



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

(21) BR 10 2012 000187-0 A2



\* B R 1 0 2 0 1 2 0 0 0 1 8 7 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 05/01/2012

(43) Data da Publicação: 07/04/2015  
(RPI 2309)

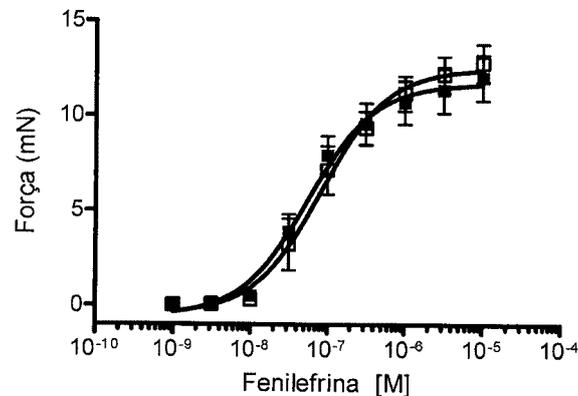
(54) **Título:** DERIVADOS N-FENILPIPERAZÍNICOS ANTAGONISTAS DE ADRENOCEPTORES  $\alpha_1A$ ,  $\alpha_1D$  E DE RECEPTORES 5-HT $1A$  NO TRATAMENTO DA HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS

(51) **Int.Cl.:** C07D241/04; A61K31/497; A61P13/08; A61P13/02

(73) **Titular(es):** Universidade Federal do Rio de Janeiro, União Brasileira de Educação e Cultura - UBEC, União Brasileira de Educação e Cultura - UBEC

(72) **Inventor(es):** Claudia Lucia Martins da Silva, Fernanda Chagas da Silva, François Germain Noël, Jessica Barbosa do Nascimento Viana, Laís Flávia Nunes Lemes, Luana Chaves Barberato, Luciana de Camargo Nascente, Luis Antônio Soares Romeiro, Renata Oliveira Silva

(57) **Resumo:** Derivados N-fenilpiperazínicos antagonistas de adrenoceptores  $\alpha_1A$ ,  $\alpha_1D$  e de receptores 5-HT $1A$  no tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna, Composições Farmacêuticas contendo os Mesmos. A presente invenção proporciona derivados N-fenilpiperazínicos como ligantes e/ou antagonistas múltiplos de adrenoceptores  $\alpha_1A$ , adrenoceptores  $\alpha_1D$  e receptores serotoninérgicos 5-HT $1A$ . Tais substâncias são candidatas a protótipos para tratamento da hiperplasia prostática benigna e sintomas do trato urinário inferior, sendo úteis em composições farmacêuticas.



### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

Derivados *N*-fenilpiperazínicos antagonistas de adrenoceptores  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1D$  e de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna, Composições Farmacêuticas contendo os Mesmos.

5

#### **Campo da Invenção**

A presente invenção é do campo técnico de produtos e processos farmacêuticos. Mais especificamente, a presente invenção proporciona derivados *N*-fenilpiperazínicos como ligantes e/ou antagonistas múltiplos de adrenoceptores  $\alpha 1A$ , adrenoceptores  $\alpha 1D$  e receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>. Tais substâncias são candidatos a protótipos para tratamento da hiperplasia prostática benigna e sintomas do trato urinário inferior, sendo úteis em composições farmacêuticas.

10

#### **Antecedentes da Invenção**

15

*Receptores acoplados à proteína G (GPCR)*

Os receptores acoplados à proteína G heterotrimérica possuem sete domínios transmembranares e são também denominados “receptores acoplados à proteína G” (GPCR) (OLDHAM & HAMM, Nature 9:60-71, 2008).

20

Segundo a *International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR)* - Receptor Database, em humanos, esses receptores são distribuídos em classes, incluindo a família Rodopsina (R) (FREDRIKSSON e cols. Mol. Pharmacol. 63:1256-1272, 2003).

25

De acordo com OVERINGTON e colaboradores (Nat. Rev. Drug Discov. 5 (12):993-996, 2006), os fármacos utilizados clinicamente que possuem como alvo farmacológico esta família de GPCR correspondem a aproximadamente 1/4 do mercado farmacêutico mundial. Isso se justifica devido ao principal papel desses receptores, que é o de reconhecer uma diversidade de ligantes extracelulares endógenos e exógenos como hormônios, proteínas, lipídeos, neurotransmissores, entre outros (BJARNADÓTTIR e cols., Genomics 88:263-273, 2006; OLDHAM & HAMM, Nature 30 9:60-71, 2008), o que os envolve em diversos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos. Como exemplo, a ativação de GPCR no sistema urogenital masculino

regula desde a contração muscular até a proliferação e diferenciação celular (AVELLAR e cols., An. Acad. Bras. Cienc. 81(3):321-344, 2009). Os ligantes que agem nestes receptores mostram um notável grau de diversidade estrutural (WESS, Pharmacol. Ther. 80(3):231-264, 1998).

5 GPCR's da família *R* apresentam uma grande similaridade na sequência de aminoácidos em regiões específicas destes receptores, particularmente na região transmembranar hidrofóbica de reconhecimento do ligante. Isto pode ser verificado, por exemplo, em adrenoceptores  $\alpha 1A$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, os quais apresentam resíduo Asp na região TM3 comprometido com a interação com grupo nitrogenado protonado do ligante, e resíduos Ser e Tyr na região TM5 importantes no reconhecimento do  
10 ligante via ligação de hidrogênio. Considerando estes dois receptores, estas regiões de reconhecimento de ligantes apresentam homologia de 45% entre si (revisto em OLDHAM & HAMM, Nature 9:60-71, 2008). Além disso, verifica-se uma relação estrutural entre os ligantes desses receptores que correspondem a moléculas com grupos  
15 nitrogenados protonáveis contendo ainda uma região aromática (FREDRIKSSON e cols. Mol. Pharmacol. 63:1256-1272, 2003).

#### *Adrenoceptores*

Em humanos, os adrenoceptores  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$  e  $\alpha 1D$  são codificados por genes distintos (HIEBLE e cols. Pharmacol. Rev. 45:267-270, 1995; MICHEL e cols., Naunyn  
20 Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 352(1):1-10, 1995), cuja principal característica estrutural consiste no alto grau de similaridade na sequência de aminoácidos, exibindo similaridade em torno de 65-73% em seus domínios (LANGER, Eur. J. Urol. 36: 2-6, 1999; VARMA & DENG, Can. J. Physiol. Pharmacol. 78:267-292, 2000; ZHONG & MINNEMAN, Eur. J. Pharmacol. 375:261-276, 1999; HUH e cols., Genes Genet. Syst.  
25 85(1):65-73, 2010). Os três subtipos apresentam ampla distribuição tecidual, podendo haver predominância de um determinado subtipo como mostrou o estudo de RNAm de tecidos de ratos realizados por SCOFIELD e colaboradores (J. Pharmacol. Exp. Ther. 275: 1035-1042, 1995). Neste estudo podemos observar a predominância do subtipo  $\alpha 1A$  na próstata e bexiga,  $\alpha 1B$  no fígado, e  $\alpha 1D$  na aorta de rato.

30 No sistema nervoso autônomo, os adrenoceptores  $\alpha 1$  são responsáveis pela modulação da contração da musculatura lisa não vascular e também vascular, e por isso

apresentam grande importância no controle do tônus vascular e conseqüentemente no controle da pressão arterial (HIEBLE, *Pharm. Acta. Helv.* 74(2-3):163-171, 2000; MICHELOTTI e cols., *Pharmacol. Ther.* 88:281-309, 2000).

5 Cabe ressaltar suas ações no sistema urogenital masculino. Diversos estudos têm caracterizado a presença desses receptores no trato urinário inferior, particularmente no tecido prostático humano e no músculo detrusor da bexiga (FORRAY e cols., *Mol. Pharmacol.* 45(4):703-708, 1994; HATANO e cols., *Br. J. Pharmacol.* 113(3):723-728, 1994; MARSHALL e cols., *Br. J. Pharmacol.* 115(5):781-786, 1995; HIEBLE & RUFFOLO, *Expert Opin Investig Drugs.* 6(4):367-387, 1997; MALLOY e cols., *J. Urol. Sep*;160(3 Pt 1):937-943, 1998; MURAMATSU e cols., *Br. J. Urol.* 74(5):572-578, 1994; HIEBLE e cols., *Pharmacol. Rev.* 45:267-270, 1995; MICHELOTTI e cols., *Pharmacol. Ther.* 88:281-309, 2000). Neste sistema os adrenoceptores  $\alpha 1$  estão envolvidos na contração da base da bexiga, principalmente via adrenoceptores  $\alpha 1A$  e adrenoceptores  $\alpha 1D$ , respectivamente (CHEN e cols., *J. Urol.* 174:370-374, 2005).

15 Antagonistas de adrenoceptores  $\alpha 1$  têm sido amplamente utilizados para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB), condição clínica que afeta uma proporção crescente da população masculina, causando obstrução do fluxo urinário devido ao aumento do tamanho da próstata (MCNEAL, *Urol. Clin. North Am.*, 17, 477-486, 1990). A prevalência da HPB aumenta com o envelhecimento, assim sendo, ela salta de aproximadamente 50% dos homens em torno de 60 anos de idade, atingindo 80% da população masculina aos 80 anos (COCKETT e cols., *Prog. Urol.* 1(6):957-72, 1991).

Foi verificado que o subtipo adrenoceptores  $\alpha 1A$  é predominante na próstata humana, em nível de RNAm (PRICE e cols., *Mol. Pharmacol.* 46:221-226, 1994; TSENG-CRANK e cols., *Br. J. Pharmacol.* 115:1475-1485, 1995), e de proteína (LEPOR e cols., *J. Urol.* 149:640-642, 1993; MICHEL e cols., *J. Auton. Pharmacol.* 16:21-28, 1996). Estudos recentes mostram que o subtipo  $\alpha 1D$  também está presente na próstata, numa extensão significativa (KOJIMA e cols., *Prostate* 66:761-767, 2006). Assim, o uso de fármacos com perfil de afinidade maior para adrenoceptores  $\alpha 1A$  e adrenoceptores  $\alpha 1D$  podem ser eficazes no tratamento da HPB e mais toleráveis que

antagonistas adrenoceptores  $\alpha 1$  não seletivos (CHAPPLE, Br. J. Urol. 76(1):47-56, 1995), uma vez que se evita efeitos adversos.

#### *Ligantes de adrenoceptores $\alpha 1$*

Muitas classes químicas apresentam a capacidade de serem reconhecidos pelos adrenoceptores  $\alpha 1$ . Dentre os fármacos com alta afinidade pelos três subtipos de receptores  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$  e  $\alpha 1D$ , temos o antagonista prazosina (SHIBATA e cols., Mol. Pharmacol., 48:250-258, 1995), derivado quinazolínico utilizada no tratamento de hipertensão arterial.

Outra classe química importante inclui derivados fenilpiperazínicos como o BMY 7378, antagonista do adrenoceptores  $\alpha 1D$  com afinidade na faixa nanomolar e utilizado como ferramenta farmacológica (GOETZ e cols., Eur. J. Pharmacol. 272(2-3): R5-6, 1995). Além disso, o BMY 7378 é um agonista parcial do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> (CHAPUT & MONTIGNI, J. Pharmacol. Exp. Ther. 246(1):359-370, 1988).

#### *Receptores serotoninérgicos (5-HT)*

Em mamíferos, são conhecidas sete famílias de receptores 5-HT (5-HT<sub>1-7</sub>), perfazendo um total de 14 subtipos de receptores 5-HT estruturalmente e farmacologicamente distintos ((HOYER e cols., Pharmacol. Rev. 46:157-203, 1994; HOYER & MARTIN, Neuropharmacology. 36:419-428, 1997; SAXENA e cols., Trends Pharmacol. Sci. 19:311-316, 1998; VILLALÓN e cols., Drug Discov. Today 2:294-300, 1997; VILLALÓN & CENTURIÓN, Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 376(1-2):45-63, 2007). Considerando a estrutura primária, os receptores 5-HT metabotrópicos apresentam alto grau de similaridade aos receptores adrenérgicos e dopaminérgicos (FREDRIKSSON e cols., Mol. Pharmacol. 63:1256-1272, 2003).

Os subtipos metabotrópicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, apresentam maior similaridade com receptores adrenoceptores  $\alpha 1$ , em cerca de 45% (TRUMPP-KALLMEYER e cols. J. Med. Chem. 35(19):3448-3462, 1992), e homologia moderada (35%) entre si (BARNES & SHARP Neuropharmacology 38:1083-1152, 1999).

#### *Receptores 5-HT<sub>1A</sub>*

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> foi um dos primeiros receptores desta família a ter o gene clonado (KOBILKA e cols. Nature 329:75-79, 1987; FARGIN e cols. Nature

335(6188):358-360, 1988). Estudos de RNAm de receptores 5-HT<sub>1A</sub> mostram sua expressão no cérebro, onde estão presentes em alta densidade no córtex cerebral. Contudo, também são encontrados fora do SNC, como por exemplo, no baço, rim (no período neonatal), intestino (PUCADYIL & CHATTOPADHYAY, Progr. Lipid Res. 45:295-333, 2006), e próstata (ABDUL e cols. Anticancer Res. 14(3A):1215-1220, 1994; DIZEYI e cols. Prostate 59(3):328-336, 2004).

Sabe-se que células neuroendócrinas prostáticas sintetizam, armazenam e liberam fatores de crescimento, incluindo neuropeptídeos e 5-HT (ABRAHAMSSON e cols., 1986), havendo receptores específicos para a 5-HT nestes tecidos (HOOSEIN e cols., 1993). Desta forma, o potencial uso de antagonistas 5-HT<sub>1A</sub> tem recebido destaque para o tratamento da HPB, uma vez que apresentam efeito anti-proliferativo em células tumorais de próstata, sendo úteis no controle do crescimento de tumores independentes de androgênio (ABDUL e cols. Anticancer Res. 14(3A):1215-1220, 1994; DIZEYI e cols. Prostate 59(3):328-336, 2004). As estruturas químicas representadas abaixo são exemplos de algumas das classes químicas que apresentam afinidade por receptores 5-HT<sub>1A</sub> (*estruturas retiradas de IUPHAR Receptor Database*):

#### *Modelo hipotético de reconhecimento molecular*

A determinação da estrutura cristalográfica dos GPCR em geral é dificultada devido à difícil reprodução, em modelos de cristalização, da conformação natural destes receptores que apresentam sete domínios transmembranares. Por exemplo, apenas recentemente foi obtida a primeira cristalografia de um GPCR, no caso o adrenoceptor  $\beta_2$  humano, e posteriormente do receptor de adenosina A<sub>2a</sub> (revisto em TATE e SCHERTLER, Curr. Opin. Struct. Biol. 19(4):386-395, 2009; KOBILKA e SCHERTLER, Trends Pharmacol. Sci. 29(2):79-83, 2008). Por isso, a construção de modelos preditivos e o estudo de interações com ligantes conhecidos são importantes para se obter novos conhecimentos sobre esses importantes alvos farmacológicos (THIEL, Nat. Biotechnol. 22:513-519, 2004).

Estudos de mutagênese indicaram que o nitrogênio protonado dos ligantes de adrenoceptores  $\alpha$ , como por exemplo derivados fenilpiperazínicos, realizam interações iônicas com um resíduo de aspartato na TM3, sendo o grupo amino na forma de íon

positivo considerado como principal grupo farmacofórico (PEREZ, *Biochem. Pharmacol.* 73(8):1051-1062, 2007). Por outro lado, os anéis aromáticos realizam interações hidrofóbicas e eletrostáticas com resíduos complementares nas TM2, 4, 6 e 7 (WAUGH e cols. *J. Biol. Chem.* 276(27): 25366-25371, 2001). Além destes

5 grupamentos importantes, a presença de um anel aromático contendo grupos aceptores de ligação hidrogênio em posições *meta* e *para* são relevantes na estabilização do complexo receptor-ligante por interagirem com resíduos de Ser na TM5 (LÓPEZ-RODRIGUEZ e cols. *J. Med. Chem.* 40, 2653-2656, 1997; PEREZ. *Biochem. Pharmacol.* 73(8):1051-1062, 2007).

10 Os adrenoceptores  $\alpha 1$  e receptores 5-HT1A apresentam grande similaridade na região transmembranar de reconhecimento do ligante (TRUMPP-KALLMEYER e cols. *J. Med. Chem.* 35(19):3448-3462, 1992). Têm-se evidências de que um importante local para a ligação de antagonistas de adrenoceptores  $\alpha 1A$  e de receptores 5-HT1A é um

15 resíduo Asp na TM3, o qual interage com grupamento amino protonado dos ligantes (LI e cols. *J. Mol. Model.* 14(10):957-966, 2008; LÓPEZ-RODRIGUEZ e cols. *Mol. Pharmacol.* 62(1):15-21, 2002). Diversas estratégias estão disponíveis para o desenho molecular de fármacos. Dentre elas a mais importante é a abordagem fisiológica, que se baseia no mecanismo de ação farmacológico pretendido (KUBINYI. *Pharmazie* 50;647-662, 1995), a qual depende da eleição do alvo-terapêutico, o que por sua vez depende do

20 conhecimento do processo fisiopatológico envolvido. Doenças crônicas podem envolver a alteração da sinalização celular de mais que um tipo de receptor, e, portanto fármacos que sejam direcionados para atuar em diferentes receptores podem ser terapêuticamente úteis (HUBER e cols. *Biochemistry.* 47(42):11013-11023, 2008).

Diversos estudos mostraram a presença de adrenoceptores  $\alpha 1$  no trato urinário

25 inferior, particularmente no tecido prostático humano e detrusor da bexiga, os quais têm sua expressão aumentada na HPB (FORRAY e cols. *Mol. Pharmacol.* 45(4):703-708, 1994; HATANO e Cols. *Br. J. Pharmacol.* 113(3):723-728, 1994; Marshall e cols. *Br. J. Pharmacol.* 115(5):781-786, 1995.; HIEBLE & RUFFOLO. *Expert Opin Investig Drugs.* 6(4):367-387, 1997; MALLOY e cols *J. Urol. Sep*;160(3 Pt 1):937-943, 1998;

30 MURAMATSU e cols. *Br. J. Urol.* 74(5):572-578, 1994; HIEBLE e cols. *Pharmacol. Rev.* 45:267-270, 1995; HIEBLE. *Pharm. Acta. Helv.* 74(2-3):163-171, 2000;

MICHELOTTI e cols. *Pharmacol. Ther.* 88:281-309, 2000). Além destes receptores, os receptores 5-HT1A também são expressos no tecido prostático humano onde exercem um efeito proliferativo (ABDUL e cols., *Anticancer Res.* 14(3A):1215-1220, 1994; DIZEYI e cols. *Prostate* 59(3):328-336, 2004). Tendo isto em vista, há um grande  
5 interesse no campo de desenvolvimento de novos fármacos, por antagonistas duais para o tratamento da HPB, uma vez que se tem o interesse pelo bloqueio de receptores adrenoceptores  $\alpha 1A/D$  e 5-HT1A.

A busca na literatura científica não apontou documentos relevantes para derivados *N*-fenilpiperazínicos como antagonistas múltiplos de adrenoceptores  $\alpha 1A$ ,  
10 adrenoceptores  $\alpha 1D$  e receptores serotoninérgicos 5-HT1A como novos candidatos à protótipos para tratamento da hiperplasia prostática benigna e sintomas do trato urinário inferior descrito na presente invenção.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma  
15 que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

São objetos da presente invenção derivados *N*-fenilpiperazínicos, ligantes,  
20 composições farmacêuticas contendo os mesmos.

Os derivados *N*-fenilpiperazínicos da invenção são particularmente úteis como ligantes para processos *in vitro*, sendo também particularmente úteis em composições farmacêuticas para o tratamento da hiperplasia prostática benigna e/ou sintomas do trato urinário inferior. Considerando os adrenoceptores  $\alpha 1$  e receptores 5-HT1A, os derivados  
25 *N*-fenilpiperazínicos da invenção possuem pré-requisitos estruturais necessários para a ligação a esses receptores, tais como átomo de nitrogênio básico para interação iônica com o grupo carboxilato do resíduo aspartato (Asp) na TM3 desses receptores (adrenoceptores  $\alpha 1$  e receptores 5-HT1A), além do anel aromático para interações hidrofóbicas e eletrostáticas com resíduos complementares nas TM2, 4, 6 e 7.

30 Um outro objeto da invenção é o processo de obtenção de derivados *N*-fenilpiperazínicos que possuem variação na cadeia alquílica.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

5 A figura 1 mostra curvas concentração-resposta a fenilefrina (FE) em aorta de rato na ausência (■) ou presença (□) do veículo utilizado para a diluição dos LDT's. Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=5).

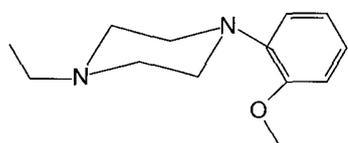
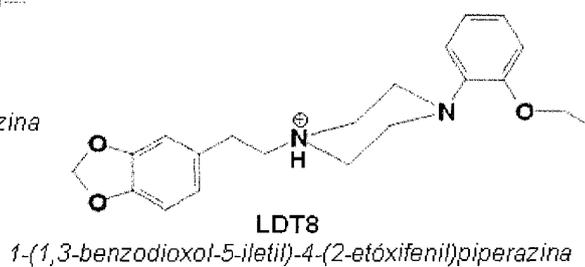
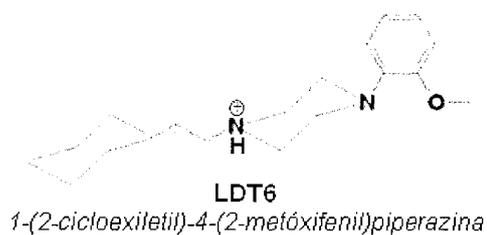
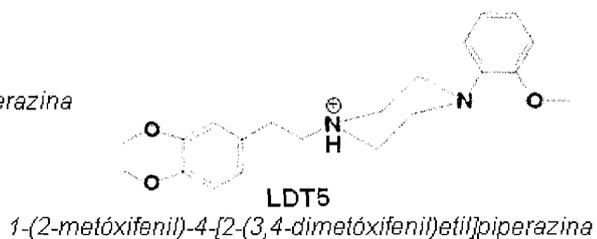
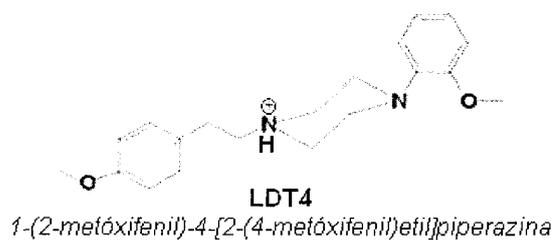
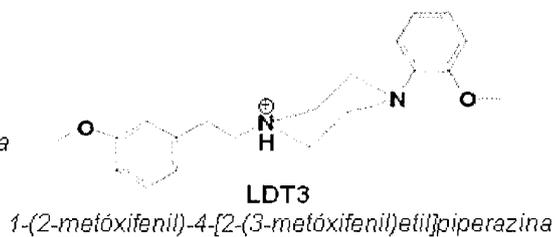
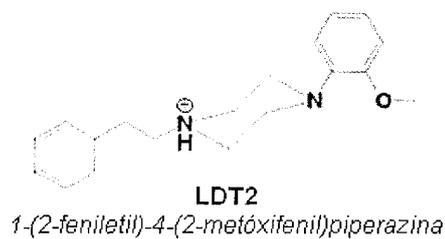
### **Descrição Detalhada da Invenção**

10 A presente invenção proporciona derivados *N*-fenilpiperazínicos, ligantes, composições farmacêuticas contendo os mesmos.

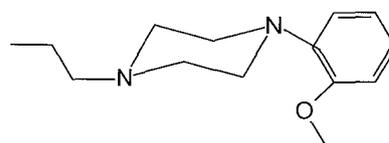
Os derivados *N*-fenilpiperazínicos da invenção são particularmente úteis como ligantes para processos *in vitro*, sendo também particularmente úteis em composições farmacêuticas para o tratamento da hiperplasia prostática benigna e/ou sintomas do trato urinário inferior. Em especial, os derivados 2-alcóxifenilpiperazínicos da invenção têm alta afinidade por adrenoreceptores  $\alpha 1A$  e  $\alpha 1D$  e receptores 5-HT1A e compreendem:

- um átomo de nitrogênio básico para interação iônica com o grupo carboxilato do resíduo aspartato (Asp) na TM3 desses receptores; e
  - ao menos um anel aromático para interações hidrofóbicas e eletrostáticas com
- 20 resíduos complementares nas TM2, 4, 6 e 7; e
- um grupo com densidade de carga negativa na posição 2 (*orto*) ao nitrogênio da subunidade *N*-fenilpiperazina, acceptor de ligação de hidrogênio e.g. alcóxidos e isósteros.

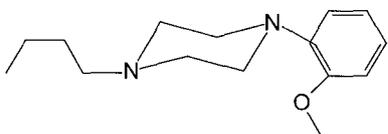
Foram sintetizados vários compostos com o grupamento farmacofórico *N*-fenilpiperazina. As estruturas químicas dos compostos da série LDT 2-6, LDT8, LDT 25 62-69, LDT 39, LDT 70 e LDT 245 estão indicadas abaixo:



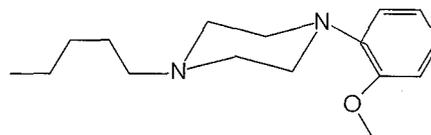
(1-etíl-4-(2-metóxifenil)piperazina)



(1-(2-metóxifenil)-4-propilpiperazina)

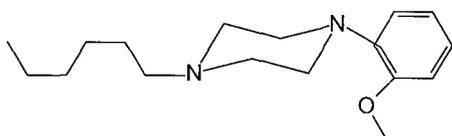
**LDT64**

(1-butil-4-(2-metóxicfenil)piperazina)

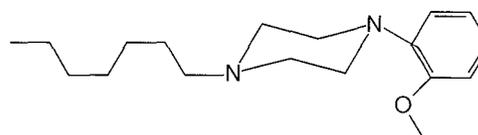
**LDT65**

(1-(2-metóxicfenil)-4-pentilpiperazina)

5

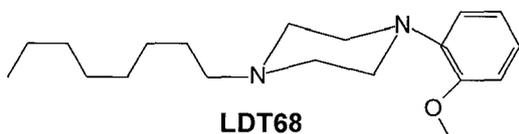
**LDT66**

(1-hexil-4-(2-metóxicfenil)piperazina)

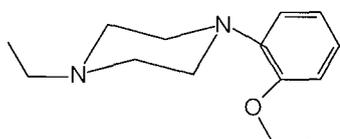
**LDT67**

(1-heptil-4-(2-metóxicfenil)piperazina)

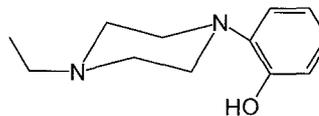
10

**LDT68**

(1-(2-METÓXIFENIL)-4-OCTILPIPERAZINA)

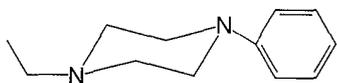
**LDT69**

(1-etil-4-(2-etóxicfenil)piperazina)

**LDT70**

(1-etil-4-(2-hidróxicfenil)piperazina)

15

**LDT39**

(1-etil-4-(2-hidróxifenil)piperazina)

5

**LDT245**

1-(2-etóxifenil)-4-[2-(3,4-dimetóxifenil)etil]piperazina

Existem dois estudos com derivados *N*-fenilpiperazínicos para adrenocetores  $\alpha_1$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub>, um de Ratouis e colaboradores (J. Med. Chem. 8:271-273, 1965), e o outro de Leopoldo e colaboradores (J. Pharm. Pharmacol. 56(2):247-255, 2003) que estudaram, dentre outros, as fenilpiperazinas ora denominadas LDT5, no primeiro, e LDT3, LDT4 e LDT5, no segundo estudo. Além disso, também existem outras duas referências caracterizando os LDT62-68 como ligantes de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (MOKROSZ e cols., Arch. Pharm. 328:143-148, 1995), e também uma referência para LDT66 e LDT68 apenas como ligantes de adrenocetores  $\alpha_1$  (MOKROSZ e cols., J. Med. Chem. 39:1125-1129, 1996). Porém, em nenhuma destas referências há determinação de atividade intrínseca, e análise sistemática, em paralelo, das razões de seletividade para receptor 5-HT<sub>2A</sub> e adrenocetores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Toda a série LDT2-6, LDT8 e LDT62-68 apresentada configura-se como uma série de candidatos potenciais no contexto da busca por antagonistas duais com afinidade para os receptores adrenocetores  $\alpha_1$  A/D e 5-HT<sub>1A</sub>.

#### Obtenção dos novos derivados *N*-fenilpiperazínicos

Todos os derivados, denominados na presente invenção de LDT's, foram sintetizados a partir dos respectivos haletos de alquila, comerciais ou previamente sintetizados a partir dos respectivos alcoóis primários, por meio de reação SN<sub>2</sub> com as *N*-fenilpiperazinas em acetonitrila, na presença de base amínica ou carbonato, sob refluxo em aquecimento convencional ou microondas, em rendimentos que variaram de

86 a 97%, e foram disponibilizados sob forma de monoclорidratos com posterior solubilização à concentração de 10 mM em água ultrapura e estoque a -20°C.

Foram registrados espectros de infra-vermelho por transformada de Fourier (FT-IR) em um espectrômetro Perkin Elmer (Spectrum BX), espectro de <sup>1</sup>H-RMN (300 e 500 MHz CDCl<sub>3</sub>) e de <sup>13</sup>C-RMN (75 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) estes registrados em mais 5 Varian Plus (7,05 T) e espectrômetros Bruker Avance DRX500 e DRX300, e os espectros de massa foram registrados em espectrômetro Shimadzu LCMS IT-TOF. As placas de cromatografia de camada delgada (TLC) eluídas com mistura de solventes polar e apolar (etanol/clorofórmio) evidenciaram apenas um único spot indicando a 10 presença de apenas um composto, em cada amostra, como corroborado pela análise espectrométrica. A cada dia de experimento, foram diluídas pequenas alíquotas da solução estoque em concentrações necessárias para a realização do experimento em questão.

Todos os experimentos utilizando as séries LDT2-6, LDT8, LDT62-68 e 15 LDT245 foram realizados sob iluminação de lâmpada de vapor de sódio a fim de evitar possível degradação dos compostos.

#### *Obtenção dos órgãos*

Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo comitê de ética da UFRJ (CEUA; protocolo: DFBCICB011).

20 Ratos Wistar machos de 2,5 – 3 meses foram eutanasiados por decapitação após serem anestesiados em câmara saturada com éter. Coelhos albinos machos (2,5 – 3 kg) foram eutanasiados por exsanguinação após serem anestesiados com pentobarbital intravenoso (40 mg/kg).

#### *Radioligantes e fármacos utilizados*

25 Os radioligantes [<sup>3</sup>H]-prazosina (atividade específica 85 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-ketanserina (atividade específica 67 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (atividade específica 170.2 Ci/mmol) foram adquiridos da PerkinElmer, EUA, e o [<sup>3</sup>H]RX821002 (atividade específica 60 Ci/mmol) foi adquirido da Amersham, RU. Prazosina cloridrato, adrenalina bitartrato, pargilina cloridrato, 5-hidroxitriptamina cloridrato, acetilcolina 30 cloridrato, (R)-(-)-fenilefrina cloridrato, (±)-propranolol cloridrato, BMY7378 dihidrocloridrato e ketanserina tartarato foram adquiridos da SIGMA, EUA.

### Ensaio funcionais

Realizou-se ensaios de contração isométrica utilizando ratos Wistar machos, com idade de 2,5 – 3 meses eutanasiados como descrito anteriormente. A aorta torácica (tecido enriquecido em receptores  $\alpha$ 1D-adrenérgicos funcionais) foi removida, livre dos  
5 tecidos conectivo e adiposo adjacentes, e cortada em segmentos de 3 mm. Em seguida, cada anel foi fixado a um transdutor de tensão (GRASS FT-03), e mergulhado em cubas contendo 9 mL de solução fisiológica (NaCl 122 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 15 mM, Glicose 11,5 mM), mantidos a 37°C sob constante aeração com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Os  
10 segmentos da aorta foram então submetidos a uma pré-carga de 20 mN por 60 minutos. Após a recuperação dos tecidos, mantidos por 1 hora em repouso, foi realizada uma contração induzida por fenilefrina (FE) 1  $\mu$ M (agonista seletivo dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos). No plateau desta contração, visando promover relaxamento endotélio-dependente decorrente da ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e  
15 conseqüente liberação de óxido nítrico (NO), adicionou-se acetilcolina 1  $\mu$ M. Os anéis que relaxaram pelo menos 80% foram considerados com endotélio intacto, sendo utilizados.

Em seguida a preparação foi lavada e mantida em repouso por 1 hora, visando a recuperação do tecido. Foram então realizadas curvas cumulativas à fenilefrina ( $10^{-9}$  –  
20  $10^{-5}$  M) na presença de propranolol 1  $\mu$ M (bloqueador de receptores  $\beta$ -adrenérgicos) antes e após a incubação por 1 hora dos LDT's a 10 ou 50 nM. Paralelamente, um controle temporal foi realizado para descartar a existência de algum artefato sobre a contração medida, onde adicionou-se apenas o veículo (água ultrapura Milli Q®) no lugar da substância a ser testada. Seguindo rigorosamente o mesmo protocolo que as  
25 demais cubas que tiveram adicionadas os LDT's.

Os dados foram digitalizados no sistema MacLab 8S conectado ao transdutor de tensão isométrico Grass FT-03, que registrou a variação de tensão em milinewtons (mN) gerada ao longo da análise. Os dados digitalizados foram então analisados através do programa Chart 3.4/s *software* (MacLab, Inc., USA). No processo de *screening*  
30 farmacológico, a concentração inicial utilizada dos LDT's foi de 50 nM, considerada como concentração de corte, ou seja, as substâncias que não tiveram efeito nesta

concentração não seriam mais investigadas neste ensaio. Em contrapartida, as substâncias que tiveram efeito, foram depois testadas em concentração menor (10 ou 2 nM) (Tabela 2). Desta forma, através da construção de curvas concentração-resposta ao agonista FE na ausência e presença do antagonista pode-se determinar os parâmetros de efeito máximo ( $E_{max}$ ) e concentração que promove 50% do  $E_{max}$  (CE50). A razão entre o valor de CE50 nestas duas condições (com e sem LDT) corresponde a um terceiro parâmetro, denominado “razão da concentração” (ou CR). Uma vez determinados estes parâmetros, foi possível calcular a afinidade aparente dos antagonistas competitivos ( $KB$ ) *in vitro* usando-se a equação de Schild (Eq. 1) (KENAKIN, Raven Press, Nova York. Pp:278-322, 1993).

$$\text{(Equação 1)} \quad \log(\text{CR}-1) = \log[B] - \log KB$$

Onde, CR=razão da concentração (CE'50/CE50); [B]=concentração do antagonista 'B'; KB= constante de equilíbrio de dissociação do antagonista 'B'.

#### Análise dos dados e tratamento estatístico

Os dados de tensão obtidos foram analisados por regressão não-linear para se calcular os parâmetros efeito máximo ( $E_{max}$ ) e concentração que promove 50% do  $E_{max}$  (CE50), utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 4 (EUA). Para verificar se houve diferença significativa entre as medidas efetuadas antes e depois do tratamento com LDT's foi realizado teste ANOVA fator único seguido por teste de Newman-Keuls, considerando um risco alfa de 5% (diferenças consideradas significativas se  $P < 0,05$ ).

#### Ensaio de ligação (*Binding*)

Adrenoceptores  $\alpha 1A$

#### Preparação membranar

Seguindo o protocolo previamente descrito na literatura, foram obtidas preparações membranares de homogeneizado de fígado de coelho. Tais preparações membranares são enriquecidas no subtipo  $\alpha 1A$  de adrenoceptores. O tecido obtido como descrito anteriormente ( $\approx 30$  g) foi descongelado naturalmente, imerso em solução de descongelamento (sacarose 0,25 M, EGTA 1 mM e Tris 5 mM (pH 7,4)) gelada. Em

seguida, o tecido foi transferido para uma placa de petri sobre gelo, contendo solução para homogeneização de fígado (EDTA 2 mM, NaCl 100 mM e Tris 50 mM (pH 7,4)) gelada. O fígado foi então cuidadosamente picotado desprezando-se a parte mais fibrosa.

5 Em seguida, transferiu-se o material para um bécher onde, com o auxílio do homogeneizador Ultra-Turrax (velocidade 24000 RPM), o tecido foi homogeneizado com a mesma solução tampão, na proporção de 6 partes da solução para 1 parte de material. O material foi homogeneizado por três vezes durante 20 segundos; nos intervalos a solução ficou em repouso por 1 minuto em gelo. Posteriormente o  
10 homogeneizado foi submetido a uma centrifugação de 10000 x g, por 10 minutos à 4°C, gerando um sobrenadante que foi submetido a uma ultracentrifugação de 80000 x g, por 40 minutos à 4°C, obtendo-se um *pellet*. Este *pellet* foi ressuspensão em solução tampão isenta de NaCl (EDTA 1 mM e Tris 50 mM (pH 7,4)) e submetido a mais uma ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores. O *pellet* obtido nesta etapa foi  
15 ressuspensão em solução de armazenamento (sacarose 0,25 M, EGTA 1 mM e Tris 5 mM (pH 7,4)) com o auxílio de um homogeneizador manual do tipo Dounce e estocado em alíquotas de 300 µL em nitrogênio líquido. Em todos os protocolos de preparações membranares a dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de LOWRY e cols. (J. Biol. Chem. 193(1):265-275, 1951).

20 *Binding* da [3H]-prazosina aos adrenoceptores  $\alpha 1A$

A padronização deste ensaio foi feita de acordo com o descrito na literatura. Nos ensaios de saturação foi medida a ligação da [3H]-prazosina aos adrenoceptores- $\alpha 1A$  nativos na ausência e presença de diferentes concentrações de prazosina não radioativa ( $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  M). Para ensaios de competição, tubos de ensaio contendo 350  
25 µL de solução intermediária ([3H]-prazosina 0,16 nM, EDTA 1,6 mM, Tris 50 mM (pH 7,4 a 25°C)), são adicionados os 50 µL de diferentes concentrações de LDT's (concentração final  $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M), ou 50 µL de água (veículo para a diluição dos LDT's), para a determinação da ligação total, ou 50 µL de prazosina não radioativa a 10 µM (final 1 µM) para a determinação da ligação não-específica, além de 200 µg das  
30 preparações membranares de fígado de coelho ( $\alpha 1A$ ), contidos em 50 µl de suspensão completando volume final de 500 µL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em ambos os ensaios as preparações membranares foram incubadas a 30°C por 45 minutos. Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução de lavagem gelada (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), seguida por filtração rápida à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak®). Os filtros foram lavados quatro  
5 vezes com 4 mL da mesma solução sob vácuo para remover todo radioligante livre. Em seguida os filtros foram secos e acondicionados em *vials* contendo 5 mL de líquido de cintilação (PPO 4%, POPOP 0,1% p/V em tolueno). A radioatividade retida nos filtros foi então determinada em contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR).

A ligação específica da [<sup>3</sup>H]-prazosina aos adrenoreceptores- $\alpha$ 1A foi definido  
10 como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica. Os dados obtidos pelo ensaio de saturação nos permitiram obter os parâmetros  $K_d$  (constante de dissociação), a qual representa a concentração de radioligante necessária para ocupar 50% dos sítios receptores, e  $B_{max}$ , densidade máxima dos sítios de ligação, os quais foram calculados por regressão não-linear. Os valores crescentes de *bound* foram calculados  
15 indiretamente através do valor de *bound* obtido na concentração do radioligante (fmol/mg proteína) o qual foi multiplicado por um fator de diluição (FD) do radioligante (ex: [3H]-prazosina) decorrente da adição do ligante não radioativo (ex: prazosina), em processo conhecido como diluição isotópica. Este procedimento visa obter uma curva de saturação com menor gasto de substância radioativa e de material biológico. Já ensaios  
20 de competição nos permitem construir curvas de inibição da ligação específica do radioligante. Quanto maior a concentração do agente competidor empregada, neste caso os LDT's em estudo, maior a competição pelos receptores específicos, diminuindo a formação do complexo receptor-radioligante. Isto pode ser observado pela progressiva redução da radioatividade retida nos filtros e detectada pelo contador de cintilação  
25 líquida.

A partir destas curvas de inibição foi possível calcular os valores da concentração dos LDT's que inibe em 50% a ligação do radioligante (CI<sub>50</sub>). Tais valores foram convertidos a valores de  $K_i$  (constante de dissociação do competidor no equilíbrio ou constante de inibição) através da equação de Cheng-Prusoff (Eq. 2).

$$K_i = \frac{CI_{50}}{1 + ([L] / K_D)}$$

(Equação 2)

Onde  $K_i$  = constante de inibição;  $CI_{50}$  = concentração que inibe em 50% a ligação do radioligante;  $[L]$  = concentração do radioligante;  $K_d$  = constante de equilíbrio de dissociação do ligante (medido em ensaio de saturação).

#### Adrenoceptores $\alpha 1B$

##### Preparação membranar

Seguindo o protocolo previamente descrito na literatura, foram obtidas preparações membranares de homogeneizado de fígado de rato. Tais preparações membranares são enriquecidas no subtipo  $\alpha 1B$  de adrenoceptores  $\alpha$ . Os tecidos obtidos como descrito anteriormente (4 fígados de rato o que corresponde a  $\approx 30$  g) foram descongelados, picotados e homogeneizados da mesma forma realizada para fígado de coelho. O homogeneizado obtido foi filtrado em quatro camadas de gaze e então submetido a uma centrifugação  $5000 \times g$ , por 20 minutos a  $4^\circ C$ , gerando um sobrenadante que posteriormente foi ultracentrifugado a  $100000 \times g$ , por 60 minutos a  $4^\circ C$ , obtendo-se um *pellet*. Este *pellet* foi ressuspensão em solução tampão isenta de NaCl e submetido a mais uma ultracentrifugação nas mesmas condições. O *pellet* obtido nesta etapa foi ressuspensão em solução de armazenamento (sacarose 0,25 M, EGTA 1 mM e Tris 5 mM (pH 7,4)) com o auxílio de um homogeneizador manual do tipo Dounce e estocado em alíquotas de  $300 \mu L$  em nitrogênio líquido.

##### *Binding* da [3H]-prazosina aos adrenoceptores $\alpha 1B$

Ensaio de ligação para adrenoceptores  $\alpha 1B$  foram padronizados da mesma forma que ensaios de ligação para adrenoceptores  $\alpha 1A$ , de acordo com a literatura, *i.e.*, foram realizados ensaios de saturação e competição em preparações membranares de fígado de rato, neste caso utilizando  $150 \mu g$  proteína por tubo, contidos em  $50 \mu l$  de suspensão, além das diferentes concentrações de LDT's ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M).

##### Adrenoceptores $\alpha 2$ e Receptores 5-HT<sub>2A</sub>

##### Preparação membranar

Foram realizadas preparações membranares de córtex de rato de acordo com o descrito anteriormente na literatura. Os órgãos foram homogeneizados em Potter com o auxílio de um aparelho motorizado (Fisatom) e pistão de *teflon*, na proporção de 20

partes de Tris HCl 50 mM (pH 7,4 a 4°C) para 1 parte de material, por três vezes durante 30 segundos cada vez, nos intervalos a solução ficou em repouso por 1 minuto em gelo.

Em seguida realizou-se uma centrifugação a 900 x g, por 10 minutos a 4°C, onde se obteve um *pellet* que foi ressuspensão em solução Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado e o mesmo procedimento foi realizado mais uma vez. O sobrenadante foi então centrifugado a 48000 x g, por 10 minutos a 4°C, obtendo-se um *pellet* que foi ressuspensão na proporção de 20 partes de Tris HCl 50 mM (pH 7,4 a 4°C) para 1 parte de material, e incubado a 37°C por 10 minutos, a fim de se remover os neurotransmissores endógenos. Por fim, foi realizada a centrifugação por mais duas vezes a 48000 x g, por 10 minutos a 4°C, e então o *pellet* final foi ressuspensão em solução de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

#### *Binding* da [3H]RX821002 aos adrenoceptores $\alpha_2$

Os ensaios de ligação para os receptores  $\alpha_2A$  foram realizados de acordo com o descrito anteriormente na literatura e previamente padronizados no laboratório através de experimentos de saturação. Os valores obtidos de *Kd* e *Bmax* foram  $2,05 \pm 0,28$  nM e  $124 \pm 7$  fmol/mg proteína ( $n = 1$ ), respectivamente. Incubou-se, por 60 minutos a 30°C, 150  $\mu$ g de preparação membranar de córtex de rato, contidos em 50  $\mu$ l de suspensão em Tris-HCl 50 mM, em tubos contendo 400  $\mu$ L de solução intermediária ([3H]RX821002 1,25 nM, Tris 50 mM, (pH 7,4, a 37°C) além de 50  $\mu$ L de diferentes concentrações de LDT's (concentração final  $10^{-7} - 3 \times 10^{-5}$  M para LDT65-68), ou 50  $\mu$ L de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à 37°C (veículo para a diluição dos LDT's), para a determinação da ligação total, ou 50  $\mu$ L de bitartarato de adrenalina não radioativa a 100  $\mu$ M para a determinação da ligação não-específica (volume final de 500  $\mu$ L). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução gelada contendo Tris 5 mM (pH 7,4), seguida por filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak®) previamente umedecidos com solução de polietilenoimina 0,5%. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL da solução gelada contendo Tris 5 mM (pH 7,4) sob vácuo para remover todo radioligante livre. Em seguida os filtros foram secos e acondicionados em *vials* contendo 5 mL de líquido de

cintilação (composição: PPO 4%, POPOP 0,1% p/V em tolueno). A radioatividade retida nos filtros foi então determinada em contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR). A ligação específica da [3H]RX821002 aos receptores  $\alpha$ 2A foi definido como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica. Para estes receptores também foram determinados os parâmetros  $CI_{50}$  e  $K_i$ .

#### Receptores 5-HT1A

##### Preparação membranar

Foram realizadas preparações membranares de hipocampo de rato de acordo com o descrito anteriormente por HALL e cols. (1985) e PEROUTKA (1986). As etapas de homogeneização e centrifugação foram realizadas de maneira idêntica à descrita anteriormente para receptores  $\alpha$ 2A e receptores 5-HT2A.

##### *Binding* da [3H]-8-OH-DPAT ou da [3H]p-MPPF aos receptores 5-HT1A

Os ensaios de ligação para os receptores 5-HT1A foram realizados de acordo com o descrito anteriormente na literatura e previamente padronizados no laboratório através de experimentos de saturação. Os valores obtidos de  $K_d$  e  $B_{max}$  foram  $0,7 \pm 0,1$  nM e  $125 \pm 42$  fmol/mg proteína, respectivamente (NEVES e cols., Bioorg. Med. Chem. 18(5):1925-1935, 2010). Incubou-se, por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , 50  $\mu\text{g}$  de preparação membranar de hipocampo de rato, contidos em 50  $\mu\text{L}$  de suspensão em Tris-HCl 50 mM, em tubos contendo 400  $\mu\text{L}$  de solução intermediária ([3H]-8-OH-DPAT 1,25 nM,  $\text{CaCl}_2$  1,25 mM,  $\text{MnCl}_2$  1,25 mM, pargilina 10  $\mu\text{M}$  (visando a proteção da possível degradação do radioligante pela enzima monoaminoxidase (MAO), Tris 50 mM, (pH 7,4, a  $37^\circ\text{C}$ ) além de 50  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de LDT's (concentração final  $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M para LDT 2-6;  $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M para LDT 8; e  $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M para LDT 62-70 e LDT 39), ou 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à  $37^\circ\text{C}$  (veículo para a diluição dos LDT's), para a determinação da ligação total, ou 50  $\mu\text{L}$  de serotonina não radioativa a 10  $\mu\text{M}$  para a determinação da ligação não-específica (volume final de 500  $\mu\text{L}$ ). Os ensaios foram realizados em triplicata. Alternativamente, incubou-se por 45 min. A  $37^\circ\text{C}$ , 50  $\mu\text{g}$  de preparação membranar de hipocampo de rato, contidos em 50  $\mu\text{L}$  de suspensão em Tris-HCl 50 mM, em tubos contendo 400  $\mu\text{L}$  de solução intermediária ([3H]p-MPPF 0,625 nM, GTP 1,25 mM e Tris 50 mM, (pH 7,4, a  $37^\circ\text{C}$ ) além de 50  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de LDT's (concentração final  $10^{-9}$  - 3

x  $10^{-7}$  M para LDT 65-68), ou 50  $\mu$ L de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à 37°C (veículo para a diluição dos LDT's), para a determinação da ligação total, ou, da mesma forma que no *binding* da [3H]-8-OH-DPAT, 50  $\mu$ L de serotonina não radioativa a 10  $\mu$ M para a determinação da ligação não-específica (volume final de 500  $\mu$ L). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução gelada contendo Tris 5 mM (pH 7,4), seguida por filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak®) previamente umedecidos com solução de polietilenoimina 0,5%. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL da solução gelada contendo Tris 5 mM (pH 7,4) sob vácuo para remover todo radioligante livre. Em seguida os filtros foram secos e acondicionados em *vials* contendo 5 mL de líquido de cintilação (composição: PPO 4%, POPOP 0,1% p/V em tolueno). A radioatividade retida nos filtros foi então determinada em contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR). A ligação específica da [3H]-8-OH-DPAT aos receptores 5-HT1A foi definido como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica. Para estes receptores também foram determinados os parâmetros  $CI_{50}$  e  $K_i$ .

#### Atividade intrínseca em receptores 5-HT1A nativos

A presença de GTP desloca o GPCR para um estado de baixa afinidade (Lahti e cols, 1992). A atividade intrínseca de uma substância ao GPCR pode ser estimada utilizando o radioligante agonista ou antagonista apropriado para definir a afinidade da substância no estado de alta e baixa afinidade do receptor, respectivamente. Portanto, para se definir a atividade intrínseca dos derivados mais potentes em receptores 5-HT1A foram calculados as suas constantes de dissociação ( $K_i$ ), utilizando-se como radioligante um antagonista ([3H]p-MPPF) na presença de uma alta concentração de GTP ( $K_i$  baixa), ou um agonista ([3H]-8-OH-DPAT) na ausência de GTP ( $K_i$  alta). Valores para razão de  $K_i$  ( $K_i$  Baixa/ $K_i$  Alta) consideravelmente maior do que 1 (um) indicam um agonismo, ao passo que valores próximos de 1 indicam antagonismo enquanto valores negativos indicam agonismo inverso.

#### *Binding* da [3H]-ketanserina aos receptores 5-HT2A

Os ensaios de ligação para os receptores 5-HT2A foram realizados de acordo com o descrito na literatura. Os valores de  $K_d$  e  $B_{max}$  obtidos em experimentos prévios

do laboratório foram  $1,77 \pm 0,07$  nM e  $348 \pm 51$  fmol/mg proteína, respectivamente. Incubou-se por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , 150  $\mu\text{g}$  de preparação membranar contidos em 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de córtex de rato em tubos contendo 400  $\mu\text{L}$  de solução intermediária ([ $^3\text{H}$ ]-ketanserina 1,25 nM, prazosina 125 nM, Tris 50 mM, HCl 1N até pH 7,4, a  $37^{\circ}\text{C}$ )  
5 além de 50  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de LDT's (concentração final  $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M para LDT 2-4; e  $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M para LDT 5-8), ou 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 à  $37^{\circ}\text{C}$  (veículo para a diluição dos LDT's), para a determinação da ligação total, ou 50  $\mu\text{L}$  de ketanserina não radioativa a 10  $\mu\text{M}$  para a determinação da ligação não-específica (volume final de 500  $\mu\text{L}$ ). Os ensaios foram realizados em triplicata.

10 Após o período de incubação, a reação foi parada pela adição de 4 mL de solução gelada contendo Tris 5 mM (pH 7,4), seguida por filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (GMF 3, Filtrak®) previamente umedecidos com solução de polietilenoimina 0,5%. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL da solução gelada contendo Tris 5 mM (pH 7,4) sob vácuo para remover todo radioligante livre. Em  
15 seguida os filtros foram secos e acondicionados em *vials* contendo 5 mL de líquido de cintilação (PPO 4%, POPOP 0,1% p/V em tolueno). A radioatividade retida nos filtros foi então determinada em contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 1600 TR). A ligação específica da [ $^3\text{H}$ ]-ketanserina aos receptores 5-HT<sub>2A</sub> foi definido como a diferença entre a ligação total e a ligação não-específica. Para estes receptores também  
20 foram determinados os parâmetros  $\text{CI}_{50}$  e  $K_i$ .

#### Dosagem de proteínas

A dosagem do conteúdo de proteínas nas amostras foi realizada pelo método colorimétrico proposto na literatura e modificado para microplaca (placa de 96 poços). Para a construção da curva padrão utilizou-se a proteína albumina sérica bovina (BSA)  
25 nas concentrações de 50, 100, 200, 250, 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  dos padrões de proteína ou 50  $\mu\text{L}$  de amostras diluídas de proteína em estudo a cada poço contendo 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de carbonato dissódico 2% em NaOH 0,1N, sulfato cúprico 1% e tartarato de sódio-potássio 2%, 50  $\mu\text{L}$  de água (branco). Por fim, seguiu-se a adição de 15  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin a cada poço e homogeneização com pipeta multicanal. A  
30 placa foi incubada por 45 min a temperatura ambiente a partir da homogeneização do primeiro poço. Os valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro de placa

em comprimento de onda igual a 700 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e usando dois fatores de diluição diferentes. Os cálculos do conteúdo de proteínas das amostras foram realizados por interpolação utilizando os valores de absorvância da curva padrão *versus* concentração de proteína, os quais foram analisados por regressão linear com o uso do programa GraphPad Prism 4.0. Os valores foram expressos em mg proteína/mL de homogeneizado.

#### Análise dos dados e tratamento estatístico

Os dados obtidos nos ensaios de ligação foram analisados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (EUA), a fim de se calcular os parâmetros da curva de competição, CI50, e da curva de saturação, tais como  $K_d$  e  $B_{max}$ . Em especial, para os experimentos de saturação nos receptores  $\alpha_1A$  e  $\alpha_1B$ -adrenérgicos foram testados os modelos de um ou dois sítios de ligação, escolhendo-se o que melhor se aplica através do teste F (DE LEAN e cols., Mol Pharmacol. 21(1):5-16, 1982). Assim, quando a soma dos quadrados dos erros foi reduzida significativamente ao assumir o modelo de dois sítios frente ao modelo de um sítio, o primeiro modelo foi utilizado para se obter estimativas dos valores de  $K_d$  da prazosina. Por outro lado, quando não houve melhora significativa ao adicionar um segundo sítio, foi obtido um único valor de  $K_d$ .

A diferença entre os grupos experimentais foi analisada por análise de variância fator único (*one-way* ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls (mais de 2 grupos), em ambos os casos considerando  $P < 0,05$ .

#### Inibição da contração induzida por fenilefrina em aorta de rato

De acordo com SCOFIELD e colaboradores (J. Pharmacol. Exp. Ther. 275: 1035-1042, 1995) assim como TESTA e colaboradores (Life Sci. 57(13):P1159-63, 1995), a aorta torácica de rato corresponde a um tecido que expressa majoritariamente adrenoceptores  $\alpha_1D$  além de serem enriquecidas em receptores serotoninérgicos subtipo 5-HT<sub>2A</sub> (Banes e cols., J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:1179-1187, 1999). Tendo isto em vista, os ensaios funcionais de contração em modelo de órgão isolado foram realizados utilizando estes tecidos. Quando adicionados ao banho de incubação, nenhum dos LDT's (50 nM) alterou a linha basal de tensão isométrica. Desta forma, descartou-se um possível efeito agonista sobre receptores com ação vasoconstrictora, como por exemplo

os adrenoceptores  $\alpha 1$  ou serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>), nesta concentração. Paralelamente, visando descartar a existência de algum artefato sobre a contração medida, um controle temporal foi realizado onde adicionou-se apenas o veículo (água ultrapura Milli Q®) no lugar da substância a ser testada, seguindo rigorosamente o mesmo protocolo que as  
5 demais cubas que tiveram adicionadas os LDT's (Figura 1).

Realizamos experimentos com BMY7378 50 nM, antagonista de adrenoceptores  $\alpha 1D$  usado como controle positivo, e obtivemos um valor de  $KB = 2,95$  nM, compatível com a literatura (CARROLL e cols., Bioorg. Med. Chem. Lett., 11:1119-1121, 2001). Dentro da série dos LDT's 2-6 e 8, todas as substâncias, exceto o LDT6, reduziram a  
10 contração induzida pela FE, além de induzirem um deslocamento das curvas concentração-resposta à FE para direita, quantificado pela razão de CE50 (CR). Assim, os dados sugerem um efeito antagonista  $\alpha 1D$  adrenérgico para todos os derivados estudados, exceto LDT6. Posteriormente foi calculada a afinidade aparente dos antagonistas (Tabela 1). A segunda condição experimental (LDT's 10 nM) foi realizada  
15 apenas para LDT 5 e 8, ou ainda 2 nM (LDT 245), visando determinar a afinidade ( $KB$ ) calculada através da equação de Schild. Toda a série LDT 2-8, exceto LDT6, mostrou grande afinidade pelos adrenoceptores  $\alpha 1D$ . Comparando-se com o BMY7378 ( $KB = 2,95$  nM) a afinidade por este receptor é maior para os derivados LDT 5 e 8 ( $KB = 0,57$  e  $0,16$ , respectivamente,  $*P < 0.05$ ).

Com relação aos demais derivados LDT's 62-70 e 39, todas as curvas concentração-resposta à fenilefrina sofreram um clássico deslocamento para direita, quantificado pela razão de CE50 (CR) (Tabela 4), na presença dos LDT's em relação a curva controle, comportando-se assim, como antagonistas competitivos. Dentre os antagonistas *N*-fenilpiperazínicos com variação na cadeia alquílica ligada à posição R1  
25 (LDT's 63-68), e comparando-os com o derivado LDT62, houve um aumento significativo da afinidade relativa ( $KB$ ) pelos receptores  $\alpha 1D$ -adrenérgicos para os derivados LDT66 e LDT67 (Tabela 2), nos quais a cadeia alquílica variou de seis a sete carbonos, respectivamente, indicando que interações hidrofóbicas são relevantes para o reconhecimento molecular por este subtipo de receptor adrenérgico, o que está de  
30 acordo com a literatura em que descreve o importante papel de forças hidrofóbicas na

determinação da afinidade de *N*-fenilpiperazinas ou *orto*-metóxilfenilpiperazinas para adrenoceptores  $\alpha$ .

O aumento da hidrofobicidade no LDT69, dado pela substituição em R2 pelo grupo etoxila, não alterou a afinidade para os receptores  $\alpha$ 1D-adrenérgicos, em relação ao LDT62, no qual R2 é uma metoxila. Por outro lado, a inserção de grupo hidrofílico doador e acceptor de ligação hidrogênio, ou a ausência de substituinte em R2, observado para LDT70 e LDT39, respectivamente, diminuem a afinidade pelos receptores  $\alpha$ 1D-adrenérgicos. A faixa de afinidade dos LDT's 66-68 para os adrenoceptores  $\alpha$ 1D é equivalente à afinidade descrita para outros antagonistas *N*-fenilpiperazínicos como o BMY7378 e o naftopidil.

Tabela 1: Afinidade dos LDT's (2-6, 8 e 245) e BMY7378 pelos adrenoceptores  $\alpha$ 1D

LDT	log CE50 $\pm$ EPM (M)		CR $\pm$ EPM	log KB $\pm$ EPM (M)	KB (nM)	N
	Controle	LDT				
2 a	-7,00 $\pm$ 0,19	- 5,65 $\pm$ 0,19	24,3 $\pm$ 8,7	-8,51 $\pm$ 0,37	2,15	5
3 a	-6,87 $\pm$ 0,25	- 5,40 $\pm$ 0,25	29,1 $\pm$ 1,8	-8,75 $\pm$ 0,03	1,78	5
4 a	-6,99 $\pm$ 0,19	- 5,79 $\pm$ 0,32	16,9 $\pm$ 5,5	-8,47 $\pm$ 0,16	3,14	5
5 b	-7,12 $\pm$ 0,22	- 5,85 $\pm$ 0,15	18,5 $\pm$ 2,5	-9,23 $\pm$ 0,06 *	0,57	6
6 a	ND	ND	ND	ND	ND	7
8 b	-7,14 $\pm$ 0,10	-5,35 $\pm$ 0,14	62,5 $\pm$ 15,5	-9,78 $\pm$ 0,19 *	0,16	10
245c	-6,72 $\pm$ 0,09	-6,23 $\pm$ 0,14	3,9 $\pm$ 1,0	-8,93 $\pm$ 0,19	1,16	7
BMY7378b	-6,99 $\pm$ 0,15	-6,36 $\pm$ 0,09	4,4 $\pm$ 0,8	-8,53 $\pm$ 0,11	2,95	6

Valores de KB calculados individualmente e obtidos a partir dos experimentos funcionais na presença de LDT, ou BMY7378, a 50 nM, b10 nM ou c2 nM;

A CR (razão entre as CE50 na presença e ausência LDTs) é a média das CRs calculadas a partir CE50 obtidas na análise por regressão não linear.

\*  $P < 0,05$  comparado ao BMY7378 (ANOVA fator único seguido por teste de Newman-Keuls).

Tabela 2: Afinidade dos LDT's (62-70 e 39) pelos adrenoceptores  $\alpha 1D$

LDT	log CE50 $\pm$ EPM (M)		CR	log KB $\pm$ EPM (M)	KB (nM)	N
	Controle	LDT				
62	-6,86 $\pm$ 0,07	-6,01 $\pm$ 0,06	7	-8,08 $\pm$ 0,02	8,3	4
63	-6,34 $\pm$ 0,14	-6,80 $\pm$ 0,18	3,1	-7,59 $\pm$ 0,12b	31,5	5
64	-6,91 $\pm$ 0,05	-6,18 $\pm$ 0,08	6,4	-7,93 $\pm$ 0,13	11,7	6
65	-6,73 $\pm$ 0,02	-5,89 $\pm$ 0,05	7,0	-8,08 $\pm$ 0,04	8,3	4
66	-6,78 $\pm$ 0,08	-5,29 $\pm$ 0,07	32	-8,78 $\pm$ 0,06 a	1,66	4
67	-6,91 $\pm$ 0,11	-5,46 $\pm$ 0,08	29,5	-8,74 $\pm$ 0,08a	1,82	4
68	-6,91 $\pm$ 0,04	-5,81 $\pm$ 0,06	12,8	-8,36 $\pm$ 0,05	4,36	5
69	-6,70 $\pm$ 0,08	-5,87 $\pm$ 0,07	6,9	-8,06 $\pm$ 0,08	8,71	3
70	-6,93 $\pm$ 0,03	-4,86 $\pm$ 0,09	123,6	-7,07 $\pm$ 0,08a	85,1	4
39	-6,77 $\pm$ 0,08	-4,91 $\pm$ 0,05	76,7	-6,85 $\pm$ 0,08a	141	5

5

Valores de KB calculados individualmente e obtidos a partir dos experimentos funcionais na presença de LDT 50 nM (LDT's 62-69) ou 10  $\mu$ M (LDT's 70 e 39); A CR (razão entre as CE50 na presença e ausência LDTs) é a média das CRs calculadas a partir CE50 obtidas na análise por regressão não linear. aP < 0,001 e bP < 0,01 comparado ao LDT62 (ANOVA fator único seguido por teste de Newman-Keuls)

10

#### Ensaio de ligação (*Binding*)

##### Adrenoceptores $\alpha 1A$ e $\alpha 1B$ - Porcentagem de ligação da [3H]-prazosina

Primeiramente ensaios de saturação em preparação de fígado de coelho e rato foram realizados para determinar os parâmetros de ligação da [3H]-prazosina. Para adrenoceptores  $\alpha 1A$ , após análise considerando a ligação do radioligante a um ou dois sítios de ligação específica, o melhor ajuste da curva foi obtido considerando-se o modelo de dois sítios. Neste caso tem-se um sítio de alta afinidade, correspondendo ao

15

sub-tipo  $\alpha 1A$ , e um segundo sítio de baixa afinidade, sub-tipo  $\alpha 1L$ , cuja existência, natureza e função são discutidas na literatura. Enquanto que para adrenoceptores  $\alpha 1B$  o melhor ajuste se deu em modelo de apenas um sítio de ligação. Utilizando a prazosina não radioativa como agente competidor padronizou-se a curva de competição para a  
5 ligação de  $[3H]$ -prazosina 0,1 nM. Nestas condições, a curva de competição foi bifásica, em preparação de fígado de coelho, com aproximadamente 2/3 dos sítios marcados pela  $[3H]$ -prazosina 0,1 nM apresentando alta afinidade pela prazosina ( $CI_{50} = 0,16$  nM) e 1/3 dos sítios apresentando baixa afinidade ( $CI_{50} = 19$  nM).

Os valores de  $K_d$  da  $[3H]$ -prazosina para adrenoceptores  $\alpha 1A$  foram 0,46 nM e  
10 56,5 nM para os sítios de alta e baixa afinidades, respectivamente ( $n = 3$ ), e para adrenoceptores  $\alpha 1B$  o valor de  $K_d$  foi 0,34 nM ( $n = 3$ ), estando de acordo com a literatura (SHIBATA e cols., Mol. Pharmacol., 48:250-258, 1995). Com relação aos LDT's, toda a série testada foi capaz de inibir a ligação específica da  $[3H]$ -prazosina em ensaios de competição.

15 Para o cálculo de  $K_i$  dos LDT's utilizou-se a equação de Cheng-Prusoff, onde utilizou-se, para a prazosina (PZS) os valores de  $K_d$  de 0,46 nM e 56,5 nM para os sítios de alta e baixa afinidade, respectivamente, para adrenoceptores  $\alpha 1A$ , e utilizou-se  $K_d = 0,34$  nM para adrenoceptores  $\alpha 1B$ . Os valores de  $K_i$  obtidos seguem sumarizados nas tabelas 3 a 5 a seguir.

Tabela 3: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (2-6 e 8) em adrenoceptores  $\alpha 1A$ 

<b>LDT</b>	<i>n</i>	<i>log CI50 ± EPM (M) a</i>	<i>Ki (M)b</i>
		<i>Sítio de alta afinidade</i>	<i>Sítio de alta afinidade</i>
<b>2</b>	4	-7,72 ± 0,26	1,57 x 10 <sup>-8</sup>
<b>3</b>	4	-8,25 ± 0,67	4,63 x 10 <sup>-9</sup>
<b>4</b>	3	-7,97 ± 0,79	8,81 x 10 <sup>-9</sup>
<b>5</b>	3	-8,35 ± 0,20	3,67 x 10 <sup>-9</sup>
<b>6</b>	3	-8,58 ± 0,34	2,16 x 10 <sup>-9</sup>
<b>8</b>	4	-8,34 ± 0,71	3,76 x 10 <sup>-9</sup>
<b>PZS</b>	3	-9,53 ± 0,15	2,43 x 10 <sup>-10</sup>

a Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM;

b Valores de *Ki* foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff;

5  $P < 0,05$  comparado à PZS (ANOVA fator único seguido por Newman-Keuls).

Tabela 4: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (2-6 e 8) adrenoceptores  $\alpha 1B$ 

<b>LDT</b>	<i>n</i>	<i>log CI50 ± EPM (M) a</i>	<i>Ki (M) b</i>
<b>2</b>	4	-7,20 ± 0,49	4,87 x 10 <sup>-8</sup>
<b>3</b>	4	-7,02 ± 0,31	7,37 x 10 <sup>-8</sup>
<b>4</b>	4	-7,52 ± 0,32	2,33 x 10 <sup>-8</sup>
<b>5</b>	5	-7,80 ± 0,37	1,22 x 10 <sup>-8</sup>
<b>6</b>	3	-6,70 ± 0,19	1,54 x 10 <sup>-7</sup>
<b>8</b>	5	-7,93 ± 0,39	9,07 x 10 <sup>-9</sup>

a Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM;

10 b Valores de *Ki* foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff.

Tabela 5: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (62-70 e 39) em adrenoceptores  $\alpha 1A$  e  $\alpha 1B$

LDT	$\alpha 1A$ (n)		$\alpha 1B$ (n)	
	log IC50 (M)	Ki (nM)	log IC50 (M)	Ki (nM)
62	-6,51 $\pm$ 0,2	261 (4)	-6,27 $\pm$ 0,05	448 (3)
63	-6,50 $\pm$ 0,08	270 (4)	-6,22 $\pm$ 0,05	511 (3)
64	-6,84 $\pm$ 0,04	124 (3)	-6,33 $\pm$ 0,16	393 (3)
65	-7,10 $\pm$ 0,06	67 (3)	-6,48 $\pm$ 0,16	277 (3)
66	-7,29 $\pm$ 0,11 a	43 (4)	-6,51 $\pm$ 0,18	221 (4)
67	-7,02 $\pm$ 0,12 a	81 (3)	-6,87 $\pm$ 0,10	113 (3)
68	-7,35 $\pm$ 0,2 a	38 (3)	-6,69 $\pm$ 0,10	173 (3)
69	-7,41 $\pm$ 0,25 a	33 (3)	-6,53 $\pm$ 0,11	185 (3)
70	-6,45 $\pm$ 0,07	304 (3)	-6,07 $\pm$ 0,10	715 (3)
39	-6,36 $\pm$ 0,21	374 (3)	-6,29 $\pm$ 0,10	425 (3)

Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software*

5 GraphPad Prism (USA) e expressos como média  $\pm$  EPM;

a Valores de Ki foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff;

b  $P < 0,01$  comparado à LDT62 (ANOVA fator único seguido por Newman-Keuls).

Toda a série LDT 2-8 apresentou, além da capacidade de reconhecimento dos  
 10 dois sítios de ligação, valores de Ki na faixa nanomolar para o componente de alta  
 afinidade ( $\alpha 1A$ ), semelhante ao observado para a prazosina (Tabela 3). Houve um  
 aumento de afinidade dos derivados LDT65 a LDT69, em relação ao LDT62 para os  
 adrenoceptores  $\alpha 1A$ . Os derivados LDT66, LDT68 e LDT69 (Ki igual a 43, 38 e 33 nM,  
 respectivamente) apresentaram afinidade de seis a oito vezes maior ( $P < 0,01$ ) do que o  
 15 LDT62 (Ki = 261 nM) (Tabela 5). Embora LDT65 e LDT67 tenham apresentado  
 valores de Ki de três a quatro vezes menores (67 e 81 nM, respectivamente) comparado  
 a LDT62, este aumento de afinidade não foi significativo ( $P = 0,06$  (LDT65) e 0,1  
 (LDT67)). Não houve diferença de afinidade entre o LDT62 e os derivados LDT63,  
 LDT64, LDT39 e LDT70. Para adrenoceptores  $\alpha 1B$ , mais uma vez observou-se um

perfil de menor afinidade para o LDT6, na faixa  $\mu\text{M}$ , quando comparados aos demais, com destaque para o LDT8, faixa nanomolar, porém a diferença não foi significativa. Desta forma, observamos que a substituição auxofórica observada em LDT6 não contribui para a modulação positiva da afinidade aparente pelos subtipos de adrenoceptores  $\alpha 1\text{B/D}$ .

Os derivados LDT's 62-70 e LDT39 possuem menor afinidade pelos adrenoceptores  $\alpha 1\text{B}$  em relação aos receptores  $\alpha 1\text{A}$  e  $\alpha 1\text{D}$ . Embora nenhuma das modificações estruturais realizadas nestes LDT's tenha alterado a afinidade significativamente, parece haver um aumento de afinidade conforme o aumento da cadeia alquílica a partir do derivado LDT65. Além disso, também parece haver maior interação quando se tem o grupo etoxila na posição R2 da subunidade fenilpiperazina presente em LDT69 (também observado para o LDT8), em comparação com a metoxila do LDT62, seguindo o mesmo padrão de afinidade que os receptores  $\alpha 1\text{A}$ , porém em um grau menor. Mokrosz e cols. (1997) apenas verificaram que os LDT's 66 e 68 são ligantes de receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos no entanto, não determinaram a sua afinidade. Desta forma, nós avaliamos por quais subtipos de adrenoceptores  $\alpha 1$  os LDT's se ligariam especificamente e qual seria a sua atividade intrínseca nestes subtipos. Assim como para os adrenoceptores  $\alpha 1\text{D}$ , parece que interações hidrofóbicas relacionadas com tamanho ótimo da cadeia alquílica são requisitos importantes para o reconhecimento molecular dos receptores  $\alpha 1\text{A}$ , pois as afinidades (Tabela 6) são significativamente maiores para os derivados LDT66 e LDT68, os quais possuem cadeia alquílica com 6 e 8 carbonos, respectivamente.

Os LDT's com aumento de tamanho da cadeia alquílica, mais especificamente os derivados LDT's 65-68, sendo os LDT 66 e 68 os mais potentes, estão dentro da faixa de afinidade apresentada pela maioria dos fármacos em uso clínico, de tal forma que se tornam assim potenciais novos antagonistas duais de adrenoceptores  $\alpha 1$  ( $\alpha 1\text{A}$  e  $\alpha 1\text{D}$ ) os quais podem ser úteis não só no alívio dos sintomas da HPB mas também para inibir a proliferação do tecido prostático via antagonismo dos adrenoceptores  $\alpha 1\text{A}$ .

Receptores  $\alpha 2\text{A}$  - Porcentagem de ligação de  $[3\text{H}]\text{RX821002}$

Previamente foram realizados, por nosso grupo, ensaios de saturação em córtex de rato, nos quais se determinou os parâmetros de ligação do  $[3\text{H}]\text{RX821002}$  ( $K_d$

=  $2,05 \pm 0,28$  nM e  $B_{max} = 124 \pm 7$  fmol/mg proteína) para receptores  $\alpha 2A$ . Este valor de  $K_d$  foi utilizado para o cálculo de  $K_i$  dos LDT's utilizando-se a equação de Cheng-Prusoff.

Em ensaios de competição, os LDT's 65-68 foram capazes de inibir a ligação específica da  $[3H]RX821002$  aos receptores  $\alpha 2A$ -adrenérgicos, porém com afinidades mais baixas (faixa  $\mu M$ , tabela 5), assim como para os  $\alpha 1B$ -adrenérgicos, em relação aos receptores  $\alpha 1A/1D$ -adrenérgicos. O fato de estas substâncias apresentarem baixa afinidade por este receptor é relevante na medida em que existe grande homologia entre os subtipos de adrenoceptor  $\alpha 2$ . Assim, os LDT's testados possivelmente apresentarão pouco bloqueio deste adrenoceptor  $\alpha 2A$  que está envolvido com a regulação dos sistemas nervoso central, cardiovascular e genitourinário masculino, por inibirem a liberação de catecolaminas nestes sistemas.

Tabela 6: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (65-68) em receptores  $\alpha 2A$ .

LDT	$\alpha 2A$	
	log IC50 (M)	$K_i$ ( $\mu M$ ) (n)
65	$-5,60 \pm 0,06$	1,5(5)
66	$-5,92 \pm 0,06$	0,8(5)
67	$-6,10 \pm 0,06$	0,5(5)
68	$-6,01 \pm 0,03$	0,6(5)

Valores de  $CI_{50}$  foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média  $\pm$  EPM de (n) experimentos individuais; Valores de  $K_i$  foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff.

#### Receptores 5-HT1A - Porcentagem de ligação de $[3H]$ -8-OH-DPAT

Foram realizados ensaios de saturação em hipocampo de rato, tecido enriquecido em receptores 5-HT1A, para determinação dos parâmetros de ligação do  $[3H]$ -8-OH-DPAT ( $K_d = 0,7 \pm 0,1$  nM e  $B_{max} = 125 \pm 42$  fmol/mg proteína, n=3), estando de acordo com a literatura (NEVES e cols., Bioorg. Med. Chem. 18(5):1925-1935, 2010). Este valor de  $K_d$  foi utilizado para o cálculo de  $K_i$  dos LDT's utilizando-se a equação

de Cheng-Prusoff. Os valores de  $K_i$  obtidos seguem sumarizados nas tabelas 7 e 8. Em ensaios de competição, toda a série testada foi capaz de inibir a ligação específica do [3H]-8-OH-DPAT. Neste receptor, o derivado de maior destaque foi o LDT8, o qual exibiu uma afinidade muito elevada ( $K_i = 23,7$  pM). Comparado a ele, todos os demais componentes da série apresentam afinidade significativamente menor ainda que todas apresentem uma afinidade elevada, na faixa nanomolar.

Comparado ao LDT62 ( $K_i = 147$  nM), os LDT's 65-68 têm afinidades de 8-29 vezes maiores ( $K_i$  (nM): 18; 5; 18 e 9, respectivamente,  $P < 0,05$ ). Por outro lado, os LDT63, LDT64, LDT69, LDT70 e LDT39 têm afinidades semelhantes, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os seus valores de  $K_i$  e aquele do LDT62 (Tabela 8).

Tabela 7: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (2-6, 8 e 245) em receptores 5-HT1A.

<b>LDT</b>	<b>n</b>	<b>log CI50 ± EPM (M) a</b>	<b>Ki (M) b</b>
<b>2</b>	4	-8,52 ± 0,03 **	<b>1,24 X 10<sup>-9</sup></b>
<b>3</b>	4	-8,56 ± 0,07 **	<b>1,13 X 10<sup>-9</sup></b>
<b>4</b>	4	-8,62 ± 0,13 **	<b>9,88 X 10<sup>-10</sup></b>
<b>5</b>	4	-8,21 ± 0,05 **	<b>2,54 X 10<sup>-9</sup></b>
<b>6</b>	4	-9,23 ± 0,24 *	<b>2,42 X 10<sup>-10</sup></b>
<b>8</b>	3	-10,24 ± 0,71	<b>2,37 X 10<sup>-11</sup></b>
<b>245</b>	2	-8,03 ± 0,05	<b>3,80 x 10<sup>-9</sup></b>

15 a Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM;

bValores de  $K_i$  foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff;

\*  $P < 0,01$  e \*\*  $P < 0,001$  comparado ao LDT 8 (ANOVA fator único seguido por teste de Newman-Keuls).

Tabela 8: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (62-70 e 39) em receptores 5-HT1A.

LDT	5-HT1A (n)	
	log IC50 (M)	Ki (nM)
62	-6,47 ± 0,10	147 (3)
63	-6,37 ± 0,03	191 (3)
64	-6,72 ± 0,19	84 (3)
65	-7,42 ± 0,09c	18 (3)
66	-7,93 ± 0,20a	5 (4)
67	-7,42 ± 0,19b	18 (3)
68	-7,70 ± 0,30b	9 (3)
69	-6,86 ± 0,30	62 (3)
70	-6,15 ± 0,08	316 (4)
39	-5,93 ± 0,13	520 (3)

Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM;

Valores de Ki foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff;

- 5 a  $P < 0.001$ , b  $P < 0.01$  e c  $P < 0.05$  comparado ao LDT 62 (ANOVA fator único seguido por teste de Newman-Keuls).

Em outro ensaio de competição pelos receptores 5-HT1A, os LDT 65-68 foram capazes de inibir a ligação específica do antagonista [3H]p-MPPF com afinidade na  
 10 faixa nM, assim como para o agonista [3H]-8-OH-DPAT. As razões dos valores de Ki para os estados de baixa e alta afinidade do receptor, dada pelo antagonista e agonista, respectivamente, foram próximas da unidade (Tabela 9), sugerindo que estes quatro derivados atuariam como antagonistas dos receptores 5-HT1A, os quais podem ser úteis na inibição da proliferação do tecido prostático que ocorre na HPB.

Tabela 9. Estimativa da atividade intrínseca dos LDT 65-68 nos receptores 5-HT1A.

LDT	<i>K<sub>i</sub></i> alta (nM)	<i>K<sub>i</sub></i> baixa (nM)	<i>K<sub>i</sub></i> baixa/ <i>K<sub>i</sub></i> alta
65	18	21,2	1,18
66	5	9,0	1,80
67	18	6,7	0,37
68	9	3,1	0,34

valores de *K<sub>i</sub>* foram calculados através de experimentos de competição com o radioligante agonista [3H]8-OH-DPAT (*K<sub>i</sub>* alta) e o radioligante antagonista [3H]p-MPPF na presença de GTP (*K<sub>i</sub>* baixa) em preparações membranares de hipocampo de rato. A razão de *K<sub>i</sub>* para os estados de baixa e alta afinidade do receptor é uma estimativa da atividade intrínseca.

#### Receptores 5-HT2A - Porcentagem de ligação de [3H]-ketanserina

Previamente foram realizados, por nosso grupo, ensaios de saturação em córtex de rato, tecido enriquecido em receptores 5-HT2A (NEVES e cols., Bioorg. Med. Chem. 18(5):1925-1935, 2010), nos quais se determinou os parâmetros de ligação do [3H]-ketanserina, ( $K_d = 1,77 \pm 0,07$  nM e  $B_{max} = 348 \pm 51$  fmol/mg proteína,  $n=2$ ). Este valor de  $K_d$  foi utilizado para o cálculo de *K<sub>i</sub>* dos LDT's utilizando-se a equação de Cheng-Prusoff (CHENG & PRUSOFF, Biochem. Pharmacol. 22:3099-3108, 1973). Os valores de *K<sub>i</sub>* obtidos seguem sumarizados nas tabelas 10 e 11. Em ensaios de competição, toda a série testada foi capaz de inibir a ligação específica da [3H]-ketanserina.

Tabela 10: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (2-6 e 8) em receptores 5-HT2A.

<b>LDT</b>	<b>n</b>	<b>log CI50 ± EPM (M) a</b>	<b>Ki (M) b</b>
<b>2</b>	3	-7,13 ± 0,11	<b>4,74 X 10<sup>-8</sup></b>
<b>3</b>	3	-7,15 ± 0,22	<b>4,52 X 10<sup>-8</sup></b>
<b>4</b>	3	-7,16 ± 0,06	<b>4,42 X 10<sup>-8</sup></b>
<b>5</b>	3	-6,41 ± 0,02	<b>2,48 X 10<sup>-7</sup></b>
<b>6</b>	3	-6,23 ± 0,46	<b>3,76 X 10<sup>-7</sup></b>
<b>8</b>	3	-6,41 ± 0,70	<b>2,48 X 10<sup>-7</sup></b>

a Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM;

5 b Valores de Ki foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff

Tabela 11: Parâmetros farmacológicos dos LDT's (62-70 e 39) em receptores 5-HT2A.

<b>LDT</b>	<b>5-HT2A (n)</b>	
	<b>log IC50 (M)</b>	<b>Ki (µM)</b>
<b>62</b>	-5,00 ± 0,16	6,41 (3)
<b>63</b>	-4,86 ± 0,13	8,85 (4)
<b>64</b>	-5,06 ± 0,09	5,58 (3)
<b>65</b>	-5,34 ± 0,09	2,93 (4)
<b>66</b>	-5,57 ± 0,16b	1,72 (3)
<b>67</b>	-5,53 ± 0,13b	1,89 (3)
<b>68</b>	-5,64 ± 0,08b	1,47 (3)
<b>69</b>	-5,02 ± 0,06	6,12 (3)
<b>70</b>	-4,20 ± 0,03a	40,4 (3)
<b>39</b>	-5,16 ± 0,16	4,44 (3)

Valores de CI50 foram calculados por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad Prism (USA) e expressos como média ± EPM;

10 Valores de Ki foram calculados através da equação de Cheng-Prusoff;

a  $P < 0,001$ , b  $P < 0,05$  comparado ao LDT 62 (ANOVA fator único seguido por Newman-Keuls).

De maneira distinta do que foi observado para os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, há pouca  
5 diferença de afinidade entre a maioria dos LDT's (diferença não excede 20 vezes entre  
os valores de  $K_i$ ), com exceção do LDT70 com afinidade bem menor, o qual possui  
afinidade 6 vezes menor que o LDT62 ( $P < 0,05$ ). De maneira geral, comparado às  
afinidades dos LDT's 2-6 e 8, LDT's 62-70 e LDT39 por todos os receptores  
estudados, as afinidades observadas para os receptores 5-HT<sub>2A</sub> são as menores, assim  
10 como ocorre para o derivado LDT65 em relação aos receptores  $\alpha_2A$ -adrenérgicos.

**Reivindicações**

Derivados *N*-fenilpiperazínicos antagonistas de adrenoceptores  $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1D e de receptores 5-HT1A no tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna, Composições Farmacêuticas contendo os Mesmos.

5

1. Derivados *N*-fenilpiperazínicos com alta afinidade por adrenoceptores  $\alpha$ 1A/D e receptores 5-HT1A caracterizados por compreender:

- um átomo de nitrogênio básico para interação iônica com o grupo carboxilato do resíduo aspartato (Asp) na TM3 desses receptores; e

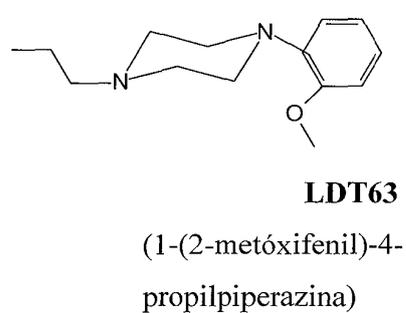
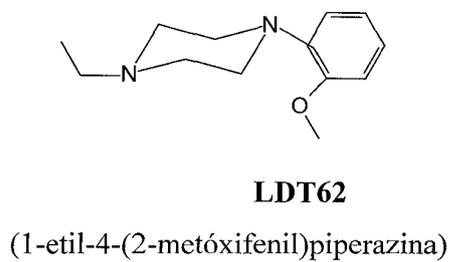
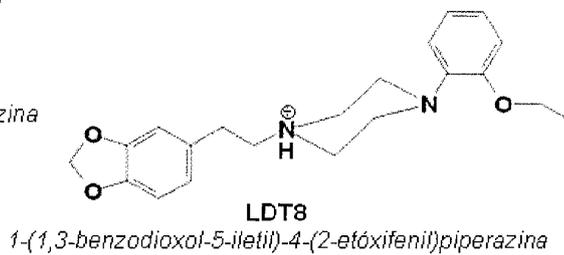
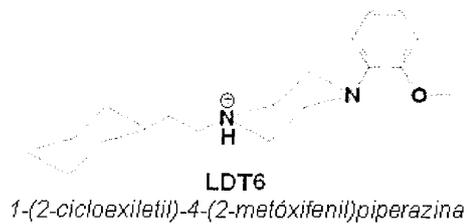
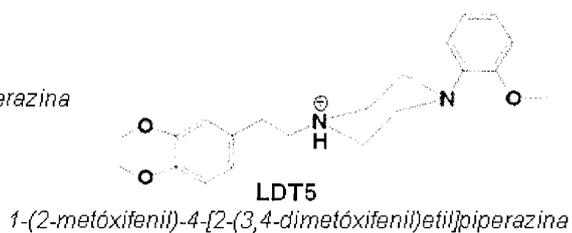
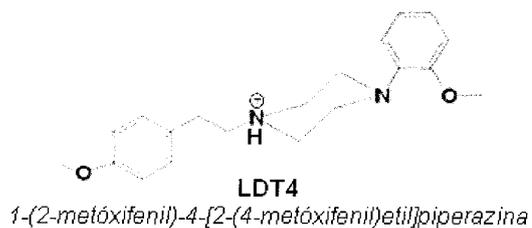
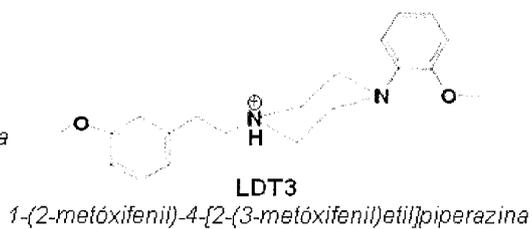
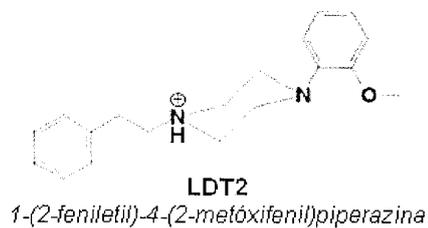
10

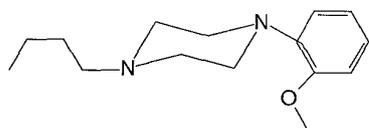
- ao menos um anel aromático para interações hidrofóbicas e eletrostáticas com resíduos complementares nas TM2, 4, 6 e 7; e

- um grupo com densidade de carga negativa na posição 2 (*orto*) ao nitrogênio da subunidade *N*-fenilpiperazina, acceptor de ligação de hidrogênio e.g. alcóxidos e isósteros.

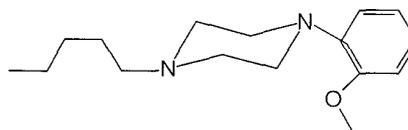
15

2. Derivados *N*-fenilpiperazínicos de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por ser selecionados do grupo que compreende:



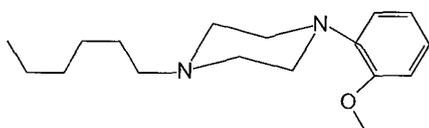
**LDT64**

(1-butil-4-(2-metóxfenil)piperazina)

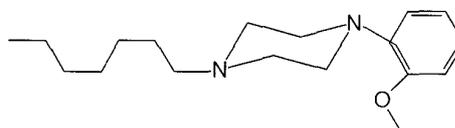
**LDT65**

(1-(2-metóxfenil)-4-pentilpiperazina)

5

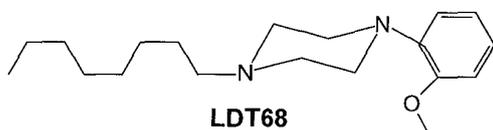
**LDT66**

(1-hexil-4-(2-metóxfenil)piperazina)

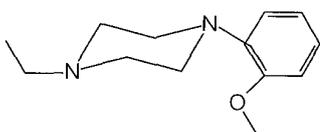
**LDT67**

(1-heptil-4-(2-metóxfenil)piperazina)

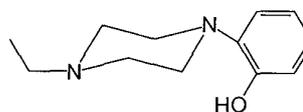
10

**LDT68**

(1-(2-METÓXFENIL)-4-OCTILPIPERAZINA)

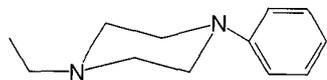
**LDT69**

(1-etil-4-(2-etóxfenil)piperazina)

**LDT70**

(1-etil-4-(2-hidróxfenil)piperazina)

15



LDT39

(1-etil-4-(2-hidróxifenil)piperazina)

5



LDT245

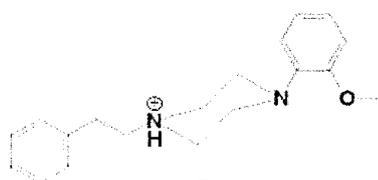
1(-2-etóxifenil)-4-[2-(3,4-dimetóxifenil)etil]piperazina.

10 3. Ligantes de adrenoceptores  $\alpha 1A/D$  e receptores 5-HT1A caracterizados por compreender:

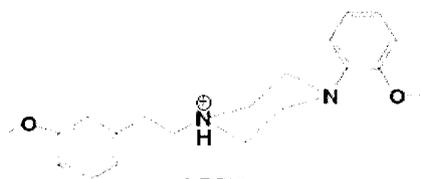
- um átomo de nitrogênio básico para interação iônica com o grupo carboxilato do resíduo aspartato (Asp) na TM3 desses receptores; e
- ao menos um anel aromático para interações hidrofóbicas e eletrostáticas com resíduos complementares nas TM2, 4, 6 e 7.

15

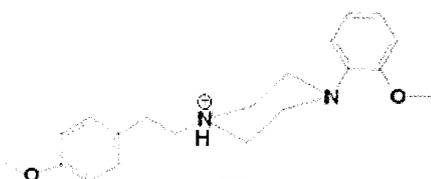
4. Ligantes de acordo com a reivindicação 3, caracterizados por ser selecionados do grupo que compreende:



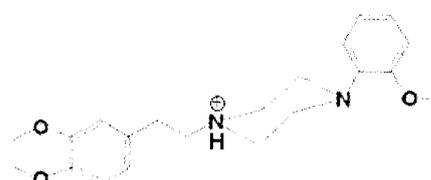
**LDT2**  
1-(2-feniletíl)-4-(2-metóxi-fenil)piperazina



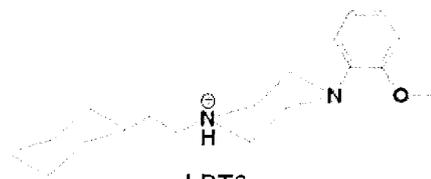
**LDT3**  
1-(2-metóxi-fenil)-4-[2-(3-metóxi-fenil)etil]piperazina



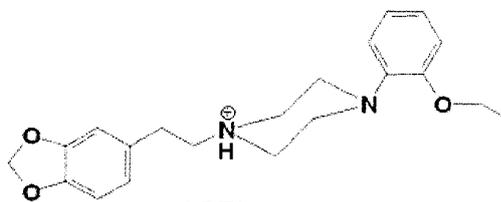
**LDT4**  
1-(2-metóxi-fenil)-4-[2-(4-metóxi-fenil)etil]piperazina



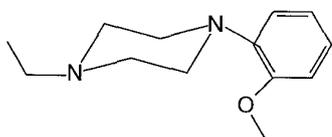
**LDT5**  
1-(2-metóxi-fenil)-4-[2-(3,4-dimetóxi-fenil)etil]piperazina



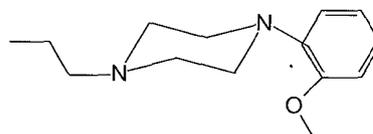
**LDT6**  
1-(2-ciclohexiletíl)-4-(2-metóxi-fenil)piperazina



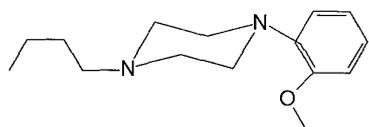
**LDT8**  
1-(1,3-benzodioxol-5-iletíl)-4-(2-metóxi-fenil)piperazina



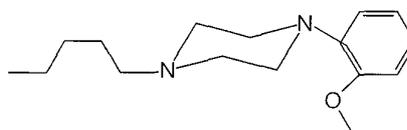
**LDT62**  
(1-etíl-4-(2-metóxi-fenil)piperazina)



**LDT63**  
(1-(2-metóxi-fenil)-4-propilpiperazina)

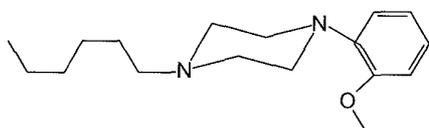
**LDT64**

(1-butil-4-(2-metóxiifenil)piperazina)

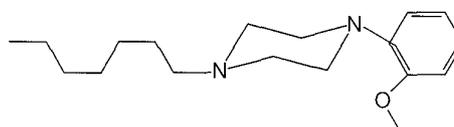
**LDT65**

(1-(2-metóxiifenil)-4-pentilpiperazina)

5

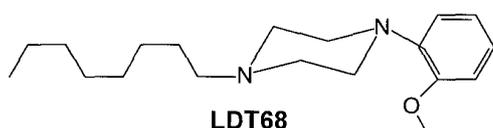
**LDT66**

(1-hexil-4-(2-metóxiifenil)piperazina)

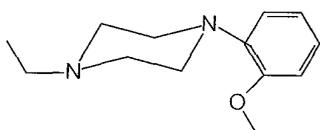
**LDT67**

(1-heptil-4-(2-metóxiifenil)piperazina)

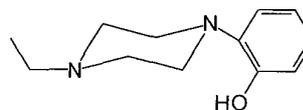
10

**LDT68**

(1-(2-METÓXIFENIL)-4-OCTILPIPERAZINA)

**LDT69**

(1-etil-4-(2-etóxiifenil)piperazina)

**LDT70**

(1-etil-4-(2-hidróxiifenil)piperazina)

15

**LDT39****LDT245**

(1-etil-4-(2-hidróxifenil)piperazina)

5

1(-2-etóxifenil)-4-[2-(3,4-dimetóxifenil)etil]piperazina.

5. Composição farmacêutica para o tratamento da hiperplasia prostática benigna e sintomas do trato urinário inferior caracterizada por compreender um veículo farmacologicamente aceitável e pelo menos um derivado *N*-fenilpiperazínico com alta afinidade por adrenoceptores  $\alpha 1A/D$  e receptores 5-HT<sub>1A</sub> compreendendo:

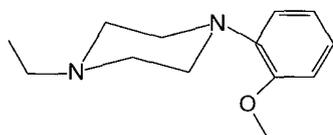
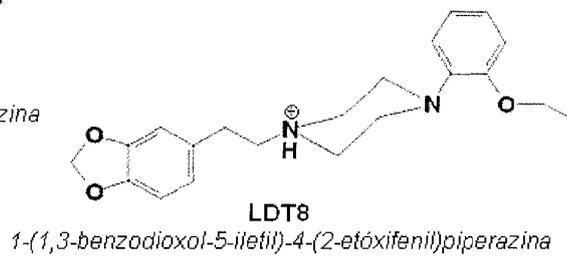
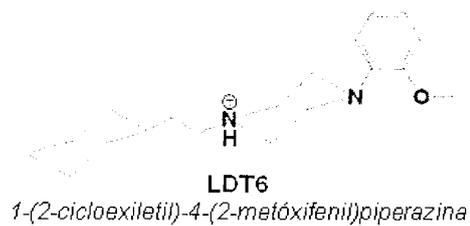
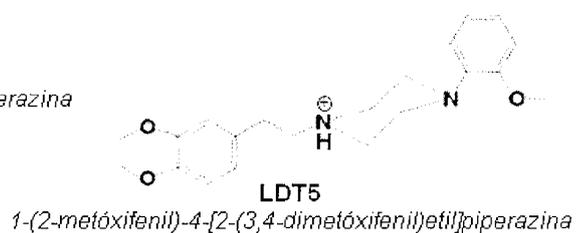
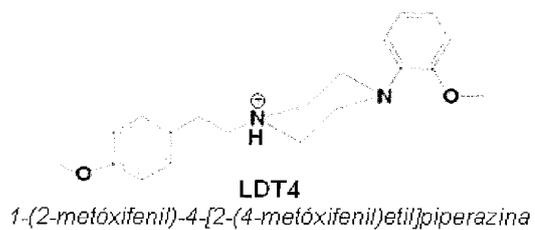
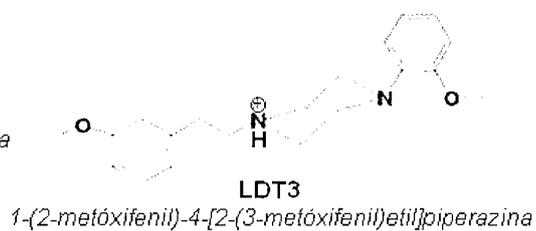
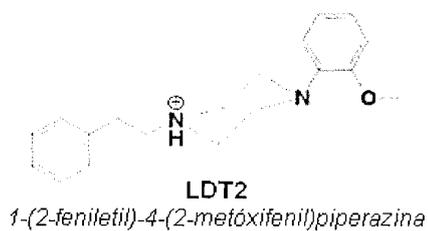
10

- um átomo de nitrogênio básico para interação iônica com o grupo carboxilato do resíduo aspartato (Asp) na TM3 desses receptores; e

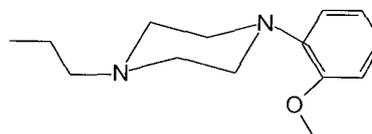
- ao menos um anel aromático para interações hidrofóbicas e eletrostáticas com resíduos complementares nas TM2, 4, 6 e 7.

15

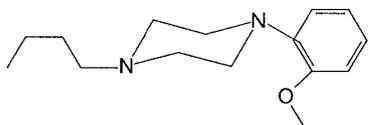
6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo referido derivado ser selecionado do grupo que compreende:



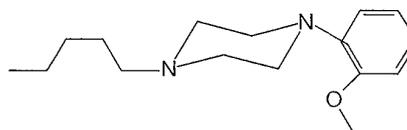
(1-etil-4-(2-metóxfenil)piperazina)



(1-(2-metóxfenil)-4-propilpiperazina)

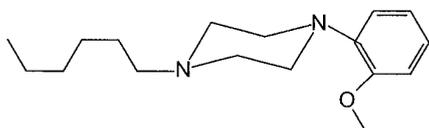
**LDT64**

(1-butil-4-(2-metóxicfenil)piperazina)

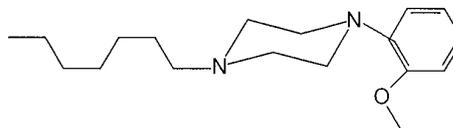
**LDT65**

(1-(2-metóxicfenil)-4-pentilpiperazina)

5

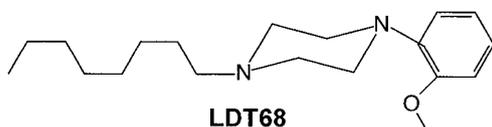
**LDT66**

(1-hexil-4-(2-metóxicfenil)piperazina)

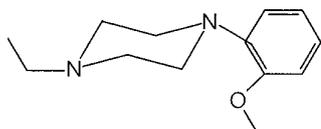
**LDT67**

(1-heptil-4-(2-metóxicfenil)piperazina)

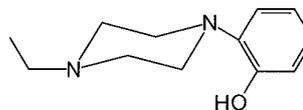
10

**LDT68**

(1-(2-METÓXIFENIL)-4-OCTILPIPERAZINA)

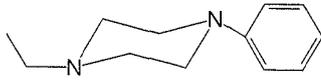
**LDT69**

(1-etil-4-(2-etóxicfenil)piperazina)

**LDT70**

(1-etil-4-(2-hidróxicfenil)piperazina)

15



**LDT39**



**LDT245**

(1-etil-4-(2-hidróxifenil)piperazina)

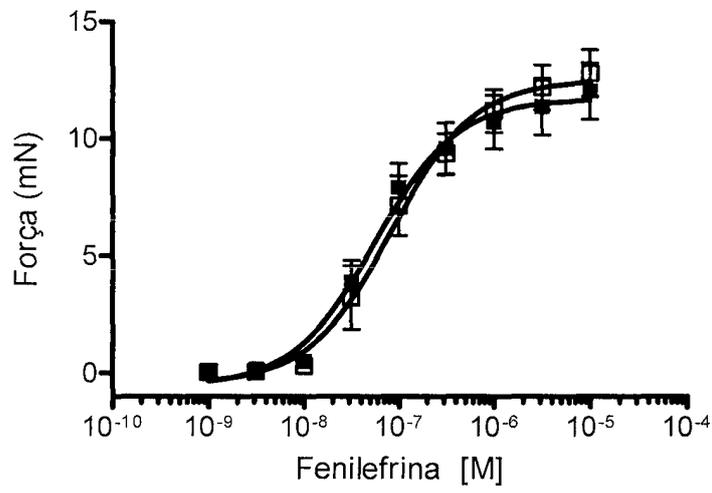
5

1(-2-etóxiifenil)-4-[2-(3,4-dimetóxiifenil)etil]piperazina.

10

Figuras

Figura 1



**Resumo**

Derivados *N*-fenilpiperazínicos antagonistas de adrenoceptores  $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1D e de receptores 5-HT1A no tratamento da Hiperplasia Prostática Benigna, Composições Farmacêuticas contendo os Mesmos.

5

A presente invenção proporciona derivados *N*-fenilpiperazínicos como ligantes e/ou antagonistas múltiplos de adrenoceptores  $\alpha$ 1A, adrenoceptores  $\alpha$ 1D e receptores serotoninérgicos 5-HT1A. Tais substâncias são candidatos a protótipos para tratamento da hiperplasia prostática benigna e sintomas do trato urinário inferior, sendo úteis em

10

composições farmacêuticas.