

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Laís Barth Arend

ANÁLISE CONFORMACIONAL DO GMI-1070, UM MIMÉTICO DE SIALYL LEWIS^X

Porto Alegre
2021

Laís Barth Arend

ANÁLISE CONFORMACIONAL DO GMI-1070, UM MIMÉTICO DE SIALYL LEWIS^X

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Verli

Porto Alegre
2021

CIP - Catalogação na Publicação

Arend, Laís Barth

Análise Conformacional do GMI-1070, um Mimético de Sialyl Lewisx / Laís Barth Arend. -- 2021.

46 f.

Orientador: Hugo Verli.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. GMI-1070. 2. Sialyl Lewis. 3. Dinâmica Molecular. 4. ConfID. 5. Glicomimético. I. Verli, Hugo, orient. II. Título.

Laís Barth Arend

ANÁLISE CONFORMACIONAL DO GMI-1070, UM MIMÉTICO DE SIALYL LEWIS^X

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas, sendo aprovado em sua forma final pelo orientador e pela banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Hugo Verli

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. José Fernando Ruggiero Bachega

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Prof. Dr. Rodrigo Ligabue-Braun

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Porto Alegre, novembro de 2021

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Hugo Verli, por me receber no Grupo de Bioinformática Estrutural e me propor um projeto desafiador, que contribuiu imensamente para meu crescimento acadêmico e pessoal. Também gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, particularmente à Crisciele e ao João, que sempre me socorreram e sem os quais eu não teria conseguido concluir o presente trabalho. Naturalmente, estendo meus agradecimentos aos membros da banca, Rodrigo Ligabue-Braun e José Fernando Ruggiero Bachega, por dedicarem um pouco do seu tempo e conhecimento à minha formação.

Para além do respaldo que recebi da minha família - mãe, pai, avós, tios, irmão e prima - também pude contar com o apoio de muitas outras pessoas queridas: meus amorzinhos de sempre, Isabel, Anays, Sarah, Jéssica e Nadine, que me acompanham desde a infância; meu amigo e professor Guilherme, que me ensinou mais que qualquer um e sempre me amparou; minha amiga Luana, que plantou em mim a ideia de cursar Ciências Biológicas, até então abandonada nos silos da decepção acadêmica; meu amigo Júnior, com quem partilhei fofocas, café e cuidado mútuo ao longo da graduação; e minha namorada, Amira, com seus abraços e beijinhos e carinhos, que fazem eu me sentir segura e amada.

Por fim, também gostaria de agradecer ao Professor José Cláudio Fonseca Moreira, pelas várias oportunidades e incentivos que me concedeu ao longo da graduação, particularmente ao me introduzir aos fascínios da Bioquímica e permitir que eu explorasse a intersecção entre Arte e Biologia em um contexto acadêmico; e à coordenadora do Núcleo de Bioinformática do Instituto do Câncer Infantil, Marialva Sinigaglia, pela aprendizagem e estímulo intelectual acompanhados de acolhimento e compreensão.

Resumo

Adesão celular aberrante e extravasamento anormal de células da corrente sanguínea foram implicados em uma série de patologias, como tumores metastáticos, crises vaso-occlusivas decorrentes de anemia falciforme e doenças inflamatórias como um todo. Consequentemente, as selectinas representam um alvo terapêutico muito atraente, que vem sendo explorado há vários anos. Utilizando o sialyl Lewis^x (ligante natural dessas proteínas) como ponto de partida, inúmeros inibidores de selectina pré-organizados na conformação bioativa foram desenvolvidos. O GMI-1070, cuja análise conformacional constitui o tema do presente trabalho, é um desses inibidores. Apesar dos resultados desanimadores obtidos em testes clínicos e da consequente descontinuação dos experimentos com o GMI-1070 por parte da empresa responsável, esse composto segue sendo um tópico de estudo muito relevante. Tendo em vista sua capacidade de se ligar às três selectinas e seus resultados promissores em etapas pré-clínicas, a análise conformacional do GMI-1070 pode contribuir em grande medida para a otimização de novos candidatos. Lançando mão de simulações de dinâmica molecular e empregando a ferramenta confID, foi possível constatar que o GMI-1070 alcançou um excelente nível de pré-organização, superando inclusive a rigidez do ligante natural. Constatou-se também que uma das características mais peculiares do GMI-1070, um apêndice extremamente flexível que faz dele um ligante de Pan-selectina, interage com a porção mimética, contribuindo inesperadamente para a restrição conformacional observada. Para além dos resultados obtidos em relação ao GMI-1070, o presente trabalho também foi capaz de confirmar o comportamento do próprio sialyl Lewis^x, identificando as conformações relevantes adotadas por essa molécula em solução.

Palavras-chave: GMI-1070; Sialyl Lewis; Dinâmica molecular; ConfID; Glicomimético

Abstract

Aberrant cell adhesion and extravasation from the bloodstream have been implicated in a number of pathologies, such as metastatic cancer, vaso-occlusive crisis typical of sickle cell disease and inflammatory diseases as a whole. Consequently, the selectins represent a very attractive therapeutic target that has been explored for many years. Utilizing sialyl Lewis^x (the natural ligand of these proteins) as a starting point, many selectin inhibitors preorganized in the bioactive conformation have been developed. GMI-1070, which analysis constitutes the theme of the present work, is one of those inhibitors. In spite of its clinical failure and the consequent discontinuation of the tests involving GMI-1070 by the responsible company, this compound remains a relevant topic of research. Owing to its ability to bind all three selectins and its promising results in preclinical trials, GMI-1070's conformational analysis may contribute largely to the optimization of new candidates. Running long molecular dynamics simulations and employing the ConflD tool, it was possible to verify that GMI-1070 reached an excellent level of preorganization, surpassing the rigidity of the natural ligand. It was also verified that one of GMI-1070's most peculiar characteristics, an extremely flexible appendage that turns it into a Pan-selectin antagonist, interacts with the mimetic portion of the molecule, unexpectedly contributing to the observed conformational restriction. Apart from the results obtained in relation to GMI-1070, the present work was also able to confirm the behaviour of sialyl Lewis^x, identifying the most relevant conformations adopted by this molecule in solution.

Keywords: GMI-1070; Sialyl Lewis; Molecular dynamics; ConflD; Glycomimetics

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura bidimensional do GMI-1070.....	10
Figura 2. Desenho esquemático das selectinas.....	11
Figura 3. Rolamento de leucócitos ou células tumorais.....	12
Figura 4. Estrutura bidimensional do sLe ^x (Adaptado de Jin, 2020).....	13
Figura 5. Interação entre sLe ^x e E-selectina (Adaptado de Binder <i>et al.</i> , 2012).....	14
Figura 6. Linhagem do GMI-1070. Partindo do sLe ^x , diversas alterações estruturais foram implementadas no sentido de aumentar a afinidade entre ligantes e selectinas, até culminar no GMI-1070. O primeiro gráfico indica o ΔG associado com a ligação entre sLe ^x e E-selectina, assim como os termos entálpico e entrópico do ΔG, enquanto os gráficos subsequentes indicam a variação do ΔG e dos seus termos entálpico e entrópico a partir das alterações estruturais realizadas (Adaptado de Binder <i>et al.</i> , 2012).....	15
Figura 7. Alguns termos do campo de força GROMOS 53A6 GLYC: na primeira linha, estão representadas as interações não-ligadas, ou seja, a interação de Van der Waals e a interação eletrostática; nas linhas subsequentes, estão representadas as interações ligadas, ou seja, o estiramento da ligação entre dois átomos, a deformação do ângulo de ligação entre três átomos; a torção diedral e a deformação do diedro impróprio.....	17
Figura 8. Estrutura bidimensional do GMI-1070 indicando os grupos de carga utilizados na construção da topologia.....	20

Sumário

1. Introdução.....	10
1.1. GMI-1070.....	10
1.2. Selectinas.....	11
1.3. Sialyl Lewis.....	12
1.4. Desenvolvimento de inibidores de selectina.....	14
1.5. Dinâmica molecular.....	16
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos.....	19
4. Metodologia.....	20
4.1. Estruturas tridimensionais e construção de topologias.....	20
4.2. Dinâmica molecular.....	20
4.3. Definição dos diedros	21
4.4. Análise das trajetórias.....	21
5. Resultados e discussão.....	23
6. Conclusões.....	41
7. Perspectivas.....	42
Bibliografia.....	43

1. Introdução

1.1. GMI-1070

Adesão celular aberrante e extravasamento anormal de células da corrente sanguínea foram implicados em uma série de patologias, como tumores metastáticos [1]–[4], crises vaso-occlusivas decorrentes de anemia falciforme [5] e doenças inflamatórias como um todo [6]–[11]. Consequentemente, as selectinas representam um alvo terapêutico muito atraente, que vem sendo explorado há vários anos. Ao longo desses anos, diversos candidatos foram desenvolvidos de forma racional, sendo sucessivamente superados por novas moléculas otimizadas a partir da performance dos seus antecessores. Um desses candidatos é o GMI-1070 (Figura 1), cuja análise conformacional constitui o tema do presente trabalho.

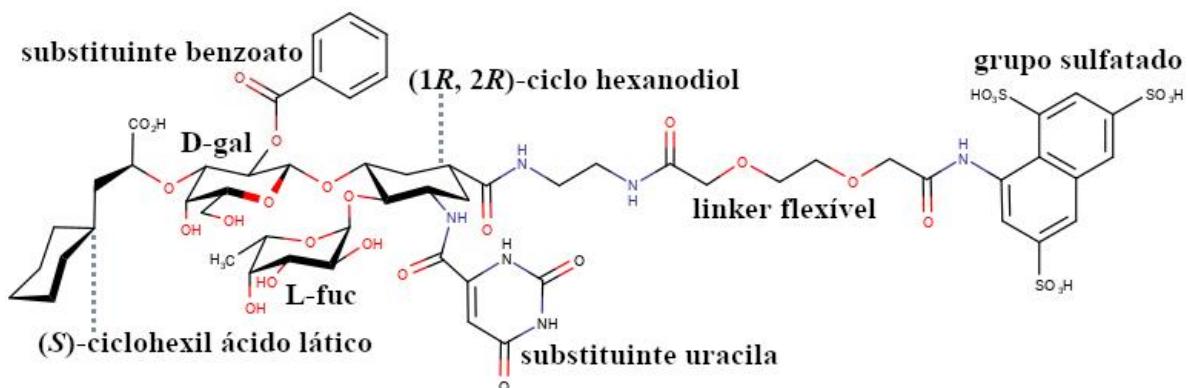


Figura 1. Estrutura bidimensional do GMI-1070.

Esse inibidor de Pan-selectina faz parte de uma longa linhagem de miméticos de sialyl Lewis^x e, tendo obtido uma série de resultados pré-clínicos promissores, acabou adquirindo status de carro-chefe do desenvolvimento de antagonistas de selectina. Entre outras coisas, o GMI-1070 se mostrou capaz de reverter vaso-oclusão aguda em modelos animais de anemia falciforme [12], bloquear adesão celular em linhagens celulares de leucemia mielóide [13] e prevenir ativação de integrina e captura de neutrófilos humanos *in vitro* [14]. Ele foi submetido a testes clínicos para o tratamento de crises vaso-occlusivas decorrentes de anemia falciforme [15], [16], mas acabou falhando na terceira etapa, tendo se mostrado incapaz de reduzir o tempo de internação e o uso de analgésicos opióides por pacientes com anemia falciforme hospitalizados.

Apesar desses resultados desanimadores e da consequente descontinuação dos experimentos com o GMI-1070 por parte da empresa responsável, esse ex-candidato segue sendo um tópico de estudo muito relevante, pois tal análise pode contribuir em grande medida para a otimização de novos candidatos: além de ter obtido resultados pré-clínicos promissores, o GMI-1070 é capaz de se ligar às

diferentes selectinas, uma habilidade que o distingue tanto de seus antecessores, quanto de seus sucessores em atual desenvolvimento.

1.2. Selectinas

As selectinas são uma subfamília de moléculas de adesão celular composta por três membros: E-selectina (CD62E), P-selectina (CD62P) e L-selectina (CD62L). Tendo sido descobertas em 1989, essas moléculas foram amplamente estudadas; sua função de adesão celular é muito bem descrita e sua estrutura primária é conhecida há décadas. Cada selectina apresenta um domínio de reconhecimento de carboidratos dependente de cálcio (CRD), um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (domínio EGF), uma série de domínios de repetição consenso (domínios CR), um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (Figura 2). Em se tratando do CRD e do domínio EGF, as três selectinas apresentam ~65% de alinhamento de sequência, ao passo que seus domínios CR, além de variar em número, apresentam apenas ~45% de alinhamento de sequência; já quanto à porção citoplasmática, as três proteínas exibem grande variabilidade entre si. A partir da elucidação da sua estrutura tridimensional por cristalografia de raios X, se sabe também que as selectinas assumem conformações muito semelhantes e podem assumir tanto uma configuração “dobrada” de baixa afinidade, quanto uma configuração “estendida”, de alta afinidade [17]–[20].

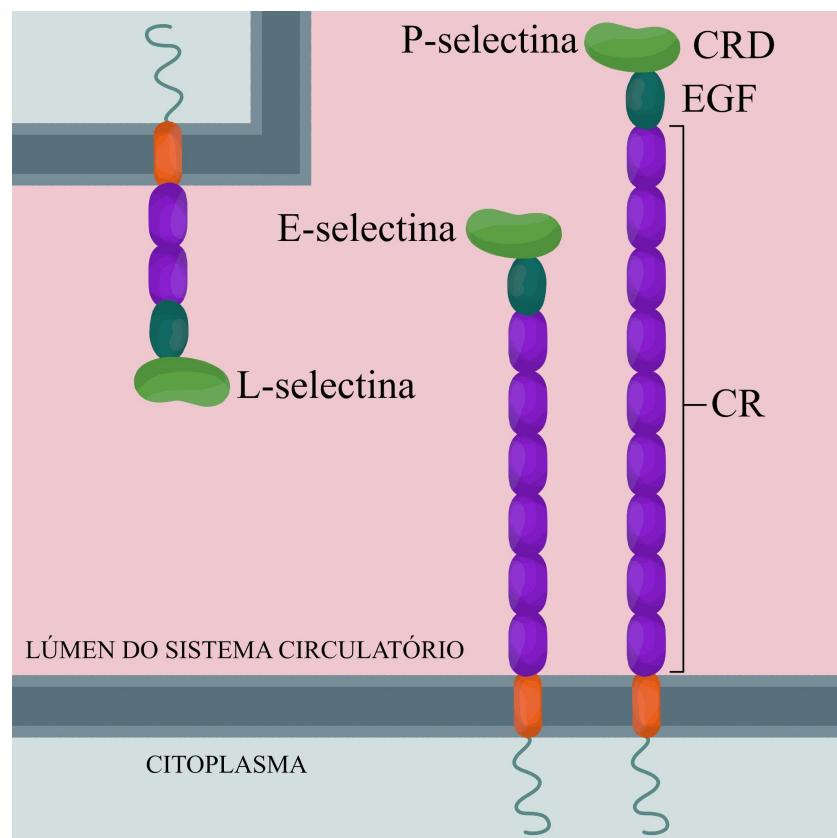


Figura 2. Desenho esquemático das selectinas.

As selectinas exibem padrões de expressão temporal e espacialmente distintos, ainda que sobrepostos. Em resposta ao estímulo inflamatório, as células endoteliais sintetizam E-selectina de novo, enquanto a P-selectina, até então armazenada em corpos de Weibel-palade, é transportada para a membrana; a P-selectina também é expressa em plaquetas ativadas, enquanto a L-selectina é exclusiva e constitutivamente expressa em leucócitos. Ao interagir com seus ligantes, O-glicanos, N-glicanos, glicoproteínas ou glicolipídeos presentes no glicocálix, as selectinas permitem a adesão dos tipos celulares supracitados uns com os outros ou com outras células presentes na corrente sanguínea. Por exemplo: é a interação entre as selectinas e seus ligantes que promove o rolamento de leucócitos ao longo do endotélio, fenômeno que precede a adesão firme mediada por outras moléculas e o subsequente extravasamento das células de defesa para o tecido subjacente. Por outro lado, esse mesmo mecanismo parece permitir a invasão de tecidos por células tumorais e o consequente estabelecimento de metástases (Figura 3) [1]–[4], [17], [18], [20].

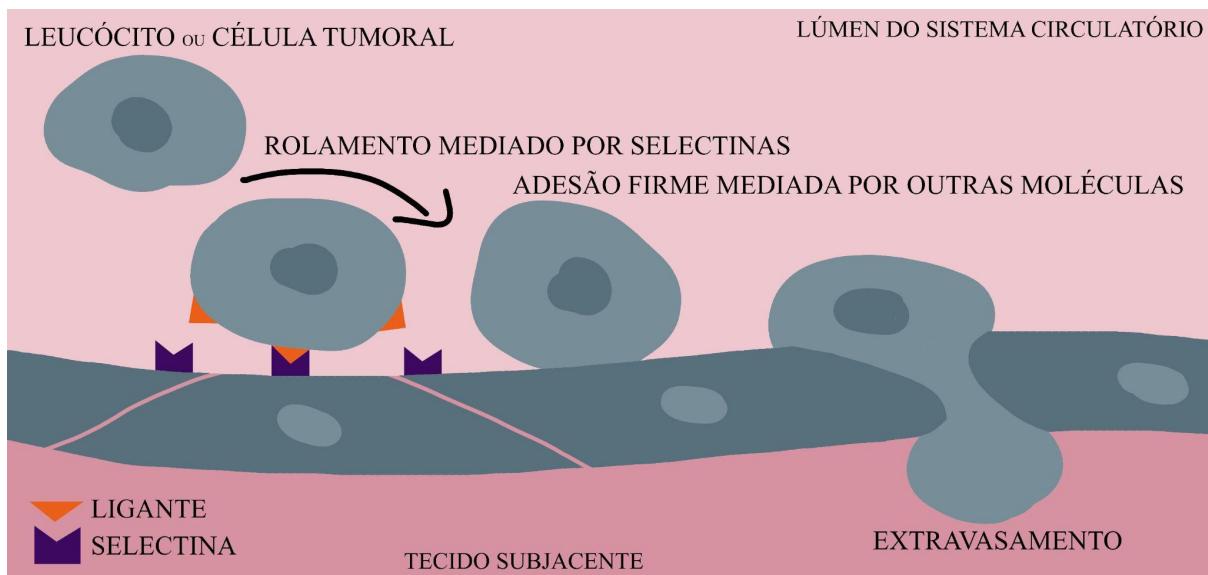


Figura 3. Rolamento de leucócitos ou células tumorais.

1.3. Sialyl Lewis

As três selectinas reconhecem um motivo em comum compartilhado por dois tetrassacarídeos que compõem os ligantes naturais dessa subfamília: o sialyl Lewis^x (Figura 4) e seu isômero, o sialyl Lewis^a. O motivo compartilhado por eles é composto por um ácido N-acetyl-D-neuramínico, uma D-galactose e uma L-fucose. Por conta de pequenas diferenças estruturais, a afinidade da ligação com o sialyl Lewis^x varia entre as três selectinas (0,3 a 1,1 mM para E-selectina, 6,8 a 8,8 mM para P-selectina e 3,3 a 4,5 mM para L-selectina), e já foi demonstrado que tanto a P-, quanto a L-selectina demandam uma interação adicional com um grupo sulfatado adjacente ao sialyl Lewis para que a ligação ocorra *in vivo*. Além disso, foi

observado que a interação entre as selectinas e o sialyl Lewis apresenta um comportamento de “catch-bond”, ou seja, quando as duas moléculas se ligam, a tensão aplicada pela corrente sanguínea ao complexo promove uma alteração estrutural nas selectinas que acarreta no aumento de afinidade [17], [19]–[24].

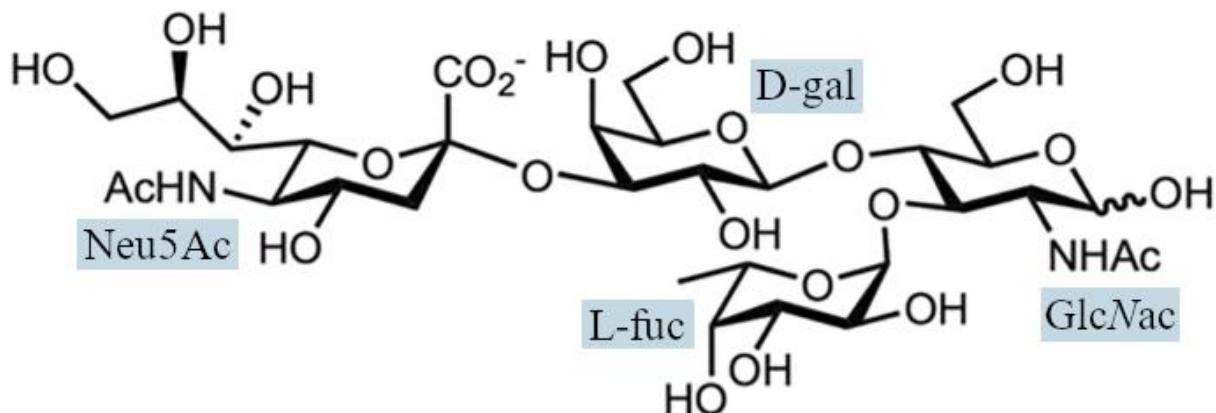


Figura 4. Estrutura bidimensional do sLe^x (Adaptado de Jin, 2020) [44].

Em função de resultados divergentes de espectroscopia por NMR, a conformação bioativa do sialyl Lewis^x foi objeto de debate ao longo de muitos anos [25]–[28]. Ela foi eventualmente confirmada através de análises cristalográficas, que demonstraram que a conformação bioativa do sialyl Lewis^x não varia entre os complexos disponíveis com as diferentes selectinas [29]. Esse tipo de análise revelou que o carboxilato do ácido N-acetil-D-neuramínico forma uma ponte salina com a proteína, enquanto as hidroxilas nas posições C3 e C4 da D-galactose estabelecem ligações de hidrogênio com ela; quanto à L-fucose, as hidroxilas nas posições C4 e C6 coordenam com um íon cálcio, ao passo que a hidroxila na posição C2 estabelece uma ligação de hidrogênio adicional com a proteína (Figura 5) [17], [20], [21], [24].

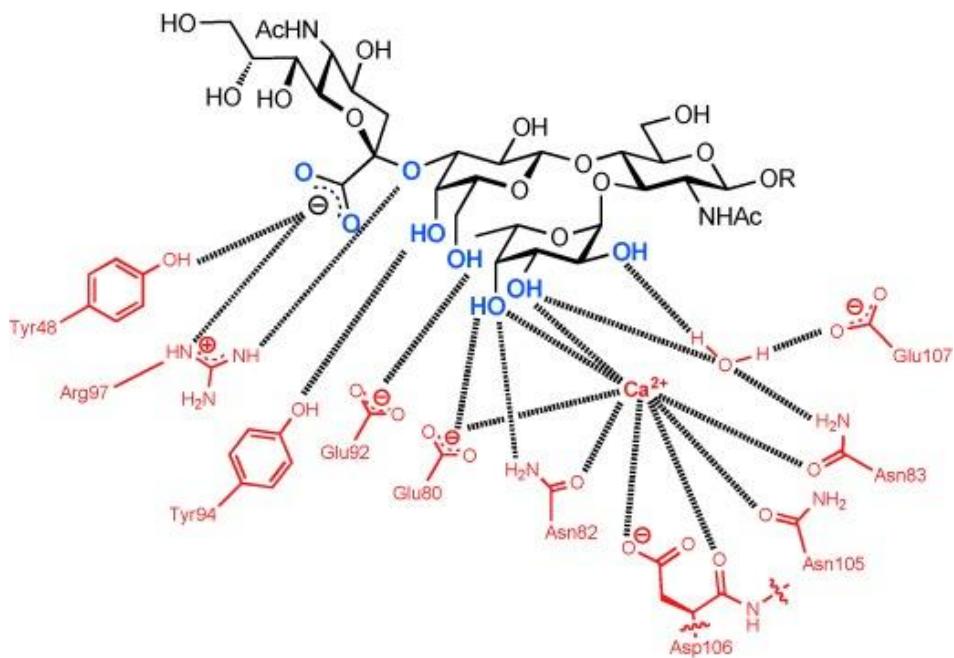


Figura 5. Interação entre sLe^x e E-selectina (Adaptado de Binder *et al.*, 2012) [23].

1.4. Desenvolvimento de inibidores de selectina

Em se tratando do desenvolvimento de inibidores de selectina, o desafio consiste em mimetizar a informação estrutural de um carboidrato funcional através de uma molécula que se comporte como um fármaco. Isso é desafiador não apenas pelas limitações farmacocinéticas inerentes aos carboidratos e seus derivados, mas também pela baixa afinidade que caracteriza a interação entre lectinas e seus ligantes [17], [18], [24].

Essa baixa afinidade é fruto da configuração do sítio ativo, que é raso e completamente exposto ao solvente, de modo que apenas alguns grupos funcionais conseguem interagir com a proteína, e o fazem sob a interferência do solvente. Termodinamicamente falando, a ligação entre selectina e sialyl Lewis é propulsada exclusivamente pelo termo entrópico da variação de energia livre, ao passo que as interações estabelecidas entre farmacóforos e aminoácidos contribuem estritamente para a especificidade da ligação e não garantem um termo entálpico favorável. A favorabilidade do termo entrópico é garantida pela pré-organização do ligante em sua conformação bioativa, por meio de forças intramoleculares que já foram exploradas através de espectroscopia por NMR com auxílio de ferramentas computacionais [21], [24], [30]–[35]. Essa pré-organização permite que a redução mínima dos graus de liberdade associados à translação, rotação e conformação do ligante seja compensada pela liberação das moléculas de água a ele associadas. Adicionalmente, a pré-organização também permite que a interação aconteça dentro de uma janela de tempo muito pequena, o que é indispensável para que o complexo se forme no fluxo da corrente sanguínea.

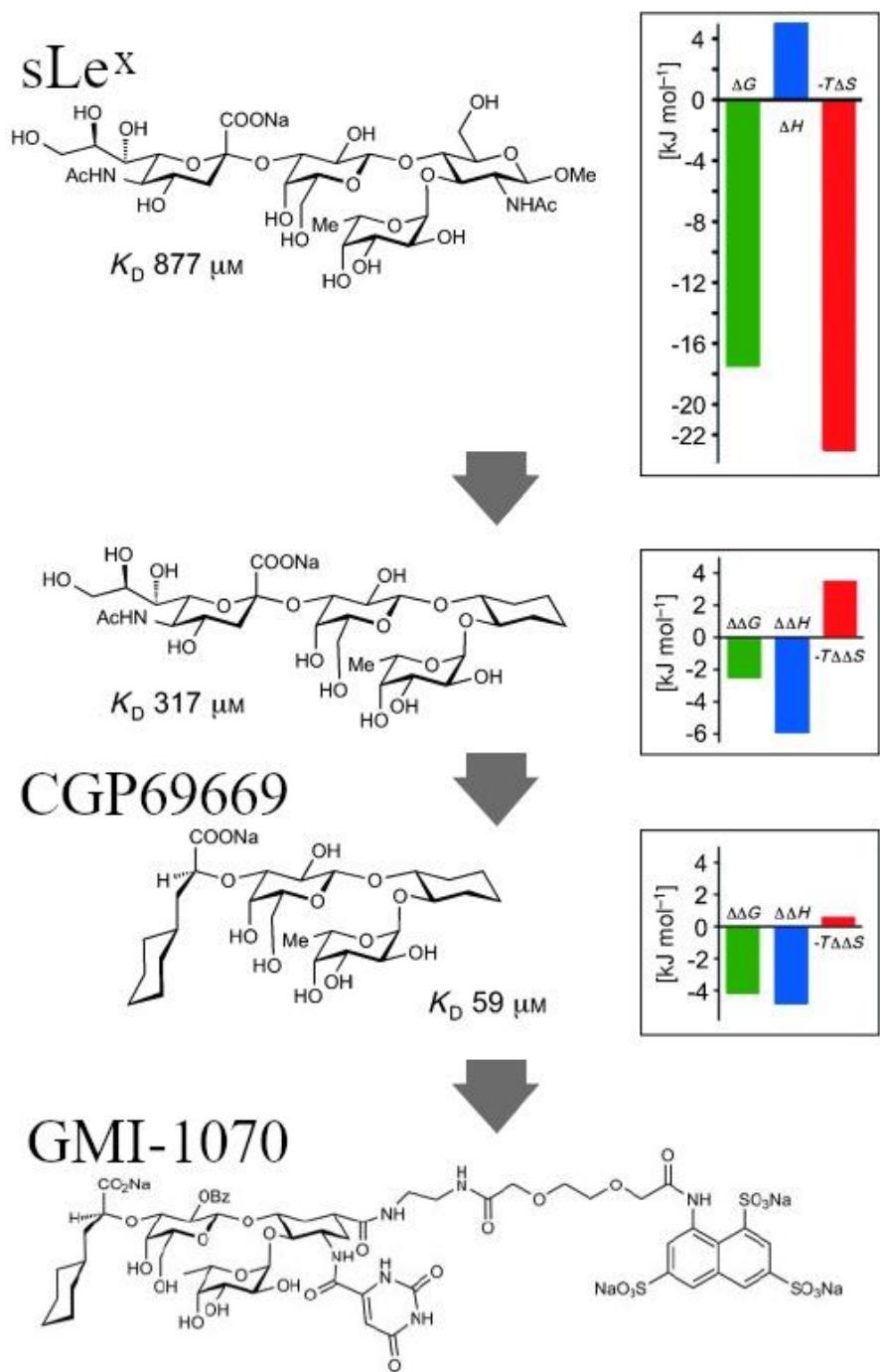


Figura 6. Linhagem do GMI-1070. Partindo do $s\text{Le}^x$, diversas alterações estruturais foram implementadas no sentido de aumentar a afinidade entre ligantes e selectinas, até culminar no GMI-1070. O primeiro gráfico indica o ΔG associado com a ligação entre $s\text{Le}^x$ e E-selectina, assim como os termos entálpico e entrópico do ΔG , enquanto os gráficos subsequentes indicam a variação do ΔG e dos seus termos entálpico e entrópico a partir das alterações estruturais realizadas (Adaptado de Binder *et al.*, 2012) [23].

Tendo isso em mente, foi adotada uma estratégia que culminou no desenvolvimento de inúmeros inibidores de selectina, o GMI-1070 entre eles (Figura 6): utilizando o sialyl Lewis^x como ponto de partida, muitos compostos foram desenvolvidos e testados até que o CGP69669 foi selecionado e se tornou o composto líder a partir do qual o GMI-1070 foi construído. A qualidade desse líder é atribuída à substituição de carboidratos meramente estruturais (ou seja, carboidratos que não portam farmacóforos) por miméticos menos polares, uma medida que tornou o termo entálpico da variação de energia livre menos desfavorável. Subsequentemente, a adição de um substituinte equatorial ao mímico da N-acetilglicosamina e a adição de um benzoato à posição C2 da D-galactose aumentaram a contribuição do termo entrópico ao otimizar a pré-organização do mimético. Por fim, a inserção de um grupo sulfatado que se conecta ao mimético por um *linker* longo e flexível fez do GMI-1070 um antagonista de Pan-selectina [21], [24], [36].

1.5. Dinâmica molecular

A análise conformacional do sialyl Lewis^x e do GMI-1070 foram realizadas a partir de longas simulações de dinâmica molecular utilizando o pacote GROMACS [37] e o campo de força GROMOS 53A6 GLYC [38]. A dinâmica molecular permite simular o movimento de uma molécula, garantindo a obtenção de modelos muito mais próximos da realidade biológica. Nesse tipo de simulação, o deslocamento de cada átomo é descrito a partir da equação de movimento relacionada à Segunda Lei de Newton, de modo que cada átomo precisa estar associado a uma massa e a uma força. Essa força resulta do somatório das diversas forças intra ou intermoleculares às quais o átomo em questão está submetido por conta de estiramento de ligações, deformação de ângulos de ligação, torção de diedros, interações não-covalentes etc. Cada uma dessas forças é definida a partir de uma equação, que é calibrada para reproduzir de forma fidedigna o comportamento daquela ligação, ângulo ou diedro em particular, e o conjunto dessas equações é denominado campo de força [39]. O GROMOS 53A6 GLYC, utilizado no presente trabalho, é um campo de força desenvolvido e otimizado para a simulação do movimento de carboidratos, permitindo o estudo dessas moléculas estruturalmente complexas cujo comportamento escapa muitas vezes às técnicas experimentais [38]. Na Figura 7, estão representados alguns termos do campo de força utilizado.

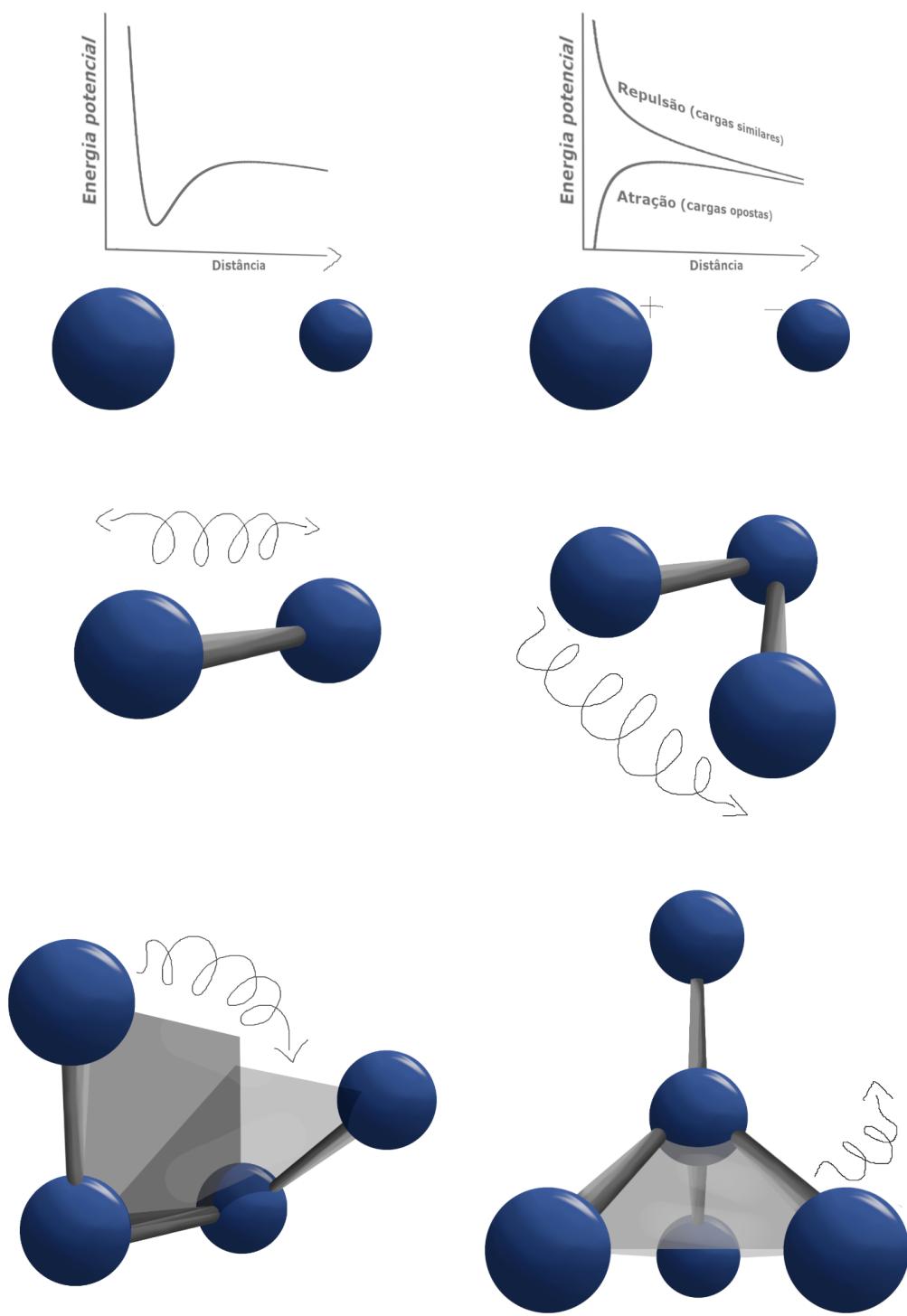


Figura 7. Alguns termos do campo de força GROMOS 53A6 GLYC: na primeira linha, estão representadas as interações não-ligadas, ou seja, a interação de Van der Waals e a interação eletrostática; na linhas subsequentes, estão representadas as interações ligadas, ou seja, o estiramento da ligação entre dois átomos, a deformação do ângulo de ligação entre três átomos; a torção diedral e a deformação do diedro impróprio.

2. Justificativa

Como previamente apontado, o GMI-1070 segue sendo um tópico de estudo muito relevante. Apesar dos resultados desanimadores na terceira etapa dos testes clínicos para o tratamento de crises vaso-occlusivas decorrentes de anemia falciforme e da consequente descontinuação dos experimentos com o GMI-1070 por parte da empresa responsável, esse ex-candidato não é de modo algum obsoleto no âmbito da exploração científica. Por conta de seu sucesso pré-clínico e da sua capacidade de se ligar às diferentes selectinas, o GMI-1070 constitui uma importante fonte de informação que pode contribuir para a otimização de novos inibidores de Pan-selectina. Sua característica mais peculiar é o *linker* longo e flexível que conecta o grupo sulfatado ao mimético e confere ao GMI-1070 a capacidade de se ligar aos diferentes membros da subfamília. Portanto, para além de acessar a suposta pré-organização do GMI-1070 em sua conformação bioativa, o presente trabalho permitirá a compreensão do comportamento deste apêndice extremamente flexível, assim como o seu impacto sobre a conformação do GMI-1070 e sobre a eficiência desta molécula enquanto um antagonista de Pan-selectina.

3. Objetivos

O presente trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de inibidores de selectina através da elucidação do comportamento em solução do GMI-1070. Mais especificamente, lançando mão de simulações de dinâmica molecular e empregando a ferramenta confID, pretende-se:

1. confirmar o comportamento do próprio sialyl Lewis^x, identificando as conformações relevantes adotadas por essa molécula em solução;
2. avaliar o nível de pré-organização do GMI-1070;
3. avaliar o comportamento da haste flexível e seu impacto na conformação da porção mimética do GMI-1070.

4. Metodologia

4.1. Estruturas tridimensionais e construção de topologias

A estrutura tridimensional do sialyl Lewis^x foi obtida no *Protein Data Bank*, complexada com a E-selectina e com o cofator Ca²⁺ [29], enquanto a estrutura tridimensional do GMI-1070 foi construída no Avogadro [40]. No pymol [41], o sialyl Lewis^x foi extraído do complexo e os ângulos diedrais do GMI-1070 foram modificados, de modo que a conformação da porção mimética correspondesse à conformação bioativa do ligante.

As topologias foram construídas de acordo com os parâmetros disponíveis para o campo de força GROMOS 53A6 GLYC [38]. Quando os parâmetros disponíveis não davam conta de descrever acuradamente os anéis aromáticos presentes no GMI-1070, recorreu-se à publicação de Polêto *et al.* [42]: a porção glicídica (D-galactose e L-fucose), o substituinte uracila e as inúmeras ligações peptídicas, que compõem o *linker* flexível e conectam o substituinte uracila ao (1*R*, 2*R*)-ciclo hexanodiol (mímico da GlcNAc) e o substituinte benzoato à D-galactose, já haviam sido parametrizados para o campo de força utilizado; por outro lado, os parâmetros para o substituinte benzoato e o grupo sulfatado negativamente carregado foram encontrados na publicação posterior de Polêto *et al.* [42]. A Figura 8 representa a estrutura bidimensional do GMI-1070, indicando os grupos de carga utilizados na construção da topologia.

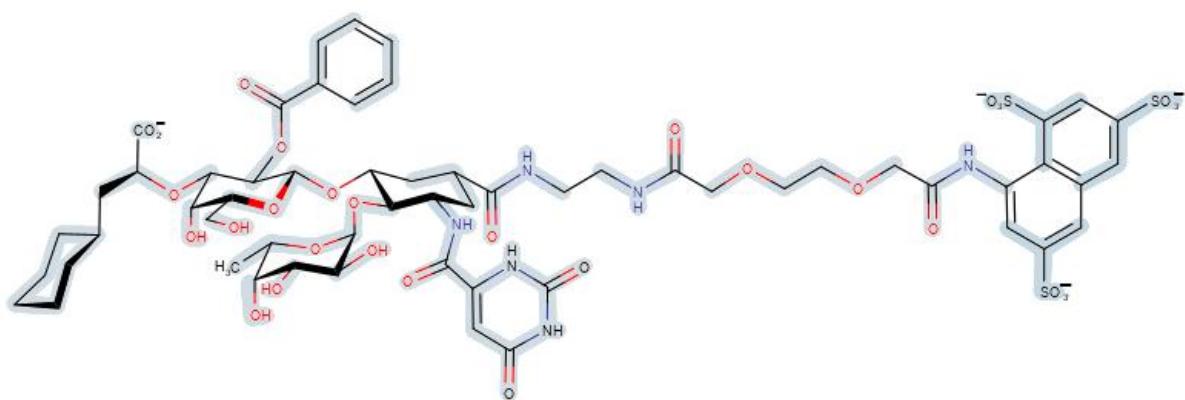


Figura 8. Estrutura bidimensional do GMI-1070, indicando os grupos de carga utilizados na construção da topologia.

4.2. Dinâmica molecular

No presente trabalho, utilizou-se o pacote GROMACS [37] e o campo de força GROMOS 53A6 GLYC [38]; todas as simulações se deram dentro de uma caixa dodecaédrica, sob condições periódicas de contorno, utilizando o modelo de água SPC/E. Antes de rodar as simulações, os sistemas foram neutralizados pela

substituição do número necessário de moléculas de solvente por íons Na^+ e a minimização de energia foi realizada pelo algoritmo de máximo declive. Na sequência, realizou-se uma simulação de dinâmica molecular de 1 μs para cada molécula, com as coordenadas sendo escritas no arquivo da trajetória comprimida a cada 2ps. Depois disso, 50 simulações de dinâmica molecular de 1 μs foram realizadas para o GMI-1070 no supercomputador Santos Dumont, pertencente ao Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC/MCTI, Brasil). As 50 trajetórias produzidas foram subsequentemente concatenadas para produzir uma única trajetória de 50 μs .

4.3. Definição dos diedros

De acordo com as normas da IUPAC, os ângulos diedrais Φ e Ψ do sialyl Lewis^x foram definidos como O6-C2-O2-C'3 e C2-O2-C'3-C'2, respectivamente, para a ligação glicosídica Neu5Ac(2 \rightarrow 3)Gal; O5-C1-O1-C'4 e C1-O1-C'4-C'3, respectivamente, para a ligação glicosídica Gal(1 \rightarrow 4)GlcNac e O5-C1-O1-C'3 e C1-O1-C'3-C'2, respectivamente, para a ligação glicosídica Fuc(1 \rightarrow 3)GlcNac. Os diedros correspondentes no GMI-1070 foram nomeados da mesma forma para facilitar comparações (ainda que o Neu5Ac e a GlcNac tenham sido substituídos por mímicos) e definidos de modo a corresponder geometricamente aos diedros do sialyl Lewis^x. A única exceção foi o Neu5Ac(2 \rightarrow 3)Gal Φ : como o átomo correspondente ao O6 do Neu5Ac consiste em um hidrogênio apolar, que não é explicitado no campo de força utilizado, utilizou-se o átomo correspondente ao C1 do Neu5Ac para definir o diedro em questão.

4.4. Análise das trajetórias

A partir das trajetórias produzidas e utilizando recursos do pacote GROMACS [37], os ângulos diedrais de interesse foram analisados: sua variação em função do tempo, assim como a sua distribuição foram plotados; o valor médio e o desvio padrão também foram obtidos. Os gráficos foram utilizados como *input* para o confID, um método analítico para a caracterização das populações conformacionais de pequenas moléculas [43]. Essa ferramenta permite a identificação das conformações mais relevantes e suas respectivas frequências, distinguindo-as de intermediários de transição. Além disso, o confID produz uma rede na qual as conformações identificadas e as interconversões entre elas podem ser claramente visualizadas. Como o GMI-1070 é uma molécula complexa, foi necessário analisar a porção mimética e o *linker* flexível separadamente: em um primeiro momento, o confID foi rodado utilizando apenas os diedros Neu5Ac(2 \rightarrow 3)Gal Φ e Ψ , Gal(1 \rightarrow 4)GlcNac Φ e Ψ e Fuc(1 \rightarrow 3)GlcNac Φ e Ψ como *input*, no sentido de avaliar o nível de pré-organização do GMI-1070; na sequência, foram incorporados à análise os diedros cuja torção determina a posição do substituinte benzoato, do substituinte uracila e do ciclohexano pertencente ao (S)-ciclohexil ácido láctico, no sentido de confirmar a presença de interações previstas pelo *design* dessa

molécula. Por fim, o confID foi rodado utilizando apenas os diedros cuja torção determina a posição do grupo sulfatado negativamente carregado.

Com o objetivo de detectar os mínimos de energia e visualizar a exploração do espaço conformacional, também realizou-se análise de componente principal (PCA), utilizando novamente recursos do pacote GROMACS.

5. Resultados e discussão

Os resultados e a discussão estão organizados na forma de um artigo científico estruturado de acordo com as normas do periódico *Carbohydrate Research*.

Conformational analysis of GMI-1070, a sialyl Lewis^x mimetic

Laís B. Arend ¹ and Hugo Verli ¹

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves, 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

Abstract

When it comes to the treatment of pathologies in which aberrant cell adhesion and extravasation from the bloodstream have been implicated, the selectins represent a central therapeutic target. The present work dedicates itself to the conformational analysis of two selectin ligands: the natural ligand sialyl Lewis^x and its mimetic GMI-1070. The employment of long molecular dynamics simulations and ConflID (an analytical method for the characterization of conformational populations of small molecules) enabled the identification of the most relevant conformations assumed by sialyl Lewis^x and GMI-1070 in solution. Overall, the results reflect the predicted behavior of both molecules, with some minor exceptions in the case of GMI-1070, which could point to optimizations for novel Pan-selectin antagonists.

Keywords

GMI-1070; Sialyl Lewis; Molecular dynamics simulation; ConflID; Glycomimetic

1. Introduction

Aberrant cell adhesion and extravasation from the bloodstream have been implicated in a number of pathologies, such as metastatic cancer [1]–[4], vaso-occlusive crisis typical of sickle cell disease [5] and inflammatory diseases as a whole [6]–[10]. Consequently, when it comes to the treatment of such pathologies, the interaction between selectins and their ligands present an important topic of research [11].

The selectins are a subfamily of cell adhesion molecules that belong to the group of C-type mammalian lectins [12]. The three members of the subfamily, E-selectin (CD62E), P-selectin (CD62P) and L-selectin (CD62L) are closely related, being composed of a calcium-dependent carbohydrate recognition domain (CRD), an epidermal growth factor (EGF)-like domain, a series of consensus repeats (CR) domains, a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail. In terms of CRD and EGF-like domain, the selectins show ~65% sequence identity, while their CR domains, besides varying in numbers, show only ~45% sequence identity. Their cytoplasmic tail shows conversely very little similarity. Additionally, they display distinct but overlapping patterns of expression: E-selectin is synthesized *de novo* on endothelial cells by means of inflammatory stimulation; P-selectin is expressed on activated platelets and is stored in Weibel-palade bodies in endothelial cells, being carried to the membrane upon activation, and L-selectin is constitutively expressed on leukocytes [11], [13], [14]. Through the binding to their ligands, the selectins promote the first and transient interaction between the above-mentioned cell types among themselves or with other cells flowing in the bloodstream. Among other things, this interaction enables the tethering and rolling of leukocytes along the endothelium, before they can firmly adhere to its surface and extravasate to the underlying tissue.

All three selectins bind a common motif shared by sialyl Lewis^x and its isomer, sialyl Lewis^a, two tetrasaccharides found in the natural ligands of each selectin. The common motif in question is composed of a N-acetyl-D-neuraminic acid, a D-galactose and a L-fucose.

Owing to small structural differences, the binding affinity to sialyl Lewis varies among the members of the subfamily (0.3 to 1.1 mM for E-selectin, 6.8 to 8.8 mM for P-selectin and 3.3 to 4.5 mM for L-selectin) and it has been shown that P and L-selectins require an additional interaction with an adjacent sulfated negatively charged group for the binding to occur *in vivo*. Another noteworthy point is the catch-bond behavior of this interaction [15] enabled by an extended high-affinity conformation assumed by the selectins upon ligand-binding under the tensile force of the blood flow [16], [17]. The bioactive conformation of sialyl Lewis^x has been subjected to debate, owing to different NMR spectroscopy results [18]–[21], but was confirmed by crystallography analysis [22], and does not vary among the available complexes. This kind of analysis has revealed that the carboxylate of the N-acetyl-D-neuraminic acid forms a salt bridge to the protein, while the hydroxyl groups in C3 and C4 of the D-galactose establish hydrogen bonds with it; as for the L-fucose, the hydroxyl groups in C4 and C6 coordinate with calcium, whereas the hydroxyl group in C2 establishes an additional hydrogen bond with the protein [11], [14], [23], [24].

Regarding the development of drugs that target selectins (preventing their binding to their natural ligands and the abnormal consequences thereof), the challenge consists of mimicking the structural information of a functional carbohydrate by means of a compound that behaves like a drug. This is challenging because of the inherent pharmacokinetic limitations of carbohydrates and their derivatives and, more specifically, because of the characteristically low binding affinity between lectins and their ligands [11], [13], [24]. This low affinity has its roots in the binding site configuration: it is shallow and exposed to the solvent, so that only some functional groups of the ligand are able to interact with the protein, doing so under the interference of the solvent. Thermodynamically speaking, this interaction is exclusively propelled by the entropic term of the binding free energy, through the release of bound water molecules that compensates for the reduction in translational, rotational and conformational degrees of freedom, while the interactions established by the pharmacophores contribute strictly to the specificity of the interaction. This phenomenon is only made possible by the preorganization of the ligand by means of intramolecular interactions that have been explored by NMR spectroscopy with the aid of computational tools [23]–[30]. Additionally, the fact that the binding occurs in the flow of the bloodstream also requires the preorganization of the ligand, since there is just a fleeting time window for it to occur.

Thus a strategy was adopted in the 1990s by Ernst and his collaborators that led to the discovery of numerous selectin antagonists, the GMI-1070 being one of them: using sialyl Lewis^x as a starting point, many compounds were tested until CGP69669 was selected and became the lead compound from which GMI-1070 was developed. The quality of this leader is attributed to the substitution of merely structural sugars (that is, sugars that did not carry pharmacophores) for less polar mimics, a measure that made the enthalpic term of the binding free energy less unfavorable. Subsequently, the addition of an equatorial substituent to the N-acetylglucosamine mimic and the addition of an benzoate substituent to the C2 of D-galactose raised the entropic term contribution by optimizing the preorganization of the mimetic. Lastly, the insertion of an sulfated negatively charged group, that connects to the core through a flexible linker, made of GMI-1070 a Pan-selectin antagonist [23], [24], [31].

Among other things, GMI-1070 has been shown to block cell adhesion of acute myelogenous leukemia cell lines [32]; reverse acute vascular occlusions in sickle cell mice

[33] and prevent integrin activation and arrest of human neutrophils [34]. The drug has been submitted to clinical trials for the treatment of vaso-occlusive crisis due to sickle cell disease [35], [36], and progressed until the third phase, when it failed to reduce the length of hospital stay and the use of opioid painkillers by hospitalized sickle cell disease patients. The results of those trials are yet to be published, and the exploration of GMI-1070 for the treatment of this pathology has been discontinued.

In spite of this discontinuation, GMI-1070 is in no way obsolete in the realm of scientific exploration. Because of its preclinical success and its ability to bind all three selectins, GMI-1070 constitutes an important source of information that may help in the optimization of new Pan-selectin inhibitors. Its most peculiar feature is its flexible linker, which connects the sulfated negatively charged group to the core and turns it into a Pan-selectin antagonist. Besides assessing the supposed preorganization of GMI-1070's core in its bioactive conformation, the present work aims at understanding the behaviour of this extremely flexible appendage, as well as the impact of such peculiar feature on the conformation of GMI-1070's core and its efficiency as a Pan-selectin antagonist.

Additionally, the present work may also contribute to the elucidation of sialyl Lewis^x behavior in solution: in spite of its preorganization, sialyl Lewis^x has been assumed to be a mixture of conformers in solution, presenting a significant variation of reported glycosidic torsion angles; the link between N-acetyl-D-neuraminic acid and D-galactose has been considered the flexible portion of the molecule, while the rest of it is taken to be quite rigid, not varying among the different configurations [24]. The identification of those configurations may however be better served through the tools employed here, expressedly longer molecular dynamics simulations and the use of confID, an analytical method for the characterization of conformational populations of small molecules.

2. Materials and Methods

2.1. Three-dimensional structure and topology construction

The three-dimensional structure of sialyl Lewis^x was downloaded from the Protein Data Bank complexed with E-selectin and its Ca²⁺ cofactor [22], while the three-dimensional structure of GMI-1070 was built in Avogadro [37]. In PyMol [38], sialyl Lewis^x was extracted from the complex and the dihedral angles of GMI-1070 were modified to match sialyl Lewis's conformation.

The topologies were built according to the available parameters for GROMOS 53A6 GLYC force field [39], resorting to the publication by Polêto et al. [40] as a source of new parameters that could more accurately describe the aromatic rings present in GMI-1070. This molecule is composed of previously parameterized moieties (Fig. 1): the glycidic portion (D-galactose and L-fucose), the uracil substituent and the many peptide bonds that compose the flexible linker and connect the uracil and benzoate substituents to (1*R*, 2*R*)-cyclohexane diol (GlcNAc mimic) and D-galactose respectively had already been parameterized for GROMOS 53A6 GLYC force field. On the other hand, the parameters for the benzoate substituent and the sulfated negatively charged group connected to the core through the flexible linker were obtained from the posterior publication by Polêto et al. [40]. Fig. 1

represents the two dimensional structure of GMI-1070, indicating the charge group partitioning utilized in the topology construction.

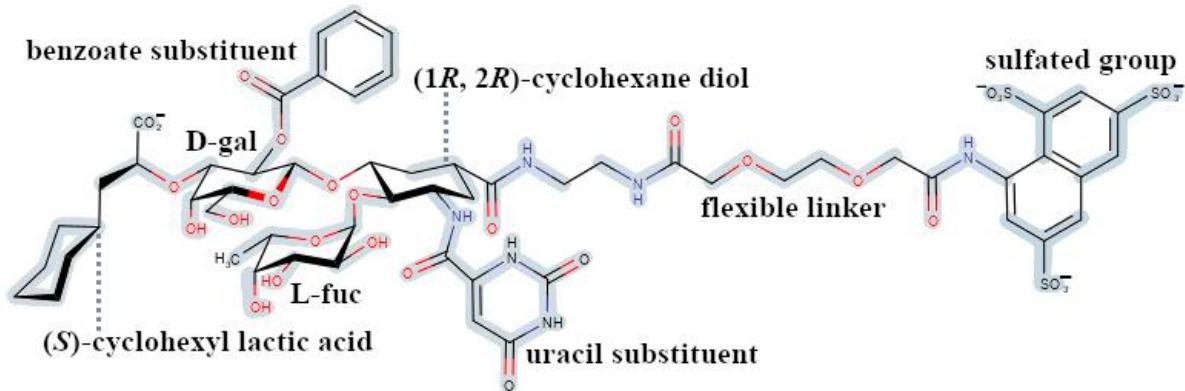


Fig. 1. GMI-1070's two dimensional structure indicating the charge group partitioning utilized in the topology construction.

2.2. Molecular dynamics of sialyl Lewis and GMI-1070

Then, the molecular dynamics were carried out in GROMOS 53A6 GLYC force field [39], using the GROMACS simulation suite [41]. They took place inside a dodecahedral box, under periodic boundary conditions, utilizing SPC/E water model as solvent. The system was neutralized by the substitution of the necessary number of solvent molecules for Na^+ ions and energy minimization was carried out by steepest descent method with a hundred steps. This preparation was followed by $1\mu\text{s}$ long molecular dynamics simulations, coordinates being written every 2ps to the compressed trajectory file. After that, 50 $1\mu\text{s}$ long molecular dynamics simulations were run for GMI-1070 utilizing the Santos Dumont supercomputer, run by the National Laboratory for Scientific Computing (LNCC/MCTI, Brazil), and the produced trajectories were concatenated to produce a single $50\mu\text{s}$ long trajectory.

2.3. Definition of dihedral angles

In accordance with IUPAC, the Φ and Ψ glycosidic torsion angles in sialyl Lewis^x were defined as O6-C2-O2-C'3 and C2-O2-C'3-C'2, respectively, for Neu5Ac(2→3)Gal; O5-C1-O1-C'4 and C1-O1-C'4-C'3, respectively, for Gal(1→4)GlcNac and O5-C1-O1-C'3 and C1-O1-C'3-C'2, respectively, for Fuc(1→3)GlcNac. The corresponding torsion angles in GMI-1070 were named in the same way to facilitate comparisons (even though Neu5Ac and GlcNac have been substituted by mimics) and were defined so as to geometrically correspond to sialyl Lewis's glycosidic torsion angles. The only exception was Neu5Ac(2→3)Gal Φ , in which case the corresponding atom to Neu5Ac's O6 consisted of an apolar hydrogen, which is not made explicit in the employed force field, so that the corresponding atom to Neu5Ac's C1 had to be utilized instead to define the torsion angle in question.

2.4. Trajectory analysis

From the produced trajectories and utilizing resources of the GROMACS package [41], the dihedral angles of interest were analyzed: their variations as a function of time, as well as their distributions were plotted; the mean values and standard deviations were also obtained. The plots were utilized as inputs for confID, an analytical method for the characterization of conformational populations of small molecules [42]. This tool enables the identification of the most relevant conformations and their respective frequencies of occurrence, distinguishing them from transition intermediates. Furthermore, it produces a network in which the identified conformations and their interconversions can be visualized. Principal component analysis was also performed from the produced trajectories, for the generation of heatmaps, utilizing resources of the GROMACS package [41].

3. Results and discussion

3.1. Sialyl Lewis^x

When it comes to sialyl Lewis^x, we were able to identify four relevant conformations, which varied mainly in relation to torsion angle Neu5Ac(2→3)Gal Φ, reflecting its trimodal distribution. The network produced by confID is represented in Fig. 2, which highlights the identified conformations and their respective frequencies as well as their similarity with the bioactive conformation. The prevalent conformation showed a populational frequency of 95% and a RMSD in relation to sialyl Lewis^x's bioactive conformation of 0.816; the second most abundant conformation showed a populational frequency of 5% and a RMSD in relation to sialyl Lewis^x's bioactive conformation of 0.887, while the third showed a populational frequency of 3% and a RMSD in relation to sialyl Lewis^x's bioactive conformation of 0.958. As for the less frequent conformation, which varied in relation to torsion angle Gal(1→4)GlcNac Φ when compared to the other three, it showed a populational frequency of 2% and a RMSD in relation to sialyl Lewis^x's bioactive conformation of 2.194. These results reflect the well-established preorganization of sialyl Lewis^x, and confirm what has been previously observed following the structural analysis of this tetrasaccharide by NMR spectroscopy and shorter molecular dynamics simulations [23]–[30], namely that D-galactose and L-fucose are mostly kept in place, while the Neu5Ac(2→3)Gal glycosidic bond lets Neu5Ac free to assume multiple orientations. The accordance between our results and the previously reported results from experimental as well as computational analysis indicate that the employed methods are able to accurately describe the behaviour of the small molecules in question.

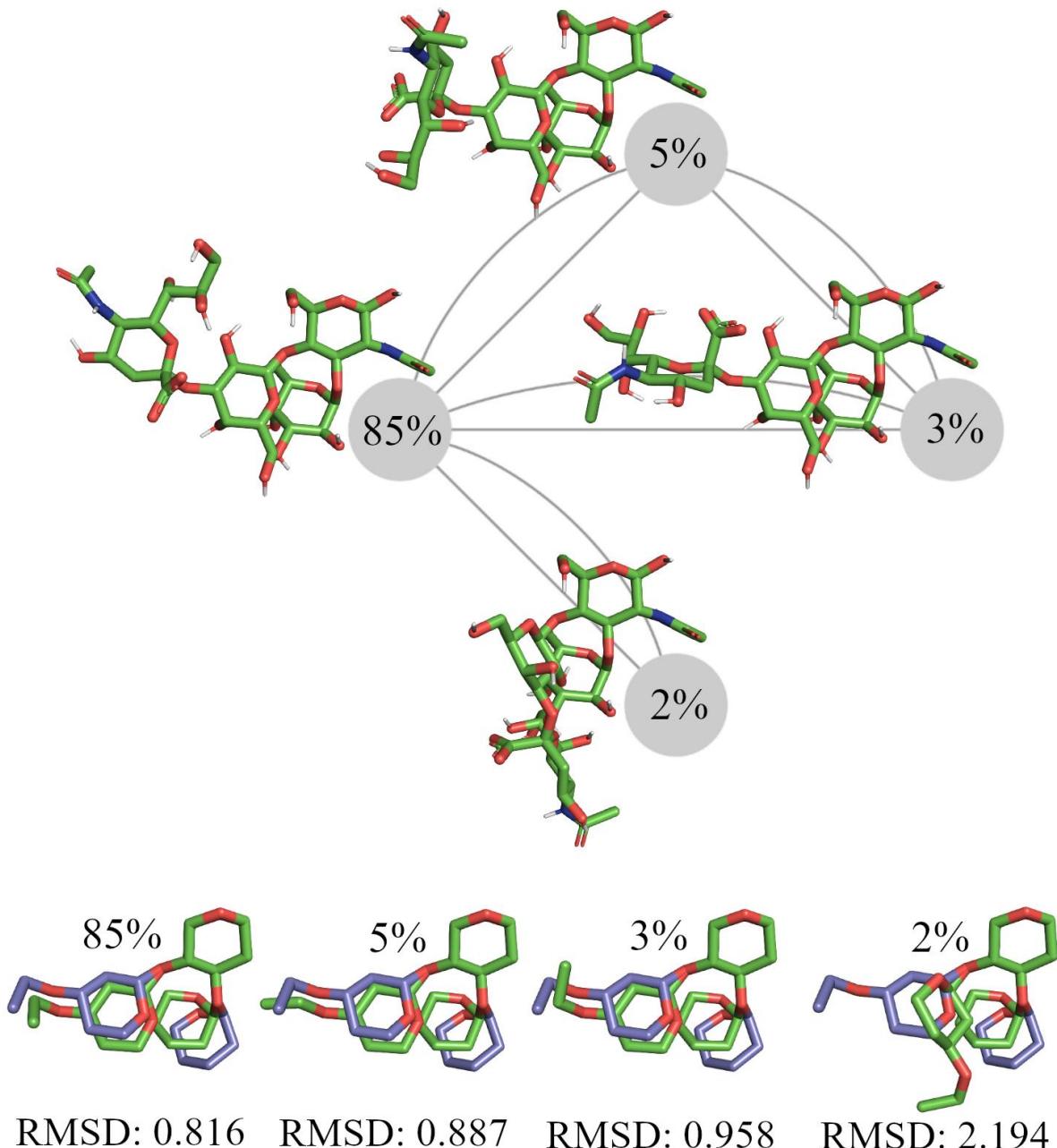


Fig. 2. Network produced by confID for sialyl Lewis^x highlighting the identified conformations and their respective frequencies as well as their similarity with the bioactive conformation.

3.2.1. GMI-1070: mimetic portion

GMI-1070's development aimed not only at the mimicry of sialyl Lewis's structural information but also at the optimization of the ligand's preorganization in its bioactive conformation. This optimization implies conformational restriction, which should raise the entropic term's contribution to the binding free energy, increasing the affinity between mimetic and its targets. The analysis of the dihedral angles that compose GMI-1070's mimetic portion - and which torsion determines the relative position of the pharmacophores -

evidence an overall increase in rigidity in comparison with sialyl Lewis^x, as shown in Fig. 3. and Table 1. The only exception to this increased rigidity seems to be torsion angle Fuc(1→3)GlcNac Ψ , with an bimodal distribution (for the concatenated 50μs long trajectory) and a higher standard deviation when compared to the corresponding glycosidic torsion angle of sialyl Lewis^x (for the 1 μs long trajectory as well as the concatenated 50μs long trajectory).

Table 1

Standard deviation for torsion angles Gal(1→4)GlcNac Φ and Ψ , Neu5Ac(2→3)Gal Φ and Ψ and Fuc(1→3)GlcNac Φ and Ψ obtained from the analysis of each trajectory.

	sialyl Lewisx (1μs)	GMI-1070 (1μs)	GMI-1070 (50μs)
Neu5Ac(2→3)Gal Φ	51.7	36.8	35.3
Neu5Ac(2→3)Gal Ψ	21.4	10.9	11.6
Gal(1→4)GlcNac Φ	34.2	9.1	9.8
Gal(1→4)GlcNac Ψ	8.8	8.7	9.4
Fuc(1→3)GlcNac Φ	15.9	10.1	11.5
Fuc(1→3)GlcNac Ψ	7.8	13.3	20.6

Considering only GMI-1070's mimetic portion (that is, using only the plots shown in Fig. 3 as an inputs for confID), we identified two relevant conformations, which varied only in relation to torsion angle Neu5Ac(2→3)Gal Φ , reflecting its bimodal distribution. The prevalent conformation showed a populational frequency of 93% and a RMSD in relation to sialyl Lewis^x's bioactive conformation of 0.701, while the less abundant conformation showed a populational frequency of 1% and a RMSD in relation to sialyl Lewis^x's bioactive conformation of 0.807 (Fig. 4). Including the dihedral angles which torsion determines the relative orientation of the benzoate substituent, the uracil substituent and the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid (Neu5Ac mimic) in the analysis, enabled the identification of 40 relevant conformations, 4 of them showing a population frequency of at least 1%. These 4 conformations varied in relation to the orientation of the uracil substituent and of the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid. Fig. 5 presents on the left a network of all identified conformations and their interconversions in which the 4 prevalent conformations and their populational frequencies have been highlighted; on the right, the figure represents the superposition of the 4 conformations in question.

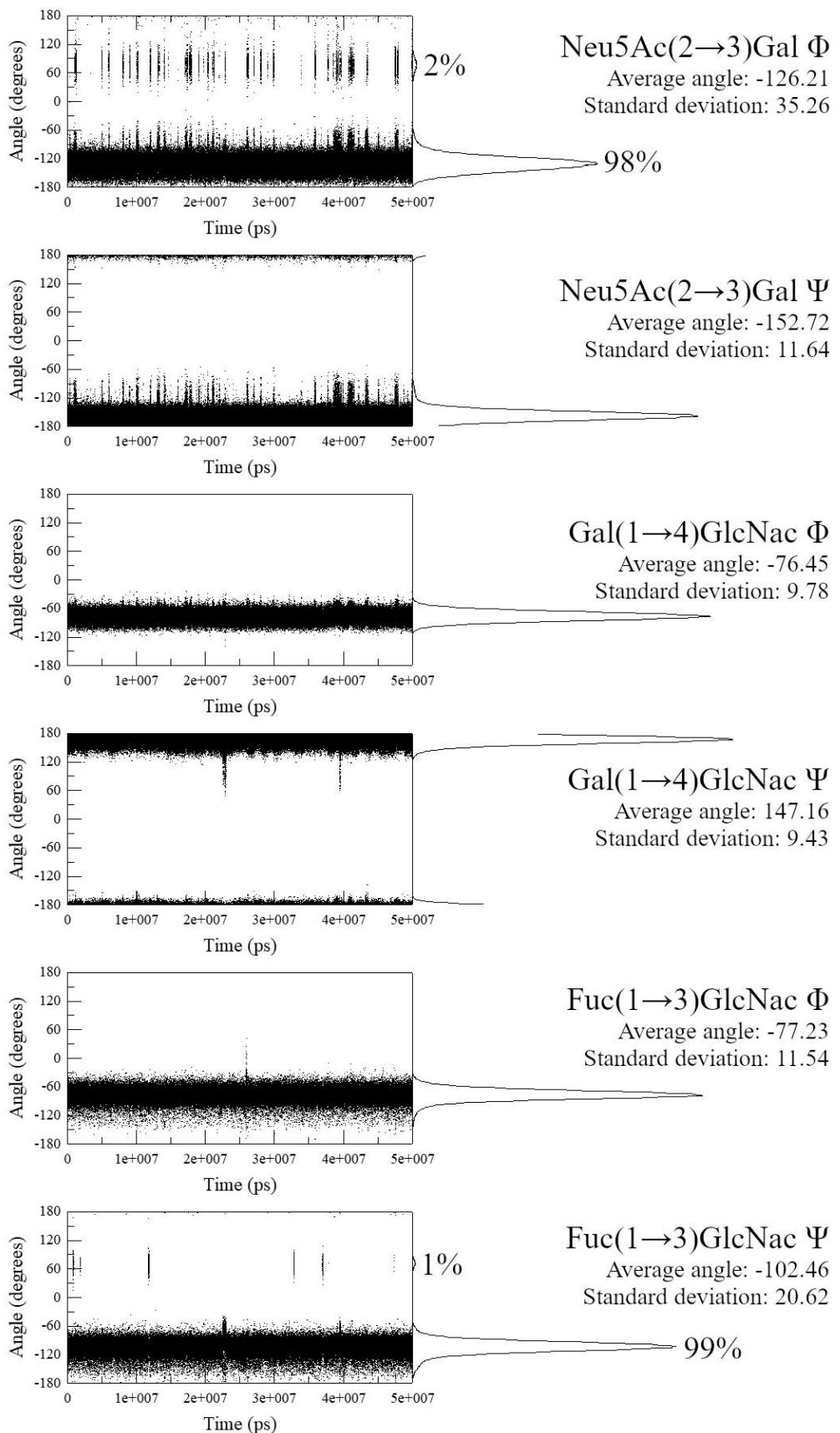


Fig. 3. Variation as a function of time, distribution, average angle and standard deviation for the dihedrals that compose GMI-1070's mimetic portion.

These results indicate an overall improvement of the ligand's preorganization in its bioactive conformation, particularly when it comes to the torsion angle Neu5Ac(2→3)Gal Φ , but the intramolecular force responsible for this conformational restriction seems to deviate from the predicted by GMI-1070's design: the addition of the benzoate substituent to the C2 of D-galactose has been shown to increase the sialyl Lewis^x mimetics's preorganization by establishing a $\sigma\text{-}\pi$ interaction with the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid [24], but this interaction is absent from the prevalent conformations that emerged in the simulation. Apart from that, the exceptional behavior of torsion angle Fuc(1→3)GlcNAc Ψ may be attributed to disruption of the intramolecular forces which have been shown to stabilize sialyl Lewis^x, namely the hydrophobic interaction between the L-fucose and β -face of the D-galactose and the nonconventional C-H · · · O hydrogen bond between H-C(5) of L-fucose and O(5) of D-galactose [24].

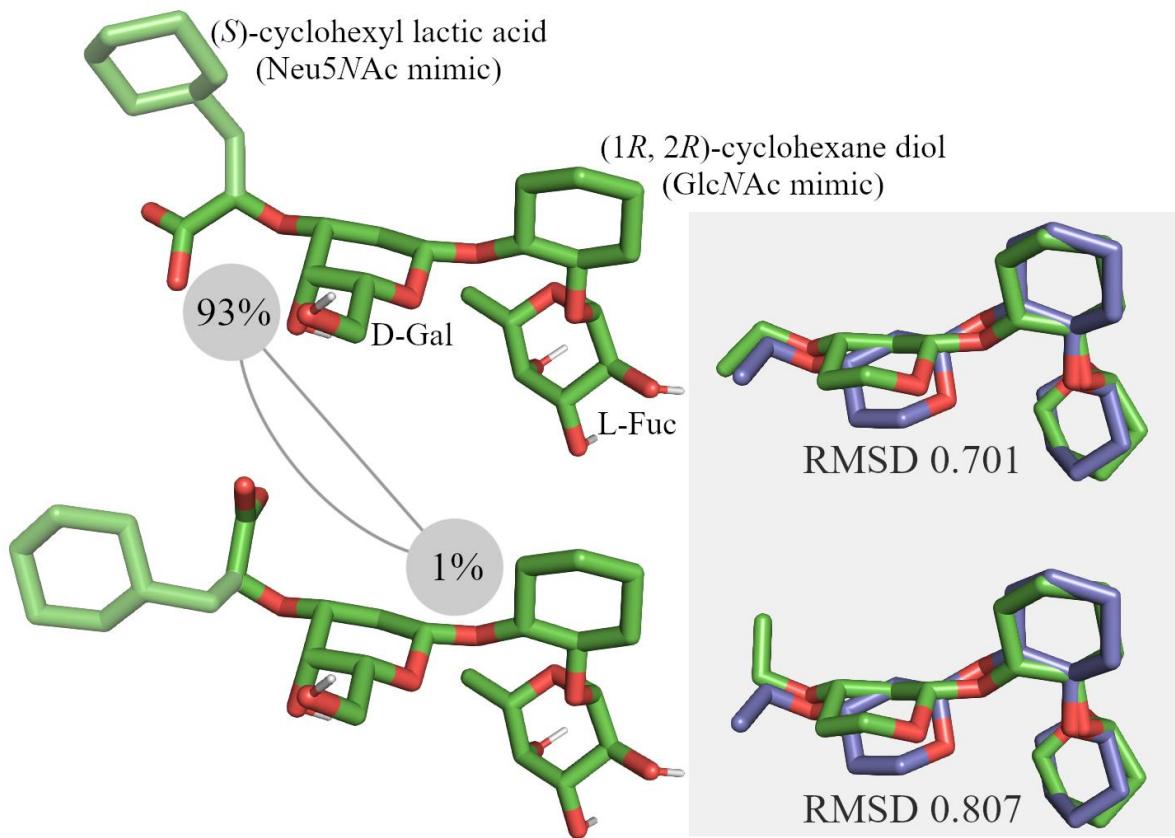


Fig. 4. Network produced by confID for GMI-1070's mimetic portion, highlighting the identified conformations and their respective frequencies as well as their similarity with the bioactive conformation.

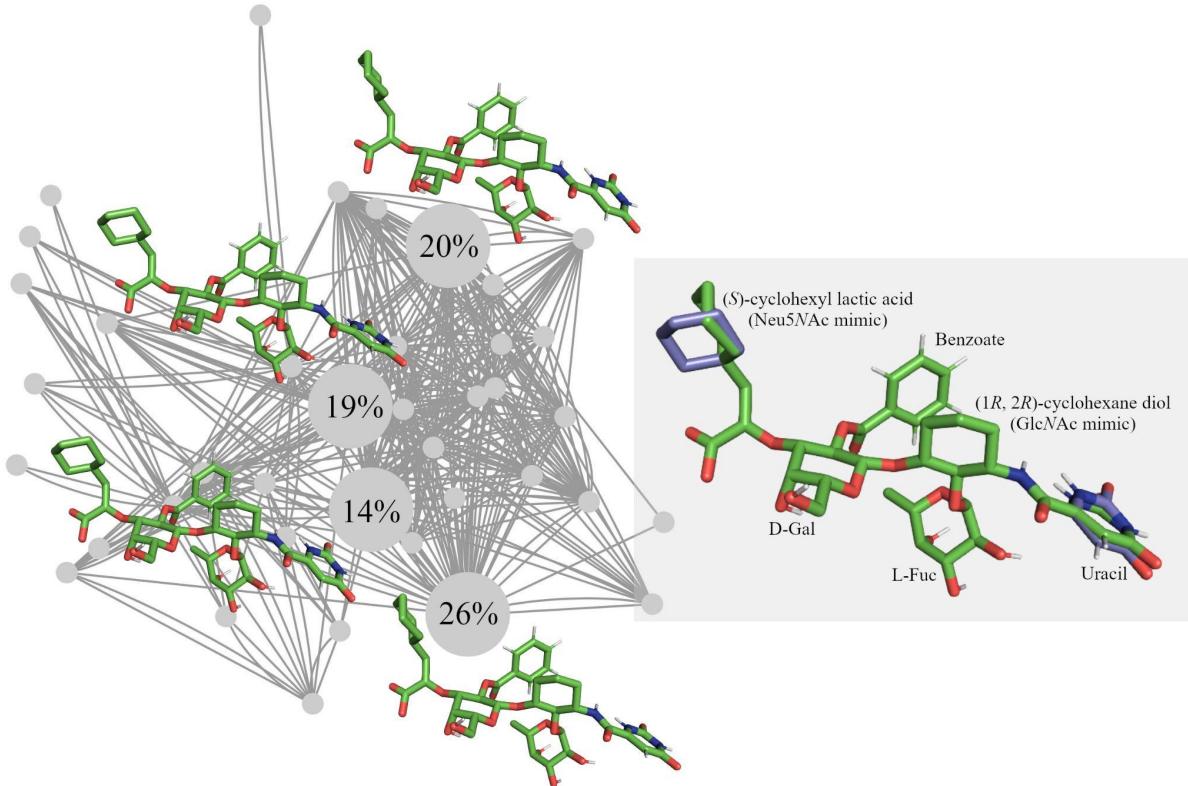


Fig. 5. Network produced by confID for GMI-1070's mimetic portion including the dihedral angles which torsion determines the relative orientation of the benzoate substituent, the uracil substituent and the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid (Neu5Ac mimic) in the analysis, highlighting the identified conformations and their superposition to each other.

3.2.2. GMI-1070: flexible linker

Considering only GMI-1070's flexible linker (that is, using only the dihedral angles which torsion determines the position of the sulfated negatively charged group in relation to the rest of the molecule as inputs for confID), we identified 1622 relevant conformations. 14 of these conformations showed a population frequency of at least 1%, and the variation among them can be attributed mainly to the rotation of the four dihedral angles indicated in Fig. 6. Measuring the distance between the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid and the sulfated negatively charged group along a 1 μ s long trajectory has evidenced a recurrent proximity, which seems to be responsible for the conformational restriction of torsion angle Neu5Ac(2→3)Gal Φ , as shown in Fig. 7. These results indicate that, in spite of its own flexibility, the flexible linker seems to contribute to the conformational restriction observed for the rest of the molecule through its interaction with the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid, rendering the addition of the benzoate substituent possibly superfluous. The importance of this interaction is also evidenced in Fig. 8, which depicts the PCA results for the whole molecule in the form of a heatmap, indicating the conformations associated with the lowest energy regions as well as their similarity to the bioactive conformation. The two principal components correspond together to 92% of the total motion.

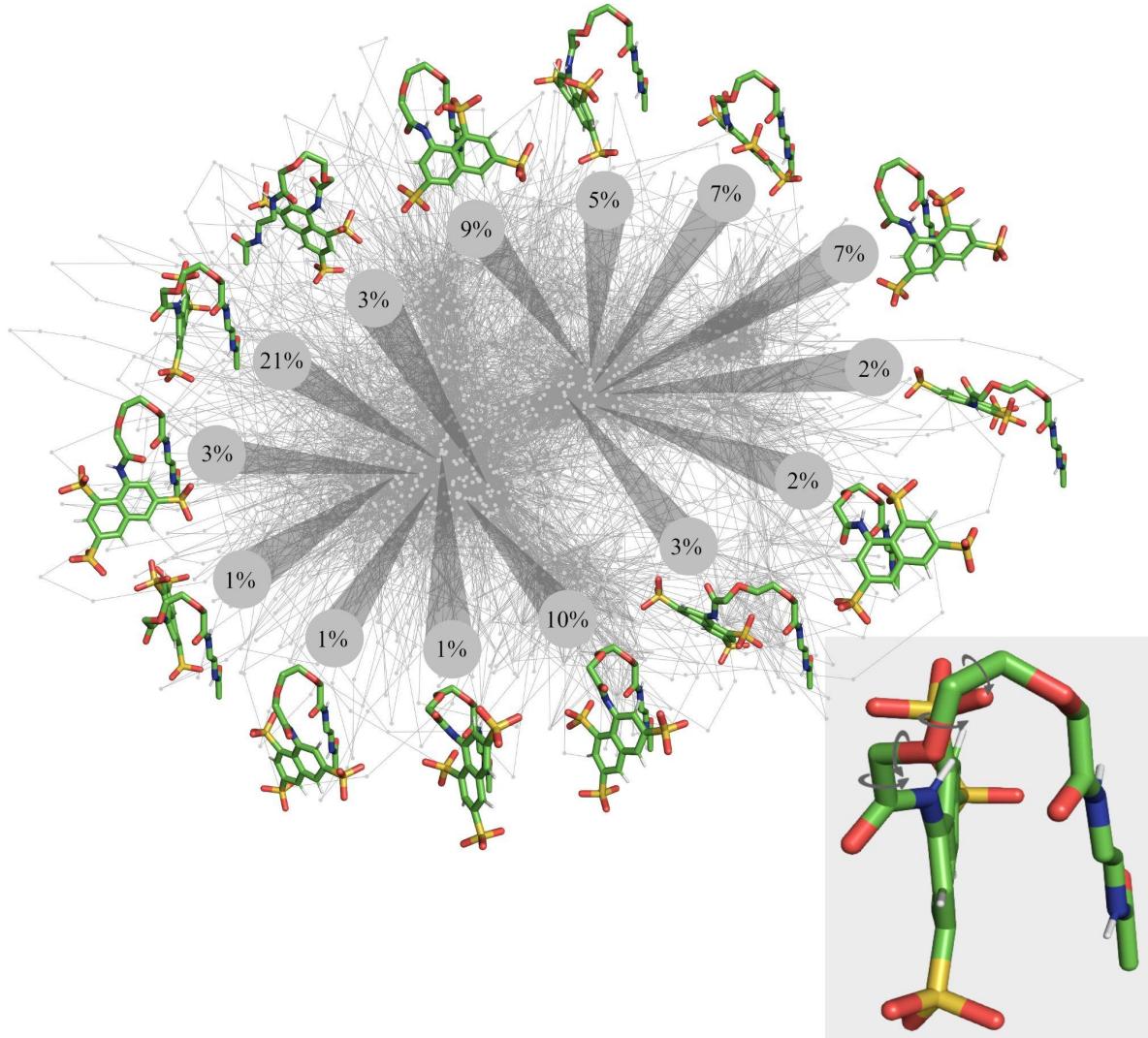


Fig. 6. Network produced by confID for GMI-1070's flexible linker, highlighting the identified conformations and the four dihedral angles which rotation constitutes the main source of variation among the different conformations.

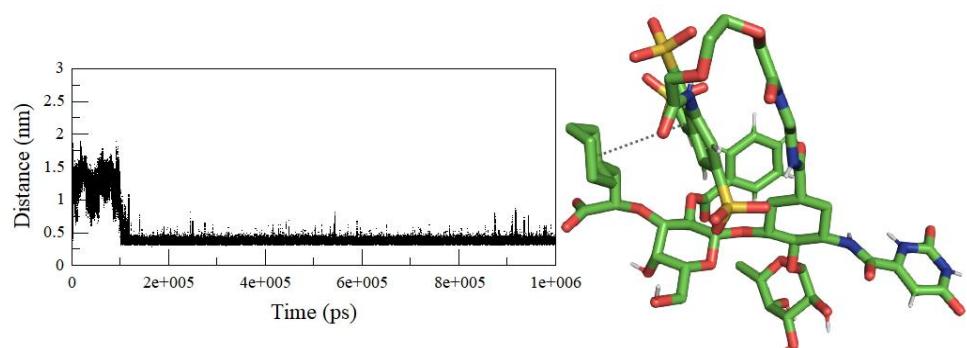


Fig. 7. Distance between the cyclohexane belonging to (S)-cyclohexyl lactic acid and the sulfated negatively charged group along a $1\mu\text{s}$ long trajectory, evidencing a recurrent proximity.

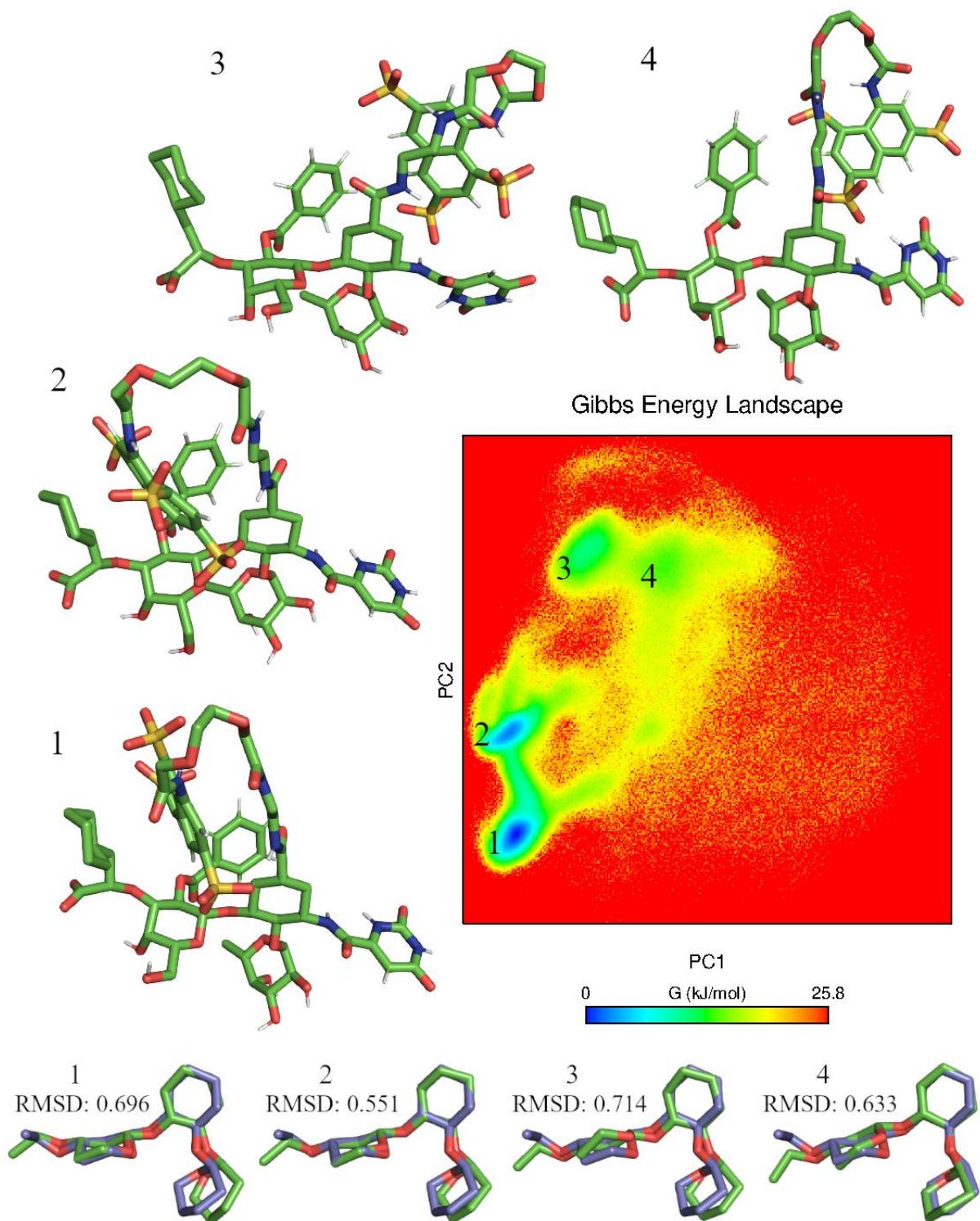


Fig. 8. PCA results for the whole molecule in the form of a heatmap, indicating the conformations associated with the lowest energy regions as well as their similarity to the bioactive conformation.

4. Conclusion

The obtained results indicate that, in spite of its preorganization, GMI-1070's behavior in solution deviates from what has been intended. The expected interaction between the benzoate substituent and the cyclohexane belonging to (*S*)-cyclohexyl lactic acid is absent from the prevalent conformations that emerged in the simulation. Instead, we observed a recurrent proximity between the cyclohexane in question and the sulfated negatively charged group that connects to the mimetic portion through the flexible linker, which seems to be mostly responsible for the conformational restriction of torsion angle Neu5Ac(2→3)Gal Φ. Apart from that, we also observed a notable reduction in torsion angle Fuc(1→3)GlcNac Ψ's rigidity, which could be attributed to the disruption of the intramolecular forces which have been shown to stabilize sialyl Lewis^x. The present work was thus able to point out some improvable characteristics of GMI-1070 that could be optimized as the development of sialyl Lewis^x mimetics continues and new candidates emerge.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank the National Laboratory for Scientific Computing (LNCC/MCTI, Brazil) for the use of the Santos Dumont supercomputer.

References

- [1] K. Konstantopoulos and S. N. Thomas, "Cancer cells in transit: The vascular interactions of tumor cells," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 11, pp. 177–202, 2009.
- [2] H. Läubli and L. Borsig, "Cancer cell adhesive interactions – more than just physical attraction Selectins promote tumor metastasis Institute of Physiology , University of Zürich , 8057 Zürich , Switzerland Current address : Department of Internal Medicine , University Hospital Ba," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 20, pp. 169–177, 2010.
- [3] M. Trinchera, A. Aronica, and F. Dall'Olio, "Selectin ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in gastrointestinal cancers," *Biology (Basel)*, vol. 6, no. 1, pp. 1–18, 2017.
- [4] I. P. Witz, "The selectin-selectin ligand axis in tumor progression," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 19–30, 2008.
- [5] E. Y. Chiang and P. S. Frenette, "Sickle cell vaso-occlusion," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 19, no. 5, pp. 771–784, 2005.
- [6] Z. M. Dong and D. D. Wagner, "atherosclerosis," pp. 369–375.
- [7] K. Ley, "The role of selectins in inflammation and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 263–268, 2003.

- [8] T. Marchini, L. S. Mitre, and D. Wolf, “Inflammatory Cell Recruitment in Cardiovascular Disease,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. February, pp. 1–12, 2021.
- [9] M. Merten and P. Thiagarajan, “P-selectin in arterial thrombosis,” *Z. Kardiol.*, vol. 93, no. 11, pp. 855–863, 2004.
- [10] P. Theofilis *et al.*, “Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 7, pp. 1–21, 2021.
- [11] B. Ernst and J. L. Magnani, “From carbohydrate leads to glycomimetic drugs,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 8, no. 8, pp. 661–677, 2009.
- [12] K. Drickamer and M. E. Taylor, “Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 34, pp. 26–34, 2015.
- [13] K. Ley, *Adhesion Molecules: function and Inhibition*. Birkhäuser, 2007.
- [14] I. Tvaroška and C. Selvaraj, “Adhesion Molecules — A Review,” *Molecules*, vol. 25, p. 2835, 2020.
- [15] W. E. Thomas, V. Vogel, and E. Sokurenko, “Biophysics of catch bonds,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 37, pp. 399–416, 2008.
- [16] P. Mehta-D’souza *et al.*, “Glycan bound to the selectin low affinity state engages Glu-88 to stabilize the high affinity state under force,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 6, pp. 2510–2518, 2017.
- [17] R. C. Preston, R. P. Jakob, F. P. C. Binder, C. P. Sager, B. Ernst, and T. Maier, “E-selectin ligand complexes adopt an extended high-affinity conformation,” *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 67–72, 2016.
- [18] R. Harris *et al.*, “Stable-isotope-assisted NMR studies on ¹³C-enriched sialyl Lewis(X) in solution and bound to E-selectin,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 11, pp. 2546–2551, 1999.
- [19] T. Peters *et al.*, “Determination of the Bioactive Conformation of the Carbohydrate Ligand in the E-Selectin/Sialyl LewisX Complex,” *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 34, no. 17, pp. 1841–1844, 1995.
- [20] B. E-, L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V Nikrad, and B. H. Shah, “Conformation of sLe,” *Receptor*, vol. 7863, no. 1, pp. 1727–1736, 1997.
- [21] K. Scheffler *et al.*, “Application of homonuclear 3D NMR experiments and 1D analogs to study the conformation of sialyl Lewisx bound to E-selectin,” *J. Biomol. NMR*, vol. 9, no. 4, pp. 423–436, 1997.
- [22] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, and R. T. Camphausen, “Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P-and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1,” *Cell*, vol. 103, no. 3, pp. 467–479, 2000.

- [23] F. P. C. Binder, K. Lemme, R. C. Preston, and B. Ernst, “Sialyl lewis x: A ‘pre-organized water oligomer’?,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 29, pp. 7327–7331, 2012.
- [24] M. Zierke, “Structure Elucidation of Selectin Antagonists in Solution and Synthesis of Sialyl Lewis x Mimics Pre- Organized in their Bioactive Conformation,” 2015.
- [25] H. F. Azurmendi, M. Martin-Pastor, and C. A. Bush, “Conformational studies of Lewis X and Lewis A trisaccharides using NMR residual dipolar couplings,” *Biopolymers*, vol. 63, no. 2, pp. 89–98, 2002.
- [26] M. D. Battistel, H. F. Azurmendi, M. Frank, and D. I. Freedberg, “Uncovering Nonconventional and Conventional Hydrogen Bonds in Oligosaccharides through NMR Experiments and Molecular Modeling: Application to Sialyl Lewis-X,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 42, pp. 13444–13447, 2015.
- [27] A. Imberty, E. Mikros, J. Koca, R. Mollicone, R. Oriol, and S. Pérez, “Computer simulation of histo-blood group oligosaccharides: energy maps of all constituting disaccharides and potential energy surfaces of 14 ABH and Lewis carbohydrate antigens,” *Glycoconj. J.*, vol. 12, no. 3, pp. 331–349, 1995.
- [28] K. E. Miller, C. Mukhopadhyay, P. Cagas, and C. A. Bush, “Solution Structure of the Lewis x Oligosaccharide Determined by NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations,” *Biochemistry*, vol. 31, no. 29, pp. 6703–6709, 1992.
- [29] Z. Su, B. Wagner, E. J. Cocinero, B. Ernst, and J. P. Simons, “The intrinsic conformation of a Lewis antigen: The Lewis × trisaccharide,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 477, no. 4–6, pp. 365–368, 2009.
- [30] M. R. Wormald, C. J. Edge, and R. A. Dwek, “The solution conformation of the Lex group,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 180, no. 3, pp. 1214-1221, 1991.
- [31] S. Sattin and A. Bernardi, “Design and synthesis of glycomimetics,” in *Carbohydrate Chemistry: Volume 41*, vol. 41, The Royal Society of Chemistry, 2016, pp. 1–25.
- [32] J. T. Patton, T. Smith, L. D. Shultz, and J. L. Magnani, “Pan-Selectin Inhibitor GMI-1070 Blocks Cell Adhesion of Acute Myelogenous Leukemia Cell Lines,” *Blood*, vol. 112, no. 11, p. 4039, Nov. 2008.
- [33] J. Chang, J. T. Patton, A. Sarkar, B. Ernst, J. L. Magnani, and P. S. Frenette, “GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice,” *Blood*, vol. 116, no. 10, pp. 1779–1786, 2010.
- [34] S. I. Simon, V. A. Morikis, S. Chase, and J. L. Magnani, “Rivipansel (GMI-1070) Inhibits E-Selectin Recognition of Sialyl LewisX Expressed on CD62L (L-selectin) and Blocks Integrin Activation and Arrest of Human Neutrophils,” *Blood*, vol. 128, no. 22, p. 2509, 2016.

- [35] M. J. Telen *et al.*, “Randomized phase 2 study of GMI-1070 in SCD: Reduction in time to resolution of vaso-occlusive events and decreased opioid use,” *Blood*, vol. 125, no. 17, pp. 2656–2664, 2015.
- [36] T. Wun *et al.*, “Effects of GMI-1070, a Pan-Selectin Inhibitor, on Leukocyte Adhesion In Sickle Cell Disease: Results From a Phase 1/2 Study,” *Blood*, vol. 116, no. 21, p. 262, Nov. 2010.
- [37] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. R. Hutchison, “Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform.,” *J. Cheminform.*, vol. 4, no. 1, p. 17, Aug. 2012.
- [38] W. L. DeLano, “The PyMOL Molecular Graphics System,” 2002.
- [39] L. Pol-Fachin, V. H. Rusu, H. Verli, and R. D. Lins, “GROMOS 53A6 GLYC, an improved GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 8, no. 11, pp. 4681–4690, 2012.
- [40] M. D. Polêto, V. H. Rusu, B. I. Grisci, M. Dorn, R. D. Lins, and H. Verli, “Aromatic rings commonly used in medicinal chemistry: Force fields comparison and interactions with water toward the design of New Chemical Entities,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. APR, pp. 1–20, 2018.
- [41] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, “GROMACS: Fast, flexible, and free,” *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, Dec. 2005.
- [42] M. D. Polêto, B. I. Grisci, M. Dorn, and H. Verli, “ConflID: An analytical method for conformational characterization of small molecules using molecular dynamics trajectories,” *Bioinformatics*, vol. 36, no. 11, pp. 3576–3577, 2020.

5. Conclusões

Os resultados obtidos indicam que, apesar da sua pré-organização, o comportamento do GMI-1070 diverge em alguns aspectos do pretendido pelo seu design. A interação prevista entre o substituinte benzoato e o ciclohexano pertencente ao (S)-ciclohexil ácido lático não se faz presente nas conformações prevalentes adotadas pelo GMI-1070 durante a simulação. Ao invés disso, foi observada uma proximidade recorrente entre o ciclohexano em questão e o grupo sulfatado negativamente carregado que se conecta à porção mimética através do *linker* flexível. Essa interação parece ser majoritariamente responsável pela restrição conformacional do diedro Neu5Ac(2→3)Gal Φ. Além disso, também foi observada uma redução significativa na rigidez do diedro Fuc(1→3)GlcNac Ψ, que talvez possa ser atribuída à disruptão de forças intramoleculares às quais foi atribuída a estabilização do sialyl Lewis^x. Assim, o presente trabalho foi capaz de apontar algumas características passíveis de otimização do GMI-1070, que podem ser levadas em consideração no desenvolvimento de novos inibidores de Pan-selectina.

6. Perspectivas

No sentido de expandir e corroborar os resultados obtidos até o presente momento, algumas análises subsequentes se fazem necessárias, como:

1. clusterização a partir da trajetória de 50μs do GMI-1070;
2. *virtual screening* contra as selectinas a partir dos *clusters* obtidos;
3. metadinâmica do *linker* flexível ou novas simulações de dinâmica molecular partindo das conformações já identificadas.

Bibliografia

- [1] K. Konstantopoulos and S. N. Thomas, "Cancer cells in transit: The vascular interactions of tumor cells," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 11, pp. 177–202, 2009.
- [2] H. Läubli and L. Borsig, "Cancer cell adhesive interactions – more than just physical attraction Selectins promote tumor metastasis Institute of Physiology , University of Zürich , 8057 Zürich , Switzerland Current address : Department of Internal Medicine , University Hospital Ba," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 20, pp. 169–177, 2010.
- [3] M. Trinchera, A. Aronica, and F. Dall'Olio, "Selectin ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in gastrointestinal cancers," *Biology (Basel)*., vol. 6, no. 1, pp. 1–18, 2017.
- [4] I. P. Witz, "The selectin-selectin ligand axis in tumor progression," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 19–30, 2008.
- [5] E. Y. Chiang and P. S. Frenette, "Sickle cell vaso-occlusion," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 19, no. 5, pp. 771–784, 2005.
- [6] Z. M. Dong and D. D. Wagner, "atherosclerosis," pp. 369–375.
- [7] K. Ley, "The role of selectins in inflammation and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 263–268, 2003.
- [8] T. Marchini, L. S. Mitre, and D. Wolf, "Inflammatory Cell Recruitment in Cardiovascular Disease," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. February, pp. 1–12, 2021.
- [9] M. Merten and P. Thiagarajan, "P-selectin in arterial thrombosis," *Z. Kardiol.*, vol. 93, no. 11, pp. 855–863, 2004.
- [10] S. J. Romano, "Selectin antagonists: Therapeutic potential in asthma and COPD," *Treat. Respir. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 85–94, 2005.
- [11] P. Theofilis *et al.*, "Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction," *Biomedicines*, vol. 9, no. 7, pp. 1–21, 2021.
- [12] J. Chang, J. T. Patton, A. Sarkar, B. Ernst, J. L. Magnani, and P. S. Frenette, "GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice," *Blood*, vol. 116, no. 10, pp. 1779–1786, 2010.

- [13] J. T. Patton, T. Smith, L. D. Shultz, and J. L. Magnani, "Pan-Selectin Inhibitor GMI-1070 Blocks Cell Adhesion of Acute Myelogenous Leukemia Cell Lines," *Blood*, vol. 112, no. 11, p. 4039, Nov. 2008.
- [14] S. I. Simon, V. A. Morikis, S. Chase, and J. L. Magnani, "Rivipansel (GMI-1070) Inhibits E-Selectin Recognition of Sialyl LewisX Expressed on CD62L (L-selectin) and Blocks Integrin Activation and Arrest of Human Neutrophils," *Blood*, vol. 128, no. 22, p. 2509, 2016.
- [15] M. J. Telen *et al.*, "Randomized phase 2 study of GMI-1070 in SCD: Reduction in time to resolution of vaso-occlusive events and decreased opioid use," *Blood*, vol. 125, no. 17, pp. 2656–2664, 2015.
- [16] T. Wun *et al.*, "Effects of GMI-1070, a Pan-Selectin Inhibitor, on Leukocyte Adhesion In Sickle Cell Disease: Results From a Phase 1/2 Study," *Blood*, vol. 116, no. 21, p. 262, Nov. 2010.
- [17] B. Ernst and J. L. Magnani, "From carbohydrate leads to glycomimetic drugs," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 8, no. 8, pp. 661–677, 2009.
- [18] K. Ley, *Adhesion Molecules: function and Inhibition*. Birkhäuser, 2007.
- [19] R. C. Preston, R. P. Jakob, F. P. C. Binder, C. P. Sager, B. Ernst, and T. Maier, "E-selectin ligand complexes adopt an extended high-affinity conformation," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 67–72, 2016.
- [20] I. Tvaroška and C. Selvaraj, "Adhesion Molecules — A Review," *Molecules*, vol. 25, p. 2835, 2020.
- [21] F. P. C. Binder, K. Lemme, R. C. Preston, and B. Ernst, "Sialyl lewis x: A 'pre-organized water oligomer'?", *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 29, pp. 7327–7331, 2012.
- [22] W. E. Thomas, V. Vogel, and E. Sokurenko, "Biophysics of catch bonds," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 37, pp. 399–416, 2008.
- [23] P. Mehta-D'souza *et al.*, "Glycan bound to the selectin low affinity state engages Glu-88 to stabilize the high affinity state under force," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 6, pp. 2510–2518, 2017.
- [24] M. Zierke, "Structure Elucidation of Selectin Antagonists in Solution and Synthesis of Sialyl Lewis x Mimics Pre- Organized in their Bioactive Conformation," 2015.
- [25] R. Harris *et al.*, "Stable-isotope-assisted NMR studies on ¹³C-enriched sialyl Lewis(X) in solution and bound to E-selectin," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 11, pp. 2546–2551, 1999.

- [26] T. Peters *et al.*, "Determination of the Bioactive Conformation of the Carbohydrate Ligand in the E-Selectin/Sialyl LewisX Complex," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 34, no. 17, pp. 1841–1844, 1995.
- [27] B. E-, L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V Nikrad, and B. H. Shah, "Conformation of sLe," *Receptor*, vol. 7863, no. I, pp. 1727–1736, 1997.
- [28] K. Scheffler *et al.*, "Application of homonuclear 3D NMR experiments and 1D analogs to study the conformation of sialyl Lewisx bound to E-selectin," *J. Biomol. NMR*, vol. 9, no. 4, pp. 423–436, 1997.
- [29] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, and R. T. Camphausen, "Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P-and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1," *Cell*, vol. 103, no. 3, pp. 467–479, 2000.
- [30] H. F. Azurmendi, M. Martin-Pastor, and C. A. Bush, "Conformational studies of Lewis X and Lewis A trisaccharides using NMR residual dipolar couplings," *Biopolymers*, vol. 63, no. 2, pp. 89–98, 2002.
- [31] M. D. Battistel, H. F. Azurmendi, M. Frank, and D. I. Freedberg, "Uncovering Nonconventional and Conventional Hydrogen Bonds in Oligosaccharides through NMR Experiments and Molecular Modeling: Application to Sialyl Lewis-X," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 42, pp. 13444–13447, 2015.
- [32] A. Imbert, E. Mikros, J. Koca, R. Mollicone, R. Oriol, and S. Pérez, "Computer simulation of histo-blood group oligosaccharides: energy maps of all constituting disaccharides and potential energy surfaces of 14 ABH and Lewis carbohydrate antigens," *Glycoconj. J.*, vol. 12, no. 3, pp. 331–349, 1995.
- [33] K. E. Miller, C. Mukhopadhyay, P. Cagas, and C. A. Bush, "Solution Structure of the Lewis x Oligosaccharide Determined by NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations," *Biochemistry*, vol. 31, no. 29, pp. 6703–6709, 1992.
- [34] Z. Su, B. Wagner, E. J. Cocinero, B. Ernst, and J. P. Simons, "The intrinsic conformation of a Lewis antigen: The Lewis × trisaccharide," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 477, no. 4–6, pp. 365–368, 2009.
- [35] M. R. Wormald, C. J. Edge, and R. A. Dwek, "The solution conformation of the Lex group," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 180, no. 3, pp. 1214-1221, 1991.

- [36] S. Sattin and A. Bernardi, "Design and synthesis of glycomimetics," in *Carbohydrate Chemistry: Volume 41*, vol. 41, The Royal Society of Chemistry, 2016, pp. 1–25.
- [37] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, "GROMACS: Fast, flexible, and free," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, Dec. 2005.
- [38] L. Pol-Fachin, V. H. Rusu, H. Verli, and R. D. Lins, "GROMOS 53A6 GLYC, an improved GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 8, no. 11, pp. 4681–4690, 2012.
- [39] Hugo Verli (Org.), *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. 2014.
- [40] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. R. Hutchison, "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform..," *J. Cheminform.*, vol. 4, no. 1, p. 17, Aug. 2012.
- [41] W. L. DeLano, "The PyMOL Molecular Graphics System," 2002.
- [42] M. D. Polêto, V. H. Rusu, B. I. Grisci, M. Dorn, R. D. Lins, and H. Verli, "Aromatic rings commonly used in medicinal chemistry: Force fields comparison and interactions with water toward the design of New Chemical Entities," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. APR, pp. 1–20, 2018.
- [43] M. D. Polêto, B. I. Grisci, M. Dorn, and H. Verli, "ConflD: An analytical method for conformational characterization of small molecules using molecular dynamics trajectories," *Bioinformatics*, vol. 36, no. 11, pp. 3576–3577, 2020.
- [44] Jin, F. & Wang, F. The physiological and pathological roles and applications of sialyl Lewis x, a common carbohydrate ligand of the three selectins. *Glycoconj. J.* 37, 277–291 (2020).