

Tatiana Emanuel Abreu de Sousa

**Tratamento de doenças renais e cardiovasculares
mineralocorticóide-dependentes.
Da espironolactona aos inibidores da aldosterona sintase.**

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Declaração de Honra

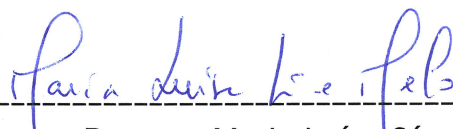
Eu, Tatiana Emanuel Abreu de Sousa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009883, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

(Tatiana Emanuel Abreu de Sousa)

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

A orientadora



(Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo)

A orientanda



(Tatiana Emanuel Abreu de Sousa)

Agradecimentos

Depois deste longo e desafiante percurso académico, não poderia deixar de agradecer:

- Ao meu grande Mestre, por toda a fé e luz no meu caminho.
- Aos meus pais, irmão e toda a minha família que, com muito carinho e apoio, sempre me fizeram acreditar que era possível e, assim, cheguei a esta etapa da minha vida. Em especial à minha Sofia, mesmo sem saber, é uma força especial para mim.
- À D. Aurora por todo o apoio e por me fazer chegar ao fim deste curso.
- Ao João por todo o apoio nos momentos mais difíceis, por todas as horas a ouvir falar de medicamentos e pela dedicação a esta causa que se tornou um pouco sua.
- À Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo, por toda a sua atenção e ajuda na realização desta Monografia. Muito obrigada por toda a força que me deu.
- Aos professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por toda a sabedoria.
- Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Índice

Resumo	VII
Abstract	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
Lista de Figuras	X
1. Introdução	1
2. Doenças renais e cardiovasculares mineralocorticóide-dependentes	2
2.1. Aldosterona nas doenças cardiovasculares	2
2.1.1. Efeitos genómicos	2
2.1.2. Efeitos não genómicos	2
2.1.3. Consequências das concentrações elevadas de aldosterona	2
2.2. Aldosterona nas doenças renais	3
2.2.1. Consequências das concentrações elevadas de aldosterona	3
3. Antagonistas dos Recetores Mineralocorticóides	4
3.1. Espironolactona	4
3.2. Mecanismo de ação	4
3.3. Efeitos secundários	4
4. Inibidores da aldosterona sintase	5
4.1. Papel da CYP11B2 na biossíntese da aldosterona	5
4.2. Isoenzimas	5
4.3. Outras enzimas do Citocromo P450	6
4.4. Exemplos de Inibidores da CYP11B2	7

4.4.1.	Compostos esteroides	7
4.4.2.	Primeiros compostos não esteroides.....	7
4.4.3.	Fadrozole e seus derivados	8
4.4.3.1.	Fadrozole.....	8
4.4.3.2.	(R)-4-(6,7-di-hidro-5H-pirrol-[1,2-c]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo	9
4.4.3.3.	Derivados do fadrozole.....	10
4.4.4.	Indóis, benzimidazóis e derivados	11
4.4.5.	Indanos, naftalenos e derivados	11
4.4.6.	Di-hidroquinolinonas, di-hidropirrolquinolinonas, di-hidrotriazoloquinolinas e derivados.....	12
5.	Inibição dual das CYP19/CYP11B2 e das CYP17/HCYPI1B2	14
6.	Conclusão.....	15
7.	Bibliografia	16

Resumo

O tratamento de doenças renais e cardiovasculares mineralocorticóide-dependentes é uma preocupação de médicos e farmacêuticos devido à forte incidência destas doenças e aos efeitos secundários associados às poucas opções terapêuticas existentes.

A aldosterona, o principal mineralocorticóide, é responsável por regular o balanço eletrolítico e a pressão sanguínea. Além disso, é um fator pro-inflamatório potente, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumenta a expressão dos genes responsáveis pela fibrose, culminando em fibrose cardíaca e renal. Os efeitos da aldosterona podem ser genómicos (ativação dos recetores mineralcorticóides (MRs)) e não-genómicos (ativação de MRs ou de outros recetores ligados na membrana, ainda não identificados). Níveis elevados de aldosterona relacionam-se com diversas doenças crónicas, tais como hipertensão, fibrose cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, alterações ventriculares e, nefropatia diabética.

A inibição da aldosterona sintase (CYPI1B2), a enzima responsável pelos passos finais na biossíntese da aldosterona, poderá ser uma alternativa terapêutica. Foram realizados vários estudos para avaliar possíveis inibidores da CYPI1B2. O R-fadrozole (FAD286) foi um sucesso em vários estudos usando modelos animais. O LCI699, um derivado estrutural do FAD286, foi avaliado em ensaios clínicos mas, em doses mais elevadas, verificava-se uma redução na síntese do cortisol.

No desenvolvimento de inibidores da CYPI1B2 é necessário ter em conta não só a potência do composto mas também a sua seletividade. Constatou-se que muitos dos compostos estudados inibiam outras enzimas do citocromo P450, em especial a 11 β -hidroxilase (CYPI1B1) responsável pela síntese do cortisol.

Recentemente, identificaram-se muitos inibidores seletivos da CYPI1B2 e relataram-se efeitos benéficos no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e da nefropatia diabética mas não há investigação clínica, até à data. Contudo, o sucesso clínico seria muito importante dado que existe uma necessidade terapêutica para as doenças anteriormente referidas.

Abstract

The treatment of mineralocorticoid dependent renal and cardiovascular diseases is a concern of doctors and pharmacists due to the high incidence of these diseases and the side effects associated with few therapeutic options.

Aldosterone, the main mineralocorticoid, is responsible for regulating electrolyte balance and blood pressure. Moreover, is a potent proinflammatory factor, induces the formation of reactive oxygen species (ROS) and increases the expression of genes responsible for fibrosis, culminating in cardiac and renal fibrosis. The effects of aldosterone can be genomic (activation of mineralocorticoid receptors (MRs)) and non-genomic (activation of MRs or of other membrane bound receptors, yet unidentified). High aldosterone levels are related to various chronic diseases, such as hypertension, cardiac fibrosis, congestive heart failure, ventricular remodeling and diabetic nephropathy.

The inhibition of aldosterone synthase (CYP11B2), the enzyme responsible for the final steps in aldosterone biosynthesis, may be a therapeutic alternative. Several studies were performed to evaluate possible CYP11B2 inhibitors. R-fadrozole (FAD286) was a success in several studies using animal models. LCI699, a structural derivative of FAD286, was evaluated in clinical trials but at higher doses a reduction of cortisol synthesis was observed.

In development of CYP11B2 inhibitors is necessary to take into account not only the power of the compound but also its selectivity. It was found that many of these compounds inhibit other cytochrome P450 enzymes, in particular 11 β -hydroxylase (CYP11B1) responsible for cortisol synthesis.

Recently, many selective CYP11B2 inhibitors were identified and the beneficial effects in the treatment of congestive heart failure and diabetic nephropathy were reported, but there is no clinical research up to date. However, clinical success would be very important since there is a therapeutic need for aforementioned diseases.

Lista de Abreviaturas

- 3 β -HSD – 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
- ACTH – hormona adrenocorticotrópica
- ADAMTS1 – desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina
- Ang II – angiotensina II
- b.i.d. – aplicação duas vezes por dia
- CYP11A1 – colesterol desmolase
- CYP11B1 – 11 β -hidroxilase
- CYP11B2 – aldosterona sintase
- CYP17 – 17 α -hidroxilase-17,20-liase
- CYP19 – aromatase
- CYP21 – 21-hidroxilase
- DOC – 11-deoxicorticosterona
- FAD286 – R-Fadrozole
- LCI699 – (R)-4-(6,7-dihidro-5H-pirrol-[1,2-c]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo
- mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
- MRs – recetores mineralcorticóides
- PA – aldosteronismo primário
- PAI-1 – inibidor do plasminogénio ativador tipo I
- q.d. – uma vez por dia
- RGS2 – regulador de sinalização da proteína G 2
- ROS – espécies reativas de oxigénio
- SF – fator de seletividade
- TGF- β 1 – fator de transformação do crescimento β 1
- TNX – tenascina X
- UPAR – recetor do ativador do plasminogénio tipo uroquinase
- V79 MZ cells – fibroblastos de pulmão de hamster chinês

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura da espironolactona.....	4
Figura 2 – Biossíntese da aldosterona.....	6
Figura 3 – Inibidores esteroides da biossíntese da aldosterona.....	7
Figura 4 – Estrutura de uma amidino-hidrazona relacionada com o guanabenz (composto 2) e do cetoconazol.....	8
Figura 5 – Estrutura do fadrozole e do FAD286.....	8
Figura 6 – Estrutura do LCI699.....	9
Figura 7 – Composto 3.....	10
Figura 8 – Composto 4.....	11
Figura 9 – Estrutura dos compostos 5 a 7.....	11
Figura 10 – Estrutura dos compostos 8 a 10.....	12
Figura 11 – Composto 11.....	13
Figura 12 – Estrutura dos compostos 12 a 14.....	13
Figura 13 – Compostos 15 e 16.....	14

I. Introdução

As doenças renais e cardiovasculares mineralocorticóide-dependentes são, como a própria designação sugere, relacionadas com a ação de um mineralocorticóide. O principal mineralocorticóide é a aldosterona, uma hormona esteróide produzida pelas células glomerulosas do córtex suprarrenal [1]. A sua produção é regulada pela angiotensina II (Ang II) e pelos níveis de potássio, bem como pela hormona adrenocorticotropica (ACTH) [2]. A sua principal função é a regulação do balanço eletrolítico (sódio e potássio) e da pressão sanguínea e, por isso, está relacionada com a fisiopatologia de doenças renais e cardiovasculares [3]. As referidas doenças já há muitos anos que têm uma grande incidência na população e, por isso, são motivo de preocupação no sentido em que existem poucos fármacos para o seu tratamento e os que existem têm associados efeitos secundários graves.

O objetivo deste trabalho é abordar as possíveis alternativas aos fármacos atualmente usados no tratamento de doenças renais e cardiovasculares mineralocorticóide-dependentes. Por outro lado, pretende-se verificar que desenvolvimento já existe nesta área e perceber qual a tendência num futuro próximo.

Numa primeira parte serão referidos os efeitos da aldosterona a nível renal e cardiovascular, depois será feita uma abordagem aos inibidores dos recetores mineralocorticóides como a espironolactona e, por fim, será referido o papel da aldosterona sintase na biossíntese da aldosterona e serão enumeradas algumas moléculas que são potenciais candidatas no desenvolvimento de fármacos inibidores da aldosterona sintase.

Para a realização deste trabalho foi feita uma pesquisa bibliográfica que incidiu sobre artigos científicos, a maioria deles muito recentes, publicados em revistas científicas de renome.

2. Doenças renais e cardiovasculares mineralocorticóide-dependentes

2.1. Aldosterona nas doenças cardiovasculares

2.1.1. Efeitos genómicos

Os efeitos genómicos são mediados pela ativação dos recetores mineralcorticóides (MRs). Nas células epiteliais do nefrónio distal, a aldosterona liga-se aos MRs e ativa-os, dá-se a modulação dos canais de sódio epiteliais para reter sódio e água mas excretar potássio levando a um aumento do volume e pressão sanguíneos [4].

2.1.2. Efeitos não genómicos

Os efeitos não genómicos são controlados tanto pelos MRs como por outros recetores de membrana e não requerem sinalização através das vias clássicas de ativação de genes, transcrição e síntese de proteínas [1]. A aldosterona leva a vasoconstrição com efeitos exacerbados na hipertensão crónica, porque é responsável pelo aumento das concentrações de sódio intracelular nas células do músculo liso vascular e aumenta a expressão da adrenomedulina e do regulador de sinalização da proteína G 2 (RGS2) [5]. Além disso, a aldosterona é um potente fator pro-inflamatório e induz espécies reativas de oxigénio (ROS) [6].

2.1.3. Consequências das concentrações elevadas de aldosterona

Através dos mecanismos referidos anteriormente, níveis elevados de aldosterona causam fibrose vascular e aumento da espessura do endotélio vascular, causando aterosclerose [4]. Além disso, a aldosterona também regula um conjunto de genes relacionados com a fibrose: tenascina X (TNX), recetor do ativador do plasminogénio tipo uroquinase (UPAR), desintegrina e metaloproteinase com motivos trombospondina (ADAMTS1) [7]. A expressão aumentada dos referidos genes em conjunto com processos de inflamação vai levar a fibrose cardíaca devido a necrose dos cardiomiócitos, síntese de colagénio e proliferação de fibroblastos. Todos os efeitos referidos levam a alterações ventriculares e hipertrofia cardíaca e, conseqüentemente, a uma deterioração estrutural acompanhada de degradação funcional. O facto de se alterar a estrutura do ventrículo, reduz

o volume sistólico e diminui a capacidade contrátil, provoca disfunções na diástole e termina em insuficiência cardíaca [4].

A aldosterona quando apresenta níveis elevados em circulação, cuja produção não é controlada pelo sistema renina–angiotensina–aldosterona, é sinal de aldosteronismo primário (PA). Esta é uma doença rara em que a produção exagerada de aldosterona está relacionada com um adenoma nas glândulas suprarrenais. Recentemente, a sua prevalência aumentou, devido a possível associação com a obesidade [8]. Correntemente, o PA é a causa mais frequente de hipertensão secundária, sendo responsável por mais de 10% dos casos hipertensivos, em particular, da hipertensão resistente.

2.2. Aldosterona nas doenças renais

A ação da aldosterona a nível renal é similar à ação a nível cardíaco. Esta aumenta os níveis de alguns fatores de crescimento pro-escleróticos como o inibidor do plasminogénio ativador tipo I (PAI-I) e o fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1). A expressão aumentada destes fatores, em conjunto com a inflamação crónica induzida pela aldosterona, leva a lesões glomerulares, danos tubulares e fibrose intersticial [9].

2.2.1. Consequências das concentrações elevadas de aldosterona

A aldosterona causa proteinúria dado que consegue diminuir a expressão do sulfato de heparano, um constituinte da membrana glomerular. Estes efeitos no rim são especialmente graves em casos de nefropatia diabética, uma complicação desenvolvida por mais de 40% dos doentes diabéticos [10].

As concentrações muito elevadas de aldosterona provocam a secreção de cálcio pela urina e pelas fezes e, também levam à sobre-regulação da hormona paratiroideia, conduzindo à redução da concentração de cálcio no plasma e, conseqüentemente, à diminuição da densidade mineral óssea [11].

3. Antagonistas dos Recetores Mineralocorticóides

3.1. Espironolactona

A espironolactona (Figura 1) é um antagonista dos MRs, responsável pela diminuição da mortalidade em doentes com insuficiência cardíaca congestiva ou com disfunção ventricular esquerda após enfarte do miocárdio [12]. Este fármaco é considerado um diurético poupador de potássio e tem como indicações terapêuticas: edemas refratários em doentes com insuficiência cardíaca, síndrome nefrótica ou cirrose hepática e em algumas situações de hiperaldoesteronismo.

A função 3-ceto-4-eno no anel A é essencial para a atividade antagonista e a abertura da lactona reduz a atividade. O substituinte 7 α - aumenta a atividade [13].

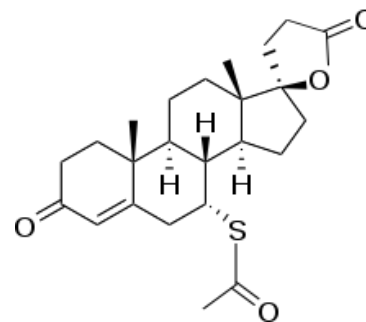


Figura 1 – Estrutura da espironolactona

3.2. Mecanismo de ação

A espironolactona compete com a aldosterona para a ligação aos MRs. Os complexos espironolactona–recetor são incapazes de estimular a produção de novo de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e proteínas nos tecidos alvo e originar as respostas biológicas da hormona agonista (aldosterona). A ligação da espironolactona aos MRs, no rim, resulta numa resposta diurética (aumento da excreção de Na⁺ e da retenção de K⁺) [13].

3.3. Efeitos secundários

Os antagonistas dos MRs provocam hipercaliémia severa e levam ao aumento dos efeitos independentes dos MRs devido à acumulação de renina e aldosterona. Além disso, a espironolactona apresenta fraca seletividade para os MRs dado que tem afinidade para os recetores da progesterona e dos androgénios, causando efeitos progestagénicos e antiandrogénicos [12]. O uso prolongado está associado a ginecomastia nos homens, disfunções sexuais e irregularidades menstruais [1]. Tendo em conta estes problemas, a inibição da aldosterona sintase (CYP11B2) poderá ser uma alternativa no tratamento de doenças relacionadas com a aldosterona.

4. Inibidores da aldosterona sintase

4.1. Papel da CYP11B2 na biossíntese da aldosterona

A CYP11B2 é uma enzima do citocromo P450 responsável pelos passos finais na biossíntese da aldosterona a partir do colesterol.

A enzima colesterol desmolase (CYP11A1) medeia a conversão do colesterol em pregnenolona, o primeiro passo na biossíntese de hormonas esteroides. A biossíntese dos mineralcorticóides ocorre na zona glomerulosa das glândulas suprarrenais, onde não existe 17 α -hidroxilase-17,20-liase (CYP17); a pregnenolona é convertida a progesterona pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) e depois dá-se a conversão a 11-desoxicorticosterona (DOC) pela 21-hidroxilase (CYP21). Formada a DOC, a CYP11B2 procede a uma hidroxilação na posição 11 β e forma-se a corticosterona. De seguida, a mesma enzima, procede a duas oxidações sequencias no Carbono 18, com libertação de água e formação da aldosterona [14]. Um ensaio em ratinhos com ausência da CYP11B2 mostrou que a deficiência em aldosterona previne os danos cardíacos, renais e vasculares induzidos pela angiotensina II (Ang II), assim confirma-se os efeitos patológicos da aldosterona [15].

4.2. Isoenzimas

A 11 β -hidroxilase (CYP11B1), uma isoforma da CYP11B2, é responsável pela síntese do cortisol a partir do colesterol [14]. A homologia entre estas isoformas é bastante elevada dado que as suas sequências de aminoácidos apresentam uma semelhança de 93.9%. Na sequência do que foi dito em 4.1., há zonas das glândulas suprarrenais onde existe a CYP17 que pode proceder uma hidroxilação na posição 17 da pregnenolona e da progesterona, dando origem a 17-hidroxipregnenolona e 17-hidroxiprogesteronona, respetivamente. A 17-hidroxiprogesteronona pode ser convertida a 11-desoxicortisol pela CYP21 e, por fim, atua a CYP11B1 que procede a uma hidroxilação na posição 11 β e dá origem ao cortisol, o principal glucocorticoide humano [4][14].

4.3. Outras enzimas do Citocromo P450

Na zona reticular, a CYP17 pode converter a 17-hidroxipregnenolona e a 17-hidroxiprogesterona em dehidroepiandrosterona e androstenediona. Estes dois esteroides são os precursores dos androgénios, a testosterona e a di-hidrotestosterona, que através da catalise da aromatase (CYP19), dão origem aos estrogénios [14].

Pelo que foi dito anteriormente, conclui-se que os inibidores da CYP11B2 têm de ser seletivos, ou seja, não podem inibir outras enzimas importantes na biossíntese dos esteroides.

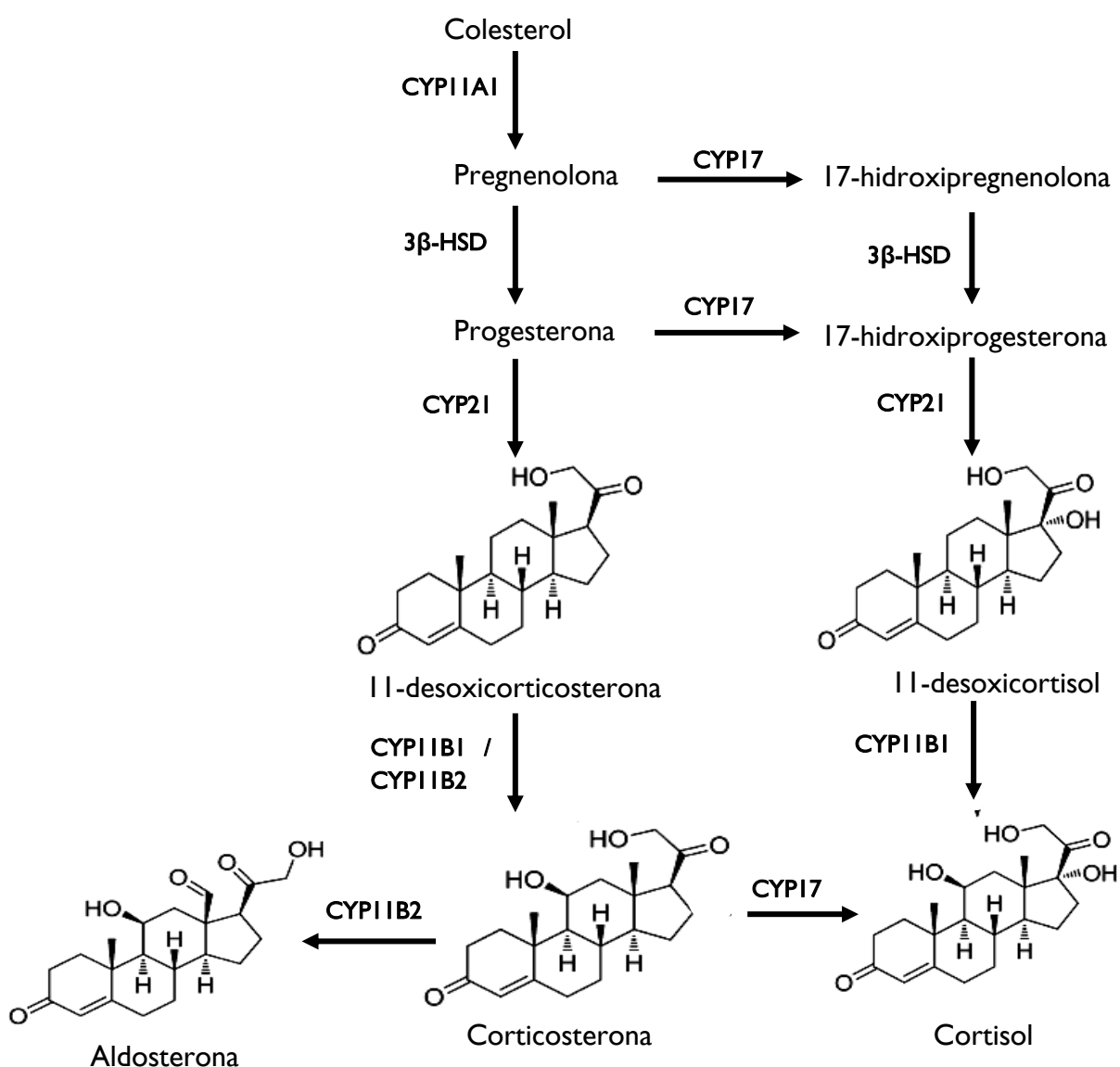


Figura 2 – Biossíntese da aldosterona

(Adaptado de *J. Med. Chem.*, 2014, vol. 57, p. 5012)

4.4. Exemplos de Inibidores da CYP11B2

4.4.1. Compostos esteroides

A mespirenona, um derivado da espironalactona (Figura 3), mostrou ser um inibidor potente e muito específico dos MRs e um inibidor da síntese de mineralocorticóides, *in vitro*. Numa concentração de 100µM, verificou-se uma redução superior a 40% na produção de aldosterona e do seu precursor 18-OH-corticosterona, mas observou-se um aumento significativo de corticosterona. Por outro lado, os níveis de androstenodiona permaneceram inalterados mostrando que a mespirenona não inibe a síntese de androgénios [16].

Um estudo usando células das glândulas suprarrenais de ratos, mostrou que derivados da progesterona com substituição no carbono 18, como o composto I (Figura 3), são potentes inibidores da síntese de aldosterona [17].

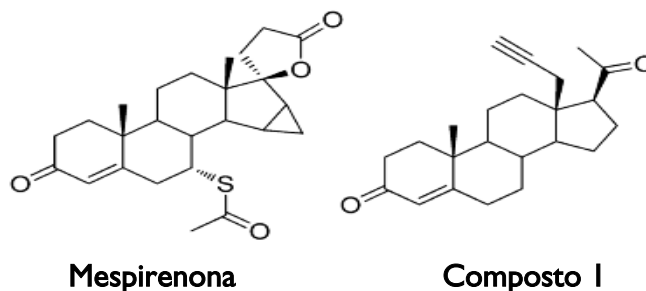


Figura 3 – Inibidores esteroides da biossíntese da aldosterona

4.4.2. Primeiros compostos não esteroides

Um estudo com células glomerulosas das glândulas suprarrenais mostrou que as amidino-hidrazonas relacionadas com o guanabenz, como o composto 2, inibiam a síntese da aldosterona (Figura 4) [18].

O cetoconazol (Figura 4), um conhecido fungicida, apresentou valores de IC₅₀ de 3.5µM para a hCYP11B2 mas verificou-se que também inibia a CYP11B1, ou seja, é um inibidor não seletivo. Outros compostos também apresentaram o mesmo problema, por exemplo, a metirapona e o *R*-etomidato [4]. Os referidos compostos têm um azoto com uma hibridização sp² no anel heterocíclico, esse azoto coordena-se com o ferro do grupo heme no centro catalítico e, assim, há uma inibição reversível da CYP11B2 [19]. Além disso, verificou-se que a introdução desse anel heterocíclico que se liga ao heme, reduz a possibilidade dos referidos compostos se ligarem aos recetores de esteróides.

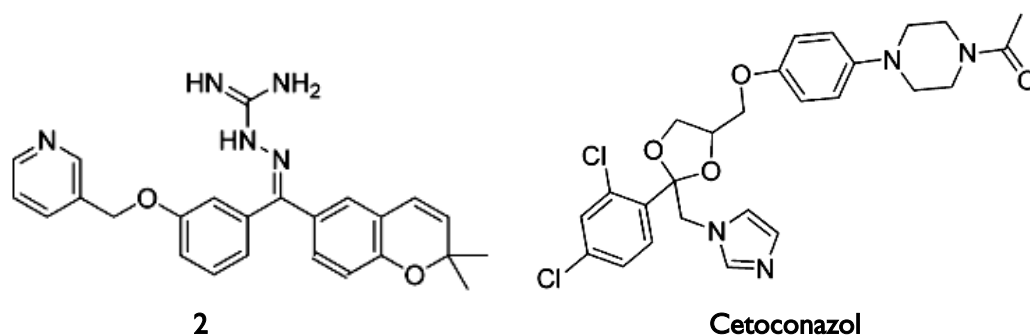


Figura 4 – Estrutura de uma amidino-hidrazona relacionada com o guanabenz (composto 2) e do cetoconazol

4.4.3. Fadrozole e seus derivados

4.4.3.1. Fadrozole

O Fadrozole foi, inicialmente, identificado como um inibidor da aromatase (CYP19). Mais tarde verificou-se que era um potente inibidor da síntese dos corticoides *in vitro* e *in vivo*. Contudo, a separação dos enantiômeros revelou que o R-Fadrozole (FAD286) inibia sobretudo a CYP11B2 ($IC_{50} = 6$ nM) mas o enantiômero S inibia preferencialmente a CYP11B1 [20].

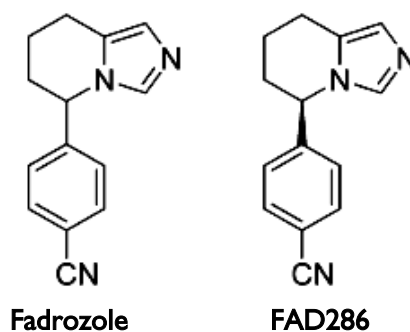


Figura 5 – Estrutura do fadrozole e do FAD286

Fiebeler, A., *et al.* (2005), realizaram um estudo com FAD286 em ratos transgênicos que sobre expressavam renina e angiotensinogênio. Em poucos dias, estes ratos morreram com hipertensão e danos severos no coração e nos rins, devido às elevadas concentrações de aldosterona no plasma. O tratamento com FAD286 levou à diminuição dos níveis de aldosterona em circulação e no coração, culminando numa redução significativa da mortalidade, alívio da fibrose do miocárdio e melhoramento da função renal. Contudo, não

se verificou influência significativa na pressão sanguínea nem na concentração de corticosterona e de renina [21].

Minnaard-Huiban, M., *et al.* (2008), testaram os enantiômeros do fadrozole em ratos com insuficiência cardíaca hipertensiva e verificou-se que só o enantiômero R era capaz de reverter a fibrose do miocárdio [22].

Mulder, P., *et al.* (2008), administraram FAD286 em ratos com insuficiência cardíaca congestiva após enfarte do miocárdio. Verificou-se um aumento do *output* cardíaco, diminuição da resistência periférica total e, também, uma reversão das alterações do ventrículo esquerdo com melhoria das suas funções e diminuição da acumulação de colagénio [23].

Lea, W. B., *et al.* (2009), verificaram que o FAD286 diminuía a aldosterona em circulação e provocava um pequeno aumento nos níveis de corticosterona, em ratos uninefrectomizados e com fibrose renal. No entanto, não houve alteração nas concentrações de sódio e potássio. O FAD286 prevenia os danos glomerulares, a fibrose intersticial cardíaca e a hipertrofia cardíaca e aórtica [24].

Gamliel-Lazarovich, A., *et al.* (2010), usaram ratinhos com deficiência em apolipoproteína E e verificaram que o FAD286 reduzia a aterosclerose e a inflamação sem alterar as concentrações plasmáticas de aldosterona [25].

Apesar do FAD286 apresentar resultados promissores em modelos experimentais, este nunca foi testado em ensaios clínicos.

4.4.3.2. (R)-4-(6,7-di-hidro-5H-pirrol-[1,2-c]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo

O (R)-4-(6,7-dihidro-5H-pirrol-[1,2-c]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo (LCI699), representado na Figura 6, é um análogo do Fadrozole e já foi testado em ensaios clínicos.

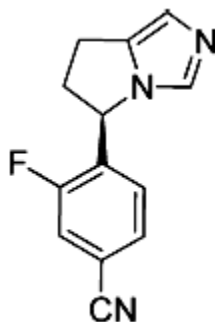


Figura 6 – Estrutura do LCI699

Menard, J., *et al.* (2010), realizaram um ensaio de fase I em pessoas saudáveis sem sódio, o LCI699 mostrou rápida absorção oral, atingindo a concentração máxima no plasma dentro de 1h, mas mostrou um baixo tempo de semi-vida tornando-se necessária a administração duas vezes por dia (b.i.d.). Uma aplicação diária de LCI699, durante sete dias, resultava numa diminuição de 53% e 36% dos níveis de aldosterona na urina e no plasma, respetivamente [26]. Com ou sem estimulação da hormona adrenocorticotrópica (ACTH), o LCI699 não inibe a biossíntese do cortisol numa dose de 0,5 mg uma vez por dia (q.d.). Contudo, em doses superiores a 3 mg q.d., verifica-se uma redução nas concentrações de cortisol no plasma e um bloqueio na resposta do cortisol á ACTH [1].

Como os ensaios de fase I mostraram que o LCI699 era bem tolerado e não se observaram efeitos adversos severos, este composto foi investigado em doentes com PA e com níveis elevados de aldosterona plasmática, hipertensão severa, e hipocaliémia [27][28]. O LCI699 numa dose de 0,5 mg b.i.d. e de 1,0 mg b.i.d., diminuiu as concentrações plasmáticas de aldosterona em 68% e 75%, respetivamente; sendo uma diminuição semelhante para ambas as concentrações. Por outro lado, os níveis plasmáticos de DOC aumentaram 710% e 1427% nas referidas concentrações, respetivamente. As concentrações plasmáticas de potássio também aumentaram rapidamente. Contudo, a melhoria na hipertensão foi moderada (-4,1 mmHg) e as concentrações plasmáticas de cortisol permaneceram inalteradas. Relativamente à ACTH, os níveis subiram 35% (considerado não significativo no ensaio) e 113% nas concentrações referidas [27].

4.4.3.3. Derivados do fadrozole

Foram obtidos vários compostos através de otimizações em todas as subestruturas do fadrozole (anéis tetra-hidropiridina, imidazole; substituinte fenilo), verificou-se a sua potência através do IC_{50} e a sua seletividade pelo fator de seletividade (SF).

O composto **3** (Figura 7) resulta da omissão de um ciclo tetra-hidropiridina e introdução de um fenilo na posição 5 do imidazole. Este composto foi avaliado em ensaios com fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79 MZ cells) que expressavam CYP11B2 ou CYP11B1 e mostrou ser o mais potente ($IC_{50} = 1,7$ nM) e o mais seletivo (SF = 16,5), dentro desta série [29].

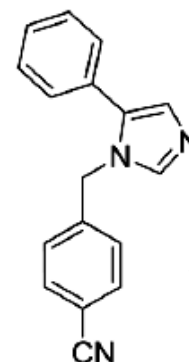


Figura 7 – Composto 3

4.4.4. Indóis, benzimidazóis e derivados

A introdução de um azoto adicional, na estrutura de um indole, permite obter inibidores com núcleos do tipo benzimidazole, imidazopiridina, pirazolopiridina e triazolopiridina. Num ensaio em células V79MZ que expressavam CYP11B1 e CYP11B2, o composto **4** (Figura 8) mostrou uma potente inibição da CYP11B2 ($IC_{50} = 0,15$ nM) e uma excelente seletividade para a CYP11B1 (SF > 1000).

Foram conseguidos outros derivados de indóis e benzimidazóis, mas influenciavam a formação de cortisol ou eram poucos seletivos [4].

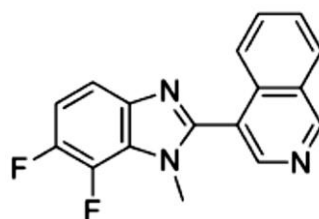


Figura 8 – Composto 4

4.4.5. Indanos, naftalenos e derivados

Através do *screening* de uma biblioteca de cerca de 500 compostos, identificaram-se dois compostos (composto **5** e **6**, Figura 9) como potentes inibidores com IC_{50} à volta de 50 nM, mas a sua seletividade era muito fraca (SF < 5) [30].

Os compostos que apresentam grupos 3-piridina, 4-isoquinolina ou 5-pirimidina complexados com o heme são muito seletivos. O composto **7** é muito potente para a hCYP11B2 ($IC_{50} = 6$ nM) e possui um SF de 120 [31].

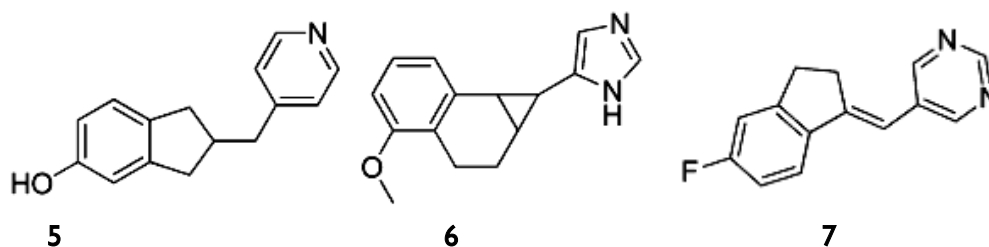


Figura 9 – Estrutura dos compostos 5 a 7

Manipulações nos anéis dos compostos desta série de inibidores, através da incorporação da sua dupla ligação exocíclica num novo ciclo condensado com o núcleo benzeno e da remoção do anel alifático original, levaram à obtenção de naftalenos e dihidronaftalenos [32][33]. Esta nova classe de inibidores da CYP11B2 detinha compostos bastante potentes mas pouco seletivos. No sentido de melhorar a seletividade, introduziu-se um núcleo indeno em substituição do naftaleno e, assim, obteve-se o composto mais seletivo desta classe, o composto **8** ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$, $SF = 1421$) [33].

Alguns compostos desta classe mostraram perfis de inibição favoráveis para as enzimas hepáticas CYP (CYP3A4 e CYP2D6), contudo verificou-se que também eram potentes inibidores da CYP1A2 e, por isso, não foram considerados fármacos candidatos. Neste sentido, vários derivados desses compostos foram testados, como por exemplo, o composto **9** ($IC_{50} = 7,8 \text{ nM}$, $SF = 496$) que resulta da redução da aromaticidade do núcleo naftaleno e introdução de grupos polares. Este composto apresentou níveis muito baixos de inibição da CYP1A2, ainda assim, tentou-se reduzir a zero essa inibição mas os compostos obtidos não eram viáveis [34].

A análise do modelo de um farmacóforo e a simulação das suas possíveis ligações ao alvo permitiu identificar uma região hidrofóbica, tendo sido ocupada por um radical benzilo para-substituído ligado ao núcleo naftaleno. Daqui resultou uma série de inibidores da CYP11B2, altamente potentes e seletivos, tal como o composto **10** ($IC_{50} = 3,9 \text{ nM}$, $SF = 913$) [35].

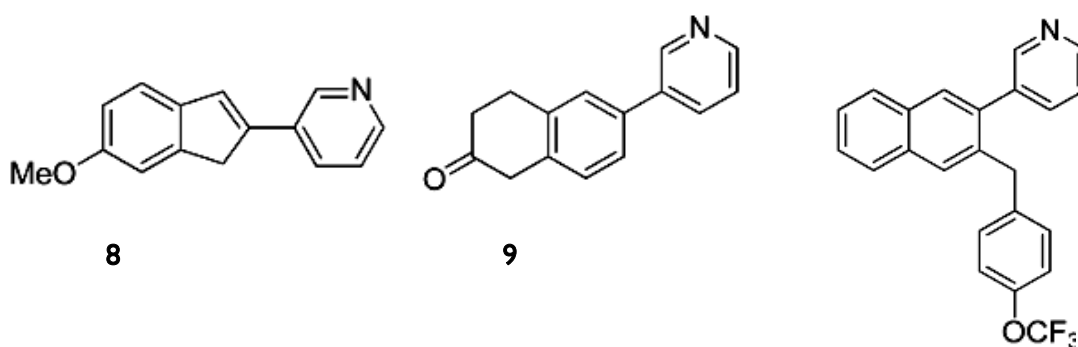


Figura 10 – Estrutura dos compostos 8 a 10

4.4.6. Di-hidroquinolinonas, di-hidropirrolquinolinonas, di-hidrotiazoloquinolinonas e derivados

O composto **9**, referido em 4.3.5., não foi considerado para novos estudos porque apresentou citotoxicidade numa linha de células humanas de leucemia histiocítica (células U-

937), em concentrações abaixo de 100 μM [34]. Este composto vai servir de base para o desenvolvimento de compostos nesta classe.

A fusão de um anel alquílico com a estrutura nuclear de **9**, permite obter análogos 5,6-di-hidro-1H-pirrol[3,2,1-ij]quinolin-4(2H)-ona, o que se revelou uma ótima modificação estrutural. O composto **11** é muito potente e seletivo ($\text{IC}_{50} = 1,1 \text{ nM}$, $\text{SF} = 650$) e não inibe a CYP17 nem a CYP19 (responsáveis pela síntese de androgénios e estrogénios, respetivamente) [36].

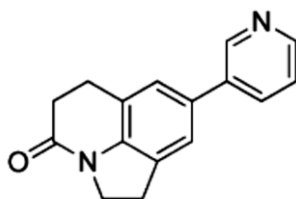


Figura 11 – Composto 11

O composto **12** mantém o núcleo dihidroquinolinona e é um potente inibidor ($\text{IC}_{50} = 1,4 \text{ nM}$) da síntese da aldosterona em células NCI-H295R. A introdução de átomos de azoto na parte aromática do núcleo mantém a potência inibitória e, outra substituição no anel piridil, aumenta a seletividade. Neste sentido, surge o composto **13** que ao ser testado numa linha células renais humanas de leiomioblastoma (células G402) que expressavam CYP11B1 e CYP11B2, apresentou um IC_{50} de 3nM e um SF de 1228. Além disto, a troca do oxigénio por azoto no anel lactâmico e o fecho do anel dá origem a uma série de compostos 4,5-di-hidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinolonas com um substituinte 3-piridil ou 4-isoquinolona. O melhor composto desta classe, composto **14**, não só apresenta uma potente inibição da CYP11B2 ($\text{IC}_{50} = 4.2 \text{ nM}$) e uma excelente seletividade sobre a CYP11B1 ($\text{SF} = 421$) como também mostrou não inibir a CYP17, a CYP19 e um conjunto de enzimas hepáticas CYP [4].

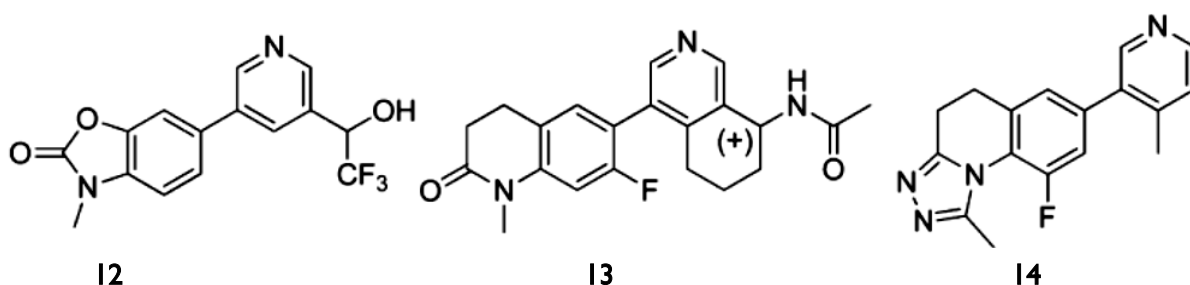


Figura 12 – Estrutura dos compostos 12 a 14

5. Inibição dual das CYP19/CYP11B2 e das CYP17/HCY11B2

Os inibidores da CYP19 e da CYP17 são usados no tratamento de doentes com cancro da mama e da próstata, respetivamente [37]. A inibição da CYP19 e CYP17 leva à deficiência em estrogénios ou androgénios, respetivamente. Essa deficiência ativa diretamente o sistema renina–angiotensina–aldosterona, aumenta os níveis de potássio no plasma, causa a acumulação de progesterona e interfere com o metabolismo das lipoproteínas. Desta forma, vai existir aumento dos níveis de aldosterona que serão a causa mais provável para o aumento da incidência de doenças cardiovasculares nesses doentes.

A inibição dual das CYP19/CYP11B2 e das CYP17/CYP11B2 apresenta-se como uma nova estratégia no tratamento do cancro da mama e da próstata para reduzir o risco de doenças cardiovasculares [38]. Esta ideia de atuar em vários alvos em simultâneo parece ter algumas vantagens, tais como, a redução do risco de interação fármaco–fármaco e melhoria na adesão à terapêutica.

Os primeiros inibidores dual para reduzir a incidência de doenças cardiovasculares nos referidos doentes, são o composto **15** ($IC_{50\text{ CYP19}} = 49\text{ nM}$ e $IC_{50\text{ CYP11B2}} = 19\text{ nM}$) e **16** ($IC_{50\text{ CYP17}} = 11\text{ nM}$ e $IC_{50\text{ CYP11B2}} = 13\text{ nM}$) [39][40].

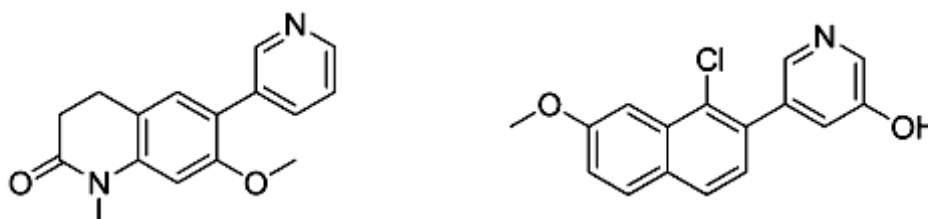


Figura 13 – Compostos 15 e 16

Estas estratégias encontram-se numa fase preliminar, sendo necessários mais estudos em modelos celulares e animais, para provar o conceito.

6. Conclusão

Nas últimas décadas, a aldosterona foi alvo de intensivos estudos numa tentativa de se perceber os efeitos que provoca a nível renal e cardiovascular. Contudo, ainda não é clara a forma como os efeitos genómicos e não genómicos da aldosterona contribuem para a patogénese das doenças crónicas renais e cardiovasculares, lesão de órgãos alvo, síndrome metabólico e hipertensão resistente [1]. Dado que os efeitos provocados por níveis elevados de aldosterona contribuem para a mortalidade e morbilidade das doenças renais e cardiovasculares, torna-se cada vez mais importante a descoberta de estratégias alternativas aos antagonistas dos MRs.

O R-fadrozole (FAD286) foi um sucesso em vários estudos usando animais como modelo de doença mas não foi usado em ensaios clínicos. O LCI699, um derivado estrutural do FAD286, foi avaliado em ensaios clínicos com doentes com PA e hipertensão. Contudo, os efeitos farmacológicos eram moderados para pequenas doses e em doses mais elevadas verificava-se uma redução na síntese do cortisol. Muitos outros compostos foram surgindo e alguns foram alvo de registo de patentes mas ainda não se chegou a nenhum composto que fosse considerado um candidato a fármaco.

O desenvolvimento de inibidores da CYP11B2 é uma tarefa difícil porque não se consegue estimar qual a seletividade necessária para que não haja problemas na inibição de outras enzimas do citocromo P450; além de que também não se sabe qual a potência necessária para se produzirem efeitos terapêuticos. Pelos estudos efetuados, considera-se que uma seletividade 100 vezes superior em relação à CYP11B1 e outras enzimas esteroideogénicas do citocromo P450 pode ser suficiente para se obter os benefícios clínicos desejados sem os efeitos negativos de se inibirem outras enzimas do citocromo P450.

Além dos problemas referidos, a inibição da CYP11B2 apresenta outros riscos, tais como: a acumulação de DOC pode fazer com que este precursor atue como um substituinte da aldosterona nos MRs; os MRs cardíacos podem permanecer ativos no local, ocupados por cortisol em vez de aldosterona; e, essa inibição em combinação com os antagonistas dos MRs pode levar hipoaldosteronismo severo [1].

Recentemente, foram identificados muitos inibidores seletivos da CYP11B2, mas nada se sabe sobre os seus efeitos clínicos ou a sua possibilidade de desenvolvimento. Observou-se, em modelos animais, efeitos benéficos no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e da nefropatia diabética, mas ainda não há investigação clínica. Será um passo muito importante a translação deste sucesso para humanos, dado que existe uma necessidade de fármacos para as doenças anteriormente referidas.

7. Bibliografia

- [1] AZIZI, M.; AMAR, L.; MENARD, J. – **Aldosterone synthase inhibition in humans.** *Nephrol. Dial. Transplant.*, Vol. 28, 1 (2013) 36–43.
- [2] STRUSHKEVICH, N.; GILEP, A. A.; SHEN, L.; ARROWSMITH, C. H.; EDWARDS, A. M.; USANOV, S. A.; PARK, H. W. – **Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition.** *Mol. Endocrinol.*, Vol. 27, 2 (2013) 315–24.
- [3] KARNS, A. D.; BRAL, J. M.; HARTMAN, D.; PEPPARD, T.; SCHUMACHER, C. – **Study of aldosterone synthase inhibition as an add-on therapy in resistant hypertension.** *J. Clin. Hypertens.*, Vol. 15, 3 (2013) 186–92.
- [4] HU, Q.; YIN, L.; HARTMANN, R. W. – **Aldosterone Synthase Inhibitors as Promising Treatments for Mineralocorticoid Dependent Cardiovascular and Renal Diseases.** *J. Med. Chem.*, Vol. 57, 12 (2014) 5011–5022.
- [5] DOOLEY, R.; HARVEY, B. J.; THOMAS, W. – **Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets.** *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol. 350, 2 (2012) 223–34.
- [6] FIEBELER, A.; LUFT, F. C. – **The mineralocorticoid receptor and oxidative stress.** *Heart Fail. Rev.*, Vol. 10, 1 (2005) 47–52.
- [7] FIEBELER, A.; MULLER, D. N.; SHAGDARSUREN, E.; LUFT, F. C. – **Aldosterone, mineralocorticoid receptors, and vascular inflammation.** *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, Vol. 16, 2 (2007) 134–142.
- [8] Tuck, M. L.; Sowers, J.; Dornfeld, L.; Kledzik, G.; Maxwell, M. – **The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients.** *N. Engl. J. Med.*, Vol. 304, 16 (1981) 930–933.
- [9] BLASI, E. R.; ROCHA, R.; RUDOLPH, A. E.; BLOMME, E. A.; POLLY, M. L.; MCMAHON, E. G. – **Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats.** *Kidney Int.*, Vol. 63, 5 (2003) 1791–1800.

- [10] VAN DEN HOVEN, M. J.; WAANDERS, F.; ROPS, A. L.; KRAMER, A. B.; VAN GOOR, H.; BERDEN, J. H.; NAVIS, G.; VAN DER VLAG, J. – **Regulation of glomerular heparanase expression by aldosterone, angiotensin II and reactive oxygen species.** *Nephrol. Dial. Transplant.*, Vol. 24, 9 (2009) 2637–2645.
- [11] CECCOLI, L.; RONCONI, V.; GIOVANNINI, L.; MARCHEGGIANI, M.; TURCHI, F.; BOSCARO, M.; GIACCHETTI, G. – **Bone health and aldosterone excess.** *Osteoporos. Int.*, Vol. 24, 11 (2013) 2801–7.
- [12] PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W. J.; CODY, R.; CASTAIGNE, A.; PEREZ, A.; PALENSKY, J.; WITTES, J. – **The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.** *N. Engl. J. Med.*, Vol. 341, 10 (1999) 709–717.
- [13] MILLER, D. D.; BRUEGGEMEIER, R. W.; DALTON, J. T. – **Adrenocorticoids.** In: Lemke, T. L.; Williams, D. A., *Foye's principles of medicinal chemistry.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. ISBN: 978-1609133450, p. 907–936.
- [14] BASSETT, M. H.; WHITE, P. C.; RAINEY, W. E. – **The regulation of aldosterone synthase expression.** *Mol. Cell. Endocrinol.*, Vol. 217, 1-2 (2004) 67–74.
- [15] LUTHER, J. M.; LUO, P.; WANG, Z.; COHEN, S. E.; KIM, H. S.; FOGO, A. B.; BROWN, J. – **Aldosterone deficiency and mineralocorticoid receptor antagonism prevent angiotensin II-induced cardiac, renal, and vascular injury.** *Kidney Int.*, Vol. 82, 6 (2012) 643–51.
- [16] WEINDEL, K.; LEWICKA, S.; VECSEI, P. – **Inhibitory effects of the novel anti-aldosterone compound mespirenone on adrenocortical steroidogenesis in vitro.** *Arzneimittelforschung.*, Vol. 41, 9 (1991) 946–949.
- [17] VIGER, A.; COUSTAL, S.; PERARD, S.; CHAPPE, B.; MARQUET, A. – **Synthesis and activity of new inhibitors of aldosterone biosynthesis.** *J. Steroid Biochem.*, Vol. 30, 1-6 (1988) 469–472.
- [18] SOLL, R. M.; DOLLINGS, P. J.; MITCHELL, R. D.; HAFNER, D. A. – **Guanabenz-related amidinohydrazones: Potent non-azole inhibitors of aldosterone biosynthesis.** *Eur. J. Med. Chem.*, Vol. 29, 3 (1994) 223–232.

- [19] HARTMANN, R. W.; BAYER, H.; GRÜN, G. – **Aromatase inhibitors. Syntheses and structure-activity studies of novel pyridyl-substituted indanones, indans, and tetralins.** *J. Med. Chem.*, Vol. 37, 9 (1994) 1275–1281.
- [20] ROUMEN, L.; SANDERS, M. P. A.; PIETERSE, K.; HILBERS, P. A. J.; PLATE, R.; CUSTERS, E.; DE GOOYER, M.; SMITS, J. F. M.; BEUGELS, I.; EMMEN, J.; OTTENHEIJM, H. C. J.; LEYSEN, D.; HERMANS, J. J. R. – **Construction of 3D models of the CYP11B family as a tool to predict ligand binding characteristics.** *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, Vol. 21, 8 (2007) 455–471.
- [21] FIEBELER, A.; NUSSBERGER, J.; SHAGDARSUREN, E.; RONG, S.; HILFENHAUS, G.; AL-SAAD, N.; WELLNER, M.; MEINERS, S.; MASER-GLUTH, C.; JENG, A. Y.; WEBB, R. L.; LUFT, F. C.; MULLER, D. N. – **Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage.** *Circulation*, Vol. 111, 23 (2005) 3087–3094.
- [22] MINNAARD-HUIBAN, M.; EMMEN, J. M. A.; ROUMEN, L.; BEUGELS, I. P. E.; COHUET, G. M. S.; VAN ESSEN, H.; RUIJTERS, E.; PIETERSE, K.; HILBERS, P. A. J.; OTTENHEIJM, H. C. J.; PLATE, R.; DE GOOYER, M. E.; SMITS, J. F. M.; HERMANS, J. J. R. – **Fadrozole reverses cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive heart failure rats: discordant enantioselectivity versus reduction of plasma aldosterone.** *Endocrinology*, Vol. 149, 1 (2008) 28–31.
- [23] MULDER, P.; MELLIN, V.; FAVRE, J.; VERCAUTEREN, M.; REMY-JOUET, I.; MONTEIL, C.; RICHARD, V.; RENET, S.; HENRY, J. P.; JENG, A. Y.; WEBB, R. L.; THUILLEZ, C. – **Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone.** *Eur. Heart J.*, Vol. 29, 17 (2008) 2171–9.
- [24] LEA, W. B.; KWAK, E. S.; LUTHER, J. M.; FOWLER, S. M.; WANG, Z.; MA, J.; FOGO, A. B.; BROWN, N. J. – **Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt.** *Kidney Int.*, Vol. 75, 9 (2009) 936–44.
- [25] GAMLIEL-LAZAROVICH, A.; GANTMAN, A.; COLEMAN, R.; JENG, A. Y.; KAPLAN, M.; KEIDAR, S. – **FAD286, an aldosterone synthase inhibitor, reduced atherosclerosis and inflammation in apolipoprotein E-deficient mice.** *J. Hypertens.*, Vol. 28, 9 (2010) 1900–1907.

- [26] MENARD, J.; WATSON, C.; REBELLO, S.; ZHANG, Y. M.; DOLE, W. P. – **Hormonal and electrolyte responses to the aldosterone synthase inhibitor LCI699 in sodium depleted healthy subjects.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, Vol. 55, 10 (2010) A61.E583–A61.E583.
- [27] AMAR, L.; AZIZI, M.; MENARD, J.; PEYRARD, S.; WATSON, C.; PLOUIN, P. F. – **Aldosterone synthase inhibition with LCI699: A proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism.** *Hypertension*, Vol. 56, 5 (2010) 831–838.
- [28] AMAR, L.; AZIZI, M.; MENARD, J.; PEYRARD, S.; PLOUIN, P. F. – **Sequential comparison of aldosterone synthase inhibition and mineralocorticoid blockade in patients with primary aldosteronism.** *J. Hypertens.*, Vol. 31, 3 (2013) 624–629.
- [29] ROUMEN, L.; PEETERS, J. W.; EMMEN, J. M. A.; BEUGELS, I. P. E.; CUSTERS, E. M. G.; DE GOOYER, M.; PLATE, R.; PIETERSE, K.; HILBERS, P. A. J.; SMITS, J. F. M.; VEKEMANS, J. A. J.; LEYSEN, D.; OTTENHEIJM, H. C. J.; JANSSEN, H. M.; HERMANS, J. J. R. – **Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 1-benzyl-1H-imidazoles as selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2).** *J. Med. Chem.*, Vol. 53, 4 (2010) 1712–1725.
- [30] HARTMANN, R. W.; MÜLLER, U.; EHMER, P. B. – **Discovery of selective CYP11B2 (aldosterone synthase) inhibitors for the therapy of congestive heart failure and myocardial fibrosis.** *Eur. J. Med. Chem.*, Vol. 38, 4 (2003) 363–366.
- [31] ULMSCHNEIDER, S.; MÜLLER-VIEIRA, U.; KLEIN, C. D.; ANTES, I.; LENGAUER, T.; HARTMANN, R. W. – **Synthesis and evaluation of (pyridylmethylene)tetrahydronaphthalenes/-indanes and structurally modified derivatives: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase.** *J. Med. Chem.*, Vol. 48, 5 (2005) 1563–1575.
- [32] VOETS, M.; ANTES, I.; SCHERER, C.; MÜLLER-VIEIRA, U.; BIEMEL, K.; BARASSIN, C.; OBERWINKLER-MARCHAIS, S.; HARTMANN, R. W. – **Heteroaryl-substituted naphthalenes and structurally modified derivatives: Selective inhibitors of CYP11B2 for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis.** *J. Med. Chem.*, Vol. 48, 21 (2005) 6632–6642.

- [33] M. VOETS, I. ANTES, C. SCHERER, U. MÜLLER-VIEIRA, K. BIEMEL, S. MARCHAIS-OBERWINKLER, AND R. W. HARTMANN, – **Synthesis and evaluation of heteroaryl-substituted dihydronaphthalenes and indenes: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2) for the treatment of congestive heart failure and myocardial fibrosis.** *J. Med. Chem.*, Vol. 49, 7 (2006) 2222–2231.
- [34] LUCAS, S.; HEIM, R.; RIES, C.; SCHEWE, K. E.; BIRK, B.; HARTMANN, R. W. – **In vivo active aldosterone synthase inhibitors with improved selectivity: Lead optimization providing a series of pyridine substituted 3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one derivatives.** *J. Med. Chem.*, Vol. 51, 24 (2008) 8077–8087.
- [35] LUCAS, S.; HEIM, R.; NEGRI, M.; ANTES, I.; RIES, C.; SCHEWE, K. E.; BISI, A.; GOBBI, S.; HARTMANN, R. W. – **Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach.** *J. Med. Chem.*, Vol. 51, 19 (2008) 6138–6149.
- [36] LUCAS, S.; NEGRI, M.; HEIM, R.; ZIMMER, C.; HARTMANN, R. W. – **Fine-tuning the selectivity of aldosterone synthase inhibitors: Structure-activity and structure-selectivity insights from studies of heteroaryl substituted 1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one derivatives.** *J. Med. Chem.*, Vol. 54, 7 (2011) 2307–2319.
- [37] GOBBI, S.; CAVALLI, A.; BISI, A.; RECANATINI, M. – **From nonsteroidal aromatase inhibitors to multifunctional drug candidates: classic and innovative strategies for the treatment of breast cancer.** *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol. 8, (2008) 869–887.
- [38] YIN, L.; HU, Q.; HARTMANN, R. W. – **Tetrahydropyrroloquinolinone type dual inhibitors of aromatase/aldosterone synthase as a novel strategy for breast cancer patients with elevated cardiovascular risks.** *J. Med. Chem.*, Vol. 56, 2 (2013) 460–470.
- [39] HU, Q.; YIN, L.; HARTMANN, R. W. – **Selective dual inhibitors of CYP19 and CYP11B2: Targeting cardiovascular diseases hiding in the shadow of breast cancer.** *J. Med. Chem.*, Vol. 55, 16 (2012) 7080–7089.
- [40] PINTO-BAZURCO MENDIETA, M. A. E.; HU, Q.; ENGEL, M.; HARTMANN, R. W. – **Highly potent and selective nonsteroidal dual inhibitors of CYP17/CYP11B2 for the treatment of prostate cancer to reduce risks of cardiovascular diseases.** *J. Med. Chem.*, Vol. 56, 15 (2013) 6101–6107.