

## Investigación

# Síntesis y actividad relajante en músculo liso vascular de una serie de 1,4-dihidropiridinas análogas de nicardipina

Martha Noyola y Zurisaddai Hernández-Gallegos\*

Sección Externa de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, AP 14-740, México 07000, D.F. Tel 5747-3800 ext. 5426; Fax 5747-7095; E-mail: zhernand@mail.cinvestav.mx

Recibido el 22 de octubre del 2002; aceptado el 7 de febrero del 2003

**Resumen.** Se sintetizaron nicardipina y cinco nuevos análogos y se determinó su efecto relajante en músculo liso vascular. Todos los compuestos presentaron una apreciable actividad relajante siendo el *m*-bromofenil derivado el más potente; el orden de potencia de los compuestos con relación al sustituyente presente fue: *m*-Br > *m*-NO<sub>2</sub> (nicardipina) > *m*-Cl ≈ *m*-F > *m*-CH<sub>3</sub> ≈ *m*-OCH<sub>3</sub>.

**Palabras clave:** Análogos de nicardipina, 1,4-dihidropiridinas, antagonistas de calcio.

**Abstract.** Nicardipine and five new analogues were synthesized and evaluated for their smooth muscle relaxing activity. All the compounds displayed significant relaxant activity and the *m*-bromophenyl derivative was the most potent; the order of potency for the complete set of derivatives were: *m*-Br > *m*-NO<sub>2</sub> (nicardipine) > *m*-Cl ≈ *m*-F > *m*-CH<sub>3</sub> ≈ *m*-OCH<sub>3</sub>.

**Key words:** Nicardipine analogues, 1,4-dihydropyridines, calcium antagonists.

## Introducción

Las 1,4-dihidropiridinas (DHPs) son importantes agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la hipertensión, la angina de pecho y otros padecimientos cardiovasculares. El mecanismo de acción de las DHPs es similar al de otros fármacos bloqueadores de la entrada de calcio y consiste en suprimir la entrada de este ion a la célula al actuar directamente sobre los canales de calcio operados por voltaje tipo L [1]. Los compuestos de tipo dihidropiridina son conocidos desde hace más de un siglo cuando Hantzsch los utilizó como intermediarios en la síntesis de piridinas. A pesar de su accesibilidad química (y de la participación de compuestos de tipo 1,3-dihidropiridina como coenzimas de numerosas deshidrogenasas), fueron de poco interés hasta la década de los sesentas (del siglo pasado) cuando se descubrió la propiedad vasodilatadora de la nifedipina y otras 4-aril-1,4-dihidropiridinas [2]. A partir de entonces, han sido sintetizadas un gran número de DHPs e investigadas sus propiedades farmacológicas.

La nicardipina (NIC) es una DHP de segunda generación en uso clínico que presenta mayor selectividad por músculo liso vascular que por músculo cardiaco en comparación a otras DHPs, lo que resulta en un importante efecto cardioprotector durante la isquemia [3, 4]. La NIC posee una cadena básica que le confiere una mejor solubilidad acuosa, solubilidad que se incrementa al formarse el clorhidrato de NIC [5]. En el presente trabajo se reporta la síntesis de nuevos análogos de la NIC en los que se varió el sustituyente sobre el anillo 4-fenilo. También se reporta la actividad relajante de los compuestos.

## Resultados y discusión

**Síntesis de compuestos.** Las DHPs (1-6) fueron preparadas por medio de la reacción de Hantzsch, de acuerdo a procedimientos descritos en la literatura [6, 7]. Esta reacción involucra la condensación de una mola del acetoacetato de *N*-bencil-*N*-metil-2-aminoetilo, una mola de metil aminocrotonato y una mola del benzaldehído correspondiente (Fig. 1). Todas las DHPs sintetizadas fueron obtenidas como racematos y su estructura y propiedades físicas son presentadas en la Tabla 1. Por problemas con la formación del clorhidrato de las DHPs 3 y 5, éstas fueron obtenidas en su forma de base libre en tanto que las otras cuatro (1, 2, 4, y 6) si fueron obtenidas como clorhidratos. Cinco de las DHPs sintetizadas (1-5) son compuestos nuevos (no reportados en la literatura) cuya estructura fue confirmada por sus espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H), así como por el análisis elemental (C, H, N) practicado; los resultados de este análisis mostraron que los valores de C, H y N determinados para cada compuesto fueron acordes a los calculados dentro de un rango de ± 0.4 %, excepto C en la DHP 2 (56.25 % vs. 56.79 %) y C en la DHP 4 (66.37 % vs. 66.86 %). En el caso de la NIC (DHP 6) su identidad fue confirmada por su espectro de RMN <sup>1</sup>H así como por su punto de fusión determinado que fue acorde al reportado para este compuesto [6].

**Actividad relajante en músculo liso vascular.** La actividad bloqueadora de los canales de calcio de la NIC y sus cinco análogos sintetizados fue evaluada por el efecto relajante que

producen las DHPs en anillos de aorta de rata pre-contraídos con potasio (80 mM). Todos los compuestos inhibieron la contracción inducida por el potasio en una forma dependiente de la concentración. En la Tabla 1 se reporta la potencia relajante de las DHPs sintetizadas, la cual es expresada en términos del logaritmo negativo de la concentración molar necesaria para inhibir en un 50 % la contracción inducida por potasio ( $pCI_{50}$ ).

Las seis DHPs probadas presentaron una significativa actividad relajante, siendo la DHP **2** la más potente y la DHP **5** la menos potente de la serie (derivados con *m*-Br y *m*-OCH<sub>3</sub> como sustituyente en el anillo 4-fenilo, respectivamente). El cambio del grupo *m*-NO<sub>2</sub> (de la NIC) por halógenos causó cambios moderados en la potencia de las DHPs: los derivados *m*-Cl y *m*-F (**1** y **3**, respectivamente) fueron ligeramente menos potentes que la NIC en tanto que el *m*-Br (**2**) fue más potente. Similar a lo encontrado en otras series de DHPs [8, 9], nuestros resultados muestran una importante influencia del tipo de sustituyente en el anillo fenilo sobre la actividad relajante de este tipo de compuestos, observándose que los compuestos con sustituyentes electroattractores (halógenos y grupo nitro) fueron los que presentaron una mejor actividad. El orden de potencia encontrado para los derivados incluidos en nuestro estudio (en base al sustituyente que presentan) fue: *m*-Br > *m*-NO<sub>2</sub> > *m*-Cl > *m*-F > *m*-CH<sub>3</sub> > *m*-OCH<sub>3</sub>, que es similar a al observado en DHPs análogas de nifedipina [9]. Esto indica de alguna manera que ambos tipos de compuestos (derivados de nifedipina y derivados de nicardipina) se acomodan de manera idéntica al interactuar con el sitio receptor a DHPs de los canales de calcio. En conclusión, se obtuvieron cinco nuevos compuestos análogos de NIC, tres de los cuales (DHPs **1-3**) presentaron una buena potencia relajante comparable a la de la NIC.

## Parte experimental

### Materiales

Todos los reactivos y solventes utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos de la compañía Sigma-Aldrich (Milwaukee, EI, USA). Los puntos de fusión fueron determinados en

**Tabla 1.** Estructura, propiedades físicas y potencia relajante de las DHPs.

DHP	X*	Pf. (°C)	Rend. (%)	$pCI_{50}^{**}$
1	Cl	150-153	32	7.69 (7.58-7.80)
2	Br	133-136	30	8.20 (8.10-8.29)
3	F	93-94	34	7.62 (7.52-7.73)
4	CH <sub>3</sub>	163-165	16	7.27 (7.19-7.35)
5	OCH <sub>3</sub>	72-73	17	7.13 (7.04-7.22)
6 (NIC)	NO <sub>2</sub>	166-169***	22	7.99 (7.90-8.06)

\* Sustituyente en el anillo aromático, Fig. 1.

\*\* Logaritmo negativo de la concentración molar requerida para inhibir la contracción un 50 % (límites de confianza del 95 %).

\*\*\* Pf reportado para la nicardipina es de 168-170 °C [6].

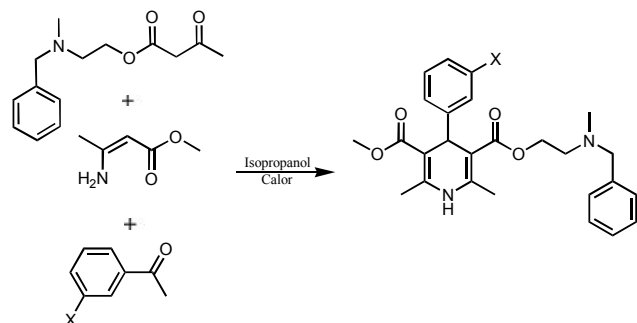
un aparato MEL-TEMP y son no corregidos. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H fueron obtenidos en un espectro Varian EM360A a 60 MHz, empleando cloroformo deuterado o acetona deuterada como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna. El análisis elemental (C, H, N) de los compuestos nuevos fueron realizados por el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Todos los compuestos fueron caracterizados por su espectro de RMN <sup>1</sup>H y su punto de fusión (en el caso de encontrarse reportado), para confirmar la identidad de las estructuras propuestas.

### Preparación de acetoacetato de *N*-bencil-*N*-metil-2-aminoetilo

Una solución de *N*-bencil-*N*-metil-2-aminoetanol (5 g, 30 mmol) en THF (9 mL) fue calentada (a 50 °C, aproximadamente), adicionándose a continuación la dicetena (2.5 g, 30 mmol) en forma lenta y con agitación. Una vez adicionada la dicetena, el calentamiento y la agitación siguieron por 2 h más. Al término de la reacción se realizó una extracción agua-cloruro de metileno. La fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio y concentrada. El producto obtenido fue purificado en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente acetato de etilo-hexano (1:1), obteniéndose 5.5 mL de producto.

### Procedimiento general para la preparación de las DHPs (reacción de Hantzsch)

Una solución de acetoacetato de *N*-bencil-*N*-metil-2-aminoetilo (4 mL), metil 3-aminocrotonato (1.6 g, 14 mmol) y el benzaldehído sustituido (14 mmol) en isopropanol (10 mL) se sometió a reflujo con agitación por un lapso de 8 a 12 h. Al término de la reacción la solución obtenida fue extraída con cloruro de metileno. La fase orgánica fue lavada con agua, secada con sulfato de magnesio y concentrada. Finalmente, el producto obtenido se purificó a través de una columna de gel de sílice usando cloroformo-acetona (20:1) como eluyente.



**Fig. 1.** Síntesis de 1,4-dihidropiridinas análogas de nicardipina.

### Procedimiento general para la obtención del clorhidrato de las DHPs

La DHP obtenida en su forma de base libre fue disuelta en cloruro de metileno (20 mL) y puesta en un baño de hielo y con agitación. Posteriormente se le fue agregando en forma lenta una solución de HCl (1 M, en éter etílico) hasta observar la formación de precipitado. La agitación se continuó por 3 h más y el producto precipitado fue filtrado, para finalmente ser recristalizado en acetona.

**Clorhidrato de D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoetoxicarbonil)-4-(3-clorofenil)-5-metoxicarbonil-1,4-dihidropiridina (1).** Sólido cristalino: pf 150-153 °C; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz) δ 2.2 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.3 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>), 2.6 (2H, t, J = 6Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.5 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.6 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.2 (2H, t, J = 6Hz, OCH<sub>2</sub>), 5.0 (1H, s, H-4), 5.7 (1H, s, NH), 7.1-7.2 (9H, m, 9 hidrógenos aromáticos). Anal. C 61.89 %, H 6.00 %, N 5.26 %, calcd para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>·HCl, C 61.78 %, H 5.98 %, N 5.54 %.

**Clorhidrato de D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoetoxicarbonil)-4-(3-bromofenil)-5-metoxicarbonil-1,4-dihidropiridina (2).** Sólido cristalino: pf 133-136 °C; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz) δ 2.3 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.4 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>), 3.2 (2H, t, J = 4Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.5 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.7 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.6 (2H, t, J = 6Hz, OCH<sub>2</sub>), 4.9 (1H, s, H-4), 6.9 (1H, s, NH), 7.1-8.1 (9H, m, 9 hidrógenos aromáticos). Anal. C 56.25 %, H 5.55 %, N 4.83 %, calcd para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>·HCl, C 56.79 %, H 5.50 %, N 5.09 %.

**D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoetoxicarbonil)-4-(3-fluorofenil)-5-etoxi-carbonil-1,4-dihidropiridina (3).** Sólido: pf 93-94 °C; RMN <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>, 60 MHz) δ 2.2 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.3 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>), 2.7 (2H, t, J = 6Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.5 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.6 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.1 (2H, t, J = 6Hz, OCH<sub>2</sub>), 5.0 (1H, s, H-4), 6.6 (1H, s, NH), 6.8-7.6 (9H, m, 9 hidrógenos aromáticos). Anal. C 69.07 %, H 6.51 %, N 5.85 %, calcd para C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>F, C 69.01 %, H 6.46 %, N 6.19 %.

**Clorhidrato de D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoetoxicarbonil)-4-(m-toluoil)-5-metoxicarbonil-1,4-dihidropiridina (4).** Sólido cristalino: pf 163-165 °C; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz) δ 2.1 (3H, s, CH<sub>3</sub>Ph), 2.3 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.4 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>), 2.7 (2H, t, J = 6Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.7 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.8 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.3 (2H, t, J = 6Hz, OCH<sub>2</sub>), 5.0 (1H, s, H-4), 6.8 (1H, s, NH), 6.9-7.6 (9H, m, 9 hidrógenos aromáticos). Anal. C 66.37 %, H 6.90 %, N 5.48 %, calcd para C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>·HCl, C 66.86 %, H 6.86 %, N 5.78 %.

**D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoetoxicarbonil)-4-(3-metoxifenil)-5-metoxicarbonil-1,4-dihidropiridina (5).** Sólido: pf 72-73 °C; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 60 MHz) δ 2.2 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.3 (6H, s, 2 CH<sub>3</sub>), 2.6 (2H, t, J=6Hz, CH<sub>2</sub>N), 3.5 (2H, s, NCH<sub>2</sub>Ph), 3.7 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.8 (3H, s,

PhOCH<sub>3</sub>) 4.1 (2H, t, J=6Hz, OCH<sub>2</sub>), 5.0 (1H, s, H-4), 5.7 (1H, s, NH), 6.6-7.3 (9H, m, 9 hidrógenos aromáticos). Anal. C 69.47%, H 6.96%, N 6.11%, calcd para C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>, C 69.81%, H 6.94%, N 6.03%.

### Efecto relajante en el modelo de anillos de aorta

Ratas Wistar macho fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por desnucamiento. Se les extirpó la aorta torácica, misma que fue limpiada de tejido conectivo y cortada en anillos de 5 mm aproximadamente. Estos fueron suspendidos (por medio de ganchos de Nichrom) en cámaras de órgano aislado de 10 mL que contenían solución de Krebs (pH 7.4, 37 °C) de la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucosa 11.6, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.17, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17, EDTA 0.026, CaCl<sub>2</sub> 2.5, burbujeada continuamente con O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (95:5). Uno de los ganchos fue fijado al fondo de la cámara y el otro a un trasductor de tensión (FORT10 de WPI), que a su vez estaba conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100 de BIOPAC Systems Inc.). Los cambios de tensión fueron registrados en una computadora (pentium II de DELL) a través del software *AcqKnowledge* (versión 3.5).

Los anillos fueron estabilizados por 30 minutos con una tensión inicial de 5 g, después de lo cual se probó tres veces su respuesta contráctil a noradrenalina (10<sup>-7</sup> M, concentración final) cada 30 min, con lavados intermedios. Después de contraer por tercera vez los anillos, y antes del lavado, fueron expuestos a acetilcolina (10<sup>-6</sup> M, concentración final). A continuación los anillos fueron lavados con una solución de Krebs alta en potasio (NaCl 42.7 mM, KCl 80 mM) pero sin calcio. Después de otro periodo de estabilización de 30 minutos, la preparación se lavó otra vez con el Krebs alto en potasio sin calcio. Inmediato a esto se agregó cloruro de calcio (2.5 mM, concentración final), lo que inicio la contracción muscular. Cuando el anillo desarrolló su tensión máxima, se adicionó la DHP (disuelta en DMSO-agua) en forma acumulativa. La potencia relajante de las DHPs fue determinada del análisis (mediante los programas SigmaStat v. 2.03 y SigmaPlot v. 5.02, SPSS Inc.) de las correspondientes curvas dosis-respuesta (seis curvas por compuesto), y es expresada en términos de pCI<sub>50</sub> (logaritmo negativo de la concentración molar requerida para inhibir la contracción un 50 %)

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Guadalupe Montiel C., Omar G. Sandoval R. y José Luis Martínez C. por su apoyo técnico. Este trabajo fue financiado parcialmente por el CONACyT, donativo 28082M.

## Referencias

1. Fleckenstein, A., in: *Calcium Antagonism in Heart and Smooth Muscle*, Wiley, New York, **1983**, 286-230.
2. Fleckenstein, A. *Circ. Res.* **1983**, 52 (Suppl. I), 3-16.
3. Baky, S.H., in: *New Cardiovascular Drugs*, Scribani, G., Ed., Raven Press, New York, **1985**, 153-172.
4. Freedman, D.D.; Waters, D.D. *Drugs* **1987**, 34, 578-598.
5. Regårdh, C.G.; Bäärnhielm, C.; Edgar, B.; Hoffmann, K.J. *Prog. Drug Metab.* **1990**, 12, 41-86.
6. Iwanami, M.; Shibamura, T.; Fujimoto, M.; Kawai, R.; Tamazawa, K.; Takenaka, T.; Takahashi, K.; Murakami, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, 27, 1426-1440.
7. Meyer, H.; Wehinger, E.; Bossert, F.; Scherling, D. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1983**, 33, 106-112.
8. Hernández-Gallegos, Z.; Lehmann, F.P.A.; Hong, E.; Posadas, F.; Hernández-Gallegos, E. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30, 355-364.
9. Coburn, R.A.; Wierzba, M.; Suto, M.J.; Solo, A.L.; Triggle, A.M.; Triggle, D.J. *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2103-2107.