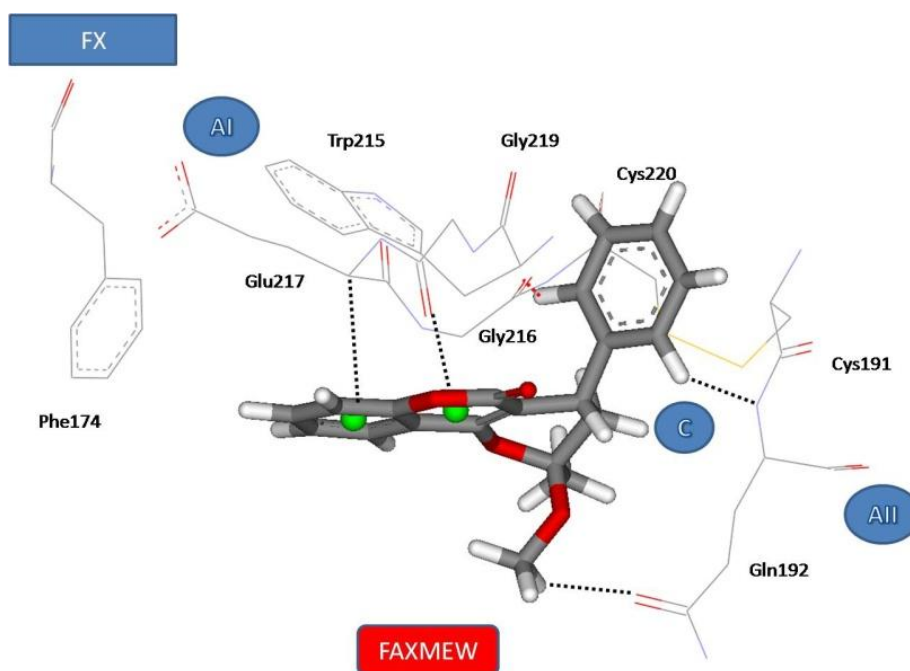


Figura 4.1.a.17 Interações do ligante FAXMEW no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.18 Ligante JAWBUE1 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Cys191/O	2,38	N1		
Trp215/CB	3,27	O1		
Trp215/HB2	2,26	O1		
Gly216/N	3,34	O1		
Gly216/H	2,34	O1		
Trp215/CA	3,05	O2		
Trp215/CB	3,09	O2		
Trp215/HB2	2,64	O2		
Trp215/HA	2,30	O2		
Gly219/N	3,48	O3		
Gly219/H	2,59	O3		
Gln192/OE1	2,81	O4		
Ser195/N	2,75	O5	51,95	-7,85
Ser195/OG	2,25	O5		
Ser195/HG	1,69	O5		
Ser195/H	2,30	O5		
Ala190/CB	3,15	O6		
Ala190/HB2	2,49	O6		
Asp194/CB	3,21	O6		
Asp194/HB2	2,16	O6		
Gly216/O	2,39	H15		
Gly219/O	2,69	H15		
Cys191/HA	2,80	Centroide C14-C19		
Gly216/O	2,26	Centroide O1-C8 (cumarina)		
Glu217/HA	2,60	Centroide C4-C9 (cumarina)		

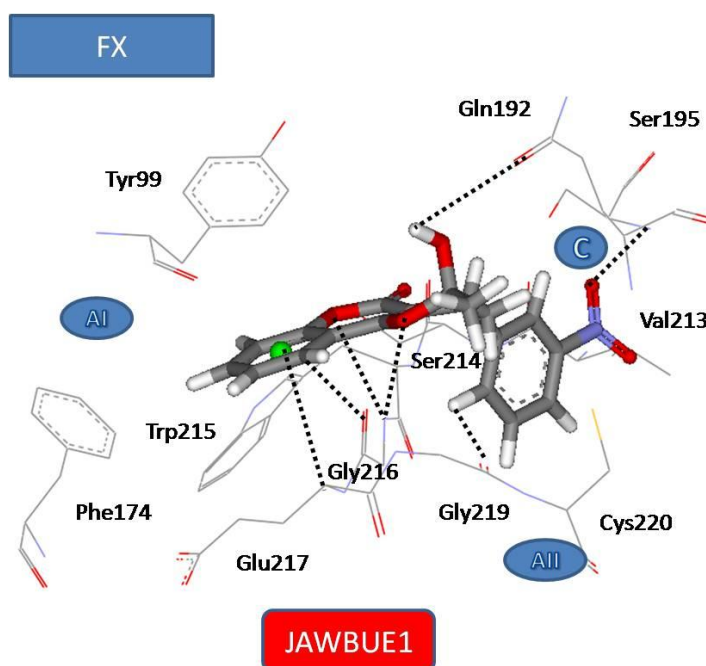


Figura 4.1.a.18 Interações do ligante JAWBUE1 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.19 Ligante JAWBUE2 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly216/CA	3,23	O7		
Gly216/HA1	2,59	O7		
Gly219/N	2,51	O8		
Gly219/H	2,15	O8		
Gln192/OE1	3,48	C30		
Ser195/OG	2,99	C32		
Cys191/SG	3,30	C37		
Cys220/SG	2,98	C37	50,61	-7,71
Cys220/SG	2,96	C38		
Asp189/OD2	2,58	H20		
Ser195/OG	2,46	H25		
Ser195/OG	2,59	H26		
Glu147/O	2,35	H28		
Cys191/SG	2,38	H29		
Cys220/SG	2,47	H29		
Cys220/SG	2,49	H30		

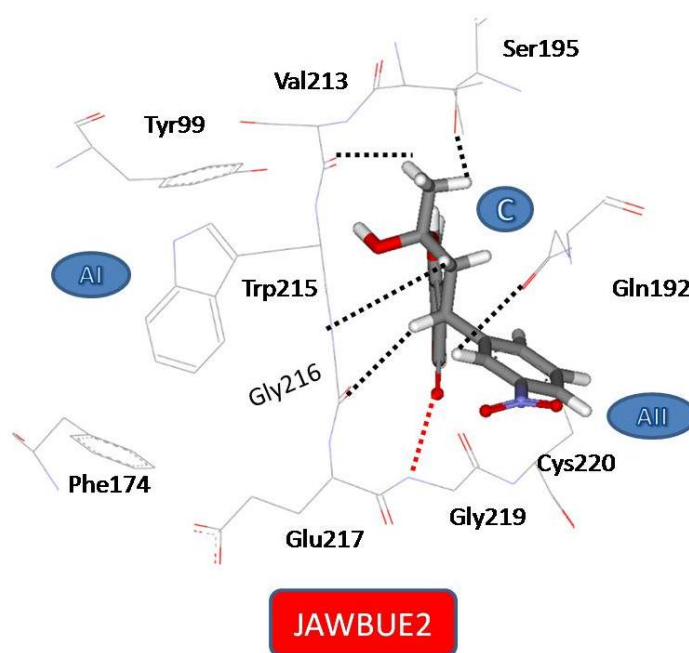


Figura 4.1.a.19 Interações do ligante JAWBUE2 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.20 Ligante JAWCAL - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Arg143/NH2	3,24	F1		
Arg143/HH21	2,87	F1		
Arg143/HH22	2,84	F1		
Glu147/O	3,11	F1		
Gly216/CA	3,11	O1		
Gly216/HA1	2,50	O1		
Gly219/N	2,56	O2		
Gly219/H	2,11	O2		
Trp215/CA	3,50	O3		
Trp215/HA	2,42	O3		
Asp189/OD2	3,36	C7	52,67	-7,93
Ser195/OG	2,60	C13		
Cys220/SG	3,39	C15		
Asp189/OD1	2,78	H4		
Asp189/OD2	2,45	H5		
Ser195/OG	2,23	H9		
Ser214/O	2,62	H9		
Ser195/OG	2,10	H11		
Cys220/SG	2,67	H12		
Gln192/HB2	2,89	Centroide C14-C19		

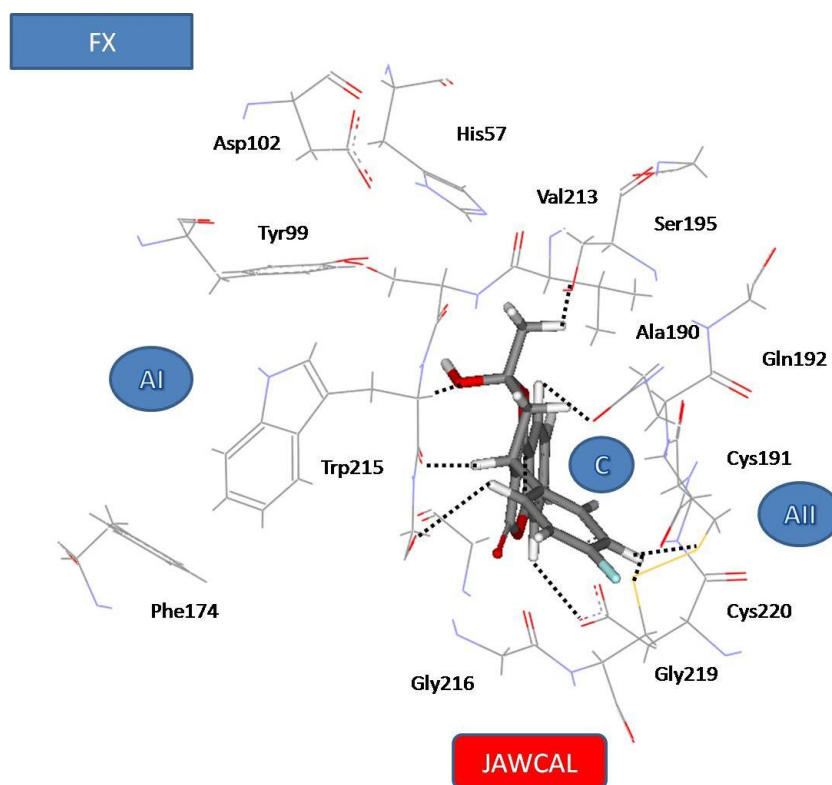


Figura 4.1.a.20 Interações do ligante JAWCAL no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.21 Ligante JOGLUM - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Ser195/OG	3,14	O1		
Trp215/CA	3,20	O1		
Trp215/HA	2,14	O1		
Gly219/O	2,73	O3		
Cys220/SG	2,71	O3		
Asp189/OD2	3,20	O5	41,76	-6,76
Gly216/O	2,64	C18		
Gly219/O	2,50	H1		
Cys220/SG	2,60	H1		
Asp189/OD2	2,36	H2		
Gly216/O	2,30	H15		

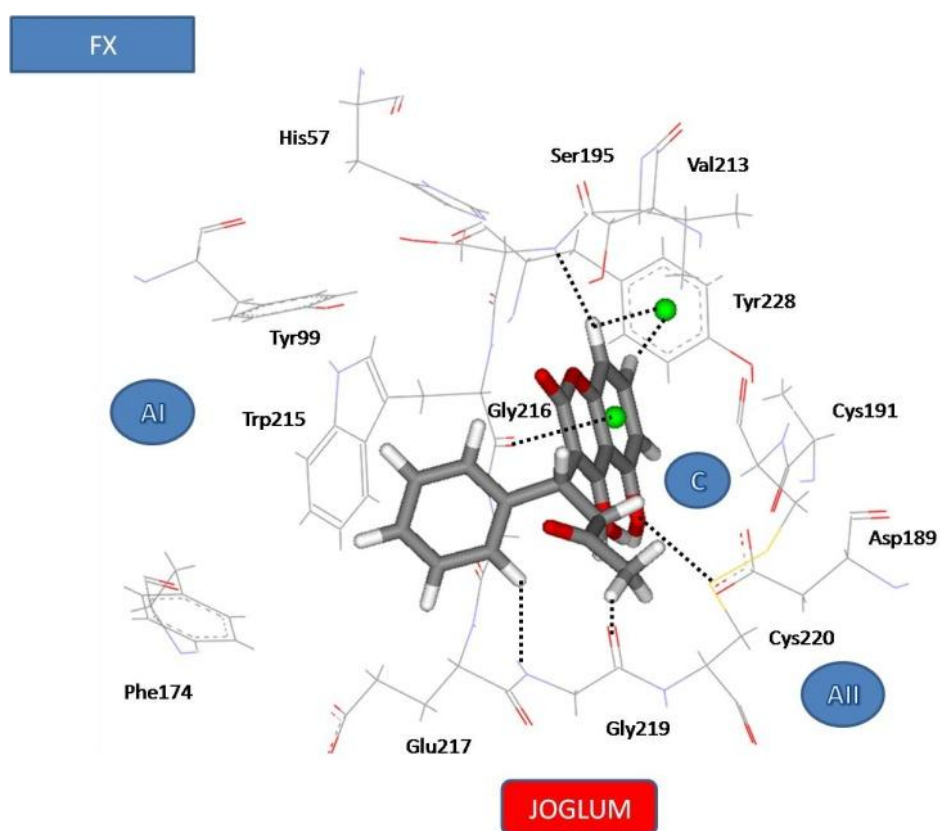
**Figura 4.1.a.21** Interações do ligante JOGLUM no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.22 Ligante p-Cl-WAR - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Ala190/O	2,66	C11		
Ala190/CB	3,28	C11		
Ala190/HB1	2,39	C11		
Gly219/O	3,43	C7		
Ser195/OG	2,97	C9		
His57/NE2	2,89	C11		
Gln192/CG	3,45	O12		
Gln192/OE1	3,23	O12		
Gln192/HG1	2,59	O12		
Gly216/O	3,00	C18		
Gly216/O	2,23	O23		
Tyr99/CE2	2,94	O24	44,98	-7,10
Tyr99/HE2	2,15	O24		
Ser195/OG	2,76	H26		
Ser214/O	2,70	H26		
Gly219/O	2,52	H28		
Cys220/SG	2,87	H28		
Ser195/OG	2,56	H31		
His57/NE2	2,58	H32		
Gly216/O	2,39	H35		
Gly216/O	1,27	H39		
Trp215/HB2	2,22	Centroide C13-C22 (cumarina)		
Trp215/HE3	3,15	Centroide C16-C21 (cumarina)		
Tyr99/centroide CG-CD2	3,03	H38		

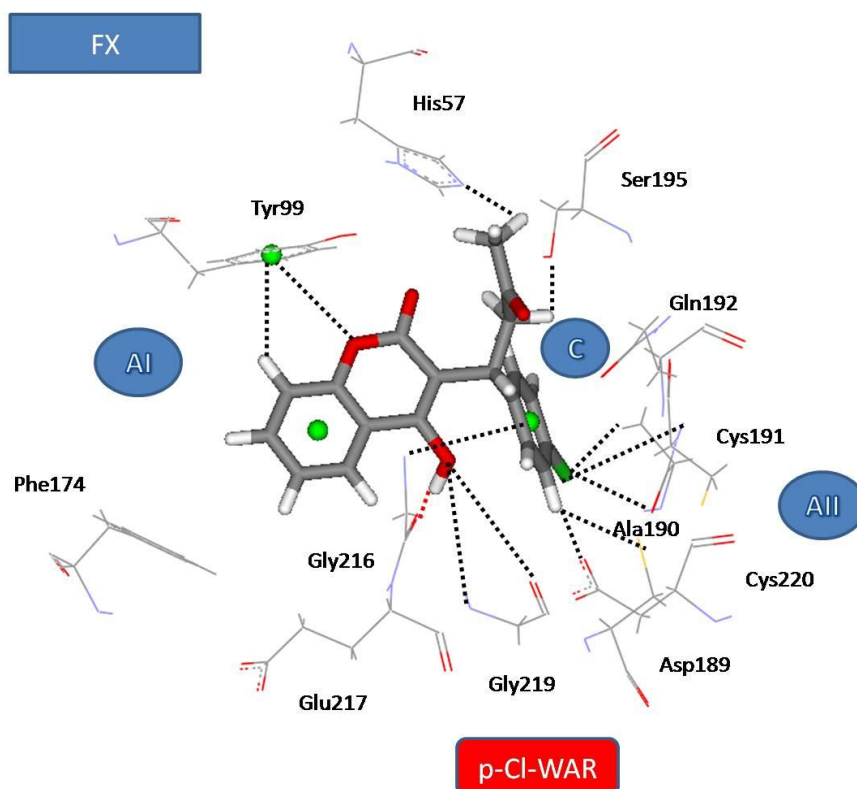


Figura 4.1.a.22 Interações do ligante p-Cl-WAR no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.23 Ligante VAWTIW - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly216/CA	3,21	O1		
Gly216/HA1	2,56	O1		
Gly219/N	2,45	O2		
Gly219/H	2,06	O2		
Trp215/CA	3,39	O3		
Trp215/HA	2,32	O3		
Trp215/CA	3,11	O4		
Trp215/CB	2,92	O4		
Trp215/HB2	2,39	O4		
Trp215/HA	2,48	O4		
Gly216/N	3,49	O4		
Gly216/H	2,63	O4		
Asp189/OD2	3,34	C7		
Ser195/OG	3,30	C13	33,02	-5,82
Ser214/O	3,38	C13		
Cys220/SG	3,39	C18		
Cys220/SG	3,33	C19		
Gln192/OE1	3,21	C21		
Asp189/OD2	2,33	H5		
Glu147/O	3,02	H7		
Cys191/SG	2,67	H8		
Cys220/SG	2,74	H9		
Ser214/O	2,34	H12		
Ser195/OG	2,71	H14		
Gln192/OE1	3,21	H18		
Cys191/HA	2,56	Centroide C4-C9 (cumarina)		

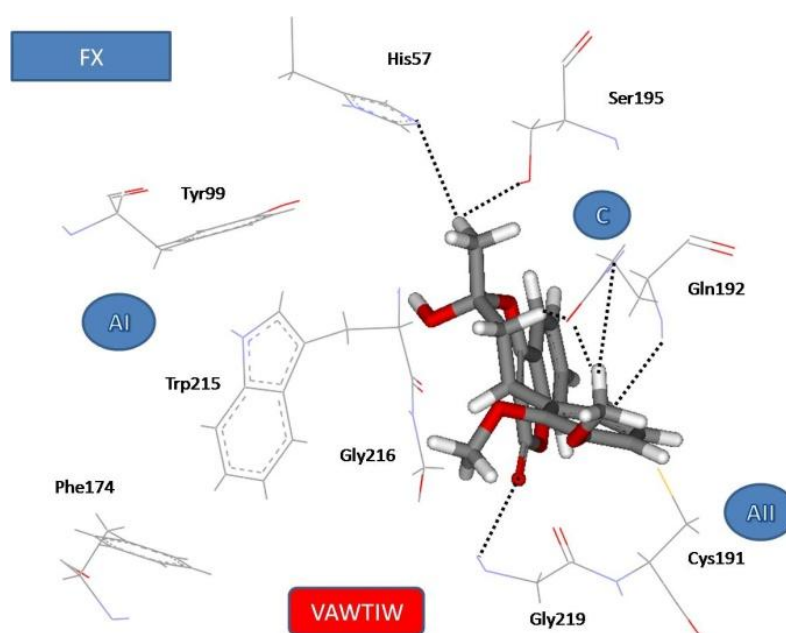


Figura 4.1.a.23 Interações do ligante VAWTIW no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.24 Ligante VAWTOC - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly216/CA	3,25	O1		
Gly216/HA1	2,59	O1		
Gly219/N	2,67	O2		
Gly219/H	2,32	O2		
Trp215/CA	3,12	O3		
Trp215/HA	2,04	O3		
Trp215/HB2	2,65	O4		
Val213/HG13	3,43	C4		
Asp189/OD2	3,31	C7		
Ser195/OG	2,90	C13	53,03	-7,97
Ser214/O	3,18	C13		
Glu147/O	2,99	C20		
Asp189/OD2	2,32	H5		
Ser214/O	2,14	H13		
Ser195/OG	2,10	H15		
Glu147/O	2,17	H18		
Gln192/HB2	2,86	Centroide C14-C19		
Gln192/OE1	3,18	Centroide C14-C19		
Gly216/HA1	3,16	Centroide C1-C19 (cumarina)		

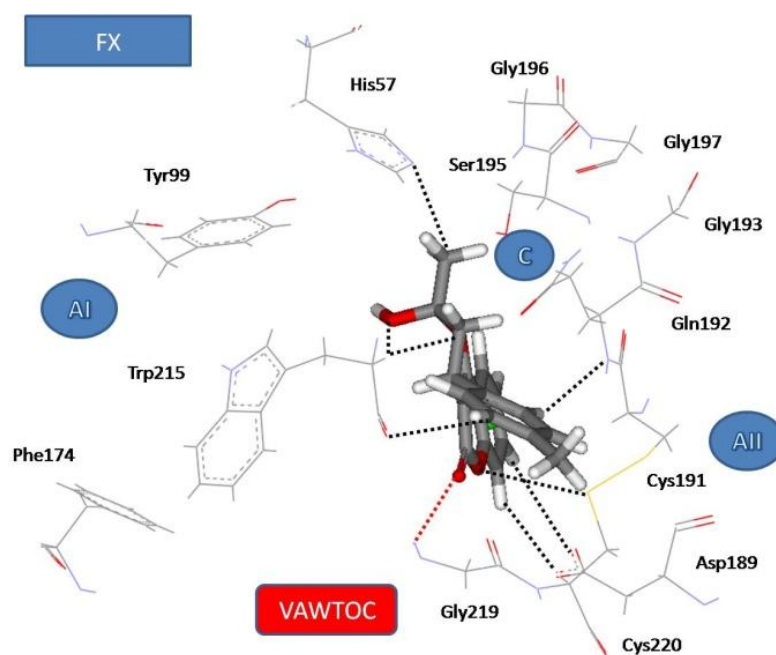


Figura 4.1.a.24 Interações do ligante VAWTOC no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.25 Ligante WARFAR10 - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Cys220/SG	3,08	C3		
Gly219/O	3,03	C7		
Cys220/SG	2,58	H2		
Cys220/SG	2,50	H3		
Gly219/O	2,32	H7		
Gln192/OE1	2,69	H12		
Trp215/CB	3,50	O1		
Trp215/HB2	2,48	O1		
Gly216/N	3,09	O1		
Gly216/H	2,10	O1		
Trp215/CA	2,87	O2	48,68	-7,50
Trp215/CB	3,10	O2		
Trp215/HB2	2,63	O2		
Trp215/HA	2,10	O2		
Gln192/OE1	2,58	O3		
Gln192/HB2	2,75	O3		
Gly219/N	3,44	O4		
Gly219/H	2,66	O4		
Gly216/O	2,10	Centróide O1-C11 (cumarina)		
Glu217/HA	2,69	Centroide C1-C19 (cumarina)		
Cys191/HA	2,57	Centroide C6-C12		

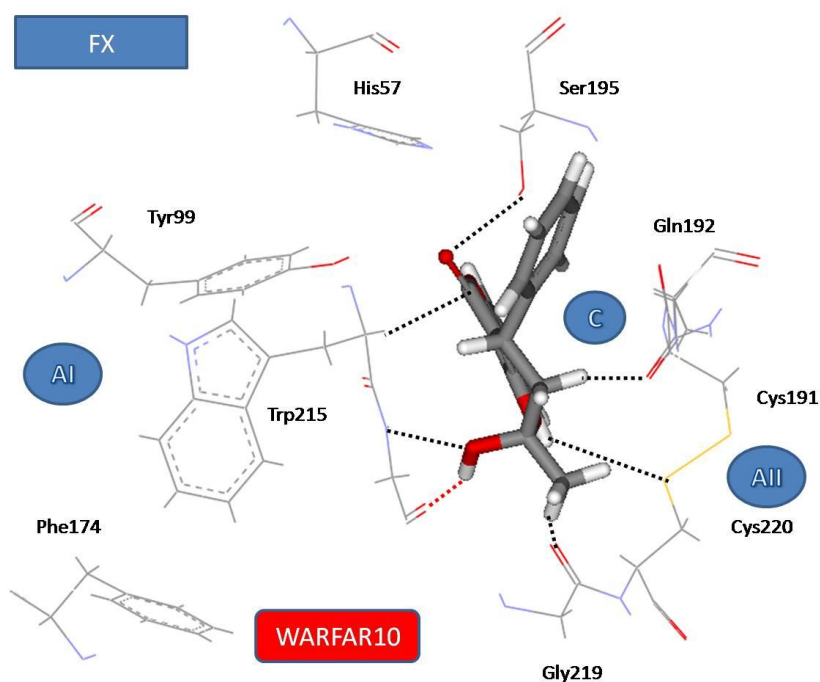


Figura 4.1.a.25 Interações do ligante WARFAR10 no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.26 Ligante WARFIN - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Ser195/OG	3,07	C5		
Ser195/OG	2,41	H6		
Cys220/SG	2,60	H10		
Asp189/OD2	2,61	H20	53,11	-7,98
Gly219/N	2,80	O3		
Gly219/H	2,47	O3		
Ser195/HG	3,46	O5		
Trp215/HA	2,73	O5		

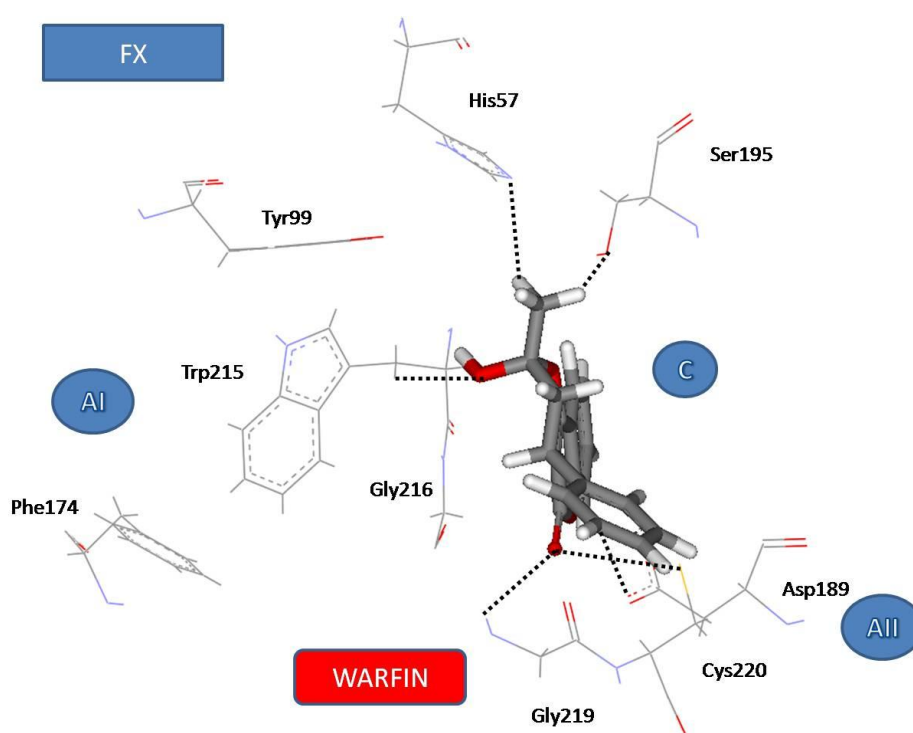


Figura 4.1.a.26 Interações do ligante WARFIN no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.27 Ligante WOGONINE - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly219/N	3,10	O9		
Gly219/H	2,33	O9		
Asp189/OD2	2,60	O17		
Gly216/CA	3,48	O17		
Gly216/HA1	2,45	O17		
Gly219/O	2,78	O17		
Cys220/HA	2,77	O17		
Asp189/OD1	2,70	O18		
Asp189/OD2	2,68	O18		
Gly226/HA2	2,41	O18		
Gly216/CA	3,09	O19		
Gly216/HA1	2,65	O19		
Ser195/OG	3,07	O21		
Val213/CG1	2,91	O21		
Val213/HG13	2,21	O21	54,45	-8,12
Ser195/OG	3,08	O22		
Trp215/CA	3,03	O23		
Trp215/CB	3,12	O23		
Trp215/HB2	2,53	O23		
Trp215/HA	2,36	O23		
Gly216/N	2,93	O23		
Gly216/H	2,09	O23		
Trp215/HB2	2,78	O25		
Gly219/O	1,88	H41		
Ser195/OG	2,10	H44		
Ser214/O	2,43	H47		
Gly216/O	2,37	Centróide C3-C8 (cumarina)		
Gly216/O	3,00	Centróide O25-C26 (cumarina)		
Trp215/centróide CG-CD2	3,16	H52		

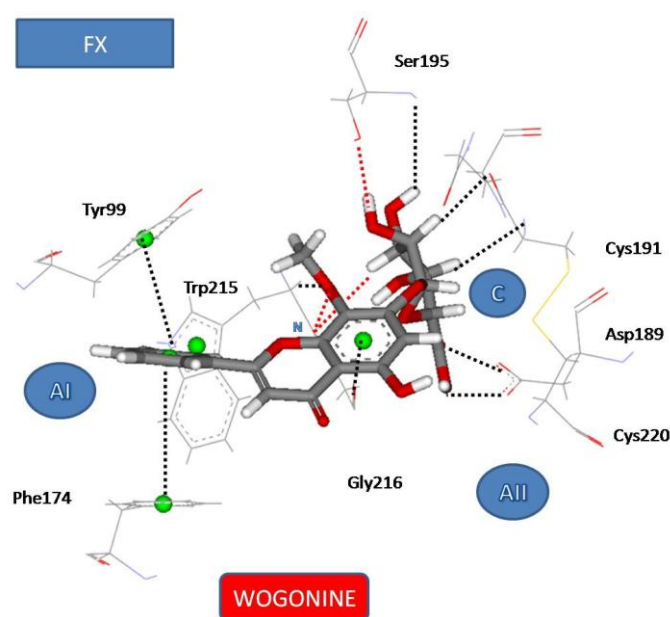
**Figura 4.1.a.26** Interações do ligante WOGONINE no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.28 Ligante WRR - Ligantes com atividade desconhecida				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gln192/OE1	2,74	C5		
Gly219/O	2,99	C12		
Trp215/CB	3,13	O1		
Trp215/HB2	2,26	O1		
Gly216/H	2,65	O1		
Gly219/CA	3,35	O3		
Gly219/HA2	2,43	O3		
Gly216/O	2,47	O4		
Glu217/CA	3,39	O4	23,90	-4,84
Glu217/HA	2,59	O4		
Gly219/N	2,73	O4		
Gly219/H	1,73	O4		
Gln192/OE1	2,22	HC1		
Gln192/OE1	2,37	HC3		
Gly219/O	2,26	HC21		
Cys191/HA	2,80	Centróide C6-C12		
Gly216/O	2,46	Centróide O1-C11 (cumarina)		

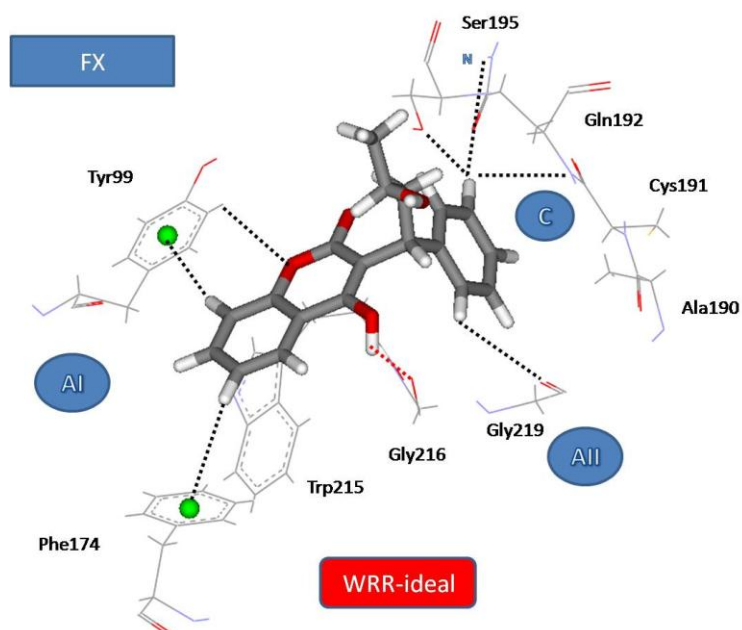


Figura 4.1.a.28 Interações do ligante WRR-Ideal no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.a.29 Ligante WRS - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly219/O	3,47	C7		
Cys220/SG	3,13	C15		
Gly219/H	2,70	O1		
Gly216/H	2,55	O2		
Gln192/CB	3,28	O4		
Gln192/HB2	2,56	O4		
Gln192/H	2,25	O4	31,75	-5,68
Cys220/SG	3,47	O4		
Gly219/O	2,63	HC7		
Cys220/SG	2,68	HC51		
Glu147/O	2,44	HC61		
Cys220/SG	2,54	HO4		
Gly219/HA2	3,11	Centróide C6-C12		
Cys191/HA	2,85	Centróide C1-C19 (cumarina)		

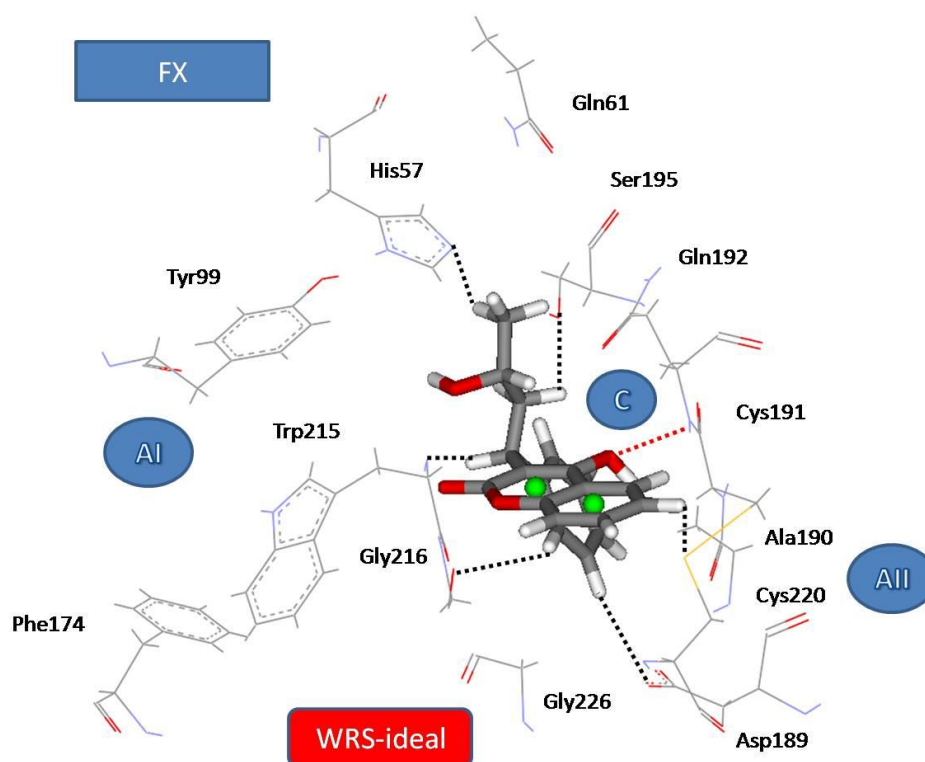


Figura 4.1.a.29 Interações do ligante WRS-Ideal no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.30 Ligante 15097-CH₂Cl - Ligantes com atividade desconhecida

aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Trp215/CB	3,31	O1		
Trp215/HB2	2,66	O1		
Gly216/O	2,94	C2		
Gly216/O	2,07	O12		
Gly219/O	2,73	O12		
Ser195/OG	3,38	C17		
Ser195/OG	3,17	O2		
Thr98/O	3,26	C30		
Gly216/O	1,95	H2		
Gly216/O	2,38	H9		
Gly219/O	1,92	H9	77,77	-10,63
Asp189/OD1	3,16	C32		
Ala190/O	3,31	C32		
Ser195/OG	2,48	H11		
Thr98/O	2,77	H19		
Asp189/OD1	2,66	H22		
Ala190/O	2,37	H22		
Tyr228/centróide CG-CD2	4,25	Cl1		
Phe174/centróide CG-CD2	3,56	Centróide C26-C31		
Tyr99/centróide CG-CD2	2,72	H14		
Trp215/HE3	3,19	Centróide C20-C25		
TRP215/centróide CD2-CE2	3,15	H20		

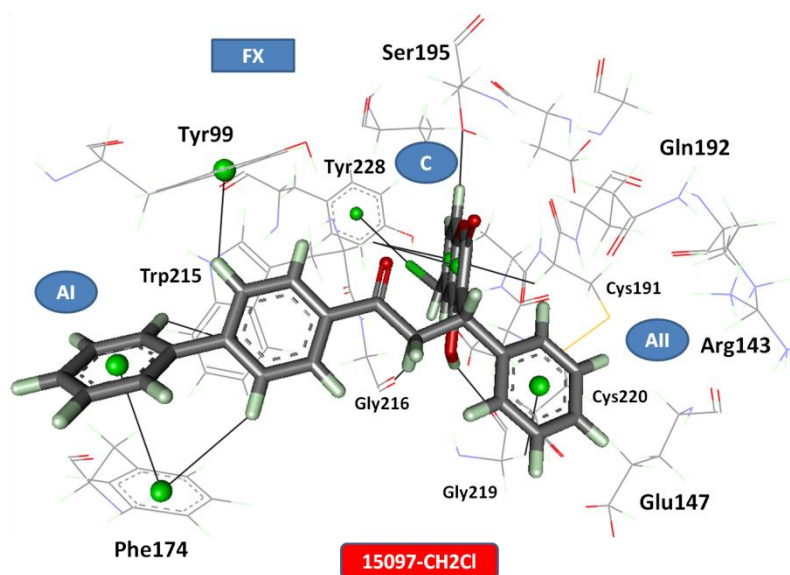
**Figura 4.1.a.31** Interações do ligante 15097-CH₂Cl no sítio da 2pr3 (Fator X).

Tabela 4.1.32 Ligante 15097-CH₂Cl-Cl-benz.				
aa./Átomo	Distância (Å)	Átomo do ligante	Escore (kcal/mol)	ΔG_{lig} (kcal/mol)
Gly216/O	3,41	C		
Gln192/OE1	3,45	C		
Gly216/O	3,27	C		
Gly216/N	3,47	O		
Gly216/C	3,02	O		
Gly216/O	2,23	O		
Gly219/N	3,48	O		
Gly219/O	2,95	O		
Cys191/O	3,07	C		
Ser195/OG	3,33	C		
Gln192/CA	3,32	O		
Gln192/HA	2,44	O		
Ser195/OG	3,04	O		
Ser195/HG	2,79	O		
Gln192/CG	3,30	O		
Gln192/OE1	3,43	O		
Gln192/HG1	2,45	O		
Gly216/O	3,28	C		
Thr98/O	3,50	C		
Thr98/O	3,33	C		
Gly216/O	2,40	H		
Glu147/CA	3,46	CL		
Glu147/C	3,43	CL		
Glu147/O	2,68	CL		
Glu147/CG	3,46	CL	92,37	-12,20
Glu147/HG1	2,78	CL		
Glu147/HA	2,71	CL		
Cys191/SG	3,32	CL		
Cys220/SG	3,33	CL		
Gly216/O	2,59	H		
Gly219/O	2,03	H		
Asp189/OD1	3,31	C		
Ala190/O	3,32	C		
Ser195/OG	2,54	H		
Tyr99/OH	2,65	H		
Gly216/O	2,28	H		
Thr98/O	3,24	H		
Val213/HG13	2,66	H		
Ala190/HB1	2,58	CL		
Gly226/CA	3,11	CL		
Gly226/HA1	2,58	CL		
Asp189/OD1	2,70	H		
Ala190/O	2,40	H		
Phe174/centróide CG-CD2	4,00	centróide		
Trp215	2,28	H		
Tyr99/centróide CG-CD2	2,28	H		
Gly219/HA2	2,99	centróide		
Cys191/HA	3,01	Centróide cumarina		
Tyr228/centróide CG-CD2	4,41	CL		

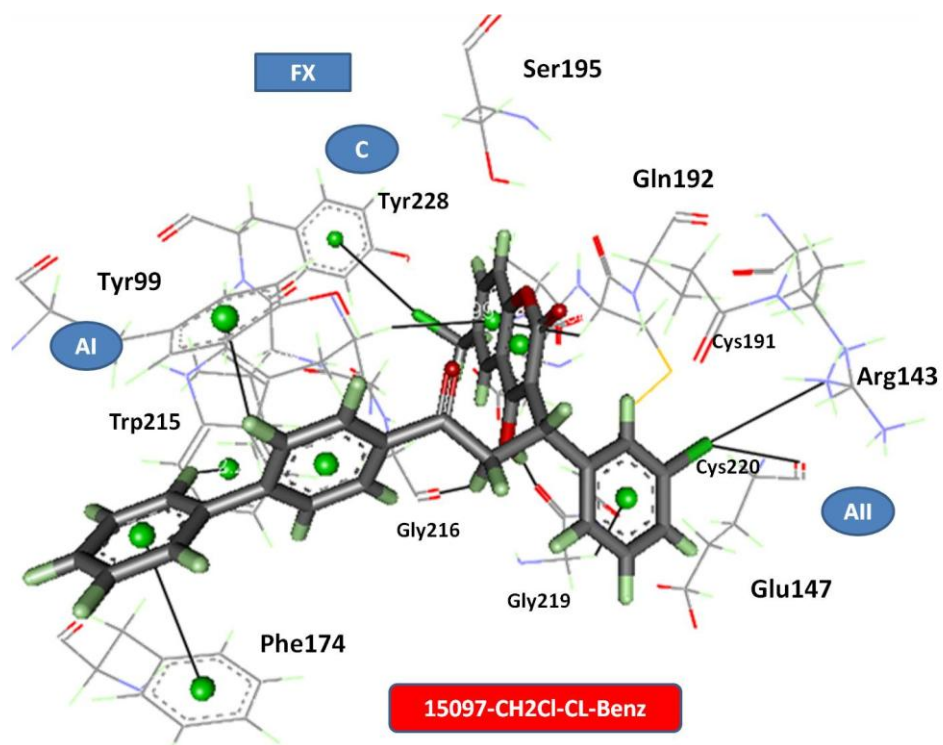


Figura 4.1.a.32 Interações do ligante 15097-CH₂Cl-CL-BENZ no sítio da 2pr3 (Fator X).

Anexo 4.2 ESCORE E OCUPAÇÃO DOS LIGANTES CUMARÍNICOS NO SÍTIO ATIVO DO FATOR X

Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X.

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
10		<p>C: Interações C-H...O com D189 no fundo e C-H...O com G219 e S195 na entrada da cavidade. Interação C-H...π na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações N-H...O com Q192 e R143.</p>	60,70
13		<p>C: Interações C-H...O com D189 no fundo e C-H...O com G219 e S195 na entrada da cavidade. Interação C-H...π com W215 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações N-H...O com Q192 e R143. Interação O...π com Q192.</p>	58,16
15		<p>C: Interações C-H...Cl com G226 no fundo. Interações C-H...π com W215 e C-H...O com G219 e S195 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações O...Cl com E147, N-H...Cl com R143 e C-H...Cl com K148.</p>	56,06
30		<p>C: Interações C-H...Cl com V190. Interações C-H...π com W215 e C-H...O com G219 e S195 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações C-H...O com E147, N-H...Cl com R143 e C-H...O com Q192.</p>	55,63

Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X (continuação).

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
10346		<p>C: Interações C-H...O com OD1 e OD2 do D189. Interação C-H...π na cumarina.</p> <p>AI: Interações C-H...O com CB do W215. Não faz interações π.</p> <p>AII: Interação C-H...O com E147.</p>	52,43
12895		<p>C: Interação C-H...π na cumarina.</p> <p>AI: Não ocupa.</p> <p>AII: Interações C-H...O com Q192 e N-H...O com R143.</p>	47,59
14692		<p>C: Interação C-H...O com Gly219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: Interações C-H...π com F174 e W215.</p> <p>AII: Interação C-H...S com Cys220.</p>	50,24
14693		<p>C: Interação C-H...π com Y228 e C-H...O com D189.</p> <p>AI: Interação C-H...O com Y99.</p> <p>AII: Interações C-H...O com Q192 e E147.</p>	64,24
15096		<p>C: Interações C-H...O e C-H...π com W215.</p> <p>AI: Interações C-H...π com F174, Y99 e W215.</p> <p>AII: Interação N-H...O com Q192.</p>	52,51

Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X (continuação).

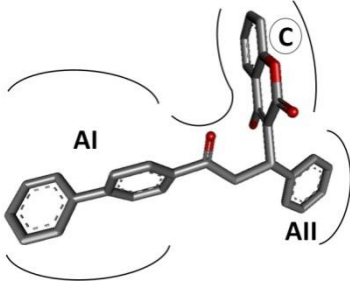
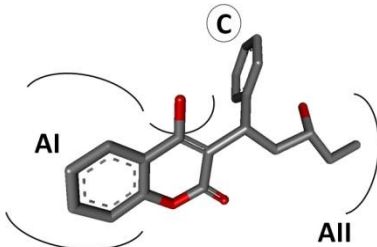
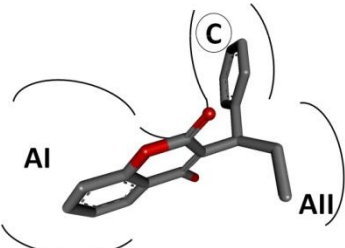
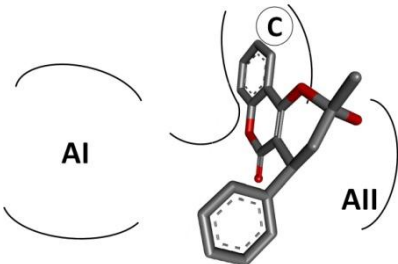
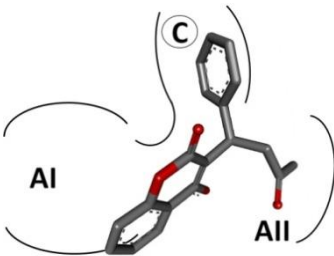
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
15097		<p>C: Interação C-H...π com C191. Interação O-H...O com G216 e G219 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: Interações π...π com F174 e C-H...π com Y99 e W215.</p> <hr/> <p>AII: Interação C-H...π com G219 entre C e AII.</p>	74,62
16493		<p>C: Interação C-H...π com W215 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: Interações C-H...π com Y99, F174 e W215</p> <hr/> <p>AII: Interações C-H...O com Q192 e E147 e N-H...O com Q192.</p>	49,17
B01AA04		<p>C: interação C-H...π com W215 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: Interações C-H...π com Y99 e W215.</p> <hr/> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	40,07
BEFZES		<p>C: anel naftil com um substituinte Cl – interação Cl... π com Y228.</p> <hr/> <p>AI: anel aromático com 1 N na composição. Interações pi-pi com Tyr99 e Phe174 e C-H...pi com Trp215.</p> <hr/> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	50,22
EFIWIZ01		<p>C: Interações C-H...π com C191 e C-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: Interações C-H...π com Y99 e W215.</p> <hr/> <p>AII: sem interações</p>	48,54

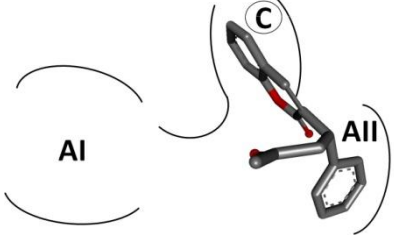
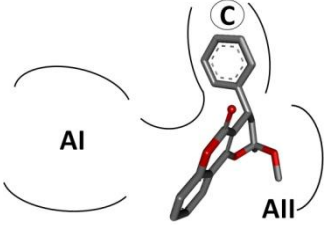
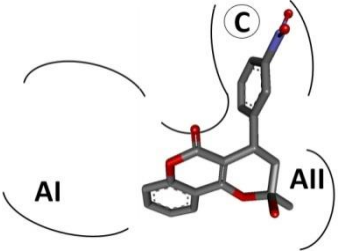
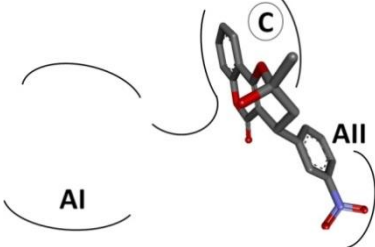
Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X (continuação).			
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
EFIWIZ02		<p>C: Interações C-H...π com Y228 e ligação de hidrogênio N-H...O com G216 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: sem interações</p>	51,21
FAXMAS		<p>C: Interação C-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	50,00
FAXMEW	Idêntico FAXMAS	<p>C: Interação C-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	50,41
JAWBUE1		<p>C: Interação N-H...O com S195 e C-H...O com G219, ambas na entrada da cavidade.</p> <p>AI: interação C-H...O com W215 – não ocupa o região.</p> <p>AII: Interação O-H...O com Q192.</p>	56,39
JAWBUE2		<p>C: anel aromático com um substituinte <i>p</i>-Cl (posição para) – interação Cl...π com Y228.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	55,80

Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X (continuação).

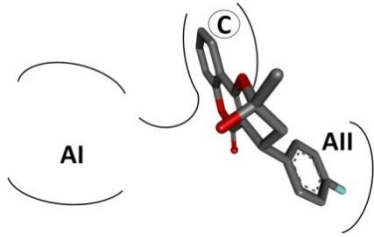
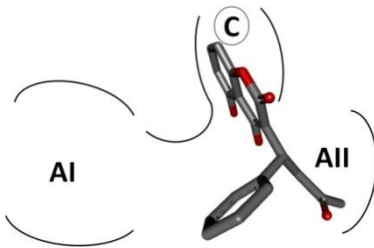
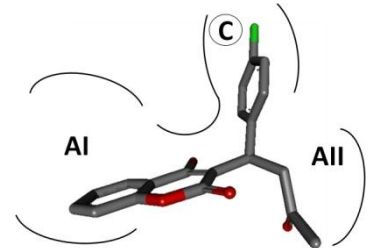
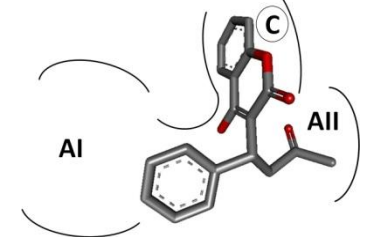
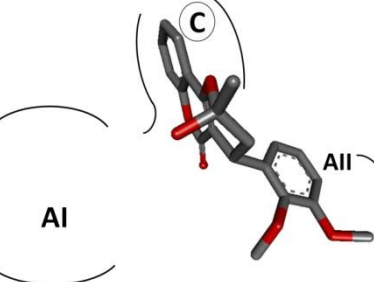
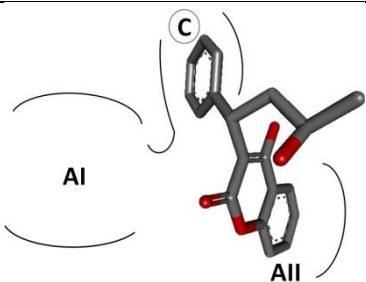
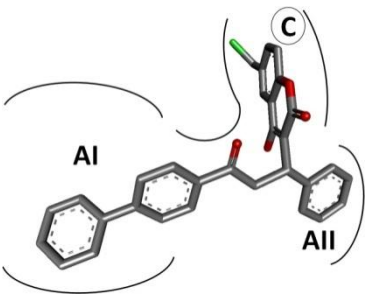
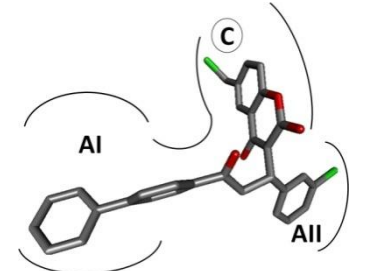
Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
JAWCAL		<p>C: Interações C-H...O com D189, N-H...O com G219 e C-H...O com S195 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações C-H...π e O...π com Q192, N-H...F com R143.</p>	51,19
JOGLUM		<p>C: Interações O-H...O com D189 no fundo e com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: sem interações.</p>	41,47
pCIWAR		<p>C: Interação C-H...Cl com V190 no fundo da cavidade e C-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: Interações C-H...π com Y99 e W215.</p> <p>AII: interação C-H...O com Q192.</p>	46,70
RWF		<p>C: Interação C-H...π com C191 e O-H...O e N-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	33,02
VAWTIW		<p>C: Interações C-H...O com D189 no fundo e N-H...O com G219.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações C-H...π e O...π com Q192.</p>	51,02

Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X (continuação).

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
VAWTOC		<p>C: Interações C-H...O com D189 no fundo e interações N-H...O com G219 na entrada na cavidade.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interações C-H...π e O...π com Q192.</p>	55,02
WARFAR10		<p>C: Interação C-H...π e C-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: Interações C-H...O com W215 entre C_AI, mas não ocupa a região.</p> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	48,68
WARFIN		<p>C: Interação C-H...O com D189 no fundo e C-H...O com S195 e N-H...O com G219.</p> <p>AI: não ocupa.</p> <p>AII: Interação C-H...O com Q192.</p>	53,11
Wogonine		<p>C: interações O-H...O com D189 e C-H...O com G226 no fundo da cavidade; interação O-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: interação π...π com Y99 e C-H...π com W215.</p> <p>AII: não ocupa.</p>	55,27
WRR		<p>C: Interação C-H...π com C191 e C-H...O com G219 na entrada da cavidade.</p> <p>AI: Interação C_H...π com W215 e O...π com G216 entre C-AI.</p> <p>AII: Interação C-H..O com Q192.</p>	21,40

McDowell et al. (2003)

Tabela 4.2.a Posição, interações e escore dos ligantes cumarínicos no sítio ativo do Fator X (continuação).

Código	Posicionamento do ligante	Descrição	Escore
WRS		<p>C: Interação C-H...π com C191; interações C-H...O e C-H...π com G219 e N-H...O com G216 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: não ocupa.</p> <hr/> <p>AII: Interação C-H...O com Q192 e E147.</p>	31,75
15097-CH ₂ Cl		<p>C: Interação C-H...π com C191. Interação Cl...π com Y228. Interação O-H...O com G216 e G219 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: Interações π...π com F174 e C-H...π com Y99 e W215.</p> <hr/> <p>AII: Interação C-H...π com G219 entre C e AII.</p>	77,77
15097-CH ₂ Cl-Cl-Benz		<p>C: Interação C-H...π com C191. Interação Cl...π com Y228. Interação O-H...O com G216 e G219 na entrada da cavidade.</p> <hr/> <p>AI: Interações π...π com F174 e C-H...π com Y99 e W215.</p> <hr/> <p>AII: Interação N-H...Cl com R143 e C=O...Cl com E147. Interação C-H...π com G219 entre C e AII.</p>	92,37

Referências – Capítulo 4

- BAUMLI, S.; ENDICOTT, J. A.; JOHNSON, L. N. 'Halogen Bonds Form the Basis for Selective P-Tefb Inhibition by Drb', *Chemistry & Biology* **Vol. 17, No. 9**, 931-936, 2010.
- FREDERICK, R.; ROBERT, S.; CHARLIER, C.; DE RUYCK, J.; WOUTERS, J.; PIROTTE, B.; MASEREEL, B.; POCHET, L. '3,6-Disubstituted Coumarins as Mechanism-Based Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 24, 7592-7603, 2005.
- SKORDALAKES, E.; ELGENDY, S.; GOODWIN, C. A.; GREEN, D.; SCULLY, M. F.; KAKKAR, V. V.; FREYSSINET, J. M.; DODSON, G.; DEADMAN, J. J. 'Bifunctional Peptide Boronate Inhibitors of Thrombin: Crystallographic Analysis of Inhibition Enhanced by Linkage to an Exosite 1 Binding Peptide', *Biochemistry* **Vol. 37, No. 41**, 14420-14427, 1998.
- VAN HUIS, C. A.; BIGGE, C. F.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; NARASIMHAN, L. S.; SCHAUM, R. P.; ZHANG, E.; BRYANT, J. W.; HAARER, S.; JANICZEK, N.; LEADLEY, R. J.; MCCLANAHAN, T.; PETERSON, J. T.; WELCH, K. M.; EDMUNDS, J. J. 'Structure-Based Drug Design of Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as a Novel Series of Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors', *Chemical Biology & Drug Design*, v.69, No. 6, 444-450, 2007.

Capítulo 5. CONCLUSÕES

5.1 DATA MINING

De toda a análise de ligantes realizada na etapa do data mining e de suas atividades, concluiu-se que é possível sugerir um padrão geral de posicionamento para ligantes mais promissores como inibidores. Este padrão está esquematizado na Figura 3.6 do Capítulo 3 e estabelece que há um perfil de ocupação dos ligantes definido pela interação com os resíduos da cavidade C e AI. Ainda definiu-se uma região denominada IP (ponto de interação), na qual foram observadas interações com resíduos em AII. No entanto, não foi possível estabelecer um padrão geral para esta região, exceto que a presença de átomos como Cl, F ou O podem contribuir para a melhora na atividade de inibição do Fator X.

5.2 COMPARAÇÃO COM O DOCKING DE CUMARINAS DE ATIVIDADE CONHECIDA

No Capítulo 3, fez-se um extenso levantamento dos complexos cristalográficos do Fator X e as atividades dos mesmos. Apesar da grande variedade de famílias de ligantes encontradas neste levantamento, observou-se que todos apresentavam tamanho suficiente para ocupar a região chamada de AI. Na maioria dos casos, apresentam inibições da ordem de nmol/L. Também, na maioria dos casos analisados, os ligantes ocupam a região AI, na qual participam de interações π com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos desta região (Tyr99, Phe174 e Trp215). Todos os ligantes também ocupam a cavidade C.

Para os ligantes da família das cumarinas com atividade conhecida (10, 13, 15 e 30), verificou-se que todos ocupam a cavidade C e a região AII. No entanto, nenhum deles ocupa a região AI. Para aqueles que inserem o anel cumarina na cavidade C, há melhora na inibição, como é o caso dos ligantes 15 e 30.

Este conjunto de quesitos, oriundos da comparação dos resultados das duas etapas (data mining e docking de ligantes cumarínicos) indica que a região AI é fundamental para a atividade inibitória de ligantes no Fator X. Deve-se salientar que o agrupamento dos aminoácidos por região (C, AI e AII) e a presente correlação com atividade de diferentes famílias é inédita. Isto poderá ter grande contribuição para o planejamento racional de novos fármacos anticoagulantes voltados à inibição específica do Fator X.

5.3 COMPARAÇÃO COM O DOCKING DE CUMARINAS DE ATIVIDADE DESCONHECIDA

Olhando para a família das cumarinas aqui estudadas, verificamos que os melhores resultados de docking são para os ligantes cujo anel cumarina posiciona-se no interior da cavidade C, semelhantemente ao obtido para as cumarinas de Frederick e colaboradores (2005).

Dos ligantes do grupo “cego”, apenas o ligante 15097 possui uma cadeia longa o suficiente para ocupar a região AI e inserir a cumarina na cavidade C. Este ligante também foi o único deste grupo a apresentar um escore na ordem do redocking. Unindo esta informação a todo o exposto, podemos sugerir que este composto pode vir a ser uma excelente estrutura de partida para o desenho de um fármaco inibidor do Fator X.

5.4 DESENHO RACIONAL DE UM LIGANTE DERIVADO DO 15097

Baseando-se no conhecimento produzido neste trabalho a partir das informações, dos cálculos e das análises (*data mining*, docking e visualização molecular), o presente estudo nos possibilitou sugerir um composto, o ligante aqui denominado 15097-CH₂Cl-Cl-Benz, que reúne características favoráveis dos ligantes cristalográficos e dos ligantes cumarínicos com atividade conhecida. A concepção deste composto foi possível somente com os resultados dos procedimentos descritos ao longo deste trabalho. O esquema de como os resultados das etapas deste trabalho levou a modelagem do 15097-CH₂Cl-Cl-Benz está apresentado na Figura 5.1

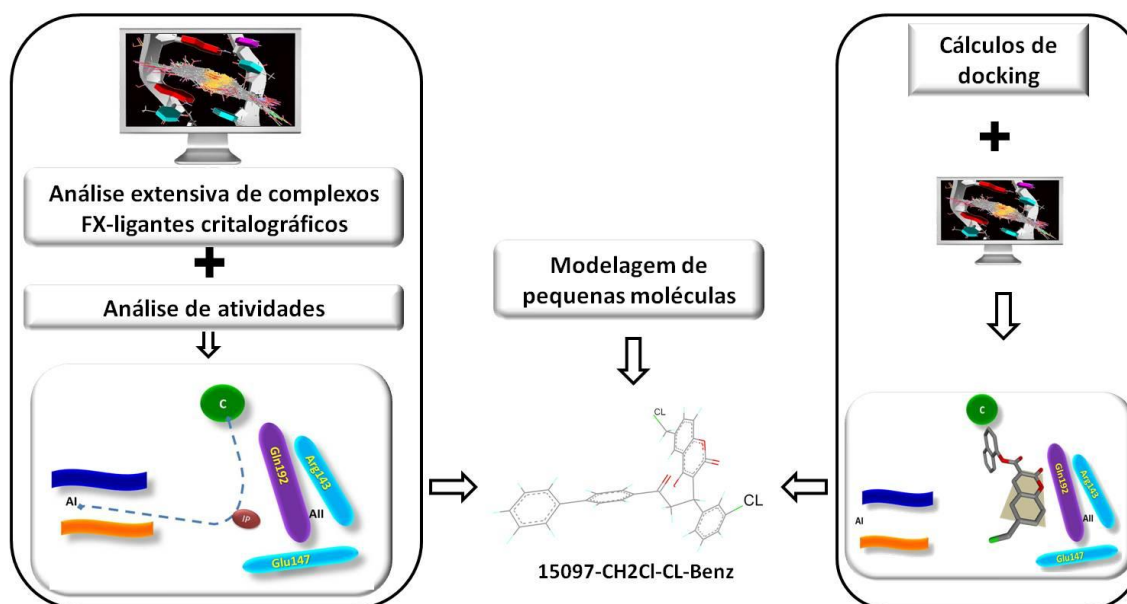


Figura 5.1 Estrutura do composto 15097-CH₂Cl-CL-Benz sugerido como um composto promissor para atuar como inibidor do Fator X.

O ligante 15097-CH₂Cl-CL-Benz de acordo com os estudos realizados, se liga ao sítio ativo do Fator X ocupando as três regiões (C, AI e AII). Deste modo, o anel cumarínico entra na cavidade C, onde há interações com o átomo de cloro do substituinte CH₂Cl. O substituinte aromático volumoso ocupa AI onde o ligante tem sua orientação estabilizada por interações envolvendo os sistemas π dos anéis do ligante e dos resíduos de aminoácidos aromáticos presentes. O anel benzeno contendo um átomo de Cl ocupa a região AII, interagindo com Arg143 e Glu147.

Portanto, candidatos promissores a serem anticoagulantes cumarínicos dirigidos ao sítio ativo do Fator X devem ocupar as três regiões descritas. Foram levantados, durante o trabalho, pontos importantes da estrutura dos ligantes a fim de melhorar o modo de ligação. As características estruturais favoráveis foram avaliadas, testadas e foi possível sugerir um composto promissor que reunisse tais características.

Referências

- ADLER, M.; DAVEY, D. D.; PHILLIPS, G. B.; KIM, S. H.; JANCARIK, J.; RUMENNIK, G.; LIGHT, D. R.; WHITLOW, M. 'Preparation, Characterization, and the Crystal Structure of the Inhibitor Zk-807834 (Ci-1031) Complexed with Factor Xa', *Biochemistry*, v.39, No. 41, 12534-12542, 2000.
- ADLER, M.; KOCHANNY, M. J.; YE, B.; RUMENNIK, G.; LIGHT, D. R.; BIANCALANA, S.; WHITLOW, M. 'Crystal Structures of Two Potent Nonamidine Inhibitors Bound to Factor Xa', *Biochemistry*, v.41, No. 52, 15514-15523, 2002.
- AGARWAL, P.; SEARLS, D. B. Literature mining in support of drug discovery. *Briefings in Bioinformatics* [S.l.], v. 9, n. 6, p. 479-492, 2008.
- ALLEN, F. H. 'The Cambridge Structural Database: A Quarter of a Million Crystal Structures and Rising', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v. 58, 380-388, 2002.
- ALLEN, F. H.; MOTHERWELL, W. D. S. 'Applications of the Cambridge Structural Database in Organic Chemistry and Crystal Chemistry', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v. 58, 407-422, 2002.
- ANSELL, J.; HIRSH, J.; POLLER, L.; BUSSEY, H.; JACOBSON, A.; HYLEK, E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists. *Chest* [S.l.], v. 126, n. 3, p. 204S-233S, Sep 2004.
- BAUMLI, S.; ENDICOTT, J. A.; JOHNSON, L. N. 'Halogen Bonds Form the Basis for Selective P-Tefb Inhibition by Drb', *Chemistry & Biology* **Vol. 17, No. 9**, 931-936, 2010.
- BOZZINI, C. E.; MOLINAS F. 2004. Hemostasia. In: Houssay A.B., Cirgolani H.E. *Fisiologia Humana de Houssay*, 7 ed. Artmed, Porto Alegre.
- BRANDSTETTER, H.; KUHNE, A.; BODE, W.; HUBER, R.; VONDERSAAL, W.; WIRTHENSOHN, K.; ENGH, R. A. 'X-Ray Structure of Active Site-Inhibited Clotting Factor Xa - Implications for Drug Design and Substrate Recognition', *Journal of Biological Chemistry*, v.271, No. 47, 29988-29992, 1996.
- BRAVIC, G.; GAULTIER, J.; HAUW, C. 'Crystal-Structure of Antivitamin-K Warfarin', *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie C*, v.277, No. 22, 1215-1218, 1973.
- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* [S.l.], v. 32, p. 335-373, 2003.
- BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; EDGINGTON, P. R.; KESSLER, M.; MACRAE, C. F.; MCCABE, P.; PEARSON, J.; TAYLOR, R. 'New Software for Searching the Cambridge Structural Database and Visualizing Crystal Structures', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v. 58, 389-397, 2002.
- CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE - CSD: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>
- CASTLEBERRY, B.; VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S. 'Open-Cyclic Warfarin Isomerism - 5-Hydroxywarfarin', *Journal of Crystallographic and Spectroscopic Research*, v.20, No. 6, 583-593, 1990.
- CHAN, C.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CAMPBELL, M.; CHAUDRY, L.; CHUNG, C. W.; CONVERY, M. A.; HAMBLIN, J. N.; JOHNSTONE, L.; KELLY, H. A.; KLEANTHOUS, S.; PATIKIS, A.; PATEL, C.; PATEMAN, A. J.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E.; WHITWORTH, C.; YOUNG, R. J.; ZHOU, P. 'Factor Xa Inhibitors: S1 Binding Interactions of a Series of N-((3s)-1- (1s)-1-Methyl-2-Morpholin-4-Yl-2-Oxoethyl -2-Oxopyrrolidin-3- Yl)Sulfonamides', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, No. 7, 1546-1557, 2007.

CHAVES, D. S. D.; COSTA, S. S.; DE ALMEIDA, A. P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R. B. Secondary Metabolites from Vegetal Origin: A Potential Source of Antithrombotic Drugs. *Quimica Nova* [S.l.], v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.

CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VANOPDENBOSCH, N. 'Validation of the General-Purpose Tripos 5.2 Force-Field', *Journal of Computational Chemistry* Vol. 10, No. 8, 982-1012, 1989.

CORTE, J. R.; FANG, T.; PINTO, D. J. P.; HAN, W.; HU, Z. L.; JIANG, X. J.; LI, Y. L.; GAUUAN, J. F.; HADDEN, M.; ORTON, D.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; WONG, P. C.; HE, K.; MORIN, P. E.; CHANG, C. H.; CHENEY, D. L.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Structure-Activity Relationships of Anthranilamide-Based Factor Xa Inhibitors Containing Piperidinone and Pyridinone P4 Moieties', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 9, 2845-2849, 2008.

CSD: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>

CUNHA, R.L.O.R.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; COMASSETO, J.V. Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. *Journal of Organometallic Chemistry* [S.l.], v. 691, n. 23, p. 4807-4815, 2006.

DAVIE, E. W. ; FUJIKAWA, K. ; KISIEL, W. The Coagulation Cascade - Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry* [S.l.], v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.

DE CANDIA, M; LOPOPOLO, G.; ALTOMARE, C. Novel factor Xa inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [S.l.], v. 19, n. 11, p. 1535-1580, 2009.

DE CARVALHO, M. J.; PEDROSA, T. N.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; NUNEZ, C. M.; OHANA, D. T.; PEREIRA, M. A. P; LIMA, E. S. Estudo Farmacognóstico e Atividade in Vitro Sobre a coagulação Sanguínea e Agregação Plaquetária das folhas de *Passiflora nitida Kunth* (Passifloraceae). *Acta Amazonica* [S.l.], v. 40, n. 1, p. 199 - 206, 2010.

DERWENT WORLD PATENTS -
http://apps.isiknowledge.com/DIIDW_GeneralSearch_input.do?highlighted_tab=DIIDW&product=DIIDW&last_prod=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&SID=4AEGAlgiBEKiejBEbEP, 08 de setembro de 2010.

DRUGBANK - <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00336>

DSVISUALIZER™ - Accelrys Software Inc. Discovery Studio Visualizer 2.0, 2.5
<http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization/discovery-studio-visualizer-registration-25.php>

ERIKSSON, B. I., K. A. BAUER, K.A.; LASSEN, M.R.; TURPIE, A. G. G.; STEERING COMM PENTASACCHARIDE, HIP. Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after hip-fracture surgery. *New England Journal of Medicine* [S.l.], v. 345, n. 18, p. 1298-1304, 2001.

ERIKSSON, B. I.; BORRIS, L. C.; DAHL, O. E.; HAAS, S.; HUISMAN, M. V.; KAKKAR, A. K.; MUEHLHOFER, E.; DIERIG, C.; MISSELWITZ, F.; KALEBO, P.; O. DIXA-HIP STUDY INVEST. A once-daily, oral, direct Factor Xa inhibitor, rivaroxaban (BAY 59-7939), for thromboprophylaxis after total hip replacement. *Circulation* [S.l.], v. 114, n. 22, p. 2374-2381, 2006.

ERIKSSON, B. I.; BORRIS, L. C.; DAHL, O. E.; HAAS, S.; HUISMAN, M. V.; KAKKAR, A. K.; MUEHLHOFER, E.; DIERIG, C.; MISSELWITZ, F.; KALEBO, P.; O. DIXA-HIP STUDY INVEST. Oral, direct Factor Xa inhibition with BAY 59-7939 for the prevention of venous thromboembolism after total hip replacement. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [S.l.], v. 4, n. 1, p. 121-128, 2006.

ERMONDI, G.; CARON, G. 'Recognition Forces in Ligand-Protein Complexes: Blending Information from Different Sources', *Biochemical Pharmacology*, v. 72, No. 12, 1633-1645, 2006.

- FARIAS, M., L. CRUZ, L.; CLAPAUCH, R.; SIQUEIRA, C. Efeitos da Terapia Estrogênica Transdérmica Isolada ou Associada à Progesterona Micronizada nos Fatores de Coagulação em Mulheres Menopausadas Com e Sem Sobrepeso. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. v. 50, n. 3, p. 505-514, 2006.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto* [S.l.], v. 34, n. 3/4, p. 229-237, 2001.
- FREDERICK, R.; ROBERT, S.; CHARLIER, C.; DE RUYCK, J.; WOUTERS, J.; PIROTTE, B.; MASEREEL, B.; POCHE, L. '3,6-Disubstituted Coumarins as Mechanism-Based Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, No. 24, 7592-7603, 2005.
- GHUMAN, J.; ZUNZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. 'Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of Human Serum Albumin', *Journal of Molecular Biology*, v.353, No. 1, 38-52, 2005.
- GILMAN, ALFRED, EDS - *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. XXI, 1436 p. ISBN 970-10-1161.
- GOEDE, A.; DUNKEL, M.; MESTER, N.; FROMMEL, C.; PREISSNER, R. 'Superdrug: A Conformational Drug Database', *Bioinformatics*, v. 21, No. 9, 1751-1753, 2005.
- GUENTHER, S.; HEMPEL, D.; DUNKEL, M.; ROTHER, K.; PREISSNER, R. 'Superhappen: A Comprehensive Database for Small Immunogenic Compounds', *Nucleic Acids Research*, v. 35, D906-D910, 2007.
- GUERTIN, K. R.; GARDNER, C. J.; KLEIN, S. I.; ZULLI, A. L.; CZEKAJ, M.; GONG, Y.; SPADA, A. P.; CHENEY, D. L.; MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; BROWN, K. D.; COLUSSI, D. J.; CHU, V.; HERAN, C. L.; MORGAN, S. R.; BENTLEY, R. G.; DUNWIDDIE, C. T.; LEADLEY, R. J.; PAULS, H. W. 'Optimization of the Beta-Aminoester Class of Factor Xa Inhibitors. Part 2: Identification of Fxv673 as a Potent and Selective Inhibitor with Excellent in Vivo Anticoagulant Activity', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.12, No. 12, 1671-1674, 2002.
- HAGINOYA, N.; KOBAYASHI, S.; KOMORIYA, S.; YOSHINO, T.; NAGATA, T.; HIROKAWA, Y.; NAGAHARA, T. 'Design, Synthesis, and Biological Activity of Non-Amidine Factor Xa Inhibitors Containing Pyridine N-Oxide and 2-Carbamoylthiazole Units', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.12, No. 21, 5579-5586, 2004.
- HAGINOYA, N.; KOBAYASHI, S.; KOMORIYA, S.; YOSHINO, T.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T.; WATANABE, K.; HIROKAWA, Y.; FURUGORI, T.; NAGAHARA, T. 'Synthesis and Conformational Analysis of a Non-Amidine Factor Xa Inhibitor That Incorporates 5-Methyl-4,5,6,7-Tetrahydrothiazolo 5,4-C Pyridine as S4 Binding Element', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, No. 21, 5167-5182, 2004.
- HALLAND, N.; HANSEN, T.; JORGENSEN, K. A. 'Organocatalytic Asymmetric Michael Reaction of Cyclic 1,3-Dicarbonyl Compounds and Alpha,Beta-Unsaturated Ketones - a Highly Atom-Economic Catalytic One-Step Formation of Optically Active Warfarin Anticoagulant', *Angewandte Chemie-International Edition*, v.42, No. 40, 4955-4957, 2003.
- HIRSH, J.; DALEN, J. E.; ANDERSON, D. R.; POLLER, L.; BUSSEY, H.; ANSELL, J.; DEYKIN, D.; BRANDT, J. T., 'Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range', *CHEST*, v. 114, No. 5 Suppl, 445S-469S, 1998.
- HIRSH, J.; DALEN, J. E.; DEYKIN, D.; POLLER, L.; BUSSEY, H., 'Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range', *Chest*, v. 108, No. 4, S231-S246, 1995.

- HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; SHINOZAKI, M.; OHNO, T.; YATAGAI, Y.; KAMIYA, M.; KUROKAWA, M.; NISHIDA, H.; MATSUSUE, T.; MIZUGUCHI, K.; ISHII, H. 'Pharmacological Characterization of the Active Synthetic Factor Xa Inhibitors M55551 and M55165', *European Journal of Pharmacology*, v.529, No. 1-3, 164-171, 2006.
- IMAEDA, Y.; KAWAMOTO, T.; TOBISU, M.; KONISHI, N.; HIROE, K.; KAWAMURA, M.; TANAKA, T.; KUBO, K., 'Discovery of Piperazinylimidazo 1,2-a Pyridines as Novel S4 Binding Elements for Orally Active Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, No. 6, 3125-3140, 2008.
- IMAEDA, Y.; KUROIITA, T.; SAKAMOTO, H.; KAWAMOTO, T.; TOBISU, M.; KONISHI, N.; HIROE, K.; KAWAMURA, M.; TANAKA, T.; KUBO, K., 'Discovery of Imidazo 1,5-C Imidazol-3-Ones: Weakly Basic, Orally Active Factor Xa Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, No. 12, 3422-3436, 2008.
- JOHNSON, D. J. D.; LI, W.; ADAMS, T. E.; HUNTINGTON, J. A. 'Antithrombin-S195a Factor Xa-Heparin Structure Reveals the Allosteric Mechanism of Antithrombin Activation', *Embo Journal*, v.25, No. 9, 2029-2037, 2006.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. 'A Genetic Algorithm for Flexible Molecular Overlay and Pharmacophore Elucidation', *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 9, No. 6, 532-549, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. 'Molecular Recognition of Receptor-Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation', *Journal of Molecular Biology*, v. 245, No. 1, 43-53, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. 'Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking', *Journal of Molecular Biology*, v. 267, No. 3, 727-748, 1997.
- KAMATA, K.; KAWAMOTO, H.; HONMA, T.; IWAMA, T.; KIM, S. H. 'Structural Basis for Chemical Inhibition of Human Blood Coagulation Factor Xa', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, No. 12, 6630-6635, 1998.
- KIM, M. J.; LEE, H. S.; CHUNG, D. H.; LEE, Y. T. 'Synthesis of Haptens of Organophosphorus Pesticides and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Parathion-Methyl', *Analytica Chimica Acta*, v.493, No. 1, 47-62, 2003.
- KISHIMOTO, T. K.; VISWANATHAN, K.; GANGULY, T.; ELANKUMARAN, S.; SMITH, S.; PELZER, K.; LANSING, J. C.; SRIRANGANATHAN, N.; ZHAO, G. L.; GALCHEVA-GARGOVA, Z.; AL-HAKIM, A.; BAILEY, G. S.; FRASER, B.; ROY, S.; ROGERS-COTRONE, T.; BUHSE, L.; WHARY, M.; FOX, J.; NASR, M.; DAL PAN, G. J.; SHRIVER, Z.; LANGER, R. S.; VENKATARAMAN, G.; AUSTEN, K. F.; WOODCOCK, J.; SASISEKHARAN, R., 'Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System', *New England Journal of Medicine*, v. 358, No. 23, 2457-2467, 2008.
- KISHIMOTO, T. K.; VISWANATHAN, K.; GANGULY, T.; ELANKUMARAN, S.; SMITH, S.; PELZER, K.; LANSING, J. C.; SRIRANGANATHAN, N.; ZHAO, G. L.; GALCHEVA-GARGOVA, Z.; AL-HAKIM, A.; BAILEY, G. S.; FRASER, B.; ROY, S.; ROGERS-COTRONE, T.; BUHSE, L.; WHARY, M.; FOX, J.; NASR, M.; DAL PAN, G. J.; SHRIVER, Z.; LANGER, R. S.; VENKATARAMAN, G.; AUSTEN, K. F.; WOODCOCK, J.; SASISEKHARAN, R., 'Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System (Vol 358, Pg 2457, 2008)', *New England Journal of Medicine*, v. 362, No. 11, 1056-1056, 2010.
- KOCHANNY, M. J.; ADLER, M.; EWING, J.; GRIEDEL, B. D.; HO, E.; KARANJAWALA, R.; LEE, W.; LENTZ, D.; LIANG, A. M.; MORRISSEY, M. M.; PHILLIPS, G. B.; POST, J.; SACCHI, K. L.; SAKATA, S. T.; SUBRAMANYAM, B.; VERGONA, R.; WALTERS, J.; WHITE, K. A.; WHITLOW, M.; YE, B.; ZHAO, Z. C.; SHAW, K. J. 'Substituted Thiophene-Anthranilamides as Potent Inhibitors of Human Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, No. 5, 2127-2146, 2007.

- KOVRT, J. T.; BIGGE, C. F.; BRYANT, J. W.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CHI, L.; CODY, W. L.; DAHRING, T.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HAARER, S.; HEEMSTRA, R.; JANICZEK, N.; NARASIMHAN, L.; MCCLANAHAN, J.; PETERSON, J. T.; SAHASRABUDHE, V.; SCHAUM, R.; VAN HUIS, C. A.; WELCH, K. M.; ZHANG, E.; LEADLEY, R. J.; EDMUNDS, J. J. 'The Discovery of (2r,4r)-N-(4-Chlorophenyl)-N-(2-Fluoro-4-(2-Oxopyridin-1(2h)-Yl)Phenyl)- 4-Methoxypyrrolidine-1,2-Dicarboxamide (Pd 0348292), an Orally Efficacious Factor Xa Inhibitor', *Chemical Biology & Drug Design*, v. 70, No. 2, 100-112, 2007.
- KOVRT, J. T.; FILIPSKI, K. J.; CODY, W. L.; BIGGE, C. F.; LA, F.; WELCH, K.; DAHRING, T.; BRYANT, J. W.; LEONARD, D.; BOLTON, G.; NARASIMHAN, L.; ZHANG, E.; PETERSON, J. T.; HAARER, S.; SAHASRABUDHE, V.; JANICZEK, N.; DESIRAJU, S.; HENA, M.; FIAKPUI, C.; SARASWAT, N.; SHARMA, R.; SUN, S. Y.; MAITI, S. N.; LEADLEY, R.; EDMUNDS, J. J. 'The Discovery of Glycine and Related Amino Acid-Based Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, No. 13, 4379-4392, 2006.
- KOMORIYA, S.; HAGINOYA, N.; KOBAYASHI, S.; NAGATA, T.; MOCHIZUKI, A.; SUZUKI, M.; YOSHINO, T.; HORINO, H.; NAGAHARA, T.; ISOBE, Y.; FURUGOORI, T. 'Design, Synthesis, and Biological as Factor Xa Inhibitors: Sar Study of S1 Activity of Non-Basic Compounds and Aryl Binding Sites', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, No. 12, 3927-3954, 2005.
- LEE, Y. K.; PARKS, D. J.; LU, T.; THIEU, T. V.; MARKOTAN, T.; PAN, W.; MCCOMSEY, D. F.; MILKIEWICZ, K. L.; CRYSLER, C. S.; NINAN, N.; ABAD, M. C.; GIARDINO, E. C.; MARYANOFF, B. E.; DAMIANO, B. P.; PLAYER, M. R. '7-Fluoroindazoles as Potent and Selective Inhibitors of Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, No. 2, 282-297, 2008.
- LUDEMAN, J. P.; PIKE, R. N.; BROMFIELD, K. M.; DUGGAN, P. J.; CIANCI, J.; LE BONNIEC, B.; WHISSTOCK, J. C.; BOTTOMLEY, S. P. 'Determination of the P '(1), P '(2) and P '(3) Subsite-Specificity of Factor Xa', *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.35, No. 2, 221-225, 2003.
- MACK, R.; HEHENBERGER, M., 'Text-Based Knowledge Discovery: Search and Mining of Life-Sciences Documents (Vol 7, Pg 589, 2002)', *Drug Discovery Today*, v. 7, No. 17, 889-889, 2002.
- MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; CHOI-SLEDSKI, Y. M.; BECKER, M. R.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V. 'Molecular Structures of Human Factor Xa Complexed with Ketopiperazine Inhibitors: Preference for a Neutral Group in the S1 Pocket', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, No. 5, 685-690, 2003.
- MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; POUZIEUX, S.; CHOI-SLEDESKI, Y. M.; BECKER, M. R.; KLEIN, S. I.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V. 'Crystal Structures of Human Factor Xa Complexed with Potent Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, No. 17, 3226-3232, 2000.
- MAIGNAN, S.; GUILLOTEAU, J. P.; POUZIEUX, S.; CHOI-SLEDESKI, Y. M.; BECKER, M. R.; KLEIN, S. I.; EWING, W. R.; PAULS, H. W.; SPADA, A. P.; MIKOL, V. 'Crystal Structures of Human Factor Xa Complexed with Potent Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.43, No. 17, 3226-3232, 2000.
- MANN, K. G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K., 'The Dynamics of Thrombin Formation', *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 23, No. 1, 17-25, 2003.
- MARVIN - <http://www.chemaxon.com/>
- MATTER, H.; DEFOSSA, E.; HEINELT, U.; BLOHM, P. M.; SCHNEIDER, D.; MULLER, A.; HEROK, S.; SCHREUDER, H.; LIESUM, A.; BRACHVOGEL, V.; LONZE, P.; WALSER, A.; AL-OBEIDI, F.; WILDGOOSE, P. 'Design and Quantitative Structure-Activity Relationship of 3-Amidinobenzyl-1h-Indole-2-Carboxamides as Potent, Nonchiral, and Selective Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, No. 13, 2749-2769, 2002.

- MATTER, H.; WILL, D. W.; NAZARE, M.; SCHREUDER, H.; LAUX, V.; WEHNER, V. 'Structural Requirements for Factor Xa Inhibition by 3-Oxybenzamides with Neutral P1 Substituents: Combining X-Ray Crystallography, 3d-Qsar, and Tailored Scoring Functions', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 9, 3290-3312, 2005.
- MCDOWELL, L. M.; MCCARRICK, M. A.; STUDELSKA, D. R.; O'CONNOR, R. D.; LIGHT, D. R.; GUILFORD, W. J.; ARNAIZ, D.; ADLER, M.; DALLAS, J. L.; POLIKS, B.; SCHAEFER, J. 'Human Factor Xa Bound Amidine Inhibitor Conformation by Double Rotational-Echo Double Resonance Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Dynamics Simulations', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, No. 3, 359-363, 2003.
- MCLEAN, J. 'Discovery of Heparin', *Circulation* **Vol. 19, No. 1**, 75-78, 1959
- MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; DE SA, M. P. L.; MOURAO, P. A. S., 'Heparin Quality Control in the Brazilian Market: Implications in the Cardiovascular Surgery', *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 23, No. 2, 169-174, 2008.
- MERCURY CSD - <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/mercury/>
- MIANA, L. A.; ATIK, F. A.; MOREIRA, L. F.; HUEB, A. C.; JATENE, F. B.; AULER JUNIOR, J. O.; OLIVEIRA, S. A., 'Risk Factors for Postoperative Bleeding after Adult cardiac Surgery', *Arquivos de Medicina*, v. 19, No. 3, 280-286, 2004.
- MUELLER, M. M.; SPERL, S.; STURZEBECKER, J.; BODE, W.; MORODER, L. '(R)-3-Amidinophenylalanine-Derived Inhibitors of Factor Xa with a Novel Active-Site Binding Mode', *Biological Chemistry*, v.383, No. 7-8, 1185-1191, 2002.
- MURAKAMI, M. T.; RIOS-STEINER, J.; WEAVER, S. E.; TULINSKY, A.; GEIGER, J. H.; ARNI, R. K. 'Intermolecular Interactions and Characterization of the Novel Factor Xa Exosite Involved in Macromolecular Recognition and Inhibition: Crystal Structure of Human Gla-Domainless Factor Xa Complexed with the Anticoagulant Protein Napc2 from the Hematophagous Nematode *Ancylostoma Caninum*', *Journal of Molecular Biology*, v.366, No. 2, 602-610, 2007.
- NAGATA, T.; YOSHINO, T.; HAGINOYA, N.; YOSHIKAWA, K.; ISOBE, Y.; FURUGOHRU, T.; KANNO, H. 'Cycloalkanediamine Derivatives as Novel Blood Coagulation Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, No. 16, 4683-4688, 2007.
- NAR, H.; BAUER, M.; SCHMID, A.; STASSEN, J. M.; WIENEN, W.; PRIEPKE, H. W. M.; KAUFFMANN, I. K.; RIES, U. J.; HAUEL, N. H. 'Structural Basis for Inhibition Promiscuity of Dual Specific Thrombin and Factor Xa Blood Coagulation Inhibitors', *Structure*, v.9, No. 1, 29-37, 2001.
- NAVEGA, S. 'Princípios Essenciais do Data Mining', *Anais do Infoimagem*, 1-9. 2002
- NAZARE, M.; WILL, D. W.; MATTER, H.; SCHREUDER, H.; RITTER, K.; URMANN, M.; ESSRICH, M.; BAUER, A.; WAGNER, M.; CZECH, J.; LORENZ, M.; LAUX, V.; WEHNER, V. 'Probing the Subpockets of Factor Xa Reveals Two Binding Modes for Inhibitors Based on a 2-Carboxyindole Scaffold: A Study Combining Structure-Activity Relationship and X-Ray Crystallography', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 14, 4511-4525, 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER. *Princípios de Bioquímica*. 3a. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2002. 975p.
- NISHIDA, H.; MIYAZAKI, Y.; KITAMURA, Y.; OHASHI, M.; MATSUSUE, T.; OKAMOTO, A.; HOSAKA, Y.; OHNISHI, S.; MOCHIZUKI, H. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as Factor Xa Inhibitor', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.49, No. 10, 1237-1244, 2001.
- NISHIDA, H.; MIYAZAKI, Y.; MUKAIHIRA, T.; SAITOH, F.; FUKUI, M.; HARADA, K.; ITOH, M.; MURAOKA, A.; MATSUSUE, T.; OKAMOTO, A.; HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; OHNISHI, S.; MOCHIZUKI, H. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as a Factor Xa Inhibitor - II. Substituent Effect on Biological Activities', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.50, No. 9, 1187-1194, 2002.

- NISHIDA, H.; MIYAZAKI, Y.; MUKAIHIRA, T.; SHIMADA, H.; SUZUKI, K.; SAITOH, F.; MIZUNO, M.; MATSUSUE, T.; OKAMOTO, A.; HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; OHNISHI, S.; MOCHIZUKI, H. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as Factor Xa Inhibitors Iii. Effect of Ring Opening of Piperazinone Moiety on Inhibition', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.52, No. 4, 459-462, 2004.
- NORLEDGE, B. V.; PETROVAN, R. J.; RUF, W.; OLSON, A. J. 'The Tissue Factor/Factor Viiia/Factor Xa Complex: A Model Built by Docking and Site-Directed Mutagenesis', *Proteins-Structure Function and Genetics*, v.53, No. 3, 640-648, 2003.
- PADMANABHAN, K.; PADMANABHAN, K. P.; TULINSKY, A.; PARK, C. H.; BODE, W.; HUBER, R.; BLANKENSHIP, D. T.; CARDIN, A. D.; KISIEL, W. 'Structure of Human Des(1-45) Factor-Xa at 2.2-Angstrom Resolution', *Journal of Molecular Biology*, v.232, No. 3, 947-966, 1993.
- PAULINO, M.; IRIBARNE, F.; HANSZ, M.; VEGA, M.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; OLEA, C.; STOPPANI, A.; BERRIMAN, M.; FAIRLAMB, A.; TAPIA, O. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, v. 584, p. 95-105, 2002
- PDB - Protein Data Bank Contents Guide: Atomic Coordinate Entry Format Description. Version 2.3 (1998). <http://www.wwpdb.org/documentation/format2.3-0108-us.pdf>.
- PDB - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- PERZBORN, E.; STRASSBURGER, J.; WILMEN, A.; POHLMANN, J.; ROEHRIG, S.; SCHLEMMER, K. H.; STRAUB, A., 'In Vitro and in Vivo Studies of the Novel Antithrombotic Agent Bay 59-7939 - an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, No. 3, 514-521, 2005.
- PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; TWINE, S.; EAST, M.; CURRY, S. 'Crystal Structure Analysis of Warfarin Binding to Human Serum Albumin - Anatomy of Drug Site I', *Journal of Biological Chemistry*, v.276, No. 25, 22804-22809, 2001.
- PINTO, D. J. P.; GALEMMO, R. A.; QUAN, M. L.; ORWAT, M. J.; CLARK, C.; LI, R. H.; WELLS, B.; WOERNER, F.; ALEXANDER, R. S.; ROSSI, K. A.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; LUETTGEN, J. M.; RENDINA, A. R.; KNABB, R. M.; HE, K.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Discovery of Potent, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitors of Blood Coagulation Factor Xa with Neutral P1 Moieties', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 21, 5584-5589, 2006.
- PINTO, D. J. P.; ORWAT, M. J.; KOCH, S.; ROSSI, K. A.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; HE, K.; XIN, B. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Discovery of 1-(4-Methoxyphenyl)-7-Oxo-6-(4-(2-Oxopiperidin-1-Yl)Phenyl)-4,5,6,7-Tetrahydro-1h-Pyrazolo [3,4-c] Pyridine-3-Carboxamide (Apixaban, Bms-562247), a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, No. 22, 5339-5356, 2007.
- PINTO, D. J. P.; ORWAT, M. J.; QUAN, M. L.; HAN, Q.; GALEMMO, R. A.; AMPARO, E.; WELLS, B.; ELLIS, C.; HE, M. Y.; ALEXANDER, R. S.; ROSSI, K. A.; SMALLWOOD, A.; WONG, P. C.; LUETTGEN, J. M.; RENDINA, A. R.; KNABB, R. M.; MERSINGER, L.; KETTNER, C.; BAL, S.; HE, K.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. '1-3-Aminobenzisoxazol-5-Yl-3-Trifluoromethyl-6-12-(3-(R)-Hydroxy-N-Pyrrolidinyl)methyl-1,1'-Biphen-4-Yl-1,4,5,6-Tetrahydropyrazolo-13,4-c-Pyridin-7-One (Bms-740808) a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa 10.1016/J.Bmel.2006.02.069', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 15, 4141-4147, 2006.

- POORT, S. R.; ROSENDAAL, F. R.; REITSMA, P. H.; BERTINA, R. M., 'A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated with Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis', *Blood*, v. 88, No. 10, 3698-3703, 1996.
- QIAO, J. X.; CHENEY, D. L.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A. M.; KING, S. R.; HE, K.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'Achieving Structural Diversity Using the Perpendicular Conformation of Alpha-Substituted Phenylcyclopropanes to Mimic the Bioactive Conformation of Ortho-Substituted Biphenyl P4 Moieties: Discovery of Novel, Highly Potent Inhibitors of Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 14, 4118-4123, 2008.
- QLAO, J. X.; CHANG, C. H.; CHENEY, D. L.; MORIN, P. E.; WANG, G. Z.; KING, S. R.; WANG, T. C.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y. S. 'SAR and X-Ray Structures of Enantiopure 1,2-Cis-(1r,2s)-Cyclopentylidiamine and Cyclohexylidiamine Derivatives as Inhibitors of Coagulation Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, No. 16, 4419-4427, 2007.
- QUAN, M. L.; LAM, P. Y. S.; HAN, Q.; PINTO, D. J. P.; HE, M. Y.; LI, R. H.; ELLIS, C. D.; CLARK, C. G.; TELEHA, C. A.; SUN, J. H.; ALEXANDER, R. S.; BAI, S.; LUETTGEN, J. M.; KNABB, R. M.; WONG, P. C.; WEXLER, R. R. 'Discovery of 1-(3'-Aminobenzisoxazol-5'-yl)-3-Trifluoromethyl-N- 2-Fluoro-4- (2'-Dime Thylaminomethyl)Imidazol-1-yl Phenyl -1h-Pyrazole-5-Carboxamide Hydrochloride (Razaxaban), a Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitor', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 6, 1729-1744, 2005.
- RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C., 'Evolutionary Tendency of Coumarin-Bearing Families in Angiospermae', *Quimica Nova*, v. 25, No. 4, 533-538, 2002.
- RIES, U. J.; PRIEPKE, H. W. M., 'Factor Xa Inhibitors – a Review of the Recent Patent Literature', *IDrugs*, v. 3, No. 12, 1509–1524, 2000.
- RIOS-STEINER, J. L.; MURAKAMI, M. T.; TULINSKY, A.; ARNI, R. K. 'Active and Exo-Site Inhibition of Human Factor Xa: Structure of Des-Gla Factor Xa Inhibited by Nap5, a Potent Nematode Anticoagulant Protein from *Ancylostoma Caninum*', *Journal of Molecular Biology*, v.371, No. 3, 774-786, 2007.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; DE ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. 'Extraction and Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from the Red Marine Alga *Halymenia Pseudofloresia*', *Revista Ciencia Agronomica*, v. 40, No. 2, 224-231, 2009.
- ROEHRIG, S.; STRAUB, A.; POHLMANN, J.; LAMPE, T.; PERNERSTORFER, J.; SCHLEMMER, K. H.; REINEMER, P.; PERZBORN, E. 'Discovery of the Novel Antithrombotic Agent 5-Chloro-N-((5s)-2-Oxo-3 4-(3-Oxomorpholin-4-yl)Phenyl -1,3-Oxazolidin- 5-yl)Methyl)Thiophene-2-Carboxamide (Bay 59-7939): An Oral, Direct Factor Xa Inhibitor', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.48, No. 19, 5900-5908, 2005.
- RUGGIERO, G.; PLATT, O.; VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S. 'Structures of (+/-)-Trans-4-(2,3-Dimethoxyphenyl)-(I) and (+)-Trans-4-(4-Methylphenyl)-2-Hydroxy-2-Methyl-3,4-Dihydro-2h,5h-Pyrano 3,2-C - 1 Benzopyran-5-One (II)', *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.45, 1740-1743, 1989.
- SAITOH, F.; NISHIDA, H.; MUKAIHIRA, T.; KOSUGA, N.; OHKOUCHI, M.; MATSUSUE, T.; SHIROMIZU, I.; HOSAKA, Y.; MATSUMOTO, M.; YAMAMOTO, I. 'Synthesis and Evaluation of 1-Arylsulfonyl-3-Piperazinone Derivatives as Factor Xa Inhibitors VI. A Series of New Derivatives Containing N,S- and N,So2-Spiro Acetal Scaffolds', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.55, No. 2, 317-323, 2007.
- SALONEN, L. M.; BUCHER, C.; BANNER, D. W.; HAAP, W.; MARY, J. L.; BENZ, J.; KUSTER, O.; SEILER, P.; SCHWEIZER, W. B.; DIEDERICH, F. 'Cation-Pi Interactions at the Active Site of Factor Xa: Dramatic Enhancement Upon Stepwise N-Alkylation of Ammonium Ions', *Angewandte Chemie-International Edition*, v.48, No. 4, 811-814, 2009.

- SAMAMA, M. M.; GEROTZAFAS, G. T. 'Newer Anticoagulants in 2009', *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 29, No. 1, 92-104, 2010.
- SAVELL, V. H.; VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S. 'Structures of (+/-)-Trans-4-(3-Nitrophenyl)- (I) and (+)-Trans-4-(4-Fluorophenyl)-2-Hydroxy-2-Methyl-3,4-Dihydro-2h,5h-Pyrano 3,2-C 1 Benzopyran-5-One(II)', *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.45, 1908-1911, 1989.
- SCHARER, K.; MORGENTHALER, M.; PAULINI, R.; OBST-SANDER, U.; BANNER, D. W.; SCHLATTER, D.; BENZ, J.; STIHLE, M.; DIEDERICH, F. 'Quantification of Cation-Pi Interactions in Protein-Ligand Complexes: Crystal-Structure Analysis of Factor Xa Bound to a Quaternary Ammonium Ion Ligand', *Angewandte Chemie-International Edition*, v.44, No. 28, 4400-4404, 2005.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. "On Size of Active Site in Proteases .I. Papain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27, no. 2, 157-62, 1967.
- SENA, T. S.; PINHEIRO FILHO, S. R.; ISA M. LYRA, I. M. 'Distúrbios Da Hemostasia Em Crianças Portadoras De Cardiopatias Congênitas', *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, No. 2, 149-154, 2010.
- SENG, H.; ONG, H.; ABD RAHMAN, R.; YAMIN, B.; TIEKINK, ER.T.; TAN, K.; MAAH, M.; CARACELLI, I.; NG, C. 'Factors Affecting Nucleolytic Efficiency of Some Ternary Metal Complexes with DNA Binding and Recognition Domains. Crystal and Molecular Structure of Zn(Phen)(Edda)', *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 102, No. 11, 1997-2011, 2008.
- SENG, H.; VON, S.; TAN, K.; MAAH, M.; NG, S.; RAHMAN, R.; CARACELLI, I.; NG, C.H., Crystal structure, DNA binding studies, nucleolytic property and topoisomerase I inhibition of zinc complex with 1,10-phenanthroline and 3-methyl-picolinic acid. *Biometals*, v. 23, n. 1, p. 99-118, 2010
- SENGER, S.; CONVERY, M. A.; CHAN, C. E.; WATSON, N. S. 'Arylsulfonamides: A Study of the Relationship between Activity and Conformational Preferences for a Series of Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 22, 5731-5735, 2006.
- SHETH, A. R.; BRENNESEEL, W. W.; YOUNG, V. G.; MULLER, F. X.; GRANT, D. J. W. 'Solid-State Properties of Warfarin Sodium 2-Propanol Solvate', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, No. 11, 2669-2680, 2004.
- SHETH, A. R.; YOUNG, V. G.; GRANT, D. J. W. 'Warfarin Sodium 2-Propanol Solvate', *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online*, v.58, m197-m199, 2002.
- SKORDALAKES, E.; ELGENDY, S.; GOODWIN, C. A.; GREEN, D.; SCULLY, M. F.; KAKKAR, V. V.; FREYSSINET, J. M.; DODSON, G.; DEADMAN, J. J. 'Bifunctional Peptide Boronate Inhibitors of Thrombin: Crystallographic Analysis of Inhibition Enhanced by Linkage to an Exosite 1 Binding Peptide', *Biochemistry* Vol. 37, No. 41, 14420-14427, 1998.
- SMITH, M. B.; CHRISTENSEN, N.; WANG, S. Q.; STROHECKER, J.; DAY, J. D.; WEISS, J. P.; CRANDALL, B. G.; OSBORN, J. S.; ANDERSON, J. L.; HORNE, B. D.; MUHLESTEIN, J. B.; LAPPE, D. L.; MOSS, H.; OLIVER, J.; VIAU, K.; BUNCH, T. J. 'Warfarin Knowledge in Patients with Atrial Fibrillation: Implications for Safety, Efficacy, and Education Strategies', *Cardiology*, v. 116, No. 1,
- SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, 2006.
- STROMICH, J. J.; WEBER, A. K.; MIRZAEI, Y. R.; CALDWELL, M. D.; LEWIS, D. E. 'New Adjuvants to Enhance Anticoagulant Activity of Warfarin', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, No. 6, 1928-1932, 2010.
- SUPER DRUG DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superdrug/>

- SUPER HAPTEN DATABASE: <http://bioinformatics.charite.de/superhaptent/>
- TREJO I., C. 'Anticoagulantes: Farmacología, Mecanismos De Acción Y Usos Clínicos / Anticoagulants: Pharmacology, Mechanisms of Action and Clinical Uses', *Cuadernos de cirugía - Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, Instituto de Cirugía.*, v. 18, No. 1, 83-90, 2004.
- VALENTE, E. J.; EGGLESTON, D. S.; SCHOMAKER, V. 'Structures of 5 Trans-2-Hydroxy and Trans-2-Methoxy-2-Methyl-3,4-Dihydro-4-Aryl-2h,5h-Pyrano 3,2-C Benzopyra N-5-Ones', *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, v.42, 1809-1813, 1986.
- VALENTE, E. J.; TRAGER, W. F.; JENSEN, L. H. 'Crystal and Molecular-Structure and Absolute-Configuration of (-)-(S)-Warfarin', *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, v.B 31, 954-960, 1975.
- VAN HUIS, C. A.; BIGGE, C. F.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; NARASIMHAN, L. S.; SCHAUM, R. P.; ZHANG, E.; BRYANT, J. W.; HAARER, S.; JANICZEK, N.; LEADLEY, R. J.; MCCLANAHAN, T.; PETERSON, J. T.; WELCH, K. M.; EDMUNDS, J. J. 'Structure-Based Drug Design of Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as a Novel Series of Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors', *Chemical Biology & Drug Design*, v. 69, No. 6, 444-450, 2007.
- VAN HUIS, C. A.; BIGGE, C. F.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; NARASIMHAN, L. S.; SCHAUM, R. P.; ZHANG, E.; BRYANT, J. W.; HAARER, S.; JANICZEK, N.; LEADLEY, R. J.; MCCLANAHAN, T.; PETERSON, J. T.; WELCH, K. M.; EDMUNDS, J. J. 'Structure-Based Drug Design of Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as a Novel Series of Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors', *Chemical Biology & Drug Design*, v.69, No. 6, 444-450, 2007.
- VAN HUIS, C. A.; CASIMIRO-GARCIA, A.; BIGGE, C. F.; CODY, W. L.; DUDLEY, D. A.; FILIPSKI, K. J.; HEEMSTRA, R. J.; KOHRT, J. T.; LEADLEY, R. J.; NARASIMHAN, L. S.; MCCLANAHAN, T.; MOCHALKIN, I.; PAMMENT, M.; PETERSON, J. T.; SAHASRABUDHE, V.; SCHAUM, R. P.; EDMUNDS, J. J. 'Exploration of 4,4-Disubstituted Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamides as Potent, Orally Active Factor Xa Inhibitors with Extended Duration of Action', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.17, No. 6, 2501-2511, 2009.
- VEGA-TEIJIDO, M.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuranyl- and 5-nitrothiophenyl-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 24, 349-355, 2006.
- VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. 'Improved Protein-Ligand Docking Using Gold', *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 52, No. 4, 609-623, 2003.
- VERHEUGT, F. W. A. 'The New Oral Anticoagulants', *Netherlands Heart Journal*, v. 18, No. 6, 314-318, 2010.
- VOET, D., AND J. G. VOET. *Biochemistry*. 3rd ed: John Wiley & Sons, 2004. 1616 p.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W., *Fundamentos de bioquímica*. Artmed: Porto Alegre, 2000; 931 p.
- WANG, S. X.; HUR, E.; SOUSA, C. A.; BRINEN, L.; SLIVKA, E. J.; FLETTERICK, R. J. 'The Extended Interactions and Gla Domain of Blood Coagulation Factor Xa', *Biochemistry*, v.42, No. 26, 7959-7966, 2003.
- WATSON, N. S.; BROWN, D.; CAMPBELL, M.; CHAN, C.; CHAUDRY, L.; CONVERY, W. A.; FENWICK, R.; HAMBLIN, J. N.; HASLAM, C.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KURTIS, C. L.; LEACH, A. R.; MANCHEE, G. R.; MASON, A. M.; MITCHELL, C.; PATEL, C.; PATEL, V. K.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; WESTON, H. E.; WHITWORTH, C.; YOUNG, R. J. 'Design and Synthesis of Orally Active Pyrrolidin-2-One-Based Factor Xa Inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 14, 3784-3788, 2006.

- WEI, A. Z.; ALEXANDER, R. S.; DUKE, J.; ROSS, H.; ROSENFELD, S. A.; CHANG, C. H. 'Unexpected Binding Mode of Tick Anticoagulant Peptide Complexed to Bovine Factor Xa', *Journal of Molecular Biology*, v.283, No. 1, 147-154, 1998.
- WONG, P. C.; PINTO, D. J. P.; KNABB, R. M. 'Nonpeptide Factor Xa Inhibitors: Dpc423, a Highly Potent and Orally Bioavailable Pyrazole Antithrombotic Agent', *Cardiovascular Drug Reviews*, v. 20, No. 2, 137-152, 2002.
- YE, B.; ARNAIZ, D. O.; CHOU, Y. L.; GRIEDEL, B. D.; KARANJAWALA, R.; LEE, W.; MORRISSEY, M. M.; SACCHI, K. L.; SAKATA, S. T.; SHAW, K. J.; WU, S. C.; ZHAO, Z. C.; ADLER, M.; CHEESEMAN, S.; DOLE, W. P.; EWING, J.; FITCH, R.; LENTZ, D.; LIANG, A.; LIGHT, D.; MORSER, J.; POST, J.; RUMENNIK, G.; SUBRAMANYAM, B.; SULLIVAN, M. E.; VERGONA, R.; WALTERS, J.; WANG, Y. X.; WHITE, K. A.; WHITLOW, M.; KOCHANNY, M. J. 'Thiophene-Anthranilamides as Highly Potent and Orally Available Factor Xa Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, No. 13, 2967-2980, 2007.
- YOUNG, R. J.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CAMPBELL, M.; CHAN, C.; CHARBAUT, M.; CHUNG, C. W.; CONVERY, M. A.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KLEANTHOS, S.; MASON, A. M.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A. N.; PINTO, I. L.; POLLARD, D. R.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E. 'Structure and Property Based Design of Factor Xa Inhibitors: Pyrrolidin-2-Ones with Biaryl P4 Motifs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 1, 23-27, 2008.
- YOUNG, R. J.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CAMPBELL, M.; CHAN, C.; CHARBAUT, M.; CONVERY, M. A.; DIALLO, H.; HORTENSE, E.; IRVING, W. R.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KLEANTHOS, S.; MASON, A. M.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A. N.; PINTO, I. L.; POLLARD, D. R.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E.; ZHOU, P. 'Structure and Property Based Design of Factor Xa Inhibitors: Biaryl Pyrrolidin-2-Ones Incorporating Basic Heterocyclic Motifs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, No. 1, 28-33, 2008.
- YOUNG, R. J.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CHAN, C.; CONVERY, M. A.; HUBBARD, J. A.; KELLY, H. A.; PATEMAN, A. J.; PATIKIS, A.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; TOOMEY, J. R.; WATSON, N. S.; ZHOU, P. 'Selective and Dual Action Orally Active Inhibitors of Thrombin and Factor Xa', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, No. 10, 2927-2930, 2007.
- YOUNG, R. J.; CAMPBELL, M.; BORTHWICK, A. D.; BROWN, D.; BURNS-KURTIS, C. L.; CHAN, C.; CONVERY, M. A.; CROWE, M. C.; DAYAL, S.; DIALLO, H.; KELLY, H. A.; KING, N. P.; KLEANTHOS, S.; MASON, A. M.; MORDAUNT, J. E.; PATEL, C.; PATEMAN, A. J.; SENGER, S.; SHAH, G. P.; SMITH, P. W.; WATSON, N. S.; WESTON, H. E.; ZHOU, P. 'Structure- and Property-Based Design of Factor Xa Inhibitors: Pyrrolidin-2-Ones with Acyclic Alanyl Amides as P4 Motifs', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.16, No. 23, 5953-5957, 2006.