Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool

Title: Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados de ácido borônico como inibidores de cisteíno proteases de Leishmania spp

Creator: Jean leandro Dos santos

Affiliation: São Paulo State University (unesp.br)

Funder: Digital Curation Centre (dcc.ac.uk)

Funding opportunity number: edital n. 13/2022

Grant: edital n. 13/2022

Template: Digital Curation Centre

Project abstract:

Leishmanioses são Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) causadas por protozoários do gênero*Leishmania*. Ela é transmitida aos humanos e animais através da picada do inseto vetor flebotomíneo e está presente em mais de 98 países totalizando 12 milhões de infectados e expondo à risco cerca de 350 milhões de pessoas. Atualmente, o tratamento é limitado e apresenta uma série de inconvenientes que vão desde a alta toxicidade dos fármacos disponíveis até custo elevado do tratamento, justificando assim, a busca por novos fármacos. As proteases são importantes alvos-terapêuticos e representam 3,4% dos medicamentos aprovados no mercado fazendo com que essa classe de enzima seja amplamente estudada. Nas Leishmanias, a principal cisteíno-protease é CPB, ela está relacionada a diversas funções desde nutricional até a infecção das células dos hospedeiros. Usando a estratégia de reposicionamento de fármacos foi identificado por nosso grupo o fármaco bortezemib, usado no tratamento de mieloma múltiplo, como um promissor protótipo inibidor da CPB (IC50 = 6,3 ± 1,1 μM; EC50 = 1,0 ± 0,2 μM). A partir deste protótipo, modificações moleculares assistidas por métodos computacionais foram propostas a fim de otimizar as propriedades para melhor interação com CPB, sem as ações no proteossoma humano 26S – alvo do protótipo bortezomib. Nesta proposta, os compostos mais promissores identificados nos modelos computacionais serão sintetizados e avaliados quanto a capacidade de inibição da enzima CPB. Ademais, os novos derivados serão avaliados contra as formas amastigotas *Leishmania donovani* e *Leishmania amazonensis*. A citotoxicidade e o índice de seletividade serão determinados usando macrófagos murinos. Espera-se que os novos compostos possam se constituir uma alternativa ao tratamento desta terrível doença negligenciada.

Start date: 11-01-2022

End date: 11-01-2023

Last modified: 11-03-2022

Grant number / URL: edital n. 13/2022

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados de ácido borônico como inibidores de cisteíno proteases de Leishmania spp

---

Data Collection

What data will you collect or create?

O principal desafio do projeto proposto é a seleção de derivados borônicos que apresentem efeitos leishmanicidas e atue diretamente contra o alvo parasitário: a CPB. As propostas para superar os desafios técnicos e científicos do presente projeto serão listados abaixo:

1. Depois de preparada a estrutura tridimensional da CPB, será desenvolvido o protocolo de docagem molecular para a obtenção do modo de interação entre o ligante e o alvo. Como os ligantes apresentam grupo eletrofílico, serão realizadas docagens covalentes.43
    1. Construção da coleção de ligantes derivados do bortezomib: Serão estabelecidas modificações estruturais buscando otimizar as interações desses compostos com os aminoacidos que compõem os subsítios S3, S1' e principalmente o S2 da CPB. Essa região é explorada, além da potencialização da afinidade do ligante pela enzima, como ponto de seletividade frente as catepsinas humanas (em especial a *Hs*CatL).
    2. A docagem molecular será realizada utilizando ambiente de modelagem molecular *Maestro* (Schrödinger®) contendo os pacotes *Glide* e *Covanlent Docking*, para docagem, *LigPrep*, para preparação dos ligantes e a rotina de preparação da proteína *ProteinPreparationWizard*.43 Para a visualização dos resultados serão usados os ambientes *Maestro* e *UCSF Chimera*.

- Os compostos selecionados a partir dos resultados da docagem molecular serão submetidos a simulações por dinâmica molecular que é uma técnica robusta aplicada para a compreensão de fenômenos físicos.44 Na etapa de simulação por dinâmica molecular será usado o programa *Amber16* para preparação e parametrização dos complexos, cálculo e tratamento de dados de simulação. Esse programa inclui os pacotes *tleap*, *pmind*, *cpptraj* e *antchamber*, que são fundamentais para a preparação do sistema para a realização da simulação. Os experimentos de simulação por dinâmica molecular serão realizados em triplicatas independentes e com tempo de 50 ns.

1. Serão sintetizados os compostos selecionados a partir do TBDD. Todos os produtos obtidos serão rigorosamente purificados e caracterizados. Abaixo seguem os esquemas gerais de reação que serão empregados no presente projeto:
    1. Os derivados borônicos serão obtidos em quatro etapas conforme descrito no esquema da Figura 7. A primeira etapa é a proteção da amina livre do aminoácido que será usado (Phe, Ile, Tyr e Trp). Para essa reação será usado o grupo protetor (Boc)2O.29 A segunda etapa será o acoplamento do ácido amino borônico (aminoborônico ou pirrolidil borônico). Após o acoplamento, o grupo amino protegido passará por uma etapa de desproteção e por fim será feito acoplamento formando a ligação amídica.29 Os substituintes em R1 serão: piperazina, metil-piperazina, morfolina e tiomorfolina.

Figura 8. Esquema geral de reação para a obtenção dos ácidos borônicos

1. a) (Boc)2O, THF, NaHCO3, 0º C até t.a., 24h; b) HATU, DMF, DIPEA, t.a., 24h; c) HCOOH, t.a., 24h; d) R1-COOH, HATU, DMF, DIPEA, t.a, 24h
2. Os derivados triazol borônicos serão obtidos em duas etapas. No entanto antes será necessário preparar o reagente para a reação de inserção do grupo azida (etapas a e b do esquema na Figura 8). As duas primeiras etapas são para a obtenção do intermediário azidíco. Inicialmente, o anidrido trifluorometanossulfônico será usado para a obtenção triflil azida que reagirá com o aminoácido (Phe, Leu, Tyr e Trp) para formar o ácido α-azídico.45 A etapa seguinte será a cicloadição 1,3-dipolar (cicloadição de Huisgen),46 onde será formado o intermediário triazólico a partir da reação do alcino com a azida catalizada por cobre. O alcino que será utilizado será preparado antes da etapa c. Os derivados R1 serão: piperazina, metil-piperazina, morfolina e tiomorfolina. A última etapa consistirá no acoplamento do ácido amino borônico. Dependendo dos derivados R e R1, serão realizadas etapas de proteção de eventuais grupos reativos.

Figura 9. Esquema geral para a obtenção dos derivados triazóis borônicos

1. a) NaN3, H2O, CH2Cl2, 0º C até t.a., 2h; b) aminoácido (Phe, Leu, Tyr e Trp), CuSO4, H2O, MeOH, CH2Cl2, t.a., o.n.; c) Alcino, Cu(OAc)2 5% mol, tBuOH, t.a.; d) ácido aminoboronico ou pirrolidil boronico HATU, DMF, DIPEA, t.a., 24h;

Observação: As condições descritas foram estabelecidas visando a diminuição da formação de diferentes enântiomeros. Quanto a purificação, devido a presença de centro estereogênico, será usada uma coluna cromatografia quiral em um equipamento de HPLC. Serão aplicadas as técnicas de dicroísmo circular e polarimetria para a identificação de possíveis enântiomeros.. Caso necessário, no futuro os esquemas propostos poderão ser alterados de forma a buscar melhores condições e rendimentos.

1. Expressão e purificação da CPB

Será realizada a expressão heteróloga da enzima CPB em sistema procariótico (E. *coli*). Será seguido o protocolo estabelecido por Sanderson, S. J., *et al* tanto para a expressão quanto purificação.22 Em todas as etapas da purificação serão coletadas alíquotas para o acompanhamento por meio de eletroforese em gel SDS-Page. Após purificada, a solução com a proteína em sua forma zimogênica (pró-dominio+CPB), será ativada seguindo o procedimento: (i) troca de tampão através de diálise overnight em 2 L (tampão de ativação NaOAc 100 mM, NaCl 300 mM e pH 5,5) e uma segunda diálise em 2 L tampão de ativação, agora por 2 h apenas; (ii) determinar a concentração da enzima, para sua ativação, deve estar com uma concentração de 0,5 mg mL-1; (iii) correção do pH para 5,2 e adicição de 5 mM de DTT e (iv) manter a solução em banho termostatizado a 37 °C

por 2 h.22 Novamente as etapas terão alíquotas separadas para o acompanhamento por meio de eletroforese em gel SDS-Page. A confirmação da atividade enzimática será através do monitoramento da reação de hidrólise do substrato padrão Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina) por método espectrofotométrico.29 Esta etapa já foi desenvolvida em colaboração com a Prof.ª Dr.ª Márcia Graminha, estando em fase de publicação.

1. Estudos de inibição enzimática, leishmanicidas e citotóxicos

Esta etapa será realizada em colaboração com a Prof.ª Dr.ª Márcia Graminha, em que o pesquisador acompanhará as atividades de execução.

1. Estudos de inibição enzimática serão realizados diretamente contra a CPB produzida *in house*. O método ainda não foi publicado, mas é baseado nos experimentos descritos para inibição da cruzaína.29
2. Para a avaliação da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares, serão utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis e L. donovani*, cultivadas em meio M199 1X, suplementado com soro fetal bovino 10%, HEPES 0,04 M (pH 7,5), adenina 0,1 mM, biotina 0,1%, hemina 0,25% e 2,5 U, e 2,5 µg ml-1 de penicilina/estreptomicina, respectivamente, que serão incubadas a 28º em atmosfera com 5% de CO2. As formas amastigotas serão obtidas por meio da infecção de macrófagos J774. Os compostos serão avaliados em diferentes concentrações.47

1. Estudos termodinâmicos e determinação do perfil energético dos inibidores usando Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)
    1. Os estudos termodinâmicos serão realizados por meio da ITC. Os inibidores (que ficarão na seringa do equipamento) serão preparados em solução tampão Acetato de Sódio 100 mM, NaCl 300 mM, DMSO 5%, TCEP 0,5 mM. A concentração de cada inibidor será definida de acordo com o valor de *Ki* do mesmo. Para a cela de amostra, será adicionada a enzima mantendo exatamente as condições descritas para os ligantes. Os parâmetros do experimento serão definidos com o uso de um simulador de curva de afinidade. Todos os experimentos serão realizados a 25 ºC e em triplicadas independentes. Esta etapa será realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Paul Mitchell da Universidade de Edinburg.

How will the data be collected or created?

Question not answered.

Documentation and Metadata

What documentation and metadata will accompany the data?

Chemical characterization by analytical methods, including NMR and mass spectrometry.

Molecular modelling and poses with their respective score for each compound designed.

Biological data from the assays in vitro - enzymatic inhibition.

Ethics and Legal Compliance

How will you manage any ethical issues?

The evaluation of leishmanicidal effects will be carried out by the team of Profa Marcia Graminha.

How will you manage copyright and Intellectual Property Rights (IP/IPR) issues?

We will evaluate the possibility to patent the new compounds, if there is any interest by our university. As the mains researchers belongs to the university it will be shared equally among the inventors.

Storage and Backup

How will the data be stored and backed up during the research?

All data will be stored in external drives and clouds. All the information will be stored to be part of suplemmentary material to be accessed by others.

How will you manage access and security?

The data will be stored demanding code for access.

Selection and Preservation

Which data are of long-term value and should be retained, shared, and/or preserved?
The data will be preserved for at least 10 years. All the material containing results will be shared to avoid misinformation.

What is the long-term preservation plan for the dataset?
At least 10 years.

Data Sharing

How will you share the data?
The data will share through institutional repository at https://repositorio.unesp.br/

Are any restrictions on data sharing required?
No.

Responsibilities and Resources

Who will be responsible for data management?
Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
Dr. Igor Muccilo Prokopczyk

What resources will you require to deliver your plan?
software Maestro; chemical lab for synthesis and lab for biological assays in vitro and in vivo