



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0403363-9 A**

(22) Data de Depósito: 20/08/2004
(43) Data de Publicação: 02/05/2006
(RPI 1843)



(51) Int. Cl.⁷:
C07D 409/12
A61K 31/381
A61K 31/357
A61P 9/04
A61P 21/02

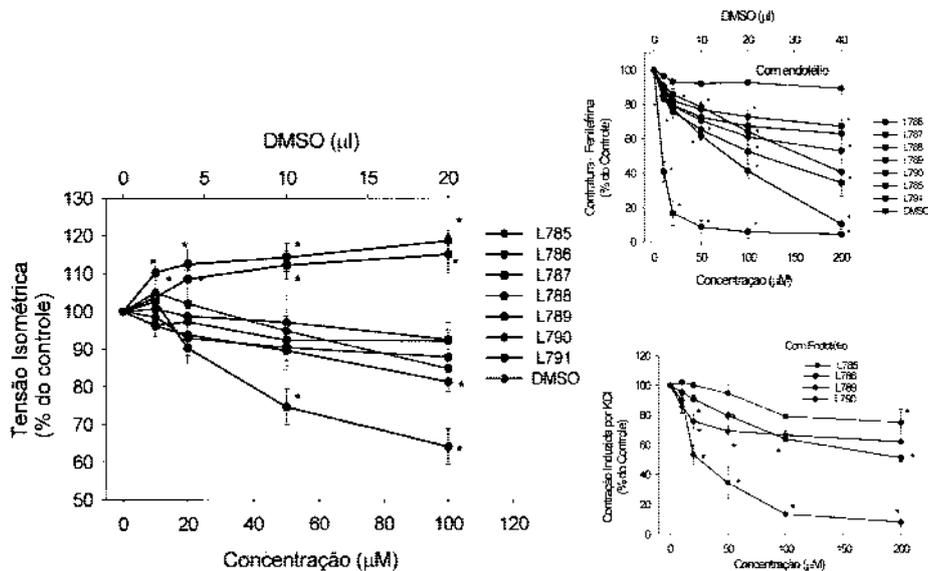
(54) Título: **RELAXANTES MUSCULARES SELETIVOS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**

(57) Resumo: "RELAXANTES MUSCULARES SELETIVOS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS". A presente invenção se refere a substâncias capazes de promover relaxamento muscular seletivo, a composições farmacêuticas contendo tais compostos e seu uso no tratamento de doenças associadas ao tecido muscular, sendo que tais compostos obedecem à fórmula geral (1):

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Gisele Zapata-Sudo, Roberto Takashi Sudo, Alexandre Godinho Silva, Arthur Eugen Kummerle, Eliezer de Jesus de Lacerda Barreiro, Carlos Alberto Manssour Fraga

(74) Procurador: Alves, Vieira, Lopes & Atem Advogados



Relatório Descritivo

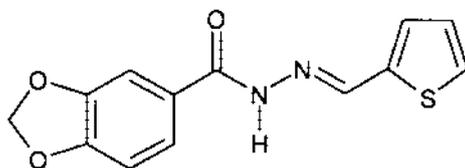
RELAXANTES MUSCULARES SELETIVOS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

5 Campo da Invenção

A presente invenção se refere a compostos capazes de atuarem como relaxantes musculares seletivos, sendo tais compostos pertencentes à família das tienil-acilidrazonas. A presente invenção se refere também a composições farmacêuticas contendo tais compostos e seu uso no tratamento de doenças associadas ao tecido muscular.

Antecedentes da Invenção

Novas substâncias bioativas pertencentes à classe das *N*-acilidrazonas foram sintetizadas usando-se como material de partida o safrol, um produto natural brasileiro obtido do óleo de sassafrás (*Ocotea pretiosa*) (Figueiredo e cols., 2000). Uma provável propriedade farmacológica desta classe seria o efeito analgésico, já que a ligação hidrazona presente nas moléculas, possui importante papel na inibição da cicloxigenase (Todeschini e cols., 1998). A substituição do anel furóil pelo tiofeno da molécula *N*-heteroarilidrazona originou o 3,4-metilenodioxibenzoil-2-tienilidrazona, mostrado na estrutura abaixo, denominado LASSBio 294 (L294) e identificado como um bioisoster de inibidores da fosfodiesterase (PDE) do tipo 4 (Piaz e cols., 1997), uma isoforma da enzima responsável pela degradação de nucleotídeos cíclicos.



LASSBio 294

O L294 foi descrito como um agente inotrópico positivo cardíaco (Sudo e cols., 2001) com propriedade vasodilatadora (Silva e cols., 2002), e também

capaz de promover aumento da contratilidade da musculatura esquelética tanto de rã (Gonzalez-Serratos e cols., 2001) quanto de rato (Zapata-Sudo e cols., 2003). O aumento da contratilidade cardíaca provocada pelo L294 não foi relacionado com a ativação de receptores β -adrenérgicos, uma vez que, o incremento da amplitude dos abalos musculares não foi modificado com o tratamento prévio de propranolol, um bloqueador não seletivo destes receptores. A possibilidade de que L294 poderia estar aumentando a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} no músculo cardíaco foi descartada devido a não alteração da curva de $[\text{Ca}^{2+}]$ versus tensão em fibras cardíacas desnudas (Sudo e cols., 2001). O provável mecanismo de ação do L294 foi atribuído a maior acúmulo de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (RS) em função da maior captação de Ca^{2+} por esta organela. Não se pode eliminar também a possibilidade de a inibição da PDE promover a elevação de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) o que levaria a maior captação de Ca^{2+} pelo RS através da fosforilação da fosfolamban presente na bomba Ca^{2+} -ATPase (SERCA, "sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase").

O L294 também reverteu a contratura de anéis de aorta induzida tanto por noradrenalina quanto por KCl (Silva e cols., 2002), efeito este observado em preparações com endotélio íntegro. O envolvimento da liberação de prostanóides pelo L294 para explicar o efeito de relaxamento vascular foi descartado já que, o relaxamento permaneceu inalterado mesmo na presença de um inibidor da cicloxigenase. A reversão do relaxamento pela inibição da guanilato ciclase sugeriu o envolvimento de GMPc no mecanismo do L294 em promover vasodilatação.

Como a função fisiológica da PDE está relacionada tanto ao aumento da contratilidade de músculo cardíaco quanto ao relaxamento de músculo liso vascular, este importante alvo farmacológico é de grande interesse para a busca de novas substâncias que atuem interferindo com a função da PDE em diferentes tecidos musculares.

Músculo cardíaco

O acoplamento excitação-contração muscular é um processo que se inicia com a geração de um potencial de ação (PA) que se propaga ao longo do sarcolema e culmina com o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . A excitação do músculo cardíaco envolve alterações da permeabilidade iônica da membrana celular, que permite inicialmente o influxo de Na^+ seguido de ativação de canais de Ca^{2+} do tipo L ou sensíveis a diidropiridinas (DHPR). O influxo de Ca^{2+} através do DHPR juntamente com a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares são os responsáveis pelo aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol, que ao se ligarem às proteínas contráteis promovem a contração muscular. Assim, os miofilamentos são ativados pelo Ca^{2+} oriundos da combinação do influxo através do sarcolema e da liberação pelo RS, através dos canais de rianodina (RyR2) e/ou de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R).

O RS é uma organela que mantém um estoque de Ca^{2+} no seu interior, devido à captação do Ca^{2+} citoplasmático através de um transportador dependente de ATP, a Ca^{2+} -ATPase, SERCA. A principal isoforma SERCA2a, presente nas células cardíacas e que transporta ativamente Ca^{2+} do citoplasma para o lúmen do RS, é uma bomba que é regulada por uma proteína intrínseca conhecida como fosfolamban. Esta proteína reduz a afinidade da SERCA2a pelo Ca^{2+} , porém, quando fosforilada, se desliga e deixa de inibir a captação do íon. O alto estoque de Ca^{2+} no RS é o principal responsável pela elevação da concentração livre do íon no sarcoplasma. A liberação para o citoplasma é feita principalmente pelo canal de rianodina, estrutura tetramérica (Block e cols 1988; Saito e cols, 1988) localizada na junção entre o RS e túbulo T, onde mantém relação com canais de Ca^{2+} do tipo L (Carl e cols, 1995; Sun e cols, 1995). O RyR que está presente no RS de qualquer tecido muscular, tem esta denominação em razão de sua afinidade pelo alcalóide rianodina (Stern e cols, 1992). Está intimamente relacionado a outras proteínas tais como fosfatases, calmodulina, calsequestrina e FKBP12 e pode ser ativado pela cafeína, Ca^{2+} e ATP e inibido pelo Mg^{2+} , procaina e rutênio vermelho. Outro tipo de canal que ativa a liberação de Ca^{2+} é o IP_3R , sensível ao segundo mensageiro IP_3 produto da degradação de inositol fosfato feita pela fosfolipase C (PLC).

Receptores α_1 -adrenérgicos quando ativados promovem aumento do inotropismo mediado pelo IP_3 .

O RS pode ser dividido em duas regiões: 1) o sistema de túbulos longitudinais que corre paralelamente aos miofilamentos e termina em grandes câmaras denominadas cisternas terminais ou juncionais. Esta região apresenta predominância de canais de rianodina e grande quantidade de calsequestrina; 2) a rede sarcotubular, rica em bombas de Ca^{2+} , e que se localiza centralmente em maior contato com o sistema contrátil.

Os eventos importantes para a redução de Ca^{2+} ao final da contração muscular são essencialmente o bombeamento de Ca^{2+} de volta para o RS e a extrusão do mesmo para o meio extracelular. Ao fim da contração, a concentração intracelular de Na^+ está elevada o que favorece ao funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase, que re-estabelece o gradiente de concentração do Na^+ , expulsando três íons Na^+ contra a entrada de dois íons K^+ . A redução do Na^+ no interior do miócito cardíaco, promove a ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} presente na membrana plasmática, de modo a expulsar o Ca^{2+} do citoplasma. Outro meio pelo qual a concentração de Ca^{2+} pode retornar ao valor de repouso é através do efluxo de Ca^{2+} realizado pela bomba Ca^{2+} -ATPase do tipo PMCA. Esta bomba presente no sarcolema funciona com gasto de energia derivada da hidrólise do ATP e apresenta alta afinidade ao Ca^{2+} e baixa velocidade de transporte.

Portanto, o Ca^{2+} tem um papel central na regulação da contração e relaxamento do músculo cardíaco que pode ser encontrado livre no citosol ou ainda, estocado em estruturas intracelulares como as mitocôndrias e o RS. Alterações na concentração de Ca^{2+} em quaisquer destes compartimentos podem afetar os processos de contração e/ou relaxamento da musculatura cardíaca. Algumas substâncias como os agonistas de receptores β -adrenérgicos podem aumentar a contratilidade cardíaca através do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Estas aumentam a produção de AMPc que por sua vez, ativa uma proteína quinase dependente do AMPc responsável pela fosforilação do canal de Ca^{2+} do tipo L e da FKBP12 presente no canal de

rianodina, o que permite aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular e mobilização dos estoques intracelulares (Kuschel e cols, 2000). A descrição do AMPc como segundo mensageiro em resposta a epinefrina deu início a compreensão das funções fisiológicas dos nucleotídeos e das fosfodiesterases (PDE) na ativação adrenérgica em diferentes tecidos. Desde então, despertou-se o interesse para descrição das vias de ação intracelular que fossem capazes de explicar o efeito produzido por hormônios e outras moléculas que atuassem via nucleotídeos (Beavo e Brunton, 2002). A PDE é uma proteína solúvel no citoplasma com atividade enzimática capaz de clivar a ligação fosfodiéster dos nucleotídeos tornando-os inativos, mais que isso, ela interfere na duração e intensidade dos efeitos dos nucleotídeos. Já foram descritos 19 genes subagrupados em 11 famílias distintas de PDE (Sordeling e Beavo, 2000) baseadas na seqüência primária de aminoácidos e sítios catalítico e regulatório, sendo que cada família contém múltiplos genes que codificam suas variações. A expressão desta enzima está intimamente ligada à especificidade tecidual, o que torna de interesse clínico a síntese de novos inibidores da PDE seletivos para modulação de determinados eventos intracelulares em diferentes tecidos. A PDE possui além do sítio catalítico de 270 ácidos aminados, com mais de 50% de homologia entre as isoformas, um sítio regulatório de homologia moderada capaz de ligar diferentes moduladores dentre as famílias existentes.

Em miócitos ventriculares, as isoformas mais abundantes são a PDE2 e a PDE4 (Verde e cols, 1999), sendo também encontradas a PDE1 e a PDE3 e mais recentemente descrita a PDE 9. As isoformas 1 e 2 possuem afinidades semelhantes para o AMPc e o GMPc, sendo ativadas por complexo Ca^{+2} -calmodulina e GMPc, respectivamente. Já as isoformas 3 e 4 tem maior afinidade pelo GMPc, sendo a PDE4 ativada por fosforilação dependente de AMPc (Tabela 1). A inibição das isoformas 2, 3 e 4 (Verde e cols, 1999) é capaz de elevar a corrente basal de Ca^{2+} proporcionando maior contratilidade cardíaca.

O AMPc, como descrito anteriormente, desempenha papel importante na contratilidade cardíaca via proteína quinase dependente de AMPc, aumentando

a probabilidade de abertura do canal de Ca^{2+} tipo L. Pela mesma via, o nucleotídeo é capaz de promover a remoção do íon através da ativação da bomba Ca^{2+} -ATPase.

O inotropismo cardíaco pode ser modulado através do uso de fármacos que atuem nestes importantes alvos citados acima, que são responsáveis pelo aumento do Ca^{2+} intracelular e da sensibilidade das proteínas contráteis a este íon. Os fármacos mais antigos com essa propriedade são os glicosídeos cardíacos, também conhecidos como digitálicos em razão do princípio ativo ser proveniente de vegetais do gênero *Digitalis* (digoxina e a digitoxina). Estes inibem diretamente a bomba de Na^+/K^+ -ATPase (Akeris e Brody, 1997) promovendo um aumento na concentração intracelular de Na^+ , com conseqüente redução do efluxo de Ca^{2+} pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A maior retenção de Ca^{2+} proporciona um aumento dos estoques intracelulares, com maior quantidade de Ca^{2+} a ser liberado. Neste caso, durante o evento da contração existe uma maior disponibilidade de Ca^{2+} para interagir com as proteínas contráteis, o que caracteriza o inotropismo positivo destes fármacos. Os agentes cardiotônicos provocam efeitos adversos relacionados com o excesso de Ca^{2+} intracelular como arritmias cardíacas e injúrias que podem levar a morte celular.

Uma outra classe de agentes inotrópicos, incluem fármacos que atuam sobre as proteínas contráteis aumentando a ligação de Ca^{2+} a troponina C (TnC), nos sítios regulatórios do filamento fino e/ou diretamente no ciclo das pontes cruzadas (Endoh, 1998; Lee e Allen, 1997). Estes fármacos são conhecidos como sensibilizadores ao Ca^{2+} , e o interesse por eles está relacionado ao fato de não apresentarem a mesma toxicidade dos cardiotônicos. A ligação de dois íons Ca^{2+} a TnC enfraquece a ligação da TnI a actina, deslocando a tropomiosina de seu sítio permitindo a interação da actina com a miosina levando ao encurtamento das fibras musculares e conseqüente contração muscular (Katz, 2001). Os sensibilizadores de Ca^{2+} podem ser divididos em três classes: 1) aumentam a ligação do Ca^{2+} a troponina C; classe

2) facilitam a regulação da actina através do complexo de Ca^{2+} com os filamentos finos; classe 3) agem direto na interação da actina-miosina.

O levosimendan e o pimobendan são exemplos de agentes sensibilizadores de Ca^{2+} que promovem inotropismo cardíaco positivo em modelos animais *in vitro* e *in vivo* (Endoh, 1995) pelo aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} . O pimobendan, agente de classe 1, além de diminuir o limiar do deslizamento da actina dependente de Ca^{2+} (Sata e cols, 1995) também atua inibindo a PDE3 (Scholz e Meyer, 1986). O levosimendan, um agente de classe 2, atua principalmente estabilizando a conformação do complexo Ca^{2+} -troponina C, além de inibir a PDE3.

Músculo liso

A contração da musculatura lisa vascular assim como nas outras células musculares é dependente do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , que se dá via influxo deste pela abertura de canais iônicos presentes na membrana plasmática ou ainda pela liberação de estoques intracelulares. O acoplamento eletroquímico e o farmacológico (Figura 3) são responsáveis pela alteração na concentração de Ca^{2+} . No primeiro, a geração de um PA, onde o potencial de membrana passa de -60mV a 10mV , promove a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependente permitindo o influxo do Ca^{2+} a favor do gradiente eletroquímico. Estes canais iônicos são complexas proteínas que possuem regiões especializadas sensíveis a mudanças no potencial de membrana e causam alterações de conformação no canal, o que permite o influxo de Ca^{2+} . Já no acoplamento farmacológico, a concentração do Ca^{2+} pode ser alterada sem a mudança no potencial de membrana, ou seja, o influxo de Ca^{2+} (Nelson e cols, 1988) e sua mobilização de estoques intracelulares (Hashimoto, T., 1986) podem ocorrer pela ligação de agentes extracelulares a receptores de membrana. A noradrenalina, através da sua ligação a receptores de membrana acoplados a proteína G estimulatória, ativa através da fosfolipase C (PLC) a formação de segundos mensageiros capazes de controlar o processo da contração muscular. Um destes mensageiros é o IP3 cuja molécula intracelular ativa a liberação de Ca^{2+} do RS. O próprio influxo de

Ca^{2+} pode mobilizar seus estoques intracelulares (Herrmann-Frank e cols, 1991; Nelson e cols, 1995) e aumentar sua concentração no citoplasma. Pela ação da PLC também é formado o diacilglicerol (DAG), cujo papel é aumentar a sensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} .

5 Invaginações presentes nas fibras musculares chamadas de caveolas (Taggart, 2001), desempenham função regulatória na homeostasia do Ca^{2+} . As proteínas formadoras das invaginações, as caveolinas, quando estimuladas recrutam para periferia da célula, enzimas envolvidas na inibição da miosina fosfatase, enzima responsável pela defosforilação da cadeia leve de miosina,
10 etapa importante no processo de relaxamento muscular.

 Ao fim do estímulo de contração, o relaxamento da musculatura lisa não ocorre imediatamente, sendo a redução na concentração de Ca^{2+} e a defosforilação de miofilamentos os meios pelos quais ocorre o relaxamento. O mesmo RS que libera Ca^{2+} no processo de contração é o principal responsável
15 pela recaptção do íon contra o gradiente de concentração, graças a Ca^{2+} -ATPase (bombas SERCA), presente em maior parte exposta ao citoplasma. O relaxamento da musculatura lisa pode ser induzido farmacologicamente pela geração de nucleotídeos cíclicos ou bloqueando a degradação deste segundo mensageiro. Outra via de relaxamento está relacionada a ativação de canais de
20 potássio dependente de voltagem, que uma vez abertos promovem a repolarização celular, evento iniciador da redução de Ca^{2+} intracelular.

 A ativação de receptores beta-adrenérgicos em células de músculo liso traqueal induzido pelos agonistas como salbutamol, albuterol, fenoterol leva a formação de AMPc, segundo mensageiro que via proteína quinase é
25 responsável pelo transporte do Ca^{2+} de volta para o RS, promovendo o relaxamento (Hoiting e cols, 1996).

 As células endoteliais vasculares são responsáveis pela formação de moléculas capazes de levar ao relaxamento do músculo liso. O aumento de Ca^{2+} promovido pelos agonistas muscarínicos como exemplo o ipatrópio, é
30 capaz de ativar a síntese de óxido nítrico (NO) através da NO sintase. O NO difunde-se através do músculo liso e no meio intracelular promove a formação

de GMPc via guanilato ciclase (Iijima e cols, 1995), que por sua vez atua no relaxamento da musculatura lisa ativando a miosina fosfatase, enzima responsável pela defosforilação da cadeia leve de miosina. Através de uma enzima quinase dependente de GMPc, o nucleotídeo promove a redução de Ca^{2+} citoplasmático pela ativação de bombas SERCA e PMCA. A fosforilação da fosfolamban presente na Ca^{2+} -ATPase do RS ativa esta bomba (Raeymaekers, 1988) , assim como, a enzima quinase ativa a bomba presente na membrana plasmática (Yoshida, 1999)

A atividade contrátil da musculatura lisa também é alvo dos inibidores de PDE. Moléculas seletivas para as isoformas do músculo liso podem ser usadas no tratamento de disfunções vascular e erétil.

No músculo liso vascular foram identificadas as isoformas de 1 a 5 (Saeki e Saito, 1993). A miirinona, inibidor de PDE seletivo para isoforma do tipo 3, apresenta efeito cardiinotrópico positivo e efeito vasodilatador periférico, o que resulta em alguns efeitos hemodinâmicos, tais como, redução na pós-carga com aumento do débito cardíaco e redução da resistência vascular periférica (Shipley e cols, 1996).

No músculo liso de corpo cavernoso, a inibição da principal isoforma, PDE5, aumenta a oferta de GMPc que por meio da proteína quinase dependente de GMPc reduz a probabilidade de abertura de canais de Ca^{2+} de membrana, levando ao relaxamento do tecido responsável pela ereção (Archer, 2002). Assim atuam fármacos como o sildenafil, vardenafil e o tadalafil.

Músculo Esquelético

No músculo esquelético, o processo de contração se inicia com a despolarização da terminação nervosa da junção neuromuscular com liberação de acetilcolina e ativação de receptores nicotínicos presentes na fibra muscular. O neurotransmissor aumenta a permeabilidade da fibra aos íons Na^+ na região quimioexcitável (placa motora) gerando o potencial de placa motora (PPM). A despolarização focal na placa motora excita a região adjacente (membrana eletroexcitável). Nesta região, ocorre o influxo de Na^+ originando o PA tipo tudo-ou-nada que se propaga ao longo do túbulo T. Diferente do

músculo cardíaco, o aumento do Ca^{2+} intracelular decorrente da liberação de Ca^{2+} pelo RS não é dependente do influxo deste íon do meio extracelular. A despolarização da membrana da fibra muscular (túbulo T) é percebida pelo DHPR (McPherson e cols, 1993) e transmitida ao canal de RyR1 que por sua vez promove a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol. Uma vez ativado, o RyR1 transmite uma informação que libera a ligação do Ca^{2+} da calsequestrina, proteína encontrada no lúmen do RS (Ikemoto e cols, 1991). A liberação de Ca^{2+} pelo RS de músculo esquelético pode ser ativada por agentes farmacológicos como a cafeína, halotano, rianodina (concentração nanomolar), nucleotídeos de adenina, 4-cloro-m-cresol e outros. O ATP e o Ca^{2+} são os principais ativadores endógenos. Pode ser bloqueada pelo Mg^{2+} , pela rianodina (concentração micromolar), rutênio vermelho, procaína, calmodulina, dantrolene e outros.

A Literatura patentária possui documentos bastante relevantes. Podemos citar o WO 00/78754, trabalho que originou o composto LASSBio 294, que descreve compostos com capacidade inotrópica. Porém, ao contrário do objetivo desta invenção, tais compostos do estado da técnica são considerados inotrópicos positivos.

Compostos capazes de promover o relaxamento seletivo dos músculos não são inéditos. Podemos citar o documento WO 94/28902, que descreve compostos capazes de atuar seletivamente no músculo liso. O documento WO 04/050084 revela novos compostos com capacidades de inibir a ECA e serem doadores de NO ao mesmo tempo. Já o documento WO 04/047837 revela novos bloqueadores β -adrenérgicos multifuncionais, com capacidades adicionais, tais como doadores de NO e ação antioxidante.

No entanto, nenhum composto descrito anteriormente apresenta semelhança estrutural e farmacodinâmica com os compostos desta invenção.

Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra o registro típico de abalos musculares de músculo papilar de rato, estimulado eletricamente à frequência de 1 Hz. Os traçados

foram obtidos no controle, 30 minutos após o equilíbrio da preparação na presença de 100 μ M dos derivados L789, L791 e L786 e 30 minutos após a lavagem dos tecidos com solução de Tyrode.

5 A Figura 2 mostra os efeitos dos derivados *N*-acilidrazônicos na amplitude dos abalos de músculo papilar de ratos. Os dados representam a média \pm EPM de 6 experimentos para cada derivado testado. (* $P < 0,05$ quando comparado ao controle).

10 A Figura 3 mostra os efeitos dos derivados *N*-acilidrazônicos na tensão isométrica de feixes de ventrículo esquerdo de coração de rato. Os dados representam a média \pm EPM de 6 experimentos para cada derivado testado. (* $P < 0,05$ quando comparado ao controle).

15 A Figura 4 mostra o registro representativo do protocolo experimental utilizado para testar a atividade relaxante da musculatura lisa da aorta, preservada de endotélio, pelos derivados *N*-acilidrazônicos. No exemplo, a substância testada foi o L785, que provocou relaxamento completo à contratura induzida pela fenilefrina (FNF). As setas indicam os momentos em que as substâncias indicadas foram adicionadas na solução nutritora. Observe entre os registros, a lavagem da preparação com solução de Tyrode durante 30 minutos.

20 A Figura 5 mostra a inibição da contratura induzida pela fenilefrina pelos análogos do L294 em anéis de aorta de ratos com o endotélio vascular preservado. Os pontos representam a média \pm EPM de 6 experimentos para cada derivado. (* $P < 0,05$ em relação ao controle).

25 A Figura 6 mostra a curva dose-resposta das concentrações cumulativas dos derivados na contratura de anéis de aorta induzida por KCl (40mM). (* $p < 0,05$ quando comparado ao controle. $n = 6$).

30 A Figura 7 mostra o registro representativo do protocolo experimental utilizado para testar a atividade relaxante da musculatura lisa da aorta, sem endotélio, pelos derivados *N*-acilidrazônicos. No exemplo, a substância testada foi o L790, que não provocou efeito relaxante significativo na contratura induzida pela fenilefrina (FNF). As setas indicam os momentos em que as

substâncias indicadas foram adicionadas na solução nutritora. Observe entre os registros, a lavagem da preparação com solução de Tyrode durante 30 minutos.

5 A Figura 8 mostra a curva dose-resposta contrátil de anéis de aorta na presença dos derivados *N*-acilidrazônicos. Os pontos representam a média \pm EPM de 6 experimentos para cada derivado. (* indica $P < 0,05$ quando comparado ao controle).

10 A Figura 9 mostra o efeito inibitório dos análogos do L294 na contratura de anéis de aorta de rato sem endotélio induzida pelo KCl (40mM). Os pontos representam a média \pm EPM ($n = 6$). (* $P < 0,05$ em relação ao controle).

A Figura 10 mostra o efeito de concentrações cumulativas do derivado L786 na contratura de corpo cavernoso de cobaio induzida pela fenilefrina (30 μ M).

15 A Figura 11 mostra o efeito das concentrações cumulativas de derivados do L294 na contratura induzida pela fenilefrina em corpo cavernoso de cobaio. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao controle. Os números entre parênteses correspondem ao número de experimentos realizados.

20 A Figura 12 mostra o efeito de concentrações cumulativas do derivado L785 na contratura de anéis de traquéia de rato induzida pela acetilcolina (10 μ M).

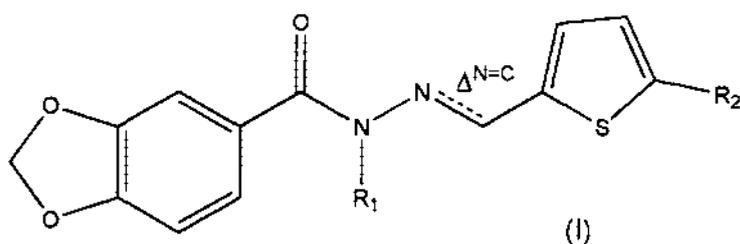
A Figura 13 mostra o efeito de concentrações cumulativas de derivados do L294 na contratura de anéis de traquéia de rato. (* indica $p < 0,05$ quando comparado ao controle). Os números entre parênteses correspondem ao número de experimentos realizados.

25 A Figura 14 mostra os registros de abalos de músculos EDL e SOL de camundongos na ausência (Controle), presença de L786 (50 μ M) e 30 minutos após a lavagem das preparações com solução de Krebs. Observe a mudança da velocidade de registro.

30 **Sumário da Invenção**

É um objeto da presente invenção a apresentação de derivados tienil-acilidrazônicos capazes de provocar relaxamento muscular seletivo. Mais especificamente, estes derivados são seletivos para músculos cardíacos e/ou lisos e/ou esqueléticos.

- 5 É um adicional objeto da presente invenção os derivados tienil-acilidrazônicos diretamente relacionados com a fórmula geral (I) abaixo:



- 10 onde:

R1 pode ser H, alquil C1-C6, alquenil C1-C6 ou arilalquil, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

- 15 $\Delta^{N=C}$ se refere à ligação entre o nitrogênio e o carbono, ligação esta que pode ser simples ou dupla, desde que quando a ligação for simples, o nitrogênio faça mais uma ligação simples com um hidrogênio;

R2 pode ser H, alquil C1-C6, halogênio, NO₂, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

e seus sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis.

- 20 É um adicional objeto da presente invenção composições farmacêuticas contendo tais derivados e seu uso em animais, preferencialmente humanos. Mais especificamente, tais composições são destinadas para o relaxamento de músculos cardíacos e/ou lisos e/ou esqueléticos.

Descrição Detalhada da Invenção

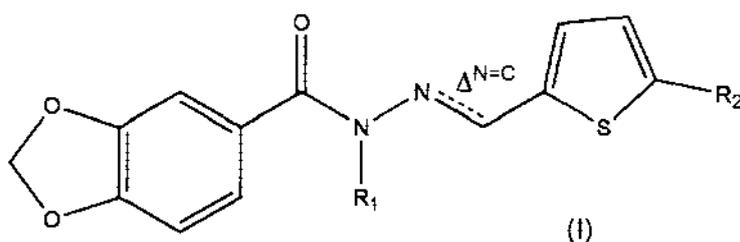
- 25 Como pode ser claramente observado, os compostos da presente invenção são diretamente relacionados com o composto LASSBio-294 (L294), apresentado no documento WO 00/78754, e derivados. De acordo com o

relatório descritivo desta referência, é somente objeto da invenção compostos que possuam atividade inotrópica positiva, ou seja, que sejam capazes de aumentar a contratilidade das células musculares. Os derivados aqui descritos, diferem destes compostos justamente por apresentarem atividades inotrópicas negativas, além de possuírem seletividade tissular.

Os exemplos aqui descritos não possuem a intenção de limitar a invenção, possuindo apenas caráter ilustrativo.

Para efeitos desta invenção considera-se tecido muscular o conjunto de tecidos formado pelos músculos cardíaco, liso e esquelético. Ainda para efeitos desta invenção, a expressão "análogos de L294" engloba os compostos L785, L786, L787, L788, L790 e L791.

Os derivados tienil-acilidrazônicos da presente invenção são compostos diretamente relacionados com a fórmula geral (I) abaixo:



onde:

R1 pode ser H, alquil C1-C6, alquenil C1-C6 ou arilalquil, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

$\Delta^{N=C}$ se refere à ligação entre o nitrogênio e o carbono, ligação esta que pode ser simples ou dupla, desde que quando a ligação for simples, o nitrogênio faça mais uma ligação simples com um hidrogênio;

R2 pode ser H, alquil C1-C6, halogênio, NO₂, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

e seus sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis.

Os derivados da presente invenção possuem seletividade tissular, atuando preferencialmente no tecido muscular. Mais ainda, os compostos da presente invenção apresentam seletividade entre os tecidos musculares, atuando em pelo menos um dos tecidos do grupo escolhido para avaliação, que consiste de músculo cardíaco, músculo liso e músculo esquelético.

Os derivados da presente invenção podem ser preparados de acordo com procedimentos químicos conhecidos e descritos no estado da técnica.

Os compostos preferenciais da invenção, análogos de L294 seguem a fórmula geral (I) e seus substituintes correspondem à Tabela 1 abaixo.

10

Tabela 1: Compostos preferenciais da invenção

Derivado	R1	$\Delta^{N=C}$	R2
LASSBio 785 (L785)	CH ₃ -	Sim	H
LASSBio 786 (L786)	C ₆ H ₅ CH ₂ -	Sim	H
LASSBio 787 (L787)	H	Sim	CH ₃
LASSBio 788 (L788)	CH ₂ =CHCH ₂ -	Sim	H
LASSBio 790 (L790)	H	Sim	NO ₂
LASSBio 791 (L791)	H	Não	H

Os compostos preferenciais da invenção são escolhidos do grupo que compreende:

15 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-metil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida (L785)

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-benzil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida (L786)

20 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-metil-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida (L787)

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-N-alil-hidrazida (L788)

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-nitro-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida (L790)

25 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-tiofen-2-ilmetil-hidrazida (L791)

Para averiguar a atividade biológica dos compostos da presente invenção, foram realizados diversos experimentos, de acordo com o esquema abaixo:

- 5 1) Músculo Cardíaco
- a. Tensão isométrica em músculo papilar
 - b. Tensão isométrica em feixes ventriculares
- 2) Músculo Liso
- a. Vascular
 - 10 i. Tensão isométrica em artéria aorta – indução por fenilefrina (com endotélio)
 - ii. Tensão isométrica em artéria aorta – indução por KCl (com endotélio)
 - iii. Tensão isométrica em artéria aorta – indução por fenilefrina (sem endotélio)
 - 15 iv. Tensão isométrica em artéria aorta – indução por KCl (sem endotélio)
 - b. Corpo Carvenoso
 - i. Contratura induzida pela fenilefrina
 - 20 c. Traqueal
 - i. Contratura induzida pela acetilcolina
- 3) Músculo Esquelético
- a. Amplitude de abalos induzidos eletricamente em fibras rápidas
 - b. Amplitude de abalos induzidos eletricamente em fibras lentas

25

Realizados os experimentos, os resultados sofreram análise estatística, sendo expressos em média \pm EPM como porcentual do valor de controle e construídos gráficos utilizando-se o programa Sigma Plot 5.0 para representar os dados obtidos. Para a análise estatística dos efeitos nos diferentes tecidos musculares avaliou-se a diferença entre as concentrações do mesmo derivado

30 utilizando-se o teste de "t" Student. Para verificar a diferença entre os derivados

utilizou-se o teste *one-way* ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$. A CI_{50} foi expressa como média \pm EPM dos valores obtidos para cada experimento através de regressão não-linear baseada na equação, $y = y_0 + ae^{-bx}$.

5

- Ensaio Laboratoriais

Músculo Cardíaco

Protocolo Experimental

Após anestesia com éter etílico, ratos Wistar machos pesando entre
 10 240-280 g eram sacrificados através de deslocamento cervical. O coração era rapidamente retirado e o músculo papilar e feixes ventriculares eram dissecados em solução Tyrode, cuja composição se encontra na Tabela 2 abaixo, à temperatura ambiente. Os músculos eram colocados em cubas verticais de capacidade de 10 mL e fixados pelas extremidades: sua porção
 15 inferior a uma garra localizada na haste de fixação do eletrodo de estimulação e a porção superior conectada a um transdutor de força (Grass FT03) para registro dos abalos musculares.

Tabela 2. Composição em mM da solução Tyrode. pH ajustado para 7,4 com KOH 5M

Compostos	Concentração (mM)
NaCl	130,0
KCl	5,0
MgCl ₂	1,0
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	24,0
Na ₂ HPO ₄	0,9
Dextrose	5,6

20

Os músculos eram estimulados eletricamente com voltagem supramaximal (50-60 V), por meio de um estimulador (Grass S88) a frequência de 1,0 Hz. Os sinais captados pelo transdutor eram amplificados (Cyberamp 380, Axon Instruments) e a tensão isométrica digitalizada (Digidata 1322A,
 25 Axon Instruments) sendo armazenada em computador. A visualização e a

análise do experimento era feita utilizando-se o programa axoscope 8.0 (Axon Instruments) (Sudo e cols, 2001). A solução da cuba era continuamente borbilhada com mistura carbogênica (95% O₂ / 5% CO₂) e mantida a temperatura de 37 °C.

5 Após a estabilização dos abalos musculares (aproximadamente 30 min), os registros eram realizados na ausência (controle) e presença de concentrações crescentes (10 a 100 µM) dos diferentes análogos do L294, diluídos em DMSO. Os registros eram realizados aos pares (dois papilares e dois ventrículos), permitindo assim, que em um dos pares fosse efetuado o
10 experimento controle, ou seja, com quantidades crescentes do DMSO equivalente a aquelas utilizadas para diluir as substâncias. A reversibilidade do efeito das substâncias era investigada ao final de cada experimento observando-se a recuperação dos abalos musculares após lavagem da preparação com solução de Tyrode.

15 Resultados

A Figura 1 mostra registros típicos de abalos de músculo papilar na ausência e na presença de 100 µM de L789, L791, L786.

Este efeito foi inteiramente revertido após a lavagem da preparação com solução de Tyrode. A diversidade de resposta dos análogos do L294 no
20 coração pode ser vista nos dois registros seguintes. Assim, a mesma concentração (100 µM) de L791 não alterou significativamente a resposta contrátil do músculo papilar. Por outro lado, o L786 reduziu intensamente a amplitude dos abalos musculares, sendo este efeito, parcialmente revertido com a lavagem da preparação.

25 A curva dose-resposta relacionando tensão isométrica de músculo papilar e concentração crescente dos análogos do L294 está apresentada na Figura 2. L789 aumentou significativamente a amplitude dos abalos musculares em relação ao controle. Efeito máximo com este análogo foi alcançado na concentração de 100 µM (120,5 ± 3,7% do controle, n= 6, P<0.05). Ao
30 contrário, L786 e L788 reduziram de forma concentração-dependente a amplitude dos abalos do músculo papilar, com diminuição para 64,1 ± 5,9% e

81,2 ± 2,6% do controle, respectivamente, na concentração de 100 µM. Ainda no músculo papilar, as alterações máximas dos abalos provocadas pelo L785 (86,5 ± 4,0% do controle, n= 6), L787 (115,0 ± 5,0% do controle, n= 6), L790 (87,8 ± 5,6% do controle, n= 6) e L791 (92,4 ± 2,5% do controle, n= 6) não foram significativas. O DMSO adicionado à solução no mesmo volume em que as substâncias foram diluídas não modificou significativamente a amplitude dos abalos musculares.

Como mostrado na Figura 3, resultados semelhantes foram obtidos em feixes ventriculares onde o L789 (100 µM) também aumentou significativamente os abalos musculares para 118,8 ± 4,0% do controle (P<0,05). O L786 e L788 (100 µM) reduziram a contratilidade muscular para 79,9 ± 10,6% (P<0,01) e 74,9 ± 5,1% (P<0,05) do controle, respectivamente. Os outros derivados testados nesta preparação não provocaram alterações maiores que 10%, isto é, L785, L787, L790 e L791 modificaram a resposta muscular para 96,5 ± 3,8%, 105 ± 6,9%, 92,3 ± 1,6% e 89,4 ± 4,5% do controle, respectivamente.

A reversão da depressão ou do aumento da contratilidade da musculatura cardíaca foi avaliada após a perfusão de solução nutritiva desprovida do derivado em teste durante 30 minutos. A recuperação dos abalos musculares foi total para a maioria dos derivados, exceto para o L786, que ainda se encontrava 79,7 ± 4,6% do controle (P<0,05) após a lavagem.

Músculo Liso Vascular – Artéria Aorta

Protocolo Experimental

Ratos Wistar machos pesando entre 240-280 g eram sacrificados por deslocamento da coluna cervical sob anestesia pelo éter etílico. A artéria aorta era retirada e transferida para placa de Petri contendo solução de Tyrode modificada, cuja composição encontra-se descrita na Tabela 3 abaixo, onde era realizada a limpeza do vaso e a retirada de tecido conectivo. De acordo com o protocolo experimental programado, o endotélio vascular era removido mecanicamente com o auxílio de uma haste de polietileno. A artéria era

dividida em anéis de largura entre 2-3 mm. Duas garras eram posicionadas na parede do vaso com objetivo de registrar a tensão gerada pelo músculo no sentido transversal. Para isto, uma das garras era amarrada a um ponto fixo no interior da cuba e a outra a um transdutor de força (FT 03) para registro de

5 tensão isométrica. A tensão gerada pelo músculo era transformada em um sinal elétrico, digitalizada (Digidata 1322A) e armazenada em computador para posterior análise usando o programa axoscope 8.0 (Axon Instruments, Inc). A cuba era preenchida com solução de Krebs e esta oxigenada e mantida a

10 37°C.

Tabela 3. Composição da solução de Tyrode (em mM). A solução era continuamente borbulhada com a mistura 95% O₂ / 5% CO₂ e o pH ajustado para 7,4. A temperatura do meio experimental era mantida em 37°C.

Compostos	Concentração (mM)
NaCl	120,0
KCl	5,9
MgCl ₂	1,2
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	24,0
Na ₂ HPO ₄	0,9
Dextrose	5,6

15 Após a estabilização da preparação, aproximadamente 120 minutos, dava-se início ao protocolo experimental. Inicialmente, com objetivo de identificar a presença ou ausência do endotélio vascular, a preparação era exposta a fenilefrina (10 µM) e, no momento em que a contratatura em resposta a esta substância era estabilizada, a acetilcolina (10 µM) era adicionada à

20 solução nutritora. Relaxamento superior a 80% em resposta à acetilcolina indicava integridade total do endotélio e relaxamento inferior a 10% indicava ausência de endotélio. Os tecidos em que a intensidade de relaxamento se situava entre >10% e <80% eram desprezados. Para investigar o efeito vasodilatador dos diferentes análogos do L294, estes eram adicionados às

25 cubas experimentais, em concentrações crescentes, após a estabilização da contratatura do vaso induzida pela fenilefrina. A tensão registrada após o

tratamento com cada concentração dos análogos do L294 foi normalizada em função da amplitude da contração gerada pela fenilefrina. Para efeito comparativo de potência entre alguns análogos do L294, a CI_{50} era determinada para cada experimento usando a equação $y = y_0 + ae^{-bx}$ e a média delas utilizada para a análise estatística.

Resultados

Efeitos na contração induzida pela fenilefrina em preparação com endotélio

A Figura 4 mostra registro típico de um experimento realizado em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro. Após a estabilização da contração em resposta a fenilefrina (10 μ M), foram adicionados 10 μ M de acetilcolina (Ach) a cuba experimental. O relaxamento provocado pela Ach foi superior a 80% do controle demonstrando com isto, a preservação do endotélio vascular. O efeito da Ach foi totalmente reversível uma vez que a fenilefrina provocou contração de intensidade igual ao do início do experimento 30 minutos após a lavagem da preparação. O análogo L785 diminuiu de forma dose-dependente a contração da fenilefrina atingindo o seu máximo de efeito na concentração de 100 μ M.

Protocolo semelhante ao da Figura 4 foi repetido para as demais substâncias estudadas. Como apresentado na Figura 5, ficou evidenciado que todos os análogos do L294 tem efeito semelhante ao L785, porém, com diferenças significativas de potência e eficácia entre eles. O L785 e L788 foram os derivados mais eficazes, onde reduziram a amplitude da contração de anéis com endotélio íntegro para $4,4 \pm 2,8\%$ ($n = 6$) e $10,4 \pm 3,2\%$ ($n = 6$) do controle, respectivamente.

No entanto, o efeito inibitório máximo induzido pelo L785 foi alcançado com 50 μ M, concentração esta quatro vezes menor do que a do L788 para promover inibição de intensidade equivalente. A inibição máxima observada com os outros derivados foram de $34,5 \pm 7,6\%$ ($n = 6$), $37,1 \pm 7,0\%$ ($n = 6$), $32,7 \pm 4,2\%$ ($n = 6$), $47,0 \pm 5,9\%$ ($n = 6$) e $59,2 \pm 7,8\%$ para L786, L787, L789, L790 e L791, respectivamente.

Potência comparativa entre os análogos do L294 nesta preparação está mostrada na Tabela 5 abaixo. Observe que a CI_{50} do L785 é quase 7 vezes menor do que a do L788 e quase 30 vezes menor do que a do L787 mostrando a grande potência daquela substância. O análogo L789 é de baixa potência não provocando relaxamento vascular significativo e assim, não possibilitando a determinação da CI_{50} .

Tabela 5. CI_{50} dos análogos do L294 na contratatura induzida pela fenilefrina ($10 \mu M$) em anéis de aorta com a preservação do endotélio. A CI_{50} foi determinada para cada experimento e os dados da tabela representam a média \pm EPM de 6 experimentos. ND indica situação em que a CI_{50} não pode ser determinada em função da reduzida potência do análogo em inibir a contratatura induzida pela fenilefrina.

Inibição da Contratatura Induzida pela Fenilefrina – Com Endotélio	
Análogos do L294	CI_{50} (μM) Média \pm EPM
L785	$10,2 \pm 0,5$
L788	$67,9 \pm 6,5$
L786	$134,1 \pm 31,0$
L791	$172,8 \pm 26,7$
L790	$216,0 \pm 39,3$
L787	$293,0 \pm 76,0$
L789	ND

Efeitos na contratatura induzida pelo KCl em preparação com endotélio

Efeitos dos análogos do L294 foram investigados em anéis de aorta de rato com preservação de endotélio cuja contratatura foi induzida pelo aumento da concentração extracelular de KCl para 40 mM. Dos sete análogos do L294, o teste foi realizado apenas com o L785, L786, L789 e L790, neste grupo de experimentos.

O critério de escolha dos análogos do L294 para serem testados na contratatura induzida pelo KCl foi baseado nos resultados obtidos nos músculos cardíacos e no relaxamento provocado em vasos à contratatura induzida pela fenilefrina. Assim, o L785 e L786 por terem sido os mais potentes em provocar relaxamento vascular, o L789 pelo efeito inotrópico positivo cardíaco e o L790

5 pelo fato de ser o análogo inerte tanto no coração quanto no vaso. A inibição da contratura provocada pelo L790 foi insignificante até 100 μM , porém, esta foi reduzida para $74,9 \pm 8,8\%$ ($P < 0,05$ em relação ao controle) na concentração de 200 μM . Os análogos L789 e L786 reduziram a contratura pelo KCl para $61,9 \pm 3,0\%$ ($P < 0,05$ em relação ao controle) e $51,1 \pm 2,8\%$ ($P < 0,05$ em relação ao controle) do controle, respectivamente. O L785 foi novamente o análogo mais eficaz, reduzindo a amplitude da contratura para $8,1 \pm 3,8\%$ do controle ($P < 0,05$), conforme é mostrado na Figura 6.

10 Como apresentado na Tabela 6, a CI_{50} com L785 foi de $34,1 \pm 6,3 \mu\text{M}$ enquanto que com o L786 foi de $127,1 \pm 13,7 \mu\text{M}$. Devido a baixa potência a CI_{50} do L789 e L790 não pode ser determinada.

15 Tabela 6. CI_{50} dos análogos do L294 na contratura induzida pelo KCl (40 mM) em anéis de aorta com a preservação do endotélio. A CI_{50} foi determinada para cada experimento e os dados da tabela representam a média \pm EPM de 6 experimentos. ND indica situações em que a CI_{50} não pode ser determinada em função da reduzida potência do análogo em inibir a contratura induzida pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .

Inibição da Contratura Induzida pelo KCl – Com Endotélio	
Análogos do L294	CI_{50} (μM) Média \pm EPM
L785	$34,1 \pm 6,3$
L786	$127,1 \pm 13,7$
L789	ND
L790	ND

20 Efeitos na contratura induzida pela fenilefrina em preparação sem endotélio

A importância da presença do endotélio vascular na ação vasodilatadora dos análogos do L294 foi avaliada em experimentos em que estas células foram mecanicamente removidas. No registro da Figura 7, ficou demonstrada a ausência do endotélio vascular em função do não relaxamento do vaso na presença de Ach. Também ficaram evidenciadas a reprodutibilidade das contraturas à fenilefrina mesmo após a lavagem da preparação e a ausência de efeito relaxante do L790. Quando os resultados dos experimentos sem

endotélio foram analisados no conjunto, confirmou-se a ausência de efeito do L790. Da mesma forma as modificações estruturais do L791 não resultaram em atividade vasodilatadora nesta preparação (Figura 8). O relaxamento máximo provocado pelos análogos L787 e L789 foi inferior a 50% do controle e os demais análogos provocaram relaxamento na seguinte ordem decrescente de eficácia: L785>L788>L786. Chamou mais uma vez a atenção a grande eficiência dos análogos L785 e L788. Com o L785 o relaxamento foi praticamente total com 100 µM da substância.

A potência entre os análogos do L294 obedeceram à mesma ordem da eficácia. Como apresentado na Tabela 7 abaixo, a CI_{50} do L785 se destacou por ser muito inferior das demais substâncias. No grupo intermediário estão o L788 e o L786 e daqueles que provocaram efeitos, os menos potentes foram o L789 e o L787. Os análogos L791 e L790 foram desprovidos de ação vasodilatadora (Tabela 7).

Tabela 7. CI_{50} dos análogos do L294 na contratura induzida pela fenilefrina (10 µM) em anéis de aorta sem a preservação do endotélio. A CI_{50} foi determinada para cada experimento e os dados da tabela representam a média ± EPM de 6 experimentos. ND indica situações em que a CI_{50} não pode ser determinada em função da reduzida potência do análogo em inibir a contratura induzida pela fenilefrina.

Inibição da Contratura Induzida pela Fenilefrina – Sem Endotélio	
Análogos do L294	CI_{50} (µM) Média ± EPM
L785	18.5 ± 3.6
L788	65.7 ± 8.0
L786	86.2 ± 7.1
L789	196.1 ± 39.7
L787	273.4 ± 22.0
L791	ND
L790	ND

Efeitos na contratura induzida pelo KCl em preparação sem endotélio

Os análogos do L294 também revertem à contratura pelo K^+ em preparação sem endotélio. Não houve diferença na eficácia entre o L786 e

L790 que constituíram um grupo intermediário (Figura 9). O análogo de menor eficácia foi o L789 e o L785 o de maior. Diferente do que foi demonstrado para a contração pela fenilefrina, o L785 não foi capaz de reverter completamente a contração pelo K^+ mesmo na concentração mais elevada (200 μ M), nesta
5 preparação.

A Tabela 8 apresenta a CI_{50} comparativa entre os análogos do L294 na contração induzida pelo K^+ na preparação de aorta sem endotélio. Pode-se observar que L785 foi o análogo mais potente ($CI_{50} = 40,5 \pm 9,5 \mu$ M) seguido de L790 ($123,0 \pm 17,3 \mu$ M) e L786 ($151,4 \pm 7,6 \mu$ M). O L789 foi aquele de menor
10 potência ($CI_{50} = 394,0 \pm 25,4 \mu$ M).

Tabela 8. CI_{50} dos análogos do L294 na contração induzida pelo KCl (40 mM) em anéis de aorta sem a preservação do endotélio. A CI_{50} foi determinada para cada experimento e os
15 dados da tabela representam a média \pm EPM de 6 experimentos. ND indica situação em que a CI_{50} não pode ser determinada em função da reduzida potência do análogo em inibir a contração induzida pelo aumento de KCl extracelular.

Inibição da Contração Induzida pelo KCl – Sem Endotélio	
Análogos do L294	CI_{50} (μ M) Média \pm EPM
L785	40.5 ± 9.5
L786	151.4 ± 7.6
L789	394.0 ± 25.4
L790	ND

20 *Corpo Cavernoso*

Os derivados do L294 que se mostraram mais potentes em provocar relaxamento da musculatura lisa vascular tais como o L785, L786 e L788, e um outro derivado incapaz de relaxar a musculatura lisa vascular, L790 foram inicialmente avaliados na resposta contrátil da musculatura lisa do corpo
25 cavernoso do cobaio. A Figura 10 mostra registro típico da contração induzida pela fenilefrina (30 μ M) no corpo cavernoso de cobaio seguida de exposição de

concentrações crescentes e cumulativas do L788 até 200 μM . Note que ocorreu inibição concentração dependente da resposta contrátil do corpo cavernoso pelo L788.

5 O mesmo protocolo experimental foi repetido para os demais derivados em teste e para o solvente isoladamente (Figura 11). Verificou-se que somente o L788 promoveu um relaxamento significativo, onde a amplitude da contratura na concentração de 200 μM foi de $46,5 \pm 8,8$ % do controle. Enquanto que os outros derivados não provocaram efeitos significativos na amplitude da resposta contrátil do corpo cavernoso. O efeito do solvente (DMSO) foi testado
10 nos volumes correspondentes aos usados para os derivados e não foi capaz de alterar significativamente a contratilidade deste tecido.

Traquéia

15 A preparação de anéis de traquéia é utilizada para a observação de provável ação destes potentes vasodilatadores em outros tecidos de musculatura lisa. Na Figura 12 está representado o registro típico da contratura de anéis de traquéia induzida pela acetilcolina (Ach, 10 μM) seguida da exposição de concentrações crescentes cumulativas do derivado L785 até atingir 200 μM . Pode-se observar uma redução dose-dependente da amplitude
20 da contratura induzida pela Ach.

O mesmo protocolo foi utilizado para o derivado L786 e o solvente (Figura 13). Observa-se que o L785 promoveu efeito de relaxamento muscular significativo de forma dose-dependente. Na concentração de 200 μM , L786 reduziu a amplitude da contratura para $25,3 \pm 12,1$ % do controle. O mesmo não
25 foi observado com L786. Vale ressaltar que o solvente usado (DMSO) não apresentou efeito de relaxamento, pelo contrário provocou um leve aumento da amplitude da contratura ($127,5 \pm 0,9$ % do controle) no volume correspondente a concentração de 200 μM dos derivados.

30 *Músculo Esquelético*

Protocolo Experimental

Camundongos machos pesando entre 22-28g eram sacrificados por deslocamento cervical, e os músculos *extensor digitorum longus* (EDL) e *soleus* (SOL) eram dissecados em solução Ringer-Krebs, cuja composição se encontra na Tabela 9, à temperatura ambiente. Os músculos eram colocados em cubas verticais com capacidade de 10 ml e fixados pelas extremidades a haste de fixação do eletrodo de estimulação e a um transdutor de força (Grass FT03) para registro de abalos musculares. A solução da cuba foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O₂ / 5% CO₂) e mantida a temperatura de 37 °C. Os músculos eram estimulados eletricamente por meio de um estimulador (Grass S88) a uma frequência de 0,2 Hz, à 37°C. Após a estabilização dos abalos musculares (\pm 30min) foi feito registro controle na ausência da droga, e posteriormente concentrações crescentes (de 10 μ M a 200 μ M) dos derivados do L294, diluídos em DMSO, eram adicionadas a cada dez minutos. A reversibilidade da preparação foi verificada ao término do experimento por meio da lavagem com solução nutritora. Os sinais captados pelo transdutor eram amplificados (Cyberamp) e a tensão isométrica digitalizada (Digidata 1322A) sendo armazenada em computador. A visualização e a análise do experimento eram feitas utilizando-se o programa axoscope 8.0. (Zapata-Sudo, 2003).

20

Tabela 9. Composição da solução Ringer-Krebs em mM. pH ajustado para 7,4 com KOH 5M.

Compostos	Concentração (mM)
NaCl	135,0
KCl	5,0
MgCl ₂	1,0
CaCl ₂	2,0
NaHCO ₃	15,0
Na ₂ HPO ₄	1,0
Dextrose	11,0

Resultados

Medida da amplitude de abalos induzidos eletricamente foi escolhida para avaliar os efeitos dos análogos do L294 no inotropismo de músculos

25

esqueléticos. Músculo constituído de fibras rápidas (*extensor digitorum longus*-EDL) e outro de fibras lentas (*soleus*-SOL) de camundongos foram escolhidos para este propósito. Experimentos típicos, em duas velocidades de registro, realizados nos músculos SOL e EDL estão apresentados na Figura 14.

5 Diferenças no curso temporal dos abalos entre os músculos rápido e lento é mostrada na velocidade de registro mais rápida. A administração de 50 μ M de L786 provocou nitidamente redução da amplitude e aumento da duração dos abalos musculares tanto no músculo EDL quanto no SOL. A lavagem da
10 preparação com solução de Krebs, provocou reversão parcial dos efeitos induzidos pelo L786.

O mesmo protocolo foi repetido para os demais análogos e os resultados estão apresentados nas figura 19 e 20. Foi observada distinção de efeito dos derivados entre os músculos. O L786 mostrou-se mais eficaz na redução da amplitude do abalo de músculo EDL ($28,7 \pm 9,9\%$ do controle) do que de
15 músculo SOL ($61,9 \pm 5,5\%$ do controle). Já o L785 apresentou eficácia equivalente, reduzindo a contração dos músculos EDL e SOL para $31,6 \pm 4,7\%$ e $28,4 \pm 6,6\%$ do controle, respectivamente, ressaltando que este foi o derivado de maior eficácia no músculo SOL. Neste último, os derivados L787 e L788 destacaram-se por reduzir a amplitude para $47,6 \pm 4,2\%$ e $45,1 \pm 5,1\%$ do
20 controle, respectivamente, enquanto que os demais derivados, L789, L790 e L791, promoveram reduções menores que 50%, ou seja, $59,4 \pm 3,4\%$, $71,3 \pm 5,2\%$ e $69,3 \pm 4,8\%$ do controle, respectivamente.

Em músculo EDL, estes três últimos derivados causaram maiores reduções, $38,9 \pm 4,8\%$, $52,2 \pm 3,4\%$ e $45,8 \pm 6,9\%$, respectivamente, e os
25 derivados L787 e L788 reduziram a amplitude para $37,8 \pm 3,5\%$ e $47,6 \pm 5,4\%$ do controle, respectivamente. Porém, este efeito no EDL pode ser atribuído em parte ao solvente, fato este não observado no SOL.

A inibição dos abalos dos músculos esqueléticos, provocada pelos análogos do L294, não pôde ser totalmente revertida pela lavagem. Como
30 apresentada na Tabela 10, a maioria dos análogos provocou efeitos

irreversíveis 30 minutos após a lavagem. Alguns análogos como o L791 no EDL e L787 no SOL tiveram seus efeitos parcialmente revertidos.

5 Tabela 10. Reversão dos efeitos dos análogos do L294 na amplitude de abalos musculares de músculo esquelético.

Derivados	EDL		SOL	
	200 μ M (% do controle)	30 min - Lavagem (% do Controle)	200 μ M (% do controle)	30 min - Lavagem (% do Controle)
L785	31,6 \pm 4,7	36,4 \pm 4,5	28,4 \pm 6,6	37,9 \pm 9,6
L786	28,7 \pm 9,9	ND	61,9 \pm 5,5	77,0 \pm 10,3
L787	37,8 \pm 3,5	38,6 \pm 2,5	47,6 \pm 4,2	76,0 \pm 4,6
L788	47,6 \pm 5,4	26,8 \pm 2,3	45,1 \pm 5,1	37,8 \pm 4,7
L789	38,9 \pm 4,8	42,2 \pm 6,4	59,4 \pm 3,4	60,6 \pm 5,5
L790	52,2 \pm 3,8	49,2 \pm 5,1	71,3 \pm 5,2	70,8 \pm 7,7
L791	45,9 \pm 6,9	71,5 \pm 19,0	69,3 \pm 4,8	74,4 \pm 13,8

Os compostos da invenção podem ser administrados em uma variedade de formas de dosagem, por exemplo, oralmente, na forma de tabletes, cápsulas, açúcar ou tabletes cobertos de filme, soluções líquidas ou 10 suspensões; via retal na forma de supositórios; parenteralmente, isto é via intramuscular, ou por infusão ou injeção intravenosa e/ou intratecal e/ou intraespinal.

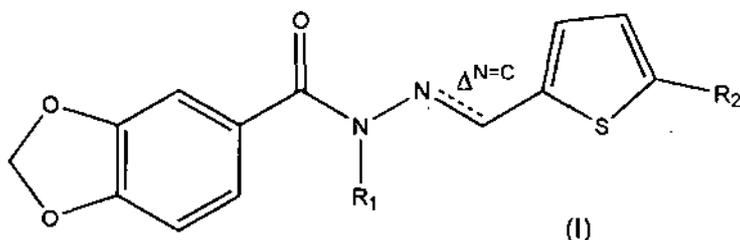
A presente invenção também inclui composições farmacêuticas compreendendo compostos da Fórmula (I), ou sais farmacêuticamente 15 aceitáveis dos mesmos, em associações com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

As composições farmacêuticas contendo os compostos da invenção são normalmente preparadas seguindo métodos convencionais e são administrados em forma farmacêutica apropriada.

Reivindicações

RELAXANTES MUSCULARES SELETIVOS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

- 5 1. Substância caracterizada por possuir estrutura de acordo com a fórmula geral (I):



onde:

- R1 pode ser H, alquil C1-C6, alquenil C1-C6 ou arilalquil, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

$\Delta^{N=C}$ se refere à ligação entre o nitrogênio e o carbono, ligação esta que pode ser simples ou dupla, desde que quando a ligação for simples, o nitrogênio faça mais uma ligação simples com um hidrogênio;

- R2 pode ser H, alquil C1-C6, halogênio, NO₂, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados; e seus sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis.

2. Substância, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser escolhida do grupo que compreende:

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-metil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-benzil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-metil-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-N-alil-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-nitro-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida

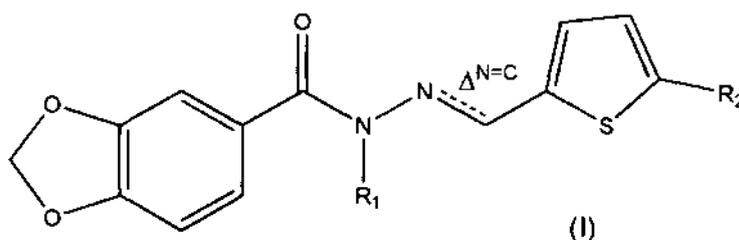
Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-tiofen-2-ilmetil-hidrazida

3. Substância, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizada por ser capaz de provocar relaxamento muscular seletivo.

4. Substância, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo músculo ser escolhido do grupo que compreende músculo liso, músculo cardíaco, músculo esquelético e mistura dos mesmos.

5. Composição farmacêutica caracterizada por compreender:

10 a) uma substância cuja estrutura corresponde a Fórmula geral (I):



onde:

R1 pode ser H, alquil C1-C6, alquenil C1-C6 ou arilalquil, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

15 $\Delta^{N=C}$ se refere à ligação entre o nitrogênio e o carbono, ligação esta que pode ser simples ou dupla, desde que quando a ligação for simples, o nitrogênio faça mais uma ligação simples com um hidrogênio;

R2 pode ser H, alquil C1-C6, halogênio, NO₂, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

20 e seus sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis;

b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela substância ser escolhida do grupo que compreende:

25 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-metil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-benzil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-metil-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-N-alil-hidrazida

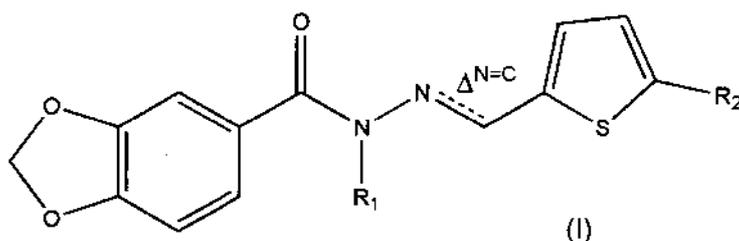
5 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-nitro-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-tiofen-2-ilmetil-hidrazida

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por provocar relaxamento muscular seletivo.

10 8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo músculo ser escolhido do grupo que compreende músculo liso, músculo cardíaco, músculo esquelético e mistura dos mesmos.

9. Uso de uma substância caracterizada por possuir estrutura de acordo com a fórmula geral (I):



15

onde:

R1 pode ser H, alquil C1-C6, alquenil C1-C6 ou arilalquil, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

20 $\Delta^{N=C}$ se refere à ligação entre o nitrogênio e o carbono, ligação esta que pode ser simples ou dupla, desde que quando a ligação for simples, o nitrogênio faça mais uma ligação simples com um hidrogênio;

R2 pode ser H, alquil C1-C6, halogênio, NO₂, sendo que tais radicais podem ser opcionalmente substituídos, insaturados e/ou ramificados;

e seus sais, derivados e/ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis;

25 na preparação de um medicamento destinado ao tratamento de doenças associadas ao tecido muscular.

10. Uso de uma substância, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por ser escolhida do grupo que compreende:

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-metil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida

5 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N-benzil-N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-metil-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida

10 Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-[1-tiofen-2-il-met-(E)-ilidene]-N-alil-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, [1-(5-nitro-tiofen-2-il)-met-(E)-ilidene]-hidrazida

Ácido 1,3-Benzodioxola-5-carboxílico, N'-tiofen-2-ilmetil-hidrazida

15 11. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela doença associada ao tecido muscular ser escolhida do grupo que compreende insuficiência coronariana, espasmos do músculo liso vascular sistêmico, dificuldades de ereção, espasmos de músculos esqueléticos e espasmos da musculatura lisa respiratória.

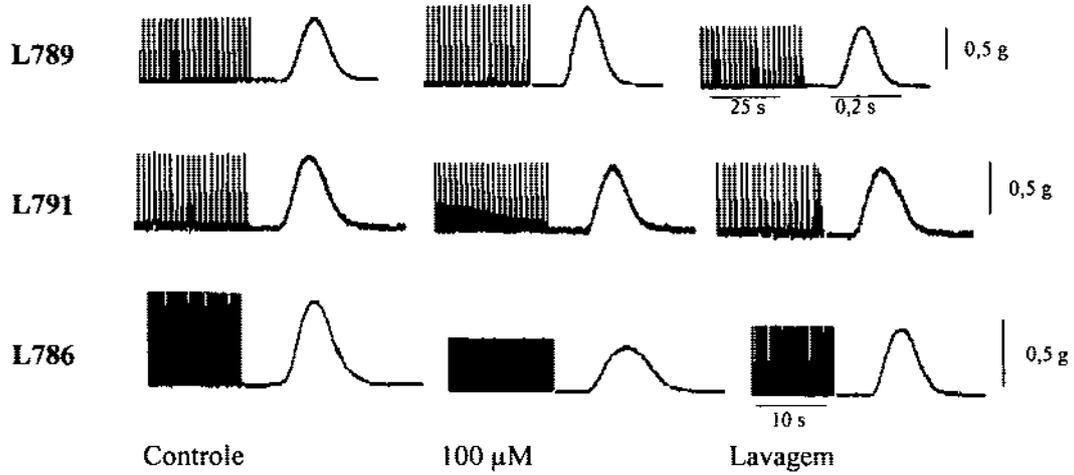


FIGURA 1

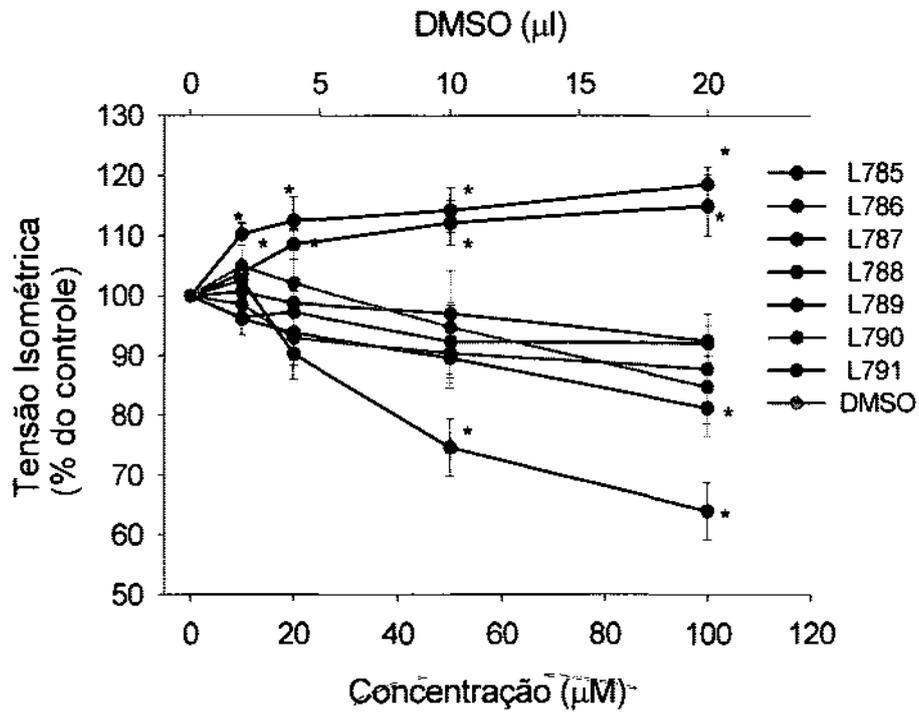


FIGURA 2

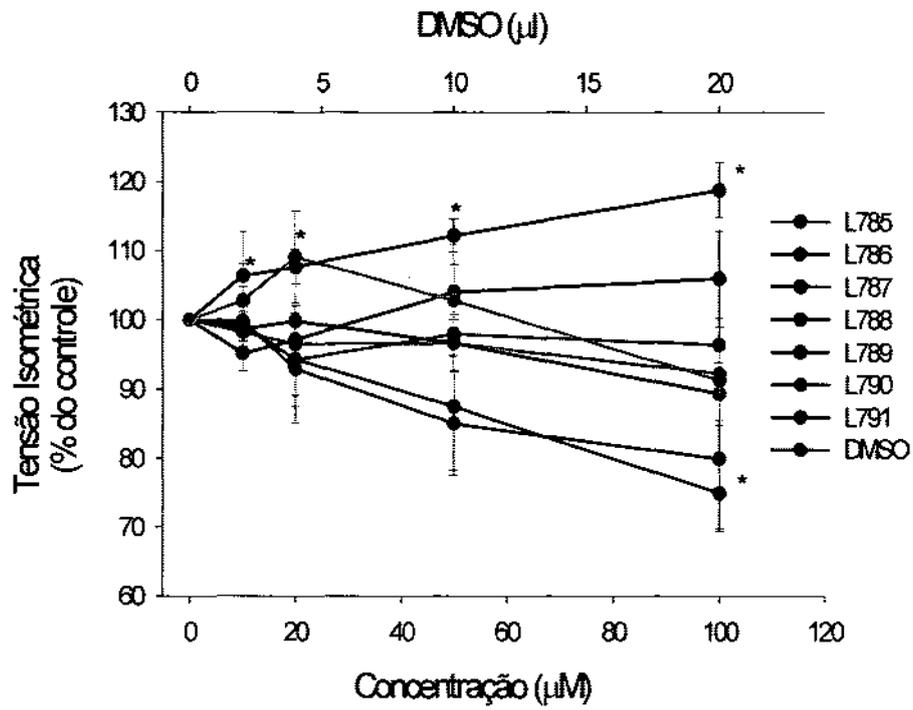


FIGURA 3

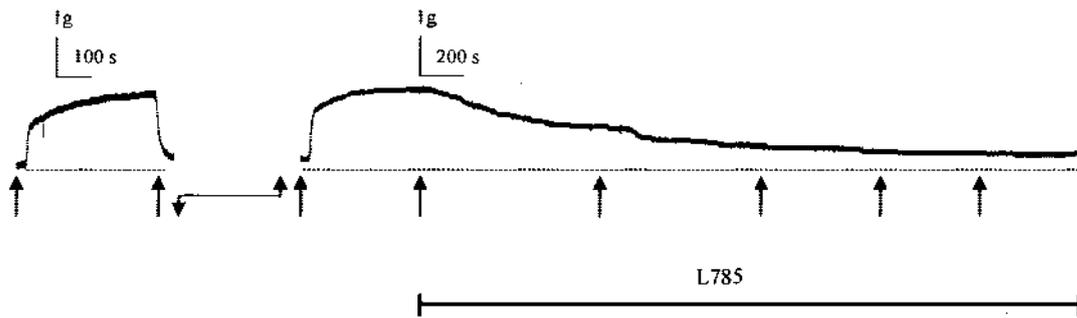


FIGURA 4

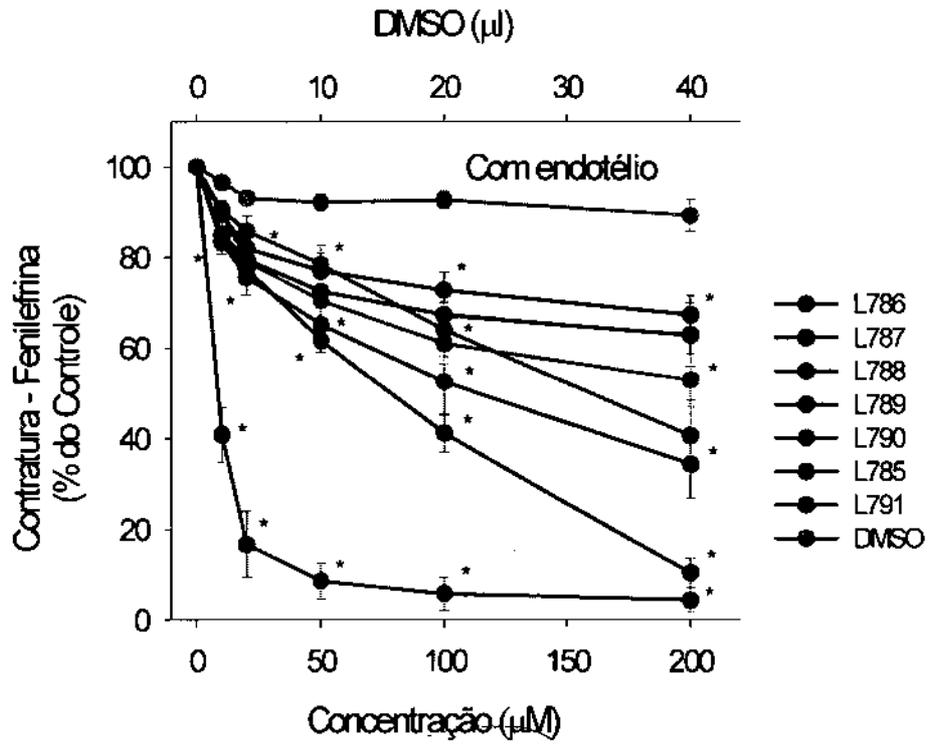


FIGURA 5

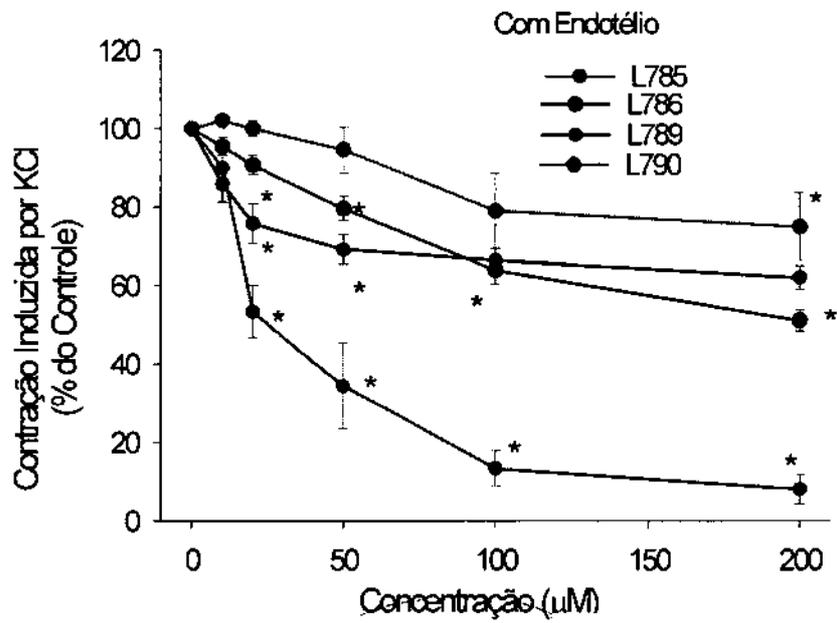


FIGURA 6

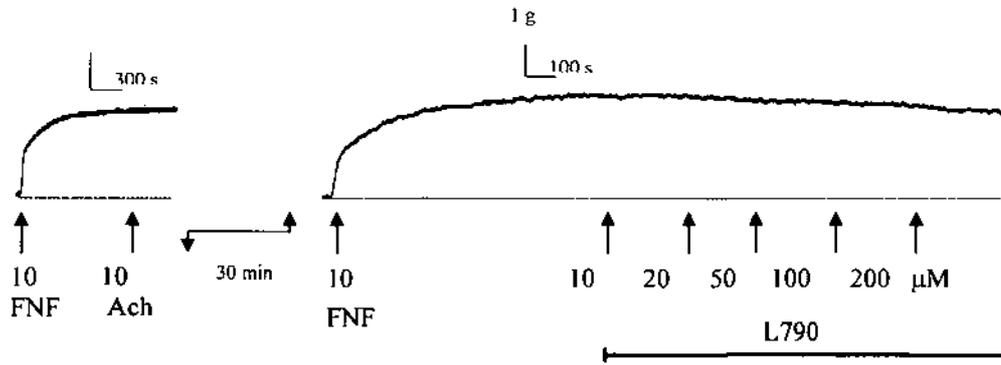


FIGURA 7

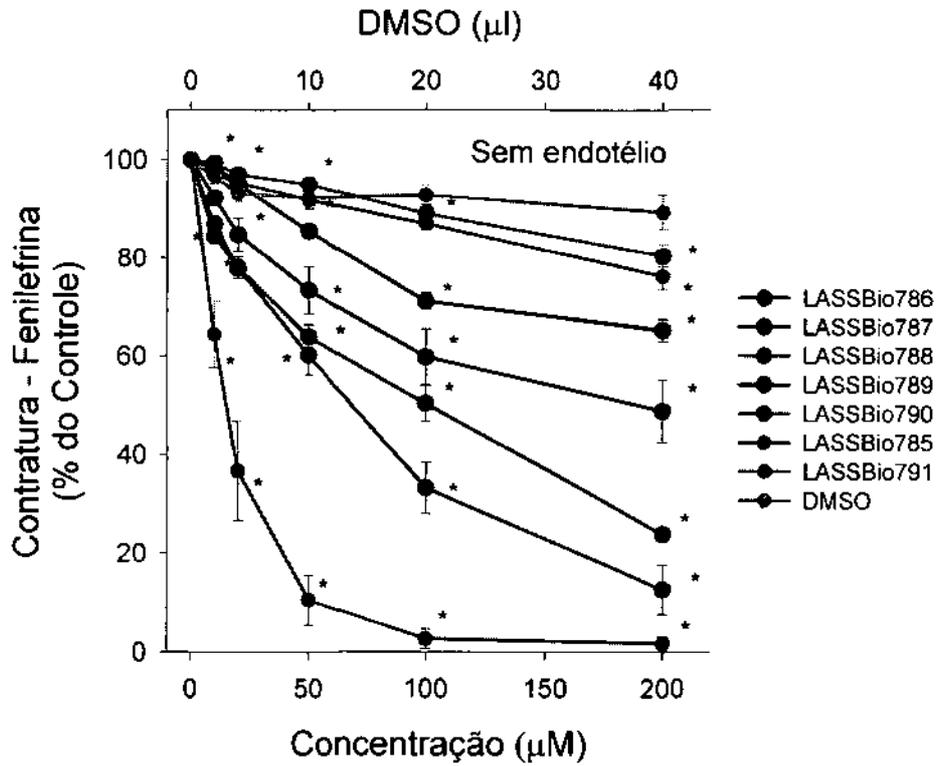


FIGURA 8

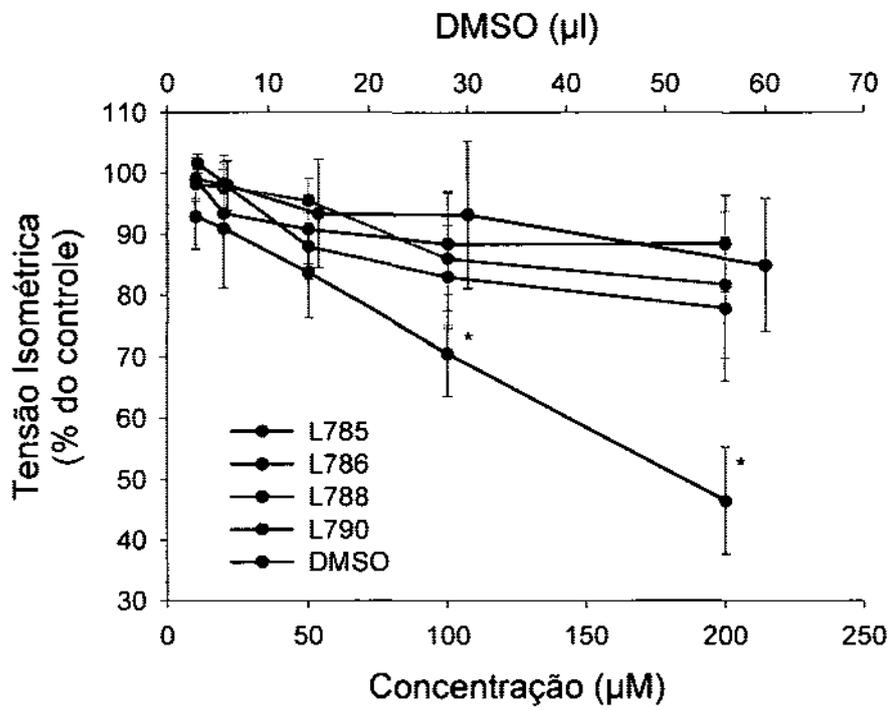


FIGURA 11

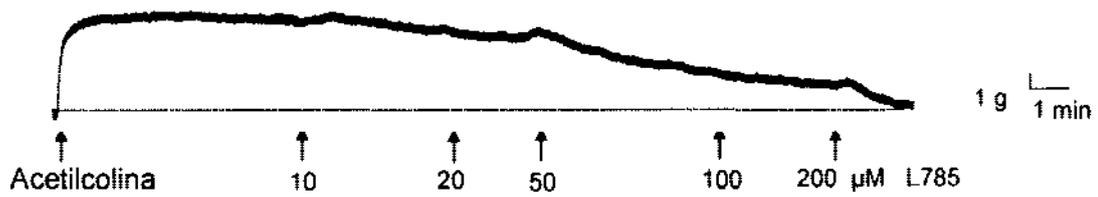


FIGURA 12

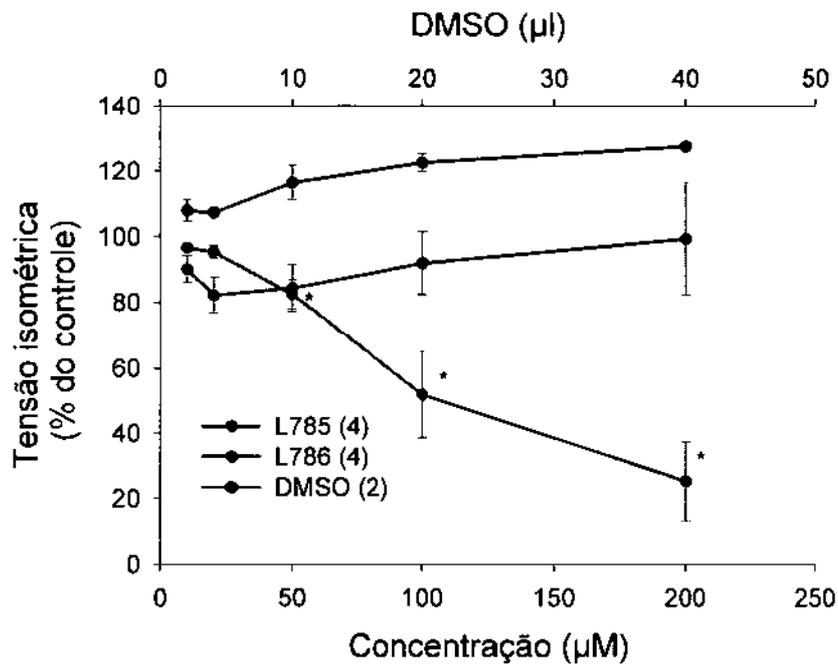


FIGURA 13

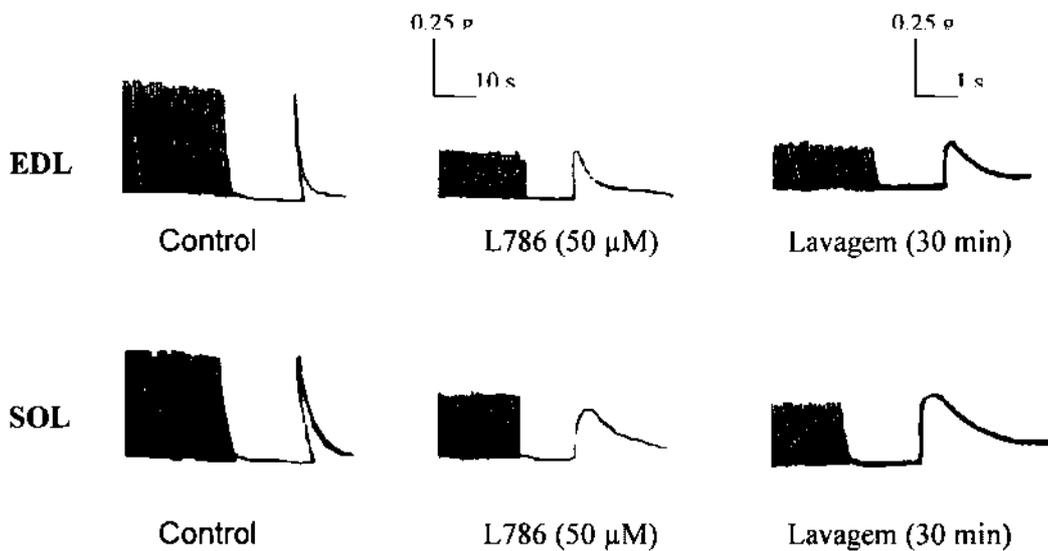


FIGURA 14

Resumo**RELAXANTES MUSCULARES SELETIVOS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**

- 5 A presente invenção se refere a substâncias capazes de promover relaxamento muscular seletivo, a composições farmacêuticas contendo tais compostos e seu uso no tratamento de doenças associadas ao tecido muscular, sendo que tais compostos obedecem à fórmula geral (I):

