



OTIMIZAÇÃO DE COMPOSTOS LÍDERES PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Síntese de Análogos de Pirrolidina-Isoxazol com Potencial Atividade Biológica

Palavras-Chave: Chagas, *Hit-to-Lead*, Pirrolidina-Isoxazol

Autores:

João Pedro Nogueira Bonesconto, IQ - Unicamp
Dr. Guilherme Augusto de Melo Jardim, IQ - Unicamp
Prof. Dr. Luiz Carlos Dias (orientador), IQ - Unicamp

INTRODUÇÃO:

O protozoário *Trypanosoma cruzi* infecta cerca de 6 milhões de pessoas em todo o mundo, e é responsável pela morte de pelo menos quatorze mil indivíduos por ano apenas no Brasil. Agente etiológico da doença de Chagas, o organismo flagelado é vetorizado por percevejos hematófagos do gênero triatoma, através de suas fezes depositadas em picadas ou consumo direto do invertebrado, e é endêmico de toda a América Latina¹. Considerando o impacto socioeconômico da Doença de Chagas no Brasil e no mundo², torna-se imprescindível o desenvolvimento de um tratamento efetivo, confiável e acessível para a enfermidade.

Atualmente, apenas um composto com atividade antitripanossômica é aprovado no Brasil: o benznidazol (Figura 1). Uma amida nitro-aromática, este fármaco foi desenvolvido ainda na década de 1970, e possui efeitos terapêuticos limitados, além de considerável toxicidade. Frente a isso, o consórcio *Lead Optimization Latin America* (LOLA)³ concentra esforços para a descoberta de medicamentos contra Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), como a Doença de Chagas.

Destarte, o projeto visa, em parceria com a *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi), a síntese *hit-to-lead* de compostos análogos de pirrolidina-isoxazol com potencial atividade biológica contra o *Trypanosoma cruzi*, semelhantes ao hit inicial DNDI0003319713 da Série ChemDiv_9 encontrado em um ensaio fenotípico (Figura 1).

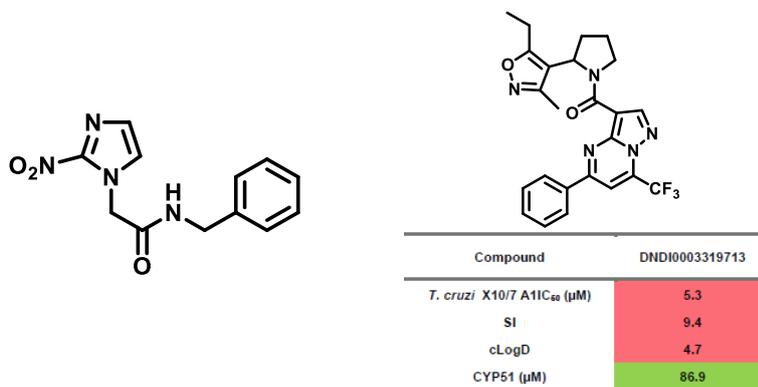
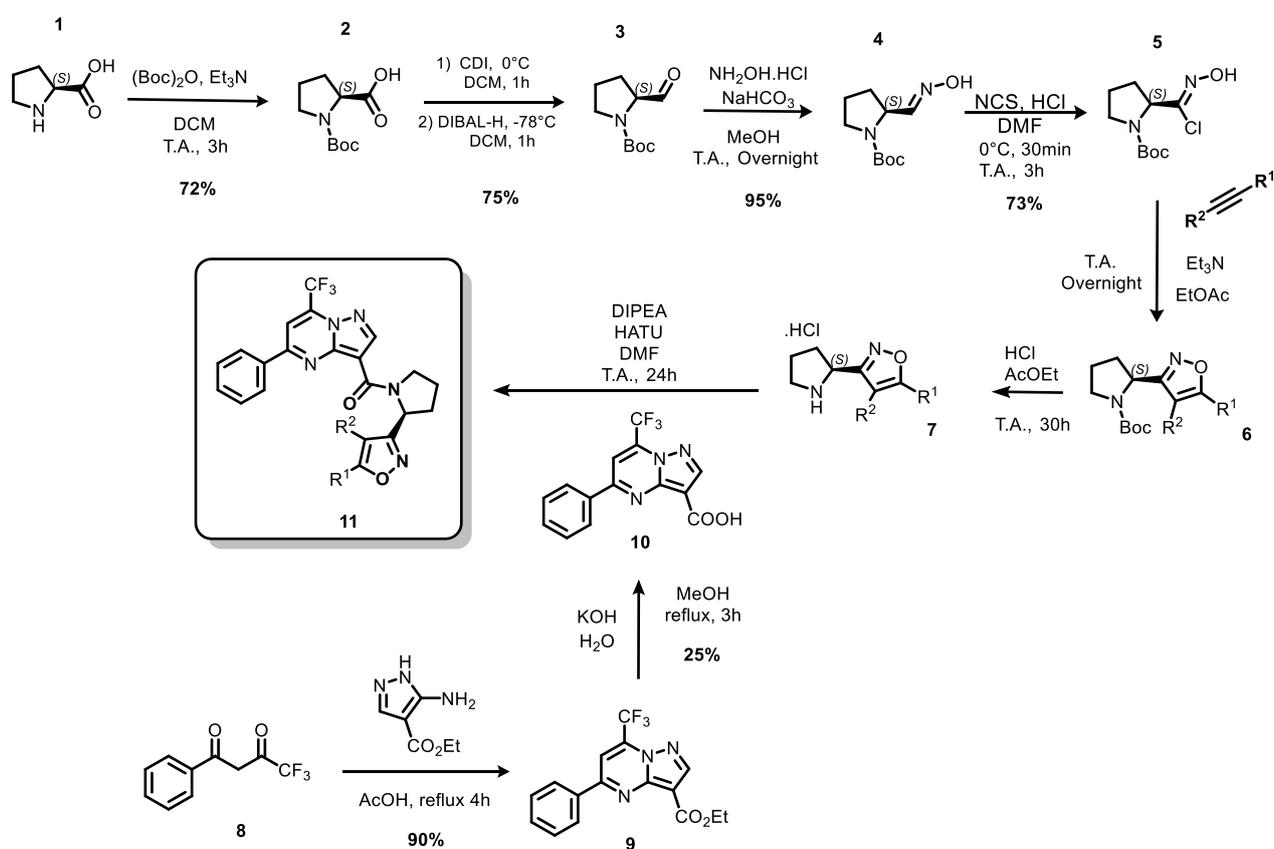


Figura 1: Benznidazol (esquerda) e hit inicial da ChemDiv_9 com resultados biológicos (direita)

METODOLOGIA:

Para a síntese dos compostos, foi proposta uma rota convergente, na qual duas porções previamente sintetizadas – uma pirazolopirimidina contendo um grupo carboxila e um análogo de pirrolidina com isoxazol – serão unidas por um acoplamento de amina. A pirazolopirimidina foi sintetizada a partir da condensação do aminopirazol com a butadiona **8** comerciais representados no esquema abaixo (Esquema 1), seguida da hidrólise do éster obtido com KOH.

A porção referente a pirrolidina, por sua vez, é sintetizada a partir da L-prolina⁴ através da proteção do grupo amino com Boc⁵ e redução da carboxila a aldeído⁶, seguidas da formação de oxima e posterior cloração com N-clorosuccinimida, obtendo a cloroxima **5**. Esta será, então, utilizada para gerar o óxido de nitrila, 1,3-dipolo empregado em reações de cicloadição [3+2] com alcinos para obtenção de diferentes porções isoxazol. Essas duas porções serão posteriormente unidas por meio de um acoplamento de amina utilizando DIPEA e HATU⁷.

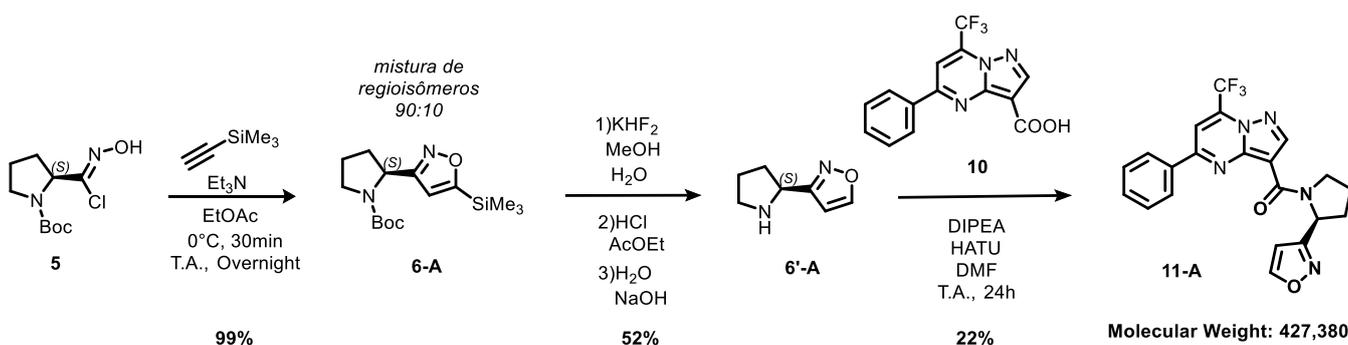


Esquema 1: Rota proposta para a síntese dos análogos

Os compostos sintetizados serão, então, enviados para avaliação biológica e de parâmetros farmacêuticos nos laboratórios de ensaios da *DNDi*. Esta etapa possui finalidade de verificar eficácia oral *in vivo* e identificar compostos que satisfazem os critérios de progressão para o surgimento de compostos líderes. As moléculas serão testadas quanto a sua atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen C4 (LacZ)) e citotoxicidade *in vitro* no LQMC, USP-São Carlos, além de propriedades farmacocinéticas *in vitro* (ADME – solubilidade, estabilidade metabólica, lipofilicidade, permeabilidade) e *in vivo*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Até o momento, foi sintetizado um análogo do composto **11**, contendo hidrogênios nas posições de R¹ e R². O composto, enumerado **LOLA1068**, foi obtido através da reação entre a cloroxima **5** e o alcino representado abaixo, juntamente às condições reacionais (Esquema 2). Neste caso, a reação do isoxazol com **10** foi realizada tanto com seu cloridrato, quanto com a amina livre **6'-A**, sem diferença significativa no rendimento do acoplamento. Para os próximos compostos, será utilizado apenas o cloridrato, uma vez que sua manipulação é mais simples e a neutralização do sal em meio básico gera perdas significativas de massa do produto.



O sucesso da rota sintética proposta foi corroborado por espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton de cada intermediário sintetizado, assim como os espectros de RMN de próton e carbono para o composto final **11-A**, unidos ao espectro de infravermelho e apresentados na Figura 3. O candidato foi obtido na forma de um sólido cristalino amarelo-pálido com ponto de fusão igual a 209,9°C, massa total de 53 mg - ou 124umol - e foi despachado para realização dos ensaios biológicos.

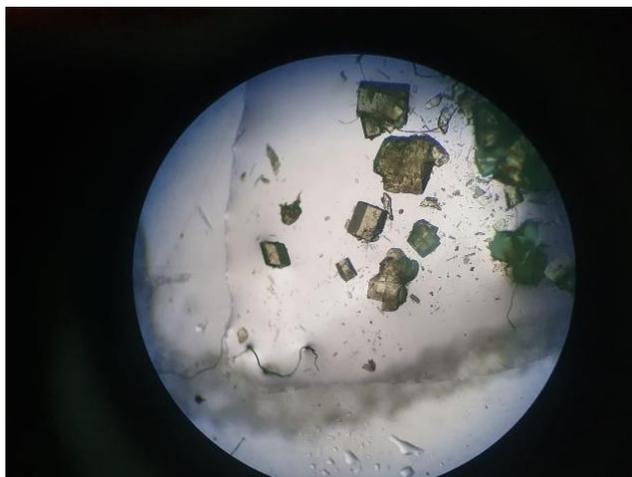
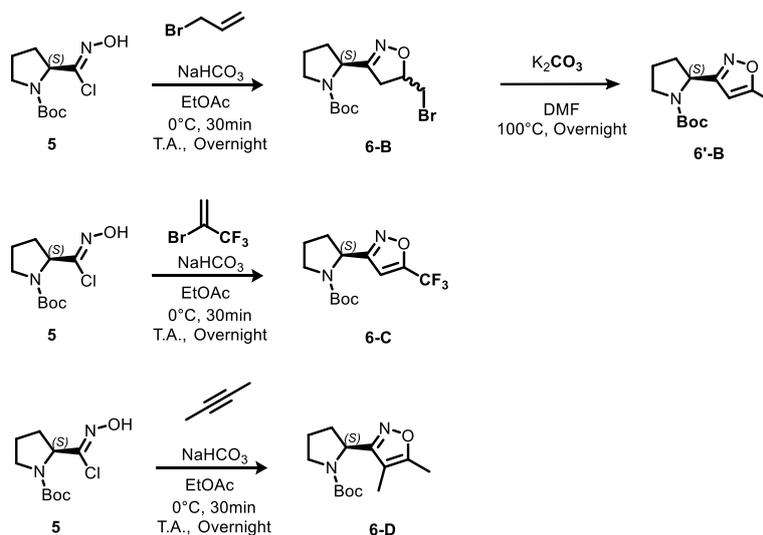


Figura 2: Cristais do composto **11-A** visualizados com luz polarizada sob microscópio óptico

Frente ao êxito da rota estabelecida, a prioridade torna-se sintetizar, agora, compostos com substituintes na porção isoxazol da molécula. O foco continuará direcionado a substituintes alquílicos, com adição de um análogo fluorado, e outras três rotas já estão definidas para confecção dos candidatos (Esquema 3)^{4,8}.



Esquema 3: Próximos núcleos pirrolidina-isoxazol a serem sintetizados

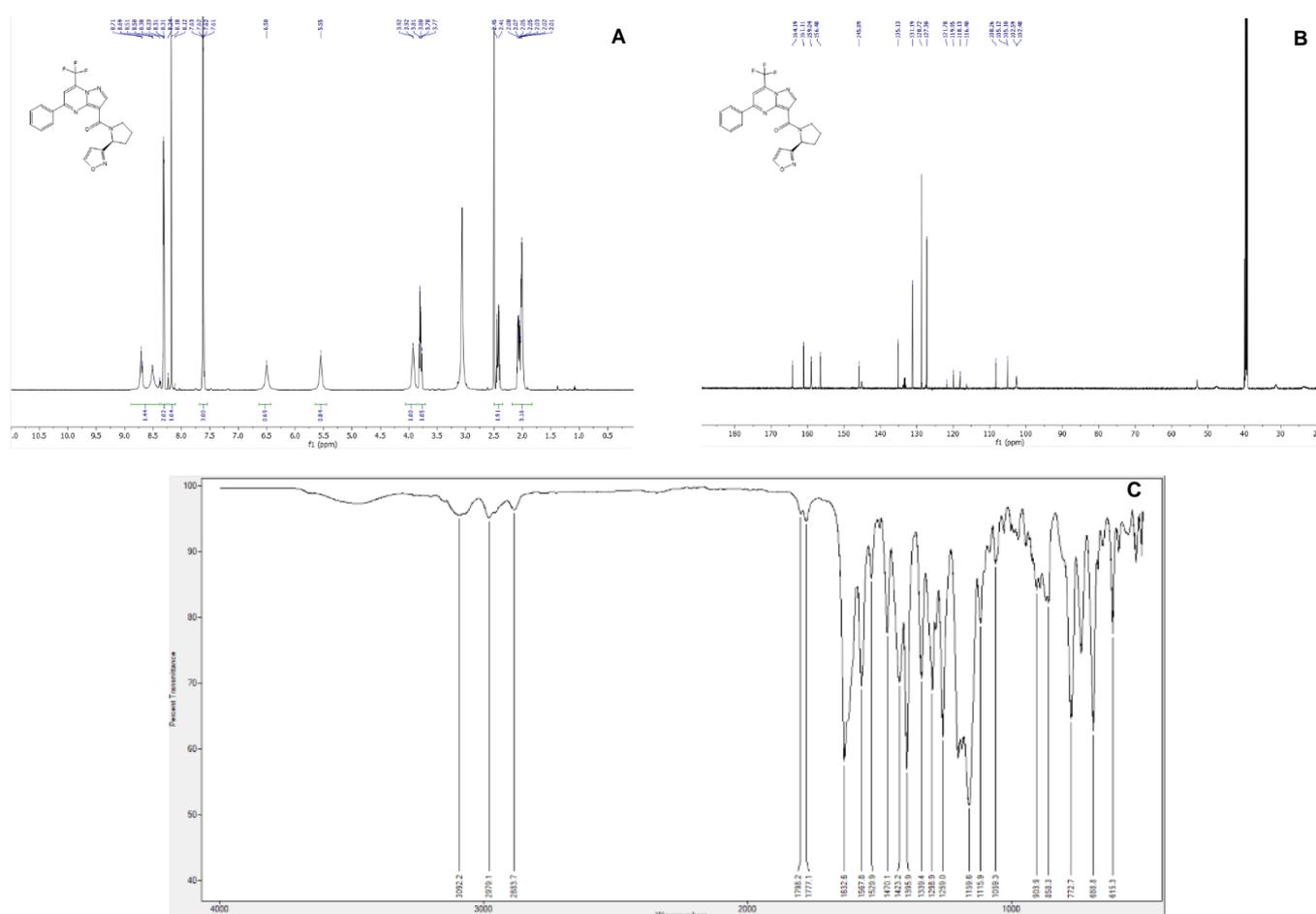
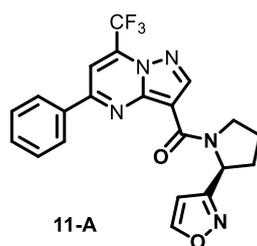


Figura 3: Análises referentes ao composto **11-A**. A- RMN-1H a 80°C em DMSO-d₆; B- RMN-13C a 85°C em DMSO-d₆; C- Espectro FTIR com detector de LiTaO₃

Outrossim, dados obtidos por Difração de Raios-X de Monocristal (DRX-Monocristal) estão sendo avaliados, juntamente com aqueles de HPLC quiral, para definir o excesso enantiomérico do produto final **11-A** e, portanto, definir se foi possível manter a configuração absoluta da L-Prolina ao longo da rota. Caso se verifique manutenção da configuração absoluta, a rota poderá ser repetida utilizando a D-Prolina para que se possa comparar a eficácia e os parâmetros biológicos dos dois enantiômeros.



Compound	DNDI0004042333
<i>T. cruzi</i> X10/7 A1IC ₅₀ (μM)	9.07
SI	> 7.07
eLogD	3.49
HEPG2 (μM)	> 64

Figura 4: Resultados dos testes *in vitro* e ADME do composto **11-A** e comparação com o hit inicial

Por fim, os testes biológicos realizados demonstram que, embora haja uma diminuição da potência da droga explicitada pelo aumento do parâmetro IC₅₀, o composto **11-A** apresenta uma lipofilicidade experimental (eLogD – obtido em pH = 7.4) superior àquela calculada para o hit inicial (Figura 1), indicando melhor permeabilidade celular e consequente melhora na disponibilidade do composto no citosol. A citotoxicidade, medida utilizando células HEPG2, também se mostrou adequada. Os testes indicaram, ainda, metabolismo em microsossomos humanos *in vitro* igual a 67.6 μL/min/mg e solubilidade em água de 5.33 μg/mL em pH 7.4, o que configura uma boa solubilidade para drogas de via oral.⁹

CONCLUSÕES:

Pelo conteúdo aqui apresentado, a rota sintética utilizada se mostra promissora para obtenção e otimização de auspiciosos compostos líderes análogos de pirrolidina-isoxazol e apresenta potencial para ser uma importante ferramenta na descoberta de fármacos tripanossomicidas de via oral e, assim, auxiliar na evolução da qualidade de vida de mais de seis milhões de pessoas ao redor do planeta.

BIBLIOGRAFIA

- MARTINS-MELO, F. R. et al. **Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis.** Acta tropica, v. 130, p. 167–74, fev. 2014.
- PINHEIRO, E. et al. **Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 50, n. 3, p. 296–300, jun. 2017.
- NTD DRUG DISCOVERY BOOSTER HIT-TO-LEAD.** Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2023. Disponível em: <https://dndi.org/research-development/portfolio/drug-discovery-boosters/>, acesso em jul. 2023
- CHALYK, B. A. et al. **A base promoted multigram synthesis of aminoisoxazoles: valuable building blocks for drug discovery and peptidomimetics.** RSC Advances, v. 6, p. 25713-25723, mar. 2016.
- WU, X. et al. **An L-proline functionalized metallo-organic triangle as size-selective homogeneous catalyst for asymmetry catalyzing aldol reactions.** Chemical Communications, v.47, p. 8415-8417, jun. 2011.
- IVKOVIC, J. et al. **A rapid and efficient one-pot method for the reduction of N-protected α-amino aldehydes using CDI/DIBAL-H.** Organic and Biomolecular Chemistry, v. 13, p. 10456-10460, set. 2015.
- ALEXANDER, M. D. et al., ROBIDOUX, A. L. C. et al. **Patent number WO 2014/149164 A1.** Depositada em 14.01.2014, concedida em 25.09.2014.
- CHALYK, B.A. et al. **Synthesis of 5-(Fluoroalkyl)isoxazole Building Blocks by Regioselective Reactions of Functionalized Halogenoximes.** The Journal of Organic Chemistry, v. 84, p. 15877 – 15899, out. 2019.
- CISNEROS, J. A. et al. **Systematic Study of Effects of Structural Modifications on the Aqueous Solubility of Drug-like Molecules.** ACS Medicinal Chemistry Letters, v. 8, p. 124-127, jan. 2017.