

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata

NÚCLEO DISCIPLINAR: Química Fina

TÍTULO DEL TRABAJO: **CONSTRUCCIÓN, VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE UN MODELO QSAR PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES ANTIEPILÉPTICOS.**

AUTOR/ES: Alan Talevi, Julián J. Prieto, Eduardo Castro, Luis E. Bruno – Blanch.

E-MAIL DE LOS AUTORES: atalevi@biol.unlp.edu.ar, lbb@biol.unlp.edu.ar.

PALABRAS CLAVES: Virtual screening – topología molecular – anticonvulsivos - QSAR.

PALAVRAS-CHAVES: Virtual screening – topología molecular – anticonvulsivos - QSAR.

1. INTRODUCCIÓN.

a. Sobre los estudios QSAR.

En las últimas décadas la Química Medicinal ha desarrollado sendas metodologías que apuntan a:

- a) racionalizar el desarrollo de nuevos compuestos
- b) facilitar la búsqueda de propiedades insospechadas en compuestos ya conocidos, particularmente alguna actividad biológica de interés.

En particular, la Química Computacional saca partido de la gran capacidad de cálculo que aportan las nuevas tecnologías informáticas para minimizar el componente fortuito en la búsqueda de nuevas estructuras y de este modo optimizar –**no reemplazar**- el uso de las herramientas de síntesis y ensayo farmacológico, reduciendo los tiempos de selección de estructuras promisorias y la probabilidad de que la actividad observada de un compuesto promisorio no se corresponda finalmente con la actividad deseada, con la consiguiente economía de recursos materiales. De esta forma, la Química Experimental y la Química Computacional deben ser consideradas como ramas complementarias de la Ciencia Química con capacidad para realizar valiosos aportes mutuos.

En este contexto, el modelado y la predicción de propiedades fisicoquímicas y biológicas se ha ido transformando en un campo importante de desarrollo de la química contemporánea. Este tipo de estudios **se basa en el paradigma de que las propiedades físico-químicas y biológicas dependen de la estructura molecular**. Una de las metodologías utilizadas habitualmente son los estudios de Relación Cuantitativa Estructura – Actividad (*Quantitative Structure–Activity Relationship* – QSAR), que consisten en utilizar herramientas estadísticas (regresión lineal múltiple, redes neuronales, PLS) para vincular una serie de descriptores con la propiedad que se desea modelar o predecir, mediante un algoritmo de la forma:

$$\text{Propiedad} = f(\text{descriptor molecular 1, descriptor molecular 2, ..., descriptor molecular n})$$

donde el término *descriptores moleculares* se refiere a números que codifican información relevante acerca de la estructura de la molécula [1]. Estos parámetros pueden ser de naturaleza **empírica** (como es el caso del coeficiente de partición octanol – agua, de fácil determinación y significado físico - químico claro [2]) o **teórica** (como por ejemplo, los llamados índices topológicos (ITs) [1,3-6]). Asimismo, los hay de naturaleza bi, tri o tetradimensional; estos últimos consideran a la molécula como una entidad dinámica cuya conformación varía con el tiempo.

En síntesis: cualquier molécula puede ser representada como un vector formado por parámetros teóricos o empíricos que refieren información relevante de la molécula. En un estudio QSAR un conjunto de compuestos cuya propiedad físico – química o biológica de

interés ya ha sido determinada y cuantificada se utilizan para generar un modelo matemático que permitirá:

- establecer qué características estructurales están asociadas a la propiedad de interés, mediante la adecuada selección de los descriptores incorporados en el modelo y el peso relativo que cada descriptor tiene en el mismo. Por ejemplo: si el coeficiente de reparto octanol – agua tiene mucho peso en el modelo matemático, puede suponerse que la lipofilia de los compuestos es una característica importante para que exista actividad, y este parámetro deberá tenerse en cuenta a posteriori para el diseño de nuevas estructuras activas.
- predecir la actividad de otros compuestos distintos a los que se utilizaron en la construcción del modelo. Este último enfoque incluye el llamado **screening virtual o screening en silicio**, que consiste en seleccionar, entre grandes colecciones de estructuras, unos pocos candidatos para ser ensayados [7-10].

1.b. Uso de descriptores topológicos en estudios QSAR.

En la actualidad existe un enorme número de descriptores que puede ser utilizado en estudios QSAR [11,12]. Pese al continuo desarrollo de metodologías QSAR 3D y 4D, los descriptores 2D aún permanecen entre los descriptores más ampliamente utilizados en el desarrollo farmacéutico actual [4-6, 13,14]. Intuitivamente tendería a pensarse que dado que los descriptores 3D “capturan” o codifican más características de la estructura molecular que los descriptores 2D, aquellos serían más efectivos en la predicción de la actividad y selección de compuestos activos. No obstante, varios ejemplos en la literatura muestran que esta suposición no siempre se corresponde con la realidad [15-17]. Particularmente interesante nos parece en ese sentido el enfoque de Schuffenhauer y sus colaboradores [17], quienes han optado por sugerir que los dos tipos de descriptores son de naturaleza complementaria. A pesar de que los descriptores 2D no siempre presentan una interpretación físico-química clara, poseen en cambio algunas ventajas que deberían ser consideradas, particularmente su bajo “costo computacional” –lo que equivale a decir que son de cálculo sencillo – y la posibilidad de calcularlos para todas las estructuras químicas existentes, incluyendo las estructuras nuevas y aquellas en etapa de desarrollo, aún estructuras hipotéticas [1].

Los índices topológicos son entidades matemáticas derivadas de una representación simple de la molécula, el grafo, en la cual los vértices representan los átomos presentes en la estructura y los ejes hacen lo propio con los enlaces entre dichos átomos. En el grafo sólo se considera explícitamente la conectividad entre átomos distintos de hidrógeno. [1,5, 18]

Siguiendo el enfoque de Schuffenhauer el modelo generado en el presente trabajo combina dos descriptores topológicos con dos descriptores de naturaleza geométrica. Se presenta la metodología utilizada para construir el modelo, evaluar su solidez estadística, los resultados de las validaciones interna y externa y, finalmente, seis de las moléculas que el modelo seleccionó como más promisorias entre un conjunto de 5100 moléculas elegido al azar de entre una colección de casi dos millones de estructuras generada por nuestro equipo de trabajo en formato .mol.

1.c. Motivación.

La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes entre los que afectan la condición humana. La palabra epilepsia describe una enfermedad caracterizada por crisis epilépticas que van desde un breve lapso en la atención hasta convulsiones severas y frecuentes debidas a una liberación de neurotransmisores masiva y sincrónica en el sistema nervioso central. Alrededor de 50 millones de personas en el mundo sufren de epilepsia, especialmente en la infancia, adolescencia y vejez [18,19] Los tratamientos disponibles fracasan en el control de la enfermedad en un 30 % de los casos. En países en vías de

desarrollo, sin embargo, alrededor de tres cuartos de los pacientes no reciben el tratamiento que necesitan [18]. Más aún, incluso la nueva generación de drogas antiepilépticas causan importantes efectos adversos, entre ellos ataxia, diplopía, mareo, dolor de cabeza, náusea, sedación, alergias, enfermedades de la sangre y hepatotoxicidad [19]. De ahí que se necesiten con urgencia nuevos agentes antiepilépticos de mayor seguridad, menor toxicidad y mayor eficacia en el control de los pacientes sin tratamiento efectivo.

Usualmente las consecuencias sociales de la epilepsia son más difíciles de superar que las convulsiones en sí mismas. El miedo, la incomprensión y hasta la superstición son algunos de los problemas que enfrentan los pacientes epilépticos. En países como Camerún, India e Indonesia, la epilepsia es considerada en la actualidad como asociada a fuerzas demoníacas. En India y China la epilepsia se considera un motivo válido para anular un matrimonio [19].

2. METODOLOGÍA.

2.a. Creación del training set.

Se generó un conjunto de trabajo -training set- formado por 20 compuestos de actividad biológica conocida, activos en el MES (Maximal Electroshock Seizure) test. Este ensayo forma parte del Programa de Desarrollo de Drogas Antiepilépticas del Instituto Nacional de Salud (NHI) de Estados Unidos. Consiste en aplicar una descarga eléctrica controlada a animales de experimentación (ratas o ratones) con el objeto de provocar artificialmente un episodio convulsivo. Se mide la capacidad que tiene un fármaco, administrado en forma previa, para prevenir la convulsión. Este ensayo preclínico permite definir si un compuesto es o no promisorio para el control de las convulsiones tónico – clónicas generalizadas en humanos, o Grand Mal. Los compuestos activos en el MES test actúan, al menos parcialmente, mediante bloqueo de canales de sodio a nivel del sistema nervioso central [20,21]. Todos los compuestos que componen el training set han sido utilizados en clínica; el 80 % de ellos forma parte de medicamentos que actualmente se comercializan en el mercado farmacéutico; el 20 % restante se encuentra en fase clínica. Se espera, de este modo, que el modelo generado permita seleccionar no sólo compuestos activos, **sino también compuestos seguros**. Esta primera aproximación hacia la selección de drogas que permitan su utilización en clínica podrá ser optimizada posteriormente mediante la construcción de un nuevo modelo que considere sólo la toxicidad de los compuestos, y la ulterior combinación de ambos modelos generados. En la tabla 1 se presenta un listado de los compuestos utilizados y su dosis efectiva 50 (ED₅₀).

Tabla 1. Valores de dosis efectiva cincuenta en el MES test para los compuestos que integran el training set.

Compuesto	ED ₅₀ experimental (µmol/kg)	Compuesto	ED ₅₀ experimental (µmol/kg)
ADCI	36	Mefenitoína	277
Canabidiol	254	Methsuximida	375
Carbamacepina	42	Oxcarbamacepina	79
Clonazepam	272	Primidona	52
Diazepam	67	Ralitolina	9
Etoxuximida	49585	Remacemida	292
Felbamato	220	Rufinamida	71
Fenitoína	35.5	Tetrahydrocanabbinol	134
Fenobarbital	103	TV – 1901	759
Lamotrigina	13	Vinpocetina	77

2.a. Generación del modelo QSAR.

Se utilizó el programa Dragon [22] en su versión Academic 4.0. El mismo permite calcular más de 1600 descriptores de distinta complejidad pero que pueden ser clasificados según su dimensionalidad en descriptores 0D, 1D, 2D y 3D. Dragon es utilizado extensamente en la actualidad en estudios QSAR [23-26], como puede observarse en la gran cantidad de trabajos en publicaciones internacionales que lo utilizan como herramienta de cálculo, de los cuales citamos sólo algunos ejemplos.

La ecuación de regresión se obtuvo correlacionando los valores experimentales de logaritmo natural de la dosis efectiva cincuenta en el MES test con cuatro de los descriptores calculados. Para ello se utilizó el análisis de regresión lineal múltiple (MRLA), el cual dio por resultado una ecuación de la forma general:

$$P = A_0 + \sum A_i X_i$$

donde A_0 y A_i son los coeficientes de regresión de la ecuación obtenida y X_i los descriptores incluidos en la misma. El criterio de inclusión y exclusión de descriptores en el modelo fue el valor del estadístico F parcial para cada descriptor para un nivel de significancia de 0.05. Tampoco se incluyeron pares de descriptores altamente correlacionados (con coeficiente de correlación lineal mayor a 0.9) para evitar incluir descriptores redundantes. La ecuación fue obtenida utilizando el programa de bioestadística BMDP [27]. En la tabla 2 se muestra la función generada. Se presentan los descriptores utilizados, los coeficientes de regresión A_i para cada descriptor, el coeficiente independiente A_0 , el error estándar SE asociado a cada coeficiente, el nivel de significancia estadística p para cada término de la ecuación, y los parámetros estadísticos globales: N (número de moléculas utilizadas), r^2 (coeficiente de correlación), q^2 (coeficiente de correlación de la validación cruzada, también referido por algunos autores como coeficiente de predicción), SEE (Standard Error of the Estimate - error estándar en la estimación), el estadístico F global y el nivel de significancia estadística p .

Tabla 2.

Descriptor	Coficiente A	Nivel p
Constante A_0	10.17	
Xt (índice de conectividad total)	95.85	3×10^{-5}
PJ12 (índice de forma 2D de Petitjean)	-3.02	0.03
CENT (centralización)	8.74×10^{-3}	0.0001
G2 (índice gravitacional restringido a enlaces)	-0.20	0.001

Variable dependiente : $\ln ED_{50}$ (administrado intraperitoneal en ratón)

N = 20 SEE = 0.66 P = 3×10^{-7}
F = 31.01 $r^2 = 0.892$ $q^2 = 0.826$

2.c. Ensayos de randomización y habilidad predictiva.

En los estudios QSAR se utilizan dos tipos de validaciones para evaluar la habilidad predictiva de los modelos generados: **validaciones internas** y **validaciones externas** [28, 29, 5]. Las **validaciones internas** se realizan mediante validación cruzada y/o test de randomización. La **validación cruzada** consiste en remover uno (leave-one-out) o varios (leave-group-out) de los compuestos del training set de forma aleatoria o sistemática. Luego se genera un nuevo modelo con los compuestos remanentes y con este modelo se predice la actividad para los compuestos excluidos. La calidad del modelo se expresa ahora con el coeficiente de correlación de la validación cruzada o coeficiente de predicción q^2 . De estas dos técnicas, la técnica leave – one – out es la más sólida y la que supone más trabajo. La

técnica de randomización consiste en reconstruir el modelo con los mismos descriptores, pero ahora dando valores aleatorios al valor experimental (es decir, se asignan aleatoriamente los valores experimentales de actividad al grupo de compuestos utilizado para generar el modelo). La randomización se repite varias veces, cada vez generando un nuevo modelo; se supone que estos nuevos modelos serán estadísticamente muy inferiores al modelo auténtico siempre y cuando este último no haya sido generado por correlaciones fortuitas. La **validación externa** es el paso más importante para evaluar cuán robusto es el modelo generado. Consiste en predecir la actividad de compuestos de actividad conocida que no han sido incluidos en el training set. El número de compuestos utilizados para esta última debe representar –por lo menos- entre un 20 y 30 % del número de compuestos del training set. En el presente trabajo se validó la ecuación internamente mediante la técnica leave - one - out, se realizaron veinte randomizaciones y finalmente se validó externamente utilizando 2 grupos de compuestos: un primer grupo de 32 compuestos de actividad conocida y cuantificada en el MES test (entre ellos ácido valproico, valpramida, zonisamida y topiramato, todos estos comercializados actualmente) y un segundo grupo de 18 drogas sin referencias de actividad anticonvulsiva en bibliografía. El grupo I tiene por objeto definir si el modelo predice correctamente la actividad cuando la droga evaluada por el mismo posee efectivamente actividad en el MES test; el grupo II se utiliza para verificar que el modelo no sobreestima la actividad, prediciendo como activas moléculas que presuntamente no poseen actividad anticonvulsivante.

2.c. Screening virtual.

Nuestro grupo de trabajo ha generado una colección de casi dos millones de estructuras en formato .mol, que pueden ser procesadas por el programa Dragon y empleadas en screening en silicio. Esta colección incluye moléculas de origen natural y sintético. Se eligieron aleatoriamente 123108 de estas estructuras; se calcularon los descriptores utilizados en el modelo y se aplicó el modelo para predecir la actividad.

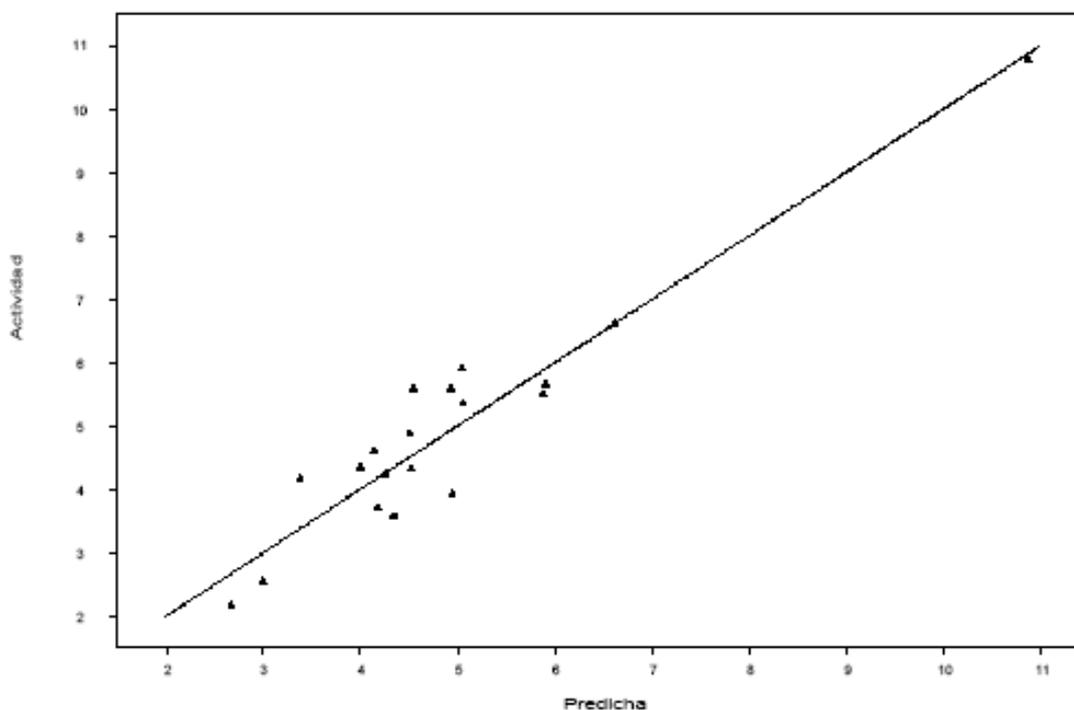
Se utilizó un segundo filtro de selección, considerando que el valor óptimo del logaritmo del coeficiente de reparto octanol – agua ($\log P$) para compuestos de acción en el sistema nervioso central es de 2 (debido a la mayor facilidad para atravesar pasivamente la barrera hematoencefálica) [31-33].

Los compuestos seleccionados por su actividad (aquellos con ED_{50} menor a 200 mg/kg y con $\log P$ de Moriguchi entre 1.3 y 2.7) fueron sometidos a una búsqueda bibliográfica intensiva para averiguar si alguno de ellos o algún compuesto estructuralmente similar tenía antecedentes de actividad anticonvulsiva en literatura.

3. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

En la figura 1 se presenta el gráfico de Actividad versus Actividad Predicha. Un valor de r^2 de 0.8921 indica que el 90 % de la varianza en los datos puede ser explicada por el modelo.

Figura 1.



El coeficiente q^2 para el modelo generado por validación cruzada, es superior a 0,826. Un valor superior a 0,50 es generalmente aceptado como satisfactorio [5, 30].

LA figura 2 presenta el gráfico de los residuales obtenidos con el modelo real versus los residuales obtenidos mediante validación cruzada LOO. Se observan sólo dos *outliers*, canabidiol y etosuximida, lo cual representa predicciones con buena exactitud para el 90 % de los compuestos del training set.

La figura 3 presenta los resultados del estudio de randomización. Para esto se graficaron los r^2 vs. q^2 de los 20 modelos generados por randomización y del modelo real. En el extremo inferior izquierdo del gráfico se observan los puntos correspondientes a las randomizaciones, claramente separados del punto correspondiente al modelo auténtico (esquina superior derecha) y caracterizados aquellos por bajos valores de r^2 y q^2 .

Ninguno de los compuestos del training set presenta residual (diferencia entre el valor predicho y el real) por encima de ± 2 SEE. La mayoría de ellos posee residual por debajo de ± 1 SEE, lo cual implica una buena capacidad predictiva que fue confirmada mediante validación externa y en el proceso de virtual screening. Si observamos la columna correspondiente al nivel de significancia p en la tabla 2, vemos que todos los descriptores utilizados son estadísticamente significativos por encima del 97 % (más aún, todos ellos con excepción de PJI2 son significativos por encima del 99.9 %). Esto significa que todos poseen información estructural y topológica suficiente para cuantificar la actividad anticonvulsiva mediada por bloqueo de canales de sodio.

Para la validación externa se decidió clasificar a los compuestos en tres clases: se definió como compuesto Activo a aquel cuya dosis efectiva 50 estuviera por debajo de los 100 mg; compuesto de Actividad Intermedia: aquel cuya dosis efectiva 50 esté entre los 100 y los 300 mg y compuesto Inactivo: aquel cuya dosis efectiva 50 esté por encima de los 300 mg (para esta clasificación se tomo como referencia la fase I del programa de desarrollo de antiepilépticos del NIH). Se logró un porcentaje de aciertos del 83 % para el grupo I y del 71 % para el grupo II, confirmando una muy buena actividad predictiva (de cada 10 compuestos evaluados por la ecuación, entre 7 y 8 serán correctamente predichos). Los resultados del grupo II y el bajo porcentaje de compuestos seleccionados mediante el virtual screening garantizan la alta selectividad del modelo y que el mismo no sobreestima la actividad de los compuestos evaluados.

Fig. 2. Residuales obtenidos con nuestro modelo versus residuales obtenidos por validación cruzada. R^2 es 0.956.

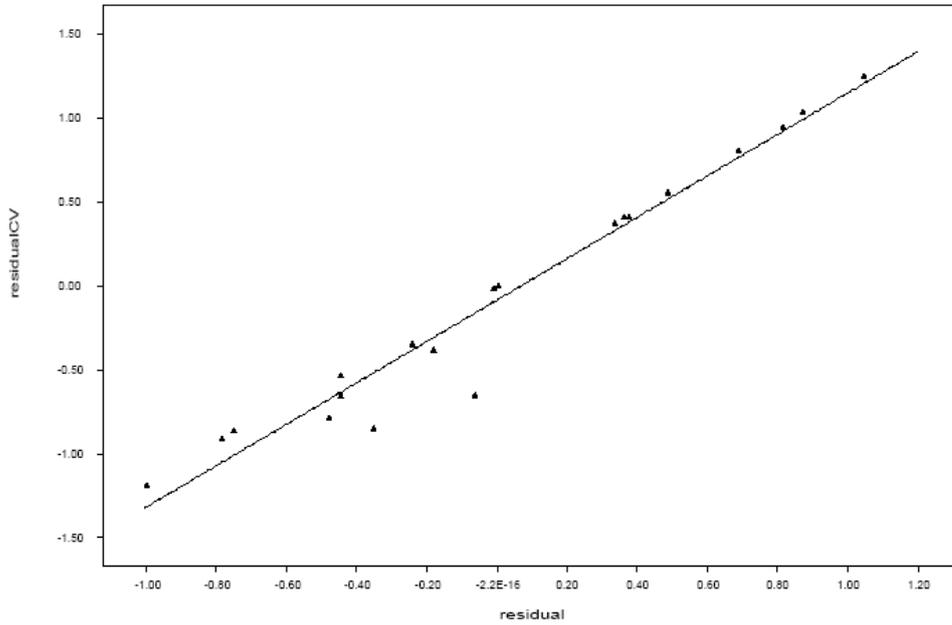
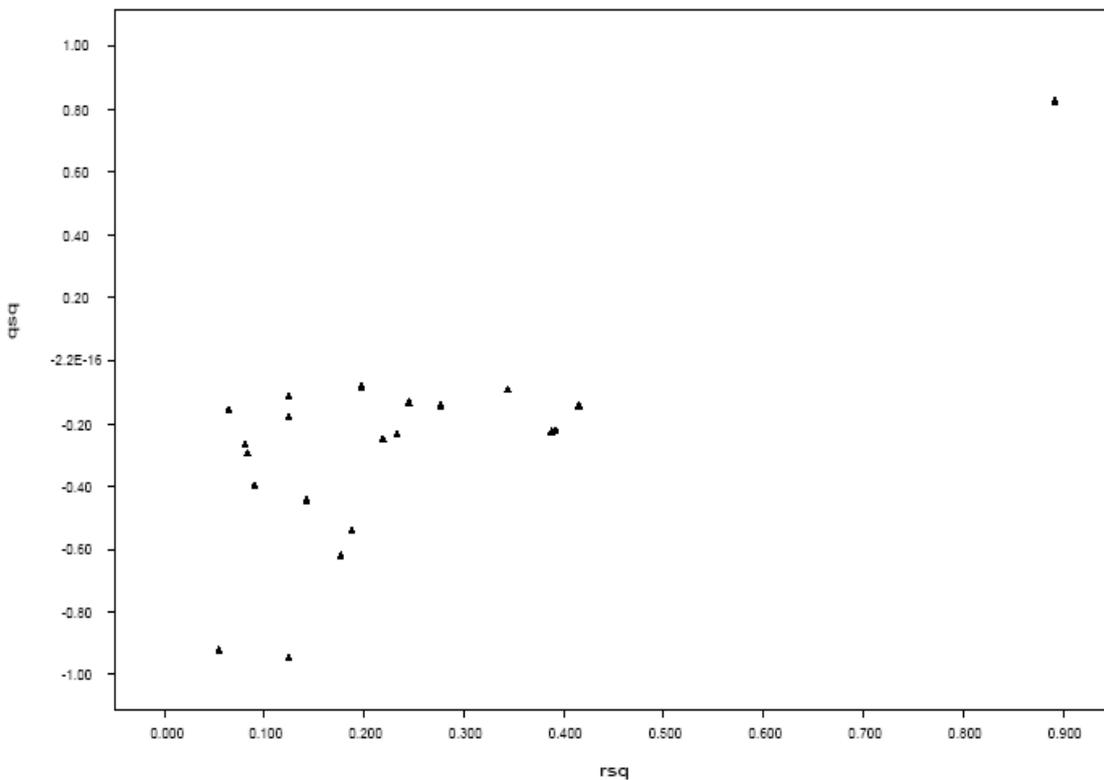


Fig 3. Resultados de la randomización.



45 compuestos fueron seleccionados en el VS por sus valores predichos de ED_{50} por debajo de 200 mg/kg. Esto representa alrededor de un 0.0036 % del total de compuestos evaluados, verificándose una altísima selectividad, aún mayor que la que podría inferirse de la validación externa. Pese a que estos compuestos no han sido ensayados en vivo aún, la búsqueda bibliográfica ulterior ha mostrado que varios de ellos, en unos casos, o por lo

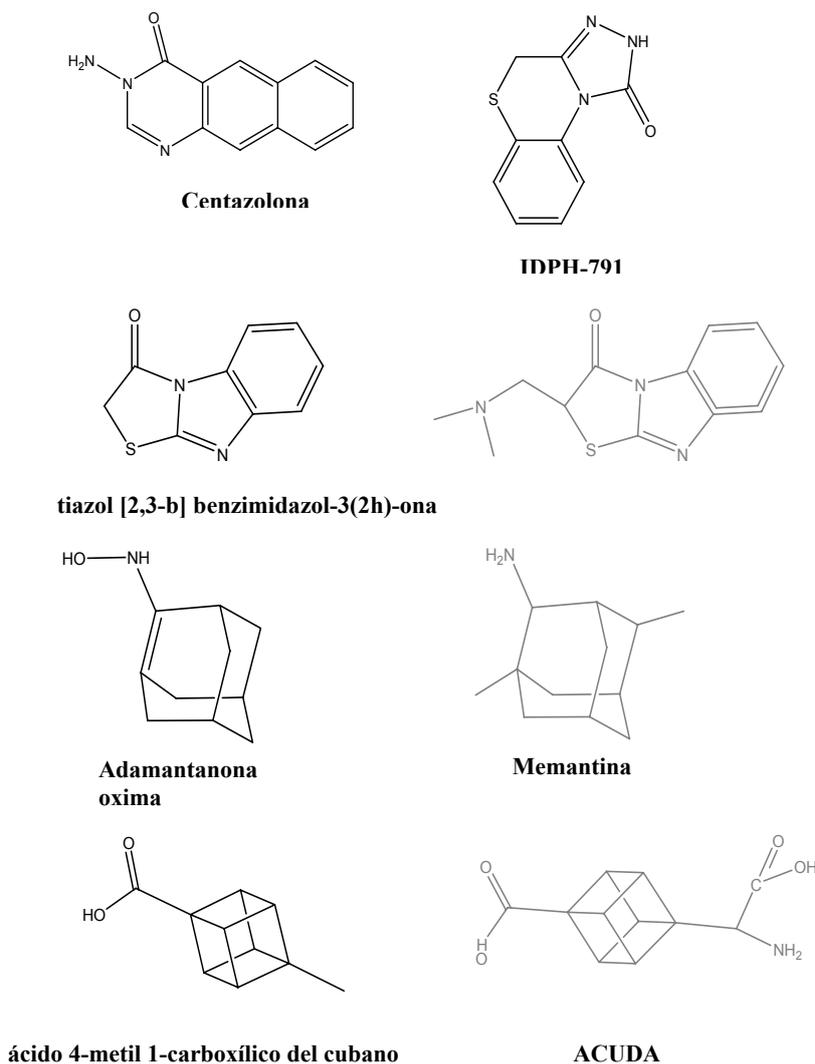
menos compuestos estructuralmente relacionados, en otros, han mostrado actividad anticonvulsiva en el pasado.

Uno de los compuestos seleccionados, centazolona, ha sido reportado como anticonvulsivo por Tripathi y colaboradores [34]. Otro de los compuestos seleccionados, identificado como IDPH – 791, ha sido referido como anticonvulsivo por Junnakar y colaboradores [35]. Varios derivados del tiazolo [2,3-b] benzimidazol -3(2H)-ona han sido reportados como anticonvulsivos por Singh en 1969 [36]. La memantina ha mostrado actividad anticonvulsiva en el pasado [37-38]. Varios derivados de la memantina fueron seleccionados mediante el VS, entre ellos la oxima de la amantana, el ácido 4- oxoadamantano 2- carboxílico, el ácido 4-hidroxiadamantano 2 – carboxílico, la pentaciclo undecan-11-ona y el pentaciclo undecan-11-ol. El ácido 4-metil 1-carboxílico del cubano también fue seleccionado mediante el VS; la carboxicubiligicina (ACUDA) ha sido referida en literatura como agonista parcial de receptores de glutamato de tipo II [39], por lo que puede sospechársele actividad anticonvulsiva.

Toda esta evidencia confirma la alta capacidad anticonvulsiva, el éxito del modelo QSAR construido y que las estructuras que aún no han sido ensayadas tienen alta probabilidad de poseer actividad anticonvulsiva y actuar como punto de partida en el diseño y síntesis de nuevos líderes en la lucha contra la epilepsia.

En la figura 4 se presentan las estructuras de los compuestos mencionados en los párrafos anteriores, que o bien han sido reportados como anticonvulsivos o que son estructuralmente cercanos a compuestos de actividad anticonvulsiva verificada. Los compuestos relacionados estructuralmente con actividad anticonvulsiva probada se presentan en gris.

Fig. 4.



PERSPECTIVAS.

- Adquirir las drogas seleccionadas y realizar los ensayos preclínicos para verificar la exactitud de la predicción.
- Realizar el screening virtual de las estructuras remanentes disponibles en la colección compilada por nuestro grupo de trabajo.

AGRADECIMIENTOS: E. Castro pertenece al CONICET. A. Talevi agradece al CONICET su beca de posgrado de tipo I. L. Bruno - Blanch es investigador de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata. Este trabajo fue posible gracias a subsidios de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 06-11985/2004) CONICET (PIP n° 02207 Res 1478) y Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Devillers J.; Balaban A. T. "Topological Indices and Related Descriptors in QSAR and QSPR". Capítulo 1: No Free – lunch Molecular Descriptors in QSAR and QSPR. Gordon and Breach Science Publishers. **1999**, 1-20.
- [2] Leo A.; Hansch C.; Elkins D. "Partition Coefficients and Their Uses". *Chemical Reviews*. **1971**, 71, 525-616.
- [3] Merlot C.; Domine D.; Church D. J. "Fragment análisis in small molecule discovery". *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2002**,5, 391-9.
- [4] Bajaj S.; Sambia S. S.; Madanb A. K. "Topological Models for prediction of anti-HIV activity of acylthiocarbamates". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, 13, 3263–3268.
- [5] Duart M. J.; Antón-Fos G. M.; de Julian-Ortiz J. V.; Gozalbes R.; Gálvez J.; García-Domenech R. "Use of molecular topology for the prediction of physicochemical, pharmacokinetic and toxicological properties of a group of antihistaminic drugs". *International Journal of Pharmaceutics*. **2002**, 246, 111- 119.
- [6] García-García A.; Gálvez J.; de Julián-Ortiz J. V.; García-Domenech R.; Muñoz C.; Guna1 R.; Borrás R. "New agents active against *Mycobacterium avium* complex selected by molecular topology: a virtual screening method". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2004**, 53, 65-73.
- [7] Pirard, B., Brendel J., Peukert S. "The Discovery of Kv1.5 Blockers as a Case Study for the Application of Virtual Screening Approaches". *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 477-485.
- [8] Bajorath, J. "Integration of Virtual and High-Throughput Screening". *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, 1, 882-894.
- [9] Langer, T.; Hoffmann, R. D. "Virtual Screening: an Effective Tool for Lead Structure Discovery?" *Curr. Pharm. Des.* **2001**, 7, 509-527.
- [10] Walters, W. P.; Stahl, M. T.; Murcko, M. A. "Virtual Screening – an Overview". *Drug DiscoVery Today* **1998**, 3, 160-178.
- [11]. Karelson, M. "Molecular Descriptors in QSAR/QSPR"; John Wiley & Sons: New York, **2000**.
- [12]. Diudea, M. V. "QSPR/QSAR Studies by Molecular Descriptors", Ed. Nova Science, Huntington, NY, **2001**.
- [13] Merlot C.; Domine D.; Cleva C.; Church D. J. "Chemical substructures in drug discovery". *Drug Discovery Today*. **2003**, 8, 594-602.
- [14] Merlot C.; Domine D.; Church D. J. "Fragment análisis in small molecule discovery". *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2002**,5, 391-9.
- [15] Sheridan R. P.; Kearsley S. K. "Why do we need so many chemical similarity search methods?". *Drug Discovery Today*. **2002**, 903-911.
- [16] Matter H.; Pötter T. "Comparing 3D Pharmacophore Triplets and 2D Fingerprints for Selecting Diverse Compound Subsets". *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 1211-1225.

- [17] Schuffenhauer A.; Gillet V. J.; Willett P. "Similarity Searching in Files of Three-Dimensional Chemical Structures: Analysis of the BIOSTER Database Using Two-Dimensional Fingerprints and Molecular Field Descriptors". *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 295-307.
- [18] World Health Organization Fact sheet n° 265: "Mental and neurological disorders". **Diciembre de 2001**.
- [19] World Health Organization Fact sheet n° 165: "Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis". **Febrero de 2001**.
- [20] Stables J. P., Kupferberg H. J. "The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project". *Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*. Capitulo 16. John Libbey & Company Ltd., pág. 191-198. **1997**.
- [21] Gladding G.D., Kupferberg H.J., Swinyard E. A. "Antiepileptic Drug Development Program". *Handbook Exp. Pharm.* Volumen 74. **1985**.
- [22] Todeschini R., Consonni V., Pavan M. Dragon Academia versión 4.0, **2003**. <http://www.disat.unimib.it/chm/dragon.htm>.
- [23] Fernández M., Caballero J., Helguera A. M., Castro E. A., Gonzalez M. P. "Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds". *Bioorg Med Chem.* **2005**, *13*, 3269-77.
- [24] Gupta MK, Sagar R, Shaw AK, Prabhakar YS. CP-MLR directed QSAR studies on the antimycobacterial activity of functionalized alkenols--topological descriptors in modeling the activity. *Bioorg Med Chem.* **2005**. *13*, 343-351.
- [25] E. Knehta, P.L. Andersson, M. Johansson, M. Tysklind. "An overview of OSPAR priority compounds and selection of a representative training set". *Chemosphere Volume 57, Issue 10* , **2004**, 1495-1503.
- [26] Garkani-Nejad Z., Karlovits M., Demuth W., Stimpfl T., Vycudilik W., Jalali-Heravi M., Varmuza K. . Prediction of gas chromatographic retention indices of a diverse set of toxicologically relevant compounds. *Journal of Chromatography A Volume 1028, Issue 2* , **2004**, Pages 287-295
- [27] Dixon, W.J. BMDP - Biomedical Computer Programs. Los Angeles, California versión 2.0., **2001**.
- [28] Shu-Sheniu, Hai-Ling Liu, Chun-Sheng Yin,† and Lian-Sheng Wang "VSMP: A Novel Variable Selection and Modeling Method Based on the Prediction" *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 964-969
- [29] Yasri A., Hartsough D. "Toward an Optimal Procedure for Variable Selection and QSAR Model Building" *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1218-1227
- [30] Carbo Dorca, R., Robert, D., Amat, L., Girone X., Besalu E., "Molecular Quantum Similarity in QSAR and Drug Design." Springer, Berlin, Heidelberg. **2000**.
- [31] Begley D.J. "Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities". *Pharmacology & Therapeutics.* **2004**, *104*, 29– 45.
- [32] Ter Laak A. M.; Tsai R. S.; Donné-Op den Kelder G. M.; Carrupt P. A.; Testa B.; Timmerman H. "Lipophilicity and hydrogen-bonding capacity of H1-antihistaminic agents in relation to their central sedative side-effects". *Eur. J. Pharm. Sci.* **1994**, *2*, 373-384.
- [33] Hadjipavlou – Litina D. "Review, reevaluation, and new results in quantitative structure-activity studies of anticonvulsants". *Med Res Rev.* **1998**, *18*, 91-119.
- [34] Tripathi L. M.; Tekwani B. L.; Sen R.; Ghatak S. "Effect of anticonvulsants, centazolone and centpropazine, on gamma amino butyric acid metabolism in mouse brain". *Indian J Exp Biol.* **1985**, *23*, 452-5.
- [35] Junnarkar A. Y.; Singh P. P.; Patnaik G. K.; Shrotri D. S. "Neuropsychopharmacological study of 2,4-dihydro[1,2,4]triazolo[3,4-c][1,4]benzothiazine-1-one (IDPH-791)". *Pharmacol Res.* **1992**, *26*, 131-41.
- [36] Singh J. M. "Possible Anticonvulsant Thiazolo[3,2-a]benzimidazole Mannich Bases. Part XI". *J Med Chem.* **1969**, *12*, 962.
- [37] McLean M. J.; Gupta R. C.; Dettbarn W. D.; Wamil A. W. "Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Memantine Against Seizures Produced by Soman in the Rat". *Toxicol Appl Pharmacol.* **1992**, *112*, 95-103.

- [38] Löscher W.; Hönack D. "Over-additive anticonvulsant effect of memantine and NBQX in kindled rats". *European Journal of Pharmacology*. **1994**, 259, R3 – R5.
- [39] Schoepp D. D.; Jane D. E.; Monn J. A. "Review: Pharmacological Agents Acting at Subtypes of Metabotropic Glutamate Receptors". *Neuropharmacology*. **1999**, 38, 1431–1476.