UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**Síntese e Relações Estrutura-Atividade de
Dipeptidil-nitrilas Inibidoras da Cruzaína**

Erika Vanessa Meñaca Orozco

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos, SP
2014

ERIKA VANESSA MEÑACA OROZCO

**Síntese e Relações Estrutura-Atividade de
Dipeptidil-nitrilas Inibidoras da Cruzaína**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica
e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto
Montanari

São Carlos, SP

2014

*A maior descoberta da minha geração foi
a de que o ser humano pode alterar sua vida
alterando sua mente.*

William James

Dedico este trabalho a meus pais e a meu amor, Luis Felipe Rodriguez...Por seu apoio incondicional durante estes anos!

AGRADECIMENTOS

Muito, muito obrigada ao professor Carlos Montanari ao me permitir fazer parte de Nequimed e me ensinar o caminho da Química Medicinal.

Um agradecimento muito especial para o Peter Kenny, seu otimismo e alegria fizeram dias para lembrar!

Uma infinita gratidão a todos meus parceiros de Nequimed, todos são pessoas maravilhosas das que aprendi o valor da amizade: ao Gerardo por toda a ajuda que me deu quando cheguei no Brasil e ainda continua-me dando. Ao Bije por me ensinar, por sua crítica construtiva e pela paciência. Ao Igor e ao Daniel por estar dispostos a me ajudar quando precisei. O Jean, quem além de me ajudar, alegrou muitos os dias no lab. Ao Wiliam pela companhia nos dias esportivos e ajuda no lab. Ao Leandro por escutar todas as minhas dúvidas e dar-me ânimos dias esportivos. O Cristian, pelo seu apoio e suas histórias engraçadas! A Karen pela companhia no lab e as risadas.

A Fabiana Rossini, pelo tempo compartilhado!

Obrigada a todos meus amigos Colombianos em São Carlos por ser parte de forma direta ou indireta deste logro, escutar-me e dar-me seus pontos de vista. Um agradecimento muito especial a Don Júlio por seu apoio. A Lina K Bernal, Mónica Soto, Claudia Abadia, David González, Cesar Escobar, Andrea Naranjo e Martin Emilio González...excelentes amigos!

Meus agradecimentos ao pessoal da CAQI, a Silvana, ao André e Audimar, ao Guilherme Miota, da cromatografia, muito, muito obrigada.

Finalmente um tributo de amor e gratidão a meu amor, Luis Felipe Rodríguez, por me acompanhar nesse caminho de crescimento não só intelectual, mas também pessoal. A minha família pelo apoio incondicional, a minha mãe Clara Inés Orozco e meu pai Freddy Meñaca por todas as bases da educação que me deram...pelo amor e a paciência de não poder compartilhar muitos finais de semana. A meu irmão Victor Hugo por me entender.

A minha segunda família, Dona Rosa, Don Luis e Claudia e a Juanca, porque sempre nos apoiam.

Agradeço também às agências de fomento pelo financiamento dos projetos do NEQUIMED e pela bolsa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Obrigada Deus por todas as pessoas antes mencionadas, por elas, este trabalho, é o que é!

RESUMO

A cruzaina é a principal cisteína protease encontrada no parasito *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da Doença de Chagas. A enzima é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro e possui uma excelente validação pré-clínica como alvo susceptível à ação de fármacos. Várias classes de inibidores peptídicos reversíveis e irreversíveis, baseados no estado de transição, inibem efetivamente a cruzaina. No entanto, a maioria destes inibidores ainda não apresenta perfis farmacodinâmicos/farmacocinéticos adequados e/ou estão relacionados com potenciais efeitos fora do alvo (do inglês, *off-target*).

Com o objetivo de encontrar inibidores mais eficientes e seletivos, foi aplicado uma abordagem de planejamento de ligantes baseada em hipótese, combinando quiminformática, síntese orgânica, ensaios bioquímicos e determinação do modo de interação para validar os compostos planejados como inibidores de cruzaina. Neste trabalho, é mostrado um conjunto de dipeptidil-nitrilas que foram sintetizadas e avaliadas com base nestes métodos para investigar as interações nos subsítios S1, S2 e S3 de cruzaina. Nossos resultados demonstram o sucesso da abordagem aplicada que resultou na identificação de vários inibidores da cruzaina em concentrações que chegam a sub-micromolar, como é o caso dos inibidores quirais Neq0551, Neq0568 e Neq0569, com pK_i 's de 6,7; 7,3 e 7,6 respectivamente.

Alguns dos compostos dessa classe de dipeptidil-nitrilas também são agentes tripanossomicidas por apresentar concentrações efetivas com formas infectivas do *T. cruzi* em baixo micromolar.

ABSTRACT

Cruzain is the major cysteine protease found in the parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. The enzyme is essential for the development and survival of the parasite within host cells, having excellent pre-clinical validation evidence as a druggable target. Several classes of peptide inhibitors including transition state-based reversible and irreversible ones effectively inhibit cruzain. However, most of these inhibitors still have poor PK/PD profiles and are related with potential off target effects. In order to find more efficient and selective inhibitors, we have applied the hypothesis driven ligand design approach, combining cheminformatics, organic synthesis, biochemical assays and mode of binding determination to validate the designed compounds as cruzain inhibitors. Here, we show a set of dipeptidyl nitriles that were synthesized and evaluated based on these methods to probe interactions at S1, S2 and S3 pockets of cruzain binding site. Our results unveil the success of the applied approach that yielded in the identification of several cruzain inhibitors at sub-micromolar concentrations, as in the case of chiral inhibitors Neq0551, and Neq0568 Neq0569 with pK_i's 6.7; 7.3 and 7.6 respectively.

Some of the compounds of this class of dipeptidyl nitriles are also trypanocidal agents with effective concentrations in the low micromolar range against infective forms of *T. cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo.	18
Figura 2 – Três estágios morfológicos do <i>T. Cruzi</i> : tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas.	19
Figura 3 – Estruturas dos fármacos usados no tratamento da Doença de Chagas.	20
Figura 4 – Estrutura do candidato a fármaco K777 e uma das suas modificações estruturais	21
Figura 5 – Fármacos reposicionados para o tratamento da Doença de Chagas	22
Figura 6 – Estrutura cristalográfica da cruzaina (PDB:2AIM) Em destaque os resíduos que participam do mecanismo catalítico	24
Figura 7 – Formação do par iônico tiolato-imidazólio na cruzaina	25
Figura 8 – Estado de transição de cisteíno-proteases na hidrólise da ligação peptídica.	25
Figura 9 – Sítio ativo da cruzaina representado por superfície de Van der Waals.	27
Figura 10 – Algumas das modificações estruturais feitas no K777	28
Figura 11 – Inibidor irreversível de cruzaina com <i>wardhead</i> cetona	29
Figura 12 – Variações aromáticas feitas no esqueleto tiosemicarbazona	30
Figura 13 – Variações estruturais feitas em derivados tiosemicarbazona	30
Figura 14 – Compostos <i>N</i> -acilidrazonas inibidores de cruzaina.....	31
Figura 15 – Estrutura do inibidor da catepsina K odanacatibe	32
Figura 16 – Compostos dipeptidilnitrilas testados em CatB.....	33
Figura 17 – Estrutura geral de compostos dipeptidilnitrilas testados em CatS.....	34
Figura 18 – Representação da estrutura geral de compostos dipeptidilnitrilas testados em CatL	34
Figura 19 – Lipofilia (clogP) Vs. massa molecular.	35

Figura 20 – Estrutura do inibidor Neq0409.....	42
Figura 21 – Estrutura de raios-X da substância protótipo Neq0409 inibindo a cruzaína mutante.	43
Figura 22 – Representação 2D da estrutura química básica dos inibidores dipeptidil-nitrilas sintetizados	44
Figura 23 – Estrutura do inibidor de CatK	49
Figura 24 – Estrutura do composto HOBt	55
Figura 25 – Estrutura química dos reagentes de acoplamento usados na síntese das dipeptidil- nitrilas	56
Figura 26 – Ativação por HATU.....	57
Figura 27 – Espectro de RMN- ¹ H de Neq0409	60
Figura 28 – Prótons benzílicos de Neq0409	61
Figura 29 – Espectro de RMN ¹³ C de Neq0409	61
Figura 30 – Agentes guanidilantes para converter Orn a Arg	63
Figura 31 – Substrato ZFRMCA usado nos ensaios cinéticos com cruzaína	73
Figura 32 – Curvas cinéticas de inibição enzimática	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Classificação de cisteíno proteases	23
Tabela 3.1 – Valores de potência obtidos para os inibidores sintetizados representados pelo valor de K_i^{app}	42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4.1 – Rota sintética para preparação de Neq0409	53
Esquema 4.2 – Mecanismo de reação de esterificação	53
Esquema 4.3 – Mecanismo de hidrólise básica de ésteres	54
Esquema 4.4 – Possíveis modos de ataque na ativação por BOP.	57
Esquema 4.5 – Mecanismo de reação para racemização: (Rota A) enolização direita, (Rota B) formação de 5(4H)-oxazolona.....	58
Esquema 4.6 – Rota sintética para preparação de Neq0409, Neq0570, Neq0573, Neq0568 e Neq0569	59
Esquema 4.7 – Rota sintética para preparação de Neq0550 e Neq0551, Neq0552, Neq0567 Neq0571 e Neq572.....	62
Esquema 4.8 – Reações competitivas dos resíduos Arg desprotegidos.....	63
Esquema 4.9 – Reações competitivas do Trp desprotegido.....	64
Esquema 4.10 – Mecanismo de acoplamento com anidridos mistos	65
Esquema 4.11 – Reação de hidrólise do composto Neq0550	66
Esquema 4.12 – Rota sintética para preparação de Neq0534	67
Esquema 4.13 – Mecanismo da reação de formação de isocianato e aminólise	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
BOP	Benzotriazol-(1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonium hexafluorofosfato
Bz	Benzoíla
Cat	Catepsina
CC	Cromatografia de Coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
Cys	Cisteína
DCM	Diclorometano
ddd	Duplo duplo dubleto
DDT	DL-Ditrioeritol
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
HATU	2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniohexafluorofosfato
Hex	Hexano
His	Histidina

HOBt	1-hidroxi-1H-benzotriazol
HTS	Ensaio em larga escala
IBCF	Isobutilcloroformato
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% da atividade
IND	Investigational New Drug
k_{cat}	Constante catalítica
K _m	Constante de Michaelis-Menten
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MCA	7-amino-4-metilcumarina
Met	Metionina
MOB	Mode of Binding
Neq	Código do banco de dados do grupo Nequimed
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
NTDs	Neglected Tropical diseases ou Doenças tropicais negligenciadas
Orn	Ornitina
PDB	Protein Data Bank
Phe	Fenilalanina
RMN ¹³ C	Ressonância magnética de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética de hidrogênio
SAR	Struture Activity Relationship ou Relação Estrutura-Atividade, em português
Ser	Serina
TEA	Trietilamina
THF	Tetraidrofurano
Thr	Treonina

Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
WHO	World Health Organization ou Organização Mundial de Saúde, em português
ZFRMCA	<i>N</i> -benzoxycarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metil-cumarina
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ESQUEMAS	10
SUMÁRIO.....	14
Capítulo 1	16
Introdução.....	16
1.1 Doença de Chagas	Erro! Indicador não definido.
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2 Estratégias terapêuticas	20
1.3 Proteases.....	22
1.4 Cisteíno Proteases	22
1.4.1 Cruzaína	23
1.4.2 Mecanismo de proteólise	24
1.4.3 Sítio ativo da cruzaína.....	26
1.5 Inibidores da Cruzaína	28
1.5.1 Inibidores irreversíveis.....	28
1.5.2 Inibidores reversíveis	29
1.6 Síntese orgânica em química medicinal	34
Capítulo 2	36
2.1 Objetivo	38
2.2 Justificativa	38
Capítulo 3	40
3.1 Planejamento de Inibidores de cruzaína: Composto ligante.....	42
3.2 Relações estrutura-atividade (SAR) dos compostos sintetizados	45
3.2.1 <i>SAR das interações P2/S2</i>	46
3.2.2 <i>SAR de interações P3/S3</i>	49
3.2.3 <i>SAR de interações P1/S1</i>	50
3.3 Conclusões.....	50
Capítulo 4	51
4 Síntese de dipeptidil-nitrilas	53

4.1	Síntese do ligante.....	53
4.1.1	<i>Reação de Esterificação</i>	53
4.1.2	<i>Reação de Hidrólise</i>	54
4.1.3	<i>Reação de Acoplamento</i>	55
4.1.3.1	<i>Reagentes de Acoplamento</i>	55
4.2	Síntese dos compostos Neq0409, Neq0570, Neq0573, Neq0568 e Neq0569	59
4.3	Síntese dos compostos Neq0550, Neq0551, Neq0552, Neq0567, Neq0571 e Neq0572.....	62
4.3.1	<i>Proteção do grupo guanidínio de Arg</i>	62
4.3.2	<i>Proteção do grupo indol de Triptofano (Trp)</i>	64
4.3.3	<i>Proteção do grupo fenol de Tirosina (Tyr)</i>	65
4.4	Síntese de Neq0534	66
4.5	Conclusões	68
Capítulo 5		69
5.1	Materiais	71
5.2	Equipamentos para separação e caracterização dos precursores e produtos finais.....	71
5.3	Reagentes usados em ensaios bioquímicos.....	72
5.4	Equipamentos usados nos ensaios bioquímicos.....	72
5.5	Determinação da afinidade	72
5.5.1	Ensaio enzimático para determinação de K_i	74
5.6	Procedimentos sintéticos.....	76
5.6.1	Preparação do composto Neq0409	76
5.6.2	Preparação do composto Neq0410	78
5.6.3	Preparação do composto Neq0412	78
5.6.4	Preparação do composto Neq0413	80
5.6.5	Preparação do composto Neq0570	81
5.6.6	Preparação do composto Neq0573	83
5.6.7	Preparação do composto Neq0568	85
5.6.8	Preparação do composto Neq0569	86
5.6.9	Preparação do composto Neq0550	88
5.6.10	Preparação do composto Neq0551	89
5.6.11	Preparação do composto Neq0552	90
5.6.12	Preparação do composto Neq0567	91
5.6.13	Preparação do composto Neq0571	92
5.6.14	Preparação do composto Neq0572	93
5.6.15	Preparação do composto Neq0534	93
REFERÊNCIAS		96
6	Anexos.....	105

Capítulo 1

Introdução

1.1 Doença de Chagas

Também conhecida como tripanossomíase americana, a Doença de Chagas foi descrita pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 que reportou com grande detalhe o ciclo de transmissão da doença, causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* e as manifestações clínicas em humanos. É reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (WHO) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas (NTDs, do inglês *Neglected Tropical Diseases*), mesmo tendo sido descoberta há mais de 100 anos (1)

A doença afeta cerca de 7 a 8 milhões (2) de pessoas na América Latina, resultando na morte de 14000 pessoas a cada ano (3). Representa a terceira maior doença parasitária em nível mundial (depois da malária e esquistossomose) e é tradicionalmente confinada às áreas pobres e rurais da América do Sul e Central(4).

A Doença de Chagas é transmitida aos humanos principalmente pelo inseto vetor, comumente chamado de “barbeiro”, da subfamília *Triatominae*, na qual tem sido identificadas apenas algumas espécies como vetores competentes para *T. cruzi*. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, e *Triatoma dimidiata* são os três mais importantes vetores na transmissão do *T. cruzi* ao homem. Historicamente, *T. infestans* tem sido o mais importante e principal vetor em sub-regiões endêmicas da Amazônia (sul da América do Sul). *R. prolixus* tem sido encontrado no norte da América do Sul e América Central e *T. dimidiata* se estende mais ao norte de México (1,4). Recentemente, devido à migração e imigração de pessoas contaminadas ou infecções de transfusões e transplantes de órgãos, a Doença de Chagas tem sido relatada em áreas em que normalmente não existiam (Figura 1) (5).

Figura 1 – Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo.

Fonte: Coura, J. R.; Vinas, P. A., 2010 (6)

A infecção, no ser humano e outros mamíferos, é causada pela transmissão vetorial do protozoário *T. cruzi* presente nas fezes do barbeiro contaminado com o protozoário, o qual passa à corrente sanguínea através da ferida da picada, invade o sistema imunológico do hospedeiro, multiplica-se dentro das células e retorna à circulação sanguínea.

A doença apresenta duas fases clínicas, a aguda e a crônica. A fase aguda dura de 4-8 semanas e é geralmente assintomática, mas podem surgir sintomas 1-2 semanas após a picada. Durante a fase aguda, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos potenciais para a infecção, mas com o desenvolvimento de uma resposta imune, a parasitemia reduz a uma concentração não detectável, sinalizando o final da fase aguda. No entanto, o parasito não é completamente eliminado e continua infectando tecidos musculares ou gânglio entérico e persiste indefinidamente durante toda a vida do hospedeiro, o que é conhecido como a fase crônica, manifestando-se como patologias do coração, esôfago e cólon (1).

1.1 *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* é complexo, com vários estágios de desenvolvimento em insetos vetores e hospedeiros mamíferos. Nestes últimos, encontram-se as formas típicas tripomastigota (forma não replicativa encontrada na corrente sanguínea) e amastigota (forma replicativa intracelular), enquanto as formas replicativas epimastigota e tripomastigota metacíclica infectam o vetor triatomíneo (7). (Figura 2)

Figura 2 – Três estágios morfológicos do *T. cruzi*: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas.

Fonte: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2004/Trypanosomiasis/morphology.htm>

Os processos de diferenciação para converter a forma proliferativa epimastigota à forma infectiva tripomastigota metacíclica são processos que consomem energia e dependem da disponibilidade de aminoácidos, obtidos através da degradação de proteínas. Essa função é exercida por proteases; isto é, enzimas envolvidas na ruptura da ligação peptídica, cujo papel é crítico no ciclo de vida de organismos parasitários. Há facilitação da invasão dos tecidos do

hospedeiro, viabilização da digestão de proteínas, possibilita ao parasito evadir-se da resposta imune do hospedeiro, e previne a coagulação do sangue (8), o que faz delas alvos atraentes para a descoberta de fármacos para o tratamento de doenças parasitárias.

1.2 Estratégias terapêuticas

O estado atual na pesquisa e inovação da Doença de Chagas tem dois grandes desafios; por um lado, o controle da transmissão da doença e pelo outro, o controle terapêutico. O primeiro é responsabilidade de políticas governamentais, embora, recentemente, também têm desempenhado um papel importante outras entidades não governamentais como *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) e *Médicins Sans Frontières* (MSF). O controle terapêutico, devido à falta de interesse econômico por parte das indústrias farmacêuticas, tem sido domínio exclusivo da academia. Raras parcerias público-privadas são encontradas na solução desses problemas.

O tratamento atual envolve a administração de dois medicamentos, ambos da década de 1970, o Nifurtimox, (4 -(5-nitrofurfurilindenamino)-3-metiltiomorfolina 1,1-dióxido)(Nfx) produzido apenas em El Salvador pela Bayer e não mais comercializado no Brasil, e benzonidazol, (*N*-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida) (Bnz) produzido pela Roche, e cujas estruturas são apresentadas na Figura 3.(9). A patente deste último foi cedida ao governo brasileiro e é atualmente produzido por LAFEPE. Estes medicamentos são heterocíclis nitroaromáticos, sendo o primeiro um nitrofurano e o segundo da classe dos nitroimidazóis. Ambos são ativos na fase aguda, sendo ineficazes na fase crônica. Além disso, já são conhecidas cepas resistentes de *T. cruzi* a estes fármacos, as quais levam a variadas taxas de cura parasitológica de acordo com a área geográfica.

Figura 3 – Estruturas dos fármacos usados no tratamento da Doença de Chagas.

Fonte: Adaptado de González, Cereceto, 2011.(10)

O mecanismo de ação do Nifurtimox no organismo dá-se através da redução do grupo nitro para o radical nitroânion que reage com radicais de oxigênio para produzir superóxido, um metabólito altamente tóxico, em um processo conhecido como ciclagem redox. O Benzonidazol

age também através da redução do grupo nitro e os intermediários reduzidos ligam-se covalentemente a biomacromoléculas, modificando-as. Os efeitos adversos mais frequentes desses medicamentos incluem anorexia, vômitos, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgicas, provavelmente pelos danos causados pelos metabólitos dos medicamentos ao tecido do hospedeiro (9).

Os efeitos colaterais associados a estes fármacos são responsáveis pela alta taxa de desistência ao tratamento (Nfx 6-40% dos pacientes e Bnz de 7-12%)(11), assim como a baixa eficácia terapêutica, além da genotoxicidade que os converte em medicamentos inadequados para o tratamento de qualquer tipo de doença (12-15).

Alguns novos inibidores da cruzaina relevantes são os K777 e WRR483 (Figura 4) que, depois de refinamento e extensos testes realizados pelo grupo do Professor McKerrow no Sandler Center (EUA), inclusive em diferentes modelos da fase aguda da Doença de Chagas (16-18), apresentam um bom perfil farmacêutico, adequada solubilidade em água, biodisponibilidade oral e ausência de efeitos tóxicos e mutagênicos (19,20). O K777 induziu um acúmulo da cruzaina no complexo de Golgi, resultando na morte da forma epimastigotas de *T. cruzi* (21,22). Foi avaliado em estudos pré-clínicos para completar a etapa novo fármaco investigacional (IND, do inglês: Investigational New Drug) e ser transferido à fase clínica, mas o projeto foi interrompido por recomendação do Comitê Consultivo Científico de DNDi em meados de 2013, devido a descobertas de intolerância em baixas doses em primatas e cães (23).

Figura 4 – Estrutura do candidato a fármaco K777 e uma das suas modificações estruturais

Fonte: Adaptado de González, Cereceto, 2011.(10)

Outros compostos de relevância na fase “composto-líder” são os inibidores da biossíntese de ergosterol, derivados do triazol, que surgiram por meio da estratégia de reposicionamento de fármacos, já que alguns deles são utilizados como agentes antifúngicos. Os dois mais promissores são o posaconazol e ravuconazol (Figura 5), que já foram mostrados para ter ação *in vitro* contra o *T. cruzi*, (24,25). O posaconazol era atualmente a maior esperança para o

tratamento da Doença de Chagas e já estava em fase inicial de experimentação em seres humanos mas os estudos foram descontinuados por falta de eficácia terapêutica (26).

Figura 5 – Fármacos reposicionados para o tratamento da Doença de Chagas

Fonte: Adaptado de Otero *et al*, 2012 (27)

Diante do exposto, atualmente um tratamento menos agressivo, eficaz e seguro é urgentemente necessário. A busca por alvos para ação de fármacos é fundamental para o início do estudo de terapias médicas e, no *T. cruzi*, existem diversos alvos já identificados e explorados na busca do fármaco eficaz e seguro (28). Entre eles estão as proteases, enzimas chaves na patogenicidade de muitas doenças parasitárias (29-32).

1.3 Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação peptídica, uma reação energeticamente favorável, mas extremadamente lenta em condições não catalíticas. (33) Estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos importantes, incluindo a rotatividade de proteínas, a digestão, coagulação do sangue e a cicatrização de feridas, a fertilização, o crescimento e diferenciação de células, a sinalização celular, resposta imune, e a apoptose. A proteólise descontrolada, desregulada ou indesejada pode conduzir a vários estados de doença, incluindo efisema pulmonar, acidente vascular cerebral, infecções virais, câncer, doença de Alzheimer, inflamação e artrite (30). Estão divididas em quatro classes: serino, aspártico, cisteíno e metaloproteases.

1.4 Cisteíno Proteases

As cisteíno proteases são divididas em várias classes catalíticas distintas (Tabela 1.1), incluindo classes CA (enzimas semelhantes à papaína ou catépsinas (Cat)), CD (caspases e proteases relacionadas), e PA (proteases picornaviral)(33,34). A maioria das cisteíno proteases conhecidas pertence à superfamília da papaína. (29).

As proteases de parasitos e mamíferos pertencem à primeira classe, mas o sítio ativo mostra uma variação considerável entre as proteases individuais, mesmo dentro da mesma classe; isto

é, enzimas que desempenham reações químicas semelhantes normalmente partilham estruturas semelhantes. No entanto, enzimas análogas têm pouca ou nenhuma semelhança estrutural, embora partilhem a mesma atividade catalítica (35).

Tabela 1.1 – Classificação de cisteíno proteases

Clã	Família	Proteases	Ocorrência
CA	C1A	Papaína Cathepsina L Falcipaina Rodesaina Cruzaína	Plantas Mamíferos <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>
	C1B C2	Cathepsina B Calpains	Mamíferos Mamíferos
CD	C14	Caspases	Mamíferos
CL	C60	Sortases	<i>Staphylococcus aureus</i>
PA	C3A-C3G C30	Proteases picornaviral Principais proteases coronavirais	HRV, HAV TGEV, SARS-CoV *

*HRV: Rinovírus humano, HAV: Vírus da hepatites A, TGEV: Vírus da gastroenterites transmissível, SARS-CoV: coronavírus do síndrome respiratório agudo grave

Fonte: Vicik et al, 2006 (36)

A família C1A é muito bem conservada estruturalmente. De fato, os resíduos de aminoácidos são diferentes, mas o enovelamento é exatamente o mesmo; porém, as pequenas diferenças são utilizadas na concepção de inibidores específicos e seletivos para a protease alvo da terapêutica de infecções parasitárias, sem afetar as enzimas do hospedeiro.

1.4.1 Cruzaína

É a maior protease lisossomal do *T. cruzi*. Está classificada no clã CA das cisteíno proteases, com 35-45% de homologia com a cathepsina L (CatL) (1). A cruzaína desempenha um papel vital em todas as fases do ciclo de vida do parasito. Está envolvida na degradação de proteínas para a alimentação, a remodelação da célula hospedeira e a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (37,38).

Em comum com outras cisteíno proteases da família da papaína, a cruzaína contém um peptídeo-sinal, um pró-peptídeo e um domínio catalítico PepC1, (equivalente à enzima madura proteoliticamente ativa)(39). O pró-peptídeo é necessário para o enovelamento correto e a ativação do domínio catalítico (40). A extensão C-terminal é altamente imunogênica, é liberada a partir do domínio maduro no hospedeiro durante a infecção (31).

Existem várias estruturas cristalográficas depositadas na base de dados PDB (Protein Data Bank, www.pdb.org), (41), uma delas mostrada abaixo (Figura 6) com código PDB 2AIM, co-cristalizada com benzoil-arginina-alanina-fluorometilcetona.

Figura 6 – Estrutura cristalográfica da cruzaína (PDB:2AIM) Em destaque os resíduos que participam do mecanismo catalítico

Fonte: Protein Data Bank PDB: 2AIM

A enzima madura é constituída por 215 resíduos de aminoácidos enovelados em dois domínios, o N-terminal (domínio L) principalmente helicoidal e o C-terminal (domínio R), composto por folhas β antiparalelas.

1.4.2 Mecanismo de proteólise

Entre os dois domínios N e C-terminal, situa-se o sítio ativo da cruzaína que reconhece o substrato em uma conformação estendida. Esse sítio é constituído por a) uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácido Cys25, His159, e Asn175 (numeração de acordo com a sequência da papaína) (Figura 6), sendo os dois primeiros responsáveis diretos pela proteólise da ligação peptídica, e o último resíduo atua como aceitador de ligação hidrogênio para o grupo imidazol da His159, permitindo a formação de um par iônico tiolato-imidazol permanente como demonstrado na Figura 7b (34). Os subsítios de reconhecimento orientam apropriadamente, por meio de interações reversíveis, o grupo eletrofílico do substrato ou inibidor (*warhead*) no interior do sítio ativo aproximando-o à espécie nucleofílica para a catálise acontecer ou ser inibida.

Figura 7 – Formação do par iônico tiolato-imidazólio na cruzafina

Fonte: Adaptado de Powers *et al*, 2002 (30)

Quando são alocados substratos proteicos dentro da cavidade catalítica, a hidrólise da ligação peptídica envolve um estado de transição tetraédrico (Figura 8), formado pelo ataque do tiolato da cisteína nucleofílica ao carbono carboxílico do substrato, com a estabilização do oxoânion por meio de ligação hidrogênio com resíduos de aminoácido da proteína. A interação com a cavidade do oxoânion é geralmente essencial para a hidrólise eficaz do substrato mas, nas cisteíno proteases, por exemplo, a cavidade do oxoânion é muito mais flexível quando comparado com serino proteases (34).

Figura 8 – Estado de transição de cisteíno-proteases na hidrólise da ligação peptídica.

Fonte: Autoria própria

O intermediário tetraédrico é transformado em uma acil-enzima (enzima-substrato tioléster), com a liberação simultânea da porção C-terminal do substrato (acilação). Este passo é seguido pela hidrólise da acil-enzima, formando um segundo intermediário tetraédrico que se desfaz e libera a enzima livre e a porção N-terminal do substrato (desacilação) (39). A reação é mostrada no Esquema 1.1.

Esquema 1.1 – Reação de hidrólise do substrato em cisteíno proteases

Fonte: Adaptado de Lecaille, Kaleta and Brömme, 2002 (39)

1.4.3 Sítio ativo da cruzaina

Os bolsões de ligação chamados subsítios são nomeados de acordo com a nomenclatura Schechter e Berger (42) subsítios na direção N-terminal são denominados S1, S2, S3 ... Sn, e subsítios em direção C-terminal são denominados S1', S2', S3'...Sn'. A porção do substrato ou inibidor apropriado ligado a cada um dos subsítios são designados como P1, P2, P3, etc. e P1', P2', P3', etc. (43). Para a cruzaina existem quatro subsítios, evidenciados pelos estudos cristalográficos, mostrados na Figura 9, onde este enzima foi cocristalizada com o inibidor K777.

Figura 9 – Sítio ativo da cruzaina representado por superfície de Van der Waals.

Fonte: Adaptado Wiggers. H, *et al*, 2013 (44)

O subsítio S1, onde se localiza a tríade catalítica, é o único que possui característica hidrofílica. O subsítio S2 é de natureza hidrofóbica e possui o resíduo flexível Glu208, o que possibilita à cruzaina tolerar resíduos básicos ou hidrofóbicos, como Phe ou Tyr. Além disso, este subsítio é determinante da especificidade do substrato (40). Os subsítios S3 e S1' são menos específicos, mais superficiais e hidrofóbicos.

A estrutura cristalográfica da cruzaina co-cristalizada com o inibidor K777 mostrada na Figura 9, permitiu fazer uma sondagem do sítio, vislumbrando algumas interações intermoleculares importantes para o reconhecimento de inibidores desta enzima, como a formação de ligações de hidrogênio com Gly66 e interações hidrofóbicas dos anéis aromáticos com Gly23, Ala133 e Leu67.

De acordo com o conhecimento de seu sítio ativo e, levando em conta a sua importância como fator fundamental da virulência na invasão e sobrevivência do parasito, a cruzaina é um excelente ponto de partida como alvo para o planejamento de fármacos úteis para o tratamento da Doença de Chagas.

Com base nessas ideias, o objetivo é inibir a enzima e assim evitar a invasão da célula hospedeira e bloquear a replicação, bem como a diferenciação entre as formas intracelulares amastigotas e tripomastigotas.

1.5 Inibidores da Cruzaína

1.5.1 Inibidores irreversíveis

Atualmente os inibidores de cisteína proteases mais potentes são inibidores irreversíveis; isto é, aqueles que reagem com a enzima modificando a sua estrutura química por ligação química. Podem atuar como agentes alquilantes da enzima através do deslocamento nucleofílico ou adição conjugada, por exemplo, como o caso de fluorometil cetonas, aciloximetil cetonas, vinil sulfonas ou epoxisuccinatos.

A primeira geração de inibidores da cruzaína corresponde aos inibidores irreversíveis, uma classe de compostos chamados peptidomiméticos, que em suas estruturas têm como *warhead* a vinilsulfona ($R-C=C-SO_2-R_1$), responsável pela interação irreversível com o resíduo de Cys25 através de uma adição conjugada de Michael, originando uma ligação covalente carbono-enxofre. O protótipo desta classe de compostos é o composto K777 (Figura 4).

Foram feitas várias modificações estruturais neste composto com o intuito de obter novos análogos ativos, baseados principalmente em duas estratégias: (1) introdução de grupos ionizáveis para produzir um aumento da solubilidade em água (Figura 10a) (32), (2) modificação da natureza do grupo farmacofórico com o fim de modular sua reatividade na reação de adição nucleofílica frente ao resíduo de aminoácido Cys25 (Figura 10b) (45,46), resultando em análogos ativos com uma potência determinada através dos valores de IC_{50}^* de 60 nM.

Figura 10 – Algumas das modificações estruturais feitas no K777

Fonte: adaptado de Maler, G and Moreira, 2012 (47)

O valor da afinidade (K_i^{**}) do composto mostrado na Figura 10c é inferior a 1 nM em estudos de inibição realizados contra a cruzaína, sendo de 100 a 1000 vezes mais seletivo para esta enzima do que para as cisteína proteases humanas, a CatL e a CatB, respectivamente (48).

* O valor de IC_{50} corresponde à concentração do inibidor que é necessária para diminuir a 50 % a atividade enzimática.

** K_i é a constante de afinidade do inibidor pela enzima

O segundo grupo de inibidores irreversíveis é constituído por um grupo de compostos não peptídicos, que têm como *warhead* a função cetona (45,49), capaz de estabelecer ligações covalentes com Cys25 (Figura 11). Neste caso, o grupo tetrafluorofenoximetilcetona lhe confere a eletrofilia necessária para que a adição da Cys25 aconteça no metileno α ao grupo carbonila (49,50).

Figura 11 – Inibidor irreversível de cruzaina com wardhead cetona

Fonte: Adaptado de Maler, G and Moreira, 2012(47)

1.5.2 Inibidores reversíveis

Outros tipos de inibidores são os inibidores reversíveis. Estes inibem a atividade da enzima pela interação com o sítio ativo através de interações usualmente não covalentes, como interações eletrostáticas, ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. No caso de inibidores reversíveis covalentemente ligados à cruzaina, há formação de um hemi-tioacetal, cetal ou um intermediário tetraédrico similar (32), que voltam às espécies originais enzima e inibidor após a hidrólise.

Estes compostos podem ser peptídicos ou não-peptídicos. A principal família de inibidores reversíveis de cruzaina está constituída por compostos não-peptídicos, como os da classe tiosemicarbazona (Figura 12). Estes últimos são caracterizados por sua simplicidade estrutural e boa potência tanto na enzima isolada como em culturas celulares. Esta estrutura privilegiada foi descoberta a partir de ensaios de triagem de coleções de compostos de laboratórios privados.

Figura 12 – Variações aromáticas feitas no esqueleto tiosemicarbazona

Fonte: Adaptado de Maler, G and Moreira, 2012(47)

A substituição do hidrogênio ilidênico ($\text{HC}=\text{N}$) por um grupo alquila favorece a potência inibitória (Figura 13b), mas os intentos de ciclização diminuem a potência (Figura 13c), assim mesmo com a redução da ligação dupla imínica (Figura 13d) e a funcionalização do grupo amina primário (Figura 13e) (22).

A substituição isostérica do átomo de enxofre, presente na função tiosemicarbazona, por oxigênio, diminui significativamente a potência, o que pode ser compreendido com a formação do intermediário tetraédrico estável resultante da adição nucleofílica do resíduo de Cys25 ao grupo tiocarbonila, quando comparado com o intermediário tetraédrico formado pela carbonila, de acordo com os coeficientes de seu orbital molecular LUMO (do inglês: *lowest unoccupied molecular orbital*). (47)

Figura 13 – Variações estruturais feitas em derivados tiosemicarbazona

Fonte: Adaptado de Maler, G and Moreira, 2012(47)

Têm sido descritos derivados arilacilidrazonas, heteroacilidrazonas ativos contra cruzáina (Figura 14), obtidos de estudos computacionais de docking molecular ou outras técnicas de triagem virtual.

Figura 14 – Compostos *N*-acilidrazonas inibidores de cruzáina

Fonte: Adaptado de Maler, G and Moreira, 2012 (47)

Apesar do considerável sucesso, muitos potenciais inibidores, incluindo aqueles que entram em ensaios clínicos, acabam por ser rejeitados devido aos seus perfis farmacocinéticos insuficientes ou potenciais efeitos *off-target*, sendo por isso necessário construir múltiplos inibidores cruzáina que podem ser otimizados em distintos candidatos terapêuticos.

A importância da presença de um grupo eletrofílico como principal subunidade farmacofórica de inibidores de cisteína proteases levou-nos à busca de *wardheads* que se ligam à Cys25 de modo covalente reversível, que possuam menos efeitos adversos quando comparados aos inibidores irreversíveis, devido às suas interações *off-target*. Nesse contexto, destacam-se as nitrilas, já amplamente estudadas como inibidores de cisteína proteases (34,51,52,53).

O melhor inibidor da cruzáina conhecido é a vinil-sulfona K777 que é um inibidor irreversível da enzima. Cisteína proteases, tais como a catepsina K, tem sido alvo na indústria farmacêutica que usa dipeptidil-nitrilas planejadas para formar uma ligação covalente e reversível com essas enzimas, dessa forma diminuindo/eliminando os efeitos quimogenéticos indesejáveis. Por exemplo, o inibidor da catepsina K odanacatibe (Figura 15), foi avaliado extensivamente para o tratamento da osteoporose, o que demonstra que a presença da nitrila eletrofílica na estrutura molecular pode ser compatível com a obtenção de perfis farmacodinâmico, farmacocinético e toxicológico necessários para o doseamento em seres humanos. Portanto, o nosso desafio neste trabalho é usar dipeptidil-nitrilas como esqueleto fundamental para planejamento molecular e otimização das propriedades estruturais, físico-químicas, biológicas e toxicológicas para o tratamento da Doença de Chagas. O método para

superar esse desafio baseia-se no planejamento molecular por hipótese dentro do ciclo planejamento-síntese-ensaios.

Figura 15 – Estrutura do inibidor da cathepsina K odanacatibe

Fonte: Dossetter *et al.*, (54)

Neste trabalho, foi sintetizada uma série de inibidores peptidilnitrílicos com variações estruturais focadas na otimização da potência frente à cruzaina, modulando suas interações não covalentes com a enzima.

1.5.2.1 Nitrilas como *warheads*

As dipeptidilnitrilas têm sido conhecidas como inibidores da papaína há 30 anos (32,51), e desde então vêm sendo descritas como inibidores potentes e seletivos de cisteíno proteases.

O mecanismo de ação da cruzaina sobre as nitrilas inicia com o ataque nucleofílico do tiolato da Cys25 ao carbono *sp* da nitrila formando um tioimidato. Esta é uma reação reversível, mas os tioimidatos ligam-se eficientemente pois, de acordo com o princípio HSAB*, a adição do enxofre nucleófilo mole polarizável das cisteíno proteases ao carbono eletrofílico mole da ligação tripla do CN é favorecida.

De um ponto de vista enzimológico, existe uma diferença na estabilização do estado de transição tetraédrico de hidrólise da ligação amida, quando comparada com a ligação nitrílica: as cisteíno proteases são mais propensas a aceitar ao tioimidato plano formado a partir de um inibidor nitrílico ao invés do estado de transição tetraédrico formado após a hidrólise de um substrato peptídico (Löser *et al.*, 2005) (Esquema 1.2).

* Acrônimo do inglês Hard and Soft Acid and Bases ("ácidos e bases duros e moles"). Teoria proposta por Ralph G. Pearson em 1963, amplamente usada em química para explicar a estabilidade dos compostos químicos e reações químicas.

Esquema 1.2 – Formação reversível de tioimidato de dipeptidil-nitrilas e cisteína proteases

Fonte: Adaptado de Löser *et al.*, 2005(34)

Greenspan e colaboradores (55) sintetizaram uma série de compostos peptidilnitrilas inibidores de CatB. Um destes inibidores (Figura 16) teve um valor de $IC_{50} = 0.012 \mu M$ e foi 100 vezes seletivo em relação às outras catepsinas. Os dados estruturais de cristalografia de raios-X deste composto ajudaram na elucidação do mecanismo de inibição de dipeptidil-nitrilas.

Figura 16 – Compostos dipeptidilnitrilas testados em CatB

Fonte: Adaptado de Greenspan *et al.*, 2001(55)

A estrutura destes compostos permite complementariedade com o sítio catalítico da enzima, e podem estabelecer interações hidrofóbicas ou polares, levando a potências dentro da mesma faixa nM, como mostrado para os inibidores da Figura 16.

Em outro estudo, feito por Ward e colaboradores (56), agora focado em CatS, foram planejados e sintetizados inibidores dipeptidilnitrilas com o intuito de explorar os subsítios S1, S2 e S3 dessa enzima. Essa busca resultou em inibidores com inibição da enzima na ordem de picomolar e com atividade no sistema celular (Figura 17)

Figura 17 – Estrutura geral de compostos dipeptidilnitrilas testados em CatS

Fonte: Adaptado de Ward *et al.*, 2002 (56)

Outra série de inibidores tipo dipeptidil-nitrilas foi testada em catepsinas por Löser e colaboradores (34) e estudadas suas seletividades entre catepsinas L, K, S e papaína, fazendo variações estruturais na porção da molécula que interage com o subsítio S2 do sítio ativo das catepsinas (P2) (Figura 18). Estas enzimas comportaram-se sensivelmente a mudanças sutis na porção P2 do inibidor, o que nos abre o caminho para testar este tipo de inibidores em cruzaína, dada a similaridade estrutural dos sítios ativos.

Figura 18 – Representação 2D da estrutura geral de compostos dipeptidilnitrilas testados em CatL

Fonte: Adaptado de Löser *et al.*, 2005(34)

1.6 Síntese orgânica em química medicinal

Algumas características desejáveis de compostos candidatos a fármacos, como a baixa lipofilia ($\text{ClogP} < 3$) e alta solubilidade em meio aquoso, tornam-se um desafio para o químico medicinal sintético, pois a introdução de fragmentos polares ou fragmentos contendo funcionalidades de modo a obedecer tais características podem reduzir o rendimento da reação, o que leva a um menor aproveitamento dos métodos sintéticos. Em sua grande maioria, estão focados em compostos que possuem alta lipofilia ($\text{ClogP} > 4$; Figura 19) (57).

Figura 19 – Lipofilia (clogP) Vs. massa molecular.

Fonte: Cooper, Campbell and Macdonald, 2010 (57)

Cada quadrado colorido na Figura 19 representa um membro de uma matriz a partir da literatura. A área sombreada em vermelho é o espaço da "química tradicional". A área sombreada em verde representa o espaço fármaco-similar, em que o químico medicinal pode operar. Tendo um espaço para desenvolvimento de compostos bioativos limitados pela massa e lipofilia, por exemplo, a etapa de síntese e purificação torna-se em um gargalo na busca destas substâncias bioativas.

Contudo, é necessário focar no ganho de experiência em síntese nos grupos de química medicinal, pois é, por exemplo, através da síntese que a química medicinal vê-se materializada. Por outro lado são das Universidades o maior foco da pesquisa de doenças negligenciadas, uma tarefa que não é nada fácil, mas reflete-se na autonomia de um país quanto a capacidade de estudar as próprias doenças que o afetam.

Capítulo 2

Objetivo e Justificativa

2.1 Objetivo

Síntese de compostos do tipo dipeptidil-nitrilas como potenciais inibidores reversíveis da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*.

2.1.1 Objetivos específicos

Modificar as estruturas com o intuito de estabelecer relações estrutura-atividade (SAR). Racionalizar as modificações moleculares com o objetivo de identificar as razões da atividade inibitória. Empregar tais racionalizações para desenvolvimento posterior de novos inibidores mais potentes.

2.2 Justificativa

O planejamento e o desenvolvimento de um novo fármaco são processos longos, complexos, caros e muito arriscados. Este processo envolve várias fases e somente uma pequena fração de compostos selecionados como candidatos é usada para continuar o processo de desenvolvimento de fármacos. Apesar dos elevados riscos, os potenciais benefícios para os milhões de pacientes com doenças graves representam uma motivação crescente para a manutenção do investimento nesta área. Em especial, a Doença de Chagas tem sido considerada a mais grave das doenças tropicais negligenciadas já que não tem um fármaco eficaz e os que estão disponíveis têm efeitos adversos elevadíssimos que levam os pacientes a preferir abandonar o tratamento!

Na fase inicial da pesquisa de novos compostos a ser inseridos na terapia de uma doença, o primeiro passo é definir um alvo terapêutico, que deve ter um mecanismo terapêutico comprovado, com relevância para a doença em questão (16). O alvo enzimático selecionado para este estudo foi a cruzaina por ser a principal cisteína protease expressada pelo *T. cruzi* durante a infecção, por ter um papel importante na sobrevivência do parasito e possuir excelentes estudos de validação pré-clínica. É sem dúvida, considerado um ótimo alvo terapêutico, além de ser amplamente estudado e possuir estruturas cristalográficas que dão suporte e facilitam a compreensão de seu comportamento e reconhecimento de substratos/inibidores, consequentemente auxiliando em seu estudo (42,58,59).

Na descoberta de substâncias bioativas, o processo central de construir hipótese se fundamenta em ciclos curtos de planejamento, síntese, ensaios e análise dos dados obtidos, e é conhecido como planejamento baseado na hipótese. É requerido portanto uma equipe multidisciplinar que possa abordar estas quatro etapas no desenvolvimento de substâncias bioativas.

Na etapa de planejamento racional além dos estudos computacionais relacionados à busca de entidades químicas com atividade e interações desejadas com o alvo de interesse, são previstas propriedades farmacológicas, ADME, toxicológicas, empregando diferentes métodos disponíveis, antes do início da síntese, que é geralmente a etapa que mais tempo consome. A seguir as etapas de testes e análise dos dados obtidos, são etapas que oferecem informação que será usada no seguinte ciclo do planejamento baseado na hipótese.

Capítulo 3

Planejamento e SAR

3.1 Planejamento de Inibidores de cruzaina: Composto ligante

A estratégia abordada no planejamento de novos inibidores contra a cruzaina está baseada na hipótese que inibidores de catepsinas podem ser ou originar inibidores potentes de cruzaina. Desta forma foram aplicados métodos de planejamento baseado na hipótese (60,61), que fundamentam-se em ciclos curtos de planejamento-síntese-avaliação biológica-análise dos dados associados a uma série inicial de inibidores para propor novas mudanças estruturais construindo uma série de compostos mais ampla. Assim cada passo depende muito das entradas e saídas de informação dos outros três componentes que devem ser levados em consideração antes do investimento maior de recursos para sintetizar e testar novos compostos.

A hipótese levantada pode ser validada a partir das dipeptidil-nitrilas sintetizadas e avaliadas neste estudo, concebidas com base no inibidor (Figura 20) de CatL (62), nomeado pelo nosso grupo de pesquisa Neq0409. Este composto foi confirmado em nossos ensaios cinéticos como potente inibidor da cruzaina ($K_i^{app} = 0.453 \mu\text{M} \pm 0.032 \mu\text{M}$)¹.

Figura 20 – Estrutura do inibidor Neq0409

Fonte: Autoria própria

Neq0409 foi co-cristalizada com uma construção mutante (C25S) da cruzaina² e foi encontrado seu modo de ligação com a proteína (MOB, do inglês *Mode of Binding*), descrito por cristalografia de raios-X³. A estrutura do cristal está depositada no PDB com o código 4QH6 (Figura 21).

¹ K_i^{app} é uma constante cinética que indica a afinidade do composto pela enzima a uma determinada concentração de substrato.

² A enzima apresenta a substituição do resíduo catalítico Cys25 por Ser25, isto é a substituição do tiol pela hidroxila.

³ Desenvolvido pelo grupo Nequimed com a parceria do Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases (CDIPD) na University of California San Francisco, USA, pelo estudante de doutorado Fernandes, W. B.

Figura 21 – Estrutura de raios-X do complexo da substância protótipo Neq0409 e cruzaína mutante.

Fonte: PDB 4QH6, Fernandes W. F. 2014.

Do estudo de difração de raios-X foram elucidadas algumas interações do esqueleto dipeptidil para o enantiômero S, estabilizado por três ligações hidrogênio com os resíduos do sítio ativo Asp161 e Gly66.

Outras interações encontradas são do tipo hidrofóbica entre o anel benzílico da fenilalanina no subsítio S2 e resíduos de aminoácidos que conferem seletividade à interação enzima-inibidor, Leu67, Met68, Ala133, Leu157, Gly160 e Glu205, em relação a outras cisteíno proteases (63). Este subsítio é conhecido por ser grande e profundo, ter características lipofílicas, e por conferir especificidade e seletividade, em relação à enzima homóloga mais próxima presente em humanos, a CatL.

O subsítio S3 apresenta apenas uma interação com o inibidor através da Leu67, que segundo a literatura age como uma ‘pinça molecular’ em CatL (62). S3 é um subsítio superficial, grande e com poucos pontos de interação, como pode ser observado na estrutura cristalográfica de raios-X.

O modo de interação identificado para o Neq409 segue o perfil de interações adotados por outros inibidores derivados de peptídeos (peptídeo-miméticos) que são reconhecidos pela enzima cruzaína da mesma maneira que seus substratos naturais e, com o MOB do Neq0409 com a cruzaína mutante descrito por estas interações intermoleculares, pode-se inferir que o grupo nitrila liga-se covalentemente à Cys25 catalítica, como o esperado para este *wardhead*

no caso da enzima nativa. Este não é o caso para a enzima mutante, pois a hidroxila da Ser25 não encontra-se dissociada em pH 7,5.

Além da coleta das informações obtidas a partir do estudo da estrutura do complexo proteína-ligante, MOB, os ensaios bioquímico e celular do composto Neq0409, mostraram que este possui uma afinidade (K_i) pela cruzaina de 0,453 μM (Tabela 3.1) e é capaz de eliminar as formas amastigotas do parasita *T. cruzi*. Com a confirmação deste composto como inibidor da cruzaina com atividade Tripanosomicida, este composto foi adotado como protótipo para modificações estruturais com o intuito melhorar a afinidade e seletividade através de modificações moleculares que resultassem em compostos com maior complementaridade com o sítio ativo da cruzaina e que pudessem explorar interações não conservadas em outras enzimas homólogas presentes em humanos.

As interações dos inibidores com o sítio da enzima vêm-se refletidas na constante de afinidade, K_i . (Tabela 3.1), assim cada variação estrutural feita no esqueleto dipeptidilnitrila oferece a informação útil para o planejamento de inibidores do ciclo seguinte de hipóteses para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas. Deste modo, baseado na informação sobre a ocupação dos diferentes sítios da cruzaina pelos grupos químicos presentes no Neq0409, podemos estabelecer uma estrutura geral como esqueleto base para modificações moleculares de forma que com os inibidores sintetizados foi possível sondar interações não covalentes com os diferentes subsítios de cruzaina que conferem-lhe especificidade no reconhecimento molecular e maior afinidade pelos ligantes. A estrutura geral dos compostos sintetizados é apresentada na Figura 22.

Figura 22 – Representação da estrutura química básica dos inibidores dipeptidil-nitrilas sintetizados

Fonte: Autoria própria

As modificações feitas nos substituintes P1, P2 e P3 aos 17 compostos, cujas estruturas são mostradas na Tabela 3.1, juntamente com os valores de K_i obtidos do estudo cinético feito por fluorimetria, cujo procedimento é mostrado na seção 5.5.

3.2 Relações estrutura-atividade (SAR) dos compostos sintetizados

A Tabela 3.1 mostra os valores obtidos do estudo cinético feito por fluorimetria para as dipeptidil-nitrilas sintetizadas.

Tabela 3.1 – Valores de potência obtidos para os inibidores reversíveis sintetizados representados pelo valor de K_i^{app}

Compostos ID	P1	P2	P3	K_i (μM)	pK_i
Neq0579				6.34 ± 2.39	5,2
Neq0409				0.453 ± 0.032	6,3
Neq0580				0.742 ± 0.048	6,1
Neq0410				22.9 ± 2.32	4,6
Neq0412				4.61 ± 0.450	5,3
Neq0581				4.91 ± 3.79	5,3
Neq0413				0.228 ± 0.012	6,6
Neq0550				1.30 ± 0.090	5,9
Neq0551				0.192 ± 0.010	6,7
Neq0552				0.389 ± 0.066	6,4
Neq0568				0.056 ± 0.003	7,3
Neq0571				Inativa	

Tabela 3.1 – Valores de potência obtidos para os inibidores sintetizados representados pelo valor de K_i^{app} (Continuação)

Neq0534				0.391 ± 0.020	6,4
Neq0569				0.025 ± 0.001	7,6
Neq0570				0.252 ± 0.019	6,6
Neq0572				Inativa	
Neq0573				Inativa	

* Os compostos que aparecem com ligação (—) correspondem ao enantiômero S, os que aparecem com ligação (.....) correspondem ao enantiômero R e os que aparecem com ligação tracejada (- - -) correspondem à mistura racêmica

Fonte: Autoria própria

3.2.1 SAR das interações P2/S2

As modificações em P2 foram feitas com o objetivo de modular as interações com o subsítio S2, que por ter características lipofílicas e ser profundo acomoda bem substratos hidrofóbicos e volumosos. Este fato é confirmado a partir do inibidor Neq0409, o qual possui um grupo benzila ocupando este sítio. A seletividade da enzima por acomodar aminoácidos de configuração S, também foi testada através do inibidor Neq0579, o qual é o enantiômero R de Neq0409, este apresentou um K_i de $6.34 \mu\text{M}$, um valor 14 vezes maior que o inibidor Neq0409 ($K_i = 0.453 \mu\text{M}$), com uma razão eudísmica estereosseletiva igual a 1.2. Assim, podemos perceber que o sítio S2 da cruzaina é capaz de reconhecer compostos com estereoquímica R, porém com menor complementaridade do que para enantiômeros S.

Também foi feita a modificação da substância Neq0409 pela substituição do anel benzílico na posição -meta de hidrogênio por um átomo de cloro para originar o composto Neq0413. Com esta alteração buscou-se uma interação com a Leu67, que se localiza entre os sítios S2 e S3, e é um resíduo de aminoácido conservado em CatL que funciona como suporte para a molécula de tal modo que facilita as interações com o S3 (64). Esta hipótese foi confirmada por um aumento da afinidade de 0.5 vezes ($K_i = 0.228 \mu\text{M} \pm 0.01 \mu\text{M}$) em relação ao composto

Neq0409. Por outro lado o enantiômero R deste mesmo composto (Neq0581) permitiu evidenciar mais uma vez a seletividade da enzima por compostos de configuração S, devido à perda da afinidade dada pelo incremento de 21,5 vezes o valor de K_i em relação ao composto Neq0413.

Compostos contendo nitrilas constituem parte substancial fármacos em uso terapêutico. Considera-se uma estratégia importante a introdução de nitrilas na estrutura da pequena molécula para fins de estudos baseados na estrutura em projetos de química medicinal. A nitrila pode modular propriedades físico-químicas e farmacocinéticas para melhorar a biodisponibilidade, melhorar a seletividade e afinidade da interação e também para promover interações de ligação hidrogênio, interações covalentes polares e interações π - π . Além disso, a nitrila atua como bioisótero de vários grupos funcionais, tais como grupos carbonila e halogênio. Assim, a seguinte modificação foi feita com a substituição do átomo de cloro (3-cloro) pelo grupo ciano com o objetivo de explorar as interações com o S2 ((R,S)-Neq0412). O valor de K_i obtido foi 4.61 μ M, portanto seis vezes maior quando comparado com Neq0409, o que indica uma perda na afinidade que sugere uma interação menos favorável com o grupo ciano nesta posição.

Para estudar a possibilidade de interação através de um grupo doador de ligação hidrogênio ao Glu208, foi introduzida a variação na posição *-para* do anel benzílico da L-fenilalanina com o grupo hidroxila (Neq0551). Segundo Ward e colaboradores a presença deste resíduo em S2 confere-lhe especificidade dual para aceitar resíduos hidrofóbicos e polares como Phe (56). Os inibidores Neq0551 e Neq0567, derivados de L-Tyr e L-Arg respectivamente, são compostos polares que permitiram comprovar a hipótese, pois os valores de K_i que eles apresentaram foram 0.42 vezes o valor do K_i de Neq0409. Isto evidencia uma interação favorável com o resíduo de Glu208 através da doação de ligação de hidrogênio pela hidroxila do composto Neq0551 com a carboxila do resíduo Glu205, que atua como aceitador de ligação hidrogênio.

Uma vez testada a afinidade por grupos polares capazes de alcançar interações com o resíduo Glu205, moléculas contendo grupos volumosos e menos polares em P2 foram sintetizadas com o objetivo de avaliar a preferência do sítio S2 por anéis aromáticos ou grupos alquílicos, visto que este sítio possui caráter mais hidrofóbico. Então foi sintetizado o composto Neq0552, com um substituinte indol o qual apresentou um valor de $K_i = 0.389 \mu$ M, ou seja, um ganho de afinidade pela enzima em relação ao Neq0409, provavelmente pelo aumento do contato hidrofóbico devido ao volume do anel indol comparado à fenila.

Kenny e colaboradores (65) exploraram de forma eficiente a posição *-para* do grupo benzila do substituinte em P2 para explorar um sítio de interação que alonga o sítio S2 em catepsinas. Esta mesma região, na cruzaina, possui uma cavidade equivalente, porém a carboxila do Glu205 ao interagir com o nitrogênio da amida do resíduo Asn69, forma um portão que delimita esta cavidade para ocupação por substituintes. Por outro lado, McCammon e colaboradores (66) sugerem que esta região na enzima Cruzaina também pode ser explorada, sendo que anéis e cadeias alifáticas devem ser reconhecidas por este bolsão de interação. Assim o composto Neq0550, que carrega em sua estrutura éster benzílico derivado de um fenol foi sintetizado para verificar esta hipótese. O Neq0550 ($K_i = 1.30 \mu\text{M} \pm 0.090 \mu\text{M}$) se mostrou 2.87 vezes menos potente que o Neq0409, mostrando que, apesar da provável existência do bolsão, a fenila não foi reconhecida pelo mesmo. Isto pode estar relacionado à carboxila como conector entre os dois anéis, e portanto, outros derivados análogos com diferentes conectores são necessário para uma investigação mais eficiente da possibilidade de ocupação deste novo sítio.

O processo de desenvolvimento de inibidores de CatL em candidatos a fármaco para o tratamento da osteoporose(64) mostrou que esta proteína homóloga da cruzaina tem preferência pelo grupo isobutila do resíduo de leucina como substituinte em P2. Diante desta informação, procurou se avaliar se a presença de uma cadeia alquílica mais volumosa também poderia ser acomodada por esse sítio e sintetizamos o composto Neq0573, que contém um grupo neopentila na posição P2. Como mostram os dados da Tabela 3.1, esta modificação se mostra totalmente desfavorável para a afinidade do ligante com a proteína. Uma das razões mais prováveis é a repulsão estereo-eletrônica da metilas do substituinte em P2 com o substituinte em P3, visto que o sítio S2 certamente possui espaço suficiente para acomodar este substituinte.

Estudos de SAR de inibidores de anteriores (34,62), mostraram que o substituinte 1-metil-*terc*-butilpirazol-5-carboxiamida em P3 faz uma interação com o resíduo Leu69 (Leu67 na Cruzaina) presente em CatL conferindo potência e seletividade para esta enzima em relação às outras catepsinas (62). Além disso, a avaliação deste grupo como substituinte em P3 mantendo-se benzila como substituinte em P2 foi feita por Avelar, L. (67), originando o composto Neq0414 que mostrou excelente afinidade pela cruzaina ($K_i 0,135 \mu\text{M} \pm 0,008 \mu\text{M}$). Então, decidiu-se fazer uma combinação de grupos que individualmente contribuem para a afinidade, substituindo benzila por isobutila em P2, e benzoíla por metil-*terc*-butilpirazol-5-carboxiamida em P3, gerando o composto Neq0568. As substituições foram muito bem sucedidas, e o Neq0568 apresentou um valor de K_i de $0.056 \mu\text{M}$, ou seja, o dobro da afinidade em relação

inibidor Neq0414, e mais de 7 vezes a afinidade do Neq0409, sendo o composto mais potente da série.

Recentemente, nosso grupo identificou uma series de inibidores não covalentes da cruzaina contendo como farmacóforo o grupo 2-aminotiofeno-3-carboxamida e caracterizou seu modo de interação com a cruzaina através de cristalografia de raios-X(44). De acordo com a estrutura do complexo o farmacóforo ocupa um posição no sítio na qual o tiofeno se acomoda entre os subsítios S1 e S2 e dessa forma estende o substituinte ao logo do sítio S3. Na tentativa de verificar se o ciclopentil ligado diretamente ao carbono α do peptídeo central poderia funcionar da mesma maneira, foi então sintetizado o Neq0571, permitindo que sejam exploradas apenas interações no sítio S3 através do grupo benzoíla. Como pode-se perceber, houve uma perda de afinidade em relação ao o que reflete na perda de afinidade em relação ao composto Neq0409, o que de certa forma é esperado, tendo em vista a perda de interações com o subsítio S2. Por outro lado, também verificamos que mesmo com a perda de quiralidade houve reconhecimento pela proteína e dessa forma, o anel saturado deve funcionar como um bioisótero do tiofeno presente nos compostos derivados de grupo 2-aminotiofeno-3-carboxamida.

3.2.2 SAR de interações P3/S3

As variações no fragmento P3 foram feitas com base na interação do anel da piperazina presentes no K777 e no composto da Figura 23 com o subsítio da cruzaina e da CatK, respectivamente. As estruturas de seus complexos foram alinhadas e resultaram coincidentes quando superpostas, e, a partir desta observação, foi proposta a substituição do anel de piperazina por tetra-hidroisoquinolina no estudo realizado por Dossetter e colaboradores (54), levando a um incremento do pIC_{50} de 4,4 a 5,5. Foi então introduzida a função tetra-hidroisoquinolina no composto Neq0534, para nosso estudo de SAR frente a cruzaina.

Figura 23 – Estrutura do inibidor de CatK

Fonte : Dossetter e colaboradores (54)

No entanto, esta variação, não contribuiu para um ganho significativo da afinidade quando comparado com o composto prototípico Neq0409. A interação com a porção ureia é favorecida, mas não o suficiente como para incrementar a afinidade.

3.2.3 SAR de interações P1/S1

A última variação realizada neste estudo foi motivada pelo fato do grupo aminoacetonitrila ser alvo de metabolismo (64), o que levou à introdução de um anel ciclopropila em P1 para diminuir a metabolização *In vivo* antes e permitir que estes derivados tenham maior chance de chegar ao alvo de interesse intactos e assim melhorar o perfil farmacocinético da molécula, o qual foi observado nos estudos anteriormente realizados por Gauthier e colaboradores (64). Além disso, esta modificação também vem acompanhada de um incremento na afinidade, como constatado na diferença entre os valores de K_i^{app} dos compostos Neq570 (0,252 μ M) e Neq0409 (0,453 μ M), e também Neq0568 (0.056 μ M) e Neq0569 (0.025 μ M) causado pela contribuição positiva para a afinidade devido ao favorecimento do correto posicionamento do carbono eletrofílico do *warhead* para o ataque da Cys25. Por outro lado, a substituição dos hidrogênios em P1 por duas metilas que resultou no composto (R.S)-Neq0410 provoca diminuição da potência contra a cruzaina em relação a Neq0580, que corresponde ao racemato de Neq0409.

Em quanto os compostos Neq0571 e Neq0572 ambos foram inativos, não tendo um valor para comparação.

3.3 Conclusões

Algumas das razões fundamentais das relações estrutura-atividade foram estabelecidas. A afinidade experimentada pelos inibidores da cruzaina está dentro do intervalo 4,6-7,6 (valores de pK_i). O valor médio de pK_i é $6,2 \pm 0,83$. Somente um composto (R.S)-Neq0410 apresentou valor de pK_i menor que 5, portanto abaixo de nosso valor de corte que foi 4,3 para quando o inibidor de cruzaina é considerado inativo. A maior afinidade demonstrada pela cruzaina está estabelecida para o composto Neq0569 ($pK_i = 7,6$). O Neq0569 possui 26 átomos pesados, isto é, diferentes do átomo de hidrogênio e apresenta uma eficiência de ligante (LE) igual a 0,42 kcal mol⁻¹ átomo⁻¹. A sua eficiência lipofílica (LLE_{AT}) está calculada para o valor de 0,39 kcal mol⁻¹ átomo⁻¹. Portanto, este composto reúne características que justificam estudos continuados para a fase de otimização com o objetivo de classifica-lo como composto matriz.

Capítulo 4

Síntese de dipeptidil-nitrilas como
inibidores de cruzaina

4 Síntese de dipeptidil-nitrilas

4.1 Síntese do ligante

Para obter a série de compostos com a estrutura padrão apresentada na Figura 21 foram seguidas três rotas sintéticas. A primeira rota (Esquema 4.1), utilizada para a obtenção do composto protótipo (Neq0409), iniciou-se com a reação de esterificação da L-Phe, seguida pela reação de acoplamento com o cloreto de benzoíla para fornecer 2, Bz-L-Phe-OMe), após é feita a reação de hidrólise do éster para obtenção do sal de lítio do carboxilato (Bz-L-Phe-O⁻Li⁺) e subsequentemente, o acoplamento deste com a acetoaminonitrila para obter finalmente o composto desejado Neq0409.

Esquema 4.1 – Rota sintética para preparação de Neq0409

Reagentes e condições: (a) MeOH, SOCl₂, -10°C → t.a., 17 h.; (b) BzCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C → t.a., 24 h; (c) LiOH, THF, MeOH, H₂O, → t.a., 2 h; (d) H₂NCH₂CN, BOP, DIPEA, DMF → t.a., 24 h.

Fonte: Autoria própria.

Os compostos feitos por esta rota foram o Neq0410, Neq0412 e Neq0413.

4.1.1 Reação de Esterificação

A reação de esterificação foi adaptada de Sun e colaboradores (68), é foi utilizada neste trabalho para introduzir uma função protetora na carboxila do aminoácido (1). Utilizou-se, cloreto de tionila como agente ativante do grupo carboxila, formando o cloreto do ácido *in situ* a -10°C, que experimenta o ataque nucleofílico do metanol no carbono carboxílico. Esta reação é um equilíbrio que pode ser em direção aos produtos utilizando um excesso de álcool que atua ao mesmo tempo como solvente. Após 18 h de reação, o produto foi obtido com 36% de rendimento e ponto de fusão de 150-151°C.

O esquema 4.2 apresenta o mecanismo para reação de esterificação através da ativação do ácido carboxílico da L-Phe, no qual a espécie ativa é um cloreto de acila.

Esquema 4.2 – Mecanismo de reação de esterificação

Fonte: Autoria própria

A reação inicia como ataque do oxigênio carboxílico ao cloreto de tionila conduzindo à formação do intermediário clorossulfonato, que após um ataque do ânion cloreto forma um intermediário tetraédrico que decompõe-se no cloreto de acila e dióxido de enxofre. Posteriormente o oxigênio nucleofílico do álcool metílico faz um ataque no carbono carboxílico formando o éster protonado que rapidamente forma o éster metílico. O nitrogênio da amina permanece protonado nas condições de reação.

4.1.2 Reação de Hidrólise

Os metil ou etil ésteres são clivados por saponificação com KOH , NaOH ou LiOH metanólicos ou etanólicos em uma ampla gama de solventes, tais como DMF, dimetil-sulfóxido (DMSO), piridina, e misturas aquosas de álcool, acetona, EtOAc , e dioxano (69). É usada para desproteger o ácido carboxílico, e assim obter o composto 3, é uma reação quantitativa, pois o éster metílico reage com um excesso de 3 equivalentes molares de LiOH , e depois de 2 horas o ácido é recuperado como um sal de lítio por evaporação da mistura de solventes, THF, H_2O e MeOH .

A hidrólise do éster é usualmente catalisada por ácidos ou por bases, pois OR é um fraco grupo abandonador. Quando a reação é catalisada com base, como é o caso, a espécie que ataca é o nucleófilo OH^- (Esquema 4.3), formando um intermediário tetraédrico. Por outro lado, na reação catalisada por ácido, o carbono carboxílico se torna mais positivo e mais susceptível de ser atacado por nucleófilos. Essa última é uma reação reversível, que experimenta o mesmo mecanismo tanto para formação do éster como do ácido, e, por esse motivo, a hidrólise catalisada por base é mais frequentemente usada, embora seja uma reação lenta quando comparada à catálise ácida.

Esquema 4.3 – Mecanismo de hidrólise básica de ésteres

Fonte: adaptado de Smith, M and March, 2007 (70)

4.1.3 Reação de Acoplamento

A formação da ligação peptídica que envolve a formação de ligações amida não é uma reação espontânea que ocorre à temperatura ambiente. Por esta razão, é normalmente necessário primeiro ativar o ácido carboxílico, um processo que ocorre geralmente convertendo o -OH do ácido para um bom grupo de saída antes da adição da amina (71).

A reação entre intermediário ativado e a amina, conhecida como reação de acoplamento, é realizada na presença de reagentes de acoplamento. A escolha de um determinado reagente de acoplamento é determinada pela sua eficiência, altas conversões (71), baixos níveis de epimerização e subprodutos limitados (72).

4.1.3.1 Reagentes de Acoplamento

Há uma enorme variedade de reagentes de acoplamento, desde os clássicos até os mais seletivos usados atualmente na síntese de peptídeos, para garantir maior controle de racemização (71,72,73).

Entre os reagentes clássicos estão os cloretos de acila, os anidridos mistos, anidridos carbônicos ou ésteres ativos, que em geral levam a um grau de racemização do carbono α . Na tentativa de controlar esta mudança no centro quiral do aminoácido foram introduzidos reagentes como as carbodiimidas, que geralmente são usadas com um aditivo, o 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt) (Figura 24) (74), agindo não só como um supressor de racemização, mas também acelerador da velocidade de reação (72).

Figura 24 – Estrutura do composto HOBt

Fonte: Adaptado de Valeur and Bradley, 2009

Reagentes usados para estes fins, como sais de urônio, fosfônio e imônio, entre outros, já trazem em sua estrutura o supressor de racemização HOBt. Estes reagentes têm sido estruturalmente identificados (Figura 25), mas a estrutura dos reagentes de acoplamento

baseados em sais de urônio como o HATU ainda é matéria de debate, pois aparentemente elas dependem do método de isolamento, do solvente e contra ânion, etc. (75). A estrutura inicialmente reportada foi como o isômero-O, no entanto, foi demonstrado por cristalografia de raios-X, que 1-[Bis(dimetilamino) metileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridínio 3-óxido hexafluorofosfato, HATU e O-(benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronio Hexafluorofosfato, HBTU são Isômeros -*N*.

Figura 25 – Estrutura química dos reagentes de acoplamento usados na síntese das dipeptidil-nitrilas

Fonte: adaptado de Joullié and Lassen, 2010 (71)

As reações de acoplamentos utilizadas para a síntese dos inibidores deste trabalho partiram ou de cloreto de ácido ou do ácido que é ativado com um reagente de acoplamento como BOP (Figura 25), que é um sal de fosfônio, cristalino e estável, e o HATU (Figura 25), um sal de urônio.

O mecanismo de reação do BOP é mostrado no Esquema 4.4, ele pode realizar dois tipos de ataque: (1) por deslocalização dos elétrons do triazol para liberar o grupo fosfônio e subsequentemente ligar-se ao carboxilato para formar um intermediário éster ativo que é atacado pela amina e assim gerar uma ligação amida, ou (2) o carboxilato atacar ao fosfônio ligado ao benzotriazol para formar um éster de fosfônio que experimenta o ataque nucleofílico do BtO^- para formar o éster ativo que reage com a amina para gerar a amida correspondente. Devido as espécies iônicas presentes inicialmente, a reação é favorecida em solventes não polares, mas também podem ser usados solventes inertes, e por razões de solubilidade DMF é o solvente geralmente escolhido.

Esquema 4.4 – Possíveis modos de ataque na ativação por BOP.

Fonte: adaptado de Joullié and Lassen, 2010(71)

Para o caso de HATU, este pode coexistir em duas formas em solução como mostrado na Figura 23, e reagir da mesma forma que os sais de fosfônio formando um éster ativo (Figura 26) o qual realiza uma catálise intramolecular básica geral quando reage com o componente amino para oferecer a ligação amida. O último passo da reação é o passo determinante da velocidade e é o responsável pela racemização, embora eles tenham revelado se serem mais eficazes do que os reagentes de fosfônio ou de carbodiimidas na presença de derivados de hidroxilamina (76).

Estes reagentes são usualmente usados em acoplamentos com substratos impedidos e dão um mínimo de racemização (71).

Figura 26 – Ativação por HATU.

Fonte: adaptado de Joullié and Lassen, 2010 (71)

No caso do protótipo, a rota mostrada no Esquema 4.1 utiliza o acoplamento com cloreto de benzoíla e acoplamento com BOP.

A análise de Neq0409 por cromatografia de alta eficiência (HPLC), usando uma coluna quiral de celulose (2-phase da Phenomenex, tamanho de partícula 5 μm , tamanho de poro 1000 $\text{\AA}$), permitiu concluir que a síntese levou a uma mistura racêmica.

Este resultado pode ser devido à etapa de acilação com cloreto de benzoíla, a qual representa um sério obstáculo para a obtenção do produto desejado na forma

enantiomericamente pura, devido a formação de enolato pela ativação por meio do cloreto de tionila.

A razão para ter acontecido racemização via o cloreto de acila é que o ácido ativado é altamente reativo, portanto, propenso a numerosas reações colaterais, assim como ocorre com outros reagentes de cloração, como cloreto de pivaloil, cloreto de ftaloil, cloreto de tionila, cloreto de oxalila, entre outros (72).

A reação com cloreto de benzoíla, feita no solvente cloreto de metileno e pH básico ~9, usando trietilamina (TEA) é uma condição que favorece a racemização do aminoácido, ajudado também pela estrutura molecular do mesmo, se possui grupos retiradores de elétrons ou grupos volumosos. Isto pode ser explicado pela compreensão do mecanismo de racemização.

A perda da configuração pode seguir dois caminhos principais: (a) enolização direta (Rota A) e (b) formação de 5(4H)-oxazolona (Rota B) (Esquema 4.5), (73).

Esquema 4.5 – Mecanismo de reação para racemização: (Rota A) enolização direta, (Rota B) formação de 5(4H)-oxazolona

Fonte: Adaptado de El-Faham and Albericio, 2011(73)

Seja qual for o mecanismo, o intermediário formado, carbânion (Rota A) ou íon oxazolônio (Rota B), pode ser estabilizado ou desestabilizado de acordo com a estrutura do aminoácido.

Os grupos laterais ligados ao carbono α do aminoácido influenciam na velocidade de racemização, onde grupos que estabilizam o carbânion aceleram, e grupos que desestabilizam o carbânion retardam a racemização. O efeito geral do grupo lateral do aminoácido depende da combinação das características de retirador ou doador de elétrons (fatores eletrônicos), e seu

volume e forma (fatores estereoquímicos) (77). Grupos volumosos podem impedir a remoção do próton, e, assim, diminuir a velocidade de racemização. Foi citada a seguinte ordem de racemização dos aminoácidos em um estudo prévio por Smith e Colaboradores, 1978, para aminoácidos livres em solução aquosa.

A partir do fato do composto protótipo ter racemizado nessas condições de reação, uma rota alternativa (Esquema 4.6) foi utilizada para a síntese do composto Neq0409. Os outros compostos que também foram sintetizados por esta rota foram separados por cromatografia quiral.

4.2 Síntese dos compostos Neq0409, Neq0570, Neq0573, Neq0568 e Neq0569

Esquema 4.6 – Rota sintética para preparação de Neq0409, Neq0570, Neq0573, Neq0568 e Neq0569

Reagentes e condições: (a) (Boc)₂O, THF, NaHCO₃, 0°C → t.a., 24h; (b) HATU, DMF, DIPEA, HCl·H₂NCH₂CN ou HCl·H₂NC(C₃H₅)CN → t.a., 24 h. (c) ácido fórmico → t.a., 24 h; (d) C₆H₅-COOH, HATU, DMF, DIPEA → t.a., 24 h.

Fonte: autoria própria

Esta rota se iniciou-se com a proteção do nitrogênio do aminoácido com o anidrido di-*tert*-butil dicarbonato (Boc)₂O, formando um carbamato derivado de Boc. A proteção do nitrogênio como carbamato de Boc diminui a probabilidade de formação oxazolona (73). Em seguida foi feito o acoplamento com aminoacetonitrila usando HATU como reagente de acoplamento, para a obtenção do derivado (2) de L-Phe com 85% de rendimento. Então, foi feita a desproteção do Boc usando ácido fórmico para obter o derivado (3) de L-Phe com 86 % de rendimento. Geralmente, para a desproteção deste grupo é utilizado o ácido trifluoroacético, mas este que acaba por hidrolisar a nitrila, impedindo a obtenção do produto final. O método de proteção com Boc oferece rendimentos muito bons, mas sempre a baixa temperatura, além disso os subprodutos, CO₂ e *tert*-butanol podem ser removidos facilmente.

Uma vez desprotegido o nitrogênio, foi neutralizado para sua posterior reação de acoplamento com o ácido benzóico realizado com HATU. Foi obtido o derivado (4) de L-Phe com 73 % de rendimento. A análise cromatográfica por meio de coluna quiral comprovou a presença do enantiômero desejado, o enantiômero S.

A caracterização espectroscópica do composto Neq0409 é mostrada a seguir.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), mostrado na Figura 27, é uma expansão do espectro que também encontra-se na seção de anexos.

Figura 27 – Espectro de RMN- ^1H de Neq0409, obtido em DMSO.

Fonte: Autoria própria

Neste espectro os sinais que permitem evidenciar os dois acoplamentos feitos à L-Phe através dos sinais **b** e **c**, os quais correspondem às duas ligações amida, no caso de **b** a multiplicidade é um dubleto (**d**), por causa de sua vizinhança ao próton α , cujo sinal é um multipletto em 4.69 ppm (**a**). O sinal do próton **c** é um tripleto (t) devido a que é afetado pelo spin nuclear do metileno vizinho da nitrila, o qual é um dupleto no sinal de RMN a 4.16 ppm. Os prótons benzílicos (**d**) são enantiotópicos ou pro-quirais, pois sua substituição originaria um centro quiral, e no espectro de RMN ^1H de fato eles aparecem com deslocamentos químicos diferentes (Figura 28).

Figura 28 – Prótons benzílicos de Neq0409, obtido em DMSO.

Fonte: Autoria própria

Por sua parte os prótons aromáticos da benzoíla aparecem à esquerda da fenila da L-Phe, por ser estar menos blindados devido à ligação amida. Os prótons **f** e **i** tem sinais dubleto, enquanto **g**, **h** e **j**, **k** são triplete.

Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C de Neq0409, obtido em DMSO.

Fonte: Autoria própria

No Espectro de RMN ^{13}C (Figura 29) é possível observar o sinal dos carbonos sp^2 das amidas, estes sinais para as carbonilas são os que aparecem à esquerda no espectro. Na região entre 127 e 138 ppm aparecem os carbonos aromáticos, o carbono da nitrila aparece a 117,90 ppm. O carbono α está deslocado a 55.80 ppm, e o carbono benzílico e metilénico estão a 37,84 e 28,21 ppm, respectivamente.

A caracterização dos compostos feitos por esta rota é apresentada no capítulo 5 e os respectivos espectros na seção de anexos.

4.3 Síntese dos compostos Neq0550, Neq0551, Neq0552, Neq0567, Neq0571 e Neq0572

Nem todos os compostos sintetizados seguiram esta última rota, já que alguns deles, por razões eletrônicas, não experimentaram racemização, como foi o caso dos compostos derivados da L-Tyr (Neq0550 e Neq0551), L-Trp (Neq0552), L-Arg (Neq0567), e por razões óbvias, os compostos derivados de Cicloleu (Neq0571 e Neq0572), que não contém centro quiral. Para estes compostos foi seguida uma rota mais simples, de dois passos, mostrada no Esquema 4.7.

Esquema 4.7 – Rota sintética para preparação de Neq0550 e Neq0551, Neq0552, Neq0567 Neq0571 e Neq0572

Reagentes e condições: (a) NaOH Aq., BzCl, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 2 h; (b) HATU, DMF, DIPEA, $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CN}$ ou $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{NC}(\text{C}_3\text{H}_5)\text{CN} \rightarrow \text{t.a.}$, 24 h. ou NMM, THF, IBCF, $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CN}$, $-20^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 2 h

Fonte: autoria própria

Estas duas reações já foram discutidas nas anteriores rotas sintéticas, mas alguns dos aminoácidos usados com esta rota são especiais por que apresentam grupos básicos na cadeia lateral, que representam um eventual inconveniente nas reações de acoplamento, pelo que seria necessário fazer reações de proteção destes grupos para propósitos sintéticos.

4.3.1 Proteção do grupo guanidínio de Arg

O grupo guanidínio da L-arginina possui três nitrogênios N^δ , N^ω , e $\text{N}^{\omega'}$, que de não ser protegidos podem estar envolvidos na formação de δ -lactamas (Esquema 4.8 a), derivados de cicloheptano (Esquema 4.8 b), e desguanidilação de Arg a Orn (Esquema 4.8 c), no entanto não tem sido conseguida uma proteção ideal para estes nitrogênios. A eficácia da proteção é

determinada pela propriedade do grupo protetor (Pg) de ser retirador de elétrons ou de seu volume (ou pela combinação de ambos os fatores) (69).

Esquema 4.8 – Reações competitivas dos resíduos Arg desprotegidos.

Fonte: adaptado de Sureshbabu and Narendra, 2011(69).

As proteções mais comuns são através de protonação, nitratação, pois o grupo NO_2 é um forte retirador de elétrons e impede a formação de δ -lactamas, o grupo pode ser removido por hidrogenação catalítica ou redução com SnCl_2 ou por tratamento com HF anidro. Outra metodologia é mudar a estratégia sintética, usando resíduos de Orn para depois ser convertido a Arg por guanidilação do grupo δ -amino por reagentes como N,N^1 -bis(alcoxicarbonil)tiourea (Figura 30a), N,N^1 -bis(alcoxicarbonil)-2-trifililguanidina (Figura 30b), ou N,N^1 -bis(alcoxicarbonil)pirazol-1-carboximidamida (Figure 30c)(69).

Figura 30 – Agentes guanidilantes para converter Orn a Arg

Fonte: adaptado de Sureshbabu and Narendra, 2011(69)

A estratégia empregada na síntese do composto Neq0567, foi protonação, pois o grupo guanidínio é fortemente básico ($\text{pK}_a = 12.5$) existe na forma protonada a maior parte do tempo da reação de acoplamento com cloreto de benzoíla, assim manter o pH por abaixo deste valor foi chave para conseguir o produto desejado, e por sua vez evitar reações competitivas.

Embora o N^o protonado pode ser parcialmente desprotonado durante o acoplamento por componentes moderadamente básicos na mistura de reação e levar a ciclização com o resíduo C-terminal para dar δ -lactama, reduzindo o rendimento da reação.

Para a reação de acoplamento, foi necessário empregar um excesso molar de 2 equiv. de L-Arg, reagente de acoplamento HATU e HOBT, em relação ao sal hidrolórico de acetoaminonitrila, esta mistura é considerada inativa, porque não tem sido adicionada a base, que é convencionalmente usada para promover o acoplamento ao acetoaminonitrila, a qual é adicionada imediatamente depois de ser adicionada a base DIPEA. É evitado o uso de um excesso molar de DIPEA e essencial, manter a temperatura durante todo o tempo de acoplamento entre -5°C e 5°C, seguindo indicações da patente EP1968995A1 (78), tudo isto para evitar a auto-ciclização da Bz-L-Arg.

4.3.2 Proteção do grupo indol de Triptofano (Trp)

Para a síntese da substância Neq0552, derivada do Trp, se optou pela não proteção do grupo indol. A reação de acoplamento ao cloreto de benzoíla foi feita em meio aquoso básico, entre pH 9.4 e 10.5, com o objetivo de ter o nitrogênio α desprotonado, mas não o N indólico. Sob estas condições de reação é provável que tenha ocorrido reações competitivas que diminuam o rendimento o qual foi de 79%.

O grupo indol de Trp pode experimentar reações colaterais, como alquilação, sulfonilação, oxidação (para produzir um derivado oxiindol, Esquema 4.9 a), e dimerização (devido à auto-acilação por um Trp protonado) em condições de desproteção catalisada por ácidos, como por exemplo terc-butilação durante a remoção do grupo Boc. As posições 1 (N indólico) e 2 no resíduo indólico são susceptíveis de substituição eletrofílica para gerar os derivados b (em médio fortemente básico) e c do Esquema 4.9(69).

Esquema 4.9 – Reações competitivas do Trp desprotegido

Fonte: adaptado de Sureshababu and Narendra, 2011(69)

O segundo acoplamento foi feito usando isobutilclorofornato (IBCF) a -20°C , por 2 horas em atmosfera de argônio, condição de reação que evita algumas das reações competitivas como a oxidação na posição 2, ou o ataque eletrofílico na posição 1. O mecanismo de acoplamento usando IBCF é mostrado no Esquema 4.10.

Esquema 4.10 – Mecanismo de acoplamento com anidridos mistos

Fonte: Adaptado de El-Faham and Albericio, 2011(73)

O método de anidridos mistos, onde a primeira é a etapa de ativação ou formação do anidrido, o reagente comumente usado é o IBCF o qual reage com o amino ácido em presença de uma amina terciária (geralmente a mais usada, por dar melhores rendimentos é a N-metilmorfolina (79), e um solvente inerte para formar dióxido de carbono. A segunda etapa é a condensação do anidrido com a amina para dar a ligação amida. O ataque nucleofílico ocorre no carbono carboxílico original, devido a que o carboxilo que provém do derivado carbônico encontra-se flanqueado por dois átomos de oxigênio que diminuem sua reatividade (Esquema 4.10). O método provê uma velocidade de reação rápida em baixas temperaturas, com altos rendimentos y fácil purificação do bruto da reação.

A principal reação colateral é a formação de uretano, dada pela aminólise na carbonila da porção carbonato (Rota B), mas na maioria dos casos esta reação não tem grande importância, pois pode ser evitada limitando a quantidade de reagente e incrementando o tempo de ativação.

4.3.3 Proteção do grupo fenol de Tirosina (Tyr)

A função fenólica de Tyr permite-lhe ser facilmente acilada em presença de um excesso de agente acilante devido à formação de íon fenóxido de natureza nucleofílica, uma característica que foi aproveitada para proteger o N^{α} e a hidroxila usando 2 equivalentes de cloreto de benzoíla. O procedimento foi tomado de Hu e colaboradores (80). Uma vez protegida esta

função a solubilidade do composto em água diminuiu notavelmente o qual facilitou sua purificação em um work-up aquoso, produzindo um rendimento quantitativo.

A segunda reação de acoplamento foi feita com IBCF a -20°C com um rendimento de 95%, fornecendo o Neq0550. O mesmo rendimento foi obtido usando HATU. A substância Neq0550 foi submetida a hidrólise básica em K_2CO_3 metanólico, que levou a formação de três compostos como mostrado no esquema 4.11.

Esquema 4.11 – Reação de hidrólise do composto Neq0550

Fonte: autoria própria

O composto A foi identificado por sua massa em uma fração obtida da purificação por cromatografia de coluna, com um rf. (0.3(hex/AcOet 3:7)) muito parecido ao do composto Neq0551 (rf. 0.31(hex/AcOet 3:7)), que não foi possível separar por esta técnica, mas se por cromatografia em camada delgada preparativa. O composto não foi caracterizado por outra técnica analítica, pelo que a sua estrutura é só uma proposta.

4.4 Síntese de Neq0534

Por último está o composto Neq0534. Este tem uma funcionalidade carbamida em sua estrutura e por isso a sua síntese é feita de um modo diferente. Inicialmente se protegeu a carboxila da L-Phe como éster metílico, usando a reação de ativação do ácido com cloreto de tionila. Depois foi formado um isocianato (Esquema 4.12, 2), usando o reagente trifosgênio. O isocianato intermediário foi estável, e usado na seguinte reação, assumindo um rendimento quantitativo.

O procedimento para sintetizar o isocianato e acoplamento com a base tetra-hidroisoquinolina foi adaptado do artigo de Yan e colaboradores (3). O composto (3) (Esquema 4.12) foi obtido com 63 % de rendimento. Os dois passos subsequentes foram a desproteção do ácido com hidróxido de lítio e o acoplamento com acetoaminonitrila com HATU, para obter (4) (Esquema 4.12). A desproteção do éster deu o ácido com 91 % de rendimento, enquanto a reação de acoplamento deu um rendimento de 32%.

Esquema 4.12 – Rota sintética para preparação de Neq0534

Reagentes e condições: (a) CH_2Cl_2 , $\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$ (trifosgênio), NaOH aq. $0^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$, 15 min; (b) tetra-hidroisoquinolina, THF, DIEA $0^\circ\text{C} \rightarrow 10$ min, 2 em THF $\rightarrow$ t.a, 12 h; (c) LiOH , THF, MeOH, H_2O , $\rightarrow$ t.a, 2 h; (d) HATU, DMF, DIPEA, $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CN} \rightarrow$ t.a, 24 h.

Fonte: autoria própria

Como aconteceu com o composto protótipo, a rota de síntese do Neq0534 gerou uma mistura racêmica, devido à formação do isocianato, um grupo retirador de elétrons que estabiliza o carbânion formado devido às condições de reação fortemente básicas ou também devido à reações de esterificação e hidrólise. Este composto foi isolado de seu enantiômero R usando HPLC com coluna quiral, as condições cromatográficas são descritas no capítulo 5 na seção de métodos experimentais. O mecanismo de formação de isocianato e seu posterior acoplamento com uma amina (aminólise) é apresentado no Esquema 4.13.

Esquema 4.13 – Mecanismo da reação de formação de isocianato e aminólise

Fonte: autoria própria

Algumas das vantagens da utilização do reagente trifosgênio são a fácil eliminação dos sub produtos (fosgênio e HCl) por evaporação e o curto tempo de reação.

4.5 Conclusões

Foram exploradas várias estratégias para formação de ligações amida em função do aminoácido empregado, com rendimentos aceitáveis para ter-se quantidades suficientes dos produtos a serem caracterizados e testados nos ensaios enzimáticos e celulares.

A rota sintética que levou a obtenção de compostos enantiomericamente puros é a rota que usa proteção do N^α com Boc e o posterior acoplamento com acetoaminonitrila.

A síntese e purificação dos compostos derivados de aminoácidos polares como L-arginina foram desafiantes, devido ao fato destes serem solúveis em solventes polares e um *work-up* aquoso ter que ser evitado.

Capítulo 5

Materiais e Métodos Experimentais

5 Materiais e Métodos

5.1 Materiais

Foram utilizados na síntese solventes como hexano, acetato de etila, clorofórmio, dimetilformamida, tetraidrofurano, metanol, todos adquiridos da Synth e VETEC. Quando necessário, foram secados sob peneira molecular 3 Å (20% m/v)

Enquanto solventes empregados em cromatografia de alta eficiência (HPLC) foram fornecidos pela empresa Tedia. Reagentes de acoplamento como HATU e BOP foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, o trifosgênio foi fornecido pela empresa Across, Ltda. (com especial agradecimento ao Prof. Dr. Fernando Coelho da UNICAMP que o forneceu), e alguns compostos precursores pela Combi Blocks, todos com pureza superior a 97 % e utilizados conforme iam sendo recebidos.

5.2 Equipamentos para separação e caracterização dos precursores e produtos finais

Entre outros equipamentos utilizados estão a balança analítica DENVER INSTRUMENT APX-200, o rotaevaporador Marca IKA modelo RV 05 basic.

No monitoramento das reações foi usada Cromatografia em Camada Delgada (placa de CCD, Fluka, matriz sílica gel, suporte de alumínio, com indicador fluorescente 254 nm e espessura da camada de 200µm), reveladores: iodo sublimado, vanilina e luz ultravioleta (UV). Para purificação em coluna cromatográfica utilizou-se sílica gel 60 (0,063-0,2mm), e sílica gel Flash (tamanho de poro 60Å, tamanho de partícula 220-440mesh (35-75 µm) de Fluka). Foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) usando um Cromatógrafo Líquido, série Prominence 20AT da Shimadzu, com detecção por arranjo de diodos (DAD) spd-M20A, coletor de fracciones FRC-10, e coluna quiral de celulose 2-phase da Phenomenex, tamanho de partícula 5 µm, tamanho de poro 1000 Å) na purificação das misturas racêmicas.

Os pontos de fusão foram determinados no aparelho digital de ponto de fusão Química Micro MQAPF-302, Microquímica Equipamentos Ltda.

Para análise estrutural dos produtos foram utilizadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C no equipamento Agilent Technologies modelos 500/54 Premium Shield e 400/54 Premium Shield na Central de Análise Química do Instituto de Química de São Carlos (CAQI) e, a obtenção de espectros em solventes deuterados com padrão interno tetrametilsilano (TMS), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) e clorofórmio deuterado (CDCl_3), comprados da Sigma-Aldrich.

Na confirmação da identidade dos compostos foi utilizada a técnica de espectrometria de massas no Espectrômetro de Massas do tipo Quadrupolo/Tempo de voo (QqTOF) da Bruker Daltonics, do grupo de cromatografia do Instituto de Química de São Carlos.

5.3 Reagentes usados em ensaios bioquímicos

Os reagentes usados na preparação de soluções tampão foram fosfatos de sódio monobásico e dibásico, etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), Triton-x100, acetato de sódio, glicerol, cloreto de sódio, ZFRMCA, os quais foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O reagente Ditiotreitól (DDT) foi adquirido da empresa USB Corporation com grau de pureza “ultrapuro”.

Todos os reagentes têm certificação do fabricante de pureza > 99 %. Nenhuma purificação/avaliação da integridade adicional foi realizada.

5.4 Equipamentos usados nos ensaios bioquímicos

Nas medições de cinética enzimática foi usado o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader da Biotek com software Gen5 1.10. Foi utilizando também uma placa de 96 poços; os filtros de banda de excitação e emissão foram de 355 nm e 460 nm respectivamente.

5.5 Determinação da afinidade

Os compostos planejados e sintetizados foram para a etapa seguinte, a avaliação da afinidade com a enzima cruzaina do *T. cruzi*, definidas em termos de equilíbrio de interação reversível bimolecular, para um inibidor competitivo, esquematizado na equação 4.1(81,82).

A equação 4.1 considera os dois extremos, primeiro o caso que o complexo covalente E-I seja governado só pela constante k_2 , sendo k_{-2} =zero, tratando-se de um inibidor irreversível, e segundo no caso que o complexo E-I não seja formado, k_2 =zero, para um inibidor reversível.

O equilíbrio de interação bimolecular covalente reversível têm valores finitos para k_2 e k_{-2} . Eles abrangem uma gama de comportamentos entre esses dois extremos, em que formação da ligação covalente aumenta o grau de inibição e assim, torna o inibidor mais potente, e em que o tempo de vida do complexo inibido é tipicamente governado por k_{-2} (82).

Assim a reação entre a enzima (E) e inibidor(I) é governado por dois parâmetros, a afinidade da interação não-covalente inicial (refletida no valor de $K_i = k_1/k_2$) e a velocidade da subsequente reação covalente E-I, (k_2), dada pela afinidade com o *warhead*.

O valor de K_i (constante cinética de afinidade) é particularmente útil a fim de expressar a afinidade de um inibidor porque, ao contrário de IC_{50} , é independente da concentração e identidade do substrato. Não sendo o IC_{50} adequado para fins comparativos da potência de diferentes inibidores testados em laboratórios diferentes (82).

Como trata-se de inibidores reversíveis competitivos, a velocidade de reação do inibidor, compete com a velocidade de reação da enzima com um substrato (S), na verdade o inibidor é outro substrato da enzima que compete pelo mesmo sítio ativo.

As reações cinéticas são conduzidas sob condições experimentais do estado estacionário, que se refere ao intervalo de tempo no qual o complexo ES é mantido em um nível constante elevado, o qual é alcançado mantendo-se a concentração do substrato em grande excesso em relação à concentração da enzima.

A concentração do S empregada deve ser maior o igual a K_M , a constante de Michaelis-Menten, que representa a concentração do S na qual a metade dos sítios ativos da enzima encontra-se saturados por moléculas de S, e está relacionada com a afinidade da enzima pelo substrato em ausência de inibidor. Um inibidor competitivo interfere com a ligação do substrato à enzima de forma a aumentar o valor de K_M sem afetar V_{max} .

No caso da cruzaina é usado um substrato peptídico ligado a uma porção fluorogênica, o N-benzóxicarbonil-L-fenilalanila-L-arginina-7-amido-metil-cumarina (Z-Phe-Arg-MCA ou ZFRMCA) (Figura 31) que após reagir com a enzima libera o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (MCA)(83,84,85), pelo que o monitoramento da reação enzimática é realizado com técnicas fluorimétricas.

Figura 31 – Substrato ZFRMCA usado nos ensaios cinéticos com cruzaina

Fonte : Adaptado de WIGGERS, H. J. (86)

Os ensaios realizados servem para medir a extensão da inibição em um determinado período de tempo para um número variado de concentrações crescentes do inibidor [I] a diferentes concentrações de substrato (87). São geradas curvas como as mostradas na Figura 32.

Figura 32 – Curvas cinéticas de inibição enzimática

Fonte: adaptado de <http://www.graphpad.com/faq/file/P4-Competitive%20inhibition.pdf> (87)

A determinação das constantes cinéticas é feita diretamente a partir de regressão não-linear destas curvas, e em segundo lugar é feito um reajuste a partir destes valores conforme à seguinte equação:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

Equação 4.2

Os valores de K_M reportados na literatura para o substrato ZFRMCA estão entre 0,96 e 1,4 μM (83,84,85). O valor obtido experimentalmente foi 1,7 nM. Os valores de K_i para cada inibidor estão dados na tabela 3.1.

5.5.1 Ensaio enzimático para determinação de K_i

A determinação do K_i foi realizada em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,5), 300 mM de NaCl, 5 mM de DTT, 5% de DMSO e cruzaína 0,15 nM. O substrato estabelecido como padrão para os ensaios cinéticos será o N-benzoxycarbonil-L-fenilalanina-L-arginina-amido-metil-cumarina (Z-Phe-Arg-MCA ou ZFRMCA) variando sua concentração no ensaio de 30 – 0,11 μM , seguindo um fator de diluição de 2x.

Os inibidores foram distribuídos em uma placa de 96 poços, nas concentrações determinadas previamente através dos ensaios de percentual de inibição entre 400 μ M a 6,8 nM dissolvidos em 100% de DMSO, estas concentrações, do mais concentrado para o menos concentrado, foram realizadas segundo um esquema de diluição serial na proporção de diluição 2 vezes, partindo da concentração mais alta de 10 mM.

Foi usado DMSO puro, como branco, e como controle o inibidor E64 (inibidor padrão)(88) em concentrações entre 2 nM e 2 μ M, com a finalidade de monitorar a concentração da enzima no correr dos ensaios.

A hidrólise do substrato foi acompanhada por fluorescência com a excitação em 355 nm e emissão em 460 nm, a 37 °C. A velocidade inicial da reação foi medida em cada poço durante um período de 5 minutos, considerando os 20 primeiros pontos da reta. Todos os experimentos foram feitos no mínimo em duplicata. A análise dos dados foi feita no programa SigmaPlot 10.0

5.6 Procedimentos sintéticos

5.6.1 Preparação do composto Neq0409

A continuação a descrição do procedimento detalhado para obter cada precursor, baseado na rota do esquema 4.1:

Éster metílico de L-fenilalanina hidrocloreto (L-Phe-OMe) (1). A uma solução de fenilalanina (10 g, 60,54 mmol) em metanol seco (22 mL) a -10°C foi gotejado lentamente SOCl_2 (3.6 equiv., 181,62 mmol, 12,86 mL), foi agitada durante 30 min a -10°C , Depois da adição o banho frio (gelo, NaCl) foi retirado e deixada aquecer até à temperatura ambiente, e a reação deixada em refluxo (60°C) durante 17 h. A mistura de reação foi secada ao vácuo a 40°C e triturado com éter etílico para a formação de um sólido branco que foi filtrado a pressão reduzida, o qual teve um peso de 4,68 g (36% de rendimento). O produto foi usado na seguinte reação sem purificação adicional. Pf $152\text{--}153^{\circ}\text{C}$ (Lit. $155\text{--}162^{\circ}\text{C}$, (89)) RMN^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,35 – 7,30 (m, 2H); 7,28 (d, $J = 7.0$ Hz, H); 7,23 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H); 4,22 (dd, $J = 7,3; 6,0$ Hz, H); 3,64 (s, 3H); 3,20 (dd, $J = 14,0, 5,8$ Hz, 1H); 3,09 (dd, $J = 14,0; 7,5$ Hz, H).

Éster metílico de N-benzoil-L-fenilalanina hidrocloreto (Bz-L-Phe-OMe) (2). A uma solução do éster metílico da fenilalanina (3,5 g, 16,23 mmol) e Et_3N (2,2 equiv., 35,70 mmol, 4,95 mL) em CH_2Cl_2 seco em peneira molecular foi gotejado lentamente a 0°C cloreto de benzoíla (1,1 equiv., 17,85 mmol, 2,07 mL), depois da adição a mistura de reação foi deixada até atingir temperatura ambiente, mantida em agitação até não ser detectado o material de partida por CCD. A mistura de reação foi lavada com HCl 1 M, solução saturada de NaHCO_3 e secada em MgSO_4 . O solvente foi evaporado ao vácuo rendendo 78% de um sólido branco, que foi purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de etila 8:2, rf: 0,4; 3,5 g) obtido 2,60 g com pf. $80\text{--}81^{\circ}\text{C}$ (Lit. $81\text{--}83^{\circ}\text{C}$, (90)). RMN^1H (400 MHz, DMSO) δ 3,13 (ddd, $J = 23,8 13,8 7,7$ Hz, 2H), 3,63 (s, 3H), 4,67 (ddd, $J = 10,0 7,9 5,4$ Hz, 1H), 7,18 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 7,32 – 7,23 (m, 4H), 7,45 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,45 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,52 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,83 – 7,74 (m, 2H), 8,83 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H).

N-benzoyl-*L*-fenilalanina (*Bz-L-Phe-OH*) (**3**). A uma solução da substância 2 (1 g, 3.57 mmol) em THF (10 mL), MeOH (5 mL) e H₂O (5 mL) foi adicionado em uma porção hidróxido de lítio (LiOH) (3,3 equiv., 256,5 mg; 10,71) mmol) a temperatura ambiente. A solução resultante foi agitada por 2 horas e então concentrada a pressão reduzida para render o produto ácido como um sal de lítio com rendimento quantitativo, usado na próxima reação sem purificação adicional. RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ 3,04 (dd, *J* = 13,3; 6,6 Hz, 1H), 3,21 (dd, *J* = 13,3; 4,8 Hz, 1H), 4,28 (dd, *J* = 11,7; 6,6 Hz, 1H), 7,13 – 7,06 (m, 1H), 7,20 – 7,14 (m, 4H), 7,41 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,48 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,71 – 7,66 (m, 2H), 7,73 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H).

1-(aminoacetonitrila)-*N*-benzoyl-*L*-fenilalanina (*Bz-L-Phe-NHCH₂CN*) (**Neq0580**). A uma solução de 3 (0,2 g; 0,73 mmol) em DMF (2 mL) foi adicionado em um porção BOP (1.2 equiv., 389,21 mg, 0,88 mmol), DIPEA (4 equiv., 0.5 mL, 2,92 mmol) e o sal sulfônico de 2-aminoacetonitrila (1,6 equiv., 180,36 mg; 1,17 mmol). A mistura de reação foi deixada em agitação a temperatura ambiente em atmosfera de argônio, depois de 24 horas foi diluída em acetato de etila, lavada com água (10x), NaOH 1M (2x), 1M HCl (1x) e concentrada ao vácuo, para render 50% de um sólido branco. A purificação foi feita por coluna cromatográfica (sílica gel, hexano:acetato de etila 2:8, rf: 0.7, 113 mg). Foram obtidos 72 mg do produto, pf 179.7-180°C (racemato). Os enantiômeros foram separados por HPLC, em uma coluna quiral de celulose 2-phase da Phenomenex, tamanho de partícula 5 µm, tamanho de poro 1000 Å, com fluxo isocrático de 0.5ml/min em 60% ACN, o enantiômero S tem um pf. 196-198 °C (Lit.(34) 199-200°C). $[\alpha]^{23}_D = -34,1$ (Conc = 1,01 Dioxano). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3,02 (dd, 13,6; 10,8 Hz, 1H), 3,14 (dd, 13,6; 4,4 Hz, 1H), 4,17 (d, 5,6 Hz, 2H), 4,70 (ddd, 10,8, 8,4, 4,4 Hz, 1H), 7,17 (t, 7,4 Hz, 1H), 7,26 (t, 7,4 Hz, 2H), 7,34 (d, 7,4 Hz, 2H), 7,45 (t, 7,4 Hz, 2H), 7,52 (t, 7,4 Hz, 1H), 7,84 – 7,78 (m, 2H), 8,69 (d, 8,4 Hz, 1H), 8,79 (t, 5,6 Hz, 1H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) δ 27,62 37,25 55,22 117,32 127,11 127,49 128,75 128,87 129,35 132,30

133,53 137,24 168,21 172,88 IV (KBr) 3299, 3060, 2236, 1673, 1636, 1532, 1326, 693 cm^{-1} .
HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2]$ 308,1393, presente: 308,1387 $[\text{M}+\text{H}]$.

5.6.2 Preparação do composto Neq0410

(S)-N-(1-((2-cianopropan-2-il) amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida (Neq0410).

Foi preparado a partir do derivado 3 do composto anterior e seguindo o mesmo procedimento, mas foi acoplado com o sal hidrolórico de 2-amino-2-metil propanonitrila com um rendimento de 40 %. A purificação foi feita por coluna cromatográfica (sílica gel, acetato de etila 100%, rf: 0.4, 98 mg). Foram obtidos 19 mg do produto (8%). Com pf. 114-117°C (lit. 199-200°C). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,66 (s, H); 8,60 (d, $J = 8,3$ Hz, H); 7,86 – 7,78 (m, 2H); 7,51 (d, $J = 7,3$ Hz, H), 7,45 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,36 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7,27 (t, $J = 7,5$ Hz; 2H), 7,18 (t, $J = 7,3$ Hz, H), 4,74 (td, $J = 8,3$; 5,9 Hz, H); 3,04 (dd, $J = 11,5$; 6,9 Hz, H), 1,58 (d, $J = 15,1$ Hz; 6H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 171.74, 167.34, 137.56, 133,72; 132,14; 129,57; 128,82; 128,58; 127,61; 126,97; 121,89; 54,98; 49,00; 46,07; 37,62; 26,64; 26,35. HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2]$ 336,1706. Presente: 336.1689 $[\text{M}+\text{H}]$.

5.6.3 Preparação do composto Neq0412

O procedimento usado foi o que se usou para obter o composto Neq0409, resumido na rota do esquema 4.1.

Metil (S)-2-amino-3-(3-cianofenil)propanoato hidrolórico (L-CNPhe-OMe). Foi obtido um sólido branco com um rendimento de 95%, de pf. 156-158°C, usado sem purificação na seguinte reação. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,76 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 7,8$

Hz, 1H); 7,56 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 4,35 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H); 3,69 (s, 3H); 3,24 (dd, $J = 6,6$; 4,4 Hz, 2H).

Metil (S)-2-benzamido-3-(3-cianofenil)propanoato (Bz-L-CNPhe-OMe). A reação rendeu 76,4 % de um sólido branco, o qual foi purificado por coluna cromatográfica (sílica gel, acetato de etila 100%, rf: 0,3; 470 mg). Foram obtidos 330 mg do produto com Pf. 75°C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,83 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,79 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 7,54 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,46 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 7,32 – 7,25 (m, 4H); 7,20 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H); 4,68 (ddd, $J = 10,0$; 7,9; 5,4 Hz, 1H); 3,14 (ddd, $J = 23,8$; 13,8; 7,7 Hz, 2H).

N-benzoil-L-meta-ciano-fenilalanina. A hidrólise do éster metílico ofereceu o sal de lítio com um sólido branco com rendimento quantitativo, usado na próxima reação de acoplamento. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,78 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H); 7,68 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H); 7,61 – 7,54 (m, 2H); 7,52 – 7,35 (m, 4H); 4,18 (dd, $J = 11,4$; 5,9 Hz, 1H), 3,11 (dd, $J = 13,2$; 5,9 Hz, 2H).

(S)-N-(1-((cianometil)amino)-3-(3-cianofenil)-1-oxopropan-2-il)benzamida (Neq0412). Na obtenção deste foi acoplado o composto anterior com aminoacetnitrila, o rendimento da reação foi de 33.3%. Pf. 194-196°C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,80 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 8,74 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 7,79 (d, $J = 8,6$ Hz, 3H); 7,65 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,48 (dt, $J = 15,8$; 7,3 Hz, 4H); 4,83 – 4,60 (m, 1H); 4,17 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H); 3,25 – 3,00 (m, 2H). RMN ^{13}C (101

MHz, DMSO-d₆) δ 172,06; 167,09; 139,96; 134,59; 133,87; 133,05; 131,99; 130,67; 129,79; 128,66; 127,70; 119,23; 117,76; 111,35; 54,57; 39,52; 36,57; 27,59. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₉H₁₇N₄O₂] 333,1346. Presente: 333,1330 [M+H].

5.6.4 Preparação do composto Neg0413

Do mesmo jeito que os compostos anteriores obtidos pela rota do esquema 4.1, foi seguido o mesmo procedimento das reações.

Ester metílico de L-meta-cloro-fenilalanina hidroclórica. Foi obtido um sólido branco com um rendimento quantitativo. Pf. 93-96 °C (racemato). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,71 (s, 3H); 7,39 – 7,34 (m, 3H); 7,24 – 7,19 (m, H); 4,33 (s, H); 3,68 (s, 3H); 3,23 – 3,10 (m, 2H).

Êster metílico de N-benzoil-L-meta-cloro-fenilalanina hidroclicrica. Foi obtido um sólido branco, purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de etila(1:1), rf: 0,4; 470 mg) obtendo 234 mg (61%) de um sólido branco de pf. 67-70°C (racemato).(isómero S, Lit. 103°C(91)). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d6) δ 8,83 (d, *J* = 7,9 Hz, H); 7,78 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H); 7,57 – 7,50 (m, H); 7,46 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H); 7,39 (s, 1H); 7,34 – 7,22 (m, 3H); 4,70 (ddd, *J* = 10,4; 7,9; 5,1 Hz; H); 3,65 (s, 3H); 3,20 (dd, *J* = 13,7; 5,1 Hz, 1H); 3,10 (dd, *J* = 13,7; 10,4 Hz, H).

N-benzoil-*L*-meta-cloro-fenilalanina. O produto é um sólido branco, obtido com rendimento quantitativo, e usado sem purificação na reação de acoplamento que segue. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,76 (d, $J = 4,4$ Hz, H); 7,68 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H); 7,46 (dd, $J = 17,0$; 6,8 Hz; 3H); 7,19 (d, $J = 15,6$ Hz; 3H); 7,09 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H); 4,16 (d, $J = 5,0$ Hz, H); 3,21 (s, 1H); 3,07 (dd, $J = 12,8$; 5,0 Hz; H).

1-(aminoacetonitrila)-*N*-benzoil-*L*-meta-cloro-fenilalanina (**Neq0413**). A reação rendeu 17% de um sólido branco purificado em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de etila(4:6), rf: 0,4; 75 mg) obtendo 40 mg de um sólido branco, pf. 176-178°C (racemato). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,81 (s, 1H); 8,72 (d, $J = 8,1$ Hz; 1H); 7,80 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,51 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,49 – 7,39 (m, 3H); 7,29 (s, 2H); 7,23 (s, 1H); 4,70 (s, 1H); 4,17 (d, $J = 5,1$ Hz; 2H); 3,23 – 2,87 (m, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 173,06; 168,70; 140,44; 134,09; 133,89; 132,84; 130,98; 129,75; 129,40; 128,61; 128,03; 127,55; 117,87; 55,36; 39,52; 37,32; 28,17. HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_2]$ 342,1004. Presente: 342,0974 $[\text{M}+\text{H}]$.

5.6.5 Preparação do composto Neq0570

A obtenção deste composto é baseada na rota do Esquema 4.6.

(*tert*-butoxycarbonil)-*L*-fenilalanina (**Boc-L-Phe-OH**). A uma solução de fenilalanina (10 g, 61 mmol) em THF (100 mL) 0°C, foi adicionado di-*tert*-butildicarbonato (15.9 g 60 mmol) e solução saturada de $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ (100 mL). A mistura de reação foi agitada a 0 °C por 6 h e concentrada sob pressão reduzida; o pH foi ajustado 2~3 com uma solução saturada de KHSO_4 . Posteriormente, a reação foi extraída com acetato de etila (EtOAc) (3 X) e a fase orgânica obtida foi secada em MgSO_4 , filtrada e concentrada ao vácuo para dar o produto oleoso

colorido (14.5 g, 91%). O produto foi puro suficiente para ser usado na reação seguinte sem purificação adicional. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.27 (dd, $J = 12,9; 6,0$ Hz; 3H); 7.19 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H); 7.06 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 4.09 (ddd, $J = 10,3; 8,6; 4,6$ Hz, 1H); 3.01 (dd, $J = 13,8; 4,6$ Hz, 1H); 2.82 (dd, $J = 13,7; 10,3$ Hz, 1H); 1.31 (s, 6H).

(*S*)-1-((1-cianociclopropil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamate de terc-butila (*Boc-L-Phe-NHC(C₃H₆)CN*). O composto anterior (600 mg, 2.26 mmol), foi misturado com HATU (1,1 equiv., 945,9 mg, 2,49 mmol) e DIPEA (4 equiv., 1,6 mL, 9,04 mmol) e dissolvidos em DMF (15.3 mL); em seguida foi adicionado 1-aminociclopropano-1-carbonitrila (1,6 equiv., 429 mg, 3,62 mmol). A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente por 16 horas; a mistura de reação foi diluída em acetato de etila (100 mL) e lavada com água (10x 100), 1M NaOH (2x 100), 1M HCl (1x 100), posteriormente foi concentrada ao vácuo, purificada em coluna cromatográfica (sílica gel, hexano:acetato de etila/1:1). O composto obtido foi um sólido branco (583 mg, 78,31%). Pf. 146-147 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,83 (s, 1H); 7.31 – 7.15 (m, 5H); 7.00 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 4.05 (dt, $J = 8,6; 6,1$ Hz, 1H); 2.87 (dd, $J = 13,5; 5,6$ Hz, 1H); 2.82 – 2.70 (m, 1H); 1.31 (s, 9H).

(*S*)-2-amino-*N*-(1-cianociclopropil)-3-fenilpropanamida (*L-Phe-NHC(C₃H₆)CN*). Uma solução de *L-Phe-NHC(C₃H₆)CN* (549 mg, 1,67 mmol) dissolvida em ácido fórmico puro (55 mL), foi agitada por 16 h a temperatura ambiente. A mistura de reação foi concentrada ao vácuo para fornecer um óleo incolor o qual foi neutralizado com uma solução de NaOH/aq (0.5 M) e extraído com acetato de etila, secado MgSO_4 , filtrado e concentrado ao vácuo para dar o produto oleoso colorido (189 mg, 49.5%). Foi usado na seguinte etapa sem purificação adicional. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.25 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7.20 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7.16 (d, $J = 7,2$

Hz, 2H); 2,82 (dd, $J = 13,3$; 6,1 Hz, 1H); 2,68 (dd, $J = 13,3$; 7,3 Hz, 1H); 1,41 (d, $J = 3,2$ Hz, 2H); 1,01 – 0,93 (m, 2H).

(*S*)-*N*-(1-((1-cianociclopropil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida (*Bz-L-Phe-NHC(C₃H₆)CN*). O ácido benzoico (62,35 mg; 0,51 mmol) foi dissolvido em DMF (4 mL), a esta solução foi adicionado em uma porção HATU (1,1 equiv., 213,31 mg, 0,561 mmol) e DIPEA (4 equiv., 0,356 mL, 2,05 mmol), posteriormente foi adicionado o composto L-Phe-NHC(C₃H₆)CN, a deixado em agitação durante 24 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de argônio. Depois deste tempo foi diluída em acetato de etila, lavada com água (10x), NaOH 1M (2x), 1M HCl (1x) e concentrada ao vácuo, para render 42% de um sólido branco. A purificação foi feita por HPLC quiral, usando uma coluna quiral de celulose 2-phase da Phenomenex, tamanho de partícula 5 μ m, tamanho de poro 1000 Å e utilizando um fluxo isocrático de 0.5ml/min 60% ACN. Pf. 189-190 °C. $[\alpha]^{23}_D = (\text{Conc} = 1,01 \text{ Dioxano})$. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 9.02 (s, 1H); 8,64 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 7,82 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 7,52 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,44 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,30 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 7,25 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,17 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,60 (ddd, $J = 9,6$; 8,2; 5,4 Hz, 1H); 3,03 (ddd, $J = 23,4$; 13,6; 7,6 Hz, 2H); 1,46 (d, $J = 2,7$ Hz, 2H); 1,04 (d, $J = 9,7$ Hz, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 173,18; 166,71; 138,29; 134,26; 131,81; 129,61; 128,61; 128,55; 127,93; 126,80; 121,18; 55,05; 37,39; 20,19; 16,15; 16,13. HRMS (ESI(+)) Calcd. [C₂₀H₂₀N₃O₂] 334,1550. Presente: 334,1550 [M+H].

5.6.6 Preparação do composto Neq0573

A obtenção deste composto é baseada na rota do Esquema 4.6. O procedimento seguido é o mesmo que para o composto Neq0570.

Ácido (*S*)-2-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-4,4-dimetilpentanoico (*Boc*- γ -metil-Leu-OH). O composto foi obtido com 82% de rendimento, como um óleo incoloro. Usado sem purificação adicional para a seguinte reação. RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,02 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 3,95 (td, J = 8,2; 4,1 Hz, 1H); 1,56 – 1,52 (m, 2H); 1,46 (s, 1H); 1,37 (s, 7H); 0,89 (s, 7H).

Terc-butil (*S*)-(1-((1-cianociclopropil)amino)-4,4-dimetil-1-oxopentan-2-il)carbamato (*BOC*- γ -metil-Leu- $\text{NHC}(\text{C}_3\text{H}_6)\text{CN}$). A reação de acoplamento deu um 79% de rendimento, oferecendo um sólido branco, com pf. 180-181 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,76 (s, 1H); 6,89 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 3,91 (td, J = 8,1; 4,9 Hz, 1H); 1,50 – 1,42 (m, 4H); 1,37 (s, 9H); 1,07 (dd, J = 7,9; 5,3 Hz, 2H); 0,87 (s, 9H).

(*S*)-2-amino-*N*-(1-cianociclopropil)-4,4-dimetilpentanamida (γ -metil-Leu- $\text{NHC}(\text{C}_3\text{H}_6)\text{CN}$). A hidrólise do grupo Boc ofereceu 96% de uma substância oleosa, que foi usada na seguinte etapa sem precisar de purificação adicional. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,32 (s, 1H); 3,23 (dd, J = 6,6; 5,9 Hz, 1H); 1,65 (dd, J = 13,8; 6,9 Hz, 1H); 1,46 (q, J = 5,7 Hz, 1H); 1,26 (dd, J = 14,1; 6,0 Hz, 1H); 1,13 – 1,10 (m, 1H); 0,88 (s, 5H).

(*S*)-*N*-(1-((1-cianociclopropil)amino)-4,4-dimetil-1-oxopentan-2-il)benzamida (*Bz*- γ -metil-Leu- $\text{NHC}(\text{C}_3\text{H}_6)\text{CN}$). Neste acoplamento de γ -metil-Leu- $\text{NHC}(\text{C}_3\text{H}_6)\text{CN}$ com ácido benzoico foi obtido um sólido branco com 91% de rendimento, pf. 186-187°C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,91 (s, 1H); 8,51 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,90 (d, J = 7,0 Hz, 2H); 7,53 (t, J = 7,3 Hz, 1H); 7,46 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 4,49 (td, J = 9,2; 3,4 Hz, 1H); 1,76 (dd, J = 14,2; 9,3 Hz, 1H); 1,63 (dd, J = 14,2; 3,4 Hz, 1H); 1,47 (dd, J = 8,0; 5,3 Hz, 2H); 1,11 (dd, J = 8,1; 5,4 Hz, 2H); 0,91 (s, 8H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO-*d*6) δ 173,96; 165,89; 133,98; 131,29; 128,14; 127,55; 120,78; 50,69; 44,15; 39,52; 30,29; 29,49; 19,91; 15,75; 15,55. HRMS (ESI(+)) Calcd. [$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$] 314,1863. Presente: 314,1866 [M+H].

5.6.7 Preparação do composto Neq0568

(3-(*terc*-butil)-1-metil-1H-pirazol-5-carbonil)-L-leucina (*Pir*-L-Leu-OH). Na preparação desta substância foi empregada a reação de acoplamento usando o método de anidridos mistos com o reagente IBCF. A purificação foi feita cromatografia de coluna (sílica gel, hexano:acetato de etila/6:4, rf.0,3), obtendo um sólido muito higroscópico, com um rendimento obtido de 87%. RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,47 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 6,65 (d, J = 3,9 Hz, 1H); 4,00 (s, 3H); 3,72 (dd, J = 6,5, 4,2 Hz, 1H); 1,59 (d, J = 43,7 Hz, 2H); 1,44 (s, 1H); 1,23 (s, 9H); 0,90 – 0,81 (m, 6H).

(*S*)-3-(*tert*-butil)-*N*-(1-((cianometil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-1-metil-1*H*-pirazol-5-carboxamida. (*Pir-L-Leu-NHCH₂CN*). O acoplamento foi feito a partir do acoplamento com precursor *Pir-L-Leu-OH* e acetoaminonitrila, e como reagente de acoplamento o HATU seguindo o procedimento que usou-se na preparação da substância Bz-L-Phe-NHCH₂CN (Neq0409), A purificação foi feita cromatografia de coluna (sílica gel, hexano:acetato de etila/6:4, rf.0,2) obtendo um sólido branco com um rendimento obtido de 70 % e pf. 179-180°C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,70 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 8,46 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,88 (s, 1H); 4,43 (ddd, *J* = 10,6; 8,1; 4,6 Hz, 1H); 4,12 (dd, *J* = 5,6; 1,4 Hz, 2H); 3,97 (s, 3H); 1,71 – 1,59 (m, 2H); 1,57 – 1,50 (m, 1H); 1,25 (s, 9H); 0,91 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H); 0,86 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,68; 159,63; 158,66; 134,91; 117,56; 103,88; 59,74; 50,88; 39,52; 31,62; 30,41; 27,16; 24,30; 23,00; 21,16; 14,08. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₇H₂₈N₅O₂] 334,2237. Presente: 334,2249 [M+H].

5.6.8 Preparação do composto Neq0569

A obtenção deste composto é baseada na rota do Esquema 4.6. O procedimento seguido é o mesmo que para o composto Neq0570.

(*tert*-butoxycarbonil)-*L*-leucina (*Boc-L-Leu-OH*). Foi obtida uma substância higroscópica, com um rendimento de 85%, usada na seguinte reação sem ser submetido a purificação adicional. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.02 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 3,89 (ddd, *J* = 10,2; 8,3; 4,8 Hz, 1H); 1,68 – 1,57 (m, 1H); 1,50 (ddd, *J* = 12,4; 8,9; 3,5 Hz, 1H); 1,45 – 1,39 (m, 1H); 1,37 (s, 9H); 0,85 (dd, *J* = 11,9; 6,6 Hz, 6H).

Terc-butil (S)-2-amino-N-(1-cianociclopil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)carbamato (Boc-L-Leu-NHCH₂CN). O acoplamento foi feito com o reagente de acoplamento HATU seguindo o procedimento que usou-se na preparação da substância Bz-L-Phe-NHCH₂CN (Neq0409), obtendo um sólido branco com um rendimento de 85 %. Pf. 86-87 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,80 (s, 1H); 6,90 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 3,87 (td, *J* = 9,4; 5,5 Hz; 1H); 1,59 – 1,51 (m, 1H); 1,45 (dd, *J* = 7,9; 5,3 Hz, 2H); 1,40 (m, 2H); 1,07 (dd, *J* = 7,8; 5,4 Hz, 2H); 0,84 (dd, *J* = 11,1; 6,6 Hz, 6H).

(S)-2-amino-N-(1-cianociclopil)amino)-4-metilpentanamida(L-Leu-NHC(C₃H₆)CN) A hidrólise do grupo Boc ofereceu 87 % de rendimento de uma substância oleosa, que foi usada na seguinte etapa sem precisar de purificação adicional. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,05 (s, H); 3,10 (dd, *J* = 8,8; 5,5 Hz, 1H); 1,67 (ddt, *J* = 19,4; 13,1; 6,6 Hz, 1H); 1,45 (dd, *J* = 8,0; 5,4 Hz; 2H); 1,34 (ddd, *J* = 13,6; 8,2; 5,5 Hz, 1H); 1,25 – 1,18 (m, H); 1,10 (dd, *J* = 8,8; 5,1 Hz, 2H); 0,85 (dd, *J* = 15,4; 6,6 Hz; 6H).

(S)-3-(terc-butil)-N-(1-(1-cianociclopil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida. O acoplamento de L-Leu- NHC(C₃H₆)CN com ácido 3-(terc-butil)-1-metil-1H-pirazol-5-carboxílico foi obtido um sólido branco com 94 % de rendimento, pf. 185-187°C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,96 (s, 1H); 8,41 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 6,87 (s,

1H); 4,36 (ddd, $J = 10,4; 8,2; 4,8$ Hz; 1H); 3,96 (s, 3H); 1,67 – 1,56 (m, 2H), 1,47 (dd, $J = 7,4; 4,7$ Hz, 3H); 1,24 (s, 9H); 1,13 – 1,07 (m, 2H); 0,89 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H); 0,85 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 173,45; 159,60; 158,70; 134,97; 120,79; 103,88; 50,81; 39,52; 38,65; 31,63; 30,42; 24,31; 23,00; 21,25; 19,85; 15,70; 15,62. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₉H₃₀N₅O₂] 360,2394. Presente: 360,2389 [M+H].

5.6.9 Preparação do composto Neq0550

Para obtenção deste composto foi seguida a rota do Esquema 4.7

Ácido (*S*)-2-benzamido-3-(4-(benzoiloxi)fenil)propanoico (*Bz-L- Bz Tyr-OH*). A uma solução de L-Tyr (3,5 g; 19,32 mmol) em NaOH aq. (0,75M; 4,7 mL) foi gotejado lentamente cloreto de benzoíla (2,1 equiv., 5,7 g, 40,56 mmol) a 0°C. A mistura de reação foi agitada por uma hora e então ajustado a pH 2-3 com ácido hidrocloreto concentrado. A mistura reacional foi filtrada, secada e recristalizada de acetato de etila para oferecer um sólido branco, com um rendimento de 92 %. Pf. 214-215°C (Lit., (80) 214-215°C). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,81 (s, 1H); 8,74 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 8,10 (dd, $J = 8,3; 1,2$ Hz, 2H); 7,85 – 7,80 (m, 2H); 7,76 – 7,69 (m, 1H); 7,59 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H); 7,56 – 7,49 (m, 1H); 7,46 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,41 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 7,22 – 7,16 (m, 2H); 4,66 (ddd, $J = 10,6; 8,2; 4,5$ Hz, 1H); 3,24 (dd, $J = 13,9; 4,4$ Hz, 1H); 3,12 (dd, $J = 13,8; 10,7$ Hz, 1H).

(*S*)-4-(2-benzamido-3-((cianometil)amino)-3-oxopropil)fenil benzoato (*Bz-L- Bz Tyr-NHCH₂CN*). Foi preparada uma solução de Bz-L- Bz Tyr-OH (1 g; 2,57 mmol) em THF (15 mL) e levado a -20°C. Subsequentemente, N-metilmorfolina (0,141 mL, 2,57mmol) e clorofornato de isobutila (0,166 mL; 2,57 mmol) foram sequencialmente adicionados sob agitação vigorosa. Imediatamente depois da formação de um precipitado branco (cloridrato de N-metilmorfolina), uma solução de cloridrato de aminoacetonitrilo (0,261 g; 2,83 mmol) em

H₂O (0,225 ml), previamente resfriada em gelo, e NaOH 1 M (2,83 mL) foi adicionada. A mistura resultante foi deixada aquecer e agitada à temperatura ambiente. Após 2 h, o THF foi removido sob pressão reduzida e a mistura aquosa residual diluiu-se com um pequeno volume de H₂O, ajustada a pH 1 (NaHSO 10%). Extraíu-se com acetato de etilo e (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com H₂O (10 mL), NaHCO₃ sat. (2 x 10 mL) e NaCl sat. (10 mL), foi secada sobre Na₂SO₄, e evaporada ao vácuo. Foi obtido um sólido branco (1,040 g; 95%), que foi recristalizado de acetato de etila para se obter um sólido de pf. 254-256 °C. RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,90 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 8,77 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 8,13 – 8,07 (m, 2H); 7,87 – 7,82 (m, 2H); 7,73 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,59 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H); 7,53 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,49 – 7,40 (m, 4H); 7,18 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H); 4,74 (ddd, *J* = 10,8; 8,4; 4,3 Hz, 1H); 4,18 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H); 3,18 (dd, *J* = 13,7; 4,3 Hz, 1H), 3,07 (dd, *J* = 13,6; 10,8 Hz, 1H). HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₂₅H₂₂N₃O₄] 428,1605. Presente: 428,1616 [M+H].

5.6.10 Preparação do composto Neq0551

(*S*)-*N*-(1-((cianometil)amino)-3-(4-hidroxifenil)-1-oxopropan-2-il)benzamida (*Bz-L-Tyr-NHCH₂CN*). O composto Neq0550 (0.6 g; 1,41 mmol) foi submetido à hidrólise básica com K₂CO₃ (1,05 equiv., 0,205 g; 1,48 mmol) e MeOH (17 mL) até não ser observado o composto de partida por monitoramento com CCD (sílica gel, hexano:acetato de etila/3:7), a mistura reacional foi evaporada ao vácuo e purificada por cromatografia de coluna (sílica gel, hexano:acetato de etila/4:6 rf 0,35), a fração obtida foi purificada com cromatografia de camada delgada preparativa (sílica gel, hexano:acetato de etila/4,5:6.5). Pf. 209-210 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 9,15 (s, 1H); 8,74 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 8,61 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,81 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H); 7,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,45 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); 6,62 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); 4,59 (ddd, *J* = 10,4; 8,3; 4,5 Hz, 1H); 4,15 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H); 3,00 (dd, *J* = 13,8; 4,4 Hz, 1H); 2,89 (dd, *J* = 13,7; 10,5 Hz, 1H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 172,20; 166,30; 155,75; 133,87; 131,34; 130,02; 128,16; 128,09; 127,47; 117,53; 114,92; 55,09; 39,52; 36,09; 27,17. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₈H₁₈N₃O₃] 324,1343. Presente: 324,1353 [M+H].

5.6.11 Preparação do composto Neq0552

Benzoil-L-triptofano (Bz-L-Trp-OH). Foi preparado com o mesmo procedimento que se usou para obter o éster metílico de Bz-L-Phe-OMe, com um rendimento de 79 %, e pf. 104-105°C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,72 (s, 2H); 10,89 (d, $J = 1,2$ Hz, 2H); 8,66 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H); 7,83 (d, $J = 7,0$ Hz, 4H); 7,60 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 7,51 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,43 (d, $J = 7,1$ Hz, 4H); 7,33 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,22 (d, $J = 2,3$ Hz, 2H); 7,05 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 6,98 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H); 4,72 – 4,61 (m, 2H); 3,32 (dd, $J = 14,8$; 4,6 Hz, 3H); 3,23 (dd, $J = 14,7$; 9,8 Hz, 2H).

(S)-N-(1-((cianometil)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oxopropan-2-il)benzamida (Bz-L-Trp-NHCH₂CN). Esta substância foi preparada seguindo o procedimento para obter o composto Bz-L- Bz Tyr-NHCH₂CN, conseguido um rendimento de 95%, e depois purificada por coluna cromatográfica (sílica gel, hexano/acetato de etila(1:1), rf: 0,3), pf. 158-159 °C. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,79 (s, 1H); 8,82 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H); 8,60 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,83 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H); 7,67 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,51 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H); 7,44 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,20 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,05 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 6,98 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 4,73 (s, 1H); 4,17 (dd, $J = 5,5$; 3,3 Hz, 2H); 3,25 (dd, $J = 14,6$; 4,5 Hz, 1H); 3,16 (dd, $J = 14,6$; 10,1 Hz, 1H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172,46; 166,27; 136,05; 133,83; 131,34; 128,12; 127,48; 127,14; 123,68; 120,90; 118,36; 118,26; 117,59; 111,34; 110,21; 54,03; 39,52; 27,22; 27,17. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₂₀H₁₉N₄O₂] 347,1502. Presente: 347,1505 [M+H].

5.6.12 Preparação do composto Neq0567

Benzoyl-L-arginina hidrolórica (Bz-L-Arg-OH·HCl). A uma solução de L-Arg-OH (5 g, 28,7 mmol) em H₂O (57 mL) e dioxano (29 mL) a 0 °C foi gotejado lentamente cloreto de benzoíla (1.1 equiv., 3,670 mL, 31,57 mmol) mantendo ajustado o pH 9-10, entre 10 e 15 °C. Após 1 h de agitação entre 10-15 °C, a mistura de reação diluiu-se com um pequeno volume de H₂O, ajustada a pH 1.5 (HCl 37%) e centrifugada a 9000 rpm durante 9 min, separado o sobrenadante. O processo de centrifugação foi repetido 3 vezes, e seguidamente foi evaporada ao vácuo a 60 °C. Foi obtido um sólido (7,921 g, 87 %), pf. 50-52 °C, usado sem purificação adicional na seguinte reação de acoplamento. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,10 (s, H), 8,54 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H); 7,74 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H); 7,37 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,26 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 4,18 (td, *J* = 8,2; 5,0 Hz, H); 3,17 – 2,98 (m, 2H); 1,81 (dd, *J* = 22,8; 9,7 Hz, 2H); 1,63 – 1,43 (m, 2H).

(S)-N-(1-((cianometil)amino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-il)benzamida hidrolórica (Bz-L-Arg-NHCH₂CN·HCl). A uma solução de Bz-L-Arg-OH (2 g, 6,35 mmol), HATU (1 equiv., 2,414 g; 6,35 mmol) e HOBt (1 equiv., 0,858 g; 6,35 mmol) em DMF (23 mL) mantida a 0°C em banho de gelo e atmosfera de argônio foi adicionado DIPEA (1equiv., 1,1 mL; 6,35 mmol) e imediatamente depois uma solução de aminoacetonitrila hidrolórica (0,5 equiv., 0,294 g, 3,18 mmol) em DMF(5mL) e DIPEA (0,5 equiv., 0,554 mL; 3,18 mmol). Depois de 24 horas foi concentrada ao vácuo, de purificada por cromatografia de coluna em gradiente (sílica gel, hexano:acetato de etila/4:6 a 0:100, etanol 100%), esta última fração rendeu 80 % de um sólido, que foi recristalizado de etanol (71 mg, 6 %), pf. 117-118 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,96 (t, *J* = 5,5 Hz, H); 8,73 (d, *J* = 7,8 Hz, H); 8,33 (d, *J* = 3,0 Hz, H); 8,10 (dt, *J* = 11,5; 5,7

Hz; 2H); 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); 7,91 – 7,85 (m, H); 7,53 (dd, $J = 14,9$; 7,4 Hz; 2H); 7,46 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H); 4,45 (ddd, $J = 9,4$; 8,0; 5,3 Hz, 1H); 4,12 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H); 3,19 – 3,08 (m, 2H); 1,89 – 1,78 (m, 2H); 1,64 – 1,49 (m, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172,49; 166,57; 157,18; 133,75; 131,40; 128,26; 128,14; 127,73; 117,58; 53,03; 39,52; 28,24; 27,13; 25,42. HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_2]$ 317,1720. Presente: 317,,1726 $[\text{M}+\text{H}]$.

5.6.13 Preparação do composto Neq0571

Ácido 1-benzamidociclopentano-1-carboxílico (Bz-cicloleu-OH). Esta substância foi preparada seguindo o procedimento que se usou para obter o éster metílico de Bz-L-Phe-OH, com um rendimento de 95 %, e pf. 186-189°C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,37 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 7,85 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H); 7,50 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H); 7,45 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,19 – 2,09 (m, 2H); 2,09 – 2,01 (m, 2H); 1,69 (dd, $J = 10,9$; 5,4 Hz, 4H).

N-(1-((cianometil)carbamoil)ciclopentil)benzamida (Bz-cicloLeu-NHCH₂CN). O acoplamento foi realizado seguindo o procedimento para obtenção da substância Bz-L-Phe-NHCH₂CN (Neq0409), purificado por cromatografia de coluna (sílica gel, hexano:acetato de etila/6:4, rf.0,3) com um 92% de rendimento, pf. 165-166°C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,42 (s, 1H); 8,26 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H); 7,91 (s, 2H); 7,53 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,46 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 4,03 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H); 2,17 – 2,07 (m, 2H); 2,06 – 1,97 (m, 2H); 1,67 (dd, $J = 11,6$; 5,7 Hz, 4H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 174,48; 166,41; 134,35; 131,20; 127,96; 127,79; 117,75; 66,48; 39,52; 36,33; 27,70; 24,26. HRMS (ESI (+)) Calcd. $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2]$ 272,1393. Presente: 272,1390 $[\text{M}+\text{H}]$.

5.6.14 Preparação do composto Neq0572

N-(1-((1-cianociclopropil)carbamoil)ciclopentil)benzamida (*Bz-cicloleu-NHCH(C₃H₆)CN*). O acoplamento foi realizado seguindo o procedimento para obtenção da substância Bz-L-Phe-NHCH₂CN (Neq0409), com um 25% de rendimento, pf. 161-162°C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,42 (s, 1H); 8,26 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.03 (d, *J* = 5,7 Hz; 2H); 2,16 – 2,08 (m, 2H); 2,03 (dd, *J* = 11,7; 6,7 Hz, 2H); 1,71 – 1,63 (m, 4H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,48; 166,41; 134,35; 131,20; 127,96; 127,79; 117,75; 66,48; 39,52; 36,33; 27,70; 24,26. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₁₇H₂₀N₃O₂] 298,1550. Presente: 298,1540 [M+H].

5.6.15 Preparação do composto Neq0534

A síntese desta substância foi baseada no Esquema 4.12.

(*S*)-2-isocianato-3-fenilpropanoato de metila (isocianato de *L*-Phe-OMe). A uma solução de L-Phe-OMe (1 g, 4.63 mmol) em CH₂Cl₂ (9 mL) a 0°C, foi adicionado NaHCO₃ sat. (9 mL) e trifosgênio (0,3 equiv., 0,459 mg) em uma porção com agitação vigorosa, durante 15 min a 0°C, então foi vertida em um funil de separação, a fase orgânica foi coletada, e a fase orgânica foi extraída com CH₂Cl₂ (3x10 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio, secada com Na₂SO₄, filtrada e concentrada a pressão reduzida para dar um produto oleoso, o qual foi usado na seguinte reação sem purificação adicional.

Metil (1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-2-carbonil)-L-fenilalaninato (THIQ-L-Phe-OMe). Uma solução de tetra-hidroisoquinolina (THIQ) (0,741 g; 5,56 mmol) em THF (10 mL), a 0°C, adicionada uma solução do composto obtido na reação anterior (0,83 equiv., 0,95 g) em THF (10 mL). Foi agitada durante 12 h e concentrada ao vácuo para dar um óleo marrom, o qual foi subsequentemente diluído com água (100 mL) e extraída com AcOEt (3x50 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e lavados com uma solução saturada de cloreto de sódio, secada com Na₂SO₄, filtrada e concentrada a pressão reduzida para dar um produto (63% de rendimento) que foi purificado por cromatografia de coluna (sílica gel, CHCl₃/MeOH, 9,5:0,5; rf.0,64) rendendo 54 % de um sólido branco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,32 (s, 1H), 7,26 – 7,24 (m, 3H); 7,16 (ddd, *J* = 9,0; 6,8; 3,7 Hz, 4H); 7,11 – 7,07 (m, 1H); 6,92 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 4,45 (d, *J* = 4,4 Hz, 2H), 4,29 (ddd, *J* = 9,4; 8,0; 5,8 Hz, 1H); 3,58 (s, 3H); 3,52 (de, *J* = 6,3; 5,1 Hz, 2H); 3,03 – 2,95 (m, 2H); 2,75 – 2,66 (m, 2H).

(1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-2-carbonil)-L-fenilalanina (THIQ-L-Phe). A reação de hidrólise resultou em um sólido branco com rendimento quantitativo. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,24 – 7,21 (m, 3H); 7,12 (ddd, *J* = 20,5; 7,1; 4,0 Hz, 3H); 6,67 (s, H); 4,42 (d, *J* = 10,6 Hz, 2H); 4,25 – 4,21 (m, H); 3,03 (dd, *J* = 13,6; 4,6 Hz, 2H); 2,92 (dd, *J* = 13,6; 10,1 Hz, 2H); 2,69 (dd, *J* = 10,9; 5,7 Hz, 2H).

(*S*)-*N*-(1-((cianometil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-3,4-dihidroisoquinolina-2(1*H*)-carboxamida (THIQ-*L*-Phe-NHCH₂CN). O acoplamento de THIQ-*L*-Phe com acetoaminonitrila, com HATU como reagente de acoplamento rendeu 91 %, a substância foi recristalizada de etanol com um 22% de rendimento, com pf. 147-149 °C. .RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,64 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 7,30 – 7,25 (m, 2H); 7,22 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,19 – 7,07 (m, 5H); 4,44 (q, *J* = 16,5 Hz, 2H); 4,38 – 4,30 (m, 1H); 4,13 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,51 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 3,00 (dd, *J* = 13,5; 4,5 Hz, 1H); 2,89 (dd, *J* = 13,5; 10,4 Hz, 1H); 2,77 – 2,60 (m, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*6) δ 173,23; 156,77; 138,42; 134,77; 134,01; 129,17; 128,48; 128,01; 126,18; 126,16; 126,10; 125,95; 117,57; 55,89; 45,20; 41,01; 39,52; 37,09; 28,08; 27,11. HRMS (ESI (+)) Calcd. [C₂₁H₂₃N₄O₂] 363,18155. Presente: 363,1821 [M+H].

REFERÊNCIAS

- 1 RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2015. Disponível em: <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 26 set. 2014.
- 3 YANG, P.Y.; WANG, M.; HE, C. Y.; YAO, S. Q. Proteomic profiling and potential cellular target identification of K11777, a clinical cysteine protease inhibitor, in *Trypanosoma brucei*. **Chemical Communications**, v. 48, n. 6, p. 835–7, 2012.
- 4 RASSI, A.; DIAS, J. C. P.; MARIN-NETO, J. A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 95, n. 7, p. 524–34, 2009.
- 5 YANG, P.-Y.; WANG, M.; LI, L.; WU, H.; HE, C. Y.; YAO, S. Q. Design, synthesis and biological evaluation of potent azadipeptide nitrile inhibitors and activity-based probes as promising anti-*Trypanosoma brucei* agents. **Chemistry European Journal**, v. 18, n. 21, p. 6528–41, 2012.
- 6 COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6–S7, 2010.
- 7 TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–81, 2001.
- 8 MCKERROW, J. H. Parasite proteases. **Experimental Parasitology**, v. 68, p. 111–115, 1989.
- 9 PORCAL, W. HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, M.; AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CHIDICHIMO, A.; CAZZULO, J. J.; CAMPILLO, N. E.; PAEZ, J. A.; CASTRO, A.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIES, C.; BASOMBRÍO, M. A.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. In vivo anti-Chagas vinylthio-, vinylsulfinyl-, and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6004–15, 2007.
- 10 GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Estrategias terapéuticas. Estado del arte en el desarrollo de vacunas y de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de chagas. In: GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; MAHLER, G.; MOREIRA, L.; GAMBINO, D.; CHARRIS, J.; CARVALHO, I.; CAMPO, V.; DE ANDRADE, P.; OTERO, L.; RIVERA, G.; KAWANO, D. **Enfermedad de chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión iberoamericana**. México: Ridimedchag-cyted. Laboratorios Silanes, 2012. p. 37–41.
- 11 BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–34, 2011.

- 12 CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–9, 2006.
- 13 DE CASTRO, C.; MONTALTO DE MECCA, M.; FANELLI, S.; DEFERREYRA, E.; DIAZ, E.; CASTRO, J. Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in rat esophagus. **Toxicology**, v. 191, n. 2-3, p. 189–198, 2003.
- 14 NAGEL, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. **Mutation Research**, v. 191, n. 1, p. 17–20, 1987.
- 15 BARTEL, L. C.; MONTALTO DE MECCA, M.; FANELLI, S. L.; RODRIGUEZ DE CASTRO, C.; DIAZ, E. G.; CASTRO, J. A. Early nifurtimox-induced biochemical and ultrastructural alterations in rat heart. **Human & experimental Toxicology**, v. 26, n. 10, p. 781–8, 2007.
- 16 ENGEL, B. J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.
- 17 BARR, S. C.; WARNER, K. L.; KORNREIC, B. G.; PISCITELLI, J.; BENET, L.; MCKERROW, J. H.; WOLFE, A. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5160–5162, 2005.
- 18 DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3932–9, 2007.
- 19 ABDULLA, M.-H.; LIM, K.-C.; SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 1, p. e14, 2007.
- 20 MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 263–9, 2009. Supplement.
- 21 MCKERROW, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 833–7, 1999.
- 22 SILES, R.; CHEN, S.-E.; ZHOU, M.; PINNEY, K. G.; TRAWICK, M. L. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p. 4405–9, 2006.
- 23 Drugs For Neglected Diseases Initiative (DNDI). **K777 - DNDi**. 2015. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/k777.html?highlight=WyJrNzc3Il0=>>>. Acesso em 26 set. 2014.

- 24 PINAZO, M.-J.; ESPINOSA, G.; GÁLLEGO, M.; LÓPEZ-CHEJADE, P. L.; URBINA, J. A; GASCÓN, J. Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 583–7, 2010.
- 25 CLAYTON, J. Chagas disease : pushing through the pipeline. **Nature**, n. 24 June, p. 12–15, 2010.
- 26 COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549–54, 2009.
- 27 OTERO, L.; RIVERA, G.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Biosíntesis de esteroides de *T. cruzi*. In: GONZÁLEZ, M; CERECETTO, H; MAHLER, G; MOREIRA, L; GAMBINO, D; CHARRIS, J; CARVALHO, I; CAMPO, V; DE ANDRADE, P; OTERO, L; RIVERA, G, KAWANO, D. **Enfermedad de chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión iberoamericana**. Montevideo: Ridimedchag-cyted Laboratorios Silanes. 2012. p. 123–136.
- 28 GONZÁLEZ, M; CERECETTO, H; MAHLER, G; MOREIRA, L; GAMBINO, D; CHARRIS, J; CARVALHO, I; CAMPO, V; DE ANDRADE, P; OTERO, L; RIVERA, G, KAWANO, D. **Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos**. Montevideo: Ridimedchag-cyted Laboratorios Silanes, 2012. p. 37–158
- 29 LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 305–41, 2000.
- 30 POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4639–750, 2002.
- 31 CAFFREY, C. R.; STEVERDING, D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 12–9, 2009.
- 32 OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–172, 1997.
- 33 WOLFENDEN, R.; SNIDER, M. J. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, n. 12, p. 938–45, 2001.
- 34 LÖSER, R.; SCHILLING, K.; DIMMIG, E.; GÜTSCHOW, M. Interaction of papain-like cysteine proteases with dipeptide-derived nitriles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 24, p. 7688–707, 2005.
- 35 FITCH, W. M. Distinguishing homologous from analogous proteins. **Systematic Zoology**, v. 19, n. 2, p. 99–113, 1970.
- 36 VICIK, R.; BUSEMANN, M.; BAUMANN, K.; SCHIRMEISTER, T. Inhibitors of cysteine proteases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 331–53, 2006.

- 37 CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; FRASCH, A C.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J. J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 50, n. 2, p. 225–34, 1992.
- 38 EAKINSB, A. E.; MILLSLII, A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIKS, C. S. The sequence , organization , and expression of the major cysteine protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411–7420, 1992.
- 39 LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4459–88, 2002.
- 40 OGINO, T.; KAJI, T.; KAWABATA, M.; SATOH, K.; TOMOO, K.; ISHIDA, T.; YAMAZAKI, H.; ISHIDOH, K.; KOMINAMI, E. Function of the propeptide region in recombinant expression of active procathepsin L in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 78–83, 1999.
- 41 BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J. B.; MEYER JR., E. F.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCHI, T.; TASUMI, M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, p. 535–542, 1977.
- 42 HARPER, E.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases: pronase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 46, n. 5, p. 1956–60, 1972.
- 43 HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A A; ENGEL, J. C.; SMITH, R.; MCKERROW, J. H. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 17–24, 1993.
- 44 WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; FERNANDES, W. B.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; CHELESKI, J.; DA SILVA, A. B. F.; JULIANO, L.; CEZARI, M. H. S.; SILVA, J. S.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A. Non-peptidic cruzain inhibitors with trypanocidal activity discovered by virtual screening and in vitro assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2370, 2013.
- 45 HUANG, L.; LEE, A.; ELLMAN, J. A. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain using solid-phase parallel synthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 676–84, 2002.
- 46 GÖTZ, M. G.; CAFFREY, C. R.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H.; POWERS, J. C. Peptidyl allyl sulfones: a new class of inhibitors for clan CA cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 5203–11, 2004.
- 47 MAHER, G.; MOREIRA, L. Cisteína endopeptidasa de *T.cruzi*:cruzipaína. In: RED IBEROAMERICANA DE INVESTIGACIÓN. **Enfermedad de chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión iberoamericana**. México: Laboratorios Silanes, 2012. p. 45–61.

- 48 ROUSH, W. R.; CHENG, J.; KNAPP-REED, B.; ALVAREZ-HERNANDEZ, A.; MCKERROW, J. H.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C. Potent second generation vinyl sulfonamide inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 20, p. 2759–62, 2001.
- 49 BRAK, K.; KERR, I.; BARRETT, K.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J.; MCKERROW, J.; DOYLE, P.; BRINEN, L. Ellman, Jonathan a et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763–73, 2010.
- 50 BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404–10, 2008.
- 51 HANZLIK, R. P.; ZYGMUNT, J.; MOON, J. B. Reversible covalent binding of peptide nitriles to papain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1035, n. 1, p. 62–70, 1990.
- 52 ZHANG, Y.; FENG, J.; LIU, C.; FANG, H.; XU, W. Design, synthesis and biological evaluation of tyrosine-based hydroxamic acid analogs as novel histone deacetylases (HDACs) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 15, p. 4437–44, 2011.
- 53 BEAULIEU, C.; ISABEL, E.; FORTIER, A.; MASSÉ, F.; MELLON, C.; MÉTHOT, N.; NDAO, M.; NICOLL-GRIFFITH, D.; LEE, D.; PARK, H.; BLACK, W CAMERONHALIE.. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**, v. 20, n. 24, p. 7444–9, 2010.
- 54 DOSSETTER, A. G.; BEELEY, H. B.; COOK, C. R.; CRAWFORD, J.; FINLAYSON, J.; HERON, N.; HEYES, C.; HIGHTON, A.; HUDSON, J.; JESTEL, A.; KENNY, P.; KRAPP, S.; MARTIN, S.; MACFAUL, P.; MCGUIRE, T.; GUTIERREZ, P.; MORLEY, A.; MORRIS, J.; PAGE, K.; RIBEIRO, L.; SAWNEY, H.; STEINBACHER, S.; SMITH, C.; VICKERS, M. (1R,2R)-N-(1-Cyanocyclopropyl)-2-(6-methoxy-1,3,4,5- tetrahydropyrido[4,3-b]indole-2-carbonyl)cyclohexanecarboxamide (AZD4996): A potent and highly selective cathepsin k inhibitor for the treatment of osteoarthritis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 6363–6374, 2012.
- 55 GREENSPAN, P. D.; CLARK, K. L. TOMMASI, R. A.; COWEN, S. D.; MCQUIRE, L. W.; FARLEY, D. L.; VAN DUZER, J. H.; GOLDBERG, R. L.; ZHOU, H.; DU, Z.; FITT, J. J.; COPPA, D. E.; FANG, Z.; MACCHIA, W.; ZHU, L.; CAPPARELLI, M. P.; GOLDSTEIN, R.; WIGG, A. M.; DOUGHTY, J. R.; BOHACEK, R. S. KNAP, A. K.. Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 26, p. 4524–34, 2001.
- 56 WARD, Y. D.; THOMSON, D. S.; FRYE, L. L.; CYWIN, C. L.; MORWICK, T.; EMMANUEL, M. J.; ZINDELL, R.; MCNEIL, D.; BEKKALI, Y.; GIRARDOT, M. HRAPCHAK, M.; DETURI, M.; CRANE, K.; WHITE, D.; PAV, S.; WANG, Y.; HAO, M.-H.; GRYGON, C. A.; LABADIA, M. E.; FREEMAN, D. M.; DAVIDSON, W.; HOPKINS, J. L.; BROWN, M. L.; SPERO, D. M.; GIRADOT, M. Design and synthesis of dipeptide nitriles as reversible and potent Cathepsin S inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 25, p. 5471–82, 2002.

- 57 COOPER, T. W. J.; CAMPBELL, I. B.; MACDONALD, S. J. F. Factors determining the selection of organic reactions by medicinal chemists and the use of these reactions in arrays (small focused libraries). **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 49, n. 44, p. 8082–91, 2010.
- 58 KARP, P. D.; KRUMMENACKER, M.; PALEY, S.; WAGG, J. Integrated pathway–genome databases and their role in drug discovery. **Trends Biotechnology**, v. 7799, n. 99, p. 275–281, 1999.
- 59 ROGERS, K. E.; KERÄNEN, H.; DURRANT, J. D.; RATNAM, J.; DOAK, A.; ARKIN, M. R.; MCCAMMON, J. A. Novel cruzain inhibitors for the treatment of Chagas' disease. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, n. 3, p. 398–405, 2012.
- 60 ZHAO, H.; GUO, Z. Medicinal chemistry strategies in follow-on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 9-10, p. 516–22, 2009.
- 61 PLOWRIGHT, A. T.; JOHNSTONE, C.; KIHLEBERG, J.; PETTERSSON, J.; ROBB, G.; THOMPSON, R. A. Hypothesis driven drug design: improving quality and effectiveness of the design-make-test-analyse cycle. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 1-2, p. 56–62, 2012.
- 62 ASAAD, N.; BETHEL, P. A.; COULSON, M. D.; DAWSON, J. E.; FORD, S. J.; GERHARDT, S.; GRIST, M.; HAMLIN, G. A.; JAMES, M. J.; JONES, E. V.; KAROUTCHI, G. I.; KENNY, P. W.; MORLEY, A. D.; OLDHAM, K.; RANKINE, N.; RYAN, D.; WELLS, S. L.; WOOD, L.; AUGUSTIN, M.; KRAPP, S.; SIMADER, H. STEINBACHER, S. Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4280–3, 2009.
- 63 LECAILLE, F.; AUTHIÉ, E.; MOREAU, T.; SERVEAU, C.; GAUTHIER, F.; LALMANACH, G. Subsite specificity of trypanosomal cathepsin L-like cysteine proteases. Probing the S2 pocket with phenylalanine-derived amino acids. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 9, p. 2733–41, 2001.
- 64 GAUTHIER, J. Y.; CHAURET, N.; CROMLISH, W.; DESMARAIS, S.; DUONG, L. T.; FALGUEYRET, J.-P.; KIMMEL, D. B.; LAMONTAGNE, S.; LÉGER, S.; LERICHE, T.; LI, C. S.; MASSÉ, F.; MCKAY, D. J.; NICOLL-GRIFFITH, D. A.; OBALLA, R. M.; PALMER, J. T.; PERCIVAL, M. D.; RIENDEAU, D.; ROBICHAUD, J.; RODAN, GIDEON A.; RODAN, S. B.; SETO, C.; THÉRIEN, M.; TRUONG, V. -L.; VENUTI, M. C.; WESOŁOWSKI, G.; YOUNG, R. N.; ZAMBONI, R.; BLACK, W. C. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 923–8, 2008.
- 65 BETHEL, P. A.; GERHARDT, S.; JONES, E. V.; KENNY, P. W.; KAROUTCHI, G. I.; MORLEY, A. D.; OLDHAM, K.; RANKINE, N.; AUGUSTIN, M.; KRAPP, S.; SIMADER, H.; STEINBACHER, S. Design of selective Cathepsin inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 16, p. 4622–5, 2009.
- 66 DURRANT, J. D.; KERÄNEN, H.; WILSON, B. A.; MCCAMMON, J. A. Computational identification of uncharacterized cruzain binding sites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. e676, 2010.

- 67 AVELAR, Leandro. **Síntese de inibidores das enzimas cruzaina e diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi**. 2014. 211 f. Tese (Mestrado em Química orgânica e biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2014.
- 68 SUN, T.; ZHANG, W.; ZONG, C.; WANG, P.; LI, Y. Total synthesis and stereochemical reassignment of tasiamide B. **Journal of Peptide Science**, v. 16, n. 7, p. 364–74, 2010.
- 69 SURESHBABU, V. V.; NARENDRA, N. **1 Protection reactions**. [s.l: s.n.], 2011. v. 4
- 70 SMITH, M. AND MARCH, J. **March's advanced organic chemistry reactions, mechanisms, and structure**. 6 ed. New York: John Wiley, 2007. p. 1402–1404
- 71 JOULLIÉ, M. M.; LASSEN, K. M. Evolution of amide bond formation. **Arkivoc**, v. 8, p. 189–250, 2010.
- 72 VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606–31, 2009.
- 73 EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 6557–602, 2011.
- 74 KÖNIG, W.; GEIGER, R. Eine neue methode zur synthese von peptiden: aktivierung der carboxylgruppe mit dicyclohexylcarbodiimid und 3-hydroxy-4-oxo-3.4-dihydro-1.2.3-benzotriazin. **Chemische Berichte**, v. 103, n. 7, p. 2034–2040, 1970.
- 75 CARPINO, LOUIS A.; IMAZUMI, H.; EL-FAHAM, AYMAN; FERRER, FERNANDO J.; ZHANG, C.; LEE, YUNSUB; FOXMAN, BRUCE M.; HENKLEIN, P.; HANAY, CHRISTIANE; MUGGE, CLEMENS; WENSCHUH, H.; KLOSE, JANA; BEYERMANN, MICHAEL AND BIENERT, M. The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. **Angewandte Chemie**, v. 41, n. 3, p. 441–445, 2002.
- 76 BOFILL, J. M.; ALBERICIO, F. Understanding the structure/reactivity of aminium/uronium salts as coupling reagents in peptide synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 13, p. 2641–2644, 1999.
- 77 SMITH, G AND EVANS, R. The effect of struture and conditions on the rate of racemizations of free and bound amino acids. In: HARE, P.E.; HOERING, T.C.; KING, K., J. (Ed.). **Biogeochemistry of amino acids**. New York: John Wiley, 1980. p. 257–282.
- 78 CHEN, L.; CHRISTOPHER, R. R. **Methods for the synthesis of arginine-containing peptides**. US n. EP1968995A1, 17 Set. 2008.
- 79 ANDERSON, G. W.; ZIMMERMAN, J. E.; CALLAHAN, F. M. The mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. **Journal of American Chemical Society**, v. 2902, n. 6, p. 5012–5017, 1967.

80 HU, Z.; AN, Q.; LI, K.; ZHANG, Y.; QIU, J.; XU, B.; PAN, W.; CAO, P.; LIU, C.; HUANG, Z.; XIA, W.; LIANG, G. Identification, synthesis, and strategy for minimization of potential impurities in the preclinical Anti-HBV drug Y101. **Organic Process Research & Development**, v. 17, p. 1156–1167, 2013.

81 SCHWARTZ, P. A.; KUZMIC, P.; SOLOWIEJ, J.; BERGQVIST, S.; BOLANOS, B.; ALMADEN, C.; NAGATA, A.; RYAN, K.; FENG, J.; DALVIE, D.; KATH, J. C.; XU, M.; WANI, R.; MURRAY, B. W. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 1, p. 173–8, 2014.

82 SINGH, J.; PETTER, R. C.; BAILLIE, T. A.; WHITTY, A. The resurgence of covalent drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 10, n. 4, p. 307–17, 2011.

83 ZIMMERMAN, M.; ASHE, B.; YUREWICZ, E. C.; PATEL, G. Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 47–51, 1977.

84 ALVES, L. C.; MELO, R. L.; CEZARI, M. H.; SANDERSON, S. J.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. Analysis of the S(2) subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 137–43, 2001.

85 LIMA, A. P.; DOS REIS, F. C.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; MÉNARD, R.; VERNET, T.; THOMAS, D. Y.; STORER, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 41–52, 2001.

86 WIGGERS, H. J. **Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrizos**. 2011. 173 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

87 GRAPHPAD PRISM. **Computing Ki for a competitive enzyme inhibitor, Step by step examples**. Version 4.0, 2003. Disponível em: <<http://www.graphpad.com/faq/file/P4-Competitive%20inhibition.pdf>>. Acesso em 26 set. 2014.

88 BARRETT, A.; KEMBHAVI, A.; BROWN, M. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins, B, H and L. **Biochemical Journal**, v. 201, n. 1, p. 189–198, 1982.

89 MALAVAŠIČ, Č.; GROŠELJ, U.; GOLOBIČ, A.; BEZENŠEK, J.; STANOVNIK, B.; STARE, K.; WAGGER, J.; SVETE, J. Synthesis and structure of novel (S)-1,6-dialkylpiperazine-2,5-diones and (3S,6S)-1,3,6-trialkylpiperazine-2,5-diones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 22, n. 6, p. 629–640, 2011.

90 THALHAMMER, A.; MECINOVIĆ, J.; SCHOFIELD, C. J. Triflic anhydride-mediated synthesis of oxazoles. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 9, p. 1045–1047, 2009.

91 CABEZAS, M. J.; CAMPO, C. D. E. L.; LLAMA, E.; SINISTERRA, J. V; GUISAN, J. M. Organic reactions catalyzed by insolubilized enzymes part II. Influence of structure of the acyl donor in selectivity of α -chymotrypsin. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 62, p. 353–367, 1990.

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Meñaca Orozco, Erika Vanessa

Síntese e relações estrutura-atividade de dipeptidil-nitrilas inibidoras da Cruzaina. / Erika Vanessa Meñaca Orozco. — São Carlos, 2015.
150 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Carlos, 2015.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

1. Inibidores de enzimas. 2. Compostos orgânicos. 3. Cruzaina. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

6 Anexos

São anexados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , e os correspondentes espectros de massa. Deve-se ressaltar que só foram apresentados os espectros de RMN- ^{13}C , assim mesmo para os espectros de massa para os produtos finais.

Nos espectros de RMN ^1H , aparecem alguns sinais que não foram etiquetados devido a que correspondem a sinais de solventes como:

Acetato de etila, ou tetraidrofurano.

Neq0409, RMN ¹H, solvente DMSO

Neq0409, RMN ¹³C, solvante DMSO

Neq0409, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0410, RMN ¹H, solvent DMSO

Neq0410, RMN ¹³C, solvente DMSO

Neq0410, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0412, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0412, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0412, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0413, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0413, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0413, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0570, RMN ^1H , Solvente DMSO

Neq0570, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0570, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0573, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0573, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0573, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0550, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0550, RMN ^{13}C , Solvente DMSO

Neq0550, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0551, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0551, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0551, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0552, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0552, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0552, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0567, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0567, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0567, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0571, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0571, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0571, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0572, RMN ^1H , Solvente DMSO

Neq0572, RMN ^{13}C , Solvente DMSO

Neq0572, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0568, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0568, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0568, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0569, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0569, RMN ^{13}C , Solvente DMSO

Neq0569, Espectro de Massa, solvente Metanol

Neq0534, RMN ¹H, Solvente DMSO

Neq0534, RMN ¹³C, Solvente DMSO

Neq0534, Espectro de Massa, solvente Metanol