

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

Max Gerlack

SINTESE DE INIBIDORES DUAIS COMO AGENTES REVERSORES DE LATENCIA PARA HIV

Araraquara 2021

Max Gerlack

SINTESE DE INIBIDORES DUAIS COMO AGENTES REVERSORES DE LATENCIA PARA HIV

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador: Prof^o Dr^o Jean Leandro dos Santos Co-orientadora: M. Juliana Romano Lopes

Araraquara 2021

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família por ter me dado todo o apoio, emocional e financeiro, necessário para chegar até aqui, e claro por terem sempre se preocupado em como estavam minhas coisas da faculdade e me dado alguns puxões quando foram necessários.

Gostaria também de agradecer muito as todos as pessoas do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf), por terem me ajudado quando foi necessário e pelas ideias e conhecimentos que me foram passados, que foram muito importantes para meu completo entendimento e realização deste trabalho.

Por último e não menos importante, gostaria de agradecer a mestre Juliana Romano e ao Professor, por terem paciência de aguentar minhas piadas sem graça e terem me ensinado tanto em um período tão curto, vou levar esses conhecimentos para o resto da minha vida.

Esse trabalho foi financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq), processo nº 136636/2020-9.

RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA ou AIDS em inglês). Embora altamente efetivo na redução da carga viral, o tratamento com a terapia antirretroviral (TARV) não promove a eliminação do vírus, uma vez que o HIV permanece em estado latente nos linfócitos T CD4+ de memória, sendo reativado com a interrupção do tratamento. Essas células latentes não expressam as proteínas virais e, portanto, permanecem indetectáveis pelo sistema imunológico. A fim de eliminar o vírus dos reservatórios celulares, e atingir a 'cura funcional' foi planejada a estratégia *kick and kill*. Essa abordagem visa o uso de agentes reversores de latência, capazes de reativar o HIV em estado latente e levar novamente a replicação viral. Duas classes investigadas nessa abordagem são os inibidores de histona deacetilase (HDAC) e os inibidores de bromodomínio 4 (BRD4). Assim visando a reativação desses reservatórios, devido sua importância para o processo de latência viral, este trabalho teve por objetivo sintetizar e caracterizar moléculas que apresentaram boa seletividade para a inibição das HDAC classe I (HADC 1, 2 e 3) e BRD4, sendo que um dos compostos sintetizados apresentou capacidade de inibição de 92% para HADC 1 e também 12% de inibição para BRD4 em ensaios enzimáticos.

Palavras chaves: Epigenética, novos fármacos, inibidores de bromodomínio, inibidores de histona deacetilase, HIV.

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus (HIV) is the cause of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS or AIDS in English). Still highly effective in reducing viral load, treatment with antiretroviral therapy (ART) does not promote the elimination of the virus, since HIV remains in a latent state in memory CD4+ T lymphocytes, being reactivated with the interruption of treatment. These latent cells do not express as viral proteins and therefore remain undetectable by the immune system. In order to eliminate the virus from the cell reservoirs, and achieve the "functional cure" the "kick and kill" strategy was planned. This approach aims at the use of latency reversing agents, capable of reactivating HIV in a latent state and leading to viral replication again. Two classes investigated in this approach are histone deacetylase inhibitors (HDAC) and bromodomain 4 inhibitors (BRD4). Therefore, the reactivation of these reservoirs, due to their importance for the viral latency process, this work aimed to synthesize and characterize molecules that dissipate good selectivity for inhibiting HDAC class I (HADC 1, 2 and 3) and BRD4, being that one of the synthesized compounds has 92% inhibition capacity for HADC 1 and also 12% inhibition for BRD4 in enzymatic assays.

Keywords: Epigenetics, New drugs, bromodomain inhibitors, HIV, Histone Deacetylase Inhibitors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores	de rendimento	o global e	e faixa d	e fusão	para os	compostos	finais ((7),
(12) e (1	8)								.46
() - (-	-,								

Tabela 2. Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho dos gruposquímicos presentes na estrutura química dos compostos (7), (12) e (18)......47

Tabela 3.	Resultado	da avaliação	enzimática	do composto	(7) e (18)	frente as	HDACs-
1,2 e 3.							48

Lista de llustrações

Figura 1 Ciclo infeccioso do vírus HIV14
Figura 2 Processo de latência15
Figura 3 A estrategia "Kick-and-Kill"
Figura 4 Vorinostat, um pan-inibidor de HADC18
Figura 5 Processo de reativação da latência de HIV por meio da inibição de
BRD4
Figura 6 Estrutura do composto 4d que contém uma subunidade isoxazol. Os
valores de IC50 obtidos frente a inibição de BRD2 e BRD4 são apresentados no
quadro em destaque 20
Figura 7 Otimização do composto CI-994 para obtenção de um inibidor seletivo
HDAC-1 e HDAC-2. Os valores de IC50 obtidos frente a inibição de HDAC são
apresentados no quadro em destaque 21
Figura 8 Estrutura do composto BRD3308 da classe das o-aminoanilidas, um
inibidor seletivo de HDAC classe I, com atividade de inibição de HDAC-3 22
Figura 9 Hibridação molecular entre o composto inibidor de HDAC classe I (19)
e o composto inibidor de BRD4 (4d), levando a formação dos híbridos contendo
os grupos fenil, flúor-fenil e flúor na posição do anel tiofeno 23
Figura 10. Etapas sintéticas para a obtenção dos composto final N-(4-amino-
[1,1'-biphenil]-3-il)-4-(3,5-dimethil-4,5-dihidroisoxazol-4-il)benzamida (7) 25
Figura 11. Etapas sintéticas para a obtenção do composto final N-(4-amino-4-
fluoro-[1,1'-biphenil]-3-il)-4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamida (12)
Figura 12. Etapas sintéticas para obtenção do composto final N-(2-amino-5-
fluorophenil)-4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamida(18)
Figura 13. Etapa sintética para obtenção de (2)
Figura 14. Etapa sintética para obtenção de (3)
Figura 15. Etapa sintética para obtenção de (4) 29
Figura 16. Etapa sintética para a obtenção de (5)
Figura 17. Etapa sintética para obtenção de (6) 31
Figura 18. Etapa para obtenção de (7) 32
Figura 19. Etapa para obtenção de (8)
Figura 20. Etapa sintética para obtenção de (9)

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARL	Agentes reversores de latência
BET	Bromodomain and extraterminal domain
BRD4	Bromodomínio 4
CCD	Cromatografia em camada delgada
HADC	Histona deacetilase
HADCi	Inibidores de Histona deacetilase
HIV	Human immunodeficiency vírus
LTR	Promotor de repetição terminal longa
NF-kB	fator nuclear kappa B
ONG	Organização Não Governamental
P-TEFb	Fator de alongamento positivo da transcrição
RNA Pol II	RNA Polimerase II
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TARV	Tratamento existente com antirretrovirais
TFA	Ácido Trifluoracético
TR	Transcriptase reversa

SUMÁRIO

1.	INTR	DDUÇÃO
1.1	. HIV	e AIDS: Epidemiologia
1.2	. Infe	cção e tratamento atual
1.4	. Inib	idores de histona deacetilase como ARL 16
1.5	. Inib	idores de bromodomínios como ARL18
1.6	Efei	tos sinérgicos no uso de ARLs19
2.	OBJE	FIVOS
3.	METO	DDOLOGIA
3.1	. Plar	ejamento estrutural dos compostos
3	.1.1.	Inibidores de Bromodomínio
3	.1.2.	Inibidores de HDAC
3.2	. Mo	lelagem molecular
3	.3. M	etodologia sintética
	3.3.	1.1. Síntese do tert-butyl (4-bromo-2-nitrophenyl)carbamato – (2) 27
	3.3.	1.2. Síntese do tert-butil (3-nitro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – (3) 27
	3.3.	1.3. Síntese do tert-butil(3-amino-[1,1'-biphenil]-4-il) carbamato – (4) 28
	3.3.	1.4. Síntese do tert-butil (3-(4-iodobenzamido)-[1,1'-biphenil]-4-
	il)ca	rbamato – (5)
	3.3.	1.5. Síntese do tert-butil (3-(4-(3,5-dimethil-4,5-dihydroisoxazol-4-
	il)be	enzamido)-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – (6)
	3.3.	1.6. Síntese do N-(4-amino-[1,1'-biphenil]-3-yl)-4-(3,5-dimethil-4,5-
	dihi	droisoxazol-4-il)benzamida – (7) 32
	3.3.	1.7. Síntese do tert-butil (4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato –
	(8)	
	3.3.	1.8. Síntese do tert-butil (3-amino-4'-fluoro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato
	- (9	
	3.3.	1.9. Síntese do tert-butil (4'-fluoro-3-(4-iodobenzamido)-[1,1'-biphenil]-4-
	il)ca	rbamato – (10)
	3.3.	1.10. Síntese do tert-butil (3-(4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamido)-4'-
	fluo	ro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – (11)

	3.3.1.11.	Síntese do N-(4-amino-4'-fluoro-[1,1'-biphenil]-3-i	l)-4-(3,5-
	dimethilis	soxazol-4-il)benzamida – (12)	37
	3.3.1.12.	Síntese do tert-butil (4-fluoro-2-nitrophenil)carbamato – (14)) 38
	3.3.1.13.	Síntese do tert-butil (2-amino-4-fluorophenil)carbamato – (1	5) 39
	3.3.1.14.	Síntese do tert-butil (4-fluoro-2-(4-iodobenzamido)phenil)c	arbamato
	- (16)		40
	3.3.1.15.	Síntese do tert-butil (2-(4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benza	amido)-4-
	fluorophe	enil)carbamato – (17)	41
	3.3.1.16.	Síntese do N-(2-amino-5-fluorophenil)-4-(3.5-dimethilis	oxazol-4-
	il)benzam	nida – (18)	
31	Mátodo	as analíticos	13
3.4.	11 Cro	omatografia em camada delgada (CCD)	43 43
3.4	1.2. Det	terminação da faixa de fusão	
3.4	1.3. Esp	pectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV).	
3.4	1.4. Res	ssonância magnética nuclear (RMN)	43
3.4	1.5. Ens	saios de inibição enzimática	44
3.5.	Métodos	s de purificação	44
3.5	5.1. Bio	otage® Isolera TM	44
3.5	5.2. Col	luna de bancada	44
3.5	5.3. Cro	omatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	44
4. RI	ESULTAI	DOS	45
4.1.	Modelage	em molecular	45
4.1.1	I. HDA	C 2	45
4.1.2	BRD4	4	45
4.2.	Síntese e	caracterização estrutural	46
4.3.	Avaliação	o enzimática	
5. CO	ONCLUS	5ÃO	49
6. RI	EFERÊN	CIAS	50
7. Ap	pêndice		53
7.1.	RMN de	o composto (2)	53
7.2.	RMN de	o composto (3)	54
7.3.	RMN d	o composto (4)	55
7.4.	RMN d	o composto (5)	56

7.5.	RMN do composto (6)	. 57
7.6.	RMN do composto (7)	. 59
7.7.	RMN do composto (8)	60
7.8.	RMN do composto (9)	61
7.9.	RMN do composto (11)	. 62
7.10.	RMN do composto (12)	. 63
7.11.	RMN do composto (14)	. 63
7.12.	RMN do composto (15)	64
7.13.	RMN do composto (17)	65
7.14.	RMN do composto (18)	65
7.15.	RMN do ácido isoxazol	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. HIV e AIDS: Epidemiologia

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o causador da <u>S</u>índrome da <u>ImunoD</u>eficiência <u>A</u>dquirida (SIDA ou AIDS em inglês). Estimativas recentes do UNAIDS (2021) apontavam que 37,6 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV no mundo em 2020, com registro de 1,5 milhões de novos casos e 690 mil mortes por causas associadas à AIDS naquele ano (UNAIDS, 2021).

Até o presente momento a infeção por HIV continua sendo incurável. Desde seu pico em 2004 (UNAIDS, 2021), dados relatam que as mortes diminuíram em 61%, devido ao uso do tratamento com os antirretrovirais (TARV). Este é capaz de controlar de maneira eficaz a infecção, interferindo em diferentes etapas do ciclo de vida do vírus.

1.2. Infecção e tratamento atual

O principal alvo do vírus são os linfócitos T CD4+, e em menor frequência, as células dendríticas e macrófagos. A fusão ocorre pós a interação de glicoproteínas presentes no envelope viral, como a gp120, com os receptores CD4 da membrana celular hospedeira, esta etapa é auxiliada pela presença de co-receptores específicos, como o CCR5 e o CXCR4 (DEEKS et al., 2015). Com a entrada do vírus na célula e liberação de seu conteúdo viral, começa então a etapa da transcrição reversa realizada pela enzima viral transcriptase reversa (TR), que transforma o RNA viral em fita simples de DNA, e então em uma dupla fita (ANDRADE, 2003). Em seguida, o DNA pró-viral é inserido no DNA da célula hospedeira por ação da enzima viral integrase (DEEKS et al., 2015). A transcrição do DNA viral, pela enzima RNA polimerase humana e pelo auxílio de fatores de transcrição, como o NF-kB (fator nuclear kappa B), leva à formação de RNA genômico viral e RNA mensageiro. No processo de tradução, proteínas essenciais para o vírus são produzidas e posteriormente maturadas com auxílio da enzima viral protease. Há formação do envelope glicoproteico do vírus na superfície da célula hospedeira, levando a formação de novos vírions e sua liberação por brotamento (DEEKS et al., 2015).



Figura 1 Ciclo infeccioso do vírus HIV

Fonte: DEEKS, S. G. et al. HIV infection. Nature Reviews. v. 1, p. 9, 2015.

Até o presente momento é estimado cerca de trinta tipos de fármacos aprovados que atuam em diferentes etapas do ciclo de vida do vírus (ZHAN, 2016; DEEKS et al., 2015), classificados de acordo com seu mecanismo de ação como os: a) inibidores de transcriptase reversa que atuam bloqueando a etapa de transcriptase reversa do vírus e impedindo a síntese de DNA viral, sendo constituídos por duas classes: os análogos de nucleosídeo, como tenofovir e lamivudina e não-nucleosídicos como nevirapina e rilpivirina (DEEKS et al., 2015). Os não-nucleosídicos inibem a enzima transcriptase reversa, enquanto os nucleosídicos são incorporados ao genoma do vírus e bloqueiam a síntese de DNA viral (DEEKS et al., 2015); b) inibidores de fusão, que impedem a entrada do vírus na célula hospedeira, tendo como exemplo o fármaco maraviroc que atua interagindo com o receptor CCR5 evitando o processo de fusão por vírus que reconhecem esse co-receptor (DEEKS et al., 2015); c) inibidores de integrase impedem que o genoma do vírus integre o DNA da célula hospedeira, como os fármacos dolutegravir, raltegravir e eltegravir (DEEKS et al., 2015); d) inibidores de protease bloqueiam a etapa final do ciclo de vida do vírus

impedindo a formação de proteínas essenciais para os novos vírions, como os fármacos darunavir e atazanavir (DEEKS et al., 2015).

1.3. Estratégia "Kick-and-Kill"

Embora tais fármacos sejam eficazes no controle da infecção, não são capazes de atuar em células que abrigam o vírus HIV no estado latente. O reservatório latente mais bem estabelecido ocorre nas células T CD4+ de memória, que perduram como células de longa duração e abrigam o genoma do vírus integrado em seu DNA (DEEKS, et al., 2012), podendo ser fonte do reestabelecimento da infecção, uma vez que as células podem retornar ao seu estado ativo com a interrupção do TARV (DEEKS et al., 2012; SILICIANO et al., 2003).



Fonte: Autoria própria

Uma nova estratégia que visa a eliminação das células de reservatório foi denominada de "kick and kill". Essa abordagem visa o uso de agentes reversores de latência (ARL), capazes de reativar o HIV latente levando novamente a produção de proteínas virais. Após a reativação, a eliminação celular do reservatório aconteceria por dois caminhos: pelo sistema imune do paciente ou com o uso de "kill agents", combinando os agentes reversores de latência com anticorpos monoclonais ou vacinas terapêuticas (DEEKS et al., 2012). Portanto, essa abordagem visa uma possível cura da infecção, forçando o vírus latente a sair de seu esconderijo e levando a eliminação do reservatório viral.



Figura 3 A estrategia "Kick-and-Kill"

Fonte: Autoria própria

1.4. Inibidores de histona deacetilase como ARL

Os inibidores de histona deacetilase (HDACi) são uma classe de agentes reversores de latência bastante explorada na literatura (DEEKS et al., 2012). As HDACs são responsáveis por remover o grupo acetil da lisina presente nas histonas, regulando o grau de compactação das histonas e promovendo a

transcrição do DNA viral inserido no genoma da célula do hospedeiro (Shirakawa et al., 2013). As HADCs podem ser classificadas em quatro famílias sendo: classe I (HDAC1–3 e -8), II (HDAC4, -5, -7 e -9), III (HDAC6 e -10) e IV (HDAC11), que diferem em estrutura, função enzimática, localização subcelular e padrões de expressão (HUBER et al., 2011). Keedy e colaboradores (2009) demonstraram que dentre todos os tipos de HDACs recrutados para a transcrição do promotor de repetição terminal longa (LTR) do HIV, os mais importantes são as de classe I, em especifico as HDACs 2 e 3, por estarem associadas ao LTR do HIV, sendo responsáveis pela transcrição do DNA viral.

Archin e colaboradores (2012) avaliaram a capacidade do vorinostat em atuar como reversor de latência. Os pesquisadores selecionaram pacientes que possuíssem um reservatório de HIV que respondesse à medicamento. Para isso, foram coletados os linfócitos T CD4 + de memória desses pacientes. Estas foram tratadas com vorinostat. Dos 16 sujeitos, 11 exibiram um significativo aumento da expressão do RNA viral mediado pelo vorinostat. Os pesquisadores administraram uma dose baixa do medicamento (200 mg) a esses oito indivíduos para determinar a tolerabilidade. Algumas semanas depois, uma dose mais alta (400 mg) foi administrada para determinar atividade reversora de latência. Dentro de seis horas os pesquisadores extraíram as células T CD4 + de memória de repouso dos pacientes para medir a concentração de RNA do HIV associado a células. No nos oito indivíduos, os níveis de RNA do HIV nas células T CD4 + de memória aumentaram em resposta ao vorinostat, com o aumento médio sendo 4,8 vezes.

O vorinostat é um pan-inibidor de HDAC, ou seja, possui a capacidade de inibir todas as classes de HADC de forma não seletiva. Assim, ele interrompe o ciclo celular levando a célula ao processo de apoptose, razão está pela qual o fármaco é aprovado para linfomas e leucemias (BARTON et al., 2014). Entretanto para um melhor resultado na reativação do reservatório latente do HIV é importante uma inibição mais efetiva das HDAC 2 e 3, por estarem ligadas diretamente a região do DNA na qual está integrada o DNA viral do HIV (BARTON et al., 2014).





1.5. Inibidores de bromodomínios como ARL

Os bromodomínios são agrupados dentro de oito famílias contendo 61 bromodomínios de 46 proteínas diferentes, sendo responsáveis por atuarem como leitoras do DNA, uma vez que essas proteínas possuem a capacidade de se reconhecer resíduos N-acetilados de lisina, atuando no controle transcricional da cromatina (LIU, et al. 2017). Dentre as oito famílias a mais relevante para o HIV é a família bromodomínios extra-terminais (BET, bromodomain and extraterminal domain), composta por BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT, sendo o mais importante o BRD4, pois ele está diretamente envolvido no processo transcricional das proteínas virais competindo com a proteína viral Tat pela ligação com o P-TEFb, sendo o P-TEFb responsável por promover a regulação do processo de transcrição pela RNA Polimerase II (RNA Pol II) (YANG, et al. 2005). Uma vez a ligação BRD4-P-TEFb leva ao impedimento da ligação da Tat com o P-TEFb, e assim reprimindo a produção de proteínas virais e consequente levando a latência. Os inibidores de BRD4 podem atuar favorecendo a ligação Tat-P-TEFb e estimular a RNA polimerase II a gerar transcritos completos do HIV, com a maior produção de proteína virais. Assim, a célula seria removida do estado de latência e consequentemente eliminação pelo sistema de defesa do organismo.



Figura 5 Processo de reativação da latência de HIV por meio da inibição de BRD4

Fonte: Autoria própria

Estudos recentes demonstraram que compostos como o JQ1 tem a capacidade de aumentar a expressão de proteínas virais, uma vez que são potenciais inibidores do BRD4, assim atuando como reversores de latência do HIV (BANERJEE et al. 2012).

1.6. Efeitos sinérgicos no uso de ARLs

Dada a natureza multifatorial da latência do HIV-1, nenhum composto isolado pode ser capaz de reverter com eficácia todos os bloqueios para a expressão do gene pró-viral, de forma que a estratégia de "kick-and-kill" para eliminação dos reservatórios latentes do HIV-1 em células T CD4+ requer ARL que atuem de forma sinérgica por meio de mecanismos de ação diferentes. Estudos sugeriram que a terapia combinada envolvendo ARLs que atuem por mecanismos distintos pode ser necessária para reverter a latência de forma mais robusta (LAIRD et al., 2015).

Entretanto, uma vez que a estratégia "kick-and-kill" visa o uso dos ARLs juntamente com o uso dos TARV, podem ocorrer muitas reações adversas em decorrência da grande quantidade de medicamento administrados conjuntamente. Morphy e colaboradores em 2005 descreveram que a hibridação molecular é um processo caracterizado pela modificação das estruturas visando a conjugação de características estruturais definidas entre dois compostos

bioativos distintos em uma única molécula. Essa abordagem pode ser benéfica como forma de evitar as interações medicamentosas e suas possíveis reações adversas, uma vez que compostos híbridos não apresentam as diferenças farmacocinéticas da administração individual de dois fármacos. Dessa forma, nessa pesquisa a hibridação molecular foi utilizada como ferramenta para o desenho de novos ARLs atuando por mecanismos duais de ação por meio da inibição de HDAC e BRD4.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa o planejamento, síntese, purificação, caracterização e avaliação de híbridos com atividade dual frente as HDACs de classe I (HDAC-1, 2 e 3) e ao BRD4, com fins de atuar como possíveis agentes reversores de latência de HIV através da estratégia "kick-and-kill".

3. METODOLOGIA

- **3.1.** Planejamento estrutural dos compostos
- 3.1.1. Inibidores de Bromodomínio

Derivados contendo a subunidade 3,5-dimetil-isoxazol foram explorados como inibidores de BET em estudos prévios na literatura (HEWINGS et al., 2011). A subunidade isoxazol é capaz de realizar ligação de hidrogênio com a asparagina-140 e uma molécula de água interna na cavidade de BRD4 (HEWINGS et al., 2011).

Figura 6 Estrutura do composto 4d que contém uma subunidade isoxazol. Os valores de IC50 obtidos frente a inibição de BRD2 e BRD4 são apresentados no quadro em destaque.



Fonte: autoria própria.

3.1.2. Inibidores de HDAC

Quanto à inibição seletiva de HDAC classe I, do ponto de vista estrutural a classe das o-amino-benzamidas é relatada como estrutura privilegiada capaz de interagir com o átomo de zinco (Zn²⁺) presente no sítio ativo das HDAC-1, 2 e 3 (WAGNER et al., 2013). No estudo de Moradei e colaboradores (2007), os autores otimizaram a estrutura de um inibidor de HDAC classe I (HDAC-1, 2 e 3), CI-994 (HOLSON; WAGNER; STAHLY; 2013) produzindo o composto **19** que contém um substituinte tiofeno na posição para em relação ao grupo amino da subunidade 2-amino-benzamida (Figura 6), conferindo assim, maior seletividade para HDAC-1 e 2, uma vez que o tiofeno permite a ocupação

Da cavidade adicional de 14 Å presente nestas duas isoformas (MORADEI et al., 2007).

Figura 7 Otimização do composto CI-994 para obtenção de um inibidor seletivo HDAC-1 e HDAC-2. Os valores de IC50 obtidos frente a inibição de HDAC são apresentados no quadro em destaque.



Fonte: Autoria própria (Adaptado de MORADEI et al., 2007).

Para a inibição seletiva de HDAC-3, estudos demonstram que substituições por grupos volumosos na posição *p*-amino dificultam uma interação favorável com o sítio da enzima (CAO, ZWINDERMANN, DEKKER, 2018). O composto BRD3308 (Figura 7) com a presença de um átomo de flúor na posição meta em relação ao grupamento amina, apresentou seletividade para HDAC-3 em relação isoformas 1 e 2 (CAO, ZWINDERMANN, DEKKER, 2018)

Figura 8 Estrutura do composto BRD3308 da classe das o-aminoanilidas, um inibidor seletivo de HDAC classe I, com atividade de inibição de HDAC-3.



Tendo em vista a obtenção de compostos duais a estratégia de hibridação molecular foi empregada combinando fragmentos estruturais de um inibidor de HDAC classe I (19) e de BRD4 (4d) (Figura 6). A classe das *o*-amino-benzamidas foi escolhida com objetivo de promover uma inibição seletiva para HDAC classe I e o anel tiofeno substituído por uma fenila, flúor-fenila e flúor. A estrutura do 3,5-dimetil-isoxazol foi escolhida para reconhecimento de BRD4. A Figura 9 exemplifica a estratégia adotada visando uma atividade dual pelos compostos envolvendo a conexão entre uma região de derivados de *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (subunidade A; em azul) para reconhecimento de HDAC e outra região contendo um grupo 3,5 dimetil-isoxazol (subunidade B; em vermelho) capaz de interagir com BRD.

Figura 9 Hibridação molecular entre o composto inibidor de HDAC classe I (19) e o composto inibidor de BRD4 (4d), levando a formação dos híbridos contendo os grupos fenil, flúor-fenil e flúor na posição do anel tiofeno



3.2. Modelagem molecular

Os experimentos de ancoragem molecular foram realizados utilizando o software Maestro[®] 2018-4 (SCHRÖDINGER, 2017a) em um computador com sistema operacional Windows 7 Home Premium, processador Intel Core I7-4790 com memória de 16 Gb e placa de processamento gráfico Nvidea Gforce GTX 980. Para este estudo, as estruturas cristalográficas de BRD-4 e HDAC-2 foram obtidas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sob o código 4WIV (MCKEOWN *et al.*, 2014) com resolução de 1,56 Å para BRD-4; 4LY1 com resolução de 1,57 Å para HDAC-2 (LAUFFER *et al.*, 2013). As referidas estruturas se apresentam cristalizadas com seus respectivos inibidores, sendo 3P2 para o BRD-4 e 20Y para HDAC-2.

As estruturas foram importadas para o software isoladamente e preparadas para o estudo de ancoragem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard.* O seguinte protocolo foi executado: (i) remoção das moléculas de água

(exceto aquelas conservadas presentes no sítio ativo para BRD-4); (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento de cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. A caixa de interação ("*grid*") foi definida pelo *Receptor Grid Generation* (SCHRÖDINGER, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Com a conclusão do preparo das proteínas, os ligantes foram desenhados e importados no formato SDF para o software Maestro[®] e sua preparação se deu através da função *Ligand Preparation* (*LigPrep*) a fim de realizar a minimização de energia utilizando campo de força OPLS3, e obter a simulação dos possíveis estados de ionização em pH 7 ± 2 (SCHRÖDINGER, 2017c).

Para determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por *redocking*, em que os ligantes originais das proteínas foram removidos e seguidamente, ancorados no mesmo sítio enzimático. A qualidade deste resultado foi analisada pelo cálculo *Root Mean Square Desviation* (RMSD) entre o ligante co-cristalizado e o "redocado". O valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (YUSUF *et al.,* 2008).

3.3. Metodologia sintética

A metodologia sintética realizada consistiu em: a) reações de proteção e desproteção, com o objetivo de proteger grupamentos livres reativos; b) reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura na presença do respectivo ácido borônico e catalisador paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, com o objetivo da inserção dos anéis: 3,5-dimetil-isoxazol, fenil e flúor-benzeno; c) reações de redução do grupo nitro na presença de Fe⁰, cloreto de amônia (NH₄Cl) e metanol; d) uso de cloreto de oxalila para formação de amida. As etapas sintéticas envolvidas na obtenção dos compostos finais (7), (12) e (18) estão esquematizadas respectivamente nas Figuras 1, 2 e 3:



Figura 10. Etapas sintéticas para a obtenção dos composto final N-(4-amino-[1,1'-biphenil]-3-il)-4-(3,5-dimethil-4,5-dihidroisoxazol-4-il)benzamida (7).

Fonte: autoria própria.



Figura 11. Etapas sintéticas para a obtenção do composto final N-(4-amino-4'-fluoro-[1,1'-biphenil]-3-il)-4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamida (12).

Fonte: Autoria própria.

Figura 12. Etapas sintéticas para obtenção do composto final N-(2-amino-5-fluorophenil)-4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamida(18).



Fonte: Autoria própria.

3.3.1.1. Síntese do tert-butyl (4-bromo-2-nitrophenyl)carbamato – (2)
A metodologia para realizar a proteção da amina livre, levou a formação de
(2), de acordo com o esquema apresentado na figura 2.



Figura 13. Etapa sintética para obtenção de (2).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 2,0 g (9,21 mols) de 4-bromo-2-nitroaniline (1), 5,49 mL (23,03 mmol) de di-tert-butil oxalato (BOC), 562,92 mg (4,6076 mmol) de DMAP e 7mL de THF anidro. A reação foi mantida a temperatura de 66ºC e agitação por 24 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (9:1) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor amarela que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage[®] IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 9:1 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 77,6%.

3.3.1.2. Síntese do tert-butil (3-nitro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – (3)

A metodologia aplicada para a inserção do anel fenil foi a de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura na presença do ácido fenil borônico e catalisador paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, como representado na figura a seguir (figura 3).



Figura 14. Etapa sintética para obtenção de (3).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 300 mg (0,94 mmol) de (2), 54,62 mg (0,047 mmol) de paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, 138,3 mg (1,13 mmol) de ácido fenil borônico, 261,28 mg (1,8903 mmol) de K₂CO₃ e 5mL de dioxano. A reação foi mantida a temperatura de 110ºc e agitação por 24 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (7:3) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor amarelo claro que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 7:3 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 73,62%.

3.3.1.3. Síntese do tert-butil(3-amino-[1,1'-biphenil]-4-il) carbamato – (4)

A redução do grupo nitro, seguiu a metodologia de reação de redução na presença de Fe^o, cloreto de amônia (NH₄CI) e metanol, e obteve-se o composto **(4)**, como mostra a figura 4.



Figura 15. Etapa sintética para obtenção de (4).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10mL foi adicionado 214,3 mg (0,68 mmol) de (4), 152,32 mg (2,72 mmol) de Fe⁰, 182,34 mg (3,40 mmol) de cloreto de amônia (NH4CI) e 5mL de metanol. A reação foi mantida a temperatura de 65°c e agitação por 5 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (9:1) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o termino da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor marrom clara que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 9:1 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 72,46%.

3.3.1.4. Síntese do tert-butil (3-(4-iodobenzamido)-[1,1'-biphenil]–4il)carbamato – **(5)**

Para formação de amida foi usada a reação de cloreto de oxalila, ácido iodo benzoico e metil morfolina, obtendo-se o composto **(5)**, como mostra a figura 5.





Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo (1) de 10 mL foi adicionado 141,58 mg (0,70 mmol) de ácido iodo benzoico, 0,07551 mL (0,87 mmol) de cloreto de oxalila, 2 gotas de DMF e 4 mL de diclorometano, a temperatura ambiente, esta etapa foi acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até o consumo completo do ácido iodo benzoico. Após o término da reação, o conteúdo do balão foi transferido para béquer de 50 mL (2) e separado até a completa evaporação do solvente (diclorometano).

Em um balão de fundo redondo (3) de 10 mL foi adicionado 100 mg (0,35 mmol) de (4), 0,7733 mL (0,70 mmol) de metil morfolina, o balão foi colocado em banho de gelo, e então o conteúdo do béquer (2) foi diluído em 4mL de THF anidro, e gotejado no balão (3). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação, overnight. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (9:1) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o termino da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada uma vez com 50 mL de água saturada com NaHCO₃, e mais três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor bege claro que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 9:1 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção

de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 83,99%.

3.3.1.5. Síntese do tert-butil (3-(4-(3,5-dimethil-4,5-dihydroisoxazol-4-il)benzamido)-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – **(6)**

Para a obtenção do composto **(6)**, foi realizada uma reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura na presença do respectivo ácido isoxazol borônico e catalisador paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, como representado na figura 6.



Figura 17. Etapa sintética para obtenção de (6)

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 100 mg (0,19 mmol) de **(5)**, 11,24 mg (0,0097 mmol) de paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, 52,05 mg (0,23 mmol) de ácido isoxazol borônico, 53,74 mg (0,38 mmol) de K₂CO₃ e 5mL de dioxano. A reação foi mantida a temperatura de 85° c e agitação por 24 h. O acompanhamento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (7:3) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor branca que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila

7:3 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 60,30%.

3.3.1.6. Síntese do N-(4-amino-[1,1'-biphenil]-3-yl)-4-(3,5-dimethil-4,5dihidroisoxazol-4-il)benzamida – **(7)**

Obteve-se o composto (7), por meio de uma reação de desproteção, assim como representado na figura 7.



Figura 18. Etapa para obtenção de (7)

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10mL foi adicionado 50 mg (0,10 mmol) de **(6)**, 1,25 mL (11,74 mmol) de ácido tricloroacético (TFA). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação por 3 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada uma vez com 50 mL de água saturada com NaHCO₃, e depois mais três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor branca que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 5:5 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção

de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 67,52%.

3.3.1.7. Síntese do tert-butil (4'-fluoro-3-nitro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – (8)

A síntese do **(8)** foi feita a partir de uma reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura na presença do ácido fluoro benzenoborônico e catalisador paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, como representado na figura a seguir (figura 9).



Figura 19. Etapa para obtenção de (8).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 200 mg (0,63 mmol) de **(2)**, 105,8 mg (0,75 mmol) de ácido fluoro benzeborônico, 36,4 mg (0,03 mmol) de paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, 174,2 mg (1,26 mmol) de K₂CO₃ e 5mL de dioxano. A reação foi mantida a temperatura de 100°c e agitação por 24 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando hexano (100%) como eluente da fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor laranja-amarelado que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano 100% como

método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 71,57%.

3.3.1.8. Síntese do tert-butil (3-amino-4'-fluoro-[1,1'-biphenil]-4il)carbamato – **(9)**

A síntese do **(9)**, seguiu a metodologia de reação de redução na presença de Fe^o, cloreto de amônia (NH₄Cl) e metanol, como mostra a figura 10.



Figura 20. Etapa sintética para obtenção de (9).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10mL foi adicionado 80 mg (0,24 mmol) de **(8)**, 76,8 mg (1,37mmol) de Fe⁰, 91,95 mg (1,7 mmol) de cloreto de amônia (NH₄CI) e 5mL de metanol. A reação foi mantida a temperatura de 65°c e agitação por 5 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (8:2) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor marrom que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 8:2 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento

de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 95,96%.

3.3.1.9. Síntese do tert-butil (4'-fluoro-3-(4-iodobenzamido)-[1,1'-biphenil]4-il)carbamato – (10)

A síntese para obtenção do composto **(10)**, levando formação de um grupo amida, foi feita a partir da reação de cloreto de oxalila, ácido iodo benzoico e metil morfolina, como representado na figura 11.



Figura 21. Etapa sintética para obtenção de (10).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo (1) de 10 mL foi adicionado 741,02 mg (3,68 mmol) de ácido iodo benzoico, 0,321 mL (3,73 mmol) de cloreto de oxalila, 2 gotas de DMF e 4 mL de diclorometano, a temperatura ambiente, esta etapa foi acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até o consumo completo do ácido iodo benzoico. Após o término da reação, o conteúdo do balão foi transferido para béquer de 50 mL (2) e separado até a completa evaporação do solvente (diclorometano).

Em um balão de fundo redondo (3) de 10 mL foi adicionado 453,2 mg (1,49 mmol) de (9), 0,329 mL (2,98 mmol) de metil morfolina, o balão foi colocado em banho de gelo, e então o conteúdo do béquer (2) foi diluído em 4mL de THF anidro, e gotejado no balão (3). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação, overnight. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (7:3)

hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada uma vez com 50 mL de água saturada com NaHCO₃, e mais três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor bege que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 7:3 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 69,88%.

3.3.1.10. Síntese do tert-butil (3-(4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamido)-4'- fluoro-[1,1'-biphenil]-4-il)carbamato – (11)

Para a obtenção do composto **(11)**, foi realizada uma reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura na presença de ácido isoxazol borônico e catalisador paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, como representado na figura 12.



Figura 22. Etapa sintetica para obtenção de (11).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 425,2 mg (0,79 mmol) de **(11)**, 46,15 mg (0,034 mmol) de paládio-tetrakis Pd(PPh₃)₄, 213,81 mg (0,95 mmol) de ácido isoxazol borônico, 352,7 mg (2,55 mmol) de K₂CO₃ e 5mL de

dioxano. A reação foi mantida a temperatura de 85°c e agitação por 24 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (7:3) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor bege claro que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 7:3 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 68,95%.

3.3.1.11. Síntese do N-(4-amino-4'-fluoro-[1,1'-biphenil]-3-il)-4-(3,5dimethilisoxazol-4-il)benzamida – **(12)**

Obteve-se o composto final **(12)**, por meio de uma reação de desproteção, assim como representado na figura 13.



Figura 23. Etapa sintética para obtenção de (12).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10mL foi adicionado 198,8 mg (0,39 mmol) de **(11)**, 4,97 mL (64,95 mmol) de ácido tricloroacético (TFA). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação por 3 h. O desenvolvimento da reação foi

feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (6:4) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada uma vez com 50 mL de água saturada com NaHCO₃, e depois mais três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor bege amarelado que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 6:4 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 67%.

3.3.1.12. Síntese do tert-butil (4-fluoro-2-nitrophenil)carbamato – (14)

A síntese do **(14)**, foi feita por meio de uma reação de proteção da amina livre do **(13)**, como representado na figura 15.



Figura 24. Etapa sintética para obtenção de (14).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 1,0 g (6,40 mmols) de (13), 3,13 mL (12,81 mmol) de di-tert-butyl oxalato (BOC), 391,3 mg (3,20 mmol) de DMAP e 7mL de THF anidro. A reação foi mantida a temperatura de 66°c e agitação por 24 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (9:1) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254

nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o termino da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor amarela que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 9:1 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 33,20%.

3.3.1.13. Síntese do tert-butil (2-amino-4-fluorophenil)carbamato – (15)

A síntese do **(15)**, foi feita por meio da redução do grupo nitro, presente no composto **(14)**, na presença de Fe⁰, cloreto de amônia (NH4CI) e metanol, como mostra a figura 16.



Figura 25. Etapa sintética para obtenção de (15).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10mL foi adicionado 500 mg (1,95 mmol) de (14), 368,425 mg (6,59 mmol) de Fe⁰, 521,875 mg (9,75 mmol) de cloreto de amônia (NH₄Cl) e 5mL de metanol. A reação foi mantida a temperatura de 65°c e agitação por 5 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (6:4) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL

de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor amarelo esverdeado que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 6:4 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 86,83%.

A síntese do **(16)**, formação de amida, foi feita a partir da reação de cloreto de oxalila, ácido iodo benzoico e metil morfolina, como representado na figura 17.



Figura 26. Etapa sintética para obtenção de (16)

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo (1) de 10 mL foi adicionado 328,89 mg (1,63 mmol) de ácido iodo benzoico, 0,1424 mL (1,65 mmol) de cloreto de oxalila, 2 gotas de DMF e 4 mL de diclorometano, a temperatura ambiente, esta etapa foi acompanhada por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até o consumo completo do ácido iodo benzoico. Após o termino da reação, o conteúdo do balão foi transferido para béquer de 50 mL (2) e separado até a completa evaporação do solvente (diclorometano).

Em um balão de fundo redondo (3) de 10 mL foi adicionado 150 mg (0,66 mmol) de **(15)**, 0,1458 mL (1,32 mmol) de metil morfolina, o balão foi colocado em banho de gelo, e então o conteúdo do béquer (2) foi diluído em 4mL de THF

anidro, e gotejado no balão (3). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação, overnight. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (7:3)hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o termino da reação, foi feita a extração liquido/liquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada uma vez com 50 mL de água saturada com NaHCO₃, e mais três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor marrom que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 7:3 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 65,11%.

3.3.1.15. Síntese do tert-butil (2-(4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamido)-4-fluorophenil)carbamato – (17)

Para a obtenção do composto (17), foi realizada uma reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura na presença de ácido isoxazol borônico e catalisador paládio-tetrakis Pd(PPh3)4, como representado na figura 18.



Figura 27. Etapa sintética para obtenção de (17).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25mL foi adicionado 150 mg (0,32 mmol) de **(16)**, 18,99 mg (0,016 mmol) de paládio-tetrakis Pd(PPh3)4, 88,00 mg (0,39 mmol) de ácido isoxazol borônico, 90,88 mg (0,65 mmol) de K2CO3 e 5mL de

dioxano. A reação foi mantida a temperatura de 85°c e agitação por 24 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor marrom escuro que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 5:5 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 86,58%.

3.3.1.16. Síntese do N-(2-amino-5-fluorophenil)-4-(3,5-dimethilisoxazol-4-il)benzamida – **(18)**

Obteve-se o composto final **(18)**, por meio de uma reação de desproteção, assim como representado na figura 19.



Figura 28. Etapa sintética para obtenção de (18).

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10mL foi adicionado 150 mg (0,35 mmol) de **(17)**, 3,75 mL (49 mmol) de ácido tricloroacético (TFA). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação por 3 h. O desenvolvimento da reação foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição

(5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o término da reação, foi feita a extração líquido/líquido diluindo o meio reacional em 150 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada uma vez com 50 mL de água saturada com NaHCO3, e depois mais três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor marrom escura que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® IsoleraTM(SNAP ultra 10, com hexano/ acetato de etila 5:5 como método isocratico, fluxo de 36 mL/min e com detecção de comprimento de onda 254 nm) levando a formação do produto puro com rendimento de 64,43%.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplacas de alumínio (AL TLC- Merck[®]) de sílica-gel 60 F254 para o acompanhamento das reações. A visualização das substâncias foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

3.4.2. Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão dos compostos finais serão determinadas em um equipamento de ponto de fusão capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific[®].

3.4.3. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

As análises de espectrofotometria serão realizadas na faixa de absorção de 4.000 a 400 cm⁻1, região do infravermelho (IV), através de um espectrofotômetro IR Prestige21 Shimadzu[®], utilizando pastilhas KBr.

3.4.4. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais (Bruker 600 e Bruker 300, operando a 600 MHz e 300 MHz, respectivamente, para o núcleo de ¹H e

TMS como referência interna e a 75 MHz para ¹³C) foram realizadas utilizando solvente deuterado (DMSO-*d*6 ou acetona- *d*6). O equipamento está lotado no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.4.5. Ensaios de inibição enzimática

Os compostos finais sintetizados foram avaliados através de ensaios enzimáticos a fim de identificar sua capacidade de inibição das enzimas HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3. Os ensaios foram realizados em colaboração com a empresa BPS Bioscience localizada em San Diego, Califórnia. Os compostos foram solubilizados em DMSO e testados em uma concentração de 10 μ M tendo como referência o pan-inibidor de HDAC (SAHA) nas concentrações de 0,005, 0,05 e 0,5 μ M.

3.5. Métodos de purificação

3.5.1. Biotage® Isolera[™]

A purificação dos compostos obtidos foi realizada através de cromatografia com o uso do Biotage® Isolera[™], utilizando a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP-Sphere 25 µm), por um método isocrático com acetato de etila e hexano como eluentes, fluxo de 36 mL/min e detecção no comprimento de onda fixo em 254 nm.

3.5.2. Coluna de bancada

Outro método de purificação empregado foi o uso de cromatografia em coluna de bancada utilizando eluentes como acetato de etila e hexano (fase móvel) e sílica flash como fase estacionária.

3.5.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

A CCDP foi realizada por um método isocrático com acetato de etila e hexano como eluentes (100 mL) e sílica gel HF254 como fase estacionária. Foram utilizados os comprimentos de onda em 254 e 365 nm para identificação das manchas.

4. RESULTADOS

4.1. Modelagem molecular

4.1.1. HDAC 2

Os resultados de ancoragem molecular para HDAC-2 demonstraram que a substituição do tiofeno por fenila, flúor-fenila e flúor levaram a poses adequadas, sendo estes grupos capazes de ocupar a cavidade adicional de 14 Å presente na HDAC-2 (Figura 29). Como observado no modelo computacional, os compostos derivados de *o*-amino-benzamidas são capazes de interagir com o átomo de Zn²⁺ na cavidade interna de HDAC-2 através do átomo de nitrogênio da amina aromática e do átomo de oxigênio da carboníla da amida, que possuem pares de elétrons disponíveis e distância adequada (Figura 29).

Figura 29 Docking molecular entre um dos compostos planejados e HDAC-2. A porção contendo o anel fenil ocupa a cavidade de 14 A dessa isoforma e o grupo amina e o oxigênio da carboníla da amida interagem com o átomo de Zn2+. A região da molécula contendo o grupamento 3,5dimetil-isoxazol fica projetado para fora do sítio ativo da enzima.



3,5-dimetil-isoxazol apontado para "fora" Reconhecimento de BRD4

4.1.2. BRD4

No modelo computacional desse estudo, a região das moléculas contendo o grupamento 3,5-dimetil-isoxazol foi capaz de reconhecer o resíduo de ASP-140 e água interna no sítio ativo de BRD4 através de interações de hidrogênio. Os resultados do estudo de modelagem molecular corroboram com os dados da literatura em que derivados de 3,5-dimetil-isoxazol possuem inibição frente a BRD-4 (Figura 30).

Figura 30 Docking molecular entre um dos compostos planejados e BRD-4. A porção contendo o grupamento 3,5-dimetil-isoxazol é responsável pelo reconhecimento da ASP-140 e água em sua cavidade interna.



4.2. Síntese e caracterização estrutural

As etapas para síntese do composto final (7) ocorreram normalmente. Observou-se uma melhora no rendimento de 14,3% para 84% ao se realizar a etapa sintética de acoplamento para formação do grupo amida com cloreto de oxalila ao invés de agentes acoplantes, como EDC. Com a obtenção de um melhor rendimento na etapa sintética de acoplamento realizado para o composto final (7), seguiu-se a metodologia com o uso de cloreto de oxalila para os outros dois compostos (12) e (18). Os rendimentos globais e a faixa de fusão para os compostos foram organizados na Tabela 1:

Compostos	Rendimento global (%)	Faixa de fusão (ºC)
(7)	72,6	162-166
(12)	75,2	243-246
(18)	67,2	98-102

Tabela 1. Valores de rendimento global e faixa de fusão para os compostos finais (7), (12) e (18)

A caracterização estrutural foi realizada através de RMN de ¹H e IV (representados nas figuras do Apêndice deste documento). Para o composto **(7)** os sinais característicos de RMN de ¹H que comprovam sua obtenção são: 2,48 e 2,31 ppm (s, 3H) ambos os sinais característicos das metilas do grupo 3,5dimetil-isoxazol; NH₂ 2,86 ppm (s, 2H) e hidrogênio do grupo amida 8,41 ppm (s, 1H). Quanto aos hidrogênios dos anéis aromáticos os sinais apresentados foram: 8,20 ppm (d, 1H) com J = 8.0 Hz; 8,06 ppm (m, 1H); 7,72 ppm (dd, 2H) com J = 8.3, 1.1 Hz; 7,59 ppm (m, 3H); 7,50 ppm (m, 1H); 7,43 ppm (m, 1H); 7,39 (m, 2H). Para o composto **(12)** os sinais característicos de RMN de ¹H que demonstram sua obtenção são: 2,45 e 2,27 ppm (s, 3H) sinais característicos das metilas do grupo 3,5-dimetil-isoxazol; sinais dos hidrogênios da NH₂ em 5,14 ppm (s, 2H); e o sinal do hidrogênio do grupo amida em 9,81 ppm (s, 1H). Quanto aos hidrogênios dos anéis aromáticos os sinais apresentados foram: 8,10 ppm (d, 2H) com J = 8.2 Hz; 7,57 ppm (m, 6H); 7,51 ppm (d, 1H); 7,31 ppm (dd, 2H) com J = 8.4, 2.2 Hz; 7,22 ppm (m, 2H); 6,87 ppm (d, 1H) com J = 8.3 Hz.

Para o composto **(18)** os sinais característicos de RMN de ¹H que demonstram sua obtenção são: 2,44 e 2,26 ppm (s, 3H) sinais característicos das metilas do grupo 3,5-dimetil-isoxazol; sinais dos hidrogênios da NH₂ em 5,25 ppm (s, 2H) e o sinal do hidrogênio do grupo amida em 9,65 ppm (s, 1H). Quanto aos hidrogênios dos anéis aromáticos os sinais apresentados foram: 8,07 ppm (d, 2H) com J = 8.2 Hz; 7,63 ppm (m, 2H); 7,56 ppm (m, 1H); 7,53 ppm (d, 1H) com J = 8.2 Hz; 7,12 ppm (dd, 2H) com J = 8.4, 6.5 Hz; 6,55 ppm (dd, 1H) com J = 11.2, 2.8 Hz e 6,37 ppm (td, 1H) com J = 8.5, 2.8 Hz.

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença de bandas de absorção indicando grupos químicos característicos dos compostos finais (7), (12) e (18) representados na Tabela 2:

Tipo de vibração	(7)	(12)	(18)
Tipo de vibração –		cm⁻¹	
ν NH2	3381,21	3290,56	3273,20
ν C=O (amida)	1647,21	1627,92	1639,49
δ C-N-H (amida)	1539,20	1539,20	1539,20
δ₅ CH₃ (anel isoxazol)	1417,68	1396,46	1423,47
v C-N (aminas aromáticas)	1319,31	1319,31	1290,38

Tabela 2. Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho dos grupos químicos presentes na estrutura química dos compostos (7), (12) e (18).

4.3. Avaliação enzimática

Os compostos (7) e (18) foram avaliados em ensaios de inibição enzimática para HDAC-1, 2 e 3 e BRD4 e seus resultados organizados na Tabela 3:

Composto	% de inibição					
	HDAC-1	HDAC-2	HDAC-3	BDR-4		
NH ₂ NH O CH ₃ H ₃ C	92	76	7	12		
(7) (10 μM)						
NH ₂ NH ₂ NH						
l F	11	10	23	-		
(18) (10 μΜ)						
Vorinostat ¹	90	89	90	0		
JQ1 ²	-	-	-	88		

Tabela 3. Resultado da avaliação enzimática do composto (7) e (18) frente as HDACs-1,2 e 3.

¹ *Vorinostat(SAHA), inibidor pan-HDAC, avaliado na concentração de 0.5 μM. ²JQ1 na concentração de 2,5 μM foi usado como padrão frente a BRD4. (-): não determinado.

Os resultados da avaliação enzimática demonstram que o composto (7) obteve maior seletividade para HDAC-1 e 2 que para 3, uma vez que o grupo fenila é responsável por ocupar a cavidade adicional de 14 Å dessas enzimas. Para o composto (18), apesar de valores mais baixos de inibição, observa-se uma seletividade maior para HDAC-3 em relação às duas outras isoformas. Sua inibição frente a BRD-4 não foi determinada.

5. CONCLUSÃO

Através da estratégia de hibridização molecular, três compostos finais com regiões de interação HDAC classe I e BRD-4 foram sintetizados com rendimentos globais entre 75 – 67 %. A caracterização estrutural realizada por meio de RMN de ¹H e espectroscopia de infravermelho, sugere a obtenção dos três compostos finais. Quanto a avaliação enzimática, destaca-se o composto (7) com valores expressivos de inibição para HDAC-1 (92%) e HDAC-2 (76%) e sua capacidade em inibir BRD-4 (12%), ainda que em menor potência que as HDACs, justificando a obtenção de um composto híbrido HDAC/BRD4.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, J.; TOMÁS, N.; LOURENÇO, S. HIV: perspectivas imunológicas. Licenciatura em bioquímica, Universidade de Evora. 2003.

Archin, N. M. et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy, **Nature**, v. 487, pag 482–485, 26 de julho de 2012.

BANERJEE, C. et al. BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 1147-1154, dezembro 2012.

Barton, K. M. et al. Selective HDAC Inhibition for the Disruption of Latent HIV-1 Infection, **Plos One**, v. 9, Agosto 2014.

CAO, F.; ZWINDERMAN, M. R. H.; DEKKER, F. J. The process and strategy for developing selective histone deacetylase 3 inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 551, 2018.

DEEKS, S. G.; Overbaugh, J.; Phillips, A.; Buchbinder, S. HIV infection, **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, artigo número 15035, pag 1-22, 1 de outubro de 2015.

DEEKS, S. G. Shock and kill, Nature, v. 487, p. 439-440, 26 julho 2012.

HEWINGS, D. S. 3,5-Dimethylisoxazoles act as acetyl-lysine-mimetic bromodomain ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 6761-6770, 2011.

HOLSON, E.; WAGNER, F. F.; STAHLY, G. P. **Solid forms of tacedinaline**. Broad Institute, Inc. Cambridge, MA (US). no.US8691875B2. Depósito: 15 Set. 2012. Concessão: 25 Abr. 2013. Huber, K. et al. Inhibitors of Histone Deacetylases correlation between isoform specificity and reactivation of HIV type 1 (HIV-1) from latente infected cells, **The Journal of Biological Chemestry**, v. 286, número 25, p. 22211–22218, 24 junho 2011.

Keedy, K. S. et al. A Limited Group of Class I Histone Deacetylases Acts To Repress Human Immunodeficiency Virus Type 1 Expression, **Journal of Virology**, v. 83, número 10, p. 4749–4756, Maio 2009.

Laird, G. M. et al. Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency–reversing drug combinations, **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, número 5, pag 1901-1912, Maio de 2015.

LAUFFER, B. E. et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 26926-26943, 2013.

LI, Z.; Guo, J.; Wu, Y.; Zhou, Q. The BET bromodomain inhibitor JQI activates HIV latency trough antagonizing BRD4 inhibition of Tat-transactivation, **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 277-287, 2013.

LIU, Z. et al. Drug discovery targeting bromodomain-containing protein 4, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 4533-4558, 2017.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigma, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523-6543, 2005.

MORADEI, O. M. et al. Novel aminophenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 5543-5546, 2007.

MCKEOWN, M. R. et al. Biased multicomponent reactions to develop novel bromodomain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 9019-9027, 2014.

Schrödinger, LigPrep, New York, 2017.

Schrödinger, Maestro, New York; 2017.

Schrödinger, Glide, New York, 2017.

Shirakawa, K.; Chavez, L.; Hakre, S.; Calvanese, V.; Verdin, E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors, **Trends in Microbiology**, Junho 2013, v. 21, No. 6, p. 277-285.

UNAIDS. Fact sheet – Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic, Disponível em: < <u>https://unaids.org.br/estatisticas/</u> >; Acessado em: 16/03/2021.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; LEWIS, M. C.; HOLSON, E. B. Small molecule inhibitors of zinc-dependent histone deacetylases. **Neurotherapeutics**, v. 10, p. 589-604, 2013.

YANG, Z.; Yik, J. H. N.; Chen, R.; He, N.; Jang, M. K.; Ozato, K.; Zhou, Q. Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4, **Molecular Cell**. v. 19, n. 4, p. 535-545, 2005.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, p. 1411-422. 07 de abril de 2008.

ZHAN, P.; Pannecouque, C.; Clercq, E.; Liu, X. Anti-HIV drug discovery and development: current innovations and future trends, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2849-2878, 2016.

7. Apêndice

7.1. RMN do composto (2)











1.99-2.00-≢

8.0

8.5

7.5

6.5

7.0

6.0

5.5

5.0 4.5 f1 (ppm)

9.5

9.0

ò

-2.50 DMSO

2.0

1.5

0.5

1.0

0.0

2.92≁

3.5

3.0

4.0











7.7. RMN do composto (8)





























7.14. RMN do composto (18)





7.15. RMN do ácido isoxazol

