Síntese e avaliação biológica de um possível inibidor covalente da enzima guanina fosforibosiltransferase (GPRTase) como ferramenta terapêutica contra giardíase

Palavras-Chave: Giardíase, GPRTase, inibidor covalente

Autores:

Luciano Marchi De Souza Mello - FCF UNICAMP

B.Sc Gabriel Silva Leite (coorientador) - FCF UNICAMP

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano (orientador) - FCF UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Doenças tropicais negligenciadas são responsáveis por inúmeras mortes anualmente, em especial em países em desenvolvimento (ROCHA, 2023). Nesse cenário, temos a giardíase, causada pelo protozoário *Giardia lamblia*, parasito de destaque nesse grupo de doenças (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006). Porém, o surgimento de linhagens resistentes do parasito impulsionam a necessidade de novas ferramentas para seu tratamento (MÜLLER; HEMPHILL; MÜLLER, 2011). O projeto explora a enzima GPRTase, essencial ao parasito, e propõe um ligante covalente altamente seletivo, o que aumentaria o perfil de biossegurança e eficácia do tratamento (MEHLHORN, 2001). Visando uma estrutura análoga à GMP (figura 1), a estratégia de design empregada foi a substituição bioisostérica do anel de ribose presente na GMP por um 1,2,3- triazol, devido a complexidade sintética menor, que pode ser facilmente obtido através de reações do tipo *Click Chemistry* (MALIK et al., 2020). Ao explorar a diferença estrutural entre a GPRTase e HGPRTase, sugerimos a expansão de cadeia na posição usual da carbonila da purina, a fim de gerar seletividade para GPRTase, uma vez que o sítio ativo da HGPRTase (enzima humana correspondente) não comportaria tal expansão (MUNAGALA; SARVER; WANG, 2000). Dessa forma, propomos sua obtenção através de sua síntese química e avaliação de sua atividade citotóxica contra o parasito *G. lamblia* bem como células de mamíferos, para um possível novo tratamento da doença.

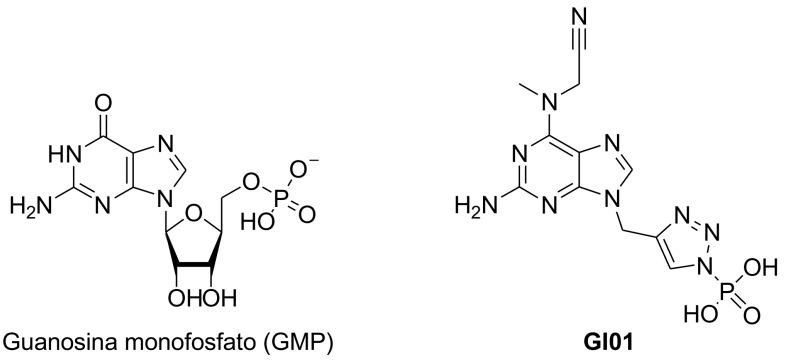

Figura 1. Estruturas da guanosina monofosfato e do composto GI01, proposto como inibidor da enzima GPRTase.

METODOLOGIA:

A rota de síntese proposta partiu do reagente comercial 2-Amino-6-cloro-purina (**1**). A primeira etapa consiste em uma reação de propargilação do nitrogênio N-9 do composto **1**. Em seguida, uma condensação do intermediário **2** com Difenilfosforil azida através de uma reação de *Click Chemistry* gera o composto **3**, contendo um 1,2,3-triazol. Na etapa seguinte ocorre a inserção da (Metilamino)acetonitrila através de uma reação de substituição com o cloro da posição 6 da purina, gerando o composto **4**. A etapa final parte do intermediário **4** e consiste na desproteção do grupo fosfato, gerando o inibidor proposto GI01 (figura 2).

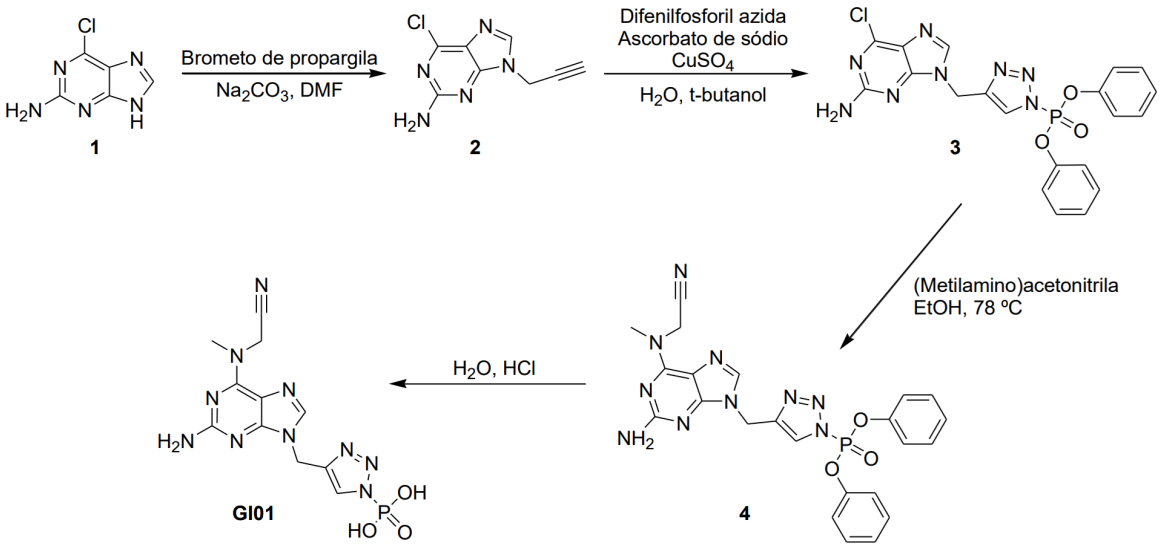

Figura 2. Rota de síntese proposta para obtenção do possível inibidor de GPRTase GI01.

Devido ao alto custo da (Metilamino)acetonitrila, adquirida comercialmente na ordem de mg, optamos pela padronização da rota primeiramente com o grupo etanolamina como substituinte, para então reintroduzirmos a (Metilamino)acetonitrila à rota após sua padronização. Desta forma proporcionamos uma melhor gestão de recursos sem afetar o andamento sintético.

RESULTADOS:

○ <u>Propargilação da 2-Amino-6-cloropurina</u>:

Primeiramente foi adicionado 2-Amino-6-cloropurina (200 mg, 1,18 mmol) em DMF (5 ml) e K_2CO_3 (163 mg, 1,18 mmol), sendo agitado por 30 minutos a temperatura ambiente. Então, brometo de propargila (140 mg, 1,18 mmol) foi adicionado e a reação permaneceu em temperatura ambiente por 48 horas (LINDSELL et al, 1999). Após o término da reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o bruto reacional foi purificado por coluna cromatográfica clássica (CCC) de sílica (acetato de etila/hexano, 5:2, v/v). A análise do espectro de RMN de hidrogênio (Figura 3) comparado à literatura nos mostra o sucesso da reação. R_f = 0,71 (acetato de etila/etanol 100:5 v/v). Rendimento 70,7 %. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.18 (s, 1H), 7.03 (s, 2H), 4.93 (d, 2H), 3.48 (t, 1H).

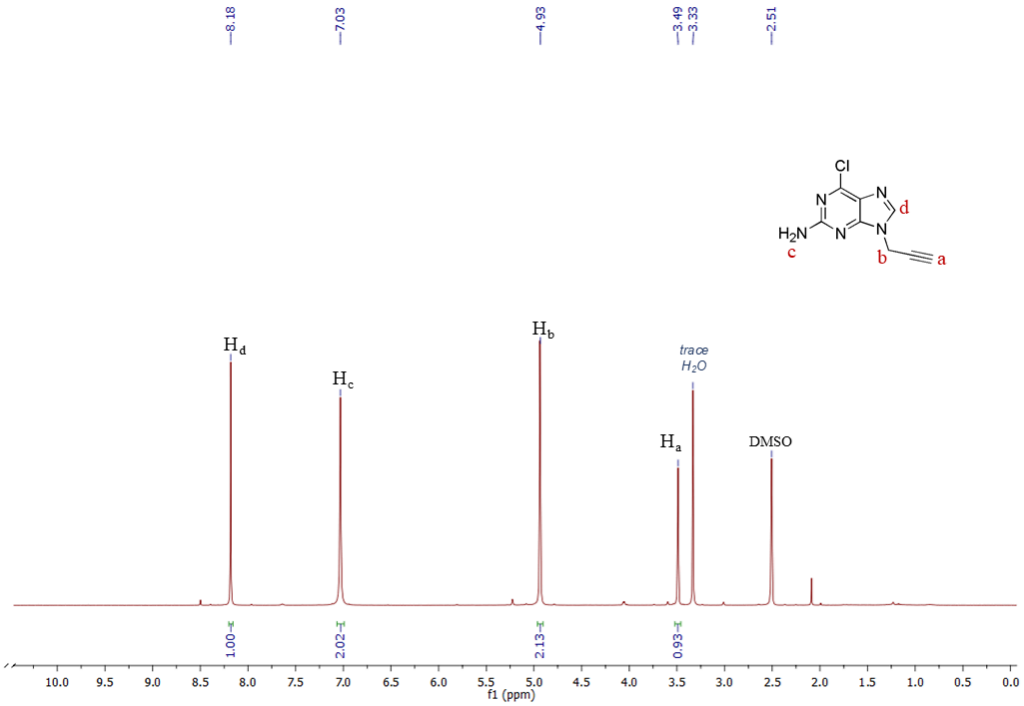

Figura 3. Espectro de RMN ^{1}H do produto da reação de propargilação da 2-Amino-6-cloropurina. Os sinais correspondem com os encontrados na literatura para este composto.

○ <u>Reação de *Click Chemistry* com a Difenilfosforil azida</u>:

Purina propargilada (163,2 mg, 0,786 mmol) e Difenilfosforil azida (216,3 mg, 0,786 mmol) foram solubilizados em DMF (4 ml) e então adicionados ascorbato de sódio (15,6 mg, 0,786 mmol) e 4 gotas de sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO4.5H2O) (FAROOQ et al, 2014). A solução foi aquecida a 80° C por 72 h e acompanhada por CCD. Após o término da reação, o solvente foi evaporado e o bruto reacional submetido a uma primeira extração em diclorometano para remover a maior parte das impurezas de caráter mais apolar, seguido por extração em água saturada com NaCl e acetato de etila. A fase orgânica resultante foi evaporada e o sólido purificado em CCC de sílica (acetato de etila/etanol 3:1 v/v). As análises foram realizadas pelo RMN de bancada (baixa resolução) que dispomos em nosso laboratório nos dando o espectro seguinte (Figura 2). R_f = 0,22 (acetato de etila/etanol 100:5 v/v). Rendimento 51,1 %. NMR (60 MHz, D_2O) δ 7.33 (m). A reação apresentou a formação de apenas um único produto em CCD com significativa mudança de R_f, de R_f = 0,71 da

purina propargilada e R_f = 0,9 da difenilfosforil azida para R_f = 0,22 do produto (sólido branco). Portanto, apesar de os demais sinais esperados não aparecerem no espectro, decidimos partir para a etapa seguinte a fim de otimizar o tempo de trabalho, uma vez que a reação de *Click Chemistry* é conhecida pela sua alta especificidade, nos dando uma maior segurança para continuarmos.

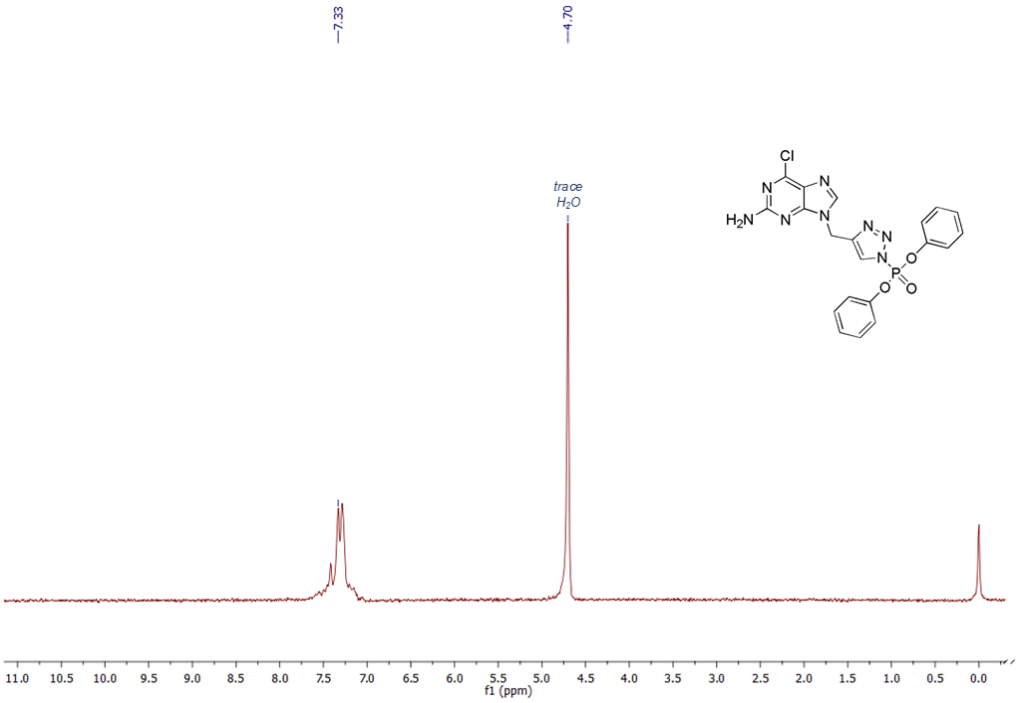

Figura 4. Espectro de RMN ^{1}H do produto de *Click Chemistry*. Observamos a presença dos anéis aromáticos pertencentes a difenilfosforil azida através do seu sinal característico em δ 7,33.

○ <u>Inserção da etanolamina:</u>

Iniciamos esta etapa com a adição do produto da reação de *Click* (194 mg, 0,402 mmol) em etanol (suficiente para solubilizar) e adição de etanolamina (0,036 ml, 0,603 mmol) e N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA, 0,07 ml, 0,402 mmol) sob refluxo (BOËNS et al., 2013). Após 48 h não foi possível visualizar nenhuma nova mancha além do próprio material de partida. Esta reação já foi realizada anteriormente no grupo de pesquisa tanto com 2-Amino-6-cloropurina quanto com seu análogo propargilado e ambos foram funcionalizados com etanolamina. Entretanto, para o intermediário atual, após a reação de *Click*, a atividade do haleto como grupo abandonador é aparentemente reduzida, não permitindo que a reação ocorra. Diferentes abordagens já foram realizadas a fim de se obter o resultado esperado, mas ao que tudo indica a reação não foi bem sucedida. Portanto, no exato momento, estamos trabalhando com a inversão das etapas da rota sintética, partindo do composto **1** inserindo a etanolamina, seguido de sua propargilação para posterior *Click Chemistry* e desproteção. Acreditamos que a síntese de GI01 seja concluída antes do relatório final.

CONCLUSÕES:

A rota proposta para o composto GI01 necessitou de alterações devido aos desafios impostos pela própria química orgânica. Esperamos concluir em breve a síntese do composto GI01 e realizar a sua então caracterização biológica como possível inibidor de Guanina Fosforibosiltransferase, visando um futuro tratamento para a giardíase.

BIBLIOGRAFIA

BOËNS, B.; AZOUZ, M.; OUK, T.; ZERROUKI, R. **Synthesis and biological evaluation of nitrogen mustard derivatives of purine bases**. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, v. 32, n.2, p. 69-80, 2013.

EDWARD LINDSELL, W.; MURRAY, C.; PRESTON, P. N.; WOODMAN, T. A. J. **Synthesis of 1,3-Diynes in the Purine, Pyrimidine, 1,3,5- Triazine and Acridine Series**. Tetrahedron, v. 56, n. 9, p. 1233–1245, 2000.

FAROOQ, S.; SHAKEEL-U-REHMAN; HUSSAIN, A.; HAMID, A.; QURISHI, M. A.; KOUL, S. **Click chemistry inspired synthesis and bioevaluation of novel triazolyl derivatives of osthol as potent cytotoxic agents**. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 84, p. 545–554, 2014.

HEINZ MEHLHORN. **Encyclopedic Reference of Parasitology**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.

MALIK, M. S.; AHMED, S. A.; ALTHAGAFI, I. I.; ANSARI, M. A.; KAMAL, A. **Application of triazoles as bioisosteres and linkers in the development of microtubule targeting agents**. RSC Medicinal Chemistry, v. 11, n. 3, p. 327–348, 2020.

MUNAGALA, N.; WANG, C. C. **The pivotal role of guanine phosphoribosyltransferase in purine salvage by Giardia lamblia**. Molecular Microbiology, v. 44, n. 4, p. 1073–1079, 2002.

MÜLLER, J.; HEMPHILL, A.; MÜLLER, N. **Treatment of giardiasis and drug resistance**. In: LUJÁN, H. D.; SVÄRD, S. (Eds) *Giardia* - a model organism. New York: Springer Verlag, 2011.

ROCHA, M. I. F.; MARANHÃO, T. A.; DA FROTA, M. M. C.; DE ARAUJO, T. K. A.; VERAS E SILVA, W. W. S.; SOUSA, G. J. B.; DUARTE PEREIRA, M. L.; DE ARAUJO FILHO, A. C. A. **Mortalidade por doenças tropicais negligenciadas no Brasil no século XXI: análise de tendências espaciais e temporais e fatores associados**. Revista Panamericana de Salud Pública, v. 47, p. 1, 2023.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. **Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'**. Trends in Parasitology, v. 22, n. 5, p. 203–208, 2006.