



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JÚNIOR

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
LIGANTES DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CC E CXC

RIO DE JANEIRO

2013

NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JÚNIOR

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
LIGANTES DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CC E CXC

Tese de doutorado realizada no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PGQu), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, em Química.

Orientador: Carlos Alberto Manssour Fraga

Coorientador: Eliezer J. Barreiro

RIO DE JANEIRO
2013

N244

Nascimento Júnior, Nailton Monteiro.

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos ligantes de receptores de quimiocinas CC e CXC. / Nailton Monteiro Nascimento Júnior – Rio de Janeiro : UFRJ, 2013.

359 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2013.

Orientadores: Carlos Alberto Manssour Fraga e Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro.

1. Química orgânica. 2. Receptores de quimiocinas. 3. Ancoramento molecular. 4. Derivados N-acilidrazônicos. 5. Derivados piperidínicos. 6. Atividade anti-inflamatória. I. Fraga, Carlos Alberto Manssour. II. Barreiro, Eliezer Jesus de Lacerda. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação Química. IV. Título.

CDD 547

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE NOVOS LIGANTES DE
RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CC E CXC

Tese de Doutorado realizada no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PGQu), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, em Química.

Aprovada em

(Carlos Alberto Manssour Fraga, DSc, LASSBio-ICB-UFRJ)

(Eliezer J. Barreiro, DSc, LASSBio-FF-UFRJ)

(Carlos Maurício R. Sant'Anna, DSc, DEQUIM-UFRRJ)

(Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins, DSc, FIOCRUZ)

(Angelo da Cunha Pinto, DSc, IQ-UFRJ)

(Bárbara Vasconcellos da Silva, DSc, IQ-UFRJ)

Esta Tese de Doutorado é dedicada a Deus, meus familiares Arlinda S. Monteiro (avó), Nailton M. Nascimento (pai), Marília F. Oliveira (mãe), José S. Cardoso (avô), Priscilla F. Monteiro (irmã) e a minha noiva Thaís R. F. Melo.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao professor Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga pela orientação ao longo do mestrado e doutorado, amizade e treinamento nesses primeiros anos de minha trajetória científica na química medicinal, contribuindo para o meu amadurecimento como cientista e capacidade para resolução de problemas que enfrentei dentro e fora da esfera científica.
- ❖ Ao professor Dr. Eliezer J. Barreiro pela coorientação durante minha trajetória no LASSBio até o momento, amizade e contribuições para a minha formação como Químico Medicinal através de seus ensinamentos, sugestões e questionamentos.
- ❖ Ao professor Dr. Rob Leurs, coorientador durante o meu estágio de doutoramento-sanduíche, por me aceitar em seu Grupo de Pesquisa na Vrije Universiteit (VU) – Amsterdam, proporcionar condições e ambiente de trabalho que contribuíram para a fácil adaptação que tive durante minha estada na Holanda.
- ❖ A Dra. Nelilma Correia Romeiro (NUPEM-UFRJ) e Carlos Maurício R. Sant'Anna (DEQUIM-UFRRJ) pelas contribuições nos estudos de modelagem molecular (construções dos modelos por homologia e estudos de docking) presentes neste trabalho.
- ❖ Ao Dr. Marco Aurélio Martins e a aluna de iniciação científica Ana Paula Leite D'Almeida do Laboratório de Inflamação da Fundação Oswaldo Cruz pela realização dos ensaios farmacológicos dos compostos sintetizados no LASSbio.
- ❖ Ao Dr. Chris de Graaf e Dr. Luc Roumen pelo treinamento nas técnicas de modelagem molecular aprendidas na Vrije Universiteit – Amsterdam e contribuição com a parte de modelagem molecular relacionada ao receptor de quimiocina CXCR4.

- ❖ Ao Dr. Maikel Wijtmans pela receptividade e discussões científicas no laboratório de síntese orgânica da Vrije Universiteit – Amsterdam.
- ❖ A doutoranda Marlies Vreeker pela realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* no receptor CXCR4 na Vrije Universiteit – Amsterdam.
- ❖ Aos responsáveis pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear: Leandro Bandeira Borre e Luciana Benevides (IQ-UFRJ), assim em relação as análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS): Ari da Silva Miranda (IPPN-UFRJ).
- ❖ As centrais analíticas do IQ-UFRJ, DEQUIM-UFRRJ, IPPN e VUMC (Amsterdam) pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular, HRMS e CLAE-massas.
- ❖ A todos os colegas e amigos do LASSBio e outros laboratórios da UFRJ: Leandro Louback da Silva, Tiago Fernandes da Silva, Daniel Nascimento do Amaral, Maria Letícia de Castro Barbosa, Renata Barbosa Lacerda, Alexandra Basílio Lopes, Arthur E. Kümmerle, Fernando Rodrigues de Sá Alves, Bruna Lima Roedel dos Santos, Clemilson Berto Júnior, Thiago Sampaio, Raquel de Oliveira Lopes, Ewerton Alves Portela dos Santos, Aline Guerra Manssour Fraga, Lídia Moreira Lima, Everton Dias D’Andrea, Cleverton Kleiton Freitas de Lima, Marina Amaral Alves, Ůros Laban, Luciana Almeida Piovesan, Ana Luisa Palhares de Miranda, Carol Martins Ávila, Éverton Dias D’Andrea, Irma Torres, Christian Tadeo, Rodolfo do Couto Maia, Roberta Tesch, Taissa Tavares, Thaise da Silva Martins, Juliana Vilacha, Larissa Abrahão, Mariana Vieira, Ciro Gonçalves e Sá, Thalita Reis, Eli Trindade, Irwin Valentim, Karine Campos, Miguel Divino da Rocha, Rosana Freitas, Filipe Costa e Isabelle Karine Costa Nunes.
- ❖ Aos colegas de trabalho durante meu período de doutoramento-sanduíche na Vrije-Universiteit – Amsterdam: Sebastiaan Kuhne, Sabine Schultes, Mark Kerstjens, Albert Kooistra, Kristina Orrling, Hans Custers, Andrea van de

Stolpe, Chimed Jansen, Daphné Truan, Tinna Brøbech Bach, Olaf van der Veen, Kimberley Fidom, Kirsten Visser, Finbar Schutte, Nikè Bon, Iwan de Esch, Mark Verheij, Maarten Sijm e Dana Ohana.

- ❖ Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.
- ❖ E desde já, a Banca Examinadora por aceitar o convite.

“Os analfabetos do futuro não serão aqueles que não sabem ler ou escrever, mas aqueles que não sabem aprender, desaprender e reaprender”

(Alvin Toffler)

RESUMO

NASCIMENTO-JÚNIOR, Nailton M. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos ligantes de receptores de quimiocinas CC e CXC. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Visando a obtenção de compostos inéditos com atividade dual em receptores de quimiocinas dos tipos CCR3 e CCR4 para o tratamento da asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, este trabalho foi iniciado com a construção de dois modelos por modelagem molecular comparativa destes receptores a partir da estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4, cocristalizado com o antagonista sintético 1t1t, e posterior validação dos modelos obtidos *in silico* com ligantes da literatura com atividades *in vitro* conhecidas. Em seguida, foram planejados compostos com padrão estrutural inédito, explorando estratégias da química medicinal, como por exemplo: bioisosterismo de anéis e de grupos funcionais e restrição conformacional, assim como a introdução de subunidades originadas de aminoácidos visando o reconhecimento molecular ligante-receptor destes novos compostos como peptídeo-miméticos. Com base em estudos de modelagem molecular, 16 compostos planejados foram triados para eleição dos derivados mais promissores para a etapa de síntese, em 6 etapas e envolvendo irradiação com micro-ondas na etapa-chave de formação da subunidade N-acilidrazona e posterior avaliação farmacológica *in vitro* e *in vivo*. Os derivados N-acilidrazônicos LASSBio-1641 e LASSBio-1642 destacaram-se por apresentarem atividade anti-inflamatória, inibindo claramente o acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas pulmonares, com destaque para LASSBio-1642, que apresentou inibição

significativa nas provas de elastância e resistência pulmonares. Além disso, LASSBio-1765 bloqueou a migração de eosinófilos *in vitro* induzida por eotaxina, sugerindo fortemente a modulação de receptores de quimiocina do tipo CCR3. Num estudo paralelo, envolvendo a estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4, realizou-se validação do modelo *in silico* por meio de ancoramento molecular rígido do antagonista presente na estrutura cristalográfica e seus respectivos análogos sintéticos. Em seguida, foram planejados fragmentos moleculares com padrão estrutural *N*-benzilpiperidínico com base em fragmentos já descritos com atividade *in vitro* seguido de estudos de ancoramento molecular e pós-processamento destes resultados por meio da técnica de impressão digital da interação ligante-proteína visando identificação das melhores subunidades para o reconhecimento molecular. Os fragmentos eleitos nos estudos *in silico* e inspirados nos fragmentos já descritos com atividade *in vitro* foram então sintetizados e avaliados por meio de ensaios *in vitro* para o receptor CXCR4. O fragmento mais ativo VUF13925 foi usado para o planejamento, síntese e avaliação *in vitro* de compostos estruturalmente maiores, resultando em um composto mais ativo *in vitro* frente ao receptor CXCR4, VUF14464.

Palavras-chave: antagonistas, atividade dual, CCR3, CCR4, CXCR4, ancoramento molecular rígido, impressão digital da interação ligante-proteína, planejamento de fármacos com base em fragmentos, síntese orgânica assistida com micro-ondas, *N*-acilidrazona, piperidina.

ABSTRACT

NASCIMENTO-JÚNIOR, Nailton M. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos ligantes de receptores de quimiocinas CC e CXC. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Aiming to achieve novel compounds with dual activity in CCR3 and CCR4 chemokine receptors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, this work has started in the construction of two homology models of these receptors by using the CXCR4 chemokine receptor crystal structure, co-crystallized with the synthetic antagonist 1t1t as template followed by validation of the *in silico* obtained models with ligands from literature with known *in vitro* activities. Then, novel compounds were designed by exploiting medicinal chemistry strategies, for instance: rings and functional groups bioisosteric relationships and conformational constraints, as well as the introduction of subunits originated from aminoacids aiming the ligand-receptor molecular recognition of these new compounds as peptidomimetics. Based on the molecular modeling studies, 16 designed compounds were screened for the election of the most promising derivatives for the synthesis step, in 6 steps by using microwave irradiation in the *N*-acylhydrazone subunit formation key step, followed by *in vitro* and *in vivo* pharmacological evaluation. The derivatives LASSBio-1641 e LASSBio-1642 have shown relevant antiinflammatory activity, by inhibition of the neutrophils in the pulmonary airways, for which LASSBio-1642 is highlighted because of a significantly inhibition in the pulmonary resistance test. Additionally, LASSBio-1765 has blocked the migration of eosinophils induced by eotaxin *in vitro*,

suggesting the modulation of CCR3 chemokine receptors. In a parallel study involving the CXCR4 chemokine receptor crystal structure, the validation of the *in silico* was performed by using a rigid docking approach with the original antagonist present in the crystal structure and their respective synthetic analogues. Afterwards, some molecular fragments with piperidine scaffold were designed based in some fragments with known *in vitro* activity followed by molecular docking and post processing of these results by using the protein-ligand interaction fingerprint (PLIF) approach as a way to identify the best subunities for the molecular recognition. The elected fragments in the *in silico* studies and inspired in the fragments with known *in vitro* activity were then synthesized and evaluated through CXCR4 receptor *in vitro* assays. The most active fragment VUF13925 was then used for the design, synthesis and *in vitro* evaluation of the growthed fragments, resulting in higher activities, for instance, VUF14464 .

Keywords: antagonists, dual activity, CCR3, CCR4, CXCR4, rigid docking, protein-ligand interaction fingerprint, fragment-based drug design, microwave-assisted organic synthesis, *N*-acylhydrazone, piperidine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Classificação e exemplos de quimiocinas com base na posição dos resíduos de cisteína conservados: **(a)** quimiocinas CXC (α), **(b)** quimiocinas CC (β), **(c)** quimiocinas C (γ) e **(d)** quimiocinas CX3C (δ) (adaptado de ROSTÈNE et al., 2007).....38
- Figura 2.** Fármacos e candidatos a fármacos registrados como antagonistas dos receptores de quimiocina dos tipos CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 e CXCR4 (PEASE & HORUK, 2012).....41
- Figura 3.** Antagonistas do receptor de quimiocina CXCR4 com padrões estruturais peptídico **(7)** e heterocíclico **(8)** (WU et al., 2010).....42
- Figura 4.** Vista do ligante 1t1t **(8)** (em verde) co-cristalizado com o receptor CXCR4 (Hélices em azul). Alguns resíduos (em laranja) são mostrados de acordo com a numeração Ballesteros-Weinstein e os sítios de ligação menor e maior são mostrados em cinza e vermelho, respectivamente (WU et al., 2010). Figura elaborada a partir do cristal de CXCR4 [PDB ID: 3ODU] (Protein Data Bank) com o programa PyMol e edição final com o programa Powerpoint.....43
- Figura 5.** Estruturas e perfil de atividade farmacológica do antagonista do receptor de quimiocina CCR3 **9** e o agonista **10** com dados de mutagênese sítio dirigido disponíveis (WISE et al., 2007), (SABROE et al., 2000).....46
- Figura 6.** Estruturas, CI_{50} e atividade inibitória de antagonistas do receptor de quimiocina CCR3 **(11-16)** (GARDNER et al., 2008), (DE LUCCA et al., 2005), (PRUITT et al., 2007), (SATO et al., 2009), (CHERNEY et al., 2008).....47
- Figura 7:** Relação estrutura-atividade (REA) para derivados bispiperidina amida substituídos antagonistas de receptores CCR3 com base em valores de K_i (TING et al., 2005b).....49
- Figura 8:** Relação estrutura-atividade (REA) para derivados ureídicos antagonistas de receptores CCR3 com base em valores de CI_{50} (NITTA et al, 2012).....51

Figura 9: Relação estrutura-atividade (REA) para derivados antagonistas de receptores CCR3 seletivos com base em valores de CI_{50} (NAYA et al., 2001).....	52
Figura 10. O antagonista dual CCR4/CCR5 (44) e os antagonistas CCR4 45 e 46 (ANDREWS et al., 2008), (ROUMEN et al., 2012).....	55
Figura 11. Diferentes padrões estruturais de antagonistas de receptores CCR4 (47-51) (ANDREWS et al., 2008), (ROUMEN et al., 2012); (YOKOYAMA et al., 2008b), (YOKOYAMA et al., 2009), (WANG et al., 2006), (YANG et al., 2006), (ALLEN et al., 2004).....	56
Figura 12. Aspectos da relação estrutura-atividade (REA) com valores de K_i para antagonistas sulfonamídicos do receptor CCR4 (BURDI et al., 2007).....	58
Figura 13. Relação estrutura-atividade (REA) com valores de K_i para antagonistas tiofenilsulfonamídicos do receptor CCR4 (PROCOPIOU et al., 2012).....	59
Figura 14. Relação estrutura-atividade com valores de CI_{50} para antagonistas do receptor CCR4 de padrão estrutural purínico e piridino[2,3- <i>d</i>]pirimidínicos (PURANDARE et al., 2007).....	60
Figura 15. O envolvimento de diferentes tipos celulares, quimiocinas, receptores de quimiocinas do tipo CCR3 e CCR4 na gênese da asma (KOELINK et al., 2012).....	62
Figura 16: (A) Requisitos básicos frequentemente observados em ligantes de receptores CCR3 e CCR4 da literatura. (B) Os antagonistas de receptores CCR3 (78) e CCR4 (52). (C) Estrutura geral dos compostos inéditos planejados. (D) Estrutura química do produto natural Safrol.....	65
Figura 17: Compostos propostos como ligantes duais dos receptores CCR3 e CCR4 (Parte A).....	68
Figura 18: Compostos propostos como ligantes duais dos receptores CCR3 e CCR4 (Parte B).....	69
Figura 19. Gráfico de Ramachandran referente ao modelo obtido por modelagem comparativa do receptor CCR3 a partir da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4. Legenda: regiões mais favoráveis (vermelho), regiões adicionalmente	

permitidas (amarelo), regiões geralmente permitidas (bege) e regiões não permitidas (branco).....71

Figura 20. Gráfico de Ramachandran referentes ao modelo obtido por modelagem comparativa do receptor CCR4 a partir da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4. **Legenda:** regiões mais favoráveis (vermelho), regiões adicionalmente permitidas (amarelo), regiões geralmente permitidas (bege) e regiões não permitidas (branco).....72

Figura 21. Estruturas químicas do antagonista de receptor CCR3 UCB-35625 (**9**) e do antagonista de receptor CCR4 (**52**).....73

Figura 22. Interações observadas para o modelo *in silico* de CCR3 com o ligante **9** (vista lateral, **A** / vista superior, **B**). (**C**) O sistema de numeração Ballesteros Weinstein foi utilizado para a comparação entre resíduos mostrados no sítio de ligação para os receptores CCR3 (modelo *in silico*) e CXCR4 (estrutura cristalográfica). Interações hidrofóbicas são mostradas em azul e interações de hidrogênio são mostradas em vermelho.....74

Figura 23. Interações observadas para o modelo *in silico* de CCR4 com o ligante **52** (vista lateral, **A** / vista superior, **B**). (**C**) O sistema de numeração Ballesteros Weinstein foi utilizado para a comparação entre resíduos mostrados no sítio de ligação para os receptores CCR4 (modelo *in silico*) e CXCR4 (estrutura cristalográfica). Interações hidrofóbicas são mostradas em azul e interações de hidrogênio são mostradas em vermelho.....76

Figura 24: Ligantes dos receptores de quimiocinas do tipo CCR3 usados na etapa de validação do modelo por modelagem molecular comparativa de CCR3.....79

Figura 25: Ligantes dos receptores de quimiocinas do tipo CCR4 usados na etapa de validação do modelo por modelagem molecular comparativa de CCR4.....80

Figura 26. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida no programa GOLD 5.1 com a função de pontuação ASP, para o ligante 101 no modelo <i>in silico</i> do receptor CCR3. (A) Vista lateral. (B) Vista superior.....	83
Figura 27. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida no programa GOLD 5.1 com a função de pontuação ASP para o ligante 106 no modelo <i>in silico</i> do receptor CCR4. (A) Vista lateral. (B) Vista superior.....	87
Figura 28. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida no programa GOLD 5.1 com a função de pontuação ASP para o ligante LASSBio-1830 (81) no modelo <i>in silico</i> do receptor CCR3. (A) Vista lateral. (B) Vista superior.....	90
Figura 29. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida com a função de pontuação ASP para o ligante LASSBio-1830 (81) no modelo <i>in silico</i> do receptor CCR4. (A) Vista lateral. (B) Vista invertida.....	93
Figura 30. Compostos <i>N</i> -acilidrazônicos selecionados com base nos estudos <i>in silico</i> , como candidatos a ligantes duais de receptores de quimiocina do tipo CCR3 e CCR4.....	94
Figura 31. Análise retrosintética para a obtenção dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos eleitos para a etapa de síntese.....	95
Figura 32. Espectro de RMN de ¹ H do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (119) (D ₂ O/200 MHz).....	98
Figura 33. (A) Formação do complexo de Vilsmeier-Hack (eletrófilo). (B) Formação dos cloretos de benzenosulfonila 120 e 121	100
Figura 34. (A) Tentativas de esterificação de aminoácidos com TMSCl. (B) Tentativa de esterificação da glicina utilizando-se MAOS.....	102
Figura 35. Metodologia alternativa para a obtenção das sulfonamidas 126 e 127	103
Figura 36. Espectro de RMN de hidrogênio da sulfonamida 126 (200 MHz, DMSO-d ₆).....	103

Figura 37. Espectro de RMN de hidrogênio do éster metílico da glicina na forma de cloridrato (123) (200 MHz, Metanol-d ₄).....	105
Figura 38. Espectro de RMN de hidrogênio da sulfonamida 134 e ampliação (200 MHz, CDCl ₃).....	108
Figura 39. Espectros de RMN de hidrogênio e de carbono-13 da sulfonamida 130 (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl ₃).....	110
Figura 40. Espectro de RMN de hidrogênio da hidrazida 137 (200 MHz, DMSO-d ₆).....	112
Figura 41. Estruturas químicas do acetaldeído (esquerda) e da acetona (direita) com suas respectivas superfícies de potencial eletrostático, calculadas pelo método semiempírico PM3 no programa Spartan '8.0.....	113
Figura 42. Espectros de RMN de ¹ H, ¹³ C e DEPT-135 obtidos para a <i>N</i> -acilidrazona 90 (200 e 50 MHz, respectivamente, DMSO-d ₆).....	120
Figura 43. Experimento de dicroísmo circular dos derivados LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1830 (81) . T(°C)=25, Varredura entre 200-500 nM, Concentração=10 ⁻³ M.....	121
Figura 44: Micrografia do cito-centrifugado do lavado bronco-alveolar obtido a partir de camundongos.....	123
Figura 45: Contagem de leucócitos totais e diferenciais no lavado bronco-alveolar. (A) Contagem leucócitos totais. (B) Contagem de células mononucleares. (C) Contagem de neutrófilos recuperados nas amostras de camundongos provocados com solução salina, LPS, LASSBio-1641 (82) + LPS e LASSBio-1642 (92) + LPS. Os valores representam a média ± EPM de no mínimo 5 animais por grupo. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman Keuls. <i>P</i> < 0,05.....	124
Figura 46: Efeito dos compostos LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1642 (92) sobre o aumento de resistência pulmonar e hiper-reatividade observados após provocação alérgica. Os valores apresentam a média ±EPM de no mínimo 5 animais por grupo.	

*P<0,05 comparado ao grupo não tratado. *P<0,05 comparado ao grupo estimulado intranasalmente com solução salina.....125

Figura 47: Efeito dos compostos LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1642 (92) sobre o aumento de elastância pulmonar e hiper-reatividade observados após provocação alérgica. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. *P<0,05 comparado ao grupo não tratado. *P<0,05 comparado ao grupo estimulado intra nasalmente com solução salina.....125

Figura 48: Efeito do tratamento com composto LASSBio-1765 (91) nas concentrações de 50 μ mol/kg e 100 μ mol/kg sobre o aumento de resistência e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * p<0.05 comparado ao grupo não tratado. + p<0.05 comparado ao grupo estimulado com salina.....126

Figura 49: Efeito do tratamento com composto LASSBio-1765 (91) nas concentrações de 50 μ mol/kg e 100 μ mol/kg sobre o aumento de elastância pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * p<0.05 comparado ao grupo não tratado. +p<0.05 comparado ao grupo estimulado com salina.....127

Figura 50: Contagem de leucócitos totais e diferenciais no lavado bronco-alveolar. As análises incluem: Leucócitos totais (A); Macrófagos (B); Linfócito (C); Eosinófilos (D); e Neutrófilos (E). O tratamento com LASSBio-1765 (91) nas doses de 50 μ mol/kg e 100 μ mol/kg, foi realizada por via intraperitoneal. Os valores representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman-Keuls. P< 0,05.....128

Figura 51: Quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em amostras de tecido pulmonar. Os valores representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo. Análises estatísticas: one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman-Keuls. P<0,05.....129

Figura 52: Efeito do tratamento com LASSBio-1765 (91) sobre a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J. A análise da produção de muco foi avaliada por morfometria digital. Os valores representam a média ± EPM. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman-Keuls. $P < 0,05$	130
Figura 53: Foto micrografias representativas do efeito do tratamento com LASSBio-1765 (91) sobre a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J. Salina (A); Ova + Tween 80 (0,2%) (B); LASSBio-1765 (91) (50µmol/kg) (C) e LASSBio-1765 (91) (50µmol/kg) (D). O tratamento com LASSBio-1765 (91) nas doses de 50 µmol/kg e 100µmol/kg, foi realizada por via <i>i.p.</i>	131
Figura 54: Efeito do composto LASSBio-1765 (91) sobre a quimiotaxia de eosinófilos <i>in vitro</i> induzida por eotaxina murina. As células foram incubadas com LASSBio-1765 (91) nas concentrações de 10 µM e 1 µM; ou meio ou PEG 0,01%, a 37°C por 10 min e estimulados com eotaxina (0,1 µM). Os valores representam a média ± EPM. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman-Keuls. $P < 0,05$. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado teste “t” de Student para amostras não pareadas.....	132
Figura 55: Ensaio realizado com células recombinantes humanas do tipo CHO, estímulo: eotaxina-2 (10 nM), Temperatura de incubação: 28°C, método de detecção: espectroscopia dielétrica. Antagonista de referência J113863 (100%): IC ₅₀ = 5,0 nM.....	133
Figura 56: Estrutura do fragmento molecular VUF13925 (1) e suas interações com os resíduos D2.63 e E7.39 no modelo <i>in silico</i> do receptor CXCR4 (Adaptado de ROUMEN <i>et al.</i> , 2011).....	137
Figura 57: Estrutura do antagonista do receptor de quimiocina CXCR4 (1t1t) (2) e 9 análogos estruturais.....	139
Figura 58: Estrutura de 11 análogos estruturais do antagonista do receptor de quimiocina CXCR4 (1t1t) (2).....	140

Figura 59: Composto 1t1t (2) cristalizado no sítio menor da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4 (Adaptado de ROUMEN <i>et al.</i> , 2011).....	141
Figura 60. O modelo <i>in silico</i> do receptor CXCR4 contendo o ligante 1t1t (2) (branco) e seu análogo estrutural 20 (laranja), mostrando o efeito de interação que moléculas de água fixas podem apresentar no ancoramento molecular.....	144
Figura 61. (A) VUF13925 (1). (B) 1t1t (2). (C) Junção de “A” e “B”, 1 e 2 sobrepostos. Esta representação bidimensional dos resíduos-chave em azul ilustra uma estratégia simplificada para visualizar modificações em potencial.....	145
Figura 62. Estrutura química dos 190 compostos de padrão estrutural piperidínico propostos para a triagem virtual no modelo <i>in silico</i> validado do receptor de quimiocina CXCR4.....	146
Figura 63. Compostos com os maiores valores de PLIF (>0,70) gerados a partir de cálculos de ancoramento molecular por meio da função de pontuação GoldScore, seguidos de pós-processamento utilizando arquivo .IFP com base na estrutura do fragmento VUF13925 (1).....	147
Figura 64. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13925 (1).....	148
Figura 65. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13924 (32).....	149
Figure 66. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13936 (35).....	149
Figura 67. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13930 (38).....	150
Figura 68. Planejamento do fragmento 40, a partir do composto 1t1t (2).....	150
Figura 69. Planejamento dos compostos 48-50 a partir de VUF13925 (1) e VUF14349 (47).....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC ₅₀ para antagonistas seletivos de receptores de quimiocina CCR3 frente a CCR1 (NAYA et al., 2001).....	53
Tabela 2: Análise estatística das funções de pontuação do programa GOLD 5.1 na validação do modelo <i>in silico</i> de CCR3.....	81
Tabela 3: Valores de afinidade dos ligantes e pontuação da função ASP do programa GOLD 5.1 para o modelo <i>in silico</i> de CCR3.....	82
Tabela 4: Análise estatística das funções de pontuação do programa GOLD 5.1 na validação do modelo <i>in silico</i> de CCR4.....	85
Tabela 5: Valores de afinidade dos ligantes e pontuação da função ASP do programa GOLD 5.1 para o modelo <i>in silico</i> de CCR4.....	85
Tabela 6: Valores de pontuação ASP após ancoramento molecular com o programa GOLD 5.1 dos compostos 81-96 planejados como ligantes, juntamente com os 7 antagonistas do receptor CCR3 utilizados na etapa de validação.....	89
Tabela 7: Valores de pontuação ASP após ancoramento molecular com o programa GOLD 5.1 dos compostos 81-96 planejados como ligantes, juntamente com os 7 antagonistas do receptor CCR4 utilizados na etapa de validação.....	92
Tabela 8: Valores de pontos de fusão e aspectos físicos dos cloretos de sulfonila 120 e 121 e dos precursores 118 e 119	101
Tabela 9: Compostos <i>N</i> -acilidrazônicos 81, 82, 89-92 e seus respectivos rendimentos de acordo com a variação do tempo e número de equivalentes de <i>N</i> -benzilpiperidona 108 empregados.....	117
Tabela 10: Compostos <i>N</i> -acilidrazônicos 81, 82, 89-92 e seus respectivos graus de pureza e tempos de retenção determinados por CLAE, assim como valores de P.F e picos registrados por HRMS.....	118
Tabela 11. Avaliação das funções de pontuação GoldScore e ChemPLP, considerando (wet) ou não (dry) as moléculas de água do cristal. As poses de	

ancoramento molecular para os compostos **2-22** foram avaliadas em relação ao valor de PLIF, orientação espacial e interações com resíduos-chave. Os compostos com resultados de qualidade intermediária não foram contabilizados nesta Tabela (informações complementares: ANEXOS 5-8).....143

Tabela 12. Atividade in vitro dos fragmentos sintetizados (ensaio realizado por Marlies C. A. Vreeker).....154

Tabela 13. Atividade in vitro frente ao receptor CXCR4 dos compostos **48-50*** (ensaio realizado por Marlies C. A. Vreeker).....157

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de obtenção do 2-metil-3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (118) e do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (119).....	97
Esquema 2: Reação de obtenção dos cloretos de 2-metil-4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (120) e de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (121).....	99
Esquema 3: Reação de obtenção do cloridrato de éster metílico da glicina (123).....	104
Esquema 4: Procedimento geral empregado para a síntese das sulfonamidas 129-134.....	106
Esquema 5: Procedimento geral empregado para a síntese das hidrazidas 135-140.....	111
Esquema 6: Metodologia teste para obtenção das <i>N</i> -acilidrazonas LASSBio-1842 (143) e 144.....	114
Esquema 7: Metodologia teste para obtenção da <i>N</i> -acilidrazona LASSBio-1844 (146).....	115
Esquema 8: Metodologia geral empregada na obtenção das <i>N</i> -acilidrazonas planejadas como ligantes duais de receptores CCR3 e CCR4 (81, 82, 89-92).....	116
Esquema 9: Síntese dos fragmentos amídicos VUF14427 (30), VUF14363 (34) e VUF14364 (39).....	151
Esquema 10: Síntese do fragmento VUF14428 (31).....	152
Esquema 11: Síntese dos fragmentos 1, 36, 37, 40, 24 e 33.....	152
Esquema 12: Síntese dos compostos 48-50.....	156

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å : Angstrom

AIDS : *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AINEs : Anti-inflamatórios não esteroidais

Ala (A) : Resíduo do aminoácido alanina

ANOVA : *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

ASP : *Astex Statistical Potential*

Asp (D) : Resíduo do aminoácido aspartato

CHO : *Chinese Hamster Ovary* (Ovário de Hamster Chinês)

CI₅₀ : Concentração inibitória

CCF : Cromatografia em Camada Fina

CCL(n°) : Ligante do receptor de quimiocina CC(n°)

CCR(n°) : Receptor de Quimiocina do Tipo CCR(n°)

CDCl₃ : Clorofórmio deuterado

CLAE : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CXCL(n°) : Ligante do receptor de quimiocina CXC(n°)

CXCR(n°) : Receptor de Quimiocina do Tipo CXCR(n°)

Cys (C) : Resíduo do aminoácido cisteína

Da : Dalton

DCM : Diclorometano

DEPT : *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DFT : *Density Functional Theory* (Teoria do Funcional de Densidade)

DMF : *N,N*-dimetilformamida

DMSO-d₆ : Dimetilsulfóxido deuterado

DPOC : Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

D₂O : Água deuterada

EDTA : Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA : *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EPM : Erro-Padrão da Média

FBVS : *Fragment-Based Virtual Screening* (Triagem Virtual Baseada em Fragmentos)

FDA : *Food and Drug Administration*

Gln (Q) : Resíduo do aminoácido glutamina⁷

Glu (E) : Resíduo do aminoácido glutamato

GPCRs : Receptores Acoplados à Proteína G

hERG : *the human Ether-à-go-go-Related Gene* (Gene Relacionado ao Éter-à-go-go humano)

HIV-1 : *Human immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência humana)

HRMS : *High Resotulion Mass Spectroscopy* (Espectrometria de Massas de Alta Resolução)

IFP : Interaction Fingerprint (Impressão Digital da Interação)

IGF : Interconversão de Grupo Funcional

IL(n°) : Interleucina(n°)

Ile (I) : Resíduo do aminoácido isoleucina

i.p. : Intraperitoneal

IV : Infravermelho

J : Constante de acoplamento

KBr : Brometo de Potássio

Ki : Constante de inibição

LPS : Lipopolissacarídeo

Lys (K) : Resíduo do aminoácido lisina

MAOS : *Microwave-Assisted Organic Synthesis* (Síntese Orgânica Assistida por Micro-Ondas)

MDC : *Macrophage-Derived Chemokine* (Quimiocina Derivada de Macrófago)

MHz : Mega Hertz

MMFF : *Merck Molecular Force Field* (Campo de Força Molecular da Merck)

MOE : *Molecular Operating Environment* (Ambiente de Operação Molecular)

NCBI : *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)

NK : *Natural Killer* (Assassinas Naturais)

OVA : Ovoalbumina

PDB : *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteína)

PEG : Polietilenoglicol

P.F. : Ponto de fusão

Phe (F) : Resíduo do aminoácido fenilalanina

PLIF : *Protein-Ligand Interaction Fingerprint* (Impressão Digital da Interação Ligante-Proteína)

PM3 : *Parametric Method 3* (Método Paramétrico 3)

ppm : Partes por milhão

SBDD : *Structure Based Drug Design* (Planejamento de Fármacos Baseados do Receptor)

RANTES : *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (Células T Normais Expressas e Secretadas, Reguladas na Ativação)

REA : Relação Estrutura-Atividade

RMN : Ressonância Magnética Nuclear

rmsd : *Root-Mean-Square Deviation*

SCF : *Stem Cell Factor* (Fator de células tronco)

SDM : *Site Directed Mutagenesis* (Mutagênese Sítio Dirigida)

SEAr : Substituição Eletrofílica Aromática

Ser (S) : Resíduo do aminoácido serina

S_N2 : Substituição Nucleofílica Bimolecular

TARC : *Thymus and Activation-Regulated Chemokine* (Quimiocina de Ativação e Regulação do Timo)

TEA : Trietilamina

T_H cells : *T helper cells* (Células auxiliaroras do tipo T)

TMs : Transmembranares

TMSCl : Cloreto de Trimetilsilano

TOF : *Time-of-Flight* (Tempo de Voo)

Trp (W) : Resíduo do aminoácido triptofano

TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin* (Linfopoiatina Estromal Tímica)

Tyr (Y) : Resíduo do aminoácido tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	37
1.1 QUIMIOCINAS: ASPECTOS GERAIS.....	37
1.2 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS E SEUS LIGANTES: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES.....	39
1.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXC DO TIPO 4 (CXCR4).....	41
1.4 O RECEPTOR DE QUIMIOCINA CC DO TIPO 3 (CCR3) E A BUSCA DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS.....	45
1.5 O RECEPTOR DE QUIMIOCINA CC DO TIPO 4 (CCR4) E A BUSCA DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS.....	54
1.6 A ASMA E SUA RELAÇÃO COM OS RECEPTORES DE QUIMIOCINA DOS TIPOS CCR3 E CCR4.....	60
2 OBJETIVOS.....	64
2.1 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.1 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DOS MODELOS <i>IN SILICO</i> DE RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR3 E CCR4.....	70
3.2 VALIDAÇÃO DOS MODELOS <i>IN SILICO</i> DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4.....	78
3.2.1 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES DA LITERATURA DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR3 E CCR4.....	78
3.2.2 ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM OS LIGANTES DE CCR3 PARA VALIDAÇÃO.....	81
3.2.3 ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM OS LIGANTES DE CCR4 PARA VALIDAÇÃO.....	84

3.3 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM MODELOS <i>IN SILICO</i> DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4.....	87
3.3.1 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM RECEPTORES DE QUIMIOCINA DO TIPO CCR3.....	88
3.3.2 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM RECEPTORES DE QUIMIOCINA DO TIPO CCR4.....	91
3.3.3 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE NOS ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	94
3.4 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE.....	95
3.4.1 ANÁLISE RETROSSÍNTÉTICA.....	95
3.4.2 OBTENÇÃO DOS CLORETOS DE BENZENOSSULFONILA 120 E 121	98
3.4.3 REAÇÕES ENVOLVENDO OS AMINOÁCIDOS GLICINA E <i>S</i> -PROLINA VISANDO A OBTENÇÃO DOS ESTERES 129-134	101
3.4.4 OBTENÇÃO DAS SULFONAMIDAS 129-134 DERIVADAS DE ÉSTERES DE AMINOÁCIDOS 125 , 123 e 128	105
3.4.5 HIDRAZINÓLISE DOS ÉSTERES COM SUBUNIDADE SULFONAMÍDICA DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS.....	111
3.4.6 ETAPA DE OBTENÇÃO CARACTERIZAÇÃO DAS <i>N</i> -ACILIDRAZONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS.....	113
3.5 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS 81 , 82 , 89-92	122
3.5.1 EFEITO DOS DERIVADOS LASSBio-1641 (82) E LASSBio-1642 (92) SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	122
3.5.2 ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS DERIVADOS LASSBio-1641 (82) E LASSBio-1642 (92) SOBRE A HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS E ELASTÂNCIA PULMONAR DAS VIAS AÉREAS PERIFÉRICAS.....	124

3.5.3	ATIVIDADE DO COMPOSTO LASSBio-1765 (91) NAS ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS ASSOCIADAS À INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR.....	126
3.5.4	AVALIAÇÃO DE LASSBio-1765 (91) QUANTO AO PERFIL LEUCOCITÁRIO NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL).....	127
3.5.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LASSBio-1765 (91) SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCINAS EM AMOSTRAS DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM OVA.....	128
3.5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LASSBio-1765 (91) QUANTO A INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUÇO NAS VIAS AÉREAS.....	129
3.5.7	EFEITO DE DE LASSBio-1765 (91) NA MOBILIZAÇÃO DE EOSINÓFILOS <i>IN VITRO</i>	131
3.5.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS 81, 82, 89-92 EM ENSAIOS <i>IN VITRO</i> ENVOLVENDO CÉLULAS RECOMBINANTES ESTIMULADAS POR EOTAXINA-2.....	132
3.6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	134
4	CAPÍTULO COMPLEMENTAR – ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE FRAGMENTOS E MICROMOLÉCULAS LIGANTES DE RECEPTORES DO TIPO CXCR4.....	136
4.1	PREAMBULO.....	136
4.2	PESQUISADORES ENVOLVIDOS E FILIAÇÃO.....	136
4.3	RESUMO.....	137
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	138
4.4.1	VALIDAÇÃO DO MODELO DO RECEPTOR CXCR4.....	138
4.4.2	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	145
4.4.3	TRIAGEM VIRTUAL DOS LIGANTES PLANEJADOS.....	147

4.4.4	SELEÇÃO DE FRAGMENTOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE EM UMA QUIMIOTECA DE FRAGMENTOS COM ATIVIDADE IN VITRO FRENTE AO RECEPTOR CXCR4.....	148
4.4.5	SÍNTESE DOS FRAGMENTOS PIPERIDÍNICOS.....	151
4.4.6	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DOS FRAGMENTOS PIPERIDÍNICOS.....	153
4.4.7	COMPOSTOS ORIGINADOS DO CRESCIMENTO DO FRAGMENTO VUF13925 (1).....	155
4.4.8	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DOS COMPOSTOS ORIGINADOS DO CRESCIMENTO DO FRAGMENTO VUF13925 (1).....	156
4.4.9	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	158
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	159
5.1	METODOLOGIAS EMPREGADAS NA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS COMPUTACIONAIS.....	159
5.1.1	CONSTRUÇÃO DOS MODELOS POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4.....	160
5.1.2	ORIENTAÇÃO MANUAL DOS ANTAGONISTAS UCB-35625 (9) (CCR3) E 52 (CCR4) EM SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES.....	161
5.1.3	ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM LIGANTES DA LITERATURA PARA VALIDAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4.....	162
5.1.4	ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM OS COMPOSTOS PLANEJADOS E OS MODELOS VALIDADOS DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4.....	163

5.1.5	TRATAMENTO E ANCORAMENTO MOLECULAR DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXCR4 COM O ANTAGONISTA 1t1t (8) E SEUS ANÁLOGOS.....	164
5.1.6	PÓS-PROCESSAMENTO DOS RESULTADOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR DO RECEPTOR CXCR4 COM O ANTAGONISTA 1t1t (8) E SEUS ANÁLOGOS E VALIDAÇÃO DO MODELO.....	165
5.1.7	CONSTRUÇÃO DOS 190 COMPOSTOS PLANEJADOS COM BASE NO ANTAGONISTA 1t1t (8) E NO FRAGMENTO DE PADRÃO ESTRUTURAL PIPERIDÍNICO VUF13925 (1) E TRIAGEM VIRTUAL FRENTE AO MODELO <i>in silico</i> DO RECEPTOR CXCR4.....	166
5.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS E PRODUTOS FINAIS.....	167
5.2.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS 2-METIL-3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (118) E DO 3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (119).....	168
5.2.1.1	2-METIL-3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (118).....	169
5.2.1.2	3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (119).....	169
5.2.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DOS CLORETOS DE 2-METIL-4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (120) E 4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (121).....	170
5.2.2.1	CLORETO DE 2-METIL-4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (120).....	171
5.2.2.2	CLORETO DE 4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (121).....	171
5.2.3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DO CLORIDRATO DO ÉSTER METÁLICO DA GLICINA (123).....	172

5.2.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMIDAS (129-134).....	173
5.2.4.1	2-(6-METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE METILA (131).....	174
5.2.4.2	2-(BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE METILA (132).....	174
5.2.4.3	2-(<i>N</i> ,6-DIMETILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE ETILA (133).....	175
5.2.4.4	2-(<i>N</i> -METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE ETILA (134).....	176
5.2.4.5	(<i>S</i>)-1-((6-METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA (129).....	176
5.2.4.6	(<i>S</i>)-1-((BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA (130).....	177
5.2.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS HIDRAZIDAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMÍDICAS (135-140).....	178
5.2.5.1	2-(6-METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA (137).....	179
5.2.5.2	2-BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA (138).....	179
5.2.5.3	2-(<i>N</i> ,6-DIMETILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA (139).....	180
5.2.5.4	2-(<i>N</i> -METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA (140).....	181
5.2.5.5	(<i>S</i>)-1-((6-METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-ACETIL HIDRAZIDA (135).....	182

5.2.5.6	(S)-1-((BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-ACETIL HIDRAZIDA (136).....	183
5.2.6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS N- ACILIDRAZONAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMÍDICAS (81, 82 89-92).....	184
5.2.6.1	N-(2-(2-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)-2-OXOETIL)-6- METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA LASSBio-1843 (90).....	185
5.2.6.2	N-(2-(2-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)-2-OXOETIL) BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA LASSBio-1831 (89).....	186
5.2.6.3	N-(2-(2-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)-2-OXOETIL)-N,6- DIMETILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA LASSBio-1642 (92).....	187
5.2.6.4	N-(2-(2-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)-2-OXOETIL)-N- METILBENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA LASSBio-1765 (91).....	188
5.2.6.5	(S)-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)-1-((6-METILBENZO[<i>d</i>][1,3] DIOXOL-5-ILSULFONIL)-PIRROLIDINO-2-CARBOIDRAZIDA LASSBio- 1641 (82).....	190
5.2.6.6	(S)-1-BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOL-5-ILSULFONIL-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4- ILIDENO)PIRROLIDINO-2-CARBOIDRAZIDA LASSBio-1830 (81).....	191
5.2.7	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS N- ACILIDRAZONAS MOLECULARMENTE SIMPLIFICADAS LASSBio-1842 (143) e 144.....	192
5.2.7.1	N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)BENZOIDRAZIDA LASSBio-1842 (143).....	193

5.2.7.2	<i>N'</i> -(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO-BENZO[<i>d</i>][1,3]DIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA (144)	194
5.2.8	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DO (S)-1-NAFTALEN-2-ILSULFONIL-PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA.....	196
5.2.9	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DA (S)-1-(NAFTALEN-2-ILSULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOIDRAZIDA (145)	197
5.2.10	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DA (S)- <i>N'</i> -(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENE)-1-(NAFTALEN-2-ILSULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOIDRAZIDA LASSBio-1844 (146)	198
5.3	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE DOS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS.....	200
5.3.1	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-1641 (82) E LASSBio-1642 (92)	200
5.3.1.1	INFLAMAÇÃO PULMONAR POR LPS E TRATAMENTOS.....	200
5.3.1.2	AVALIAÇÃO DA HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS.....	201
5.3.1.3	LAVAGEM BRONCIALVEOLAR (BAL) E CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS.....	201
5.3.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO DERIVADO <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICO LASSBIO-1765 (91) EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA.....	202
5.3.2.1	SENSIBILIZAÇÃO, DESAFIO ANTIGÊNICO E TRATAMENTOS.....	202

5.3.2.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR E HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS.....	203
5.3.2.3 TÉCNICA DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL).....	203
5.3.2.4 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS.....	204
5.3.2.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS.....	204
5.3.2.6 CONFEÇÃO DOS CORTES PARA A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	205
5.3.2.7 QUANTIFICAÇÃO DO MUCO POR MORFOMETRIA DIGITAL.....	205
5.3.2.8 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....	206
5.3.2.9 ESTÍMULO QUIMIOTÁTICO.....	206
5.3.2.10 TRATAMENTO DOS EOSINÓFILOS COM LASSBIO-1765 (91).....	206
5.3.2.11 QUIMIOTAXIA EM CÂMARA DE BOYDEN MODIFICADA.....	206
5.3.2.12 CONTAGEM CELULAR NO FILTRO.....	207
5.3.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA – ENSAIO FUNCIONAL DE RECEPTOR NUCLEAR E CELULAR (CEREP).....	207
5.3.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO DOS FRAGMENTOS E MICROMOLÉCULAS DE PADRÃO ESTRUTURAL PIPERIDÍNICO FRENTE AOS RECEPTORES CXCR4.....	208
5.3.4.1 PREPARAÇÃO DA MEMBRANA.....	208
5.3.4.2 ENSAIO DO BINDING COM RADIOLIGANTE.....	209
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	210
7 ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO PROJETO DE DOUTORADO.....	222
8 ANEXOS.....	269

1. INTRODUÇÃO

1.1 QUIMIOCINAS: ASPECTOS GERAIS

As quimiocinas são pequenas proteínas homólogas (8-15 kDa) que, através da interação com receptores cognatos, controlam o tráfego celular em condições fisiológicas (KOELINK et al., 2012; WHITE et al., 2013), *e.g.* homeostase, imunidade adaptativa e na migração de células inflamatórias, as quais são responsáveis pela reação do organismo contra processos desenvolvidos por alérgenos e autoimunes crônicos, sendo estas classificadas como quimiocinas homeostáticas. Por outro lado, alguns destes polipeptídeos também participam do controle da migração celular em condições patológicas, *e.g.* patogênese de tumores, doenças autoimunes e a doenças inflamatórias, sendo portanto, classificados como quimiocinas inflamatórias (D'AMBRÓSIO et al., 2003; RAMAN et al., 2011; SZPAKOWSKA et al., 2012).

A grande maioria das quimiocinas são secretadas pelas células após biossíntese, com exceção da CX3CL1 (fractalina) e CXCL16 (SR-PSOX), as quais permanecem na superfície celular (WHITE et al., 2013). A primeira quimiocina descrita, *i.e.* CXCR8 (IL-8), foi descoberta por Yoshimura et al. (1987) como um importante fator de quimioatração de neutrófilos e, em seguida, várias outras quimiocinas foram descobertas e a elas foi atribuída a modulação da quimiotaxia de grupos específicos de leucócitos.

São descritas na literatura cerca de 50 quimiocinas (CHOI et al., 2012) relacionadas a espécie humana e estas são classificadas em 4 classes de acordo com a posição da ponte dissulfeto formada entre resíduos de cisteína (Cys, C) presentes na região N-terminal do polipeptídeo, a saber: **(a)** CXC, **(b)** CC, **(c)** C e **(d)** CX3C (**Figura 1**). Estas quatro classes apresentam estrutura terciária conservada e estão intimamente ligadas a classificação dos aproximadamente 20 receptores de quimiocinas conhecidos. Neste contexto, é importante destacar que a subunidade N-terminal das quimiocinas possuem um papel crítico na ativação de seus respectivos receptores, podendo suas particularidades e alterações estruturais serem

responsáveis por quimiocinas com atividade agonista, inativas ou mesmo capazes de atuarem como antagonistas (ROSTÈNE et al., 2007; WHITE et al., 2013).

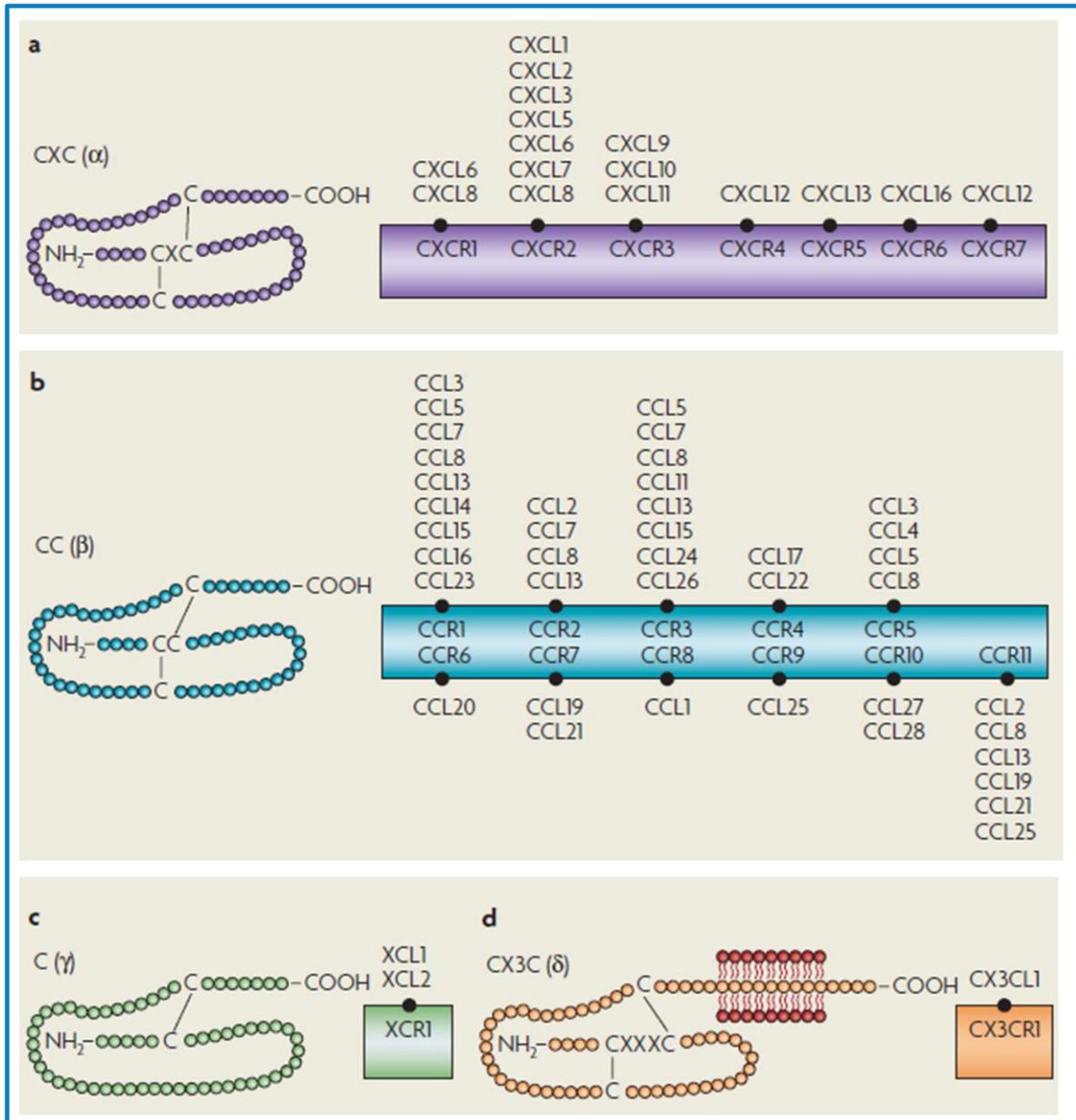


Figura 1. Classificação e exemplos de quimiocinas com base na posição dos resíduos de cisteína conservados: **(a)** quimiocinas CXC (α), **(b)** quimiocinas CC (β), **(c)** quimiocinas C (γ) e **(d)** quimiocinas CX3C (δ) (adaptado de ROSTÈNE et al., 2007).

1.2 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS E SEUS LIGANTES: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES

Os receptores de quimiocinas são proteínas (8-14 kDa) que pertencem a classe A da superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*) (THIELE et al., 2012; WHITE et al., 2013). Os receptores de quimiocinas podem formar homo- ou heterodímeros (RODRÍGUES-FRADE et al., 2001; RAMAN et al., 2011), que estão envolvidos em diversos processos inflamatórios de doenças que ainda são um desafio para os químicos medicinais e para a indústria farmacêutica, como por exemplo: artrite reumatoide, esclerose múltipla, asma (TAKA et al., 2008), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (CARAMORI et al., 2003), câncer metastático (GROS et al., 2012), síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immune deficiency syndrome*) (PLANESAS et al., 2012) e dor neuropática (WHITE et al., 2013).

Neste contexto, estudos envolvendo o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de ligantes deste grupo de GPCRs com padrão estrutural não peptídico têm se mostrado uma abordagem eficiente adotada por vários grupos de pesquisa na academia e em companhias farmacêuticas (BLAKENEY et al., 2007). Os progressos no desenho de fármacos baseados na estrutura (SBDD, do inglês *structure based drug design*) de diversos GPCRs trouxeram informações valiosas para a compreensão de importantes interações ligante-proteína e para o desenvolvimento de novos ligantes e antagonistas de receptores de quimiocinas (CONGREVE et al., 2011) como alternativas relevantes para o bloqueio do recrutamento celular relacionado ao efeito de quimiocinas, como pode ser visto em vários artigos que exploram a diversidade química dos antagonistas de receptores de quimiocinas (GAO & METZ, 2003; PEASE & HORUK, 2012), incluindo peptídeos (MUNGALPARA et al., 2012), anticorpos monoclonais (CATLEY et al., 2011) e pequenas moléculas de origem sintética (THOMA et al., 2008; WIJTMANS et al., 2012).

Os receptores do tipo CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 e CXCR4 são exemplos de receptores de quimiocinas que possuem antagonistas em ensaios farmacológicos pré-clínicos ou como fármacos já registrados pelo órgão regulatório de fármacos nos EUA, o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), como pode ser observado na **Figura 2**. As estruturas mostradas nesta **Figura**, ilustram a recorrente presença de grupos funcionais amida, sulfonamida e ureia (em vermelho), assim como átomos de nitrogênio básicos ou carregados positivamente (em azul) na arquitetura molecular destes antagonistas. Enquanto os antagonistas BX471 (**1**) e JNJ-17166864 (**2**) tiveram seus estudos interrompidos devido a falta de eficácia em estudos clínicos de fase II, os compostos BMS-639623 (**3**) e GSK2239633 (**4**) estão com estudos clínicos fase I em andamento. O antagonistas de receptores de quimiocinas maraviroc (**5**) e plerixafor (**6**) são fármacos registrados pelo FDA para o tratamento da AIDS e mieloma múltiplo, respectivamente (PEASE & HORUK, 2012; WHITE et al., 2013).

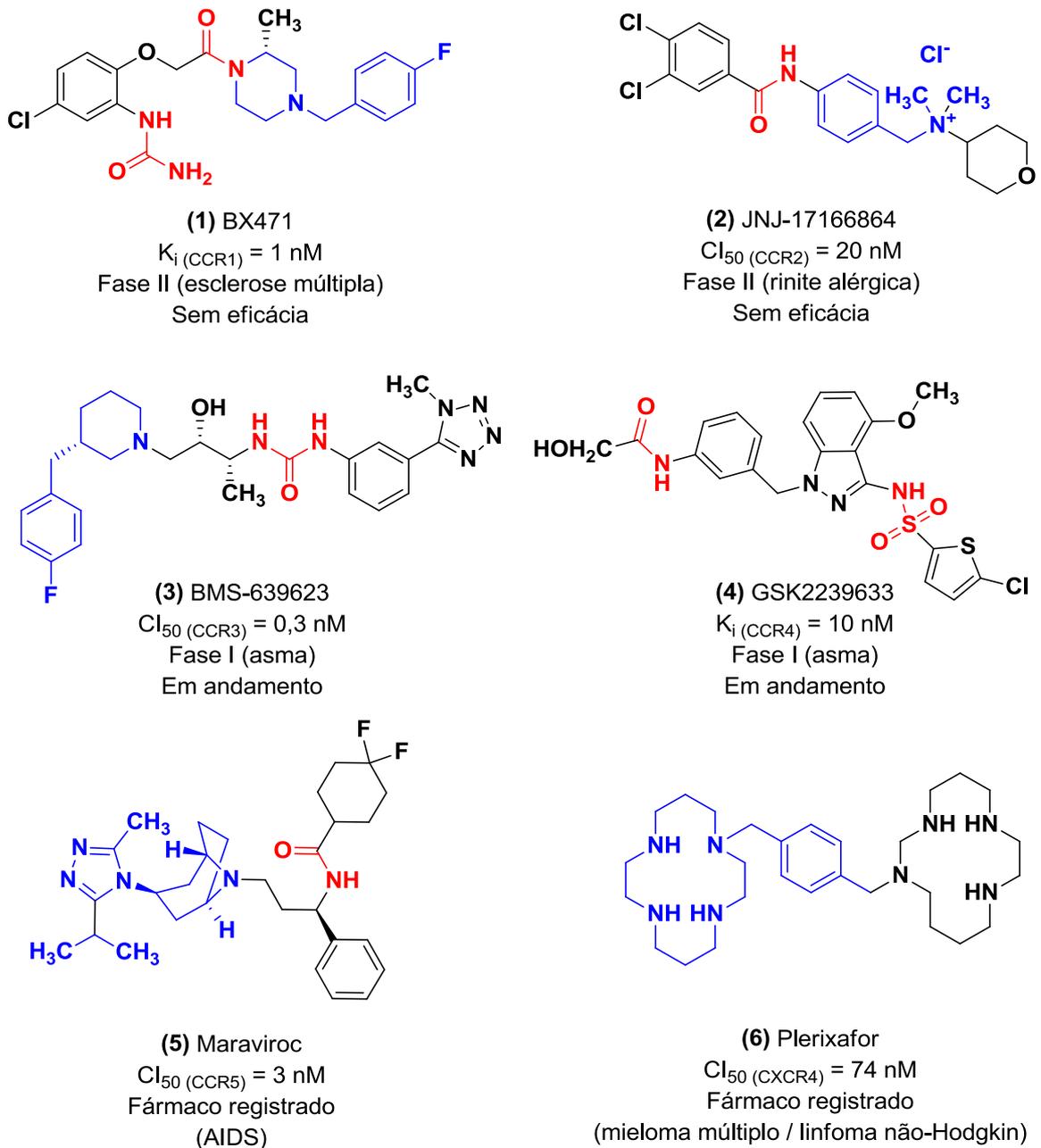


Figura 2. Fármacos e candidatos a fármacos registrados como antagonistas dos receptores de quimiocina dos tipos CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 e CXCR4 (PEASE & HORUK, 2012).

1.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXC DO TIPO 4 (CXCR4)

O receptor de quimiocinas CXCR4, o qual é expresso em células T, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B (HORUK, 2009), é provavelmente o mais conhecido receptor de quimiocina até o

momento. Como agonista endógeno deste receptor podemos citar a quimiocina CXCL12, sendo ela responsável pelo processo inflamatório envolvido na infecção do HIV-1 (*Human immunodeficiency virus*), câncer, tumores sólidos, artrite reumatoide e asma alérgica (CHOI et al., 2012). Um antagonista de CXCR4 eficiente pode promover o controle efetivo destas respostas fisiológicas, por esta razão vários trabalhos científicos vem relatando esforços para o desenvolvimento de novos antagonistas do receptor CXCR4 (ABOYE et al., 2012; BOGGS et al., 2009; LEFRANÇOIS et al., 2012; MUNGALPARA et al., 2012; THOMA et al., 2008; YOSHIKAWA et al., 2012).

As primeiras estruturas cristalográficas de receptores de quimiocinas foram publicadas em 2010 para o homodímero do receptor CXCR4 cristalizado com o antagonista peptídico CVX15 (7) (no sítio maior) e para um outro cristal com o antagonista 1t1t (8) (no sítio menor) em 3,2 e 2,5 Å de resolução, respectivamente (WU et al., 2010) (Figura 3).

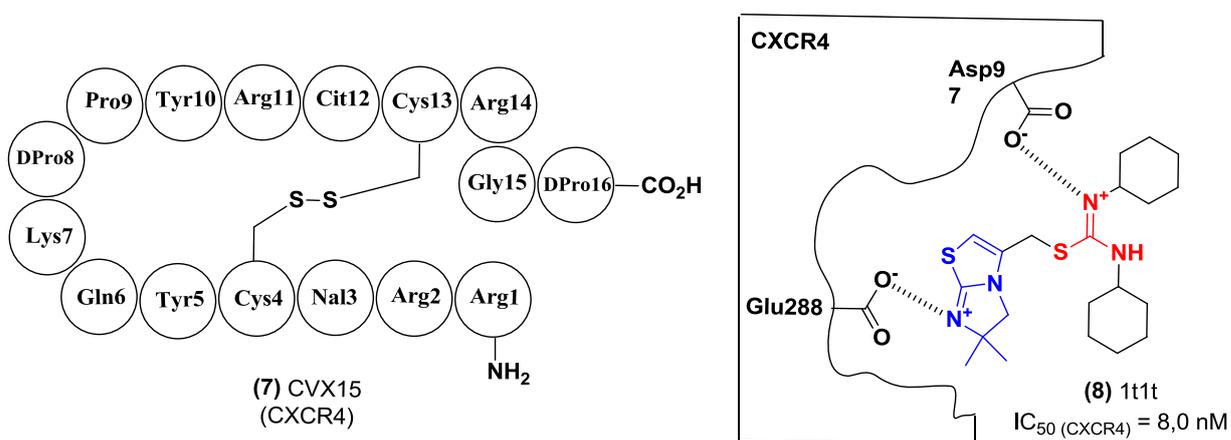


Figura 3. Antagonistas do receptor de quimiocina CXCR4 com padrões estruturais peptídico (7) e heterocíclico (8) (WU et al., 2010).

Quanto as regiões de reconhecimento molecular dos receptores de quimiocinas, o sítio menor é compreendido entre as hélices transmembranares (TMs)

1, 2, 3 e 7 enquanto que o sítio maior é compreendido entre as hélices 3, 4, 5, 6 e 7 (ROUMEN et al., 2012) (Figura 4). Dois anos após a descoberta da estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4, foi publicada a estrutura do receptor de quimiocina CXCR1 humano, sendo esta a primeira estrutura de GPCR descoberta utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (PARK et al., 2012). Antes destas descobertas, a rodopsina bovina [PDB ID: 1F88]¹ foi frequentemente usada para a construção de modelos *in silico* de receptores de quimiocinas assim como para outros GPCRs sem estrutura cristalográfica elucidada (BAYRY et al., 2008; YOKOYAMA et al., 2008a). A estrutura cristalográfica do receptor β_2 -adrenérgico também foi usada como molde alternativo para a construção de modelos *in silico* de GPCRs, por exemplo, os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 (CARTER & TEBBEN, 2009).

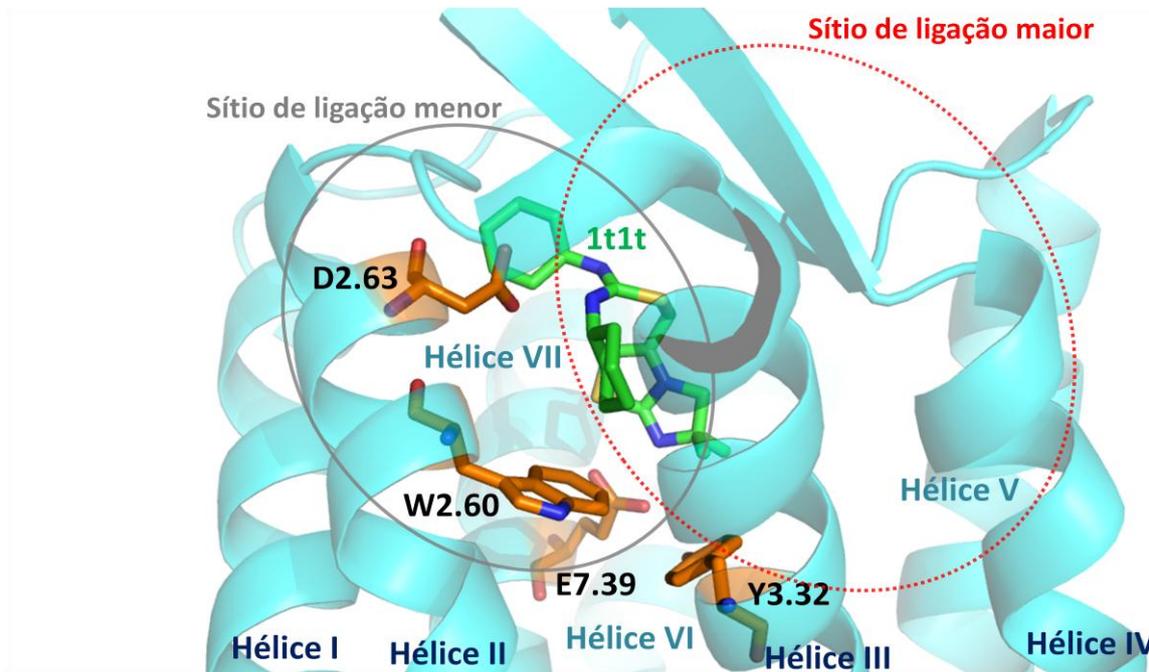


Figura 4. Vista do ligante 1t1t (8) (em verde) co-cristalizado com o receptor CXCR4 (Hélices em azul). Alguns resíduos (em laranja) são mostrados de acordo com a numeração Ballesteros-Weinstein e os sítios de ligação menor e maior são mostrados em cinza e vermelho, respectivamente (WU et al., 2010). Figura elaborada a partir do cristal de CXCR4 [PDB ID: 3ODU] (Protein Data Bank) com o programa PyMol e edição final com o programa Powerpoint.

1. Pymol (edição final): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Os receptores de quimiocinas apresentam entre 20-90% de homologia em suas sequências primárias (ROSTÈNE et al., 2007) e esta similaridade tem sido explorada na construção de novos modelos *in silico* de receptores de quimiocinas a partir dos receptores CXCR4 (KOTHANDAN et al., 2012), especialmente do cristal contendo a micromolécula antagonista 1t1t (**8**) [PDB ID: 3ODU] para a qual as principais interações ligante-receptor podem ser melhor observadas (**Figura 4**).

No caso do cristal do receptor CXCR4 contendo o antagonista 1t1t (**8**), os átomos de nitrogênio carregados positivamente interagem por meio de interações iônicas com os resíduos de aminoácidos de aspartato Asp97 (presente na hélice II, D2.63) e de glutamato Glu288 (presente na hélice VII, E7.39) (**Figura 4**). As distâncias entre os átomos de nitrogênio de **8** e estes dois resíduos são de 2,7 e 2,8 Å, respectivamente (**Figura 3**). Além disso, o resíduo de triptofano Trp94 (presente na hélice II, W2.60) interage por meio de interações hidrofóbicas com uma das subunidades cicloexila, enquanto que o resíduo de tirosina Tyr116 (presente na hélice III, Y3,32) interage por meio de interações hidrofóbicas com duas metilas ligadas diretamente ao anel heterocíclico do antagonista 1t1t (**8**). Estas interações ligante-receptor podem ser usadas para auxiliar a identificação de resíduos chave nos modelos *in silico* construídos a partir da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4 (WU et al., 2010).

A forma como os resíduos de aminoácidos são representados na **Figura 4** segue o sistema de numeração desenvolvido por Ballesteros e Weinstein, para o qual os aminoácidos são representados pelas letras correspondentes, seguido por um número referente a que hélice na qual o resíduo está presente, por exemplo, o aspartato (Asp, D) na posição 97, que está presente na segunda hélice transmembranar (II) é representado como **D2.63**. O número 63 é obtido a partir do resíduo mais conservado na hélice II. Para cada uma das 7 hélices o resíduo mais conservado recebe o número 50, ou seja, 1.50, 2.50, 3.50, 4.50, 5.50, 6.50 e 7.50. De modo ascendente ou descendente os resíduos correspondentes são identificados. Este

tipo de notação é uma ferramenta muito útil quando se deseja comparar receptores na mesma classe ou família visto que resíduos equivalentes (na mesma hélice e altura/posição) podem ser comparados de forma mais clara (BALLESTEROS & WEINSTEIN, 1995).

1.4 O RECEPTOR DE QUIMIOCINA CC DO TIPO 3 (CCR3) E A BUSCA DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS

Os receptores de quimiocina CC do tipo 3 (CCR3), os quais são expressos em eosinófilos, basófilos, células T, monócitos e macrófagos, foram descritos pela primeira vez em 1996 e estão envolvidos na regulação dos processos inflamatórios da asma, DPOC (SCHOLTEN et al., 2012) e rinite (HORUK, 2009) através do reconhecimento molecular das quimiocinas CCL5 (RANTES) (CLEMETSON et al., 2000), CCL6-8, CCL11 (eotaxina), CCL13, CCL15, CCL24 (eotaxina-2) e CCL26 (eotaxina-3) (WHITE et al., 2013).

Agonistas plenos, parciais e inversos do receptor CCR3 conhecidos (WAN et al., 2002) e estudos de mutagênese sítio-dirigido envolvendo o antagonista dual CCR1/CCR3 UCB-35625 **(9)** (SABROE et al., 2000; MENDONÇA et al., 2005) e o agonista CH0076789 **(10)** (WISE et al., 2007) (**Figura 5**) contribuíram significativamente para o entendimento de fatores estruturais associados a modulação do receptor CCR3 (WISE et al., 2007; ROUMEN et al., 2012). Em contrapartida, o desenho, a síntese e a avaliação farmacológica de novos antagonistas de receptores CCR3 (WACKER et al., 2002; TING et al., 2005a; TING et al., 2005b; KAUFFMAN et al., 2006; JAIN et al., 2011 ALLEGRETTI et al., 2012) tem fornecido mais ferramentas para a busca de antagonistas novos e efetivos.

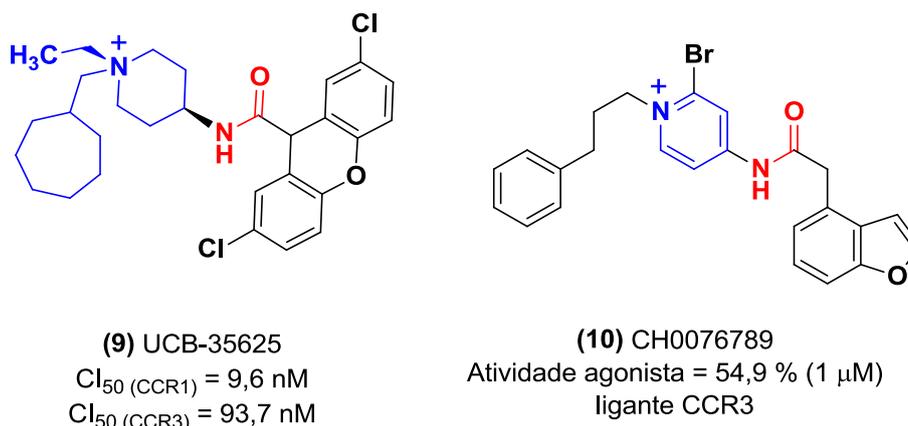


Figura 5. Estruturas e perfil de atividade farmacológica do antagonista do receptor de quimiocina CCR3 **9** e o agonista **10** (WISE et al., 2007), (SABROE et al., 2000).

Para grande parte dos antagonistas de CCR3, *e.g.* os compostos mostrados na **Figura 6 (11-16)**, são observados ao menos uma subunidade amida ou ureia (em vermelho) e ao menos um átomo de nitrogênio básico ou carregado positivamente (em azul), frequentemente ligado a uma subunidade aromática, como pode ser observado no caso dos potentes derivados ureídicos **12-14**, os quais diferem entre si estruturalmente na subunidade à esquerda da subunidade ureídica, assim como nos derivados amídicos **15** e **16**, apresentam o grupo funcional amida (PEASE & HORUK, 2012), (GARDNER et al., 2008), (DE LUCCA et al., 2005), (PRUITT et al., 2007), (SATO et al., 2009), (CHERNEY et al., 2008), (TING et al., 2005a), (NITTA et al., 2012).

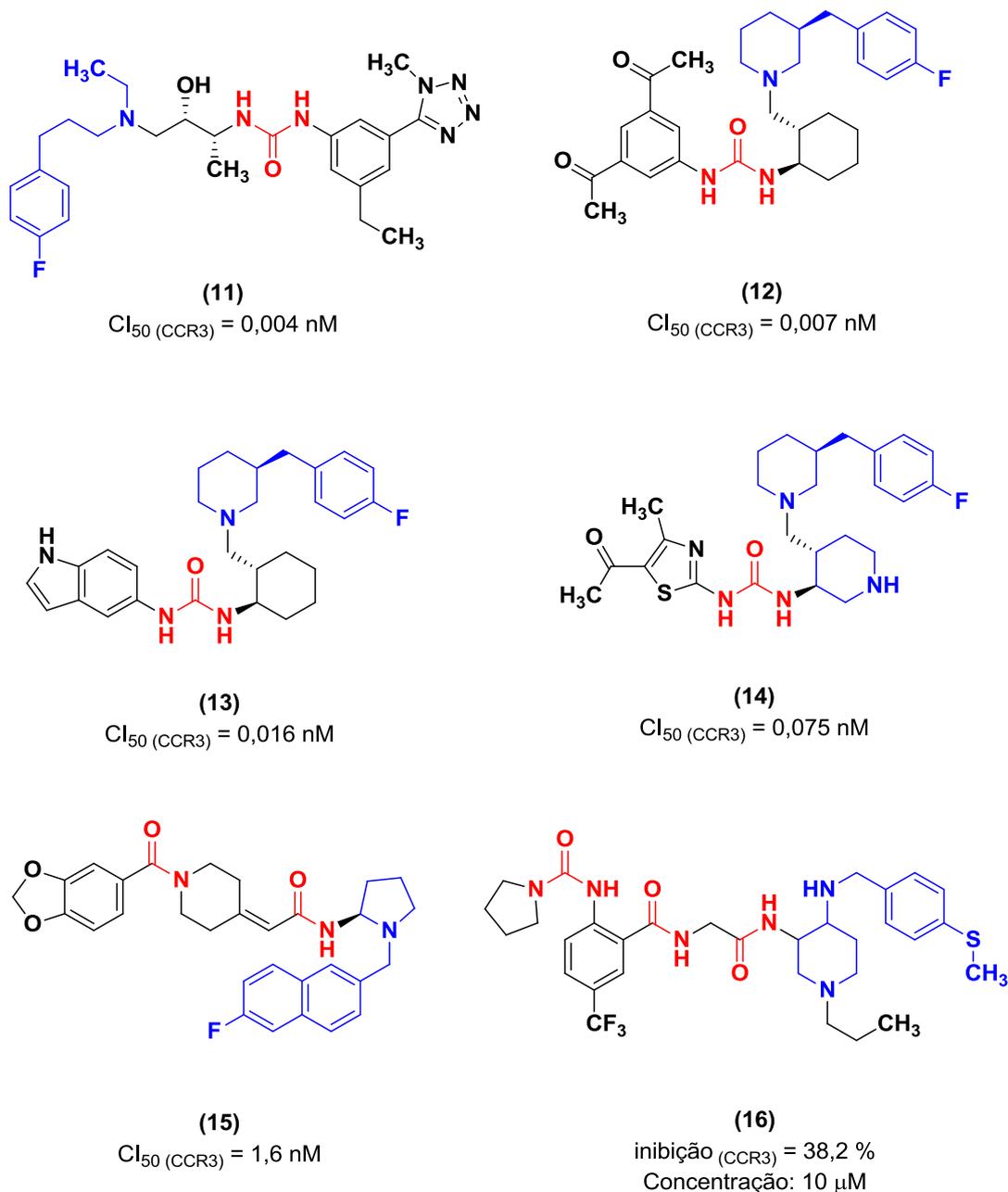


Figura 6. Estruturas, Cl_{50} e atividade inibitória de antagonistas do receptor de quimiocina CCR3 (11-16) (GARDNER et al., 2008), (DE LUCCA et al., 2005), (PRUITT et al., 2007), (SATO et al., 2009), (CHERNEY et al., 2008).

A subunidade bispiperidina amida substituída do composto **17** é um exemplo que pode ser usado para investigação da relação estrutura-atividade (REA) envolvendo antagonistas de receptores de quimiocinas CCR3 (**Figura 7**). Quando a subunidade (2-metil)benzila (**A**) é substituída pelas subunidades potencialmente

aceptoras de ligação de hidrogênio 4-aminofenila (**18**) ou 3-quinolinila (**19**), observa-se aumento da constante de inibição (K_i), enquanto que substituição pelo grupo 4-quinolinila (**20**), com átomo de nitrogênio menos básico que no composto **19**, não afeta significativamente o perfil de ação antagonista. Por outro lado, a substituição pelo grupo 6-quinolinila (**21**) diminui a constante de inibição em CCR3, mostrando que a funcionalização regioseletiva do grupo quinolina, que resulta em maior afastamento entre o átomo de nitrogênio do sistema heterocíclico e o grupo amida, resulta em uma interação mais efetiva com o biorreceptor. Por sua vez quando a subunidade 3,4-diclorofenila (**17**) foi substituída por 4-clorofenila (**22**), 3-clorofenila (**23**), 4-fluorofenila (**24**), 4-metoxifenila (**25**) ou 4-bromofenila (**26**) a atividade evidenciada foi menos pronunciada que a do composto **17**, destacando a importância da subunidade 3,4-diclorofenila para a atividade de antagonistas de receptores CCR3 desta série, o que provavelmente é consequência de suas particulares propriedades estereo-eletrônicas e contribuição hidrofóbica (**B**) (em azul) (TING et al., 2005b).

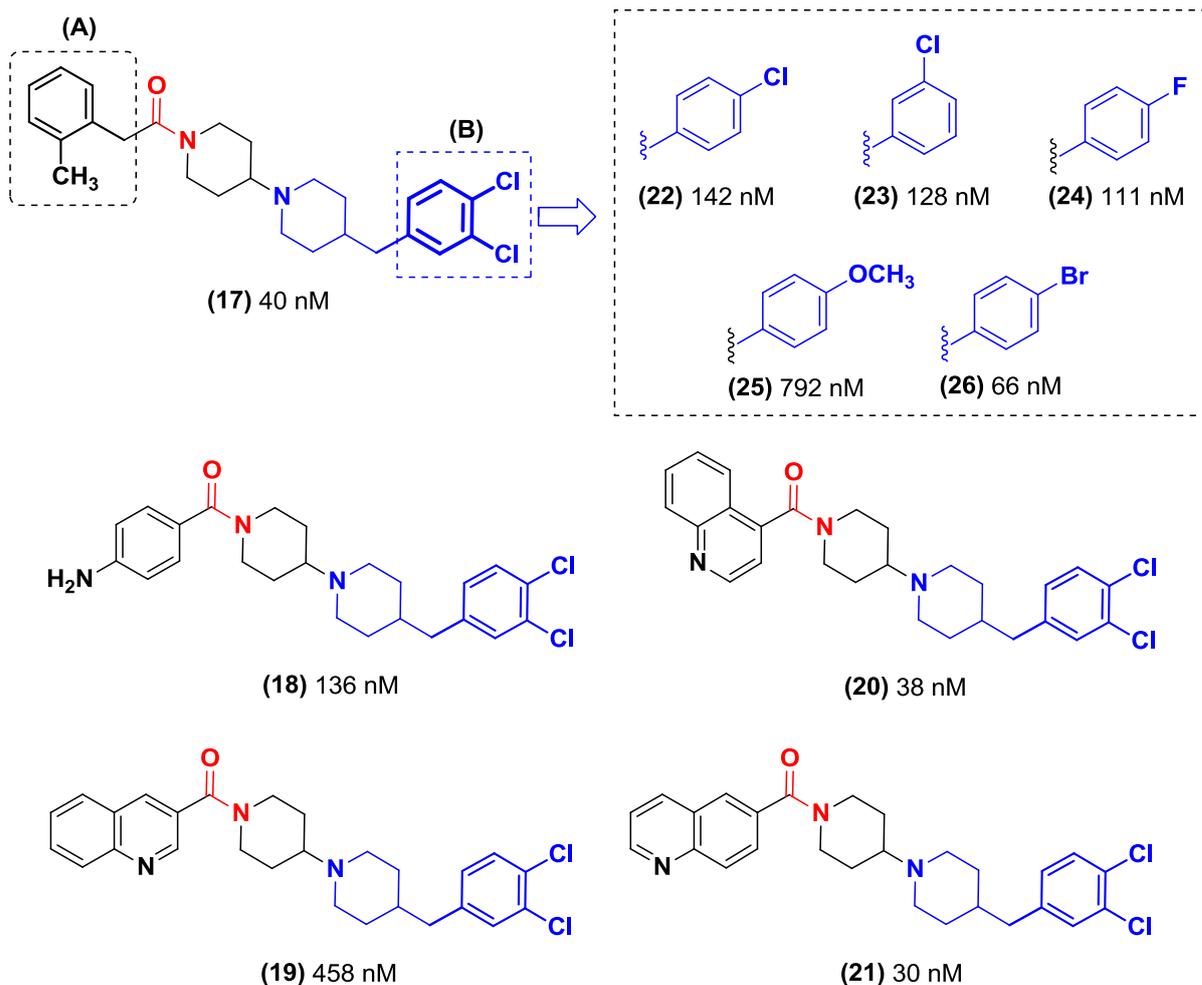


Figura 7: Relação estrutura-atividade (REA) para derivados bispiperidina amida substituídos antagonistas de receptores CCR3 com base em valores de K_i (TING et al., 2005b).

Um exemplo de REA para uma série de antagonistas de CCR3 apresentando padrão ureídico também ilustra importantes informações estruturais (**Figura 8**) relacionadas ao reconhecimento molecular pelo receptor-alvo. Quando a subunidade fenila do composto **27** é substituída por um átomo de bromo na posição 4 (**28**) ocorre diminuição da potência, enquanto que a substituição pelo mesmo grupo na posição 3 do anel (**29**) resulta em um pequeno aumento da potência. Por sua vez, a presença do átomo de bromo na posição 2 do anel aromático foi responsável pelo aumento da potência inibitória (**Figura 8**), com perfil que foi produzido pelos átomos de cloro (**31**) ou flúor (**32**) na mesma posição. Estes dados indicam que a presença de substituintes na posição orto do anel fenila resultam em mudanças conformacionais relevantes

para o aumento de potência por CCR3. Também foi observado que a subunidade aminoacídica prolina dos compostos **27-32** é relevante para o aumento da potência inibitória quando comparada com as respectivas subunidades aza-cíclicas presentes nos derivados **33** e **34**, que apresentam maior volume e caráter lipofílico. Dentre os derivados ureídicos **33-35**, o composto **35** foi o que apresentou potência inibitória mais destacada, fato que provavelmente se deve a substituição do grupo carbonila pelo grupo isostérico sulfonamida, o qual apresenta dois pontos potencialmente aceptores de ligação de hidrogênio capazes de interagir com resíduos de aminoácidos do sítio ativo do receptor CCR3. O derivado **36**, apesar de não possuir as subunidades prolina e sulfonamida, apresenta potência inibitória compatível com os derivados *orto*-substituídos **30-32**, provavelmente devido ao efeito *orto* promovido pela subunidade *orto*-bifenila, a qual introduz variações conformacionais além de pontos adicionais de reconhecimento molecular pelo receptor-alvo.

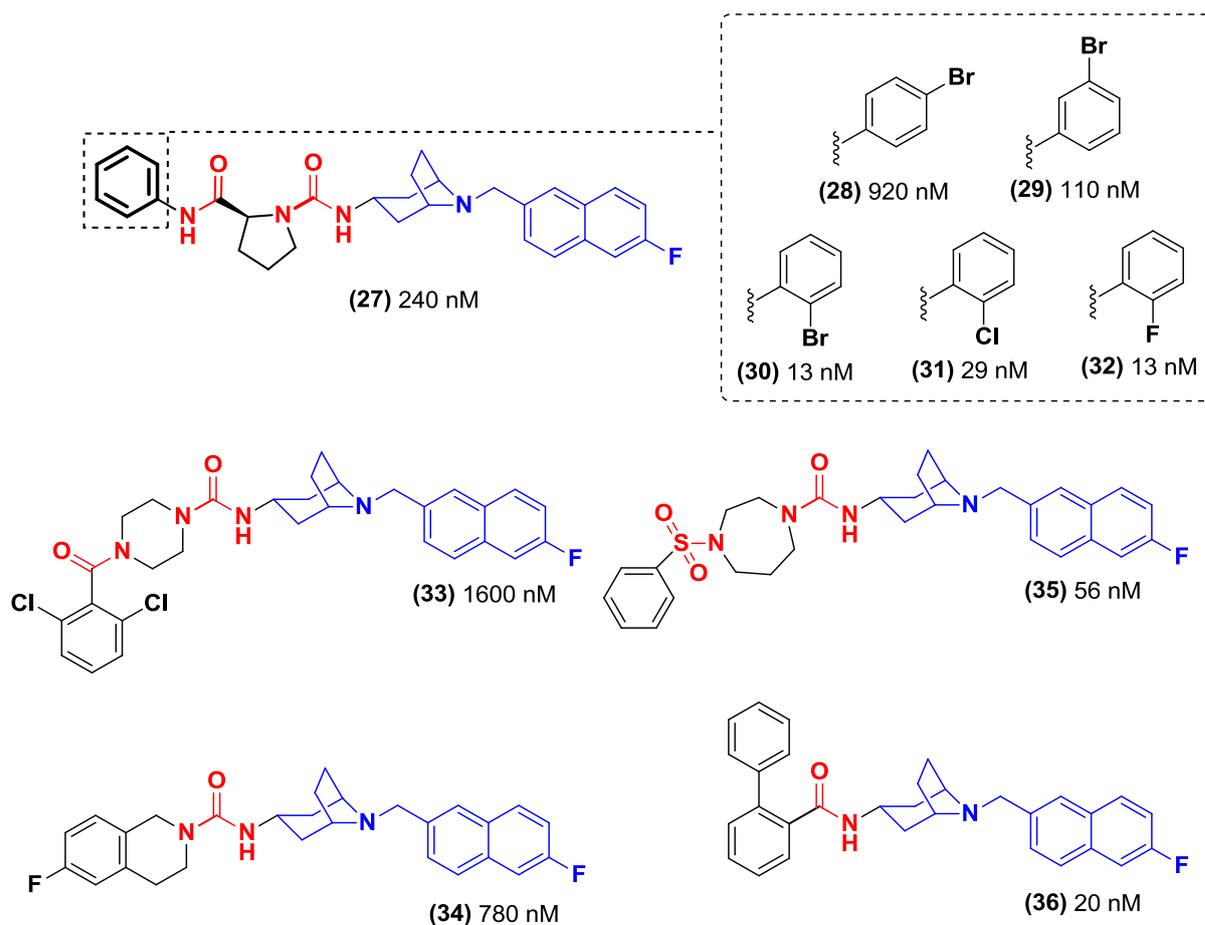


Figure 8: Relação estrutura-atividade (REA) para derivados ureídicos antagonistas de receptores CCR3 com base em valores de CI_{50} (NITTA et al., 2012).

Um interessante estudo de REA envolvendo antagonistas seletivos de CCR3 frente ao CCR1 pode ser observado na **Figura 9**. Mudanças da importante subunidade 3,4-diclorofenila (**B**) do composto **37**, já mostrada previamente na **Figura 7**, a qual apresenta propriedades estereoelêtrônicas e lipofilicidade que a diferencia das subunidades fenila (**38**), 4-Cl-fenila (**39**) ou 3-Cl-fenila (**40**) resultaram em diminuição da potência inibitória. Ademais, mudanças do anel aromático benzotiazola resultaram em diminuição da potência inibitória, como pode ser observado para o composto **41**, porém em aumento da potência à medida que o grupo introduzido na subunidade heterocíclica torna-se mais básico, que é o caso dos compostos **42** e **43**. Na **Tabela 1**, o perfil de seletividade dos compostos **37-43** pode ser observado e o derivado que apresenta maior seletividade como antagonista de

CCR3 frente a CCR1 apresenta a subunidade 3,4-diclorofenila (**43**), seguido dos derivados **41** e **42**. Para os três exemplos de estudos de REA envolvendo antagonistas de CCR3 podemos observar que duas subunidades aromáticas são frequentemente observadas, assim como ao menos uma subunidade espaçadora amida ou ureia ligada a uma subunidade básica contendo uma amina terciária (em azul) (**Figura 9**) (NAYA et al., 2001).

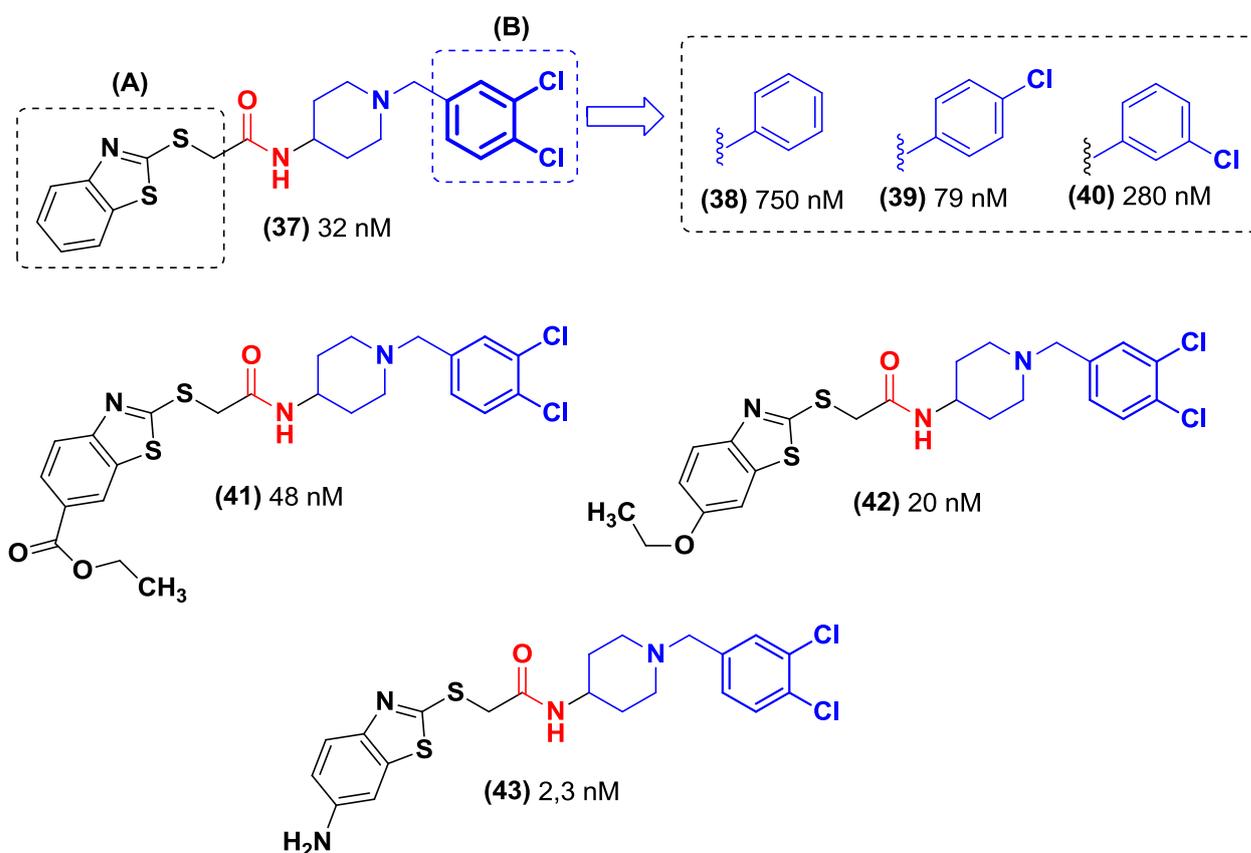


Figura 9: Relação estrutura-atividade (REA) para derivados antagonistas de receptores CCR3 seletivos com base em valores de CI_{50} (NAYA et al., 2001).

Outro resultado interessante envolveu a descoberta de antagonistas duais de receptores de quimiocina CCR3 e de histamina do subtipo H₁ para o tratamento da asma com risco reduzido de modulação dos canais de potássio Kv 11.1 (hERG), os quais podem estar relacionados a efeitos cardíacos adversos. Quando dois receptores relacionados com a asma são modulados pela ação de antagonistas, espera-se que o processo inflamatório seja mais eficientemente controlado, especialmente devido ao fato de casos reportados na literatura indicarem o benefício em pacientes asmáticos da associação de antagonistas de receptores H₁ com fármacos anti-inflamatórios (BAHL et al., 2012). Dessa forma, podemos modular a seletividade de antagonistas de receptores CCR3 (**Tabela 1**), como mostrado para os compostos da **Figura 9** (NAYA et al., 2001), assim como a atividade dual envolvendo ao menos um subtipo de receptor de quimiocina. Este conhecimento pode ser útil no desenvolvimento de antagonistas duais de receptores de quimiocinas (DE LUCCA et al., 2005), apesar dos melhores ligantes identificados até o momento falharem nos ensaios clínicos ou pré-clínicos (WHITE et al., 2013).

Tabela 1: Valores de CI₅₀ para antagonistas seletivos de receptores de quimiocina CCR3 frente a CCR1 (NAYA et al., 2001).

<i>Composto</i>	<i>CCR3 CI₅₀ (nM)</i>	<i>CCR1 CI₅₀ (nM)</i>	<i>CCR1/CCR3</i>
37	32	450	14,1
38	750	7200	9,6
39	79	260	3,3
40	280	>10000	>35,7
41	48	>10000	>208,3
42	20	3600	180
43	2,3	1900	826,1

1.5 O RECEPTOR DE QUIMIOCINA CC DO TIPO 4 (CCR4) E A BUSCA DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS

Os receptores de quimiocina CC do tipo 4 (CCR4), os quais são expressos em células T, dendríticas, *natural killer* (NK), basófilos, monócitos e macrófagos, também estão envolvidos na modulação dos processos inflamatórios da asma (MIKHAK et al., 2009) através da ativação por ação das quimiocinas CCL17 (TARC), CCL22 e da quimiocina derivada de macrófagos (do inglês *Macrophage-Derived Chemokine*, MDC) (MANTOVANI et al., 2000; HORUK et al., 2009; WHITE et al., 2013).

Existem várias substâncias sintéticas antagonistas de receptores CCR4 descritos na literatura (BURDI et al., 2007; ZHAO et al., 2009; SUN et al., 2011; ZHANG et al., 2011; PROCOPIOU et al., 2012; PROCOPIOU et al., 2013), como pode ser ilustrado na **Figura 10**. (ANDREWS et al., 2008), (ROUMEN et al., 2012); (YOKOYAMA et al., 2008a), (YOKOYAMA et al., 2008b), (YOKOYAMA et al., 2009), (WANG et al., 2006), (YANG et al., 2006), (ALLEN et al., 2004). O composto pirazínico **44** é um antagonista dual dos receptores de quimiocina CCR4 e CCR5, enquanto que os compostos **45** e **46** são exemplos de potentes antagonistas de receptores CCR4 com diferentes subunidades estruturais que foram identificados a a partir de estudos de ancoramento molecular, mostrando a importância da modelagem molecular na descoberta de novos antagonistas deste receptor de quimiocina (ANDREWS et al., 2008), (ROUMEN et al., 2012).

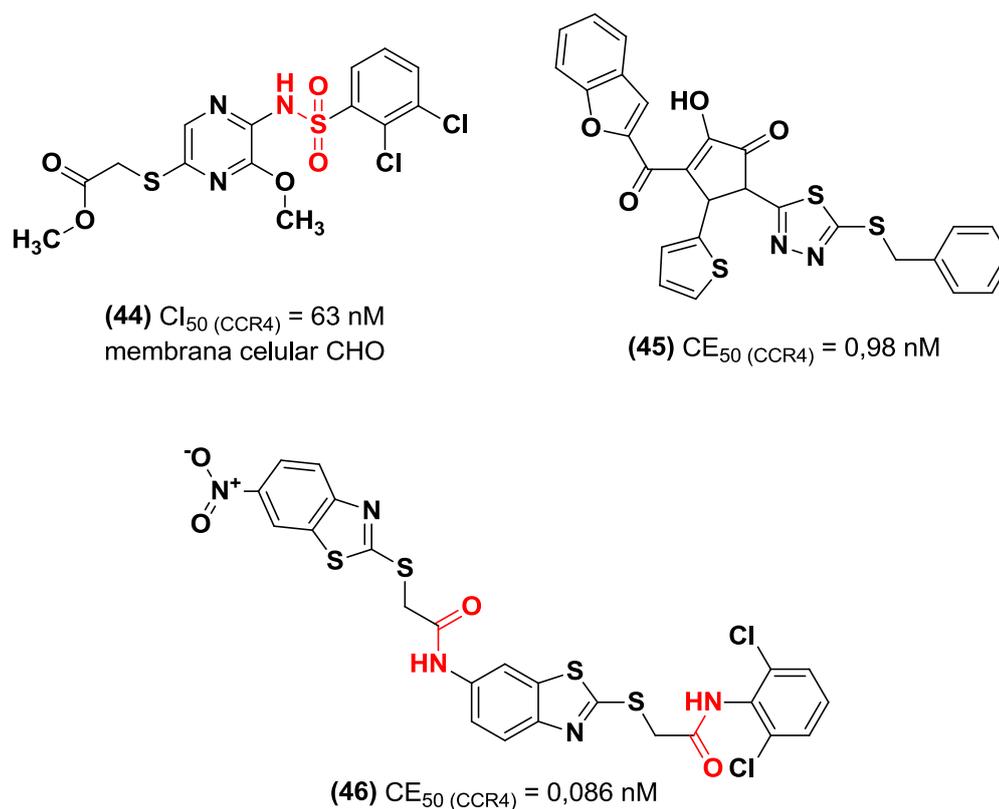


Figura 10. O antagonista dual CCR4/CCR5 (44) e os antagonistas CCR4 45 e 46 (ANDREWS et al., 2008), (ROUMEN et al., 2012).

Pode-se observar na **Figura 11** compostos com relevante atividade antagonista frente ao receptor CCR4 que apresentam subunidades heteroaromáticas e amins terciárias (47-49), assim como derivados que combinam subunidades amídicas com amins terciárias. Essa quimiodiversidade mostra a importância marcante da subunidade amina terciária e ilustra os diferentes grupos funcionais que podem ser explorados no planejamento de novos ligantes para o receptor de quimiocina do tipo CCR4 (YOKOYAMA et al., 2008b), (YOKOYAMA et al., 2009), (WANG et al., 2006), (YANG et al., 2006), (ALLEN et al., 2004).

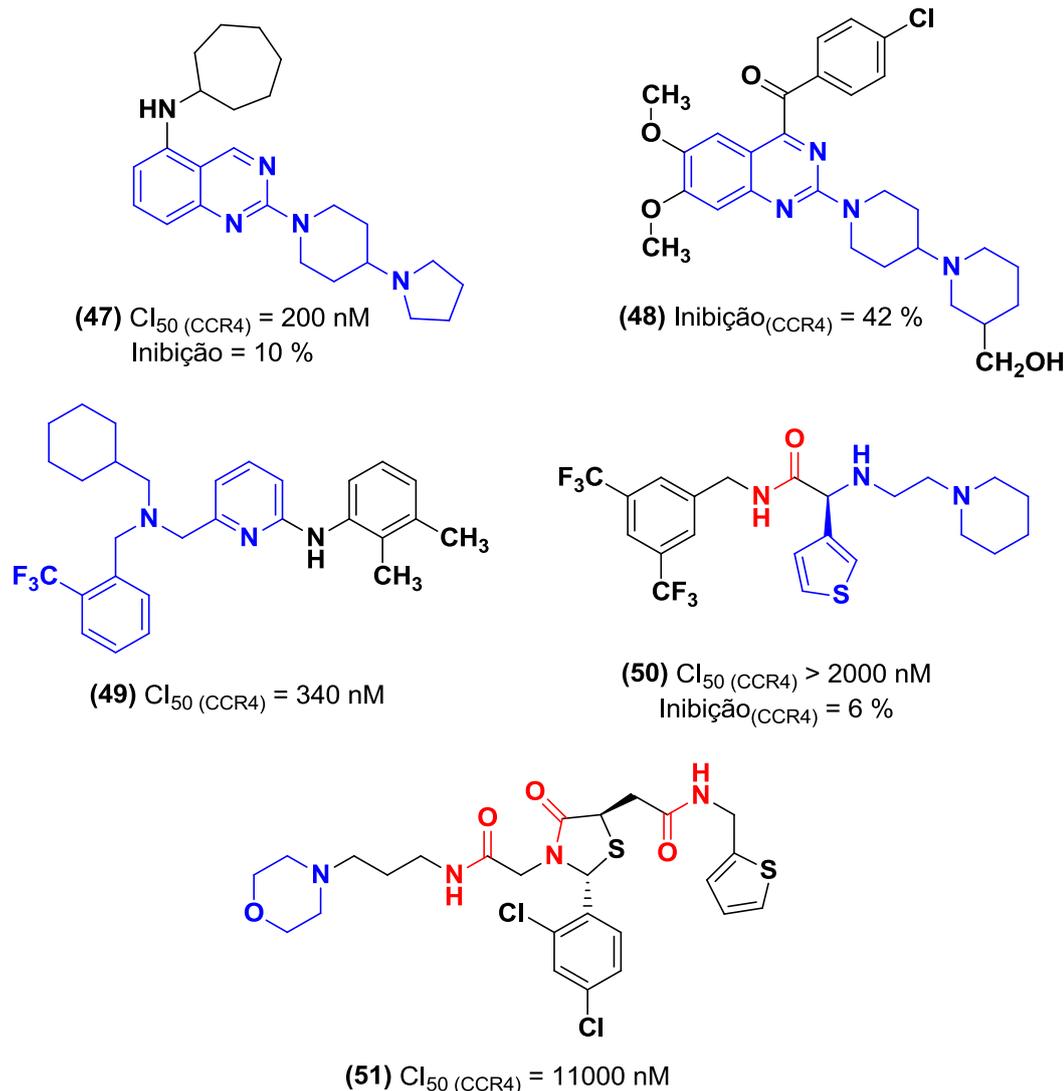


Figura 11. Diferentes padrões estruturais de antagonistas de receptores CCR4 (47-51) (ANDREWS et al., 2008), (ROUMEN et al., 2012); (YOKOYAMA et al., 2008b), (YOKOYAMA et al., 2009), (WANG et al., 2006), (YANG et al., 2006), (ALLEN et al., 2004).

Estudos com o antagonista dos receptores de quimiocina CCR4 **52** e seus análogos ilustram as contribuições das alterações em várias subunidades estruturais e suas consequências sobre o perfil de bioatividade (**Figura 12**). A substituição da subunidade 2-naftila do composto **52** por outras subunidades aromáticas, *e.g.* 4-isopropilfenila (**53**), fenila (**55**) ou benzila (**56**), ou não-aromáticas, *e.g.* isopropila (**54**), resultou em aumento de K_i em relação ao composto protótipo **52**. A troca do grupo sulfona (SO_2) pelo isostero carbonila (**57**) ou por um grupo metileno (**58**) também foi

responsável pela diminuição de atividade antagonista, provavelmente devido a perda de dois átomos aceptores de ligação de hidrogênio. Quando a subunidade benzila do composto **52** foi substituída por um átomo de hidrogênio (**59**) ou pelo grupo isopropila (**60**) a atividade antagonista diminuiu, demonstrando a importância da presença de uma subunidade aromática nesta região para interação com o biorreceptor-alvo. Da mesma forma, o antípoda ótico **61**, que apresenta a configuração absoluta R do grupo espaçador prolina também teve sua atividade antagonista expressivamente reduzida. Por outro lado, a *N*-metilação de **52** resultou em aumento de atividade do análogo **62**, indicando a influência de variações conformacionais da ligação peptídica e as consequências no perfil de bioatividade (BARREIRO et al., 2011). Além disso, trocas simultâneas, como por exemplo: 5-Cl-2-naftila (mais lipofílica) substituindo 2-naftila, *N*-metilação e a introdução de um espaçador metilênico no grupo benzila (**63**) resultam em aumento significativo da atividade do protótipo **52** (**Figura 12**) (BURDI et al., 2007).

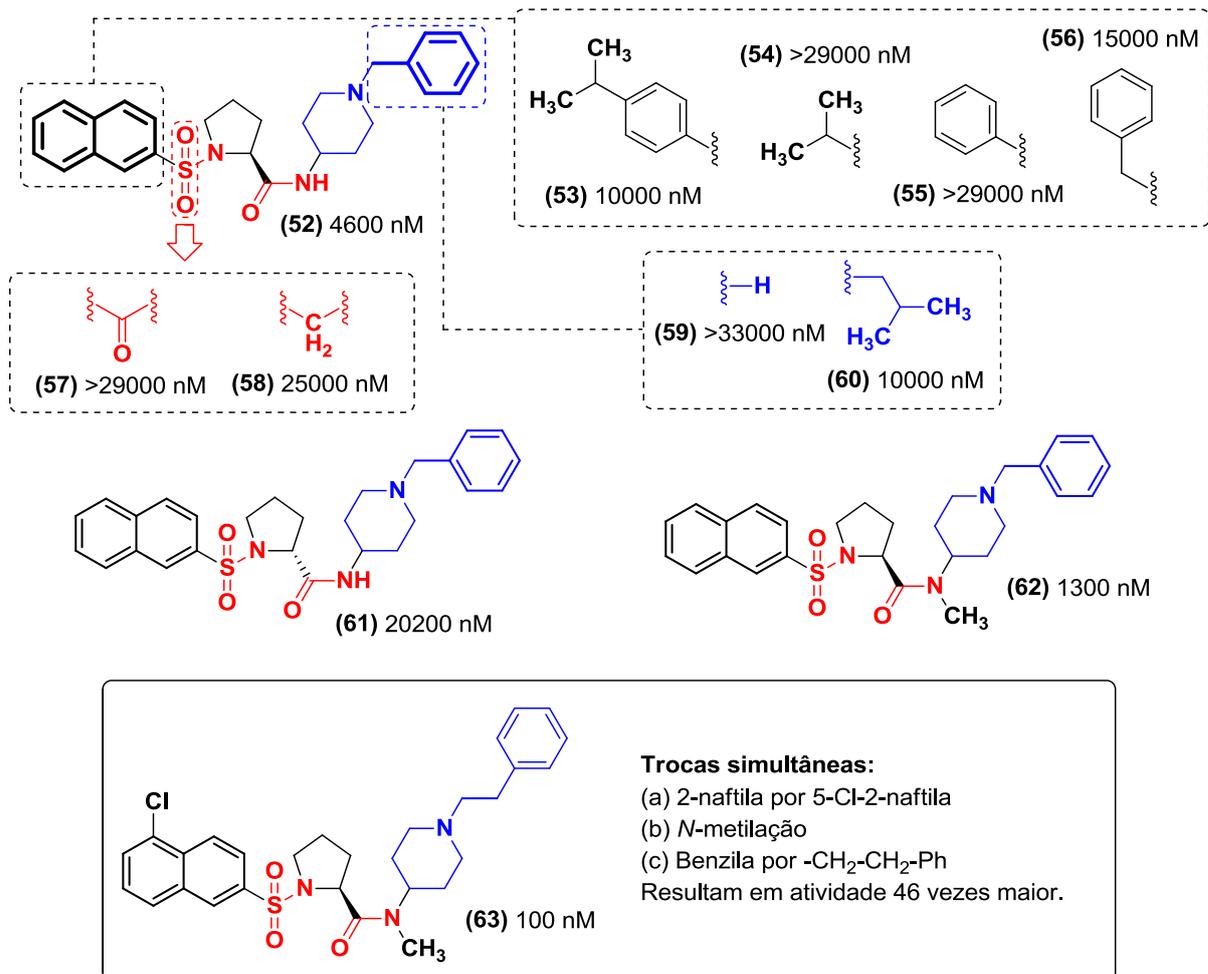


Figura 12. Aspectos da relação estrutura-atividade (REA) com valores de K_i para antagonistas sulfonamídicos do receptor CCR4 (BURDI et al., 2007).

Na **Figura 13** pode-se observar um interessante exemplo de REA relacionado a potentes antagonistas de receptores CCR4 da família das indazol-arilsulfonamidas. Quando o substituinte fenila, destacado em **negrito**, do composto de referência **64** é substituído pelo grupo 4-metoxila em **67** a afinidade frente ao receptor CCR4 se mantém semelhante, entretanto substituições pelos grupos 3-metoxila (**66**) e 2-metoxila (**65**) (efeito *orto*) são responsáveis pelo aumento de afinidade devido a característica contribuição eletrônica deste substituinte, com destaque para o derivado 3,4-dimetoxila (**68**), que apresenta dois heteroátomos que podem atuar como potenciais aceptores de ligação de hidrogênio. Podemos observar que a introdução de uma subunidade amida ligada ao grupo fenila de **64** resultou em

diminuição da atividade do composto **69**, entretanto modificações por subunidades amida retroisostéricas mais hidrofílicas, resultaram em relevante aumento de afinidade (**70-73**), (PROCOPIOU et al., 2012). Apesar da quimiodiversidade dos ligantes de receptores CCR4, foi observado que o grupo sulfonamida ligado a um anel aromático é um requisito estrutural frequentemente observado de antagonistas de CCR4, além da presença de ao menos duas subunidades aromáticas, as quais são frequentemente observadas em vários destes antagonistas.

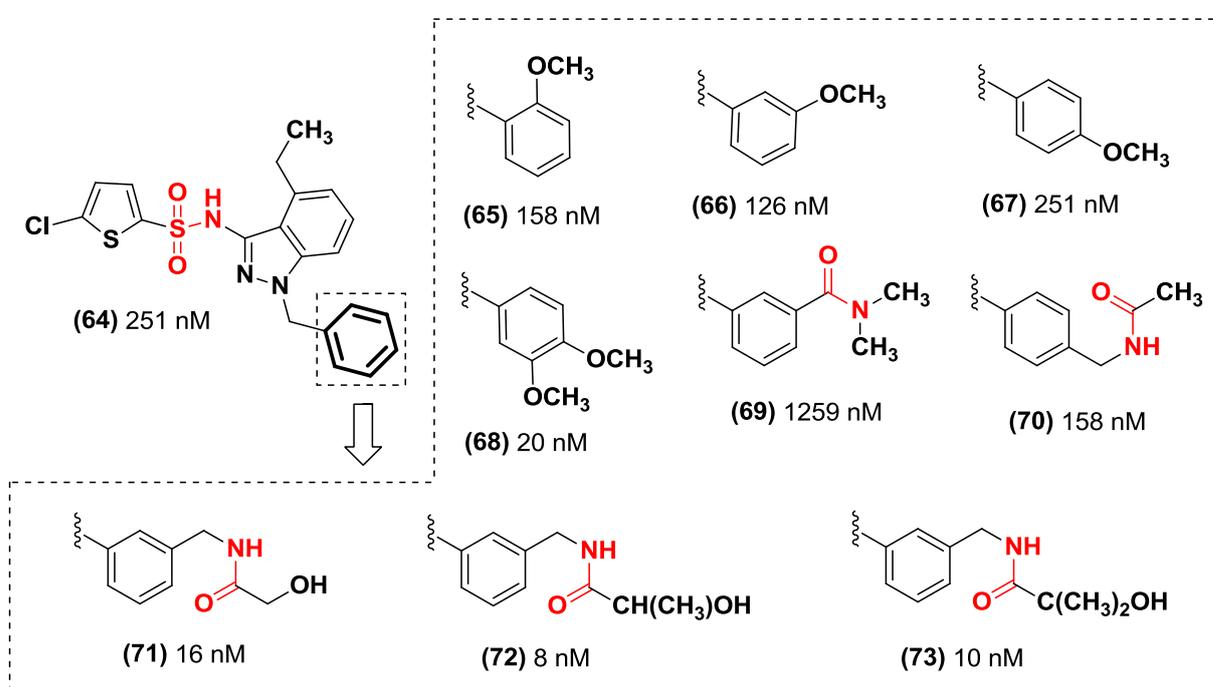


Figura 13. Relação estrutura-atividade (REA) com valores de K_i para antagonistas tioenilsulfonamídicos do receptor CCR4 (PROCOPIOU et al., 2012).

Como último exemplo de REA para antagonistas do receptor de quimiocina CCR4, uma variação de núcleo estrutural descrita por Purandare et al. (2007) está ilustrada na **Figura 14**. Enquanto a adição de um grupo etila ao composto de padrão estrutural purínico **74** pode aumentar a atividade em quatro vezes (**75**), provavelmente devido ao aumento de lipofilicidade, a atividade aumenta ainda mais quando modificações isostéricas no núcleo purínico são realizadas (em negrito), resultando nos derivados piridino[2,3-*d*]pirimidínicos **76** e **77**. O mais ativo

antagonista de receptor CCR4 deste estudo, *i.e.* (**77**) (CI = 20 nM), possui uma subunidade amídica na cadeia lateral básica e é 500 vezes mais seletivo para CCR4 comparado com CCR2, CCR3 e CXCR3 (PURANDARE et al., 2007).

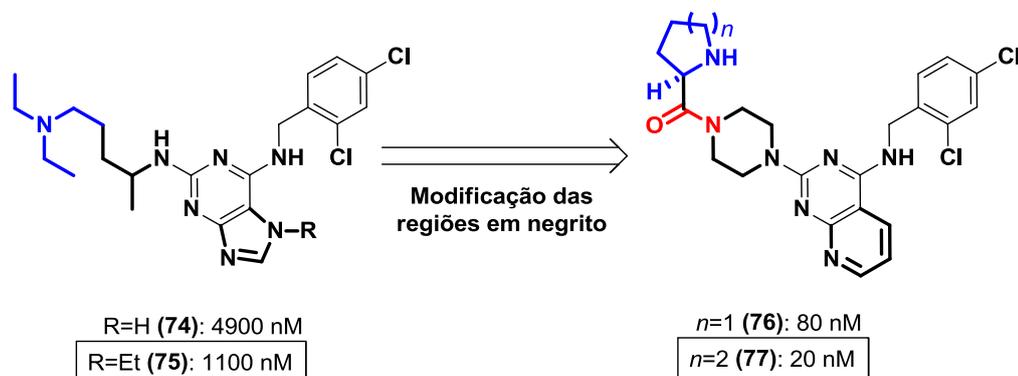


Figura 14. Relação estrutura-atividade com valores de CI_{50} para antagonistas do receptor CCR4 de padrão estrutural purínico e piridino[2,3-*d*]pirimidínicos (PURANDARE et al., 2007).

1.6 A ASMA E SUA RELAÇÃO COM OS RECEPTORES DE QUIMIOCINA DOS TIPOS CCR3 E CCR4

A asma é uma doença inflamatória crônica complexa que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo e este número tem crescido a cada ano (MADDOX & SCHWARTZ, 2002; MURDOCH et al., 2010). Existem várias abordagens terapêuticas atualmente empregadas capazes de resultar em bons resultados no controle dos episódios de crises da doença (ADCOCK et al., 2008; MORAGÓN, 2010), *e.g.* broncodilatadores (DALENCE-GUZMÁN et al., 2010), agonistas β_2 -adrenérgicos (ALIKHANI et al., 2004), corticosteroides (GUPTA et al., 2004; MILLAN et al., 2011; PIAZ & GIOVANNONI, 2000), antagonistas de receptores de leucotrienos (MONTUSCHI, 2008), etc. Por outro lado, pacientes que sofrem de asma severa (5-10%) não respondem bem às terapias atualmente disponíveis para o tratamento desta doença (ADCOCK et al., 2008), induzindo a necessidade de se desenvolver novas

alternativas terapêuticas eficientes na melhoria da qualidade de vida de pacientes asmáticos.

A fisiopatologia da asma está intimamente ligada com os receptores de quimiocina CCR3 (TERAN, 2000) e CCR4 (ZIMMERMANN et al., 2003; SMIT & LUKACS, 2006), os quais são abundantemente expressos em eosinófilos e células do tipo T_H2 , respectivamente. Na **Figura 15** podemos observar melhor como estes dois receptores de quimiocinas do tipo CC estão envolvidos no processo fisiopatológico da asma, o qual apresenta três principais características: a inflamação, obstrução reversível e hiperresponsividade das vias aéreas (BARNES, 2008; KOELINK et al., 2012).

O processo alérgico da asma, o qual é caracterizado pela ativação de células do tipo T_H2 , eosinófilos e mastócitos, inicia-se com a exposição a estímulos externos, *e.g.* alérgenos inaláveis. Em seguida, estes alérgenos podem desencadear o processo inflamatório da asma de duas formas: **(a)** ligando-se às imunoglobulinas E presentes em mastócitos, dessa forma, desencadeando a liberação de vários mediadores (*e.g.* histamina, leucotrienos e prostaglandinas), os quais são responsáveis pela broncoconstrição das células musculares lisas presentes nas vias aéreas; **(b)** ativando células dendríticas que são responsáveis pela liberação das quimiocinas CCL17 e CCL22. Podemos observar na **Figura 15** que a modulação do receptor de quimiocina CCR3 é promovida pela quimiocina CCL11, dessa forma, desencadeando o recrutamento e ativação de eosinófilos, o qual também está relacionado a IL-5. Em paralelo, a ativação do receptor de quimiocina CCR4 é promovida pelas quimiocinas CCL17 e CCL22, as quais são mais abundantes nas vias aéreas de pacientes asmáticos. A ativação do receptor CCR4 tem como consequência o desencadeamento do processo inflamatório através da liberação das interleucinas IL-4 e IL-9, que se ligam a imunoglobulina E em mastócitos e a liberação da interleucina IL-13, a qual ativa as células B responsáveis pela produção da imunoglobulina E (IgE) (KOELINK et al., 2012).

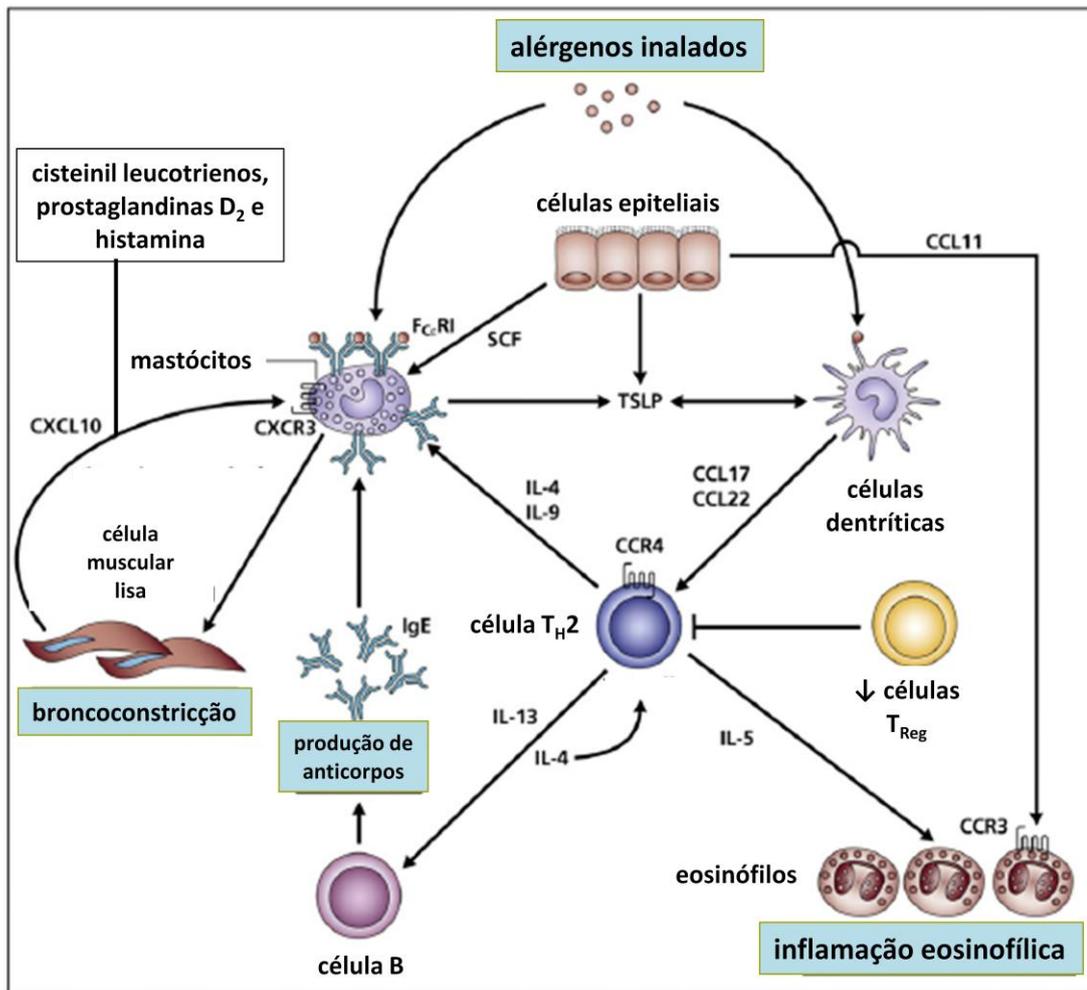


Figura 15. O envolvimento de diferentes tipos celulares, quimiocinas, receptores de quimiocinas do tipo CCR3 e CCR4 na gênese da asma (KOELINK et al., 2012).

Pelo exposto, podemos concluir que antagonistas de receptores de quimiocinas do tipo CCR3 podem impedir a ativação promovida pela quimiocina CCL11 e conseqüentemente a bloqueio da inflamação eosinofílica. Adicionalmente, a ação de antagonistas no receptor de quimiocina do tipo CCR4 bloqueia diversos pontos estratégicos do processo inflamatório da asma: ativação das IgE em mastócitos, que resultam em broncoconstrição (IL-4 e IL-9), ativação pela IL-13 das células responsáveis pela produção de IgE (células B) e inflamação eosinofílica pela

IL-5 (KOELINK et al., 2012). Portanto, a busca de novos antagonistas duais de receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4 mostra-se uma estratégia promissora para o tratamento do processo inflamatório envolvido na asma brônquica.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de ligantes duais de receptores CCR3 e CCR4 com padrão estrutural inédito para o tratamento da asma brônquica, através das metas específicas descritas a seguir:

- ✓ Planejamento de novos ligantes seguido de estudos *in silico* de ancoramento molecular com os modelos dos receptores validados, triagem virtual dos compostos planejados e análise das interações ligante-receptor;
- ✓ Síntese de compostos selecionados a partir do planejamento, em grau de pureza e em quantidade adequados à realização dos ensaios farmacológicos;
- ✓ Realização dos ensaios bioquímicos e farmacológicos, *in vitro* e *in vivo* para os compostos sintetizados, de modo a avaliar-se a atividade anti-inflamatória dos derivados sintetizados em modelos de asma.

2.1 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Com base em similaridades estruturais presentes em diversos antagonistas descritos na literatura (**Figura 16, A**), conforme pode ser exemplificado nas estrutura do antagonista de CCR3 (**78**) (TING et al., 2005b) e do antagonista de CCR4 (**52**) (BURDI et al., 2007) (**Figura 16, B**), foram planejados 16 compostos inéditos (**Figura 16, C**) como candidatos a ligantes duais dos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4 (**Figura 17**).

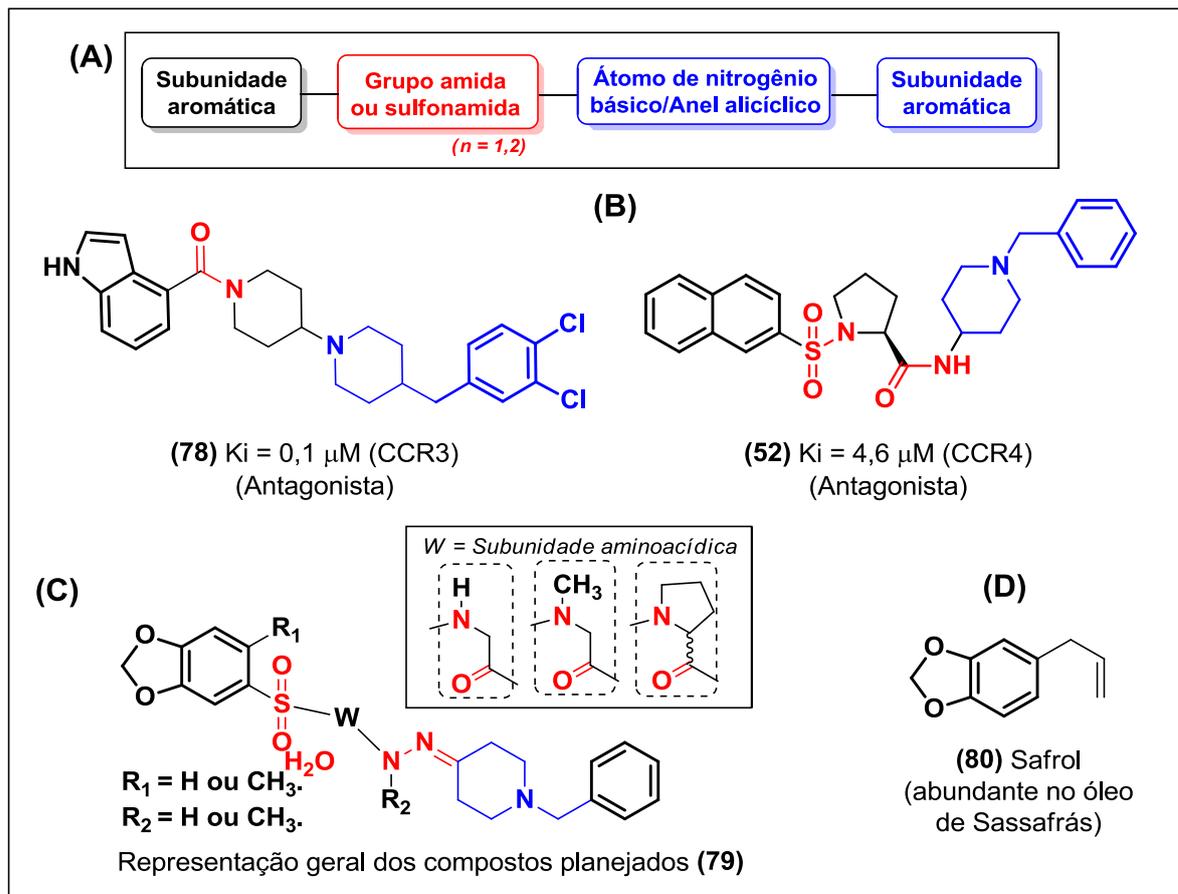


Figura 16: (A) Requisitos básicos frequentemente observados em ligantes de receptores CCR3 e CCR4 da literatura. (B) Os antagonistas de receptores CCR3 (78) e CCR4 (52). (C) Estrutura geral dos compostos inéditos planejados. (D) Estrutura química do produto natural Safrol.

Com base na estratégia da química medicinal de isosterismo de anéis, a subunidade aromática 1,3-benzodioxola, presente no produto natural safrol (**Figura 16, D**), é proposta em substituição às subunidades 4-indola e 2-naftila presentes nos compostos 78 e 52. Além do safrol (80) ser um biofóro natural empregado na obtenção de diversos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), a subunidade 1,3-benzodioxola pode estar envolvida tanto em interações hidrofóbicas como em ligações de hidrogênio (LAGES et al., 1998). Ademais, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram a relação bioisostérica entre anéis aromáticos com 10 elétrons π , e.g. o anel indólico, com o anel 1,3-benzodioxola, no desenvolvimento

de protótipos anti-inflamatórios análogos ao fármaco etodolaco (SILVA & BARREIRO, 1993). Adicionalmente, a introdução de um grupo metila na posição 6 da subunidade 1,3-benzodioxola pode introduzir efeitos conformacionais relevantes para o reconhecimento molecular dos novos protótipos frente aos receptores-alvo (CCR3 e CCR4);

Além da sulfona ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$), que pode atuar como acceptor de ligação de hidrogênio nos dois átomos de oxigênio, é proposta uma subunidade aminoácida (**Figura 16, C**), explorando: **(a)** a restrição conformacional resultante da internalização do aminoácido *L*-prolina e de seu antípoda ótico *D*-prolina, **(b)** o efeito da liberdade conformacional resultante da internalização do aminoácido glicina e **(c)** os efeitos conformacionais da internalização do aminoácido não natural sarcosina (*N*-metilglicina). Além da característica peptídeo-mimética resultante da internalização destes resíduos de aminoácidos (OLSON et al., 1993) é importante destacar a investigação da contribuição da configuração absoluta em derivados com centros assimétricos, utilizando a abordagem onde se trabalha com reagentes quirais para a síntese dos enantiômeros *R* e *S* propostos (*chiron approach*) (HANNESIAN, 1983).

A subunidade amida presente nos compostos **78** e **52** inspirou a proposta de introdução de seu aza-homólogo vinílico correspondente, a subunidade *N*-acilidrazona (**Figura 16, C**, em vermelho), a qual está presente em diversos compostos com perfis de atividade anti-inflamatória descritos na literatura (LIMA & BARREIRO, 2005; BEZERRA-NETO et al., 2006; DUARTE et al., 2007; BARREIRO & FRAGA, 2008; TRIBUTINO et al., 2009; KÜMMERLE et al., 2009; MAIA et al.; 2009).

A subunidade heterocíclica, conformacionalmente restrita, *N*-metilenopiperidina (**Figura 16, C**, em azul), a qual encontra-se protonada em pH fisiológico, é proposta com base nos compostos **78** e **52** e diversos antagonistas dos receptores CCR3 e CCR4 da literatura como uma subunidade capaz de realizar interações iônicas com os receptores-alvo, além da vantagem estratégica de resultar

em *N*-acilidrazonas que não apresentam formas diastereoisoméricas (*E* e *Z*) (PALLA et al., 1986).

Por fim, a subunidade fenila é proposta, com base nos compostos **78** e **52**, de modo a introduzir à nova classe uma subunidade adicional capaz de realizar interações hidrofóbicas, *e.g.* empilhamento π e empilhamento T, com os receptores-alvo.

Nas **Figuras 17 e 18**, são representadas as estruturas químicas dos compostos planejados (**81 a 96**) com base nas variações estruturais de ligantes dos receptores CCR3 e CCR4.

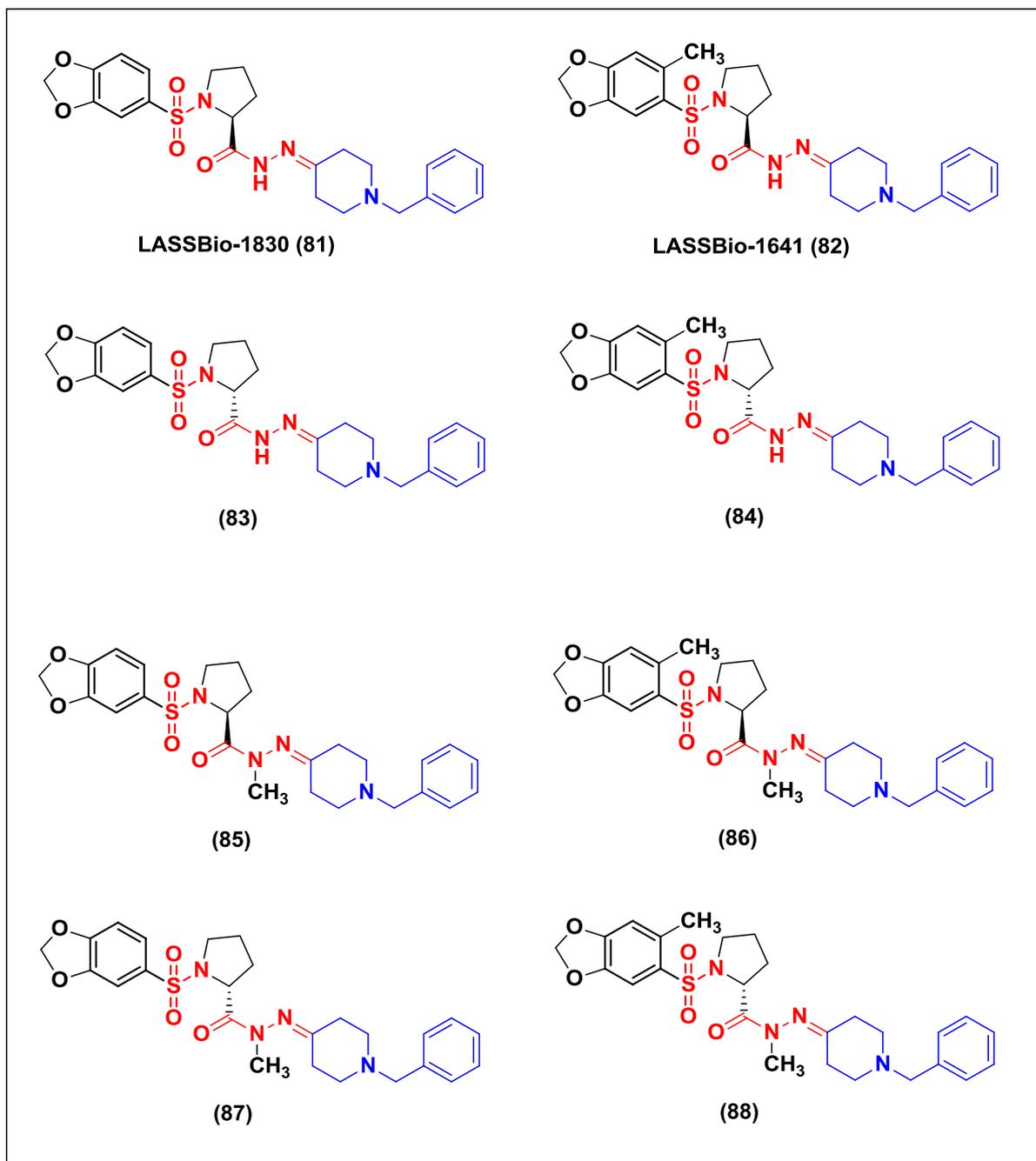


Figura 17: Compostos propostos como ligantes duais dos receptores CCR3 e CCR4 (Parte A).

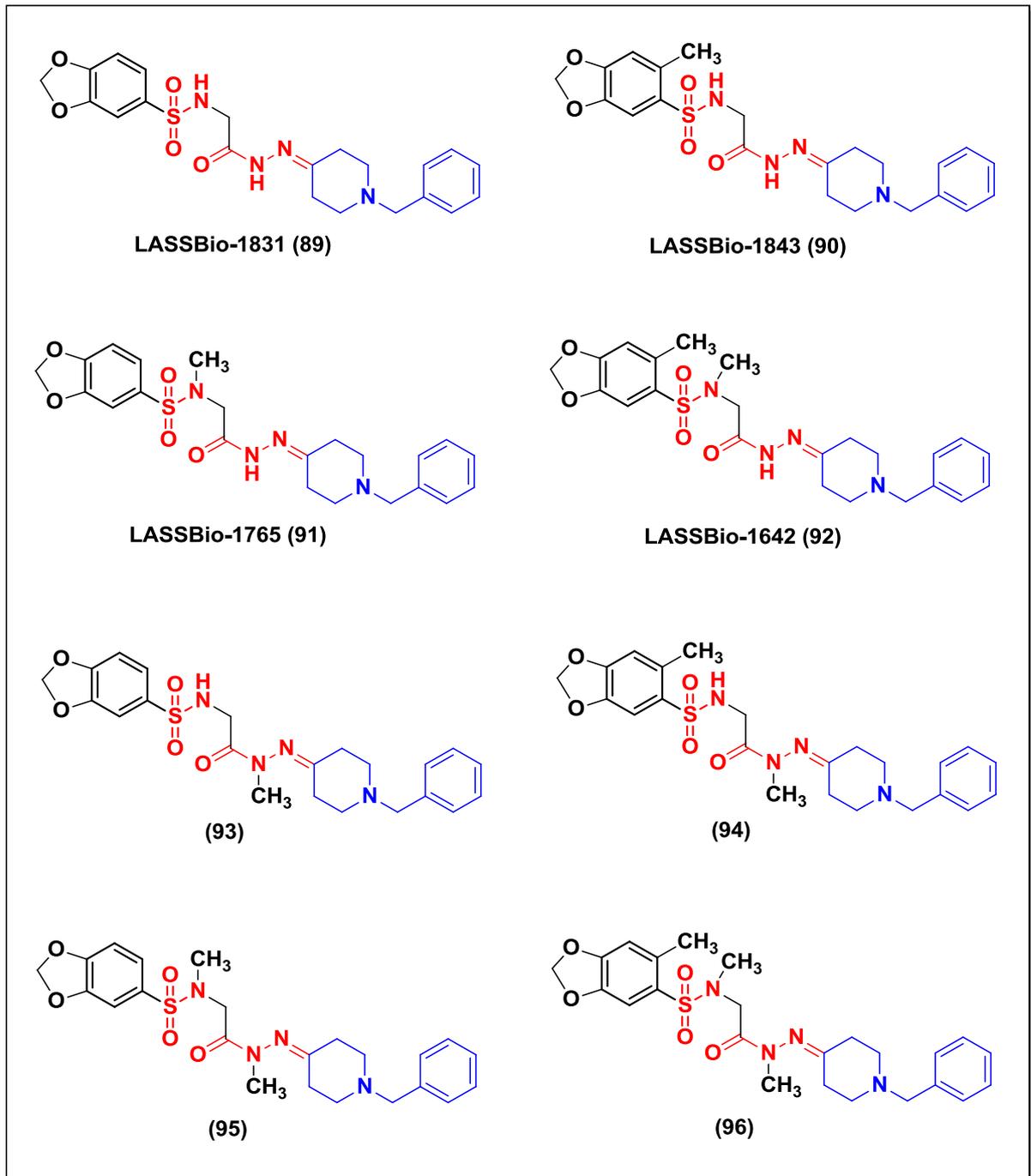


Figura 18: Compostos propostos como ligantes duais dos receptores CCR3 e CCR4 (Parte B).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DOS MODELOS *IN SILICO* DE RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR3 E CCR4

Para se obter mais informações relacionadas aos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4, a estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 foi utilizada para a construção de modelos por modelagem molecular comparativa dos receptores CCR3 e CCR4, os quais foram usados em combinação com dados experimentais visando o planejamento de novos ligantes (KUFARENA *et al.*, 2011; ROUMEN *et al.*, 2011). Para este fim, as sequências primárias (FASTA) dos receptores de quimiocina CCR3 e CCR4 foram obtidas do NCBI¹ e a estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 com o antagonista 1t1t (**8**) [PDB ID: 3ODU, resolução: 2,5 Å]² foi eleita a melhor estrutura para a construção dos modelos por homologia para ambos os receptores de acordo com o programa SWISS-MODEL³, o qual também foi usado para construção e avaliação dos modelos *in silico*. Os gráficos de Ramachandran gerados para ambos os modelos apresentam mais de 90% dos resíduos em regiões mais favoráveis ou em regiões adicionalmente permitidas, sendo 99,6% para CCR3 e 98,9% para CCR4 (**Figuras 19 e 20**).

Adicionalmente, quando compara-se a sequência primária do receptor CXCR4 com as sequências primárias dos receptores CCR3 e CCR4 utilizando-se o programa *on line* EXPASY⁴ observa-se um grau de similaridade relevante para a construção destes modelos. Quando as sequências primárias dos receptores CXCR4 (360 resíduos) e CCR3 (376 resíduos) são comparadas, pode-se observar identidade de 32,4% e sobreposição de 299 resíduos. Comparando-se as sequências primárias de CXCR4 e CCR4 (360 resíduos) a identidade observada é de 39,7% e sobreposição de 292 resíduos. O percentual de homologia para ambos os modelos é de 59%¹. Com base na análise destas sequências e inspeção visual dos modelos *in silico* obtidos para os receptores CCR3 e CCR4 utilizando o programa MOE⁵ pode-se considerar estes modelos *in silico* como ferramentas adequadas para a realização dos estudos de

1. www.ncbi.nih.gov

2. www.pdb.org/pdb/home/home.do

3. swissmodel.expasy.org/workspace/

4. www.expasy.org/

ancoramento molecular com os ligantes de receptores de quimiocinas com resultados de atividade *in vitro* selecionados da literatura.

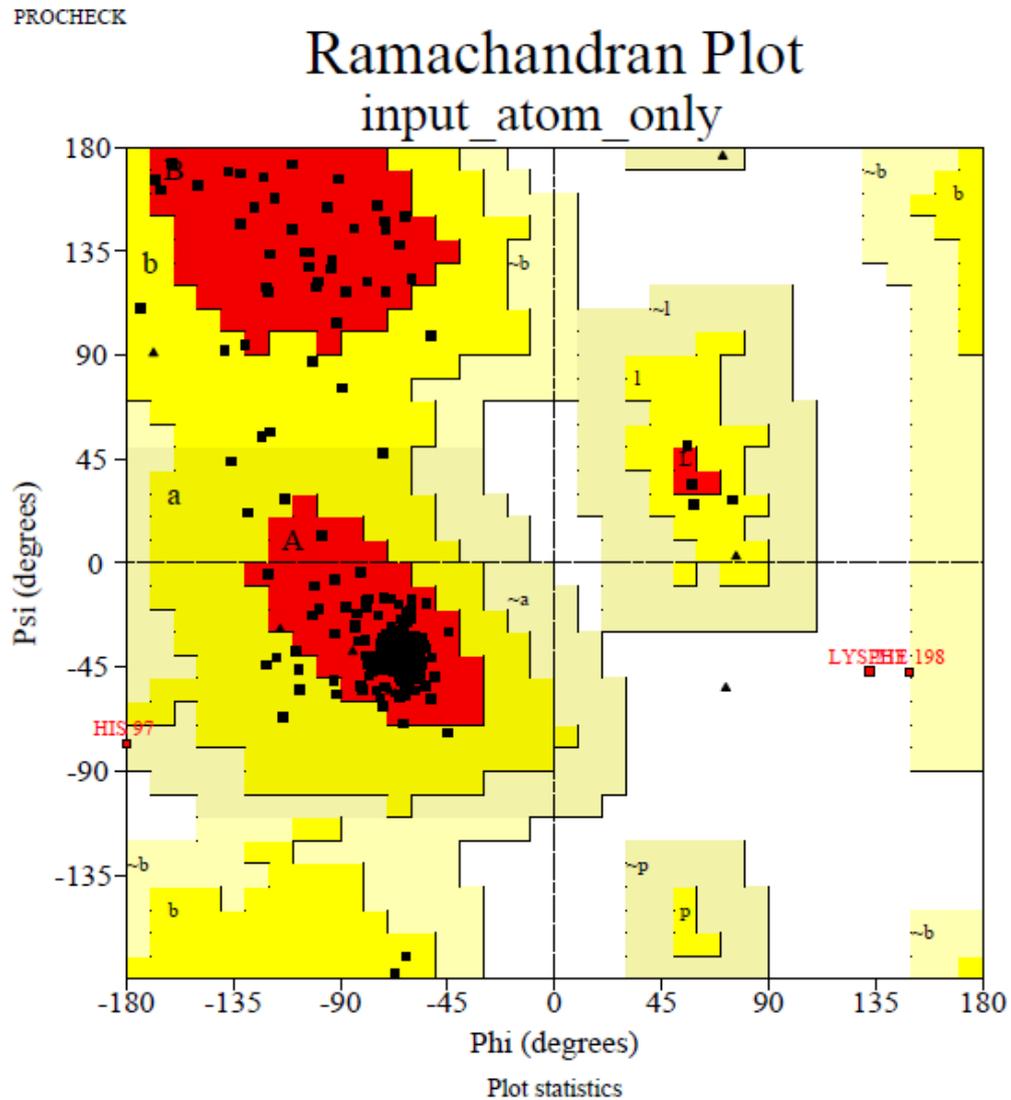


Figura 19. Gráfico de Ramachandran referente ao modelo obtido por modelagem comparativa do receptor CCR3 a partir da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4. **Legenda:** regiões mais favoráveis (vermelho), regiões adicionalmente permitidas (amarelo), regiões geralmente permitidas (bege) e regiões não permitidas (branco).

PROCHECK

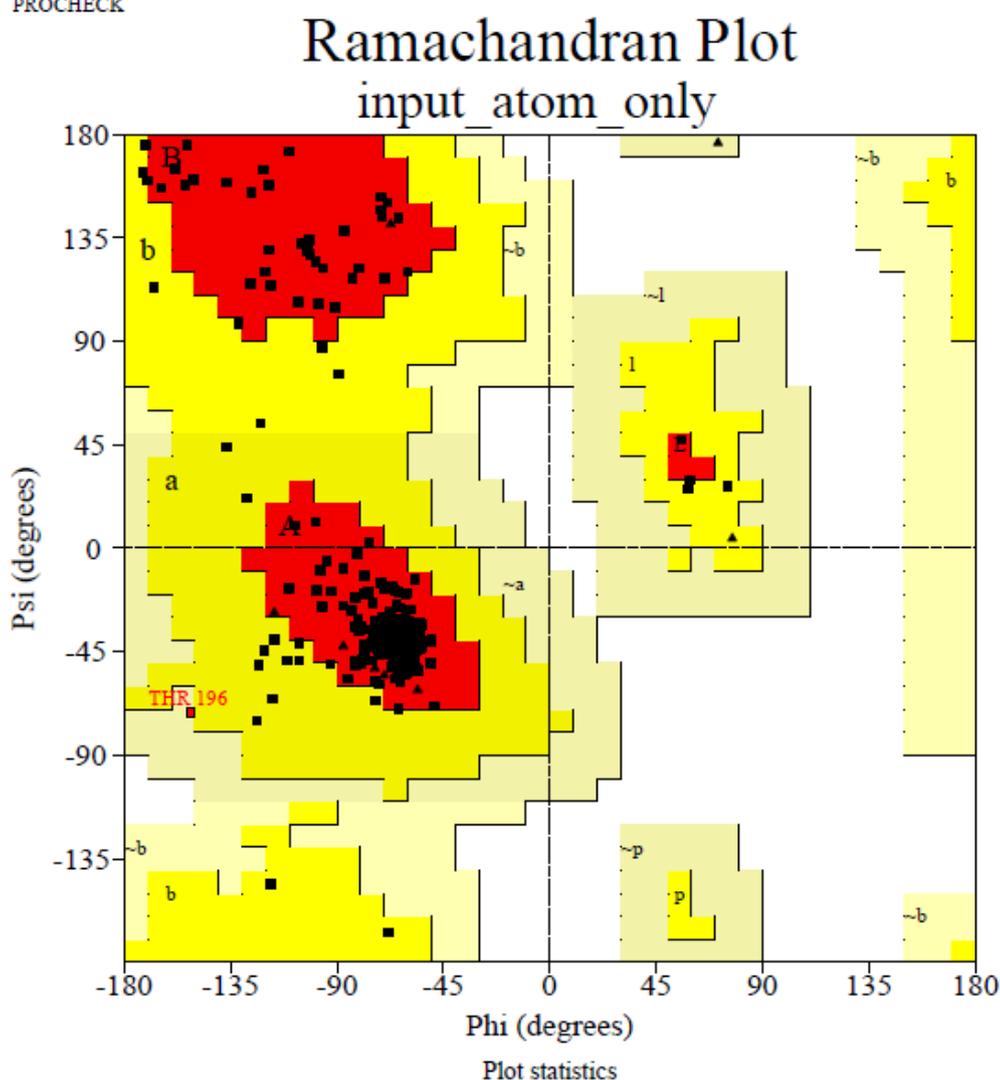


Figura 20. Gráfico de Ramachandran referentes ao modelo obtido por modelagem comparativa do receptor CCR4 a partir da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4. **Legenda:** regiões mais favoráveis (vermelho), regiões adicionalmente permitidas (amarelo), regiões geralmente permitidas (bege) e regiões não permitidas (branco).

Visando a identificação de interações ligante-receptor relevantes, o antagonista do receptor CCR3 UCB-35625 (**9**) e o antagonista do receptor CCR4 **52** (**Figura 21**) foram construídos com o programa MOE⁵, minimizados por meio de cálculos de mecânica molecular (MMFF) e então orientados manualmente dentro dos sítios de ligação dos seus respectivos modelos *in silico*, CCR3 e CCR4, respectivamente. Considerando dados de mutagênese disponíveis para o receptor CCR3 (WISE *et al.*, 5. <http://www.chemcomp.com/software.htm>

2007), pode-se observar que dois resíduos de tirosina (Tyr, Y) e um resíduo de ácido glutâmico (Glu, E), presentes nas hélices I (Y1.39), III (Y3.32) e VII (E7.39), respectivamente, estão envolvidos em importantes interações ligante-proteína. Apesar de não existirem dados de estudos de mutagênese sítio-dirigidos (*site-directed mutagenesis*, SDM) disponíveis para o receptor CCR4, pode-se observar que átomos de nitrogênio básicos (carregados positivamente) ligados a subunidades aromáticas ou alicíclicas para a maioria dos ligantes de receptores de quimiocinas com dados de estudos de mutagênese disponíveis estão orientados espacialmente no sítio menor, inclusive para o receptor CCR3 (ROUMEN *et al.*, 2012). Com base nestas informações, a subunidade ciclooptila do antagonista **9** e a subunidade benzila do composto **52** foram orientadas na região do sítio menor (compreendida pelas hélices I, II, III e VII) para os modelos *in silico* dos receptores CCR3 e CCR4, respectivamente. Em seguida, cálculos de mecânica molecular (MMFF) foram realizados para ambos os complexos (ligante-receptor) por meio do programa MOE⁵, visando a reorientação dos aminoácidos ao redor de ambos os ligantes.

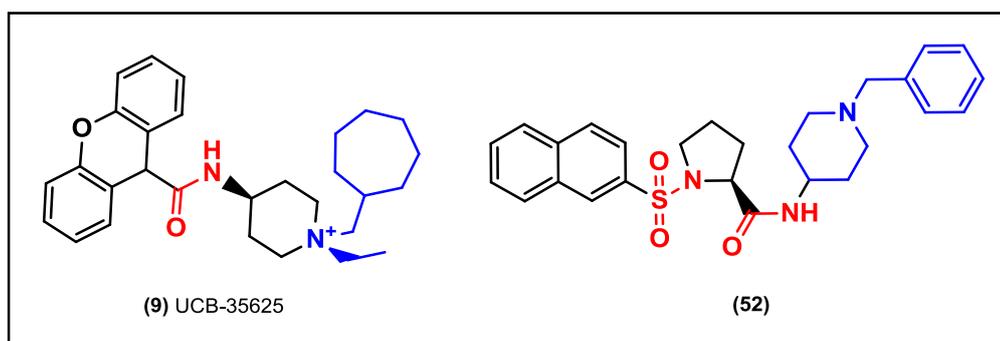


Figura 21. Estruturas químicas do antagonista de receptor CCR3 UCB-35625 (**9**) e do antagonista de receptor CCR4 (**52**).

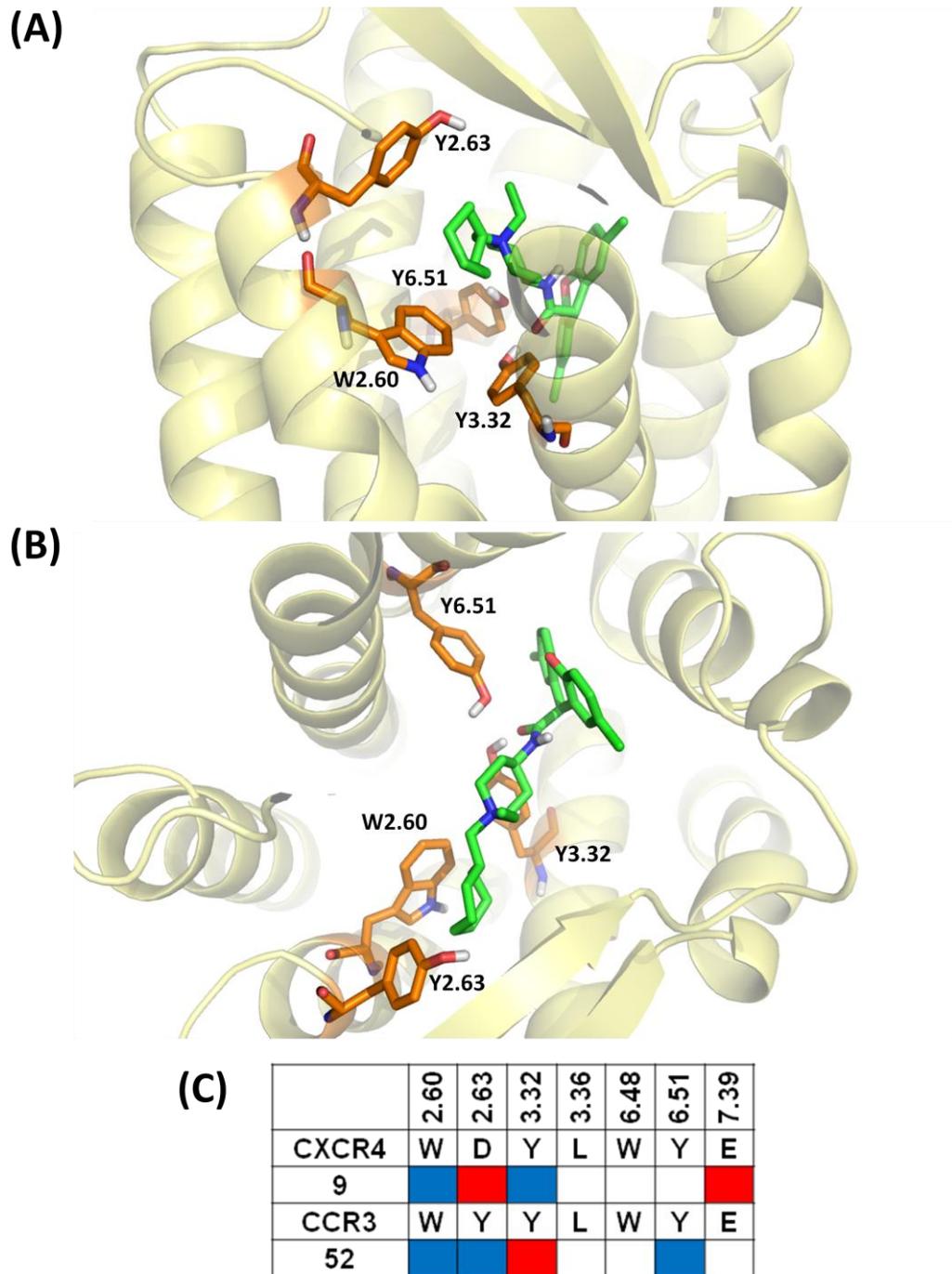


Figura 22. Interações observadas para o modelo *in silico* de CCR3 com o ligante **9** (vista lateral, **A** / vista superior, **B**). **(C)** O sistema de numeração Ballesteros Weinstein foi utilizado para a comparação entre resíduos mostrados no sítio de ligação para os receptores CCR3 (modelo *in silico* da figura) e CXCR4 (estrutura cristalográfica cocristalizada com o antagonista 1t1t). Interações hidrofóbicas são mostradas em azul e ligações de hidrogênio são mostradas em vermelho.

A visualização das potenciais interações ligante-receptor foram feitas com o programa PyMol⁶. No modelo *in silico* de CCR3, a subunidade tricíclica do ligante **9** apresenta interações hidrofóbicas com o resíduo de tirosina Y6.51 (Tyr-232), enquanto que o grupo carbonila em **9** faz interação de hidrogênio com o resíduo de tirosina Y3.32 (Tyr-90) (1.5 Å). Adicionalmente, a subunidade cicloptila mostra interações hidrofóbicas com os resíduos de tirosina Y2.63 (Tyr-70) e de triptofano W2.60 (Trp-67) (**Figura 22**).

No caso do modelo *in silico* de CCR4, a subunidade naftila do composto **52**, apresenta interações hidrofóbicas com os resíduos de fenilalanina F3.36 (Phe-93) e de triptofano W6.48 (Trp-227), enquanto o grupo sulfonamida realiza interações de hidrogênio com os resíduos de tirosina Y3.32 (Tyr-89) (1.5 Å) e Y6.51 (Tyr-230) (1.5 Å). O átomo de hidrogênio do grupo amida do composto **52** também faz interação de hidrogênio com o resíduo de tirosina Y3.32 (Tyr-89) (2.6 Å). A subunidade fenila em **52** também realiza interações hidrofóbicas com o resíduo de triptofano W2.60 (Trp-67), enquanto que átomo de nitrogênio carregado positivamente da subunidade piperidina pode realizar interação de hidrogênio com o resíduo de glutamato E7.39 (Glu-262) (1.7 Å) (**Figura 23**).

No caso das estruturas químicas do antagonista do receptor CCR3 **9** e do antagonista do receptor CCR4 **52**, pode-se observar um átomo de nitrogênio carregado positivamente como um ponto de interação iônica em potencial com resíduos de aminoácidos carregados negativamente, presentes nos respectivos sítios ativos destas quimiocinas (*e.g.* E7.39), assim como subunidades alicíclicas presentes nas estruturas dos antagonistas, de modo a restringir conformacionalmente os compostos visando seletividade.

Na parte “C” das **Figuras 22 e 23**, podemos observar que os receptores CXCR4, CCR3 e CCR4 apresentam dois resíduos conservados em comum (W2.60 e Y3.32) envolvidos em interações tanto na estrutura cristalina como nos modelos *in silico* em seus sítios de ligação.

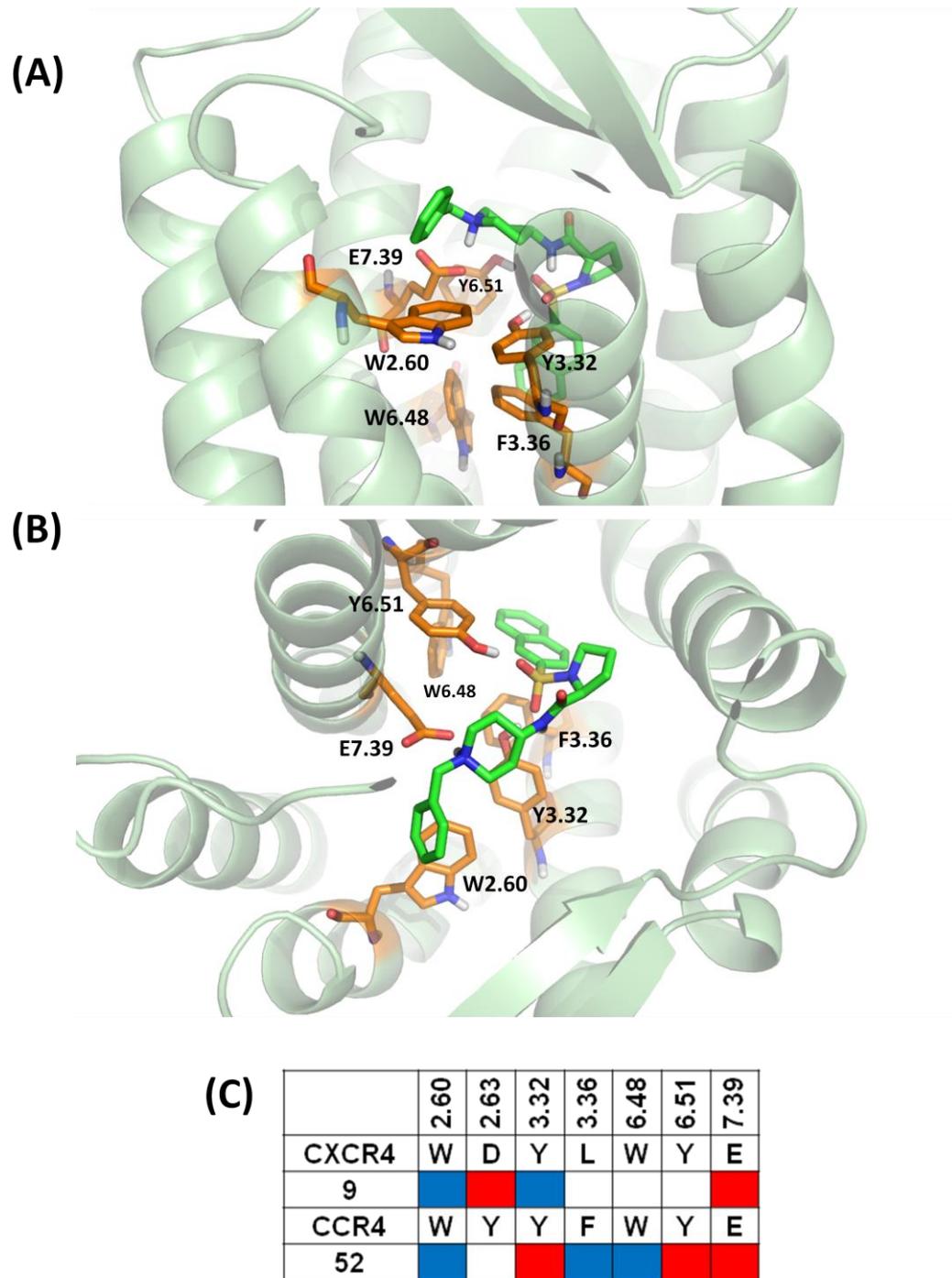


Figura 23. Interações observadas para o modelo *in silico* de CCR4 com o ligante 52 (vista lateral, A / vista superior, B). (C) O sistema de numeração Ballesteros Weinstein foi utilizado para a comparação entre resíduos mostrados no sítio de ligação para os receptores CCR4 (modelo *in silico* da figura) e CXCR4 (estrutura cristalográfica cocristalizada com o antagonista 1t1t). Interações hidrofóbicas são mostradas em azul e ligações de hidrogênio são mostradas em vermelho.

Além disso, o receptor CXCR4 possui outro resíduo de aminoácido conservado no sítio de ligação em comum com o receptor CCR4 (E7.39) e o receptor CCR3 também possui resíduo em comum com o receptor CCR4 (Y6.51) em seu sítio de ligação. Estas similaridades estruturais podem ser usadas no planejamento/análise dos ligantes duais propostos para estes receptores.

Adicionalmente, grupos funcionais amida e sulfonamida podem ser importantes pontos de interação de hidrogênio com os resíduos presentes nos sítios de ligação (*e.g.* Y3.32 e Y6.51) e as duas subunidades aromáticas ou alicíclicas em ambas as extremidades dos compostos-protótipo **9** e **52** são potencialmente importantes para a realização de interações hidrofóbicas (*e.g.* W2.60). Estas características observadas na análise *in silico* dos receptores CCR3 e CCR4 são também evidenciadas nas análises de relação estrutura-atividade (REA), mostradas nas **Seções 1.4 e 1.5**.

Portanto, para o planejamento de ligantes/antagonistas duais de receptores CCR3 e CCR4, ao menos um grupo amida ou sulfonamida parecem ser relevantes, ao menos um átomo de nitrogênio básico (carregado positivamente) em uma subunidade conformacionalmente restrita, assim como a presença de dois anéis aromáticos adequadamente espaçados. O resíduo de aminoácido prolina internalizado (restrição conformacional) na estrutura de alguns antagonistas de receptores CCR3 e CCR4 observados nos estudos de REA, assim como outros resíduos de aminoácidos podem ser explorados visando reconhecimento molecular com os receptores de quimiocinas alvo deste estudo.

3.2 VALIDAÇÃO DOS MODELOS *IN SILICO* DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4

Os modelos *in silico* dos receptores CCR3 e CCR4, inicialmente obtidos, ou seja, sem minimização por mecânica molecular, foram validados por meio de estudos de ancoramento molecular rígido envolvendo ligantes da literatura com afinidade *in vitro* para seus respectivos receptores e posteriormente utilizados para a triagem virtual, de modo a selecionar os novos compostos planejados os mais promissores para síntese, seguido de avaliação farmacológica, de acordo com as etapas mostradas nas próximas seções.

3.2.1 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES DA LITERATURA DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR3 E CCR4

Com base nas informações discutidas na **Seção 3.1**, 7 ligantes da literatura com afinidade *in vitro* frente aos receptores de quimiocinas CCR3 foram selecionados aleatoriamente de uma mesma série de compostos para validação do modelo *in silico* de CCR3 (**Figura 24**) (TING et al., 2005b). Cada composto foi construído utilizando-se o programa Spartan 08', seguido de cálculo de mecânica molecular (MMFF). De modo a melhorar a qualidade das estruturas construídas, cada composto foi submetido a otimização por meio de cálculo semiempírico AM1, pois este se mostrou melhor que o método PM3 quanto a capacidade de reproduzir as distâncias interatômicas. Adicionalmente, os valores de desvio padrão de ligações importantes como S=O, C=C e C-N foram melhores usando o método semiempírico AM1, em comparação com PM3 e com o método ab initio DFT (B3LYP, 6-31G**).

Também foram selecionados 7 ligantes da literatura com afinidade *in vitro* frente aos receptores de quimiocinas CCR4 selecionados para validação do modelo *in silico* de CCR4 (**Figura 25**) (BURDI et al., 2007). Os critérios de seleção, construção e otimização estrutural dos compostos seguiram metodologia análoga aos ligantes de CCR3.

Os 14 ligantes construídos para ambos os receptores foram protonados na subunidade amina terciária, mostrada em azul nas **Figuras 24 e 25**, de modo a realizar os estudos de ancoramento molecular considerando o estado de protonação das moléculas em pH fisiológico, com base em dados experimentais descritos na literatura (BERGERON et al., 1995).

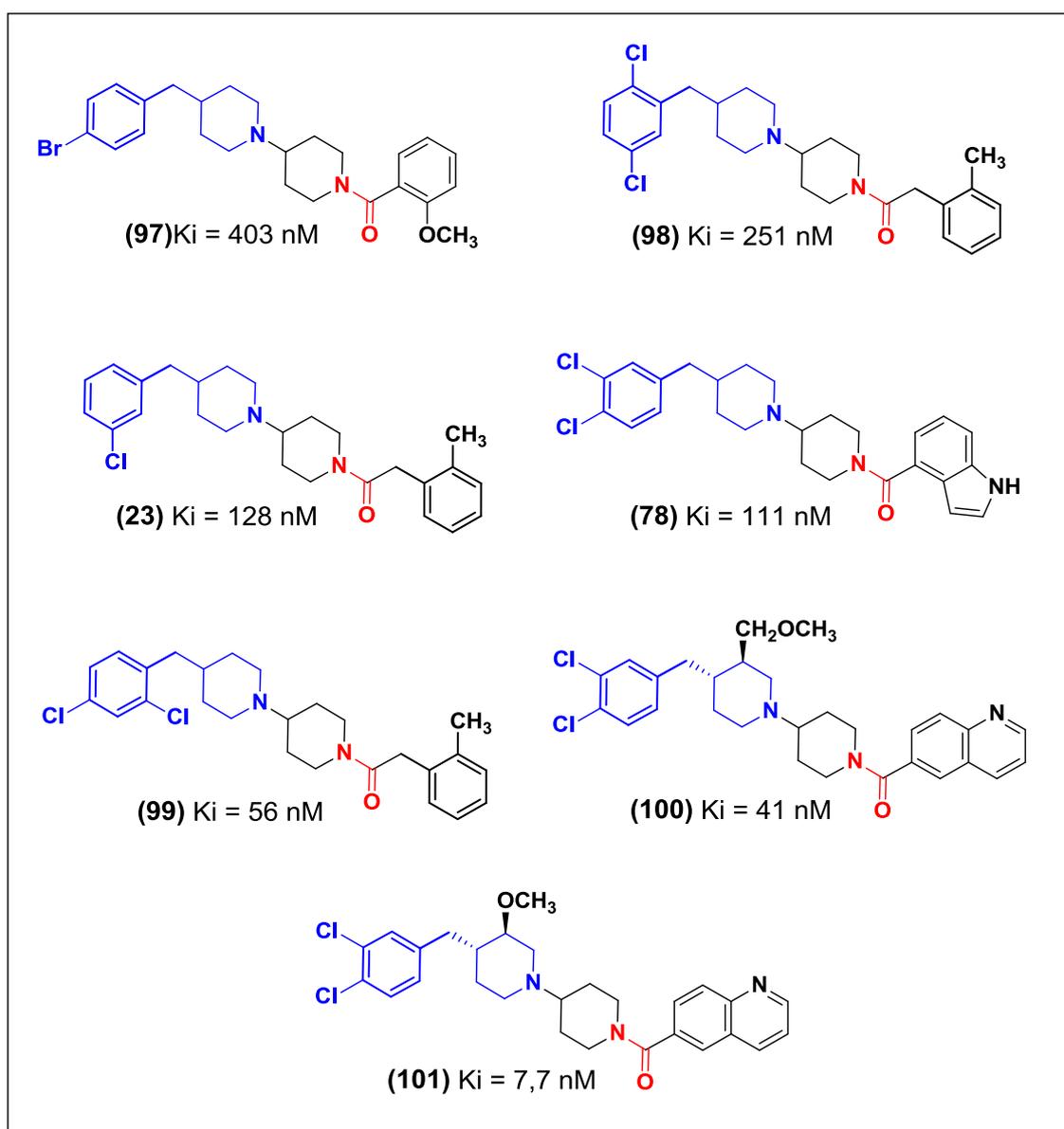


Figura 24: Ligantes dos receptores de quimiocinas do tipo CCR3 usados na etapa de validação do modelo por modelagem molecular comparativa de CCR3 (TING et al., 2005b).

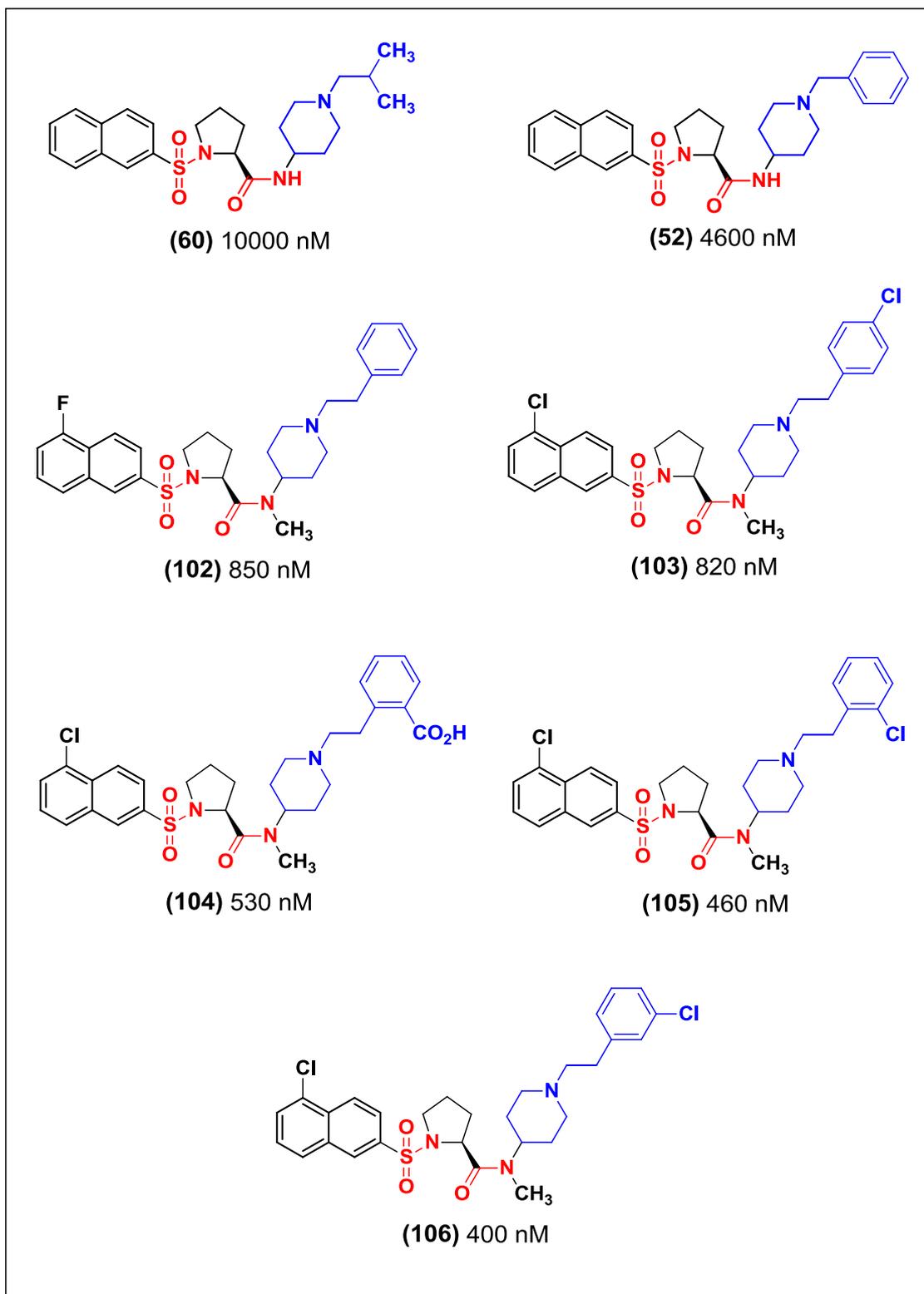


Figura 25: Ligantes dos receptores de quimiocinas do tipo CCR4 usados na etapa de validação do modelo por modelagem molecular comparativa de CCR4 (BURDI et al., 2007).

3.2.2 ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM OS LIGANTES DE CCR3 PARA VALIDAÇÃO

Os 7 ligantes com valores experimentais de afinidade frente ao receptor CCR3 mostrados na **Figura 24** foram submetidos ao ancoramento molecular rígido utilizando-se o modelo obtido por modelagem molecular comparativa do receptor de quimiocina do tipo CCR3. Esta etapa foi realizada com o programa GOLD 5.1 com as quatro funções de pontuação disponíveis no programa, a saber: **(a)** GoldScore, **(b)** ChemScore, **(c)** ASP e **(d)** ChemPLP. Para cada função de pontuação, os estudos de ancoramento molecular foram realizados 5 vezes, de modo a possibilitar análise estatística do desempenho de cada função utilizada.

Dentre as quatro funções de pontuação utilizadas, as funções ChemScore e ASP apresentaram as menores médias dos valores de desvio padrão em relação a pontuação obtida para os ligantes submetidos ao ancoramento molecular, mostrando que as funções ChemScore e ASP apresentaram menor variação em relação as funções GoldScore e ChemPLP. Quando os valores de pontuação foram correlacionados aos valores de afinidade, observou-se que as funções ASP e ChemPLP apresentaram índice de correlação melhores que as funções GoldScore e ChemScore, conforme pode ser observado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Análise estatística das funções de pontuação do programa GOLD 5.1 na validação do modelo *in silico* de CCR3.

CCR3		
<i>Função de pontuação</i>	<i>Coefficiente de correlação</i>	<i>Média do desvio padrão</i>
GoldScore	-0,63	2,52
ChemScore	-0,53	1,31
ASP	-0,75	1,63
ChemPLP	-0,75	2,13

Dentre as funções de pontuação avaliadas, as funções ASP e ChemPLP apresentaram os melhores índices de correlação, porém a função ASP apresentou melhor reprodutibilidade, logo esta função foi selecionada para avaliação da orientação das melhores poses de ancoramento molecular, assim como os resíduos do receptor CCR3 envolvidos nas interações com seus respectivos ligantes, listados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Valores de afinidade dos ligantes e pontuação da função ASP do programa GOLD 5.1 para o modelo *in silico* de CCR3. Quanto maior o valor da função de pontuação, mais interações o ligante faz no modelo *in silico*.

CCR3		
Composto*	Ki (nM)	ASP
101	7,7	52,96
100	41	52,832
99	56	47,376
78	111	47,912
23	128	47,764
98	251	47,486
97	403	45,5

*As respectivas estruturas são descritas na **Figura 24**.

Na **Figura 26**, é mostrada a melhor pose de ancoramento molecular obtida com a função de pontuação ASP para o ligante **101** no modelo *in silico* do receptor CCR3. Podemos observar que a subunidade 6-quinolina do composto **101** realiza interações hidrofóbicas com os resíduos de triptofano W2.60 (Trp-67) e tirosina Y2.63 (Tyr-70) no sítio menor, enquanto que o hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio carregado positivamente do composto **101** faz ligação de hidrogênio com o resíduo

de serina S5.23 (Ser-161) (2,2 Å). Adicionalmente, a subunidade 3,4-diclorofenila de **101** realiza interações hidrofóbicas com os resíduos de tirosina Y5.26 (Tyr-164) e tirosina Y5.32 (Tyr-170) no sítio maior.

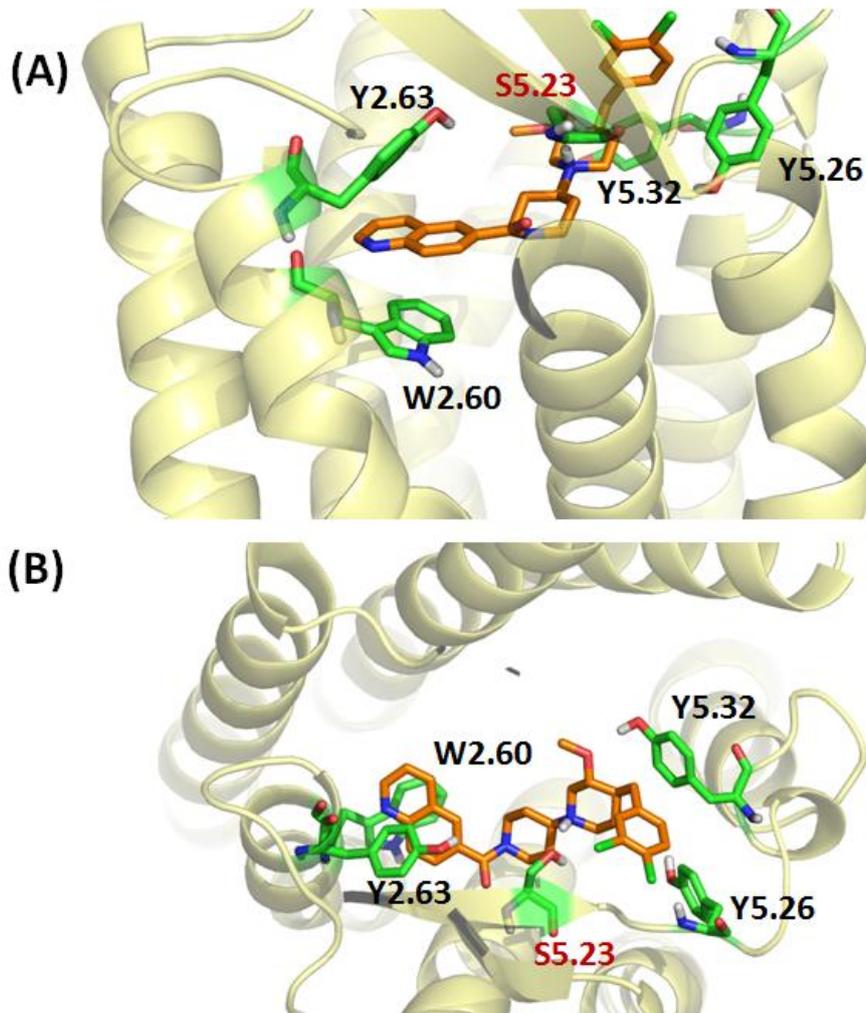


Figura 26. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida no programa GOLD 5.1 com a função de pontuação ASP, para o ligante **101** no modelo *in silico* do receptor CCR3. (A) Vista lateral. (B) Vista superior.

Na **Figura 26 (B)**, também podemos observar uma interação entre um par de elétrons não ligante do átomo de cloro na posição 4 da subunidade 3,4-diclorofenila de **101** e o átomo de hidrogênio da tirosina Y5.26 (Tyr-164) (2,4 Å), assim como a

ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo metoxila em **101** e o átomo de hidrogênio da hidroxila da tirosina Y5.32 (Tyr-170) (3,2 Å).

3.2.3 ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM OS LIGANTES DE CCR4 PARA VALIDAÇÃO

De forma análoga à validação do modelo *in silico* do receptor CCR3, os 7 ligantes com valores experimentais de afinidade frente ao receptor CCR4 mostrados na **Figura 25** foram submetidos ao ancoramento molecular rígido utilizando-se o modelo obtido por modelagem comparativa do receptor de quimiocina do tipo CCR4.

Assim como para a validação do modelo *in silico* do receptor CCR3, as funções ChemScore e ASP apresentaram as menores médias dos valores de desvio padrão em relação a pontuação obtida para os ligantes da literatura submetidos ao ancoramento molecular rígido, mostrando que as funções ChemScore e ASP apresentaram menor variação em relação as funções GoldScore e ChemPLP. Da mesma forma, as funções ASP e ChemPLP apresentaram coeficiente de correlação melhores que as funções GoldScore e ChemScore, conforme pode ser observado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Análise estatística das funções de pontuação do programa GOLD 5.1 na validação do modelo *in silico* de CCR4. Quanto maior o valor da função de pontuação, mais interações o ligante faz no modelo *in silico*.

<i>CCR4</i>		
<i>Função de pontuação</i>	<i>Coefficiente de correlação</i>	<i>Média do desvio padrão</i>
GoldScore	-0,51	2,26
ChemScore	-0,66	1,48
ASP	-0,87	1,80
ChemPLP	-0,96	2,89

Logo, a função de pontuação ASP também foi selecionada para avaliação da orientação das melhores poses de ancoramento molecular, assim como os resíduos do receptor CCR4 envolvidos nas interações com seus respectivos ligantes, listados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Valores de afinidade dos ligantes e pontuação da função ASP do programa GOLD 5.1 para o modelo *in silico* de CCR4.

<i>CCR4</i>		
<i>Composto*</i>	<i>Ki (μM)</i>	<i>ASP</i>
106	0,4	47,40
105	0,46	47,56
104	0,53	48,47
103	0,82	49,32
102	0,85	50,57
52	4,6	47,40
60	10	42,36

*As respectivas estruturas são descritas na **Figura 25**.

Na **Figura 27 (A)**, podemos observar a melhor pose de ancoramento molecular obtida com a função de pontuação ASP para o ligante **106** no modelo *in silico* do receptor CCR4. A subunidade 5-cloro-2-naftila de composto **106**, posicionada no sítio menor, realiza interações hidrofóbicas com os resíduos de tirosina Y2.63 (Tyr-70) e tirosina Y5.22 (Tyr-158). O resíduo de glutamina Q7.36 (Gln-259) faz ligações de hidrogênio (1,9 Å) com um dos átomos de oxigênio do grupo sulfonamida de **106**, enquanto que a subunidade 3-clorofenila deste composto, posicionada no sítio maior, está envolvida em interações hidrofóbicas com os resíduos de tirosina Y3.32 (Tyr-89), fenilalanina F3.36 (Phe-93) e isoleucina I 5.42 (Ile-178). Além disso, um dos pares de elétrons não ligantes do átomo de cloro (raio atômico: 0,97 Å; 0,32 Å a menos do que no caso do oxigênio) da subunidade 5-cloro-2-naftila de **106** parece realizar interações com a cadeia lateral do resíduo de lisina K1.24 (Lys-3) (2,9 Å) (**Figura 27, B**).

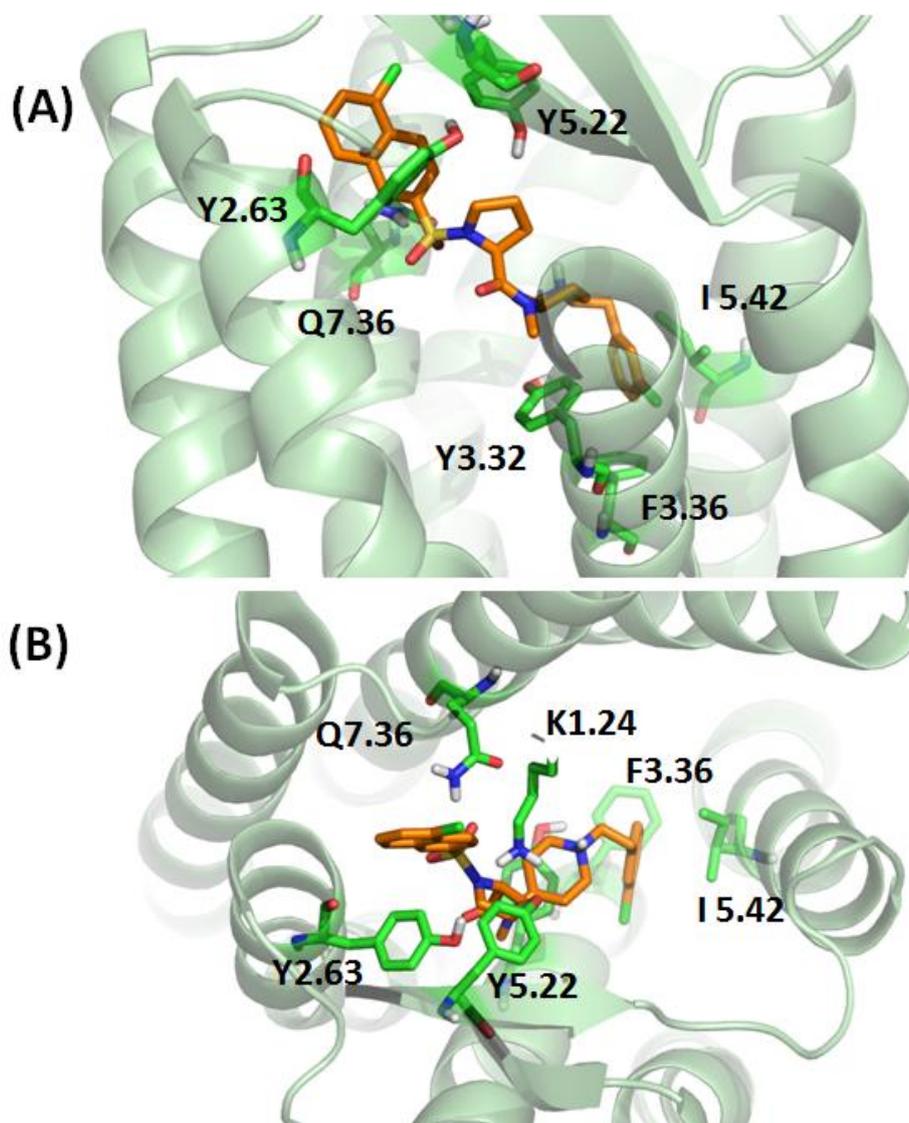


Figura 27. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida no programa GOLD 5.1 com a função de pontuação ASP para o ligante **106** no modelo *in silico* do receptor CCR4. (A) Vista lateral. (B) Vista superior.

3.3 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM MODELOS *IN SILICO* DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4

Após a etapa de validação dos modelos dos receptores CCR3 e CCR4, obtidos por modelagem comparativa, eles foram empregados para a triagem virtual e análise *in silico* dos compostos propostos como ligantes duais destes dois receptores de quimiocinas. Para este propósito, os 16 compostos planejados (81-96) (**Figuras 17 e**

18) foram previamente construídos, considerando-se o estado de protonação adequado, com o programa Spartan 08', seguido de cálculo de mecânica molecular. Visando melhorar a qualidade das estruturas construídas, cada composto foi submetido a otimização por meio de cálculo semiempírico do tipo AM1.

Visto que a função de pontuação ASP apresentou o melhor desempenho quando analisamos o desvio padrão e o coeficiente de correlação, esta foi então empregada nos experimentos de ancoramento molecular, sendo realizadas 5 corridas para cada ligante, entre os compostos planejados e os modelos *in silico* dos receptores CCR3 e CCR4.

3.3.1 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM RECEPTORES DE QUIMIOCINA DO TIPO CCR3

Quando analisamos os valores da função de pontuação ASP para os antagonistas de CCR3 da literatura juntamente com os compostos planejados, podemos observar que os derivados planejados apresentam os maiores valores de pontuação, com destaque para os derivados que apresentam um resíduo de *R*-prolina ou *S*-prolina internalizado na estrutura (**Tabela 6**). O derivado com mais elevado valor de pontuação ASP, que apresenta um resíduo de aminoácido natural internalizado em sua estrutura, *i.e.* LASSBio-1830 (**81**), foi escolhido para exemplificarmos e discutirmos as interações ligante-receptor, conforme pode ser observado na **Figura 28 (A e B)**.

Tabela 6: Valores de pontuação ASP após ancoramento molecular com o programa GOLD 5.1 dos compostos **81-96** planejados como ligantes, juntamente com os 7 antagonistas do receptor CCR3 utilizados na etapa de validação.

Compostos avaliados	Valores da função de pontuação ASP
H_RPro_Me (87)	55,38
Me_RPro_Me (88)	54,64
LASSBio-1830 (H_SPro_H) (81)	54,56
H_SPro_Me (85)	53,65
Me_SPro_Me (86)	53,34
Me_Sar_Me (96)	53,11
101	52,96
100	52,83
H_Sar_Me (95)	52,65
Me_Gli_Me (94)	52,12
H_Gli_Me (93)	51,93
LASSBio-1641 (Me_SPro_H) (82)	51,90
LASSBio-1765 (H_Sar_H) (91)	51,47
H_RPro_H (83)	51,36
Me_RPro_H (84)	50,36
LASSBio-1642 (Me_Sar_H) (92)	49,67
LASSBio-1843 (Me_Gli_H) (90)	49,57
LASSBio-1831 (H_Gli_H) (89)	49,53
78	47,91
23	47,76
98	47,49
99	47,38
97	45,50

O derivado LASSBio-1641 (**82**) apresenta valor intermediário na função ASP, porém também apresenta um resíduo de *S*-prolina internalizado em sua estrutura.

A melhor pose de ancoramento molecular obtida com a função de pontuação ASP para LASSBio-1830 (**81**) no modelo *in silico* do receptor CCR3 apresenta interações que foram destacadas para 5 resíduos de aminoácidos. A subunidade benzodioxola de (**81**) realiza interações hidrofóbicas com os resíduos de tirosina Y5.26 (Tyr-164) e tirosina Y5.32 (Tyr-170) no sítio maior (**Figura 28, B**).

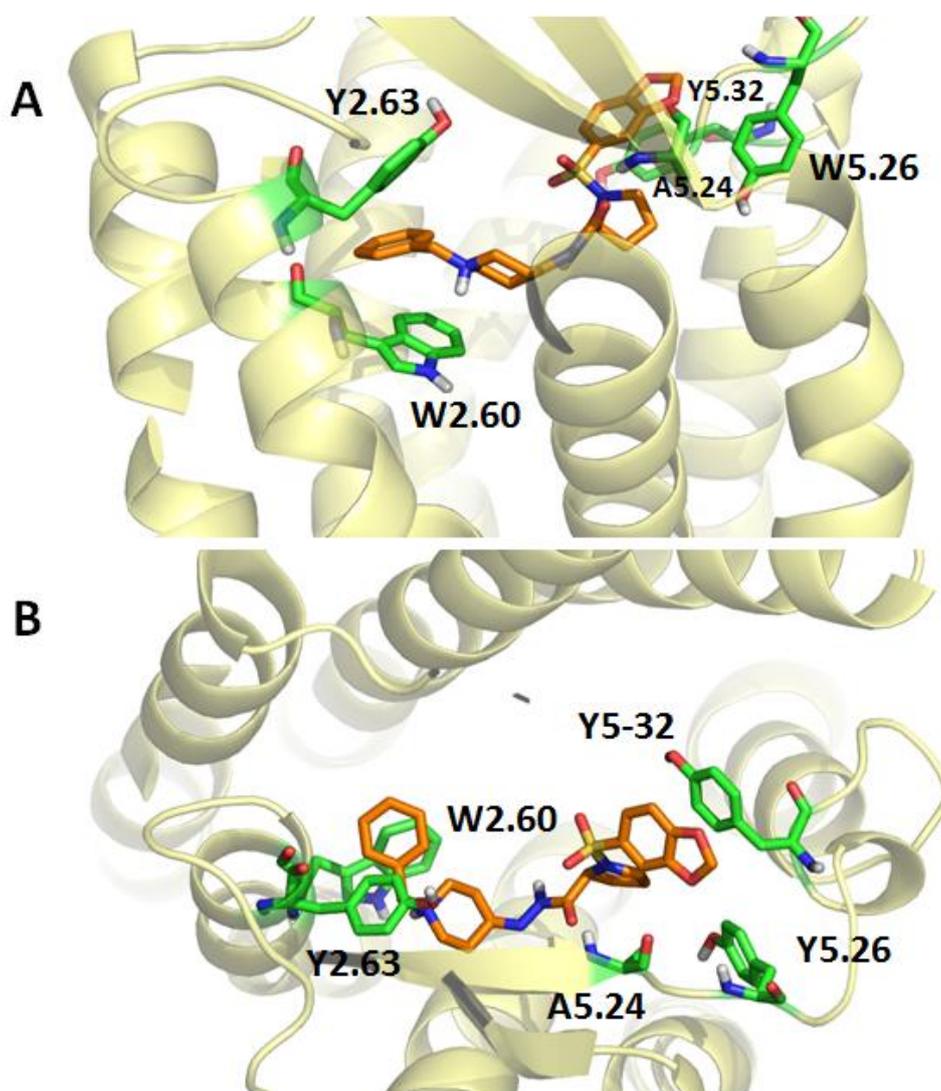


Figura 28. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida no programa GOLD 5.1 com a função de pontuação ASP para o ligante LASSBio-1830 (**81**) no modelo *in silico* do receptor CCR3. **(A)** Vista lateral. **(B)** Vista superior.

O resíduo de alanina A5.24 (Ala-162) está a uma distância inferior a 5 Å da carbonila da subunidade *N*-acilidrazona de **81**, porém não com proximidade suficiente para efetuar ligações de hidrogênio relevantes (3,6 Å). Adicionalmente, a subunidade benzila de **81**, orientada no sítio menor, está envolvida em interações hidrofóbicas com os resíduos de tirosina Y2.63 (Tyr-70) e triptofano W2.60 (Trp-67) (**Figura 28, A**).

3.3.2 TRIAGEM VIRTUAL DOS COMPOSTOS PLANEJADOS EM RECEPTORES DE QUIMIOCINA DO TIPO CCR4

No caso dos valores da função ASP para os antagonistas de CCR4 da literatura juntamente com os compostos planejados, podemos observar que o derivado LASSBio-1830 (**81**) apresenta uma posição de destaque, apresentando o mais elevado valor médio de pontuação. Os derivados LASSBio-1843 (**90**) e LASSBio-1642 (**92**), assim como **81**, não apresentam a subunidade *N*-acilidrazona metilada, mas apresentam valores de pontuação maiores do que todos os ligantes da literatura que foram submetidos ao ancoramento molecular frente ao receptor CCR4 (**Tabela 7**). LASSBio-1830 (**81**) foi escolhido para exemplificarmos e discutirmos as interações ligantes-receptor, conforme pode ser observado na **Figura 29 (A e B)**.

A melhor pose de ancoramento molecular obtida com a função de pontuação ASP para LASSBio-1830 (**81**), desta vez no modelo *in silico* do receptor CCR4 apresenta interações que foram destacadas para 7 resíduos de aminoácidos. A subunidade benzila de (**81**), orientada no sítio menor, realiza interações hidrofóbicas com os resíduos de triptofano W2.60 (Trp-67), W2.18 (Trp-75) e isoleucina I2.28 (Ile-85) (**Figura 28, B**). O resíduo de lisina K1.24 (Lys-3) realiza ligação de hidrogênio (3,1 Å) com a carbonila da subunidade *N*-acilidrazona de LASSBio-1830 (**81**) enquanto que o resíduo de glutamina Q7.36 (Gln-259) realiza ligações de hidrogênio relevantes com o grupamento sulfonamida de **81** (3,1 Å).

Tabela 7: Valores de pontuação ASP após ancoramento molecular com o programa GOLD 5.1 dos compostos **81-96** planejados como ligantes, juntamente com os 7 antagonistas do receptor CCR4 utilizados na etapa de validação.

Compostos avaliados	Valores da função de pontuação ASP
LASSBio-1830 (H_SPro_H) (81)	51,04
H_RPro_H (83)	50,97
LASSBio-1843 (Me_Gli_H) (90)	50,89
Me_Gli_Me (94)	50,88
LASSBio-1642 (Me_Sar_H) (92)	50,67
102	50,57
H_Gli_Me (93)	50,52
H_Sar_Me (95)	50,40
H_SPro_Me (85)	49,89
Me_Sar_Me (96)	49,62
103	49,33
LASSBio-1641 (Me_SPro_H) (82)	49,29
LASSBio-1831 (H_Gli_H) (89)	49,29
Me_RPro_H (84)	48,98
LASSBio-1765 (H_Sar_H) (91)	48,86
104	48,47
H_RPro_Me (87)	48,38
Me_RPro_Me (88)	48,00
105	47,56
106	47,40
52	47,40
Me_SPro_Me (86)	45,69
60	42,36

Além disso, um dos átomos de oxigênio da subunidade benzodioxola de **81** realiza interações de hidrogênio (3,0 Å) com a tirosina Y2.63 (Tyr-70), enquanto que a subunidade aromática do resíduo de tirosina Y5.22 (Tyr-158) realiza interações hidrofóbicas com a mesma subunidade benzodioxola em **81**, dessa forma, mostrando a característica desta subunidade realizar tanto interações hidrofóbicas com polares.

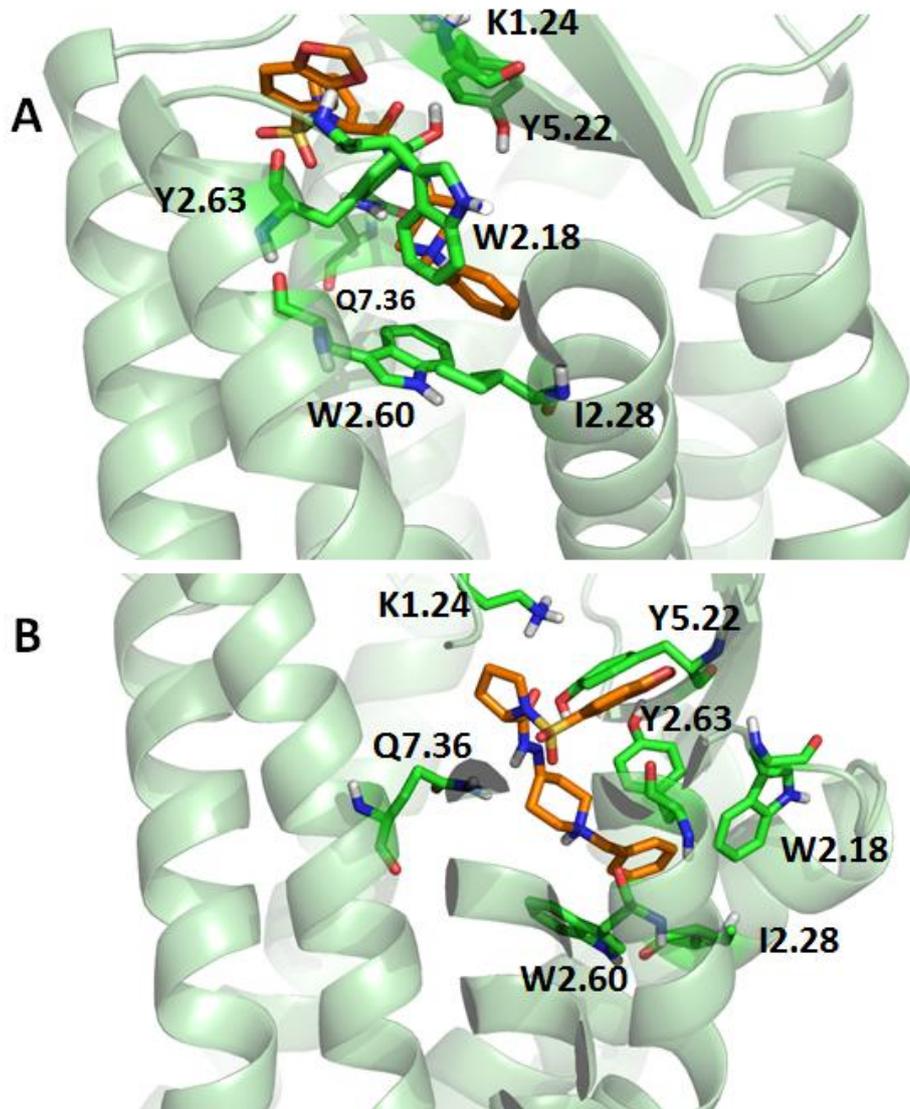


Figura 29. Interações observadas para a melhor pose de ancoramento molecular obtida com a função de pontuação ASP para o ligante LASSBio-1830 (**81**) no modelo *in silico* do receptor CCR4. (A) Vista lateral. (B) Vista invertida.

3.3.3 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE NOS ESTUDOS *IN SILICO*

Com base nas informações discutidas nas Seções 3.3.1 e 3.3.2, foram selecionados 6 derivados para a etapa de síntese (Figura 30). Dessa forma, podemos avaliar o derivado LASSBio-1830 (81), que apresentou boas pontuações para ambos os receptores, além de derivados que apresentam valores intermediários de pontuação: LASSBio-1641 análogo de 81 metilado no anel benzodioxola (82), LASSBio-1642 (92) e LASSBio-1765 (91), os derivados com a subunidade sarcosina internalizada, assim como os derivados LASSBio-1843 (90) e LASSBio-1831 (89), que apresentam a subunidade glicina internalizada. Os compostos 87 e 88, apesar de apresentarem boa pontuação *in silico* para o receptor CCR3, seus valores de pontuação foram muito baixos para o receptor CCR4, logo e eles não foram selecionados para a etapa de síntese.

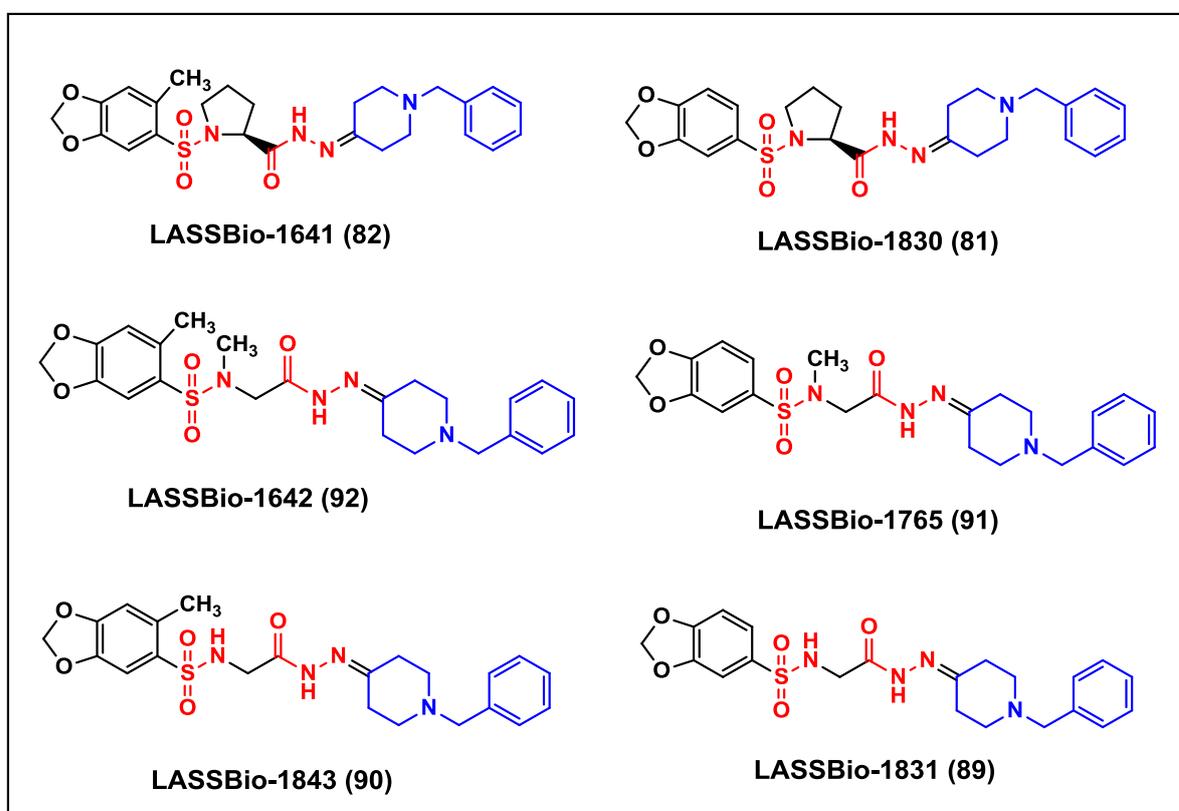


Figura 30. Compostos *N*-acilidrazônicos selecionados com base nos estudos *in silico*, como candidatos a ligantes duais de receptores de quimiocina do tipo CCR3 e CCR4.

3.4 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS SELECIONADOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE

3.4.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA

De modo a racionalizar a melhor estratégia de síntese dos derivados selecionados para a etapa de síntese, a seguir é mostrada a análise retrosintética para a obtenção dos derivados mostrados na **Seção 3.3.3 (Figura 31)**. A desconexão da ligação C=N da *N*-acilidrazona **107** nos permite identificar como precursores sintéticos a hidrazida **109** e a *N*-benzilpiperidona **108** através da reação de condensação, a qual pode ser realizada por meio de catálise ácida. Por sua vez, a desconexão da ligação C-N da hidrazida **109** permite identificar o respectivo éster **110** como precursor, através da interconversão de grupos funcionais (IGF)

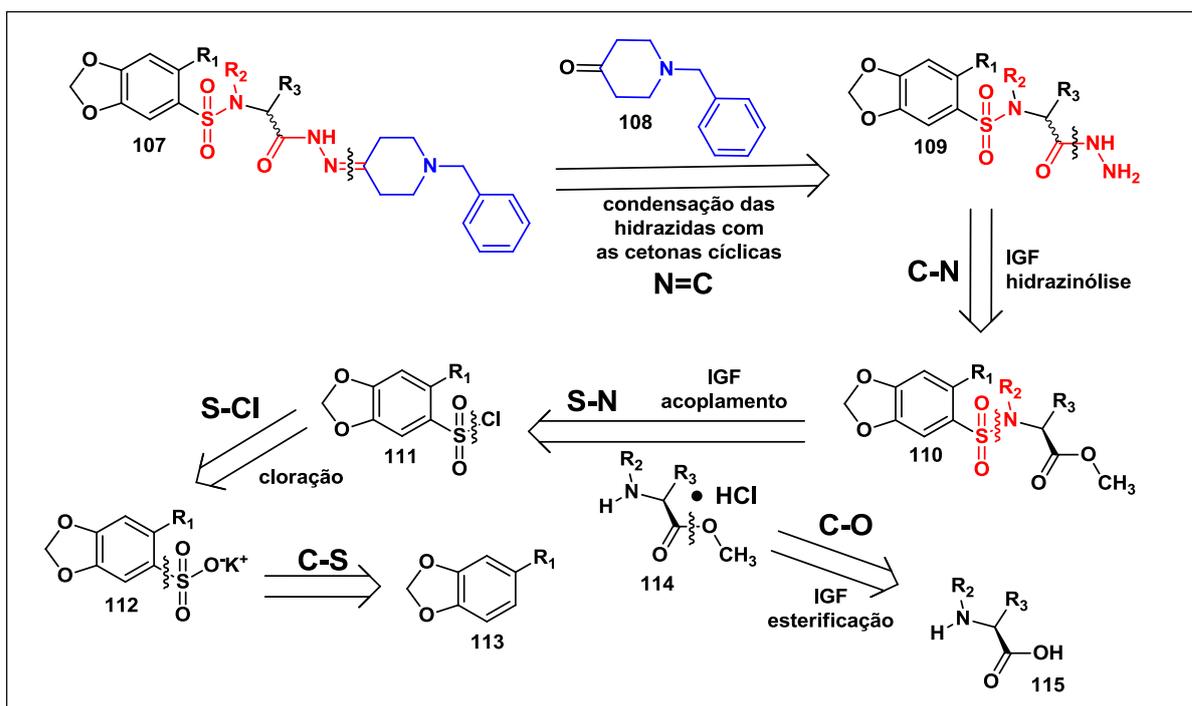
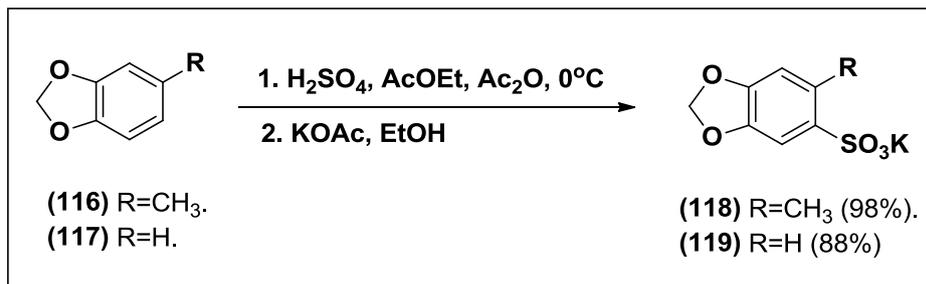


Figura 31. Análise retrosintética para a obtenção dos derivados *N*-acilidrazônicos eleitos para a etapa de síntese.

Ademais, a desconexão da ligação S-N de **110** permite evidenciar o cloreto de sulfonila **111** como precursor, também através de uma IGF, a qual envolve substituição nucleofílica à sulfona realizada por **114**, seguida de eliminação do íon cloreto. Por fim, a desconexão da ligação C-S de **112** permite evidenciar a benzodioxola **113**, substituída ou não por um grupo alquila, como precursor, explorando a reação de substituição eletrofílica aromática (SEAr). Em paralelo, a desconexão da ligação C-O em **114**, permite-nos evidenciar o aminoácido **115** como precursor, explorando uma IGF.

A obtenção do cloreto de sulfonila **111** em uma etapa empregando-se ácido clorosulfônico poderia resultar em cisão da ponte metilenodioxila (FRAGA, 1991), por isso, considerou-se a obtenção de **111** a partir de **113** em duas etapas, de modo a poder explorar conversões químicas mais brandas (GRAHAM et al., 1990), conforme será discutido a seguir.

Para a obtenção dos benzenossulfonatos de potássio **118** e **119**, os respectivos precursores sintéticos **116** e **117** foram submetidos a reação de substituição eletrofílica aromática (SEAr) em banho de gelo e com adição de ácido sulfúrico gota-a-gota para evitar que a sulfonação ocorresse em outras posições do sistema benzodioxólico. Após a adição lenta do acetato de potássio na segunda etapa para evitar a formação de grumos, foi possível obter-se os produtos desejados em rendimentos elevados e em graus de pureza adequados para a etapa seguinte (**Esquema 1**) (FRAGA et al., 1992).



Esquema 1: Reação de obtenção do 2-metil-3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (118) e do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (119).

No espectro de RMN de hidrogênio do benzenossulfonato de potássio **119** (**Figura 32**), podemos observar a presença de um simpleto em 6,10 ppm referente aos dois átomos de hidrogênio H-2 magneticamente equivalentes presentes na subunidade metilenodioxila. Na parte inferior da **Figura 32**, podemos observar o átomo de hidrogênio H-6 como um duplo duplete em 7,4 ppm, com constantes de acoplamento J^3 (8,4 Hz) em relação ao átomo de hidrogênio H-7 e J^4 (2,0 Hz) em relação ao átomo de hidrogênio H-4. Os átomos de hidrogênio H-4 e H-7 são observados como dupletos com valores de deslocamento químico de 7,30 (2,0 Hz) e 6,99 (8,4 Hz) ppm, respectivamente.

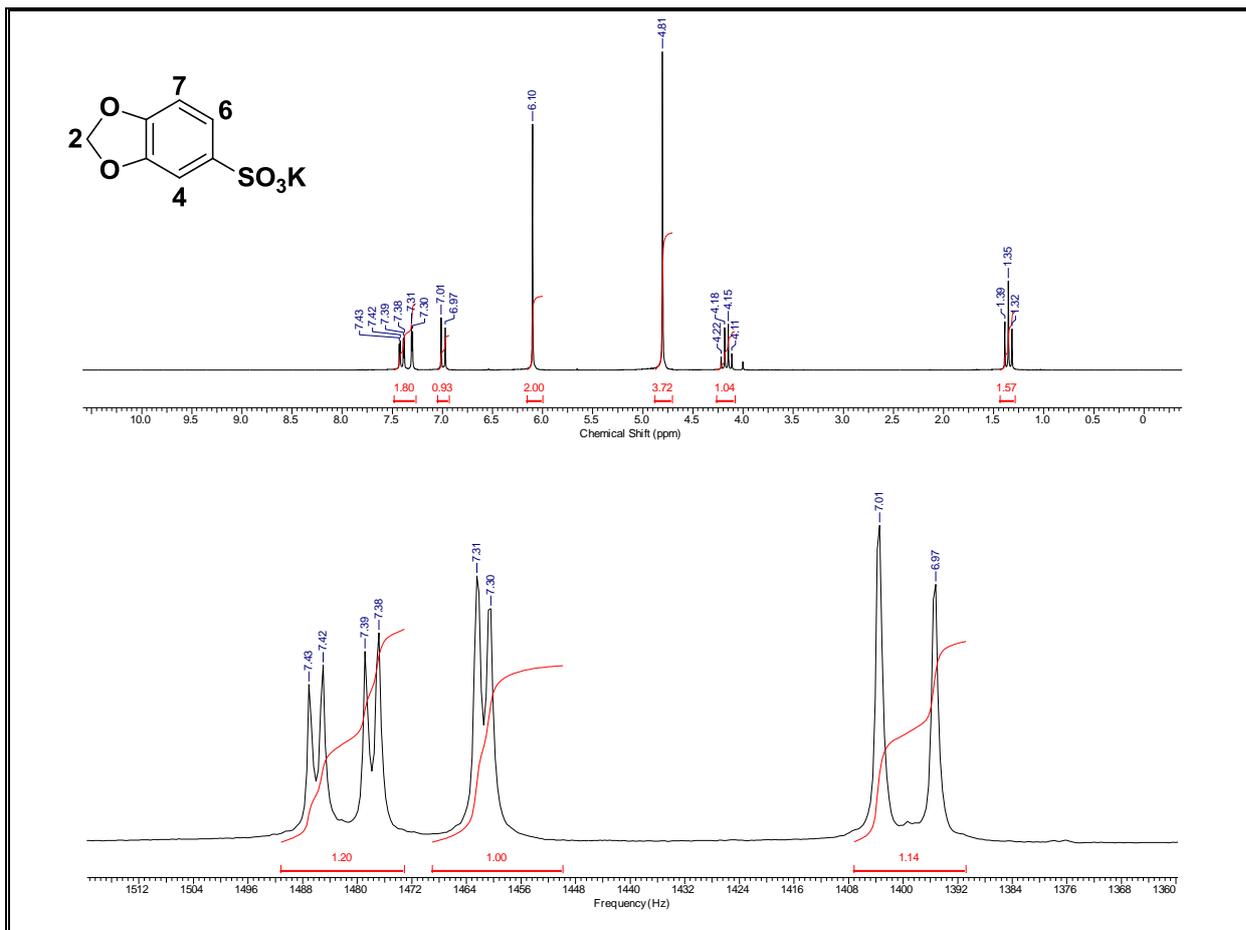
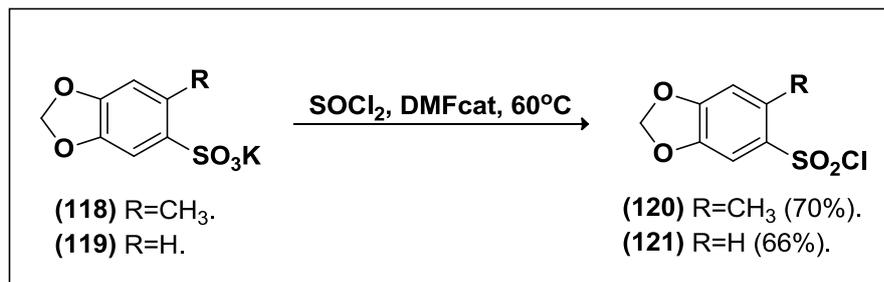


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do 3,4-metilenodioxibenzossulfonato de potássio (**119**) ($\text{D}_2\text{O}/200$ MHz).

3.4.2 OBTENÇÃO DOS CLORETOS DE BENZENOSSULFONILA **120** E **121**

Em seguida, os sulfonatos de potássio **118** e **119** foram submetidos a reação de cloração em cloreto de tionila e *N,N*-dimetilformamida (DMF) catalítico. A temperatura não deve ultrapassar 70°C de modo a evitar degradação e formação de subprodutos. Os cloretos de sulfonila **120** e **121** foram obtidos em grau de pureza e rendimentos adequados (**Esquema 2**) sem a necessidade de utilização de purificação por cromatografia em coluna (FRAGA et al.,1992).



Esquema 2: Reação de obtenção dos cloretos de 2-metil-4,5-metilenodioxibenzenossulfonila **(120)** e de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila **(121)**.

O mecanismo de formação dos cloretos de sulfonila a partir dos seus respectivos sulfonatos de potássio, utilizando DMF catalítico é mostrado na **Figura 33**. Inicialmente, o deslocamento do par de elétrons do átomo de nitrogênio terciário do DMF propicia o ataque nucleofílico, em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) ao átomo de enxofre do composto tetraétrico cloreto de tionila, que teve o par de elétrons livres no enxofre omitido no mecanismo para melhorar a visualização (**Figura 33 (A)**). Em seguida, o cloreto liberado na S_N2 ataca o átomo de carbono da imina do segundo intermediário formado e um par de elétrons na ligação dupla da imina neutraliza a carga positiva do átomo de nitrogênio. A primeira parte do mecanismo é finalizada com a formação do eletrófilo *N*-(clorometileno)-*N*-metilmetanamínio, após a formação da ligação C=N e liberação de dióxido de enxofre e do íon cloreto (CLAYDEN et al., 2001).

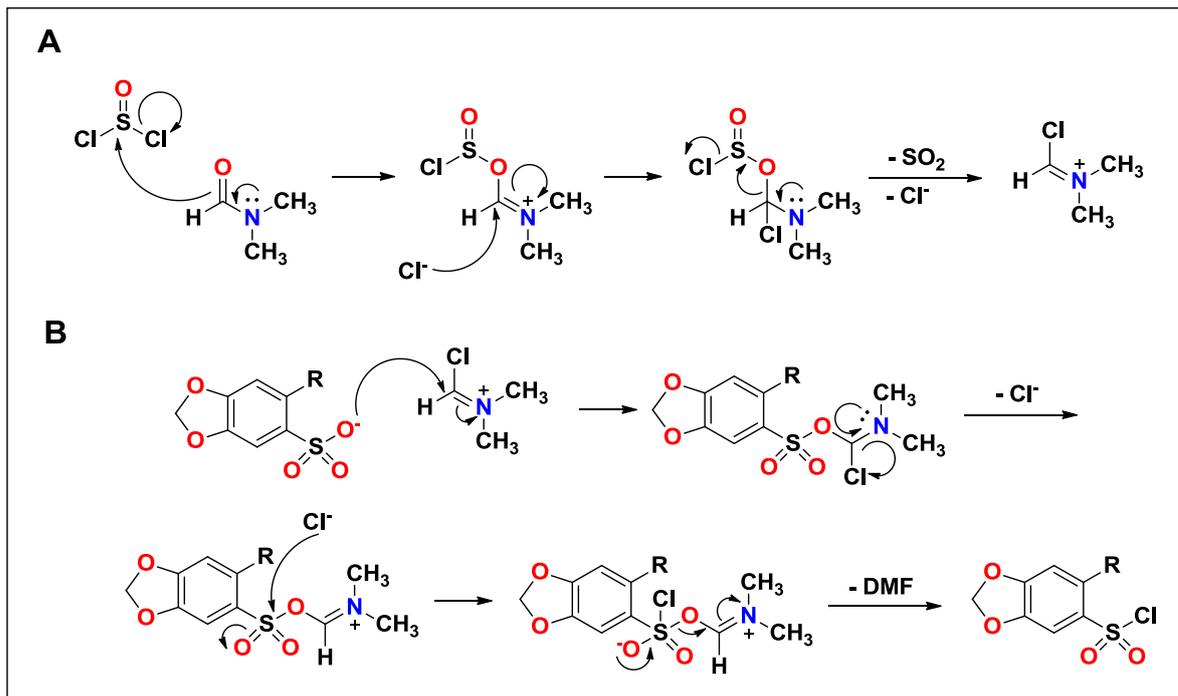


Figura 33. (A) Formação do complexo de Vilsmeier-Haack (eletrófilo). (B) Formação dos cloretos de benzenossulfonila **120** e **121**.

Na segunda parte do mecanismo, representado na **Figura 33 (B)**, um dos pares de elétrons livres de um dos átomos de oxigênio do sulfonato de partida realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono com hibridização sp^2 do cátion *N*-(clorometileno)-*N*-metilmetanamínio para gerar o intermediário subsequente, que após a restauração da ligação dupla da imina, libera o ânion cloreto. Em seguida, o íon cloreto (nucleófilo) liberado ataca o átomo de enxofre da subunidade sulfona e concentra a carga negativa de um dos pares de elétrons de uma ligação π no átomo de oxigênio. Esta mesma carga negativa do par eletrônico é a responsável por regenerar a ligação dupla S=O e formar novamente o catalisador da reação (DMF) e o cloreto de sulfonila correspondente.

Apesar das pequenas variações de deslocamento químico dos sinais dos espectros de RMN de carbono-13 e hidrogênio-1 dos cloretos de sulfonila **120** e **121**

em relação aos seus precursores **118** e **119**, há variação significativa nos pontos de fusão e aspectos físicos observados, conforme pode ser observado na **Tabela 8**.

Tabela 8: Valores de pontos de fusão e aspectos físicos dos cloretos de sulfonila **120** e **121** e dos precursores **118** e **119**.

	Sulfonatos de potássio		Cloretos de sulfonila	
	118	119	120	121
P.F. (°C)	192-194	231-233	58-60	41-43
Aspecto físico	<i>Sólido branco</i>	<i>Sólido branco</i>	<i>Sólido marrom</i>	<i>Sólido marrom</i>
Solubilidade em água	<i>Solúvel</i>	<i>Solúvel</i>	<i>Insolúvel</i>	<i>Insolúvel</i>
Solubilidade em DCM	<i>Insolúvel</i>	<i>Insolúvel</i>	<i>Solúvel</i>	<i>Solúvel</i>

3.4.3 REAÇÕES ENVOLVENDO OS AMINOÁCIDOS GLICINA E S-PROLINA VISANDO A OBTENÇÃO DOS ESTERES **123** e **125**

Inicialmente, tentou-se obter os ésteres metílicos da glicina **123** e da S-prolina **125** utilizando-se cloreto de trimetilsilano em metanol anidro por 24 horas (LI & SHA., 2008) (**Figura 34 (A)**) porém houve a formação de várias impurezas observadas por RMN de ^1H e ^{13}C , além dos tempos de reação demasiadamente longos na obtenção de ambos. Ademais, encontrou-se o P.F diferente da literatura no caso da tentativa de obtenção de **123** (P.F._{lit} = 130; P.F._{exp} = 175), enquanto que **125** também não foi obtido com a metodologia empregada. A segunda tentativa envolveu a esterificação da glicina por metodologia com micro-ondas em metanol e ácido sulfúrico catalítico, porém após isolamento, o produto não foi obtido em quantidade apreciável (menos de 5% de rendimento) (**Figura 34 (B)**).

Por conta do insucesso observado nas duas tentativas supracitadas, considerou-se a possibilidade de sintetizarmos as sulfonamidas da etapa seguinte

através da reação direta entre os cloretos de sulfonila **120** e **121** e os aminoácidos **122** e **124**.

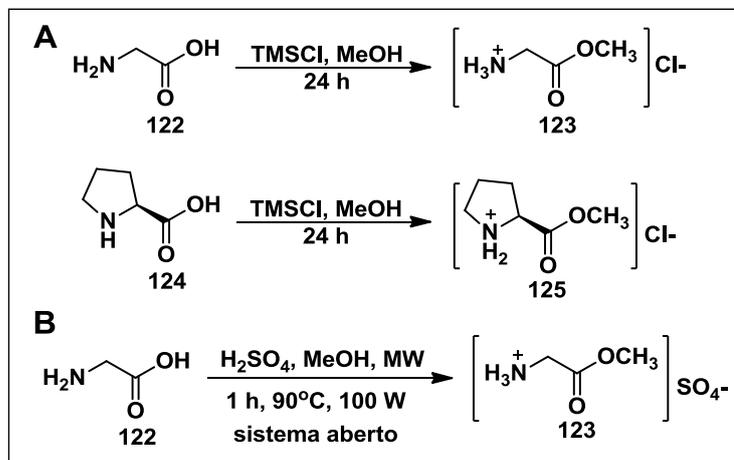


Figura 34. (A) Tentativas de esterificação de aminoácidos com TMSCl. (B) Tentativa de esterificação da glicina utilizando-se Síntese Orgânica Assistida por Micro-ondas (*Microwave-Assisted Organic Synthesis*, MAOS).

De acordo com esta abordagem alternativa, as sulfonamidas obtidas poderiam ser então transformadas nos cloretos de ácido correspondentes, seguido de hidrazinólise e posterior acoplamento na etapa de condensação com a *N*-benzilpiperidona (**108**) para a obtenção das *N*-acilidrazonas planejadas. Para tal, dentre as metodologias disponíveis na literatura, explorou-se a reação entre os cloretos e os aminoácidos em TEA e DCM (HAN et al., 2005; LIMA et al., 2008) (**Figura 35**).

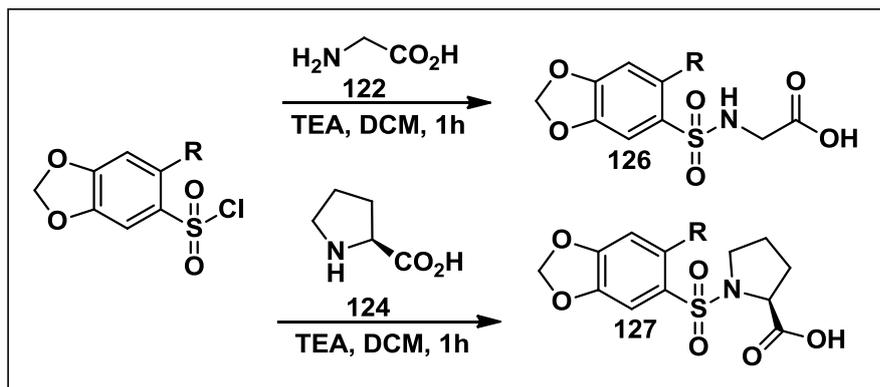


Figura 35. Metodologia alternativa para a obtenção das sulfonamidas **126** e **127**.

No caso da sulfonamida **126**, o produto foi obtido em torno de 10% de rendimento após isolamento, já a reação para a obtenção da sulfonamida **127** não resultou na formação do produto. Na **Figura 36**, é mostrado o espectro de RMN de ^1H para a sulfonamida **126**.

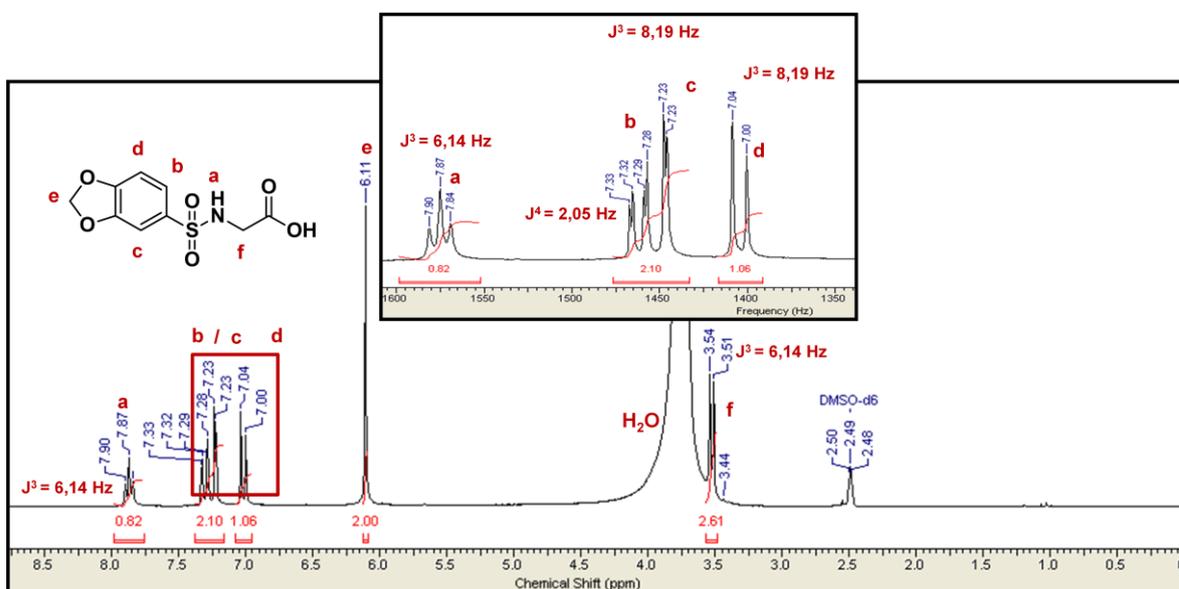
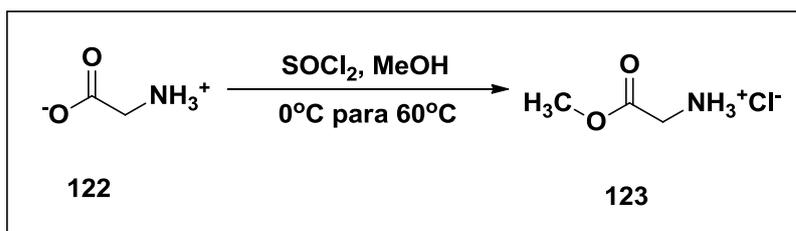


Figura 36. Espectro de RMN de hidrogênio da sulfonamida **126** (200 MHz, DMSO-d_6).

O átomo de hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio da sulfonamida é observado no espectro de RMN- ^1H como um tripleto em 7,87 ppm e realiza

acoplamento com os hidrogênios metilênicos vizinhos, que são observados como um duplete em 3,52 ppm, a constante de acoplamento resultante J^3 é de 6,1 Hz. Em 6,1 ppm está o simpleto relativo ao metileno a subunidade metilenodioxila. Na ampliação da região do espectro que vai de 6,5 a 8,5 ppm, podemos analisar melhor o perfil dos sinais relativos aos hidrogênios aromáticos. O átomo de hidrogênio H_b apresenta-se como um duplo duplete ($J^3 = 8,2$ Hz e $J^4 = 2,0$ Hz, dd) por conta dos acoplamentos com H_d em 7,23 ppm ($J^3 = 8,20$ Hz, d) e H_c em 7,0 ppm ($J^4 = 2,0$ Hz, d) (Figura 36).

Em função do baixo rendimento observado na obtenção de **126**, ainda tentou-se outra metodologia para a obtenção dos ésteres metílicos derivados de aminoácidos baseando-se em metodologia desenvolvida por Gros et al. (2006). Dessa forma, realizou-se a síntese do éster **123** com 10 equivalentes de metanol seguido da adição de 3 equivalentes de cloreto de tionila. A reação ocorreu a 60°C por 12 horas e gerou o produto desejado em rendimento quantitativo, permitindo retomar a rota sintética originalmente planejada (Esquema 3).



Esquema 3: Reação de obtenção do cloridrato de éster metílico da glicina (**123**).

No espectro de infravermelho feito em pastilha de KBr para o éster **123**, pode-se destacar os estiramentos referentes a deformação axial da ligação N-H ($\nu_{\text{N-H}} = 3484$ cm^{-1}), a deformação axial da ligação C=O ($\nu_{\text{C=O}} = 1753$ cm^{-1}) e a deformação angular

da ligação C-H ($\delta_{\text{C-H}} = 1442 \text{ cm}^{-1}$), além da banda referente a deformação axial da ligação C-O ($\nu_{\text{C-O}} = 1250\text{-}1131 \text{ cm}^{-1}$). Na **Figura 37**, podemos observar o espectro de RMN de hidrogênio para o composto **123**, que apresenta um simpleto alargado referente aos átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio (NH_3) em 4,85 ppm, e os sinais referentes aos hidrogênios dos grupos metila da função éster e metileno alfa à carbonila como simpletos em 3,83 e 3,85 ppm, respectivamente.

Os cloridratos dos ésteres da *N*-metilglicina (sarcosina) **128** e da prolina **125** foram obtidos comercialmente e empregados na obtenção das sulfonamidas **129-134**, conforme mostrados na seção a seguir.

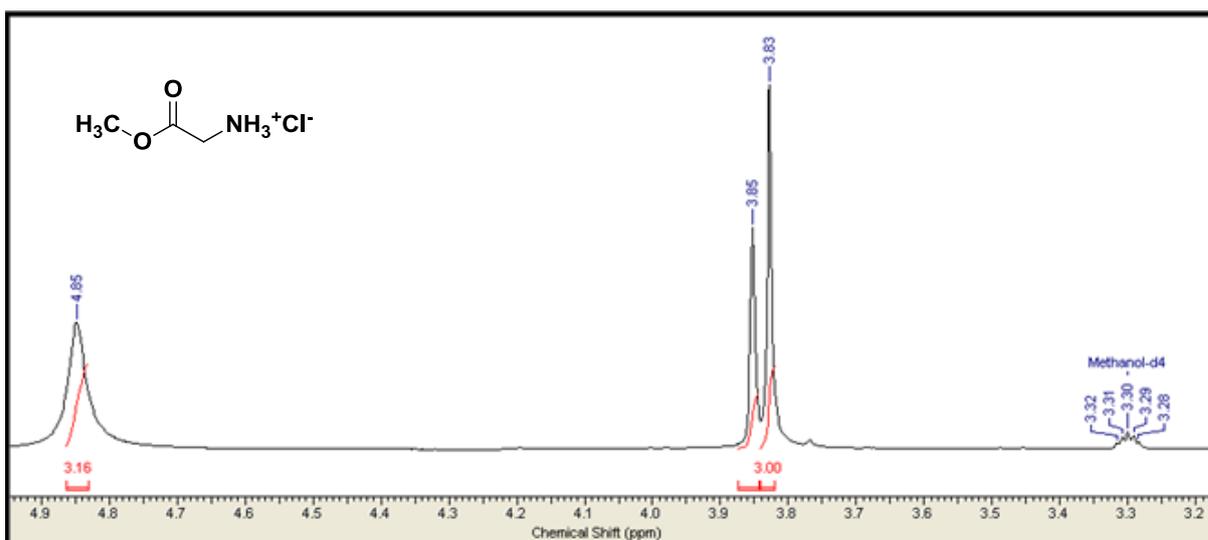


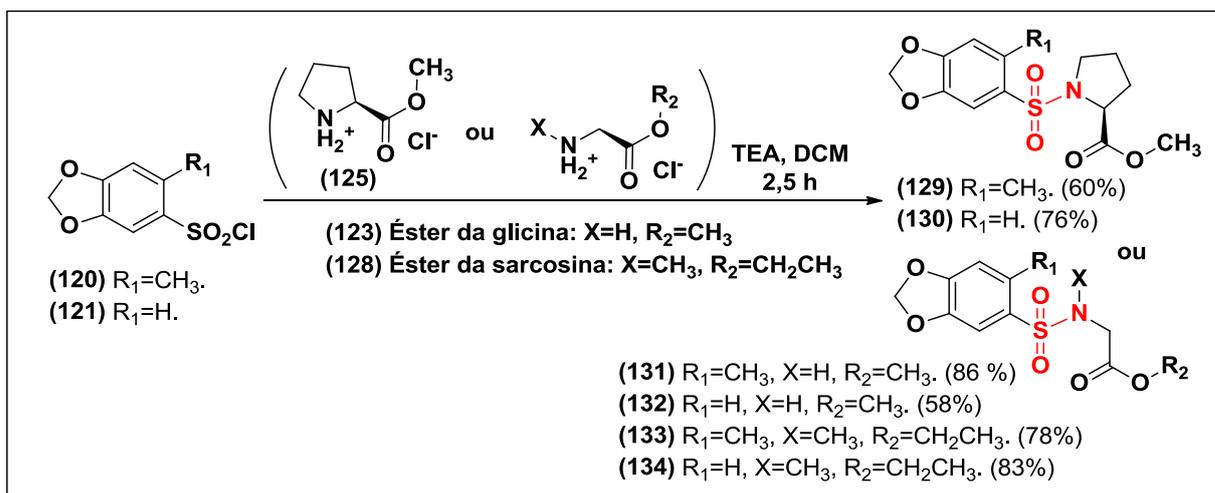
Figura 37. Espectro de RMN de hidrogênio do éster metílico da glicina na forma de cloridrato (**123**) (200 MHz, Metanol- d_4).

3.4.4 OBTENÇÃO DAS SULFONAMIDAS **129-134** DERIVADAS DE ÉSTERES DE AMINOÁCIDOS **125**, **123** e **128**

Solucionada a questão referente a obtenção dos ésteres de aminoácidos, estes foram utilizados na preparação das sulfonamidas planejadas na análise

retrossintética. Dessa forma, os cloretos de sulfonila **120** e **121** foram reagidos com os ésteres **125**, **123** e **128** para a obtenção das sulfonamidas **129-134**, empregando-se dois equivalentes de trietilamina (TEA) em diclorometano (DCM) em temperatura ambiente por 2,5 horas. Após isolamento por extração líquido-líquido e secagem da fase orgânica, as sulfonamidas alvo foram obtidas com faixa de rendimento entre bons e moderados (58-86%) (**Esquema 4**) (LIMA et al., 2008).

No espectro de infravermelho da sulfonamida **132**, foram evidenciados estiramentos referentes a deformação axial da ligação N-H ($\nu_{\text{N-H}} = 3247 \text{ cm}^{-1}$) e a deformação axial da ligação C=O ($\nu_{\text{C=O}} = 1753 \text{ cm}^{-1}$). Adicionalmente, a presença da banda referente a deformação axial da ligação C-H_{aromático} também foi observada ($\nu_{\text{C-H}} = 3097\text{-}3056 \text{ cm}^{-1}$), assim como a banda referente a deformação axial da ligação S=O ($\nu_{\text{S=O}} = 1320\text{-}1139 \text{ cm}^{-1}$).



Esquema 4. Procedimento geral empregado para a síntese das sulfonamidas **129-134**.

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para todas as seis sulfonamidas obtidas. A título de ilustração, na **Figura 38** é mostrado o espectro de RMN de hidrogênio da sulfonamida **134**, onde temos o átomo de hidrogênio H_6 como um

duplo duplete centrado em 7,3 ($J^3 = 7,8$ e $J^4 = 1,2$ Hz), o qual acopla com os hidrogênios H_4 em 7,2 ppm ($J^3 = 2,0$ Hz) e H_7 em 6,8 ppm ($J^3 = 7,8$ Hz). Os hidrogênios da subunidade metilenodioxila são observados como um simpleto em 6,01 ppm, enquanto que os hidrogênios metilênicos do grupo etoxila são observados como um quarteto em 4,07 ppm ($J^3 = 5,9$ Hz) por conta do acoplamento com os três hidrogênios da metila vizinha no tripleto em 1,17 ppm ($J^3 = 5,9$ Hz). A metila ligada diretamente ao nitrogênio da sulfonamida é observado como um simpleto em 2,81 ppm, enquanto que o grupo metileno α -carbonila é observado como um simpleto em 3,89 ppm.

De modo a também discutirmos um exemplo dentre as sulfonamidas obtidas contendo uma subunidade aminoacídica estruturalmente mais complexa, é mostrada na **Figura 39** uma sulfonamida contendo um resíduo do aminoácido *S*-prolina internalizado (**130**).

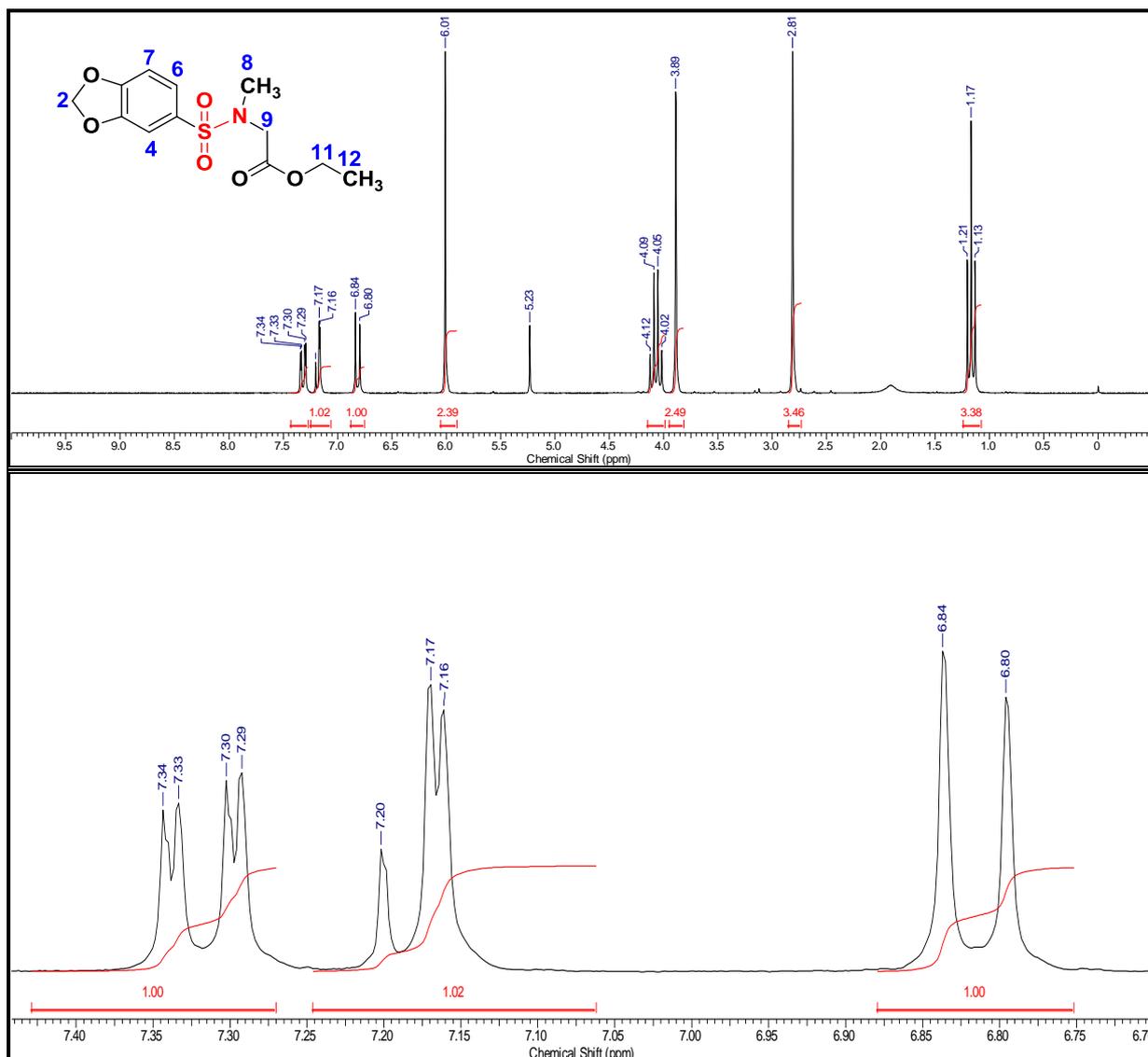


Figura 38. Espectro de RMN de hidrogênio da sulfonamida **134** e ampliação (200 MHz, CDCl_3).

Assim como no caso da sulfonamida com o resíduo do aminoácido sarcosina (*N*-metil glicina) internalizado (**134**), o composto **130** apresenta um duplo duplete em 7,4 ppm referente ao hidrogênio aromático H_6 ($J^3 = 8,3$ e $J^4 = 2,0$ Hz) e os dupletos referentes a H_4 em 7,2 ppm ($J^4 = 2,0$ Hz) e H_7 em 6,8 ppm ($J^3 = 8,3$ Hz). Os hidrogênios do metileno da subunidade metilenodioxila são observados como um simpleto em 6,01 ppm. O átomo de hidrogênio ligado diretamente no carbono assimétrico de **130** é observado como um duplo duplete em 4,22 ppm com constantes de acoplamento em 8,0 e 5,2 Hz, que provavelmente são resultantes de acoplamentos dos tipos J^3 e J^4

com os metilenos mais próximos, presentes na subunidade azaciclopentano, que apresenta três metilenos em dois multipletos, um na faixa entre 3,50-3,10 ppm, que foi atribuída aos dois hidrogênios em H₈ e outro entre 2,20-1,60 ppm, que foi atribuída aos quatro hidrogênios em H₉ e H₁₀. Os três átomos de hidrogênio da metila são observados como um simpleto em 3,66 ppm (**Figura 39**).

No espectro de RMN de ¹³C, podemos observar todos os seus 13 átomos de hidrogênio mostrados ao final da **Figura 39**. O carbono carbonílico tem sinal com deslocamento químico em 172,69 ppm, enquanto que os carbonos presentes do anel aromático são observados na faixa entre 155 e 105 ppm por conta do efeito de anisotropia magnética gerado pelo sistema aromático durante a aquisição do espectro. Em 102,40 ppm está o sinal referente ao carbono da metilenodioxila, o qual está ligado diretamente a dois átomos de oxigênio responsáveis por fazer com que este sinal seja observado em uma região do espectro de campo mais baixo do que o usual para um carbono metilênico. O metileno ligado diretamente ao nitrogênio sulfonamídico é o segundo mais desprotegido, sendo observado em 48,52 ppm. O átomo de carbono quiral tem sinal em 60,47 ppm e o carbono metílico é observado em 52,50 ppm, estando ambos ligados a um heteroátomo, logo são os átomos de carbono mais desprotegidos desta região. Os dois sinais observados em campo mais alto deste espectro (31,04 e 24,79 ppm) são referentes aos dois grupos metileno presentes na subunidade aza-ciclopentano, logo não estão suscetíveis a efeitos anisotrópicos ou efeitos eletrônicos elétron-retiradores significativos.

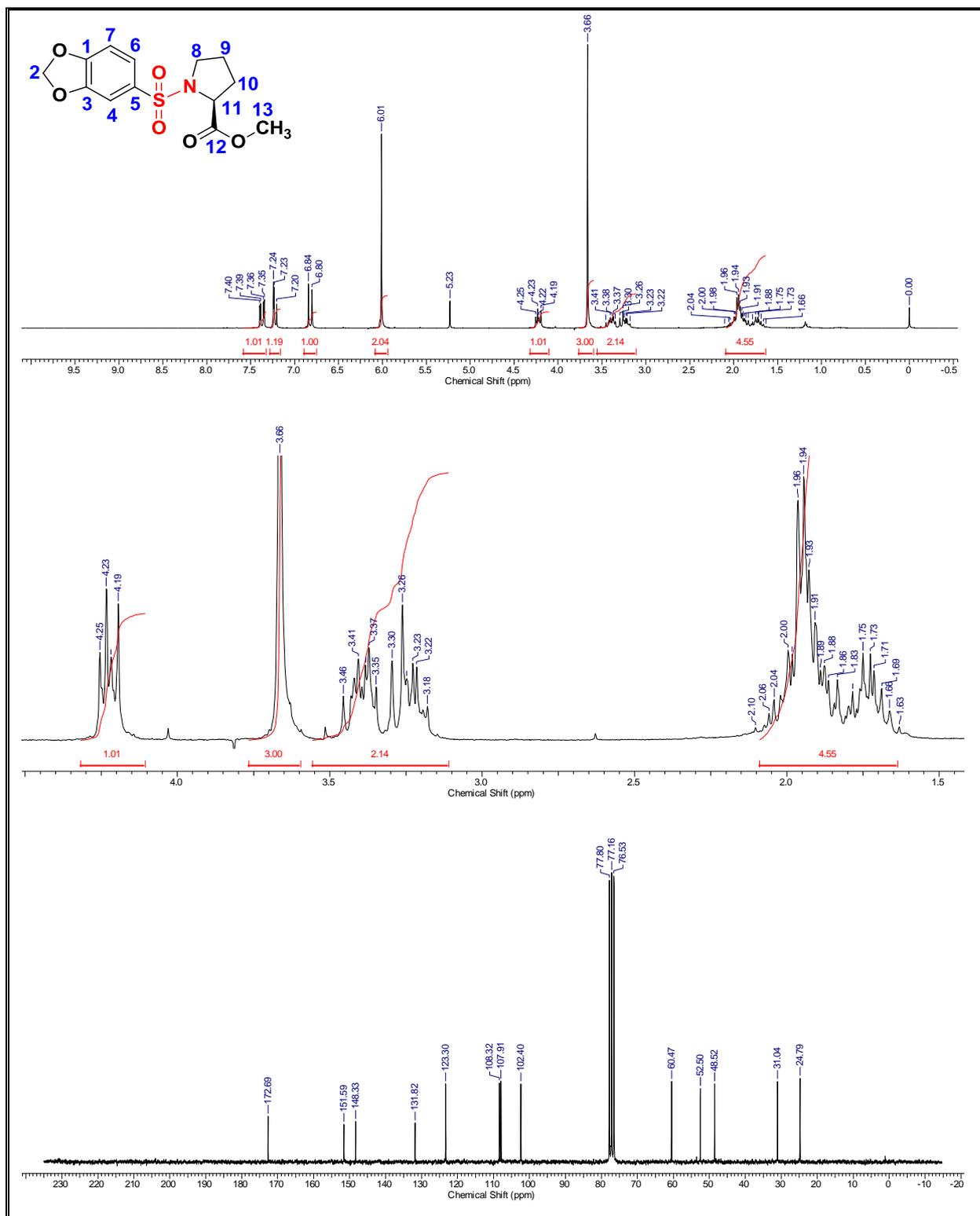
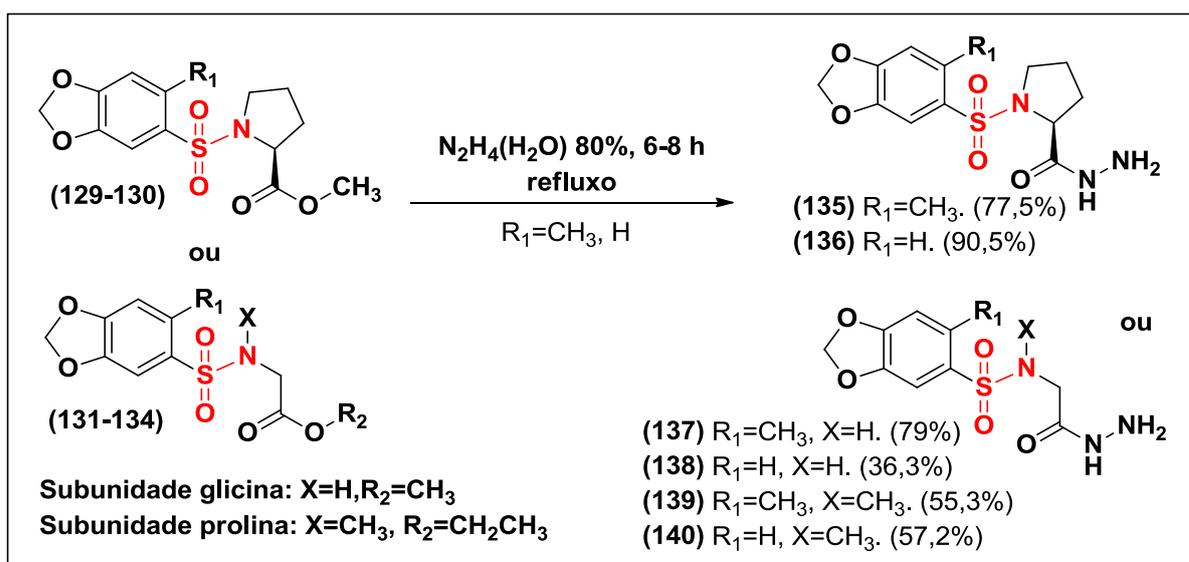


Figura 39. Espectros de RMN de hidrogênio e de carbono-13 da sulfonamida **130** (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl₃).

3.4.5 HIDRAZINÓLISE DOS ÉSTERES COM SUBUNIDADE SULFONAMÍDICA DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

A etapa de hidrazinólise dos ésteres **129-134** foi realizada com hidrato de hidrazina sob refluxo para fornecer os derivados hidrazídicos com rendimentos entre 36 e 90,5%, como pode ser observado no esquema a seguir (**Esquema 5**) (TIAN et al., 2009). As hidrazidas **135-140** foram isoladas por precipitação ou extração líquido-líquido de modo a fornecer os produtos em grau de pureza adequado, conforme foi comprovado por espectroscopia de infravermelho (IV) e RMN de carbono-13 e hidrogênio.



Esquema 5. Procedimento geral empregado para a síntese das hidrazidas **135-140**.

No caso do espectro de infravermelho da hidrazida **140**, pode-se destacar os estiramentos referentes as deformações axiais das ligações N-H ($\nu_{\text{N-H}} = 3190\ \text{cm}^{-1}$), NH_2 ($\nu_{\text{NH}_2} = 3315\ \text{cm}^{-1}$) e a deformação axial da ligação C=O ($\nu_{\text{C=O}} = 1661\ \text{cm}^{-1}$). Também foram identificadas as bandas referentes a deformação axial da ligação C-H_{aromático} ($\nu_{\text{C-H}} = 3070-3018\ \text{cm}^{-1}$), C-H_{não aromático} ($\nu_{\text{C-H}} = 2968-2911\ \text{cm}^{-1}$) assim como a

banda referente a deformação angular da ligação S=O ($\delta_{\text{S=O}} = 1320\text{-}1139\text{ cm}^{-1}$). A comparação entre as bandas e estiramentos entre os espectros dos ésteres **129-134** e hidrazidas **135-140** mostraram claramente a interconversão de grupo funcional (IGF) entre estas duas funções químicas.

Na **Figura 40**, podemos observar o espectro de hidrogênio da hidrazida **137**, que apresenta a particularidade de ser constituído apenas por simpletos. Em 9,01 ppm está o sinal alargado do hidrogênio amídico (C=O-NH), enquanto que o átomo de hidrogênio da subunidade sulfonamida é observado em 7,86 ppm (SO₂-NH). Em 7,32 e 6,97 ppm, podemos observar os átomos de hidrogênio H₄ e H₇, respectivamente. Os hidrogênios da metilenodioxila está em 6,11 ppm. Outro sinal alargado é observado em 3,80 ppm e corresponde ao grupo amino (NH-NH₂). E por último, os hidrogênios metilênicos estão em 3,42 ppm e os hidrogênios da metila em 2,50 ppm, juntamente com o sinal referente ao DMSO-d₆.

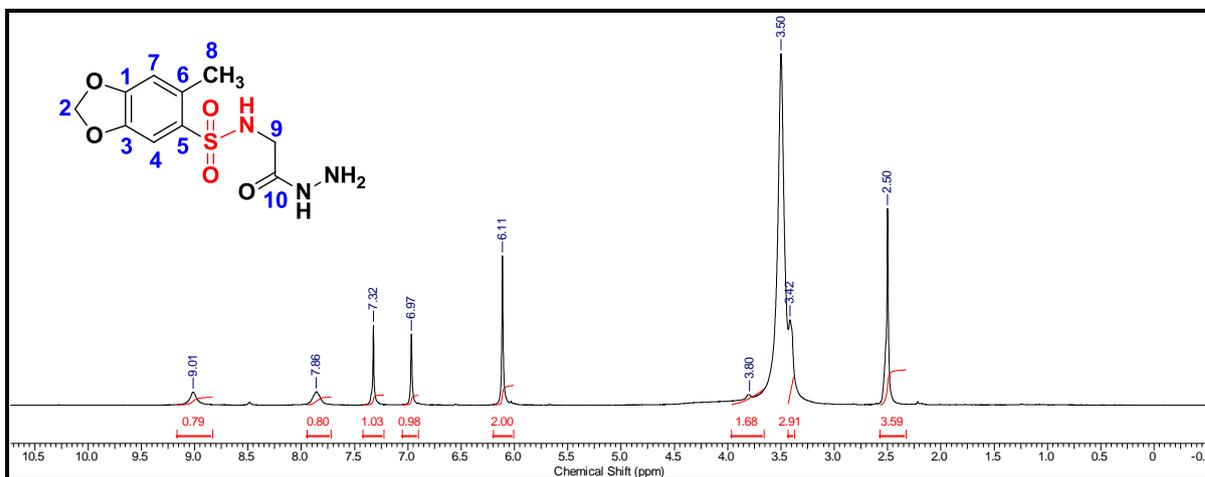


Figura 40. Espectro de RMN de hidrogênio da hidrazida **137** (200 MHz, DMSO-d₆).

3.4.6 ETAPA DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS *N*-ACILIDRAZONAS DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS

Concluída a etapa de obtenção das hidrazidas **135-140**, iniciou-se o estudo do da condensação entre hidrazidas e a *N*-benzilpiperidona (**108**). Quando se tentou obter os derivados *N*-acilidrazônicos em metanol e temperatura ambiente não houve reação, mesmo após 48 horas de reação ou emprego de ácido catalítico (KÜMMERLE et al., 2009; TIAN et al., 2009), porém a *N*-benzilpiperidona (**108**) pôde ser recuperada por extração após as tentativas realizadas.

Uma explicação está na diferente reatividade entre aldeídos e cetonas frente às hidrazidas, que se dá parcialmente por fatores estéricos, visto que as cetonas são mais impedidas estericamente do que os aldeídos. Visando avaliar também os fatores eletrônicos e tornar esta análise mais concreta, foram geradas cargas eletrostáticas líquidas calculadas com o método semiempírico PM3 no programa Spartan '8.0 (**Figura 41**) para o acetaldeído e para a propanona. Enquanto a diferença de carga entre o carbono e o oxigênio no acetaldeído é de 0,2, no caso da acetona este valor é de apenas 0,07, dessa forma, corroborando a maior reatividade dos carbonos carbonílicos de aldeídos frente a nucleófilos.

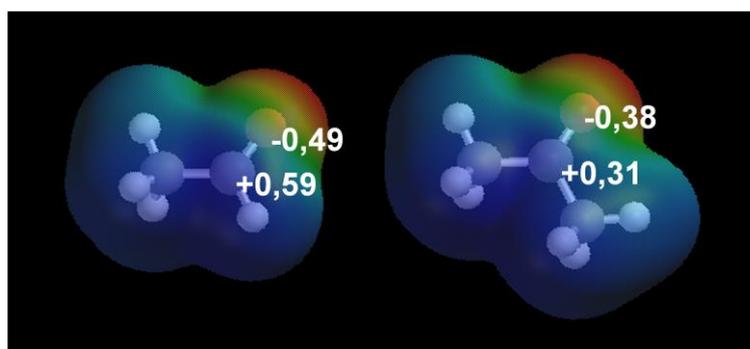
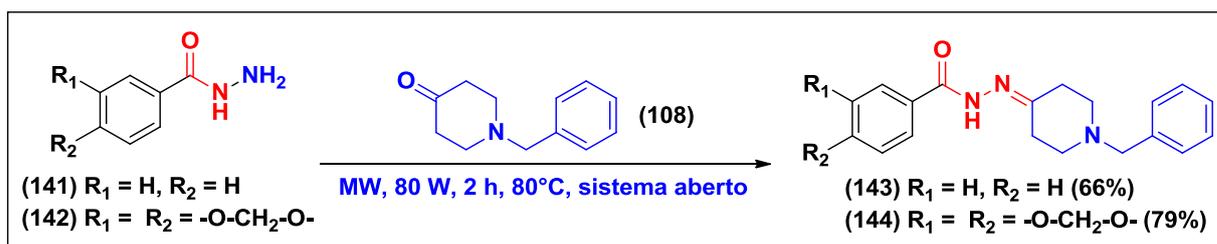


Figura 41. Estruturas químicas do acetaldeído (esquerda) e da acetona (direita) com suas respectivas superfícies de potencial eletrostático, calculadas pelo método semiempírico PM3 no programa Spartan '8.0.

Dentre as novas abordagens consideradas para a realização da etapa de condensação, foi selecionada a aplicação da síntese orgânica auxiliada por micro-ondas (MAOS) visto que há vários relatos na literatura que mostram como a irradiação com micro-ondas resolveu problemas de reatividade e rendimento nos mais variados tipos de reações químicas (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2011), inclusive na síntese de *N*-acilidrazonas a partir de cetonas ou aldeídos (ANDRADE & BARROS, 2010). Dessa forma, uma metodologia utilizando o reator de micro-ondas científico CEM Discover, sem o emprego de solvente e com histórico de bons rendimentos (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2010) foi adaptada e empregada para a obtenção dos derivados *N*-acilidrazônicos.

Inicialmente, foram realizados testes entre a benzoidrazida (**141**), benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carboidrazida (**142**) e o dobro de equivalentes da *N*-benzilpiperidona (**108**), de modo a avaliar os parâmetros produtivos, como rendimento, tempo e eficiência da condensação antes de empregá-la com os intermediários obtidos ao longo das 5 etapas anteriores. O **Esquema 6** mostra os produtos obtidos, assim como as condições otimizadas do experimento.

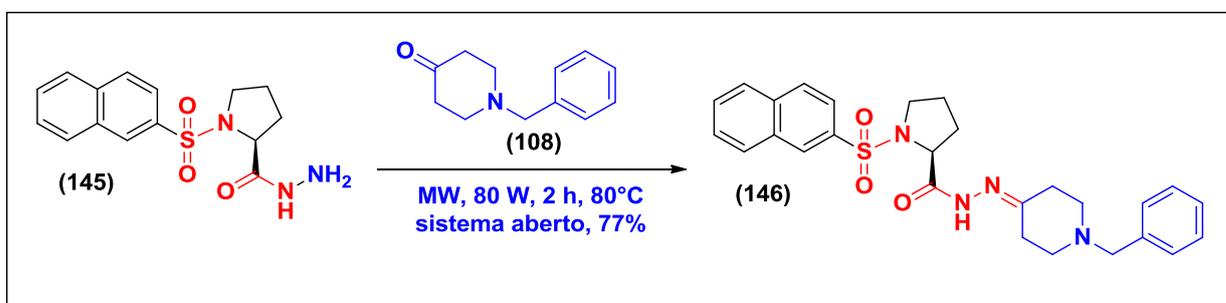


Esquema 6: Metodologia teste para obtenção das *N*-acilidrazonas LASSBio-1842 (**143**) e **144**.

A *N*-acilidrazona **LASSBio-1842** (**143**) foi obtida em rendimento quantitativo, enquanto que o derivado **144** foi obtido em 79% de rendimento. A formação dos produtos, assim como a caracterização e determinação do grau de pureza foi

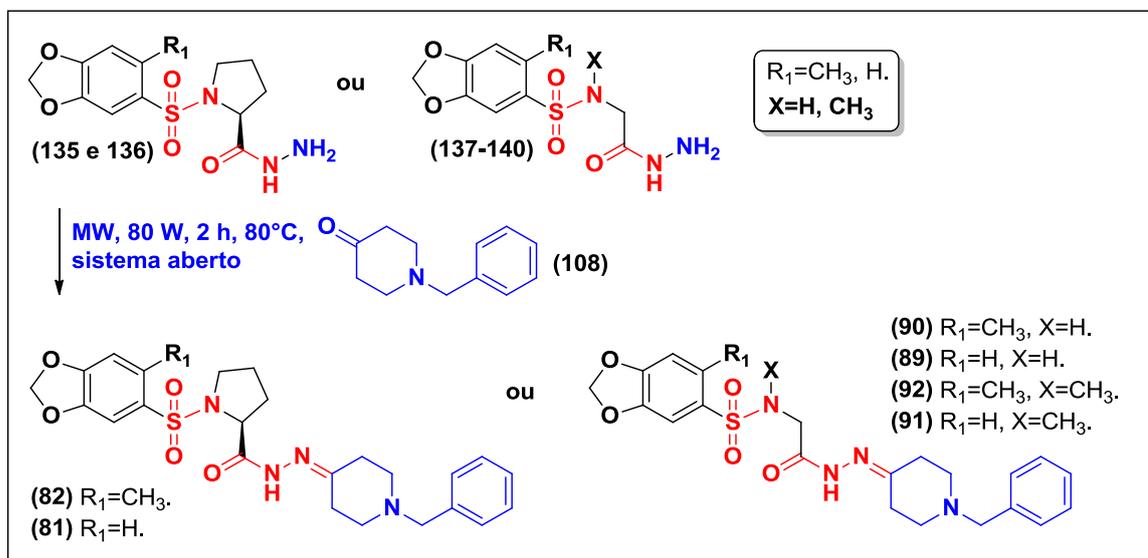
confirmada por RMN de carbono-13 e hidrogênio, DEPT-135, CLAE e espectroscopia de massas de alta resolução (HRMS). É importante destacar que os produtos foram obtidos em grau de pureza elevado, 97% para **143** e 99% para **144**, após lavagem dos produtos com éter etílico e sem a realização de coluna cromatográfica, o que mostra mais uma vantagem desta metodologia. Além disso, na obtenção de **LASSBio-1842 (143)**, quando partiu-se de 0,7 g, foram obtidos 1,58 g de produto, mostrando que esta metodologia pode ser avaliada como candidata a um eventual aumento de escala.

Uma vez padronizadas as condições experimentais aplicadas nesta metodologia, outro teste foi realizado com a hidrazida **145**, por esta apresentar padrão estrutural mais próximo ao das hidrazidas previamente sintetizadas (**Esquema 7**). A hidrazida **145** foi obtida empregando-se metodologias previamente descritas nas **Seções 3.4.5 e 3.4.6**, através de formação da sulfonamida correspondente a partir do cloreto de naftaleno-2-sulfonila, seguido de hidrazinólise. A *N*-acilidrazona **LASSBio-1844 (146)** foi obtida em 77% de rendimento e 98% de pureza determinada por CLAE. Analogamente às *N*-acilidrazonas previamente obtidas, a caracterização foi feita por RMN de carbono-13 e hidrogênio, DEPT-135 e HRMS.



Esquema 7: Metodologia teste para obtenção da *N*-acilidrazona **LASSBio-1844 (146)**.

Após os testes de metodologia realizados, estas condições foram empregadas na síntese dos compostos planejados, conforme pode ser observado no **Esquema 8**.



Esquema 8: Metodologia geral empregada na obtenção das *N*-acilidrazonas planejadas como ligantes duais de receptores CCR3 e CCR4.

As *N*-acilidrazonas **81**, **82**, **89-92** foram sintetizadas empregando-se a metodologia previamente estabelecida, porém dois parâmetros foram alterados de modo a avaliarmos a otimização: **(a)** o tempo de reação e **(b)** quantidade de *N*-benzilpiperidona **108** empregada. Dessa forma foi possível observar o consequente impacto no rendimento, conforme pode ser observado na **Tabela 9**. Pode-se observar que ao reduzirmos o tempo de reação e diminuirmos o número de equivalentes de *N*-benzilpiperidona (**108**) de 2 para 1, houve queda de rendimento em todos os casos, porém a queda foi mais acentuada no caso de **LASSBio-1831 (89)**, **LASSBio-1641 (82)** e **LASSBio-1830 (81)**. Logo, dois equivalentes de *N*-benzilpiperidona (**108**) e 2 horas de reação são necessários para a etapa de formação das *N*-acilidrazonas desejadas.

No espectro de infravermelho da *N*-acilidrazona **82**, são observados os estiramentos referentes as deformações axiais das ligações N-H ($\nu_{\text{N-H}} = 3211\text{-}3175 \text{ cm}^{-1}$), C-H_{aromático} ($\nu_{\text{C-H}} = 3032 \text{ cm}^{-1}$), C-H ($\nu_{\text{C-H}} = 2955\text{-}2801 \text{ cm}^{-1}$) e a deformação axial da ligação C=O ($\nu_{\text{C=O}} = 1685 \text{ cm}^{-1}$). O estiramento referente a deformação axial da ligação C=N foi encontrada em 1546 cm^{-1} , enquanto que o estiramento referente a ligação C-O foi encontrado em $1244\text{-}1034 \text{ cm}^{-1}$. Também foram identificadas as bandas referentes as deformações angulares da ligação S=O ($\delta_{\text{S=O}} = 1321\text{-}1152 \text{ cm}^{-1}$) e C-H ($\delta_{\text{C-H}} = 1485 \text{ cm}^{-1}$).

Tabela 9: Compostos *N*-acilidrazônicos **81**, **82**, **89-92** e seus respectivos rendimentos de acordo com a variação do tempo e número de equivalentes de *N*-benzilpiperidona **108** empregados.

Compostos	0,5 h e 1 eq. de 108	2,0 h e 2 eq. de 108
LASSBio-1843 (90)	75,6	83,0
LASSBio-1831 (89)	60,0	85,6
LASSBio-1642 (92)	74,9	80,0
LASSBio-1765 (91)	72,7	82,7
LASSBio-1641 (82)	50,0	65,7
LASSBio-1830 (81)	57,5	78,8

Para todas as *N*-acilidrazonas **81**, **82**, **89-92** obtidas, foram realizadas análises de RMN de carbono-13, hidrogênio e DEPT-135, assim como determinação da pureza por CLAE. Na **Tabela 10**, são mostrados percentuais de pureza obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com seus respectivos tempos de retenção, os pontos de fusão obtidos e as massas moleculares registradas por HRMS,

de modo a completar a etapa de caracterização dos derivados *N*-acilidrazônicos alvo deste estudo.

Tabela 10: Compostos *N*-acilidrazônicos **81**, **82**, **89-92** e seus respectivos graus de pureza e tempos de retenção determinados por CLAE, assim como valores de P.F e picos registrados por HRMS.

Composto	Pureza (%)	Tempo de retenção* (min)	P.F. (°C)	HRMS (m/z)
LASSBio-1843 (90)	99,92	5,88	162-164	459,1713 [M+H] ⁺
LASSBio-1831 (89)	98,11	4,58	79-81	467,1375 [M+Na] ⁺
LASSBio-1642 (92)	96,25	6,93	84-86	473,1873 [M+H] ⁺
LASSBio-1765 (91)	98,69	5,50	141-143	459,1710 [M+H] ⁺
LASSBio-1641 (82)	98,20	6,35	50-52	499,2034 [M+H] ⁺
LASSBio-1830 (81)	98,80	5,49	---	507,1665 [M+Na] ⁺
LASSBio-1842 (143)	96,74	5,06	142-144	330,1588 [M+Na] ⁺
LASSBio-1844 (146)	97,89	8,,94	---	491,2134 [M+H] ⁺

* As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para os produtos finais foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU Prominence Liquid Chromatograph (LASSBio-UFRJ). As fases móveis empregadas foram 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 µL).

Dentre os derivados *N*-acilidrazônicos obtidos, o derivado **90** foi selecionado para discutirmos seus espectros de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT-135 (**Figura 42**). O átomo de hidrogênio do grupo amida da subunidade *N*-acilidrazona é representado por dois sinais alargados em 10,49 e 10,22 ppm (CONH), enquanto que o átomo de hidrogênio da sulfonamida é observado como um simpleto em 7,69 ppm (SO₂NH). Os átomos de hidrogênio aromáticos das subunidades benzodioxola e fenila são observados como um multipletto entre 7,50-7,20 ppm, com exceção do hidrogênio H₇, que é observado em 6,93 ppm. O simpleto referente ao metileno da benzodioxola aparece em 6,13 ppm. Por conta da complexidade estrutural, os hidrogênios em H₈ e

H₅ são observados como multipletos em 4,20-3,50 ppm, o mesmo ocorrendo com os átomos de hidrogênio da subunidade piperidina na faixa entre 2,75-2,00 ppm.

Os sinais dos espectros de RMN de carbono-13 foram atribuídos com o auxílio de tabelas contendo valores em ppm de compostos contendo subunidades estruturalmente semelhantes às subunidades presentes nos compostos sintetizados, assim como dos espectros dos intermediários obtidos durante a rota sintética (**Figura 42**).

Adicionalmente, os espectros de DEPT-135 auxiliaram na caracterização e diferenciação entre CH₃, CH (sinal positivo) e CH₂ (sinal negativo) dos derivados obtidos (**Figura 42**).

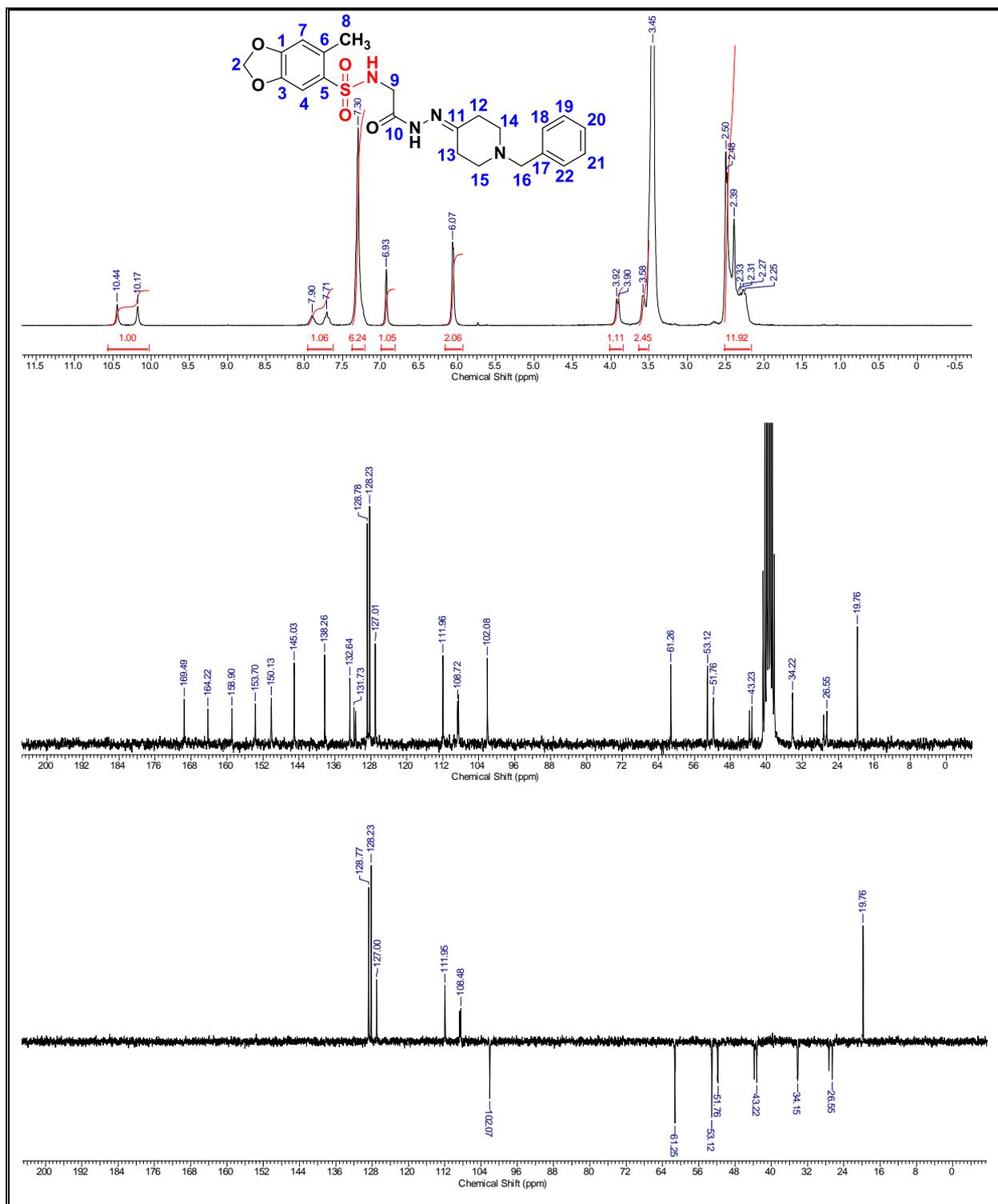


Figura 42. Espectros de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT-135 obtidos para a *N*-acilidrazona **90** (200 e 50 MHz, respectivamente, DMSO-d₆).

Por conta da presença de carbono quiral nos derivados contendo o resíduo do aminoácido *S*-prolina internalizado, **82** e **81**, realizou-se o experimento de dicroísmo circular de modo a comprovarmos que não houve racemização durante as etapas de formação da sulfonamida, hidrazinólise e condensação entre as hidrazidas obtidas e a *N*-benzilpiperidona **108**. Por conta da técnica de dicroísmo circular realizar a varredura em vários comprimentos de onda na determinação do grau de desvio da luz polarizada, a mesma pode ser aplicada tanto na determinação do grau de desvio, em qual sentido e o perfil ao longo da faixa analisada. Na **Figura 43** são mostrados os espectros de dicroísmo circular de **LASSBio-1641 (82)** e **LASSBio-1830 (81)**. Dessa forma é possível concluirmos que não houve racemização do centro assimétrico dessas duas *N*-acilidrazonas e que ambas desviam o plano da luz polarizada para a esquerda (levorrotatórios) ao longo da faixa utilizada na varredura entre 200 e 500 nM.

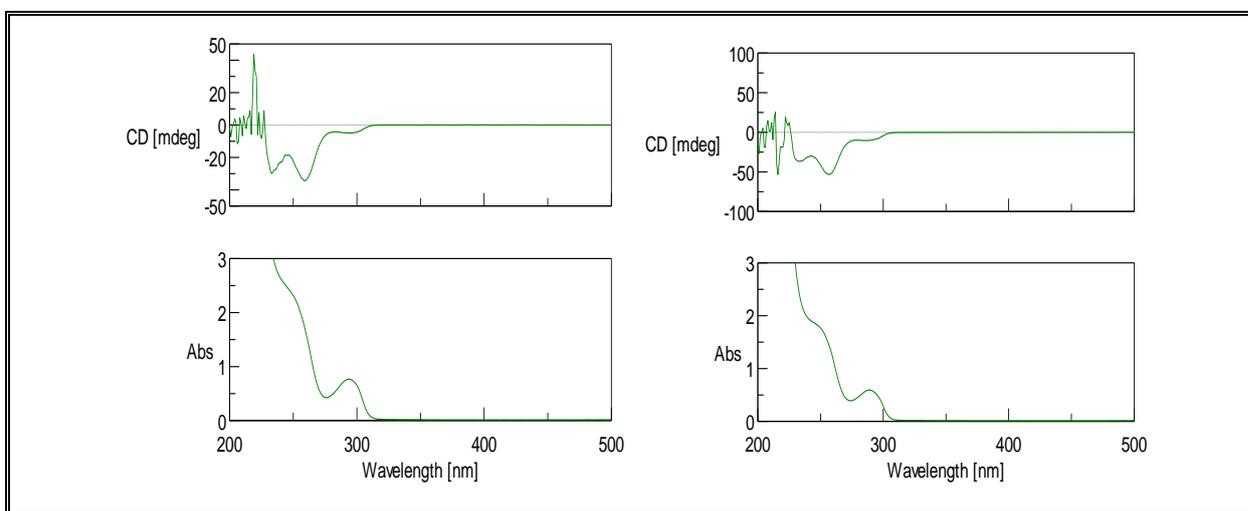


Figura 43. Experimento de dicroísmo circular dos derivados **LASSBio-1641 (82)** e **LASSBio-1830 (81)**.

T(°C)=25, Varredura entre 200-500 nM, Concentração= 10^{-3} M .

3.5 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS **81, 82, 89-92**

Nesta seção, serão discutidos os resultados dos ensaios farmacológicos obtidos para os derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-1641 (**82**), LASSBio-1765 (**91**) e LASSBio-1642 (**92**) em trabalho de colaboração com o Prof. Dr. Marco Aurélio Martins e a aluna de iniciação científica sob sua orientação, Ana Paula Leite D'Almeida, no Laboratório de Inflamação (FIOCRUZ) (D'ALMEIDA, 2013; NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2013). Os demais derivados encontram-se em fase de avaliação.

3.5.1 EFEITO DOS DERIVADOS LASSBio-1641 (**82**) E LASSBio-1642 (**92**) SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Visando investigar o efeito dos derivados **82** e **92** quanto à capacidade de inibir a migração de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar em camundongos estimulados com LPS, foram realizados experimentos de micrografia do cito-centrifugado bronco-alveolar de camundongos, nos quais podemos observar o efeito dos derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-1641 (**82**) e LASSBio-1642 (**92**) (**Figura 44**), visto que há uma densidade celular menor nos grupos tratados se comparados ao grupo não tratado (LPS).

LASSBio-1641 (**82**) e LASSBio-1642 (**92**), que diferem entre si basicamente pela restrição conformacional da subunidade aminoacídica em **82**, são ambos igualmente capazes de atenuar significativamente a migração celular para o foco da lesão, conforme se pode observar pela contagem total e diferencial das células recuperadas no lavado bronco-alveolar, em que houve inibição tanto na migração total de leucócitos quanto na migração de neutrófilos (**Figura 45**).

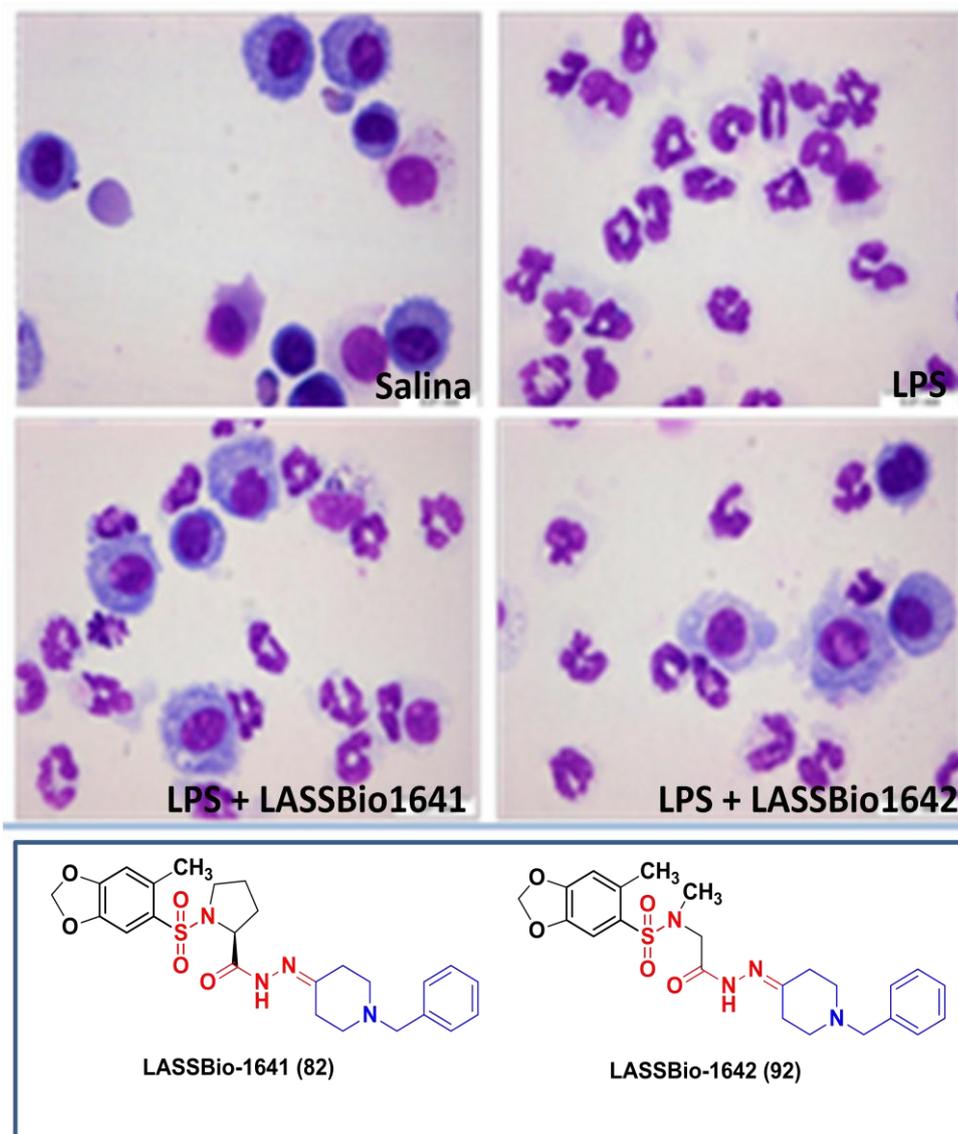


Figura 44: Micrografia do cito-centrifugado do lavado bronco-alveolar obtido a partir de camundongos. Os neutrófilos estão coloridos em lilás.

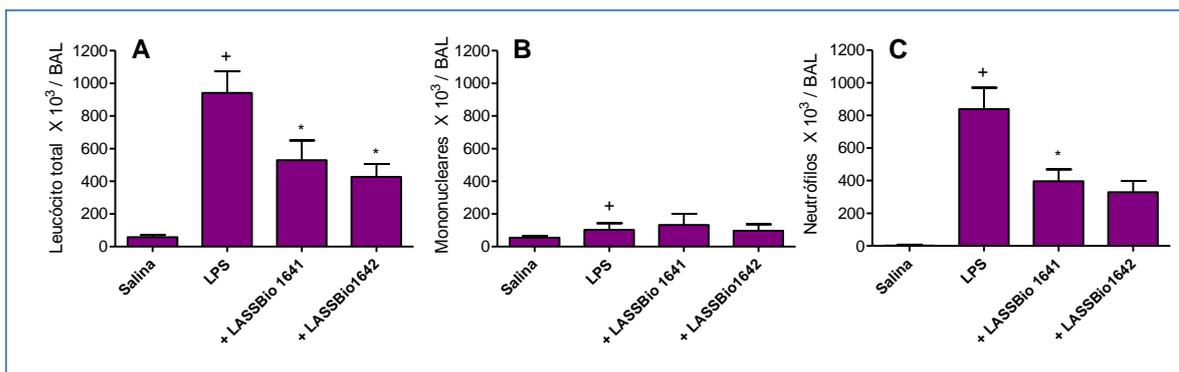


Figura 45: Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado bronco-alveolar. **(A)** Contagem leucócitos totais. **(B)** Contagem de células mononucleares. **(C)** Contagem de neutrófilos recuperados nas amostras de camundongos provocados com solução salina, LPS, LASSBio-1641 (82) + LPS e LASSBio-1642 (92) + LPS. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman Keuls. $P < 0,05$.

3.5.2 ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS DERIVADOS LASSBio-1641 (82) E LASSBio-1642 (92) SOBRE A HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS E ELASTÂNCIA PULMONAR DAS VIAS AÉREAS PERIFÉRICAS

A hiper-reatividade das vias aéreas é uma das principais características da asma, logo, os derivados LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1642 (92) foram avaliados em um modelo experimental de asma utilizando camundongos. A estimulação com LPS resulta em hiper-reatividade das vias aéreas, como mostrado através das respostas de aumento de resistência pulmonar (**Figura 46**) e elastância pulmonar (**Figura 47**), geradas após aerolização de doses crescentes do agente bronco-constritor metacolina. O tratamento por via intraperitoneal (*i.p.*) com o derivado LASSBio-1642 (92) na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$ inibiu a hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina, na concentração mais alta (27 mg/ml), única em que há diferença entre os grupos salina e LPS (**Figura 46**), enquanto nas alterações relacionadas ao aumento de elastância pulmonar (vias aéreas periféricas) não houve efeito estatisticamente significativo, apesar da melhora deste parâmetro. Os animais tratados com LASSBio-1641 (82) na

mesma dose, não induziu melhora significativa da resistência, porém diminuiu significativamente o aumento da elastância induzido pela metacolina a 3 mg/mL.

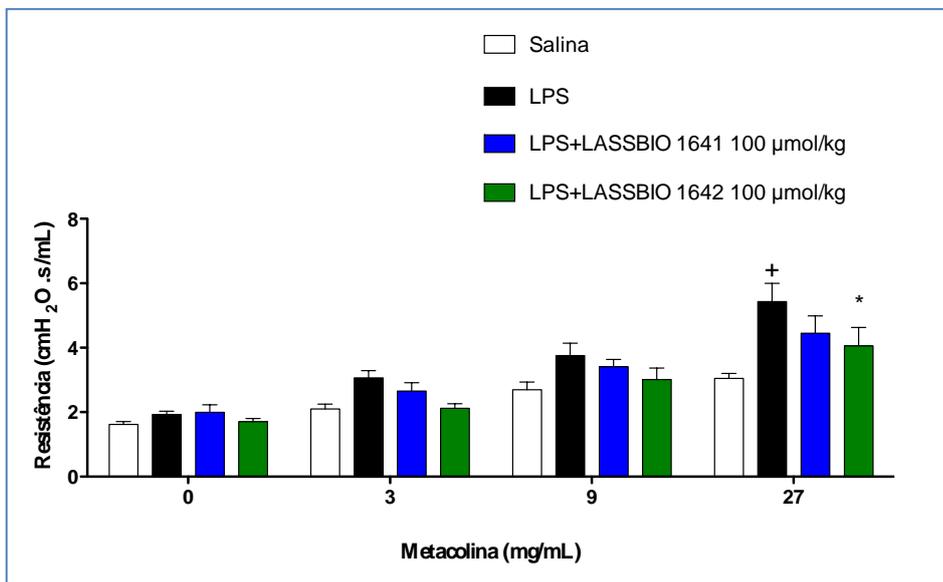


Figura 46: Efeito dos compostos LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1642 (92) sobre o aumento de resistência pulmonar e hiper-reatividade observados após provocação alérgica. Os valores apresentam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. *P<0,05 comparado ao grupo não tratado. +P<0,05 comparado ao grupo estimulado intranasalmente com solução salina.

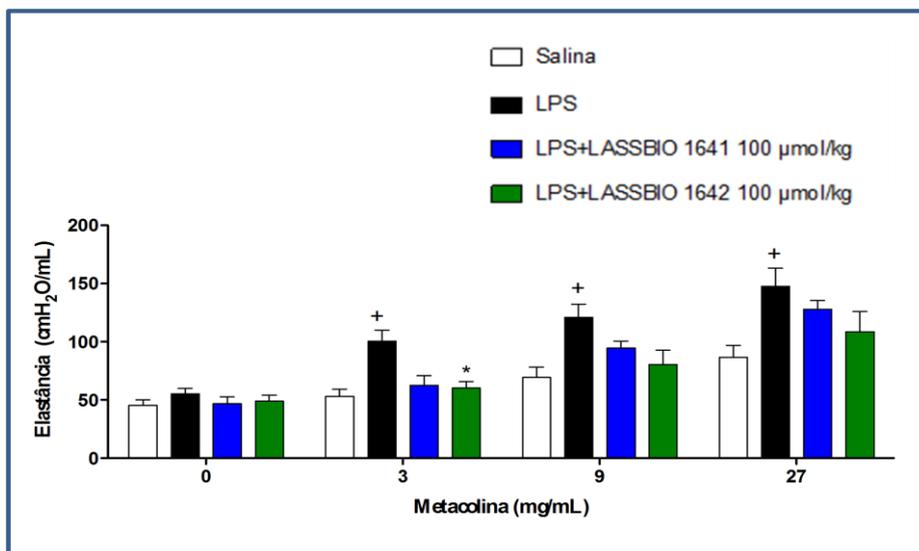


Figura 47: Efeito dos compostos LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1642 (92) sobre o aumento de elastância pulmonar e hiper-reatividade observados após provocação alérgica. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. *P<0,05 comparado ao grupo não tratado. +P<0,05 comparado ao grupo estimulado intranasalmente com solução salina.

3.5.3 ATIVIDADE DO COMPOSTO LASSBio-1765 (91) NAS ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS ASSOCIADAS À INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR

Em estudos paralelos realizados no Laboratório de Inflamação da FIOCRUZ, empregando-se um modelo experimental de asma em camundongos, o tratamento por via *i.p.* com o derivado LASSBio-1765 (91) foi avaliado quanto a sua capacidade de modificar o quadro de hiper-reatividade brônquica (D'ALMEIDA, 2013). Os camundongos desafiados com ovoalbumina (OVA) apresentaram alteração significativa na função pulmonar, o que pôde ser evidenciado pelo aumento da resistência das vias aéreas (**Figura 48**) e elastância pulmonar (**Figura 49**) após provocação com metacolina, quando comparados aos animais controles (desafiados com solução salina).

O pré-tratamento com o LASSBio-1765 (91), nas doses de 50 e 100 $\mu\text{mol/Kg}$, não alteraram os valores basais de resistência e elastância pulmonares, porém em ambas as doses houve inibição da hiper-reatividade das vias aéreas, a qual foi revelada após aerossolização com metacolina.

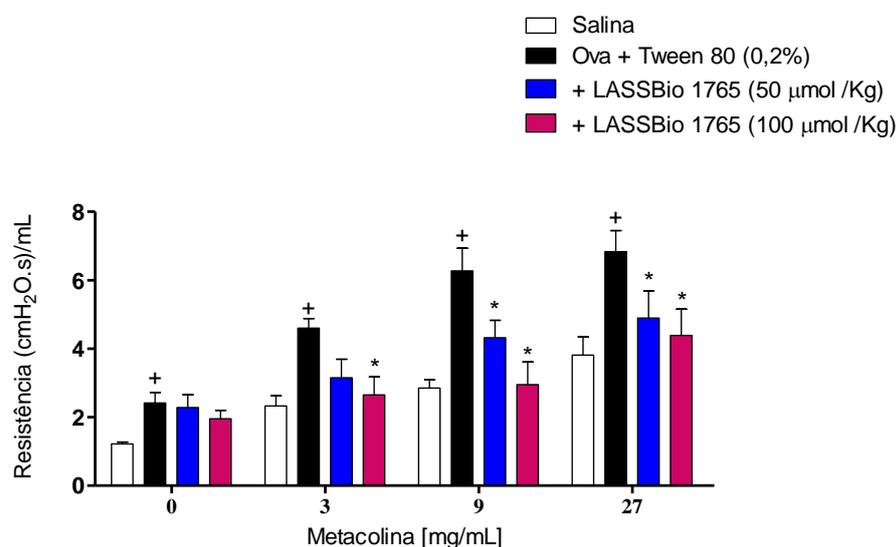


Figura 48: Efeito do tratamento com composto LASSBio-1765 (91) nas concentrações de 50 $\mu\text{mol/kg}$ e 100 $\mu\text{mol/kg}$ sobre o aumento de resistência e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado ao grupo não tratado. + $p < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com salina.

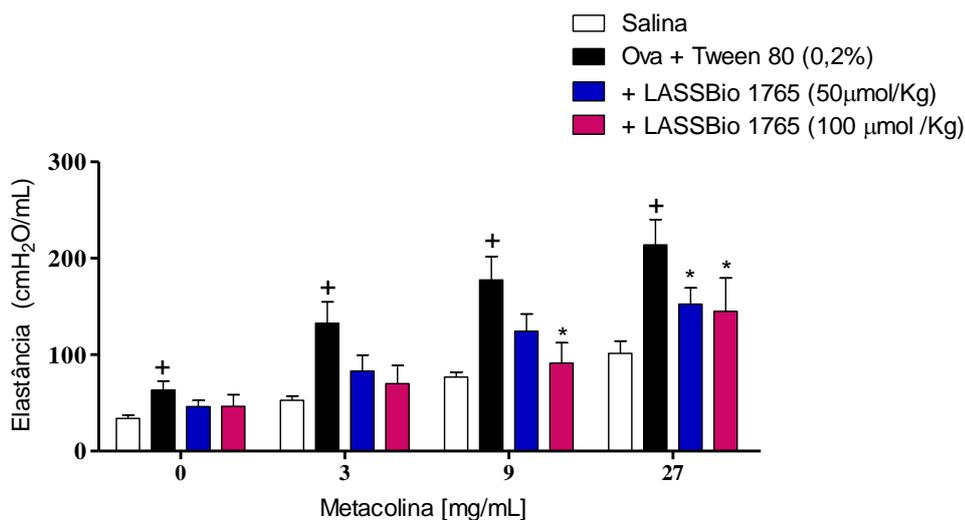


Figura 49: Efeito do tratamento com composto LASSBio-1765 (**91**) nas concentrações de 50 $\mu\text{mol/kg}$ e 100 $\mu\text{mol/kg}$ sobre o aumento de elastância pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos desafiados com OVA. Os valores representam a média \pm EPM de no mínimo 5 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado ao grupo não tratado. ⁺ $p < 0.05$ comparado ao grupo estimulado com salina.

3.5.4 AVALIAÇÃO DE LASSBio-1765 (**91**) QUANTO AO PERFIL LEUCOCITÁRIO NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)

Em seguida, o perfil leucocitário presente no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos foi avaliado para LASSBio-1765 (**91**). A provocação alérgica com OVA causa aumento significativo no número de leucócitos totais (**Figura 50 (A)**) recuperados no lavado bronco-alveolar (BAL) quando comparado aos camundongos desafiados apenas com solução salina, em função da migração de eosinófilos (**Figura 50 (D)**) e neutrófilos (**Figura 50 (E)**) para o espaço bronco-alveolar. No caso dos macrófagos (**Figura 50 (B)**) e dos linfócitos (**Figura 50 (C)**), a provocação alérgica com OVA não elevou significativamente suas populações no BAL. O derivado LASSBio-1765 (**91**), na dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$, inibiu de forma significativa o aumento do número de leucócitos totais de eosinófilos e de neutrófilos no BAL.

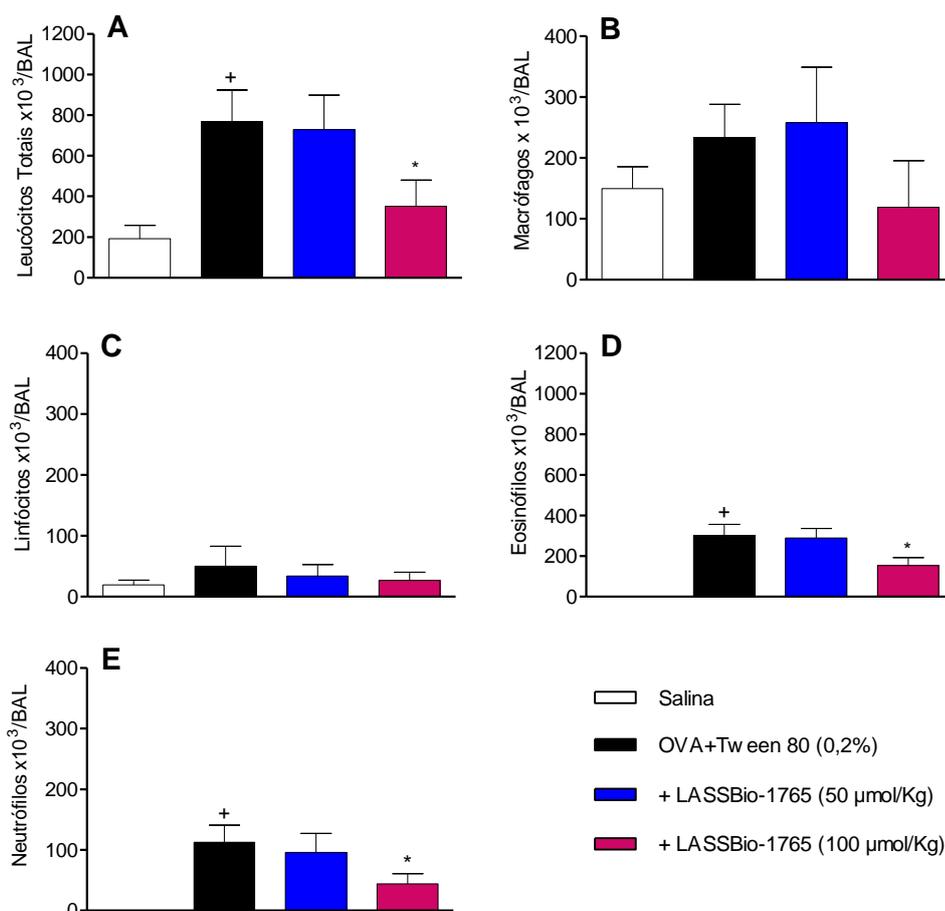


Figura 50: Contagem de leucócitos totais e diferenciais no lavado bronco-alveolar. As análises incluem: Leucócitos totais (A); Macrófagos (B); Linfócito (C); Eosinófilos (D); e Neutrófilos (E). O tratamento com LASSBio-1765 (**91**) nas doses de 50 µmol/kg e 100 µmol/kg, foi realizada por via intraperitoneal. Os valores representam a média ± EPM de 5 animais por grupo. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman-Keuls. $P < 0,05$.

3.5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LASSBio-1765 (**91**) SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCINAS EM AMOSTRAS DE TECIDO PULMUNAR DE CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM OVA

O potencial antagonismo de citocinas e quimiocinas por LASSBio-1765 (**91**) foi avaliado para complementação dos dados acerca da interferência desse tratamento na inflamação pulmonar alérgica, por meio do método de ELISA e quantificação das interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em extratos do tecido pulmonar.

Entretanto, LASSBio-1765 (**91**) não modificou os níveis aumentados de IL-4 e IL-13 nas doses de 50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$. Já em relação aos níveis de IL-5 em ambas as doses, houve aparente aumento, enquanto que para o caso da eotaxina-1 não houve diminuição significativa, quando LASSBio-1765 (**91**) foi administrado na dose de 50 $\mu\text{mol/kg}$, porém este resultado não foi estatisticamente significativo (**Figura 51**).

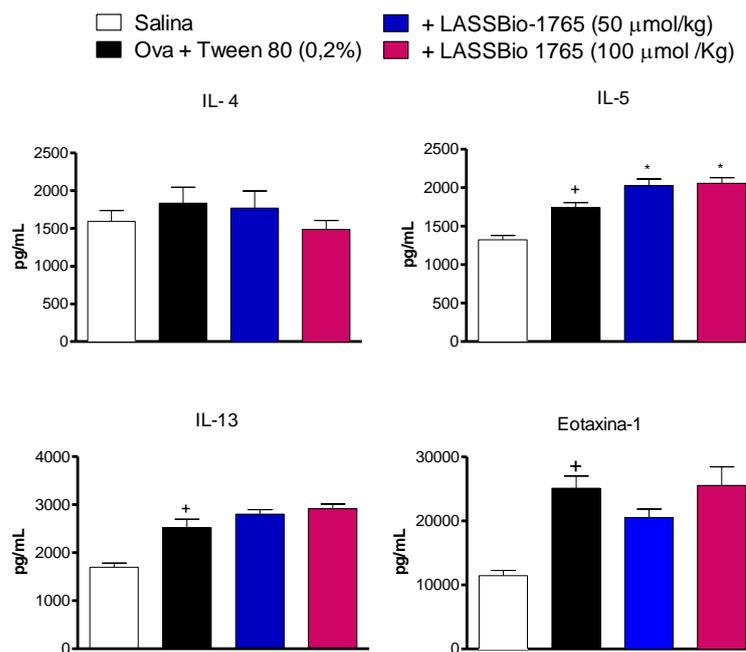


Figura 51: Quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina-1 em amostras de tecido pulmonar. Os valores representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo. Análises estatísticas: one-way ANOVA seguido pelo teste t de Newman-Keuls. $P < 0,05$.

3.5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LASSBio-1765 (**91**) QUANTO A INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NAS VIAS AÉREAS

Quando a ovoalbumina (OVA) é administrada semanalmente em camundongos, são observadas mudanças estruturais relevantes como a hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes, resultando no aumento significativo na produção de muco em relação a solução salina (controle). O tratamento com LASSBio-1765 (**91**) nas doses de 50 e 100 $\mu\text{mol/kg}$, em animais desafiados durante quatro semanas,

inibiu, inibiu de forma estatisticamente significativa a produção de muco nas vias aéreas, como pode ser observado na **Figura 52**, segundo avaliação por morfometria digital.

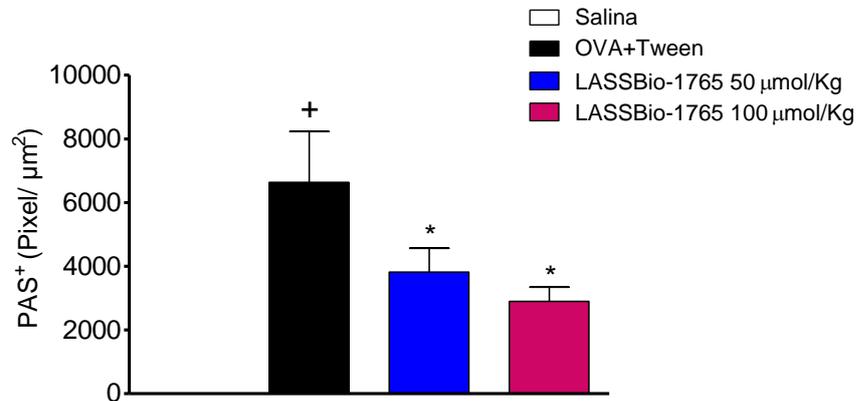


Figura 52: Efeito do tratamento com LASSBio-1765 (**91**) sobre a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J. A análise da produção de muco foi avaliada por morfometria digital. Os valores representam a média \pm EPM. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman-Keuls. $P < 0,05$.

Na **Figura 53**, podemos analisar as foto micrografias referentes ao efeito de LASSBio-1765 (**91**) nas doses de 50 e 100 µmol/kg, as quais mostram claramente a redução de muco nas vias aéreas em camundongos em ambas as concentrações.

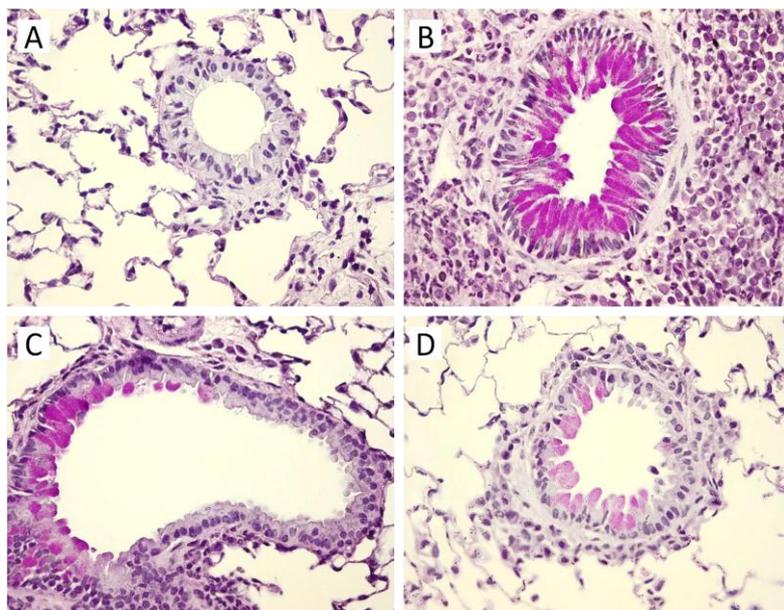


Figura 53: Foto micrografias representativas do efeito do tratamento com LASSBio-1765 (**91**) sobre a produção de muco nas vias aéreas de camundongos A/J. Salina (**A**); Ova + Tween 80 (0,2%) (**B**); LASSBio-1765 (**91**) (50µmol/kg) (**C**) e LASSBio-1765 (**91**) (50µmol/kg) (**D**). O tratamento com LASSBio-1765 (**91**) nas doses de 50 µmol/kg e 100µmol/kg, foi realizada por *i.p.*

3.5.7 EFEITO DE DE LASSBio-1765 (**91**) NA MOBILIZAÇÃO DE EOSINÓFILOS *IN VITRO*

De modo a ampliar os estudos referentes ao composto LASSBio-1765 (**91**), investigou-se seu efeito, nas concentrações de 1 e 10 µM, na resposta quimiotática de eosinófilos isolados da cavidade peritoneal de ratos normais expostos ao gradiente quimiotático de eotaxina-1 *in vitro*, visto que os receptores do tipo CCR3 estão majoritariamente expressos em eosinófilos (KOELINK et al., 2012). Como podemos analisar na **Figura 54**, a estimulação com eotaxina-1 murina foi capaz de aumentar de forma significativa o número de eosinófilos migrados à 30 µm da superfície de contato do filtro de nitro celulose, posto na interface entre o compartimento contendo a solução de eotaxina e aquele contendo as células. LASSBio-1765 (**91**), em ambas as concentrações, reduziu essa resposta inibindo completamente a migração dos

eosinófilos, mostrando forte indício desta resposta estar relacionada ao antagonismo de receptores de quimiocinas do tipo CCR3.

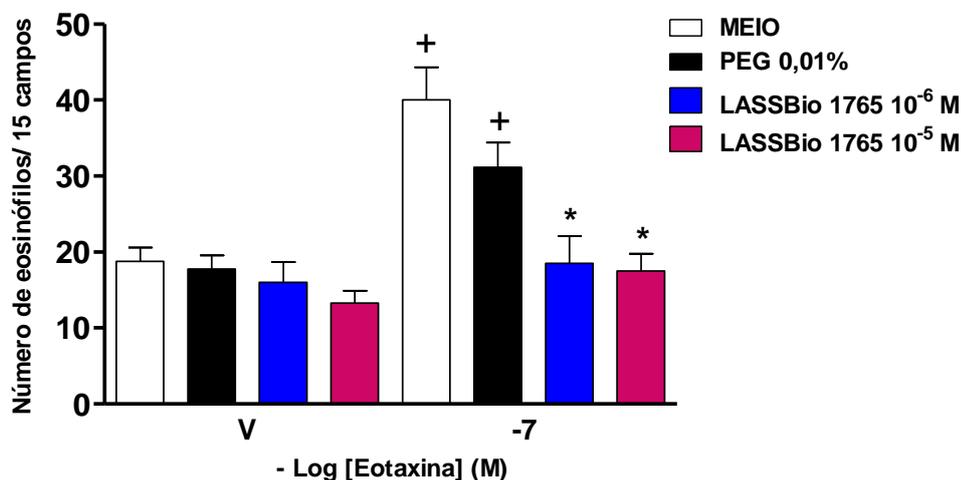


Figura 54: Efeito do composto LASSBio-1765 (**91**) sobre a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro* induzida por eotaxina murina. As células foram incubadas com LASSBio-1765 (**91**) nas concentrações de 10 μ M e 1 μ M; ou meio ou PEG 0,01%, a 37°C por 10 min e estimulados com eotaxina (0,1 μ M). Os valores representam a média \pm EPM. Análises estatísticas: one-way ANOVA e teste t de Newman-Keuls. $P < 0,05$. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado teste “t” de Student para amostras não pareadas. V = veículo. -7 = concentração de 10^{-7} .

3.5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS **81**, **82**, **89-92** EM ENSAIOS IN VITRO ENVOLVENDO CÉLULAS RECOMBINANTES ESTIMULADAS POR EOTAXINA-2

Paralelamente aos ensaios realizados e mostrados entre as **Seções 3.5.1 e 3.5.7** no Laboratório de Inflamação da FIOCRUZ, todos os compostos planejados e sintetizados neste estudo, *i.e.* **81**, **82**, e **89-92**, foram enviados para a empresa CEREP e submetidos ao ensaio realizado com células do tipo CHO expressando o receptor CCR3 humano, estimuladas com eotaxina-2 (10 nM). A temperatura de incubação foi 28°C e o método de detecção utilizado espectroscopia dielétrica. Antagonista de referência empregado foi o J113863 (100%), que apresenta $CI_{50} = 5,0$ nM

(DAUGHERTY et al. 1996). Conforme pode-se observar na Figura 55, LASSBio-1831 (89) e LASSBio-1642 (92) aumentam a atividade do agonista (eotaxina-2). Este aumento, o qual foi estatisticamente significativo nas concentrações de 1 μM (146,6%) e 0,3 μM (132,8%), respectivamente (**Figura 55**), podem estar relacionados a duas hipóteses: **(a)** a modulação agonista alostérica de receptores do tipo CCR3 e consequente potencialização da resposta da eotaxina-2, **(b)** estes dois derivados podem ser, na verdade agonistas dos receptores CCR3 capazes de deslocar o agonista J113863. Os demais derivados não foram capazes de gerar respostas estatisticamente significativas, neste modelo, nas concentrações avaliadas.

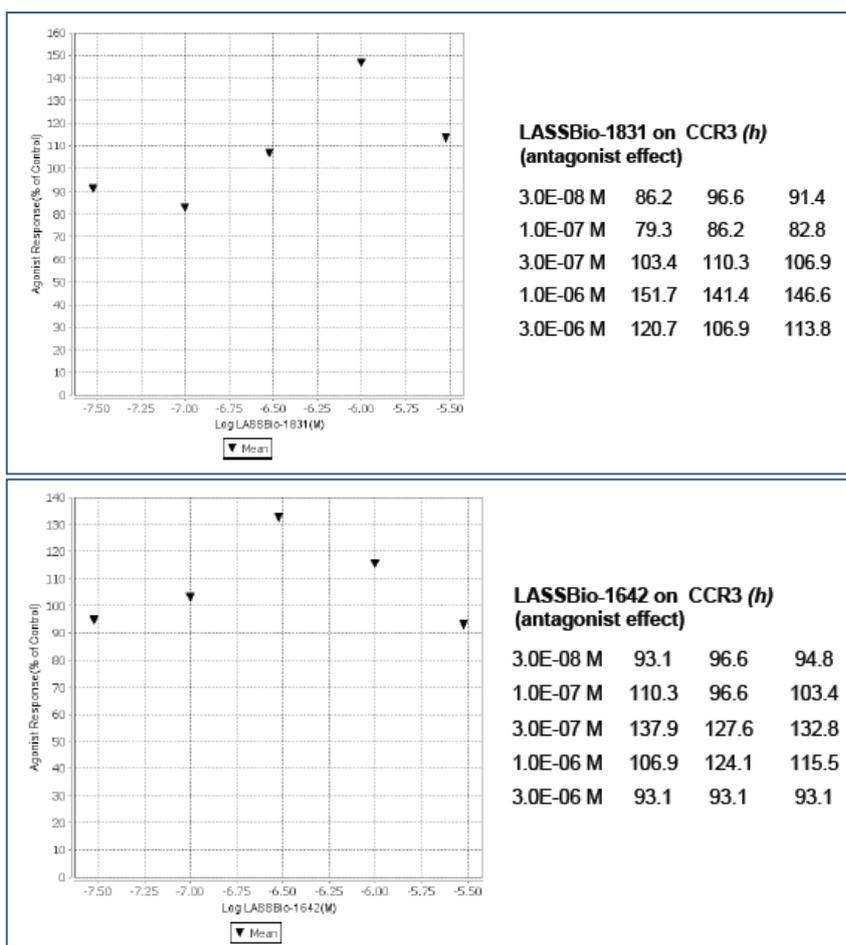


Figura 55: Ensaio realizado com células recombinantes humanas do tipo CHO, estímulo: eotaxina-2 (10 nM), Temperatura de incubação: 28°C, método de detecção: espectroscopia dielétrica. Antagonista de referência J113863 (100%): $\text{CI}_{50} = 5,0$ nM.

3.6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os modelos *in silico* dos receptores de quimiocina CCR3 e CCR4, obtidos por modelagem molecular comparativa, foram adequadamente analisados, validados e empregados na seleção dos derivados *N*-acilidrazônicos eleitos para a etapa de síntese.

A rota sintética mostrou-se adequada para a obtenção dos 6 compostos planejados, em 6 etapas, com rendimentos globais entre 8 e 46%, sem a necessidade de purificação por coluna, resultando na obtenção dos derivados em graus de pureza na faixa entre 96,7 e 99,9% por CLAE e em quantidade adequada à realização dos ensaios farmacológicos.

Os derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-1641 (**82**) e LASSBio-1642 (**92**) apresentam atividade anti-inflamatória, inibindo claramente o acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas pulmonares induzido por LPS, com destaque para LASSBio-1642 (**92**), que apresentou inibição significativa nas provas de elastância e resistência pulmonares.

O derivado LASSBio-1765 (**91**) inibiu significativamente o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos nas vias aéreas de animais desafiados com OVA, assim como as alterações na função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas. Ademais, LASSBio-1765 (**91**) bloqueou a migração de eosinófilos *in vitro* induzida por eotaxina, sugerindo fortemente a modulação de receptores de quimiocina do tipo CCR3.

No ensaio *in vitro* realizado com células recombinantes humanas do tipo CHO, estimuladas com eotaxina-2, LASSBio-1831 (**89**) eleva a resposta agonista até 146,6% (1 μ M) e LASSBio-1642 até 132,8% (0,3 μ M), em relação ao agonista de receptores CCR3 de referência J113863.

Os modelos *in silico* obtidos neste trabalho podem ser utilizados na eleição de novos protótipos para ligantes de receptores de quimiocinas dos tipos CCR3 e CCR4, assim como para estudos das interações ligante-receptor relevantes frente a estes receptores.

A rota sintética desenvolvida pode ser utilizada para ampliação da série de compostos obtidos neste trabalho, seja por meio de modificações em suas subunidades aromáticas, na subunidade *N*-acilidrazônica ou na subunidade aminoacídica, visando ampliação e continuação deste projeto de pesquisa.

Os ensaios farmacológicos serão completados para os compostos não avaliados. Ademais, novos ensaios farmacológicos *in vitro*, ensaios funcionais e *in vivo* serão realizados visando a melhor compreensão da ação farmacológica destes derivados, assim como avaliação da relação estrutura-atividade dos compostos sintetizados.

4. CAPÍTULO COMPLEMENTAR – ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA IN VITRO DE FRAGMENTOS E MICROMOLÉCULAS LIGANTES DE RECEPTORES DO TIPO CXCR4

4.1 PREAMBULO

O conteúdo deste capítulo foi desenvolvido e elaborado com base do estágio de doutoramento sanduíche realizado na Faculdade de Ciências Exatas (Faculteit der Exacte Wetenschappen) da Universidade Livre de Amsterdam (Vrije Universiteit – Amsterdam) no período de março a agosto de 2013, sob orientação do Prof. Dr. Rob Leurs. Este trabalho envolveu o aprendizado e aplicação de ferramentas e técnicas referentes a química computacional e síntese orgânica no âmbito dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), particularmente dos receptores de quimiocinas. Este capítulo foi escrito em formato/estrutura semelhante a de um artigo científico*.

4.2 PESQUISADORES ENVOLVIDOS E FILIAÇÃO

Nailton. M. Nascimento-Júnior^{§,||}, Luc Roumen[¶], Marlies C. A. Vreeker[¶], Hans Custers[¶], Maikel Wijtmans[¶], Iwan de Esch[¶], Eliezer J. Barreiro^{§,||}, Carlos A. M. Fraga^{§,||}, Chris de Graaf[¶], Rob Leurs[¶].

[§]Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 68023, RJ 21944-971, Brazil.

^{||}Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[¶]Leiden/Amsterdam Center of Drug Research , Department of Medicinal Chemistry, Vrije Universiteit Amsterdam, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam , The Netherlands.

*As referências bibliográficas desta seção se encontram listadas junto às demais referências da tese.

4.3 RESUMO

Neste trabalho, a estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 foi ancorada com micromoléculas da literatura **2-22** (THOMA et al., 2008) e com o fragmento molecular VUF13925 (**1**) (**Figura 56**), considerando seus respectivos valores de atividade *in vitro* frente ao receptor CXCR4 para validação e posterior utilização do modelo *in silico* na Triagem Virtual Baseada em Fragmentos (FBVS, do inglês, *Fragment-Based Virtual Screening*).

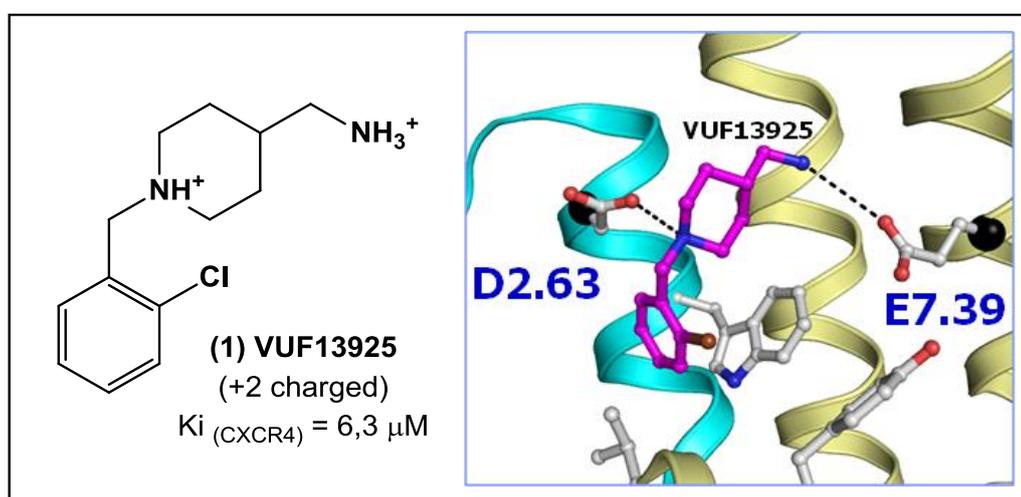


Figura 56: Estrutura do fragmento molecular VUF13925 (**1**) e suas interações com os resíduos D2.63 e E7.39 no modelo *in silico* do receptor CXCR4 (Adaptado de ROUMEN *et al.*, 2011).

Os estudos de ancoramento molecular foram combinados com a ferramenta de pós-processamento conhecida como Impressão Digital da Interação Ligante-Receptor (PLIF, do inglês, *Protein-Ligand Interaction Fingerprint*). Os novos fragmentos foram planejados com base no modelo *in silico* validado, sintetizados e avaliados farmacologicamente através de ensaios *in vitro* envolvendo a modulação de receptores CXCR4. Adicionalmente, o fragmento mais ativo foi usado para a etapa de

otimização estrutural (*fragment growth*) de modo a alcançarmos compostos mais ativos frente ao receptor-alvo.

Palavras-chave: CXCR4, benzilpiperidinas, desenho de fármacos baseado na estrutura do receptor, ancoramento molecular, triagem virtual, impressão digital da interação ligante receptor.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 VALIDAÇÃO DO MODELO DO RECEPTOR CXCR4

Inicialmente, a estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 [código PDB: 3ODU], a qual está co-cristalizada com a micromolécula antagonista 1t1t (**2**) (**Figura 57**) em resolução de 2,5 Å (WU et al., 2010), foi obtida do banco de dados de proteína (PDB)¹ e o arquivo com extensão .pdb foi aberto por meio do programa MOE² 2011.10. Antes do ancoramento molecular, a subunidade lisozima foi removida e somente a **cadeia A** da estrutura cristalográfica dimérica foi otimizada por meio de cálculos de densidade eletrônica*. A conformação dos aminoácidos do sítio de ligação foi otimizada através do uso do programa COOT³ para gerar o arquivo otimizado*.

As moléculas de água cristalizadas foram consideradas nos cálculos de ancoramento molecular, entretanto, elas também foram removidas da estrutura cristalográfica num segundo momento por conta da lipofilicidade do sítio do receptor CXCR4 e o fato de não existirem moléculas de água envolvidas em interações polares entre o ligante e o receptor (ROUMEN et al., 2011). Em relação as funções de pontuação usadas nos estudos de ancoramento molecular, foram usadas as funções de pontuação GoldScore do programa GOLD 4.0⁴ e a função ChemPLP do programa PLANTS⁵.

*Obs.: A otimização da estrutura cristalográfica e otimização da conformação dos aminoácidos da estrutura do receptor CXCR4 foram feitas previamente pelo Dr. Luc Roumen (Vrije Universiteit).

Um grupo de 21 ligantes que apresentam a subunidade isotiourea, carregados com carga +2 (**Figuras 57 e 58**), incluindo o antagonista 1t1t (**2**) (THOMA *et al.*, 2008) foi construído com o programa MOE, seguido de minimização por mecânica molecular (MMFF) e utilização nos estudos de ancoramento molecular.

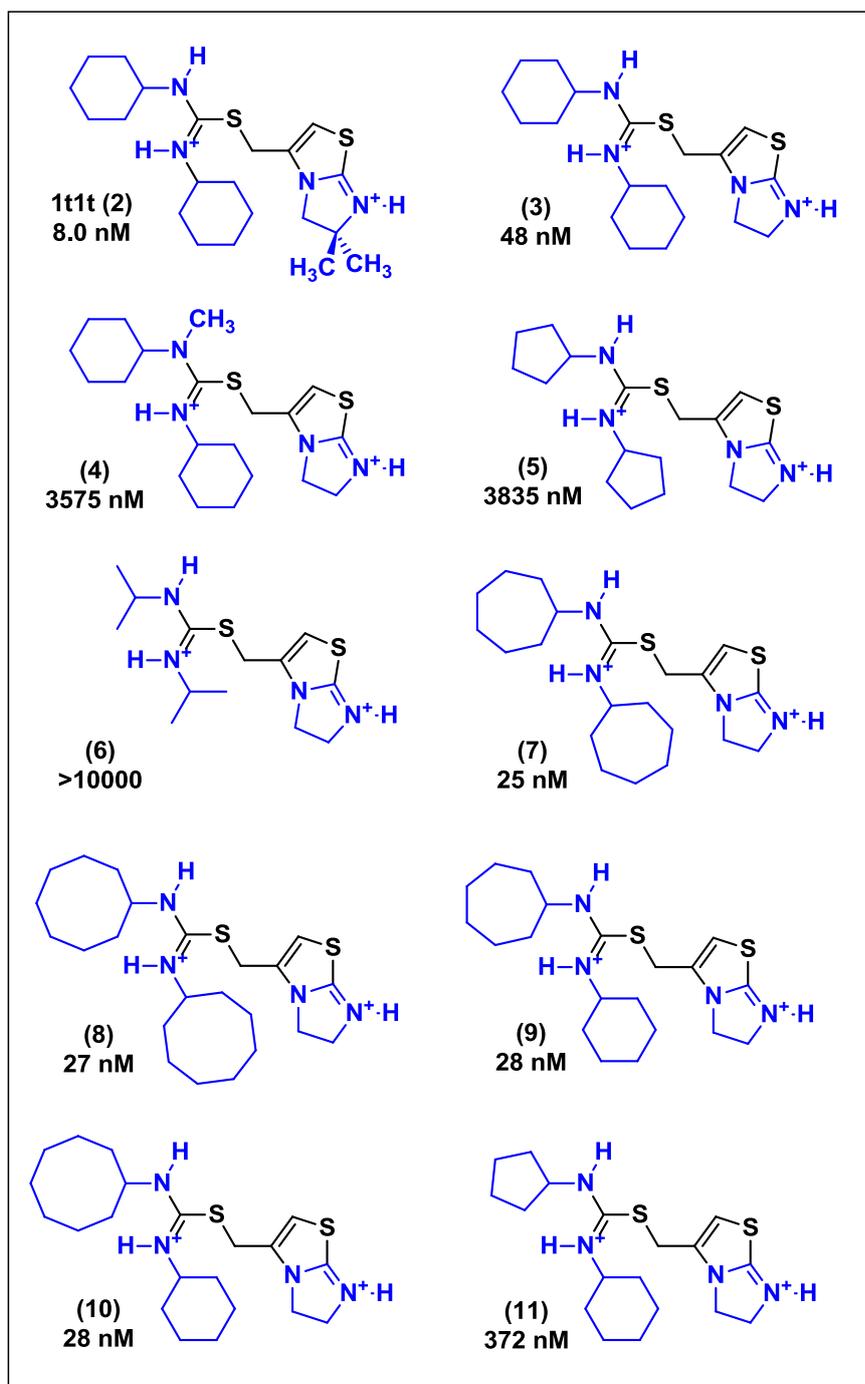


Figura 57: Estrutura do antagonista do receptor de quimiocina CXCR4 (1t1t) (**2**) e 9 análogos estruturais (THOMA *et al.*, 2008).

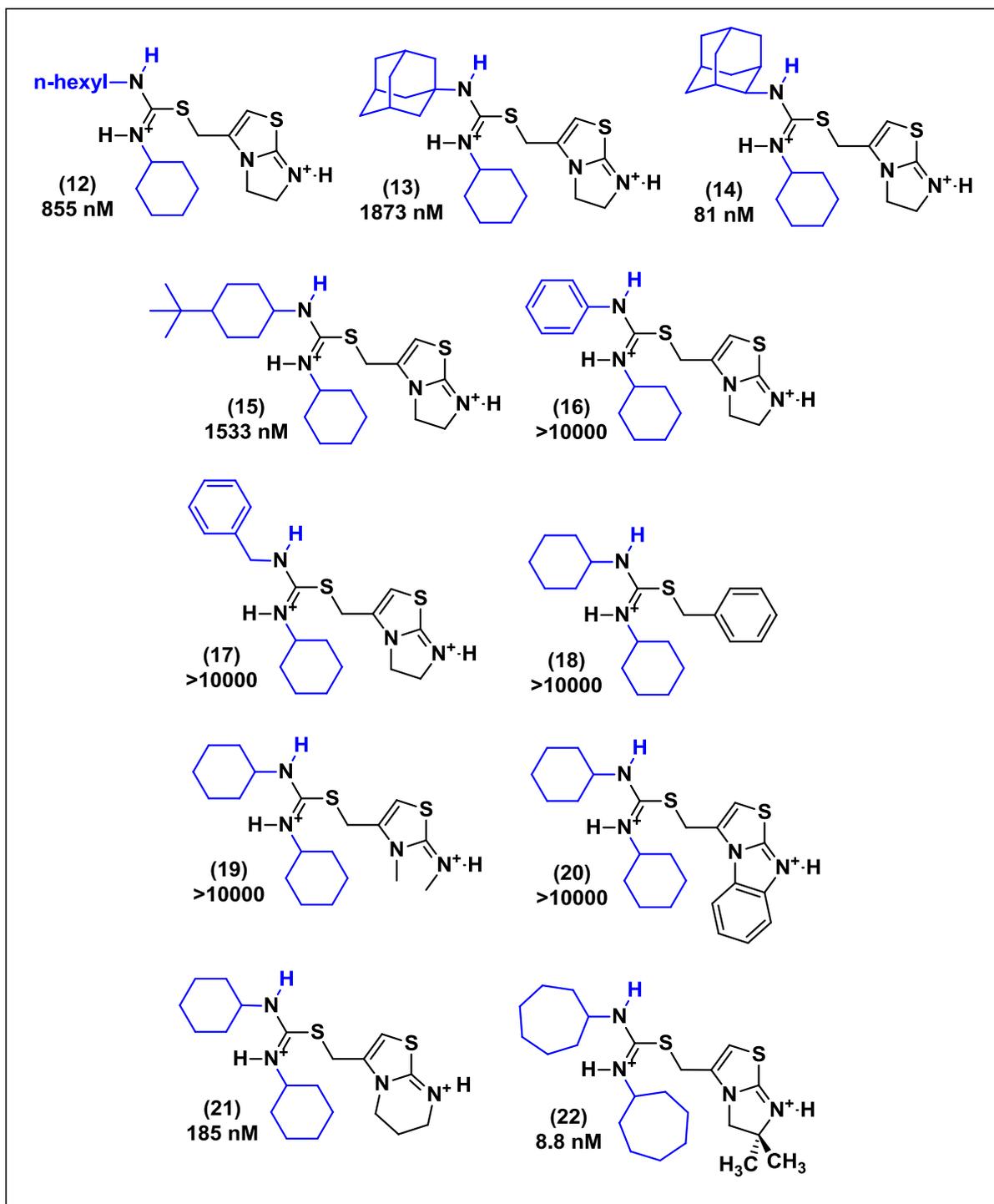


Figura 58: Estrutura de 11 análogos estruturais do antagonista do receptor de quimiocina CXCR4 (1t1t) (2).

Os átomos de referência do sítio menor na estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 (D2.63, E7.39 e W2.60) (**Figura 59**) foram usados para guiar a seleção das coordenadas xyz (21.255, -7.369 , 72.779) usadas no ancoramento molecular dos 21 ligantes (**2-22**). O raio foi fixado em 7Å de modo a evitar interações com o sítio maior. Foram obtidas 15 poses de ancoramento molecular para cada ligante e apenas uma corrida foi realizada. Além disso, os átomos de hidrogênio foram adicionados ao receptor em pH fisiológico (7.4) e considerando temperatura fixada em 298,15 K.

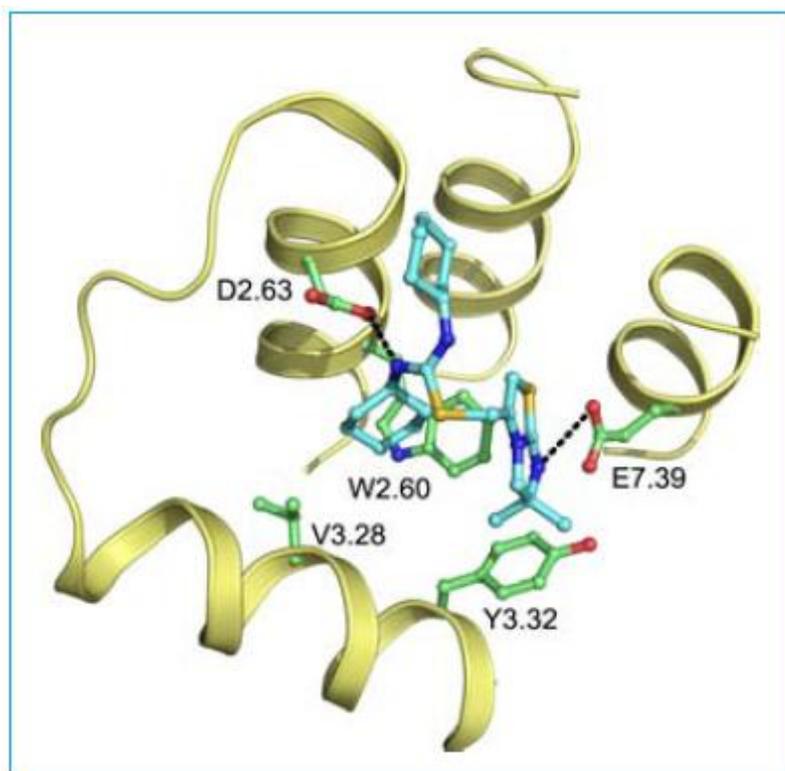


Figura 59: Composto 1t1t (**2**) cristalizado no sítio menor da estrutura cristalográfica do receptor CXCR4 (Adaptado de ROUMEN *et al.*, 2011).

O ancoramento molecular rígido foi eleito para todos os cálculos realizados usando as funções de pontuação GoldScore e ChemPLP, considerando ou não

moléculas de água, porque a estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 está cocristalizada com um antagonista que possui afinidade *in vitro* neste receptor (2). Portanto, sugere-se que as orientações dos resíduos-chave na estrutura cristalográfica são adequadas o suficiente para observarmos interações ligante-proteína relevantes no modelo objeto de estudo deste trabalho.

Após a realização dos cálculos, todas as poses de ancoramento molecular foram pós-processadas por meio da ferramenta de impressão digital da interação ligante-receptor (PLIF) (MARCOU & ROGNAN, 2007). Para este propósito, o arquivo contendo os principais resíduos próximos ao ligante num raio de 5 Å foram otimizado* juntamente com o composto 1t1t (2) em seu sítio no cristal. O arquivo otimizado foi utilizado para a geração no arquivo com extensão .IFP*, no qual a melhor orientação do ligante e interações com os principais resíduos foram conservadas.

Em seguida, as 15 poses obtidas para cada ligante após a corrida realizada foram ordenadas e comparadas com base na orientação de cada pose, rmsd e interações com os resíduos-chave no arquivo .IFP. Observou-se interações entre o ligante e todos os resíduos próximos num raio de 5 Å, especialmente Asp-288 e Glu-97, que realizam importantes interações iônicas, como pode ser observado no arquivo PDBsum e no arquivo .PDB da estrutura cristalográfica (PDB ID: 3ODU).

A melhor pose de ancoramento molecular foi selecionada com base em um valor numérico, que foi fornecido após o cálculo de PLIF. O programa FINGERPRINT⁶ fornece um valor entre 0,00 e 1,00 com base nos seguintes tipos de interações: (1) hidrofóbicas, (2) empilhamento π , (3) empilhamento T, (4) ligação de hidrogênio (aceptor-doador), (5) ligação de hidrogênio (doador-aceptor), (6) iônica (negativo-positivo) e (7) iônica (positivo-negativo). Neste contexto, à medida que o valor de PLIF se aproxima de 1,00 a pose de ancoramento molecular é igual ou similar a orientação com às melhores interações. A inspeção visual também foi

utilizada na seleção da melhor pose de ancoramento molecular para cada ligante, por meio da comparação entre o valor de PLIF, orientações e interações-chave com os resíduos de aminoácidos.

Observou-se que um considerável número de compostos dentre os 21 submetidos ao ancoramento molecular apresentaram valores de PLIF, interações e orientações em concordância com a orientação otimizada do composto 1t1t (**2**) no arquivo .IFP, conforme pode ser sumarizado na **Tabela 11**.

Tabela 11. Avaliação das funções de pontuação GoldScore e ChemPLP, considerando (wet) ou não (dry) as moléculas de água do cristal. As poses de ancoramento molecular para os compostos **2-22** foram avaliadas em relação ao valor de PLIF, orientação espacial e interações com resíduos-chave. Os compostos com resultados de qualidade intermediária não foram contabilizados nesta Tabela (informações complementares: ANEXOS 5-8).

Função de pontuação	Boas poses	Poses ruins
GoldScore (wet)	16	3
GoldScore (dry)	10	4
ChemPLP (wet)	11	4
ChemPLP (dry)	6	4

As funções de pontuação, ao considerarem moléculas de água de cristalização, apresentaram o maior número de boas poses de ancoramento molecular, porém as moléculas de água não realizam deslocamentos, movimentos rotacionais ou translacionais no modelo rígido utilizado, além de parecerem apresentar um efeito de ligação/interação no ancoramento molecular (**Figura 60**), resultando provavelmente em resultados artificiais, conforme pode ser observado na ligação de hidrogênio entre subunidade aromática benzoimidazotiazola ionizada do derivado **20** (em laranja) e o átomo de oxigênio de uma das moléculas de água de cristalização. Adicionalmente, moléculas de água com coordenadas fixadas ocupam posições que

poderiam ser ocupadas por algumas poses de ancoramento molecular. Portanto, os modelos *in silico* contendo moléculas de água de cristalização foram descartados da etapa de triagem virtual.

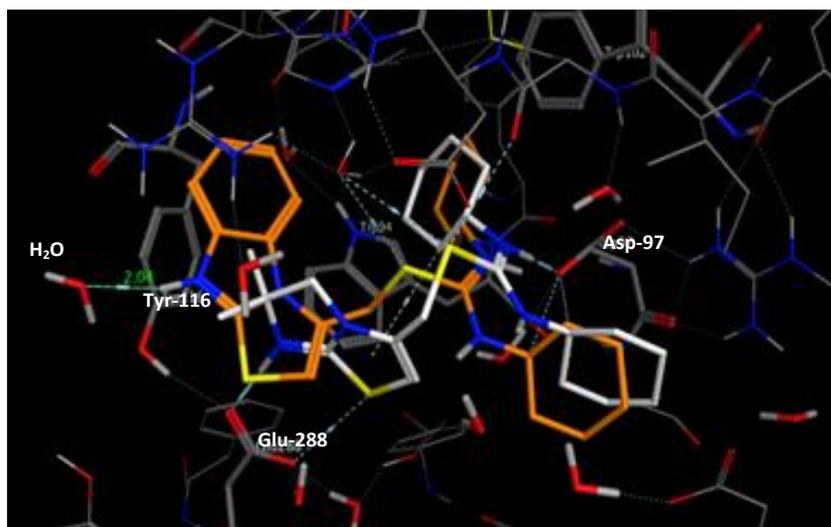


Figura 60. O modelo *in silico* do receptor CXCR4 contendo o ligante 1t1t (**2**) (branco) e seu análogo estrutural **20** (laranja), mostrando o efeito de interação que moléculas de água fixas podem apresentar no ancoramento molecular.

Ao realizar-se o ancoramento molecular do ligante originalmente co-cristalizado, 1t1t (**2**), no modelo *in silico* de CXCR4, utilizando-se as funções de pontuação GoldScore e ChemPLP, sem as moléculas de água de cristalização, pode-se observar interações com os resíduos E7.39 (Glu-288) e D2.63 (Asp-97), orientações próximas a do ligante originalmente co-cristalizado e valores de PLIF de 0,895 e 0,947, respectivamente. Após esta segunda consideração na validação dos modelos, visto que o “reancoramento molecular” (*redocking*) também é utilizado para avaliar a capacidade preditiva da orientação mais adequada, ambas as funções de pontuação foram usadas no processo de triagem virtual.

4.4.2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Com base na micromolécula 1t1t (**2**) e no fragmento molecular VUF13925 (**1**), pode-se fazer as seguintes considerações (**Figura 61**): (a) O contato polar entre o grupo NH_3^+ de **1** e o resíduo Trp-95 pode ser conservado e novas modificações podem ser propostas visando interações com Trp-102, dessa forma o átomo de nitrogênio carregado positivamente pode ser mantido, (b) em contrapartida, uma das subunidades cicloexila de 1t1t (**2**) não está próxima dos resíduos-chave e pode ser removida.

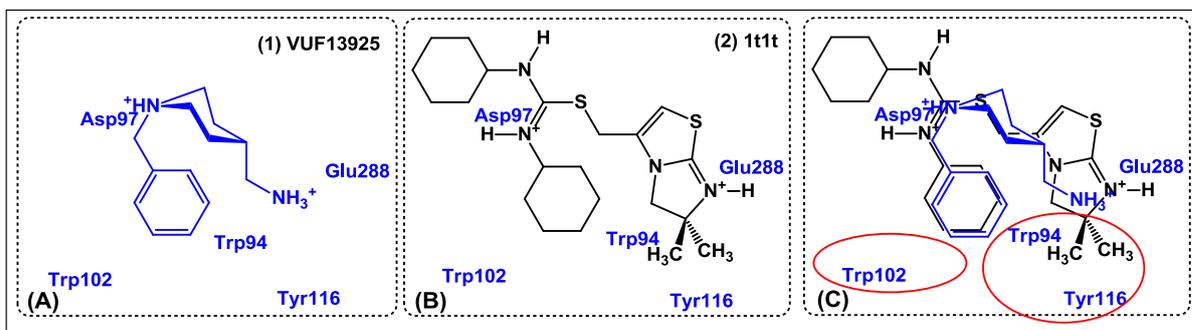


Figura 61. (A) VUF13925 (**1**). (B) 1t1t (**2**). (C) Junção de “A” e “B”, **1** e **2** sobrepostos. Esta representação bidimensional dos resíduos-chave em azul ilustra uma estratégia simplificada para visualizar modificações em potencial.

É importante destacar que ambos os átomos de nitrogênio carregados positivamente, presentes em **1** e **2** apresentam interações relevantes com os resíduos D2.63 (Asp-97) e E7.39 (Glu-288), logo, a carga positiva do anel piperidínico também parece ter papel relevante para a interação ligante-receptor. Também pode-se considerar a introdução de uma subunidade estrutural ao grupo NH_3^+ de **1**, visando alcançar interações com os resíduos Trp-94 e Tyr-116. Com base nestas observações, são propostos 190 fragmentos para a etapa de triagem virtual baseada em fragmentos (FBVS) (**Figura 62**).

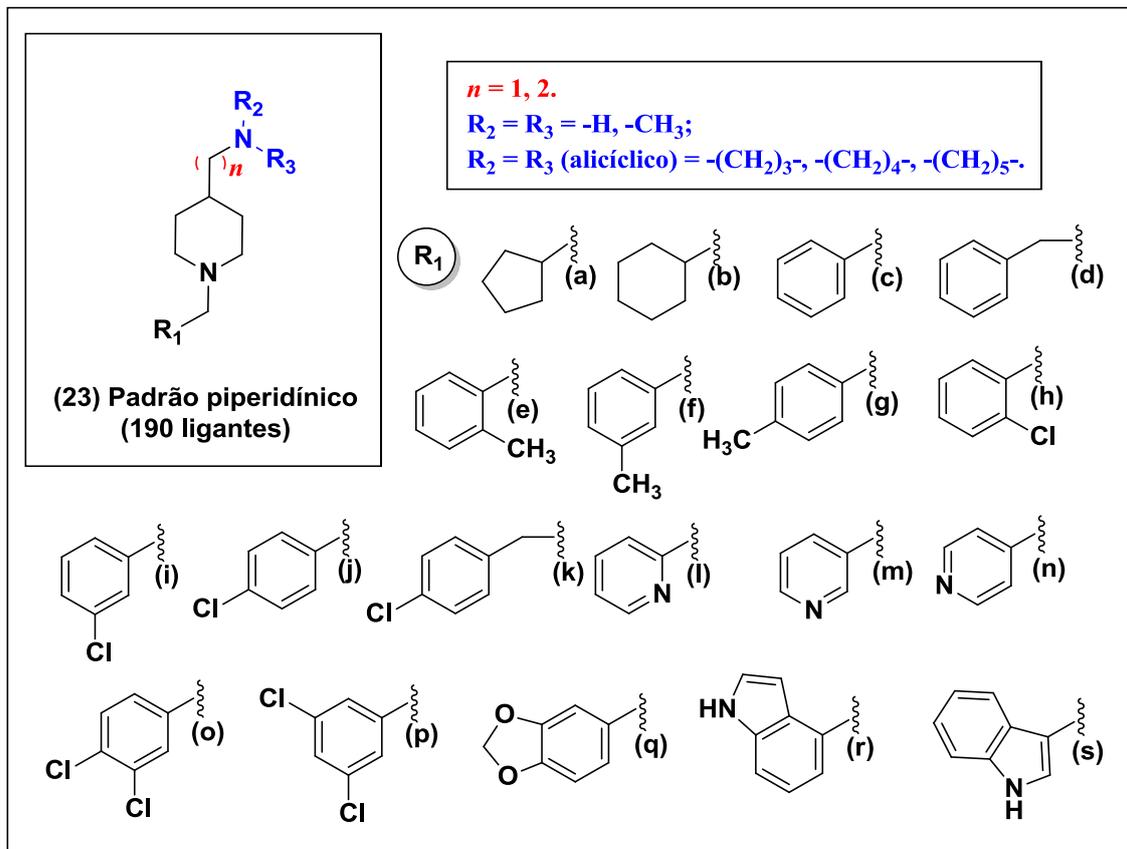


Figura 62. Estrutura química dos 190 compostos de padrão estrutural piperidínico propostos para a triagem virtual no modelo *in silico* validado do receptor de quimiocina CXCR4.

A estrutura geral **23** (**Figura 62**) resume o que foi considerado essencial à estrutura dos compostos propostos, na qual o espaçador “ n ” visa avaliar a distância adequada entre os átomos de nitrogênio carregados positivamente, assim como as variações em R_1 visam avaliar a contribuição de subunidades alicíclicas, aromáticas (contendo ou não substituintes) e heteroaromáticas. As posições R_2 e R_3 possibilitam avaliar a importância da presença dos átomos de hidrogênio do grupo amino, assim como a influência de grupos alquila ligados diretamente a este átomo de nitrogênio, sejam eles o grupo metila ou substituintes alicíclicos.

4.4.3 TRIAGEM VIRTUAL DOS LIGANTES PLANEJADOS

Todos os fragmentos da **Figura 62** foram construídos com a ferramenta QuaSAR de construção combinatória do programa MOE, minimizados por meio de cálculos de mecânica molecular (MMFF) e submetidos ao ancoramento molecular por meio das funções de pontuação ChemScore e ChemPLP. Ambos os arquivos do tipo .JFP contendo os ligantes VUF13925 (**1**) e 1t1t (**2**) podem ser usados para a geração de valores de PLIF, logo, ambos foram utilizados para a etapa de pós-processamento dos resultados de ancoramento molecular dos 190 compostos planejados.

Devido a elevada similaridade entre o fragmento molecular VUF13925 (**1**) e os fragmentos propostos (**23**), neste caso, os valores de PLIF foram melhores do que quando o composto 1t1t (**2**) foi usado como molde/referência. Adicionalmente, a função de pontuação GoldScore foi capaz de gerar mais compostos com elevados valores de PLIF em comparação com a função de pontuação ChemPLP. Portanto, a abordagem que utiliza a função GoldScore, combinada com o complexo “sitio de ligação do CXCR4 / VUF13925 (**1**)” otimizado na geração do arquivo de referência .JFP foi escolhida para a eleição do melhor fragmento para a etapa de síntese (**Figura 63**). Cabe destacar que o valor de corte geralmente utilizado para os resultados de PLIF está em torno de 0,70.

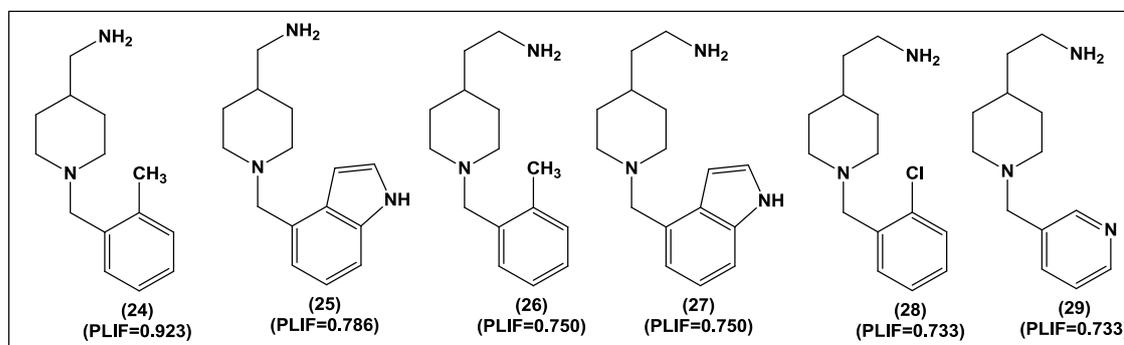


Figura 63. Compostos com os maiores valores de PLIF (>0,70) gerados a partir de cálculos de ancoramento molecular por meio da função de pontuação GoldScore, seguidos de pós-processamento utilizando arquivo .JFP com base na estrutura do fragmento VUF13925 (**1**).

Os seis fragmentos mostrados (**24-29**) possuem valores de PLIF superiores a 0,70, porém o composto **24** apresenta um valor de PLIF muito superior aos demais (0,92), logo este fragmento foi eleito para a etapa de síntese. O fragmento **25** (PLIF=0,79) também foi obtido por meio da função de pontuação ChemPLP e pós-processado com o arquivo .IFP de VUF13925 (**1**), porém o valor de PLIF de **25** neste caso foi somente de 0,65 e este foi o mais elevado valor obtidos por meio da função ChemPLP.

4.4.4 SELEÇÃO DE FRAGMENTOS PARA A ETAPA DE SÍNTESE COM BASE EM UMA QUIMIOTECA DE FRAGMENTOS COM ATIVIDADE IN VITRO FRENTE AO RECEPTOR CXCR4

Com base no fragmento VUF13925 (**1**), o qual apresenta valor de K_i de 6,3 μM em CXCR4, e outros fragmentos bioativos da quimioteca do grupo do Prof. Rob Leurs (Vrije Universiteit), mais fragmentos foram eleitos para a etapa de síntese, como pode ser observado nas **Figuras 64-68** visando o estudo das relações estrutura-atividade. O fragmento VUF13925 (**1**), após substituições do grupo amino por amida e éster para gerar VUF14427 (**30**) e VUF14428 (**31**), respectivamente, possibilitou avaliarmos se a subunidade amino é realmente essencial para a atividade in vitro destes fragmentos (**Figura 64**).

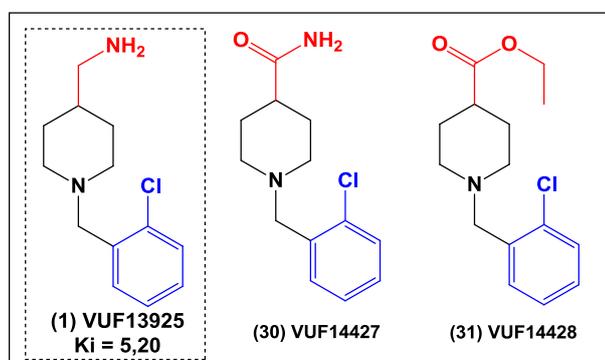


Figura 64. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13925 (**1**).

Partindo-se do fragmento diclorado VUF13924 (**32**), foram planejados os fragmentos VUF14444 (**33**) e VUF14363 (**34**), explorando a ciclização e restrição conformacional da região intermediária de **32** e troca da subunidade *N,N*-dimetilamino pelas subunidades amino e amida, respectivamente, de modo a avaliar-se a contribuição destas modificações para a atividade destes fragmentos (**Figura 65**).

Em seguida, a subunidade hidroxibenzila e os dois átomos de nitrogênio básicos de VUF13936 (**35**) inspiraram o planejamento de VUF14441 (**36**) e VUF14462 (**37**), que tiveram sua estrutura básica planejada a partir de VUF13925 (**1**), visando avaliar-se as contribuições dos grupos hidroxila e metoxila, respectivamente para a interação com o biorreceptor-alvo (**Figura 66**).

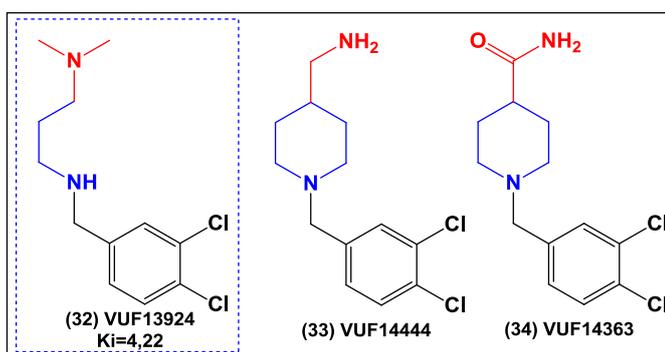


Figura 65. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13924 (**32**).

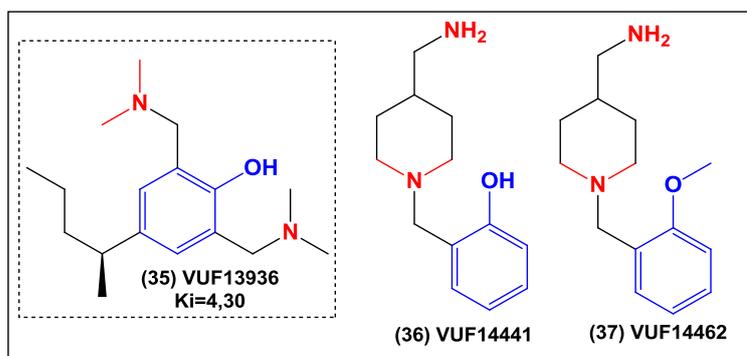


Figure 66. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13936 (**35**).

O fragmento VUF13930 (**38**) foi usado para inspirar o planejamento dos fragmentos VUF14443 (**24**), o qual já foi eleito como o melhor fragmento apontado pelos estudos *in silico*, além do fragmento amídico VUF14364 (**39**) (Figura 67).

E finalmente, a micromolécula antagonista do receptor CXCR4, o composto 1t1t (**2**), inspirou o planejamento de VUF14429 (**40**), baseando-se em suas subunidades cicloexila e nos dois átomos de hidrogênio carregados positivamente (Figura 68).

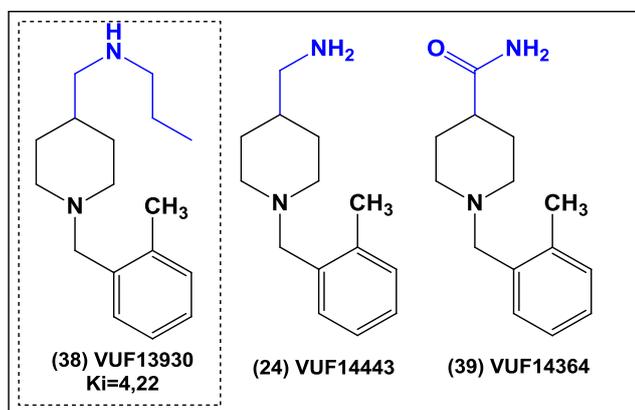


Figura 67. Novos fragmentos planejados a partir de VUF13930 (**38**).

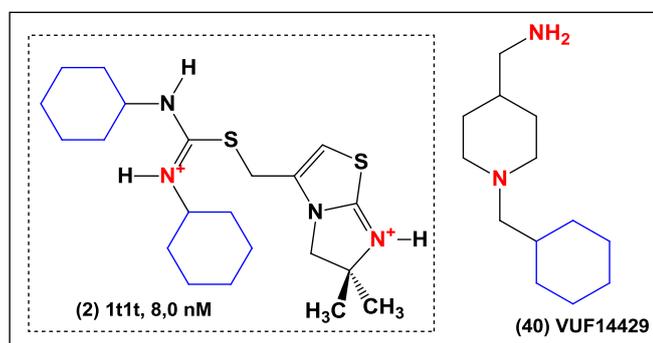
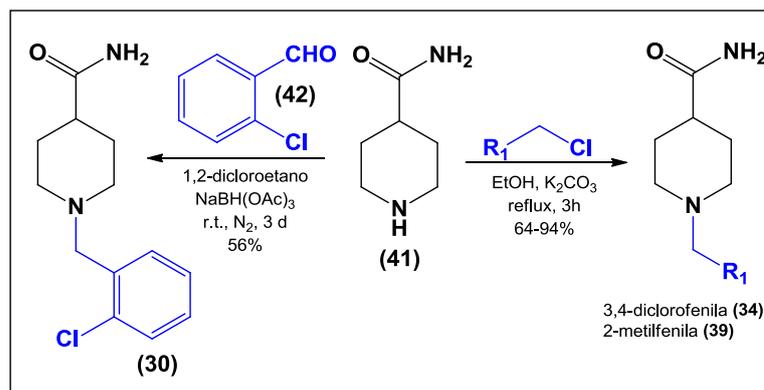


Figura 68. Planejamento do fragmento 40, a partir do composto 1t1t (**2**).

4.4.5 SÍNTESE DOS FRAGMENTOS PIPERIDÍNICOS

O fragmento VUF14427 (**30**) foi sintetizado por meio de aminação redutiva entre a isonipectamida (**41**) e o 2-clorobenzaldeído (**42**) em triacetoxiboroidreto de sódio e 1,2-dicloroetano (ABDEL-MAGID et al., 1996). Enquanto que os fragmentos amídicos, VUF14363 (**34**) e VUF14364 (**39**), foram sintetizados por meio de substituição nucleofílica entre a isonipectamina (**41**) e os cloretos de benzila substituídos correspondentes, em carbonato de potássio e etanol sob refluxo (KLAVENESS et al., 2009) (**Esquema 9**).

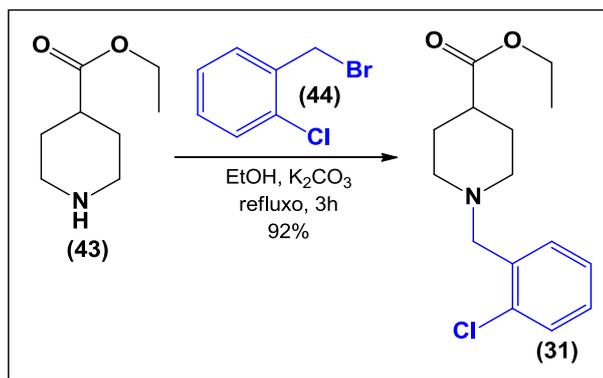


Esquema 9. Síntese dos fragmentos amídicos VUF14427 (**30**), VUF14363 (**34**) e VUF14364 (**39**).

O fragmento VUF14428 (**31**) também foi obtido em uma etapa, por meio de uma substituição nucleofílica entre o isonipecotato de etila (**43**) e o brometo de 2-clorobenzila (**44**), em carbonato de potássio e etanol sob refluxo (KLAVENESS et al., 2009) (**Esquema 10**).

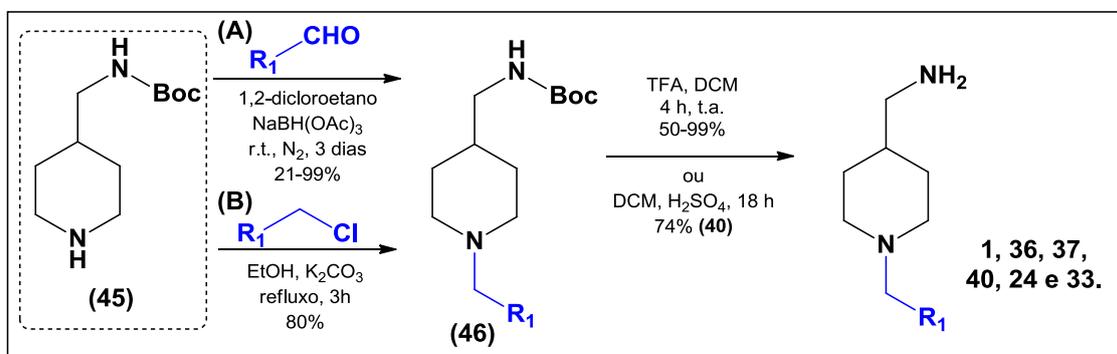
Para a síntese de 6 dos fragmentos planejados, partiu-se do *t*-butil((1-(2-metilbenzil)piperidin-4-il)metil)carbamato (**45**) e adotou-se duas abordagens: (A) Aminação redutiva, seguida de desproteção do grupamento *N*-Boc em **46** para fornecer dos fragmentos VUF13925 (**1**), VUF14441 (**36**), VUF14462 (**37**) e VUF14429

(40) (ABDEL-MAGID et al., 1996; YOU et al., 2011). (B) Substituição nucleofílica seguida de desproteção do *N*-Boc em 46 para fornecer os fragmentos VUF14443 (24) e VUF14444 (33) (KVALENESS et al., 2009; YOU et al., 2011) (Esquema 11).



Esquema 10. Síntese do fragmento VUF14428 (31).

A etapa de desproteção com ácido sulfúrico em diclorometano (STRAZZOLINI et al., 2005) foi realizada somente quando o substituinte em R_1 era a cicloexila, visto que para os demais substituintes poderia ocorrer reação de substituição eletrofílica aromática, resultando na formação de subprodutos.



Esquema 11. Síntese dos fragmentos 1, 36, 37, 40, 24 e 33.

Todos os fragmentos e as moléculas otimizadas subsequentes foram obtidos em grau de pureza adequado (>95% por CLAE), em quantidade suficiente para a realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* e foram caracterizados por meio de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas e HRMS.

4.4.6 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VITRO* DOS FRAGMENTOS PIPERIDÍNICOS

A **Tabela 12** ilustra os valores de pK_i obtidos para os compostos **1**, **24**, **30**, **31**, **33**, **34**, **36**, **37**, **39**, **40** como ligantes de CXCR4. Quando a subunidade metilamino de VUF13925 (**1**) é substituída por uma amida ou éster, há perda de atividade, como pode ser observado para os fragmentos amídicos VUF14427 (**30**), VUF14363 (**34**) e VUF14364 (**39**), assim como para o fragmento contendo um grupo éster VUF14428 (**31**). Logo, é recomendado que haja a presença de uma subunidade amino básica e protonada para que a afinidade por CXCR4 seja mantida (**Tabela 12**).

Tabela 12. Atividade in vitro dos fragmentos sintetizados (ensaios realizados por Marlies C. A. Vreeker).

Fragmento	Atividade in vitro em CXCR4 (pKi)
VUF13925 (1)	5,204
VUF14443 (24)	5,036
VUF14427 (30)	Inativo
VUF14428 (31)	Inativo
VUF14444 (33)	3,963
VUF14363 (34)	Inativo
VUF14441 (36)	Inativo
VUF14462 (37)	4,882
VUF14364 (39)	Inativo
VUF14429 (40)	4,606

O fragmento VUF14464 (36), que apresenta o anel aromático 2-hidroxissubstituído, também mostrou-se inativo no ensaio realizado, indicando que substituintes polares nesta posição parecem não serem recomendados (Tabela 12).

Dentre os fragmentos ativos, o composto diclorado VUF14444 (33) possui baixa atividade (pKi = 3,963), enquanto que o composto metoxilado VUF14462 (37) apresenta atividade superior (pKi = 4,882), assim como o fragmento que apresenta a subunidade cicloexila no lugar da subunidade aromática, VUF14429 (40) (pKi = 4,606). O fragmento VUF13925 (1) (pKi = 5,204) apresentou o melhor resultado de atividade in vitro, seguido de VUF14443 (24) (pKi = 5,036), que foi o fragmento que se mostrou mais promissor com base nos estudos *in silico* (Tabela 12).

4.4.7 COMPOSTOS ORIGINADOS DO CRESCIMENTO DO FRAGMENTO VUF13925 (1)

Visto que o fragmento VUF13925 (1) apresentou o maior valor de atividade *in vitro* dentre os fragmentos testados, o mesmo foi utilizado para a etapa de crescimento de fragmento (*fragment growth*), de modo que ambos os átomos de nitrogênio básicos fossem mantidos. Dessa forma, a subunidade 2-clorobenzila ligada ao núcleo piperidínico foi mantida e incrementos estruturais foram propostos no grupo amino, conforme pode ser visto na **Figura 69**.

Podemos observar que o composto VUF14349 (47) apresenta uma subunidade heterocíclica adicional, a qual foi utilizada para inspirar a eleição das subunidades heterocíclicas 3-piridinila em VUF14463 (48) e 4-imidazola em VUF14464 (49). Adicionalmente, foi proposta a subunidade 1,3-benzodioxola em VUF14445 (50) por conta da capacidade dessa subunidade estrutural atuar realizando tanto interações hidrofóbicas como polares (*e.g.*:ceptor de ligação de hidrogênio).

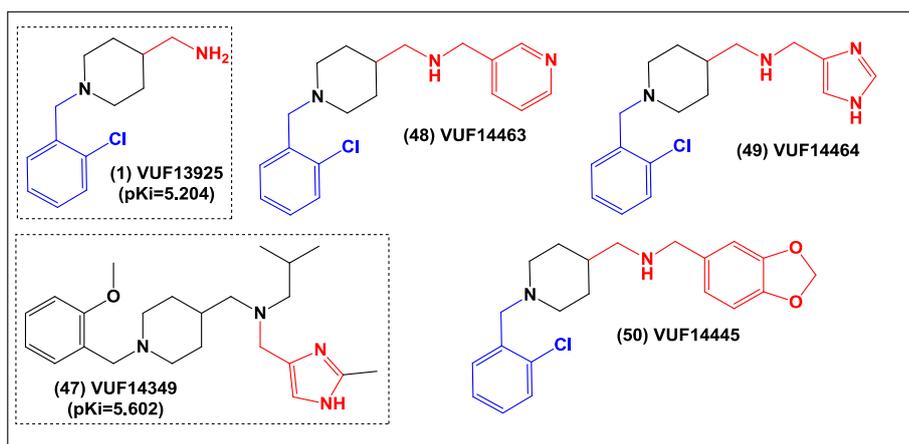
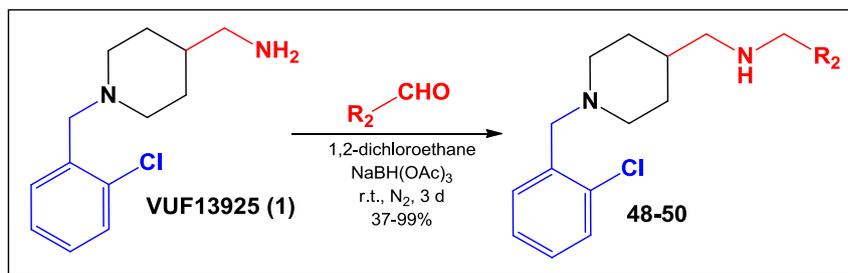


Figura 69. Planejamento dos compostos 48-50 a partir de VUF13925 (1) e VUF14349 (47).

A síntese destes três compostos **48-50** foi realizada em uma etapa a partir do fragmento VUF13925 (**1**) e dos aldeídos correspondentes, por meio de aminação redutiva em triacetoxiboroidreto de sódio e 1,2-diclorometano (ABDEL-MAGID et al., 1996) (**Esquema 12**).



Esquema 12. Síntese dos compostos **48-50**.

4.4.8 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA IN VITRO DOS COMPOSTOS ORIGINADOS DO CRESCIMENTO DO FRAGMENTO VUF13925 (**1**)

Em comparação com o fragmento VUF13925 (**1**), a subunidade adicional 1,3-benzodioxola em VUF14445 (**50**) ($pK_i=4,944$) resultou em atividade ligeiramente inferior frente ao receptor CXCR4, porém as subunidades 3-piridinila em VUF14463 (**48**) ($pK_i=5,729$) e imidazola e VUF14464 (**49**) ($pK_i=5,874$) aumentaram a atividade *in vitro* significativamente, mostrando que esta estratégia mostrou-se adequada para o aumento de atividade frente a este receptor. Os valores de atividade *in vitro* são mostrados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Atividade in vitro frente ao receptor CXCR4 dos compostos 48-50*.

Fragmento	Atividade in vitro em CXCR4 (pKi)
VUF13925 (1)	5,204
VUF14445 (50)	4,944
VUF14463 (48)	5,729
VUF14464 (49)	5,874

4.4.9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O modelo *in silico* validado mostrou-se capaz de prever poses boas de ancoramento molecular e interações para o composto 1t1t (**2**) e outros derivados estruturalmente análogos **3-22**. Porém o modelo do receptor CXCR4 somente foi capaz de prever interações boas para fragmentos que apresentam o grupo amino não-substituído além da subunidade *N*-benzilpiperidina adequadamente funcionalizada.

Todos os fragmentos e micromoléculas foram obtidos em graus de pureza adequado e em quantidade adequada para a realização dos ensaios *in vitro* frente ao receptor CXCR4.

O fragmento VUF13925 (**1**) apresentou o mais elevado valor de atividade *in vitro* dentre os fragmentos avaliados, seguido do fragmento VUF14443 (**24**), *i.e.* pKi = 5,204 e 5,036, respectivamente. Adicionalmente, os compostos VUF14463 (**48**) e VUF14464 (**49**), planejados com base na estratégia de *fragment growth*, mostraram atividade superior a observada para os fragmentos, mostrando que esta abordagem mostrou-se adequada para atingir o objetivo proposto.

Estes resultados podem ser aplicados para propor novos fragmentos e micromoléculas mais ativas frente ao receptor CXCR4, com base no modelo *in silico* validado, assim como com base nos compostos apresentados como resultado deste trabalho, *e.g.* os derivados piridinico **48** e imidazólico **49**.

*Ensaio realizado por Marlies C. A. Vreeker (Vrije Universiteit).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 METODOLOGIAS EMPREGADAS NA REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Os estudos de modelagem molecular foram feitos com a utilização dos seguintes programas, instalados em computadores ou de acesso via internet:

¹Banco de dados de micromoléculas bioativas semelhantes a fármacos (ChEMBLdb): Reino Unido, Cambridge: EBI – Subestação do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (www.ebi.ac.uk/chembl/): Pesquisa de moléculas bioativas para compreensão de requisitos estruturais e obtenção de dados farmacológicos para os estudos *in silico*.

²Programa FINGERPRINT: Usado para pós-processamento dos resultados de ancoramento molecular por meio da técnica de análise da impressão digital da interação ligante-proteína (*protein-ligand interaction fingerprint*).

³GOLD: Realização dos estudos de ancoramento molecular utilizando as funções de score: ASP, ChemScore, ChemPLP e GoldScore.

⁴MOE: Molecular Operating Environment. Chemical Computing Group. Canada, Quebec, Montreal: Programa usado para desenho de estruturas, minimizações de energia, tratamento de estruturas de receptores, análise de interações ligante-receptor, pós-processamento de resultados de docking.

⁵NCBI: National Center for Biotechnology Information. United States, MD: US Biblioteca nacional de medicina (www.ncbi.nih.gov): Pesquisa das sequências primárias com extensão .fasta dos biorreceptores CCR3 e CCR4 e outras informações estruturais.

⁶Protein Data Bank (PDB). RCSB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. Portal de Informação de Estruturas Biológicas Macromoleculares. United States (www.rcsb.org/pdb/home/home.do): Obtenção da estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4.

⁷**PyMol:** Sistema de visualização molecular. SCHRÖDINGER: Programa usado para visualização de interações ligante-receptor e edição de figuras.

⁸**SPARTAN '8.0:** Construção e minimização, conformacional e energética, das estruturas dos antagonistas de receptores de quimiocinas usados nos estudos de docking.

⁹**SWISS MODEL** (swissmodel.expasy.org/workspace/): Usado para identificação dos melhores moldes (*templates*) para construção dos modelos por modelagem molecular comparativa dos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4, assim como para a construção dos respectivos modelos e avaliação da qualidade dos modelos pelo gráfico de Ramachandran.

5.1.1 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4

Os arquivos com extensão .fasta contendo as sequências primárias dos receptores de quimiocinas CCR3 (HuCCR3, 355 resíduos) e CCR4 (HuCCR4, 360 resíduos) humanos foram obtidas do site do NCBI⁵ (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) e carregados no programa *on line* SWISS MODEL⁹ para a busca das estruturas cristalográficas com maior identidade sequencial e percentual de homologia, maior resolução e demais informações estruturais adequadas para a construção dos modelos por homologia dos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4.

A estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina homodimérico CXCR4 (código PDB: 3ODU), co-cristalizado com o antagonista 1t1t (**8**), com resolução de 2,5 Angstrom, foi a mais adequada para a construção dos modelos por homologia: **(a)** O receptor de quimiocina CCR3 apresentam identidade sequencial de 35% (68/191) e percentual de homologia de 58% (111/191) em relação ao receptor de quimiocina CXCR4, **(b)** o receptor de quimiocina CCR4 apresentam identidade sequencial de

38% (79/204) e percentual de homologia de 59% (122/204) em relação ao receptor de quimiocina CXCR4.

Apesar de ambas as cadeias (A e B) do receptor de quimiocina CXCR4 possuírem a mesma sequência primária, o programa SWISS MODEL⁹ foi usado para a construção dos modelos dos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4 por modelagem molecular comparativa e avaliação dos modelos por meio dos gráficos de Ramachandran de ambas as cadeias (A e B) e a cadeia com melhor qualidade estrutural (cadeia B para ambos os casos) foi utilizada para a realização dos estudos *in silico*. O programa MOE⁴ (Molecular Operating Environment) foi utilizado para inspeção visual dos modelos obtidos, os quais não apresentaram erros estruturais que poderiam comprometer os resultados gerados a partir dos modelos.

5.1.2 ORIENTAÇÃO MANUAL DOS ANTAGONISTAS UCB-35625 (**9**) (CCR3) E **52** (CCR4) EM SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES

Os antagonistas UCB-35625 (**9**) (CCR3) e **52** (CCR4) foram construídos com o programa MOE⁴, minimizados por meio de cálculos de mecânica molecular MMFF (do inglês, *Molecular Mechanic Force Field*) e então orientados manualmente dentro dos sítios de ligação dos seus modelos *in silico*. Dados de mutagênese sítio dirigido (SDM, do inglês, *site-directed mutagenesis*) disponíveis para o receptor CCR3 (WISE *et al.*, 2007) foram utilizados para propor as interações ligante-proteína. Apesar de não existirem dados de estudos de mutagênese sítio-dirigido disponíveis para o receptor CCR4, similaridades estruturais entre os receptores de quimiocinas foram utilizados para este fim (ROUMEN *et al.*, 2012). A subunidade cicloeptano do antagonista **9** e a subunidade benzila do composto **52** foram orientadas na região do sítio menor (compreendida pelas hélices I, II, III e VII) para os modelos *in silico* dos receptores CCR3 e CCR4, respectivamente. Em seguida, cálculos de mecânica molecular (MMFF) foram realizados para ambos os complexos (ligante-receptor) por meio do

programa MOE⁴, visando a reorientação dos aminoácidos ao redor de ambos os ligantes. A visualização das interações ligante-receptor potenciais foram feitas com o programa PyMol⁷, de modo a orientar modificações estruturais.

5.1.3 ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM LIGANTES DA LITERATURA PARA VALIDAÇÃO DOS MODELOS OBTIDOS POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4

Para a validação dos modelos obtidos por modelagem molecular comparativa dos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4, foram selecionados 7 ligantes da literatura com atividade *in vitro* para cada um dos receptores de quimiocinas (TING et al., 2005b; BURDI et al., 2007). Em seguida, os ligantes foram construídos, com as subunidades amina terciária protonadas, utilizando o programa SPARTAN '8.0⁸ e minimizados por meio do método de cálculo semiempírico AM1, sendo cada estrutura salva com extensão .mol2 no mesmo diretório das estruturas dos modelos dos receptores CCR3 e CCR4 (extensão .PDB) obtidas de acordo com metodologia descrita na seção 5.1.1.

As configurações para os estudos de ancoramento molecular foram feitas no programa GOLD³ de acordo com os seguintes parâmetros: **(a)** carregamento do arquivo com extensão .PDB do modelo do biorreceptor (CCR3 ou CCR4), **(b)** adição dos átomos de hidrogênio ao receptor segundo os parâmetros do programa GOLD³, **(c)** inspeção visual para verificação das distâncias e ângulos após adição dos átomos de hidrogênio, **(d)** determinação do átomo de referência para o ancoramento molecular, o qual foi determinado previamente através de sobreposição das estruturas dos receptores de quimiocinas CXCR4 (Trp94, W94), CCR3 (Tyr93, W93) e CCR4 (Tyr98, W98), utilizando o programa PyMol⁷ com base na localização do antagonista 1t1t **(8)** co-cristalizado com o receptor CXCR4, **(e)** determinação do raio em relação ao átomo de referência para o ancoramento molecular = 20 angstrom, **(f)**

determinação do número de orientações (poses) para cada molécula submetida aos estudos de ancoramento molecular = 15, **(g)** determinação da função de score utilizada para o ancoramento molecular para cada um dos cálculos: 1º ChemPLP, 2º ASP, 3º ChemScore e 4º GoldScore **(h)** carregamento das moléculas previamente desenhadas, com extensão de arquivo .mol2 (para os ligantes do biorreceptor CCR3 ou CCR4) seguido de início do cálculo.

Os cálculos de ancoramento molecular rígido foram feitos separadamente para o receptor de quimiocina CCR3 e seus ligantes (TING et al., 2005b), assim como para o receptor de quimiocina CCR4 e seus ligantes (BURDI et al., 2007), separadamente, 5 vezes para cada uma das quatro funções de score.

Visando a validação dos modelos obtidos por modelagem molecular comparativa para os receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4, os resultados foram analisados: **(i)** através da média dos 5 valores de score para cada um dos dois receptores e para cada função de score, separadamente, **(ii)** além de análise do desvio padrão dos valores, **(iii)** índice de correlação entre o K_i e o valor de score, **(iv)** orientação da melhor orientação (pose) para cada ligante com o programa PyMol e **(v)** análise dos resíduos com os quais o ligante faz interações com o programa PyMol.

5.1.4 ESTUDOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR COM OS COMPOSTOS PLANEJADOS E OS MODELOS VALIDADOS DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR3 E CCR4

Após validação dos modelos dos receptores de acordo com a seção 5.1.3, os 16 ligantes planejados como antagonistas duais de receptores CCR3 e CCR4 foram construídos, minimização e submetidos ao ancoramento molecular rígido em ambos os modelos *in silico* dos receptores de quimiocinas CCR3 e CCR4 de acordo com metodologia descrita na seção 5.1.3, utilizando a melhor função de score para cada caso, a qual foi detectada durante os estudos de validação dos modelos obtidos.

5.1.5 TRATAMENTO E ANCORAMENTO MOLECULAR DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CXCR4 COM O ANTAGONISTA 1t1t (8) E SEUS ANÁLOGOS

O arquivo com extensão .PDB da estrutura cristalográfica do receptor de quimiocina CXCR4 co-cristalizado com o antagonista 1t1t (8) [código PDB: 3ODU], com resolução de 2,5 Å (WU et al., 2010), foi obtido do Protein Data Bank⁶. Em seguida, o programa MOE⁴ foi usado para a abertura do arquivo .PDB, remoção da lisozima, da cadeia B do homodímero do cristal do receptor CXCR4, remoção do antagonista 1t1t (8) e demais ligantes do cristal. Foram salvas: (a) a estrutura do receptor contendo as moléculas de água de cristalização e (b) outro arquivo totalmente isento das moléculas de água.

O antagonista 1t1t (8) e seus outros 20 análogos estruturais (ANEXO 12 e 13) (THOMA et al., 2008) foram construídos com o programa MOE⁴, na forma carregada (Carga: + 2), seguido de minimização das estruturas por meio de cálculo de mecânica molecular (MMFF). As estruturas foram salvas com extensão .mol2.

Ambos os arquivos .PDB, apresentando ou não moléculas de água de cristalização, foram submetidos aos estudos de ancoramento molecular rígido usando as funções de score GoldScore (Programa GOLD 4.0) e ChemPLP (Programa PLANTS) com os 21 antagonistas previamente construídos. As coordenadas de referência (xyz: 21.255, -7.369, 72.779) usadas nos estudos de ancoramento molecular foram determinadas com base nos resíduos de Asp97 (D2.63), Glu288 (E7.39) e Trp94 (W2.60), os quais apresentam interações relevantes com o antagonista 1t1t (8) na estrutura cristalográfica. O raio utilizado no ancoramento molecular foi fixado em 7 Å de modo a favorecer interações com o sítio maior e o número de poses de ancoramento molecular para cada ligante foi fixado em 15. Adicionalmente, os átomos de hidrogênio foram adicionados a proteína em pH 7.4 e a temperatura foi fixada em 298,15 K.

5.1.6 PÓS-PROCESSAMENTO DOS RESULTADOS DE ANCORAMENTO MOLECULAR DO RECEPTOR CXCR4 COM O ANTAGONISTA 1t1t (8) E SEUS ANÁLOGOS E VALIDAÇÃO DO MODELO

Após o ancoramento molecular, todas as poses geradas foram pós-processadas com a técnica de impressão digital da interação ligante-receptor (PLIF, do inglês, *Protein-Ligand Interaction Fingerprint*) (MARCOU & ROGNAN, 2007). Dessa forma, um arquivo contendo o antagonista 1t1t (8) e todos os resíduos ao redor num raio de 5 Å do receptor CXCR4 foi otimizado previamente por meio de cálculos de densidade eletrônica com o programa COOT (<http://lmb.bioch.ox.ac.uk/coot/>). O arquivo otimizado foi convertido em um arquivo com extensão .IFP, no qual a melhor orientação e interações ligante-proteína foram registradas. Em seguida, as 15 poses de ancoramento molecular obtidas para cada molécula foram ordenadas com base nas orientações (rmsd) e interações-chave em relação ao complexo ligante-proteína do arquivo com extensão .IFP com o programa FINGERPRINT². As poses geradas foram filtradas e analisadas principalmente com base nas interações entre os ligantes e os resíduos Asp97 e Glu288.

As melhores poses obtidas pelo ancoramento molecular são selecionadas pelo programa FINGERPRINT² e geram um valor numérico entre 0,00 e 1,00 (PLIF) com base nas seguintes interações ligante-proteína: (1) hidrofóbica, (2) aromática face-face, (3) aromática face-topo, (4) ligação de hidrogênio (aceptor-doador), (5) ligação de hidrogênio (doador-aceptor), (6) iônica (carga negativa-carga positiva) e (7) iônica (carga positiva-carga negativa). Os valores mais próximos de 1,00 estão associados aos compostos com melhor orientação e interações-chave com o receptor-alvo. Ademais, inspeção visual das poses de ancoramento molecular também foi empregada para seleção da melhor pose de cada ligante, em combinação com o melhor valor de PLIF, orientação e interações feitas por cada molécula ancorada. A validação do melhor modelo *in silico* do receptor CXCR4 (função de score GoldScore ou ChemPLP / com ou sem moléculas de água) envolveu a interpretação desses

dados com base nos valores de atividade *in vitro* para o antagonista 1t1t (**8**) e seus análogos.

5.1.7 CONSTRUÇÃO DOS 190 COMPOSTOS PLANEJADOS COM BASE NO ANTAGONISTA 1t1t (**8**) E NO FRAGMENTO DE PADRÃO ESTRUTURAL PIPERIDÍNICO VUF13925 E TRIAGEM VIRTUAL FRENTE AO MODELO *in silico* DO RECEPTOR CXCR4

Todos os 190 compostos propostos com base no antagonista 1t1t (**8**) e no fragmento de padrão estrutural piperidínico VUF13925 foram construídos por meio da ferramenta combinatória QuaSAR do programa MOE⁴. Dessa forma foi construído o núcleo piperidínico, com as posições ocupadas pelos substituintes nomeadas como A₁, A₂, ... A_n e os conjuntos de substituintes foram construídos em um banco de dados com extensão .mdb tendo suas valências livres nomeadas com A₀. Em seguida, os 190 compostos foram construídos de forma combinatória pelo programa e salvos em um único arquivo com extensão .mdb, minimizados energeticamente por meio de cálculos de mecânica molecular (MMFF) e em seguida convertido para extensão .mol2.

Os 190 compostos construídos foram então submetidos ao ancoramento molecular com o modelo *in silico* do receptor de quimiocina CXCR4 totalmente isento de moléculas de água de cristalização por meio da metodologia mostrada na seção 5.1.5 por meio das funções de score GoldScore e ChemPLP. Em seguida, as poses de docking obtidas foram pós-processadas por meio da técnica de PLIF.

Visto que o fragmento VUF13925 apresenta maior similaridade com os compostos planejados que o antagonista 1t1t (**8**), o fragmento VUF13925 também foi submetido ao processo de ancoramento molecular, a melhor pose obtida foi otimizada e utilizada para a geração do arquivo .IFP para os estudos de impressão

digital da interação ligante-proteína, seguindo os mesmos critérios usados para o antagonista 1t1t (**8**) na seção 5.1.6.

Nesta etapa os resultados do estudo de ancoramento molecular foram pós-processados tanto por meio do antagonista 1t1t (**8**), como por meio do fragmento VUF13925. A função de pontuação (GoldScore ou ChemPLP) e o arquivo com extensão .IFP (1t1t (**8**) ou VUF13925), que geraram valores de PLIF acima de 0,70 para o maior número de compostos propostos foram utilizados para orientar a eleição dos compostos que foram sintetizados.

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS E PRODUTOS FINAIS

As análises cromatográficas em camada fina (CCF) foram realizadas em placas de alumínio revestidas com sílica (Whatman) de 250 μm de espessura. As fases móveis empregadas nas corridas cromatográficas foram metanol ou *n*-hexano/acetato de etila e diclorometano/etanol em diferentes proporções. Após corrida, as placas foram secas sob fluxo de ar e visualizadas por meio de lâmpada de luz ultravioleta (254 e 365 nm). Os pontos de fusão foram determinados em um medidor da marca Quimis Q-340S13 (40 W).

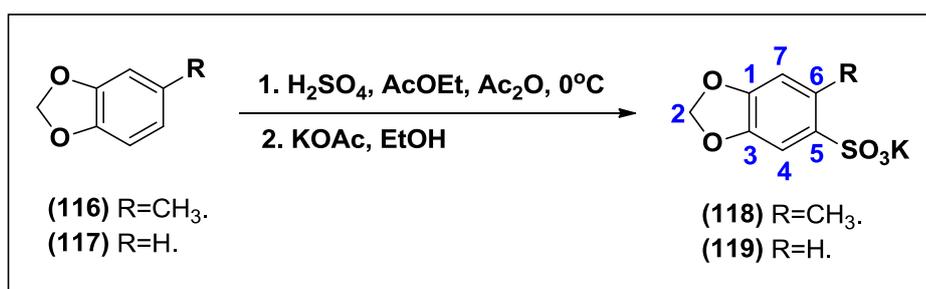
Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio-1 (^1H), carbono-13 (^{13}C) e DEPT-135 foram obtidos em aparelho Bruker DPX-200 (IQ-UFRJ), operando a 200 e 50 MHz, respectivamente.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para os produtos finais foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU Prominence Liquid Chromatograph (LASSBio-UFRJ). As fases móveis empregadas foram 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL , detector de UV, fluxo de 1 mL/min).

Os resultados de espectrometria de massas (HRMS) para os produtos finais foram obtidos em Espectrômetro de Massas de Alta Resolução da marca Bruker com detector do tipo TOF (*time-of-flight*) (IPPN-UFRJ). As amostras foram solubilizadas em acetonitrila (grau CLAE) em frascos de 1,5 mL e as análises foram realizadas com o equipamento configurado para detecção de íons positivos, faixa de razão massa/carga de 50-2000 m/z e fluxo de gás seco de 5,0 L/min.

As análises de dicroísmo circular foram realizadas para os produtos finais quirais LASSBio-1641 (82) e LASSBio-1830 (81) em alíquotas de 50 µL em solução de diclorometano em concentração de 1 µM em equipamento Jasco (J-815) CD Spectro à temperatura de 25°C e faixa de comprimento de onda de 200-500 nm.

5.2.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS 2-METIL-3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (118) E DO 3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (119)

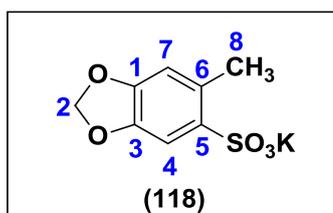


Uma solução contendo 29,41 mmol do 3,4-metilenodioxibenzeno correspondente e 8,4 mL (88 mmol) de anidrido acético em 88 mL de acetato de etila foi resfriada a 0°C em um balão de fundo redondo de 250 mL de capacidade. Em seguida, uma solução contendo 2,4 mL (37,2 mmol) de ácido sulfúrico concentrado (d=1,84 g/mL) em 12 mL de acetato de etila gelado foi então adicionada a primeira,

gota a gota, durante 5 minutos. A mistura reacional foi agitada por 2 horas enquanto aqueceu até a temperatura ambiente.

Em seguida, uma solução contendo 4,32 g (44 mmol) de acetato de potássio em 22,4 mL de etanol a 95% foi adicionada, gota a gota, ao meio reacional que permaneceu sob agitação por mais 30 minutos. O produto foi isolado por filtração em funil de Buchner (FRAGA et al., 1992).

5.2.1.1 2-METIL-3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (118)

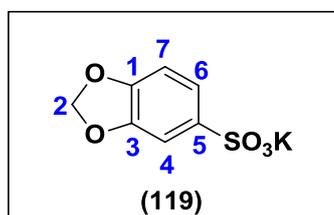


Foram obtidos 7,32 g (98%) do 2-metil-3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (118) como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 192-194°C.

RMN de ^1H a 200 MHz, D_2O (δ -ppm): 7,46 (1H, s, H-4); 6,92 (1H, s, H-7); 6,10 (2H, s, H-2) e 2,63 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, D_2O (δ -ppm): 149,40 (C-1); 144,96 (C-3); 134,23 (C-6); 131,71 (C-5); 111,94 (C-4); 107,65 (C-7); 102,00 (C-2) e 19,62 (C-8).

5.2.1.2 3,4-METILENODIOXIBENZENOSSULFONATO DE POTÁSSIO (119)

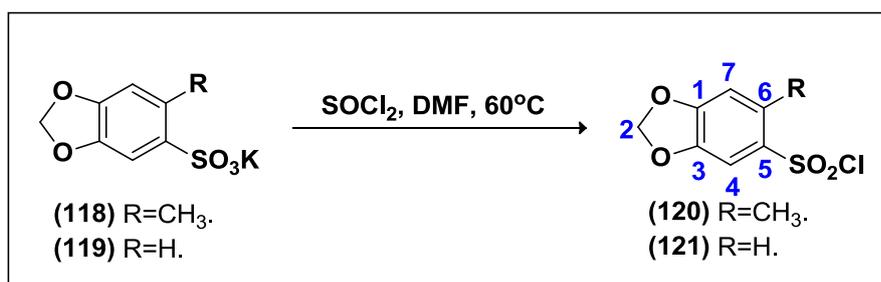


Foram obtidos 6,18 g (87,5%) do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (**119**) como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 231-233°C.

RMN de ^1H a 200 MHz, D_2O (δ -ppm): 7,405 (1H, dd, H-6, $J^3 = 8,42$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,305 (1H, d, H-4, $J^4 = 1,96$ Hz); 6,99 (1H, d, H-7, $J^3 = 8,42$ Hz) e 6,10 (2H, s, H-2).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, D_2O (δ -ppm): 149,63 (C-1); 147,38 (C-3); 136,13 (C-5); 120,35 (C-6); 108,17 (C-4); 105,96 (C-7) e 102,00 (C-2).

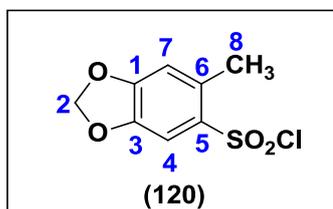
5.2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DOS CLORETOS DE 2-METIL-4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (**120**) E 4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (**121**)



Uma solução contendo 14 mL (22,83 g, 191,7 mmol) de cloreto de tionila e 0,13 mL (0,12 g, 1,64 mmol) de *N,N*-dimetilformamida (DMF) anidra foram rapidamente adicionados a 19,7 mmol do metilenodioxibenzenossulfonato de potássio correspondente previamente pesado em um balão de fundo redondo com 250 mL de capacidade. A mistura resultante foi agitada a 60°C por 3,5 horas. Ao final deste tempo, adicionou-se cuidadosamente quantidade suficiente de gelo picado a mistura, que foi então extraída utilizando-se diclorometano (DCM) (3 x 80 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 80 mL).

Em seguida, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer o cloreto de benzenossulfonila correspondente (FRAGA et al., 1992).

5.2.2.1 CLORETO DE 2-METIL-4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (120)

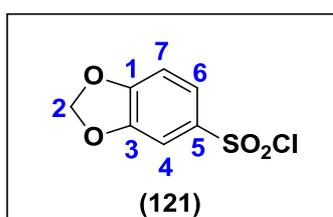


Foram obtidos 3,21 g (69,7%) do cloreto de 2-metil-4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**120**) como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 58-60°C, Rf = 0,70 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 7,21 (1H, s, H-4); 6,71 (1H, s, H-7); 5,95 (2H, s, H-2) e 2,42 (3H, s, H-8).

RMN de ¹³C a 50 MHz, DMSO (δ-ppm): 147,39 (C-1); 144,16 (C-3); 139,44 (C-6); 129,99 (C-5); 110,82 (C-4); 107,49 (C-7); 101,06 (C-2) e 19,93 (C-8).

5.2.2.2 CLORETO DE 4,5-METILENODIOXIBENZENOSSULFONILA (121)

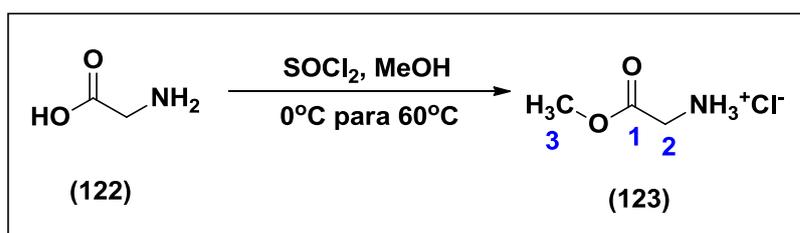


Foram obtidos 2,85 g (65,8%) do cloreto de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**121**) como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 41-43°C, Rf = 0,70 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 7,105 (1H, dd, H-6, J³ = 8,42 e J⁴ = 1,96 Hz); 7,045 (1H, d, H-4, J⁴ = 1,96 Hz); 6,83 (1H, d, H-7, J³ = 8,42 Hz) e 6,01 (2H, s, H-2).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 147,69 (C-1); 146,72 (C-3); 141,89 (C-5); 119,67 (C-6); 117,37 (C-4); 106,34 (C-7) e 101,35 (C-2).

5.2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DO CLORIDRATO DO ÉSTER METÍLICO DA GLICINA (123)

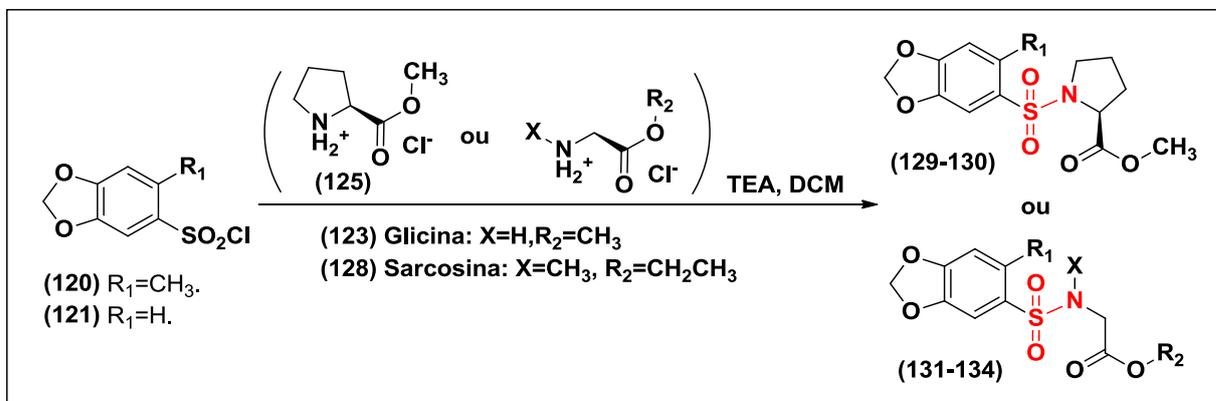


Foram adicionados 3 equivalentes de cloreto de tionila (22 mL, $d = 1,64 \text{ g/cm}^3$) em uma solução contendo 1 equivalente de glicina (P.F. = $238\text{-}240^\circ\text{C}$) (7,5 g) e 10 equivalentes de metanol (41 mL, $d = 0,79 \text{ g/cm}^3$) em um balão de fundo redondo de 500 mL de capacidade em banho de gelo. A solução resultante foi então aquecida até temperatura de refluxo em metanol por cerca de 12 horas. O metanol e o cloreto de tionila em excesso foram então removidos sob pressão reduzida para fornecer o cloridrato do éster metílico da glicina em rendimento quantitativo (11,56 g; 100%) como um sólido amorfo de cor branca e ponto de fusão na faixa de $175\text{-}177^\circ\text{C}$.

RMN de ^1H a 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 8,62 (3H, s, NH_3^+); 3,75 (2H, s, H-2) e 3,71 (3H, s, H-3).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 168,02 (C-1); 52,58 (C-2) e 39,52 (C-3).

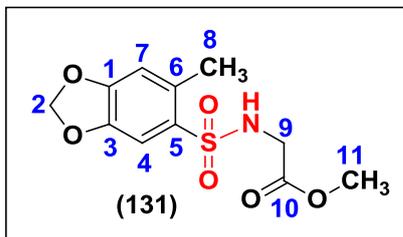
5.2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMIDAS (129-134)



Em um balão de 250 mL de capacidade, contendo 5,54 mmol do cloridrato do éster de aminoácido correspondente (123, 125 e 128) em 0,85 mL de trietilamina, adicionou-se 40 mL de diclorometano e em seguida 5,54 mmol do cloreto de metilenodioxibenzenosulfonamida correspondente (120 e 121). A mistura reacional foi agitada por 2,5 horas à temperatura ambiente, sendo adicionado 1,22 mL de trietilamina (1,1 equivalente) após 1 hora do início da reação.

Ao final da reação, evidenciado por cromatografia em camada fina (CCF), o produto foi isolado após adição de 100 mL de diclorometano e extração com solução de HCl 10% (4 x 40 mL), seguido de extração com solução saturada de NaCl (3 x 80 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, seguido de evaporação do solvente para fornecer produto desejado (129-134) na faixa de rendimento de 58-86% (LIMA et al., 2008).

5.2.4.1 2-(6-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE METILA (131)

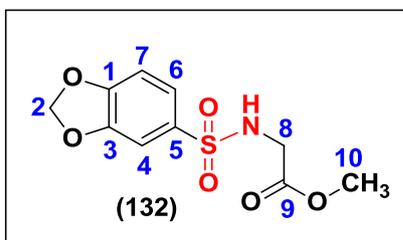


Foram obtidos 1,37 g (86,0%) de 2-(6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (131) como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 72-74°C, Rf = 0,61 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 7,35 (1H, s, H-4); 6,67 (1H, s, H-7); 5,96 (2H, s, H-2); 5,28 (1H, t, NH, J³ = 3,92 Hz); 3,67 (2H, d, H-9, J³ = 3,92 Hz); 3,61 (3H, s, C-11) e 2,51 (3H, s, H-8).

RMN de ¹³C a 50 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 169,61 (C-10); 151,31 (C-1); 145,77 (C-3); 133,59 (C-6); 129,84 (C-5); 112,29 (C-4); 110,09 (C-7); 102,22 (C-2); 52,70 (C-11); 43,93 (C-9) e 20,30 (C-8).

5.2.4.2 2-(BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE METILA (132)

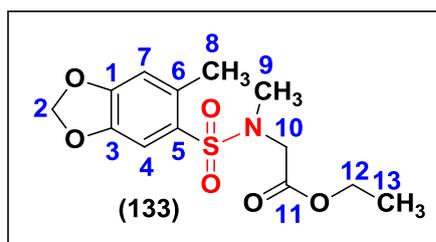


Foram obtidos 932 mg (57,9%) de 2-benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (132) como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 144-146°C, Rf = 0,62 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H a 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 8,06 (1H, t, NH, $J^3 = 5,88$ Hz); 7,325 (1H, dd, H-6, $J^3 = 7,84$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,255 (1H, d, H-4, $J^4 = 1,96$ Hz); 7,055 (1H, d, H-7, $J^3 = 7,84$ Hz); 6,15 (2H, s, H-2); 3,665 (2H, d, H-8, $J^3 = 5,88$ Hz) e 3,55 (3H, s, H-10).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 169,37 (C-9); 150,64 (C-1); 147,71 (C-3); 133,83 (C-5); 122,00 (C-6); 108,06 (C-4); 106,52 (C-7); 102,36 (C-2); 51,77 (C-10) e 43,71 (C-8).

5.2.4.3 2-(*N*,6-DIMETILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE ETILA (133)

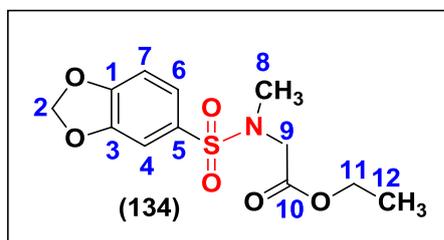


Foram obtidos 1,29 g (77,5%) de 2-(*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (133) como um óleo de cor marrom clara, $R_f = 0,70$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H a 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 7,39 (1H, s, H-4); 6,67 (1H, s, H-7); 5,96 (2H, s, H-2); 4,105 (2H, q, H-12, $J^3 = 5,88$ Hz); 3,93 (2H, s, H-10); 2,82 (3H, s, H-9); 2,46 (3H, s, H-8) e 1,19 (3H, t, H-13, $J^3 = 5,88$ Hz).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 168,82 (C-11); 151,24 (C-1); 145,80 (C-3); 134,22 (C-6); 129,71 (C-5); 112,35 (C-4); 110,51 (C-7); 102,20 (C-2); 61,51 (C-12); 50,40 (C-10); 35,39 (C-9); 20,49 (C-8) e 14,21 (C-13).

5.2.4.4 2-(*N*-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETATO DE ETILA (134)

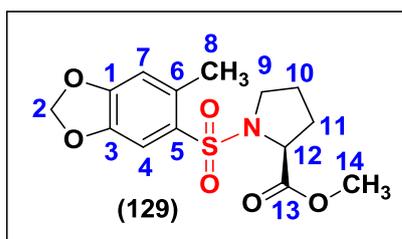


Foram obtidos 1,40 g (82,9%) de 2-(*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (134) como um óleo de cor marrom clara, $R_f = 0,68$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H a 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 7,315 (1H, dd, H-6, $J^3 = 7,84$ e $J^4 = 1,96$ Hz); 7,165 (1H, d, H-4, $J^3 = 1,96$ Hz); 6,82 (1H, d, H-7, $J^3 = 7,84$ Hz); 6,01 (2H, s, H-2); 4,07 (2H, q, H-11, $J^3 = 5,88$ Hz); 3,89 (2H, s, H-9); 2,81 (3H, s, H-8) e 1,17 (3H, t, H-12, $J^3 = 5,88$ Hz).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 172,71 (C-10); 151,59 (C-1); 148,33 (C-3); 131,80 (C-5); 123,31 (C-6); 108,33 (C-4); 107,92 (C-7); 102,40 (C-2); 60,47 (C-11); 52,51 (C-9); 31,04 (C-8) e 24,80 (C-12).

5.2.4.5 (*S*)-1-((6-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA (129)

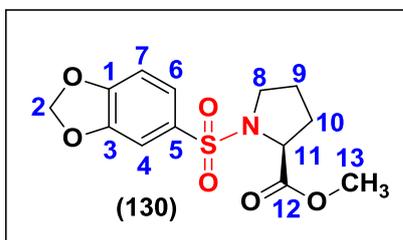


Foram obtidos 1,09 g (60,4%) de (S)-1-((6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonil)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**129**) como um óleo de cor marrom clara, Rf = 0,64 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 7,39 (1H, s, H-4); 6,66 (1H, s, H-7); 5,95 (2H, s, H-2); 4,34 (1H, dd, H-12, J = 3,52 e 8,50 Hz); 3,55 (3H, s, H-14); 3,45-3,25 (2H, m, H-9); 2,50 (3H, s, H-8) e 2,25-1,75 (4H, m, H-10 e H-11).

RMN de ¹³C a 50 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 172,62 (C-13); 151,25 (C-1); 145,75 (C-3); 134,72 (C-6); 130,05 (C-5); 112,12 (C-4); 110,30 (C-7); 102,16 (C-2); 59,79 (C-12); 52,27 (C-14); 48,51 (C-9); 31,29 (C-11); 24,88 (C-10) e 20,45 (C-8).

5.2.4.6 (S)-1-((BENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA (**130**)

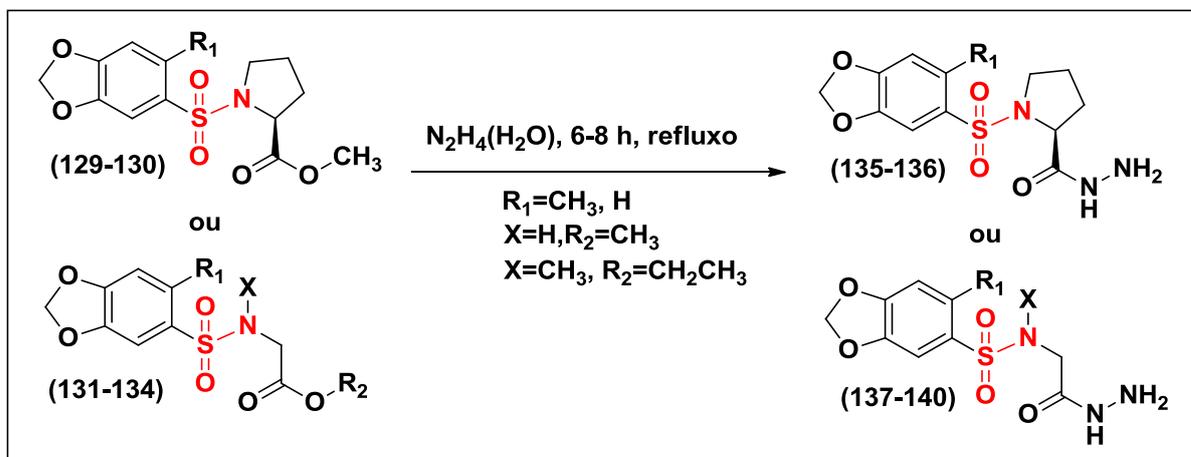


Foram obtidos 1,40 g (75,8%) de (S)-1-((benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonil)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**130**) como um sólido bege, P.F = 83-85°C, Rf = 0,54 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, CDCl₃ (δ-ppm): 7,375 (1H, dd, H-6, J³ = 8,26 e J⁴ = 2,05 Hz); 7,235 (1H, d, H-4, J⁴ = 2,05 Hz); 6,82 (1H, d, H-7, J³ = 8,26 Hz); 6,01 (2H, s, H-2); 4,22 (1H, dd, H-11, J = 8,04 e 5,20 Hz); 3,66 (3H, s, H-13); 3,50-3,10 (2H, m, H-8) e 2,20-1,60 (4H, m, H-9 e H-10).

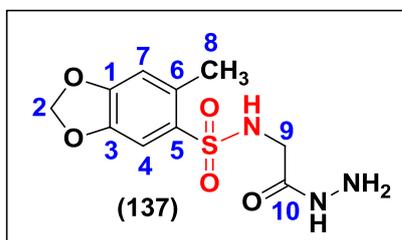
RMN de ^{13}C a 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 172,69 (C-12); 151,59 (C-1); 148,33 (C-3); 131,82 (C-5); 123,30 (C-6); 108,32 (C-4); 107,91 (C-7); 102,40 (C-2); 60,47 (C-11); 52,50 (C-13); 48,52 (C-8); 31,04 (C-10) e 24,79 (C-9).

5.2.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS HIDRAZIDAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMÍDICAS (135-140)



Os ésteres aminoácidos *N*-sulfonilsubstituídos (3,48 mmol) foram adicionados, em pequenas porções, a um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 1,1 mL de hidrato de hidrazina (65%) em 1,8 mL de etanol sob agitação. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo por 6-8 horas. Após isolamento, conforme descrito a seguir para cada produto obtido, as hidrazidas correspondentes foram obtidas com faixa de rendimento entre 36,0 e 90,5% (TIAN et al., 2009).

5.2.5.1 2-(6-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL
HIDRAZIDA (137)

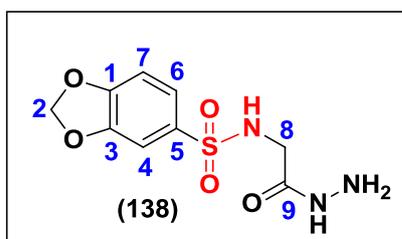


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada, o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min e o precipitado formado foi filtrado em funil de Buchner. Foram obtidos 790 mg (79,0%) de 2-(6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (137) como um sólido amorfo de cor amarelo clara, P.F. = 180-182°C, Rf = 0,10 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO-*d*₆ (δ-ppm): 9,01 (1H, s, C=O-NH); 7,86 (1H, s, SO₂-NH); 7,32 (1H, s, H-4); 6,97 (1H, s, H-7); 6,11 (2H, s, H-2); 3,80 (2H, s, NH-NH₂); 3,42 (2H, s, H-9) e 2,50 (3H, s, C-8).

RMN de ¹³C a 50 MHz, DMSO-*d*₆ (δ-ppm): 167,14 (C-10); 150,32 (C-1); 145,19 (C-3); 132,69 (C-6); 131,25 (C-5); 112,04 (C-4); 108,78 (C-7); 102,19 (C-2); 43,57 (C-9) e 19,80 (C-8).

5.2.5.2 2-BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA (138)



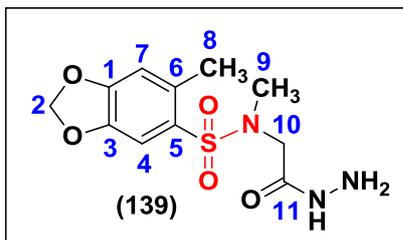
Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada, o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min e o precipitado formado foi

filtrado em funil de Buchner. Foram obtidos 363 mg (36,3%) de 2-benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**138**) como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 126-128°C, R_f = 0,08 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 9,03 (1H, s, C=O-NH); 7,75 (1H, s, SO₂-NH); 7,325 (1H, dd, H-6, J³ = 8,24 e J⁴ = 1,54 Hz); 7,265 (1H, d, H-4, J⁴ = 1,54 Hz); 7,055 (1H, d, H-7, J³ = 8,24 Hz); 6,15 (2H, s, H-2); 4,14 (2H, s, NHNH₂) e 3,34 (2H, s, H-8).

RMN de ¹³C a 50 MHz, DMSO (δ-ppm): 166,83 (C-9); 150,72 (C-1); 147,77 (C-3); 133,54 (C-5); 122,23 (C-6); 108,27 (C-4); 106,73 (C-7); 102,43 (C-2) e 43,95 (C-8).

5.2.5.3 2-(*N*,6-DIMETILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL HIDRAZIDA (**139**)

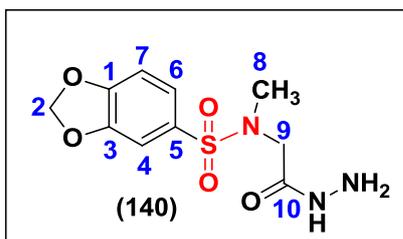


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, mas não houve precipitação. Em seguida o etanol foi evaporado, adicionou-se 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo e o produto foi finalmente extraído em acetato de etila (3x50 mL). Foram obtidos 552 mg (55,3%) de 2-(*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**139**) como um óleo de cor amarela, R_f = 0,12 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 9,13 (1H, s, C=O-NH); 7,35 (1H, s, H-4); 6,69 (1H, s, H-7); 6,12 (2H, s, H-2); 4,25 (2H, s, NHNH₂); 3,73 (2H, s, H-10); 2,77 (3H, s, H-9) e 2,45 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 166,81 (C-11); 150,62 (C-1); 145,43 (C-3); 133,17 (C-6); 129,57 (C-5); 112,22 (C-4); 109,09 (C-7); 102,33 (C-2); 49,83 (C-10); 35,20 (C-9) e 19,96 (C-8).

5.2.5.4 2-(*N*-METILBENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA)ACETIL
HIDRAZIDA (**140**)

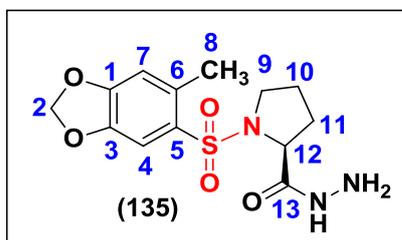


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada, o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min e o precipitado formado foi filtrado em funil de Buchner. Foram obtidos 572,5 mg (57,2%) de 2-(*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**140**) como um sólido de cor branca, P.F. = 156-158°C, Rf = 0,08 *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H a 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 9,15 (1H, s, C=O-NH); 7,34 (1H, s, H-6); 7,29 (1H, s, H-4); 7,105 (1H, d, H-7, $J^3 = 7,90$ Hz); 6,17 (2H, s, H-2); 4,34 (2H, s, NHNH₂); 3,58 (2H, s, H-9) e 2,67 (3H, s, H-8).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, DMSO (δ -ppm): 166,40 (C-10); 151,17 (C-1); 147,98 (C-3); 130,29 (C-5); 123,04 (C-6); 108,44 (C-4); 107,25 (C-7); 102,59 (C-2); 50,94 (C-9) e 35,93 (C-8).

5.2.5.5 (S)-1-((6-METILBENZO[d][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-ACETIL HIDRAZIDA (135)

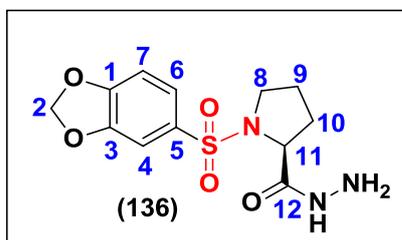


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, mas não houve precipitação. Em seguida o etanol foi evaporado, adicionou-se 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo e o produto foi finalmente extraído em acetato de etila (3x50 mL). Foram obtidos 775 mg (77,5%) de (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonil)pirrolidina-2-acetil hidrazida (135) como um óleo de cor marrom, $R_f = 0,09$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H a 200 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 7,94 (1H, s, C=O-NH); 7,29 (1H, s, H-4); 6,67 (1H, s, H-7); 5,97 (2H, s, H-2); 4,19 (1H, dd, H-12, $J = 2,72$ e $8,20$ Hz); 3,40-3,10 (2H, m, H-9); 2,94 (2H, s, NHNH₂); 2,49 (3H, s, H-8) e 2,25-1,70 (4H, m, H-10 e H-11).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 171,86 (C-13); 151,72 (C-1); 146,29 (C-3); 134,34 (C-6); 127,91 (C-5); 112,45 (C-4); 110,16 (C-7); 102,43 (C-2); 60,98 (C-12); 49,31 (C-9); 30,51 (C-11); 24,77 (C10) e 21,12 (C-8).

5.2.5.6 (S)-1-((BENZO[*d*][1,3]DIOXOL-5-IL)SULFONIL)PIRROLIDINA-2-ACETIL
HIDRAZIDA (136)

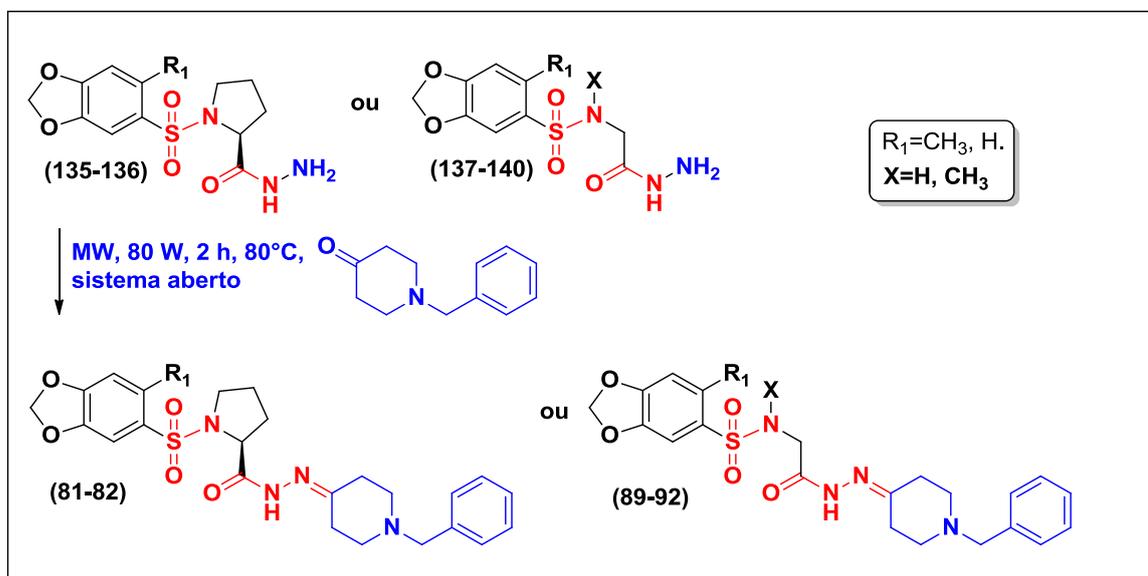


Ao término da reação o pH foi ajustado para 8-9, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, mas não houve precipitação. Em seguida o etanol foi evaporado, adicionou-se 40 mL de solução saturada de cloreto de sódio, o balão foi colocado em banho de gelo e o produto foi finalmente extraído em acetato de etila (3x50 mL). Foram obtidos 905 mg (90,5%) de (S)-1-((benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (**136**) como um óleo de cor marrom clara, $R_f = 0,08$ *n*-hexano/AcOEt (1:9).

RMN de ^1H a 200 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 8,22 (1H, s, C=O-NH); 7,335 (1H, dd, H-6, $J^3 = 8,13$ e $J^4 = 2,03$ Hz); 7,195 (1H, d, H-4, $J^4 = 2,03$ Hz); 6,86 (1H, d, H-7, $J^3 = 8,13$ Hz); 6,04 (2H, s, H-2); 4,20-4,00 (1H, m, H-11); 3,80-3,00 (4H, m, H-8 e NHNH₂) e 2,30-1,50 (4H, m, H-9 e H-10).

RMN de ^{13}C a 50 MHz, CDCl_3 (δ -ppm): 171,63 (C-12); 152,14 (C-1); 148,64 (C-3); 129,04 (C-5); 123,73 (C-6); 108,67 (C-4); 107,99 (C-7); 102,62 (C-2); 61,85 (C-11); 49,85 (C-8); 30,27 (C-10) e 24,48 (C-9).

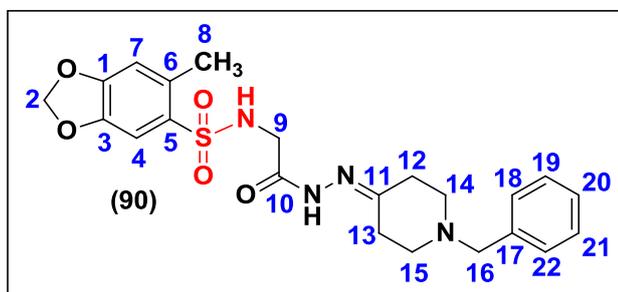
5.2.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS *N*-ACILIDRAZONAS METILENODIOXIBENZENOSSULFONAMÍDICAS (81, 82 89-92)



Em um tubo para reator de micro-ondas de Pyrex equipado com agitador magnético, adicionou-se 1 equivalente das hidrazidas sulfonamídicas correspondentes (135-140) e 02 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (108). Visando homogeneização, foram adicionados cerca de 5 mL de diclorometano ao tubo, agitou-se a mistura reacional por 2 minutos e o solvente foi então evaporado. O tubo foi colocado no reator de micro-ondas científico CEM Discover o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80°C, Tempo = 2 horas e em sistema aberto. O fluxo de ar para resfriamento do sistema foi usado somente para manter a temperatura (80°C) constante durante toda a reação.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, resultando na formação das *N*-acilidrazonas correspondentes (81, 82, 89-92). Em seguida, o produto foi lavado com éter etílico em funil de Büchner e o solvente residual foi removido em bomba de alto vácuo, fornecendo os derivados com faixa de rendimento entre 66 e 86% (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2010).

5.2.6.1 *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1843 (90)



Partindo-se de 500 mg (1,74 mmol) da hidrazida correspondente (137) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (108), foram obtidos 662 mg (82,96%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1843 (90) como um sólido amorfo de cor bege, P.F. = 162-164°C, R_f = 0,67 metanol 100%.

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO (δ-ppm): 10,44 e 10,17 (1H, CONH); 7,90-7,71 (1H, SO₂NH); 7,50-7,10 (6H, m, H-4, H-18, H-19, H-20, H-21 e H-22); 6,93 (1H, s, H-7); 6,07 (2H, s, H-2); 4,00-3,50 (4H, H-16 e H-9) e 2,60-2,00 (11H, m, H-8, H-12, H-13, H-14 e H-15).

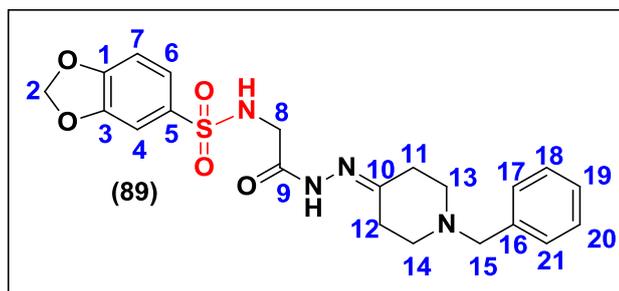
RMN de ¹³C a 50 MHz, DMSO (δ-ppm): 169,49 e 164,22 (C-10, C=O); 158,90 e 153,70 (C-11); 150,13 (C-1); 145,03 (C-3); 138,26 (C-17); 132,64 (C-6); 131,73 (C-5); 128,78 (C-18 e C-22); 128,23 (C-19 e C-21); 127,01 (C-20); 111,96 (C-4); 108,72 (C-7); 102,08 (C-2); 61,26 (C-16); 53,12 (C-14 e C-15); 51,76 e 43,23 (C-9); 34,22 e 26,55 (C-12 e C-13) e 19,76 (C-8, CH₃).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ-ppm): 128,78 (C-18 e C-22); 128,23 (C-19 e C-21); 127,01 (C-20); 111,96 (C-4); 108,72 (C-7); 102,08 (C-2); 61,26 (C-16); 53,12 (C-14 e C-15); 51,76 e 43,23 (C-9); 34,22 e 26,55 (C-12 e C-13) e 19,76 (C-8, CH₃).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,88 min. 99,92% (240 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = C₂₂H₂₆N₄O₅S. Massa Monoisotópica: 458,162391 m/z. [M + H] = 459,169667 m/z; [2M + Na] = 939,314002 m/z. Massas encontradas: 459,1713 e 939,3115 m/z.

5.2.6.2 *N*-(2-(2-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)HIDRAZINIL)-2-OXOETIL) BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-SULFONAMIDA LASSBio-1831 (89)



Partindo-se de 500 mg (1,83 mmol) da hidrazida correspondente (**138**) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (**108**), foram obtidos 696 mg (85,58%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1831 (**89**) como um sólido amorfo de cor amarela, P.F. = 79-81°C, R_f = 0,75 metanol 100%.

RMN de ¹H a 200 MMHz, DMSO (δ-ppm): 10,49 e 10,22 (1H, CONH); 7,69 (1H, s, SO₂NH); 7,50-7,20 (7H, m, H-4, H-6, H-17, H-18, H-19, H-20 e H-21); 7,10-6,90 (1H, m, H-7); 6,13 (2H, s, H-2); 4,20-3,50 (4H, m, H-8 e H-15) e 2,75-2,00 (8H, m, H-11, H-12, H-13 e H-14).

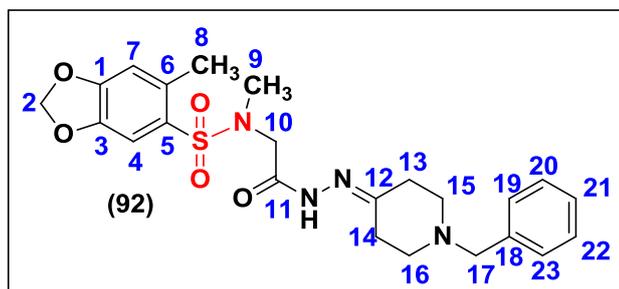
RMN de ¹³C a 50 MMHz, DMSO (δ-ppm): 169,28 e 164,06 (C-9, C=O); 159,07 e 153,88 (C-10); 150,66 (C-1); 147,71 (C-3); 138,27 (C-16); 133,96 (C-5); 128,80 (C-17 e C-21); 128,26 (C-18 e C-20); 127,04 (C-19); 122,21 (C-6); 108,07 (C-4); 106,76 (C-7); 102,40 (C-2); 61,28 (C-15); 53,14 e 52,28 (C-13 e C-14); 44,56 e 40,68 (C-8) e 34,24 e 27,32 (C-11 e C-12).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,80 (C-17 e C-21); 128,26 (C-18 e C-20); 127,04 (C-19); 122,21 (C-6); 108,07 (C-4); 106,76 (C-7); 102,40 (C-2); 61,28 (C-15); 53,14 e 52,28 (C-13 e C-14); 44,56 e 40,68 (C-8) e 34,24 e 27,32 (C-11 e C-12).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 4,585 min. 98,11% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{21}H_{24}N_4O_5S$. Massa Monoisotópica: 444,146741 m/z. $[M + Na] = 467,135962$ m/z; $[2M + Na] = 911,282702$ m/z. Massas encontradas: 467,1375 e 911,2820 m/z.

5.2.6.3 *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1642 (92)



Partindo-se de 300 mg (0,99 mmol) da hidrazida correspondente (**139**) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (**108**), foram obtidos 376 mg (79,92%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1642 (**92**) como um sólido amorfo de cor branca, P.F. = 84-86°C, R_f = 0,57 metanol 100%.

RMN de ¹H a 200 MHz, DMSO (δ -ppm): 10,56 e 10,34 (1H, CONH); 7,50-7,25 (6H, m, H-4, H-19, H-20, H-21, H-22 e H-23); 7,03 (1H, s, H-7); 6,16 (2H, s, H-2); 4,34 e 3,97 (2H, H-17); 3,57 (2H, s, H-10); 2,89 e 2,86 (3H, H-9) e 2,75-2,25 (11H, m, H-8, H-13, H-14, H-15 e H-16).

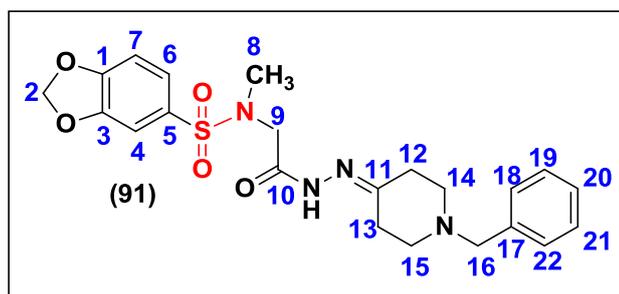
RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 169,21 e 163,99 (C-11, C=O); 158,81 e 153,55 (C-12); 150,40 (C-1); 145,30 (C-3); 138,24 (C-18); 132,86 (C-6); 130,48 (C-5); 128,72 (C-19 e C-23); 128,19 (C-20 e C-22); 126,97 (C-21); 112,17 (C-4); 108,81 (C-7); 102,22 (C-2); 61,21 (C-17); 53,09 (C-15 e C-16); 51,78 e 49,83 (C-10); 35,28 (C-9); 34,22 e 26,51 (C-13 E C-14) e 19,79 (C-8, CH_3).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,72 (C-19 e C-23); 128,19 (C-20 e C-22); 126,97 (C-21); 112,17 (C-4); 108,81 (C-7); 102,22 (C-2); 61,21 (C-17); 53,09 (C-15 e C-16); 51,78 e 49,83 (C-10); 35,28 (C-9); 34,22 e 26,51 (C-13 E C-14) e 19,79 (C-8, CH_3).

[CLAE] Tempo de retenção (t_r) = 6,931 min. 96,25% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$. Massa Monoisotópica: 472,178041 m/z. $[\text{M} + \text{H}] = 473,185317$ m/z; $[2\text{M} + \text{Na}] = 967,345303$ m/z. Massas encontradas: 473,1873 e 967,3443 m/z.

5.2.6.4 *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1765 (91)



Partindo-se de 300 mg (1,04 mmol) da hidrazida correspondente (**140**) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (**108**), foram obtidos 396 mg (82,70%) de *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-

sulfonamida **LASSBio-1765 (91)** como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 141-143°C, Rf = 0,79 metanol 100%.

RMN de ^1H a 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 10,50 e 10,32 (1H, CONH); 7,50-7,00 (8H, m, H-4, H-6, H-7, H-18, H-19, H-20, H-21 e H-22); 6,16 (2H, s, H-2); 4,19 e 3,79 (2H, H-16); 3,60 (2H, H-9); 2,79 e 2,72 (3H, H-8) e 2,60-2,20 (8H, m, H-12, H-13, H-14 e H-15).

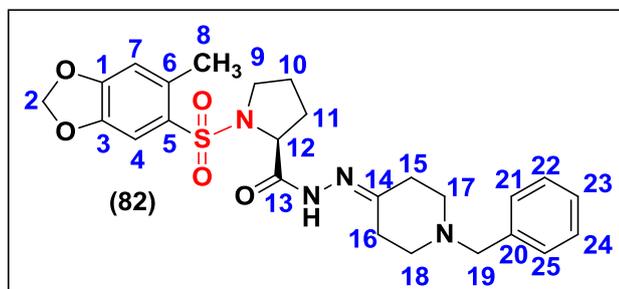
RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 169,12 e 163,81 (C-10, C=O); 159,32 e 153,67 (C-11); 151,18 (C-1); 147,94 (C-3); 138,29 (C-17); 131,89 (C-5); 128,89 (C-18 e C-22); 128,32 (C-19 e C-21); 127,11 (C-20); 123,03 (C-6); 108,42 (C-4); 107,10 (C-7); 102,57 (C-2); 61,34 (C-16); 53,20 (C-14 e C-15); 51,89 e 50,52 (C-9); 35,85 (C-8) e 34,22 e 26,59 (C-12 e C-13).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,89 (C-18 e C-22); 128,32 (C-19 e C-21); 127,11 (C-20); 123,03 (C-6); 108,42 (C-4); 107,10 (C-7); 102,57 (C-2); 61,34 (C-16); 53,20 (C-14 e C-15); 51,89 e 50,52 (C-9); 35,85 (C-8) e 34,22 e 26,59 (C-12 e C-13).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,504 min. 98,69% (248 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$. Massa Monoisotópica: 458,162391 m/z. $[\text{M} + \text{H}] = 459,169667$ m/z; $[2\text{M} + \text{H}] = 917,332058$ m/z. Massas encontradas: 459,1710 e 917,3290 m/z.

5.2.6.5 (S)-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)-1-((6-METILBENZO[d][1,3]DIOXOL-5-ILSULFONIL)-PIRROLIDINO-2-CARBOIDRAZIDA LASSBio-1641 (82)



Partindo-se de 500 mg (1,52 mmol) da hidrazida correspondente (135) e 2 equivalentes da N-benzilpiperidona (108), foram obtidos 581 mg (65,66%) de (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-((6-metilbenzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil)-pirrolidino-2-carboidrazida LASSBio-1641 (82) como um sólido amorfo de cor marrom, P.F. = 50-52°C, Rf = 0,61 metanol 100%.

RMN de ^1H a 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 10,36 e 10,28 (1H, CONH); 7,50-7,10 (6H, m, H-4, H-20, H-21, H-22, H-23 e H-24); 6,98 (1H, s, H-7); 6,11 (2H, s, H-2); 5,25-4,25 (1H, m, H-12); 3,62 e 3,55 (2H, H-19); 3,50-3,20 (2H, m, H-9); 2,75-2,25 (11H, m, H-8, H-15, H-16, H-17 e H-18) e 2025-1,65 (4H, m, H-10 e H-11).

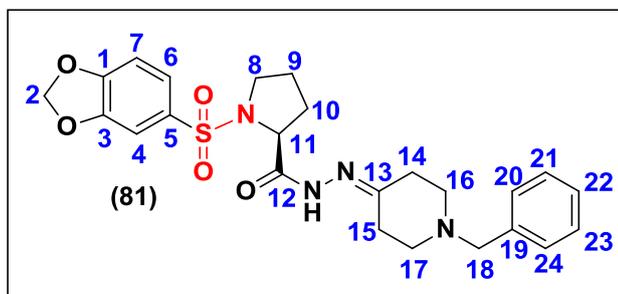
RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 172,73 e 167,55 (C-13, C=O); 160,10 (C-14); 150,29 (C-1); 145,41 (C-3); 138,20 (C-20); 133,76 (C-6); 129,68 (C-5); 128,88 (C-21 e C-25); 128,29 (C-22 e C-24); 127,09 (C-23); 112,13 (C-4); 109,07 (C-7); 102,32 (C-2); 61,30 (C-19); 60,72 e 59,24 (C-12); 52,30 (C-17 e C-18); 51,85 e 48,56 (C-9); 40,67 (C-15 e C-16); 34,17 e 31,34 (C-11); 27,45 e 24,64 (C-10) e 20,02 (C-8, CH₃).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,88 (C-21 e C-25); 128,30 (C-22 e C-24); 127,10 (C-23); 112,14 (C-4); 109,08 (C-7); 102,32 (C-2); 61,31 (C-19); 60,72 e 59,23 (C-12); 52,30 (C-17 e C-18); 51,83 e 48,54 (C-9); 40,67 (C-15 e C-16); 34,17 e 31,34 (C-11); 27,46 e 24,65 (C-10) e 20,02 (C-8).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 6,353 min. 98,20% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{25}H_{30}N_4O_5S$. Massa Monoisotópica: 498,193691 m/z. $[M + H] = 499,200967$ m/z; $[2M + H] = 997,394658$ m/z. Massas encontradas: 499,2034 e 997,3936 m/z.

5.2.6.6 (S)-1-BENZO[d][1,3]DIOXOL-5-ILSULFONIL-*N'*-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)PIRROLIDINO-2-CARBOIDRAZIDA LASSBio-1830 (81)



Partindo-se de 500 mg (1,59 mmol) da hidrazida correspondente (**136**) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (**108**), foram obtidos 607 mg (78,85%) de (S)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil-*N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)pirrolidino-2-carboidrazida LASSBio-1830 (**81**) como um óleo viscoso de cor laranja, $R_f = 0,75$ metanol 100%.

RMN de 1H a 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 10,45 e 10,32 (1H, CONH); 7,50-7,00 (8H, m, H-4, H-6, H-7, H-20, H-21, H-22, H-23 e H-24); 6,17 (2H, s, H-2); 5,00-4,00 (1H, m, H-11); 3,59 e 3,54 (2H, H-18); 3,50-3,00 (2H, m, H-8); 2,75-2,25 (8H, m, H-14, H-15, H-16 e H-17) e 2,00-1,25 (4H, m, H-9 e H-10).

RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 172,79 e 167,57 (C-12, C=O); 160,35 (C-13); 151,35 (C-1); 148,11 (C-3); 138,15 (C-19); 130,36 (C-5); 128,93 (C-20 e C-24); 128,32 (C-21 e C-23); 127,14 (C-22); 123,26 (C-6); 108,49 (C-4); 107,33 (C-7); 102,66 (C-2); 61,31 (C-

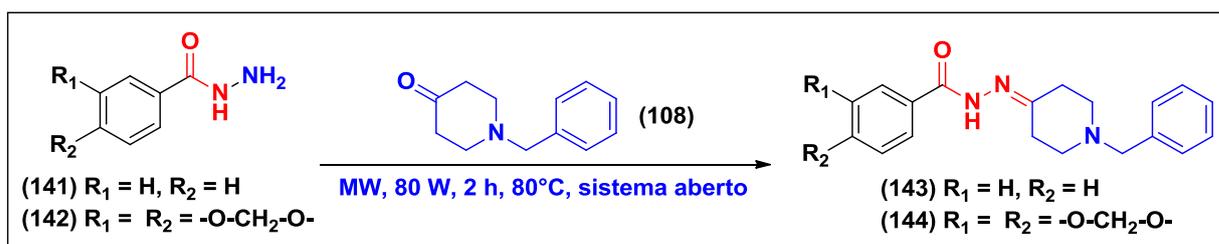
18); 60,74 e 60,07 (C-11); 52,31 (C-16 e C-17); 51,90 e 49,10 (C-8); 40,67 (C-14 e C-15); 34,18 e 30,83 (C-10) e 27,48 e 24,50 (C-9).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 128,93 (C-20 e C-24); 128,32 (C-21 e C-23); 127,13 (C-22); 123,25 (C-6); 108,49 (C-4); 107,31 (C-7); 102,66 (C-2); 61,30 (C-18); 60,73 e 60,05 (C-11); 52,30 (C-16 e C-17); 51,89 e 49,09 (C-8); 40,67 (C-14 e C-15); 34,17 e 30,83 (C-10) e 27,48 e 24,49 (C-9).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,494 min. 98,80% (248 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μ L).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $C_{24}H_{28}N_4O_5S$. Massa Monoisotópica: 484,178041 m/z. $[M + Na] = 507,167262$ m/z; $[2M + Na] = 991,345303$ m/z. Massas encontradas: 507,1665 e 991,3392 m/z.

5.2.7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GERAL PARA PREPARAÇÃO DAS N-ACILIDRAZONAS MOLECULARMENTE SIMPLIFICADAS LASSBio-1842 (143) e 144



Em um tubo para reator de micro-ondas de Pyrex equipado com agitador magnético, adicionou-se 1 equivalente das hidrazidas correspondentes (141 e 142) e 02 equivalentes da N-benzilpiperidona (108). Visando homogeneização, foram adicionados cerca de 5 mL de diclorometano ao tubo, agitou-se a mistura reacional por 2 minutos e o solvente foi então evaporado. O tubo foi colocado no reator de

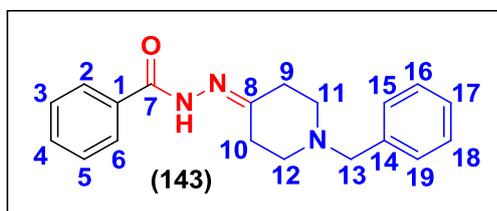
micro-ondas científico CEM Discover o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80°C, Tempo = 2 horas e em sistema aberto. O fluxo de ar para resfriamento do sistema foi usado somente para manter a temperatura (80°C) constante durante toda a reação.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, resultando na formação das *N*-acilidrazonas correspondentes (**143** e **144**), as quais foram obtidas em grau de pureza adequado após lavagem com éter etílico em funil de Büchner e remoção do solvente residual em bomba de alto vácuo (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2010).

Obs 1.: benzohidrazida (**141**): Intermediário obtido pela esterificação do ácido benzoico (em metanol, sob refluxo e HCl catalítico) por 5 horas, seguido de elevação do pH de 3 para 7 com bicarbonato de sódio e extração com acetato de etila. Em seguida, o benzoato de metila foi submetido à hidrazinólise em EtOH/H₂O, por 6-8 horas sob refluxo, seguido de resfriamento e lavagem do precipitado.

Obs 2.: benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carboidrazida (**142**): Intermediário obtido de outros projetos desenvolvidos LASSBio, usado para teste do acoplamento frente a *N*-benzilpiperidona.

5.2.7.1 *N'*-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO)BENZOIDRAZIDA LASSBio-1842 (143)



Partindo-se de 700 mg (5,14 mmol) da benzoidrazida (**141**) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (**108**), a *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzoidrazida LASSBio-1842 (**143**) foi obtida em rendimento quantitativo (1,58 g, 100%) como um sólido amorfo de cor laranja, P.F. = 142-144°C, R_f = 0,64 metanol 100%.

RMN de ^1H a 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 9,05 (1H, CONH); 7,70 (2H, d, H-2 e H-6, $J^3 = 6,94$ Hz); 7,50-7,00 (8H, m, H-3, H-4, H-5, H-15, H-16, H-17, H-18 e H-19); 3,50 (2H, s, H-13) e 2,75-2,25 (8H, m, H-9, H-10, H-11 e H-12).

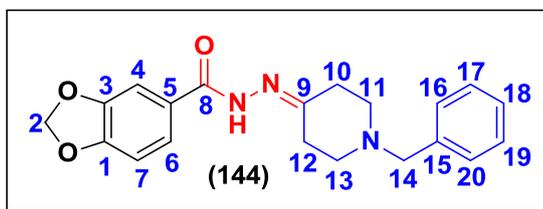
RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 164,36 e 160,65 (C-7, C=O); 138,09 (C-1 e C-8); 133,65 (C-14); 131,73 (C-2 e C-6); 129,00 (C-15 e C-19); 128,61 (C-3 e C-5); 128,36 (C-16 e C-18); 127,34 (C-4); 127,27 (C-17); 62,36 e 61,97 (C-13); 52,91 e 52,12 (C-11 e C-12) e 41,30 e 34,77 (C-9 e C-10).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 131,75 (C-2 e C-6); 129,02 (C-15 e C-19); 128,63 (C-3 e C-5); 128,38 (C-16 e C-18); 127,36 (C-4); 127,29 (C-17); 62,38 e 61,99 (C-13); 52,93 e 52,14 (C-11 e C-12) e 41,32 e 34,79 (C-9 e C-10).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,065 min. 96,74% (256 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$. Massa Monoisotópica: 307,168462 m/z. $[\text{M} + \text{Na}] = 330,157683$ m/z; $[2\text{M} + \text{Na}] = 637,326146$ m/z. Massas encontradas: 330,1588 e 637,3271 m/z.

5.2.7.2 *N'*-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENO_BENZO[*d*][1,3]DIOXOLA-5-CARBOIDRAZIDA (144)



Partindo-se de 150 mg (0,83 mmol) da benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carbohidrazida (142) e 2 equivalentes da *N*-benzilpiperidona (108), a *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carbohidrazida (144) foi obtida em rendimento de 79%

(292 mg) como um sólido amorfo de cor beje, P.F. = 118-120°C, R_f = 0,64 metanol 100%.

RMN de ¹H a 200 MMHz, DMSO (δ-ppm): 8,86 (1H, s, CONH); 7,50-7,20 (7H, m, H-4, H-6, H-16, H-17, H-18, H-19 e H-20); 6,81 (1H, d, H-7, J³ = 8,59 Hz); 6,00 (2H, s, H-2); 3,56 (2H, s, H-14) e 2,75-2,25 (8H, m, H-10, H-11, H-12 e H-13).

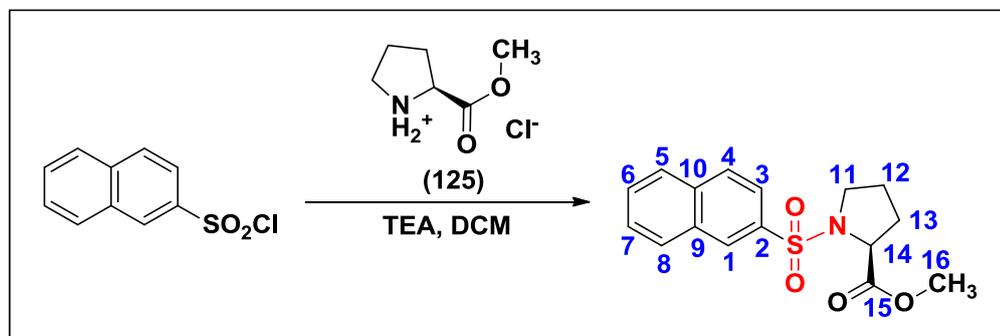
RMN de ¹³C a 50 MMHz, DMSO (δ-ppm): 168,06 (C-8, C=O); 150,69 (C-1); 148,01 (C-3); 138,15 (C-9); 129,07 (C-16 e C-20); 128,43 (C-17 e C-19); 127,66 (C-5); 127,34 (C-18); 121,72 (C-6); 108,14 (C-4 e C-7); 101,81 (C-2); 62,44 (C-14); 53,01 e 52,16 (C-11 e C-13) e 41,38 e 34,84 (C-10 e C-12).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ-ppm): 129,06 (C-16 e C-20); 128,42 (C-17 e C-19); 127,33 (C-18); 121,71 (C-6); 108,13 (C-4 e C-7); 101,80 (C-2); 62,43 (C-14); 53,00 e 52,15 (C-11 e C-13) e 41,37 e 34,83 (C-10 e C-12).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 5,063 min. 98,80% (269 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 µL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = C₂₀H₂₁N₃O₃. Massa Monoisotópica: 351,158292 m/z. [M + Na] = 374,147513 m/z; [2M + Na] = 725,305804 m/z. Massas encontradas: 374,1489 e 725,3062 m/z.

5.2.8 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DO (S)-1-NAFTALEN-2-ILSULFONIL_PIRROLIDINA-2-CARBOXILATO DE METILA



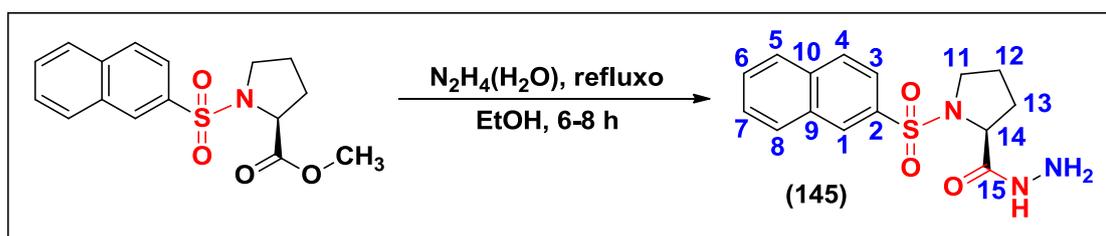
Em um balão de 250 mL de capacidade, contendo 415 mg (2,50 mmol) do cloridrato do éster metílico do aminoácido *S*-prolina (**125**) em 0,46 mL de trietilamina, adicionou-se 23 mL de diclorometano e em seguida 567 mg (2,50 mmol) do cloreto de naftaleno-2-sulfonila. A mistura reacional foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente, sendo adicionados mais 0,69 mL de trietilamina após uma hora do início da reação.

Ao final da reação, evidenciado por cromatografia em camada fina (CCF), o produto foi isolado após adição de 100 mL de diclorometano e extração com solução de HCl 10% (4 x 40 mL), seguido de extração com solução saturada de NaCl (3 x 80 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, seguido de evaporação do solvente para fornecer o (*S*)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila em rendimento quantitativo (798 mg, 100%) como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F.= 81-83°C, R_f = 0,69 *n*-hexano/AcOEt (1:9) (LIMA et al., 2008).

RMN de ¹H a 200 MMHz, DMSO (δ-ppm): 8,36 (1H, s, H-1); 8,00-7,70 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-8); 7,65-7,45 (2H, m, H-6 e H-7); 4,33 (1H, t, H-14, J³ = 7,66 Hz); 3,61 (3H, s, H-16); 3,55-3,20 (2H, m, H-11) e 2,10-1,50 (4H, m, H-12 e H-13).

RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 172,66 (C-15); 135,47 (C-10); 135,03 (C-2); 132,29 (C-9); 129,42 (C-5); 128,90 (C-7); 128,02 (C-4 e C-8); 127,63 (C-6); 122,90 (C-1 e C-3); 60,57 (C-14); 52,49 (C-16); 48,61 (C-11); 31,04 (C-13) e 24,78 (C-12).

5.2.9 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DA (S)-1-(NAFTALEN-2-ILSULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOIDRAZIDA (**145**)

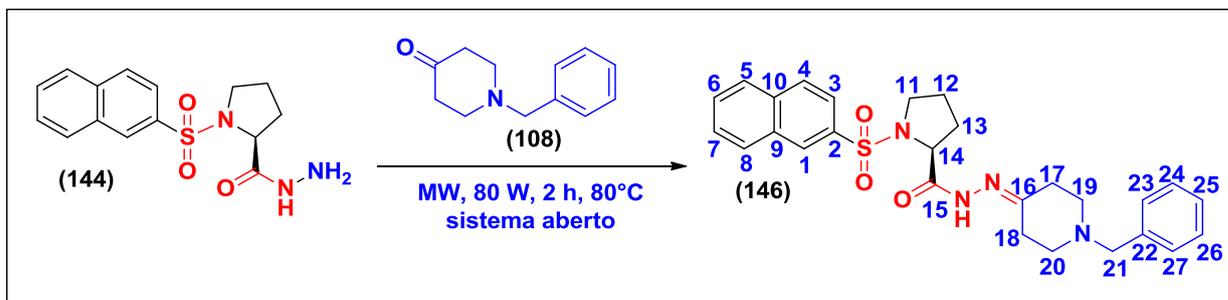


O (S)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila (800 mg, 3,50 mmol) foi adicionado, em pequenas porções, a um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 5 mL de hidrato de hidrazina (65%) em 15 mL de etanol sob agitação. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo por 6-8 horas. Ao término da reação, adicionou-se 40 mL de água gelada e o balão foi colocado em banho de gelo por 30 min, o que resultou na precipitação da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carbohidrazina (**145**) em 37,50% (300 mg) de rendimento como um sólido amorfo de cor marrom clara, P.F. = 145-147°C, R_f = 0,23 *n*-hexano/AcOEt (1:9) (TIAN et al., 2009).

RMN de ^1H a 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 8,36 (1H, s, H-1); 8,80-8,10 (1H, s, CONH); 8,00-7,70 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-8); 7,70-7,50 (2H, m, H-6 e H-7); 4,205 (1H, dd, H-14, J^3 = 8,41 e J^4 = 3,15 Hz); 4,00-3,00 (2H, s, NHNH₂); 3,75-3,00 (2H, m, H-11); 2,25-1,25 (3H, m, H-12 e H-13).

RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 171,72 (C-15); 135,29 (C-10); 132,95 (C-2); 132,34 (C-9); 129,90 (C-5); 129,65 (C-7); 129,54 (C-4); 129,38 (C-8); 128,13 (C-6); 128,03 (C-3); 122,86 (C-1); 62,01 (C-14); 49,99 (C-11); 30,32 (C-13) e 24,56 (C-12).

5.2.10 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA PREPARAÇÃO DA
(S)-N'-(1-BENZILPIPERIDIN-4-ILIDENE)-1-(NAFTALEN-2-
ILSULFONIL)PIRROLIDINA-2-CARBOIDRAZIDA LASSBio-1844 (146)



Em um tubo para reator de micro-ondas de Pyrex equipado com agitador magnético, adicionou-se 300 mg (0,94 mmol) da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazina (**145**) e 02 equivalentes da N-benzilpiperidona (**108**). Visando homogeneização, foram adicionados cerca de 5 mL de diclorometano ao tudo, agitou-se a mistura reacional por 2 minutos e o solvente foi então evaporado. O tubo foi colocado no reator de micro-ondas científico CEM Discover, o qual foi programado com os seguintes parâmetros: Potência = 80 W, Temperatura = 80°C, Tempo = 2 horas e em sistema aberto. O fluxo de ar para resfriamento do sistema foi usado somente para manter a temperatura constante (80°C) durante toda a reação.

Ao término da reação, o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, resultando na formação da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida LASSBio-1844 (**146**). Em seguida, o produto foi lavado com éter etílico em funil de Büchner e o solvente residual foi removido em bomba de alto vácuo, fornecendo LASSBio-1844 (**146**) em 77,15% (414 mg) de rendimento como um óleo viscoso de cor marrom clara, R_f = 0,64 metanol 100% (NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2010).

RMN de ^1H a 200 MMHz, DMSO (δ -ppm): 10,46 e 10,33 (1H, CONH); 8,51 e 8,46 (1H, H-1); 8,30-7,80 (4H, m, H-3, H-4, H-5 e H-8); 7,33 (5H, m, H-23, H-24, H-25, H-26 e H-27); 5,075 e 4,375 (1H, m, H-14); 3,60 e 3,54 (2H, H-21); 3,70-3,30 (2H, m, H-11); 2,75-2,25 (8H, m, H-17, H-18, H-19 e H-20) e 2,00-1,30 (4H, m, H-12 e H-13).

RMN de ^{13}C a 50 MMHz, DMSO (δ -ppm): 172,55 e 167,27 (C-15, C=O); 160,41 (C-16); 138,17 (C-22); 134,45 (C-10); 131,75 (C-2); 129,43 (C-9); 129,37 (C-5); 128,97 (C-7); 128,78 (C-4); 128,71 (C-8); 128,20 (C-23 e C-27); 127,84 (C-24 e C-26); 127,84 (C-6); 127,63 (C-3); 127,00 (C-25); 122,68 (C-1); 61,22 (C-21); 60,64 e 60,09 (C-14); 53,01 e 52,22 (C-19 e C-20); 51,82 e 49,07 (C-11); 40,61 (C-17 e C-18); 34,13 e 30,80 (C-13); 27,45 e 24,34 (C-12).

RMN de DEPT-135, DMSO (δ -ppm): 129,37 (C-5); 128,97 (C-7); 128,78 (C-4); 128,71 (C-8); 128,20 (C-23 e C-27); 127,84 (C-24 e C-26); 127,84 (C-6); 127,63 (C-3); 127,00 (C-25); 122,68 (C-1); 61,22 (C-21); 60,64 e 60,09 (C-14); 53,01 e 52,22 (C-19 e C-20); 51,82 e 49,07 (C-11); 40,61 (C-17 e C-18); 34,13 e 30,80 (C-13); 27,45 e 24,34 (C-12).

[CLAE] Tempo de retenção (t_R) = 8,936 min. 97,89% (254 nm) em 60% de acetonitrila e 40% de água (volume de injeção: 20 μL).

[Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)] Fórmula molecular proposta = $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$. Massa Monoisotópica: 490,203862 m/z. $[\text{M} + \text{H}] = 491,211138$ m/z; $[\text{M} + \text{Na}] = 513,193083$ m/z; $[2\text{M} + \text{H}] = 981,5000$ m/z; $[2\text{M} + \text{Na}] = 1003,396944$ m/z. Massas encontradas: 491,2134; 513,1955; 981,4123 e 1003,3939 m/z.

5.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE DOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS

5.3.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INTI-INFLAMATÓRIO DOS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS LASSBio-1641 (**82**) E LASSBio-1642 (**92**)

Os derivados LASSBio-1641 (**82**) e LASSBio-1642 (**92**) foram avaliados quanto aos seus respectivos efeitos no tratamento sobre o infiltrado de leucócitos nas vias aéreas de camundongos provocados com lipopolissacarídeo (LPS) por instilação intranasal. Avaliou-se também a repercussão desses tratamentos sobre a resposta de hiperreatividade brônquica, que está fortemente associada ao infiltrado inflamatório pulmonar.

Foram utilizados camundongos fêmeas da cepa A/J, pesando entre 17 e 19 g, obtidos da unidade de criação da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram alojados nas caixas em grupos de 5 com suprimento de água e comida, sem restrições, em ambiente com temperatura controlada entre 22 e 25°C e 12h (06:00 – 18:00) de luz. Os procedimentos que envolvem o cuidado e uso de animais de laboratório foram previamente examinados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz.

Foram feitos gráficos no programa GraphPad Prism 5.0. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores de *P* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

5.3.1.1 INFLAMAÇÃO PULMONAR POR LPS E TRATAMENTOS

Os animais foram anestesiados com halotano (aerossol) para a provocação por instilação nasal com LPS (25 µg/25 µL) ou solução salina (controle negativo), sendo as análises realizadas 18 h depois. Os compostos LASSBio-1641 (**82**) e LASSBio-1642 (**92**) foram dissolvidos em solução de NaCl 0.9% (salina) contendo 0,2% de Tween 80

imediatamente antes do uso. O tratamento foi feito por via intraperitoneal (*i.p.*) 1 hora antes de desafio com LPS.

5.3.1.2 AVALIAÇÃO DA HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS

A reatividade à metacolina aerossolizada foi medida utilizando-se pletismografia barométrica de corpo inteiro, pelo método invasivo de monitoramento da função pulmonar. Os animais foram anestesiados com nembutal (60 mg/Kg, *i.p.*) curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon, 1 mg/ kg), e em seguida foram traqueostomizados e ventilados mecanicamente. O pneumotacógrafo acoplado à câmara pletismográfica capturou o fluxo respiratório e o transdutor ligado à câmara permitiu que os dados coletados do fluxo fossem transferidos para o computador. O software BioSystem XA processou os dados determinando parâmetros como resistência e elastância. Para analisar o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas, os animais foram submetidos sequencialmente aos aerossóis de PBS e concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), em intervalos de 5 minutos (HOYMANN, 2007).

5.3.1.3 LAVAGEM BRONCOALVEOLAR (BAL) E CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS

Após serem submetidos às medidas de hiper-reatividade, os camundongos foram sacrificados para a realização da lavagem broncoalveolar (BAL). O procedimento consiste na injeção nas vias aéreas de um volume de 800 µL de PBS, contendo EDTA (10 mM), através da traqueia, seguido da aspiração do mesmo. O volume de 2 lavagens foi centrifugado (1500 RPM / 10 min), sendo o sedimento celular ressuspendido em um volume final de 250 µl de PBS contendo EDTA (10 mM).

Foi realizada a contagem do número de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Além disso, foi feita a citocentrifugação da amostra utilizando-se 100 µl

de lavado broncoalveolar. Os citocentrifugados foram corados com May-Grunwald e GIEMSA. Após a coloração foi feita a contagem diferencial de leucócitos.

5.3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INTI-INFLAMATÓRIO DO DERIVADO *N*-ACILIDRAZÔNICO LASSBIO-1765 (91) EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA

Para a avaliação do potencial anti-inflamatório do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1765 (91) em modelo experimental de asma, foram utilizados camundongos fêmeas da cepa A/J, pesando entre 17 g e 20 g, e ratos Wistar pesando entre 250-300 g, obtidos da unidade de criação da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram alojados nas caixas em grupos de 5 com suprimento de água e comida, sem restrições, em ambiente com temperatura controlada entre 22°C e 25°C e 12 h (06:00 – 18:00) de luz. Os procedimentos que envolvem o cuidado e uso de animais de laboratório foram examinados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - LW23/10).

O tratamento estatístico dos resultados foi feito no programa GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os valores de *p* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Para a comparação entre dois grupos experimentais foi utilizado teste “*t*” de Student para amostras não pareadas. Os valores de *p* inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

5.3.2.1 SENSIBILIZAÇÃO, DESAFIO ANTIGÊNICO E TRATAMENTOS

Os camundongos foram sensibilizados com duas injeções subcutâneas dorsais, de 50 µg de ovoalbumina (OVA) em 0,2 mL de salina estéril (NaCl 0,9%) nos dias 0 e 7. A partir do 14º dia, os animais foram anestesiados com aerossol de halotano e submetidos ao desafio intranasal de OVA (50 µg/25 µL de salina), administrada uma

vez por semana durante quatro semanas. Os animais controle foram desafiados apenas com solução de salina.

Os animais foram tratados com LASSBio-1765 (**91**) a partir da terceira semana de desafio antigênico nas doses de 50 $\mu\text{mol/kg}$ e 100 $\mu\text{mol/kg}$, sendo cada dose correspondente a um grupo. O tratamento, por via intra-peritoneal, foi administrado 1 hora antes de cada instilação intranasal de OVA. O grupo controle foi apenas desafiado com solução de salina (NaCl 0,9%). A solubilização do composto LASSBio-1765 (**91**) foi feita com Tween 80 (0,2%) e salina (0,9%), imediatamente antes da administração nos animais.

5.3.2.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR E HIPER-REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS

Para avaliação da função pulmonar foi utilizado o sistema de pletismografia de corpo inteiro, sistema invasivo (sistema Buxco). Os animais foram anestesiados com nembutal (60 mg/Kg, *i.p.*) curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon, 1 mg/kg), e em seguida foram traqueostomizados e ventilados mecanicamente. O pneumotacógrafo acoplado à câmara pletismográfica capturou o fluxo respiratório e o transdutor ligado à câmara permitiu que os dados coletados do fluxo fossem transferidos para o computador. O software BioSystem XA processou os dados determinando parâmetros como resistência das vias aéreas e elastância pulmonar. Para avaliar o fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas, os animais foram submetidos ao agente broncoconstritor metacolina a concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL), em intervalos de 5 minutos cada (HOYMANN, 2007).

5.3.2.3 TÉCNICA DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)

A lavagem broncoalveolar foi realizada utilizando-se cânula de polietileno inserida na traqueia onde, um volume total de 1,5 mL de solução salina tamponada (PBS) contendo EDTA (10 mM), foi administrado. As amostras foram centrifugadas a

1500 RPM por 10 min e o sobrenadante recolhido e congelado para posterior quantificação de mediadores. O “pellet” celular foi ressuspensionado em 0,25 mL (PBS+EDTA) para que fosse realizada a avaliação celular.

5.3.2.4 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Leucócitos totais foram analisados mediante diluição das amostras em líquido de Türk (1:10) e a contagem realizada em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio de luz. Para a análise diferencial, foram utilizados citoesfregaços corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, e a avaliação celular feita utilizando-se objetiva de imersão em óleo mineral.

5.3.2.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e da quimiocina eotaxina-1 foram quantificados por “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” (ELISA), utilizando-se amostras do tecido pulmonar que foram homogeneizadas em 1 mL de PBS, contendo um coquetel de inibidores de proteases (complete-Roche) e centrifugados a 4° C por 15 min a 10.000 g. Os sobrenadantes foram quantificados usando kits comerciais, seguindo as instruções recomendadas. Para recobrir a placa de 96 poços utilizou-se o anticorpo capturador (nas concentrações recomendadas nos kits), processo realizado por 18 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada em tampão “*Coat Buffer*” e bloqueada com PBS-BSA 1% (250 µl por poço), permanecendo em contato com o anticorpo capturador durante 1 h. Após esta incubação outra lavagem foi realizada, seguida da aplicação das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits (R&D Systems), permanecendo durante 18 h na temperatura de 4°C. Na sequência, a placa foi lavada com tampão “*Assay Buffer*” para posterior adição do anticorpo de detecção, permanecendo incubada por 1 h. Decorrido este tempo, a placa foi novamente lavada com o mesmo tampão e adicionou-se a enzima estreptoavidina, por 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e

a reação foi interrompida com H_2SO_4 (0,19 M). A leitura da placa foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro (450 nm). Os resultados obtidos foram expressos por ng/mg de proteína.

5.3.2.6 CONFECÇÃO DOS CORTES PARA A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após o teste de hiperreatividade brônquica, os camundongos foram sacrificados, a cavidade peritoneal foi aberta e em seguida a aorta abdominal foi cortada para a liberação do sangue retido. Para a retirada do sangue presente no pulmão, foi utilizada a técnica de perfusão, na qual foi inserido um cateter no ventrículo direito do coração, por onde foi gotejada uma solução de salina com EDTA (20 mM). Em seguida, o pulmão foi retirado e fixado em formalina-Milloning incluído em parafina, seccionado em micrótomo (5 μm) e os fragmentos foram corados em Ácido Periódico de Schiff (PAS) (cora componentes do muco em tonalidade que varia entre púrpura e magenta).

5.3.2.7 QUANTIFICAÇÃO DO MUCO POR MORFOMETRIA DIGITAL

A análise morfométrica digital foi realizada com o auxílio de microscópio de luz, Olympus BX50, acoplado a uma câmera de vídeo e a um sistema de análise de imagens (software-image Pro-plus). As imagens das vias áreas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) foram obtidas com o auxílio de objetiva de 40 x, digitalizadas e armazenadas no computador. O software de análise de imagens permitiu gravar padrões específicos de coloração magenta relacionada à presença de muco nas vias aéreas. Durante a análise de cada imagem digitalizada, delimitou-se a área do epitélio brônquico para quantificar a produção de muco nas células caliciformes. Para cada animal foram analisadas pelo menos oito vias aéreas.

5.3.2.8 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

Foi retirada uma alíquota da suspensão celular e adicionado turkey para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Para a identificação dos diferentes subtipos leucocitários presentes na cavidade peritoneal foram preparados citocentrifugados (Citospin), corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. Para a confecção dos esfregaços foi utilizado o volume de 100 μL contendo, aproximadamente, 10^5 células. A contagem foi realizada em microscópio óptico e objetiva de imersão em óleo, contando 100 células por esfregaço. Com isso, fez-se a obtenção do número total de eosinófilos purificados e de seu respectivo grau de pureza (> 70%).

5.3.2.9 ESTÍMULO QUIMIOTÁTICO

Para estimulação do processo de migração dos eosinófilos, utilizou-se a Eotaxina murina na concentração de 10^{-7} M, cuja diluição foi feita em solução RPMI (5,2 g/L), contendo bicarbonato de sódio (1 g/L) e HEPES (3,9 g/L). Incubação dos eosinófilos com o veículo apenas foi utilizado como controle negativo de migração celular.

5.3.2.10 TRATAMENTO DOS EOSINÓFILOS COM LASSBio-1765 (91)

Foram adicionados 2×10^5 células em 50 μl de RPMI no grupo sem tratamento e, no grupo tratado, 50 μl contendo 2×10^5 células mais PEG 0,01% ou 2×10^5 células mais LASSBio-1765 (91) nas concentrações de 10^{-5} M ou 10^{-6} M. Foram colocados em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 , a 37°C por um tempo de 10 min.

5.3.2.11 QUIMIOTAXIA EM CÂMARA DE BOYDEN MODIFICADA

Para a avaliação da resposta quimiotática dos eosinófilos *in vitro*, utilizou-se o sistema de câmara de Boyden modificada de 48 poços (NeuroProbe Inc.). Esta câmara é composta por dois compartimentos: um inferior, com poços que

comportam o volume de 29 μL , no qual são colocados o estímulo quimiotático, e seu respectivo veículo; e, um compartimento superior, no qual são depositados os eosinófilos com total de 2×10^5 células/50 μL . No processo de montagem da câmara, sobre o compartimento inferior foi colocado um filtro de nitrocelulose com poro de 3 μm , previamente umedecido em RPMI, e sobre este uma membrana de silicone (gasket). O compartimento superior foi, então, colocado sobre o sistema acima descrito, e, por meio de parafusos, foi firmemente fixado.

Após a colocação de uma lâmina sobre a câmara, visando impedir a evaporação, esta foi incubada a 37°C , por 2 h, em estufa contendo atmosfera de 5% CO_2 .

5.3.2.12 CONTAGEM CELULAR NO FILTRO

Para a montagem do filtro para contagem, fez-se a colocação do mesmo sobre uma lâmina própria para microscopia, e com auxílio de bálsamo entellan, fixou-se uma lamínula. A contagem dos eosinófilos foi realizada em microscópio óptico e objetiva de imersão em óleo. Os resultados foram expressos como o número de eosinófilos contados em 15 campos consecutivos a uma distância fixa de 30 μm da superfície do filtro (SILVA et al., 2001).

5.3.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO DE AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTAGONISTA – ENSAIO FUNCIONAL DE RECEPTOR NUCLEAR E CELULAR (CEREP)

Os derivados *N*-acilidrazônicos LASSBio-1641 (**82**), LASSBio-1642 (**92**), LASSBio-1765 (**91**), LASSBio-1830 (**81**), LASSBio-1831 (**89**), LASSBio-1842 (**143**), LASSBio-1843 (**90**), LASSBio-1844 (**146**) e SM (**144**), foram solubilizados em DMSO na concentração de $1 \cdot 10^{-2}$ molar. As diluições das soluções-estoque foram de 100x, 333x ou 1000x em DMSO puro. As concentrações teste foram de $3 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $3 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ e $3 \cdot 10^{-6}$ molar. A resposta agonista em relação ao percentual do controle foi

determinada a partir da média de duas medições para cada concentração. O antagonista de referência utilizado nos ensaios foi o J113863, o qual possui IC_{50} de 5,0 nM.

Foram utilizadas células humanas recombinantes do tipo CHO, eotaxina-2 na concentração de 10 nM como estímulo, temperatura de incubação de 28°C, impedância como componente de medição e espectroscopia dielétrica celular como método de detecção.

Os resultados são expressos como percentual da resposta agonista do controle e como percentual de inibição da resposta agonista do controle obtidos na presença dos compostos testados. Resultados mostrando estímulo ou inibição maior que 50% apresentam efeitos significativos. 50% é o valor de corte mais comum para investigações posteriores (determinação de CI_{50} e CE_{50} das curvas de concentração-resposta). Resultados mostrando estímulo ou inibição entre 25 e 50% são indicativos de efeitos fracos a moderados. Resultados mostrando estímulo menor que 25% não são considerados significativos e geralmente atribuídos a variabilidade do sinal de base ao nível de controle (DAUGHERTY, B. L. et al).

5.3.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO DOS FRAGMENTOS E MICROMOLÉCULAS DE PADRÃO ESTRUTURAL PIPERIDÍNICO FRENTE AOS RECEPTORES CXCR4

5.3.4.1 PREPARAÇÃO DA MEMBRANA

No processo de preparação da membrana, células do tipo HEK293T foram cultivadas em 5% de CO_2 a 37°C em meio Eagle modificado Dulbecco's com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomina. Todas as incubações foram realizadas nessas condições.

As células foram plaqueadas (2×10^6 células/10 cm meio de cultura) e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram transfectadas com 2,5 μ g de cDNA codificando CXCR4, suplementado com 2,5 μ g de vetor vazio pcDEF3, usando 30 μ g de PEI linear (25 kDa) em 500 μ l, 150 mM de NaCl (filtro estéril). As células foram incubadas com a mistura DNA/PEI no meio de cultura novo por 48 horas.

Posteriormente, as células raspadas em discos de 5 mL contendo tampão salino de fosfato gelado (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4), seguido de PBS resfriado e centrifugado (10 minutos, 4°C, 1500 g). As bolinhas obtidas foram resuspendidas e discos de 0,5 mL (15 mM Tris-HCl, 0,3 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , pH 7,4), para o qual o inibidor de protease completo (Diagnósticos Roche, Mannheim, Alemanha) foi adicionado para um tubo, onde foi homogeneizado. As membranas foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento, por meio de nitrogênio líquido, seguido de centrifugação a 25.000 rpm por 45 min a 4°C. As bolinhas foram então rinsadas uma vez com 1 mL de tampão de tris-sacarose (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM de sacarose) e então resuspendidas no mesmo tampão (0,15ml/disco). As membranas foram armazenadas a -80°C e a concentração de proteína foi determinada por meio do ensaios da proteína BCA (Thermo-Scientific).

5.3.4.2 ENSAIO DO BINDING COM RADIOLIGANTE

As membranas foram incubadas em placas de 96 poços em tampão HEPES (50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 0,5% BSA, pH 7,4) com 40 pM de ^{125}I -CXCL12 e deslocador por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram colhidas por meio de filtração através do filtro de placas Unifilter GF/C (PerkinElmer Life and Analytical Sciences), o qual foi pré-umedecido em 0.5% de PEI e lavado três vezes com tampão gelado (50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 500 mM NaCl pH 7,4). A radioatividade foi medida por meio de contador de cintilação Microbeta Scintillation Counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAGIG, A. F. et al. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. **J. Org. Chem.**, 61, 3849-3862, 1996.
- ABOYE, T.L. et al. Design of a Novel Cyclotide-Based CXCR4 Antagonist with Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Activity. **J. Med. Chem.**, 55, 10729-10734, 2012.
- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. New targets for drug development in asthma. **Lancet**, 372, 1073-1087, 2008.
- ALIKHANI, V. et al. Long-chain formoterol analogues: an investigation into the effect of increasing amino-substituent chain length on the β 2-adrenoceptor activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 14, 4705-4710.
- ALLEGRETTI, M. et al. Current status of chemokine receptor inhibitors in development. **Immunol. Lett.**, 145, 68-78, 2012.
- ALLEN, S. et al. Discovery and SAR of trisubstituted thiazolidinones as CCR4 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 14, 1619-1624, 2004.
- ANDRADE, M.; BARROS, M. T. Fast Synthesis of N-Acylhydrazones Employing a Microwave Assisted Neat Protocol. **J. Comb. Chem.**, 12, 245-247, 2010.
- ANDREWS, G.; JONES, C.; WREGGETT, K. A. An Intracellular Allosteric Site for a Specific Class of Antagonists of the CC Chemokine G Protein-Coupled Receptors CCR4 and CCR5. **Mol. Pharmacol.**, 2008, 73, 855-867.
- BAHL, A. et al. The discovery of CCR3/H₁ dual antagonists with reduced hERG risk. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 22, 6688-6693, 2012.
- BALLESTEROS, J. A.; WEINSTEIN, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure function relations in G protein-coupled receptors. **Methods Neurosci.**, 25, 366-428, 1995.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2ª Ed. Porto Alegre, Artmed, p536, 2008.

BARREIRO, E. J.; KÜMMERLE, A. E., FRAGA, C. A. M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry, **Chem. Rev.**, 111, 5215-5246, 2011.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nat. Rev. Immunol.**, 8, 183-192, 2008.

BAYRY, J. et al. *In silico* identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 105, 10221-10226, 2008.

BERGERON, R. J. et al. The Role of Charge in Polyamine Analogue Recognition. **J. Med. Chem.**, 38, 2278-2285, 1995.

BEZERRA-NETO, H. J. C. et al. Design and synthesis of 3,4-methylenedioxy-6-nitrophenoxyacetylhydrazone derivatives obtained from natural safrole: New lead-agents with analgesic and antipyretic properties. **Bioorg. Med. Chem.**, 14, 7924-7935, 2006.

BLAKENEY, J. S. et al. Nonpeptidic Ligands for Peptide-Activated G Protein-Coupled Receptors. **Chem. Rev.**, 107, 2960-3041, 2007.

BOGGS, S. et al. Kilogram-Scale Synthesis of the CXCR4 antagonist GSK812397. **Org. Process. Res. Dev.**, 13, 781-785, 2009.

BURDI, D. F. et al. Small molecule antagonists of the CC chemokine receptor 4 (CCR4). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 17, 3141-3145, 2007.

CARAMORI, G.; ADCOCK, I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, 16, 247-277, 2003.

CARTER, P. H.; TEBBEN, A. J. The Use of Receptor Homology Modeling to Facilitate the Design of Selective Chemokine Receptor Antagonists. **Meth. Enzymol.**, 461, 249-279, 2009.

CATLEY, M. C. et al. Monoclonal antibodies for the treatment of asthma. **Pharmacol. Ther.**, 132, 333-351, 2011.

CHERNEY, R. J. et al. Synthesis and evaluation of *cis*-3,4-disubstituted piperidines as potent CC chemokine receptor 2 (CCR2) antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 18, 5063-5065, 2008.

CHOI, W. T. et al. Drug Discovery Research Targeting the CXC Chemokine Receptor 4 (CXCR4). **J. Med. Chem.**, 55, 977-994, 2012.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. New York, Oxford University Press, 2001.

CLEMETSON, K. J. et al. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. **Blood**, 96, 4046-4054, 2000.

CONGREVE, M. et al. Progress in Structure Based Drug Design for G Protein-Coupled Receptors. **J. Med. Chem.**, 54, 4283-4311, 2011.

DALENCE-GUZMÁN, M. F. et al. Synthesis of novel tetrahydroisoquinoline bronchodilators. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 20, 4999-5003, 2010.

D'ALMEIDA, A. P. L. **Avaliação farmacológica do composto LASSBio-1765 em modelo de asma em camundongo**, 2013. Monografia (Farmacologia) – Escola de Biomedicina, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

DAUGHERTY, B.L. et al. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. **J. Exp. Med.**, 183, 2349-2354, 1996.

D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **J. Immunol. Meth.**, 273, 3-13, 2003.

DE LUCCA, G. V. et al. Discovery of Chemokine Receptor-3 (CCR3) Antagonists with Picomolar Potency. **J. Med. Chem.**, 48, 2194-2211, 2005.

DUARTE, C. D. et al. Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors. **Bioorg. Med. Chem.**, 15, 2421-2433, 2007.

FRAGA, C. A. M. **Síntese e Atividade Anti-inflamatória de Novos Oxicams a partir do Safrol**, 1991. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

Fraga, C. A. M.; BARREIRO E. J. The synthesis of a new benzothiazine derivative, related to oxicams, synthesized from natural safrole. **J. Heterocyclic Chem.**, 29, 1667-1669, 1992.

GARDNER, D. S. et al. From rigid templates to conformationally stabilized acyclic scaffolds. Part II: Acyclic replacements for the (3S)-3-benzylpiperidine in a series of potent CCR3 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 18, 586-95, 2008.

GAO, Z.; METZ, W. A. Unraveling the Chemistry of Chemokine Receptor Ligands. **Chem. Rev.**, 103, 3733-3752, 2003.

GRAHAM, S. L. et al. Topically active carbonic anhydrase inhibitors. 3. Benzofuran- and indole-2-sulfonamides. **J. Med. Chem.**, 33, 749-754, 1990.

GROS, L. et al. Evaluation of Azasterols as Anti-parasitics. **J. Med. Chem.**, 49, 6094-6103, 2006.

GROS, S. J. et al. Involvement of CXCR4 Chemokine Receptor in Metastatic HER2-Positive Esophageal Cancer. **Plos One**, 7, e47287-e47297, 2012.

GUPTA, R.; JINDAL, D. P.; KUMAR, G. Corticosteroids: the mainstay in asthma therapy. **Bioorg. Med. Chem.**, 12, 6331-6342, 2004.

HAN, Z. et al. Simple Derivatives of Natural Amino Acids as Chiral Ligands in the Catalytic Asymmetric Addition of Phenylacetylene to Aldehydes. **Eur. J. Org. Chem.**, 49, 934-938, 2005.

HANNESIAN, S. **Total Synthesis of Natural Products: The Chiron Approach**. Oxford, Pergamon, 1983.

HORUK, R. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 8, 23-33, 2009.

JAIN, V. et al. First Pharmacophore Model of CCR3 Receptor Antagonists and its Homology Model-Assisted, Stepwise Virtual Screening. **Chem. Biol. Drug Des.**, 77, 373-387, 2011.

KAUFFMAN, G. S.; WATSON, P. S.; NUGENT, W. A. Strategy for the Enantioselective Synthesis of *trans*-2,4-Disubstituted Piperidines: Application to CCR3 Antagonist IS811. **J. Org. Chem.**, 71, 8975-8977, 2006.

KLAVENESS, J.; BRUDELI, B.; LEVY, F. O. BIO-MEDISINSK INNOVASJON (Oslo, NO). **5-HTX modulators**. USPTO. US 2009/0029979 A1, 1-30, 19 jan. 2009.

KOELINK, P. J. et al. Targeting chemokine receptors in chronic inflammation diseases: An extensive review. **Pharmacol. Ther.**, 133, 1-18, 2012.

KOTHANDAN, G.; GADHE, C. G.; CHO, S. J. Structural Insights from Binding Poses of CCR2 and CCR5 with Clinically Important Antagonists: A Combined *In Silico* Study. **Plos One**, 7, e32864-e32878, 2012.

KUFARENA, I. et al. Status of GPCR Modeling and Docking as Reflected by Community-wide GPCR Dock 2010 Assessment. **Structure**, 19, 1108-1126, 2011.

KÜMMERLE, A. E. et al. Design, synthesis and analgesic properties of novel conformationally-restricted *N*-acylhydrazones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 17, 4963-4966, 2009.

LAGES, A. S. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new flosulide analogues, synthesized from natural safrole. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 8, 183-188, 1998.

LEFRANÇOIS, M. et al. Agonists for the Chemokine Receptor CXCR4. **ACS Med. Chem. Lett.**, 2, 597-602, 2011

Li, J.; SHA, Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. **Molecules**, 13, 1111-1119, 2008.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: An useful strategy for molecular modification. **Curr. Med. Chem.**, 12, 23-49, 2005.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **Eur. J. Med. Chem.**, 43, 348-356, 2008.

MADDOX, L.; SCHWARTZ, D. A. The Pathophysiology of Asthma. **Annu. Rev. Med.**, 53, 477-498, 2002.

MAIA, R. C. et al. Synthesis and analgesic profile of conformationally constrained *N*-acylhydrazone analogues: Discovery of novel *N*-arylideneamino quinazolin-4(3*H*)-one compounds derived from natural safrole. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 6517-6525, 2009.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage-derived chemokine (MDC). **J. Leuk. Biol.**, 68, 400-404, 2000.

MARCOU, G.; ROGNAN, D. Optimizing Fragment and Scaffold Docking by Use of Molecular Interaction Fingerprints. **J. Chem. Inf. Model**, 47, 195-207, 2007.

MENDONÇA, F. L. et al. Site-directed Mutagenesis of CC Chemokine Receptor 1 Reveals the Mechanism of Action of UCB 35625, a small Molecule Chemokine. **J. Biol. Chem.**, 11, 4808-4816, 2005.

MIKHAK, Z. et al. Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T_H2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 67-73, 2009.

MILLAN, D. S. et al. Design and synthesis of acting inhaled corticosteroids for the treatment of asthma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 5826-5830, 2011.

MONTUSCHI, P. Leucotrienes, Antileucotrienes and Asthma. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 8, 647-656, 2008.

MUNGALPARA, J. et al. Rational Design of Conformationally Constrained Cyclopentapeptide Antagonists for C-X-C Chemokine Receptor 4 (CXCR4). *J. Med. Chem.*, 55, 10287-10291, 2012.

MURDOCH, J. R.; LLOYD, C. M. Chronic inflammation and asthma. *Mutat. Res.*, 690, 24-39, 2010.

NASCIMENTO-JÚNIOR, et al. Microwave-assisted synthesis and structure activity relationships of neuroactive pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 74-77, 2010.

NASCIMENTO-JÚNIOR, et al. MAOS and Medicinal Chemistry: Some important examples from the last years. *Molecules*. 16, 9274-9297, 2011.

NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M.; MARTINS, M. A.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. UFRJ, Agência de Inovação da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ). Uso de novos derivados *N*-(((arilpiperidin-4 ilideno)hidrazinil)oxoalquil)arilsulfonamídicos como anti-inflamatórios e antiasmáticos, composições farmacêuticas contendo os mesmos e processos de preparação. *INPI*. BR n. PI 10 2013 026253 6, 11 out. 2013.

NAYA, A. et al. Discovery of a Novel Selective Antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 1219-1223, 2001.

NITTA, A. et al. Discovery and structure-activity relationships of urea derivatives as potent and novel CCR3 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 4951-4954, 2012.

OLSON, G. L. et al. Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics. **J. Med. Chem.**, 36, 3039-3049, 1993.

PALLA, G.; PREDIERI, G.; DOMIANO, P. Conformational Behaviour and E/Z Isomerization of *N*-acyl and *N*-aroylhydrazones. **Tetrahedron**, 42, 3649-3654, 1986.

PARK, S. H. et al. Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. **Nature**, 491, 779-783, 2012.

PEASE, J.; HORUK, R. Chemokine Receptor Antagonists. **J. Med. Chem.**, 55, 9363-9392, 2012.

PIAZ, V. D.; GIOVANNONI, M. P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to Rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. **Eur. J. Med. Chem.**, 35, 463-80, 2000.

PLANESAS, J. M. et al. Impact of the CXCR4 structure on docking-based virtual screening of HIV entry inhibitors. **J. Mol. Graph. Model.**, 38, 123-136, 2012.

PROCOPIOU, P. A. et al. Lead optimization of the *N*1 substituent of a novel series of indazole arylsulfonamides as CCR4 antagonists and identification of a candidate for clinical investigation. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 22, 2730-2733, 2012.

PROCOPIOU, P. A. et al. Synthesis and Structure – Activity Relationships of Indazole Arylsulfonamides as Allosteric CC-Chemokine Receptor 4 (CCR4) Antagonists. **J. Med. Chem.**, 56, 1946-1960, 2013.

PRUITT, J. R. et al. CC chemokine receptor-3 (CCR3) antagonists: Improving the selectivity of DPC168 by reducing central ring lipophilicity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 17, 2992-2997, 2007.

PURANDARE, A. V. et al. Core exploration in optimization of chemokine receptor CCR4 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 17, 679-682, 2007.

RAMAN, D.; SOBOLIK-DELMARE, T.; RICHMOND, A. Chemokines in health and disease. **Exp. Cell. Res.**, 317, 575-589, 2011.

RODRÍGUEZ-FRADE, J. M.; MELLADO, M.; MARTÍNEZ-A, C. Chemokine receptor dimerization: two are better than one. **Trends. Immunol.**, 22, 612-617, 2001.

ROSTÈNE, W.; KITABGI, P.; PARSADANIANTZ, S. M. Chemokines: a new class of neuromodulator? **Nat. Rev. Neurosci.**, 8, 895-904, 2007.

ROUMEN, L. et al. *In Silico Veritas*: The Pitfalls and Challenges of Predicting GPCR-Ligand Interactions. **Pharmaceuticals**, 4, 1196-1215, 2011.

ROUMEN, L. et al. C(X)CR *in silico*: Computer-aided prediction of chemokine receptor-ligand interactions. **Drug Discov. Today Tech.**, 9, e281-912, 2012.

SABROE, I. et al. A Small Molecule Antagonist of Chemokine Receptors CCR1 and CCR3. **J. Biol. Chem.**, 275, 25985-25992, 2000.

SATO, I. et al. Synthesis, biological evaluation, and metabolic stability of acrylamide derivatives as novel CCR3 antagonists. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 5989-6002, 2009.

SCHOLTEN, D. J. et al. Pharmacological modulation of the chemokine receptor function. **British J. Pharmacol.**, 165, 1617-1643, 2012.

SILVA, E. F.; BARREIRO, E. J. The Synthesis and Antiinflammatory Activity of 1-Alkyl-Isochroman-1-yl Acetic Acids Derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.**, 4, 40-44, 1993.

SMIT, J. J.; LUKACS, N. W. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. **Eur. J. Pharmacol.**, 533, 277-288, 2006.

STRAZZOLINI, P.; MISURI, N.; POLESE, P. Efficient cleavage of carboxylic *tert*-butyl and 1-adamantyl esters, and *N*-Boc-amines using H₂SO₄ in CH₂Cl₂. **Tetrahedron Lett.**, 46, 2075-2078, 2005.

SUN, Z. et al. Screening of chemokine receptor CCR4 antagonists by capillary zone electrophoresis. **J. Pharmaceutical Anal.**, 4, 264-269, 2011.

SZPAKOWSKA, M. et al. Function, diversity and therapeutic potential of the *N*-terminal domain of human chemokine receptors. **Biochem. Pharmacol.**, 84, 1366-1380, 2012.

TAKA, E. et al. Post-transcriptional silencing of CCR3 downregulates IL-4 stimulated release of eotaxin-3 (CCL26) and other CCR3 ligands in alveolar type II cells. **Cytokine.**, 44, 342-351, 2008.

TERAN, L. M. CCL Chemokines and asthma. **Rev. Immunol. Today**, 21, 235-242, 2000.

THIELE, S. et al. Modulation in Selectivity and Allosteric Properties of Small-Molecule Ligands for CC-Chemokine Receptors. **J. Med. Chem.**, 55, 8164-77, 2012.

THOMA, G. et al. Orally Bioavailable Isothioureas Block Function of the Chemokine Receptor CXCR4 In Vitro and In vivo. **J. Med. Chem.**, 51, 7915-7920, 2008.

TIAN, B. et al. Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 19, 2162-2167, 2009.

TING, P. C. et al. The synthesis of substituted piperidine amide compounds as CCR3 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 15, 1375-1378, 2005a.

TING, P. C. et al. The synthesis of piperidine amide compounds as CCR3 ligands: Antagonists versus agonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 15, 3020-1023, 2005b.

TRIBUTINO, J. L. M. et al. Novel 6-methanesulfonamide-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazones: Orally effective anti-inflammatory drug candidates. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 1125-1131, 2009.

WACKER, D. A. et al. CCR3 Antagonists: A potential New Therapy for the Treatment of Asthma. Discovery and Structure-Activity Relationships. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 12, 1785-1789, 2002.

WAN, Y. et al. Identification of full, partial and inverse CC chemokine receptor 3 agonists using [³⁵S]GTPγS binding. **Eur. J. Pharmacol.**, 456, 1-10, 2002.

WANG, X. et al. Optimization of 2-aminothiazole derivatives as CCR4 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 16, 2800-2803, 2006.

WHITE, G. E.; IQBAL, A. J.; GREAVES, D. R. CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation-Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. **Pharmacol. Rev.**, 65, 47-89, 2013.

WIJTMANS, M. et al. Therapeutic targeting of chemokine receptors by small molecules. **Drug. Discov. Today Tech.**, 9, e229-e236, 2012.

WISE, E. L. Small molecule receptor agonists and antagonists of CCR3 provide insight into mechanisms of chemokine receptor activation. **J. Biol. Chem.**, 282, 27935-27943, 2007.

WU, B. et al. Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists. **Science**, 330, 1066-1071, 2010.

YANG, L. et al. Discovery of 3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl L-arylglycinamide based potent CCR2 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 16, 3735-3739, 2006.

YOKOYAMA, K. et al. Potent CCR4 antagonists: Synthesis, evaluation, and docking study of 2,4-diaminoquinazolines. **Bioorg. Med. Chem.**, 16, 7968-7974, 2008a.

YOKOYAMA, K. et al. Discovery of potent CCR4 antagonists: Synthesis and structure-activity relationship study of 2,4-diaminoquinazolines. **Bioorg. Med. Chem.**, 16, 7021-7032, 2008b.

YOKOYAMA, K. et al. Potent and orally bioavailable CCR4 antagonists: Synthesis and structure-activity relationship study of 2-aminoquinazolines. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 64-73, 2009.

YOSHIKAWA, Y. et al. Molecular modeling study of cyclic pentapeptide CXCR4 antagonists: New insight into CXCR4-FC131 interactions. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 22, 2146-2150, 2012.

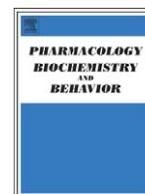
YOSHIMURA, T. et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil hemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 84, 9233-9237, 1987.

YOU, H. et al. Design, synthesis and X-ray crystallography study of NAMPTase inhibitors as anti-cancer agents. **Eur. J. Med. Chem.**, 46, 1153-1164, 2011.

ZANG, S. et al. Screening of thiourea derivatives and carbonyl-2-aminothiazole derivatives for potential CCR4 antagonists using capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. B**, 879, 75-82, 2011.

ZHAO, F. et al. Synthesis of thiourea derivatives as CCR4 antagonists. **Chinese Chem. Lett.**, 20, 296-299, 2009.

ZIMMERMANN, N. et al. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 111, 227-242, 2003.



Sedation and antinociception induced by a new pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivative (LASSBio-873) is modulated by activation of muscarinic receptors

Thaiana C.F. Mendes^a, Juliana M. Raimundo^a, Nailton M. Nascimento-Junior^{b,c}, Carlos A.M. Fraga^{b,c}, Eliezer J. Barreiro^{b,c}, Roberto T. Sudo^a, Gisele Zapata-Sudo^{a,*}

^a Programa de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2009

Received in revised form 7 July 2009

Accepted 19 July 2009

Available online 24 July 2009

Keywords:

Sedation

Muscarinic receptor

Pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives

Zolpidem

Antinociception

ABSTRACT

New substances designed for the treatment of anxiety have previously been synthesized, which resulted in the identification of four new pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives structurally designed by using zolpidem as lead compound. Among them, LASSBio-873 was the most potent to produce analgesic, sedative and hypnotic effects. Thus, we investigated the possible mechanisms involved in LASSBio-873-induced sedation, as well as its effects on different models of inflammatory pain. LASSBio-873 (4 mg/kg) reduced locomotor activity of mice in the open field test from 205.2 ± 25.6 to 87.6 ± 16.2 movements/min. Atropine, a non-selective muscarinic antagonist, prevented the LASSBio-873-induced sedation and increased locomotor activity to 192.9 ± 30.2 movements/min. In the formalin test, LASSBio-873 (4 mg/kg) significantly reduced the duration of nociceptive behavior during the inflammatory phase, reducing the control reactivity from 197.6 ± 14.5 s to 84.4 ± 10.3 s. Carrageenan reduced the latency for the animal reaction from 5.1 ± 0.2 s (control) to 2.1 ± 0.3 s which was completely reverted by LASSBio-873 (6 mg/kg) to 5.6 ± 0.6 s. Atropine prevented the LASSBio-873-induced antinociceptive and antihyperalgesic activities, indicating the interference of the cholinergic system. LASSBio-873 is a novel prototype of drug that modulates muscarinic activity and could be used for neuropsychiatric and cognitive disorders and other conditions associated to acute and chronic pain.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

According to the Pan American Health Organization, mental disorders are affecting 1 in 4 individuals at some time during their lives and the incidence is higher among patients in primary health care. Mental disorders impact adversely on the quality of their lives, families and communities. In the scope of a research aimed to develop new alternatives to treat neurological disorders, new functionalized pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives were synthesized by using zolpidem as lead compound (Menegatti et al., 2006). These new compounds were originally designed to be selective GABA receptor modulators exploring its structural analogy with zolpidem, which produces hypnosis of rapid onset and short duration as a consequence of its binding to benzodiazepine receptors (Sanger and Depoortee, 1998). Additionally, zolpidem decreases locomotor activity of adult mice (Depoortere et al., 1986; Fahey et al., 2006; Perićić et al.,

2008; Sanger et al., 1986; Tanaka et al., 2008) and induces analgesia at high doses (80 mg/kg) (Pick et al., 2005). Although the mechanisms responsible for the zolpidem-induced analgesia are still unknown, the involvement of opioid pathway has also been suggested (Pick et al., 2005).

The pharmacological profile of the new derivatives (LASSBio-873, LASSBio-872, LASSBio-981, LASSBio-980) was previously evaluated and they produced intense sedative, hypnotic and analgesic activities. Except for LASSBio-980, all derivatives significantly altered the spontaneous locomotor activity in mice and all four new heterocyclic compounds increased the duration of hypnosis induced by pentobarbital sodium. The antinociceptive effect of the new derivatives was prevented by the treatment with naloxone, indicating that this bioprofile was dependent on the activation of opioid receptors (Menegatti et al., 2006). Among the new derivatives, LASSBio-873 appeared to be the most potent compound to produce sedative and antinociceptive activity, and thus, was selected for additional pharmacological investigation including the determination of the pathways involved in its effects.

The present work investigated the involvement of opioid, GABAergic, cholinergic and adrenergic systems in the sedative activity of LASSBio-

* Corresponding author. Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, Bloco J, Sala 14, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil. Tel./fax: +55 21 25626505.

E-mail address: gsudo@farmaco.ufrj.br (G. Zapata-Sudo).

873. Besides, we evaluated the antinociceptive effects of LASSBio-873 in different models of inflammatory pain and possible mechanisms of action.

2. Materials and methods

The Animal Care and Use Committee at Universidade Federal do Rio de Janeiro approved the protocols used.

2.1. Animals

Male Swiss mice, weighing 20–25 g were housed under an artificial 12-h light and 12-h dark cycle in controlled conditions of temperature (21 °C) and humidity (60%) with food and water ad libitum.

2.2. Drugs

Naloxone and flumazenil were kindly donated by Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (São Paulo, SP, Brazil). Carrageenan, formaldehyde, indomethacin, acetyl salicylic acid, atropine, yohimbine and pirenzepine were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). All compounds were dissolved in distilled water, except for flumazenil, indomethacin and the LASSBio-873, which were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO).

2.3. Methods

2.3.1. Locomotor activity test in mice

The sedative activity of the vehicle and LASSBio-873 was investigated by recording spontaneous locomotor activity of mice in an open field (Menegatti et al., 2006). Spontaneous locomotor activity was determined in Swiss mice (20–25 g) which were placed in the center of an open field of 45 × 45 cm (LE 8811, Letica) in which 16 infrared photocells were positioned every 2.5 cm. Total locomotor activity was defined as the number of interruptions of the beams registered in a computer during a 40 min period after intraperitoneal injection of either vehicle or LASSBio-873 (4 mg/kg) in a group of ten mice. Data were expressed as the number of movements per minute. To investigate the mechanisms involved in the sedative activity of derivatives, animals were pre-treated intraperitoneally with the following antagonists: naloxone 1 mg/kg, an opioid antagonist (Zomkowski et al., 2005); flumazenil 10 and 20 mg/kg, a GABA_A antagonist (Savić et al., 2004); yohimbine 5 mg/kg, an α_2 -adrenergic antagonist (Kaur et al., 2007); atropine 2 mg/kg, a muscarinic antagonist (Adamik and Telegdy, 2004); pirenzepine 10 mg/kg, a selective antagonist of the M₁ muscarinic receptor subtype (Yin and Zhu, 2005).

2.3.2. Formalin test

Formalin test was performed based on protocol developed for Dubuisson and Dennis (1997). Formalin (20 μ l, 2.5%) was administered by intraplantar injection into the right hind paw of each animal after 15 min of the intraperitoneal injection of vehicle, acetyl salicylic acid, and LASSBio-873. After that the animal was placed in a plexiglass cage and a mirror was placed under the cage to allow full view of the hind paws and total time spent by animal licking or biting the injected paw was observed for the following 30 min. Formalin-induced pain behavior is biphasic. The initial acute phase (0–5 min) is followed by a short quiescent period; which is then followed by a prolonged tonic response (15–30 min). The involvement of different pathways in the effect of LASSBio-873 was investigated by the pre-treatment with atropine 2 mg/kg, i.p. (Anjaneyulu and Chopra, 2006), naloxone 1 mg/kg (Pini et al., 1997), flumazenil 20 mg/kg (Knabl et al., 2009) or yohimbine 5 mg/kg (Anjaneyulu and Chopra, 2006) 15–30 min before the administration of the derivative.

2.3.3. Carrageenan test

The thermal hyperalgesia was evaluated based on a described method for Hargreaves et al. (1988). The animals were placed in a plexiglass chamber on a glass plate under which a radiant heat stimulus was applied to the hind paws through the glass plate. The light beam was turned off when the animal lifted the paw, allowing the measurement of time between start of the light beam and the paw lift. This time was defined as the paw withdrawal latency, which was assessed using a plantar analgesia meter (ITC Inc. model 33). The stimulus was adjusted to give 5–6 s withdrawal latency in the control condition. For all mice both hind paws were tested three times to obtain average response latency for each hind paw.

Peripheral inflammation was induced by intraplantar (i.pl.) injection of carrageenan (20 μ l, 1%) into the right hind paw in mice. The latency of each animal to respond to the thermal stimuli was measured at different time points after carrageenan injection. LASSBio-873, vehicle and indomethacin were administered i.p. right before carrageenan. A cutoff time of 15 s was used to avoid tissue damage to the hind paw. In order to investigate the mechanism of action of LASSBio-873, animals were pre-treated intraperitoneally with different antagonists, as described for the formalin test above.

2.4. Statistical analysis

Data were presented as mean \pm SEM. Comparison of groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunn's test. Difference was considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

The sedative properties of LASSBio-873 were investigated by recording spontaneous locomotor activity of mice in an open field. In this test, compounds with sedative activity produce a decrease in the number of movements, interpreted as a decrease in curiosity of the new environment (Prut and Belzung, 2003). The i.p. administration of LASSBio-873 (4 mg/kg) decreased locomotor activity from 205.2 \pm 25.6 movements/min (DMSO) to 87.6 \pm 16.2 (Fig. 1). In order to investigate the mechanisms involved in the sedation induced by LASSBio-873, mice were pre-treated with different antagonists. The

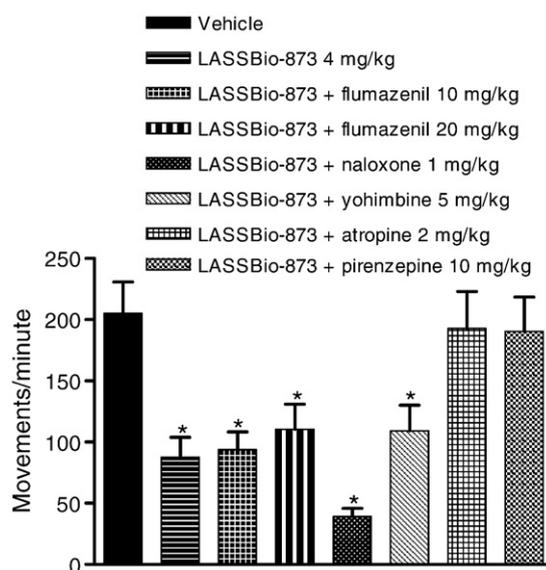


Fig. 1. Effects of LASSBio-873 on the locomotor activity in mice in the absence and presence of antagonists. Derivative was injected intraperitoneally and motor activity was determined during 40 min after injection. Data are expressed as means of the movements per minute \pm SEM. * $P < 0.05$ relative to control group (DMSO).

involvement of the benzodiazepine pathway was evaluated through pre-treatment with flumazenil (10 and 20 mg/kg, i.p.), 15 min prior to the administration of derivatives. Administration of flumazenil alone significantly reduced the motor activity in mice when compared with vehicle and did not alter the inhibitory effect of derivatives. Even after pre-treatment with a higher dose of flumazenil (20 mg/kg), LASSBio-873 reduced locomotor activity to 93.8 ± 14.4 . Pre-treatment with naloxone (1 mg/kg, i.p.), a non-selective opioid antagonist, did not inhibit the derivative-induced sedation but increased its inhibitory effect. Similarly to flumazenil, naloxone alone decreased the locomotor activity of mice.

The participation of the α_2 -adrenergic pathway was assessed by the pre-treatment with yohimbine (5 mg/kg, i.p.), which did not antagonize the effect of LASSBio-873. In order to determine the involvement of the muscarinic system in the sedative activity, mice were pre-treated with atropine (2 mg/kg, i.p.). Administration of yohimbine (203.7 ± 18.7 movements/min) and atropine (211.9 ± 30.6 movements/min) alone did not alter locomotor activity in mice. Pre-treatment with atropine significantly antagonized the derivative-induced sedation, as shown in Fig. 1. Locomotor activity was 192.9 ± 30.2 movements/min for LASSBio-873, in the presence of atropine. Similarly, pre-treatment of mice with pirenzepine, a selective antagonist of the M1 muscarinic receptor subtype, completely reversed the sedative effect of LASSBio-873 (190.6 ± 27.9 movements/min), indicating the importance of these receptors for the activity of the derivative.

Intraplantar injection of 20 μ l of formalin (2.5%) generated a classical biphasic nociceptive response (Fig. 2). The administration of acetyl salicylic acid (150 mg/kg, i.p.), a non-steroidal antiinflammatory agent, and LASSBio-873 (4 mg/kg) 15 min before formalin significantly reduced phase 2 but not phase 1 of the formalin test (Fig. 2). LASSBio-873 reduced reactivity to formalin from 197.6 ± 14.5 s to 84.4 ± 10.3 s ($P < 0.05$). Atropine (2 mg/kg, i.p.), a muscarinic receptor antagonist, administered 40 min before formalin, prevented the antinociceptive effect of LASSBio-873 demonstrated in the inflammatory phase (Fig. 2). The effect of LASSBio-873 on the reactivity to formalin was not blocked by 20 mg/kg flumazenil (66.3 ± 12.4 s), 5 mg/kg yohimbine (74.5 ± 17.3 s) and 1 mg/kg naloxone (36.2 ± 12.0 s). Pre-administration of all antagonists tested, except yohimbine, resulted in reactivity that was not significantly different than that produced by formalin alone.

The intraplantar injection of carrageenan induced thermal hyperalgesia in the ipsilateral hind paw, which was consistent with previous studies (Hargreaves et al., 1988; Shannon et al., 2001; Zhang et al., 2004). The i.p. injection of the vehicle alone did not alter the hyperalgesia induced by carrageenan, which reduced baseline with-

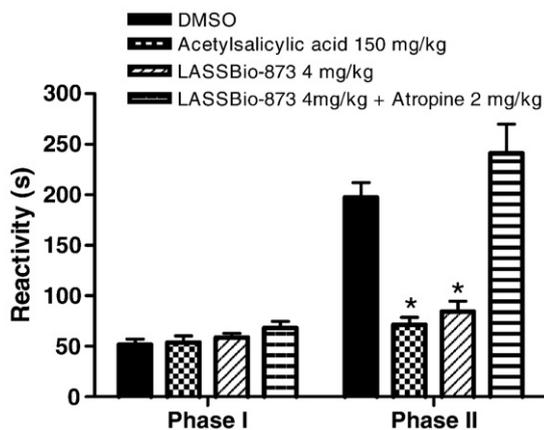


Fig. 2. Effects of LASSBio-873 on the formalin test. Derivative was injected intraperitoneally 15 min before formalin, the antinociceptive activity was observed for 30 min. Data are expressed as means of reactivity (time spent by animal licking or biting the injected paw) \pm SEM. * $P < 0.05$ relative to control group (DMSO).

drawal from 5.1 ± 0.2 to 2.0 ± 0.1 s (after 30 min) (Fig. 3). Indomethacin (2 mg/kg, i.p.) produced total recovery of carrageenan-induced hyperalgesia during 180 min. At 4 mg/kg, the heterotricyclic derivative LASSBio-873 inhibited the development of thermal hyperalgesia induced by carrageenan for 45 min. The latency was recovered to 5.0 ± 0.5 s after 30 min. At 6 mg/kg, the derivative abolished the hyperalgesic effect of carrageenan during 180 min similarly to indomethacin.

To demonstrate if the antinociceptive effect of LASSBio-873 was also related with the activation of muscarinic system, atropine (2 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the derivative. At 6 mg/kg, the derivative could abolish carrageenan-induced nociceptive effect during all protocol, with a maximal effect after 30 min, when the latency was 5.6 ± 0.6 s. As shown in Fig. 3, in the presence of atropine, latency was 2.2 ± 0.2 s, indicating the involvement of the cholinergic system. Flumazenil (20 mg/kg), yohimbine (5 mg/kg) and naloxone (1 mg/kg) did not modify the effect of LASSBio-873 on carrageenan test. Latency for paw withdrawal was 5.1 ± 0.9 , 4.6 ± 0.4 and 4.9 ± 0.5 s, respectively. Administration of all antagonists alone did not interfere with the carrageenan test.

4. Discussion

In the present work we demonstrated that unlike zolpidem, whose sedative and hypnotic profile is related to the benzodiazepine pathway, LASSBio-873-induced sedation may involve the activation of the cholinergic system since it was prevented by the non-selective muscarinic antagonist atropine and by the selective M₁ subtype antagonist pirenzepine.

It is generally believed that locomotor activity results from brain activation, which is manifested as an excitation of central neurons and an increase in cerebral metabolism. While different neurochemical mechanisms are involved in brain activation, dopamine appears to play an essential role in this process (Le and Simon, 1991; Lee et al., 2008; Salamone et al., 2005). Likewise, a proper balance between striatal cholinergic and dopaminergic neurotransmission is required for coordinated locomotor control (Calabresi et al., 2000; Di Chiara et al., 1994; Graybiel, 1990). Acetylcholine-mediated neurotransmission has a crucial role in the control of voluntary movement exerted by the striatum and, accordingly, this brain area contains some of the highest level of acetylcholine and muscarinic receptors in the central nervous system (Calabresi et al., 2000; Graybiel et al., 1994; Hersch

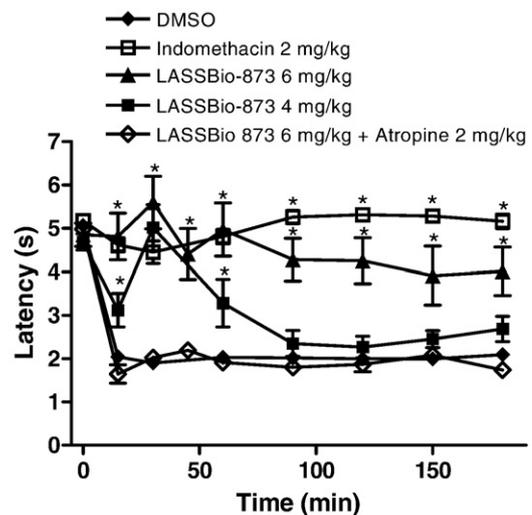


Fig. 3. Effects of LASSBio-873 on the carrageenan test. Derivative was injected intraperitoneally right before carrageenan, the antihyperalgesic activity was observed for 180 min. Data are expressed as means of latency of withdrawal threshold \pm SEM. * $P < 0.05$ relative to control group (DMSO).

et al., 1994). It is assumed that acetylcholine acting at muscarinic receptors exerts an inhibitory effect on dopaminergic neurotransmission in the striatum (Eckmann et al., 1988). M₁ and M₃ receptors promote phosphatidyl inositol hydrolysis and intracellular Ca²⁺ mobilization, whereas M₂ receptors are negatively coupled to adenylate cyclase activity (Hulme et al., 1990). These receptors exert both presynaptic and postsynaptic effects on striatal cells and mediate opposite effects on striatal synaptic plasticity (Calabresi et al., 2000). Studies have shown that M₁ receptor-deficient mice have significantly elevated levels of extracellular dopamine in the striatum and that this is most likely attributable to M₁ receptors located on extrastriatal neurons projecting to the striatum (Zhang et al., 2002). All these facts indicate that activation of muscarinic receptors is involved in the regulation of locomotor activity.

Besides sedative profile, LASSBio-873 also showed pronounced antinociceptive and antihyperalgesic activities in two different models of inflammatory pain, formalin and carrageenan tests. The subcutaneous injection of formalin produces a biphasic response characterized by an immediate and intense increase in the spontaneous activity followed by a quiescent phase and then a more prolonged increase in cell firing of both primary afferents (Heapy et al., 1987; Puig and Sorkin, 1995; Shannon et al., 2001) as well as dorsal horn neurons (Dickenson and Sullivan, 1987). LASSBio-873 only significantly reduced the late phase of formalin test and this effect was reverted by the pre-treatment with atropine. Similarly, the cholinesterase inhibitor physostigmine was shown to reduce the second phase of formalin-induced pain, which was prevented by atropine pre-treatment (Mojtahedin et al., 2008). Moreover, studies have shown that non-selective muscarinic agonists reduce the responses to formalin (Capone et al., 1999; Barocelli et al., 2001; Shannon et al., 2001).

Carrageenan produces an inflammation that can generate a state of spinal cord sensitization in which noxious stimulus produces an exaggerated response (hyperalgesia) and a normally non-noxious stimulus can produce a nocifensive response (allodynia) to both thermal and mechanical stimuli (Hargreaves et al., 1988). This central sensitization is accompanied by increases in the magnitude of C-fiber evoked responses and decreases in descending inhibition without increases in spontaneous firing of C-fiber afferents (Stanfa et al., 1992; Traub, 1997). The effect of LASSBio-873 on carrageenan test was also prevented by atropine, indicating that, as in the locomotor activity test, LASSBio-873-induced antinociception seems to involve the activation of the cholinergic system.

Modulation of antinociception can occur through different physiological systems, including opioid, adrenergic, cholinergic and GABAergic systems. Moreover, interaction and crosstalk between pathways is important for pain signalling. However, the antinociceptive effects of LASSBio-873 seem to be mediated primarily by the cholinergic system, since they were only blocked by atropine.

Muscarinic cholinergic receptors are abundant throughout pain pathways from dorsal root ganglia to somatosensory cortex and therefore could modulate processing of sensory information at several levels (Shannon et al., 1997; Tata et al., 2000). Muscarinic receptors are specially localized on the superficial laminae of the dorsal horn in rats where they terminate nociceptive fibers A δ and C (Abelson and Höglund, 2002; Shannon et al., 2001). By mimicking the release of ACh in the spinal cord, muscarinic agonists can reduce the release of glutamate (Li et al., 2002; Jones and Dunlop, 2007; Pan et al., 2008) attenuating the excitatory signals, and can enhance the inhibitory GABAergic tone (Li et al., 2002; Pan et al., 2008). In addition to the descending inhibition through direct activation of the dorsal horn neurons, muscarinic agonists may also act indirectly by modulating the nitric oxide pathways (Eisenach, 1999).

The precise mechanisms through which LASSBio-873 exerts its action still remain unclear, but activation of the cholinergic system seems largely to account for its sedative and antinociceptive activities

(formalin and carrageenan tests). The cholinergic system offers a number of possible targets for pain transmission and nervous system activity modulation, indicating its therapeutic potential for the development of new drugs. LASSBio-873 is a novel prototype of drug that modulates muscarinic activity and could be used for neuropsychiatric and cognitive disorders and other conditions associated to acute and chronic pain.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, BR), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, BR), Fundação Universitária Jose Bonifácio (FUJB, BR), Pensa Rio - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, BR) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia/Fármacos (CNPq/FAPERJ, BR) for financial support and fellowships from CAPES (to JMR, TFM) and CNPq (to GZS, RTS, NMNJ, CAMF, EJB).

References

- Abelson KS, Höglund AU. Intravenously administered oxotremorine and atropine, in doses known to affect pain threshold, affect the intraspinal release of acetylcholine in rats. *Pharmacol Toxicol* 2002;90(4):187–92.
- Adamik A, Telegdy G. Involvement of different receptors in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induced open field activity in rats. *Neuropeptides* 2004;38(1):16–20.
- Anjaneyulu M, Chopra K. Possible involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in fluoxetine mediated antinociceptive response in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2006;538(1–3):80–4.
- Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, De Amici M, Impicciatore M. Evidence for specific analgesic activity of a muscarinic agonist selected among a new series of acetylenic derivatives. *Life Sci* 2001;68(15):1775–85.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 2000;23:120–6.
- Capone F, Aloisi AM, Carli G, Sacerdote P, Pavone F. Oxotremorine-induced modifications of the behavioral and neuroendocrine responses to formalin in male rats. *Brain Res* 1999;830:292–300.
- Depoortere H, Zivkovic B, Lloyd KG, Sanger DJ, Perrault G, Langer SZ, et al. Zolpidem, a novel nonbenzodiazepine hypnotic. I. Neuropharmacological and behavioral effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237(2):649–58.
- Di Chiara G, Morelli M, Consolo S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: acetylcholine/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* 1994;17:228–33.
- Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987;30:349–60.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1997;4(2):161–74.
- Eckmann F, Fichte K, Meya U, Sastre-y-Hernández M. Rolipram in major depression: results of a double-blind comparative study with amitriptyline. *Curr Ther Res* 1988;43:291–5.
- Eisenach JC. Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci* 1999;64(6–7):549–54.
- Fahey JM, Grassi JM, Reddi JM, Greenblatt DJ. Acute zolpidem administration produces pharmacodynamic and receptor occupancy changes at similar doses. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83(1):21–7.
- Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1990;13:244–54.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 1994;265(5180):1826–31.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77–88.
- Heapy CG, Jamieson A, Russell NJW. Afferent C-fiber and A-delta activity in models of inflammation. *Br J Pharmacol* 1987;90:164P.
- Hersch S, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI. Distribution of m1–m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtypespecific antibodies. *J Neurosci* 1994;14:3351–63.
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:633–73.
- Jones PG, Dunlop J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology* 2007;53(2):197–206.
- Kaur R, Chopra K, Singh D. Role of alpha2 receptors in quercetin-induced behavioral despair in mice. *J Med Food* 2007;10(1):165–8.
- Knabl J, Zeilhofer UB, Crestani F, Rudolph U, Zeilhofer HU. Genuine antihyperalgesia by systemic diazepam revealed by experiments in GABA_A receptor point-mutated mice. *Pain* 2009;141(3):187–8.
- Le MM, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 1991;71:155–234.

- Lee K-W, Tian Y-H, You I-J, Kwon S-H, Ha R-R, Lee S-Y, et al. Blockade of M1 muscarinic acetylcholine receptors modulates the methamphetamine-induced psychomotor stimulant effect. *Neuroscience* 2008;153(4):1235–44.
- Li DP, Chen SR, Pan YZ, Levey AI, Pan HL. Role of presynaptic muscarinic and GABA(B) receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *J Physiol* 2002;543:807–18.
- Menegatti R, Silva GM, Zapata-Sudo G, Raimundo JM, Sudo RT, Barreiro EJ, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of new neuroactive pyrazolo[3, 4-b]pyrrolo[3, 4-d]pyridine derivatives with in vivo hypnotic and analgesic profile. *Bioorg Med Chem* 2006;14(3):632–40.
- Mojtahedin A, Tamaddonfard E, Zambouri A. Effects of mepyramine and famotidine on the physostigmine-induced antinociception in the formalin test in rats. *Pak J Biol Sci* 2008;11(22):2573–8.
- Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2008;117(1):141–61.
- Perićić D, Vlanić J, Strac DS. Sedative and anticonvulsant effects of zolpidem in adult and aged mice. *J Neural Transm* 2008;115(6):795–802.
- Pick CG, Chernes Y, Rigai T, Rice KC, Schreiber S. The antinociceptive effect of zolpidem and zopiclone in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81(3):417–23.
- Pini LA, Vitale G, Ottani A, Sandrini M. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280(2):934–40.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
- Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1995;64:345–55.
- Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:34–41.
- Sanger DJ, Depoortee H. The pharmacology and mechanism of action of zolpidem. *CNS Drug Rev* 1998;4:323–40.
- Sanger DJ, Joly D, Zivkovic B. Effects of zolpidem, a new imidazopyridine hypnotic, on the acquisition of conditioned fear in mice. Comparison with triazolam and CL 218,872. *Psychopharmacology (Berl)* 1986;90(2):207–10.
- Savić MM, Obradović DI, Ugresić ND, Cook JM, Yin W, Bokunjić DR. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and beta-CCT. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79(2):279–90.
- Shannon HE, Sheardown MJ, Bymaster FP, Calligaro DO, Delapp NW, Gidda J, et al. Pharmacology of butylthio[2.2.2] (LY297802/NNC11-1053): a novel analgesic with mixed muscarinic receptor agonist and antagonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281(2):884–94.
- Shannon HE, Jones CK, Li DL, Peters SC, Simmons RM, Iyengar S. Antihyperalgesic effects of the muscarinic receptor ligand vedaclidine in models involving central sensitization in rats. *Pain* 2001;93(3):221–7.
- Stanfa LC, Sullivan AF, Dickenson AH. Alterations in neuronal excitability and the potency of spinal mu, delta and kappa opioids after carrageenan-induced inflammation. *Pain* 1992;50:345–54.
- Tanaka M, Suemaru K, Watanabe S, Cui R, Li B, Araki H. Comparison of short- and long-acting benzodiazepine-receptor agonists with different receptor selectivity on motor coordination and muscle relaxation following thiopental-induced anesthesia in mice. *J Pharmacol Sci* 2008;107(3):277–84.
- Tata Am, Vilaró Mt, Mengod G. Muscarinic receptor subtypes expression in rat and chick dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;82(1–2):1–10.
- Traub RJ. Spinal modulation of the induction of central sensitization. *Brain Res* 1997;778:34–42.
- Yin LL, Zhu XZ. The involvement of central cholinergic system in (+)-matrine-induced antinociception in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:419–25.
- Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS, Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1–M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci* 2002;22(15):6347–52.
- Zhang H, Zhang YQ, Qiu ZB, Zhao ZQ. Inhibitory effect of intrathecal meptazinol on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett* 2004;356(1):9–12.
- Zomkowski AD, Santos AR, Rodrigues AL. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett* 2005;381(3):279–83.



Microwave-assisted synthesis and structure–activity relationships of neuroactive pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives

Nailton M. Nascimento-Júnior^{a,b}, Thaiana C. F. Mendes^{c,d}, Daniella M. Leal^c, Claudia Maria N. Corrêa^c, Roberto T. Sudo^c, Gisele Zapata-Sudo^c, Eliezer J. Barreiro^{a,b,c,d}, Carlos A. M. Fraga^{a,b,c,d,*}

^aLaboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68023, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-9000, RJ, Brazil

^cPrograma de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-900, RJ, Brazil

^dPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-000, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2009

Revised 7 November 2009

Accepted 10 November 2009

Available online 16 November 2009

Keywords:

Hetero Diels–Alder

Microwave

Cycloaddition

Pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine

Sedative agents

Muscarinic agonists

Molecular simplification

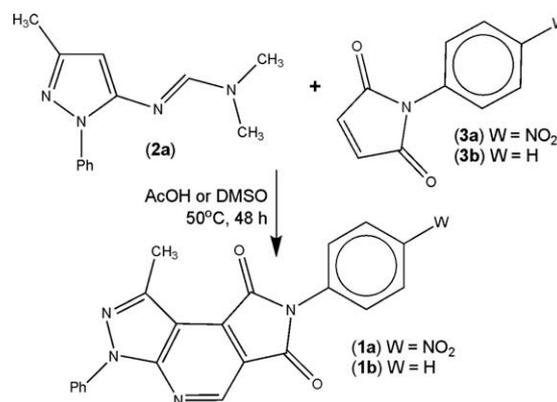
ABSTRACT

We described herein the optimization of the synthetic methodology exploited to obtain the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine sedative prototype **1a** and novel analogues designed by successive molecular simplifications. By applying microwave irradiation during the hetero Diels–Alder key-step to obtain the heterotricyclic scaffold, under solvent-free conditions, we were able to obtain the desired compounds in drastically shorter times and better yields. Additionally, *in vivo* evaluation of the sedative effects of these heterocyclic derivatives showed that **1a** and the novel structurally-related analogue **1e** were the most efficient compounds to impair the locomotor activity in mice at the dose of 10 μmol/kg.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Among the most frequently used therapeutic classes, the CNS-acting drugs correspond to ca. 15% of the total, with worldwide sales of around US\$ 118 billion in 2008.¹ In this context, many efforts to develop novel sedative/hypnotic drugs, presenting increased potency and reduced side effects, have been made in order to assure the availability of suitable alternatives for the treatment of sleep-disorders.² Previous works from our research group have described the discovery of two novel sedative and analgesic agents (**1a**) and (**1b**),³ belonging to the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine series, which displayed their CNS actions as muscarinic M₁ receptor agonists.⁴ Although these heterotricyclic compounds presented remarkable neuroactive profile, further pre-clinical studies were strongly limited by the synthetic approach used to construct them. The functionalized pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives (**1a**) and (**1b**) were prepared in very low yields (20–35%), after long reaction time (48 h), through hetero Diels–Alder cycloaddition between the formamidine (**2a**) and the corresponding *N*-phenylmaleimide (**3**), under conventional heating,³ using AcOH or DMSO as solvent (Scheme 1).

Hetero Diels–Alder reactions between pyrazolyl-2-azadienes and nitroalkenes,⁵ propiolates or maleimides⁶ using conventional heating are known to be difficult due to the hard conditions required and either do not occur or take a long time to produce the desired product in low yields.^{3,7}



Scheme 1. Synthesis of heterotricyclic derivatives (**1**) exploiting hetero Diels–Alder reaction at the key-step, by using conventional heating.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25626503; fax: +55 21 25626478.
E-mail address: cmfraga@ccsdecania.ufrj.br (C.A.M. Fraga).

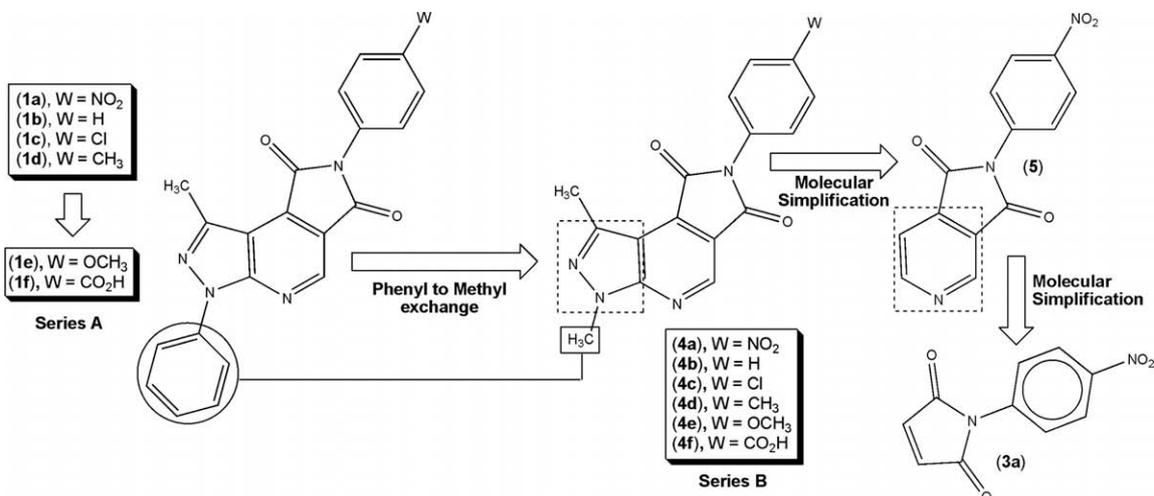


Figure 1. Design concept of pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives of series A (**1**), B (**4**), and their simplified analogues (**5**) and (**3a**).

Alternatively, the use of microwave irradiation under solvent-free conditions has proved to dramatically improve the process for obtaining new heterocyclic scaffolds exploiting Diels–Alder reaction as the key-step.⁵

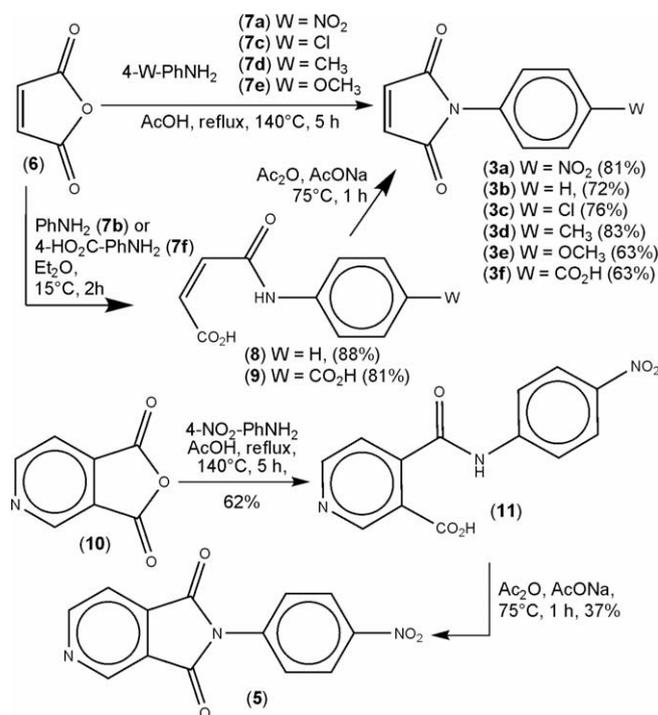
Considering this panorama, we described herein the optimization of the synthetic route to obtain the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivative (**1a**) and some previously described analogues (**1b–1d**) using microwave-assisted synthesis for the hetero Diels–Alder step under solvent-free conditions. Thus, we propose the enlargement of the congeneric series by the introduction of the isosteric carboxyl group and the electron-donating methoxy substituent at the *W* position (series A, Fig. 1).

Moreover, we exploited the developed methodology to synthesize a new series of simplified heterocyclic analogues (**4a–4f**) designed by changing the pyrazole-attached *N*-phenyl by a *N*-methyl group in order to investigate the stereoelectronic and the lipophilic influences at this position on the sedative profile of pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives (Fig. 1).

On the other hand, the exploitation of successive molecular simplifications on the structure of sedative prototype (**1a**) led us to the design of the 3-pyridinylphthalimide (**5**) and 4-nitrophenylmaleimide (**3a**) derivatives, as a result of the suppression of the pyrazole and the pyridine rings (Fig. 1). The comparative evaluation of the sedative profile displayed by these heterocyclic derivatives on the locomotor activity in mice⁸ provided a better understanding of structure–activity relationships associated with their CNS actions.

Initially, the six functionalized *N*-phenylmaleimides (**3a–3f**) were prepared starting from maleic anhydride (**6**) and the corresponding *para*-substituted anilines (**7**).

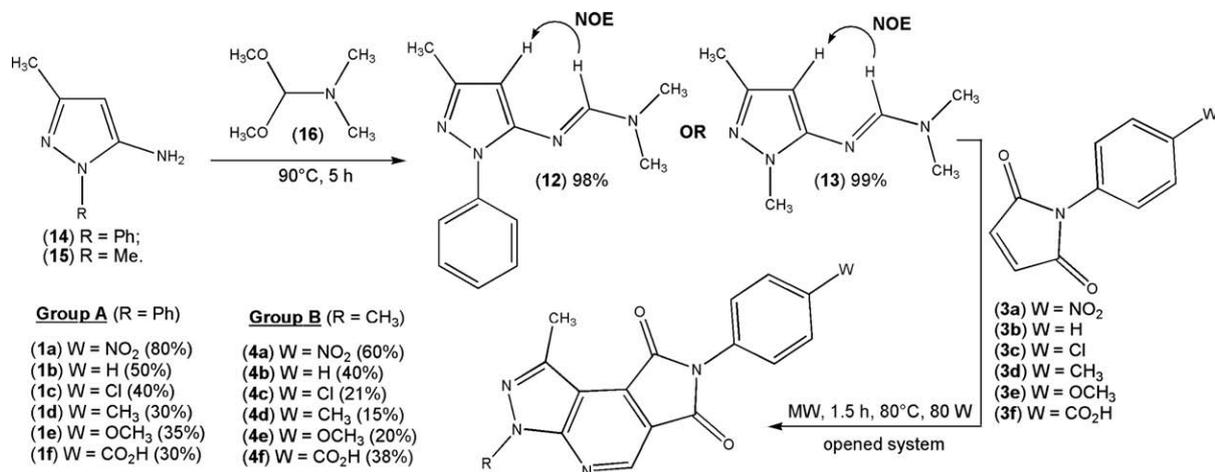
In order to obtain the desired *N*-phenylmaleimides (**3**), the different behavior of this reaction, determined by distinct solubility and nucleophilicity of the exploited anilines, was taken into consideration. Thus, only the *N*-phenylmaleimides (**3a–3d**) were prepared, in yields ranging from 63% to 83%, by refluxing a mixture of (**6**) and (**7**) in acetic acid⁹ (Scheme 2). On the other hand, the attempt to prepare the unsubstituted *N*-phenylmaleimide (**3b**) and the 4-carboxyphenylmaleimide (**3f**) under the same conditions led to the formation of the carboxy-amide intermediates (**8**) or (**9**), respectively, accompanied by other undesired subproducts. To avoid this problem, another two-step methodology was selected to prepare these two *N*-phenylmaleimides, using ethyl ether as solvent in the first step, followed by cyclization of the obtained carboxy-amide derivatives (**8**) and (**9**) after treatment with sodium acetate in acetic anhydride¹⁰ (Scheme 2). Azaphthalimide deriva-



Scheme 2. Synthesis of the functionalized *N*-phenyl maleimides (**3a–3f**) and *N*-phenyl azaphthalimide (**5**).

ive (**5**) was prepared in 23% overall yield (2 steps) through the initial condensation of 3,4-pyridinedicarboxylic anhydride (**10**) and *para*-nitroaniline (**7a**) in acetic acid at reflux, followed by cyclization of the carboxy-amide (**11**) with AcONa in acetic anhydride (Scheme 2).

The azadienes (**2a**) and (**2b**) were prepared as described previously,³ in almost quantitative yields through the condensation of the corresponding pyrazolamines (**12**) or (**13**) and DMF dimethylacetal (**14**) (Scheme 3). The relative configuration (*E*) at imine double bond of azadienes (**12**) and (**13**) was determined by ¹H NMR, through the irradiation of the C-4 attached pyrazole hydrogen and the evidence of a NOE effect at imine hydrogen (Scheme 3). This configuration is important to assure the formation of hetero Diels–Alder adduct presenting antiperiplanar orientation between the *N,N*-dimethylamino group and the vicinal hydrogen able to



Scheme 3. Synthesis of pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives (**1a–1f**) and (**4a–4f**) exploiting hetero Diels–Alder reaction under microwave irradiation in solvent-free conditions.

produce the desired heterocyclic derivatives (**1**) and (**4**) after elimination and oxidative aromatization steps.⁷

Next, in order to optimize the hetero Diels–Alder key-step we proceeded to the investigation of cycloaddition between (**2a**) and (**3a**) under microwave irradiation and solvent-free conditions, starting with 80 W, at 50 °C for 30 min.

The microwave tube used was exposed to atmospheric oxygen throughout the experiments to favor the oxidative aromatization step after Diels–Alder adduct formation.⁷ Besides these initial conditions, the temperature was systematically increased from 50 to 60, 70, 80 and 90 °C, but (**1a**) was obtained in highest yield (35%) at 80 °C. When the temperature was 90 °C and/or the power was changed to 90 W, degradation of (**4**) was detected by TLC. After setting the power to 80 W, the temperature at 80 °C and extending the time of the reaction to 60, 90 and 120 min, (**1a**) was obtained in 50%, 80% and 75% yields, respectively, after work-up by washing with warm MeOH (ca. 60 °C). All other heterocyclic derivatives of series A (**1b–1f**) and B (**4a–4f**) were synthesized following the same methodology (80 W, 80 °C, 90 min., **Scheme 3**) and their structures are in agreement with analytical and spectral data.

The sedation produced by derivatives (**1a–1f**), (**4a–4f**) and simplified analogues (**5**) and (**3a**) was investigated using locomotor activity test in mice⁸ (**Table 1**). The intraperitoneal administration of a screening dose of 10 μmol/kg for all these compounds revealed that *para*-nitro derivative (**1a**) and the novel *para*-methoxy derivative (**1e**), both from series A, presented the highest sedative activity, being able to reduce the number of movements/minute of treated animals from 214.4 ± 18.9 to 87.6 ± 16.2* and 108.6 ± 14.9* mov/min., respectively. These values are statistically equivalent to the reference drug, midazolam (**Table 1**). Even though the nitro and the methoxy groups at the W position (**Fig. 1**) exhibit different electronic characteristics, compounds (**1a**) and (**1e**) did not present significant differences in sedative activity probably due to the capability of these two groups, potential pharmacophoric points, to be recognized as H-bond acceptors with complementary residues of occasional target bioreceptors. This interaction seems to be essential for the effect investigated, once the corresponding unsubstituted compound (**1b**) and the two *para*-substituted derivatives (**1c**) and (**1d**) were not able to affect significantly the motor activity in animals. An exception to this behavior was observed in carboxyl derivative (**1f**), which did not impair the locomotor activity in animals, probably due to pharmacokinetic factors resulting from its ionization *in vivo*. As evidenced for compound (**1a**), the CNS effects of (**1e**) were reversed by the pre-treatment of animals with atropine, indicating that it could also act as a muscarinic agonist.⁴

Table 1

Effects of midazolam, pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives (**1a–1f**), (**4a–4f**) and the simplified analogues **5** and **3a** on the locomotor activity in mice⁸

Compound	Series	Motor activity ^a (mov/min)
Control	—	214.4 ± 18.9
Midazolam ^b	—	79.7 ± 25.1*
1a	A	87.6 ± 16.2*
1b	A	266.6 ± 30.6
1c	A	154.3 ± 24.3
1d	A	161.7 ± 29.2
1e	A	108.6 ± 14.9*
1f	A	174.2 ± 21.8
4a	B	141.0 ± 25.8
4b	B	208.6 ± 11.4
4c	B	133.4 ± 16.3
4d	B	187.4 ± 23.0
4e	B	150.6 ± 15.7
4f	B	128.3 ± 20.6
5	—	189.0 ± 16.76
3a	—	148.0 ± 13.85

^a All derivatives were administered ip (10 μmol/kg) and motor activity was determined during 40 min after injection. Data are expressed as means of the movements per minute ± SEM.

^b Administered at the dose of 2 mg/kg.

* *P* < 0.05 relative to the control group (DMSO) (statistic test: ANOVA followed by Dunn's test).

In addition, the compounds of series B, presenting a methyl group instead of a phenyl subunit attached to the N-1 position of the pyrazole ring, were able to display no significant sedative activity. Only derivatives **4c** (133.4 ± 16.3 mov/min) and **4f** (128.3 ± 20.6 mov/min) presented slight ability to reduce the locomotor activity in mice. These results highlight the possible influence of the phenyl group bonded to the pyrazole ring of the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine system to potentiate the sedative profile of these heterotricyclic derivatives. This behavior was confirmed through the comparative evaluation of the sedative activity of four nitro derivatives⁸ presenting sequential molecular simplifications—**1a** (87.6 ± 16.2* mov/min), **4a** (141.0 ± 25.8 mov/min), **5** (189.0 ± 16.76 mov/min) and **3a** (148.0 ± 13.85 mov/min)—which have indicated that all subunits contained in the scaffold of series A seem to be important for the observed remarkable effects of compound (**1a**) on the locomotor activity test.

As concluding remarks, the optimization of the experimental conditions exploited to access heterocyclic derivatives presenting pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine scaffold, through microwave-assisted hetero Diels–Alder reaction, permitted their synthesis in higher yields and shorter times in comparison with the conventional heating strategy previously described. The molecular

simplification study confirmed that almost all the subunits present in the structure of derivatives of series A are crucial to promote the sedative effect, as it was observed for derivative **1a** and the novel analogue **1e**. Taking together, these results make the multigram synthesis of prototype **1a** and its analogues possible, enabling the next steps towards the development of these heterotricyclic derivatives into innovative sedative agents.

Acknowledgments

The authors thank CAPES (BR), CNPq (BR), FAPERJ (BR), PRONEX (BR) and INCT-INOVAR (BR, #573.564/2008-6) for financial support and fellowships.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bmcl.2009.11.038](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.038).

References and notes

1. <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/global-brain-drugs-market-review-2008/3fy5eowy8suq3/1#>
2. Korzh, M. *Sleep Med.* **2007**, *8*, 578.
3. Menegatti, R.; Silva, G. M. S.; Zapata-Sudo, G.; Raimundo, J. M.; Sudo, R. T.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 632.
4. Mendes, T. C. F.; Raimundo, J. M.; Nascimento, N. M., Jr.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Zapata-Sudo, G. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, *94*, 70.
5. (a) Díaz-Ortiz, A.; Carrilo, J. R.; Gómez-Escalonilla, M. J.; de la Hoz, A.; Moreno, A.; Prieto, P. *Synlett* **1998**, 1069; (b) Díaz-Ortiz, A.; Carrilo, J. R.; Cossio, F. P.; Gómez-Escalonilla, M. J.; de la Hoz, A.; Moreno, A.; Prieto, P. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1569.
6. Díaz-Ortiz, A.; de La Hoz, A.; Langam, F. *Green Chem.* **2000**, *2*, 165.
7. Mason, H. J.; Wu, X.; Schmitt, R.; Macor, J. E.; Yu, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8931.
8. Mara, S.; Diaz-Veliz, G.; Lungenstrass, H.; Garcia-Gonzalez, M.; Coto-Morales, T.; Poletti, C.; De Lima, T. C. M.; Herrera-Ruiz, M.; Tortoriello, J. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 191.
9. Lima, L. M.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 3291.
10. Cava, M. P.; Deana, A. A.; Muth, K.; Mitchell, A. *J. Org. Synth. Coll.* **1973**, *5*, 944.

Review

MAOS and Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years

Nailton M. Nascimento-Júnior ^{1,2,*}, Arthur E. Kümmerle ³, Eliezer J. Barreiro ^{1,2,4} and Carlos A. M. Fraga ^{1,2,4,*}

¹ Laboratório de Avaliação e Síntese de substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68023, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-900, RJ, Brazil

³ Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, RJ, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: cmfraga@ccsdecania.ufrj.br; Tel.: +55-21-2562-6503; Fax: +55-21-2562-6478.

Received: 16 September 2011; in revised form: 17 October 2011 / Accepted: 26 October 2011 /

Published: 7 November 2011

Abstract: This review aims to highlight microwave-assisted organic synthesis as applied to medicinal chemistry in the last years, showing some reactions performed under microwave irradiation for the synthesis of distinct structurally molecules of biological interest, divided into the following groups: antineoplastics, anti-inflammatory, antimicrobial agents, antivirals, agents for the treatment of neglected diseases and central nervous system-acting prototypes.

Keywords: microwave irradiation; medicinal chemistry; bioactive compounds; drug discovery

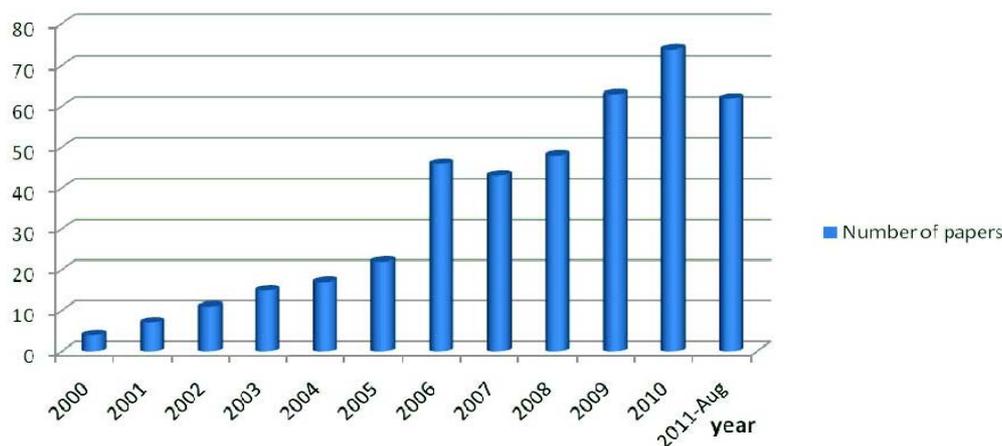
1. Introduction

The first reports describing the use of microwave irradiation in organic synthesis were published in 1986 by Gedye *et al.* and Giguere *et al.* [1,2]. After commercial microwave equipment became available (in the mid-1990s) the application of microwaves in organic chemistry has increased significantly, specially because of its positive effects, reducing reaction time and increasing yields. Consequently, problems related with reproducibility, safety and controlled conditions as temperature, stirring and pressure were solved, contributing to the development of the area of microwave-assisted organic synthesis (MAOS) [3]. In addition, new conditions, strategies and technologies were incorporated to MAOS, for example: solvent-free synthesis, which is an example of an eco-friendly approach [4], aqueous media reactions [5], multicomponent reactions [6], combinatorial chemistry [7], continuous flow reactions, microreactor reactions [8] and large scale reactions [9], showing that the problem related with the small amount of products obtained for pharmaceutical industry application is, maybe, about to be solved.

In the context of medicinal chemistry, a large variety of biologically interesting scaffolds obtained using MAOS is described in literature: indoles [10], quinoxalines, pyrido[2,3-*b*]pyrazines, thieno[3,4-*b*]pyrazines [11], quinazolines [12], [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyridines [13], porphyrines [14], 1,2,4-triazoles [15], 1,2,4-oxadiazoles [16], *N*-acylhydrazones [17], the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinone heteroaromatic subunit, present in the pharmaceutical drug sildenafil [18], *etc.*

The growth in the number of papers published in the medicinal chemistry area using microwave irradiation as a tool can be observed in the SCOPUS database [19] (Figure 1). We used the keyword “microwave” (in article title, abstract or keywords) and the main medicinal chemistry journals: “*Journal of Medicinal Chemistry*”, “*European Journal of Medicinal Chemistry*”, “*Bioorganic and Medicinal Chemistry*”, “*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*”, “*Molecules*”, “*ChemMedChem*”, “*Current Medicinal Chemistry*”, “*Journal of Pharmaceutical Sciences*” and “*Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*”. These results show the progressive increase in interest in the application of MAOS in drug discovery, as can be observed in the medicinal chemistry literature [20-22].

Figure 1. The number of papers published since the 2000th year (until August, 2011) in medicinal chemistry journals using the keyword “microwave” (www.scopus.com).



To illustrate the application of MAOS in medicinal chemistry, we have selected various examples of reactions and scaffolds of biological interest that can be obtained using microwave irradiation. For this purpose, these reactions were distributed according to therapeutic class into six areas: antineoplastics, anti-inflammatory, antimicrobial agents, antiviral, neglected diseases and central nervous system.

2. Antineoplastics

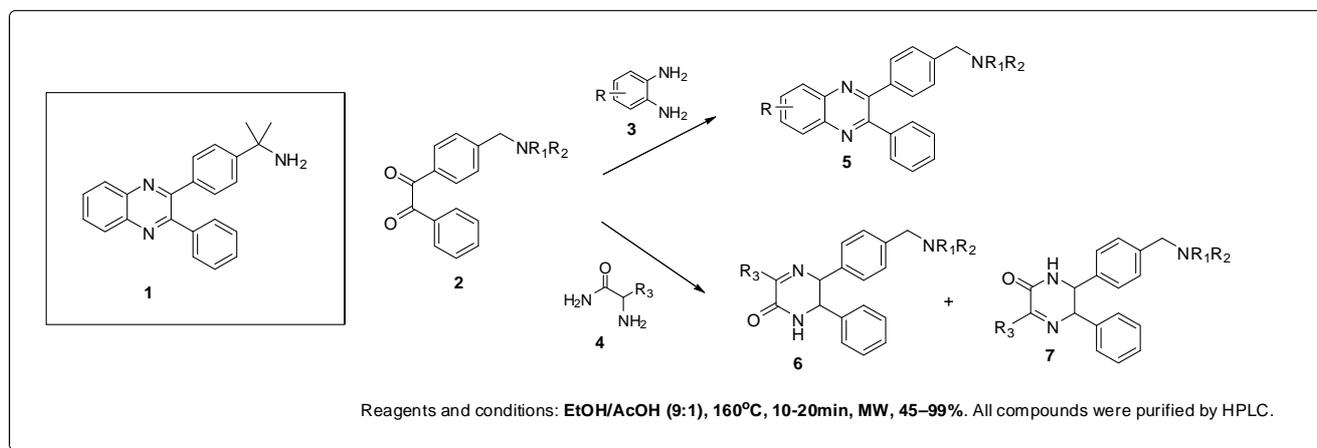
The pathophysiology of cancer is one in which a group of cells shows uncontrolled growth, tissue invasion, and sometimes metastasis. Neoplastic cells can be divided into benign, where the events of invasion and metastasis do not occur, and malignant. Cancer can affect individuals of all ages, but is most prevalent in older people, being responsible for the death of 7.9 million people worldwide in 2007 [23].

Several research groups have sought to use inhibitors of kinases as a way to combat cancer. Among these, one can cite the EGFR tyrosine kinase (endothelial growth factor receptor), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) and FGFR (vascular endothelial fibroblast growth factor receptor) and Bcr-Abl (target action imatinib), the PI3K (phosphatidylinositol 3'quinase), the cyclin-dependent kinases (CDK) and serine-threonine kinases such as MAPK (mitogen-activated protein kinase) [24].

Within the universe of serine-threonine kinases, Lindsley *et al.* decided to explore the synthesis and structure activity relationship of new selective allosteric inhibitors of Akt, a protein kinase B (PKB) recently described [25], using microwave irradiation for the construction of a chemical library of quinoxalines and pyrazinones from 1,2-diketone intermediates [26].

The authors used 2,3-diphenylquinoxaline **1**, a hit obtained by high throughput screening (HTS), and selective for isoforms 1 and 2, which are over expressed in several types of tumors, without action on PKA and PKC, as a prototype for the construction of its compounds (Figure 2).

Figure 2. Synthesis of allosteric Akt kinase inhibitors with antineoplastic activity.

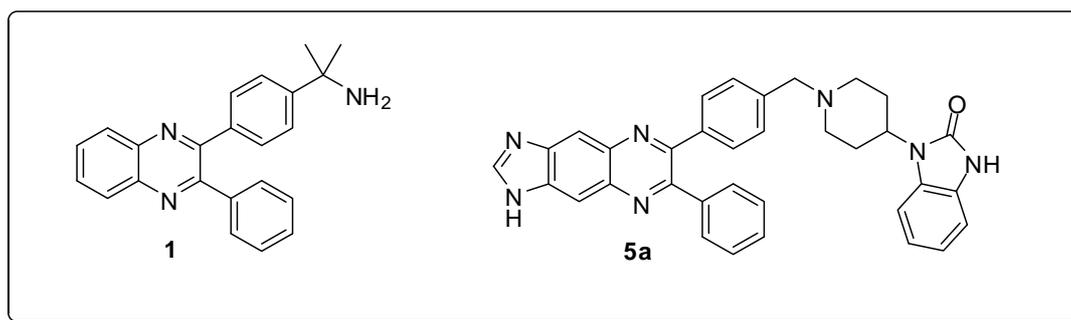


The use of microwave irradiation through a scientific microwave reactor, allowed the rapid preparation of a library containing approximately 250 chemical compounds through reactions of various 1,2-diketones **2** with 1,2-diaminobenzenes **3** or substituted α -aminocarboxamides **4**, using a

solvent mixture of EtOH/AcOH (9:1) at 160 °C for 10–20 min in yields ranging from 45 to 99%, after purification on preparative HPLC column.

The pharmacological evaluation of this chemolibrary demonstrated that several compounds were active on tumor cell lines, inhibiting allosterically the isoforms 1 and 2 of Akt, selectively, with potency in the nanomolar range. Moreover, compound **5a** (Figure 3) stood out, being able to inhibit the *in vivo* phosphorylation of Akt.

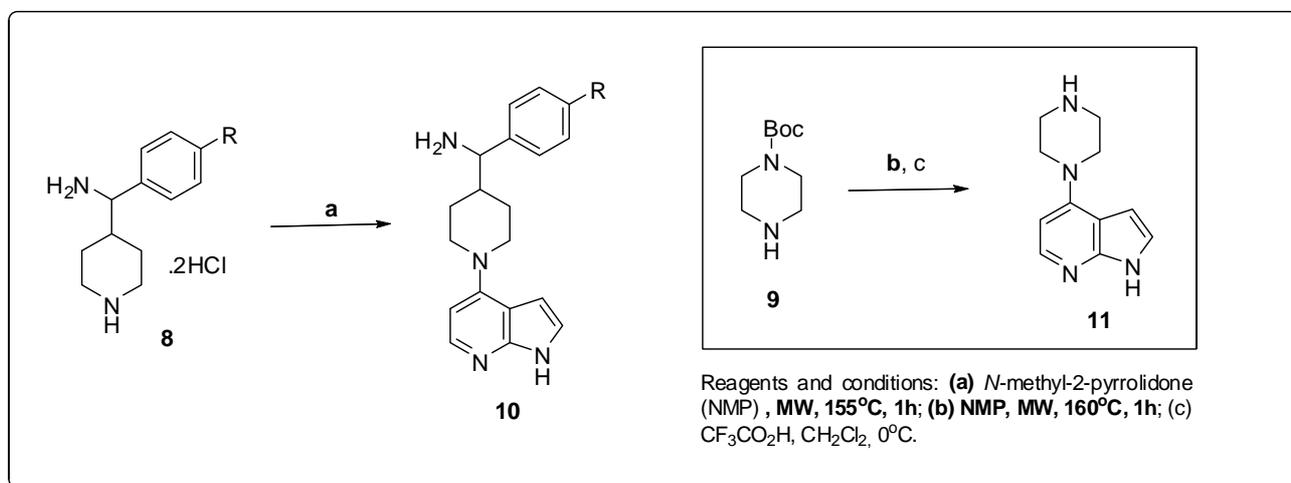
Figure 3. The diphenylquinoxaline **1** (*hit* obtained by HTS) and compound **5a**, compounds able to inhibit the *in vivo* phosphorylation of Akt.



The PI3K-PKB-mTOR intracellular kinase signaling cascade is a major component in controlling cell proliferation and survival [27]. The misregulation of this pathway is primarily associated with the development of tumors in humans, in this case, leads to a superexpression of PKB, making it a target for therapeutic interventions of proven efficacy in animal models [28].

Drug design based on crystallographic data structure, using chimeras of PKA and PKA-PKB, led to the discovery of new pyrrolo[2,3-*d*]pyridine compounds as selective inhibitors of PKB β , with potency in the nanomolar range and PKB/PKA selectivity values around 30 [29]. The final step used in the construction of these compounds passed through a nucleophilic aromatic substitution reaction (S_NAr) of secondary amines **8** and **9** with functionalized pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives (Figure 4).

Figure 4. Microwave synthesis of pyrrolo[2,3-*d*]pyridine inhibitors of PKB.

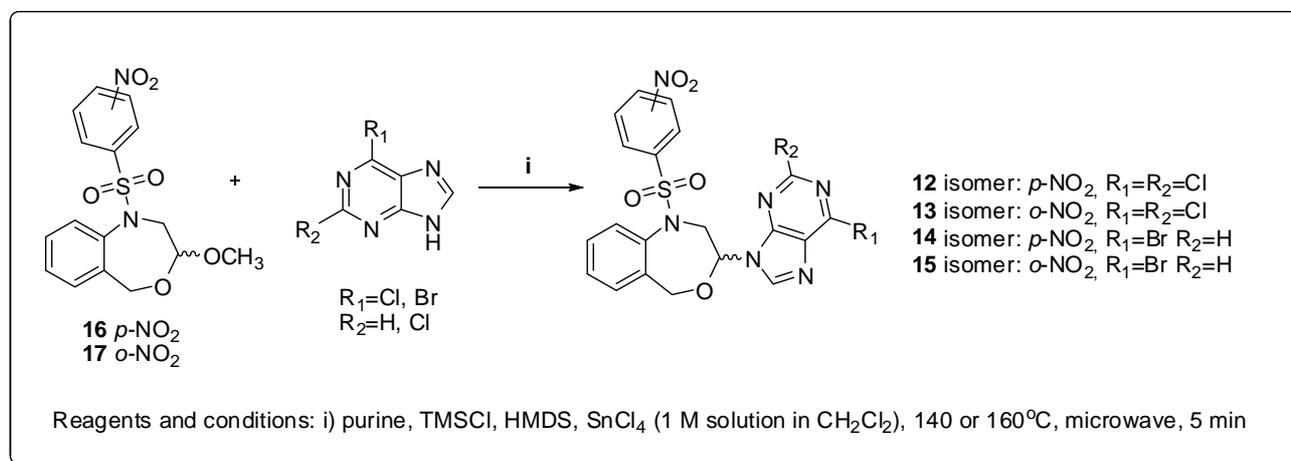


The reactivity in this step is very low under conventional heating, requiring drastic heating and long reaction times, in consequence, this reaction does not occur when less reactive amines are used. Through the use of a scientific microwave reactor, Caldwell *et al.* developed a new S_NAr methodology for halogenated purines which was then used in the synthesis of these PKB β inhibitors [30].

Several recent studies have shown a correlation between cell cycle regulation and cancer. Thus, cell cycle inhibitors are being considered a tool for the management of cancer [31]. Notably, many groups have sought effective molecules that act on targets involved in phases G_0/G_1 , such as cyclin D1, p53 and CdkIs for the control of inadequate cell proliferation [32].

In this context, a complete SAR study was performed for a group of (*R,S*)-6-substituted-7- or 9-(1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl)-7*H* or 9*H*-purines for their anticancer activity [33]. The designed compounds **12–15** (Figure 5) were obtained by the microwave-assisted Vorbrüggen one-pot condensation of the cyclic acetals **16** and **17** [34] and the commercially available purine bases 6-chloro-, 6-bromo- and 2,6-dichloropurines, using chlorotrimethylsilane (TMSCl), 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS) and tin(IV) chloride as the Lewis acid in anhydrous acetonitrile in a scientific microwave reactor. Their antiproliferative activities on MCF-7 and MDA-MB-231 cancerous cell lines led to the discovery of an active enantiomeric mixture (*RS*)-2,6-dichloro-9-[1-(*p*-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9*H*-purine (**12**) that presented an IC_{50} of 0.166 μ M against the human cancerous cell line MDA-MB-231.

Figure 5. Preparation of the *O,N*-acetals anticancer derivatives **12–15**.



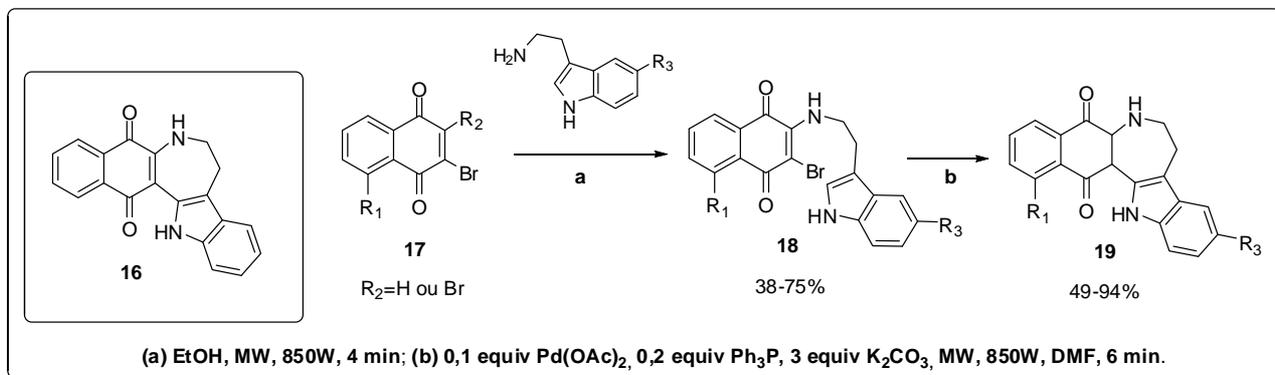
3. Anti-Inflammatory

The inflammatory process is a response to an aggression caused by an external agent and can be divided into acute and chronic inflammation, according to the time required to resolve it [35]. In this context, there are several targets for the treatment of inflammation and inhibition of pro-inflammatory cytokines, like the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukins (IL-6 and IL-1 β), that can be used for the treatment of rheumatoid arthritis, inflammatory intestinal diseases, medulla transplant-related rejection problems [36] and inflammatory diseases on the respiratory level [37].

Based on the anti-inflammatory effects of quinones obtained from natural products [38,39], Phutdhawong and co-workers have planned and synthesized a series of 1,6,7,8-tetrahydronaphtho[2,3-

d]azepino[4,5-*b*]indole-9,14-diones **16** (Figure 6) with inhibitory effects related with the pro-inflammatory cytokine production [40].

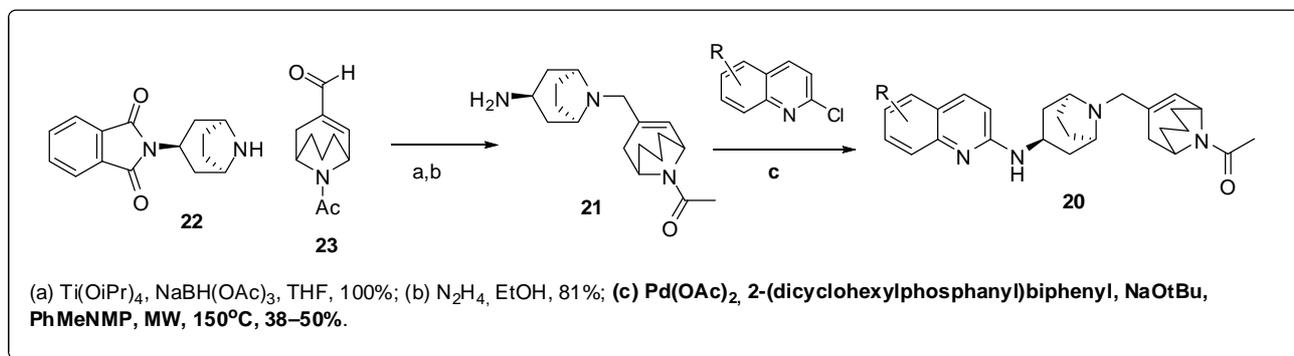
Figure 6. Synthesis of azepinonaphthoquinones with anti-inflammatory activity.



The synthetic route exploited to obtain the azepinonaphthoquinones **19** was based on the nucleophilic substitution reaction in bromonaphthoquinones **17** [41], followed by Pd-catalyzed intramolecular cyclization of **18**, using a domestic microwave oven. The products were obtained after extremely short reaction times, in good yields and without formation of reduction side products in the cyclization step (Figure 6). These results were important for the construction of this new series of heterocyclic derivatives that was able to reduce the production of pro-inflammatory cytokines *in vitro* assays.

Another anti-inflammatory approach consists in the antagonism of CXCR3 chemokine receptors, that are expressed mainly in T-lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺), B-lymphocytes, natural killer cells and astrocytes [42,43]. The antagonism of CXCR3 receptors are important to treat rheumatoid arthritis [44,45], multiple sclerosis, transplant rejection [46] and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [47]. For this propose, Knight and co-workers have described recently a series of 2-aminoquinolines **20** (Figure 7) with potent antagonist activity in CXCR3 and adequate physico-chemical properties, that have resulted in good bioavailability and *in vivo* activity [48].

Figure 7. Anti-inflammatory 2-aminoquinolines obtained using MAOS.



The aminotropanic derivative **21** used in the Knight work was obtained through the reductive amination between the amine **22** and the aldehyde **23**, followed by hydrazinolysis. To obtain the derivatives **20**, it was used a microwave-assisted amination reaction between **21** and the corresponding

chloroquinolines, using 2-(dicyclohexylphosphanyl)biphenyl as ligand, resulting in the formation of the desired product **20** in moderate yields (38–50%) [49].

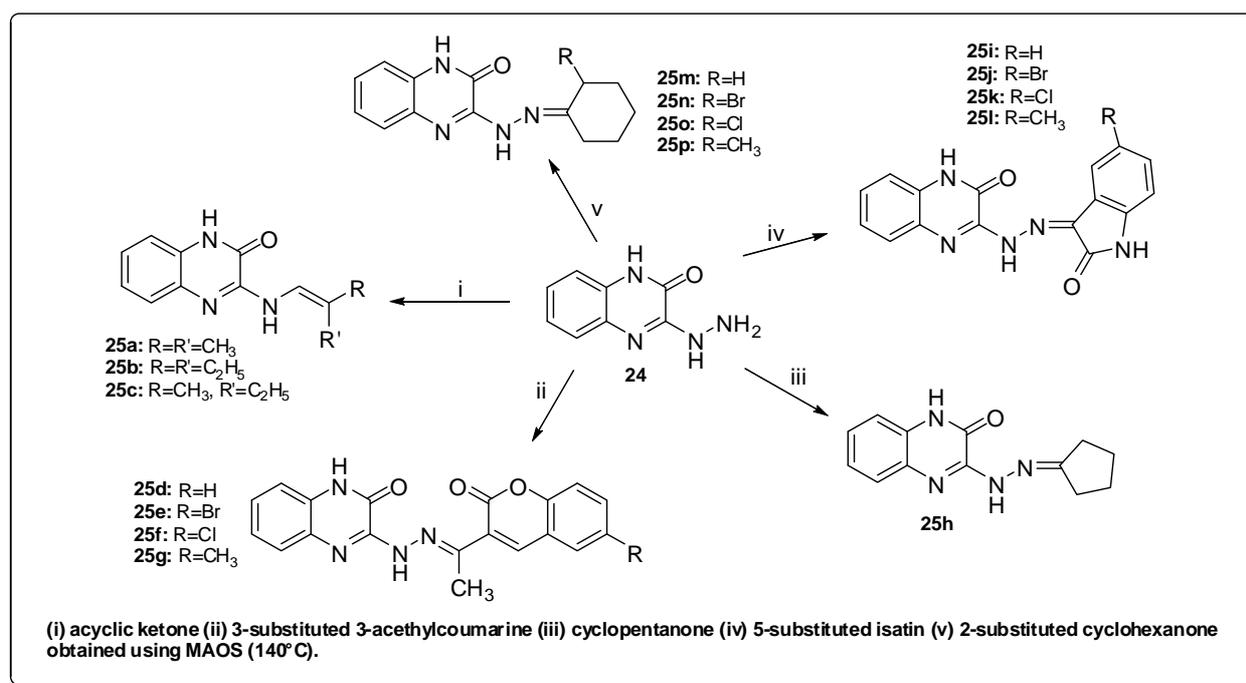
4. Antimicrobial Agents

Since the antibacterial sulfonamide drugs were introduced into clinical practice in 1936 (the beginning of antimicrobial therapy) great advances have been achieved in the chemotherapy of infectious diseases. After World War II, important antimicrobial agents were found, e.g., penicillin, and nowadays this therapeutical class is composed by an expressive diversity of drugs. The recognition of replication mechanisms in bacteria, fungi or virus have helped in the rational development of compounds able to interfere with some key steps of vital cycle of these microorganisms [50]. In addition, the strategy of using genomic information for the identification and characterization of new biotargets has improved the discovery process of novel antimicrobial prototypes targeting resistant strains of different types of microorganisms [51].

The *N*-acylhydrazones and *N*-arylhydrazones classes are described in the literature as presenting antimicrobial, anticonvulsant, analgesic, anti-inflammatory, antitumoral, antiplatelet (antiaggregant), antineoplastic and other activities [52,53]. In this context, Ajani and co-workers have described MAOS of a series of 2-quinoxalinone-3-hydrazone derivatives expected to exhibit antimicrobial profile [54].

The condensation of the key-intermediate 3-hydrazinoquinoxalin-2(*1H*)-one (**24**) with the corresponding ketone derivatives, by using a scientific microwave reactor, has resulted in the formation of hydrazone derivatives **25a–p** in very short times (1–3 minutes) and excellent yields (55–99%) (Figure 8) [54].

Figure 8. Synthesis of derivatives **25a–p**.



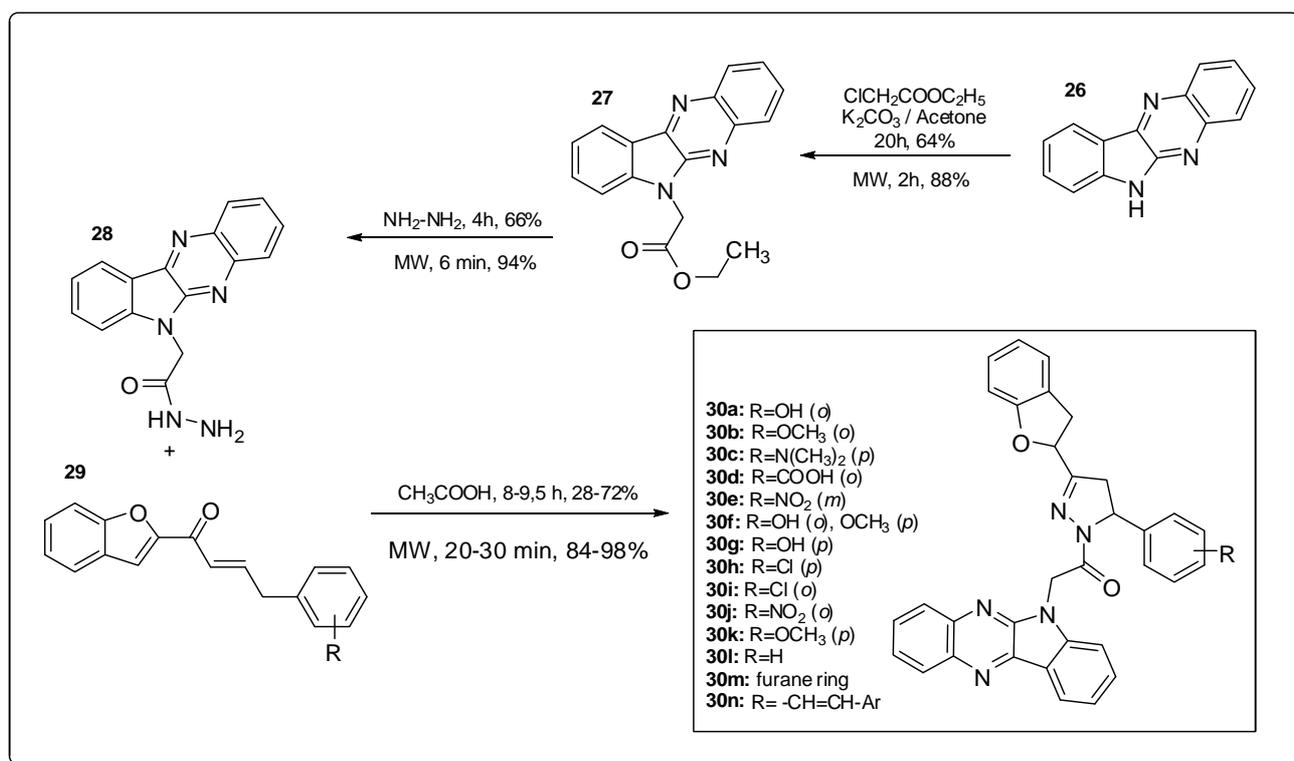
It was observed that *E. coli* and *K. pneumoniae* have developed resistance against streptomycin, while all the synthesized derivatives **25a–p** were active against these two microorganisms. The

evidenced inhibition zone is from 10 to 32 mm and the derivative **25f** stood out, showing the largest inhibition zone. Moreover, compound **25a** presented more pronounced antifungal activity against *C. albicans* [54].

The pyrazolines are well described in literature as having analgesic [55], anti-inflammatory [56], antibacterial [57], antifungal [57] and antitumoral [58] properties. As another examples of the use of MAOS applied to medicinal chemistry, Manna and co-workers described the synthesis of 1,3,5-tri-substituted indophenazyl-pyrazoline derivatives **30a–n** and their antimicrobial activity against multi-resistant bacteria [59].

The preparation of derivatives **30a–n** was conducted in a domestic microwave oven following the synthetic route shown in Figure 9. For this example, reaction time and yields are much better by using microwave irradiation in the place of conventional heating [59].

Figure 9. Synthesis of pyrazoline derivatives **30a–n**.



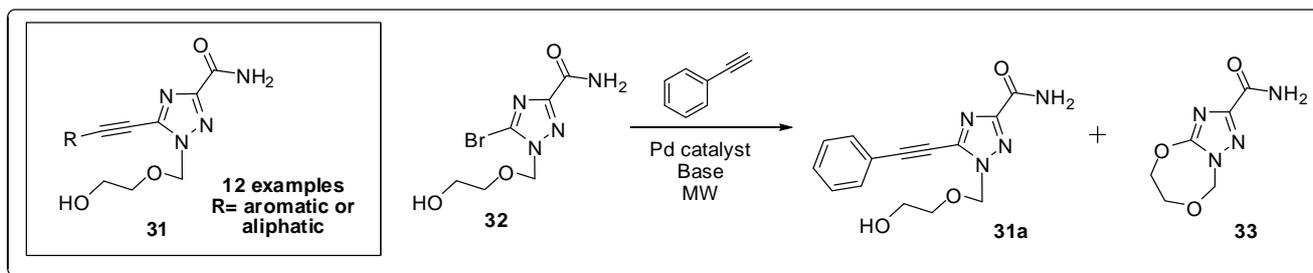
Excepting compounds **30d** and **30m**, all 1,3,5-trisubstituted indophenazyl-pyrazoline derivatives **30a–n** showed good activity against *S. pyogenes*. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of derivatives **30a–n** are adequate when compared with standard fluoroquinolone drugs. Additionally, the derivatives **30a**, **30e**, **30j**, **30k** and **30l** have shown the best antimicrobial activities against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* and *S. aureus* [59].

5. Antivirals

Among the diseases caused by viruses, hepatitis C is one of the most serious public health problems, affecting about 3% of the World's population, which represents about 170 million infected people [60]. The current treatment against hepatitis C virus (HCV) consists in the use of pegylated

interferon- α in combination with ribavirin [61]. However, this therapy is only effective in about 50% of the patients and is associated with serious side effects [61]. Therefore, it is necessary to find out more efficacious and better tolerated antiviral lead compounds. For this purpose, Zhu and colleagues have designed novel acyclic 1,2,4-triazole nucleosides **31** with various ethynyl moieties appended on the triazole nucleobase [62] (Figure 10).

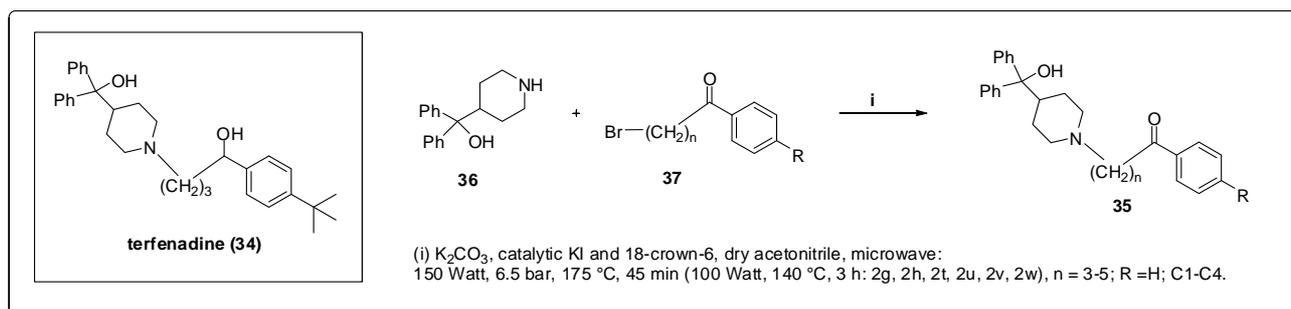
Figure 10. Synthesis of a series of compounds designed against the hepatitis C virus.



The desired molecules were synthesized efficiently, in yields ranging from 75 to 99% starting from bromotriazole acyclonucleoside **32** using an efficient one-step Sonogashira reaction in aqueous solution and under microwave irradiation using a scientific microwave reactor. To avoid the formation of the intramolecular cyclization byproduct **33** under basic conditions, optimized conditions [Pd(PPh₃)₄/CuI and Li₂CO₃, in dioxane/H₂O (3:1, v/v) as solvents for 25 min at 100 °C in a sealed vessel] were developed. One of the compounds (R = *para*-fluorophenyl) inhibited HCV subgenomic replication with a 50% effective concentration (EC₅₀) of 22 µg/mL and did not inhibit proliferation of the host cell at a concentration of 50 µg/mL [63].

Another target identified as a binding partner for the hepatitis C Virus envelope glycoprotein E2 (HCV-E2) is the *large extracellular loop* (LEL) of the human CD81 cell surface protein, a member of the tetraspanin family [64]. Since inhibition of this interaction prevents HCV from infecting hepatocytes, the HCV principal target cells [64], Holzer *et al.* aimed to prepare compounds which restrain the CD81-LEL-HCV-E2 interaction by binding to the LEL [65]. His group started the work by using a biological screening of natural products, current drugs and their in-house substance library (approximately 350 compounds, including several structurally different antihistamines) using a medium throughput assay [66]. Terfenadine (**34**) was found to be a moderate inhibitor of the CD81-LEL-HCV-E2 interaction (27% at 50 µM).

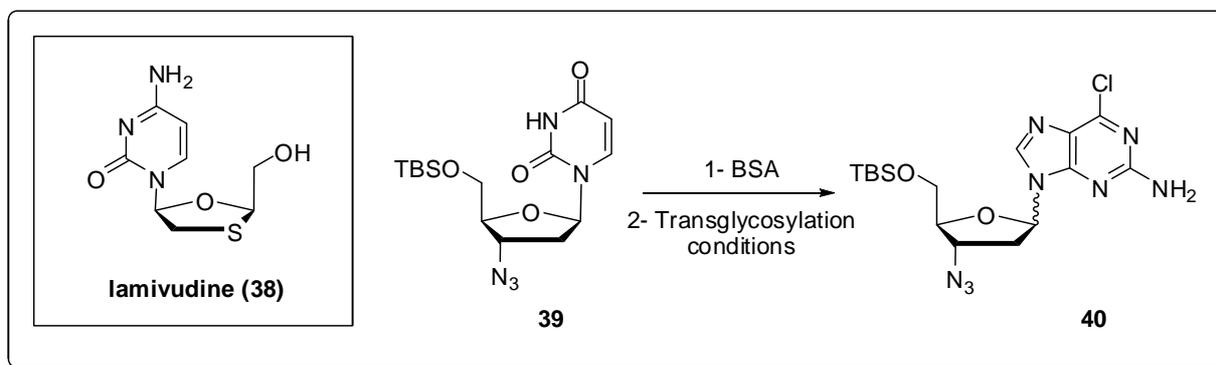
Figure 11. Synthesis of terfenadine analogues.



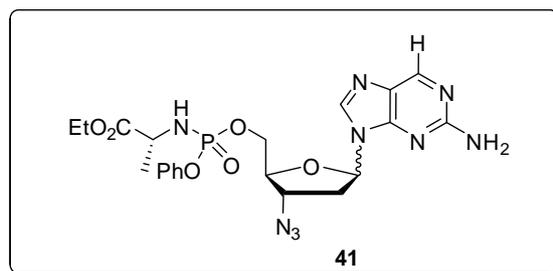
Precursors **37** were coupled to azacyclonol to furnish the planned terfenadine analogues **35** in good yields and short time (5–45 minutes) using MAOS [67] (Figure 11). The obtained ketoaryl-piperazine derivatives **35** presented an optimization regarding to the CD81-LEL-HCV-E2 interactions that resulted in an inhibitory profile of 69% at 50 μM .

Regarding the anti-HIV therapy, the research for novel nucleoside analogues with high potency, low toxicity, and favorable resistance profiles [68] continues to be the cornerstone of this branch of anti-viral drug development [69]. In 1964, the first synthesis of an L-nucleoside was reported [70]; however, only natural D-nucleosides were assumed, during decades, to exhibit biological activity due to the stereospecificity of enzymes in living systems [71,72]. As a consequence, little attention was paid to L-nucleoside analogues until the 1990s with the discovery of lamivudine (**38**) that exhibited potent antiviral activity against HIV-1 and HBV [73-75] (Figure 12).

Figure 12. Lamivudine chemical structure and the reaction used for the optimization of the transglycosylation reaction with 3-azido nucleosides.



Zang *et al.* have described a rapid, simple, and general microwave assisted transglycosylation reaction for the synthesis of several azidopurine nucleosides presenting both D- and L-configuration [76]. They examined the effect of different Lewis acids as SnCl_4 , TMSI, TMSOTf, and $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ with potential to affect the transglycosylation of **39** to **40**. SnCl_4 was found to be incompatible with **39** and led to formation of complex mixtures, whereas the use of $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$ resulted in no reaction. When TMSI was utilized, derivative **40** was obtained in low yields as a 1.2:1 mixture isomers α and β . TMSOTf provided an 1:1 anomeric mixture of **40**, in yields higher than any other Lewis acid tested. Based on the reported microwave-assisted Vorbrüggen glycosylation reaction which was optimized to a 5 min ribosylation reaction at 130 $^\circ\text{C}$ [77], they began their studies with variation of the reaction temperature using a scientific microwave reactor. The stability of the azido group to TMSOTf at elevated temperature was evaluated and the best yields with minor degradation of **40** were obtained at 105 $^\circ\text{C}$ and 120 $^\circ\text{C}$ with 10 minutes of heating and 2.7 equiv. of TMSOTf. The synthesized compounds were evaluated for antiviral activity against both HIV and the L-AZA prodrug **41**, demonstrating significant anti-HIV activity with an EC_{50} value of 1.4 μM (Figure 13).

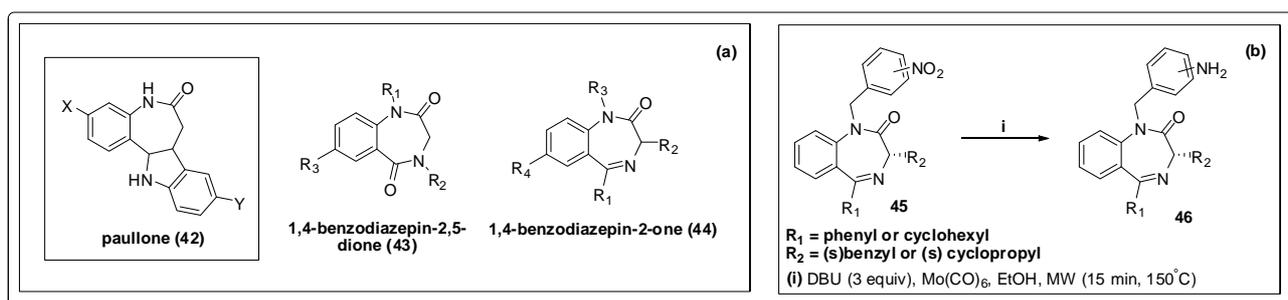
Figure 13. Chemical structure of the L-AZA prodrug **41**.

6. Neglected Diseases

One of the most neglected diseases in the World is the Human African Trypanosomiasis (HAT or sleeping sickness), which is caused by two subspecies of the parasite *T. brucei*, namely *Trypanosoma brucei rhodesiense* (causing East African sleeping sickness) or *Trypanosoma brucei gambiense* (causing West African sleeping sickness). Annually, approximately 50,000 people are reported with this disease and it is estimated that more than 300,000 are infected, but have not been diagnosed or treated [78-82].

There is an urgent need for more effective treatments for HAT, as the current therapy has many shortcomings, *viz.* high toxicity, prohibitive costs, undesirable routes of administration as well as poor efficacy. The parallel synthesis of a series of 1,4-benzodiazepin-2,5-diones **43** (Figure 14), structurally related to the paullone nucleus **42**, was recently reported [83] as presenting antileishmanial and antitrypanosomal activities [84]. Due to the structural similarity of this series with 1,4-benzodiazepine-2-ones (BZDs), the synthesis and biological evaluation of a chemolibrary of the latter and their evaluation as antitrypanosomal agents showing moderate to good trypanocidal activity was described.

Figure 14. (a) Structures of paullone and benzodiazepines; (b) Reduction methodology used to obtain the corresponding amino compounds.



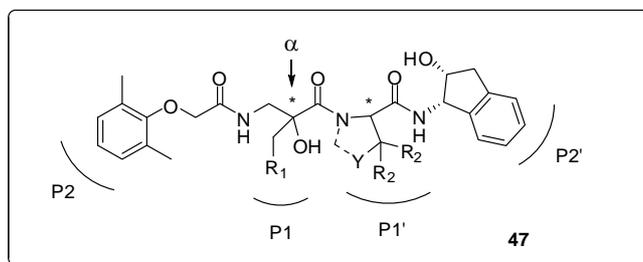
Microwave synthesis was used in order to create the *N*-benzyl series of analogues that presented moderated activity against trypanosomes [85]. The nitro compounds **45** was exploited as precursor of the corresponding anilines **46**, in yields ranging from 74 to 99%, by using molybdenum hexacarbonyl and DBU at 150 °C in a sealed tube for 15 min under microwave irradiation [86,87].

Malaria is a major cause of death, illness and poverty for approximately half of the world's population [88]. It is a parasite-inflicted disease, which is spread throughout the tropical regions of the world by female mosquitoes of the genus *Anopheles*. Four species of protozoal parasites of the *Plasmodium* genus cause malaria in humans, *i.e.*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*,

Plasmodium ovale and *Plasmodium vivax*. Despite of considerable scientific advances and the development of new drugs, malaria is reported to cause over one million fatal cases annually, the majority being children under the age of five [88]. The constant emergence of parasitic strains resistant to the currently available antimalarial agents implies an acute need for new therapeutic agents with novel routes of action [89].

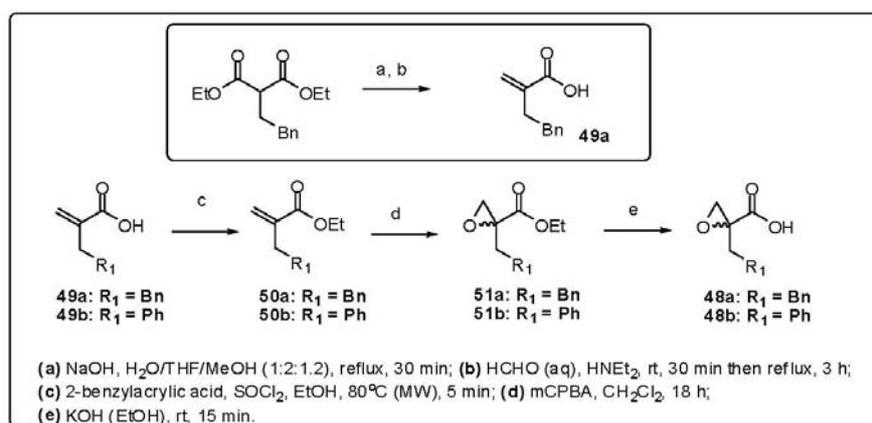
Twelve α -substituted norstatines **47** were designed (Figure 15), synthesized and evaluated for their inhibitory potencies against plasmepsin II and the plasmepsin IV orthologues (PM4) present in the digestive vacuoles of all four *Plasmodium* species causing malaria in man. The best compounds provided K_i values in the nanomolar range for all PM4, with a best value of 110 nM in PM4 from *Plasmodium ovale* [90].

Figure 15. Generic structure of the designed α -substituted norstatine inhibitors with variable length of the tether to the P1-phenyl group, variations in the P10-group and two tunable stereocenters (*).



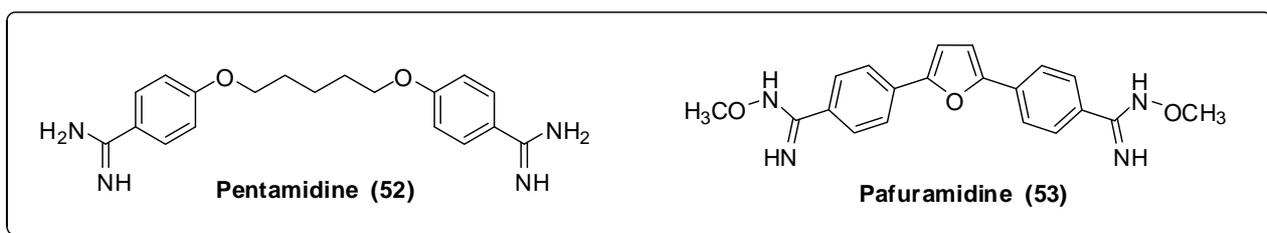
The tertiary alcohol building blocks reported for the construction of α -benzylnorstatines and α -phenylnorstatines are prepared from the respective epoxy acids **48a** or **48b**. The novel, four-step synthetic route to these key intermediates is outlined in Figure 16. The acrylic acid **49a** was prepared by a Knoevenagel reaction, by applying a similar procedure to that previously reported for the synthesis of **49b** [91]. Attempts to perform the direct epoxidation of **49a,b** were not successful. Thus, a fast and convenient one-pot microwave irradiation (MW) protocol for esterification was developed, in order to generate the corresponding ethyl ester **50a,b**. The esters were then readily oxidized by 3-chloroperbenzoic acid (mCPBA) to provide the epoxides **51a,b**. The building blocks, **48a,b**, were obtained by hydrolysis of the ester.

Figure 16. Synthesis of the P1 moieties.



Leishmaniasis is caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* and is one of the most widespread parasitic diseases been endemic in 89 countries and its visceral form, caused by *Leishmania donovani*, leads to 5,000,000 new cases and 50,000 deaths per year [92]. Commonly a well-known antiprotozoan aromatic diamidine, pentamidine (**52**, Figure 17) [93], is used against various infectious diseases such as leishmaniasis [94,95], HIV-related *Pneumocystis jirovecii* opportunistic pneumonia [96] and trypanosomiasis [94,97]. Despite of its wide antimicrobial spectrum, its use remains limited due to its high toxicity, in particular nephro-, cardio- and neurological toxicities [93,98].

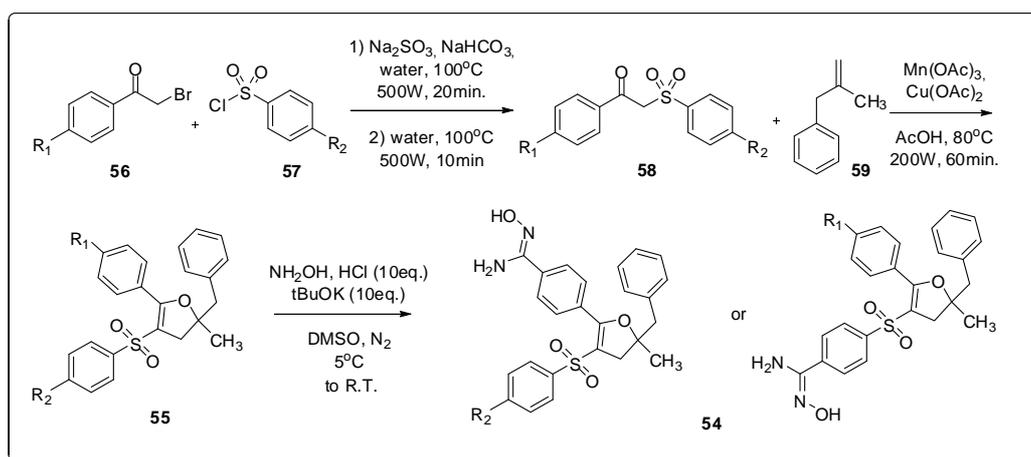
Figure 17. Compounds with antileishmanial activity.



Arylamidines are known to bind to the minor groove of AT DNA sequences along the phosphodiester backbone [99,100]. Two amidinium end groups appear to be necessary for this interaction [101] while the central part of the drug inserts into the minor groove. However, the amidine group presents poor oral bioavailability due to its protonation in the biophase needing parenteral administration. Pafuramidine (**53**, Figure 17) has shown interesting activities against *L. donovani* and presented good oral bioavailability owing to the replacement of amidines by methoxyamidoximes **52** [102].

A new series of monoamidoxime derivatives **54** was designed by Paloque and colleagues and synthesized using manganese(III) acetate by means of microwave irradiation using a multimode microwave oven, specifically in the synthesis of the 2,3-dihydrofuran intermediates **55** from several β -ketosulfones **56** (Figure 18) [103]. Some amidoximes showed interesting *in vitro* activities toward *Leishmania donovani* promastigotes with IC₅₀ values between 5.21 and 7.89 μ M. Additionally, the cytotoxicity of the synthesized compounds was evaluated revealing the corresponding selectivity index (SI), where four amidoxime derivatives **54** have exhibited an SI more than 20 times better than pentamidine (**52**).

Figure 18. New series of monoamidoxime derivatives.

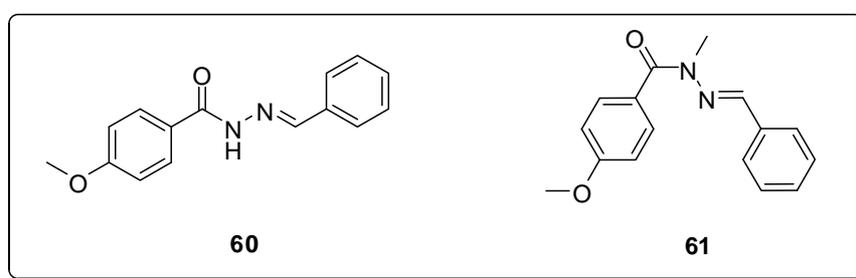


7. Central Nervous System

The central nervous system (CNS) drug market accounted for 15% (around US\$ 118 billion) of the pharmaceutical market sales in 2008 [104]. In contrast with the neglected diseases, the major part of CNS diseases affects people of all countries and economical classes. In this context, there are many efforts to develop novel drug candidates, for example: with hypnotic and sedative effects [105], as alternative for the treatment of neuropathic pain [106] and other analgesic effects [107].

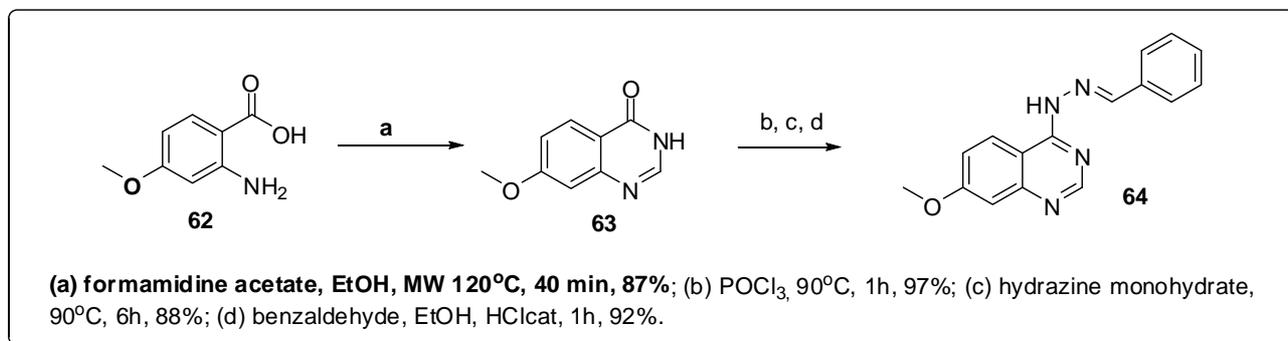
Among the compounds of *N*-acylhydrazones class developed in our research group, the major part of them presents both, analgesic and anti-inflammatory profiles [53]. Recently, we have discovered two compounds (**60** and **61**, Figure 19), that have inhibited the abdominal constrictions induced by AcOH in mice in 50% and ED₅₀ of approximately 2 mg/Kg, for both compounds [107].

Figure 19. *N*-acylhydrazones with analgesic activity.

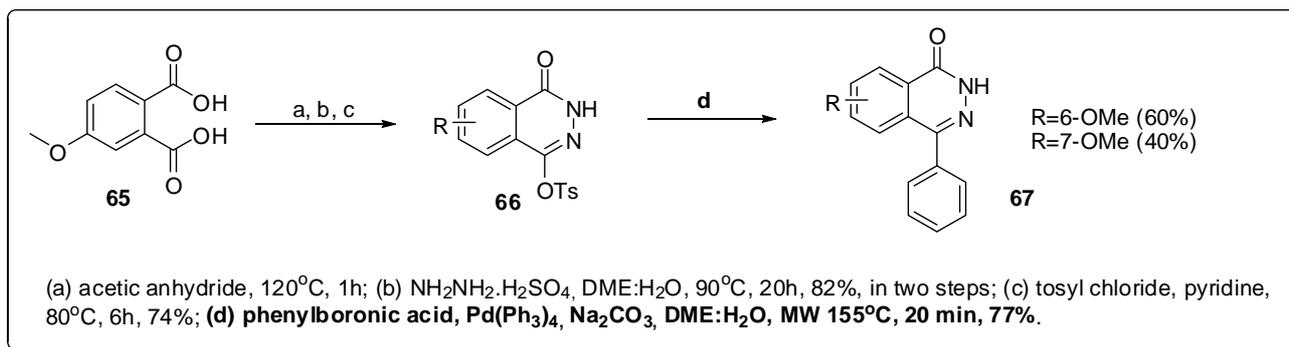


Based on this results, were proposed conformational restrictions of **60** and **61**, as a strategy to elucidate the bioactive conformations, constructing heterocyclic rings mimetic to *N*-acylhydrazone framework. A scientific microwave reactor was used to construct three heterocyclic conformationally-restricted derivatives [107]. For the construction of quinazoline scaffold of **64** (Figure 20), MAOS allowed the synthesis of the quinazolinone intermediate **63** from the reaction between anthranilic acid **62** and formamidine acetate in good yield (87%). In this case, conventional heating resulted in the formation of **63** in lower yields.

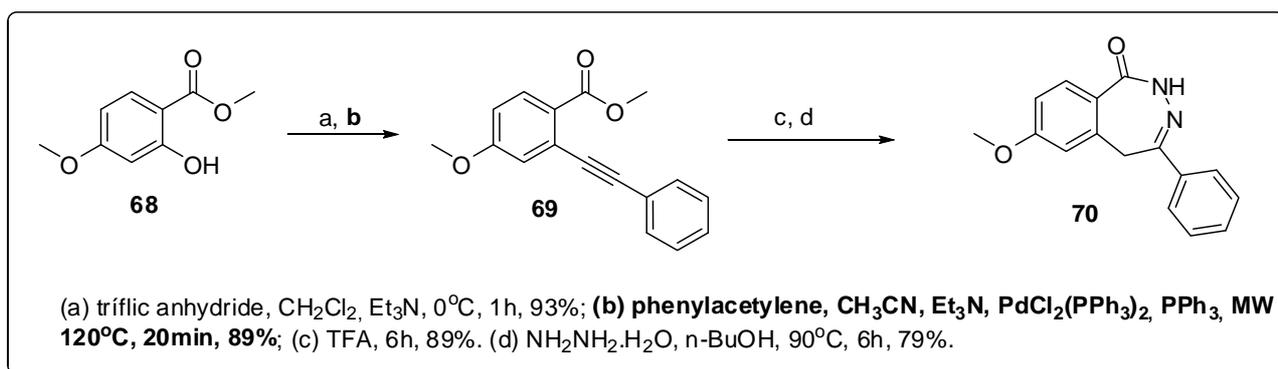
Figure 20. Use of MAOS to construct quinazoline scaffold.



The second conformationally-restricted heterocyclic compound **67** was constructed through the Suzuki cross coupling between the phenyl boronic acid and the tosyl phthalazone **66**, resulting in the formation of **67** in only 20 minutes and good yield (77%) (Figure 21) [107].

Figure 21. Use of MAOS to construct phthalazinone scaffold.

The third conformationally-restricted heterocyclic compound, a benzodiazepinone (**70**), were obtained through a Pd-catalyzed cross coupling, but in this case, the Sonogashira cross coupling was used to obtain the acetylenic derivative **69** (Figure 22). The use of MAOS was important for the reduction of the reaction time required to obtain **69**, *i.e.*, 20 minutes at 120 °C (Figure 22), which was next cyclized to form **70** [107].

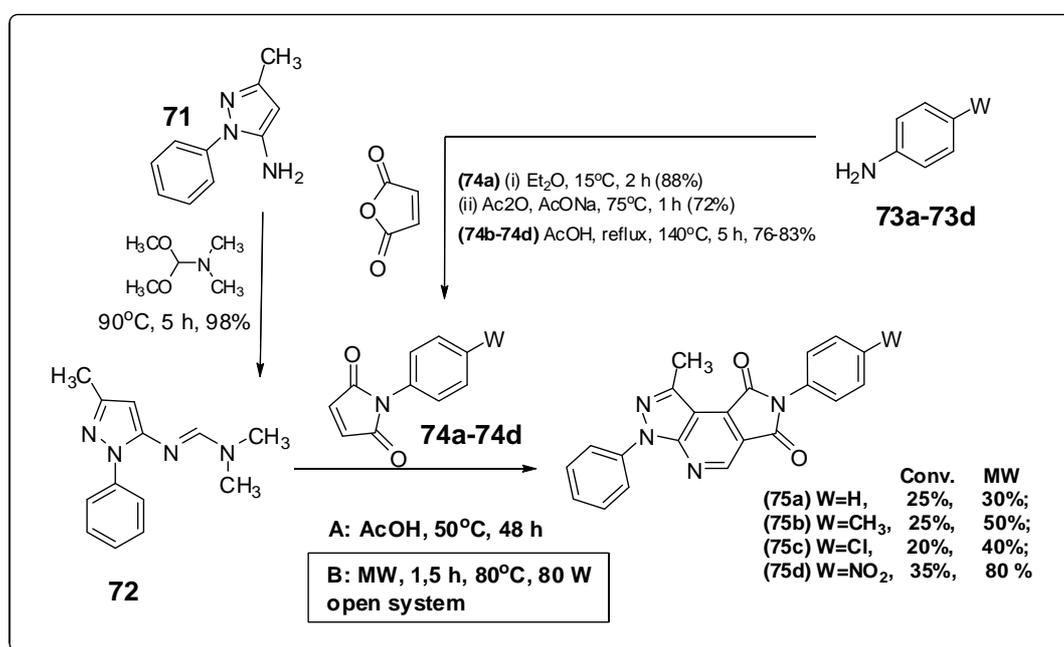
Figure 22. Use of MAOS to construct benzodiazepinone scaffold.

The antinociceptive effect of *N*-acylhydrazone derivatives **60** and **61** in AcOH-induced abdominal constrictions in mice induced by acetic acid was better than the effect observed for **64**, **67** and **70**. However the three conformationally-restricted derivatives presented analgesic potencies equivalent to paracetamol used as standard drug [107].

Another good example of MAOS applied to medicinal chemistry from our laboratory is related with the synthesis of four heterocyclic neuroactive compounds **75a–d**. They were evaluated in hypnotic, locomotor and analgesic activity protocols [108,109]. In the pentobarbital-induced-sleep test [110], the nitro-derivative **75d** has shown an important hypnotic behavior with duration of approximately 160 minutes at 6 mg/Kg dose. On the locomotor activity test in mice [111], the compounds **75a** (6 mg/Kg, 93.7 ± 15.2 mov/min) and **75d** (4 mg/Kg, 86.7 ± 16.5 mov/min) stand out as being more active to promote a sedative effect, statistically equivalent to the reference drug midazolam [108,109,112] in a dose of 2 mg/Kg. The analgesic activity was evaluated in the hot plate test in mice [113] and the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivative **75d** presented the best analgesic activity (100% in the dose of 2 mg/Kg) after only 30 minutes.

Before the construction of the four heterotricyclic compounds **75a–d**, the azadiene **72** was prepared in excellent yield (98%), through the reaction between the phenylpyrazolamine **71** and the *N,N*-dimethylformamide dimethylacetal. In addition, the phenylmaleimides **74a–d** were constructed by the condensation of *para*-substituted anilines **73a–d** with maleic anhydride in yields ranging from 72% to 83% [108,109,114]. The pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives **75a–d** were constructed in a key cycloaddition step between the azadiene **72** and functionalized phenylmaleimides **74a–d**, in very low (20–35%) yields and very long reaction times (48 hours) when conventional heating was used (Figure 23) [108,109,114].

Figure 23. Synthesis of the intermediates **72** and **74a–d** followed by the hetero Diels-Alder step exploited to obtain the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives **75a–d**.



Based on the literature of MAOS applied to the synthesis of other heterocyclic compounds obtained by cycloaddition strategy [115–117], we have developed a new methodology to construct the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives **75a–d** in a scientific microwave reactor using a new free-solvent methodology. For the four heterotricyclic derivatives **75a–d** the reaction time was reduced from 48 hours to 1.5 hours and in the case of the heterocyclic compound **75d**, the yield was increased from 35 to 80% [114].

8. Conclusions

The extensive use of microwave irradiation for the synthesis of molecules of pharmacological interest has contributed to improve the access to different chemical scaffolds by applying new methodologies and techniques. For this reason, the initial limitations faced in MAOS seem to be disappearing and these facts encourage its use as the first option for the synthesis of new drug candidates, specially based on the benefits related to better yields and shorter reaction times. As could be exemplified in this review, there are research groups using MAOS to find out hits and lead-compounds related with different biological targets and diseases in the last years. In spite of the

scale up limitations in MAOS, continuous flow technique and large reactors use have achieved good results in the challenge to obtain the amounts of substance required by the pharmaceutical industry for pre-clinical and clinical phases of the drug development process.

Acknowledgments

The authors thank CAPES (BR), CNPq (BR), FAPERJ (BR) and INCT-INOVAR (BR, #573.564/2008-6) for financial support and fellowships.

References

1. Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279-282.
2. Giguere, R.J.; Bray, T.L.; Duncan, S.M.; Majetich, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945-4948.
3. Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9225-9283.
4. Bougrin, K.; Loupy, A.; Soufiaoui, M. Microwave-assisted solvent-free heterocyclic synthesis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2005**, *6*, 139-167.
5. Pérez-Picaso, L.; Escalante, J.; Olivo, H.F.; Rios, M.Y. Efficient microwave assisted syntheses of 2,5-Diketopiperazines in aqueous media. *Molecules* **2009**, *14*, 2836-2849.
6. Hügel, H.M. Microwave multicomponent synthesis. *Molecules* **2009**, *14*, 4936-4972.
7. Kappe, C.O. High-speed combinatorial synthesis utilizing microwave irradiation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 314-320.
8. Kong, L.; Lv, X.; Lin, K.; Liu, X.; Zhou, Y.; Jia, Y. Efficient synthesis of imidazoles from aldehydes and 1,2-Diketones under superheating continuous by using a continuous flow microreactor system under pressure. *Org. Proc. Res. Dev.* **2010**, *14*, 902-904.
9. Schmink, J.R.; Kormos, C.M.; Devine, W.G.; Leadbeater, N.E. Exploring the scope for scale up of organic chemistry using a large batch microwave reactor. *Org. Proc. Res. Dev.* **2010**, *14*, 205-214.
10. Patil, S.A.; Patil, R.; Miller, D.D. Microwave-assisted synthesis of medicinally relevant indoles. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 615-637.
11. Zhao, Z.; Wisnoski, D.D.; Wolkenberg, S.E.; Leister, W.H.; Wang, Y.; Lindsley, C.W. General microwave-assisted protocols for the expedient synthesis of quinoxalines and heterocyclic pyrazines. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4873-4876.
12. Chilin, A.; Marzaro, G.; Zanatta, S.; Guiotto, A. A microwave improvement in the synthesis of the quinazoline scaffold. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3229-3231.
13. Reichelt, A.; Filsey, J.R.; Rzasca, R.M.; Thiel, O.R.; Achmatowicz, M.M.; Larsen, R.D.; Zhang, D. Palladium-catalyzed chemoselective monoarylation of hydrazides for the synthesis of [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyridines. *Org. Lett.* **2009**, *12*, 792-795.
14. Lucas, R.; Vergnaud, J.; Teste, K.; Zerrouk, R.; Sol, V.; Krausz, P. A facile and rapid iodine-catalyzed meso-tetraphenylporphyrin synthesis using microwave activation. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5537-5539.

15. Yeung, K.-S.; Farkas, M.E.; Kadow, J.F.; Meanwell, N.A. A base-catalyzed, direct synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles from nitriles and hydrazides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3429-3432.
16. Adib, M.; Jahromi, A.H.; Tavoosi, N.; Mahdavi, H.; Bijanzadeh, H.R. Microwave-assisted one efficient, one pot, three-multicomponent synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under free-solvent conditions. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2965-2967.
17. Andrade, M.M.; Barros, M.T. Fast synthesis of *N*-Acylylhydrazones employing a microwave assisted neat protocol. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 245-247.
18. Baxendale, I.R.; Ley, S.V. Polymer-supported reagents for multi-step organic synthesis: Application to the synthesis of sildenafil. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1983-1986.
19. SCOPUS. Available online: <http://www.scopus.com> (accessed on 13 September 2011).
20. Kappe, C.O.; Dallinger, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 51-64.
21. Larhed, M.; Hallberg, A. Microwave-assisted high-speed chemistry: A new technique in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 406-416.
22. Shipe, W.D.; Wolkenberg, S.E.; Lindsley, C.W. Accelerating lead development by microwave-enhanced medicinal chemistry. *Drug Discov. Today Technol.* **2005**, *2*, 155-161.
23. World Health Organization. Available online: <http://www.who.int/cancer/en/> (accessed on 1 February 2011).
24. Noble, M.E.M.; Endicott, J.A.; Johnson, L.N. Protein kinase inhibitors: Insights into drug design from structure. *Science* **2004**, *303*, 1800-1805.
25. Li, Q.; Zhu, G.D. Targeting serine/threonine protein kinase B/Akt and cell-cycle checkpoint kinases for treating cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 939-971.
26. Lindsley, C.W.; Zhao, Z.; Leister, W.H.; Robinson, R.G.; Barnett, S.F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R.E.; Hartman, G.D.; Huff, J.R.; Huber, H.E.; *et al.* Allosteric Akt (PKB) inhibitors: Discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 761-764.
27. Cheng, J.Q.; Lindsley, C.W.; Cheng, G.Z.; Yang, H.; Nicosia, S.V. The Akt/PKB pathway: Molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **2005**, *24*, 7482-7492.
28. Barnett, S.F.; Bilodeau, M.T.; Lindsley, C.W. The Akt/PKB family of protein kinases: A review of small molecule inhibitors and progress towards target validation. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 109-125.
29. Caldwell, J.J.; Davies, T.G.; Donald, A.; McHardy, T.; Rowlands, M.G.; Aherne, G.W.; Hunter, L.K.; Taylor, K.; Ruddle, R.; Raynaud, F.I.; *et al.* Identification of 4-(4-aminopiperidin-1-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as selective inhibitors of protein kinase B through fragment elaboration. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2147-2157.
30. Caldwell, J.J.; Cheung, K.-M.; Collins, I. Synthesis of 4-(cyclic dialkylamino)-7-azaindoles by microwave heating of 4-halo-7-azaindoles and cyclic secondary amines. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1527-1529.
31. Hajdúch, M.; Havlíček, L.; Veselý, J.; Novotný, R.; Mihál, V.; Strnad, M. Synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors: New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *457*, 341-353.
32. Sherr, C.J. Cancer cell cycles. *Science* **1996**, *274*, 1672-1677.

33. López-Cara, L.C.; Conejo-García, A.; Marchal, J.A.; MacChione, G.; Cruz-López, O.; Boulaiz, H.; García, M.A.; Rodríguez-Serrano, F.; Ramírez, A.; Cativiela, C.; *et al.* New (RS)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: The chiral switch from (RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9H-purine. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 249-258.
34. Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Gómez-Vidal, J.A.; Marchal, J.A.; Aránega, A.; Gallo, M.A.; Espinosa, A.; Campos, J.M. Synthesis of tetrahydrobenzoxazepine acetals with electron-withdrawing groups on the nitrogen atom. Novel scaffolds endowed with anticancer activity against breast cancer cells. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11547-11557.
35. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J. (Trad. Do Nascimento, A.P.). *Farmacologia* 6ª ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, Brazil, 2007.
36. Dinarello, C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest* **2000**, *118*, 503.
37. Tillie-Leblond, I.; Pugin, J.; Marquette, C.-H.; Lamblin, C.; Saulnier, F.; Bricchet, A.; Wallaert, B.; Tonnel, A.-B.; Gosset, P. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, *159*, 487-494.
38. Checker, R.; Sharma, D.; Sandur, S.K.; Khanam, S.; Poduval, T.B. Anti-inflammatory effects of plungabin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 949-958.
39. Ferreira, M.A.D.; Nunes, O.D.R.H.; Fontenele, J.B.; Pessoa, O.D.L.; Lemos, T.L.G.; Viana, G.S.B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 315-322.
40. Phutdhawong, W.S.; Ruensamran, W.; Phutdhawong, W.; Taechowisan, T. Synthesis of 1,6,7,8-tetrahydro-naphtho[2,3-d]-azepino[4,5b]indole-9,14-diones and their inhibitory effects on pro-inflammatory cytokines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5753.
41. Phutdhawong, W.; Buddhasukh, D. Facile microwave-assisted synthesis of 9,10-Dihydro-9,10-ethanoanthracene-11-carboxylic acid methyl ester. *Molecules* **2005**, *10*, 1409-1412.
42. Clark-Lewis, I.; Mattioli, I.; Gong, J.H.; Loetscher, P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 289-295.
43. Qin, S.; Rottman, J.B.; Myers, P.; Kassam, N.; Weinblatt, M.; Loetscher, M.; Koch, A.E.; Moser, B.; Mackay, C.R. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 746-754.
44. Lazzeri, E.; Romagnani, P. CXCR3-binding chemokines: Novel multifunctional therapeutic targets. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **2005**, *5*, 109-118.
45. Salomon, I.; Netzer, N.; Wildbaum, G.; Schif-Zuck, S.; Maor, G.; Karin, N. Targeting the function of IFN- γ -Inducible protein 10 suppresses ongoing adjuvant arthritis. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 2685-2693.
46. Hancock, W.W.; Lu, B.; Gao, W.; Csizmadia, V.; Faia, K.; King, J.A.; Smiley, S.T.; Ling, M.; Gerard, N.P.; Gerard, C. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1515-1520.
47. Donnelly, L.E.; Barnes, P.J. Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 546-553.

48. Knight, R.L.; Allen, D.R.; Birch, H.L.; Chapman, G.A.; Galvin, F.C.; Jopling, L.A.; Lock, C.J.; Meissner, J.W.G.; Owen, D.A.; Raphy, G.; *et al.* Development of CXCR3 antagonists. Part 4: Discovery of 2-amino-(4-tropinyl)quinolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 629-633.
49. Maes, B.U.W.; Loones, K.T.J.; Lemièrre, G.L.F.; Dommissie, R.A. Rapid palladium-catalyzed aminations of aryl chlorides with aliphatic amines under temperature-controlled microwave heating. *Synlett* **2003**, *12*, 1822-1825.
50. Hardman, J.; Limbird, L.E. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001.
51. Schmid, M.B. Novel approaches to the discovery of antimicrobial agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 529-534.
52. Rollas, S.; Küçükgülzel, S.G. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* **2007**, *12*, 1910-1939.
53. Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. Medicinal chemistry of N-Acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 167-198.
54. Ajani, O.O.; Obafemi, C.A.; Nwinyi, O.C.; Akinpelu, D.A. Microwave assisted synthesis and antimicrobial activity of 2-quinoxalinone-3-hydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 214-221.
55. Amir, M.; Kumar, H.; Khan, S.A. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazoline derivatives as new anti-inflammatory and analgesic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 918-922.
56. Chakrabarthy, K.J.E.; Richard, J.G.; Peter, T.; Janette, H.; Terrence, H.A. 5-Acyl-3-substituted benzofuran-2(3H)-ones as potential antiinflammatory agents. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1663-1668.
57. Akbas, E.; Berber, I. Antibacterial and antifungal activities of new pyrazolo[3,4-*d*]pyridazin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 401-405.
58. Rostom, S.A.F.; Shalaby, M.A.; El-Demellawy, M.A. Polysubstituted pyrazoles, part 5. Synthesis of new 1-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1H-pyrazole-3-carboxylic acid hydrazide analogs and some derived ring systems. A novel class of potential antitumor and anti-HVC agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 959-974.
59. Manna, K.; Agrawal, Y.K. Microwave assisted synthesis of new indophenazine 1,3,5-trisubstruted pyrazoline derivatives of benzofuran and their antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2688-2692.
60. Weiss, U. Hepatitis C. *Nature* **2005**, *436*, 929-978.
61. Feld, J.J.; Hoofnagle, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **2005**, *436*, 967-972.
62. Zhu, R.; Wang, M.; Xia, Y.; Qu, F.; Neyts, J.; Peng, L. Arylethynyltriazole acyclonucleosides inhibit hepatitis C virus replication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3321-3327.
63. Zhu, R.; Qu, F.; Quéléver, G.; Peng, L. Direct synthesis of 5-aryltriazole acyclonucleosides via Suzuki coupling in aqueous solution. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2389-2393.
64. van Compernelle, S.E.; Wiznycia, A.V.; Rush, J.R.; Dhanasekaran, M.; Baures, P.W.; Todd, S.C. Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology* **2003**, *314*, 371-380.
65. Holzer, M.; Ziegler, S.; Albrecht, B.; Kronenberger, B.; Kaul, A.; Bartenschlager, R.; Kattner, L.; Klein, C.D.; Hartmann, R.W. Identification of terfenadine as an inhibitor of human

- CD81-receptor HCV-E2 interaction: Synthesis and structure optimization. *Molecules* **2008**, *13*, 1081-1110.
66. Ziegler, S.; Kronenberger, B.; Albrecht, B.A.-M.; Kaul, A.; Gamer, A.-L.; Klein, C.D.; Hartmann, R.W. Development and evaluation of a FACS-based medium-throughput assay for HCV entry inhibitors. *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 620-626.
67. Carr, A.; Clyde, R. Piperidinderivate. D.E. Patent 25.06.770, 1975.
68. de Clercq, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Curr. Opin. Microb.* **2005**, *8*, 552-560.
69. Richman, D.D. Antiviral drug resistance. *Antivir. Res.* **2006**, *71*, 117-121.
70. Smejkal, J.; Sorm, F. Nucleic acid components and their analogues. 53. Preparation of 1-(2-deoxy- β -l-ribofuranosyl)thymine (l-thymidine). *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2809-2813.
71. Maury, G. The enantioselectivity of enzymes involved in current antiviral therapy using nucleoside analogues: A new strategy? *Antivir. Chem. Chemother.* **2000**, *11*, 165-190.
72. Focher, F.; Spadari, S.; Maga, G. Antivirals at the mirror: The lack of stereospecificity of some viral and human enzymes offers novel opportunities in antiviral drug development. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2003**, *3*, 41-53.
73. Beach, J.W.; Jeong, L.S.; Alves, A.J.; Pohl, D.; Kim, H.O.; Chang, C.-N.; Doong, S.-L.; Schinazi, R.F.; Cheng, Y.-C.; Chu, C.K. Synthesis of enantiomerically pure (2'R,5'S)-(-)-1-[2-(hydroxymethyl)oxathiolan-5-yl]cytosine as a potent antiviral agent against hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV). *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2217-2219.
74. Cameron, J.M.; Collins, P.; Daniel, M.; Storer, R.; Wilcox, P. Lamivudine. *Drugs Future* **1993**, *18*, 319-323.
75. Schinazi, R.F.; Lloyd, R.M., Jr.; Nguyen, M.-H.; Cannon, D.L.; McMillan, A.; Ilksoy, N.; Chu, C.K.; Liotta, D.C.; Bazmi, H.Z.; Mellors, J.W. Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 875-881.
76. Zhang, H.-W.; Detorio, M.; Herman, B.D.; Solomon, S.; Bassit, L.; Nettles, J.H.; Obikhod, A.; Tao, S.-J.; Mellors, J.W.; Sluis-Cremer, N.; *et al.* Synthesis, antiviral activity, cytotoxicity and cellular pharmacology of 1-3'-azido-2',3'-dideoxypurine nucleosides. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3832-3844.
77. Bookser, B.C.; Raffaele, N.B. High-throughput five minute microwave accelerated glycosylation approach to the synthesis of nucleoside libraries. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 173-179.
78. Pepin, J.; Meda, H.A. The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* **2001**, *49*, 71-132.
79. Barrett, M.P.; Burchmore, R.J.S.; Stich, A.; Lazzari, J.O.; Frasch, A.C.; Cazzulo, J.J.; Krishna, S. The trypanosomiases. *Lancet* **2003**, *362*, 1469-1480.
80. Rodgers, J.J. Human African trypanosomiasis, chemotherapy and CNS disease. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *211*, 16-22.
81. Kennedy, P.G.E. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann. Neurol.* **2008**, *64*, 116-126.
82. Denise, H.; Barrett, M.P. Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 1-5.

83. Knockaert, M.; Wieking, K.; Schmitt, S.; Leost, M.; Grant, K.M.; Mottram, J.C.; Kunick, C.; Meijer, L. Intracellular targets of paullones: Identification following affinity purification on immobilized inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25493-25501.
84. Clark, R.L.; Carter, K.C.; Mullen, A.B.; Coxon, G.D.; Owusu-Dapaah, G.; McFarlane, E.; Duong Thi, M.D.; Mackay, S.P. Identification of the benzodiazepines as a new class of antileishmanial agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 624-627.
85. Spencer, J.; Rathnam, R.P.; Harvey, A.L.; Clements, C.J.; Clark, R.L.; Barrett, M.P.; Wong, P.E.; Male, L.; Coles, S.J.; MacKay, S.P. Synthesis and biological evaluation of 1,4-benzodiazepin-2-ones with antitrypanosomal activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1802-1815.
86. Spencer, J.; Anjum, N.; Patel, H.; Rathnam, R.P.; Verma, J. Molybdenum hexacarbonyl and DBU reduction of nitro compounds under microwave irradiation. *Synlett* **2007**, *13*, 2557-2558.
87. Spencer, J.; Rathnam, R.P.; Patel, H.; Anjum, N. Microwave mediated reduction of heterocycle and fluorine containing nitroaromatics with Mo(CO)₆ and DBU. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10195-10200.
88. *World Malaria Report 2008*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2008.
89. White, N.J.J. Antimalarial drug resistance. *Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1084-1092.
90. Orrling, K.M.; Marzahn, M.R.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Åqvist, J.; Dunn, B.M.; Larhed, M. α -Substituted norstatins as the transition-state mimic in inhibitors of multiple digestive vacuole malaria aspartic proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5933-5949.
91. Ekegren, J.K.; Gising, J.; Wallberg, H.; Larhed, M.; Samuelsson, B.; Hallberg, A. Variations of the P2 group in HIV-1 protease inhibitors containing a tertiary alcohol in the transition-state mimicking scaffold. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3040-3043.
92. Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R.W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, S7-S16.
93. Sands, M.; Kron, M.A.; Brown, R.B. Pentamidine: A review. *Rev. Infect. Dis.* **1985**, *7*, 625-634.
94. Bray, P.G.; Barrett, M.P.; Ward, S.A.; de Koning, H.P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 232-239.
95. Berman, J.D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*, 684-703.
96. Castro, M. Treatment and prophylaxis of pneumocystis carinii pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* **1998**, *13*, 296-303.
97. Burri, C. Chemotherapy against human African trypanosomiasis: Is there a road to success? *Parasitology* **2010**, *137*, 1987-1994.
98. Oliveira, L.F.; Schubach, A.O.; Martins, M.M.; Passos, S.L.; Oliveira, R.V.; Marzochi, M.C.; Andrade, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. *Acta Trop.* **2011**, *118*, 87-96.
99. Fairlamb, A.H. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: Current and future prospects. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 488-494.
100. Zolek, T.; Maciejewska, D. Theoretical models of pentamidine analogs activity based on their DNA minor groove complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1991-1999.

101. Moreno, T.; Pous, J.; Subirana, J.A.; Campos, J.L. Coiled-coil conformation of a pentamidine-DNA complex. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 251-257.
102. Thuita, J.K.; Karanja, S.M.; Wenzler, T.; Mdachi, R.E.; Ngotho, J.M.; Kagira, J.M.; Tidwell, R.; Brun, R. Efficacy of the diamidine DB75 and its prodrug DB289, against murine models of human African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **2008**, *108*, 6-10.
103. Paloque, L.; Bouhleb, A.; Curti, C.; Dumtre, A.; Verhaeghe, P.; Azas, N.; Vanelle, P. Synthesis and evaluation of monoamidoxime derivatives: Toward new antileishmanial compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2984-2991.
104. Knol – A unit of knowledge. Available online: <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/global-brain-drugs-market-review-2008/3fy5eowy8suq3/1#> (accessed on 15 July 2011).
105. Korzh, M. The efficacy and safety of zolpidem over 12 months in patient with low back pain and chronic insomnia. *Sleep Med.* **2007**, *8*, 578.
106. Yogeewari, P.; Menon, N.; Semwal, A.; Arjun, M.; Sriram, D. Discovery of molecules for the treatment of neuropathic pain: Synthesis, antiallodynic and antihyperalgesic activities of 5-(4-nitrophenyl)furoic-2-acid hydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2964-2970.
107. Kummerle, A.E.; Vieira, M.M.; Schmitt, M.; Miranda, A.L.P.; Fraga, C.A.M.; Bourguignon, J.-J.; Barreiro, E.J. Design, synthesis and analgesic properties of novel conformationally-restricted *N*-acylhydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *19*, 4963-4966.
108. Menegatti, R.; Silva, G.M.S.; Zapata-Sudo, G.; Raimundo, J.M.; Sudo, R.T.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Design, synthesis and pharmacological evaluation of new neuroactive pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives with *in vivo* hypnotic and analgesic profile. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 632-640.
109. Mendes, T.C.F.; Raimundo, J.M.; Nascimento-Junior, N.M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J.; Sudo, R.T.; Zapata-Sudo, G. Sedation and antinociception induced by a new pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivative (LASSBio-873) is modulated by activation of muscarinic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, *94*, 70-74.
110. Tsuji, R.; Isobe, N.; Kawasaki, H. Mechanism of prolongation of pentobarbital-induced sleeping time by empenthrin in mice. *Toxicology* **1996**, *108*, 185-190.
111. Mora, S.; Diaz-Veliz, G.; Lungentrass, H.; García-González, M.; Coto-Morales, T.; Poletti, C.; de Lima, T.C.; Herrera-Ruiz, M.; Tortoriello, J. Central nervous system activity of the hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rat and mice. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 191-197.
112. Dundee, J.W.; Halliday, N.J.; Harper, K.W.; Brogden, R.N. Midazolam a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* **1984**, *28*, 519-543.
113. Kuraishi, Y.; Harada, Y.; Aratani, S.; Satoh, M.; Takagi, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic system in morphine analgesia: The differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res.* **1983**, *273*, 245-252.
114. Nascimento-Júnior, N.M.; Mendes, T.C.F.; Leal, D.M.; Corrêa, C.M.N.; Sudo, R.T.; Zapata-Sudo, G.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Microwave assisted-synthesis and structure-activity relationships of neuroactive pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 74-77.

115. Díaz-Ortiz, A.; Carrilo, J.R.; Gómez-Escalonilla, M.J.; de La Hoz, A.; Moreno, A.; Prieto, P. First diels-alder reaction of pyrazolil imides under microwave irradiation. *Synlett* **1998**, *10*, 1069-1070.
116. Díaz-Ortiz, A.; de La Hoz, A.; Langa, F. Microwave irradiation in free-solvent conditions: An eco-friendly methodology to prepare indazoles, pyrazolopyridines and bipyrazoles by cycloaddition reactions. *Green Chem.* **2000**, *2*, 165-172.
117. Díaz-Ortiz, A.; Carrilo, J.R.; Cossio, F.P.; Gómez-Escalonila, M.J.; de La Hoz, A.; Moreno, A.; Prieto, P. Synthesis of pyrazolo[3,4-*b*]pyridines by cycloaddition reactions under microwave irradiation. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1569-1577.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Híbridos para o Tratamento dos Sintomas da Anemia Falciforme

por Nailton M. Nascimento-Júnior e Thaís R. F. de Melo

Data de publicação na Web: 24 de Janeiro de 2012

Recebido em 17 de Janeiro de 2012

Aceito para publicação 22 de Janeiro de 2012

A anemia falciforme é uma das doenças de origem genética mais comuns no mundo, sendo causada por mutação do ácido glutâmico (Glu6) em valina (Val6) da cadeia β da hemoglobina, resultando em vários efeitos colaterais, como por exemplo, hipertensão pulmonar e infarto, que reduzem a expectativa de vida dos pacientes acometidos pela doença. Um dos maiores problemas da anemia falciforme está no fato de ainda não existir um fármaco específico para o seu tratamento, apenas fármacos para aliviar os seus sintomas da doença. O mais importante é a hidroxiureia (HU), que é um inibidor de ribonucleotídeo redutase e atualmente o único fármaco aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, que é uma agência reguladora dos EUA responsável pela aprovação de substâncias utilizadas como medicamentos) para o tratamento sintomático da anemia falciforme.¹

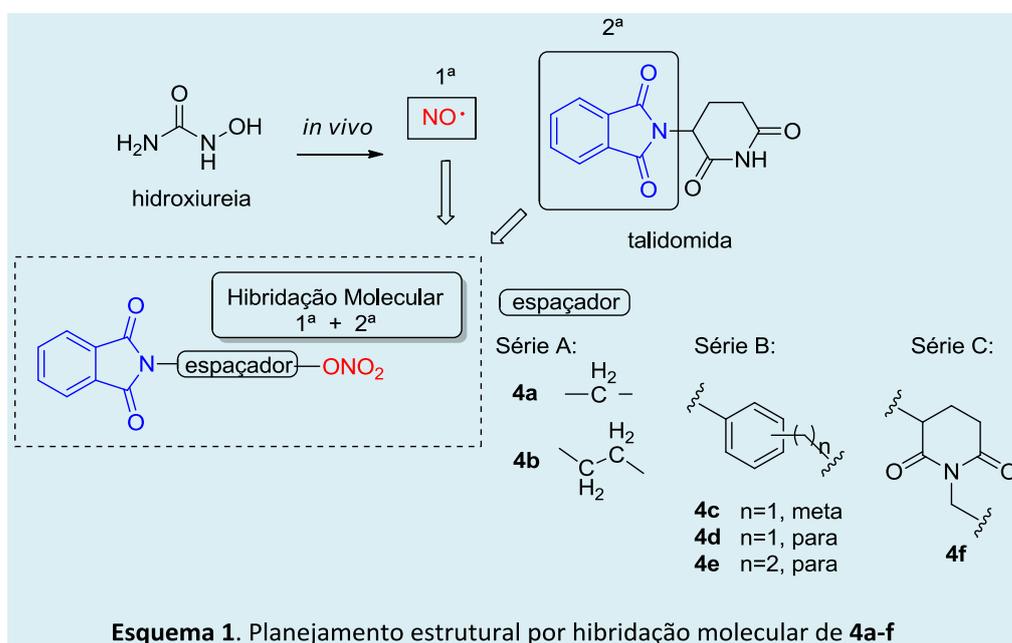
A HU é geralmente usada no tratamento de desordens mieloproliferativas e seu efeito na anemia falciforme está relacionado à sua capacidade de produzir hemoglobina fetal (HbF). Após sua metabolização, a HU pode atuar como doadora exógena de óxido nítrico (NO), o qual é responsável por

inúmeros benefícios, tais como: indução da expressão do gene da γ -globina, vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. Como indivíduos com anemia falciforme apresentam baixos níveis de NO em seu endotélio vascular, vários esforços têm sido feitos para a melhor compreensão dos efeitos positivos de substâncias doadoras de NO para o tratamento da anemia falciforme.²

Apesar de a HU ser eficiente para o tratamento sintomático da anemia falciforme, seu uso em esquemas terapêuticos prolongados e/ou continuados estão associados a vários efeitos deletérios, os quais contribuem para a diminuição da expectativa de vida dos pacientes.³ Buscando novas alternativas para o tratamento da anemia falciforme, Santos *et al.* planejaram 6 compostos, para os quais o processo de hibridação molecular

foi realizado considerando como protótipos os fármacos: talidomida (conhecido modulador de TNF- α , visando o tratamento do componente inflamatório da anemia falciforme) e HU (a fim de explorar seu efeito doador de óxido nítrico) (Esquema 1).⁴

A rota de síntese desenvolvida, em no máximo 3 etapas, para a obtenção dos 6 compostos propostos mostrou-se adequada, visto que os rendimentos globais variaram entre 49 e 80%, envolvendo síntese linear e sem utilização de reagentes de custo elevado (Esquema 2). Os derivados **4c-e** foram obtidos a partir do anidrido ftálico, o qual foi condensado com anilinas funcionalizadas em piridina sob refluxo, seguido de interconversão do grupo funcional hidroxila em éster de nitrato (-ONO₂), utilizando HNO₃/Ac₂O em diclorometano (CH₂Cl₂) a temperatura ambiente



(Esquema 2)⁵.

O derivado simplificado **4a** foi obtido a partir da condensação entre o anidrido ftálico e a uréia a 140 °C por 20 minutos, seguido de reação da ftalimida correspondente com formaldeído em aquecimento sob refluxo, durante 1h. A *N*-hidroximetil ftalimida obtida foi esterificada com HNO₃/Ac₂O em diclorometano (CH₂Cl₂) a temperatura ambiente, ao produto desejado. Esta mesma rota também foi aplicada para a obtenção de **4b**. Após *N*-funcionalização e interconversão de grupo funcional (-NO em -ONO₂), o fármaco talidomida foi convertido, em duas etapas, no derivado **4f** (Esquema 2).

Após obtenção e caracterização dos derivados **4a-4f**, estes foram submetidos a uma série de ensaios farmacológicos, dentre eles: a avaliação da capacidade dos compostos em atuarem como doadores de óxido nítrico (Reação de Griess); atividade anti-inflamatória (inibição do edema em orelha de camundongo induzido por capsaicina); atividade antinociceptiva (diminuição das

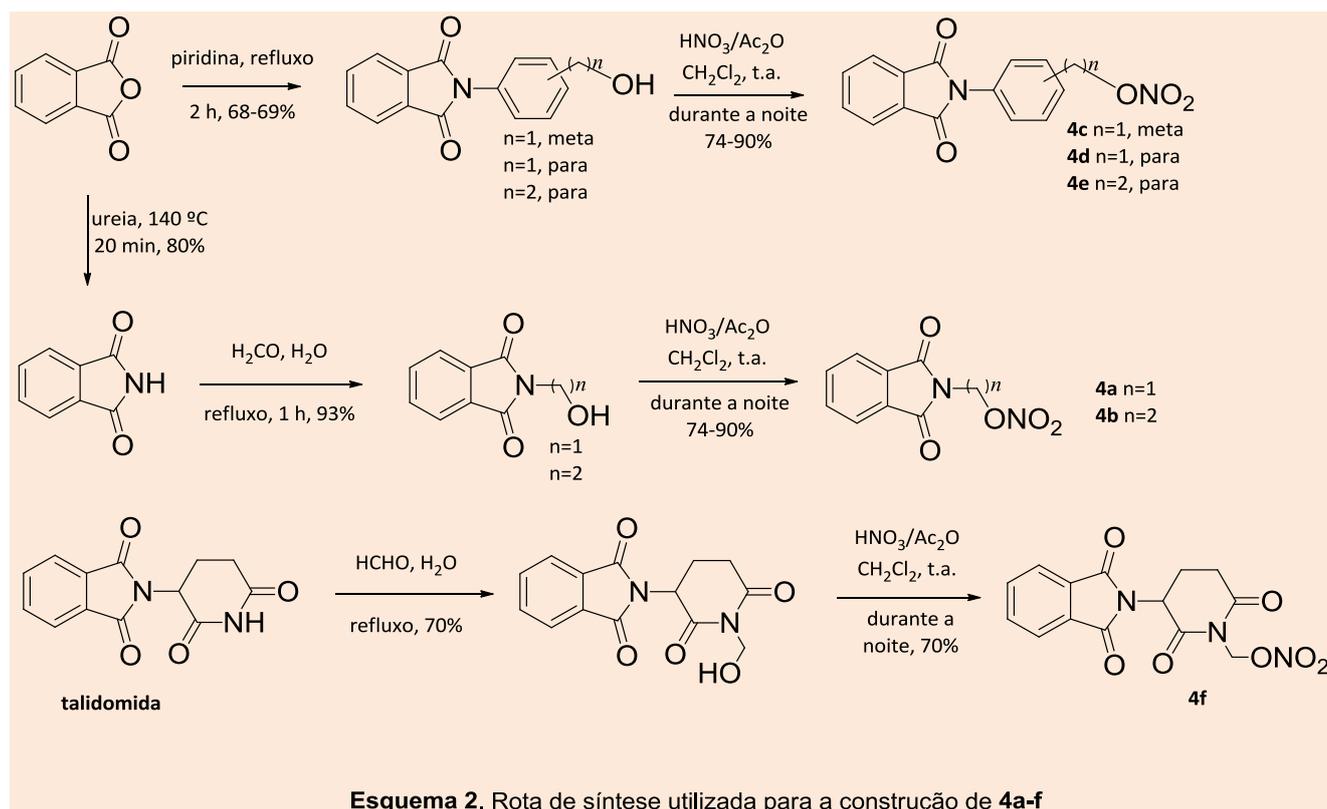
contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos) e capacidade em reduzir os níveis de TNF-α no sobrenadante de cultura de monócitos.

Todos os seis compostos apresentaram atividade como doadores de NO, com destaque para os derivados **4b**, **4c** e **4e**. Além disso, **4a-4f** também foram capazes de inibir o edema em orelha de camundongo induzido por capsaicina, com destaque para **4c** (aprox. 65%, 300 μmol/kg, v.o.), que foi capaz de inibir os níveis de TNF-α *in vitro* (91%, 300 μM), assim como **4d**, que foi o composto com atividade antinociceptiva mais proeminente (inibição de 66% a 100 μmol/kg, v.o.).

Por conta dos resultados observados para a redução dos níveis de TNF-α, assim como a atividade anti-inflamatória e doadora de NO, os compostos **4c** e **4d** podem ser destacados como novos protótipos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Referências bibliográficas

- ¹ Bonds, D. R. *Blood Rev.* **2005**, *19*, 99. [CrossRef] [PubMed]
- ² Rodgers, G. P.; Dover, G. J.; Noguchi, C. T.; Schechter, A. N.; Nienhuis, A. W. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *322*, 1037. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Haywood, C., Jr.; Beach, M. C.; Bediako, S.; Carroll, C. P.; Lattimer, L.; Jarrett, D.; Lanzkron, S. *Am. J. Hematol.* **2011**, *86*, 85. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Ribeiro, R. A.; Vale, M. L.; Ferreira, S. H.; Cunha, Q. F. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *391*, 97. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ dos Santos, J. L.; Lanaro, C.; Lima, L. M.; Gambero, S.; Franco-Penteado, C. F.; Alexandre-Moreira, M. S.; Wade, M.; Yerigenahally, S.; Kutlar, A.; Meiler, S. E.; Costa, F. F.; Chung, M. C. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5811. [CrossRef] [PubMed]



Esquema 2. Rota de síntese utilizada para a construção de **4a-f**

Entrevista com os autores do trabalho *Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds To Treat Sickle Cell Disease Symptoms*

Nailton: *O que inspirou o projeto que originou o artigo?*

Jean Leandro dos Santos: Um aluno do laboratório, que tem anemia falciforme, chegou com essa proposta para a professora Chung Man Chin e conversou com ela que tinha o sonho de desenvolver uma substância, candidata a fármaco, para o tratamento da doença dele. Só que ele não tinha ideia do que poderia fazer. O aluno comentou que a substância que ele tomava, a hidroxiureia, o único fármaco disponível para o tratamento sintomático da sua doença, era muito tóxica e que ele queria desenvolver substâncias que não tivessem a toxicidade da hidroxiureia. Partindo dessa ideia geral, que começamos a pensar em trabalhar com novas moléculas para o tratamento da anemia falciforme. Depois de estudarmos a fisiopatologia da doença, iniciamos este trabalho.

Nailton: *Comente sobre o planejamento estrutural dos compostos publicados no artigo:*

Jean Leandro dos Santos: O desenho das estruturas químicas foi feito em colaboração, e discutido entre a Dr^a Lídia M. Lima (LASSBio/UFRJ), a professora Chung Man Chin (Lapdesf/UNESP) e eu. Eu desenvolvia outro projeto em colaboração com a Dr^a Lídia, especificamente com alguns derivados ftalimídicos. Havia sido publicado um trabalho do uso da talidomida em anemia e imaginando isso nós fizemos a hibridação molecular entre a subunidade estrutural que a gente tinha visto como responsável pelo efeito benéfico da talidomida com a hidroxiureia. Baseado no mecanismo de ação benéfico da hidroxiureia, relacionado com a doação de óxido nítrico, nós propusemos que os novos derivados da talidomida também funcionassem como doadores de óxido nítrico.

Nailton: *Gostaria que você comentasse, no contexto das doenças negligenciadas, o aspecto mais relevante desse artigo:*

Jean Leandro dos Santos: Eu acredito que o aspecto mais relevante seria a possibilidade de fomentar pesquisa na área da anemia falciforme, porque tratar uma doença com um único fármaco que não é específico para esta doença é um problema muito sério. A hidroxiureia é usada atualmente como antineoplásico e sabemos que ela pode induzir câncer. A busca de novos compostos para doenças que são extremamente negligenciadas, como é o caso da anemia falciforme, é muito importante, pois necessitamos criar perspectivas para melhoria de qualidade de vida do paciente com um tratamento mais adequado.

Nailton: *Gostaria que você comentasse sobre a característica multialvo dos compostos do artigo.*

Jean Leandro dos Santos: O desenho de compostos com múltiplos mecanismos de ação, usando a ferramenta de hibridação molecular, é muito importante para o tratamento de algumas doenças. Principalmente doenças envolvendo diversos mecanismos. No caso da artrite reumatoide, por exemplo: Se conseguíssemos tratar a doença com uma molécula capaz de atuar por vias diferentes, a possibilidade de curar ou melhorar a vida do paciente é maior do que se atuarmos num simples alvo terapêutico. Considerando a complexidade da anemia falciforme, se nós conseguirmos desenhar substâncias que tenham essa possibilidade de atuar em diferentes alvos terapêuticos o sucesso para encontrar um composto promissor pode ser maior.

Nailton: *E o que você destacaria como vantagens e desafios em se planejar moléculas multialvo?*

Jean Leandro dos Santos: A vantagem seria você conseguir uma multiplicidade de ação com um único composto. Em analogia com o modelo chave-fechadura proposto por Fischer, ter uma única chave sendo capaz de abrir diversas portas é algo mais interessante do que andar com um molho de chaves. Até porque a possibilidade de desenhar uma estrutura química com ação benéfica múltipla diminui uma série de problemas, como a interação medicamentosa, ajuste de dose, adesão do paciente àquele medicamento, etc. Ter uma estrutura que faz "tudo" é muito mais prático do que ter três medicamentos que você tem que tomar pela manhã, à tarde e à noite. Ter um composto com ação multialvo aumenta a adesão do paciente e isso facilita o tratamento.

Nailton: *Comente sobre os desafios enfrentados durante o trabalho:*

Jean Leandro dos Santos: A nossa maior dificuldade não foi do ponto de vista sintético, mas sim em relação a alguns ensaios biológicos que a gente precisava realizar visando à validação da nossa estratégia de modificação. Temos tentado fazer todos os ensaios farmacológicos em colaboração. Por exemplo, o ensaio para a caracterização da atividade *in vitro* foi feito em Campinas e os ensaios para a caracterização da atividade *in vivo* foi feito com colaboração com um grupo dos Estados Unidos.

Nailton: *Gostaria que você comentasse sobre as colaborações relacionadas ao trabalho. Como aconteceram, a importância no contexto do artigo, etc.*

Jean Leandro dos Santos: Colaborar para a realização do trabalho foi fundamental. Se a gente não tivesse tido as colaborações, o trabalho não teria acontecido. A primeira colaboração importante foi com a Dr^a Lídia (LASSBio/UFRJ), que foi quem nos auxiliou na questão do desenho das novas moléculas. Em seguida, viemos para o laboratório e sintetizamos os compostos. Aí entra a segunda colaboração, que foi com a Dr^a Magna Suzana (UFAL), sendo ela responsável pela realização de alguns ensaios biológicos que caracterizaram a atividade analgésica e anti-inflamatória desses compostos. Um terceiro colaborador foi do Grupo de Pesquisa do Hemocentro da UNICAMP, que foi responsável pela caracterização da atividade *in vitro* desses compostos. Se não houvesse essa colaboração com essas diferentes pessoas o trabalho não teria acontecido.

Nailton: *Você considera a anemia falciforme como uma possível área de interesse para a indústria farmacêutica?*

Jean Leandro dos Santos: Até um tempo atrás a indústria farmacêutica não tinha interesse neste tipo de doença, mas parece que hoje está um pouco diferente. Há possibilidades de convênios com empresas interessadas em mercados de nicho pequeno. Se eu estiver pensando, por exemplo, numa doença como a beta talassemia, que não tem muita pesquisa sobre o assunto. A indústria detentora de uma substância que trate essa doença vai vender para o mundo todo. Atualmente, essa estratégia é interessante para a indústria farmacêutica em alguns aspectos.

Nailton: Qual você espera que seja a repercussão desse artigo na área de química medicinal?

Jean Leandro dos Santos: Eu gostaria que a partir deste trabalho aumentasse a preocupação em fomentar a pesquisa para o tratamento da anemia falciforme. Esta doença acomete cada vez mais brasileiros, principalmente por conta da miscigenação racial.

Nailton: Como você imagina que esse artigo contribuirá para sua carreira de pesquisador?

Jean Leandro dos Santos: Acho que ele poderá abrir portas para novos contatos com pesquisadores interessados, dentro e fora do Brasil, em trabalhar na área, que tenham interesse em pesquisas sobre o assunto anemia falciforme, inclusive com novos ensaios.

Nailton: Gostaria que você comentasse sobre as dificuldades e desafios enfrentados por jovens pesquisadores na área de química medicinal:

Jean Leandro dos Santos: Um dos maiores desafios para um jovem pesquisador na área da química medicinal é lidar com o anseio de querer ver concluído seu trabalho, não só na síntese, mas na pesquisa pré-clínica, clínica, etc. O trabalho do químico medicinal é muito árduo. Esse projeto especificamente vem sendo desenvolvido há aproximadamente 7 anos. Esse fato associado à exigência por um número de publicações adequado talvez seja um dos maiores desafios para quem está iniciando a carreira científica. Temos que ter em mente que os trabalhos da química medicinal levam mais tempo no processo de desenvolvimento, quando comparados com outros trabalhos. Acho que essa é a grande dificuldade para as pesquisas que a gente desenvolve na área.

Nailton: De um modo geral, quais são as perspectivas deste trabalho?

Jean Leandro dos Santos: Ultimamente temos feito derivatizações no sentido de tentar otimizar a atividade que foi observada para os compostos-protótipos. Além disso, não sabemos qual é a exata relação da doação de óxido nítrico com a atividade e o aumento da expressão gênica das hemoglobinas, por isso queremos traçar essa relação. Qual é o nível de doação de NO mais adequado para conseguir o efeito desejado? Dentre as próximas etapas, observaremos através de um estudo farmacocinético o comportamento dessas substâncias com relação às características de absorção, distribuição, metabolismo e excreção e tentaremos modificar as nossas moléculas para que elas tenham um perfil farmacodinâmico e farmacocinético adequados, para se tornem no futuro, possíveis fármacos.

Nailton: Como você avalia os recentes avanços em pesquisas para o tratamento de doenças negligenciadas? O cenário está melhorando?

Chung Man Chin: Quando se trata de doenças negligenciadas, as políticas públicas voltadas para P&D de medicamentos de interesse nacional dos países em desenvolvimento são ainda insuficientes e um dos grandes fatores é a falta de mercado, provocada pelo baixo interesse econômico que esses pacientes representam para a indústria farmacêutica. Porém, o cenário de investimento está mudando de forma muito lenta, pois algumas companhias farmacêuticas multinacionais vêm demonstrando interesse em auxiliar pesquisadores brasileiros com disponibilização de laboratórios para ensaios de compostos com atividade potencial, principalmente de origem natural (Na prática, observa-se que não é tão simples assim conseguir este espaço). As organizações sem fins lucrativos têm merecido crédito nesses últimos anos com investimentos na área de doenças negligenciadas, como a OMS, Fundação Bill & Melinda Gates e Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi, da sigla em inglês). Porém, as respostas ou resultados efetivos em relação a fármacos inovadores efetivos no mercado para estas doenças ainda são muito escassos, pois a pesquisa é lenta. Em relação à anemia falciforme, com grande surpresa, uma indústria nacional posicionou-se positivamente na proposta para o avanço das pesquisas e essa atitude já demonstra uma mudança de cenário.

Nailton: Além da anemia falciforme, quais outras doenças negligenciadas carecem de mais grupos de pesquisa engajados para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos?

Chung Man Chin: Dengue, esquistossomose, leishmaniose e hanseníase.

Nailton: Quais são as subáreas que necessitam de maiores avanços/investimentos para consolidar a química medicinal brasileira?

Chung Man Chin: É muito difícil responder a esta questão, pois vejo a química medicinal brasileira em expansão e ela é muito ampla. Vou desviar a resposta para a área do desenvolvimento de fármacos, que está com um buraco: o escalonamento de síntese e os estudos toxicológicos dos potenciais candidatos a fármaco. Sem estas áreas, não há continuidade do que planejamos. Outro problema que enfrentamos, mais do que os financiamentos dos projetos, é a falta dos recursos humanos que consolidam os grupos. A formação de doutores e pós-doutores que permaneçam no grupo de pesquisa é essencial (o que não acontece). A criação de centros de pesquisa em desenvolvimento de fármacos seria uma das soluções.

Nailton: Quais são os maiores desafios para os pesquisadores na área de química medicinal no Brasil hoje?

Chung Man Chin: O maior desafio é conseguir que um composto se torne um fármaco na terapêutica. Para isso, não basta apenas planejar a molécula, mas saber se este composto é viável sinteticamente, seguro e mais do que isso, conseguir um parceiro comercial. Vale lembrar que o pesquisador tem a experiência no laboratório e não tem habilidade nem disponibilidade para realizar esta tarefa. Ter alguém que busque os parceiros e permita esta ligação da universidade (pesquisador) e indústria farmacêutica é também essencial para o sucesso.

Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds to Treat Sickle Cell Disease Symptoms

Abstract: This overview relates the design, synthesis and pharmacological evaluation of six compounds designed by molecular hybridization that showed relevant effects for the treatment of sickle cell disease symptoms, as could be evidenced by *in vivo* and *in vitro* assays. These results were published by Santos, J. L.; Lanaro, C.; Lima, L. M.; Gambero, S.; Franco-Penteado, C. F.; Alexandre-Moreira, M. S.; Wade, M.; Yerigenahally, S.; Kutlar, A.; Meiler, S. E.; Costa, F. F.; Chung, M. C. in the Journal of Medicinal Chemistry. After a brief biography we show an interview with Jean Leandro dos Santos and Chung Man Chin.

Keywords: Sickle cell disease; thalidomide derivatives; molecular hybridization.

Resumo: Esta resenha descreve o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de seis compostos, planejados por hibridação molecular, que apresentaram efeitos relevantes no tratamento dos sintomas da anemia falciforme, como pode ser evidenciado por ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Estes resultados foram publicados por Santos, J. L.; Lanaro, C.; Lima, L. M.; Gambero, S.; Franco-Penteado, C. F.; Alexandre-Moreira, M. S.; Wade, M.; Yerigenahally, S.; Kutlar, A.; Meiler, S. E.; Costa, F. F.; Chung, M. C. no Journal of Medicinal Chemistry. A seguir a resenha é apresentada uma breve biografia de Jean Leandro dos Santos, Chung Man Chin e uma entrevista com eles sobre o artigo.

palavras-chave: Anemia falciforme; derivados da talidomida; hibridação molecular.



✉ nailtonjr@gmail.com

Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Nailton M. Nascimento-Jr graduou-se em Química Industrial pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ, 2007) e realizou o Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ-UFRJ, 2009). Desde 2009, desenvolve trabalho de tese em Química Medicinal no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) no planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos para o tratamento da asma sob orientação do prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga. Tem experiência em modelagem molecular, síntese de derivados heterocíclicos, *N*-acilidrazônicos e síntese orgânica com o auxílio de micro-ondas. Atualmente é bolsista FAPERJ nota 10.

Thaís R. Ferreira de Melo cursou Farmácia-Bioquímica na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP-Araraquara, 2011) e realizou estágio de iniciação científica no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (Lapdesf) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP-Araraquara) no tema "Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente úteis como preventivos de aterotromboses" sob orientação do prof. Dr. Jean Leandro dos Santos.



✉ trfmelo@gmail.com

Resumo da biografia dos autores de *Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds To Treat Sickle Cell Disease Symptoms*



Jean Leandro dos Santos é Graduado em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (2004). Possui Mestrado (2007) e Doutorado (2009) em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP). Atualmente é Professor Assistente Doutor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, ministrando as disciplinas de Atenção Farmacêutica, Introdução ao Planejamento de Fármacos e Desenvolvimento de Fármacos. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Desenvolvimento de Fármacos, Assistência e Atenção Farmacêutica. Atua também no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos principalmente para doenças negligenciadas. [Link para CV Lattes](#)



Chung Man CHIN é graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", mestrado em Ciências Biológicas (Farmacologia) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) e doutorado em Fármacos e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP. Atualmente é "Professor Assistente Doutor" da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara. É coordenadora do Lapdesf - Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos da FCF/UNESP. Participa do projeto Rede Nanobiotec 2008. Possui projetos de pesquisa de cooperação Indústria Farmacêutica/Universidade desde 2003, no planejamento de novos fármacos, patentes depositadas e concedidas nacional e internacionalmente. É orientadora (mestrado e doutorado) no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCF-Unesp e vice-presidente da Associação Farmacêutica de Araraquara (AFAR). [Link para CV Lattes](#)

Antihyperalgesic effects of a novel muscarinic agonist (LASSBio-873) in spinal nerve ligation in rats

Thaiana CF Mendes,* Fernanda Antunes,[†] Margarete M Trachez,[‡] Nailton M Nascimento Jr,[§]
Carlos AM Fraga,*[§] Eliezer J Barreiro,*[§] Gisele Zapata-Sudo* and Roberto T Sudo*

*Program of Drug Development, Institute of Biomedical Science, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,

[†]Center of Agricultural and Technological Sciences, State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos

Goytacazes, [‡]Department of Anaesthesiology, Fluminense Federal University, Niterói, and [§]Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

See editorial on page 395

SUMMARY

1. New chemicals or adjuvants with analgesic effects on chronic pain are needed and clinically relevant due to the limited number of effective compounds that possess these characteristics. LASSBio-873, a pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivative, activates muscarinic cholinergic receptors and has potent analgesic effects on acute and inflammatory pain.

2. The present study evaluated the therapeutic and prophylactic effects of oral administration of LASSBio-873 in a spinal nerve ligation (SNL) model of chronic peripheral nerve injury.

3. LASSBio-873 (100 mg/kg) inhibited the development of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia when administered once daily for 7 consecutive days after SNL surgery and reversed these symptoms. LASSBio-873 treatment did not alter rat behaviour in open field testing measured during the first 24 h after administration and again after 7 continuous days administration. The analgesic effect of LASSBio-873 was inhibited by intrathecal methocramine, an M₂ receptor antagonist, implicating the muscarinic M₂ receptor signalling pathway in the drug's action.

4. These results reinforce the potential of LASSBio-873 as a possible prototype for the development of more effective alternatives for the treatment of neuropathic pain.

Key words: Pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives, chronic pain, hyperalgesia, muscarinic, spinal nerve ligation.

INTRODUCTION

Pain in humans is a significant health and economic issue. The combined cost of pain treatment in developed countries averages

US\$1 trillion per year.¹ In the US alone, medical and lost productivity costs associated with chronic pain total as much as US \$635 billion annually.²

The International Association for the Study of Pain (IASP) defines neuropathic pain as pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system.^{3,4} Different kinds of insults to the nervous system can stimulate the development of neuropathic pain. The mechanisms involved in the development and maintenance of pain states involving the spinal cord are not fully understood.⁵

A high prevalence of chronic neuropathic pain that severely impairs the quality of life of affected patients has been observed in clinical practice.⁶ The spectrum of neuropathic pain covers a variety of disease states, including diabetes mellitus, herpes zoster, nerve compression or radiculopathy, alcoholism, chemotherapy, drug abuse and trigeminal neuralgia, which are associated with allodynia and hyperalgesia.^{7–9}

The drug classes providing clinically effective treatment of neuropathic pain include tricyclic antidepressants, serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors, the anticonvulsants gabapentin and pregabalin and opioids.^{8,10,11} Opioids are generally used to treat chronic pain only after at least two other approaches have failed. Current clinical treatments for neuropathic pain include amitriptyline, a tricyclic antidepressant with mixed pharmacology that can impair cognitive performance, and gabapentin, a compound that interacts selectively with $\alpha 2\delta 1$ calcium channel subunits.¹²

The use of multiple drug therapies is common in clinical practice. Despite a considerable increase in the number of randomized placebo-controlled trials investigating potential therapies for neuropathic pain, the medical treatments that are available are far from satisfactory, with less than 50% of patients significantly benefiting from any pharmacological agent.⁸ Adverse side-effects and insufficient efficacy have been the driving forces behind the development of new analgesics.

Novel substances, collectively referred to as pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives, have been designed and synthesised from zolpidem as a lead compound. These derivatives were originally designed to be selective GABA receptor modulators based on their structural analogy with zolpidem, which produces rapid-onset, short-duration hypnosis as a consequence of binding to benzodiazepine receptors.⁹ Zolpidem induces analgesia at high doses (80 mg/kg),⁸ but has the secondary effect

Correspondence: Dr Gisele Zapata-Sudo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco J, Sala 14, Rio de Janeiro 21941–902, Brazil. Email: gsudo@farmaco.ufrj.br

Received 22 March 2012; revision 27 March 2013; accepted 4 April 2013.

© 2013 Wiley Publishing Asia Pty Ltd

of decreasing locomotor activity in mice.^{13–17} Although the mechanisms responsible for zolpidem-induced analgesia are not yet known, opioid pathway involvement has been suggested.⁸

Of the zolpidem derivatives tested, LASSBio-873 has been shown to be the most effective as an analgesic.¹⁸ The antinociceptive activity of LASSBio-873 has been shown to be mediated via activation of the muscarinic system and it reduces carrageenan-induced thermal hyperalgesia as well as formalin-induced acute inflammatory pain.¹⁹ Unlike the parent compound zolpidem, the pharmacological activities of LASSBio-873 were not affected by flumazenil (a benzodiazepine receptor antagonist) or yohimbine (an α_2 -adrenoceptor antagonist), indicating that muscarinic acetylcholine receptor pathways are selectively important for the drug's analgesic activity.¹⁹

Based on the results of the studies discussed above, it was considered of importance to investigate the efficacy of LASSBio-873 in the treatment and prevention of neuropathic pain. Therefore, the main objective of the present study was to investigate the prophylactic and therapeutic effects of LASSBio-873 in neuropathic pain, using the experimental model of spinal nerve ligation (SNL) in rats.²⁰ In this model, as in most animal models of neuropathic pain, nerve injury leads to varying degrees of hypersensitivity to tactile stimuli, chemicals and heat, with signs of pain that, much like clinically observed neuropathic pain, do not resolve with traditional analgesics.²¹ In addition, we tested the effect of LASSBio-873 on animals' motor behaviour and examined whether the analgesic effects of LASSBio-873 are mediated through muscarinic M₂ receptor signalling.

METHODS

Animals

The present study was approved by the Animal Care and Use Committee at Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ; Rio de Janeiro, Brazil). Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) provided by the animal facility of the UFRJ, weighing 160–200 g, were maintained in a temperature (25°C)- and humidity (50–60%)-controlled room on a 12 h light–dark cycle. Water and food were available *ad libitum*. Animals were acclimated to the laboratory environment for at least 40 min before the start of experiments. Each animal was used for one experiment only.

Drugs

LASSBio-873 was synthesised and provided by the Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (UFRJ). Methocarbamol was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Morphine sulphate, dimethylsulphoxide (DMSO) and nanoemulsion were kindly donated by Cristalia Produtos Químicos e Farmacêuticos (Itapira, Brazil) and were used in the vehicle solution.

Surgery

Spinal nerve ligation was used to induce peripheral neuropathy.²⁰ Briefly, after rats had been anaesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p.), their skin was sterilized with 0.5% chlorhexidine and the lateral laminae of the lower lumbar and upper sacral vertebrae

were exposed by a dorsal incision. The right L6 transverse process was removed and the right L5 spinal nerve was isolated and ligated tightly using 6–0 silk sutures. For sham-operated rats, the same process was performed except that the spinal nerve was not ligated.

Somatosensory and motor testing

Heat withdrawal latency

Heat withdrawal latency was assessed by applying a focused radiant heat source (produced by a light beam) to the hind paw through a glass plate.²² The light beam was deactivated when the animal lifted its hind paw, allowing measurement of the length of time the paw remained in contact with the heat source. Withdrawal latency was determined using a plantar analgesia meter (model 33; ITC, Woodland Hills, CA, USA). The latency to evoke withdrawal was determined with a cut-off value of 30 s. Control latency was determined using the average response of three measurements separated by 5 min intervals prior to the surgical procedure. Both hind paws were tested. Nociceptive threshold, as determined by heat withdrawal latency, was measured prior to and on after surgery. Animals were excluded if a motor deficit was observed.

Mechanical allodynia

Withdrawal threshold to pressure applied to the hind paw (in g) was measured using a digital analgesimeter (model EFF301; Insight, Ribeirão Preto, Brazil).²³ The pressure meter consisted of a hand-held force transducer fitted with a 0.7 mm² polypropylene tip. Upon paw withdrawal, the pressure was released immediately and the nociceptive threshold was read on a scale. Stimulation of the paw was repeated five times and the readings were accepted if the difference between the highest and lowest measure was < 10 g. An upper limit of 150 g was used to avoid potential tissue injury in the absence of a response. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were evaluated on the same day.

Locomotor activity test

Sedative activity was investigated by recording spontaneous locomotor activity in a 45 × 45 cm open field chamber (LE 8811; Leticia, Barcelona, Spain) in which 16 infrared photocells were positioned every 2.5 cm. Total locomotor activity was defined as the number of beam interruptions registered in the attached computer during the 40 min period following oral administration of either vehicle or LASSBio-873 (100 mg/kg) in a group of 10 rats. Data are expressed as the number of movements per minute. This evaluation was conducted immediately and 24 h after a single administration or after 7 consecutive days of substance administration. This procedure was applied to control for sedative activity in the evaluation of postoperative hyperalgesia and allodynia.

Dose–response curve

Animals subjected to SNL surgery, as described above, were observed for 7 days and animals that then demonstrated the

development of neuropathy were divided randomly into groups treated by gavage with 0, 8, 20, 40, 75 or 100 mg/kg, p.o., LASSBio-873 for 7 consecutive days. Paw withdrawal threshold response in the heat hyperalgesia test was evaluated at the end of treatment and latency was plotted using linear regression.

Dosing protocols

Prophylactic protocol

Thirty-two Wistar rats were randomly divided into sham and SNL groups. A single dose of either vehicle or LASSBio-873 was administered orally 4 h after surgery by gavage and then again on each of the 7 consecutive days after surgery. The four dosing experimental groups were: SNL/DMSO-p.o., SHAM/DMSO-p.o., SNL/LASSBio-873-p.o and SHAM/LASSBio-873-p.o. The neuropathic (SNL/DMSO) and non-neuropathic groups (SHAM/DMSO) were treated with 1.5 μ L/g bodyweight, p.o., DMSO for 7 days, whereas the SNL/LASSBio-873-p.o and SHAM/LASSBio-873-p.o. groups were treated with 100 mg/kg, p.o., LASSBio-873 for 7 days.

Therapeutic protocol

Seven days after surgery, SNL animals with a paw withdrawal response significantly lower than the response of control animals were considered neuropathic. Treatment was then initiated and lasted 7 days (from Day 7 to Day 14 after surgery), with sham and SNL groups subdivided as in the protocol described above.

Intrathecal injection

Sevoflurane (3%)-anaesthetized rats were injected intrathecally with 10 μ g methocitramine, morphine (reference analgesic), LASSBio-873 or 40 μ L vehicle. Rats ($n = 6$ per group) were positioned for intrathecal injection at the L4–5 intervertebral space using a 30 gauge needle attached to a 300 μ L syringe. The tail flick reaction was used to confirm proper positioning of the needle in the intrathecal space. A 40 μ L aliquot of drug solution was injected into each animal. Control animals received intrathecal vehicle (nanoemulsion) only. Animals were allowed to recover from anaesthesia for 10 min before starting the nociceptive test. In this protocol, DMSO was not used as a vehicle due to its potential activity.

Experimental protocols

Prophylactic protocol

Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were measured on post-surgical Days 3 and 7. Baseline (BL) measures were evaluated immediately before surgery.

Therapeutic protocol

Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were measured on post-surgical Days 10 and 14, corresponding to post-treatment Days 3 and 7. Baseline measures were evaluated immediately before the surgery.

Intrathecal injection: Evaluation of analgesic mechanism

After 40 min acclimatization, control hind paw withdrawal latencies were obtained. Rats ($n = 6$ per group) were then anaesthetized with sevoflurane (3%) and LASSBio-873, or LASSBio-873 plus methocitramine were administered in 40 μ L of vehicle (nanoemulsion) at a dose of 10 μ g each. Paw withdrawal latency was measured before and 15, 30, 45 and 60 min after treatment and every 15 min thereafter until rats exhibited complete recovery from analgesia. Antinociceptive effects were determined as a percentage of the maximum possible effect (MPE) according to the following formula:

$$\text{MPE} = \frac{[(\text{Post-treatment latency} - \text{Control latency}) / (\text{Cut-off time} - \text{control latency})] \times 100}$$

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. Behavioural data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by Bonferroni's post hoc correction analysis. Multiple comparisons were made between the control group and the other groups. Circularity was evaluated before ANOVA tests were performed. Differences were considered significant at $P < 0.05$, with a two-sided critical value measure. All tests were performed using GraphPad Prism (version 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Dose–response curve

Orally administered LASSBio-873 (8, 20, 40, 75 or 100 mg/kg) produced a dose-dependent analgesic effect in neuropathic animals, as evidenced by increasing withdrawal thresholds (Fig. 1). Withdrawal threshold values in animals treated with 100 mg/kg LASSBio-873 were similar to controls and this dose was used in subsequent experiments.

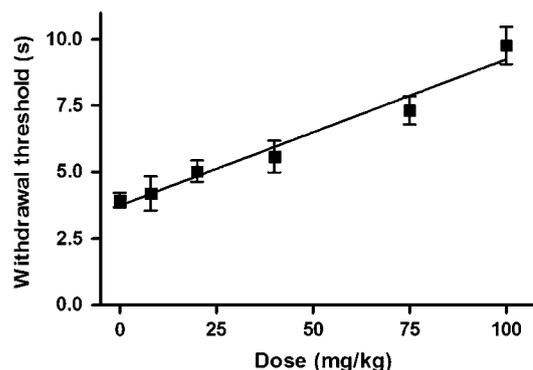


Fig. 1 Dose–response curve for LASSBio-873 in the heat withdrawal test (therapeutic protocol). Seven days after spinal nerve ligation, rats were treated orally by gavage with 0, 8, 20, 40, 75, or 100 mg/kg LASSBio-873 for 7 consecutive days. The paw withdrawal threshold response in the heat hyperalgesia test was evaluated at the end of treatment and latency was plotted using linear regression. The data shown were obtained on the last day of the 7 day treatment period. Data are the mean \pm SEM.

Prophylactic protocol

The effects of LASSBio-873 administration on SNL-induced thermal hyperalgesia were evaluated. Sham-operated animals treated with DMSO or LASSBio-873 had no signs of hyperalgesia because withdrawal latency values did not differ between BL and post-surgical Day 7 (Fig. 2). Animals in the SNL group treated with DMSO were hyperalgesic, with a decreased withdrawal latency on post-surgical Day 7 compared with BL (3.9 ± 0.3 vs 9.0 ± 0.3 s, respectively; $P < 0.01$). Signs of hyperalgesia were not observed in SNL animals treated with LASSBio-873, with no significant difference between BL and Day 7 after surgery withdrawal latency (10.3 ± 0.7 vs 10.9 ± 1.1 , respectively; Fig. 2).

The decreased withdrawal latency in the SNL/DMSO group differs significantly from that measured in each of the other groups ($P < 0.01$; Fig. 2).

Effects of LASSBio-873 on SNL-induced mechanical allodynia

As determined by withdrawal threshold measurements, mechanical allodynia did not occur in sham-operated animals treated with either DMSO or LASSBio-873 (Fig. 3). In contrast, the SNL/DMSO group developed allodynia by Day 3 after surgery because withdrawal threshold values decreased from 30.7 ± 1.8 to 21.9 ± 3.4 g and the allodynia persisted until the end of the protocol. LASSBio-873 prevented allodynia in the SNL/LASSBio-873 group because no significant change in withdrawal threshold values occurred from BL to post-surgical Day 7 (34.6 ± 2.3 vs 32.2 ± 0.9 g, respectively; Fig. 3).

Therapeutic protocol

Following surgery, sham and SNL animals were observed for 7 days. Animals from the SNL group that developed thermal hyperalgesia and allodynia (as defined by post-surgical withdrawal thresholds significantly lower than BL (control) with-

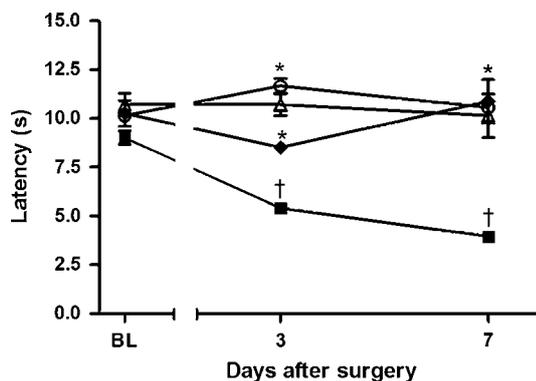


Fig. 2 Evaluation of LASSBio-873 in the heat withdrawal test (prophylactic protocol). LASSBio-873 (100 mg/kg, p.o.) was administered daily to sham-operated (○) or spinal nerve-ligated (SNL; ◆) rats for 7 days after surgery. (■), vehicle (dimethylsulphoxide)-treated sham-operated rats; (Δ), vehicle-treated SNL rats. Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle-treated SNL rats on the same day; † $P < 0.05$ compared with Day 0 (two-way ANOVA for repeated measures ($k = 9$) followed by Bonferroni's correction post hoc analysis). BL, baseline.

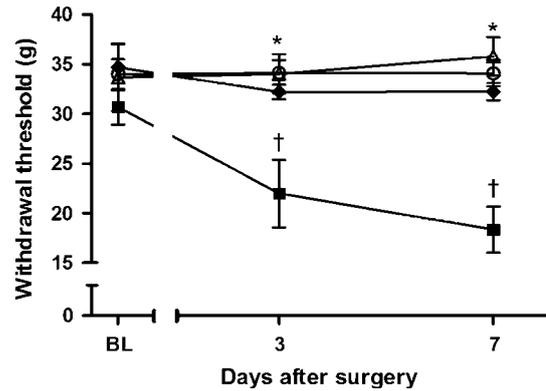


Fig. 3 Evaluation of LASSBio-873 in the mechanical withdrawal test (prophylactic protocol). LASSBio-873 (100 mg/kg, p.o.) was administered daily to sham-operated (○) or spinal nerve-ligated (SNL; ◆) rats for 7 days after surgery. (■), vehicle (dimethylsulphoxide)-treated sham-operated rats; (Δ), vehicle-treated SNL rats. Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle-treated SNL rats on the same day; † $P < 0.05$ compared with Day 0 (two-way ANOVA for repeated measures ($k = 9$) followed by Bonferroni's correction post hoc analysis). BL, baseline.

drawal thresholds during the observation period) were treated with vehicle or 100 mg/kg, p.o., LASSBio-873 for 7 days.

Effects of LASSBio-873 on SNL-induced thermal hyperalgesia

Hyperalgesia, as determined by changes in withdrawal latency, did not occur over the 14 days after surgery in the sham-operated group (Fig. 4). In contrast, all SNL-treated animals developed hyperalgesia by post-surgical Day 7. The SNL/DMSO group had changes in withdrawal latency from 10.2 ± 0.6 to 5.9 ± 0.3 s and this decreased latency persisted for 14 days after surgery (Fig. 4). The SNL/LASSBio-873 group also

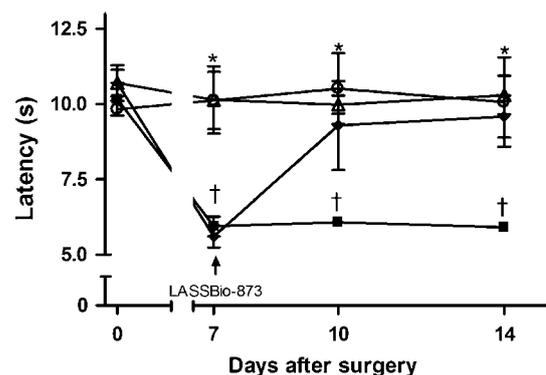


Fig. 4 Evaluation of LASSBio-873 in the heat withdrawal test (therapeutic protocol). LASSBio-873 (100 mg/kg, p.o.) was administered daily to sham-operated (○) or spinal nerve-ligated (SNL; ◆) rats for 7 days after surgery. (■), vehicle (dimethylsulphoxide)-treated sham-operated rats; (Δ), vehicle-treated SNL rats. Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with vehicle-treated SNL rats on the same day; † $P < 0.05$ compared with Day 0 (two-way ANOVA for repeated measures ($k = 12$) followed by Bonferroni's correction post hoc analysis). BL, baseline.

developed hyperalgesia, with withdrawal latency values changing from 10.7 ± 0.4 to 5.56 ± 0.4 s on post-surgical Day 7. (Fig. 4). LASSBio-873 treatment from Day 7 to Day 14 resulted in a reversal of hyperalgesia with withdrawal latency values on Day 14 (9.6 ± 0.7 s) not significantly different from those obtained during the control period ($P > 0.05$; Fig. 4).

Effects of LASSBio-873 on SNL-induced mechanical allodynia

Withdrawal threshold values did not change in the SHAM/DMSO and SHAM/LASSBio-873 groups from BL throughout the post-surgical period. (Fig. 5). Thus, mechanical allodynia did not occur in these groups. In contrast, allodynia occurred in both SNL groups, as evidenced by decreased withdrawal threshold values by post-surgical Day 7 (Fig. 5). In the SNL/DMSO group, withdrawal threshold declined from 36.6 ± 0.3 to 21.5 ± 1.2 g by Day 7 and remained low through until Day 14. Successful treatment of allodynia by LASSBio-873 was evident by reversal of the withdrawal threshold from 22.6 ± 1.4 g on Day 7 to 33.2 ± 1.0 g on Day 14 (Fig. 5).

All measurements in the contralateral paws were similar across all experimental groups, indicating that treatment with LASSBio-873 according to our protocol (described above) produced no significant motor changes in the animals.

Evaluation of the analgesic mechanism

Intrathecal injection of M_2 receptor antagonist

Intrathecal injection of $10 \mu\text{g}$ LASSBio-873 produced a maximal antinociceptive effect of $27.1 \pm 4.3\%$ MPE 15 min after administration (Fig. 6). This value is similar to the $26.5 \pm 5.9\%$ MPE produced by $10 \mu\text{g}$ morphine, injected as an analgesic reference. Coadministration of LASSBio-873 and methoctramine, an M_2

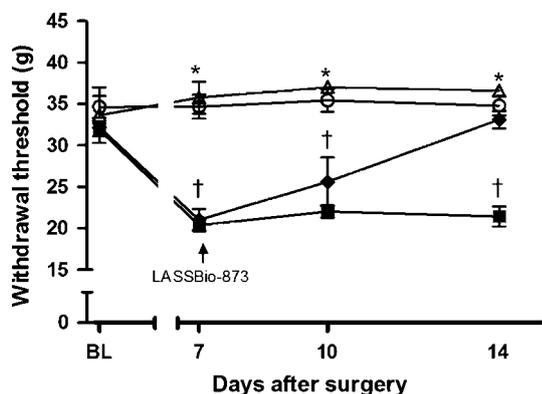


Fig. 5 Evaluation of LASSBio-873 in the mechanical withdrawal test (therapeutic protocol). LASSBio-873 (100 mg/kg , p.o.) was administered daily to sham-operated (\circ) or spinal nerve-ligated (SNL; \blacklozenge) rats for 7 days after surgery. (\blacksquare), vehicle (dimethylsulphoxide)-treated sham-operated rats; (\triangle), vehicle-treated SNL rats. Data are the mean \pm SEM. $*P < 0.05$ compared with vehicle-treated SNL rats on the same day; $\dagger P < 0.05$ compared with Day 0 (two-way ANOVA for repeated measures ($k = 12$) followed by Bonferroni's correction post hoc analysis). BL, baseline.

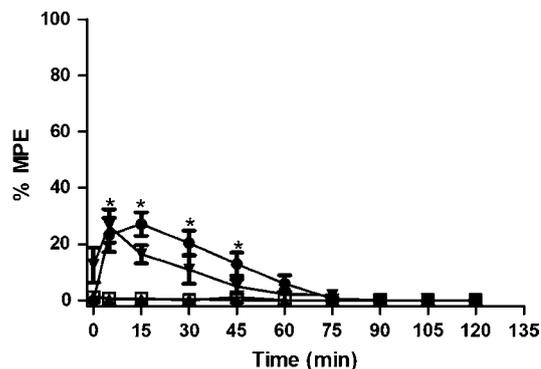


Fig. 6 Time-course of antinociceptive effects showing the percentage maximum possible effect (MPE) of intrathecally administered $10 \mu\text{g}$ LASSBio-873 (\bullet), $10 \mu\text{g}$ LASSBio-873 plus $10 \mu\text{g}$ methoctramine (\square), $10 \mu\text{g}$ morphine (\blacktriangledown) and $40 \mu\text{L}$ vehicle alone (\blacktriangle). Control animals received vehicle. Data are then mean \pm SEM. $*P < 0.05$ compared with vehicle (one-way ANOVA followed by Dunnett's test for inter-group comparisons).

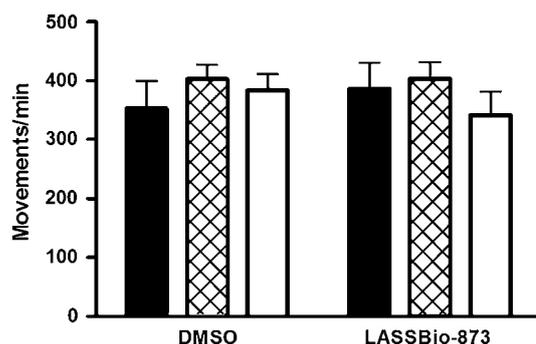


Fig. 7 Locomotor activity after oral administration of LASSBio-873. Motor activity was quantified over a 40 min test session immediately and 24 h after LASSBio-873 administration. (\blacksquare), 40 min; (\boxtimes), 24 h; (\square), 7 days. Data are the mean \pm SEM of movements per minute. $*P < 0.05$ compared with the control group (dimethylsulphoxide; one-way ANOVA followed by Dunnett's test for inter-group comparisons).

receptor antagonist, blocked the antinociceptive effects of LASSBio-873 (Fig. 6).

Open field test

The open field test was performed initially before oral administration of the test substance or vehicle. Over a 40 min observation period, the LASSBio-873 (100 mg/kg)- and vehicle-treated groups made similar amounts of movements (35.4 ± 4.6 vs 38.7 ± 5.3 movements/min, respectively). Similar results were observed 24 h after LASSBio-873 administration and after 7 days consecutive treatment (40.4 ± 2.9 and 34.1 ± 4.1 movements/min, respectively; Fig. 7).

DISCUSSION

The present study demonstrates that LASSBio-873 is efficacious in preventing and treating neuropathic pain in an SNL animal model. The development of thermal and mechanical hyperalgesia in neuropathic rats was completely abolished by administration of

LASSBio-873. In a therapeutic protocol, LASSBio-873 was also effective because threshold values returned to normal levels, indicating that LASSBio-873 reduces various neuropathic pain symptoms, including thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. In addition, our study provides evidence that the analgesic effect of LASSBio-873 seems to be mediated through M_2 receptors, reinforcing the recent findings of Mendes *et al.* in mice.¹⁹ Although a previous study provided evidence for a sedative effect of LASSBio-873,¹⁸ no effect on locomotor behaviour was observed after oral administration of LASSBio-873.

Spinal nerve ligation is a well-characterized model of neuropathic pain and is believed to result in pain sensation similar to that experienced by human patients suffering from neuropathic pain. The SNL model consists of a tight ligation at the L5 spinal nerve distal to the dorsal root ganglion (DRG), which leads to neuropathic pain that is consistent with pain associated with a partial injury of a peripheral nerve. This type of lesion contains both injured and uninjured sensory axons, which induces sympathetically dependent, long-lasting behavioural signs of ongoing pain, including mechanical and heat hyperalgesia, as well as cold allodynia.²⁰

Recently, Bartolini *et al.*²⁴ have shown that different forms of interference in the cholinergic pathway could modulate pain-including direct agonists and substances that promote acetylcholine (ACh) synthesis, enhance ACh release or inhibit acetylcholinesterase activity.

The ability of the M_2 receptor antagonist to block the antihyperalgesic effects of LASSBio-873, as observed herein, supports the hypothesis that the analgesic effect of LASSBio-873 following intrathecal administration is due to activation of M_2 receptors. Similar results were reported by Song *et al.*,²⁵ who found that the intrathecal administration of oxotremorine, also a muscarinic agonist, produced a significant increase in the tactile withdrawal threshold in rats subjected to partial sciatic nerve lesion by predominantly modulating M_2 muscarinic spinal receptors.

This finding is consistent with established knowledge of cholinergic modulation of peripheral sensory neuronal activity in both neurogenic inflammatory processes and regulation of nociceptive processing directly involving M_2 receptors,²⁶ the predominant subtype of muscarinic receptor in the spinal cord, as demonstrated in functional studies.²⁷ In addition, peripheral nerve injury produces various neurobiological events that contribute to chronic pain, including increased expression of M_2 receptors in the DRG.²³

The spinal cord is the primary site for cholinergic promotion of analgesia. Cholinergic agents block nociception by mimicking the release of ACh from spinal cholinergic nerves.²⁸ The analgesic effect is produced via activation of both spinal and supraspinal muscarinic cholinergic receptors in several species, including humans.²⁵ Activation of muscarinic cholinergic receptors inhibits spinal dorsal horn projection neuronal responses to nociceptive stimuli in rats.²⁹ The reduction of nociceptive transmission is mediated by the combination of increased inhibitory activity through GABA and glycine release and decreased excitatory activity through inhibition of glutamate release in the spinal dorsal horn. Inhibition of pain signalling likely occurs via M_2 receptors³⁰ and through activation of lamina II GABAergic interneurons.³¹

Kimura *et al.* have shown that SNL rats, but not normal rats, treated with donepezil (an anticholinesterase agent) exhibited

relief of hypersensitivity by increasing extracellular ACh concentrations. This effect was reduced by intrathecal administration of cholinergic and GABAergic antagonists.³² These findings reinforce our results and the hypothesis that the analgesic effects of LASSBio-873 are mediated through this pathway.

Some authors also demonstrated that activation of supraspinal M_1 receptors is very important for antinociceptive effects of cholinomimetic agents, such as xanomeline³³ and McN-A343,²⁴ in neuropathic pain. In the present study, the role of M_1 receptor activation in the action of LASSBio-873 was not investigated, but we have demonstrated previously the ability of LASSBio-873 to activate this receptor subtype.¹⁹

In addition, cholinergic agonists that cross the blood-brain barrier, similar to LASSBio-873, can activate the 'cholinergic anti-inflammatory pathway' and thereby reduce serum levels of proinflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor, which then inhibits the antibody response.²⁹ Inhibition of the inflammatory pathway ultimately leads to a reduction in neuropathic pain symptoms because it is known to have central effects.^{18,19}

Numerous studies have demonstrated the importance of muscarinic cholinergic agonists in inhibiting neuropathic pain symptoms and cholinomimetics are efficacious in numerous preclinical and clinical pain models, suggesting that they have broad therapeutic potential.³⁴

In humans, it is possible that different receptors may be involved in reversing thermal versus mechanical stimuli. However, there appears to be no such dissociation in rodents. Regardless, it would be difficult to conduct direct head-to-head comparisons of potencies between species and differing endpoints given the different measurement methodologies and body areas tested.³⁵

Acetylcholine modulates nicotinic receptors and chronic activation of N_1 nicotinic receptors prevents and restores neuropathic injuries. Some nicotinic agonists, such as nicotine and epibatidine, have been shown to have a highly analgesic effect in different models of pain, but most of them have a low therapeutic index.²⁴

Development of nicotinic agonists for the management of moderate-to-severe pain has been extensively studied. As yet, no direct nicotinic agonists have been successfully developed and approved for the treatment of neuropathic pain.^{36,37}

Other antinociceptive substances, such as clonidine and morphine, also enhance the release of spinal ACh, suggesting a potentially potent role for the spinal muscarinic system in the analgesic effects of these compounds.³⁰ Substances such as dexmedetomidine, a α_2 -adrenoceptor agonist, enhance the withdrawal threshold of SNL rats facilitating KCl-evoked ACh release from lumbar dorsal horn synaptosomes in SNL rats.³⁴

The major problem of cholinergic-induced analgesia is the possibility of many side-effects. LASSBio-873 is a novel substance and studies need to be performed to determine whether the side-effects that belong to cholinergic agonists are present in this new chemical class. The findings of the present study also suggest that we can rule out a sedative effect of LASSBio-873 when it is delivered according to our protocols because we found no evidence of a sedative effect after acute oral administration, 24 h after delivery or following 7 consecutive days of treatment. Moreover, over a period of 7 days, rats subjected to SNL exhibited normal behaviour with their contralateral paws. These

findings confirm that the positive effects of LASSBio-873 on neuropathic pain reported in the present study can be attributed to an analgesic effect.

In conclusion, the present study provides evidence of the therapeutic and preventive efficacy of LASSBio-873 via activation of the M₂ receptor pathway in an SNL animal model. This drug belongs to a new group of substances whose efficacy for treating neuropathic pain has not been established. Future elucidation of this compound's pharmacokinetic profile and related pharmaceutical formulations may improve the drug's pharmacokinetic profile and greatly decrease the effective dose. This compound is a novel prototype that may lead to the development of additional novel substances with greater potency for the treatment of neuropathic pain.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Fundação Universitaria Jose Bonifacio (FUJB, Brazil), Pensa Rio-Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia/Farmacos (CNPq/FAPERJ, Brazil) for financial support and fellowships.

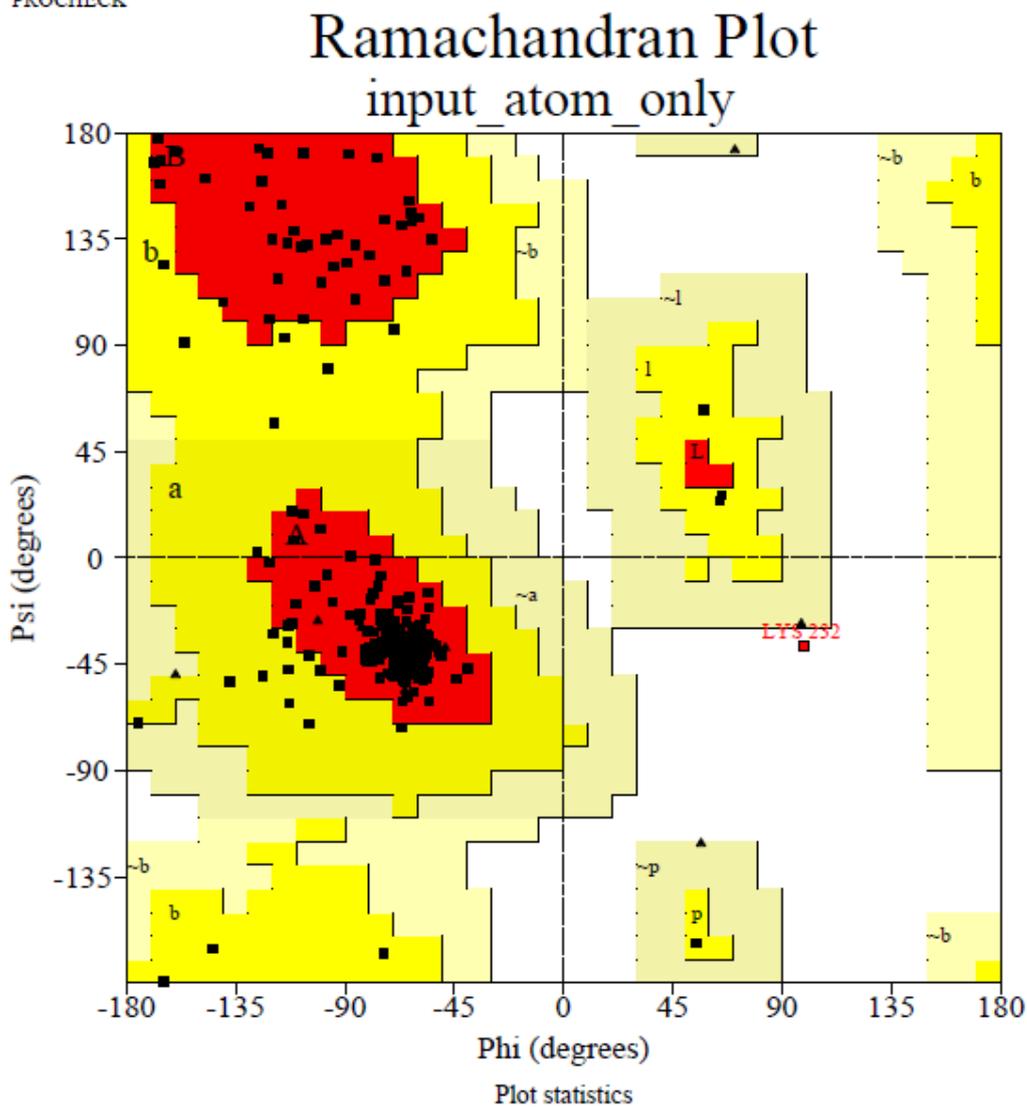
REFERENCES

- Mogil JS. Animal models of pain: Progress and challenges. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; **10**: 283–94.
- National Research Council. The economic costs of pain in the United States. In: *National Research Council. Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. The National Academies Press, Washington, DC. 2011; 331–8.
- Merskey H, Bogduk N. Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. In: Merskey H, Bogduk N (eds). *Classification of Chronic Pain*, 2nd edn. IASP Task Force on Taxonomy, Seattle, WA. 1994; 209–14.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN *et al.* Redefinition of NP and a grading system for clinical use: Consensus statement on clinical and research diagnostic criteria. *Neurology* 2008; **70**: 1630–5.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2006; **26**: 4308–17.
- Maag R, Baron R. Neuropathic pain: Translational research and impact for patient care. *Curr. Pain Headache Rep.* 2006; **10**: 191–8.
- Woolf CJ, Manion RJ. Neuropathic pain: Aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet* 1999; **353**: 1959–64.
- Basić-Kes V, Zavoreo I, Bosnar-Puretić M *et al.* Neuropathic pain. *Acta Clin. Croat.* 2009; **48**: 359–65.
- Depoortere H, Zivkovic B, Lloyd KG *et al.* Zolpidem, a novel non-benzodiazepine hypnotic. I. Neuropharmacological and behavioral effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; **237**: 649–58.
- Rey R. Treatment of neuropathic pain. Review of last guidelines and recommendations. *Neurol. Argent.* 2013 (in press).
- Holtman JR, Dwoskin LP, Dowell C *et al.* The novel small molecule $\alpha 9 \times 10$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist ZZ-204G is analgesic. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; **670**: 500–8.
- Buccafusco JJ, Terry AV Jr, Vazdarjanova A, Snutch TP, Americ SP. Treatments for neuropathic pain differentially affect delayed matching accuracy by macaques: Effects of amitriptyline and gabapentin. *Pain* 2010; **148**: 446–53.
- Fahey JM, Grassi JM, Reddi JM, Greenblatt DJ. Acute zolpidem administration produces pharmacodynamic and receptor occupancy changes at similar doses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; **83**: 21–7.
- Pericic D, Vlainić J, Strac DS. Sedative and anticonvulsant effects of zolpidem in adult and aged mice. *J. Neural. Transm.* 2008; **115**: 795–802.
- Pick CG, Chernes Y, Rigai T, Rice KC, Schreiber S. The antinociceptive effect of zolpidem and zopiclone in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005; **81**: 417–23.
- Sanger DJ, Joly D, Zivkovic B. Effects of zolpidem, a new imidazopyridine hypnotic, on the acquisition of conditioned fear in mice. Comparison with triazolam and CL 218,872. *Psychopharmacology* 1986; **90**: 207–10.
- Tanaka M, Suemaru K, Watanabe S *et al.* Comparison of short- and long-acting benzodiazepine-receptor agonists with different receptor selectivity on motor coordination and muscle relaxation following thiopental-induced anesthesia in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2008; **107**: 277–84.
- Menegatti R, Silva GM, Zapata-Sudo G *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of new neuroactive pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivatives with *in vivo* hypnotic and analgesic profile. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; **14**: 632–40.
- Mendes TC, Raimundo JM, Nascimento-Junior NM *et al.* Sedation and antinociception induced by a new pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivative (LASSBio-873) is modulated by activation of muscarinic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009; **94**: 70–4.
- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; **50**: 355–63.
- Hayashida K, Parker R, Eisenach JC. Oral gabapentin activates spinal cholinergic circuits to reduce hypersensitivity after peripheral nerve injury and interacts synergistically with oral donepezil. *Anesthesiology* 2007; **106**: 1213–9.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; **32**: 77–88.
- Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004; **37**: 391–9.
- Bartolini A, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C. Analgesic and antineuropathic drugs acting through central cholinergic mechanisms. *Recent Pat. CNS Drug. Discov.* 2011; **6**: 119–40.
- Song Z, Meyerson BA, Linderth B. Muscarinic receptor activation potentiates the effect of spinal cord stimulation on pain-related behavior in rats with mononeuropathy. *Neurosci. Lett.* 2008; **436**: 7–12.
- Dussor GO, Helesic G, Hargreaves KM, Flores CM. Cholinergic modulation of nociceptive responses *in vivo* and neuropeptide release *in vitro* at the level of the primary sensory neuron. *Pain* 2004; **107**: 22–32.
- Zhang H-M, Chen S-R, Pan H-L. Regulation of glutamate release from primary afferents and interneurons in the spinal cord by muscarinic receptor subtypes. *J. Neurophysiol.* 2007; **97**: 102–9.
- Hayashida KI, Bynum T, Vincler M, Eisenach JC. Inhibitory M2 muscarinic receptors are upregulated in both axotomized and intact small diameter dorsal root ganglion cells after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2006; **140**: 259–68.
- Chen SR, Pan HL. Activation of muscarinic receptors inhibits spinal dorsal horn projection neurons. Role of GABAB receptors. *Neuroscience* 2004; **125**: 141–8.
- Taylor BK. Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. *Curr. Pain Headache Rep.* 2009; **13**: 208–14.
- Bernardini N, Roza C, Sauer SK *et al.* Muscarinic M2 receptors on peripheral nerve endings: A molecular target of antinociception. *J. Neurosci.* 2000; **22**: RC229.
- Kimura M, Hayashida K, Eisenach JC, Saito S, Obata H. Relief of hypersensitivity after nerve injury from systemic donepezil involves

- spinal cholinergic and γ -aminobutyric acid mechanisms. *Anesthesiology* 2013; **118**: 173–80.
33. Martino G, Puma C, Yu XH *et al.* The M1/M4 preferring agonist xanomeline is analgesic in rodent models of chronic inflammatory and neuropathic pain via central site of action. *Pain* 2011; **152**: 2852–60.
34. Kimura M, Saito S, Obata H. Dexmedetomidine decreases hyperalgesia in neuropathic pain by increasing acetylcholine in the spinal cord. *Neurosci. Lett.* 2012; **529**: 70–4.
35. Hoglund AU, Hamilton C, Lindblom L. Effects of microdialyzed oxotremorine, carbachol, epibatidine, and scopolamine on intraspinal release of acetylcholine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; **295**: 100–4.
36. Ji J, Bunnelle WH, Anderson DJ *et al.* A-366833: A novel nicotinic nitrile-substituted 3,6-diazabicyclo[3.2.0]-heptane $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor selective agonist: Synthesis, analgesic efficacy and tolerability profile in animal models. *Biochem. Pharmacol.* 2007; **74**: 1253–62.
37. Andrews PLR, Friedman AI, Liu Y *et al.* Potential energetic implications of emesis in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Physiol. Behav.* 2005; **84**: 519–24.

ANEXO 1: GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO OBTIDO POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR3 (ISOFORMA 1) – CADEIA A.

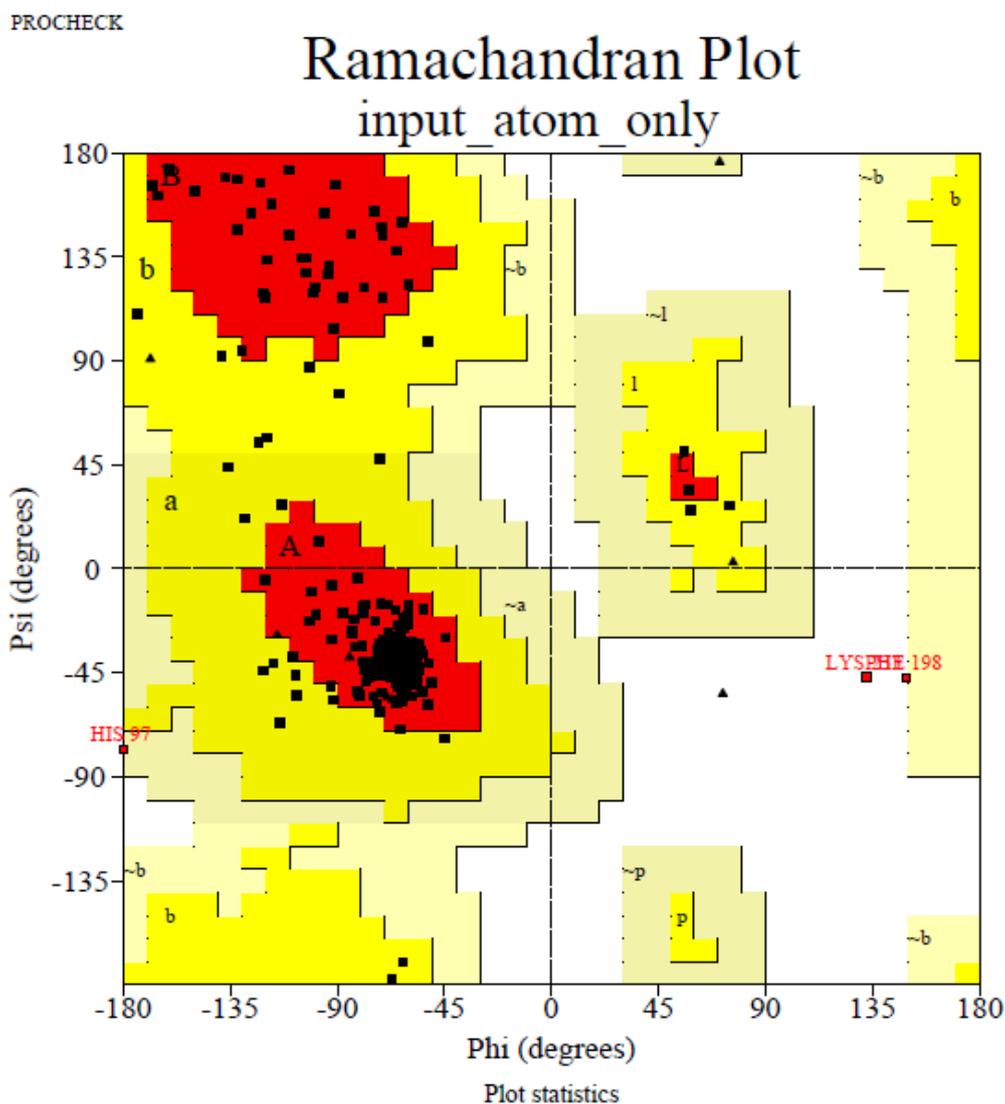
PROCHECK



- (a) Resíduos nas regiões mais favoráveis (246): 89,8%.
- (b) Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (27): 9,9%.
- (c) Resíduos em regiões geralmente permitidas (0): 0,0%.
- (d) Resíduos em regiões não permitidas (1): 0,4%.

Obs.: Os resíduos de glicina e prolina não são avaliados.

ANEXO 2: GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO OBTIDO POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR3 (ISOFORMA 1) – CADEIA B.

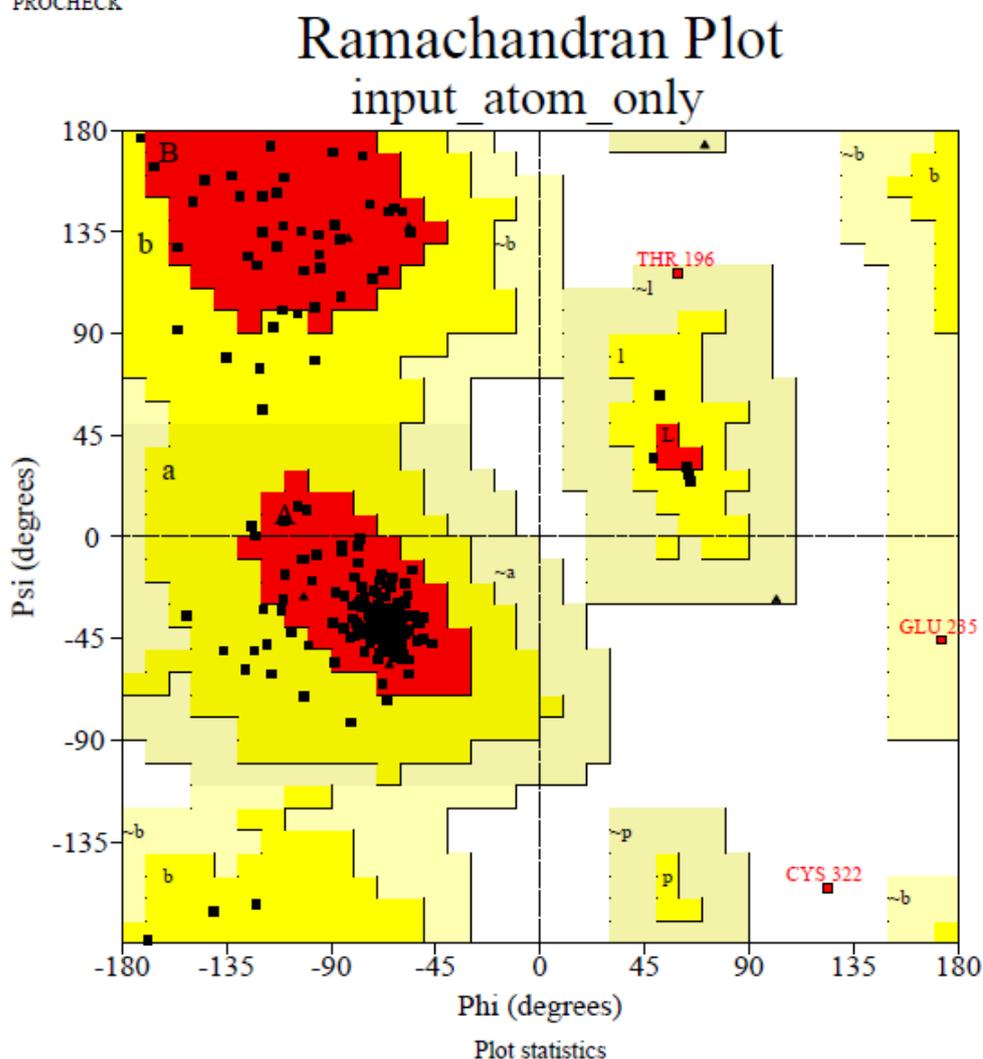


- (a) Resíduos nas regiões mais favoráveis (243): 90,0%.
- (b) Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (24): 8,9%.
- (c) Resíduos em regiões geralmente permitidas (1): 0,4%.
- (d) Resíduos em regiões não permitidas (2): 0,7%.

Obs.: Os resíduos de glicina e prolina não são avaliados.

ANEXO 3: GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO OBTIDO POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 – CADEIA A.

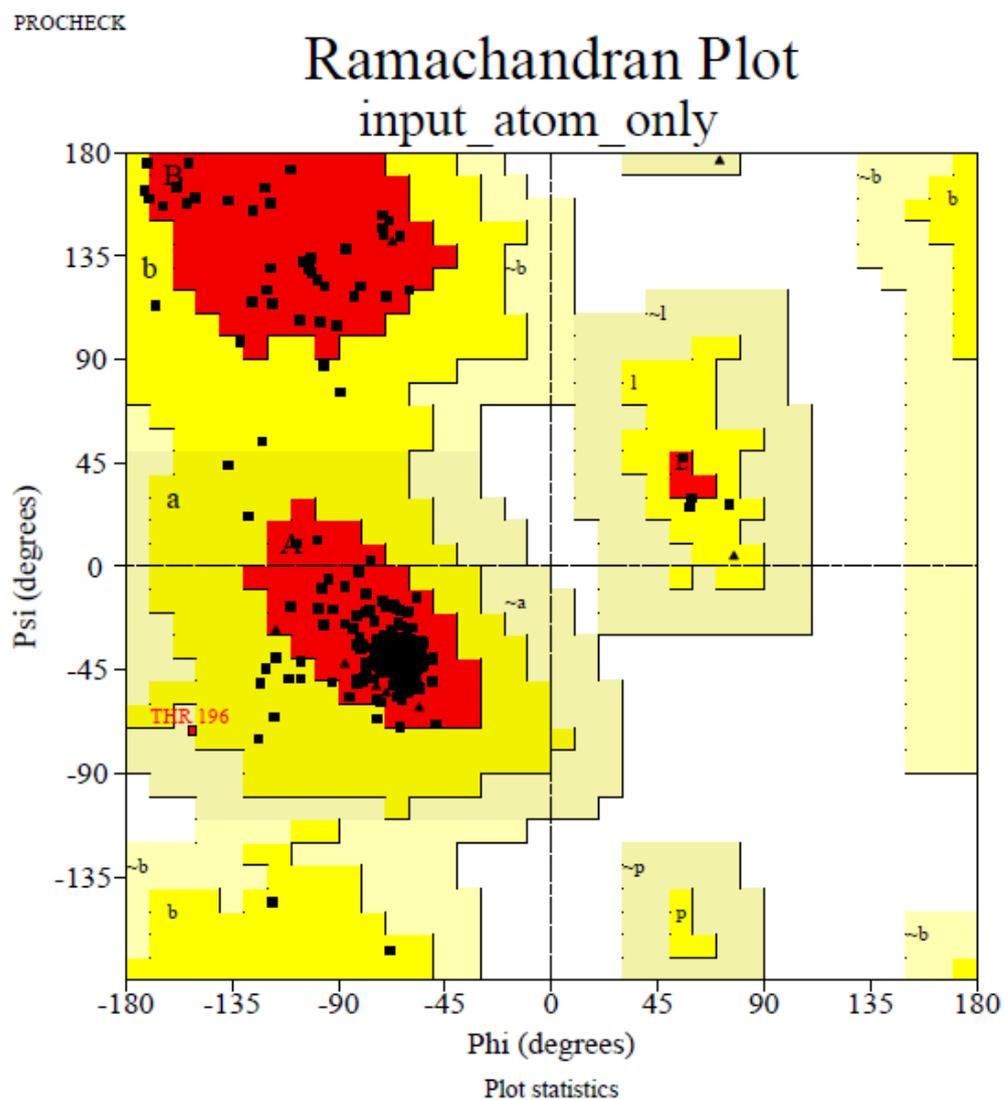
PROCHECK



- (a) Resíduos nas regiões mais favoráveis (241): 88,3%.
- (b) Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (29): 10,6%.
- (c) Resíduos em regiões geralmente permitidas (2): 0,7%.
- (d) Resíduos em regiões não permitidas (1): 0,4%.

Obs.: Os resíduos de glicina e prolina não são avaliados.

ANEXO 4: GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO OBTIDO POR MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR4 – CADEIA B.



- (a) Resíduos nas regiões mais favoráveis (241): 90,3%.
- (b) Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (24): 9,4%.
- (c) Resíduos em regiões geralmente permitidas (1): 0,4%.
- (d) Resíduos em regiões não permitidas (0): 0,0%.

Obs.: Os resíduos de glicina e prolina não são avaliados.

ANEXO 5: TABELA COM RESULTADOS DE DOCKING RÍGIDO/ANÁLISES DE PLIF PARA VALIDAÇÃO DO MODELO IN SILICO DE CXCR4 (GOLDScore/SEM ÁGUAS DE CRISTALIZAÇÃO).

Thoma et al.	CI ₅₀ (nM)	PLIF GOLD (s/ água)	Interações	Orientação
1a	48	0,833	Asp/Glu	Boa
1b	3575	0,65	Glu	Diferente
1c	3835	0,889	Asp/Glu	Mediana
1d	10000	0,789	Asp/Glu	Mediana
1e	25	0,889	Asp/Glu	Average
1f	27	0,65	Asp	Heterociclo fora
1g	28	0,944	Asp/Glu	Boa
1h	28	0,636	Asp/Glu	Heterociclo fora
1i	372	0,944	Asp/Glu	Boa
1j	855	0,833	Asp/Glu	Boa
1k	1873	0,789	Asp/Glu	Heterociclo fora
1l	81	0,682	Asp/Glu	Heterociclo fora
1m	1533	0,65	Asp/Glu	2 grupos fora
1n	10000	0,895	Asp/Glu	Boa
1o	10000	0,85	Asp/Glu	Boa
1p	10000	0,762	Asp	Boa
1q	10000	0,571	Asp/Glu	Heterociclo fora
1r	10000	0,652	Asp/Glu	Heterociclo fora
1s	185	0,789	Asp/Glu	Boa
1t	8	0,895	Asp/Glu	Boa
1u	8,8	0,944	Asp/Glu	Boa
				10 poses boas

ANEXO 6: TABELA COM RESULTADOS DE DOCKING RÍGIDO/ANÁLISES DE PLIF PARA VALIDAÇÃO DO MODELO IN SILICO DE CXCR4 (GOLDScore/COM ÁGUAS DE CRISTALIZAÇÃO).

Thoma et al.	CI ₅₀ (nM)	PLIF GOLD (c/ água)	Interações	Orientação
1a	48	0,947	Asp/Glu	Boa
1b	3575	0,611	Asp/Glu	Diferente
1c	3835	0,700	Asp/Glu	Mediana
1d	10000	0,778	Asp/Glu	Boa
1e	25	0,944	Asp/Glu	Boa
1f	27	0,944	Asp/Glu	Boa
1g	28	1,000	Asp/Glu	Boa
1h	28	1,000	Asp	Boa
1i	372	0,944	Asp/Glu	Boa
1j	855	0,895	Asp/Glu	Boa
1k	1873	1,000	Asp/Glu	Boa
1l	81	0,895	Asp/Glu	Boa
1m	1533	0,889	Asp/Glu	Boa
1n	10000	0,947	Asp/Glu	Boa
1o	10000	0,700	Asp	Diferente
1p	10000	0,833	Asp	Boa
1q	10000	0,700	Asp	Mediana
1r	10000	0,636	Asp/Glu	Mediana
1s	185	0,944	Asp/Glu	Boa
1t	8	0,944	Asp/Glu	Boa
1u	8,8	0,895	Asp/Glu	Boa

16 poses boas

ANEXO 7: TABELA COM RESULTADOS DE DOCKING RÍGIDO/ANÁLISES DE PLIF PARA VALIDAÇÃO DO MODELO IN SILICO DE CXCR4 (CHEMPLP/SEM ÁGUAS DE CRISTALIZAÇÃO).

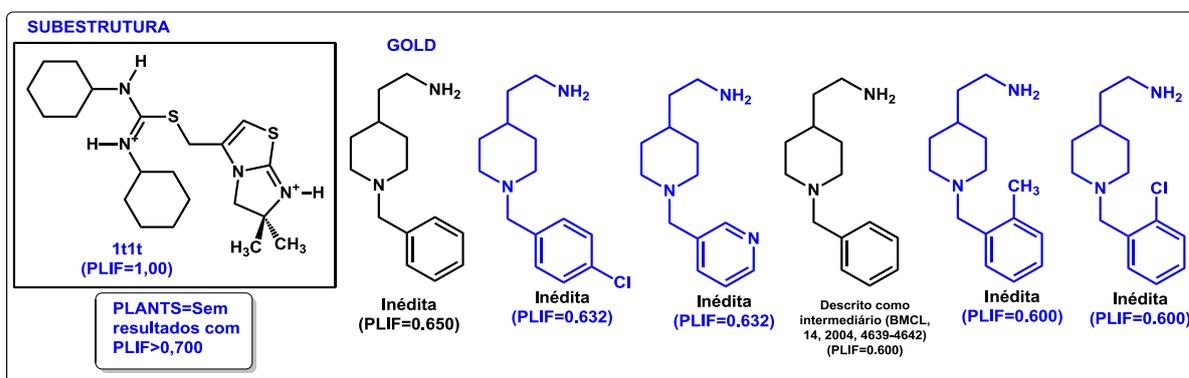
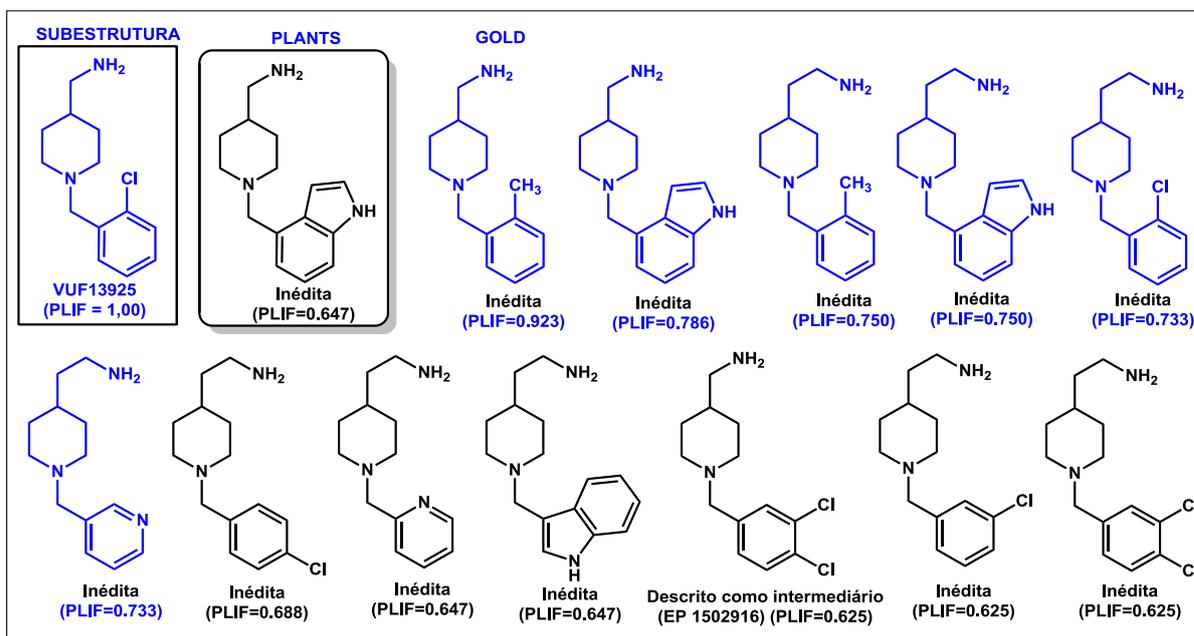
Thoma et al.	CI ₅₀ (nM)	PLIF GOLD (s/ água)	Interações	Orientação
1a	48	0,700	Asp	Heterociclo fora
1b	3575	0,632	Asp/Glu	3 grupos fora
1c	3835	0,632	Asp	Diferente
1d	10000	0,476	Asp	2 grupos fora
1e	25	0,571	Asp/Glu	Heterociclo fora
1f	27	0,895	Asp/Glu	Mediana/boa
1g	28	0,750	Asp/Glu	Heterociclo fora
1h	28	0,778	Asp/Glu	2 grupos fora
1i	372	0,842	Asp/Glu	Mediana/boa
1j	855	0,619	Asp	Diferente
1k	1873	0,722	Asp	Mediana/boa
1l	81	0,778	Asp/Glu	Heterociclo fora
1m	1533	0,667	Asp	Ruim
1n	10000	0,650	Asp	Diferente
1o	10000	0,619	Asp	Heterociclo fora
1p	10000	0,600	Asp	Diferente
1q	10000	0,833	Asp	Boa
1r	10000	0,591	Asp	Ruim
1s	185	0,667	Asp/Glu	Ruim
1t	8	0,947	Asp/Glu	Boa
1u	8,8	1,000	Asp/Glu	Boa
				6 poses boas

ANEXO 8: TABELA COM RESULTADOS DE DOCKING RÍGIDO/ANÁLISES DE PLIF PARA VALIDAÇÃO DO MODELO IN SILICO DE CXCR4 (CHEMPLP/COM ÁGUAS DE CRISTALIZAÇÃO).

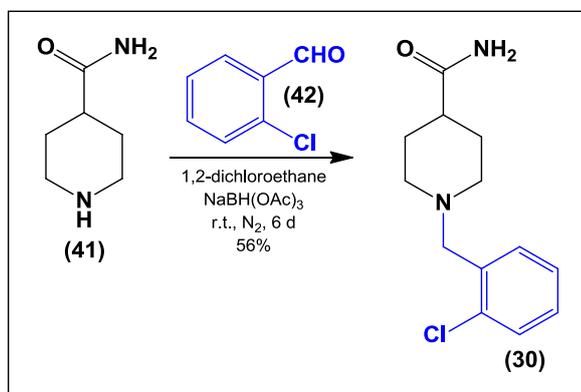
Thoma et al.	CI ₅₀ (nM)	PLIF GOLD (c/ água)	Interações	Orientação
1a	48	1,000	Asp/Glu	Boa
1b	3575	0,650	Asp	Diferente
1c	3835	0,737	Asp	Diferente
1d	10000	0,650	Asp	Ruim
1e	25	0,889	Asp/Glu	Boa
1f	27	1,000	Asp/Glu	Boa
1g	28	0,842	Asp/Glu	Mediana/Boa
1h	28	1,000	Asp/Glu	Boa
1i	372	0,944	Asp/Glu	Boa
1j	855	0,632	Asp	Mediana
1k	1873	0,944	Asp/Glu	Boa
1l	81	1,000	Asp/Glu	Boa
1m	1533	0,722	Glu	Mediana
1n	10000	0,7000	Asp	Heterociclo fora
1o	10000	0,7000	Asp/Glu	Boa
1p	10000	0,737	Asp/Glu	Cicloexila fora
1q	10000	0,778	Asp	Heterociclo fora
1r	10000	0,895	Asp	Heterociclo fora
1s	185	0,842	Asp/Glu	Heterociclo fora
1t	8	0,947	Asp/Glu	Boa
1u	8,8	0,895	Asp/Glu	Boa

11 poses boas

ANEXO 9: MELHORES FRAGMENTOS IDENTIFICADOS POR MEIO DA TRIAGEM VIRTUAL DENTRE OS COMPOSTOS PLANEJADOS (190 COMPOSTOS)



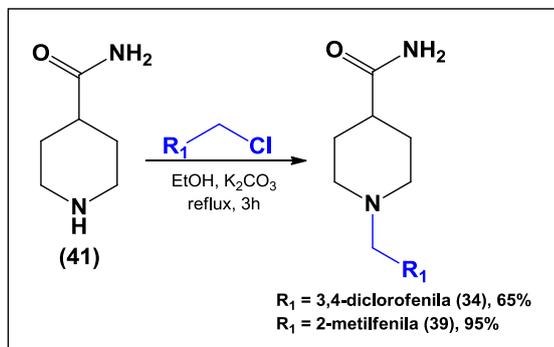
ANEXO 10: SÍNTESE DA 1-(2-CLOROBENZIL)PIPERIDINO-4-CARBOXIAMIDA VUF14427 (30)



Inicialmente, 320 mg de piperidino-4-carboxiamida (41) (2,5 mmol) e 351 mg de 2-clorobenzaldeído (42) (2,5 mmol) foram misturados em 10 mL de 1,2-dicloroetano. Em seguida, a solução foi tratada com 750 mg de triacetoxiboroidreto de sódio (3,5 mmol). A mistura de reação foi mantida em temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 6 dias (ABDEL-MAGID et al., 1996).

A reação foi finalizada por adição de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, o pH foi determinado de modo a verificar se ele não está baixo demais para favorecer o produto na forma protonada. Caso o pH esteja abaixo de 8, adiciona-se mais bicarbonato e monitora-se a elevação do pH por meio de fita indicadora, até que ele esteja em torno de 9-10. Em seguida, o produto é extraído com 3 x 50 mL de DCM, as fases orgânicas são reunidas e secas em sulfato de magnésio anidro e o solvente é evaporado para fornecer a 1-(2-clorobenzil)piperidino-4-carboxiamida VUF14427 (30) em 56% de rendimento e grau de pureza de 99,9%. A caracterização foi complementada por LCMS.

ANEXO 11: PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DA 1-(3,4-DICLOROBENZIL)PIPERIDINO-4-CARBOXIAMIDA VUF14363 (34) E DA 1-(2-METILBENZIL)PIPERIDINO-4-CARBOXIAMIDA VUF14364 (39)



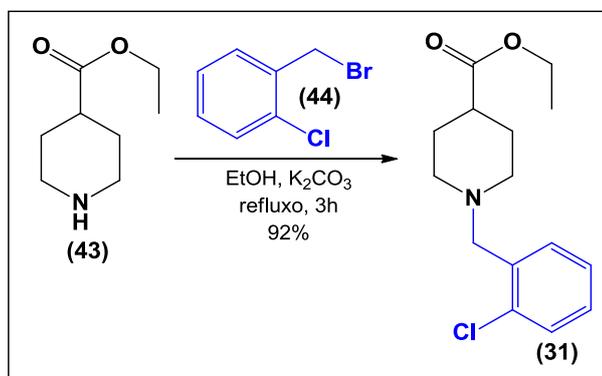
Em uma suspensão sob agitação contendo 1,67 g (13 mmol) de isonipectamida (41) e 3,59 g (26 mmol) de carbonato de potássio em 35 mL de etanol, foram adicionados 13 mmol do haleto correspondente e a mistura de reação foi aquecida sob refluxo por 3 horas, seguida de resfriamento e filtração. O filtrado foi então evaporado sob pressão reduzida e adicionou-se 20 mL de água destilada (KLAVENESS et al., 2009).

Em seguida, a fase aquosa foi extraída com 3 x 20 mL de diclorometano, as fases orgânicas foram reunidas e secas sob sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer o produto desejado. A caracterização foi complementada por LCMS.

VUF14363 (34): Sólido amarelo-claro em 65% de rendimento e 96,8% de pureza.

VUF14364 (39): Sólido branco em 95% de rendimento e 94,6% de pureza.

ANEXO 12: SÍNTESE DO 1-(2-CLOROBENZIL)PIPERIDINO-4-CARBOXILATO DE ETILA VUF14428 (31)

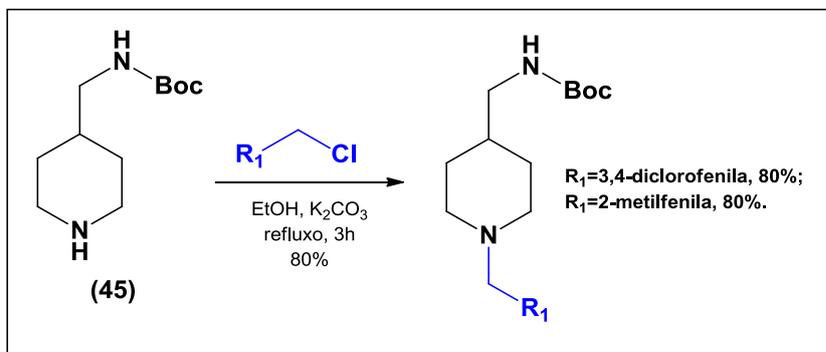


Em uma suspensão sob agitação contendo 1,6 g (10 mmol) de isonipecotato de etila (43) e 2,46 g (20 mmol) de carbonato de potássio em 35 mL de etanol, foram adicionados 2,1 g (1,35 mL; d=1,57g/mL; 10 mmol) de 1-(bromometil)-2-clorobenzeno (44) e a mistura de reação foi aquecida sob refluxo por 3 horas , seguida de resfriamento e filtração. O filtrado foi então evaporado sob pressão reduzida e adicionou-se 20 mL de água destilada (KLAVENESS et al., 2009).

Em seguida, a fase aquosa foi extraída com 3 x 20 mL de diclorometano, as fases orgânicas foram reunidas e secas sob sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer o produto desejado em 92% de rendimento e 85% de pureza.

Após extração com DCM e meio aquoso ácido, para reter apenas compostos piperidínicos na fase aquosa, seguido de alcalinização da fase aquosa e extração da fase aquosa contendo o produto com DCM, foi possível obtê-lo em 98% de pureza e rendimento final de 31%. A caracterização foi complementada por LCMS.

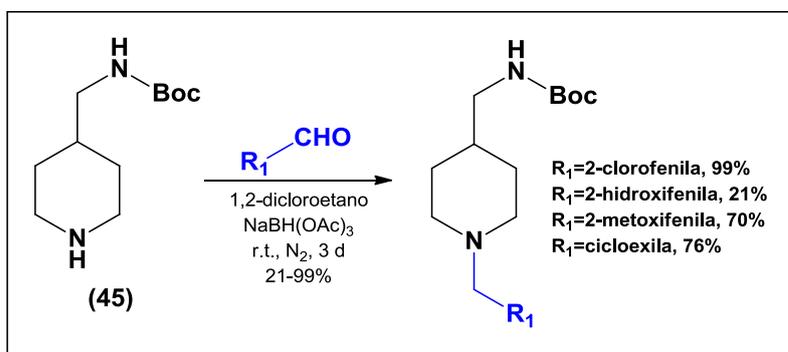
ANEXO 13: PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DO TERT-BUTIL((1-(3,4-DICLOROBENZIL)PIPERIDIN-4-IL)METIL)CARBAMATO E DO TERT-BUTIL((1-(2-METILBENZIL)PIPERIDIN-4-IL)METIL)CARBAMATO



Em uma suspensão sob agitação contendo 1,00 g (4,67 mmol) de terc-butil(piperidin-4-ilmetil)carbamato (45) e 1,29 g (9,33 mmol) de carbonato de potássio em 20 mL de etanol, foram adicionados 4,67 mmol do haleto correspondente. A mistura de reação foi aquecida sob refluxo por 3 horas, seguida de resfriamento até temperatura ambiente e filtração (KLAVENESS et al., 2009).

Nesta etapa o pH está em torno de 12. Em seguida o filtrado é evaporado sob pressão reduzida e adiciona-se 20 mL de água. O produto é então extraído com 3 x 40 mL de DCM, seco com sulfato de sódio anidro e o solvente é então evaporado para fornecer ambos os produtos desejados em 80% de rendimento, sendo os graus de pureza quando $R_1 = 3,4\text{-diclorofenila}$ e 2-metilfenila de 92,0 e 95,5%, respectivamente. A caracterização foi complementada por LCMS.

ANEXO 14: PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS TERT-BUTIL((1-(ARIL)PIPERIDIN-4-IL)METIL)CARBAMATOS



Inicialmente, 2,5 mmol de tert-butil(piperidin-4-ilmetil)carbamato **(45)** e 2,5 mmol dos aldeídos correspondentes foram misturados em 10 mL de 1,2-dicloroetano. Em seguida, a solução foi tratada com 3,5 mmol de triacetoxiboroidreto de sódio. A mistura de reação a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 3 dias (ABDEL-MAGID et al., 1996).

A reação foi finalizada por adição de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, o pH foi determinado de modo a verificar se ele não está baixo demais para favorecer o produto na forma protonada. Caso o pH esteja abaixo de 8, adiciona-se mais bicarbonato e monitora-se a elevação do pH por meio de fita indicadora, até que ele esteja em torno de 9-10. Em seguida, o produto é extraído com 3 x 50 mL de DCM, as fases orgânicas são reunidas e secas em sulfato de magnésio anidro e o solvente é evaporado para fornecer os tert-butil((1-(aril)piperidin-4-il)metil)carbamatos com faixa de rendimento entre 21-99%. A caracterização foi complementada por LCMS.

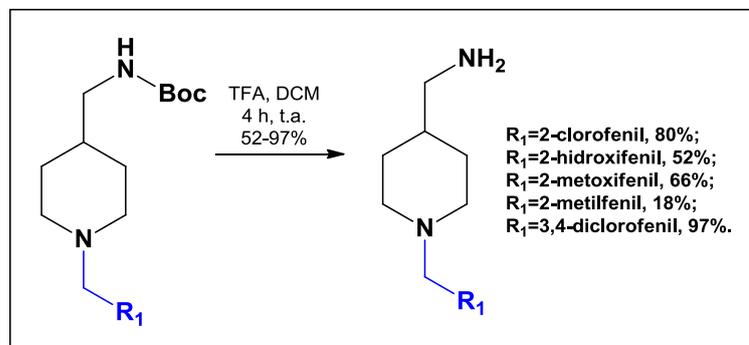
$\text{R}_1=2\text{-clorofenila}$: 99% de rendimento (96% de pureza);

$\text{R}_1=2\text{-hidroxifenila}$: 21% de rendimento (97% de pureza);

$\text{R}_1=2\text{-metoxifenila}$: 70% de rendimento (99% de pureza);

$\text{R}_1=2\text{-clorofenila}$: 76% de rendimento (95% de pureza).

ANEXO 15: PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DAS (1-(ARIL)PIPERIDIN-4-IL)METANAMINAS VUF13925 (1), VUF14443 (24), VUF14444 (33), VUF14441 (36) E VUF14462 (37)



Pesou-se 1,34 mmol do tert-butil((1-(aril)piperidin-4-il)metil)carbamato correspondente em um balão de 100 mL de capacidade, adicionou-se 10 mL de DCM e 10 mL de TFA por 4 horas em temperatura ambiente. O produto foi isolado por meio da primeira extração com 3 x 40 mL de DCM para a remoção de impurezas, a fase aquosa é então alcalinizada cuidadosamente/lentamente com hidróxido de sódio, gota-a-gota, seguido de extração do produto com 3 x 40 mL de DCM, reunião das fases orgânicas da extração básica, secagem com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente para fornecer os produtos desejados (YOU et al., 2011). A caracterização foi complementada por LCMS.

R₁=2-clorofenila: 80% de rendimento (96% de pureza);

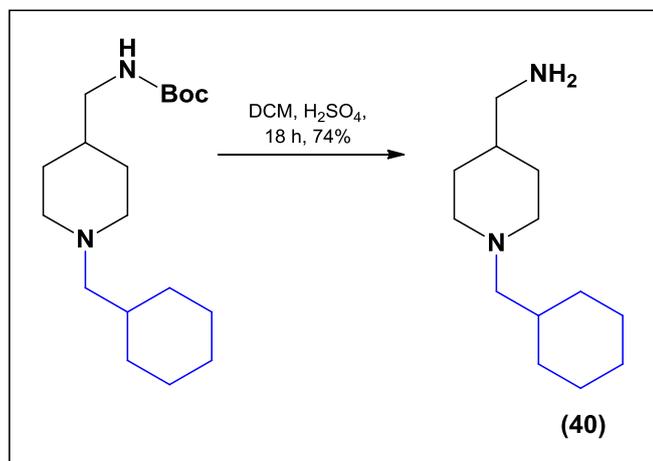
R₁=2-hidroxifenila: 52% de rendimento (99,9% de pureza);

R₁=2-metoxifenila: 66% de rendimento (97% de pureza);

R₁=2-metilfenila: 52% de rendimento (96% de pureza);

R₁=3,4-diclorofenila: 97% de rendimento (95,9% de pureza).

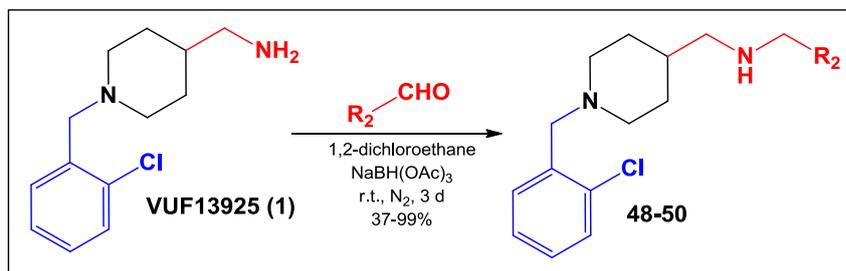
ANEXO 16: SÍNTESE DO DERIVADO (1-(CICLOEXIL)PIPERIDIN-4-IL)METANAMINA VUF14429 (40)



Uma solução contendo 1,29 mmol de terc-butil((1-(cicloexilmetil)piperidin-4-il)metil)carbamato em 15 mL de DCM foi adicionada gota-a-gota em uma mistura, resfriada com banho de gelo, contendo ácido sulfúrico 96% (1,93 mmol) e 5 mL de DCM. A solução resultante foi submetida a agitação em temperatura ambiente por 18 horas (STRAZZOLINI et al., 2005).

Ao final da reação, adicionou-se 40 mL de água destilada, o pH foi elevado pela adição cuidadosa de hidróxido de sódio e então a amina desprotegida foi extraída com 3 x 50 mL de DCM. As fases orgânicas foram lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (*brine*), secas com subfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida para fornecer a (1-(cicloexilmetil)piperidin-4-il)metanamina VUF14429 (40) em 74% de rendimento. A caracterização foi complementada por LCMS.

ANEXO 17: PROCEDIMENTO GERAL PARA SÍNTESE DOS FRAGMENTOS OTIMIZADOS VUF14463 (48), VUF14464 (49) E VUF14445 (50)



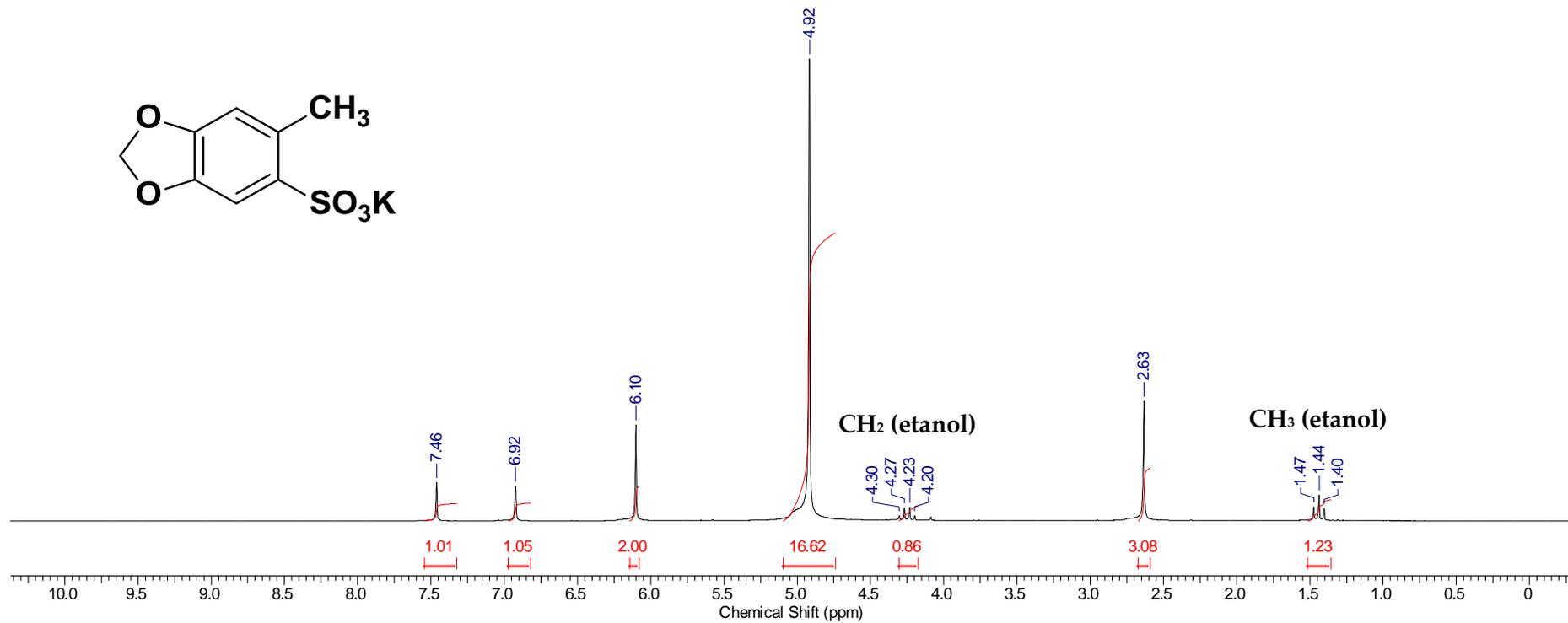
Inicialmente, 2,5 mmol de VUF13925 (1) e 2,5 mmol dos aldeídos correspondentes foram misturados em 10 mL de 1,2-dicloroetano. Em seguida, a solução foi tratada com 3,5 mmol de triacetoxiboroidreto de sódio. A mistura de reação a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 3 dias (ABDELMAGID et al., 1996).

A reação foi finalizada por adição de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, o pH foi determinado de modo a verificar se ele não está baixo demais para favorecer o produto na forma protonada. Caso o pH esteja abaixo de 8, adiciona-se mais bicarbonato e monitora-se a elevação do pH por meio de fita indicadora, até que ele esteja em torno de 9-10. Em seguida, o produto é extraído com 3 x 50 mL de DCM, as fases orgânicas são reunidas e secas em sulfato de magnésio anidro e o solvente é evaporado para fornecer os VUF14463 (48), VUF14464 (49) E VUF14445 (50) com faixa de rendimento entre 37-99%. A caracterização foi complementada por LCMS.

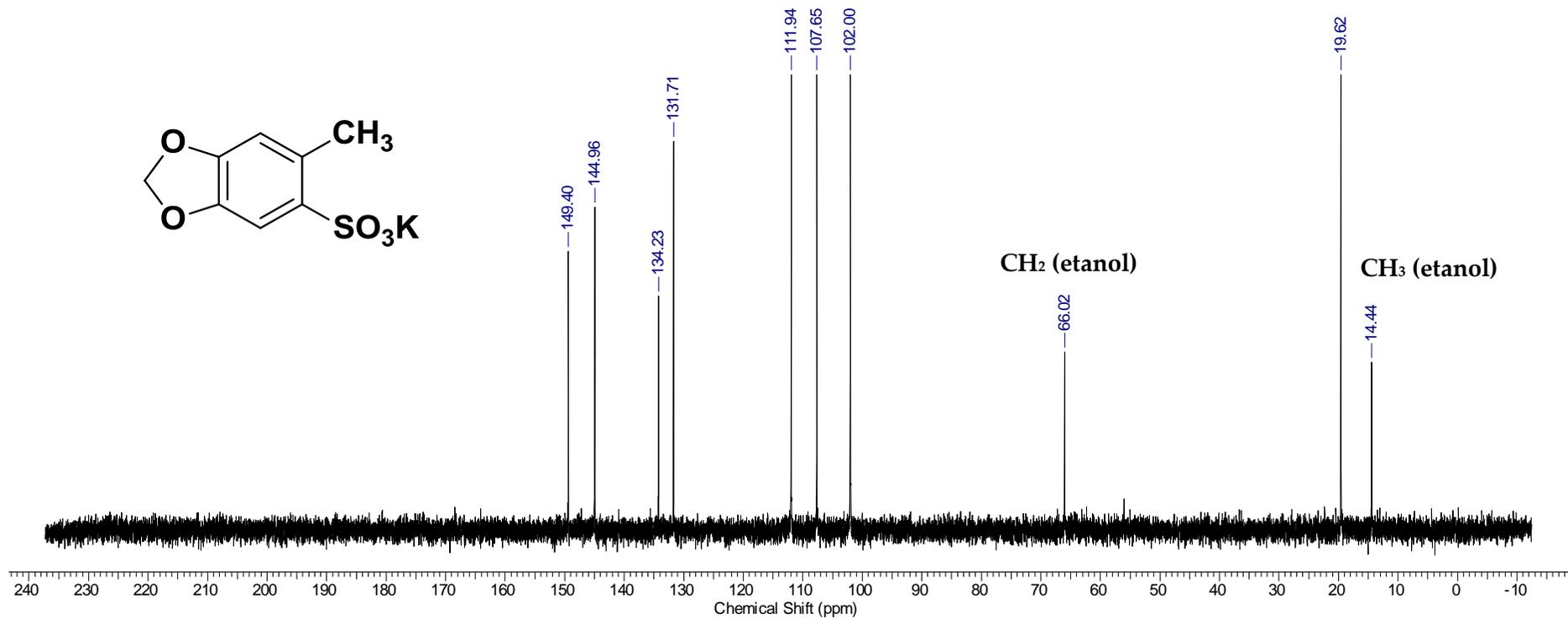
VUF14463 (48) R₂=3-piridinila: 37% de rendimento. 99,9% de pureza.

VUF14464 (49) R₂=4-imidazolil: 84% de rendimento. 95,5% 99,9% de pureza.

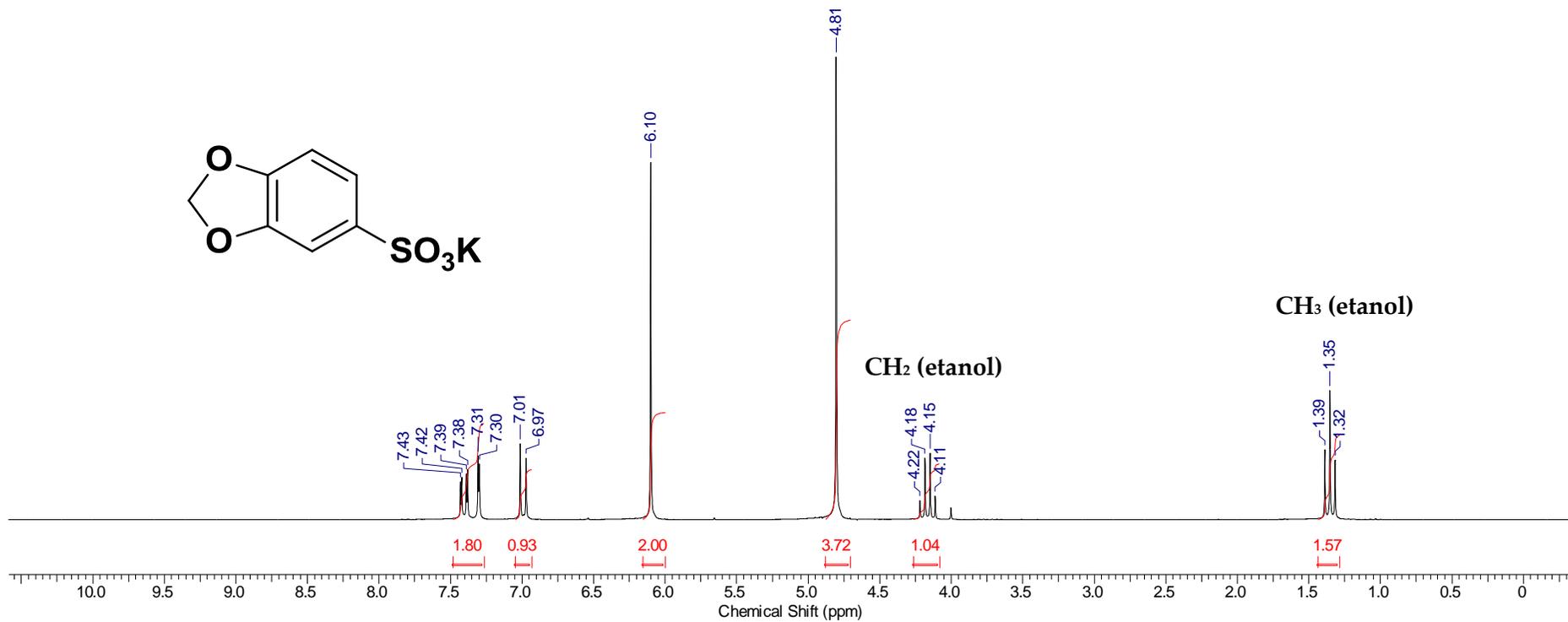
VUF14445 (50) R₂=5-benzo-1,3-dioxola: 99% de rendimento. 97,5% 99,9% de pureza.



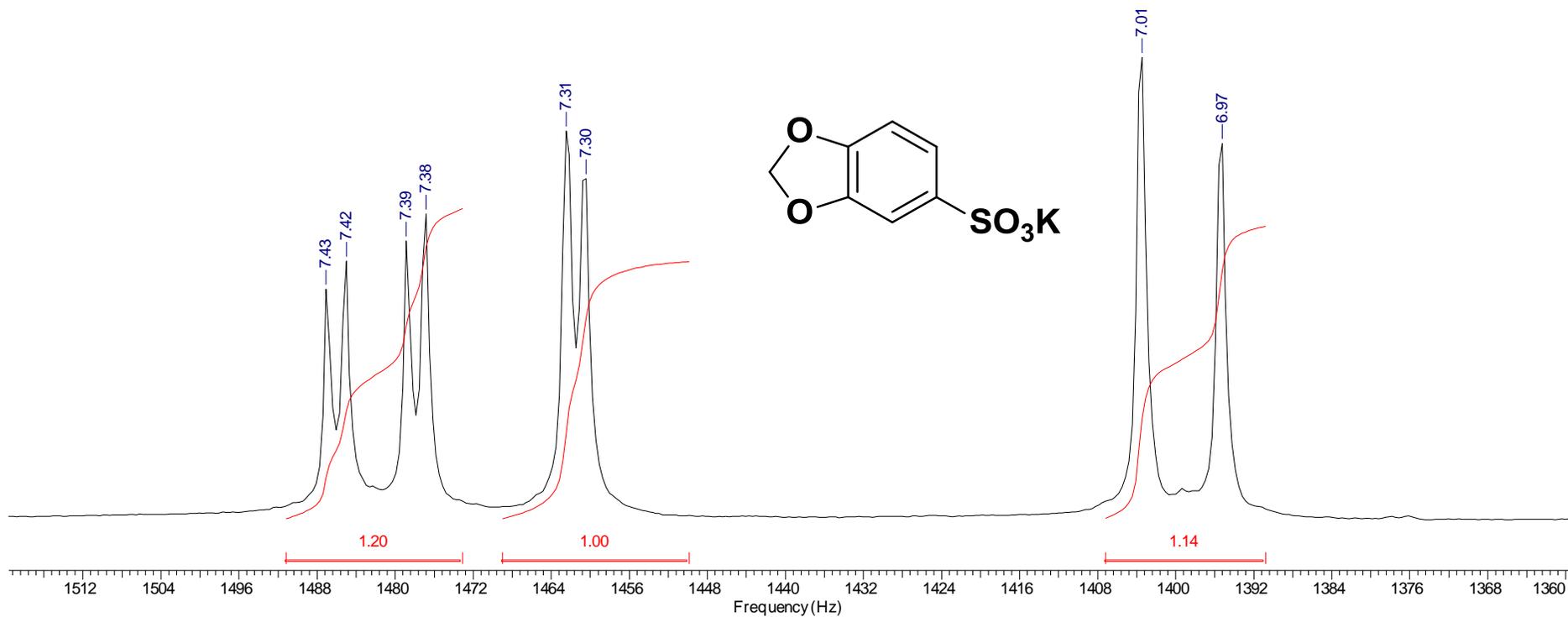
E1. Espectro de RMN de ¹H do 2-metil-3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (118) (D₂O/200 MHz).



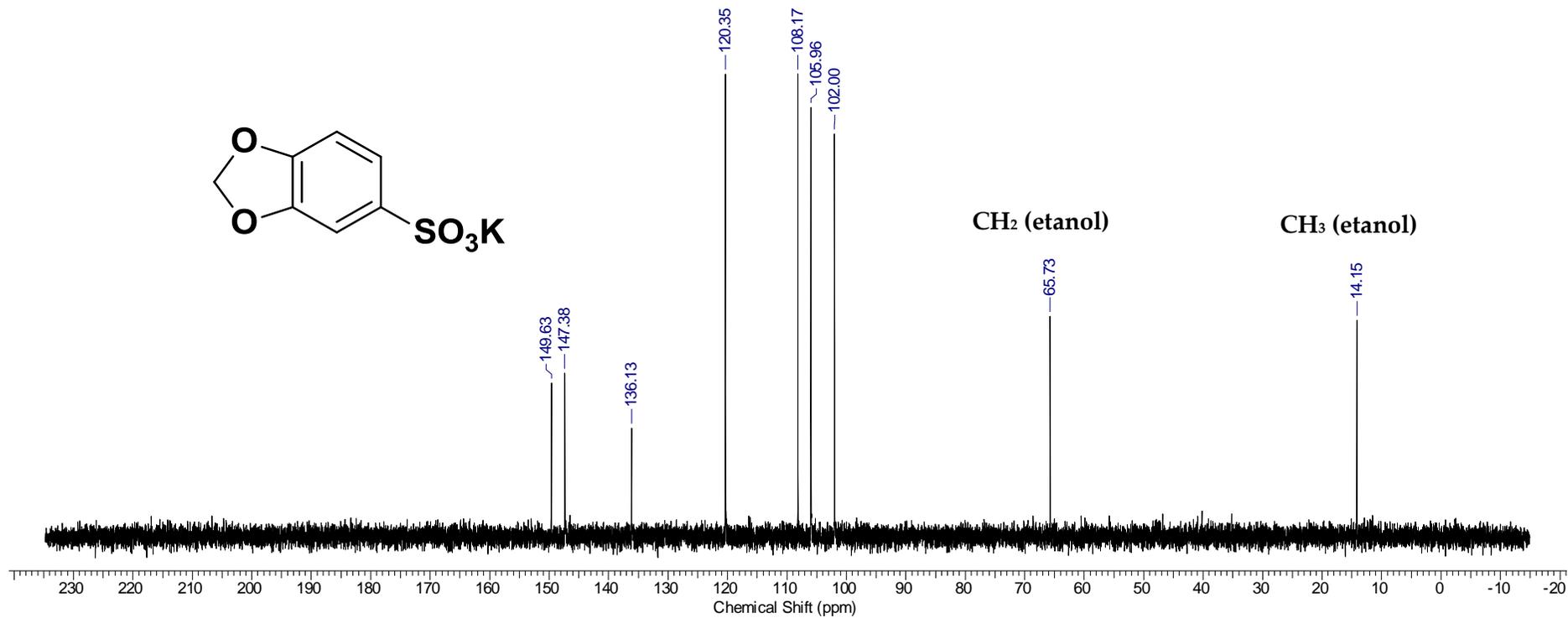
E2. Espectro de RMN de ^{13}C do 2-metil-3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (**118**) (D₂O/50 MHz).



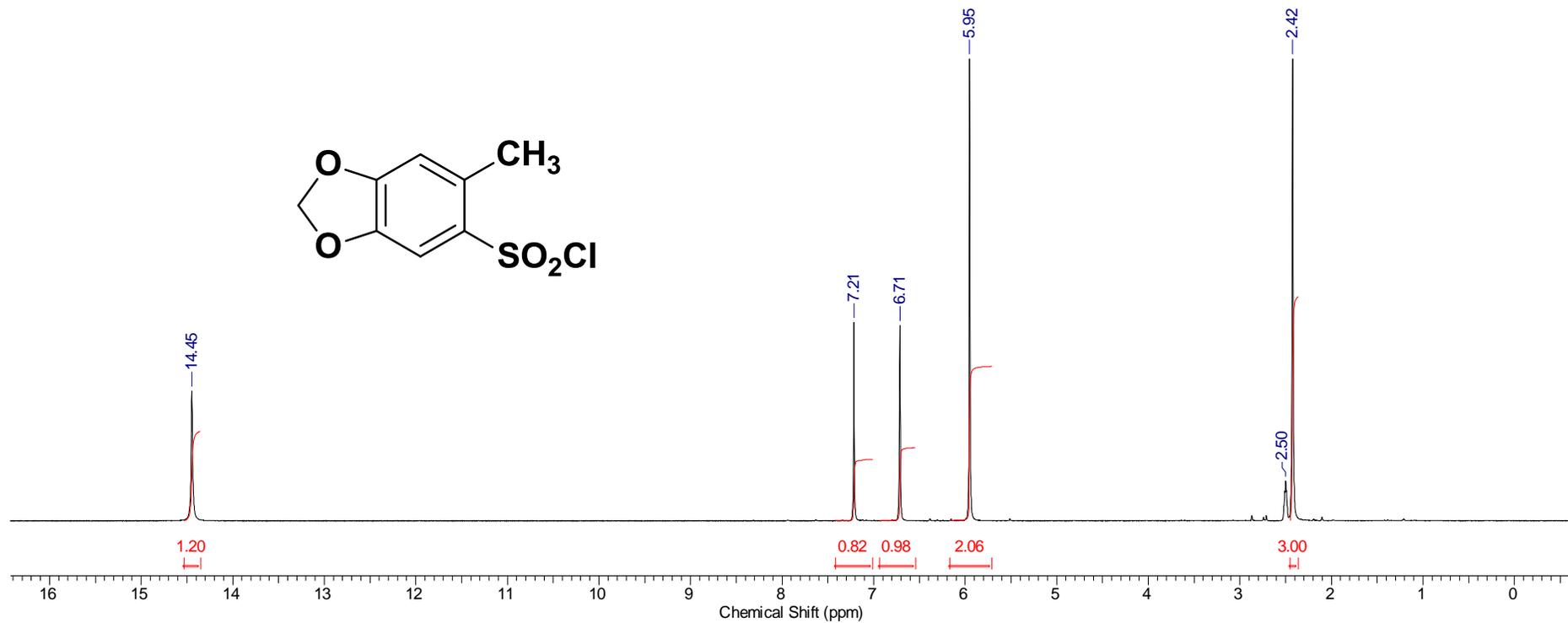
E3. Espectro de RMN de ^1H do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (**119**) ($\text{D}_2\text{O}/200\text{ MHz}$).



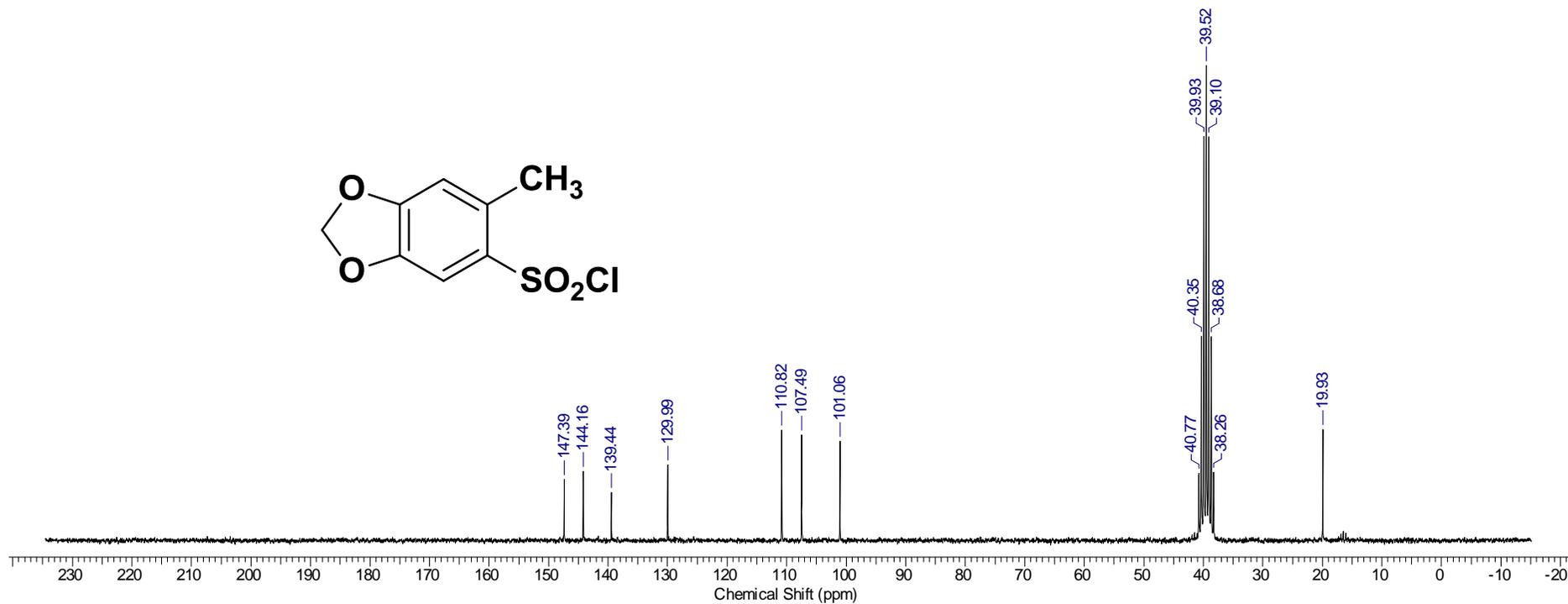
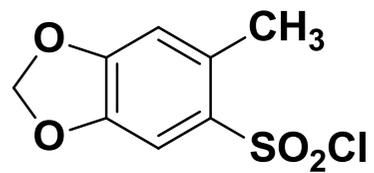
E4. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (**119**) ($\text{D}_2\text{O}/200$ MHz).



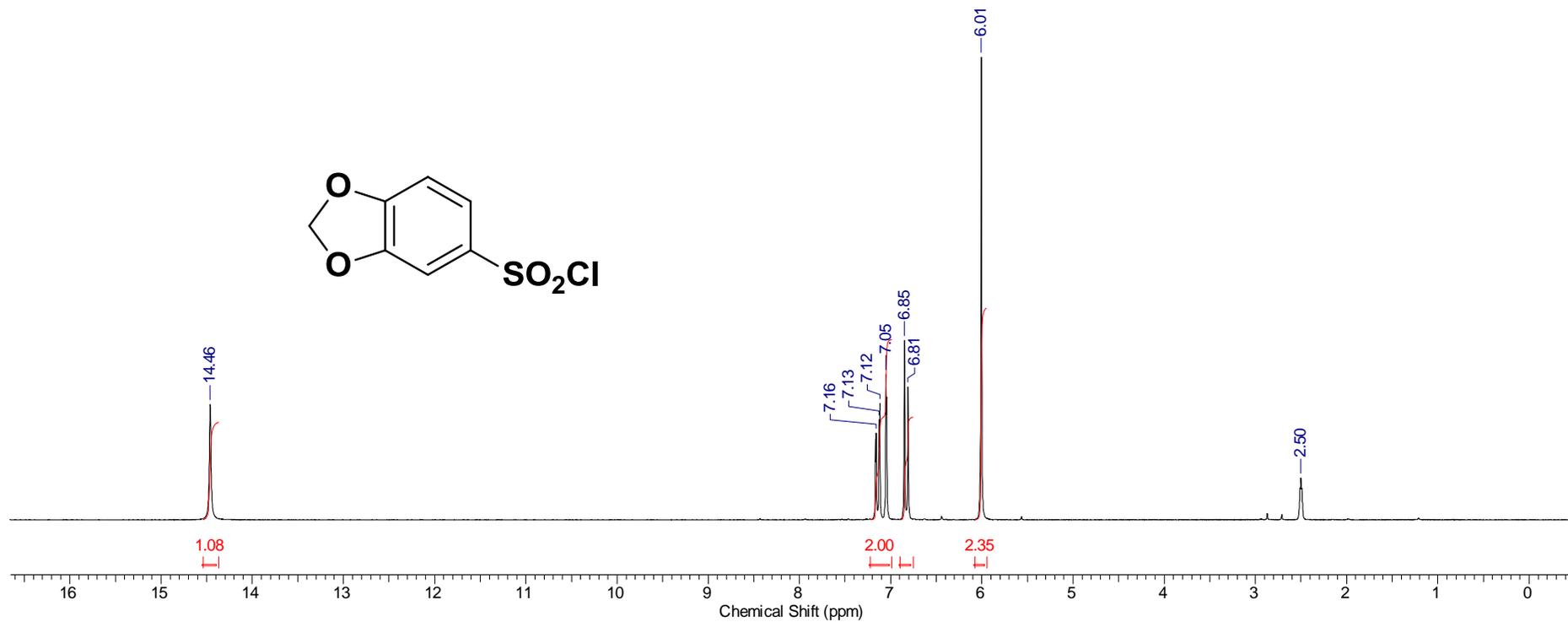
E5. Espectro de RMN de ^{13}C do 3,4-metilenodioxibenzenossulfonato de potássio (119) ($\text{D}_2\text{O}/50\text{ MHz}$).



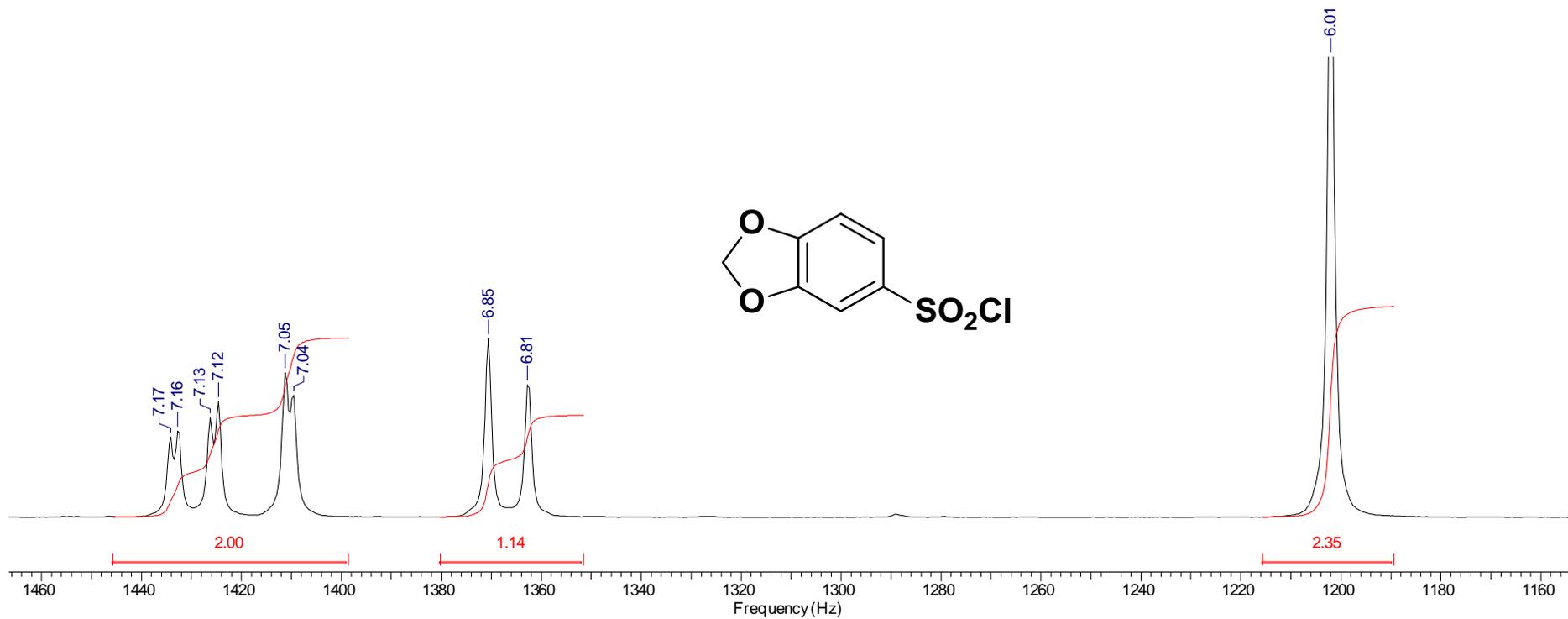
E6. Espectro de RMN de ¹H do cloreto de 2-metil-4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**120**) (DMSO-d₆/200 MHz).



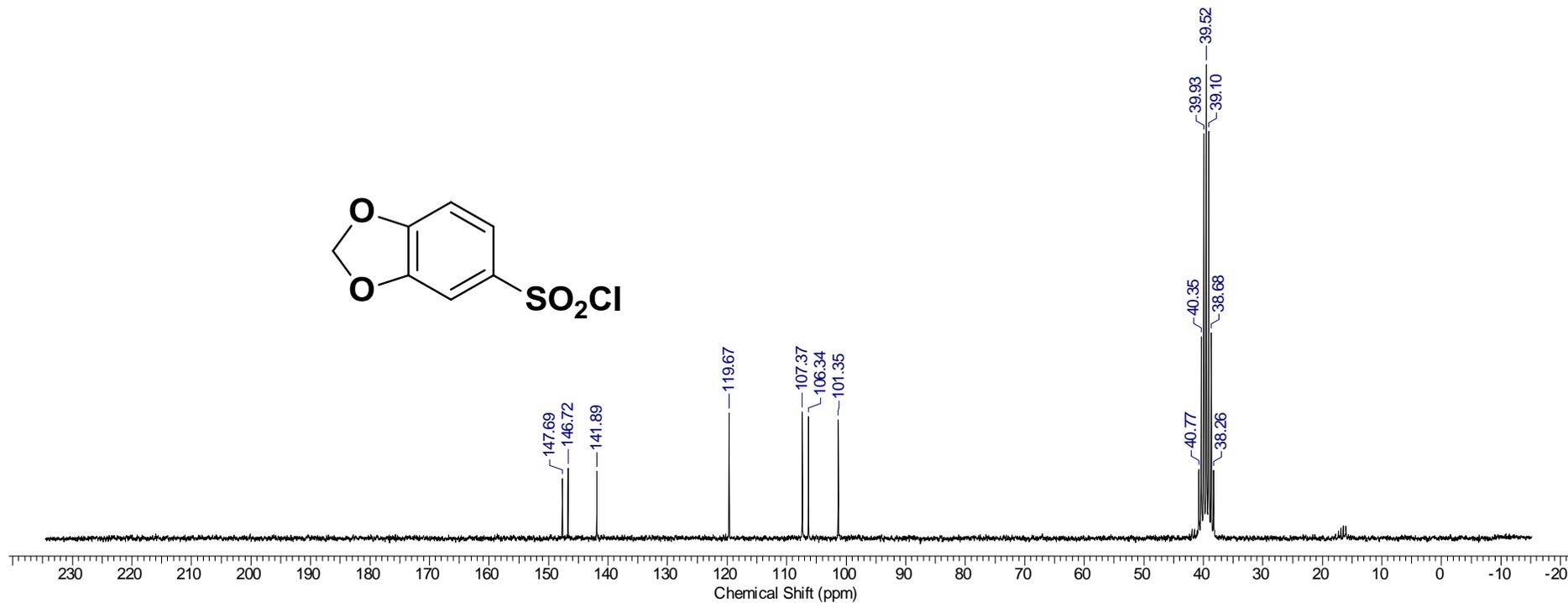
E7. Espectro de RMN de ¹³C do cloreto de 2-metil-4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**120**) (DMSO-d₆/50 MHz).



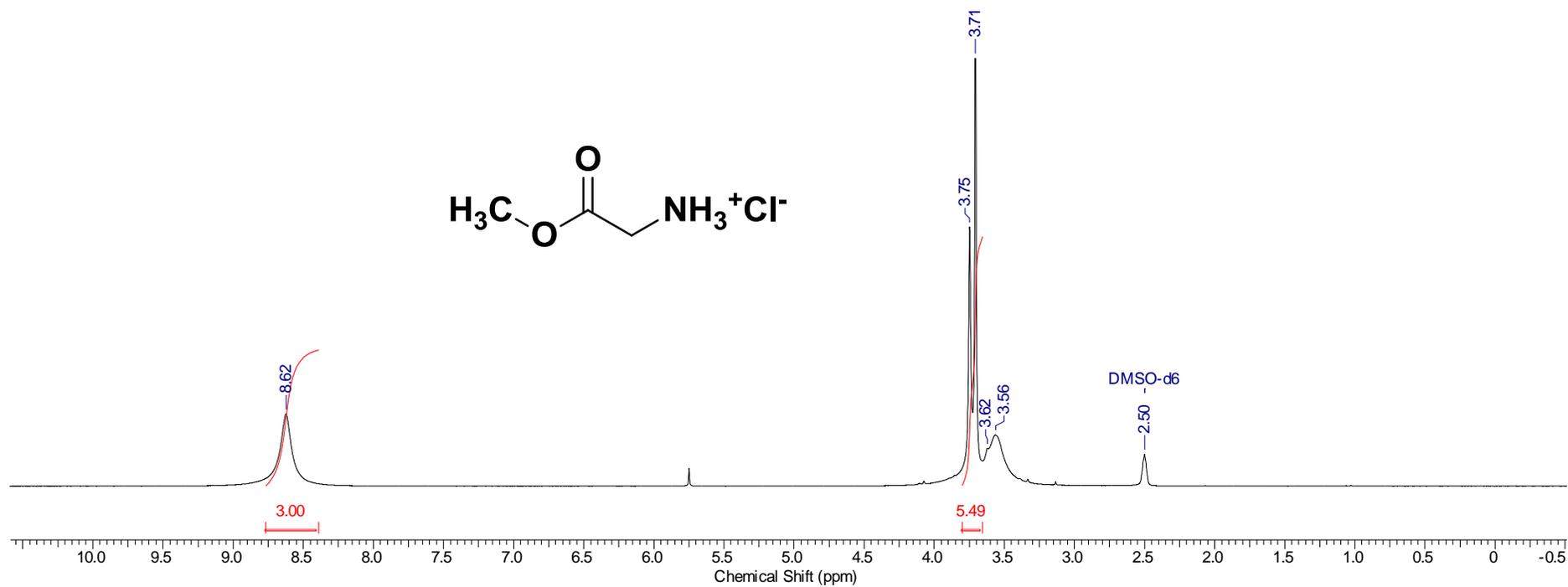
E8. Espectro de RMN de ¹H do cloreto de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**121**) (DMSO-d₆/200 MHz).



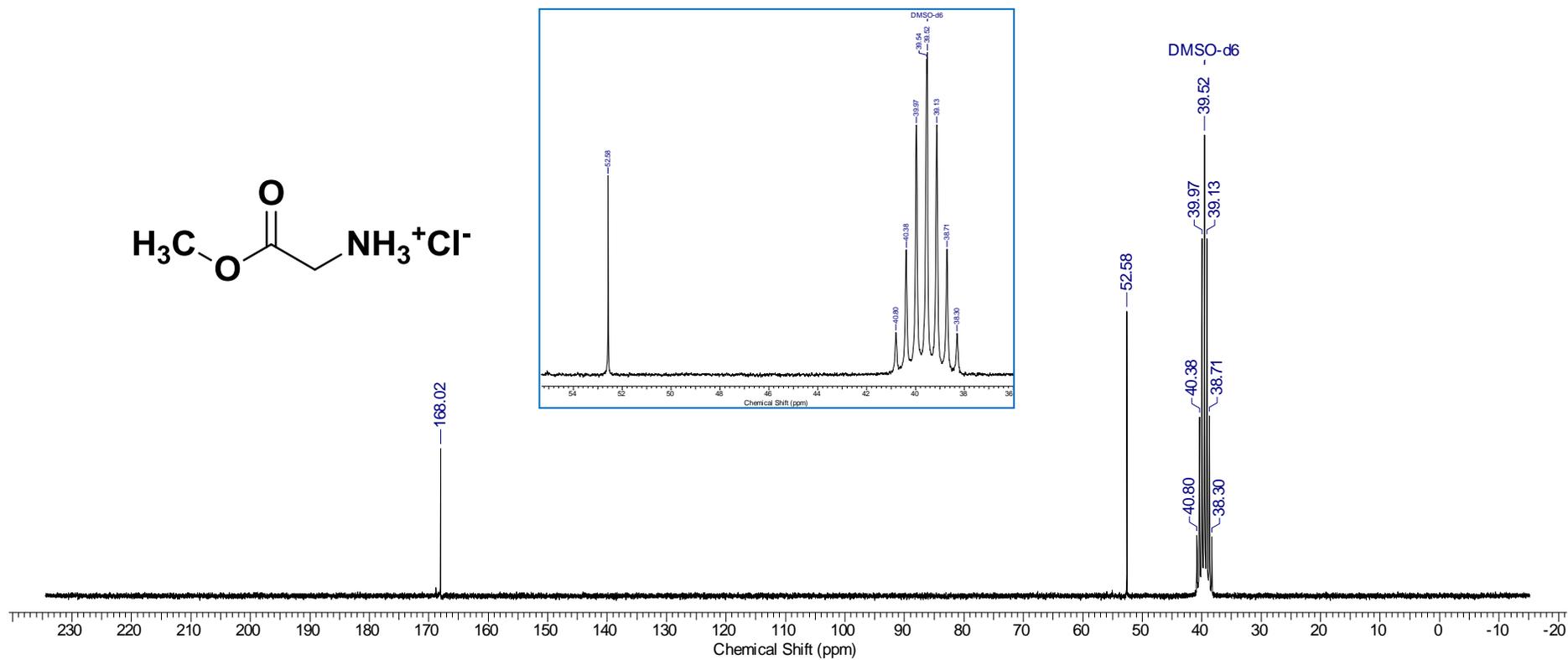
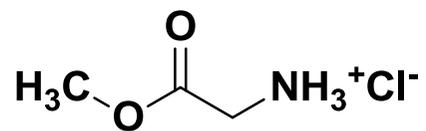
E9. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do cloreto de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**121**) ($\text{DMSO-d}_6/200$ MHz).



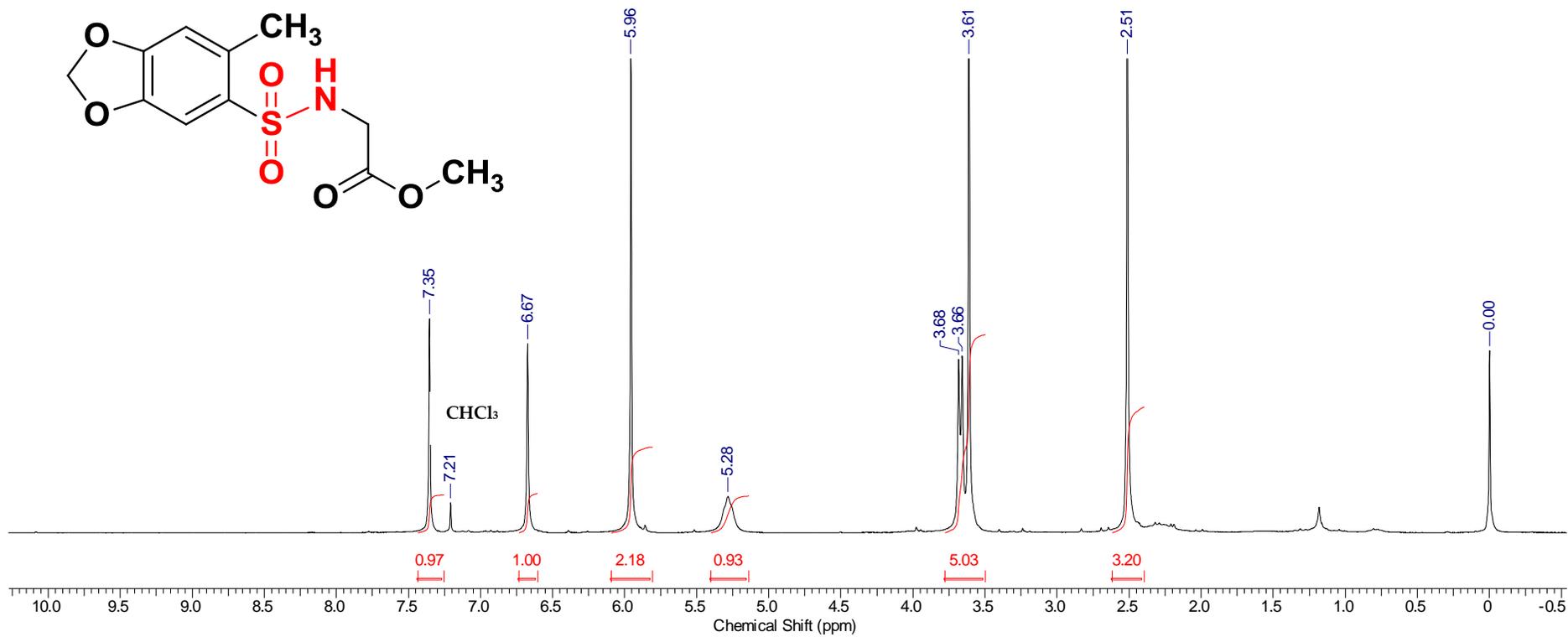
E10. Espectro de RMN de ^{13}C do cloreto de 4,5-metilenodioxibenzenossulfonila (**121**) (DMSO- d_6 /50 MHz).



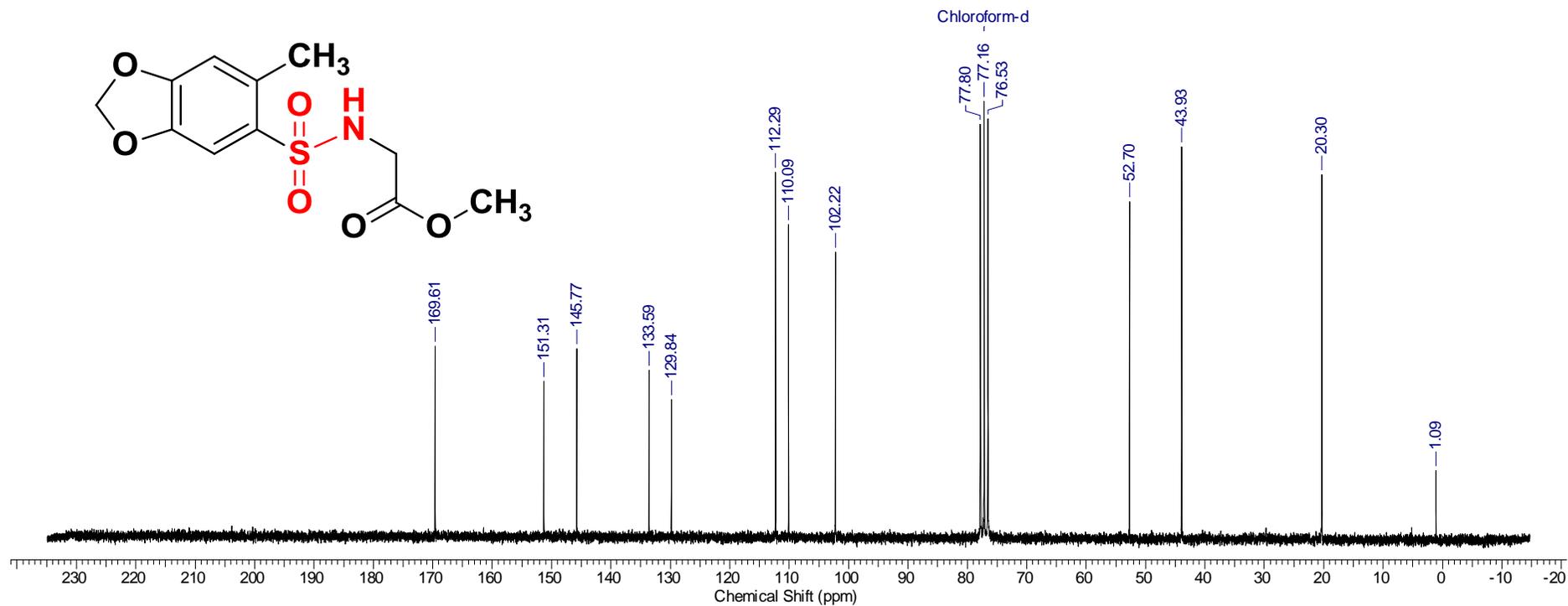
E11. Espectro de RMN de ^1H do cloridrato do éster metílico da glicina (**123**) (DMSO- d_6 /200 MHz).



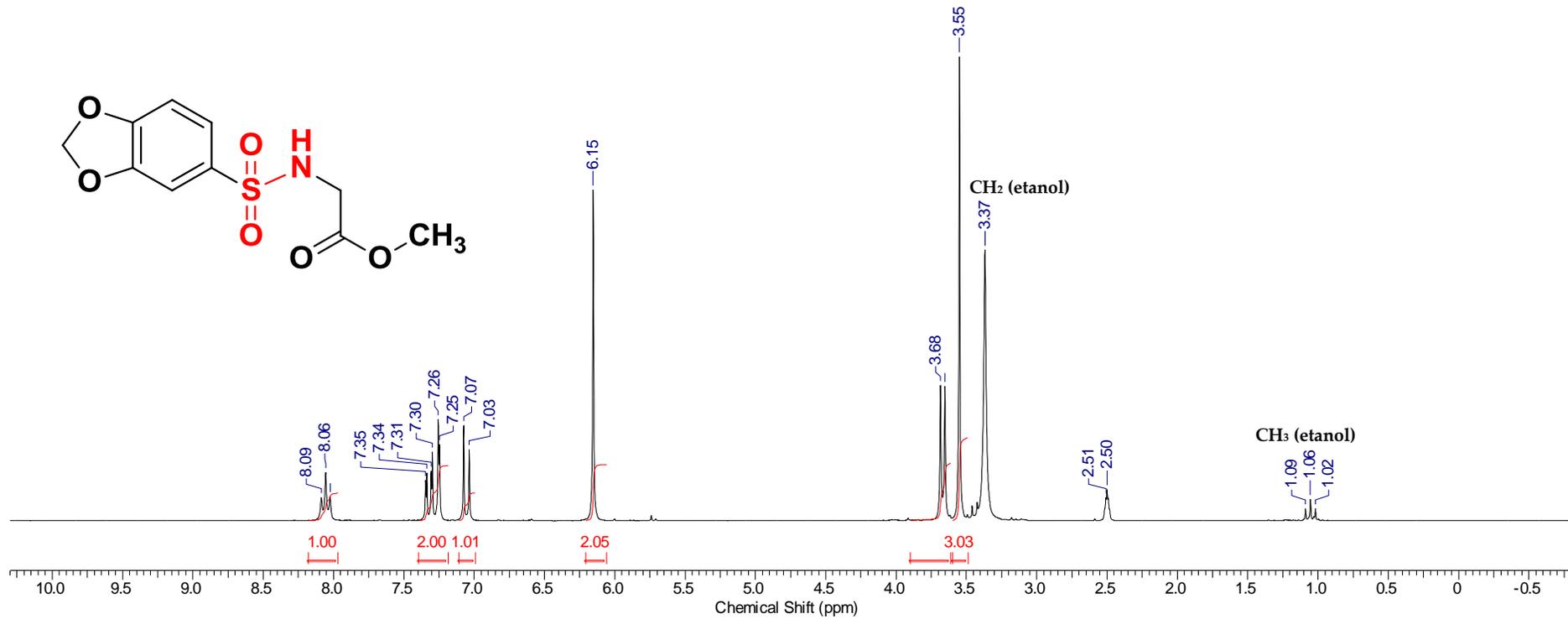
E12. Espectro de RMN de ^{13}C do cloridrato do éster metílico da glicina (**123**) (DMSO- d_6 /50 MHz).



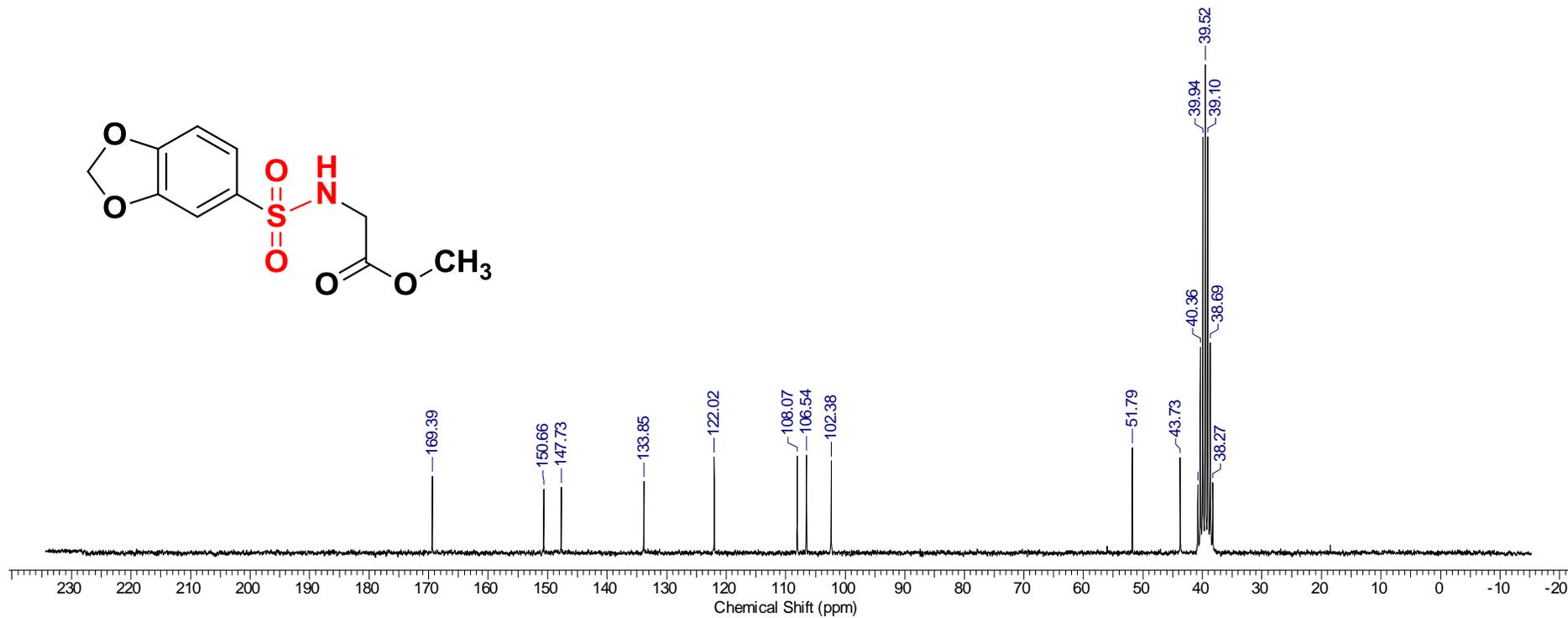
E13. Espectro de RMN de ¹H do 2-(6-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (**131**) (CDCl₃/200 MHz).



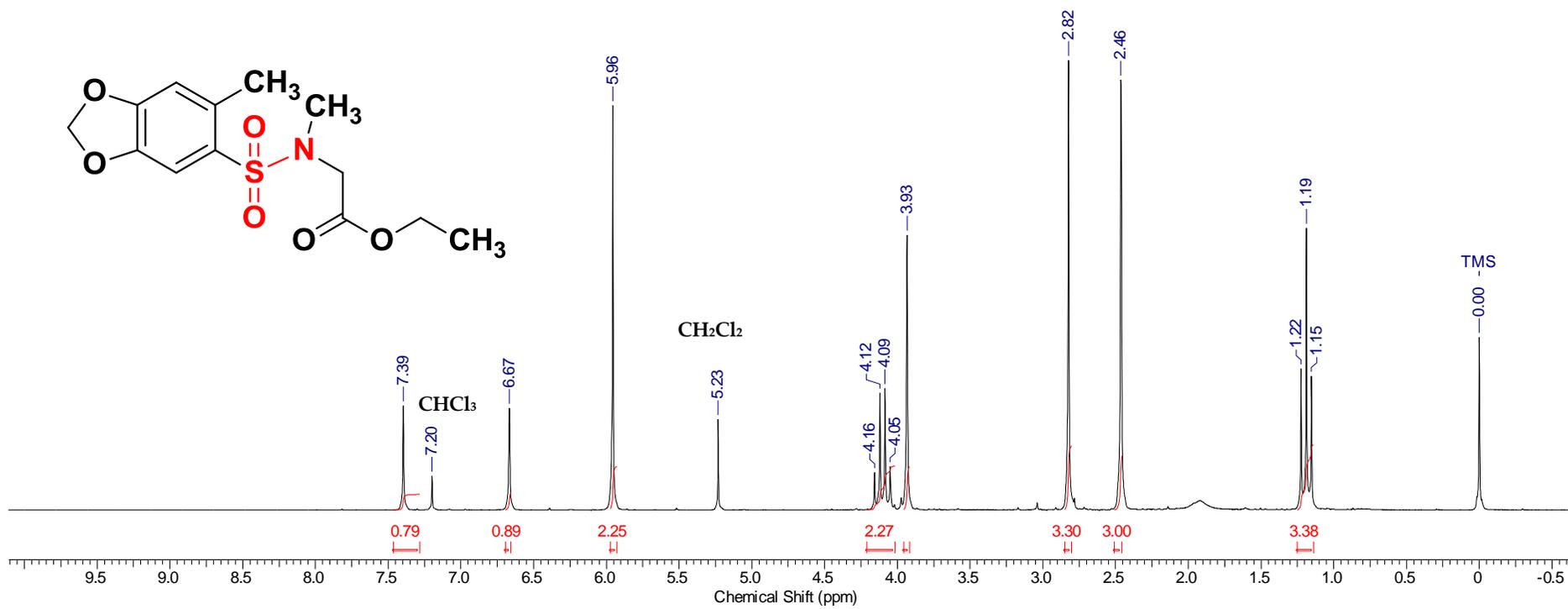
E14. Espectro de RMN de ^{13}C do 2-(6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (**131**) ($\text{CDCl}_3/50$ MHz).



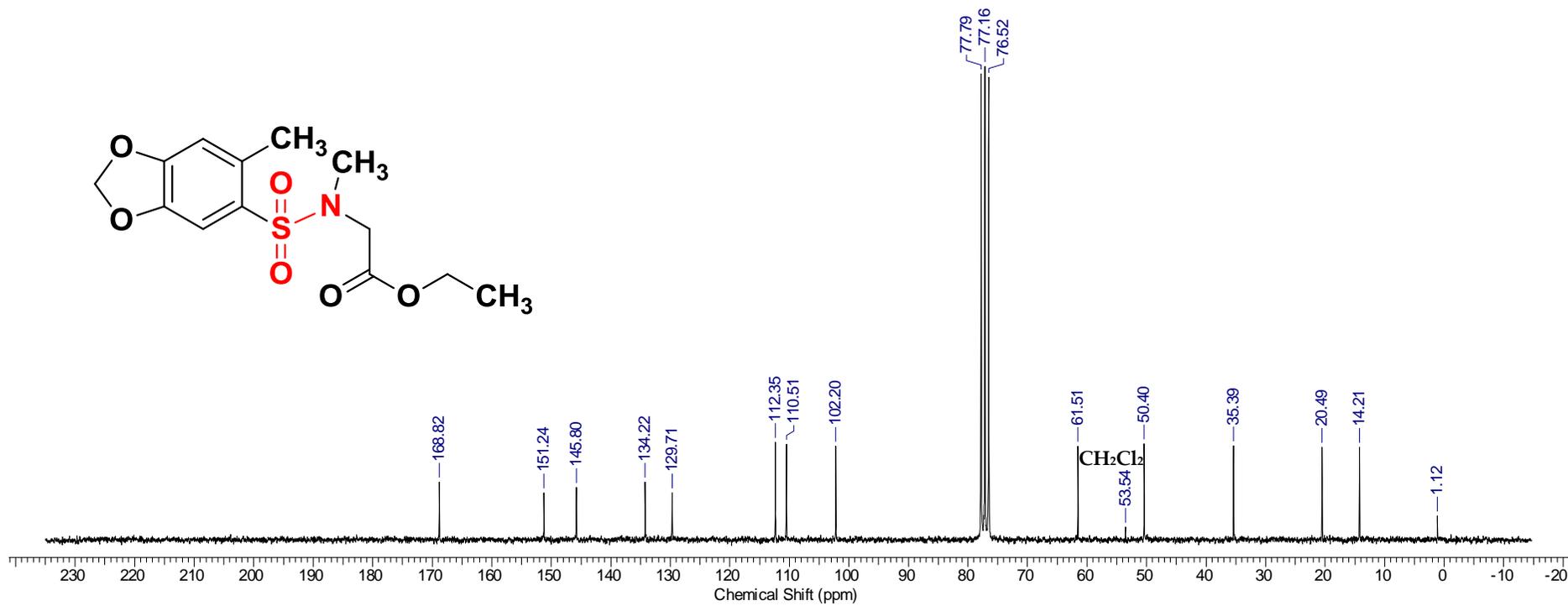
E15. Espectro de RMN de ¹H do 2-(benzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (132) (DMSO-d₆/200 MHz).



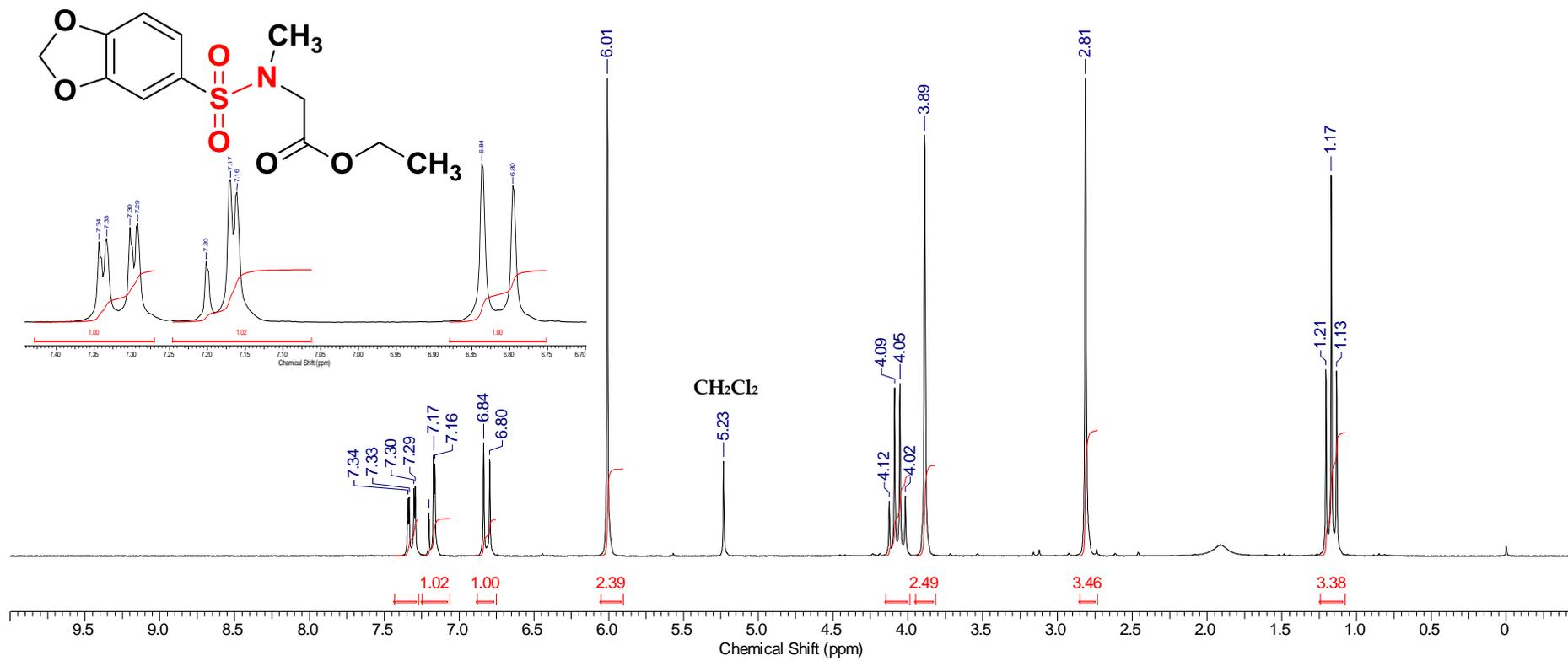
E16. Espectro de RMN de ¹³C do 2-(benzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de metila (132) (DMSO-d₆/50 MHz).



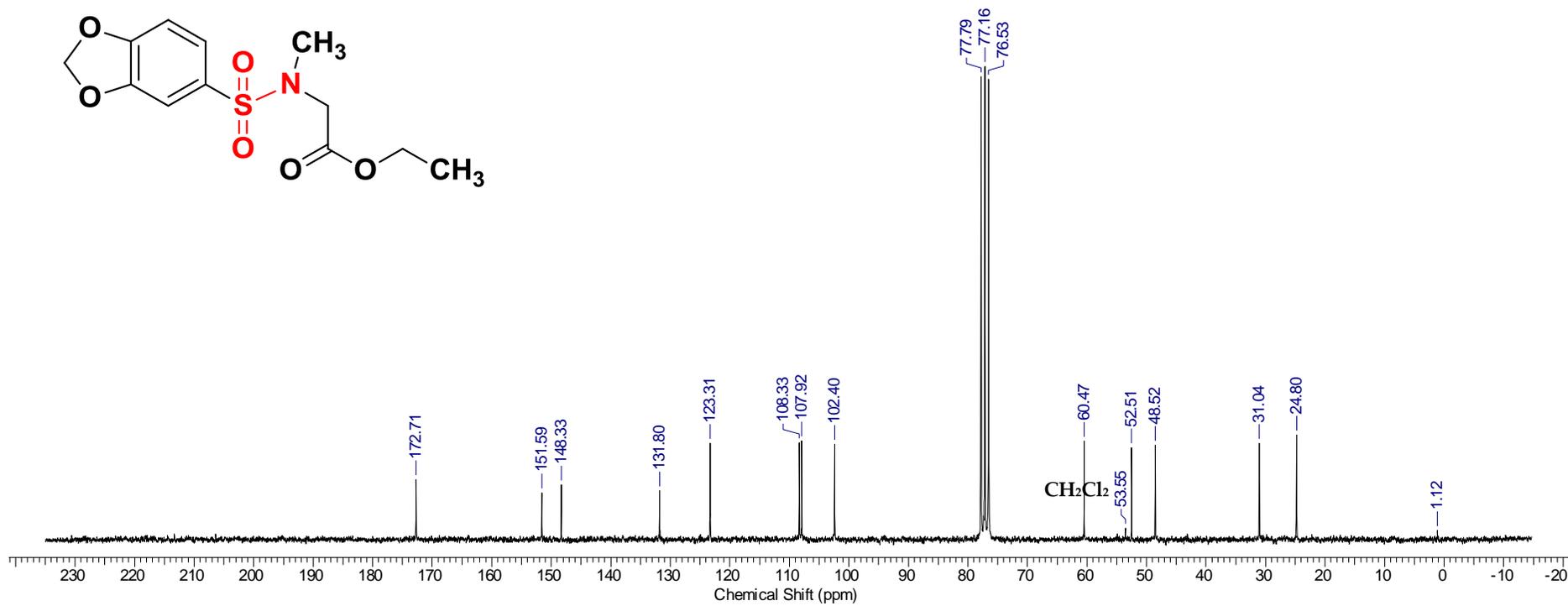
E17. Espectro de RMN de ¹H do 2-(N,N-dimetilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de etila (**133**) (CDCl₃/200 MHz).



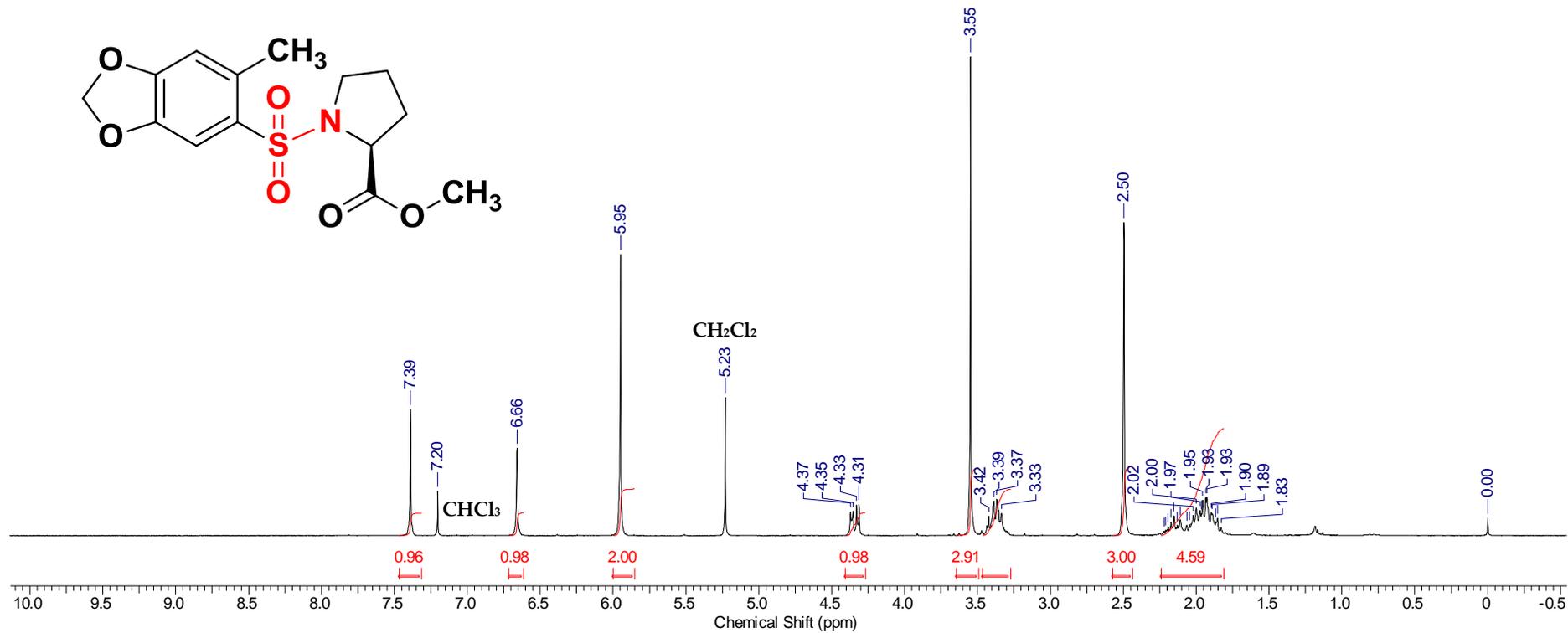
E18. Espectro de RMN de ^{13}C do 2-(*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de etila (**133**) ($\text{CDCl}_3/50$ MHz).



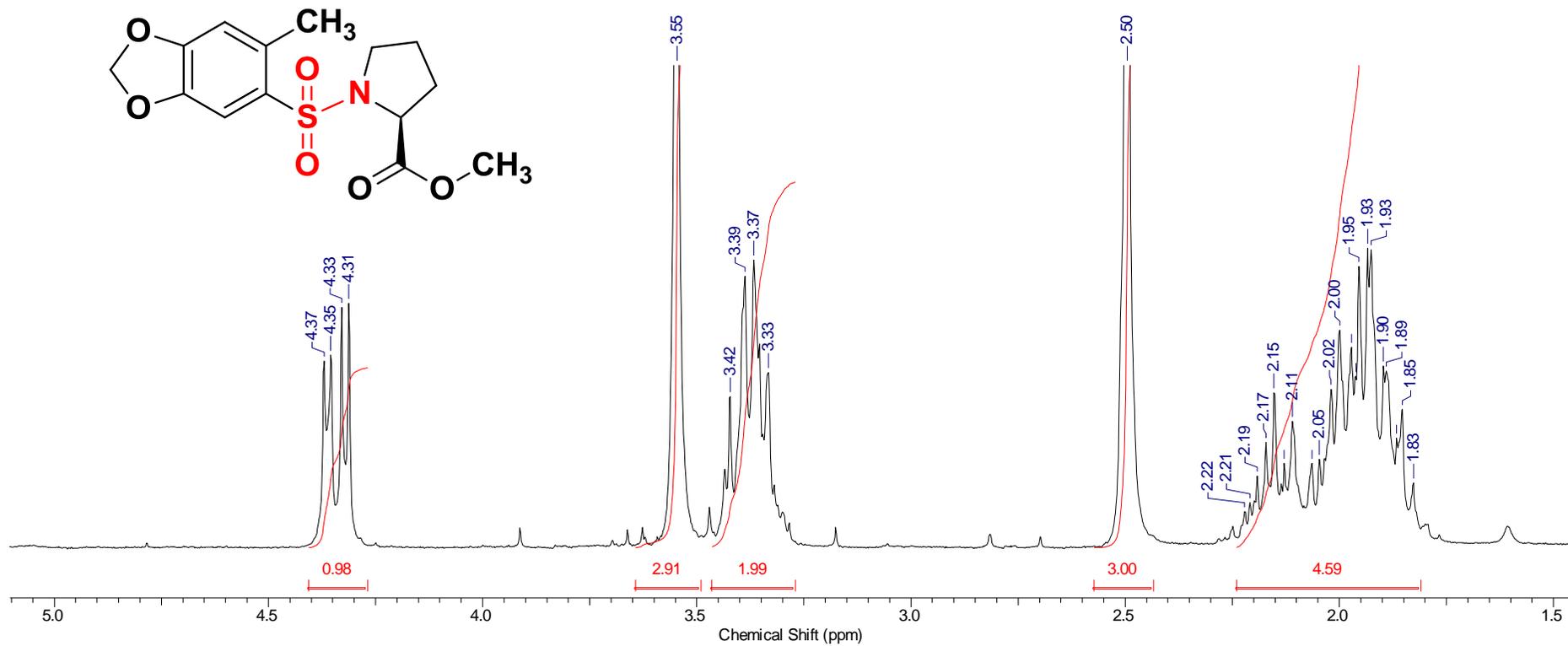
E19. Espectro de RMN de ¹H do 2-(N-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de etila (**134**) (CDCl₃/200 MHz).



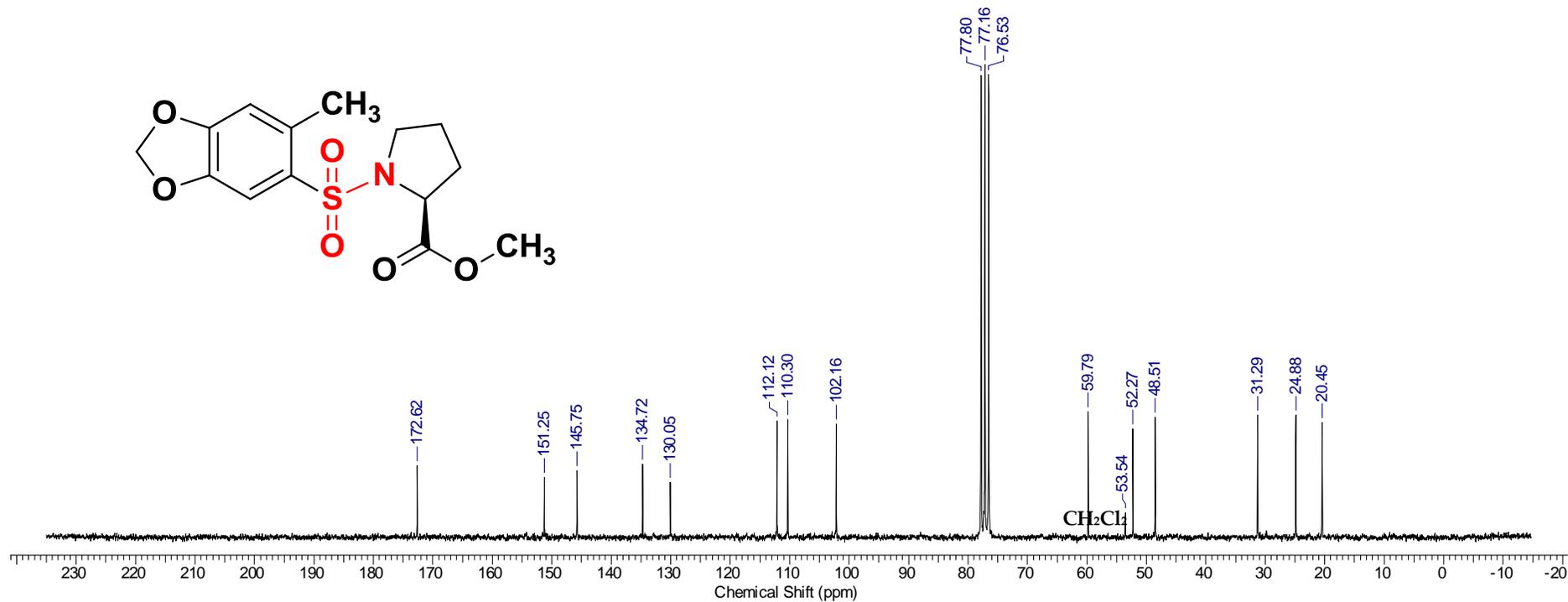
E20. Espectro de RMN de ¹³C do 2-(*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetato de etila (**134**) (CDCl₃/50 MHz).



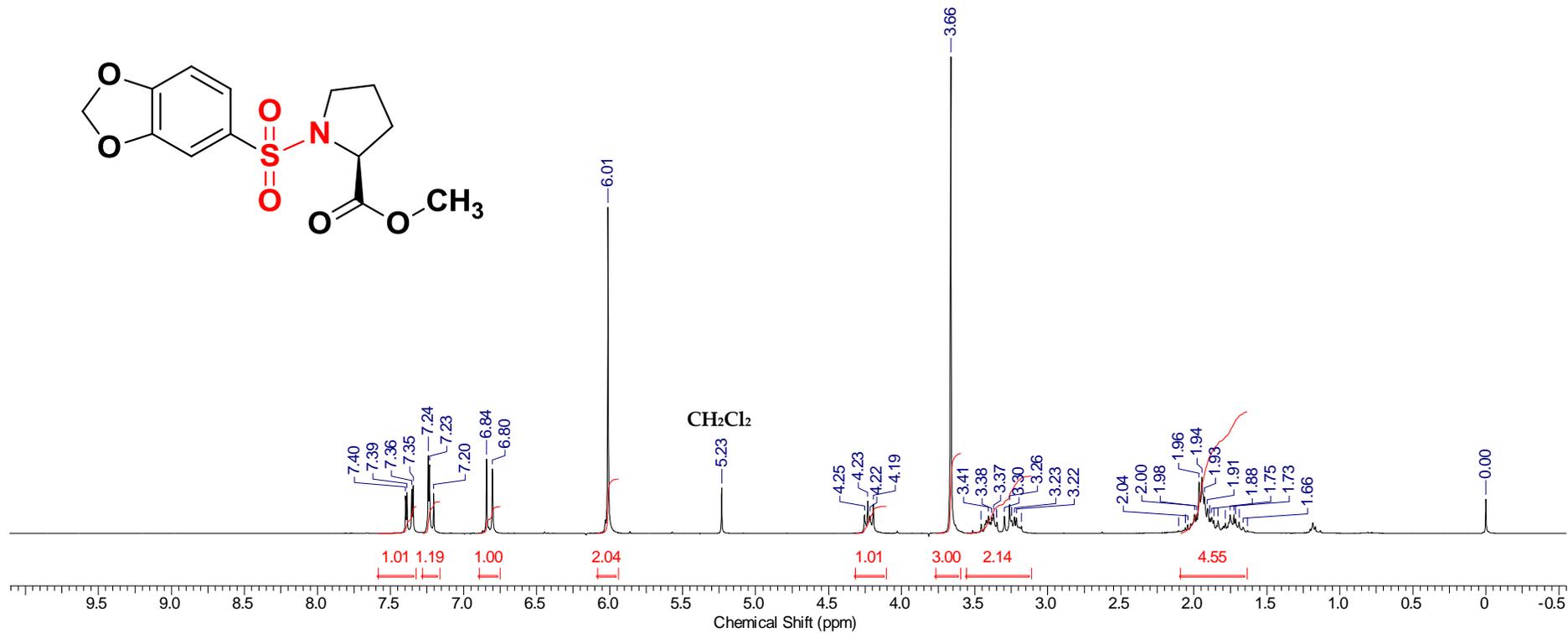
E21. Espectro de RMN de ¹H do (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**129**) (CDCl₃ /200 MHz).



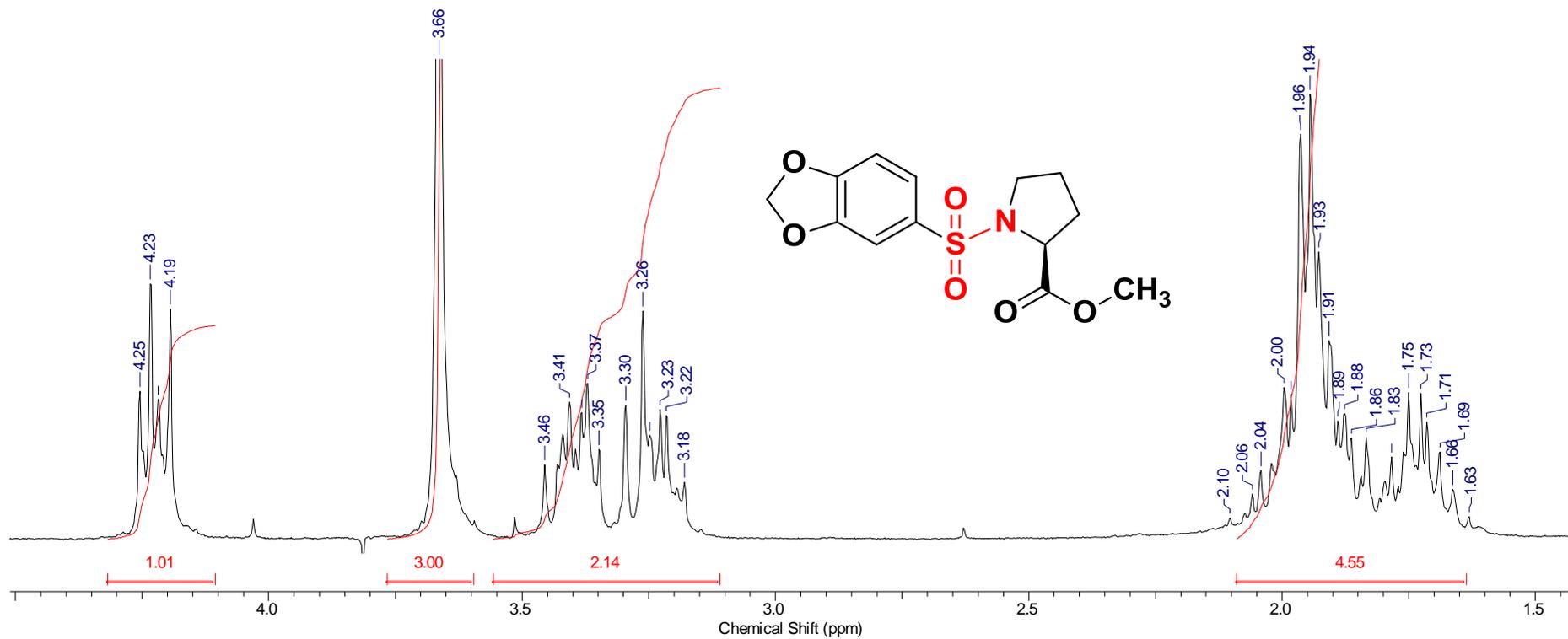
E22. Ampliação do espectro de RMN de ¹H do (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**129**) (CDCl₃/200 MHz).



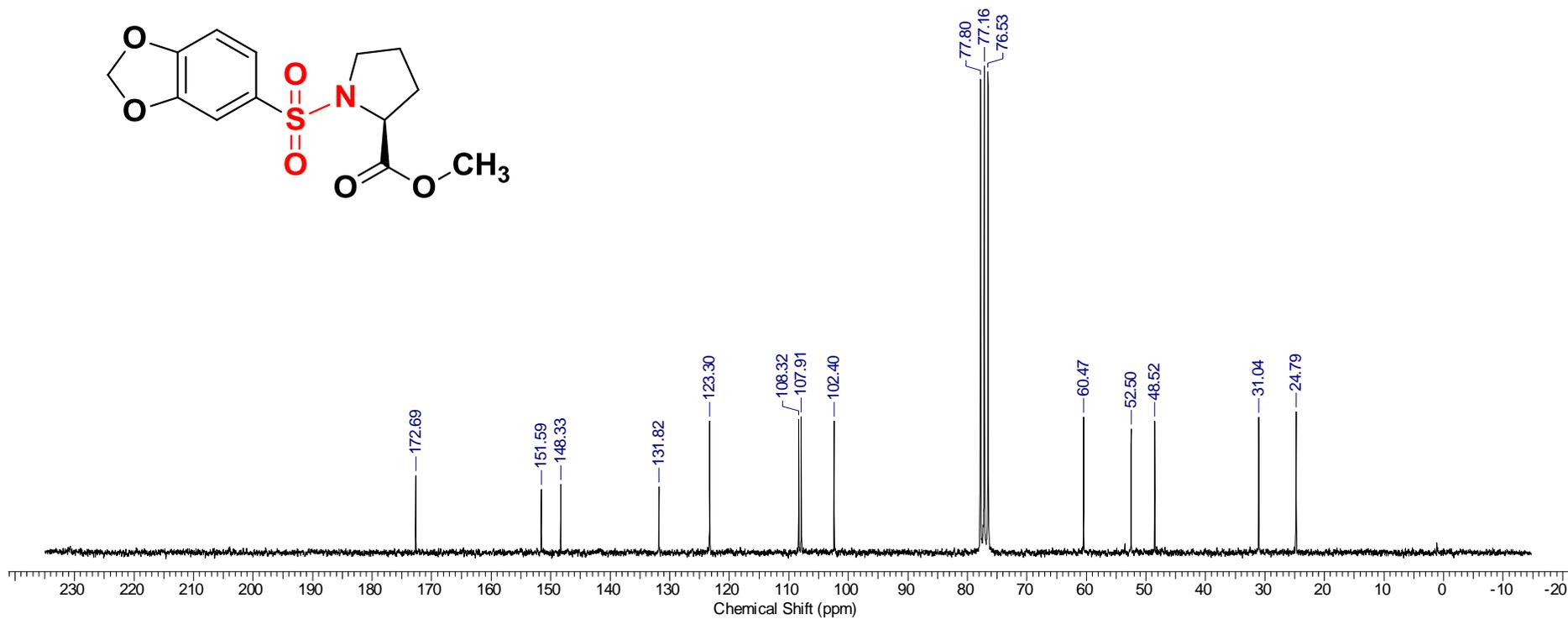
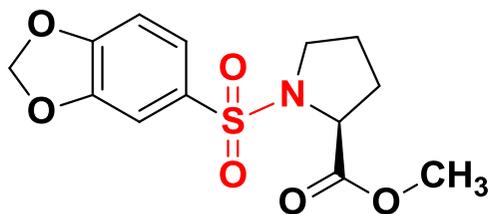
E23. Espectro de RMN de ¹³C do (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**129**) (CDCl₃/50 MHz).



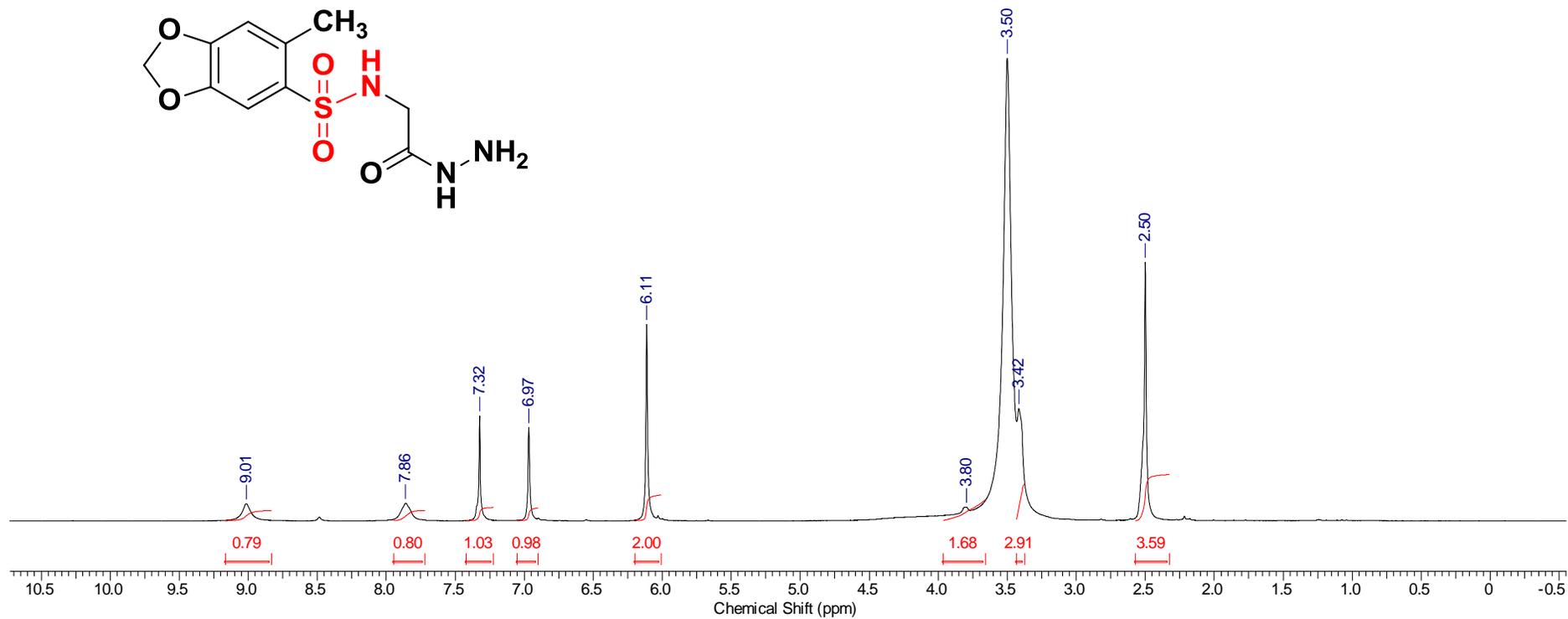
E24. Espectro de RMN de ¹H do (S)-1-((benzo[d][1,3]dioxol-5-il) sulfonyl)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**130**) (CDCl₃/200 MHz).



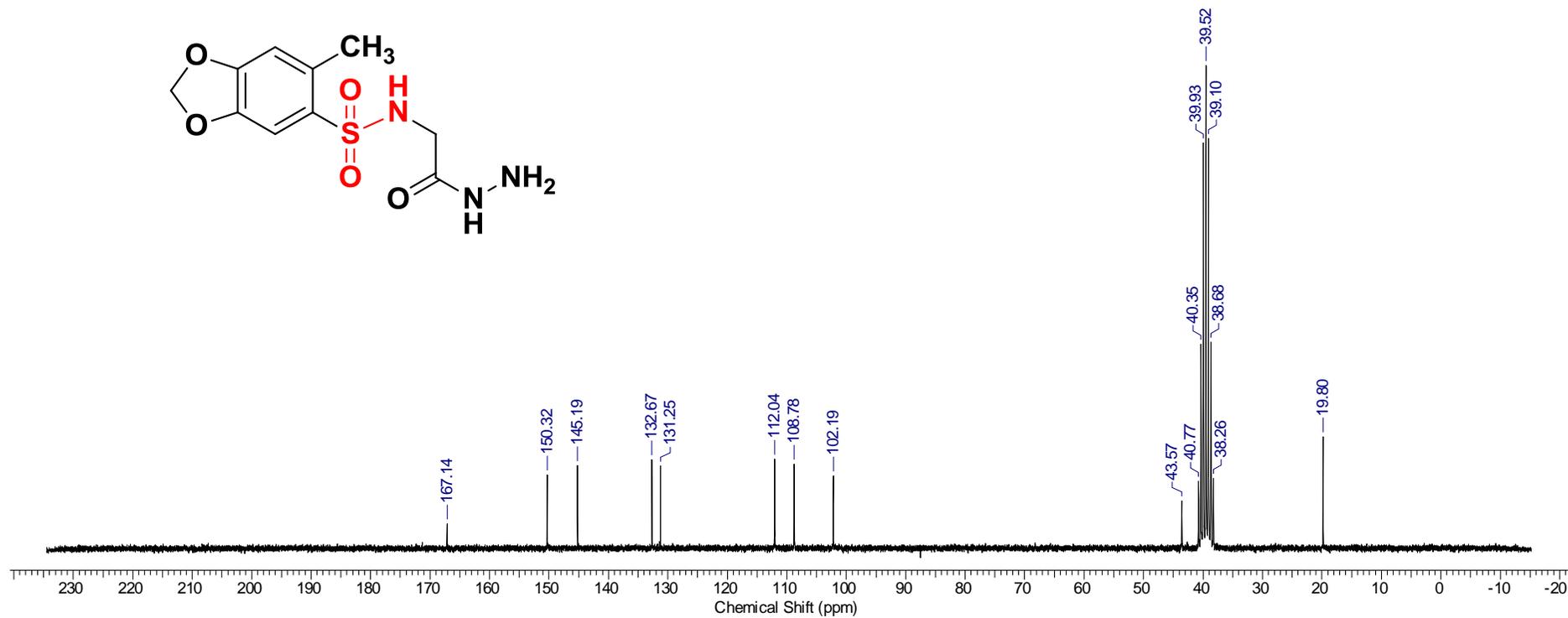
E25. Ampliação do espectro de RMN de ¹H do (S)-1-((benzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**130**) (CDCl₃/200 MHz).



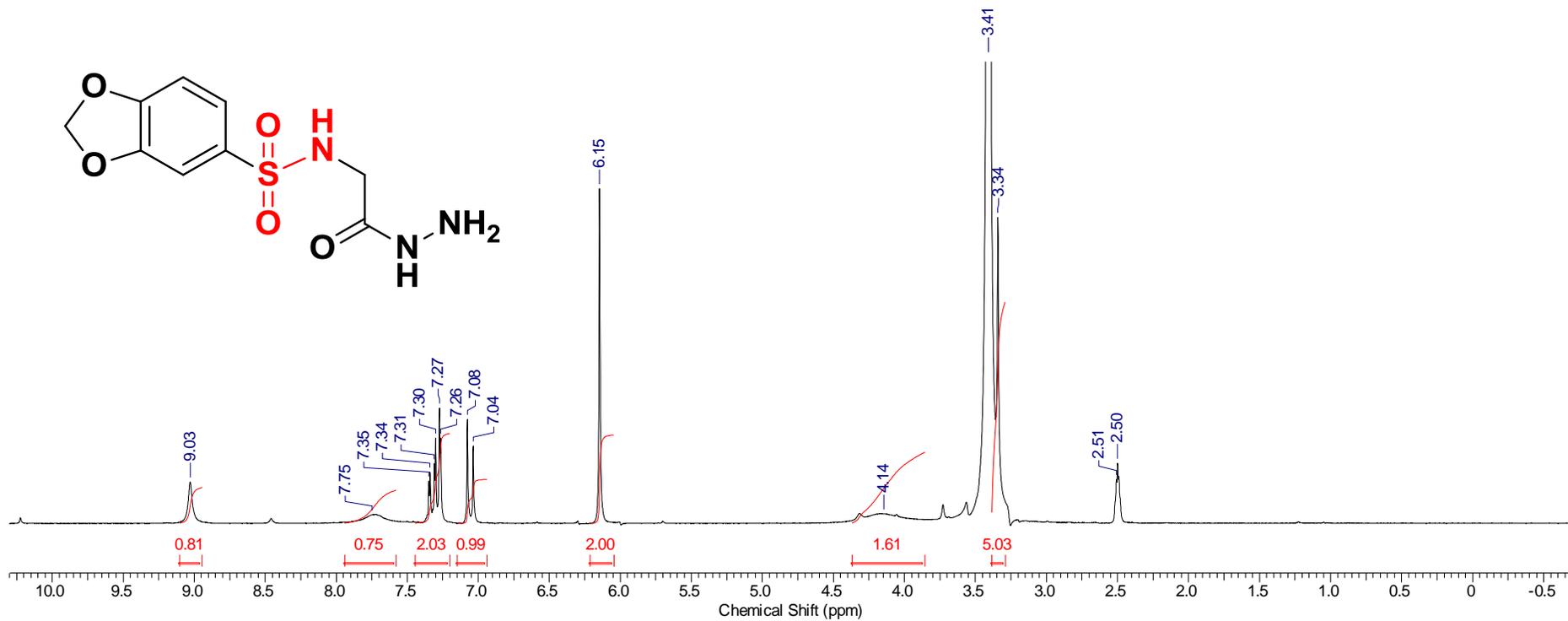
E26. Espectro de RMN de ^{13}C do (*S*)-1-((benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-carboxilato de metila (**130**) ($\text{CDCl}_3/50\text{ MHz}$).



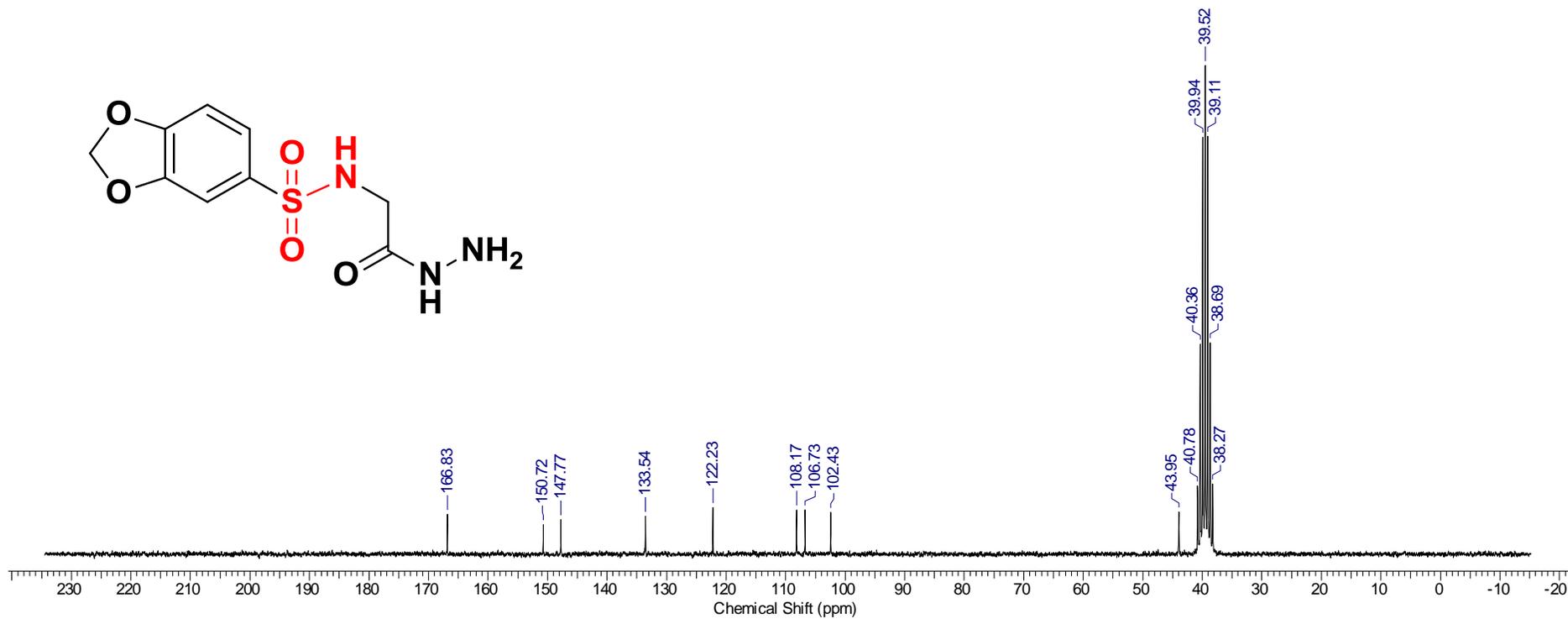
E27. Espectro de RMN de ¹H da 2-(6-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**137**) (DMSO-d₆/200 MHz).



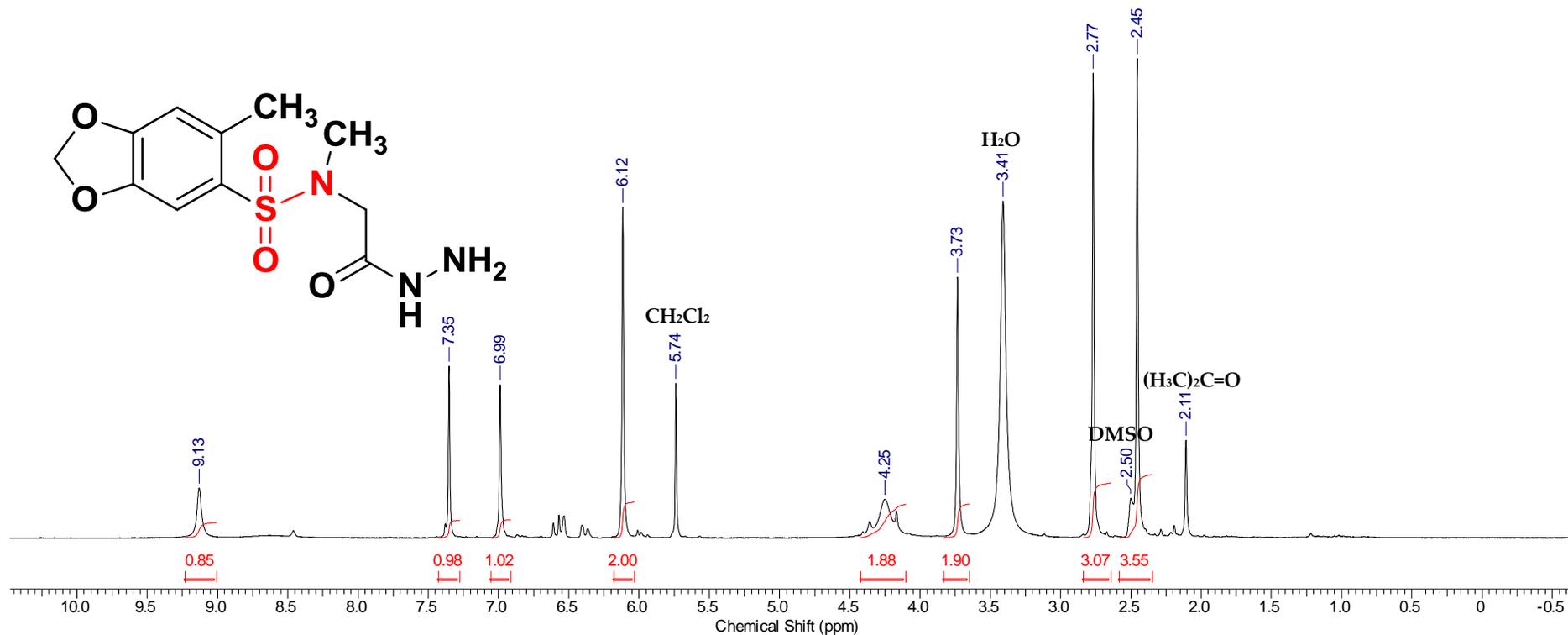
E28. Espectro de RMN de ¹³C da 2-(6-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**137**) (DMSO-d₆/50 MHz).



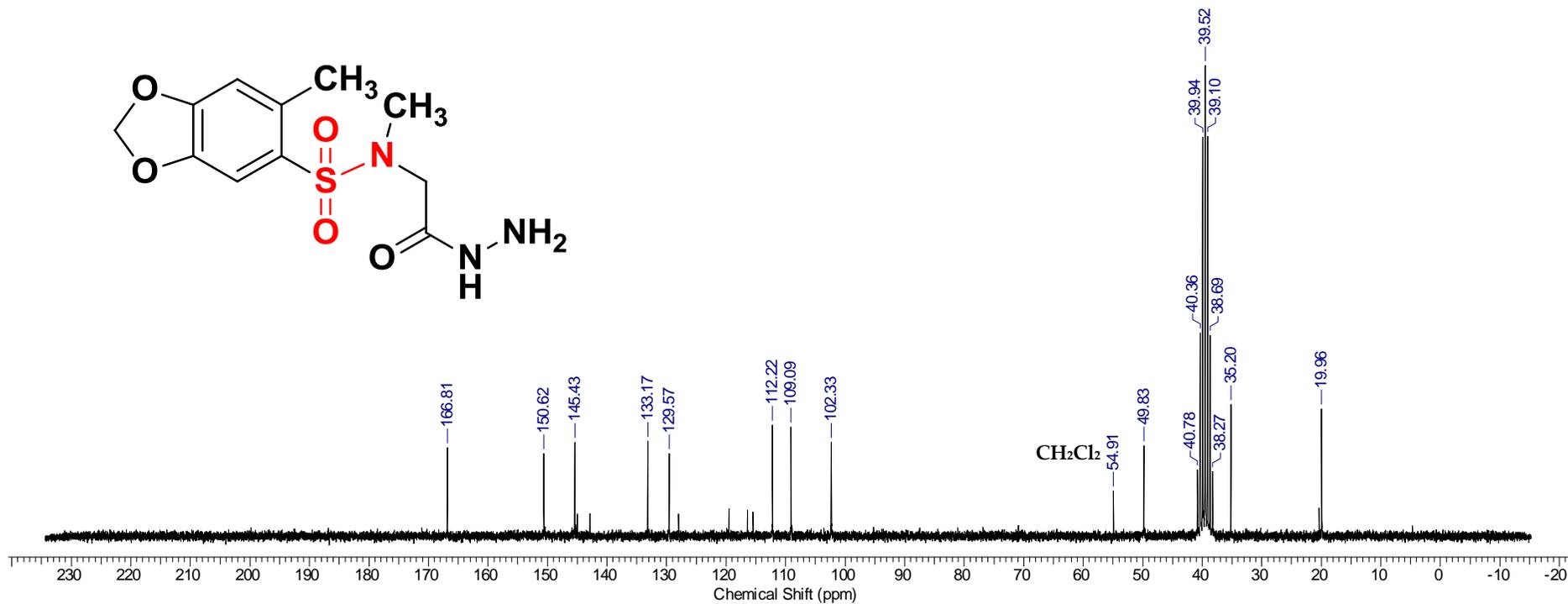
E29. Espectro de RMN de ¹H da 2-benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamidaacetil hidrazida (**138**) (DMSO-*d*₆/200 MHz).



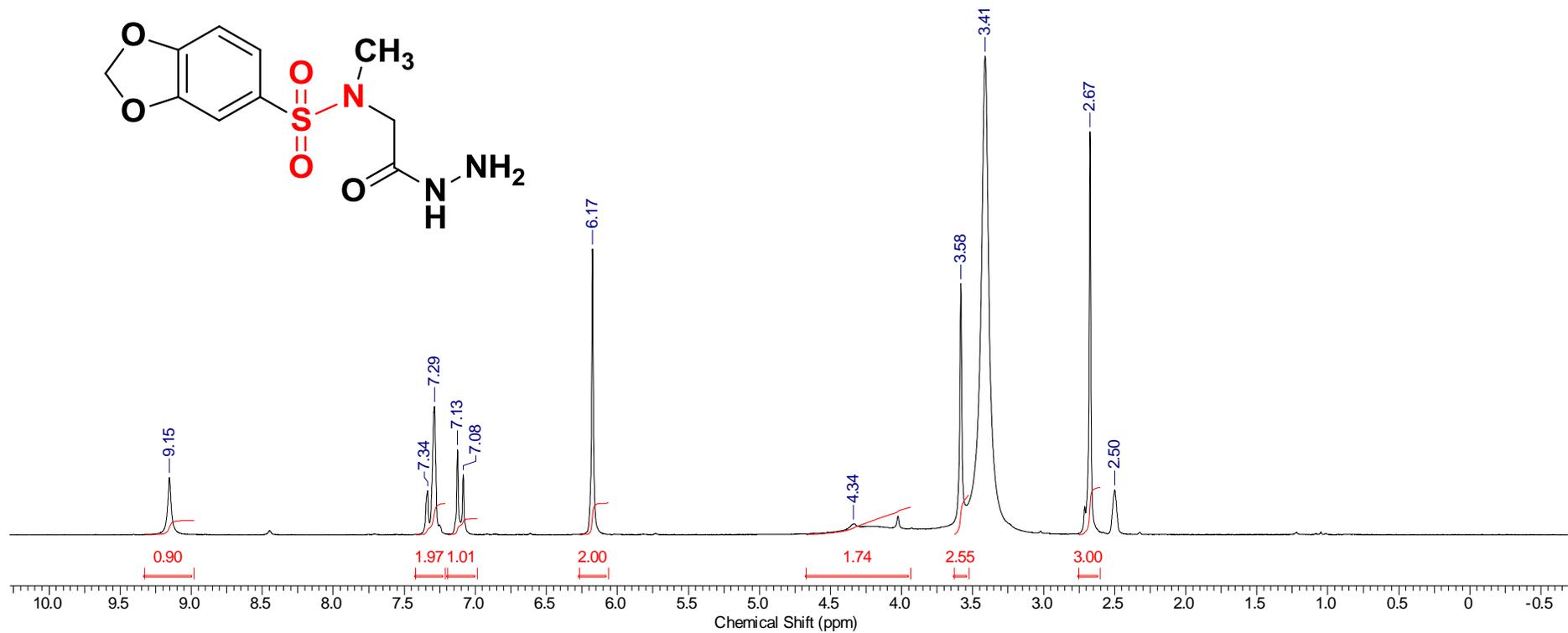
E30. Espectro de RMN de ¹³C da 2-benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**138**) (DMSO-*d*₆/50 MHz).



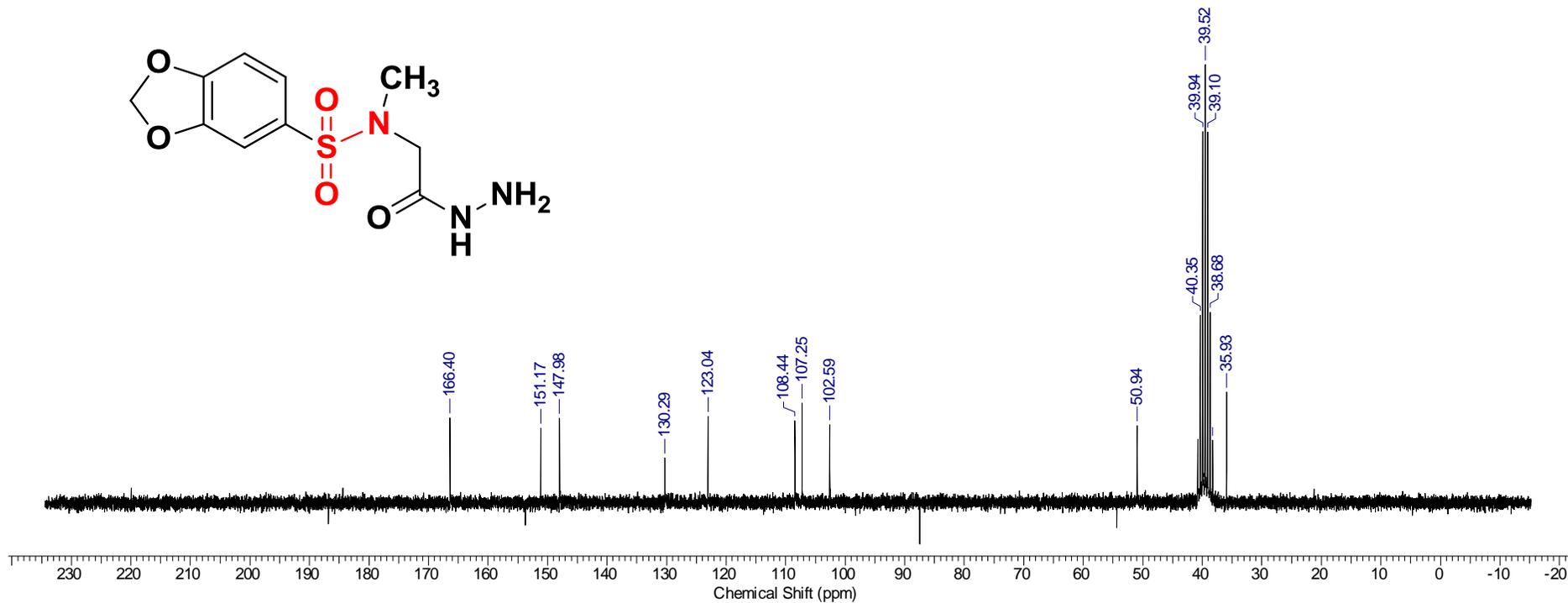
E31. Espectro de RMN de ¹H da 2-(*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**139**) (DMSO-d₆/200 MHz).



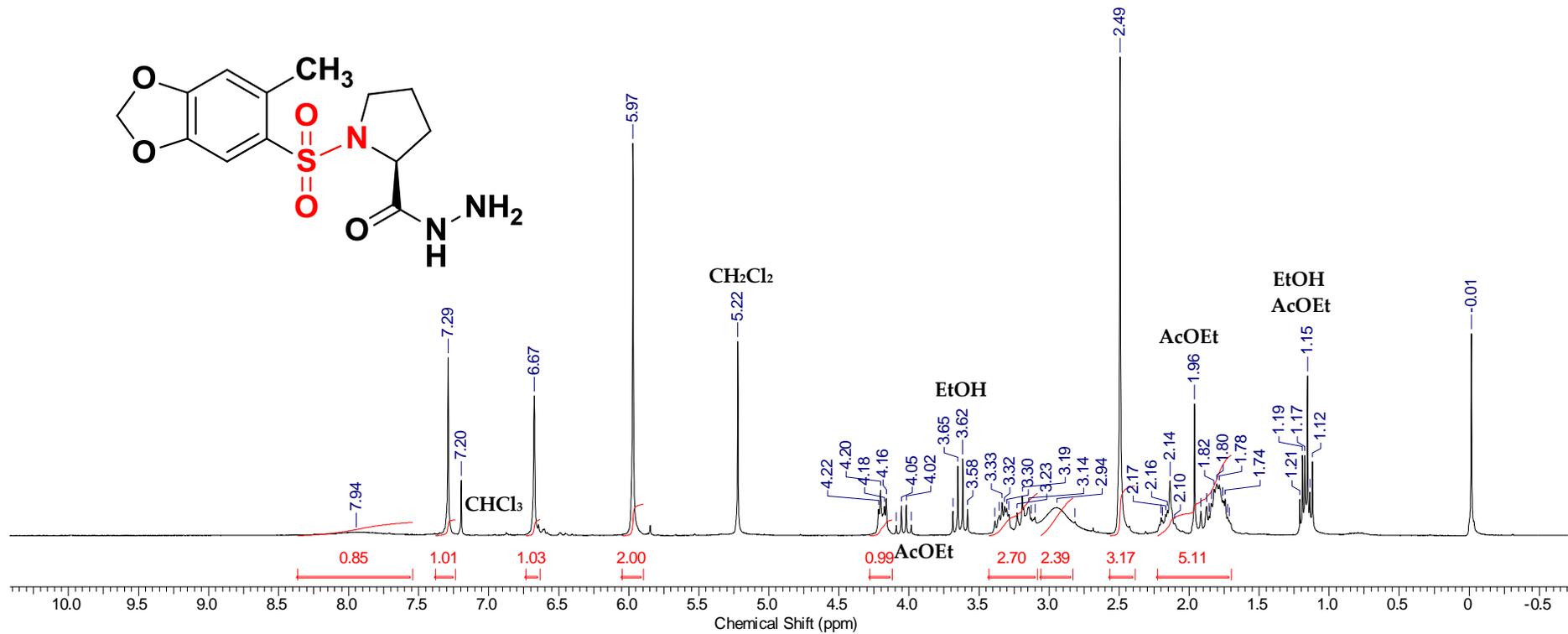
E32. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-(N,6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**139**) (DMSO- d_6 /50 MHz).



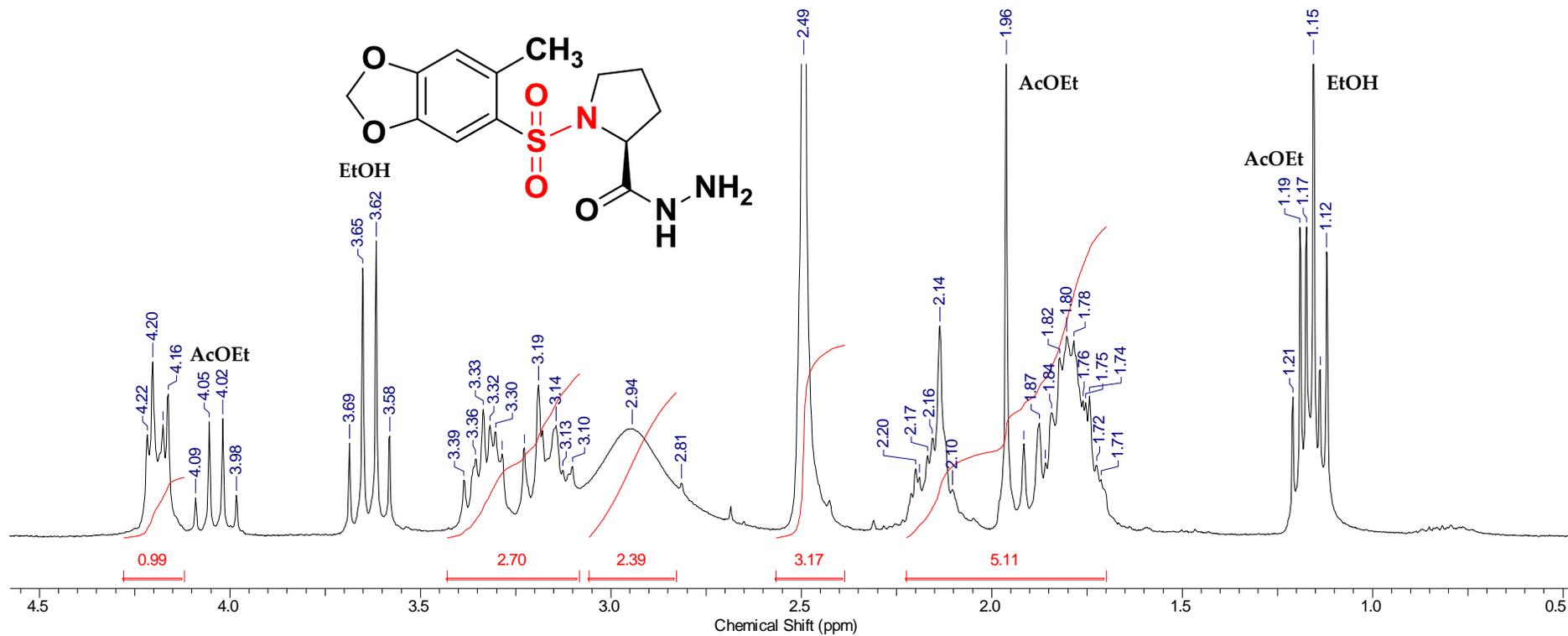
E33. Espectro de RMN de ¹H da 2-(N-metilbenzo[d][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**140**) (DMSO-d₆/200 MHz).



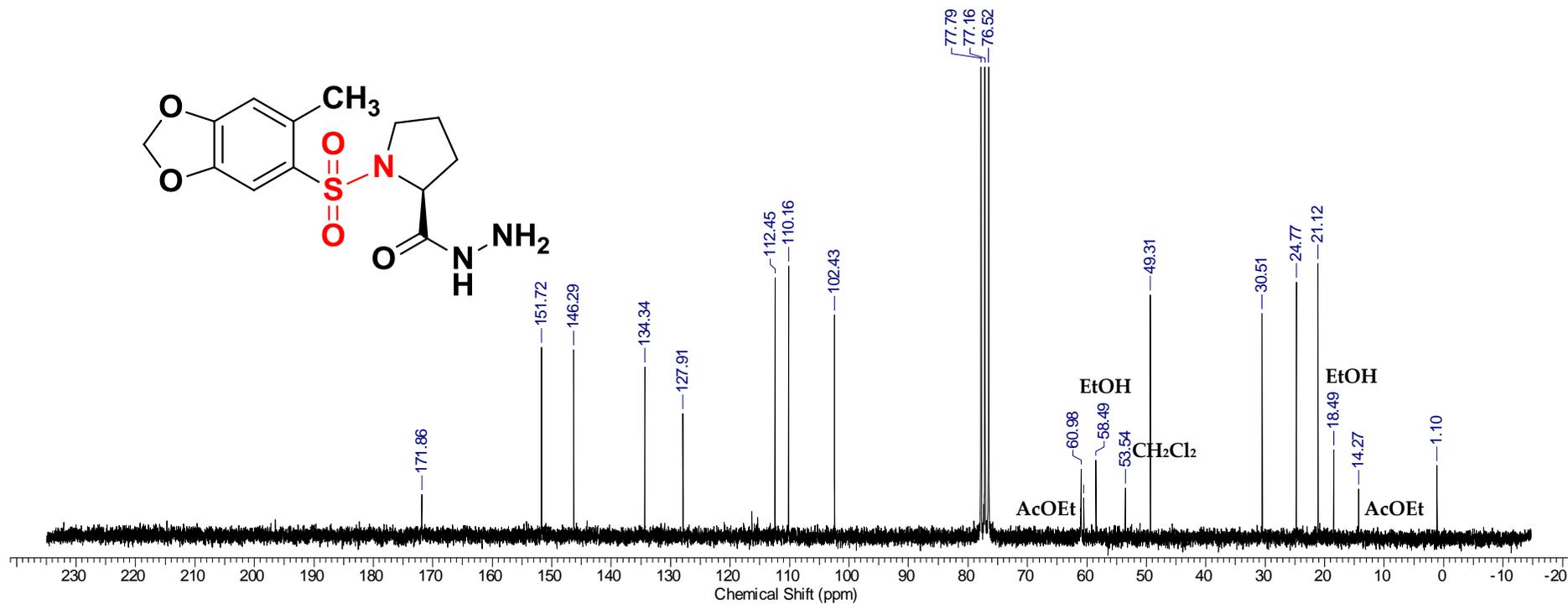
E34. Espectro de RMN de ¹³C da 2-(*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida)acetil hidrazida (**140**) (DMSO-*d*₆/50 MHz).



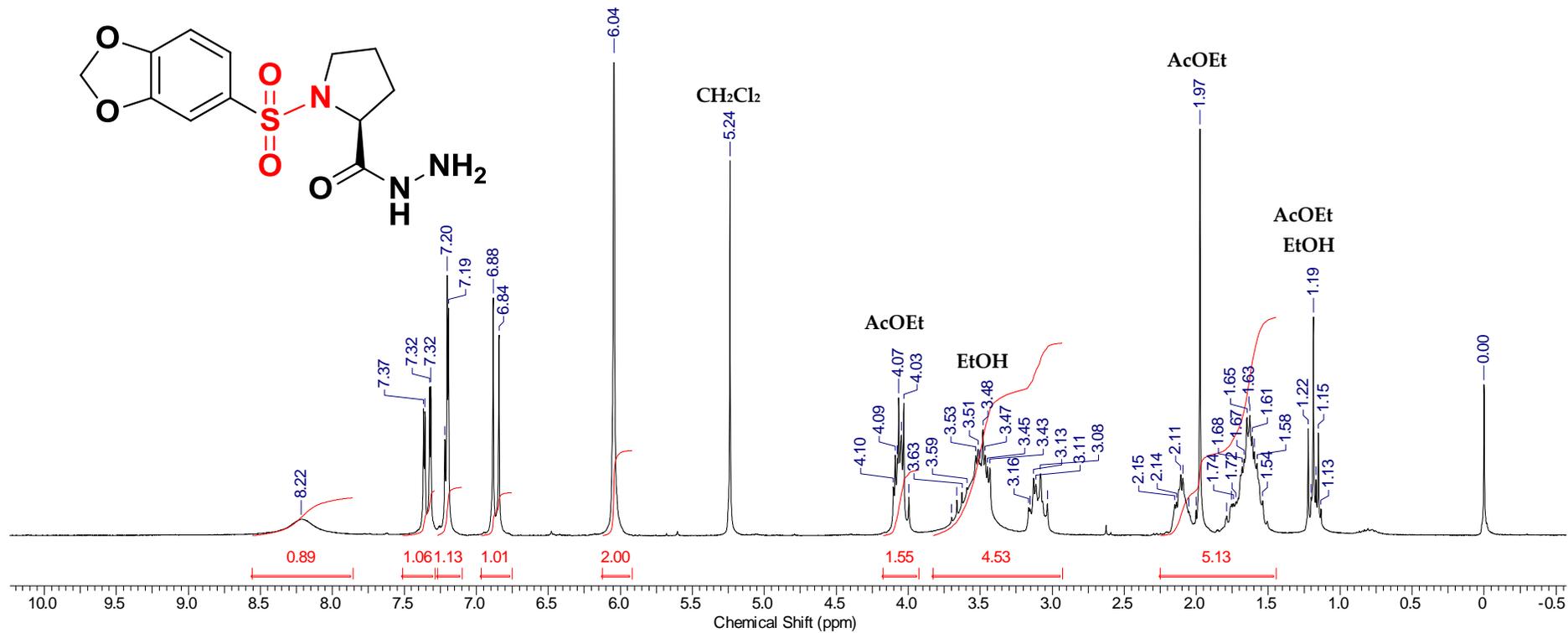
E35. Espectro de RMN de ¹H da (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (**135**) (CDCl₃/200 MHz).



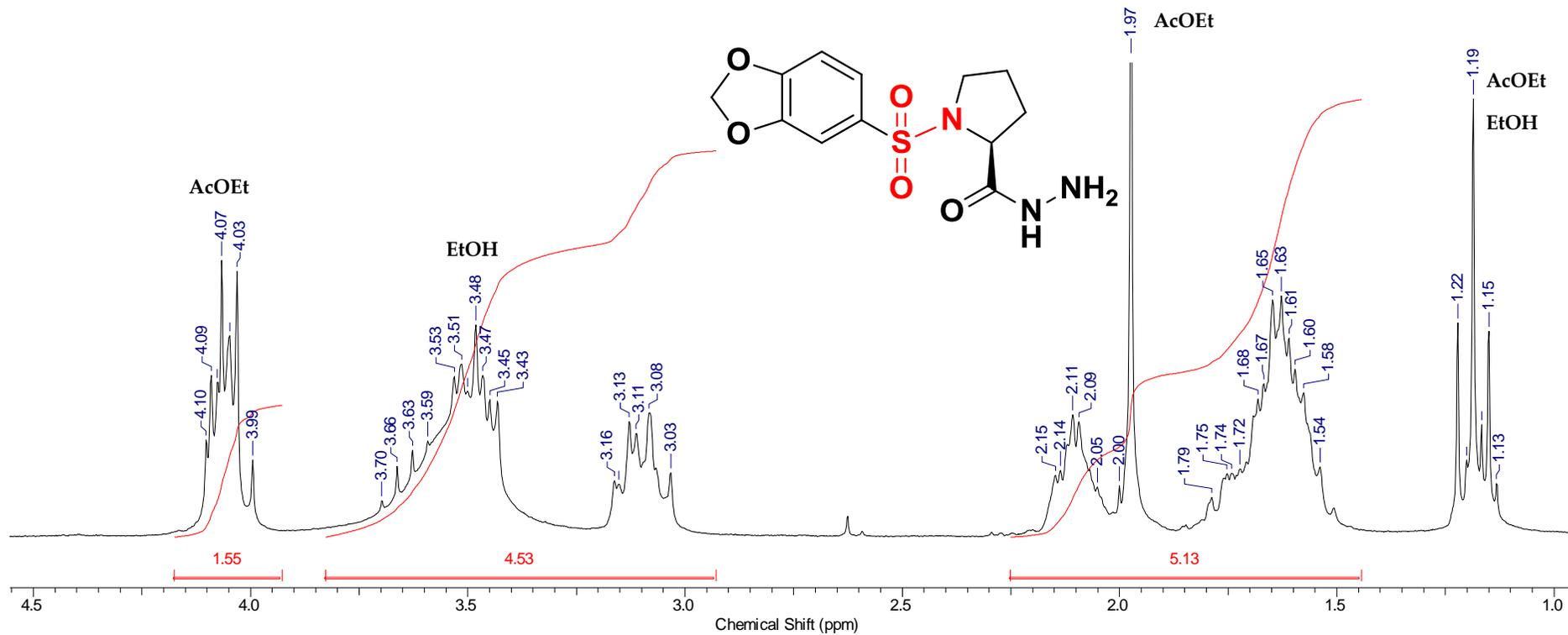
E36. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (**135**) (CDCl₃/200 MHz).



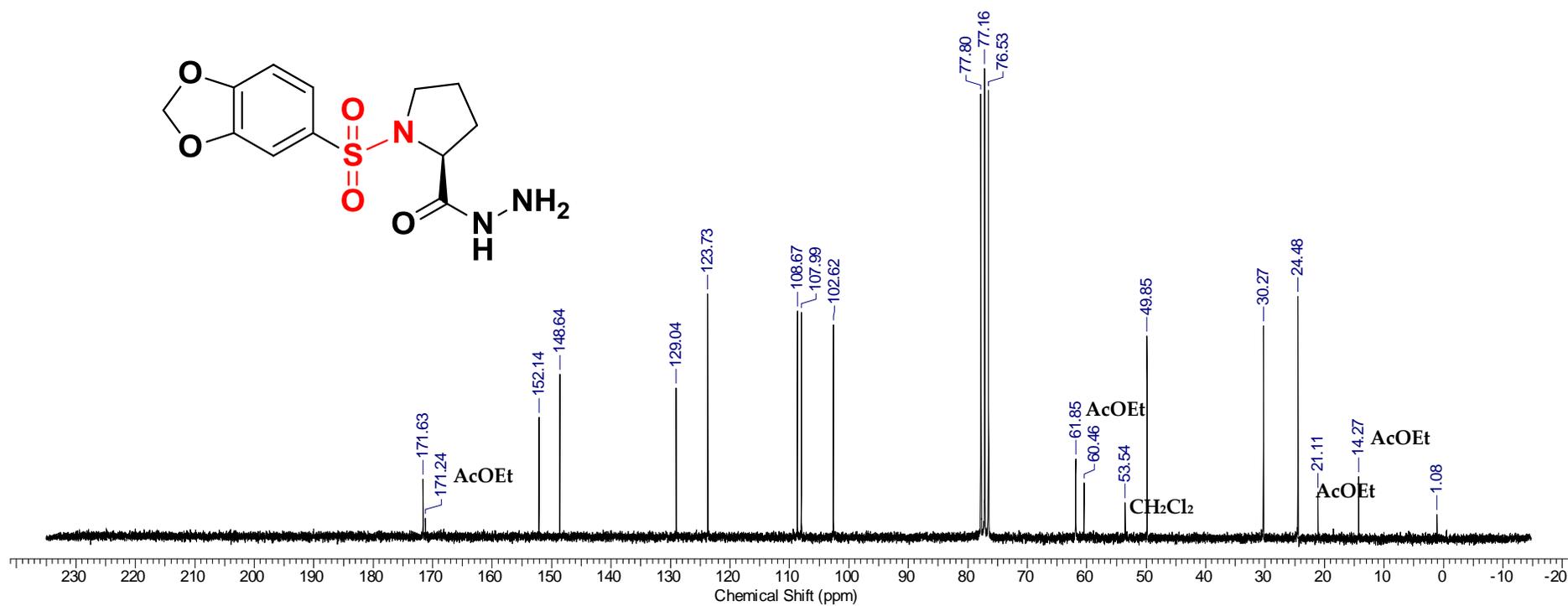
E37. Espectro de RMN de ¹³C da (S)-1-((6-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (**135**) (CDCl₃/50 MHz).



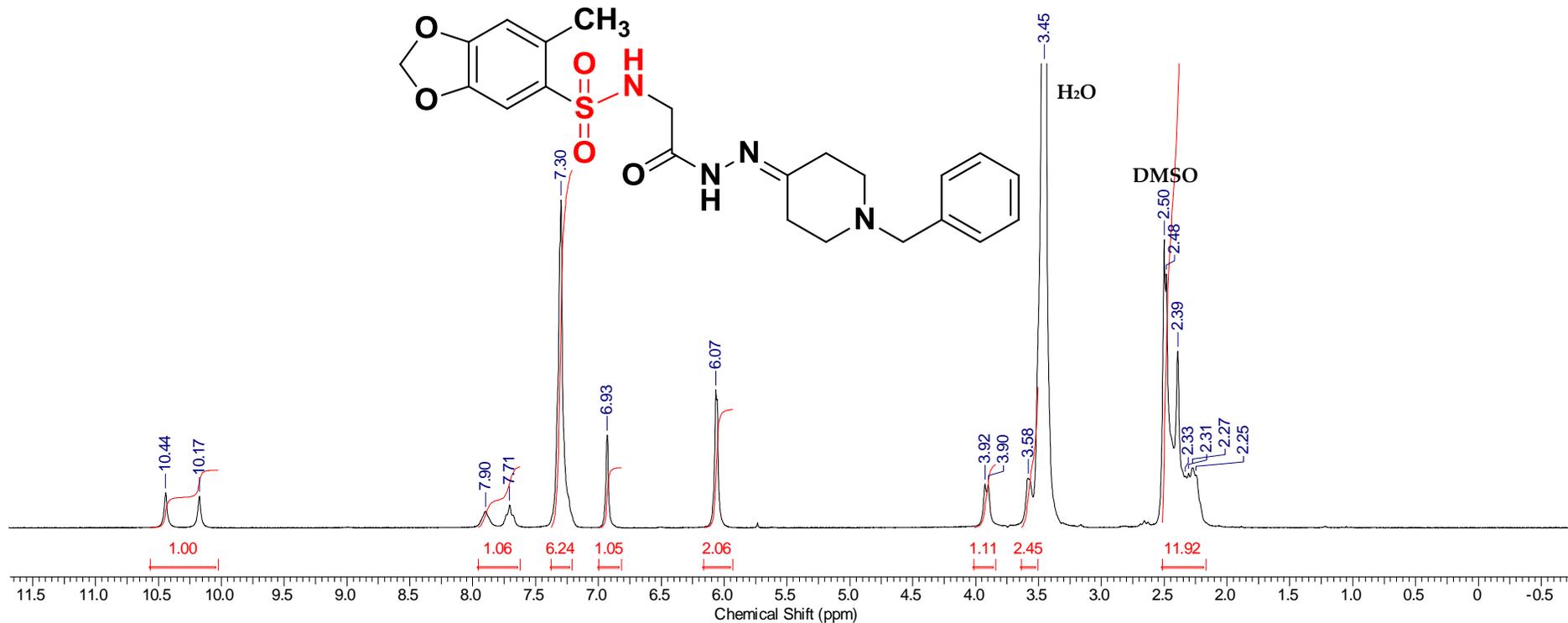
E38. Espectro de RMN de ¹H da (S)-1-((benzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (**136**) (CDCl₃/200 MHz).



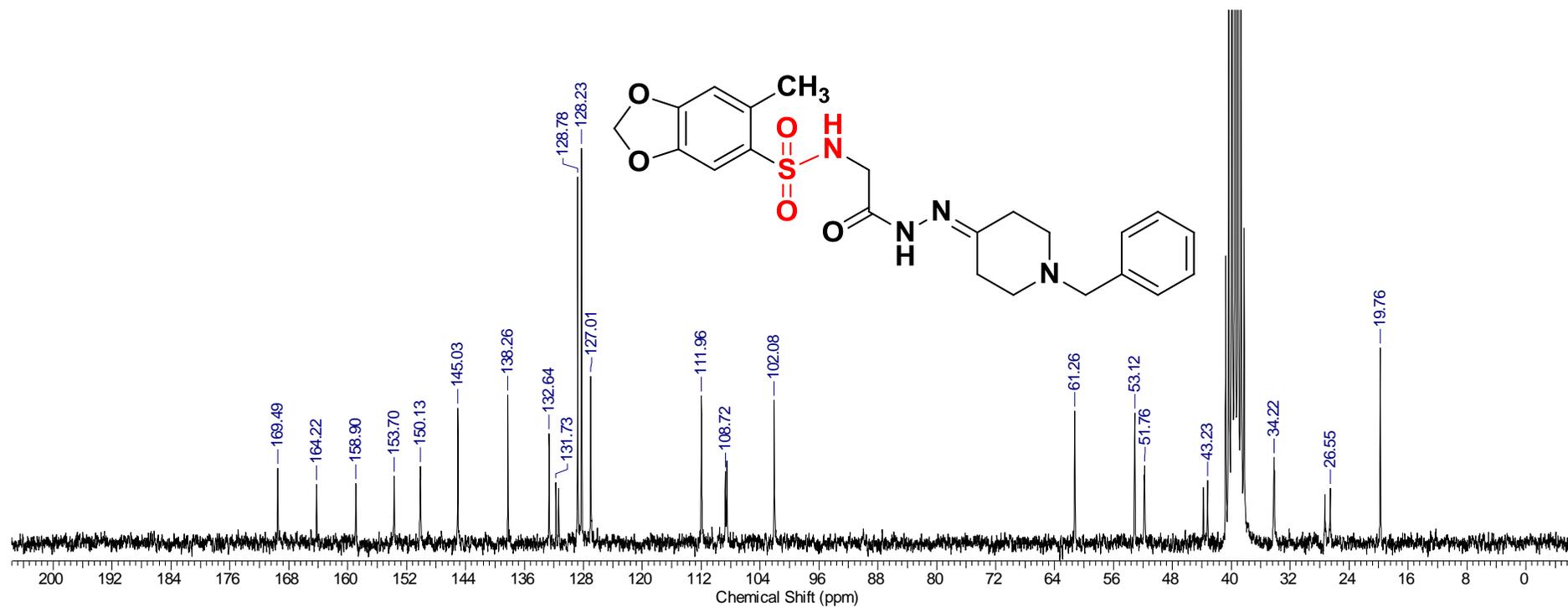
E39. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da (S)-1-((benzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (**136**) (CDCl₃/200 MHz).



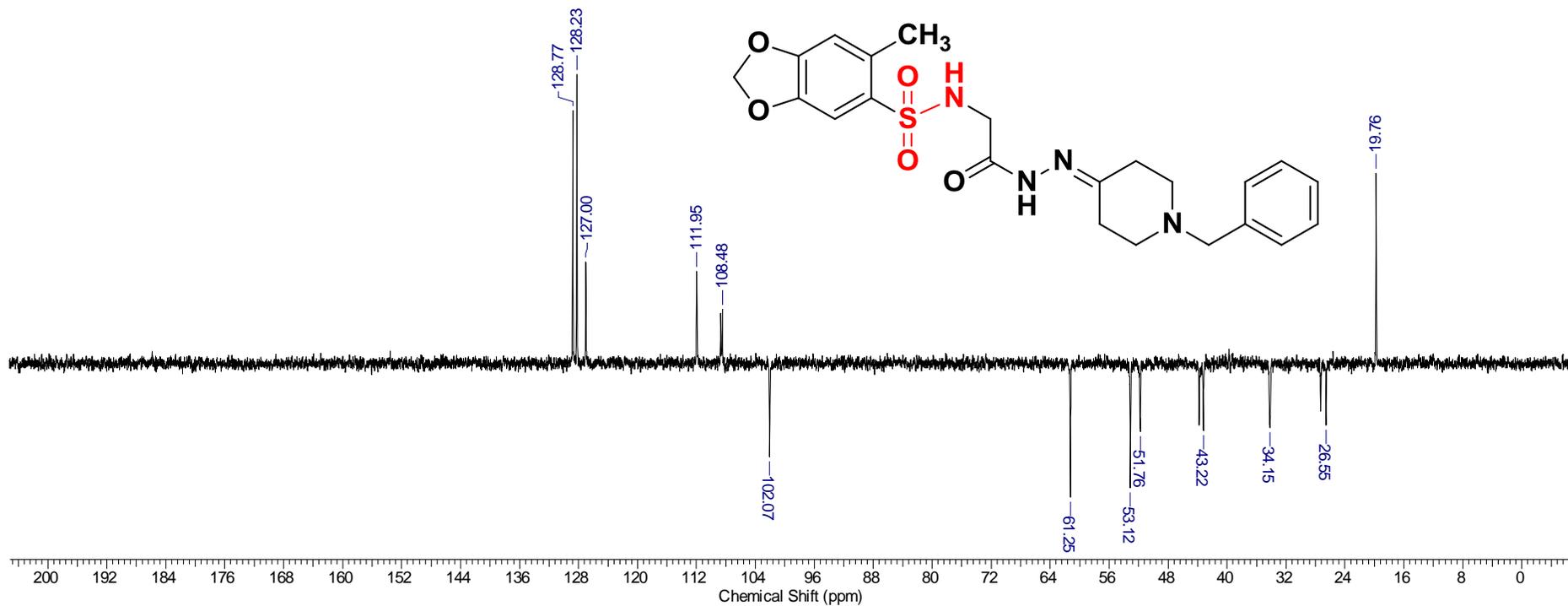
E40. Espectro de RMN de ¹³C da (S)-1-((benzo[d][1,3]dioxol-5-il)sulfonyl)pirrolidina-2-acetil hidrazida (136) (CDCl₃/50 MHz).



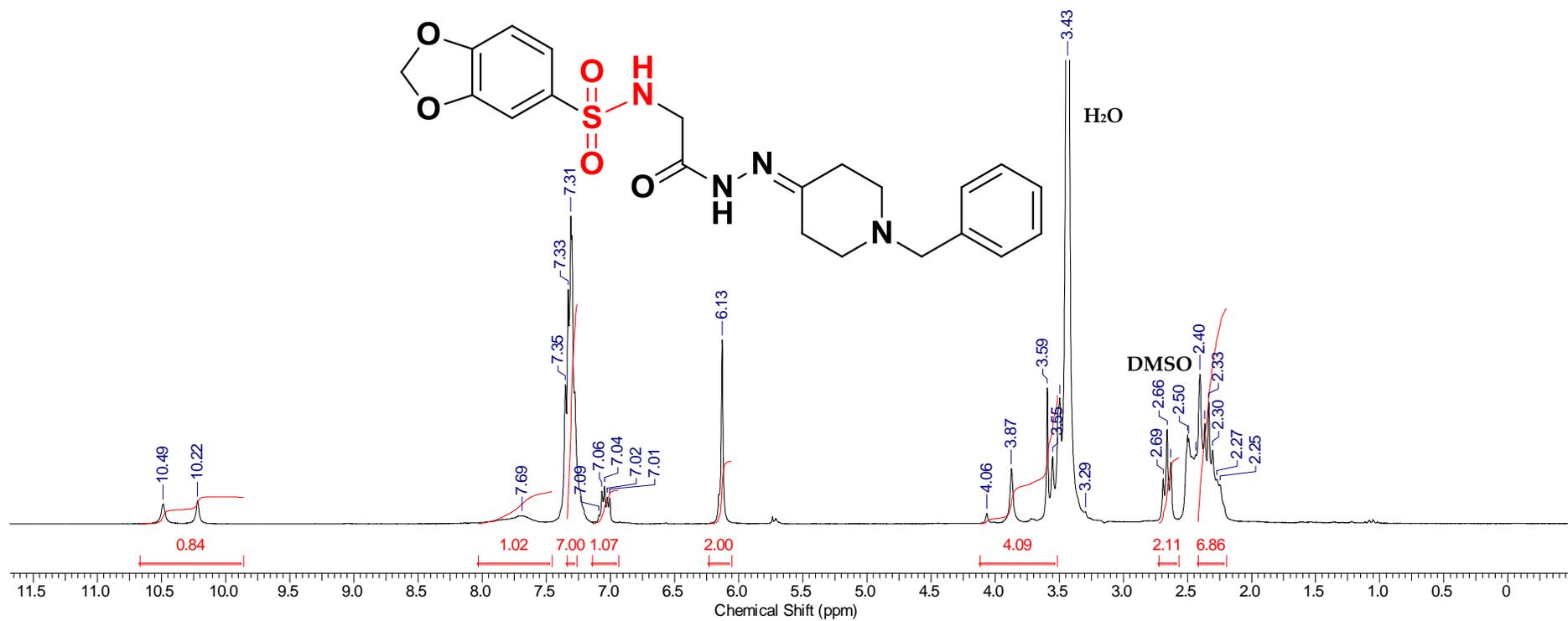
E41. Espectro de RMN de ^1H da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1843 (90)** (DMSO- d_6 /200 MHz).



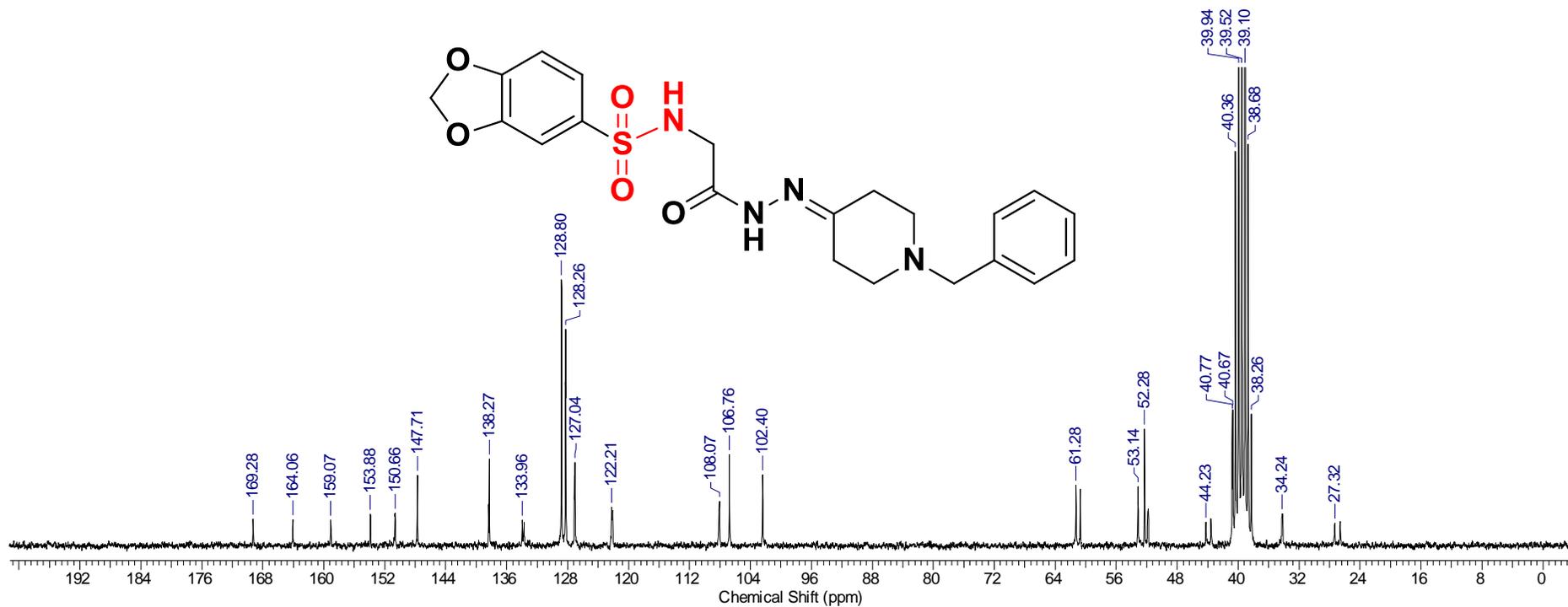
E42. Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1843 (90)** (DMSO-*d*₆/50 MHz).



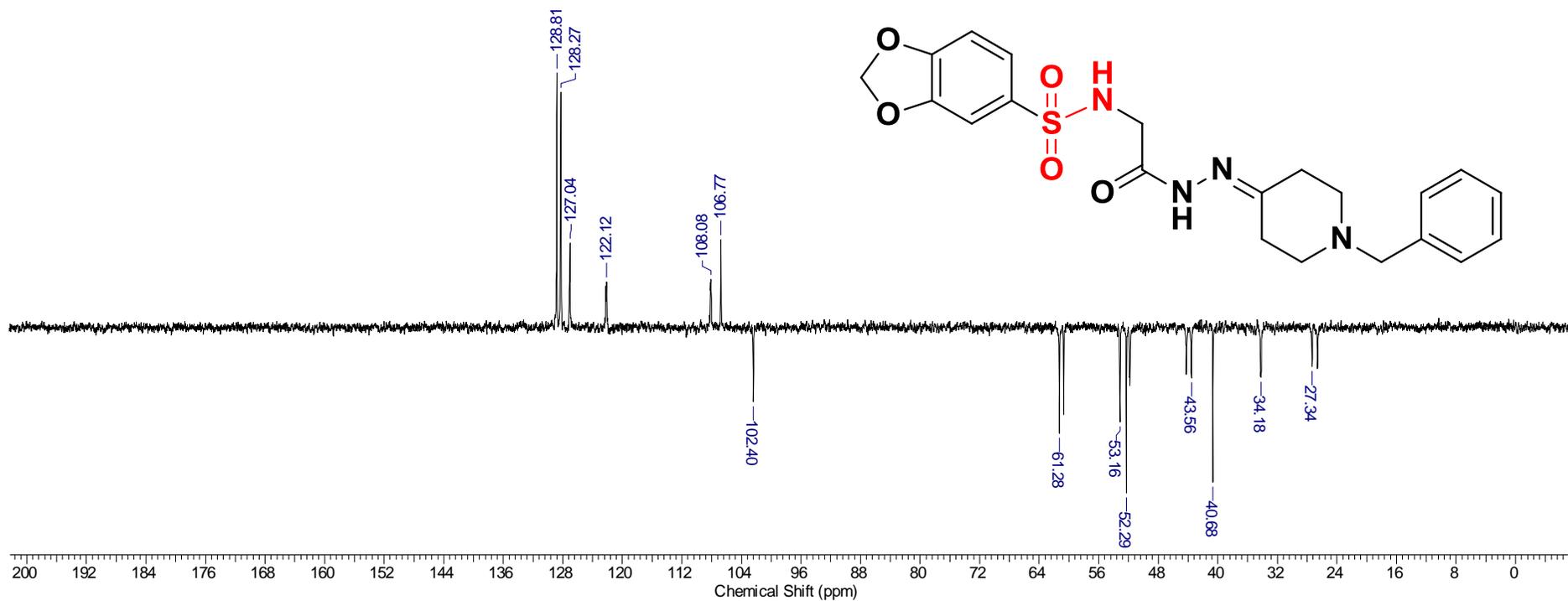
E43. Espectro de RMN de DEPT-135 da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1843 (90)** (DMSO-*d*₆/50 MHz).



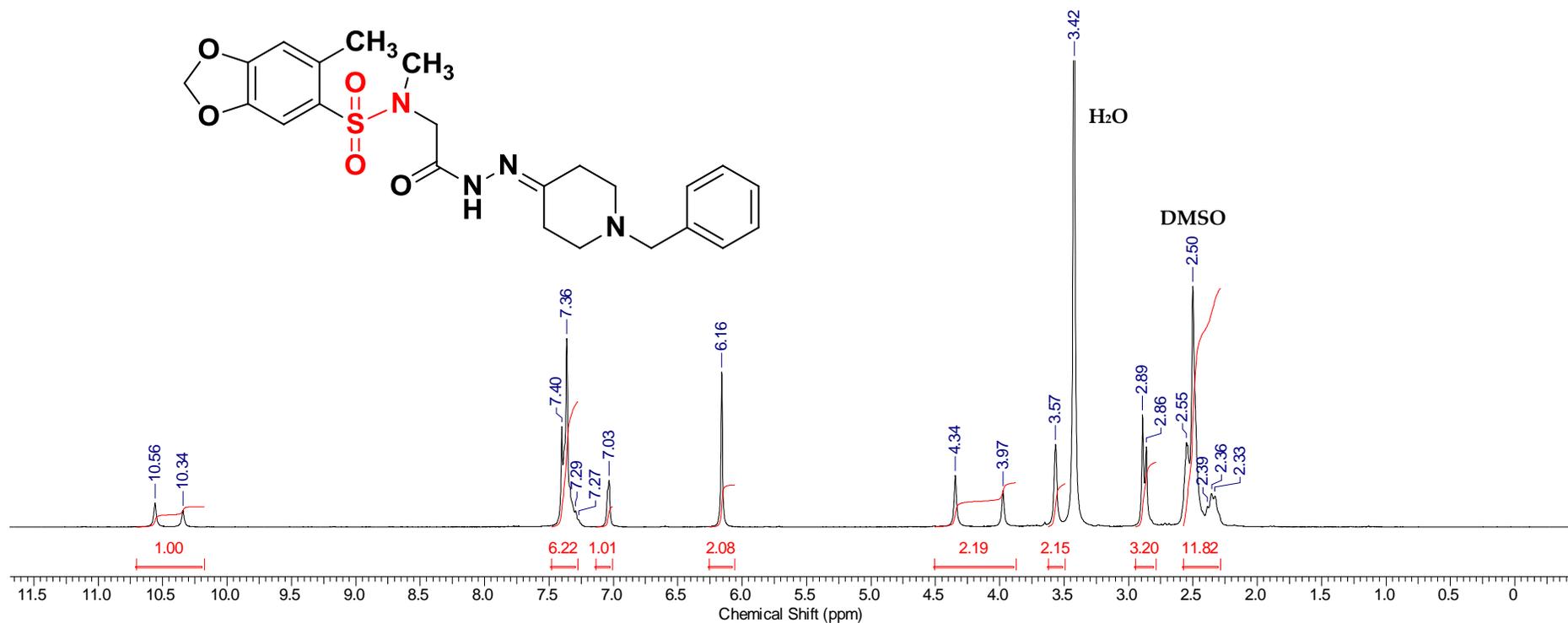
E44. Espectro de RMN de ¹H da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)benzo[*d*][1,3[dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1831 (89) (DMSO-*d*₆/200 MHz).



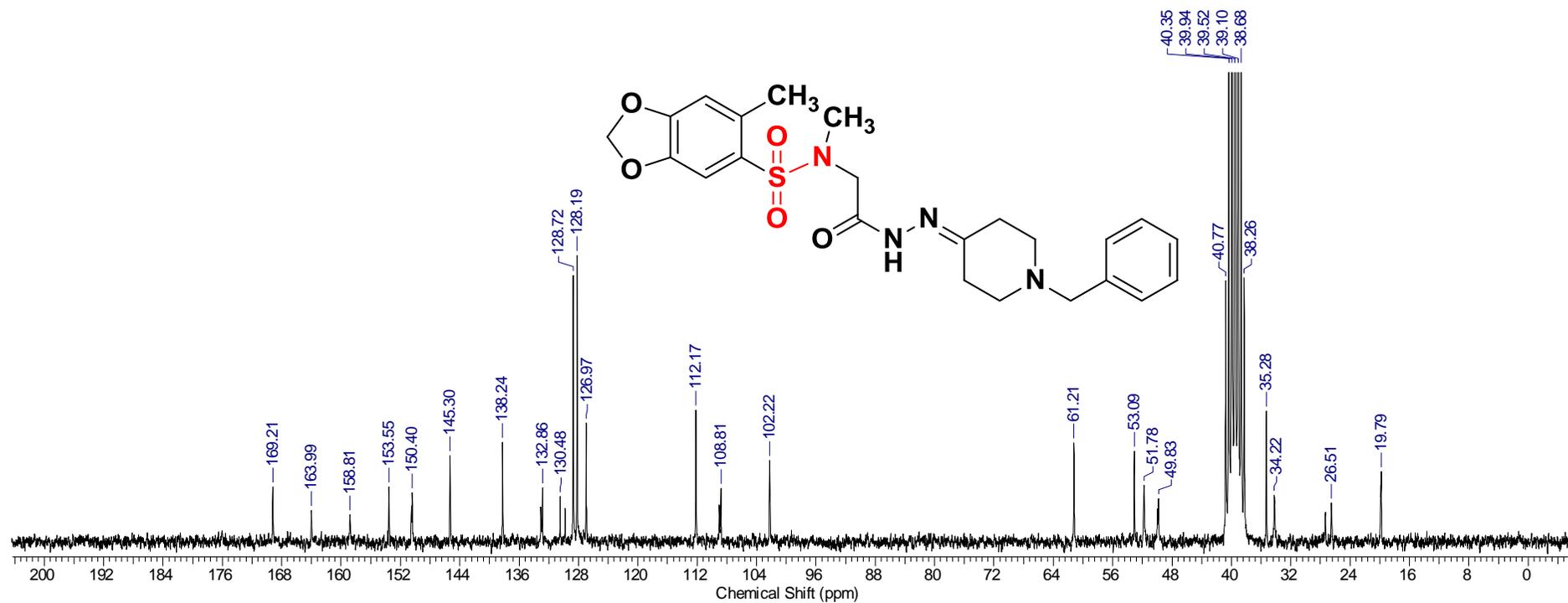
E45. Espectro de RMN de ¹³C da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1831 (89) (DMSO-d₆/50 MHz).



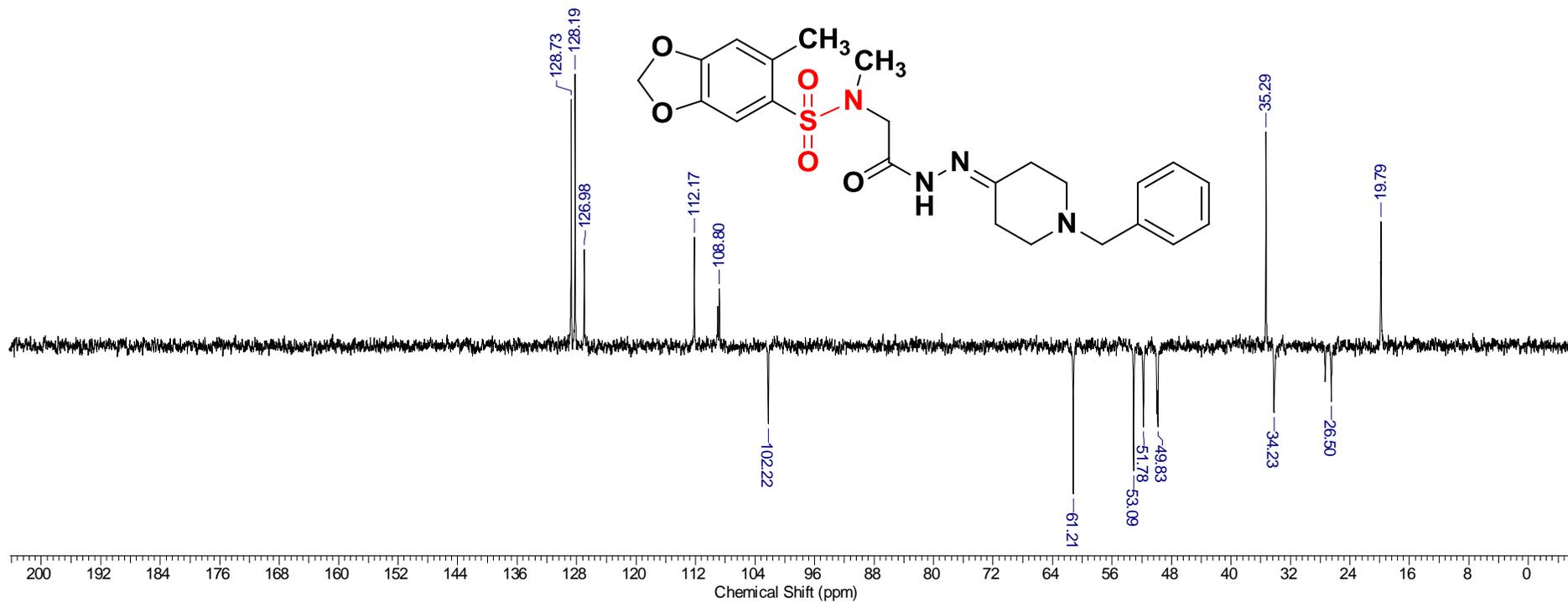
E46. Espectro de RMN de DEPT-135 da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)benzo[*d*][1,3[dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1831 (89)** (DMSO-*d*₆/50 MHz).



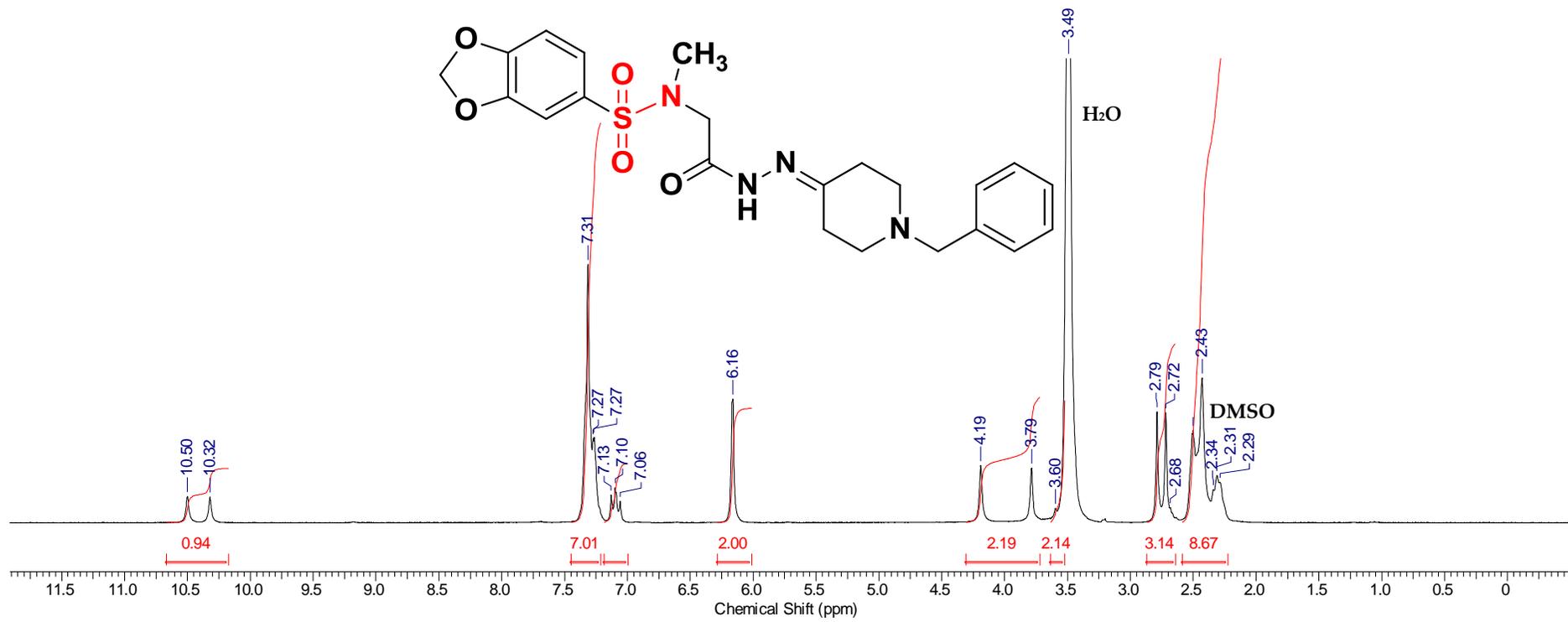
E47. Espectro de RMN de ^1H da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3[dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1642 (92)** (DMSO- d_6 /200 MHz).



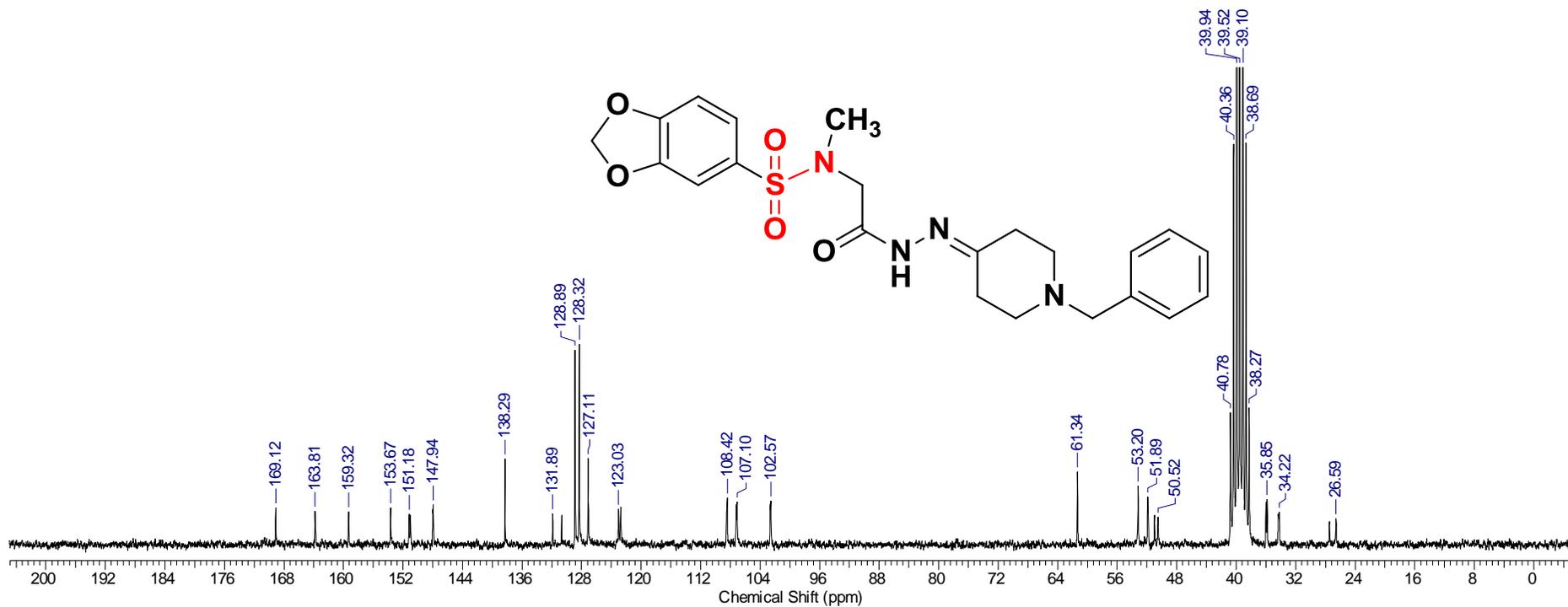
E48. Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida LASSBio-1642 (92) (DMSO- d_6 /50 MHz).



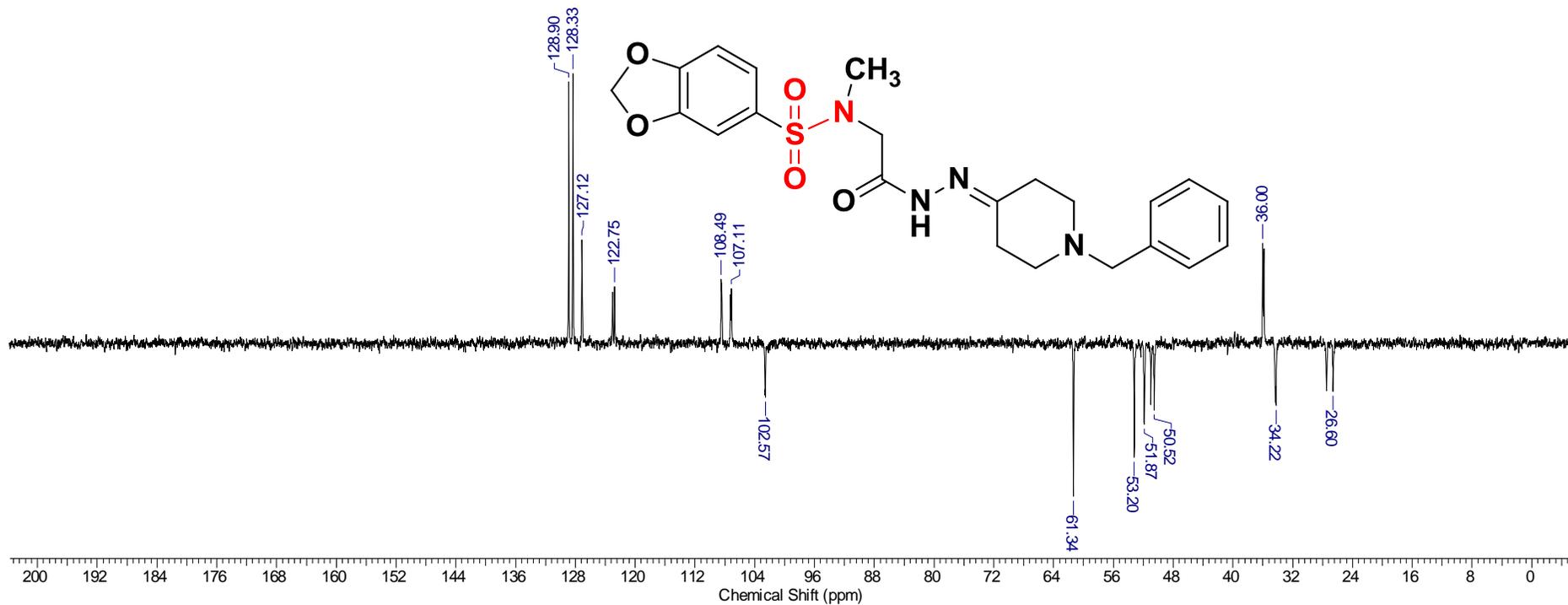
E49. Espectro de RMN de DEPT-135 da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*,6-dimetilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1642 (92)** (DMSO-*d*₆/50 MHz).



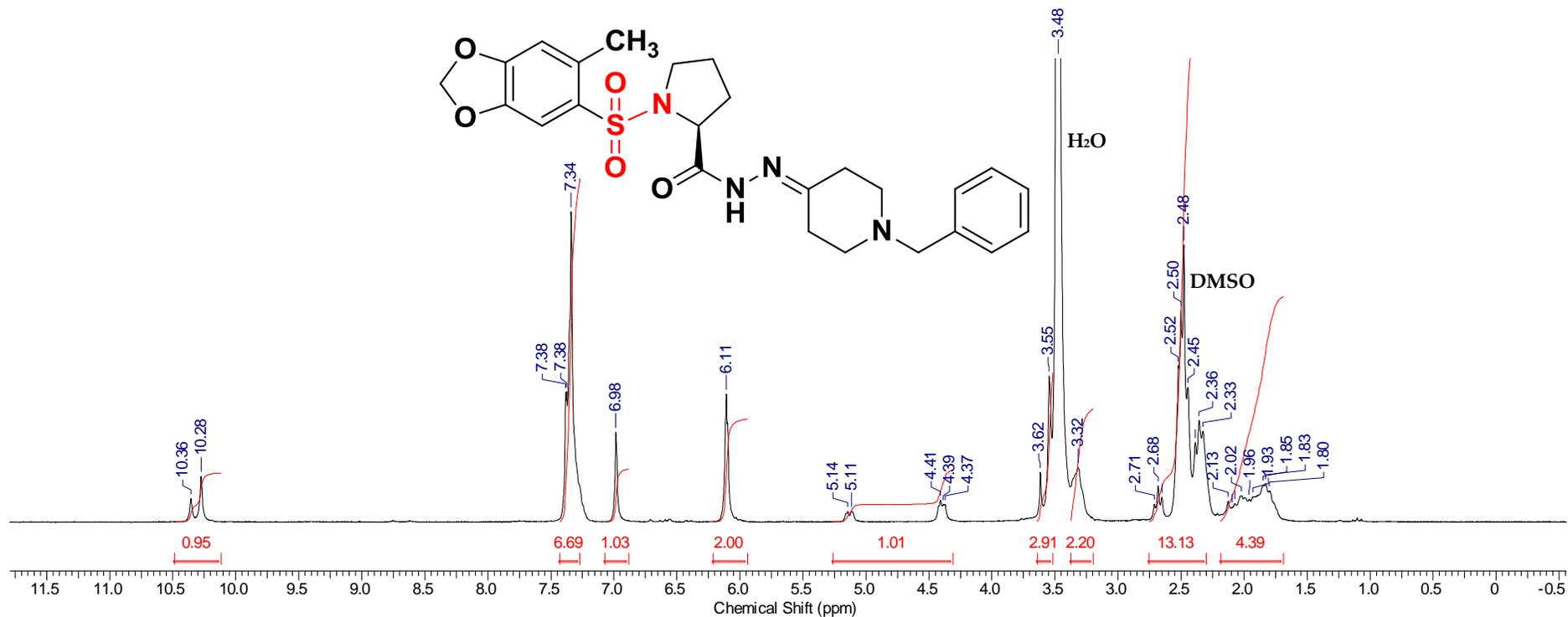
E50. Espectro de RMN de ¹H da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1765 (91)** (DMSO-*d*₆/200 MHz).



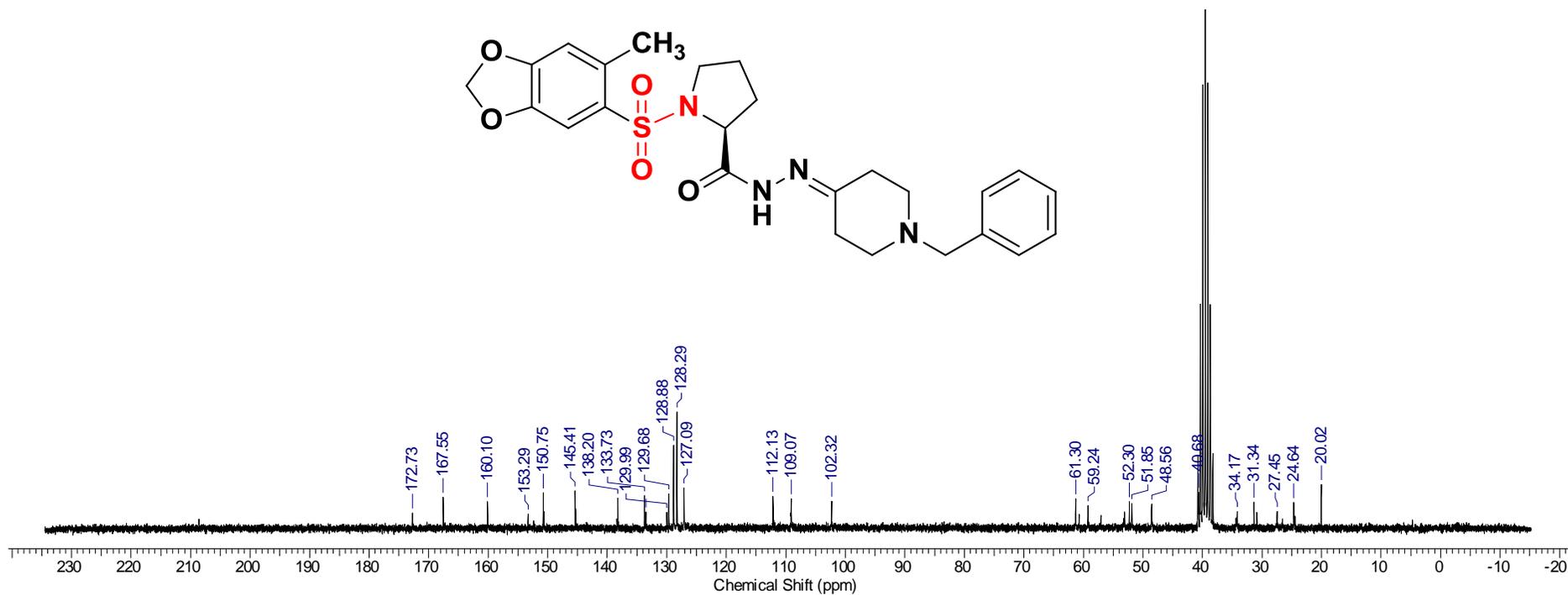
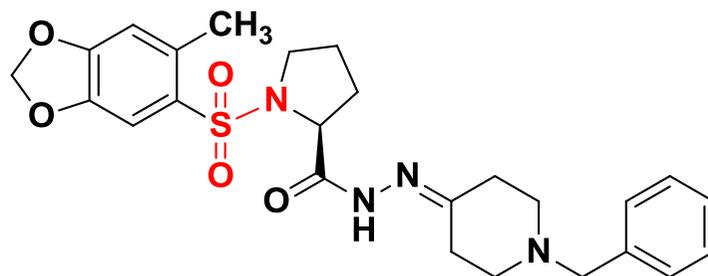
E51. Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1765 (91)** (DMSO- d_6 /50 MHz).



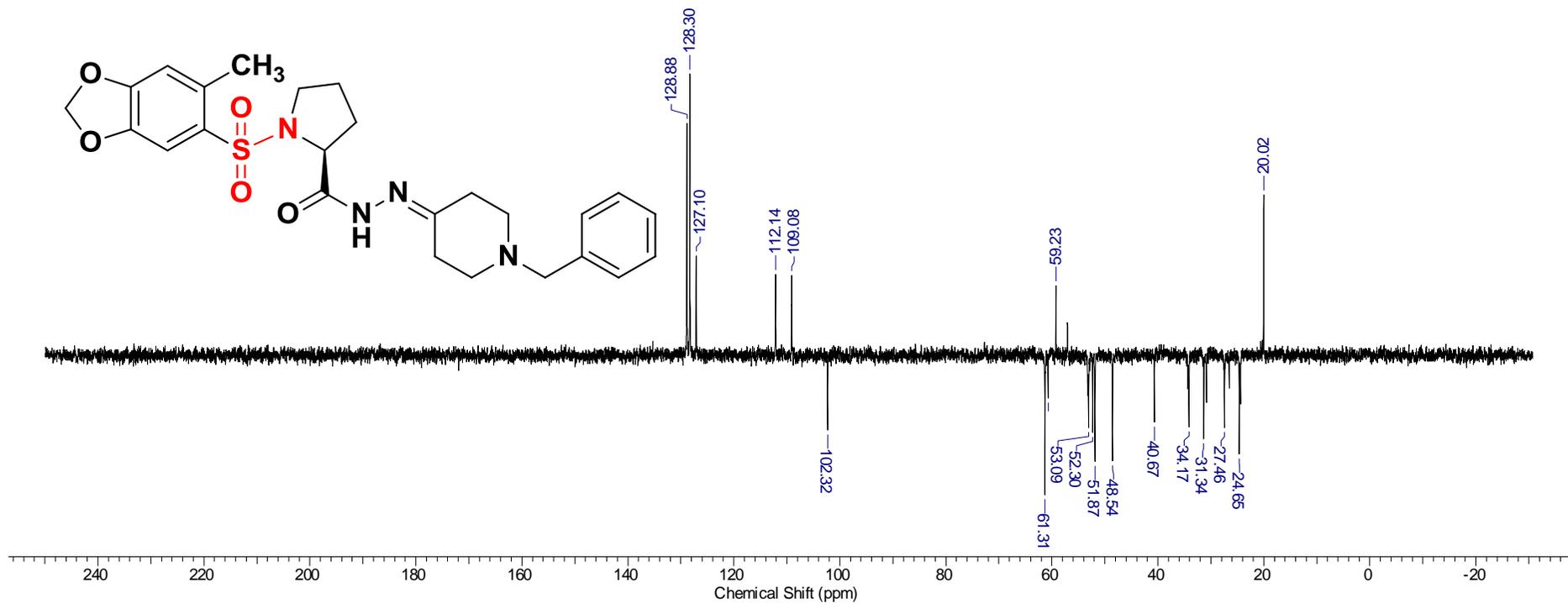
E52. Espectro de RMN de DEPT-135 da *N*-(2-(2-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)hidrazinil)-2-oxoetil)-*N*-metilbenzo[*d*][1,3]dioxola-5-sulfonamida **LASSBio-1765 (91)** (DMSO-*d*₆/50 MHz).



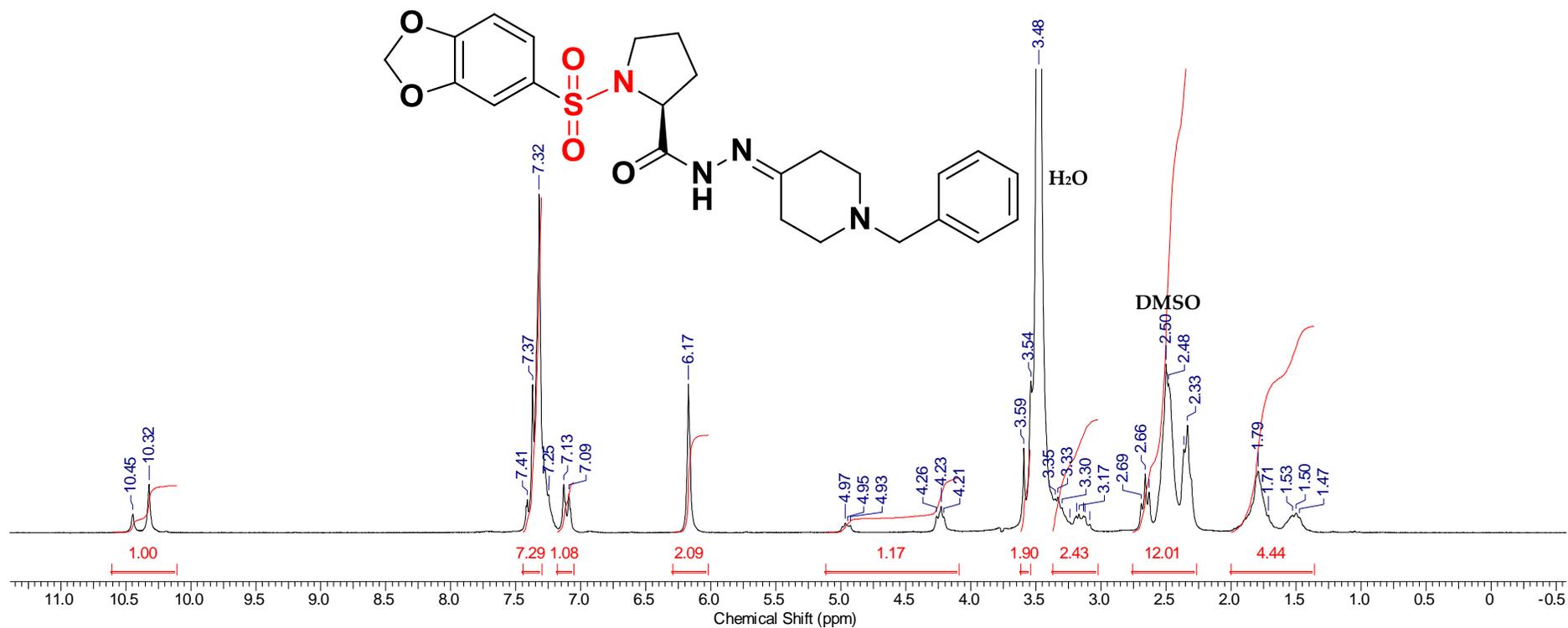
E53. Espectro de RMN de ¹H da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-((6-metilbenzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil)-pirrolidino-2-carboidrazida **LASSBio-1641 (82)** (DMSO-d₆/200 MHz).



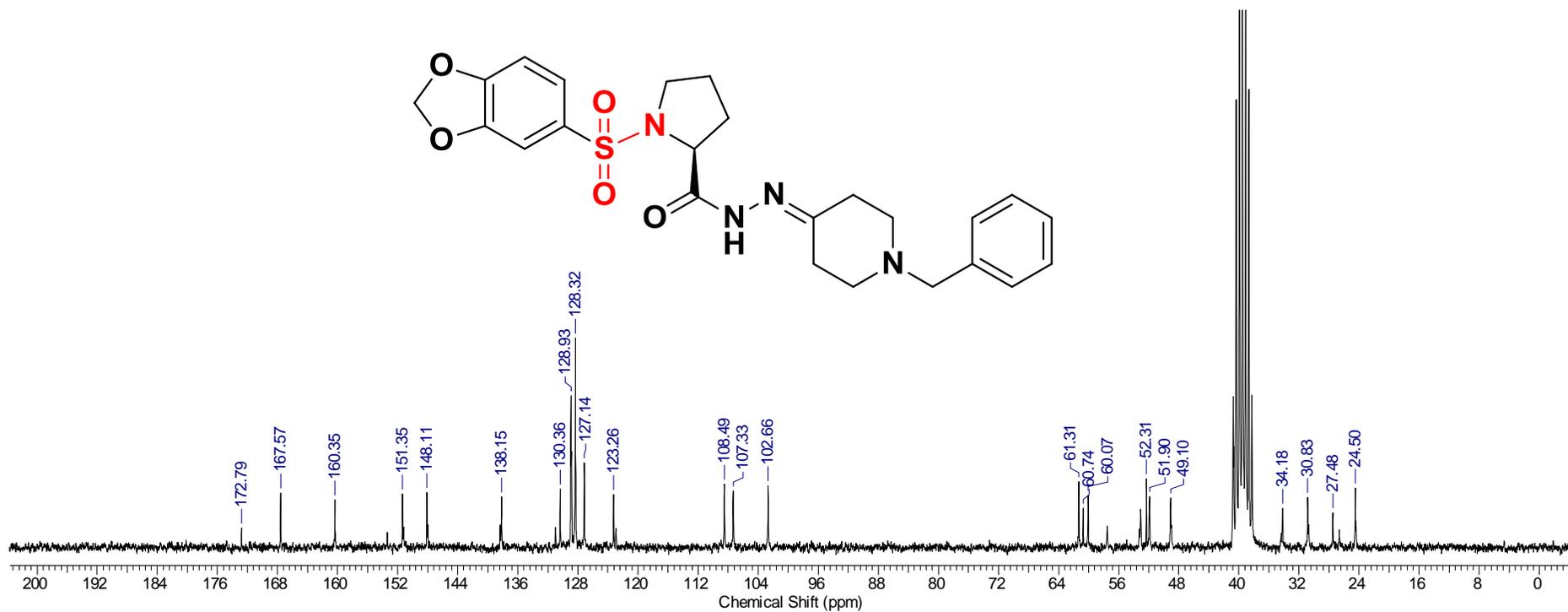
E54. Espectro de RMN de ^{13}C da (*S*)-*N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-((6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilsulfonyl)-pirrolidino-2-carboidrazida **LASSBio-1641 (82)** (DMSO- d_6 /50 MHz).



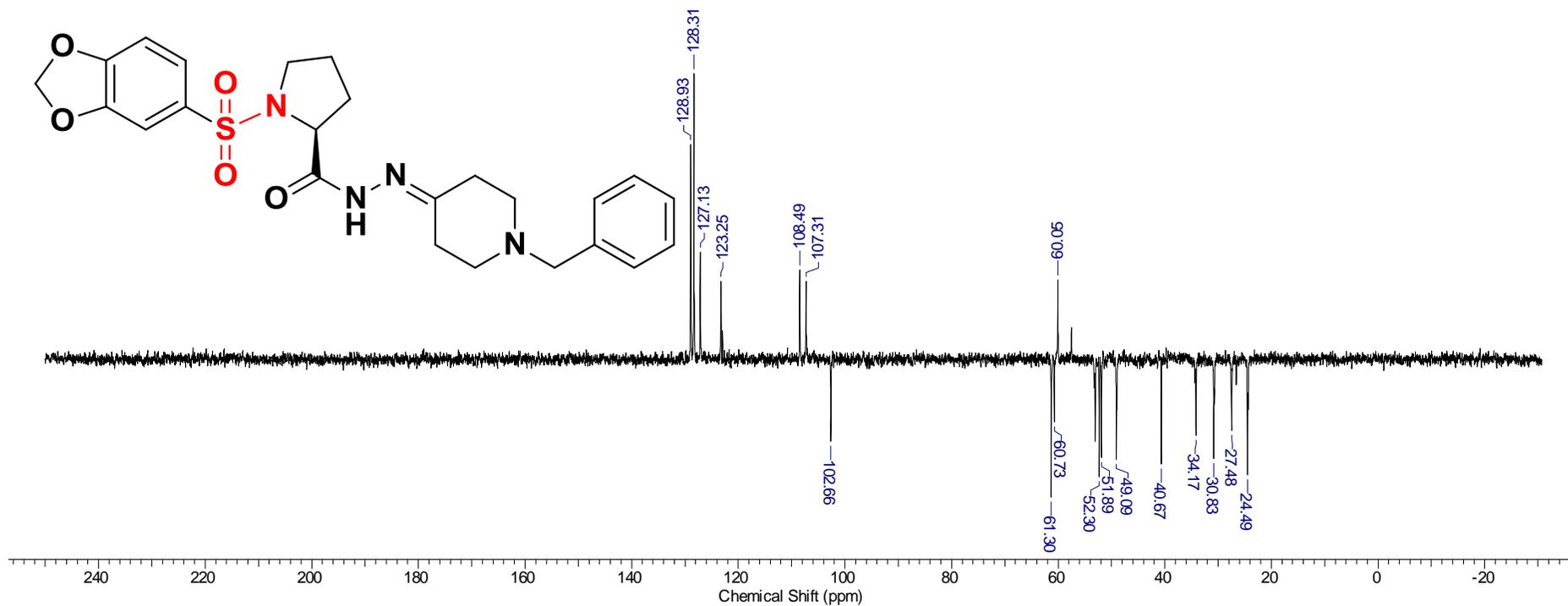
E55. Espectro de RMN de DEPT-135 da (*S*)-*N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-((6-metilbenzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilsulfonil)-pirrolidino-2-carboidrazida LASSBio-1641 (**82**) (DMSO-*d*₆/50 MHz).



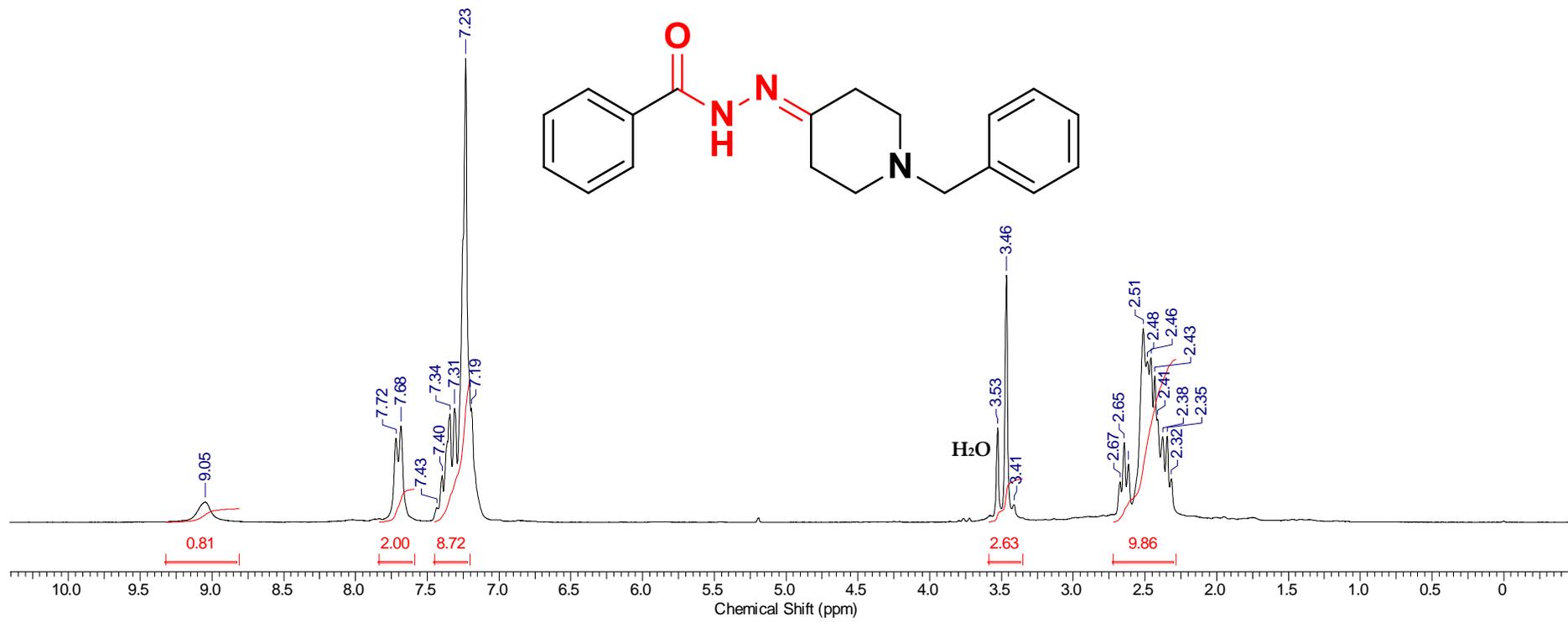
E56. Espectro de RMN de ¹H da (S)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)pirrolidino-2-carboidrazida LASSBio-1830 (81) (DMSO-d₆/200 MHz).



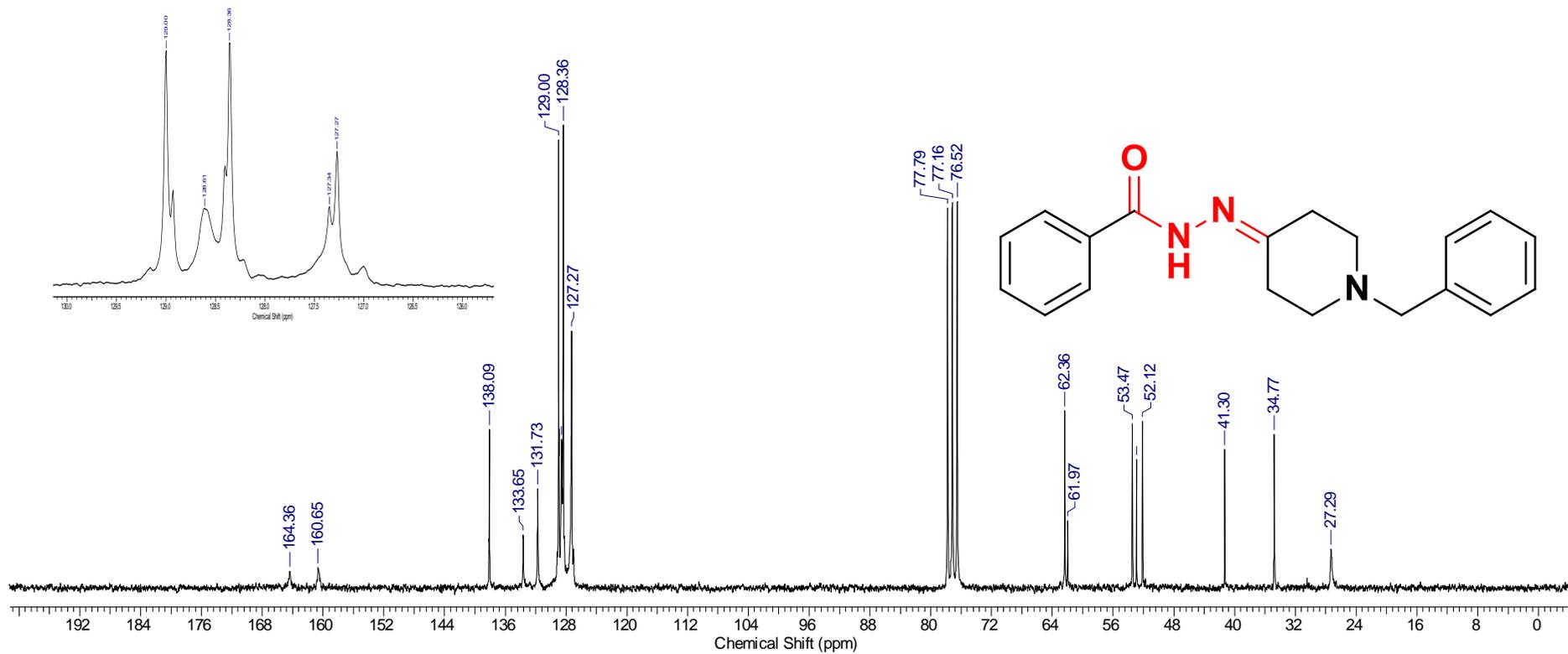
E57. Espectro de RMN de ¹³C da (S)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-ilsulfonil-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)pirrolidino-2-carboidrazida LASSBio-1830 (81) (DMSO-d₆/50 MHz).



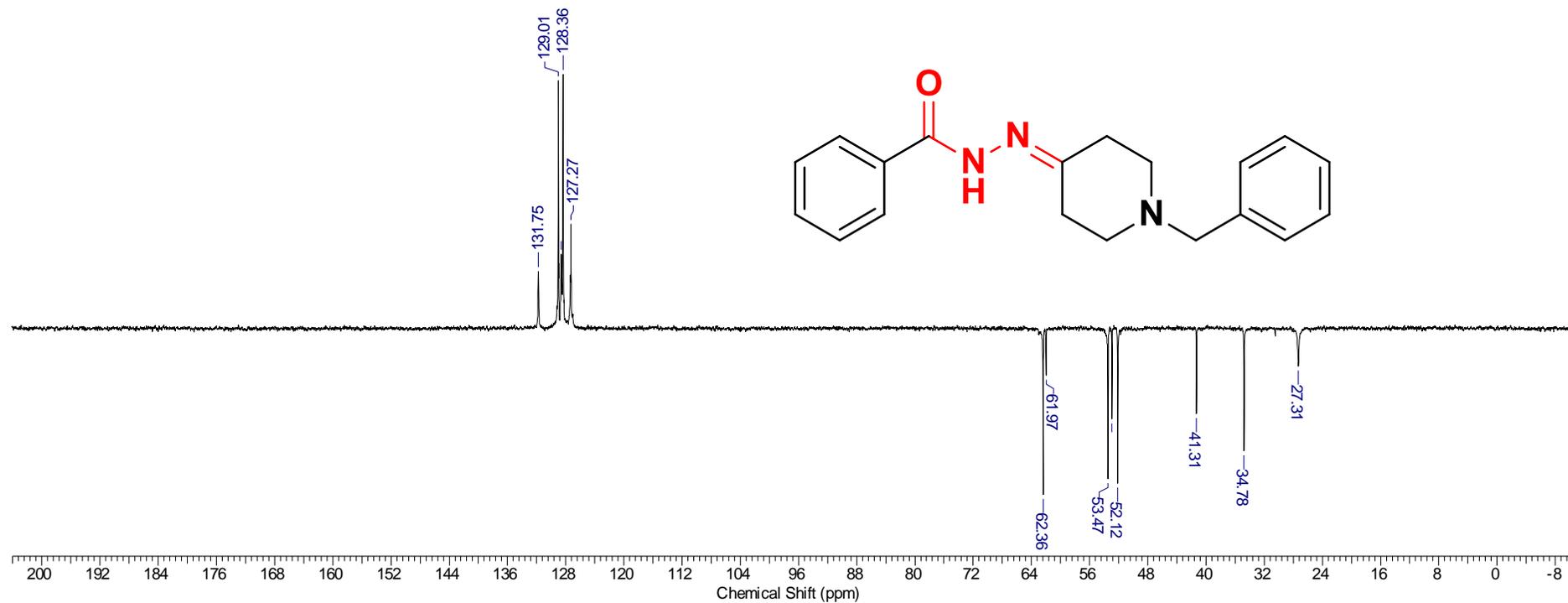
E58. Espectro de RMN de DEPT-135 da *(S)*-1-benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilsulfonil-*N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)pirrolidino-2-carboidrazida **LASSBio-1830 (81)** (DMSO-d₆/50 MHz).



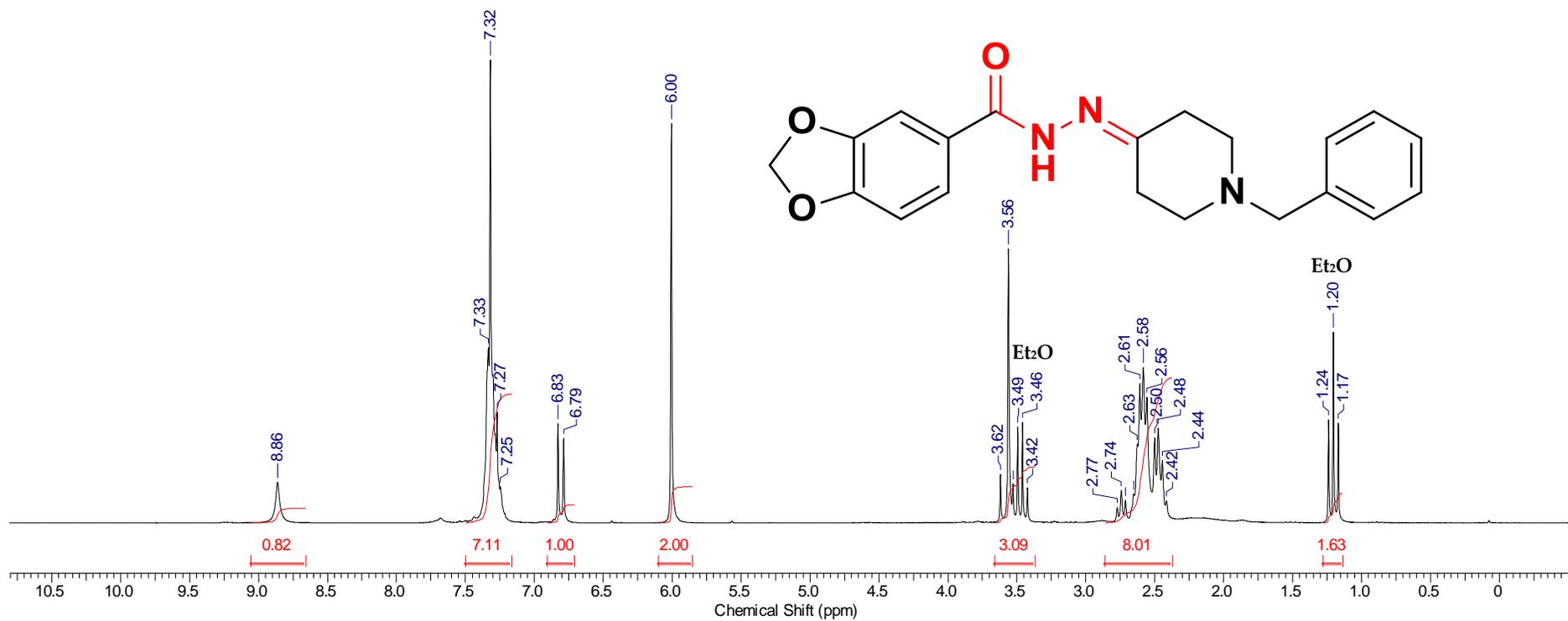
E59. Espectro de RMN de ¹H da *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzoidrazida **LASSBio-1842 (143)** (CDCl₃/200 MHz).



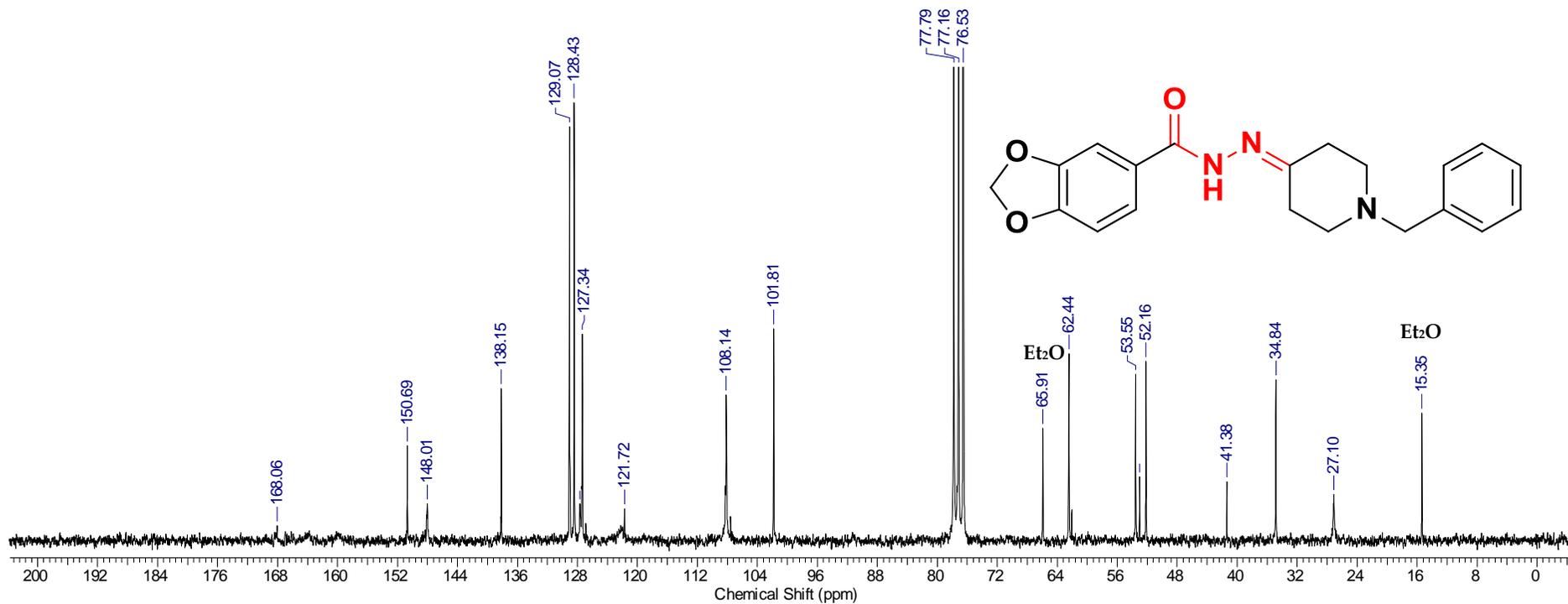
E60. Espectro de RMN de ¹³C da *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzoidrazida LASSBio-1842 (143) (CDCl₃/50 MHz).



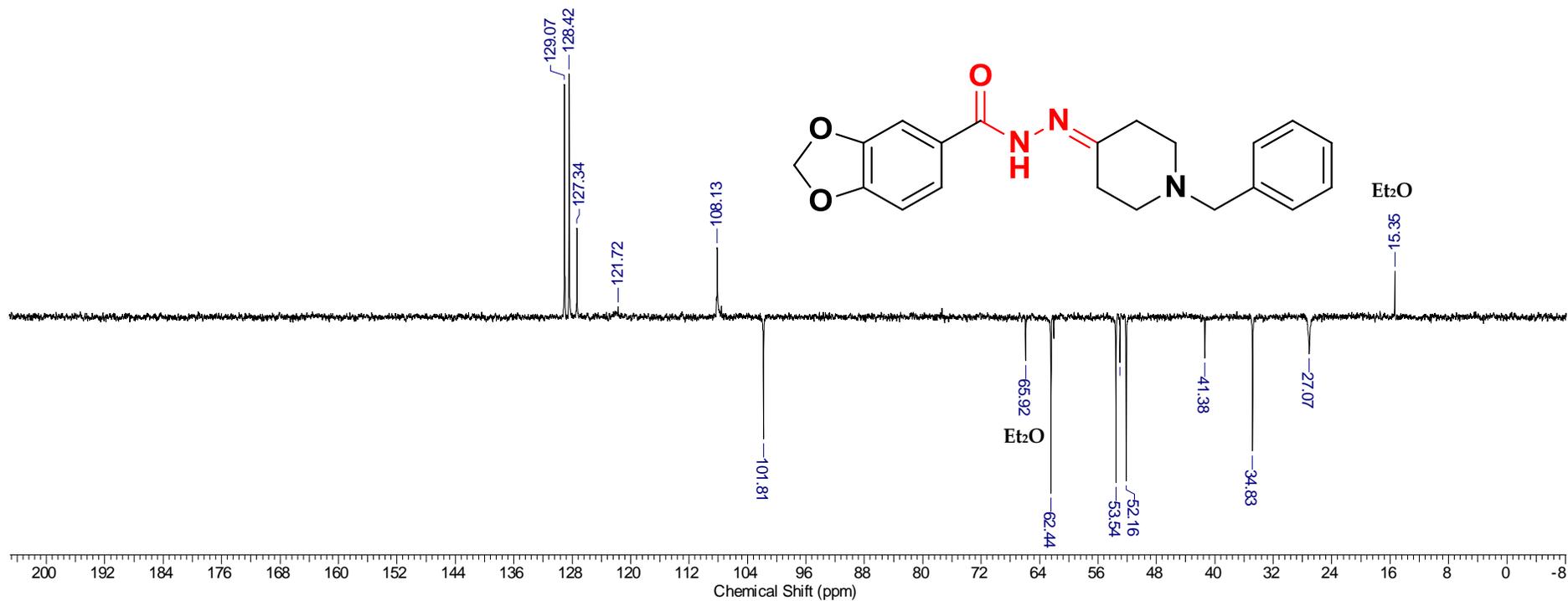
E61. Espectro de RMN de DEPT-135 da *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzoidrazida **LASSBio-1842 (143)** (CDCl₃/50 MHz).



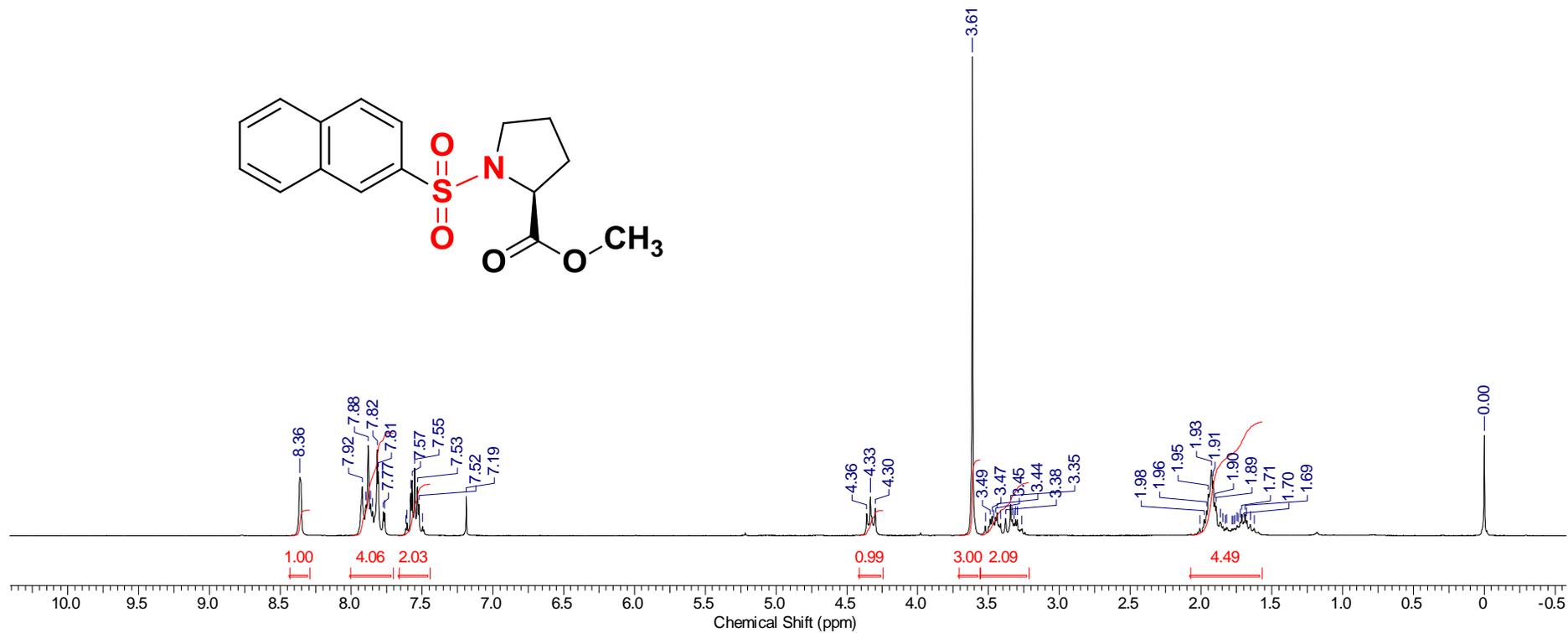
E62. Espectro de RMN de ¹H da *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carboidrazida (SM) (144) (CDCl₃/200 MHz).



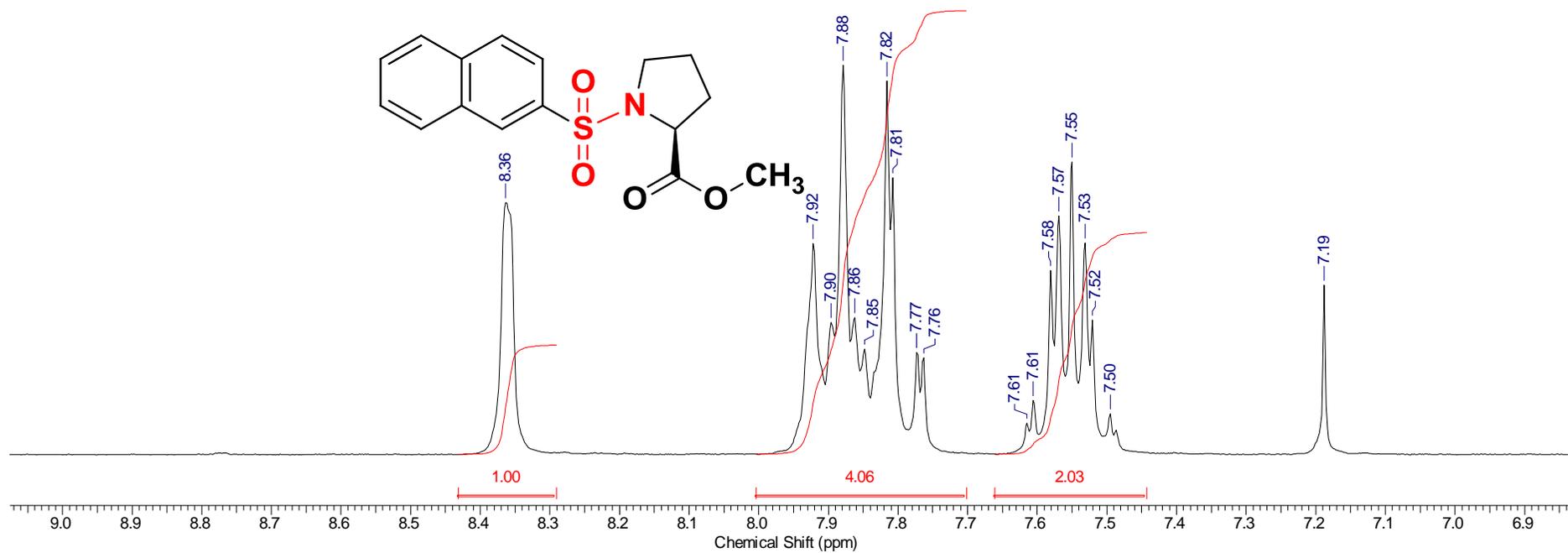
E63. Espectro de RMN de ^{13}C da *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carboidrazida (SM) (144) (CDCl₃/50 MHz).



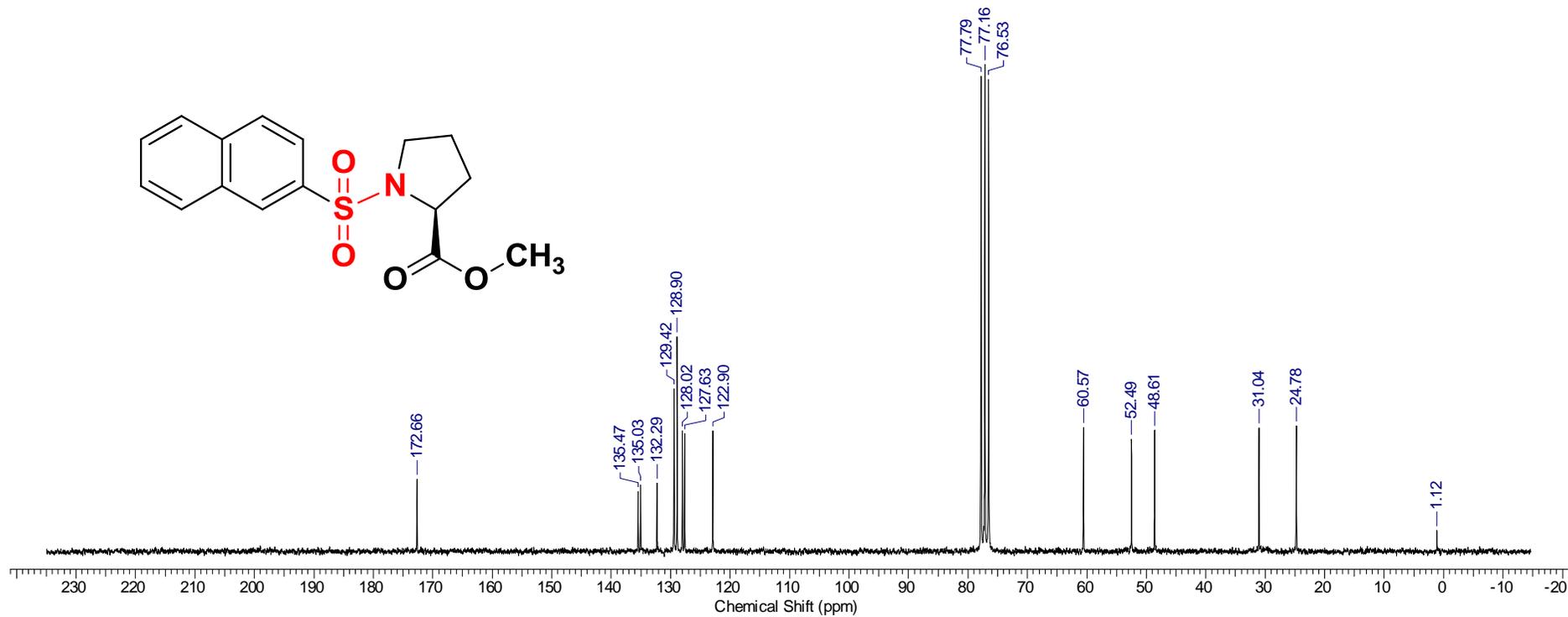
E64. Espectro de RMN de DEPT-135 da *N'*-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)benzo[*d*][1,3]dioxola-5-carboidrazida (SM) (144) (CDCl₃/50 MHz).



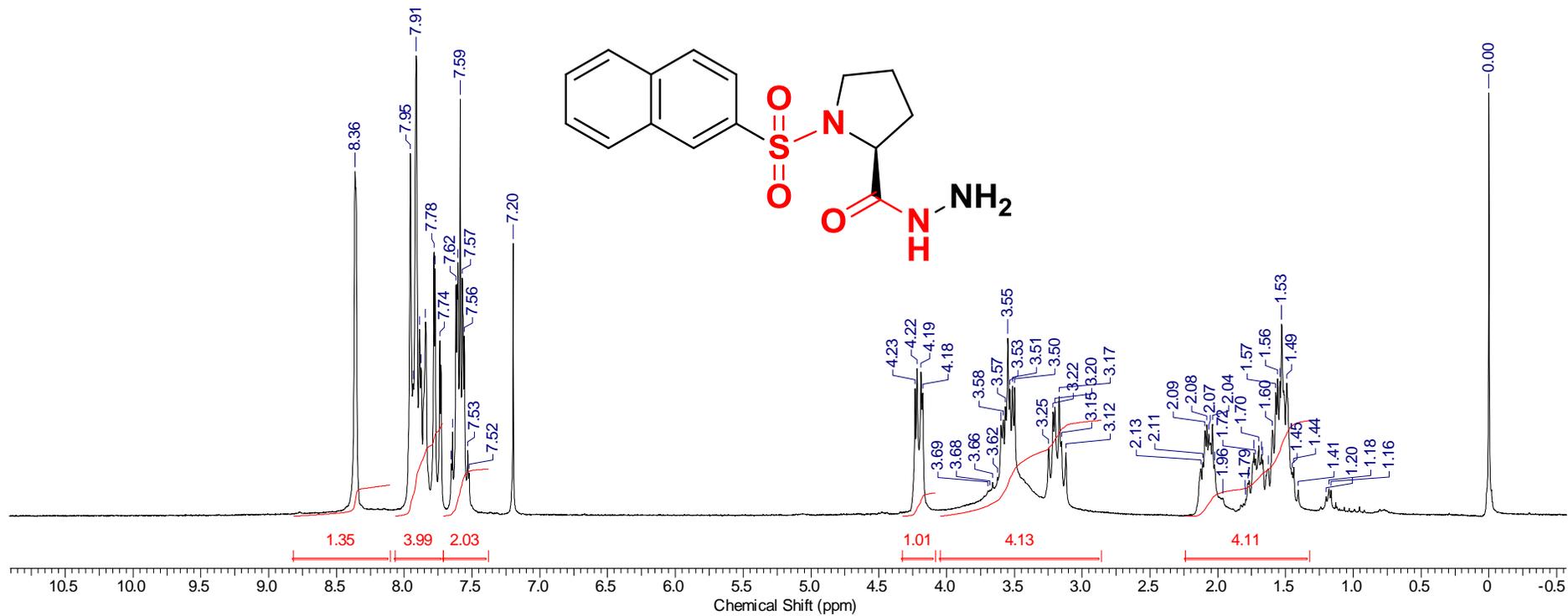
E65. Espectro de RMN de ¹H do (S)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila (CDCl₃/200 MHz).



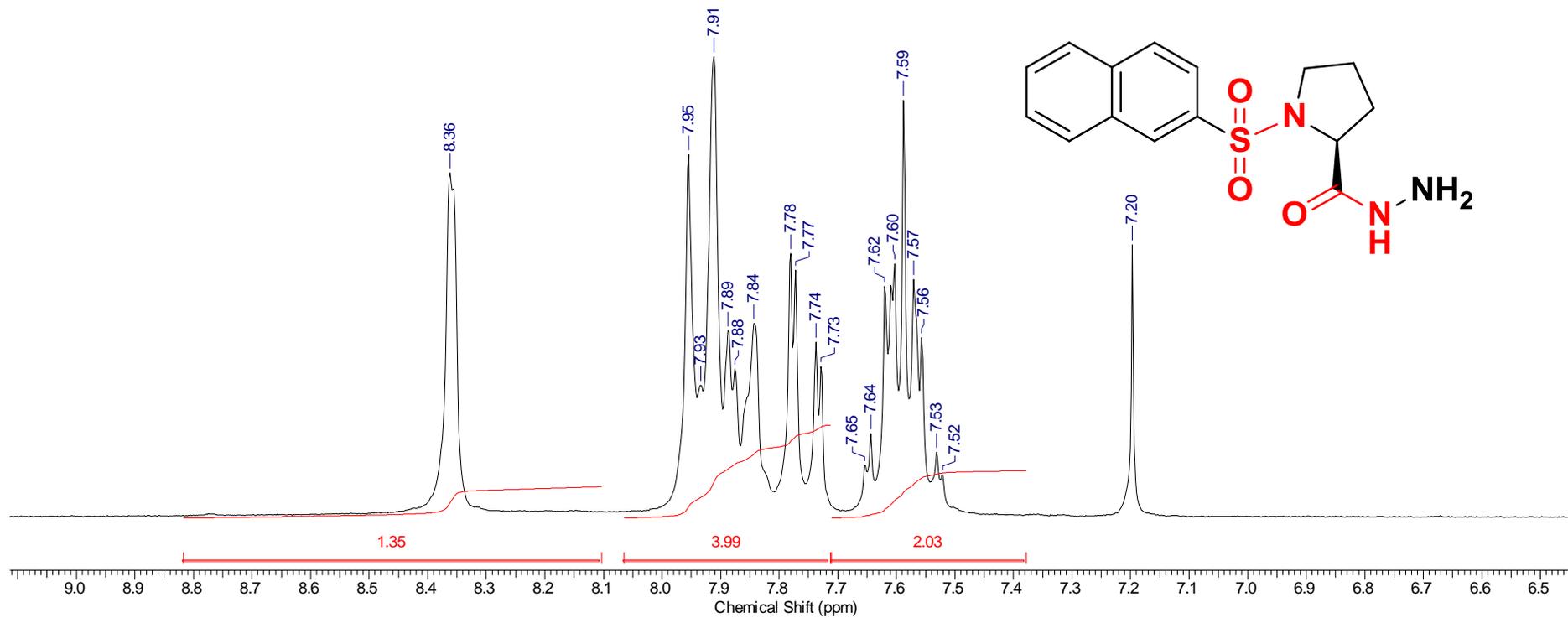
E66. Ampliação do espectro de RMN de ¹H do (S)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila (CDCl₃/200 MHz).



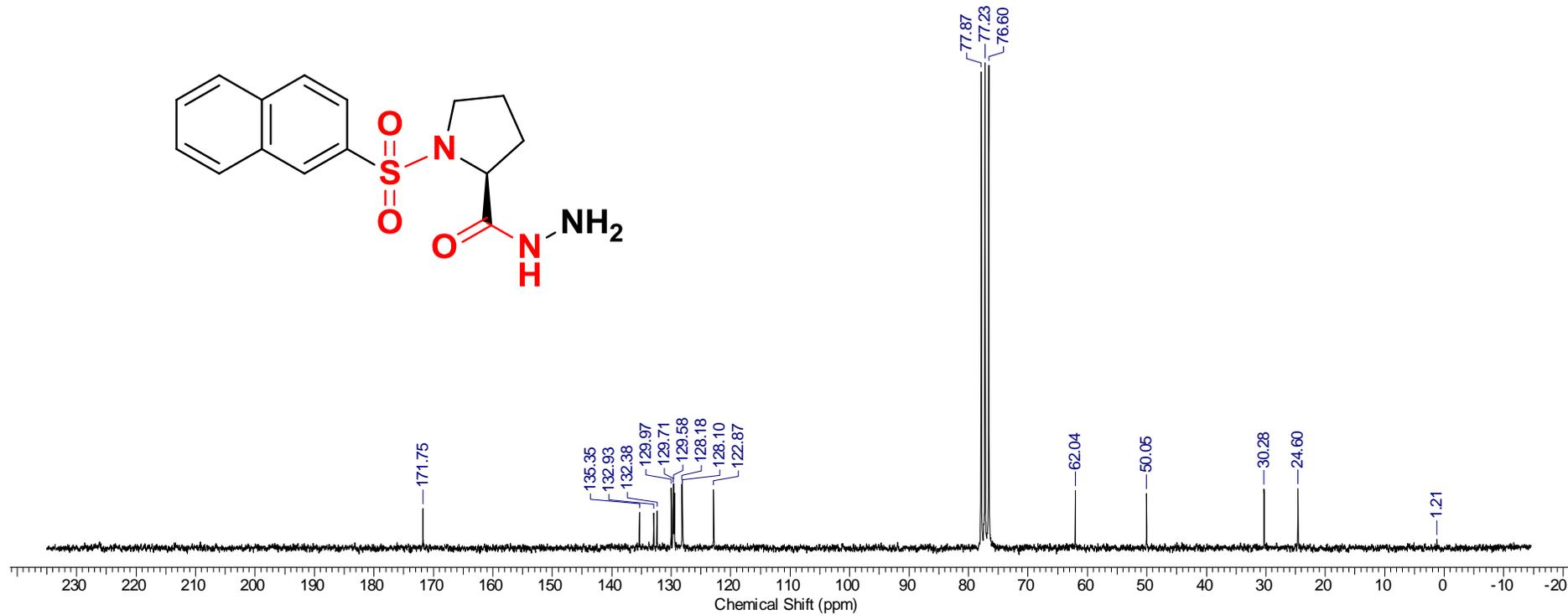
E67. Espectro de RMN de ^{13}C do (S)-1-naftalen-2-ilsulfonil-pirrolidina-2-carboxilato de metila ($\text{CDCl}_3/50\text{ MHz}$).



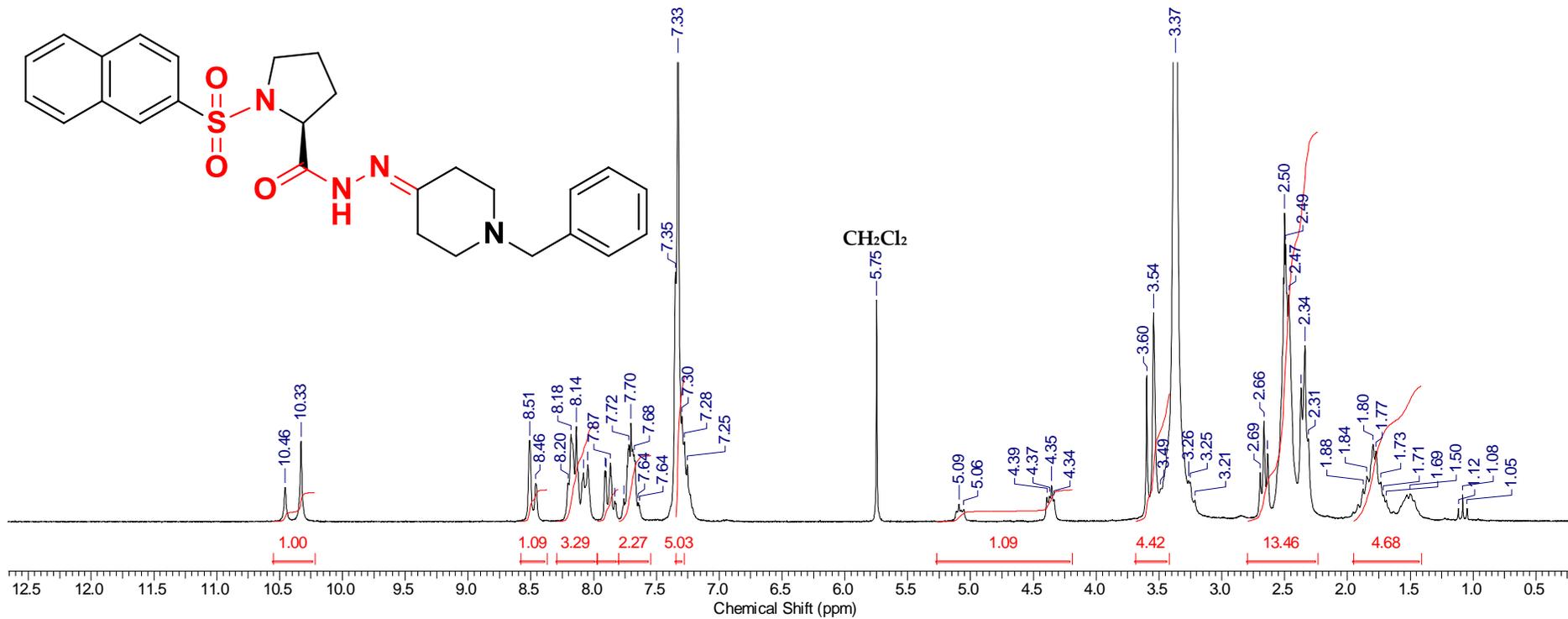
E68. Espectro de RMN de ¹H da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida (CDCl₃/200 MHz).



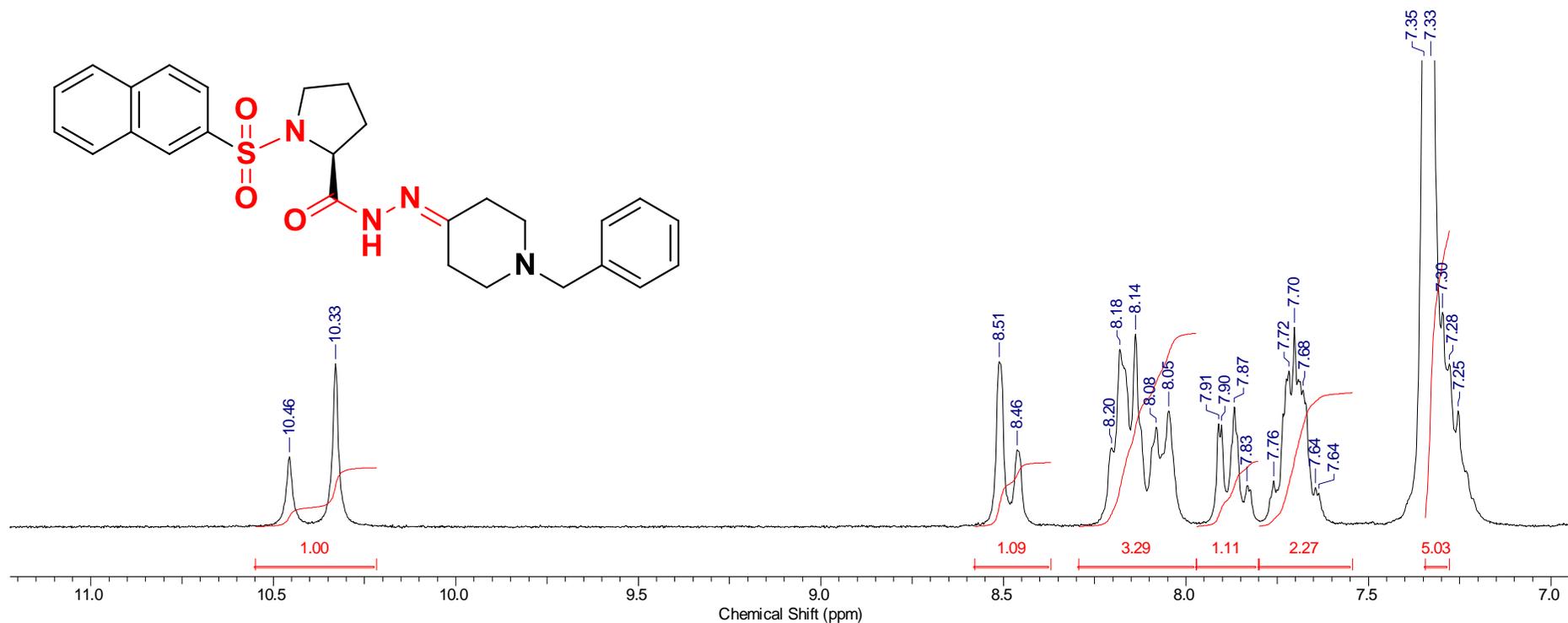
E69. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida ($\text{CDCl}_3/200$ MHz).



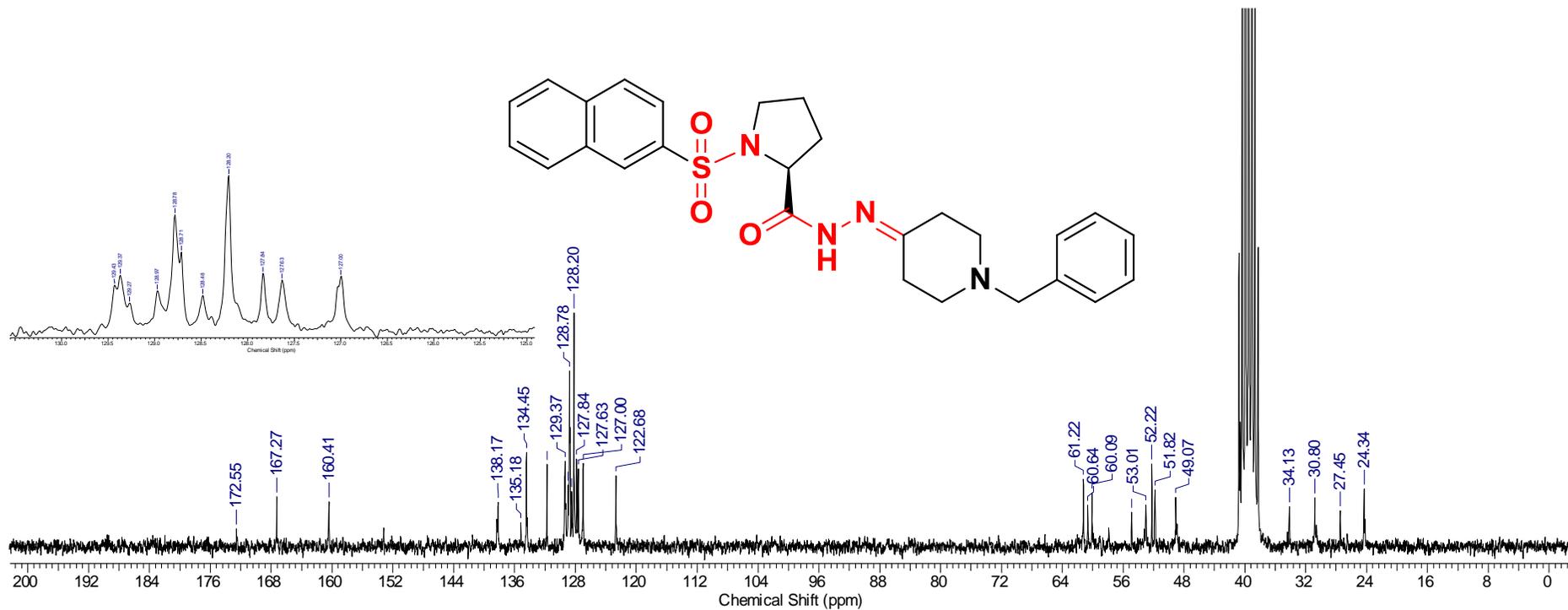
E70. Espectro de RMN de ¹³C da (S)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida (CDCl₃/50 MHz).



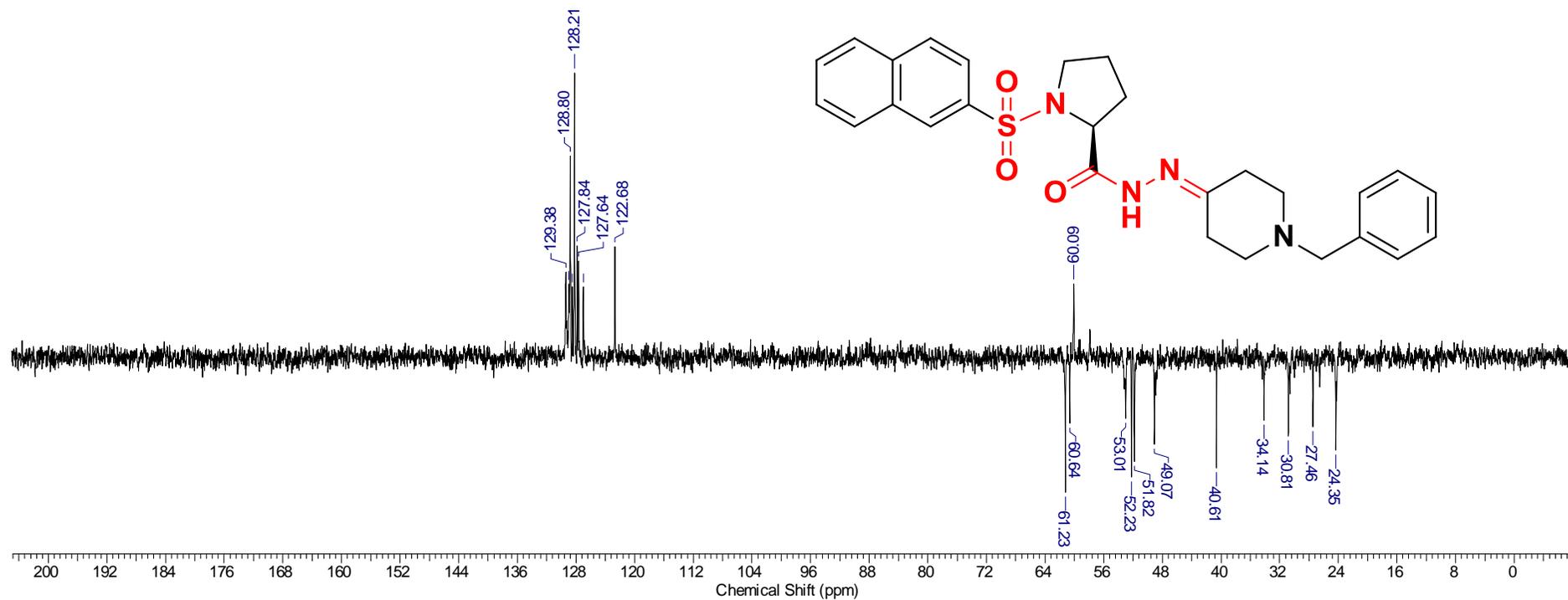
E71. Espectro de RMN de ¹H da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida **LASSBio-1844 (146)** (DMSO-d₆/200 MHz).



E72. Ampliação do espectro de RMN de ¹H da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida **LASSBio-1844 (146)** (CDCl₃/200 MHz).



E73. Espectro de RMN de ¹³C da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-(naftalen-2-ilsulfonyl)pirrolidina-2-carboidrazida LASSBio-1844 (146) (DMSO-d₆/50 MHz).



E74. Espectro de RMN de DEPT-135 da (S)-N'-(1-benzilpiperidin-4-ilideno)-1-(naftalen-2-ilsulfonil)pirrolidina-2-carboidrazida LASSBio-1844 (146) (DMSO-d₆/50 MHz).