

ARTÍCULO ORIGINAL

Derivados de 4,5-DIHI-DRO-1H-PIRAZOL como inhibidores selectivos de nNOS: Síntesis y relaciones estructura-actividad
4,5-DIHYDRO-1H-PYRAZOLE as nNOS selective inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship

Chayah M¹; Camacho M. E¹; Carrión M. D¹; Entrena A¹; Gallo M A¹; Espinosa A¹; Acuña-Castroviejo D²

¹Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada (Spain). mchayah@ugr.es. Tel.:958243844.

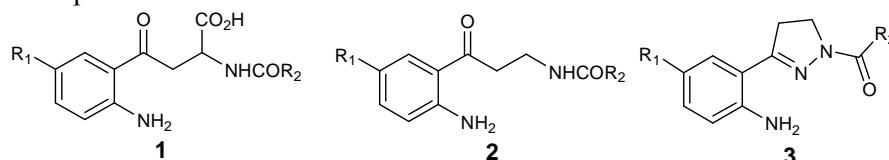
²Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada (Spain).

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La oxido nítrico sintasa (NOS) es la enzima que cataliza la biosíntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina.¹ Hasta el momento, se han descubierto cuatro isoformas:² nNOS, iNOS, eNOS y mtNOS. El NO es un biomensajero relacionado con importantes funciones fisiológicas.³ Sin embargo, se ha demostrado que una sobreproducción de NO por la nNOS está implicada en procesos neurodegenerativos.⁴ Este hecho justifica la necesidad terapéutica de encontrar inhibidores selectivos de la nNOS que permitan luchar contra enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y corea de Huntington.

Nuestro grupo de investigación ha sintetizado y evaluado una serie de derivados kinurenínicos⁵ 1 y kinurenamínicos⁶ 2 como agentes neuroprotectores que resultaron desprovistos de actividad inhibitoria frente a la enzima kinurenina-3-hidroxilasa (KYN3OH), lo que demuestra que su actividad neuroprotectora se debe a la inhibición de la nNOS.



OBJETIVO

Basándonos en estos antecedentes, hemos sintetizado y realizado la evaluación biológica in vitro frente a las isoformas nNOS e iNOS de una serie de derivados de 4,5-dihidro-1H-pirazol con estructura general 3, con objeto de encontrar inhibidores selectivos de alguna de estas isoformas.

METODOLOGÍA

Tomando como referencia los derivados kinurenínicos y kinurenamínicos, hemos sintetizado los análogos rígidos con un resto de 4,5-dihidro-1H-pirazol. Además de la restricción conformacional, se han llevado a cabo otras modificaciones, como la introducción de distintos sustituyentes en el anillo aromático y la modificación del grupo acilo en el anillo de pirazolina.

CONCLUSIÓN /DISCUSIÓN

Todos los compuestos ensayados inhiben nNOS. La inhibición de iNOS es ínfima en la mayoría de los casos, por lo que se pueden considerar selectivos, y no hay inhibición de KYN3OH. Por consiguiente, el potencial neuroprotector de estos derivados se debe únicamente a la inhibición de nNOS.

PALABRAS CLAVE: inhibidores nNOS, iNOS, NO, derivados de 4,5-dihidro-1H-pirazol, neuroprotección

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

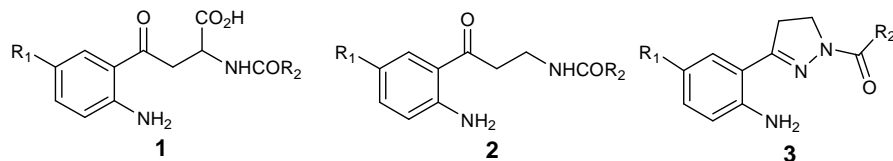
Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 77-83.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Nitric Oxide Synthase (NOS) is the enzyme which catalyses the biosynthesis of Nitric Oxide (NO) from L-arginine¹. Four NOS isoforms have been described: nNOS, iNOS, eNOS and mtNOS. NO is a biological messenger involved in several physiologic processes.³ However, an overproduction of NO by nNOS produces neurotoxicity which has been associated with various neurological disorders⁴. Therefore, it is necessary to find nNOS inhibitors to fight pathologies such as Alzheimer's disease, Parkinson, amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease.

In previous papers, our research group have described the synthesis of a series of kynurenine⁵ **1** and kynurenamine⁶ **2** derivatives as neuroprotective agents which are not active versus kynurenine-3-hydroxylase (KYN3OH). This fact demonstrates that their neuroprotective activity is only due to the nNOS inhibition.

**OBJECTIVE**

Basing on these precedents, we have developed and evaluated *in vivo*, versus nNOS and iNOS, a series of 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives with general structure 3 in order to find new selective compounds.

METHODOLOGY

Taking kynurenine and kynurenamine derivatives as reference, we have synthesized rigid analogous with a ring of 4,5-dihydro-1H-pyrazole. Besides the conformacional restriction, other modifications have been carried out, as the introduction of different substituents in the aromatic ring and the modification of the acyl group in the pyrazoline ring.

CONCLUSION /DISCUSSION

All compounds inhibit nNOS. In most of cases, the inhibition of iNOS is negligible. Thus, they can be considered selective. On the other hand, there is no KYN3OH inhibition. Consequently, the neuroprotective potential of these derivatives is due only to the inhibition of nNOS.

KEYWORDS: nNOS inhibitors, iNOS, NO, 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives, neuroprotective agents.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías que se caracterizan por una pérdida progresiva de células en determinadas poblaciones neuronales. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, se ha observado una depleción de neuronas colinérgicas fundamentalmente en el hipocampo y la amígdala, mientras que en la enfermedad de Parkinson se afectan las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales, y en la esclerosis lateral amiotrófica se reduce la población de motoneuronas.¹

Estos estados patológicos se caracterizan por unas altas concentraciones de óxido nítrico (NO) a nivel de las neuronas afectadas debido a una estimulación y sobreexpresión de las enzimas que catalizan su síntesis. Esta situación genera un estado progresivo de estrés oxidativo y nitrosativo que produce alteraciones a nivel de las células nerviosas induciendo su apoptosis y la consiguiente degeneración neuronal.

El NO es un biomensajero a la vez que un neurotransmisor. Desempeña importantes funciones reguladoras a nivel del sistema nervioso, inmune y cardiovascular.² En los mamíferos, se sintetiza a partir de L-arginina a nivel de neuronas,³ células endoteliales,⁴ y

Fecha de recepción (Date received): 10-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 77-83.

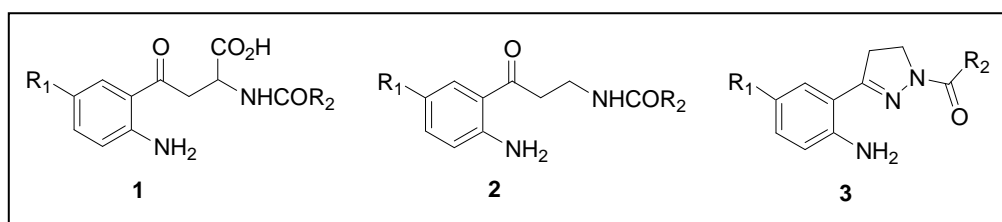
macrófagos^{5,6} mediante las distintas isoformas de la Oxido Nítrico Sintasa (NOS).⁷ Las isoenzimas constitutivas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) y mitocondrial (cmtNOS) son calcio/calmodulina dependientes y se activan fisiológicamente a través de hormonas y neurotransmisores que aumentan los niveles intracelulares de calcio. Por otro lado, las isoformas inducibles (iNOS e imtNOS) no dependen del calcio y una vez expresadas generan altas concentraciones de NO responsables de sus efectos neurotóxicos.

Estos hechos justifican la necesidad de encontrar inhibidores selectivos que permitan conseguir una herramienta farmacológica así como soluciones terapéuticas para luchar contra enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y corea de Huntington entre otras.

Con este fin, nuestro grupo de investigación ha sintetizado y evaluado una serie de derivados kinurenínicos⁸ **1** (Figura 1) y kinurenamínicos⁹ **2** (Figura 1) como agentes neuroprotectores, que resultaron desprovistos de actividad inhibitoria frente a la enzima kinurenina-3-hidroxilasa (KYN3OH), lo que demuestra que su actividad neuroprotectora se debe solamente a la inhibición de la nNOS.

Basándonos en estos antecedentes, hemos sintetizado y realizado la evaluación biológica, *in vitro*, frente a las isoformas nNOS e iNOS de una serie de derivados de 4,5-dihidro-1H-pirazol con estructura general **3** (Figura 1), con objeto de encontrar nuevos inhibidores selectivos de alguna de estas isoformas. También se ha ensayado su actividad frente a KYN3OH, demostrando ser inactivos.

Figura 1: Derivados kinurenínicos, kinurenamínico y 4,5-dihidro-1H-pirazol.



METODOLOGÍA

Tomando como referencia los derivados kinurenínicos y kinurenamínicos, hemos sintetizado los análogos rígidos con un resto de 4,5-dihidro-1H-pirazol. Además de la restricción conformacional que genera el anillo de pirazolina, se han llevado a cabo otras modificaciones, como la introducción de distintos sustituyentes (R₁) en el anillo aromático y la modificación del grupo acilo (R₂) en el anillo de pirazolina.

Fecha de recepción (Date received): 10-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 77-83.

Para la síntesis de todos los productos finales, se ha llevado a cabo la siguiente ruta sintética:

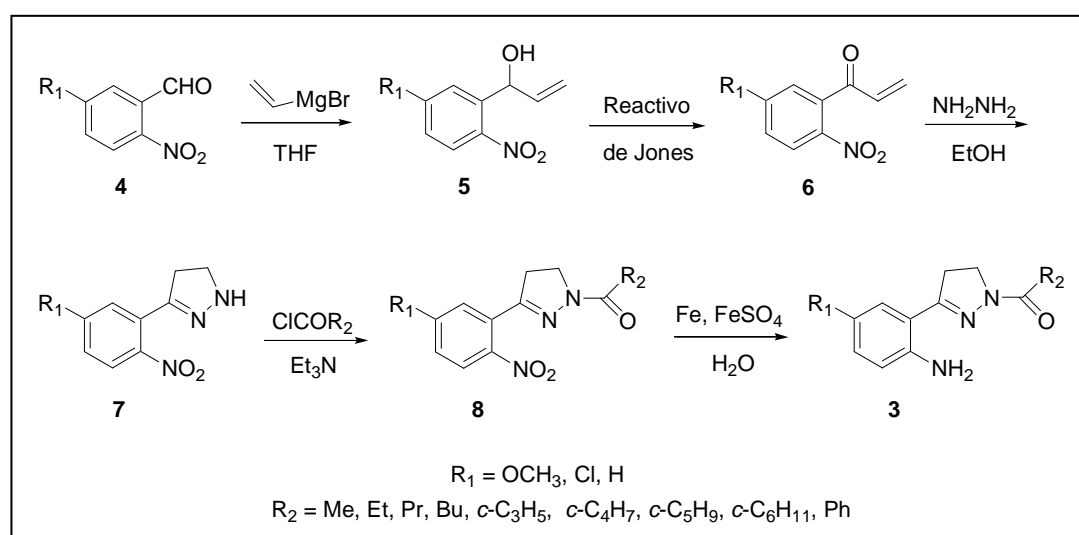
Los productos de partida de los compuestos con $R_1 = H$ y Cl son comerciales, 2-nitrobenzaldehído y 5-cloro-2-nitrobenzaldehído, respectivamente. Por otro lado, para la síntesis de los compuestos con $R = OCH_3$ se parte de 5-metoxi-2-nitrobenzaldehído, obtenido a partir del producto comercial 5-hidroxi-2-nitrobenzaldehído mediante una reacción de metilación con MeI y K_2CO_3/THF ¹⁰.

La reacción del compuesto **4** (Figura 2) con el bromuro de vinil magnesio da lugar, con un rendimiento cuantitativo, al alcohol alílico **5** (Figura 2) que, posteriormente, se oxida mediante el Reactivo de Jones para dar la correspondiente cetona **6** (Figura 2) con un 80% de rendimiento.

Los 4,5-dihidro-1H-pirazoles **7** (Figura 2) se forman al reaccionar la cetona con hidrazina en etanol. Una vez formados se tratan, *in situ*, con el correspondiente cloruro de acilo para dar lugar a los derivados de 1-acil-3-(2-nitro-5-fenilsustituido)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8** (Figura 2). El rendimiento de estas reacciones oscila entre 50 - 90% y depende tanto de R_1 como de R_2 , siendo mayor para los productos con $R_1 = OCH_3$ y H .

Por último, el grupo nitro se reduce a amino dando lugar a los productos finales **3** con un rendimiento cuantitativo. La reducción se realiza con Fe y $FeSO_4$ en agua.

Figura 2: Ruta sintética de los compuestos finales derivados de 4,5-dihidro-1H-pirazol



Fecha de recepción (Date received): 10-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 77-83.

DISCUSIÓN

Nuestro grupo de investigación ha sintetizado una serie de 4,5-dihidro-1*H*-pirazoles y se ha ensayado su actividad frente a nNOS, obteniéndose buenos valores de inhibición frente a dicha isoforma.¹⁰ Tanto estos datos como los correspondientes a los ensayos biológicos frente a iNOS de los distintos compuestos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Actividad de los compuestos sintetizados frente a iNOS, nNOS y KYN3OH

Compuesto	R ₁	R ₂	% actividad KYN3OH ¹⁰	% inhib. iNOS	% inhib. nNOS ¹⁰
3a	OMe	Me	98.84 ± 11.3	20.39 ± 0.42	38.02 ± 1.39
3b	OMe	Et	81.14 ± 8.6	20.39 ± 1.55	53.27 ± 1.85
3c	OMe	Pr	96.43 ± 10.6	13.09 ± 1.2	34.69 ± 1.54
3d	OMe	Bu	120.50 ± 12.3	-2.18 ± 1.4	49.74 ± 1.57
3e	OMe	C-C ₃ H ₅	123.35 ± 11.1	19.0 ± 2.11	62.24 ± 3.91
3f	OMe	C-C ₄ H ₇	96.54 ± 9.07	1.91 ± 2.1	38.33 ± 1.91
3g	OMe	C-C ₅ H ₉	105.19 ± 10.1	1.85 ± 1.2	49.88 ± 2.39
3h	OMe	C-C ₆ H ₁₁	87.36 ± 7.9	13.25 ± 1.32	62.21 ± 2.05
3i	OMe	Ph	-	12.18 ± 0.55	58.91 ± 2.04
3j	H	Me	77.85 ± 8.6	1.03 ± 2.31	33.7 ± 5.83
3k	H	Et	85.25 ± 7.8	13.72 ± 2.88	36.46 ± 5.95
3l	H	Pr	84.95 ± 7.9	-1.99 ± 3.26	52.38 ± 3.15
3m	H	C-C ₃ H ₅	86.93 ± 9.4	18.89 ± 2.16	38.8 ± 4.24
3n	H	Ph	82.46 ± 9.9	17.04 ± 2.55	57.06 ± 4.07
3o	Cl	Me	110.59 ± 10.5	7.73 ± 1.6	47.55 ± 1.83
3p	Cl	Et	97.74 ± 11.1	6.88 ± 0.95	46.12 ± 2.46
3q	Cl	Pr	97.74 ± 10.2	-1.35 ± 1.75	34.42 ± 1.61
3r	Cl	C-C ₃ H ₅	98.12 ± 10.1	14.8 ± 1.64	70.22 ± 2.7
3s	Cl	Ph	105.71 ± 9.5	8.7 ± 2.18	61.12 ± 1.55

Todos los compuestos presentan una reducida inhibición iNOS, además algunos poseen altos niveles de inhibición nNOS (60-70%), por lo que se pueden considerar como una nueva clase de inhibidores selectivos de esta última isoforma.

De las tres series de productos sintetizados (R₁ = OCH₃, H, Cl), la serie con R₁ = Cl (**3o-s**) presenta los mejores valores de inhibición nNOS y la mejor selectividad, de hecho, el compuesto más potente frente a nNOS es **3r** y el que mejor relación potencia/selectividad presenta es **3s**. Por consiguiente, podemos pensar que el átomo de cloro en el anillo aromático posee una influencia positiva sobre la actividad de los compuestos.

Fecha de recepción (Date received): 10-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 77-83.

En cuanto a la influencia de R_2 , no se puede establecer un criterio generalizado ya que, en algunos casos (serie $R_1 = H$), al aumentar el volumen aumenta también la actividad, y en otros (serie $R_1 = OCH_3, Cl$), ocurre lo contrario.

Estos derivados han sido ensayados, además, frente a KYN3OH. La mayoría no presenta actividad frente a este enzima, lo que indica que su potencial neuroprotector se debe únicamente a la inhibición de nNOS.

CONCLUSIONES

Se ha diseñado, sintetizado y ensayado una nueva serie de inhibidores de nNOS. Los nuevos compuestos pueden ser considerados como análogos rígidos de los derivados kinurenínicos **1** (Figura 1), anteriormente descritos.

Todos los compuestos ensayados inhiben nNOS. La inhibición de iNOS es ínfima en la mayoría de los casos, por lo que se pueden considerar nuevos inhibidores selectivos nNOS. Destaca el compuesto **3r** por su mayor actividad frente a nNOS (70.22%) y el compuesto **3s** por presentar la mejor relación potencia/selectividad frente a nNOS.

Por otro lado, no se ha observado inhibición de KYN3OH. Por consiguiente, el potencial neuroprotector de estos derivados se debe únicamente a la inhibición nNOS.

BILBIOGRAFIA

1. Segura, T.; Galindo, M. F.; Rall-Gutiérrez, B.; Ceña, V.; Iordán, I.; *Rev. Neurol.* 2003, 36, 1047-1057.
 2. Moncada, S.; Higgs, A.; Furchgott, R.; *Pharmacol. Rev.* 1997, 49, 137.
 3. Mayer, B. M.; John, M.; Bohme, E.; *FEBS. Lett.* 1990, 277, 215.
 4. Pollock, J. S.; Forstermann, U.; Mitchel, J. A.; Warner T. D.; Shmidt, H. H.; Nakane, M.; Murad, F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, 88, 10480.
 5. Stuehr, D. J.; Cho, H. J.; Kwon, N. S.; Weise, M. F.; Nathan, C. F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, 88, 7773.
 6. Hevel, J. M.; White, K. A.; Marletta, M. A.; *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 22789.
 7. (a) Hoggs, A. J.; Higgs, A.; Moncada, S.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 1999, 39, 191. (b) Tatoyan, A.; Giulivi C.; *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 11044.
 8. Camacho, E.; León, J.; Carrión, M. D.; Entrena, A.; Escames, G.; Khaldy, H.; Castroviejo-Acuña, D.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; *J. Med. Chem.* 2002, 45, 263.
 9. Entrena, A.; Camacho, M. E.; Carrión, M. D.; López-Cara, L. C.; Velasco, G.; León, J.; Escames, G.; Castroviejo-Acuña, D.; Tapias, V.; Gallo, M. A.; Vivó, A.; Espinosa, A.; *J. Med. Chem.* 2005, 48, 8174.
 10. Camacho, M. E.; León, J.; Entrena, A.; Velasco, G.; Carrión, M. D.; Escames, G.; Vivó, A.; Castroviejo-Acuña, D.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5641.
 11. Figura 1: Derivados kinurenínicos, kinurenamínico y 4,5-dihidro-1H-pirazol.
-