

Designação do Projeto	FARMTRANSANION - Anion transmembrane transport promoted by drug-like molecules: building a library of anion carriers inspired in Ataluren
Código do Projeto	LISBOA-01-0145-FEDER-016895
Objetivo Principal	This project aims to the development of synthetic anion transporters as potential channel replacement therapies in diseases such as Cystic Fibrosis.
Região de Intervenção	Lisboa
Entidade Beneficiária	FCiências.ID – Associação para a Investigação e Desenvolvimento de Ciências e Fundação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, FP.
Data de Aprovação	08-04-2016
Data de Início	01-07-2016
Data de Conclusão	31-12-2019
Custo Total Elegível	99.897,00 EUR
Apoio Financeiro da União Europeia	FEDER – 39.958,80 EUR
Apoio Financeiro Público Nacional/ Regional	OE – 59.938,20 EUR



Objetivos

O objetivo do projeto consiste no desenvolvimento de pequenas moléculas capazes de promoverem o reconhecimento e transporte de cloreto através de modelos de membranas celulares, para eventual utilização em terapias de substituição de canalopatias, como a fibrose cística.

Cronologicamente ao longo dos três anos de projeto, e no decorrer de um trabalho de investigação abrangente, foram alcançados alguns dos objetivos que a seguir se descrevem detalhadamente.

Primeiro ano de projeto (1/07/2016 a 30/06/2017)

1. O projeto iniciou-se, como previsto, com o design de duas séries de pequenas moléculas com grupos ureia/tioureia para o reconhecimento e transporte de cloreto (tarefa 1).

2. No primeiro ano foi preparada uma extensa livraria de di(tio)ureias baseadas no espaçador molecular 1,2-fenilenodiamina conectada com diversos fragmentos contendo diferentes anéis heteroaromáticos com reconhecidas propriedades farmacológicas, designadamente derivados de furano, tiofeno e isómeros de oxadiazole (tarefa 2).

3. A afinidade das novas séries de recetores preparados, para cloreto e outros aniões biologicamente relevantes, foi subsequentemente investigada sistematicamente em solução por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis). Estes estudos iniciais de afinidade realizados por titulações por RMN mostraram que alguns destes recetores sintéticos têm capacidade para reconhecer cloreto em dimetilsulfóxido (tarefa 3).

Este trabalho de síntese foi parte integrante de uma tese de projeto de licenciatura e uma tese de mestrado (ver Divulgação, Miguel Barros, FC, UL, 2017).

Os estudos teóricos relativos às séries de compostos inicialmente sintetizadas conduziram a uma tese de mestrado (Margarida Miranda, Tese de Mestrado, UA, 2017).

Segundo ano de projeto (1/07/2017 a 30/06/2018)

Realização de estudos de transporte preliminares das duas séries de compostos, iniciaram-se no início do segundo ano do projeto e mostraram que apenas as moléculas incorporando fragmentos de 2-tienilmetilo eram capazes de promover o efluxo de cloreto através de um modelo de membrana celular (uma bicamada de fosfatidilcolina, POPC), no entanto muito deficientemente (ca. 10 % de efluxo de cloreto ao fim de 270 s de ensaio) (tarefa 4).

Os resultados obtidos permitiram identificar os recetores sintéticos mais promissores, e mais importante, prever as alterações estruturais necessárias para aumentar a capacidade de transporte transmembranar destas moléculas, como por exemplo, aumento da sua lipofilia. O design de novas séries de moléculas análogas com o anel de tiofeno diretamente ligado ao grupo ureia e com diferentes graus de fluorinação no anel benzénico do espaçador foi desenvolvido (tarefa 1). Esta alteração estrutural levou



a um aumento significativo do efluxo de cloreto, ca. 70% – um valor dentro do expectável, tendo em conta os valores reportados na literatura para moléculas neutras (tarefa 4). Este resultado sugeriu que o enxofre do anel de tiofeno pode estar ativamente envolvido no reconhecimento e transporte de cloreto através da formação de ligações de calcogénio intramoleculares ou intermoleculares (ChB), as quais assistem as ligações de hidrogénio entre o cloreto e os grupos ureia (HB). Esta sinergia entre ligações HB e ChB ainda não foi explorada no transporte transmembranar de aniões e suscitou uma investigação teórica por métodos quânticos e de dinâmica molecular.

Tendo em vista obter mais resultados experimentais de afinidade e transporte que sustentem a hipótese do ponto anterior, decidiu-se sintetizar novas séries de isómeros com o anel de tiofeno e benzo[b]tiofenos substituídos nas posições 2 ou 3 e (tarefa 2). Em resumo, no segundo ano, expandiu-se as séries de moléculas com a síntese de análogos tioureia contendo tiofeno e benzo[b]tiofenos (tarefa 2). A afinidade destes novos recetores para cloreto e outros aniões foi de novo avaliada (tarefa 3). O trabalho experimental realizado (tarefas 2 e 3) originou no segundo ano de projeto uma tese de mestrado (ver Divulgação, Paulo Vieira, Tese de Mestrado em Química, FC, UL, 2018). Relativamente ao transporte transmembranar de cloreto, estes recetores revelaram-se muito mais eficientes do que os análogos de ureia (tarefa 4). Os estudos teóricos visando a racionalização dos resultados experimentais foram concluídos, e subsequentemente foi escrito o artigo correspondente.

No âmbito do projeto, o grupo de modelação molecular concluiu os estudos computacionais no transporte de cloreto promovido por esquaramidas e tioureias trípodas. Estes trabalhos em colaboração com o consultor do projeto, P. A Gale, deram origem a dois manuscritos, um aceite para publicação no final do corrente ano de projeto, enquanto que o segundo foi submetido. Estes dois artigos correspondem ainda a dois capítulos de uma dissertação de doutoramento, concluída e discutida no segundo ano de projeto (ver Divulgação, Igor Marques, Tese de doutoramento, Março 2018, UA).

Paralelamente, o grupo de modelação molecular, dedicou-se também à investigação do reconhecimento de aniões monoatômicos e poliatômicos (tipicamente dicarboxilatos) através de ligações de halogénio, calcogénio e hidrogénio por outros recetores sintéticos, incluindo estruturas e moléculas quirais. Este trabalho de colaboração com o grupo de P. D. Beer da Universidade de Oxford, Reino Unido, resultou no segundo ano do projeto na publicação de outro artigo científico.

Terceiro ano de projeto (1/07/2018 a 30/06/2019)

Neste último ano de projeto foi ajustado o design de novas séries de mono- e tris-ureias e correspondentes mono e tris-tioureias distintas das dos dois anos anteriores (tarefa 1).

Procedeu-se à síntese das novas séries de de mono- e tris-ureias e correspondentes mono e tris-tioureias (tarefa 2) e subsequente estudo de avaliação da afinidade destas novas séries de recetores para cloreto e outros aniões (tarefa 3). Foi também dada



continuidade aos estudos de transporte transmembranar com o anião cloreto, tendo sido desenvolvidos os estudos mecanísticos de transporte (tarefa 4). Paralelamente, o grupo de modelação molecular, deu continuidade aos estudos teóricos que irão suportar os estudos de transporte (tarefa 5).

Decorrem os estudos de avaliação da citotóxicidade e atividade anticancerígena das várias séries de ureias e tioureias sintetizadas que apresentaram melhores propriedades de transporte (tarefa 7) e estão a ser também testados alguns compostos ureias e tioureias em células de Fibrose Cística (tarefa 6).

Atividades

Foram desenvolvidas várias atividades de divulgação do trabalho desenvolvido ao longo dos três anos de projeto, em congressos nacionais e internacionais na área científica correspondente e publicação de artigos científicos em revistas internacionais.

No decurso deste projeto foi dada formação a estudantes de licenciatura, mestrado e doutoramento conduzindo a várias teses de licenciaturas, mestrado e doutoramento (ver resultados atingidos).

Uma nova série de transportadores sintéticos a desenvolver no âmbito deste projeto foi decidida numa reunião de projeto realizada com o consultor do projeto P. A Gale no Québec, Canadá, durante a conferência "13th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry – 2018 ISMSC" (8 a 13 de Julho, 2018), onde dois investigadores nacionais participaram (Cristina Moiteiro e Vitor Félix) com a apresentação de comunicações sobre o trabalho desenvolvido no projeto.

Resultados Esperados / Atingidos

Projeto de licenciatura

Miguel Ângelo Barros, Síntese e estudo de reconhecimento aniónico de recetores derivados da quinolina, Projeto de licenciatura em Química, CQB, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, julho 2017. (Orientação: Cristina Moiteiro)

Teses de Mestrado

Paulo Jorge Cruz Vieira, "Desenvolvimento de recetores heteroaromáticos para o reconhecimento de aniões", Mestrado em Química, Especialização em Química, CQB, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, junho de 2018. (Orientação: Cristina Moiteiro)

Margarida Miranda, "Transporte Transmembranar de aniões por recetores sintéticos", Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2017. (Orientação: Vitor Félix).



Tese de Doutoramento

Igor Oliveira Marques, "Anion transmembrane transport by synthetic molecules: a molecular modelling investigation", Doutoramento em Química, Universidade de Aveiro, 26 de Março de 2018. (Orientação: Vitor Félix).

Congressos

Paulo Vieira, Sílvia Carvalho, Igor Marques, Ethan N. W. Howe, Michael J. Spooner, Philip A. Gale, Vítor Félix, Cristina Moiteiro, Bis-(Thio)urea Receptors Based on 2-Aminobenzylamine for Anion Recognition and Transmembrane Transport, CQE Days, Salão Nobre da Academia das Ciências de Lisboa, 30 e 31 maio de 2019 (MEDLife).

Sílvia Carvalho, Cristina Moiteiro, Paulo Vieira, Igor Marques, Ethan N. W. Howe, Claudia Y.-T. Leung, Michael J. Spooner, Philip A. Gale, Vítor Félix, Neutral receptors containing urea moieties: Anion binding and membrane transport studies, 7th EuCheMS Chemistry Congress 26-30 Agosto, 2018, Liverpool UK.

Jason Y. Lim, Igor Marques, Amber L. Thompson, Kirsten E. Christensen, Vítor Félix, and Paul D. Beer, Chalcogen bonding macrocycles and [2]rotaxanes for anion recognition: an in silico approach, 13th ISMSC, July 8-13, 2018 Québec City, Canadá.
Cristina Moiteiro, Sílvia Carvalho, Paulo Vieira, Igor Marques, Margarida Q. Miranda, Ethan N. W. Howe, Claudia Y.-T. Leung, Michael J. Spooner, Philip A. Gale, Vítor Félix, Small (Thio)urea-Based Molecules for Anion Recognition and Transmembrane Transport, 13th ISMSC, July 8-13, 2018, Québec City, Canadá.

Silvia Carvalho, Paulo Vieira, Cristina Moiteiro, Igor Marques e Vítor Félix, Design of new urea and thiourea-based receptors for anions, 4th Annual Conference, Rede Saúde, Universidade de Lisboa, Reitoria da Universidade de Lisboa, 4 maio de 2017.

Silvia Carvalho, Paulo Vieira Miguel Barros, Cristina Moiteiro, Igor Marques e Vítor Félix, Bis-(thio)urea-based receptors as potential membrane transporters for anions, XXV ENSPQ, FF, UL, 16-19 de Julho de 2017.

Silvia Carvalho, Paulo Vieira, Cristina Moiteiro, Igor Marques e Vítor Félix, Design of new urea and thiourea-based receptors for anion recognition, 1º Encontro do Colégio da Química, FC, UL, Reitoria da Universidade de Lisboa, Lisboa, 20-21 de julho, 2017.

Silvia Carvalho, Paulo Vieira Miguel Barros, Cristina Moiteiro, Igor Marques e Vítor Félix, Design of new urea and thiourea-based receptors for anion recognition, CQB Day, FC, UL, 31 Maio, 2017.

Divulgação em website

<http://www.scienceportugal.com/en/institutions/faculdade-de-ciencias-da-universidade-de-lisboa/anion-transmembrane-transport-promoted-by-drug-like-molecules-building-a-library-of-anion-carriers-inspired-in-ataluren-ptc124/>



Artigos Científicos

Jason Y. C. Lim, Igor Marques, Vítor Félix, and Paul D. Beer Enantioselective Anion Recognition by Chiral Halogen-Bonding [2]Rotaxanes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139 (35), 12228–12239. DOI: 10.1021/jacs.7b06144

Jason Y. C. Lim, Igor Marques, Amber L. Thompson, Kirsten E. Christensen, Vítor Félix, and Paul D. Beer, Chalcogen Bonding Macrocycles and [2]Rotaxanes for Anion Recognition, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139 (8), 3122–3133. DOI: 10.1021/jacs.6b12745

Timothy A. Barendt, Liliana Ferreira, Igor Marques, Vítor Félix, and Paul D. Beer, Anion- and Solvent-Induced Rotary Dynamics and Sensing in a Perylene Diimide [3]Catenane, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139 (26), 9026–9037. DOI: 10.1021/jacs.7b04295

Nathalie Busschaert, Seong-Hyun Park, Kyung-Hwa Baek, Yoon Pyo Choi, Jinhong Park, Ethan N. W. Howe, Jennifer R. Hiscock, Louise E. Karagiannidis, Igor Marques, Vítor Félix, Wan Namkung, Jonathan L. Sessler, Philip A. Gale & Injae Shin. A synthetic ion transporter that disrupts autophagy and induces apoptosis by perturbing cellular chloride concentrations; *Nature Chemistry* 9, 667–675 (2017). DOI:10.1038/nchem.2

