



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Síntesis de nuevas moléculas multiobjetivo derivadas del Ácido
valproico con actividad anticonvulsiva

Tesista: Lic. Federico Mariano Garofalo

Directora: Dra. Luciana Gavernet

Año:2022

Dedicado a la memoria de Rubén Greco

Agradecimientos

A Luis E. Bruno Blanch, por abrirme las puertas del LIDeB para desarrollar mi trabajo de tesis doctoral, por sus enseñanzas y consejos.

A mi directora, Luciana Gavernet, por apoyarme y acompañarme en cada momento. Por los consejos y por guiarme siempre hacia adelante.

Al director del LIDeB, Alan Talevi, por estar siempre a disposición, por los consejos y el apoyo constante.

Al equipo de síntesis Orgánica del LIDeB, Maria Luisa Villalba, Roque Dietrich y Laureano Sabatier, por la ayuda brindada en los comienzos del doctorado y por los gratos momentos compartidos en el laboratorio.

A Manuel Llanos y Melisa Gantner por las charlas, los mates y las risas de todos los días.

A Carolina Bellera, por el apoyo y la motivación constante. Por no dejarme bajar los brazos.

A Maria L. Sbaraglini, Emilia Barrionuevo y Estefania Peralta por su amistad y colaboración con los ensayos en animales.

A Nicolas Enrique y Pedro Martín, por su ayuda con los ensayos *in vitro*.

A mis compañerxs y amigxs del LIDeB.

A la Facultad de Ciencias Exactas de La Universidad Nacional de La Plata, a CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

A mi familia y amigxs.

Objetivos

La Epilepsia es una enfermedad que se caracteriza por una actividad cerebral anómala, que se manifiesta como una predisposición a largo plazo a generar crisis epilépticas, comportamientos inusuales y, en ocasiones, pérdida de la conciencia. Existen más de 70 millones de personas en el mundo con epilepsia, concentrándose la mayor proporción en países en vías de desarrollo. En Argentina, particularmente, se estima que 1 de cada 100 personas padece esta enfermedad. La principal estrategia para abordar su tratamiento es el uso de fármacos anticonvulsivos (FACs), y la selección de la farmacoterapia óptima se basa en la clasificación adecuada de las crisis experimentadas por cada paciente. Sin embargo, alrededor del 30% de los enfermos sufren crisis persistentes incluso con el uso de farmacoterapias adecuadas, fenómeno conocido como Farmacorresistencia o Epilepsia Farmacorresistente. Los individuos farmacorresistentes experimentan un aumento de riesgo de muerte, y pueden desarrollar trastornos de índole psiquiátrica, cognitiva o de comportamiento.

La problemática resumida previamente justifica la constante búsqueda de nuevos FACs con mayor eficacia y menor toxicidad. Cabe destacar que aun en farmacoterapias que logran controlar las crisis, los compuestos administrados no están libres de efectos adversos. En algunos casos, los pacientes experimentan efectos secundarios que van desde somnolencia e irritabilidad hasta otros más graves como depresión, deterioro de las capacidades cognitivas y hepatotoxicidad.

El presente trabajo de tesis doctoral tiene como objetivo general la síntesis y evaluación biológica de nuevos FACs más eficaces y mejor tolerados, mediante el uso de estrategias racionales para el diseño de fármacos multiobjetivo.

La epilepsia es una enfermedad multifactorial, heterogénea y compleja. Al igual que en otras enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central (SNC), el desafío es lograr la modulación simultánea de un número específico de blancos moleculares (*targets*) sin alterar la actividad cerebral normal. En esta tesis se propone como hipótesis de trabajo que *es posible encontrar fármacos anticonvulsivos con mayor eficacia y menor toxicidad, mediante el empleo de estrategias racionales para la generación de compuestos multiobjetivo, que contemplen la información disponible respecto a los mecanismos de acción de los FACs, la fisiología neuronal y la generación de las crisis*. Por lo tanto, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1)** Síntesis orgánica de nuevas moléculas multiobjetivo. Se obtendrán nuevos compuestos multiobjetivo mediante la unión química del ácido valproico con compuestos seleccionados de diversa actividad biológica relacionada con la patología de estudio (bloqueantes de canales de sodio voltaje operados, inhibidores de la recaptación de ácido γ -aminobutírico y antiinflamatorios).
- 2)** Síntesis de derivados de parabenos. Se prepararán las amidas derivadas de parabenos (por considerarse bioisómeros de esta familia de compuestos) para su posterior evaluación *in vitro*. Aquellos compuestos activos podrán ser utilizados como nuevos grupos moduladores para la síntesis de drogas multiobjetivo con ácido valproico.
- 3)** Evaluación biológica *in vivo* de los candidatos sintetizados. Se testeará la capacidad anticonvulsiva de los compuestos sintetizados en modelos animales de fase preclínica.

Contenido

Capítulo 1: Epilepsia

1.1. Introducción	1
1.2. Comorbilidades	1
1.3. Crisis epilépticas	2
1.4. Diagnóstico	3
1.5. Tratamientos	4
1.6. Tratamiento farmacológico	5
1.7. Farmacorresistencia	9
1.8. Mecanismos de Acción de anticonvulsivos	11
1.8.1. Modulación de canales iónicos operados por voltaje	12
1.8.1.1. Canales de sodio dependientes de voltaje	13
1.8.1.2. Canales de calcio dependientes de voltaje	13
1.8.1.3. Canales de potasio dependientes de voltaje	14
1.8.2. Incremento de la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido γ -aminobutírico	14
1.8.3. Disminución de la transmisión excitatoria del SNC mediada por Glutamato	15
1.8.4. Modulación directa de la liberación sináptica a través de los efectos en los componentes de la maquinaria de liberación	16
1.9. Referencias	16

Capítulo 2: Polifarmacología

2.1 Introducción	21
2.2 Polifarmacología	23
2.3 Polifarmacología: Combinación de fármacos	24
2.4 Combinación de fármacos y Epilepsia	25
2.5 Polifarmacología: Fármacos multiobjetivo	27
2.6 Fármacos híbridos y epilepsia	28

2.7	Co-drogas	31
2.8	Co-drogas y epilepsia	34
2.9	¿Co-droga o fármaco híbrido?	36
2.10	Referencias	37

Capítulo 3: Diseño de fármacos multiobjetivo

3.1	Consideraciones generales	43
3.2	Ácido Valproico	44
3.2.1	Mecanismo de acción anticonvulsivo	45
3.2.2	Farmacocinética y toxicidad de VPA	45
3.3	Grupos conectores	46
3.3.1	Grupo conector derivado de formaldehído (espaciador oximetilo)	47
3.3.2	Grupo conector derivado de acetaldehído (espaciador oxietilo)	48
3.4	Fragmentos activos complementarios	49
3.5	Síntesis de fármacos multiobjetivo derivados del ácido valproico	52
3.6	Búsqueda de nuevos fragmentos activos complementarios para la síntesis de moléculas multiobjetivo derivadas del ácido valproico	53
3.7	Referencias	55

Capítulo 4: Trabajo experimental de síntesis

4.1	Consideraciones Generales	61
4.2	Trabajo experimental de Síntesis	63
4.2.1	Síntesis de Cloruro de 2-propilpentanoólo (Cloruro de Valproólo)	63
4.2.2	Preparación de cloruro de zinc anhidro (ZnCl₂ anh.)	63
4.2.3	Síntesis de 2-Propilpentanoato de clorometilo (Valproato de Clorometilo)	64
4.2.4	Síntesis de 2-Propilpentanoato de 1-cloroetilo (Valproato de 1-cloroetilo)	65
4.2.5	Síntesis de 2-Propilpentanoato de fenoximetilo (1)	66

4.2.6 Síntesis de bis(2-propilpentanoato) de (1,2-fenilenobis(oxi))bis(metileno) (2)	67
4.2.7 Síntesis de 2-propilpentanoato de (2-hidroxifenoxi)metilo (3)	68
4.2.8 Síntesis de 2-propilpentanoato de (4-acetamidofenoxi)metilo (4)	69
4.2.9 Síntesis de 2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)metil 2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (5)	70
4.2.10 Síntesis de ácido 2-(1-((2-propilpentanoil)oxi)etoxi)benzoico (6)	71
4.2.11 Síntesis de metil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (7)	72
4.2.12 Síntesis de propil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (8)	73
4.2.13 Síntesis de butil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (9)	74
4.2.14 Síntesis de bencil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (10)	75
4.2.15 Síntesis de 2-((2,3-dimetilfenil)amino)benzoato de ((2-propilpentanoil)oxi)metilo (11)	76
4.2.16 Síntesis de 1-isobutilo 3-(((2-propilpentanoil)oxi)metil) piperidina-1,3-dicarboxilato (12)	77
4.2.17 Síntesis de 2-propilpentanoato de ((2-(4-isobutilfenil)propanoil)oxi)metilo (13)	79
4.2.18 Síntesis de 1-((2-propilpentanoil)oxi)etil 2-((2,3-dimetilfenil)amino)benzoato (14)	80
4.2.19 Síntesis de Ácido 4-Acetoxibenzoico	81
4.2.20 Síntesis de N-bencil-4-hidroxibenzamida (15)	82
4.2.21 Síntesis de 4-Hidrox-N-fenetilbenzamida (16)	83
4.2.22 Síntesis de 4-Hidrox-N-ciclohexilbenzamida (17)	84
4.2.23 Síntesis de 4-Hidrox-N-propilbenzamida (18)	85
4.2.24 Síntesis de N-butil-4-hidroxibenzamida (19)	87

Capítulo 5: Evaluación Biológica

5.1 Estudios in vivo en modelos de epilepsia	90
5.1.1 Introducción	90
5.1.2 Fase de identificación	94
5.1.3 Fase de diferenciación	96

5.1.4	Modelo de Maximal Electroshock Seizure (MES)	97
5.1.5	Ensayo de Rotorod	98
5.2	Evaluación de la Actividad Anticonvulsiva de los compuestos sintetizados	100
5.2.1	Procedimiento experimental	100
5.2.1.1	Animales de laboratorio	100
5.2.1.2	Preparación y administración de los compuestos para los ensayos in vivo	101
5.2.1.3	MES-test	102
5.2.1.4	Ensayo Rotorod	103
5.2.2	Resultados de la evaluación de los compuestos sintetizados	104
5.2.3	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva:	
	Tiempo de efecto máximo (TEM)	106
5.2.4	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva:	
	Dosis efectiva media (DE50)	107
5.3	Estudios in vitro sobre el canal de sodio	108
5.3.1	Introducción	108
5.3.2	Procedimiento experimental	109
5.3.3	Protocolo de evaluación: Curvas de inactivación de estado estacionario (curva h).	111
5.3.4	Resultados de la evaluación de los compuestos sintetizados	112
5.4	Referencias	114

Capítulo 6: Análisis de resultados, conclusiones y perspectivas

6.1	Referencias	127
------------	--------------------	------------

Anexo : Espectros RMN

	2-Propilpentanoato de fenoximetilo (1)	130
	bis(2-propilpentanoato) de (1,2-fenilenobis(oxi))bis(metileno) (2)	131
	2-propilpentanoato de (2-hidroxifenoxi)metilo (3)	132

2-propilpentanoato de (4-acetamidofenoxi)metilo (4)	133
2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)metil	
2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (5)	134
ácido 2-(1-((2-propilpentanoil)oxi)etoxi)benzoico (6)	135
metil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (7)	136
Propil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (8)	137
Butil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (9)	138
Bencil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (10)	139
2-((2,3-dimetilfenil)amino)benzoato de ((2-propilpentanoil)oxi)metilo (11)	140
1-isobutilo 3-(((2-propilpentanoil)oxi)metil)	
piperidina-1,3-dicarboxilato (12)	141
2-propilpentanoato de ((2-(4-isobutilfenil)propanoil)oxi)metilo (13)	142
N-bencil-4-hidroxibenzamida (15)	143
4-Hidroxi-N-fenetilbenzamida (16)	144
4-Hidroxi-N-ciclohexilbenzamida (17)	145
4-Hidroxi-N-propilbenzamida (18)	146

Capítulo 1

EPILEPSIA



1.1 Introducción

La Epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más frecuentes, afectando aproximadamente a más de 70 millones de personas en todo el mundo **(Thijs et al., 2019)**. Esta enfermedad crónica tiene su mayor prevalencia en las primeras décadas de vida y, luego de un decrecimiento, su frecuencia aumenta nuevamente en la tercera edad **(Thijs et al., 2019)**. El número de personas con esta afección es mayor en los países en vías de desarrollo, donde los pacientes y sus familias pueden ser víctimas de estigmatización y discriminación **(WHO 2018)**. En cuanto a sus particularidades, se trata de un trastorno crónico del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por una actividad neuronal excesiva y se manifiesta como una predisposición crónica a sufrir convulsiones, comportamientos inusuales y, en algunos casos, pérdida de la conciencia **(Fisher et al., 2014a)**. Las causas de la epilepsia solo se comprenden parcialmente e incluyen una variedad de perturbaciones a la función cerebral, incluidas causas adquiridas (como el accidente cerebrovascular o la lesión cerebral traumática), enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y mutaciones genéticas **(Devinsky et al., 2018)**.

1.2 Comorbilidades

La epilepsia suele estar acompañada de comorbilidades. Más del 50% de las personas con esta enfermedad poseen otros problemas médicos adicionales, teniendo que enfrentar cambios a nivel cognitivo, psicológico y social **(Keezer et al., 2016)**. Afecciones como la depresión **(Thomson et al., 2014)**, trastornos de ansiedad **(Banerjee et al., 2009)**, psicosis y trastornos del espectro autista **(Stafstrom & Carmant, 2015)** han sido asociadas con la epilepsia desde hace ya mucho tiempo. Además, en pacientes epilépticos existe un mayor riesgo de sufrir accidentes (como quemaduras, caídas y hasta muerte por ahogamiento), infecciones respiratorias, trastornos hormonales y accidentes cerebrovasculares **(Chang et al., 2014)**. Entre las afecciones antes mencionadas, la depresión es el trastorno psiquiátrico más frecuente en personas con epilepsia **(Thomson et al., 2014)**. Estos pacientes poseen menor respuesta a los tratamientos y mayores tasas de suicidio que aquellos sin esta comorbilidad.



Debe mencionarse, además, que la mayoría de las muertes prematuras en pacientes epilépticos están relacionadas con la presencia de comorbilidades, en particular neoplasias, enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares (**Keezer et al., 2016**). Otras causas de muerte prematura que son directamente atribuibles a la epilepsia son el estado epiléptico o la muerte súbita inesperada en epilepsia (*SUDEP*). La *SUDEP* en su mayoría no es presenciada por otras personas y está relacionada con el sueño. Muchas personas con *SUDEP* son encontradas boca abajo, con evidencia de haber tenido una convulsión reciente. En este, como en otros casos, reducir la frecuencia de las convulsiones parece ser la mejor manera de disminuir el riesgo de muerte (**Harden et al., 2017**).

1.3 Crisis epilépticas

Se denomina crisis epiléptica a la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anómala en el cerebro. Según la ILAE (*International League against Epilepsy*) (**Fisher et al., 2017**) las crisis pueden clasificarse de acuerdo con su inicio en:

Convulsiones de inicio focal: se originan dentro de redes limitadas a un hemisferio. Pueden estar discretamente localizadas o más ampliamente distribuidas y pueden originarse en estructuras subcorticales. Además, el nivel de conciencia subdivide a las convulsiones focales en aquellas con conciencia retenida y con pérdida de conciencia.

Convulsiones de inicio generalizadas: se originan en algún punto dentro de las redes neuronales y rápidamente involucra a redes distribuidas bilateralmente. Pueden generarse en estructuras corticales o subcorticales. Adicionalmente, las convulsiones generalizadas se dividen en convulsiones motoras y no motoras (crisis de ausencia).

Convulsiones de inicio desconocido: se pueden evidenciar ciertas características motoras (por ejemplo, tónico-clónicas) o no motoras (por ejemplo, cambios del comportamiento). En este tipo de convulsiones no está claro si el comienzo es focal o generalizado. Mediante observaciones en el tiempo puede ser posible una reclasificación de las convulsiones de inicio desconocido en categorías focales o de inicio generalizado.

Una vez definidos los tipos de crisis/convulsiones, es pertinente definir distintos tipos de epilepsia. De acuerdo con la cantidad y tipo de crisis, el cuadro clínico general, la información genética, los hallazgos en los registros electroencefalográficos y pruebas de laboratorio, la epilepsia puede ser clasificada como: **focal, generalizada, focal y generalizada y desconocida**. La tabla 1.3.1 resume las características principales de cada clasificación.

Clasificación de tipo de Epilepsia	Características
Focal	Crisis focales con pérdida de la conciencia Crisis focales motoras y no motoras Crisis bilaterales Tónico-clónicas
Generalizada	Crisis de ausencia, mioclónicas, atónicas Crisis tónico-clónicas
Focal y generalizada	Ambos tipos de crisis
Desconocida	Se desconoce el tipo de crisis, no se dispone de Electroencefalograma, o este no brinda información relevante

Tabla 1.3.1 Características principales de las distintas clasificaciones de Epilepsia (Scheffer et al., 2017).

La categoría de epilepsia focal y generalizada combinada se utiliza para quienes presentan ambos tipos de convulsiones. Los ejemplos más comunes son el síndrome de Dravet o Lennox Gastaut (**Thijs et al., 2019**).

1.4 Diagnóstico

Un paciente es diagnosticado con epilepsia si presenta: (1) Al menos dos crisis no provocadas separadas por un intervalo de tiempo de más de 24 horas. (2) Una crisis no provocada y una predisposición a presentar nuevas crisis durante los siguientes 10 años. (3) El diagnóstico de un síndrome epiléptico (**Fisher et al., 2014b**). Si bien con frecuencia se clasifica a las personas simplemente como epilépticas, el diagnóstico debe ser lo más específico y preciso posible. Especificar tipo de convulsión, tipo de epilepsia y tipo de síndrome epiléptico es fundamental para poder llevar a cabo un tratamiento específico y aumentar las chances de éxito. Además, se deben identificar la causa y las



comorbilidades, ya que pueden tener importantes implicaciones terapéuticas. Las causas que dan origen a distintos tipos de epilepsia se dividen en seis categorías: genéticas, estructurales, metabólicas, infecciosas, inmunitarias y desconocidas (Scheffer et al., 2017). El nivel más alto de precisión en el diagnóstico se puede obtener mediante el análisis de un grupo de características clínicas que incluyen la edad de inicio, los tipos de convulsiones, las comorbilidades y las características que presentan el Electroencefalograma (EEG) y las pruebas de diagnóstico por imagen.

1.5 Tratamientos

Para la mayoría de las personas con epilepsia, el uso de fármacos anticonvulsivos (FACs) es la principal modalidad de tratamiento. Estos compuestos tienen como objetivo principal detener las convulsiones lo antes posible, sin causar efectos secundarios que puedan afectar la calidad de vida. Además, como se mencionó anteriormente, la remisión de las convulsiones reduce la morbilidad y disminuye el riesgo de mortalidad prematura asociada con convulsiones continuas (Devinsky et al., 2016; Neligan et al., 2012). A pesar de la disponibilidad de más de 25 medicamentos en el mercado alrededor del mundo, los fármacos actuales solo son efectivos en un 66% de los pacientes, donde el porcentaje restante representa a pacientes farmacorresistentes, es decir, personas que no son capaces de tener un control de las crisis con la farmacoterapia actual (Thijs et al., 2019).

La elección del fármaco adecuado debe realizarse de forma individual, evaluando las características del paciente como la edad, el sexo, la capacidad de gestar, las comorbilidades, los problemas de tolerabilidad, el tipo de convulsiones y, en caso de estar definido, el síndrome epiléptico (Moshé et al., 2015). Para aquellas personas que sufren una crisis aislada se recomienda esperar una recurrencia antes de iniciar el tratamiento. Por otro lado, en aquellos pacientes de mayor riesgo de recurrencia (debido a la presencia de una anomalía estructural, un EEG anormal o un déficit neurológico preexistente) se recomienda comenzar el tratamiento lo antes posible. Idealmente los fármacos anticonvulsivos deben ser introducidos a bajas dosis, las cuales pueden aumentarse gradualmente según sea necesario. Si el individuo no obtiene

ningún beneficio con la dosis máxima tolerada, se debe iniciar el tratamiento con un fármaco alternativo. La monoterapia (administración de un solo fármaco anticonvulsivo) suele ser la mejor opción, ya que la politerapia (administración de dos o más anticonvulsivos en simultáneo) podría aumentar el riesgo de interacciones farmacológicas y toxicidad a largo plazo (**Lamberink et al., 2017**). Se asume a un paciente como farmacorresistente luego del fracaso en el tratamiento mediante el uso de dos anticonvulsivos bien tolerados (utilizados solos o en combinación) y elegidos apropiadamente en búsqueda de una ausencia sostenida de las crisis (**Kwan et al., 2011**). En estos casos se deben considerar tratamientos alternativos no farmacológicos que incluyen, **estimulación del nervio vago** (**González et al., 2019**), **estimulación cerebral profunda** (**Salanova, 2018**), **dieta cetogénica** (**Ułamek-Kozioł et al., 2019**) y, en los casos donde el paciente tiene una mala calidad de vida, la **cirugía** se presenta como alternativa para el tratamiento (**Rugg-Gunn et al., 2019**).

1.6. Tratamiento farmacológico

Como se mencionó previamente, los FACs son la principal forma de tratamiento para las personas con Epilepsia. Estos fármacos no modifican directamente el curso de la enfermedad, sino que tratan los síntomas, disminuyendo (o suprimiendo) las crisis, con el objetivo de otorgar a los pacientes una mejora en la calidad de vida. El objetivo de la terapia farmacológica anticonvulsiva es suprimir la actividad neuronal del foco epiléptico lo suficiente como para prevenir la hiperactividad. Estos agentes ejercen sus efectos clínicos a través de interacciones con uno o más blancos moleculares (**Rogawski et al., 2016**). Los **blancos moleculares** son biomoléculas susceptibles de interaccionar con un ligando (fármaco) y experimentar cambios que encaucen una respuesta biológica determinada (**Gavernet, 2021**).

El tratamiento farmacológico de la epilepsia se inició a mediados del Siglo XIX con la introducción del bromuro de potasio por Sir Charles Locock (**Balme, 1976**). En 1912 se comenzó a utilizar el Fenobarbital como anestésico y en el mismo año se descubrió su utilidad en las crisis epilépticas. Estos compuestos, también denominados **fármacos tempranos** (Bromuro de potasio y Fenobarbital), fueron descubiertos por serendipia (casualidad) y si bien eran la única opción farmacológica para el tratamiento tenían



perfiles de eficacia/tolerabilidad relativamente desfavorables. El Fenobarbital fue prácticamente el único fármaco utilizado durante muchos años, hasta la introducción de la Fenitoína en 1938. Este compuesto (5,5-difenilhidantoína) fue sintetizado por primera vez en 1908, pero sus propiedades anticonvulsivas fueron identificadas por Putnam y Merritt en 1936, quienes también evaluaron su valor clínico en pacientes en el período 1937-1940 (Keppel Hesselink & Kopsky, 2017). Como se describirá en el capítulo 5 de modelos animales, el descubrimiento de la Fenitoína se considera un evento clave para el desarrollo moderno de FACs, ya que demostró que el efecto anticonvulsivo de una sustancia en un modelo animal se puede traducir en eficacia clínica en sistemas más complejos como los seres humanos (Löscher et al., 2017).

El éxito de la Fenitoína condujo a la búsqueda sistemática de compuestos químicamente relacionados y no relacionados con eficacia anticonvulsiva y, posteriormente, a la comercialización de más de diez nuevos FACs que comúnmente se denominan **fármacos anticonvulsivos de primera generación** (Figura 1.6.1). Estos fármacos derivan principalmente de la modificación de la estructura de los barbitúricos e incluyen Fenobarbital y Primidona, oxazolidinedionas como Trimetadiona y succinimidas como Etosuximida (Löscher & Schmidt, 2011).

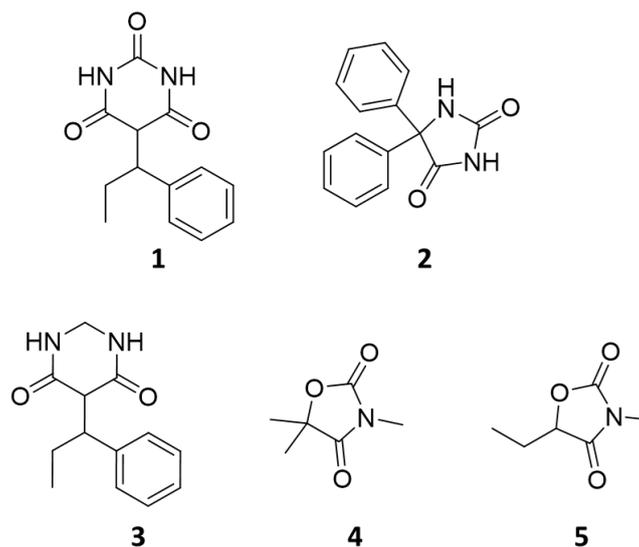


Figura 1.6.1 Primeros fármacos anticonvulsivos. 1) Fenobarbital (1912) 2) Fenitoína (1938) 3) Pirimidona (1946) 4) Trimetadiona (1952) 5) Etosuximida (1958).

Los **fármacos anticonvulsivos de segunda generación**, que incluyen Carbamazepina, Valproato y benzodiazepinas, se introdujeron entre 1960 y 1975 (Figura 1.6.2). Estos compuestos difieren estructuralmente de los ureidos cíclicos (barbitúricos, hidantoínas, succinimidias, oxazolidindionas; ver la Figura 1.1) y exhibieron tolerabilidad superior a dichas estructuras (**Löscher, 2017**). La Carbamazepina surge a fines de la década de 1950 y se utilizó para el tratamiento de la neuralgia del trigémino. En la actualidad se considera un medicamento de primera opción en el tratamiento de distintos tipos de convulsiones (**Shorvon, 2009**). Las benzodiazepinas fueron reconocidas rápidamente después de su síntesis en 1960 (**Brodie, 2010**) como anticonvulsivos. Ejemplos son el Diazepam, Clonazepam y el Clobazam, entre otros derivados. Finalmente, el **Ácido Valproico**, estructura de interés para este trabajo de tesis, fue sintetizado por primera vez en 1881. Su actividad anticonvulsiva fue descubierta por serendipia en el año 1963 mientras se lo utilizaba como solvente orgánico para ensayar las propiedades anticonvulsivas de otras moléculas. Este compuesto ha sido uno de los más extensamente usados mundialmente, para el tratamiento de las crisis en adultos y en niños (**Shorvon, 2009**).

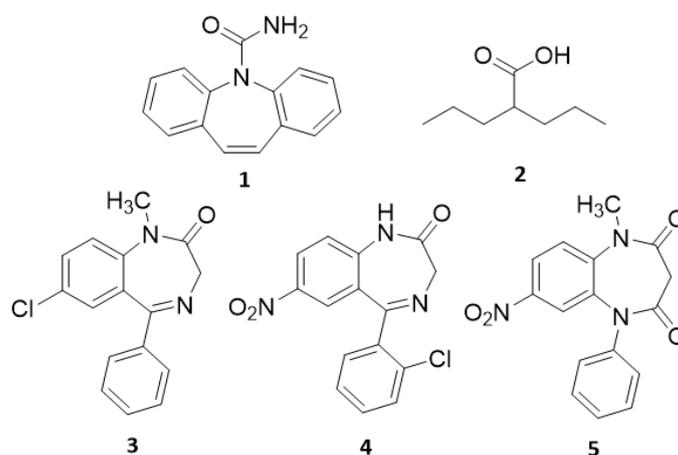


Figura 1.6.2 Fármacos anticonvulsivos descubiertos entre 1960 y 1970. 1) Carbamazepina 2) Ácido Valproico 3) Diazepam 4) Clonazepam 5) Clobazam.



Desde la creación del ente regulatorio de los medicamentos de Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration USA*) en 1962, los requerimientos necesarios para que una nueva droga sea incorporada al mercado sufrieron una sustancial modificación. Previo a la comercialización de un nuevo fármaco ya no sólo se exigía determinar la eficacia sino también su seguridad. La elección del anticonvulsivo estaba limitada a las drogas aprobadas de la época, es decir: Fenobarbital, Primidona, Fenitoína, Carbamazepina y Ácido Valproico. Aunque estos FACs clásicos tenían la ventaja de su probada eficacia, muchos pacientes presentaban crisis convulsivas resistentes a los medicamentos y/o efectos adversos indeseados. La era de los fármacos anticonvulsivos de tercera generación comenzó en la década de 1980 con el desarrollo "racional" de fármacos como la Progabida y la Vigabatrina. Estos compuestos fueron diseñados para modular selectivamente un mecanismo (inhibición GABAérgica) que se consideraba crítico para la generación de las crisis (**Löscher & Schmidt, 1994**). A partir de la década de 1990 la FDA aprobó el uso de una batería de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia, denominados también como **fármacos anticonvulsivos de tercera generación**. En esta clasificación se incluyen: Progabida, Vigabatrina, Zonisamida, Lamotrigina, Oxcarbazepina, Felbamato, Gabapentina, Topiramato, Fosfenitoína, Tiagabina, Levetiracetam, Pregabalina, Rufinamida, Estiripentol, Lacosamida, Eslicarbazepina, Retigabine, Perapamel y Brivaracetam (Figura 1.6.3) (**Löscher & Schmidt, 2011**). Estos nuevos anticonvulsivos son mejor tolerados que los de primera generación cuando se utilizan en monoterapia, tienen menos interacciones farmacocinéticas y han aumentado la posibilidad de tratamiento de crisis epilépticas que no podían ser controladas por los FACs clásicos.

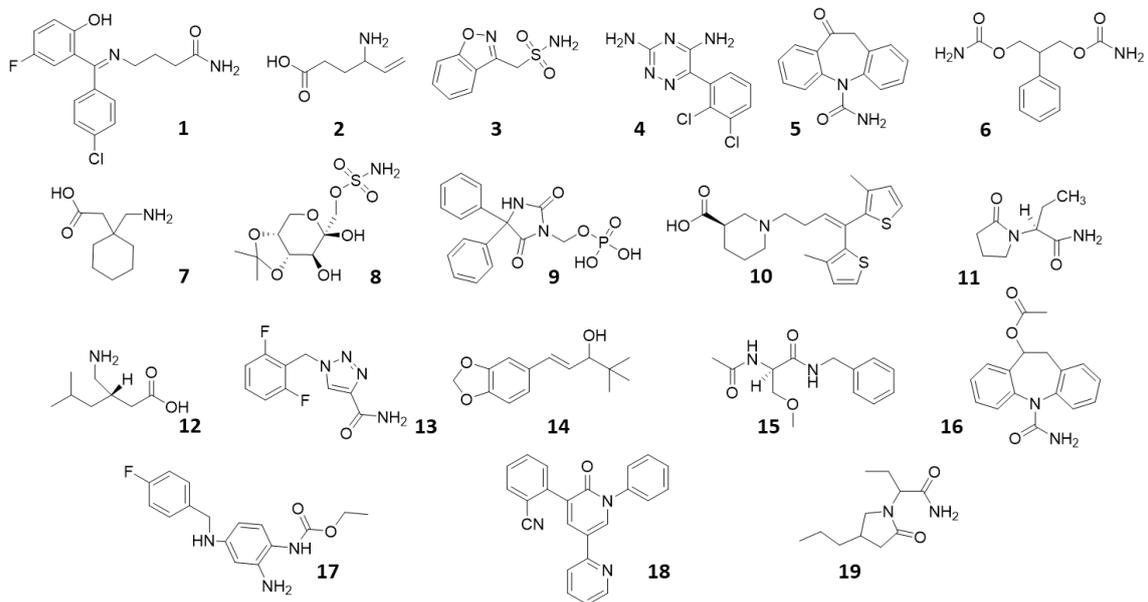


Figura 1.6.3 FACS de tercera generación: 1) Progabida 2) Vigabatrina 3) Zonisamida 4) Lamotrigina 5) Oxcarbazepina 6) Felbamato 7) Gabapentina 8) Topiramato 9) Fosfenitoina 10) Tiagabina 11) Levetiracetam 12) Pregabalina 13) Rufinamida 14) Estiripentol 15) Lacosamida 16) Eslicarbazepina 17) Retigabina 18) Perapamel 19) Brivaracetam.

El desarrollo de estos FACS sin dudas ha aumentado las posibilidades de tratamiento para los pacientes con epilepsia. Sin embargo, a pesar de la gran variedad de anticonvulsivos en el mercado el número de pacientes resistentes al tratamiento sigue siendo el porcentaje histórico que va del 30 al 40%. Por otra parte, aunque los anticonvulsivos de tercera generación sean mejor tolerados, los efectos adversos asociados a su uso siguen siendo un común denominador.

1.7. Farmacorresistencia

En el presente capítulo hemos definido cuando se diagnostica a un paciente como farmacorresistente. Desde el punto de vista molecular, existen diferentes hipótesis que intentan explicar el fenómeno de farmacorresistencia en epilepsia (**Tang et al., 2017**).

Hipótesis de los transportadores: Esta hipótesis plantea la posibilidad de que exista una sobreexpresión de transportadores de eflujo en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, de los astrocitos y de las neuronas, en los pacientes con epilepsia



refractaria. Como consecuencia de esto, muchos fármacos liposolubles, de los cuales se esperaría una buena difusión al SNC, presentan baja eficacia y bajas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo. Estos transportadores de eflujo pertenecen a un grupo de proteínas transmembrana dependientes de ATP, que se denominan ABC (del inglés *ATP binding cassette*). En esta familia, las más estudiadas son la glicoproteína-P (Pgp) y las proteínas de multirresistencia a medicamentos (MRP), específicamente la MRP1, la MRP2 y la MRP5 (**Espinosa Jovel & Sobrino Mejía, 2015**).

Hipótesis farmacocinética: En este caso también se postula una sobreexpresión de transportadores de eflujo, pero, a diferencia de la hipótesis anterior, que se produce en órganos periféricos (hígado, intestino, riñón). Como consecuencia de esta sobreexpresión, los niveles plasmáticos de los FACS se ven disminuidos y por lo tanto se reduce la cantidad de droga capaz de llegar al SNC y alcanzar el foco epiléptico cerebral (**Lazarowski et al., 2007**).

Hipótesis del blanco molecular: Plantea la posibilidad de que existan alteraciones en el sitio de acción de los FACS. Estos cambios pueden ser genéticos o adquiridos (**Wallace et al., 2002**).

Hipótesis de la red neuronal: Postula que, como consecuencia de las crisis epilépticas, se producen degeneraciones y remodelaciones sobre las redes neuronales, las cuales suprimen el sistema de control de convulsiones del cerebro (**Fang et al., 2011**).

Hipótesis de la gravedad intrínseca: Propone que la farmacorresistencia es inherente a la enfermedad, por lo que, si las crisis se desencadenan fácilmente, entonces una dosis habitual de una droga determinada no será capaz de controlarla (**Rogawski & Johnson, 2008**).

1.8. Mecanismos de Acción de anticonvulsivos

Las crisis epilépticas son causadas por una actividad neuronal anómala durante la cual se pierde el equilibrio normal entre procesos de excitación e inhibición (**Devinsky et al., 2018**). Sobre la base de este concepto, los FACs actuales buscan amortiguar los mecanismos excitatorios o potencian los inhibitorios. Si bien los mecanismos de acción de estas drogas no son completamente conocidos, se sabe que estos compuestos esencialmente actúan restableciendo el balance entre la excitación y la inhibición neuronal mediante su interacción con uno o más blancos moleculares a nivel cerebral. Estos **blancos moleculares** (*molecular targets* o *targets moleculares*) comprenden diferentes tipos de macromoléculas: canales iónicos, receptores de neurotransmisores y enzimas encargadas de su metabolización y transporte. El efecto final de estas interacciones es la alteración de la capacidad de descarga de las neuronas, la reducción de la sincronización de grupos de neuronas y la inhibición de la propagación de descargas anormales hacia sitios distales (**Rogawski & Löscher, 2004**). Los estudios básicos y clínicos han reconocido al menos cuatro mecanismos de acción de los actuales FACs (**Rogawski et al., 2016**):

- 1) Modulación de canales iónicos operados por voltaje.
- 2) Incremento de la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido γ -aminobutírico (GABA).
- 3) Disminución de la transmisión excitatoria mediada por glutamato.
- 4) Modulación directa de la liberación sináptica a través de los efectos en los componentes de la maquinaria de liberación.

Se debe mencionar que, si bien se reconocen mecanismos preponderantes para los FACs disponibles, estos fármacos pueden actuar a través de más de uno de ellos. En la Imagen 1.8.1 se resumen los blancos moleculares conocidos junto con algunos de los FACs más empleados.

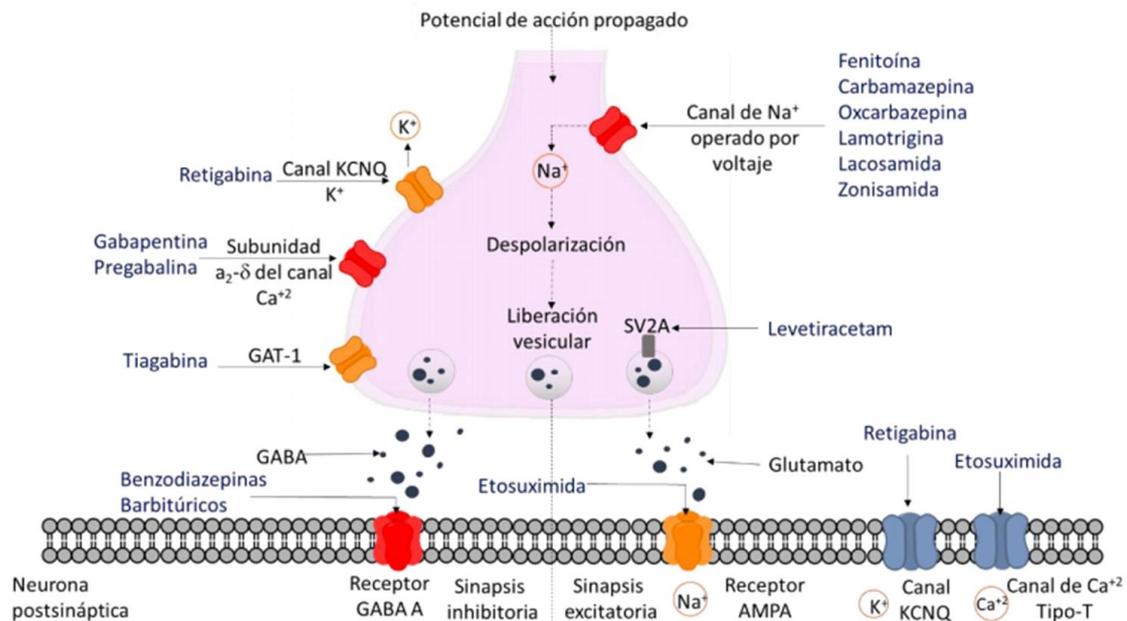


Imagen 1.8.1 Mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos. Abreviaturas: AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; GABA, ácido γ -aminobutírico; GAT-1, transportador 1 de GABA dependiente de sodio y cloruro; SV2A, glicoproteína 2A de vesículas sinápticas. Imagen adaptada de Schmidt & Schachter, 2014 y reproducida con autorización de BMJ Publishing Group.

1.8.1. Modulación de canales iónicos operados por voltaje

Los canales iónicos son proteínas que atraviesan la membrana celular y permiten el paso de iones a través de esta. Tienen una estructura tridimensional que genera un poro, el cual se vuelve accesible a los iones después de un cambio conformacional de canal abierto en la estructura proteica. Los canales iónicos son selectivos, solo permiten que ciertos iones pasen a través de ellos y juegan un papel fundamental en el control de la excitabilidad neuronal. Se dividen en aquellos que se abren por cambios en el potencial de membrana (canales iónicos dependientes de voltaje) y los que se abren por la unión de un ligando como una hormona o neurotransmisor (canales iónicos dependientes de ligandos) (**Ramachandran, 2002**). Como se menciona anteriormente, específicamente los canales iónicos activados por voltaje (que se expresan abundantemente en el SNC) son un blanco molecular de interés en el campo de la epilepsia, ya que se ha descrito que distintos anticonvulsivos eficaces en clínica actúan mediante la modulación de estas proteínas. Estos canales suelen denominarse en función de la permeabilidad y selectividad para determinados iones (p.ej., canal de sodio, calcio, potasio etc.).

1.8.1.1. Canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales de sodio producen potenciales de acción en respuesta a la despolarización parcial de la membrana. Estos canales son el blanco molecular de la mayor parte de los FACs clásicos y nuevos que, al inhibir este canal, estabilizan la membrana (**Rogawski & Löscher, 2004**). Las mutaciones en los canales de sodio dependientes de voltaje se han asociado con varias formas genéticas de epilepsia (**Oliva et al., 2012**). Los FACs que protegen contra las convulsiones a través de una interacción con los canales de sodio dependientes de voltaje se conocen comúnmente como "bloqueadores de los canales de sodio". Se encuentran entre los fármacos más utilizados en el tratamiento de las convulsiones tónico-clónicas generalizadas tanto focales como primarias. Dichos fármacos incluyen Fenitoína, Carbamazepina, Lamotrigina, Oxcarbazepina, Rufinamida y Lacosamida (**Rogawski et al., 2016**).

1.8.1.2. Canales de calcio dependientes de voltaje

La activación de los canales de calcio dependientes de voltaje se acompaña del aumento del calcio intracelular y la disminución del calcio extracelular. Se ha asociado con la liberación de neurotransmisores, con la despolarización sostenida de la neurona, con los fenómenos de potenciación prolongada y con los fenómenos de excitotoxicidad que subyacen en la epileptogénesis (**Delgado-Escueta et al., 1999**). Particularmente estos canales juegan un papel importante en los procesos que desencadenan las crisis de ausencia generalizadas (**Lambert., 2014**). Se propone que la Etosuximida, que es muy eficaz en el tratamiento de las crisis de ausencia, pero no en otros tipos de crisis, actúa mediante la inhibición de los canales de calcio de tipo T en el circuito talamocortical (**Gören & Onat, 2007**). La eficacia de algunos otros FACs también depende de su interacción con estos canales, un ejemplo es la Zonisamida, que tiene esta acción adicional al bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje (**Powell et al., 2014**), lo que explica su eficacia en las crisis de ausencia (**Hughes, 2009**). De manera similar, existe evidencia de que el Valproato, otro fármaco de elección para el tratamiento de las crisis de ausencia, también puede interaccionar con los canales de calcio de tipo T (**Broicher et al., 2007**).



1.8.1.3. Canales de potasio dependientes de voltaje

El canal de potasio dependiente de voltaje participa en la repolarización e hiperpolarización de la membrana. Los canales de potasio dependientes de voltaje se abren en respuesta a la despolarización de la membrana, lo que permite la salida de iones de potasio, impulsando el potencial de membrana hacia un nivel hiperpolarizado. Este proceso invierte eventos despolarizantes (como potenciales de acción y potenciales sinápticos) y provoca una reducción generalizada de la excitabilidad **(Rogawski et al., 2016)**. La Retigabina, que es eficaz en el tratamiento de las convulsiones focales, actúa como un modulador positivo de los canales de potasio del SNC **(Gunthorpe et al., 2012)**. Varios enfoques experimentales respaldan el papel de los canales de potasio en la actividad anticonvulsiva de la Retigabina. Por ejemplo, se observa que en ratones con un defecto genético en estos canales existe sensibilidad reducida al efecto anticonvulsivo de este compuesto **(Gunthorpe et al., 2012)**.

1.8.2. Incremento de la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido γ -aminobutírico

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio, el cual se forma en el cerebro por descarboxilación del glutamato. Actúa a través de los receptores GABA_A y GABA_B. Los receptores GABA_A son canales de iones cloruro activados por ligando y representan un blanco molecular importante para los FACs. Contrariamente, los receptores GABA_B son distintos en estructura y función a los receptores GABA_A, y no son un blanco molecular validado para ningún FAC **(Rogawski et al., 2016)**. En presencia del GABA, el receptor GABA_A se abre y produce un flujo de iones cloro que aumenta la polarización de la membrana. El incremento de la inhibición sináptica mediada por el GABA reduce la excitabilidad neuronal y eleva el umbral convulsivo. Se supone entonces que los diversos fármacos bloquean las convulsiones al regular la inhibición sináptica mediada por GABA a través de una actividad en distintos sitios de la sinapsis. Por ejemplo, existen fármacos que disminuyen el metabolismo del GABA (Vigabatrina, Tiagabina) y otros que actúan sobre el receptor GABA_A (barbitúricos, benzodiacepinas, Felbamato y Topiramato) **(Moshé et al., 2015)**.

1.8.3. Disminución de la transmisión excitatoria del SNC mediada por Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central y realiza su acción excitatoria actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Los receptores de glutamato se han clasificado en dos grupos principales: receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son designados según su especificidad; se clasifican como receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), receptores de kainato y receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos responden a la unión del glutamato incrementando la conductancia a un catión **(Meldrum, 1996)**. Los receptores metabotrópicos glutamatérgicos están asociados a proteínas G y actúan predominantemente regulando canales iónicos. Algunos estudios indican que mutaciones en estos receptores podrían estar involucradas en el desarrollo de la epilepsia **(Meldrum, 1996)**. Perampanel y Talampanel, son los únicos fármacos antiepilépticos actuales con efecto selectivo sobre los receptores de glutamato **(White et al., 2007)**. Muchos otros FACs ejercen su efecto a través del bloqueo de la neurotransmisión glutamatérgica, como por ejemplo Felbamato (que bloquea al receptor NMDA), Topiramato (que bloquea a los receptores kainato y AMPA) y Fenobarbital (que actúa sobre el receptor AMPA) **(Meldrum, 1996)**.

1.8.4. Modulación directa de la liberación sináptica a través de los efectos en los componentes de la maquinaria de liberación

La proteína de la vesícula sináptica 2 (SV2A) es una glicoproteína integral de membrana que se encuentra en las vesículas secretoras de las neuronas y células endocrinas. Es necesaria para la neurotransmisión normal y puede intervenir en la regulación de la exocitosis estimulada por el calcio **(Mendoza-Torreblanca et al., 2013)**. Si bien los mecanismos precisos de SV2A en la regulación de la liberación sináptica de neurotransmisores se encuentran aún en estudio **(Tokudome et al., 2016)** está demostrado que esta enzima es el blanco molecular de Levetiracetam. Además, existe una fuerte correlación entre la afinidad de los análogos de levetiracetam para unirse a SV2A y la potencia de los mismos en varios modelos animales de convulsiones **(Kaminski et al., 2012)**.



1.9. Referencias

- Balme, R. H. (1976). Early medicinal use of bromides (Sir Charles Locock). *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 10(2), 205-208.
- Banerjee, P. N., Filippi, D., & Allen Hauser, W. (2009). The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. *Epilepsy Research*, 85(1), 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.03.003>
- Brodie, M. J. (2010). Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 19(10), 650-655. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.10.027>
- Broicher, T., Seidenbecher, T., Meuth, P., Munsch, T., Meuth, S. G., Kanyshkova, T., Pape, H.-C., & Budde, T. (2007). T-current related effects of antiepileptic drugs and a Ca²⁺ channel antagonist on thalamic relay and local circuit interneurons in a rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*, 53(3), 431-446. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.030>
- Chang, C.-S., Liao, C.-H., Lin, C.-C., Lane, H.-Y., Sung, F.-C., & Kao, C.-H. (2014). Patients with epilepsy are at an increased risk of subsequent stroke: A population-based cohort study. *Seizure*, 23(5), 377-381. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.02.007>
- Delgado-Escueta, A. V., Wilson, W. A., Olsen, R. W., & Porter, R. J. (1999). New waves of research in the epilepsies: Crossing into the third millennium. *Advances in Neurology*, 79, 3-58.
- Devinsky, O., Spruill, T., Thurman, D., & Friedman, D. (2016). Recognizing and preventing epilepsy-related mortality: A call for action. *Neurology*, 86(8), 779-786. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002253>
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., & Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18024. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>
- Espinosa Jovel, C. A., & Sobrino Mejía, F. E. (2015). Farmacorresistencia en epilepsia. Conceptos clínicos y neurobiológicos. *Revista de Neurología*, 61(04), 159. <https://doi.org/10.33588/rn.6104.2015181>
- Fang, M., Xi, Z.-Q., Wu, Y., & Wang, X.-F. (2011). A new hypothesis of drug refractory epilepsy: Neural network hypothesis. *Medical Hypotheses*, 76(6), 871-876. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.02.039>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014a). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014b). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., D'Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E. M., & Zuberi, S. M. (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), 531-542. <https://doi.org/10.1111/epi.13671>

- Gavernet, L. (Ed.). (2021). *Introducción a la Química Medicinal*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/114312>
- Gomora, J. C., Daud, A. N., Weiergräber, M., & Perez-Reyes, E. (2001). Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Molecular Pharmacology*, *60*(5), 1121-1132.
- González, H. F. J., Yengo-Kahn, A., & Englot, D. J. (2019). Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy. *Neurosurgery Clinics of North America*, *30*(2), 219-230. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2018.12.005>
- Gören, M. Z., & Onat, F. (2007). Ethosuximide: From Bench to Bedside. *CNS Drug Reviews*, *13*(2), 224-239. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2007.00009.x>
- Gunthorpe, M. J., Large, C. H., & Sankar, R. (2012). The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy: Retigabine (Ezogabine) Mechanism of Action. *Epilepsia*, *53*(3), 412-424. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03365.x>
- Harden, C., Tomson, T., Gloss, D., Buchhalter, J., Cross, J. H., Donner, E., French, J. A., Gil-Nagel, A., Hesdorffer, D. C., Smithson, W. H., Spitz, M. C., Walczak, T. S., Sander, J. W., & Ryvlin, P. (2017). Practice guideline summary: Sudden unexpected death in epilepsy incidence rates and risk factors: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*, *88*(17), 1674-1680. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003685>
- Hughes, J. R. (2009). Absence seizures: A review of recent reports with new concepts. *Epilepsy & Behavior*, *15*(4), 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.06.007>
- Kaminski, R. M., Gillard, M., & Klitgaard, H. (2012). Targeting SV2A for Discovery of Antiepileptic Drugs. En J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen, & A. V. Delgado-Escueta (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (4th ed.). National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98183/>
- Keezer, M. R., Sisodiya, S. M., & Sander, J. W. (2016). Comorbidities of epilepsy: Current concepts and future perspectives. *The Lancet Neurology*, *15*(1), 106-115. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)
- Keppel Hesselink, J. M., & Kopsky, D. J. (2017). Phenytoin: 80 years young, from epilepsy to breast cancer, a remarkable molecule with multiple modes of action. *Journal of Neurology*, *264*(8), 1617-1621. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8391-5>
- Kwan, P., Schachter, S. C., & Brodie, M. J. (2011). Drug-Resistant Epilepsy. *New England Journal of Medicine*, *365*(10), 919-926. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004418>
- Lamberink, H. J., Otte, W. M., Geerts, A. T., Pavlovic, M., Ramos-Lizana, J., Marson, A. G., Overweg, J., Sauma, L., Specchio, L. M., Tennison, M., Cardoso, T. M. O., Shinnar, S., Schmidt, D., Geleijns, K., & Braun, K. P. J. (2017). Individualised prediction model of seizure recurrence and long-term outcomes after withdrawal of antiepileptic drugs in seizure-free patients: A systematic review and individual participant data meta-analysis. *The Lancet Neurology*, *16*(7), 523-531. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30114-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30114-X)
- Lambert, R. C., Bessaïh, T., Crunelli, V., & Leresche, N. (2014). The many faces of T-type calcium channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *466*(3), 415-423. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1353-6>



Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubienieki, F., Girardi, E., Vazquez, S., & D’Giano, C. (2007). ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 48(s5), 140-149. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01302.x>

Löscher, W., & Schmidt, D. (1994). Strategies in antiepileptic drug development: Is rational drug design superior to random screening and structural variation? *Epilepsy Research*, 17(2), 95-134. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)90012-4)

Löscher, W., & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma: Ways Out of the Current Dilemma with New AEDs. *Epilepsia*, 52(4), 657-678. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x>

Löscher, W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*, 42(7), 1873-1888. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>

Maguire, M. J., Jackson, C. F., Marson, A. G., & Nevitt, S. J. (2016). Treatments for the prevention of Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011792.pub2>

Meldrum, B. S. (1996). Update on the Mechanism of Action of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia*, 37(s6), S4-S11. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1996.tb06038.x>

Mendoza-Torreblanca, J. G., Vanoye-Carlo, A., Phillips-Farfán, B. V., Carmona-Aparicio, L., & Gómez-Lira, G. (2013). Synaptic vesicle protein 2A: Basic facts and role in synaptic function. *European Journal of Neuroscience*, 38(11), 3529-3539. <https://doi.org/10.1111/ejn.12360>

Moshé, S. L., Perucca, E., Ryvlin, P., & Tomson, T. (2015). Epilepsy: New advances. *The Lancet*, 385(9971), 884-898. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60456-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60456-6)

Neligan, A., Hauser, W. A., & Sander, J. W. (2012). The epidemiology of the epilepsies. En *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 107, pp. 113-133). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52898-8.00006-9>

Oliva, M., Berkovic, S. F., & Petrou, S. (2012). Sodium channels and the neurobiology of epilepsy: *Sodium Channels and Epilepsy*. *Epilepsia*, 53(11), 1849-1859. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03631.x>

“Organización Mundial de la Salud”. doi: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.

Powell, K. L., Cain, S. M., Snutch, T. P., & O’Brien, T. J. (2014). Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments: T-channels and epilepsy treatments. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(5), 729-739. <https://doi.org/10.1111/bcp.12205>

Ramachandran, V. S. (2002). *Encyclopedia of the human brain*. Academic Press. http://www.e-streams.com/es0606/es0606_2538.html

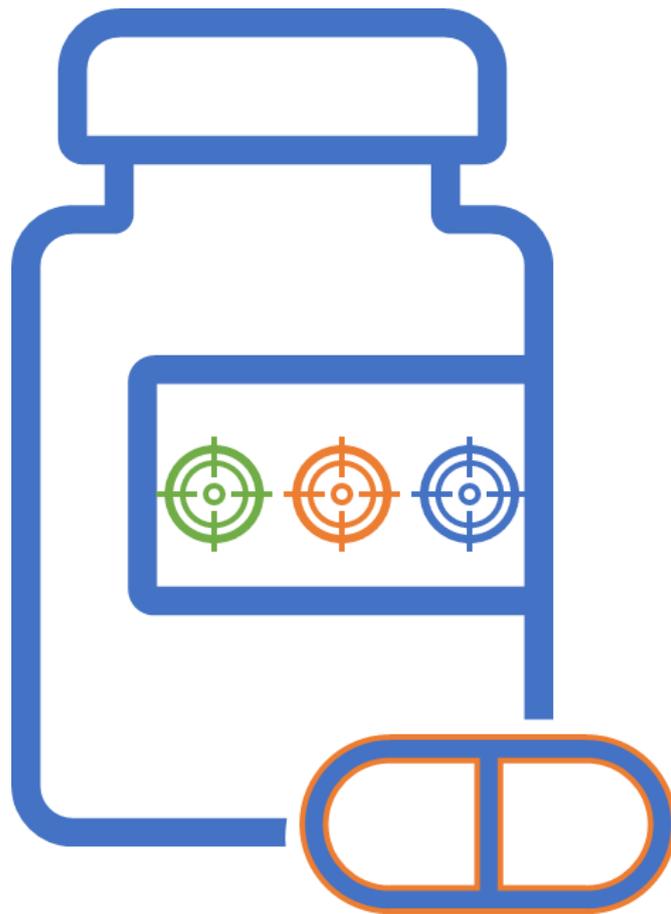
Rogawski, M. A., & Johnson, M. R. (2008). Intrinsic Severity as a Determinant of Antiepileptic Drug Refractoriness. *Epilepsy Currents*, 8(5), 127-130. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2008.00272.x>

Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553-564. <https://doi.org/10.1038/nrn1430>

- Rogawski, M. A., Löscher, W., & Rho, J. M. (2016). Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), a022780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022780>
- Rugg-Gunn, F., Miserocchi, A., & McEvoy, A. (2019). Epilepsy surgery. *Practical Neurology*, practneurol-2019-002192. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2019-002192>
- Salanova, V. (2018). Deep brain stimulation for epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 88, 21-24. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.06.041>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Schmidt, D., & Schachter, S. C. (2014). Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ*, 348(feb28 2), g254-g254. <https://doi.org/10.1136/bmj.g254>
- Shorvon, S. D. (2009). Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years, 1959-2009. *Epilepsia*, 50, 93-130. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02042.x>
- Stafstrom, C. E., & Carmant, L. (2015). Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6), a022426-a022426. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426>
- Tang, F., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2017). Drug-Resistant Epilepsy: Multiple Hypotheses, Few Answers. *Frontiers in Neurology*, 8, 301. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00301>
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), 689-701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
- Thomson, A. E., Calle, A., Fontela, M. E., Yopez, L., Muñoz Giacomelli, F., Jáuregui, A., Racosta, J. M., & Kanner, A. M. (2014). Screening of major depression in epilepsy: The Neurologic Depression Disorders Inventory in Epilepsy-Spanish version (Argentina). *Epilepsia*, 55(2), 331-334. <https://doi.org/10.1111/epi.12503>
- Tokudome, K., Okumura, T., Shimizu, S., Mashimo, T., Takizawa, A., Serikawa, T., Terada, R., Ishihara, S., Kunisawa, N., Sasa, M., & Ohno, Y. (2016). Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission. *Scientific Reports*, 6(1), 27420. <https://doi.org/10.1038/srep27420>
- Ułamek-Kozioł, M., Czuczwar, S. J., Januszewski, S., & Pluta, R. (2019). Ketogenic Diet and Epilepsy. *Nutrients*, 11(10), 2510. <https://doi.org/10.3390/nu11102510>
- Wallace, R. H., Scheffer, I. E., Parasivam, G., Barnett, S., Wallace, G. B., Sutherland, G. R., Berkovic, S. F., & Mulley, J. C. (2002). Generalized epilepsy with febrile seizures plus: Mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology*, 58(9), 1426-1429. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.9.1426>
- White, H. S., Smith, M. D., & Wilcox, K. S. (2007). Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. En *International Review of Neurobiology* (Vol. 81, pp. 85-110). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)81006-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)81006-8)

Capítulo 2

Polifarmacología





2.1 Introducción

Históricamente, se han hecho grandes esfuerzos en el campo del diseño de fármacos para el desarrollo de moléculas capaces de actuar en un blanco molecular específico con alta potencia y selectividad (**Erickson, 1998; Strebhardt & Ullrich, 2008**). Este paradigma (denominado bala mágica, o *magic bullet*) se basa en una relación directa de causa/efecto entre la actividad de una macromolécula y un fenotipo particular. En consecuencia, una molécula capaz de modular específicamente la actividad de, por ejemplo, una proteína desregulada, debería ser capaz de revertir un fenotipo patológico. Un caso particular de estos sistemas podría ser la actividad aumentada o sobreexpresión de una determinada enzima que da como resultado un funcionamiento anómalo de uno o varios procesos biológicos. En un caso hipotético como el planteado, un modulador potente y selectivo podría restaurar las funciones biológicas normales (**Anighoro et al., 2014**).

El enfoque de un *target* único ha logrado la aceptación generalizada en la comunidad científica y ha resultado exitoso, especialmente con enfermedades que pueden asociarse a mecanismos bien establecidos (**Tan et al., 2016**). Cabe destacar que aquellas moléculas que muestran interacciones significativas con *targets* que no son relevantes para abordar el efecto farmacológico deseado son consideradas no-selectivas (promiscuas), ya que esta actividad podría conducir a efectos secundarios indeseados (**Morphy & Rankovic, 2005**).

En la actualidad se reconoce que los conceptos basados en un único blanco molecular pueden ser demasiado simplistas para explicar el mecanismo de acción de algunos fármacos, o para diseñar terapias para enfermedades complejas. En patologías multifactoriales, múltiples blancos moleculares (y sus procesos biológicos asociados), cumplen un rol relevante en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Cáncer, esquizofrenia, trastornos del estado de ánimo, Alzheimer y epilepsia son algunos ejemplos de este tipo de patologías (**Csermely et al., 2005; Roth et al., 2004**).



Debido a los avances en biología de sistemas y el conocimiento generado sobre el desarrollo y progresión de distintas enfermedades (y los procesos biológicos involucrados) (**Talevi, 2015**), el diseño de fármacos moderno ha experimentado un cambio de paradigma hacia el diseño de moléculas capaces de modular simultáneamente un preciso número de macromoléculas como una posible solución terapéutica, con especial énfasis en el tratamiento de enfermedades complejas y fenómenos de resistencia a los fármacos. La bibliografía indica que las patologías complejas son a menudo de naturaleza poligénica y tienden a implicar la desregulación de redes de proteínas complejas y extendidas. Por lo tanto, resulta poco probable que dichas enfermedades se traten con éxito mediante intervenciones farmacológicas basadas en la modulación de un solo objetivo, mientras que la modulación de una variedad óptima de blancos moleculares puede proporcionar una estrategia más eficiente (**Lu et al., 2012; Proschak et al., 2019**). Por ejemplo, en un sistema biológico hipotético en el que se modula una sola vía o *target* molecular, pueden fomentarse procesos compensatorios, los cuales, mediante la activación de otras vías, pueden conducir a un fenotipo de resistencia y dar como resultado la necesidad de administrar dosis de fármaco cada vez más altas, a fin de sostener un efecto terapéutico. A su vez, si se piensa en el uso de mayores dosis, puede aumentar el riesgo de efectos secundarios, como consecuencia de modulaciones no específicas con otros *targets* moleculares (*off-target*) (**Anighoro et al., 2014**). Teniendo en cuenta estas consideraciones, y las limitaciones que presenta la aproximación simplista del paradigma de “bala mágica”, es pertinente la introducción de un marco distinto sobre el cual estudiar el diseño de fármacos para estas patologías complejas, entre las que se encuentra la epilepsia. A continuación, se introduce el concepto de polifarmacología y otras definiciones relacionadas, incluyendo ejemplos del campo de desarrollo de fármacos anticonvulsivos.



2.2 Polifarmacología

La polifarmacología estudia el diseño o uso de agentes farmacéuticos que actúan sobre múltiples blancos moleculares o procesos patológicos (**Anighoro et al., 2014**). En este marco, el término "agentes farmacéuticos" puede referirse a:

- **Combinaciones de fármacos o terapia combinatoria:** es la administración de múltiples fármacos que modulan múltiples blancos moleculares en búsqueda de un efecto aditivo/complementario.
- **Fármacos multiobjetivo / multitarget:** es la administración de un único fármaco que da lugar a un efecto terapéutico mediante la modulación de múltiples procesos o blancos moleculares (**Morphy & Rankovic, 2005**).

Debe mencionarse que algunos autores no incluyen a las combinaciones de fármacos dentro de la definición de polifarmacología, pero en este trabajo se los considerará dentro de este grupo en concordancia con otros investigadores (**Albertini et al., 2021**), debido a la importancia que poseen particularmente para el tratamiento de la epilepsia (figura 2.2.1). Cabe destacar también que en el campo de la polifarmacología se abordan las interacciones específicas de un compuesto con múltiples objetivos y sus efectos funcionales asociados. Existe aquí una sutil diferencia con los fármacos promiscuos o no-selectivos que presentan múltiples interacciones con blancos moleculares no deseados, o al menos no considerados desde el diseño (**Moya-García et al., 2017**).



Figura 2.2.1 Polifarmacología. Agentes farmacéuticos capaces de modular simultáneamente diversos targets moleculares.



2.3 Polifarmacología: Combinación de fármacos

Tradicionalmente, las combinaciones de fármacos se han indicado a pacientes que no responden a un determinado tratamiento. Las combinaciones de fármacos específicos están diseñadas para lograr un mejor control de la enfermedad, como resultado de la modulación simultánea de blancos moleculares relevantes en pacientes estudiados adecuadamente. Existen distintos criterios para seleccionar un segundo fármaco complementario para un tratamiento por combinación. En términos generales esta elección puede incluir:

- 1) Un fármaco que actúa sobre el mismo blanco molecular.
- 2) Un fármaco que actúa sobre otro blanco molecular de los procesos involucrados en la enfermedad.
- 3) Un fármaco que actúa sobre otra vía o proceso celular que está involucrado en la patogénesis y/o mecanismos de resistencia y progresión de la enfermedad.

Estas estrategias combinatorias han sido exploradas para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, leucemia y esclerosis múltiple, entre otros desórdenes poligénicos **(Anighoro et al., 2014)**. En general, para una mayor probabilidad de éxito, los fármacos combinados deben ser activos individualmente, provocar efectos sinérgicos, tener diferentes mecanismos de acción y de resistencia y toxicidades distintivas **(Kabir & Muth, 2022)**.

Lo más frecuente es que la combinación de fármacos sea administrada en forma de dos o más comprimidos individuales (Cóctel de fármacos). Sin embargo, debido a la dificultad de cumplimiento por parte del paciente, en los últimos años se han explorado opciones de fármacos multicomponentes (fármacos de dosis combinadas), es decir, formas farmacéuticas en las que se co-formulan dos o más agentes en un solo comprimido y con una combinación de dosis fija, a modo de poder simplificar los regímenes de dosificación (Figura 2.2.1) **(Abu Esba et al., 2021; I. Wertheimer, 2013)**.



Figura 2.2.1 Opciones de administración en la terapia combinatoria o combinación de fármacos.

2.4 Combinación de fármacos y Epilepsia

Si bien existen pruebas de que la combinación de fármacos puede ser un enfoque razonable para controlar ciertos tipos de epilepsias resistentes a los medicamentos **(Brodie, 2016)**, solo unos pocos estudios han comparado la eficacia de las combinaciones de fármacos con la eficacia de la monoterapia alternativa en las dosis máximas toleradas. El problema inherente con el concepto de la combinación de fármacos es que, dado el importante número de fármacos anticonvulsivos clínicamente aprobados, son posibles varios cientos de terapias duales y más de mil combinaciones triples, lo que hace prácticamente imposible cualquier evaluación clínica sistemática basada en la evidencia. Esta dificultad se vuelve aún más compleja cuando se consideran las múltiples relaciones de dosis posibles entre dos o más fármacos anticonvulsivos en combinación. Por lo tanto, una evaluación sistemática de las combinaciones de fármacos anticonvulsivos sólo es factible en modelos animales **(Deckers et al., 2000)** **(Verrotti, Tambucci, et al., 2020)**. En este contexto resulta importante que los estudios de combinación preclínica en modelos de convulsiones incorporen lecturas de eficacia y toxicidad, en las que los fármacos sean al menos mínimamente efectivos, se administren en proporciones que reflejan a las empleadas clínicamente y se incluya un análisis de concentración de fármacos (tanto en plasma como en cerebro) para poder descartar interacciones farmacocinéticas **(Brodie & Sills, 2011)**.

La combinación ideal de fármacos anticonvulsivos debería mostrar sinergismo farmacológico, es decir: eficacia mejorada con toxicidad similar, eficacia similar con toxicidad reducida o, idealmente, eficacia mejorada con toxicidad reducida. Mediante



el uso de estos criterios, se han evaluado a nivel preclínico cientos de combinaciones diferentes de fármacos anticonvulsivos (**Deckers et al., 2000**) (**Czuczwar et al., 2009**). Uno de los primeros ensayos sistemáticos fue publicado por Weaver en 1955 (**Weaver et al., 1955**), en el cual se muestra la eficacia anticonvulsiva sinérgica de la combinación de Fenitoína y Fenobarbital en la prueba MES-test en ratas, para luego observar en estudios clínicos la aparente interacción beneficiosa de esta combinación. Más recientemente, en el trabajo de revisión de Löscher (**Löscher, 2011**) se muestran las evaluaciones de duo-terapias que ejercieron una eficacia anticonvulsiva sinérgica (supra-aditiva) en modelos animales y la eficacia sinérgica presunta en ensayos clínicos, donde se puede remarcar el hecho de que existe una buena correlación entre los datos generados en estudios en animales con los datos obtenidos en estudios clínicos.

En cuanto a los estudios clínicos, los datos provienen de grupos pequeños, a menudo no replicados de forma independiente, y existen pocos estudios controlados aleatorios que comparen diferentes combinaciones de fármacos anticonvulsivos (**Verrotti, Lattanzi, et al., 2020**). Un trabajo relevante propone una sinergia verdadera en la combinación de ácido valproico y lamotrigina para convulsiones de inicio focal y generalizadas (**Kwan & Brodie, 2006**). En relación con los mecanismos de acción, puede mencionarse un análisis retrospectivo de 8000 pacientes con epilepsia de inicio focal, donde se observó que en aquellas personas que recibieron combinaciones únicamente de fármacos GABAérgicos, o únicamente bloqueadores de los canales de sodio, la efectividad del tratamiento fue menor en comparación con los que recibieron combinaciones de fármacos anticonvulsivos con diferentes mecanismos primarios (**Margolis et al., 2014**). Estos resultados evidencian la importancia de la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción frente a aquellos con el mismo modo de acción principal. Lamentablemente los datos informados hasta la fecha indican que, en general, la combinación de fármacos es clínicamente útil solo en una minoría de sujetos con epilepsia farmacorresistente a un único compuesto (**Chen et al., 2018**).



2.5 Polifarmacología: Fármacos multiobjetivo

Un fármaco activo sobre múltiples blancos moleculares puede presentar una mayor eficacia en comparación con un agente farmacológico altamente selectivo, mediante una modulación aditiva o sinérgica (Talevi, 2015). A su vez, puede evitar la promoción de procesos que generan resistencia a los medicamentos (Lu et al., 2012). En comparación con la combinación de fármacos, este tipo de compuestos presenta una farmacocinética más predecible y bajas probabilidades de interacciones medicamentosas (*drug-drug interactions*) (Talevi, 2015b).

A nivel molecular, los fármacos multiobjetivo son entidades individuales que se pueden dividir en dos clases principales: Moléculas híbridas y Co-drogas (Albertini et al., 2021)

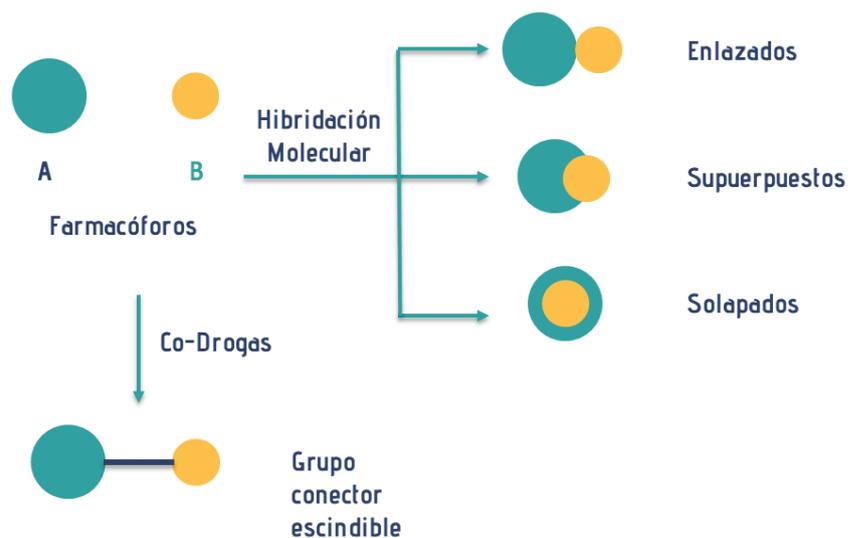


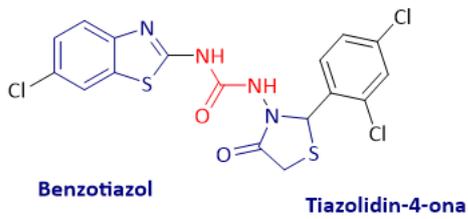
Figura 2.5.1 Fármacos multiobjetivo. Representación gráfica de los distintos modos de unión entre farmacóforos para la generación de Híbridos y co-drogas.

En el caso de las co-drogas se trata de moléculas que están pensadas para disociarse en el organismo y dar origen a dos o más fragmentos activos en diferentes *targets*, mientras que las moléculas híbridas son estructuras completas que pueden ejercer su acción como tales en múltiples blancos moleculares. Esto se logra debido a la presencia de distintos farmacóforos dentro de la misma molécula unidos a distintos niveles (enlazados, superpuestos o solapados) como se observa en la Figura 2.5.1.

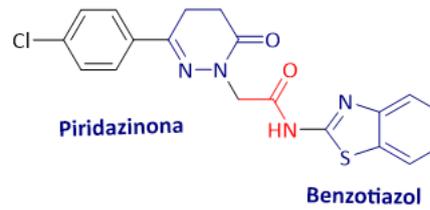


2.6 Fármacos híbridos y epilepsia

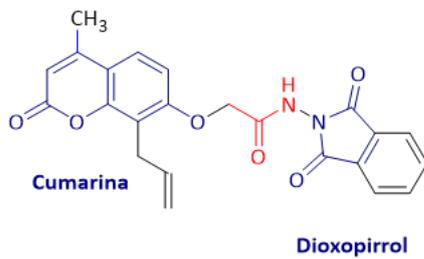
En el desarrollo de fármacos multiobjetivo, el concepto de hibridación molecular ha atraído mucha atención en las últimas décadas (**Bansal & Silakari, 2014**). En esta estrategia diferentes farmacóforos, cada uno con un efecto farmacológico particular, se combinan en una sola estructura para obtener nuevos compuestos con características multiobjetivo, proporcionando un nuevo punto de partida para mejorar su actividad biológica (**Morphy & Rankovic, 2005**). El término **farmacóforo** se refiere a aquel arreglo tridimensional de la molécula que posee las características moleculares mínimas para asegurar las interacciones con un blanco molecular específico, logrando de esa forma que se produzca la respuesta biológica (**Gavernet 2021**). Las características farmacofóricas se pueden integrar en diferentes niveles: los farmacóforos pueden estar separados por enlazadores o combinados/fusionados para aprovechar las ventajas de las características moleculares en común, generando estructuras más pequeñas y simples (**Gantner et al., 2021**). Varios grupos de investigación han aplicado la estrategia de hibridación para la generación de nuevos compuestos con actividad anticonvulsiva, aunque cabe destacar que esta combinación de farmacóforos no necesariamente revela la intención de los investigadores de modular diferentes targets moleculares (**Kamiński et al., 2016**). Sin embargo, sus resultados mostraron que el diseño de fármacos híbridos puede conducir a nuevas estructuras con un amplio espectro de actividad anticonvulsiva y alta potencia en las pruebas *in vivo*. Este perfil biológico podría indicar que algunos compuestos probablemente interactúen con diferentes targets moleculares, pero los candidatos no han sido evaluados frente a ellos en la mayoría de las investigaciones. En la Figura 2.6.1 se muestran estructuras representativas de los compuestos con acción anticonvulsiva construidos por la unión de **fragmentos activos/farmacóforos mediados por un grupo conector** recopilados de literatura (**Abd-Allah et al., 2020; Aboutabl et al., 2020; Jamal Gilani et al., 2019; Mohammadi-Khanaposhtani et al., 2019; Partap et al., 2017; Siddiqui et al., 2020**).



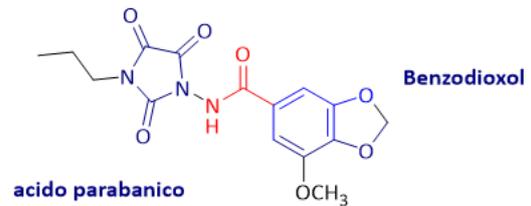
MES activo
PTZ activo
inhibidor GABA AT IC50 15.26 μ M



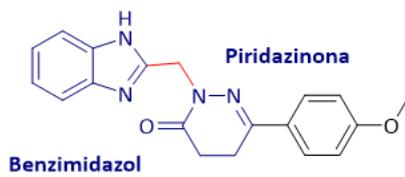
ED50 24.38mg/kg (MES, ratón)
ED50 88.23mg/kg (PTZ, ratón)



PTZ Activo
MES Activo
ED50 0.238 mmol/kg (PTZ, ratón)



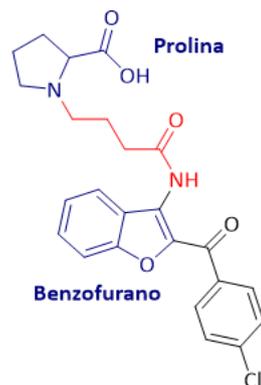
PTZ active
ED50 = 13.7 mg / kg (MES, ratón)
indice de Proteccion > 36.5.



ED50 25.10 mg/kg (MES, ratón)
ED50 85.33 mg / kg (PTZ, ratón)



MES activo



MET activo
(ED50) 31.6 mg/kg, (MES, ratón)

Figura 2.6.1. Moléculas híbridas con acción anticonvulsiva generadas por la unión de fragmentos activos (azul) mediados por un grupo conector(rojo).



Como se mencionó anteriormente, otra estrategia para las moléculas híbridas es la construcción de moléculas cuyos farmacóforos que se combinan están altamente integrados (híbridos de farmacóforos superpuestos), lo que da como resultado estructuras más pequeñas y simples. Kamiński y colaboradores han publicado numerosas investigaciones que utilizan esta estrategia para el diseño de anticonvulsivos. Sintetizaron moléculas híbridas mediante la fusión de fragmentos químicos de FACs como Etosuximida, Levetiracetam y Lacosamida (**Kamiński et al., 2015, 2016, 2020**). Los compuestos resultantes mostraron un amplio espectro de actividad, con interesantes resultados *in vivo* en las pruebas MES, PTZ y 6Hz. Además, en la mayoría de los casos, se evidencian buenos perfiles de neurotoxicidad (**Andres-Mach et al., 2020**). Entre las estructuras diseñadas, la N-Bencil-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) propanamida (Figura 2.6.2) surgió como una molécula prometedora con buenos índices de protección (**Kamiński et. al., 2020**). El compuesto también se sometió a ensayos *in vitro* para estudiar su unión a canales de calcio y de sodio, el receptor GABAA, el transportador GABA y el receptor NMDA. Los autores concluyeron que no pueden asignar un mecanismo de acción predominante para la estructura con los datos actuales disponibles, aunque los resultados ponen de manifiesto las características multiobjetivo de las moléculas obtenidas mediante esta aproximación (**Kamiński et. al., 2020**).

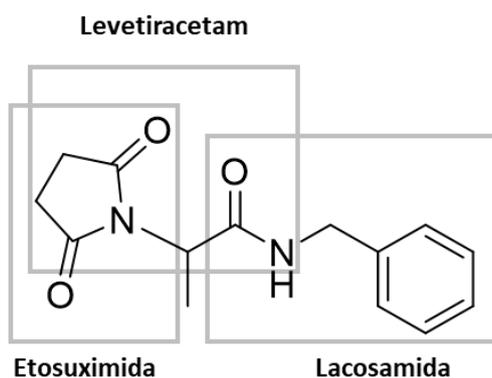


Figura 2.6.2. N-Bencil-(2,5-dioxopirrolidin-1-yl) propanamida.



Aunque la generación de híbridos ha sido propuesta para la terapia en epilepsia hace más de 25 años, solo un fármaco anticonvulsivo, Padsevonil (Figura 2.6.3), ha sido intencionalmente desarrollado como una única entidad molecular capaz de modular dos mecanismos diferentes. Esta droga novedosa muestra efectos promisorios en numerosos modelos preclínicos de convulsiones (Wood et al., 2020).

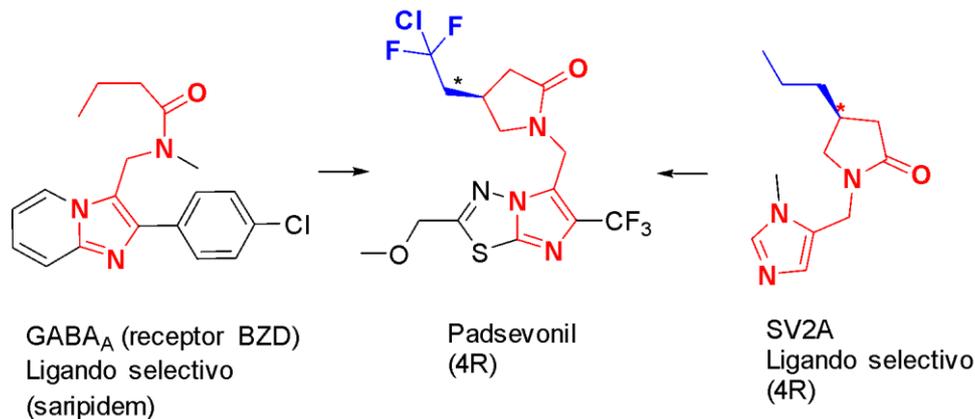


Figura 2.6.3. Padsevonil. Molécula híbrida diseñada de forma racional, generada mediante la superposición de dos *scaffolds*, uno presente en un ligando selectivo del receptor GABA_A y otro presente en un ligando selectivo de SV2A. Como resultado, el híbrido formado presenta actividad en ambos blancos moleculares y actividad *in-vivo* en diversos modelos animales.

2.7 Co-drogas

El término **Co-droga** o **Co-Fármaco** (también según algunos autores sinónimo de **prodrogas mutuas** (Baltzer et al., 1980), **moléculas conjugadas** (Cheng & Wuest, 2019), **ligandos múltiples diseñados** (*designed multiple ligands*) (Morphy & Rankovic, 2005) e incluso **híbridos** (Serafim et al., 2017)) refiere a 2 o más compuestos, cada uno con una determinada actividad farmacológica, unidos entre sí por un enlace químico conector diseñado para ser metabólicamente escindible, con el objetivo de obtener una acción sinérgica/complementaria, reducir efectos adversos o incluir algún tipo de actividad biológica de la cual carece un determinado fármaco de partida (Figura 2.7.1)(Kim et al., 2016; Parise Filho et al., 2010).

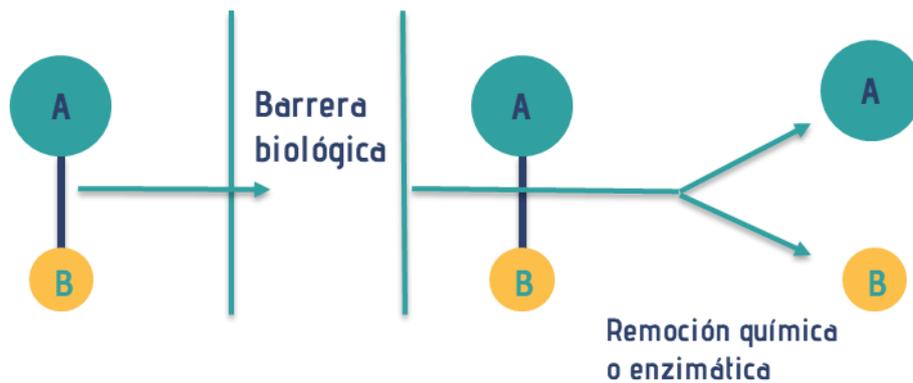


Figura 2.7.1. Representación esquemática del funcionamiento de una co-droga. A y B representan dos moléculas activas unidas entre sí por un conector metabólicamente escindible.

La introducción del concepto “co-droga” o “prodroga mutua” nos remite a la estrategia de **profármacos (o prodrogas)** extensamente estudiada en química medicinal. Por definición, un profármaco es un compuesto inactivo que, luego de su administración, sufre una transformación química o enzimática a nivel sistémico para dar lugar a una molécula activa (**Aljuffali et al., 2016**). El objetivo principal de la estrategia de prodrogas es el aumento de biodisponibilidad del compuesto activo de estudio (**Albert, 1958; Rautio et al., 2018**), para generar una mejora de la eficacia terapéutica. Una de las clases más utilizadas de profármacos es aquella donde el compuesto activo está unido en forma covalente a distintos “grupos moduladores” que son liberados luego de la metabolización de los profármacos (Figura 2.7.2). Debe evitarse entonces que dichos grupos moduladores puedan conducir a efectos adversos o interacciones no deseadas con otros targets moleculares (**Aljuffali et al., 2016**).

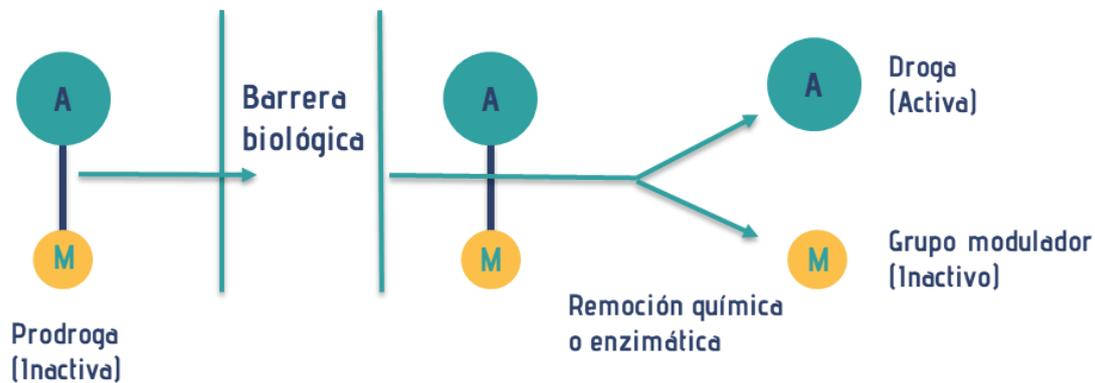


Figura 2.7.2. Representación esquemática del funcionamiento de una Prodroga. A representa una molécula activa unida por un conector metabólicamente escindible a un grupo modulador M.

Algunos autores definen a las co-drogas como un tipo especial de profármacos, en el cual ambos componentes están pensados para tener efectos sinérgicos y donde cada componente actúa como grupo modulador del otro (**Gangrade & Karande, 2017**) de manera de mejorar principalmente las propiedades de administración de uno o ambos fármacos (**Das et al., 2010**). Una co-droga en sí puede ser inactiva, poco activa o más activa que los agentes de partida. De todas formas, los dos farmacóforos combinados a través de un conector escindible están diseñados para que solo después de la biotransformación enzimática o química (idealmente en el sitio de acción deseado) liberen sus componentes y generen efectos biológicos individuales contra múltiples blancos moleculares (**Vu et al., 2016**). Cabe destacar que, a diferencia de los fármacos híbridos, las co-drogas son la única opción posible cuando los dos fármacos de partida que se desean combinar no poseen características estructurales en común que puedan dar lugar a moléculas integradas/amalgamadas (**Albertini et al., 2021**).

Las co-drogas se introdujeron por primera vez bajo el nombre de “prodroga mutua” en 1980 con el desarrollo de un compuesto mixto de Ampicilina/Sulbactam (**Baltzer et al., 1980**), la Sultamicilina (Figura 2.7.3). Actualmente el diseño de esta clase de compuestos representa un área de importancia para el estudio de soluciones terapéuticas a patologías de la piel (**Hsieh et al., 2017**), neurodegenerativas, hipertensión (**Mascarello et al., 2021**), cardiovasculares (**Gao et al., 2016**), infecciosas (**Husain et al., 2016**) e inflamatorias (**Jeong et al., 2020; Sehajpal et al., 2019**).

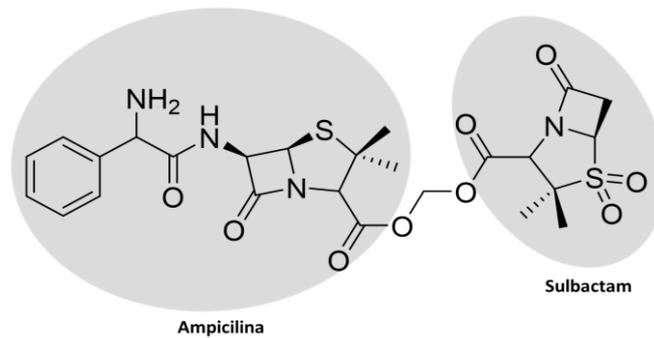


Figura 2.7.3. Sultamicilina. Co-droga del antibiótico Ampicilina y el inhibidor de betalactamasas Sulbactam mediante un grupo conector oximetilo.

2.8 Co-drogas y epilepsia

El uso de co-drogas ha sido estudiado como estrategia de diseño para enfermedades multifactoriales como trastornos neurodegenerativos, cardiovasculares, cancerosos, infecciosos e inflamatorios (Aljuffali et al., 2016), pero no se encuentra en literatura muchos ejemplos de aplicación para el campo de la epilepsia. De hecho, en esta patología el desarrollo actual de moléculas multiobjetivo se centra mayoritariamente en el desarrollo de moléculas híbridas descritas previamente en este capítulo. El primer ejemplo que puede encontrarse en literatura es de 1996, en donde se sintetizó y evaluó la actividad biológica del valproato de 3-hidroxi metilfenitoina (Figura 2.8.1) bajo la denominación de “una nueva prodroga que combina dos agentes anticonvulsivos” (Scriba, 1996).

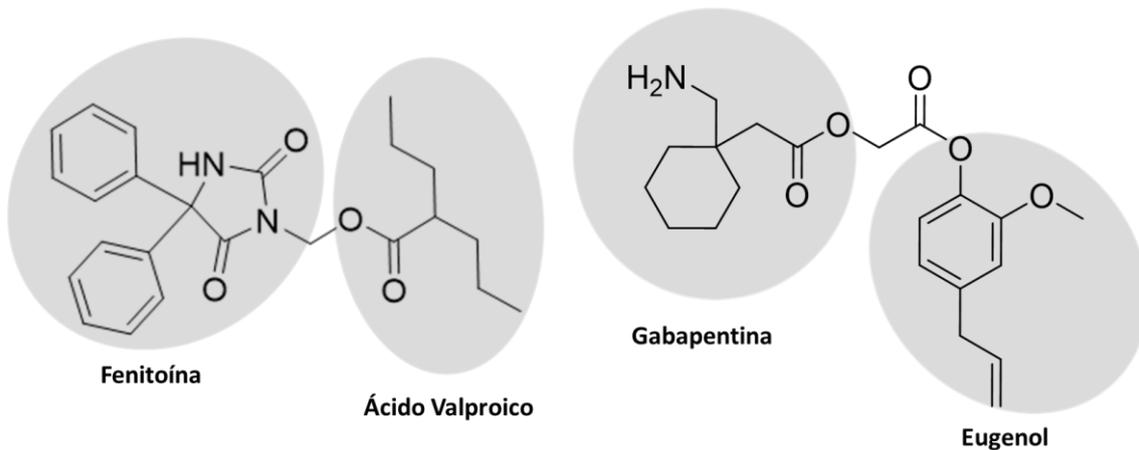


Figura 2.8.1. Co-droga de Fenitoína y Ácido Valproico mediante grupo conector oximetilo. Codroga .de Gabapentina y Eugenol mediante grupo conector acetilo.

Si se observa la estructura del compuesto estudiado, y aplicando las definiciones modernas, está podría ser una de las primeras “co-drogas” de anticonvulsivos. Presenta dos anticonvulsivos de uso en clínica como el Ácido Valproico y la Fenitoína, unidos entre sí por un enlace conector derivado de formaldehído. Los resultados de actividad biológica para este derivado mostraron un perfil anticonvulsivo similar a Fenitoína, por lo que los autores concluyen que la co-droga estudiada puede estar funcionando simplemente como una “prodroga” de la Fenitoína, debido a la baja complementariedad de los mecanismos de acción subyacentes a cada molécula de partida. Un ejemplo más reciente es la construcción de co-drogas de Gabapentina (**Mohammed & Omar, 2021**). Con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas de este fármaco, Mohammed y colaboradores sintetizaron co-drogas mediante la unión de Gabapentina a una molécula proveniente de un producto natural de demostrada actividad antiinflamatoria y/o antioxidante (Eugenol). Para ello utilizaron un grupo conector tipo acetilo como se muestra en la Figura 2.8.1. Para esta co-droga se evaluó experimentalmente la capacidad antiinflamatoria, antifúngica y antibacteriana. Lamentablemente no se evaluó la capacidad anticonvulsiva de esta molécula, sin embargo, se observó un aumento en la capacidad antiinflamatoria en relación al Eugenol.



2.9 ¿Co-droga o fármaco híbrido?

De acuerdo con las definiciones enunciadas en el presente capítulo, cabe la pregunta de qué tipo de compuestos fueron sintetizados en este trabajo de tesis. Desde el punto de vista químico, los productos obtenidos mediante síntesis orgánica constan de la unión de dos fragmentos bien definidos. Por un lado, una molécula de Ácido Valproico (ácido 2-propilpentanoico, VPA), un ácido carboxílico saturado y ramificado que presenta por sí mismo características multiobjetivo para su acción anticonvulsiva. Por el otro, una segunda molécula cuya estructura presenta el grupo funcional fenol o ácido carboxílico y algún mecanismo de acción relevante en epilepsia. Por último, un grupo conector derivado de formaldehído o acetaldehído, encargado de la unión de ambos fragmentos. Estos grupos conectores ya han sido utilizados en fármacos que tratan otras patologías, observándose que se trata de grupos lo suficientemente estables como para transportar a los componentes al sitio de acción y metabólicamente escindibles para la óptima liberación de los activos en el organismo. En la figura 2.9.1 se muestran ejemplos de las moléculas obtenidas y las subestructuras que las componen.

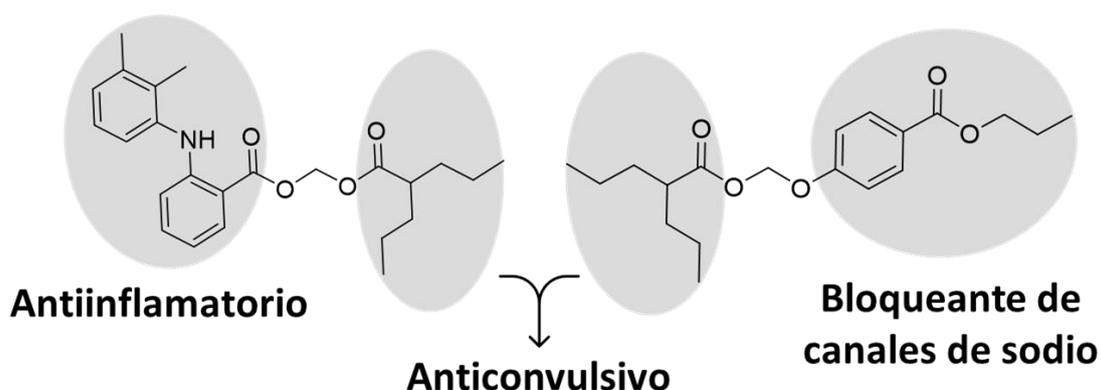


Figura 2.9.1. Ejemplos de productos obtenidos por síntesis orgánica en este trabajo de tesis.

Si el grupo conector es capaz de escindirse en el organismo, liberando ambos fragmentos activos, podremos definir a las estructuras sintetizadas como co-drogas. Sin embargo, este término sería correcto sólo si se demostrara experimentalmente la escisión del enlace, por ejemplo, en modelos animales. Hasta entonces, se adoptará un criterio más conservador en esta tesis, denominándolos **compuestos multiobjetivo**, diseñados para actuar como Co-drogas de anticonvulsivos.



2.10 Referencias

- Abd-Allah, W. H., Osman, E. E. A., Anwar, M. A.-E.-M., Attia, H. N., & El Moghazy, S. M. (2020). Design, synthesis and docking studies of novel benzopyrone derivatives as anticonvulsants. *Bioorganic Chemistry*, *98*, 103738. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103738>
- Aboutabl, M. E., Hassan, R. M., El-Azzouny, A. A.-S., Aboul-Enein, M. N., & Abd-Allah, W. H. (2020). Design and synthesis of novel parabanic acid derivatives as anticonvulsants. *Bioorganic Chemistry*, *94*, 103473. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103473>
- Abu Esba, L. C., Yousef, C., Ismail, S., Halim, M., Almodaimegh, H., Al-Abdulkarim, H. A., & Alhowimel, M. (2021). Fixed dose combinations: A formulary decision guide. *Health Policy and Technology*, *10*(2), 100500. <https://doi.org/10.1016/j.hlpt.2021.02.006>
- Albert, A. (1958). Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature*, *182*(4633), 421-423. <https://doi.org/10.1038/182421a0>
- Albertini, C., Salerno, A., Sena Murteira Pinheiro, P., & Bolognesi, M. L. (2021). From combinations to multitarget-directed ligands: A continuum in Alzheimer's disease polypharmacology. *Medicinal Research Reviews*, *41*(5), 2606-2633. <https://doi.org/10.1002/med.21699>
- Aljuffali, I. A., Lin, C.-F., Chen, C.-H., & Fang, J.-Y. (2016). The codrug approach for facilitating drug delivery and bioactivity. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *13*(9), 1311-1325. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1187598>
- Andres-Mach, M., Szewczyk, A., Zagaja, M., Luszczki, J., Maj, M., Rola, R., Abram, M., & Kaminski, K. (2020). Evaluation of the impact of compound C11 a new anticonvulsant candidate on cognitive functions and hippocampal neurogenesis in mouse brain. *Neuropharmacology*, *163*, 107849. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107849>
- Anighoro, A., Bajorath, J., & Rastelli, G. (2014). Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(19), 7874-7887. <https://doi.org/10.1021/jm5006463>
- Baltzer, B., Binderup, E., Daehne, W. V., Godtfredsen, W. O., Hansen, K., Nielsen, B., Sorensen, H., & Vangedal, S. (1980). Mutual pro-drugs of .BETA.-lactam antibiotics and .BETA.-lactamase inhibitors. *The Journal of Antibiotics*, *33*(10), 1183-1192. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.1183>
- Bansal, Y., & Silakari, O. (2014). Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *76*, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.060>
- Brodie, M. J. (2016). Pharmacological Treatment of Drug-Resistant Epilepsy in Adults: A Practical Guide. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *16*(9), 82. <https://doi.org/10.1007/s11910-016-0678-x>
- Brodie, M. J., & Sills, G. J. (2011). Combining antiepileptic drugs—Rational polytherapy? *Seizure*, *20*(5), 369-375. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.004>



Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., & Kwan, P. (2018). Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurology*, 75(3), 279. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>

Cheng, A. V., & Wuest, W. M. (2019). Signed, Sealed, Delivered: Conjugate and Prodrug Strategies as Targeted Delivery Vectors for Antibiotics. *ACS Infectious Diseases*, 5(6), 816-828. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00019>

Csermely, P., Agoston, V., & Pongor, S. (2005). The efficiency of multi-target drugs: The network approach might help drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(4), 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.02.007>

Czuczwar, S. J., Kaplanski, J., Swiderska-Dziewit, G., Gergont, A., Krocza, S., & Kacinski, M. (2009). Pharmacodynamic interactions between antiepileptic drugs: Preclinical data based on isobolography. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(2), 131-136. <https://doi.org/10.1517/17425250802677826>

Das, N., Dhanawat, M., Dash, B., Nagarwal, R. C., & Shrivastava, S. K. (2010). Codrug: An efficient approach for drug optimization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(5), 571-588. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.014>

Deckers, C. L. P., Czuczwar, S. J., Hekster, Y. A., Kewser, A., Kubova, H., Meinardi, H., Patsalos, P. N., Renier, W. O., & Rijn, C. M. (2000). Selection of Antiepileptic Drug Polytherapy Based on Mechanisms of Action: The Evidence Reviewed. *Epilepsia*, 41(11), 1364-1374. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb00111.x>

Erickson, R. P. (1998). From “magic bullet” to “specially engineered shotgun loads”: The new genetics and the need for individualized pharmacotherapy. *BioEssays*, 20(8), 683-685. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8<683::AID-BIES12>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<683::AID-BIES12>3.0.CO;2-V)

Gangrade, D., & Karande, R. (2017). Prodrugs to Codrugs. *Current Drug Therapy*, 12(1), 29-36. <https://doi.org/10.2174/1573413713666170210095211>

Gantner, M. E., Llanos, M. A., Garofalo, F. M., Villalba, M. L., & Gavernet, L. (2021). Computational and Synthetic Target-based Approaches to the Discovery of Novel Anticonvulsant Compounds. *Current Medicinal Chemistry*, 28(33), 6866-6894. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210506161234>

Gao, H., Yang, X., Gu, X., & Zhu, Y.-Z. (2016). Synthesis and biological evaluation of the codrug of Leonurine and Aspirin as cardioprotective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(19), 4650-4654. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.058>

Hsieh, P.-W., Hung, C.-F., Lin, C.-H., Huang, C.-W., & Fang, J.-Y. (2017). Anti-melasma codrug of retinoic acid assists cutaneous absorption with attenuated skin irritation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.016>

Husain, A., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2016). Synthesis and biological evaluation of a mutual prodrug of norfloxacin and fenbufen. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(3), 277-281. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2016.03.003>



I. Wertheimer, A. (2013). The Economics of Polypharmacology: Fixed Dose Combinations and Drug Cocktails. *Current Medicinal Chemistry*, 20(13), 1635-1638. <https://doi.org/10.2174/0929867311320130003>

Jamal Gilani, S., Zaheen Hassan, Mohd., Sarim Imam, S., Kala, C., & Prakash Dixit, S. (2019). Novel benzothiazole hydrazine carboxamide hybrid scaffolds as potential in vitro GABA AT enzyme inhibitors: Synthesis, molecular docking and antiepileptic evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(14), 1825-1830. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.05.007>

Jeong, S., Lee, H., Kim, S., Ju, S., Kim, W., Cho, H., Kim, H. Y., Heo, G., Im, E., Yoo, J.-W., Yoon, I.-S., & Jung, Y. (2020). 5-Aminosalicylic Acid Azo-Coupled with a GPR109A Agonist Is a Colon-Targeted Anticolitic Codrug with a Reduced Risk of Skin Toxicity. *Molecular Pharmaceutics*, 17(1), 167-179. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00872>

Kabir, A., & Muth, A. (2022). Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. *Pharmacological Research*, 176, 106055. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106055>

Kamiński, K., Rapacz, A., Filipek, B., & Obniska, J. (2016). Design, synthesis and anticonvulsant activity of new hybrid compounds derived from N -phenyl-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-propanamides and -butanamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(13), 2938-2946. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.066>

Kamiński, K., Rapacz, A., Łuszczki, J. J., Latacz, G., Obniska, J., Kieć-Kononowicz, K., & Filipek, B. (2015). Design, synthesis and biological evaluation of new hybrid anticonvulsants derived from N-benzyl-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(10), 2548-2561. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.038>

Kamiński, K., Socała, K., Zagaja, M., Andres-Mach, M., Abram, M., Jakubiec, M., Pieróg, M., Nieoczym, D., Rapacz, A., Gawel, K., Esguerra, C. V., Latacz, G., Lubelska, A., Szulczyk, B., Szewczyk, A., Łuszczki, J. J., & Wlaź, P. (2020). N-Benzyl-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamide (AS-1) with Hybrid Structure as a Candidate for a Broad-Spectrum Antiepileptic Drug. *Neurotherapeutics*, 17(1), 309-328. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00773-w>

Kim, S. J., Alamgeer, Kanwal, M., Hassan, M., Abdullah, S., Waheed, M., Ahsan, H., & Ashraf, Z. (2016). Flurbiprofen–antioxidant mutual prodrugs as safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, pharmacological investigation, and computational molecular modeling. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 10, 2401-2419. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S109318>

Kwan, P., & Brodie, M. J. (2006). Combination Therapy in Epilepsy: When and What to Use. *Drugs*, 66(14), 1817-1829. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666140-00004>

Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20(5), 359-368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>

Lu, J.-J., Pan, W., Hu, Y.-J., & Wang, Y.-T. (2012). Multi-Target Drugs: The Trend of Drug Research and Development. *PLoS ONE*, 7(6), e40262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040262>



Margolis, J. M., Chu, B.-C., Wang, Z. J., Copher, R., & Cavazos, J. E. (2014). Effectiveness of Antiepileptic Drug Combination Therapy for Partial-Onset Seizures Based on Mechanisms of Action. *JAMA Neurology*, *71*(8), 985. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.808>

Mascarello, A., Azevedo, H., Ferreira Junior, M. A., Ishikawa, E. E., & Guimarães, C. R. W. (2021). Design, synthesis and antihypertensive evaluation of novel codrugs with combined angiotensin type 1 receptor antagonism and neprilysin inhibition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *159*, 105731. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105731>

Mohammadi-Khanaposhtani, M., Ahangar, N., Sobhani, S., Masihi, P. H., Shakiba, A., Saeedi, M., & Akbarzadeh, T. (2019). Design, synthesis, in vivo, and in silico evaluation of new coumarin-1,2,4-oxadiazole hybrids as anticonvulsant agents. *Bioorganic Chemistry*, *89*, 102989. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102989>

Mohammed, Z. B., & Omar, T. N. (2021). Chemical Design, Synthesis And Biological Evaluation Of Mutual Prodrug Of Gabapentin With Different Types Of Phenolic And Alcoholic Antioxidants. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *12*(1), 11.

Morphy, R., & Rankovic, Z. (2005). Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(21), 6523-6543. <https://doi.org/10.1021/jm058225d>

Moya-García, A., Adeyelu, T., Kruger, F. A., Dawson, N. L., Lees, J. G., Overington, J. P., Orengo, C., & Ranea, J. A. G. (2017). Structural and Functional View of Polypharmacology. *Scientific Reports*, *7*(1), 10102. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10012-x>

Parise Filho, R., Polli, M. C., Barberato Filho, S., Garcia, M., & Ferreira, E. I. (2010). Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *46*(3), 393-420. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000300003>

Partap, S., Yar, M. S., Hassan, Md. Z., Akhtar, Md. J., & Siddiqui, A. A. (2017). Design, Synthesis, and Pharmacological Screening of Pyridazinone Hybrids as Anticonvulsant Agents: Benzimidazolyl-Pyridazinone Hybrids. *Archiv Der Pharmazie*, *350*(10), 1700135. <https://doi.org/10.1002/ardp.201700135>

Proschak, E., Stark, H., & Merk, D. (2019). Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, *62*(2), 420-444. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00760>

Rautio, J., Meanwell, N. A., Di, L., & Hageman, M. J. (2018). The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(8), 559-587. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.46>

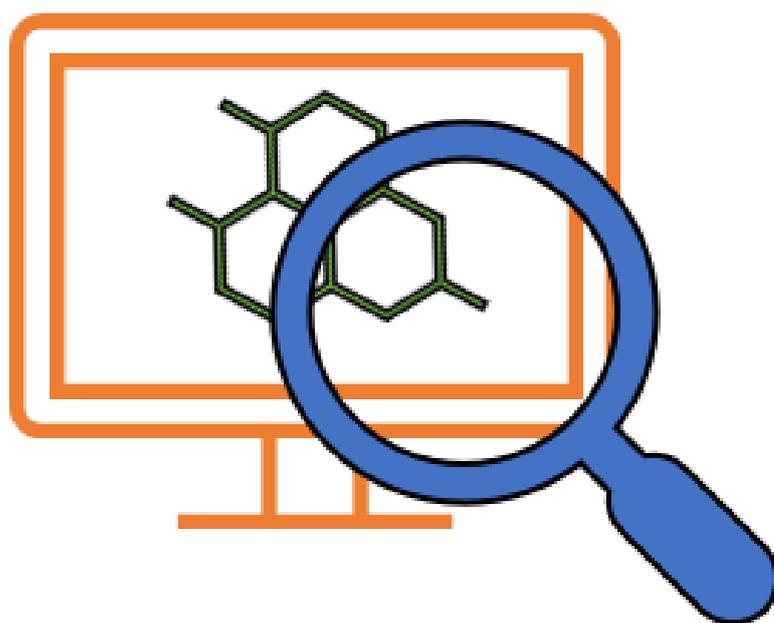
Roth, B. L., Sheffler, D. J., & Kroeze, W. K. (2004). Magic shotguns versus magic bullets: Selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(4), 353-359. <https://doi.org/10.1038/nrd1346>



- Scriba, G. K. E. (1996). 3-Hydroxymethylphenytoin Valproic Acid Ester, a New Prodrug Combining Two Anticonvulsant Drugs. *Archiv der Pharmazie*, 329(12), 554-555. <https://doi.org/10.1002/ardp.19963291208>
- Sehajpal, S., Prasad, D. N., & Singh, R. K. (2019). Novel ketoprofen–antioxidants mutual codrugs as safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, kinetic and pharmacological evaluation. *Archiv Der Pharmazie*, 352(7), 1800339. <https://doi.org/10.1002/ardp.201800339>
- Serafim, R. A. M., Pernichelle, F. G., & Ferreira, E. I. (2017). The latest advances in the discovery of nitric oxide hybrid drug compounds. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(9), 941-953. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1344400>
- Siddiqui, A. A., Partap, S., Khisal, S., Yar, M. S., & Mishra, R. (2020). Synthesis, anti-convulsant activity and molecular docking study of novel thiazole pyridazinone hybrid analogues. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103584. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103584>
- Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8(6), 473-480. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>
- Talevi, A. (2015). Multi-target pharmacology: Possibilities and limitations of the «skeleton key approach» from a medicinal chemist perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 205. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00205>
- Tan, Z., Chaudhai, R., & Zhang, S. (2016). Polypharmacology in Drug Development: A Minireview of Current Technologies. *ChemMedChem*, 11(12), 1211-1218. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600067>
- Verrotti, A., Lattanzi, S., Brigo, F., & Zaccara, G. (2020). Pharmacodynamic interactions of antiepileptic drugs: From bench to clinical practice. *Epilepsy & Behavior*, 104, 106939. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.106939>
- Verrotti, A., Tambucci, R., Di Francesco, L., Pavone, P., Iapadre, G., Altobelli, E., Matricardi, S., Farello, G., & Belcastro, V. (2020). The role of polytherapy in the management of epilepsy: Suggestions for rational antiepileptic drug selection. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 20(2), 167-173. <https://doi.org/10.1080/14737175.2020.1707668>
- Vu, C. B., Bemis, J. E., Benson, E., Bista, P., Carney, D., Fahrner, R., Lee, D., Liu, F., Lonkar, P., Milne, J. C., Nichols, A. J., Picarella, D., Shoelson, A., Smith, J., Ting, A., Wensley, A., Yeager, M., Zimmer, M., & Jirousek, M. R. (2016). Synthesis and Characterization of Fatty Acid Conjugates of Niacin and Salicylic Acid. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(3), 1217-1231. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01961>
- Weaver, L. C., Swinyard, E. A., Woodbury, L. A., & Goodman, L. S. (1955). Studies on anticonvulsant drug combinations: Phenobarbital and diphenylhydantoin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 113(3), 359-370.
- Wood, M., Daniels, V., Provins, L., Wolff, C., Kaminski, R. M., & Gillard, M. (2020). Pharmacological Profile of the Novel Antiepileptic Drug Candidate Padsevonil: Interactions with Synaptic Vesicle 2 Proteins and the GABA_A Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 372(1), 1-10. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.261149>

Capítulo 3

Diseño de fármacos multiobjetivo





3.1 Consideraciones generales

De acuerdo con las limitaciones que presentan los fármacos anticonvulsivos de uso clínico, sobre todo en aquellos pacientes resistentes a los medicamentos, se observa la necesidad de proponer nuevos compuestos anticonvulsivos más eficaces y mejor tolerados. Como se mencionó previamente, en este trabajo de tesis se llevó a cabo la obtención de nuevas entidades moleculares que constan de 3 partes bien definidas: Un **anticonvulsivo**, un **grupo conector** diseñado para ser metabólicamente escindible y una molécula compatible desde el punto de vista químico y biológico con la patología de estudio, a la cual denominaremos **fragmento activo complementario** (Figura 3.1).

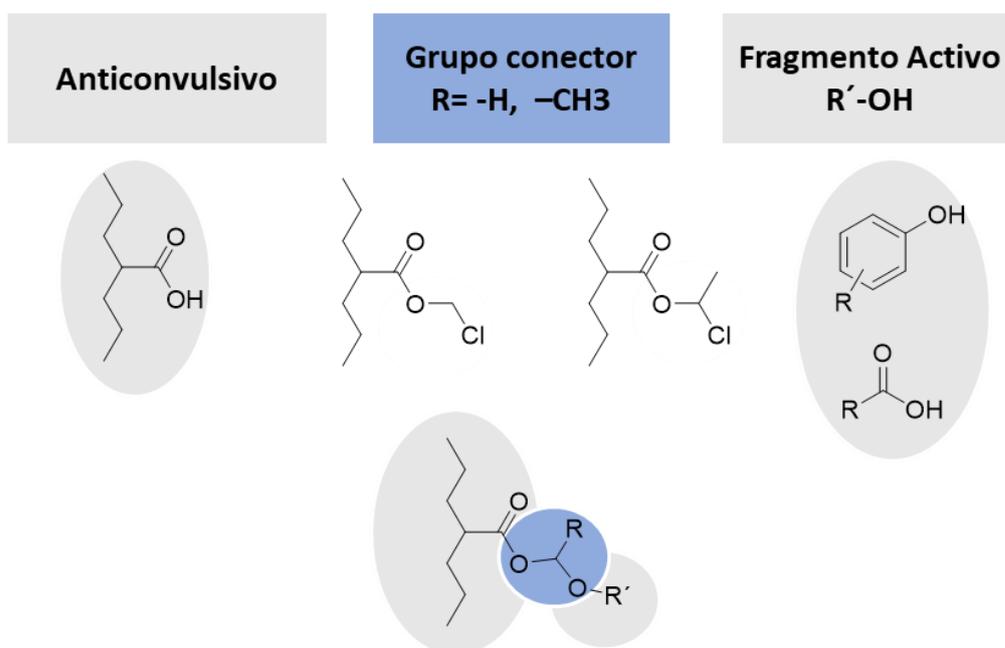


Figura 3.1.1 Esquema general de moléculas multiobjetivo sintetizadas en esta tesis.

En particular se utilizó el Ácido Valproico como anticonvulsivo, por lo que la primera etapa de síntesis implicó la incorporación del grupo conector al grupo ácido. Se obtuvieron específicamente clorometil y 1-cloroetil ésteres del ácido valproico (Figura 3.2), mediante la reacción de un halogenuro derivado de ácido valproico con formaldehído y acetaldehído, respectivamente.

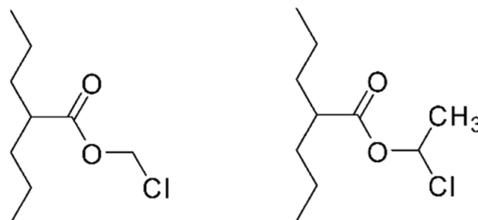


Figura 3.1.2 Clorometil éster y 1-cloroetil éster del ácido valproico. El halógeno presente en el producto intermediario constituye el punto de anclaje para la unión de una segunda estructura.

La selección de los **fragmentos activos** se llevó a cabo teniendo en cuenta la presencia de funciones químicas compatibles con la reacción de formación del producto final (un grupo fenólico o ácido carboxílico). Además, como se mencionó anteriormente, la posibilidad de modular simultáneamente diferentes blancos moleculares asociados a la epilepsia motiva a que se opte por usar fragmentos con actividad biológica *in vitro* y/o *in vivo* compatibles con la patología en estudio. Se seleccionaron estructuras de diversa actividad biológica, incluyendo moléculas con propiedades antiinflamatorias y compuestos con probada acción *in vitro* sobre blancos moleculares de anticonvulsivos. A continuación, se detallarán las características de cada uno de los tres componentes (ácido valproico, conectores y fragmentos activos) que justifican la selección de los mismos para los nuevos compuestos sintetizados.

3.2 Ácido Valproico

El VPA es un ácido graso ramificado derivado del ácido valérico, el cual se encuentra naturalmente en plantas como la Valeriana (*Valeriana Officinalis*) (**Ghodke-Puranik et al., 2013; Perucca, 2002**), presenta un logP de 2,75, características de ácido débil (pKa= 4,8) y se ioniza en un 99,8% a pH fisiológico (**Terbach et al., 2011**). Sintetizado por primera vez en 1881 por B. Burton (**López-Muñoz et al., 2012**), este compuesto se utilizó como solvente orgánico hasta 1963, cuando su actividad como anticonvulsivo fue descubierta por serendipia (**Meunier et al., 1963**). Luego de su ingreso al mercado como FAC en Francia, el VPA se posicionó en el mundo como uno de los más eficientes y ampliamente prescritos para el tratamiento de la epilepsia (**Perucca, 2002**). Si bien se conoce esencialmente como anticonvulsivo, este compuesto se utiliza también en un amplio espectro de patologías como el desorden bipolar, las migrañas y el dolor neuropático (**Chateauvieux et al., 2010; Emrich et al., 1981**). Además de sus usos en



clínica, ha mostrado una actividad prometedora para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (**Tariot et al., 2002**), la esclerosis múltiple (**Nielsen et al., 2015**) y una amplia variedad de tipos de cáncer (**Blaheta et al., 2002**). El VPA es sumamente versátil desde el punto de vista de su actividad biológica, pero además esta molécula puede presentar serios efectos adversos asociados a su uso, como la teratogenicidad y la hepatotoxicidad (**Jäger-Roman et al., 1986**).

3.2.1 Mecanismo de acción anticonvulsivo

Aunque el VPA posee una estructura de un simple ácido carboxílico ramificado, presenta un amplio espectro de actividad contra diferentes tipos de convulsiones. Aún su mecanismo de acción no fue dilucidado por completo, pero es claro que envuelve una combinación de varios tipos de mecanismos. VPA mejora la síntesis y liberación de GABA, lo que conduce a la potenciación de la transmisión GABA-érgica en regiones específicas del cerebro (**Lakhanpal & Kaur, 2007**). Al mismo tiempo, también reduce la liberación de moléculas excitadoras, como el ácido β -hidroxibutírico, y reduce la excitación neuronal debido a la activación de los receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (**Romoli et al., 2019**). Además de estas propiedades, el efecto anticonvulsivo del VPA se explica por su capacidad de bloqueo de los canales iónicos dependientes de voltaje, incluidos los canales de sodio, potasio y calcio (**Czuczwar et al., 1990; VanDongen et al., 1986**).

3.2.2 Farmacocinética y toxicidad de VPA

El ácido valproico puede administrarse de distintas formas: como soluciones orales, comprimidos, cápsulas con recubrimiento entérico y soluciones intravenosas. Presenta una vida media de absorción que varía de 30 minutos a 4 horas, según el tipo de formulación utilizada (**Romoli et al., 2019; Zaccara et al., 1988**). La fracción de VPA libre a la concentración terapéutica es 6%, el resto se une a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. Dada la alta afinidad a proteínas, VPA muestra una baja tasa de aclaramiento de 6-8 ml/h/kg (**Peterson & Naunton, 2005**). Las rutas metabólicas establecidas del VPA son la glucuronidación y la beta oxidación, las cuales representan el 50 % y el 40 % del metabolismo del VPA respectivamente (**Argikar & Remmel, 2009; Ito et al., 1990**). Otros estudios también han explorado la participación de la oxidación



mediada por el citocromo P450 (CYP450), aunque su contribución es relativamente baja (~10 % del metabolismo del VPA) (**Tan et al., 2010**). El metabolito principal que se encuentra en las muestras de orina es un producto conjugado de VPA y ácido glucurónico (15 a 40% del VPA total administrado en humanos) (**Bialer et al., 1985; Schäfer & Lührs, 1978**). Se sabe que los metabolitos producidos a través de las vías de oxidación causan hepatotoxicidad. La esterificación directa de VPA o la esterificación de uno de los principales metabolitos, 4-eno-VPA, forma los ésteres de acetil CoA respectivos. Estos ésteres son altamente reactivos y forman conjugados de tiol con el glutatión mitocondrial, lo que da como resultado el agotamiento de dicho tripéptido. La reducción resultante en la reserva de glutatión interfiere con la función mitocondrial, lo que conduce a la hepatotoxicidad (**Baillie, 1988; Kassahun et al., 1991; Rettenmeier et al., 1985**).

Se ha demostrado también que el grupo ácido carboxílico presente en VPA es el principal causante del defecto del tubo neural. Se ha informado que el grupo carboxílico del VPA, que existe como un anión a pH fisiológico, interactúa con los transportadores de aniones orgánicos (OAT) presentes en la membrana plasmática basolateral/frontal fetal de la placenta. Esta interacción de VPA con OAT conduce a la acumulación de VPA en el feto causando embriotoxicidad (**Lloyd, 2013**).

3.3 Grupos conectores

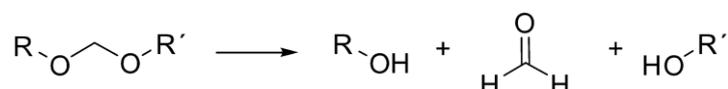
En la búsqueda de nuevas moléculas multiobjetivo capaces de surtir su efecto a nivel cerebral se propone la inclusión de un grupo conector entre dos fragmentos activos, con el objetivo de generar una unión entre ellos lo suficientemente estable como para alcanzar el sitio de acción y lo suficientemente escindible como para liberar sus componentes en él. Teniendo en cuenta estas consideraciones se escogieron grupos conectores que cumplan con las siguientes condiciones: **1)** Grupos presentes en fármacos aprobados (interesantes desde el punto de vista de su seguridad) y **2)** Grupos capaces de escindirse en el organismo de manera de liberar eficientemente los compuestos activos. Específicamente se seleccionaron grupos conectores derivados de formaldehído y acetaldehído (Figura 3.3.1) presentes en una gran cantidad de fármacos



aprobados, entre los que se encuentran compuestos eficaces para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (Laksitorini et al., 2014).

3.3.1 Grupo conector derivado de formaldehído (espaciador oximetilo)

El grupo oximetilo se ha utilizado como "espaciador" en la generación de profármacos, con el objetivo de facilitar la rápida hidrólisis enzimática (por fosfatasa o esterasa) y lograr una liberación óptima del fármaco. En este proceso se genera también una molécula de formaldehído y se remueve el grupo modulador (Esquema 3.3.1.1).



Esquema 3.3.1.1 Remoción de grupo conector oximetilo (química o enzimática). R-OH: fármaco activo, R'-OH grupo modulador del profármaco.

Este grupo conector ha sido extensamente estudiado en el campo del diseño de antibióticos y, además, ha permitido la obtención de nuevos profármacos para el tratamiento de otras patologías (Figura 3.3.1.1).

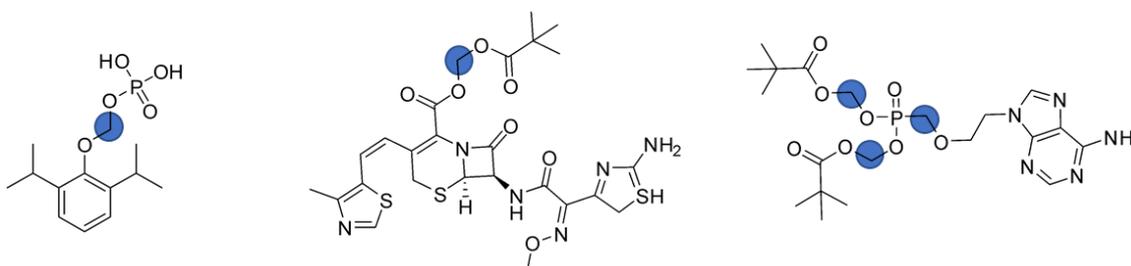


Figura 3.3.1.1 Ejemplos del uso del grupo espaciador oximetilo en compuestos utilizados en clínica. Profármacos aprobados de: Propofol (anestésico), Cefditoren (antibiótico) y Adefovir (antiviral).

En el campo de los anticonvulsivos, sólo un fármaco ha llegado al mercado presentando el grupo conector oximetilo, en este caso sobre un átomo de nitrógeno (Yamaoka et al., 1983). En la Figura 3.3.1.2 se muestra la estructura y el mecanismo de bioconversión de la Fosfenitoína (Cerebyx), un profármaco soluble en agua del fármaco anticonvulsivo Fenitoína. En presencia de la enzima fosfatasa alcalina, la Fosfenitoína se desfosforila para generar N-hidroximetilfenitoína, que a pH fisiológico genera formaldehído y Fenitoína en cuestión de segundos.

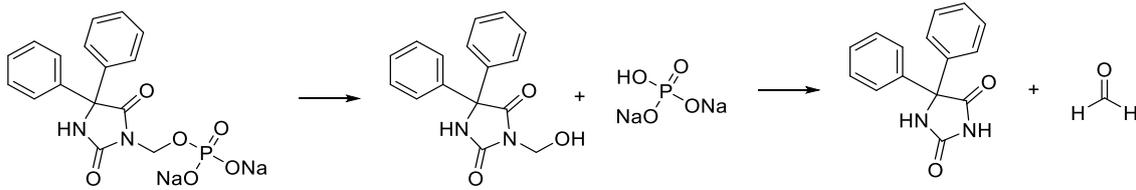
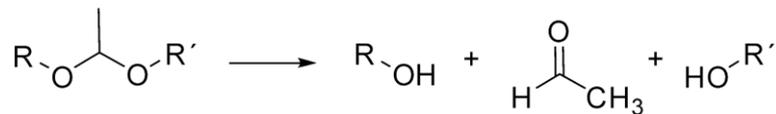


Figura 3.3.1.2 Mecanismo de liberación del profármaco Fosfenitoína. Profármaco anticonvulsivo con liberación de formaldehído.

3.3.2 Grupo conector derivado de acetaldehído (espaciador oxietilo)

El grupo conector derivado del aldehído de dos átomos de carbono (acetaldehído) también ha sido explorado en el campo de los profármacos como espaciador, generando luego de su remoción acetaldehído y el grupo modulador (Esquema 3.3.2.1).



Esquema 3.3.2.1 Remoción de grupo conector oxietilo (Remoción química o enzimática). R-OH: fármaco activo, R'-OH grupo modulador del profármaco.

Existen varios ejemplos de estructuras que contienen este grupo y que han logrado llegar al mercado, destinados al tratamiento de distintas patologías como la hipertensión, infecciones bacterianas y trastornos del sistema nervioso central (Figura 3.3.2.1). Como ejemplo en el campo de la epilepsia puede citarse un profármaco de liberación prolongada de la Gabapentina, denominado Enacabril. Este compuesto derivado del GABA presenta no sólo utilidad terapéutica como anticonvulsivo sino también como opción para el tratamiento del dolor neuropático, el síndrome de piernas inquietas, los trastornos de ansiedad, la neuralgia postherpética, entre otras enfermedades (Kim & Deeks, 2016).

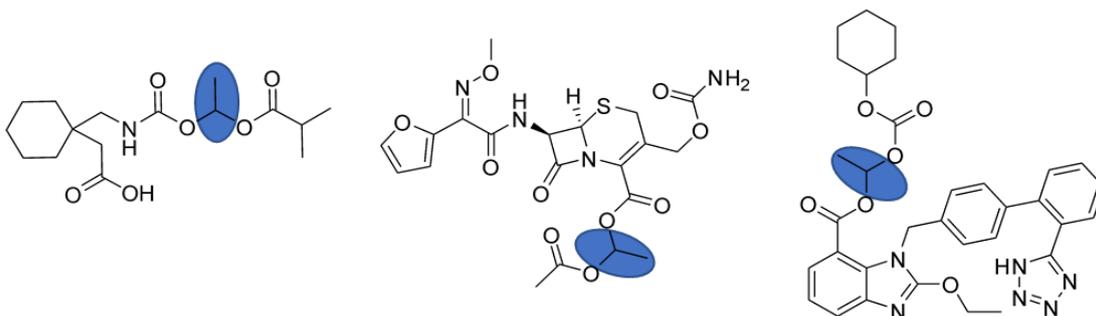




Figura 3.3.2.1 Enacabril (anticonvulsivo), Becampicilina (antibiótico) y Candesartan cilehexetilo (antihipertensivo).

Con respecto a la toxicidad asociada a estos grupos conectores, existen estudios sobre fármacos aprobados y de uso en clínica que concluyen que la cantidad de metabolitos tóxicos generados en estos profármacos (como podrían ser los aldehídos), es en varios órdenes de magnitud menor que la exposición a los mismos en el medio ambiente, siendo por tanto una fuente poco probable de toxicidad sistémica real o percibida en humanos (**Ahmed Laskar & Younus, 2019**).

3.4 Fragmentos activos complementarios

Las estructuras seleccionadas para la unión mediada por conectores al VPA pueden dividirse en dos categorías: compuestos antiinflamatorios y compuestos activos frente a blancos moleculares de anticonvulsivos como el ácido nipecótico y derivados de parabenos, compatibles para la reacción de síntesis.

La elección de antiinflamatorios se basa en el conocimiento actual de las crisis convulsivas, las cuales suelen estar acompañadas de inflamación en el tejido cerebral y el incremento de la expresión de mediadores de la inflamación luego de una convulsión o lesión, que puede causar daño cerebral permanente (**Rojas et al., 2014; Vezzani et al., 2011; Walker & Sills, 2012**). Por esta razón se postula que una estrategia para la prevención tanto del proceso epileptogénico como de la farmacorresistencia es la coadministración de compuestos antiinflamatorios (**Walker & Sills, 2012**). Además, la evidencia experimental en el campo de los antiinflamatorios indica que la derivatización química de la función carboxilato de algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) podría resultar en una mayor actividad acompañado de un efecto ulcerogénico reducido (**Suryawanshi, 2014**). La construcción de un compuesto multiobjetivo formado con dos compuestos activos (Acido Valproico y un compuesto de actividad antiinflamatoria) permite la administración de un único fármaco que contiene las dos acciones. En la Tabla 3.4.1 se muestran las estructuras de los compuestos con actividad antiinflamatoria seleccionados químicamente compatibles con los grupos conectores utilizados seleccionados. Obsérvese que además de su actividad antiinflamatoria, las moléculas escogidas poseen demostrada actividad *in vivo* y/o *in vitro* relacionadas con la epilepsia.



Capítulo 3 Diseño de fármacos multiobjetivo

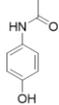
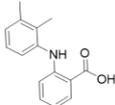
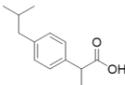
Paracetamol	Ácido Nipecótico	Ácido Mefenámico	Ibuprofeno	Catecol	Ácido Salicílico
					
Actividad anticonvulsiva significativa en modelos crónicos de crisis. (Suemaru et al., 2018) Modulador de los canales de potasio Kv7 dependientes de voltaje. (Przybyła et al., 2021)	Inhibidor de la captación de GABA (Krogsgaard-Larsen et al., 2000) Actividad anticonvulsiva en modelos <i>in vitro</i> (Michael Crider et al., 1982)	Actividad neuroprotectora (Khansari & Halliwell, 2009) Modulador de receptores GABA _A (Halliwell et al., 1999)	Aumenta la actividad anticonvulsiva cuando se coadministra con valproato o fenitoína (Kamiński et al., 1998). Modulador de receptores NMDA (Mishra et al., 2021)	Actividad antiinflamatoria y Neuroprotectora (Zheng et al., 2008)	Desplaza anticonvulsivos como ácido valproico de la unión a proteínas plasmáticas (Miners et al., 1989). Su prodroga (Ac. acetilsalicílico) presenta actividad anticonvulsiva en modelos animales (PTZ) (Tandon et al., 2003)

Tabla 3.4.1 Estructuras seleccionadas para la síntesis de moléculas multiobjetivo planteadas en esta tesis y sus actividades biológicas relevantes reportadas.

Como se observa en la tabla 3.4.1, y en adición a los compuestos antiinflamatorios mencionados, también se seleccionaron las moléculas de **paracetamol** (4-acetamidofenol) y de **ácido nipecótico**. La selección de un aminoácido, el **ácido nipecótico**, se fundamenta en su potente actividad anticonvulsiva *in vitro*, ya que se ha utilizado ampliamente como inhibidor de la captación de GABA tanto a nivel glial como neuronal, mediante la inhibición competitiva del transportador GABA (GAT) (**Barrett-Jolley, 2001**). Debido a que se trata de un compuesto altamente polar (Tabla 3.4.1, columna 2), no penetra fácilmente las barreras biológicas y, por lo tanto, es inactivo como anticonvulsivo cuando se administra *in vivo*. La combinación de este compuesto con el Acido Valproico permitirá la obtención de nuevos derivados que mejoren su lipofilidad (y por lo tanto sus propiedades farmacocinéticas) en adición a las características multiobjetivo del producto obtenido. Por su parte el paracetamol, además de sus propiedades como analgésico y antipirético mundialmente reconocidas, ha mostrado actividad anticonvulsiva en modelos *in vivo* y modulación de canales de potasio dependientes de voltaje (**Suemaru et al., 2018; Przybyla et al., 2021**).

Finalmente, el uso de **parabenos** y derivados tiene su fundamento en la demostrada actividad biológica que presenta esta familia de compuestos. Los parabenos son una



serie homóloga de ésteres de ácido p-hidroxibenzoico (incluidos metil, propil, butil y bencil parabeno, entre otros), utilizados solos o en combinación como conservantes antimicrobianos en alimentos, medicamentos y cosméticos durante más de 50 años (Kirchhof & de Gannes, 2013). Se ha informado que Metilparabeno y Propilparabeno presentan actividad anticonvulsiva en el modelo MES-test en ratones (Talevi et al., 2007). Por su parte, el Propilparabeno ha demostrado además actividad como agente neuroprotector (Enrique et al., 2020). En un trabajo reciente se identificó la actividad del Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno y Bencilparabeno como bloqueantes de los canales de sodio operados por voltaje (isoforma hNav1.2) con una clara tendencia de mayor efecto para los parabenos de mayor peso molecular (Figura 3.4.1) (Enrique et al., 2020). Con respecto a su seguridad, se han realizado varias evaluaciones sobre estas sustancias por parte de una diversidad de agencias (incluidas FAO/OMS y la FDA entre otras) concluyendo la baja toxicidad asociada a esta familia de compuestos (Kirchhof & de Gannes, 2013; Soni et al., 2001, 2002). Por último, desde el punto de vista de su estructura química, esta familia de compuestos presenta un grupo fenólico libre el cual, en condiciones básicas, es capaz de actuar como nucleófilo para la reacción de sustitución sobre halometil ésteres, reacción que da lugar a los productos finales de síntesis.

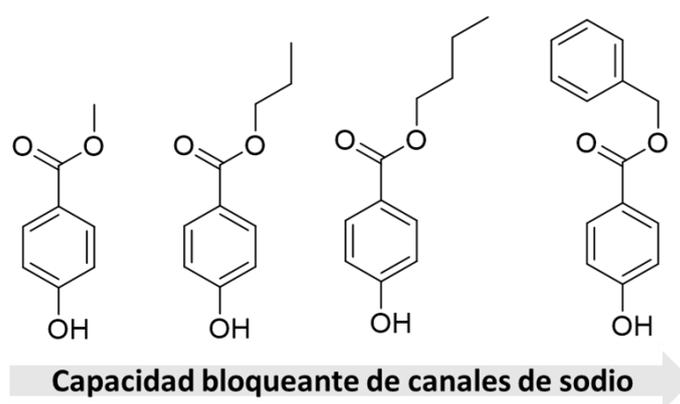
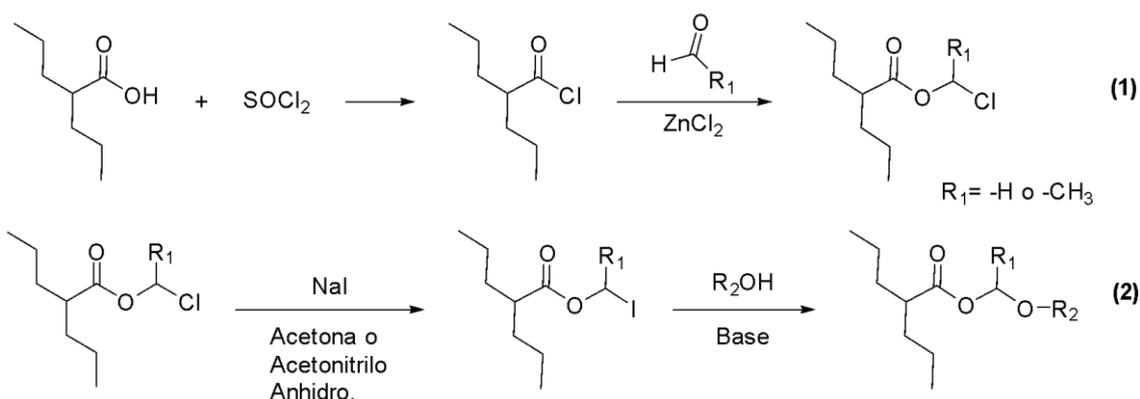


Figura 3.4.1. Metilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno y Bencilparabeno. Conservantes alimenticios, bloqueantes de canales de sodio. Esta familia de compuestos, además, presenta un grupo fenólico libre el cual funciona como punto de anclaje para halometil ésteres.



3.5 Síntesis de fármacos multiobjetivo derivados del ácido valproico

El anticonvulsivo escogido como *scaffold* común de los compuestos sintetizados, el VPA, es una de las estructuras químicas más simples disponibles en el mercado para el tratamiento de la epilepsia, y a la vez, para la inducción de modificaciones químicas. El grupo funcional ácido carboxílico presente en VPA, mediante una primera derivatización, es capaz de reaccionar químicamente con un aldehído incorporando de esta manera un grupo químico conector, que es el reactivo de partida para obtener los diferentes compuestos seleccionados en esta investigación (Esquema 3.5.1).



Esquema 3.5.1 Síntesis propuesta para la generación de híbridos de ácido valproico. Etapa (1) incorporación del grupo conector. Etapa (2): incorporación del segundo *scaffold* de actividad conocida, el grupo OH puede provenir de estructuras con el grupo funcional fenol o ácido carboxílico.

La vía sintética de los compuestos híbridos inicia con la formación del cloruro de ácido del VPA, para la posterior incorporación del grupo conector. En esta segunda etapa se lleva a cabo la reacción con un aldehído de cadena corta en presencia de cloruro de zinc anhidro, para generar el haloalquil éster derivado. De acuerdo con lo observado en literatura, en la mayoría de los casos es necesario el reemplazo del grupo saliente (cloruro por ioduro, como se muestra en el Esquema 3.5.1) para favorecer la reacción de sustitución (**Von Daehne et al., 1970**). Además, se requiere de una base en la última etapa de reacción. Algunos autores utilizan carbonato de potasio (K_2CO_3) en acetona o acetonitrilo (para la unión de haloalquil ésteres con fenoles y ácidos carboxílicos) y otros trietilamina (exclusiva para la reacción con ácidos carboxílicos) (**Bodor et al., 1983**;



Nudelman et al., 1992; Rephaeli et al., 1991; Yang et al., 2006). De acuerdo con la información recopilada en literatura, la incorporación de un segundo *scaffold* puede darse a través de una función ácido carboxílico o fenol, aunque se han estudiado otras opciones de grupos funcionales (**Thillier et al., 2013**). Por último, la identidad de los productos purificados es corroborada mediante espectroscopías $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ y espectrometría de masas de alta resolución.

3.6 Búsqueda de nuevos fragmentos activos complementarios para la síntesis de moléculas multiobjetivo derivadas del ácido valproico. Síntesis de 4-hidroxibenzamidas bioisómeros de parabenos

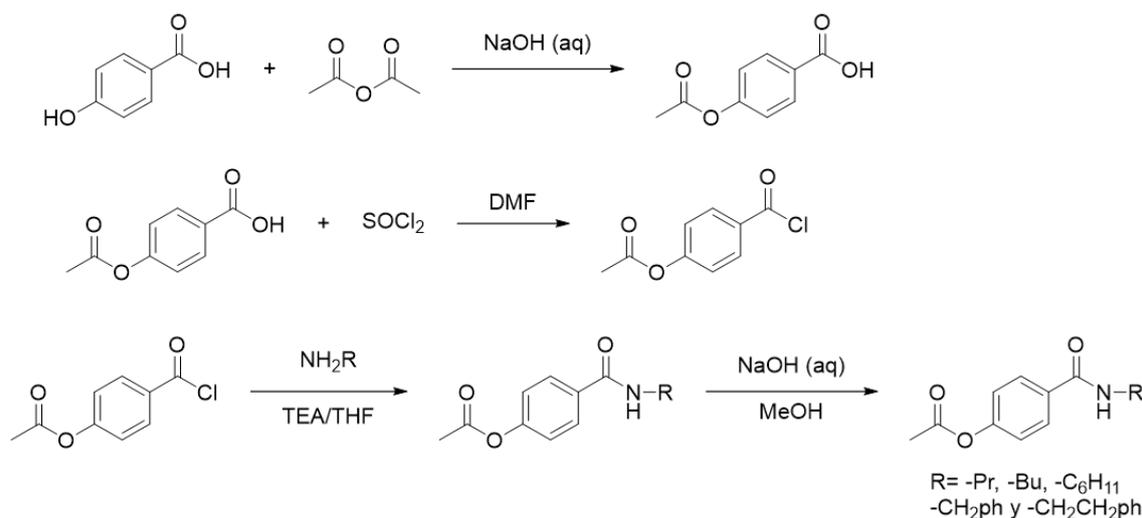
Como se mencionó anteriormente, los parabenos presentan una promisorio actividad anticonvulsiva a nivel *in vitro* e/o *in vivo*. Resulta interesante entonces analizar la actividad para las 4-hidroxibenzamidas, por considerarlas derivados bioisostéricos de los parabenos. Los bioisómeros son utilizados en el campo del diseño de fármacos con el objetivo de optimizar la actividad biológica de distintas moléculas activas. En estos derivados se realiza una pequeña modificación química/estructural con la intención de optimizar la actividad biológica, pero intentando retener la mayor cantidad de características estructurales que dan lugar a la misma (**Gavernet 2021**).

Las 4-hidroxibenzamidas surgen del reemplazo de la función éster por amida. De acuerdo con los resultados de actividad, estas estructuras pueden luego resultar nuevos fragmentos activos complementarios para la construcción de derivados del ácido valproico con características multiobjetivo.

La síntesis implica una primera etapa de protección del grupo oxihidrógeno-fenólico presente en el ácido 4-hidroxibenzoico mediante la acetilación de este con anhídrido acético en medio básico (Esquema 3.6.1). El producto de la primera reacción (ácido 4-acetoxibenzoico) se hace reaccionar con cloruro de tionilo, en presencia de dimetilformamida (DMF), a reflujo para formar el derivado halogenado de acilo. En la tercera etapa se genera el enlace amida utilizando la amina correspondiente en tetrahidrofurano (THF) y trietilamina como solventes (**Matsumoto & Koide, 2001**). El



último paso de síntesis para la obtención del producto final consta en desproteger el grupo fenólico utilizando una solución de hidróxido de sodio en agua y metanol como solventes (Bavetsias et al., 2013).



Esquema 3.6.1 Vía de síntesis para la obtención de 4-hidroxibenzamidas, bioisómeros de parabenos. Condiciones de reacción a) NaOH (aq), Anhídrido acético, Temperatura ambiente b) Cloruro de tionilo, DMF, Reflujo. No se aísla. c) THF, TEA, NH₂R, Tamb d) NaOH (aq,1M), MeOH, Tamb.

Los derivados obtenidos se probaron en su capacidad para evitar las convulsiones provocadas mediante un estímulo eléctrico (prueba MES-test) y algunos de ellos también fueron evaluados como bloqueantes de hNav1.2 (mediante técnicas *in-vitro* de patch-clamp).

3.7 Referencias

Ahmed Laskar, A., & Younus, H. (2019). Aldehyde toxicity and metabolism: The role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews*, 51(1), 42-64. <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1555587>

Argikar, U. A., & Rimmel, R. P. (2009). Effect of Aging on Glucuronidation of Valproic Acid in Human Liver Microsomes and the Role of UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), 229-236. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.022426>

Baillie, T. A. (1988). Metabolic activation of valproic acid and drug-mediated hepatotoxicity. Role of the terminal olefin, 2-n-propyl-4-pentenoic acid. *Chemical Research in Toxicology*, 1(4), 195-199. <https://doi.org/10.1021/tx00004a001>



Barrett-Jolley, R. (2001). Nipecotic acid directly activates GABA_A-like ion channels: Ion channel activation by nipecotic acid. *British Journal of Pharmacology*, 133(5), 673-678. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704128>

Bavetsias, V., Faisal, A., Crumpler, S., Brown, N., Kosmopoulou, M., Joshi, A., Atrash, B., Pérez-Fuertes, Y., Schmitt, J. A., Boxall, K. J., Burke, R., Sun, C., Avery, S., Bush, K., Henley, A., Raynaud, F. I., Workman, P., Bayliss, R., Linardopoulos, S., & Blagg, J. (2013). Aurora Isoform Selectivity: Design and Synthesis of Imidazo[4,5-*b*]pyridine Derivatives as Highly Selective Inhibitors of Aurora-A Kinase in Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(22), 9122-9135. <https://doi.org/10.1021/jm401115g>

Bialer, M., Hussein, Z., Raz, I., Abramsky, O., Herishanu, Y., & Pachys, F. (1985). Pharmacokinetics of valproic acid in volunteers after a single dose study. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 6(1), 33-42. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510060105>

Blaheta, R., Nau, H., Michaelis, M., & Cinatl, Jr, J. (2002). Valproate and Valproate-Analogues: Potent Tools to Fight Against Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 9(15), 1417-1433. <https://doi.org/10.2174/0929867023369763>

Bodor, N., Sloan, K. B., Kaminski, J. J., Shih, C., & Pogany, S. (1983). A convenient synthesis of (acyloxy)alkyl .alpha.-ethers of phenols. *The Journal of Organic Chemistry*, 48(26), 5280-5284. <https://doi.org/10.1021/jo00174a024>

Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2010). Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2010/479364>

Czuczwar, S. J., Chodkowska, A., Kleinrok, Z., Małek, U., & Jagiełło-Wójtowicz, E. (1990). Effects of calcium channel inhibitors upon the efficacy of common antiepileptic drugs. *European Journal of Pharmacology*, 176(1), 75-83. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90134-R](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90134-R)

Emrich, H. M., von Zerssen, D., Kissling, W., & Möller, H. J. (1981). Therapeutic effect of valproate in mania. *The American Journal of Psychiatry*, 138(2), 256. <https://doi.org/10.1176/ajp.138.2.256>

Enrique, A., Martín, P., Sbaraglini, M. L., Talevi, A., & Milesi, V. (2020). Parabens inhibit hNav 1.2 channels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110250. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110250>

Gavernet, L. (Ed.). (2021). *Introducción a la Química Medicinal*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/114312>

Ghodke-Puranik, Y., Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., Birnbaum, A. K., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2013). Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(4), 236-241. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2>

Halliwell, R. F., Thomas, P., Patten, D., James, C. H., Martinez-Torres, A., Miledi, R., & Smart, T. G. (1999). Subunit-selective modulation of GABA_A receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid: Fenamate anti-inflammatory agents and GABA_A receptors. *European Journal of Neuroscience*, 11(8), 2897-2905. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00709.x>

Ito, M., Ikeda, Y., Arnez, J., Finocchiaro, G., & Tanaka, K. (1990). The enzymatic basis for the metabolism and inhibitory effects of valproic acid: Dehydrogenation of valproyl-CoA by 2-



methyl-branched-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1034(2), 213-218. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(90\)90079-C](https://doi.org/10.1016/0304-4165(90)90079-C)

Jäger-Roman, E., Deichl, A., Jakob, S., Hartmann, A.-M., Koch, S., Rating, D., Steldinger, R., Nau, H., & Helge, H. (1986). Fetal growth, major malformations, and minor anomalies in infants born to women receiving valproic acid. *The Journal of Pediatrics*, 108(6), 997-1004. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(86\)80949-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(86)80949-0)

Kamiński, R., Kozicka, M., Parada-Turska, J., Dziki, M., Kleinrok, Z., Turski, W. A., & Czuczwar, S. J. (1998). EFFECT OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON THE ANTICONVULSIVE ACTIVITY OF VALPROATE AND DIPHENYLHYDANTOIN AGAINST MAXIMAL ELECTROSHOCK-INDUCED SEIZURES IN MICE. *Pharmacological Research*, 37(5), 375-381. <https://doi.org/10.1006/phrs.1998.0309>

Kassahun, K., Farrell, K., & Abbott, F. (1991). Identification and characterization of the glutathione and N-acetylcysteine conjugates of (E)-2-propyl-2,4-pentadienoic acid, a toxic metabolite of valproic acid, in rats and humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 19(2), 525-535.

Khansari, P. S., & Halliwell, R. F. (2009). Evidence for neuroprotection by the fenamate NSAID, mefenamic acid. *Neurochemistry International*, 55(7), 683-688. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.06.014>

Kim, E. S., & Deeks, E. D. (2016). Gabapentin Enacarbil: A Review in Restless Legs Syndrome. *Drugs*, 76(8), 879-887. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0584-1>

Kirchhof, M. G., & de Gannes, G. C. (2013). The health controversies of parabens. *Skin Therapy Letter*, 18(2), 5-7.

Krogsgaard-Larsen, P., Frolund, B., & Frydenvang, K. (2000). GABA Uptake Inhibitors. Design, Molecular Pharmacology and Therapeutic Aspects. *Current Pharmaceutical Design*, 6(12), 1193-1209. <https://doi.org/10.2174/1381612003399608>

Lakhanpal, D., & Kaur, G. (2007). Valproic acid alters GnRH-GABA interactions in cycling female rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27(8), 1069-1083. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9201-x>

Laksitorini, M., Prasasty, V. D., Kiptoo, P. K., & Siahaan, T. J. (2014). Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and blood-brain barriers. *Therapeutic Delivery*, 5(10), 1143-1163. <https://doi.org/10.4155/tde.14.67>

Lloyd, K. A. (2013). A scientific review: Mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons*, 6(0), hzt003-hzt003. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt003>

López-Muñoz, F., Baumeister, A. A., Hawkins, M. F., & Alamo, C. (2012). The role of serendipity in the discovery of the clinical effects of psychotropic drugs: Beyond of the myth. *Actas Espanolas De Psiquiatria*, 40(1), 34-42.

Matsumoto, K., & Koide, N. (2001). Synthesis and Thermal Properties of Liquid Crystalline Compounds Containing Carbazolyl Group. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 365(1), 81-89. <https://doi.org/10.1080/10587250108025284>

Meunier, H., Carraz, G., Neunier, Y., Eymard, P., & Aimard, M. (1963). [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. *Therapie*, 18, 435-438.



- Mishra, S. K., Hidau, M., & Rai, S. (2021). Memantine and Ibuprofen pretreatment exerts anti-inflammatory effect against streptozotocin-induced astroglial inflammation via modulation of NMDA receptor-associated downstream calcium ion signaling. *Inflammopharmacology*, 29(1), 183-192. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00760-0>
- Nielsen, N. M., Svanström, H., Stenager, E., Magyari, M., Koch-Henriksen, N., Pasternak, B., & Hviid, A. (2015). The use of valproic acid and multiple sclerosis: THE USE OF VALPROIC ACID AND MULTIPLE SCLEROSIS. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 24(3), 262-268. <https://doi.org/10.1002/pds.3692>
- Nudelman, A., Ruse, M., Aviram, A., Rabizadeh, E., Shaklai, M., Zimrah, Y., & Rephaeli, A. (1992). Novel anticancer prodrugs of butyric acid. 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(4), 687-694. <https://doi.org/10.1021/jm00082a009>
- Perucca, E. (2002). Pharmacological and Therapeutic Properties of Valproate: A Summary After 35 Years of Clinical Experience. *CNS Drugs*, 16(10), 695-714. <https://doi.org/10.2165/00023210-200216100-00004>
- Peterson, G. M., & Naunton, M. (2005). Valproate: A simple chemical with so much to offer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 30(5), 417-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2005.00671.x>
- Przybyła, G. W., Szychowski, K. A., & Gmiński, J. (2021). Paracetamol – An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(1), 3-19. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13392>
- Rephaeli, A., Rabizadeh, E., Aviram, A., Shaklai, M., Ruse, M., & Nudelman, A. (1991). Derivatives of butyric acid as potential anti-neoplastic agents. *International Journal of Cancer*, 49(1), 66-72. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910490113>
- Rettenmeier, A. W., Prickett, K. S., Gordon, W. P., Bjorge, S. M., Chang, S. L., Levy, R. H., & Baillie, T. A. (1985). Studies on the biotransformation in the perfused rat liver of 2-n-propyl-4-pentenoic acid, a metabolite of the antiepileptic drug valproic acid. Evidence for the formation of chemically reactive intermediates. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 13(1), 81-96.
- Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M.-S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., & Dingleline, R. (2014). Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*, 55(1), 17-25. <https://doi.org/10.1111/epi.12461>
- Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verrotti, A., Calabresi, P., & Costa, C. (2019). Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Current Neuropharmacology*, 17(10), 926-946. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
- Schäfer, H., & Lührs, R. (1978). Metabolite pattern of valproic acid. Part I: Gaschromatographic determination of the valproic acid metabolite artifacts, heptanone-3, 4- and 5-hydroxyvalproic acid lactone. *Arzneimittel-Forschung*, 28(4), 657-662.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L., & Greenberg, N. A. (2001). Safety assessment of propyl paraben: A review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 39(6), 513-532. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00162-9)
- Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., & Burdock, G. A. (2002). Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1335-1373. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00107-2)



Suryawanshi. (2014). Synthesis of Various Esters of Diclofenac (NSAIDs) as Pro-Drugs and their Biological Evaluation. *Chemical Science Transactions*. <https://doi.org/10.7598/cst2014.745>

Talevi, A., Bellera, C. L., Castro, E. A., & Bruno-Blanch, L. E. (2007). A successful virtual screening application: Prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(9), 527-538. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9136-9>

Tan, L., Yu, J.-T., Sun, Y.-P., Ou, J.-R., Song, J.-H., & Yu, Y. (2010). The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 112(4), 320-323. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2010.01.002>

Tandon, M., Anuradha, K., & Pandhi, P. (2003). Evaluation of antiepileptic activity of aspirin in combination with newer antiepileptic lamotrigine in mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 25(8), 607. <https://doi.org/10.1358/mf.2003.25.8.778080>

Tariot, P. N., Loy, R., Ryan, J. M., Porsteinsson, A., & Ismail, S. (2002). Mood stabilizers in Alzheimer's disease: Symptomatic and neuroprotective rationales. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(12), 1567-1577. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00153-9)

Terbach, N., Shah, R., Kelemen, R., Klein, P. S., Gordienko, D., Brown, N. A., Wilkinson, C. J., & Williams, R. S. B. (2011). Identifying an uptake mechanism for the antiepileptic and bipolar disorder treatment valproic acid using the simple biomedical model *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science*, 124(13), 2267-2276. <https://doi.org/10.1242/jcs.084285>

Thillier, Y., Stevens, S. K., Moy, C., Taylor, J., Vasseur, J.-J., Beigelman, L., & Debart, F. (2013). Solid-phase synthesis of 5'-triphosphate 2'-5'-oligoadenylates analogs with 3'-O-biolabile groups and their evaluation as RNase L activators and antiviral drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(17), 5461-5469. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.008>

VanDongen, A. M. J., VanErp, M. G., & Voskuyl, R. A. (1986). Valproate Reduces Excitability by Blockage of Sodium and Potassium Conductance. *Epilepsia*, 27(3), 177-182. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1986.tb03525.x>

Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 7(1), 31-40. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.178>

Von Daehne, Wolf., Frederiksen, E., Gundersen, E., Lund, F., Moerch, P., Petersen, H. J., Roholt, Knud., Tybring, L., & Godtfredsen, W. O. (1970). Acyloxymethyl esters of ampicillin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13(4), 607-612. <https://doi.org/10.1021/jm00298a005>

Walker, L., & Sills, G. J. (2012). Inflammation and Epilepsy: The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy?: Inflammation and Epilepsy. *Epilepsy Currents*, 12(1), 8-12. <https://doi.org/10.5698/1535-7511-12.1.8>

Yamaoka, Y., Roberts, R. D., & Stella, V. J. (1983). Low-Melting Phenytoin Prodrugs as Alternative Oral Delivery Modes for Phenytoin: A Model for Other High-Melting Sparingly Water-Soluble Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(4), 400-405. <https://doi.org/10.1002/jps.2600720420>

Yang, Y., Babiak, P., & Reymond, J.-L. (2006). New Monofunctionalized Fluorescein Derivatives for the Efficient High-Throughput Screening of Lipases and Esterases in Aqueous Media. *Helvetica Chimica Acta*, 89(3), 404-415. <https://doi.org/10.1002/hlca.200690041>



Zaccara, G., Messori, A., & Moroni, F. (1988). Clinical Pharmacokinetics of Valproic Acid—1988: *Clinical Pharmacokinetics*, 15(6), 367-389. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815060-00002>

Capítulo 4

Trabajo experimental de síntesis





4.1 Consideraciones Generales

Todas las síntesis se llevaron a cabo en material de vidrio previamente calentado con pistola de calor y luego seco por el pasaje de una corriente de nitrógeno 5.0 (contenido de agua < 3 ppm marca Linde).

Para la evaporación de los solventes se utilizó el evaporador rotatorio BUCHI R-200 a una presión aproximada de 25 torr.

El secado final de las muestras se llevó a cabo en tambor de vacío marca Precision Scientific Co. USA acoplado a una bomba de vacío a 20 torr.

Los puntos de fusión de los productos sólidos se efectuaron en un equipo Electrothermal® en capilar cerrado, y no fue corregida la temperatura por vástago emergente.

Los espectros ^1H y ^{13}C NMR fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance Neo 500 del UMYMFOR (Unidad De Microanálisis Y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica) dependiente de CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los datos de corrimiento químico se reportan en ppm respecto del estándar interno tetrametilsilano, mientras que las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz. La determinación de la masa exacta por ESI (electrospray) en modo positivo (inyección directa) se realizó en un equipo Bruker micrOTOF-QII perteneciente al UMYMFOR.

El Acetonitrilo (CH_3CN) y la Acetona (CH_3COCH_3) utilizados como solventes de reacción, se secaron previamente, destilaron y almacenaron sobre tamiz molecular 4 Å marca Merck y carbonato de potasio (K_2CO_3) anhidro respectivamente. El tetrahidrofurano (THF) se purificó en su forma anhidra por tratamiento con sodio metálico durante 24 h seguido de destilación fraccionada. La Trietilamina (TEA, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$) se purificó por destilación fraccionada y se guardó sobre Hidróxido de potasio (KOH).

El Carbonato de potasio (K_2CO_3) se llevó a su forma anhidra por calentamiento en mufla a 300°C durante 4 h previo a su uso. El sulfato de sodio (Na_2SO_4) y el Sulfato de Magnesio



Capítulo 4

Trabajo experimental de síntesis

(MgSO₄) se secaron por calentamiento en mufla a 350°C durante 3 h previo a su uso como agente desecante.

El Yoduro de sodio (NaI) se secó hasta peso constante en tambor de vacío a 50°C durante 4 h previo a su uso.

El punto final de las reacciones de síntesis se determinó mediante cromatografía en capa delgada (CCD) en cromatofolios de sílica gel 60 con fluorescencia 254 nm marca Merck (ref. 1.05554). El medio de reacción se sembró en CCD, mediante micropipeta graduada, desde una solución que contenía 0,1 mL de solvente por cada 1 mg del medio de reacción previamente llevado a sequedad en evaporador rotativo. Como técnicas de revelado de las placas cromatográficas se utilizaron: luz UV 254 y 366 nm (método no destructivo) y una solución ácida al 5.5 % p/v de molibdato de amonio (VI) tetrahidratado seguido de calentamiento a 110°C durante 5 minutos (método destructivo).

Las columnas cromatográficas se prepararon con sílica gel 60, 70–230 mesh, marca Merck (ref.1.07734.2500). Las fracciones colectadas de columna cromatográfica fueron reunidas según presentaron el mismo perfil cromatográfico en CCD.

Los solventes utilizados tanto para las cromatografías como para las cristalizaciones fueron previamente destilados según técnicas aceptadas internacionalmente y su pureza se verificó mediante la siembra de una muestra concentrada en CCD revelando con luz UV y con 2 métodos destructivos: Sc. al 10% v/v de ácido sulfúrico concentrado en metanol y solución 5,5% p/v de molibdato de amonio en ácido sulfúrico diluido.

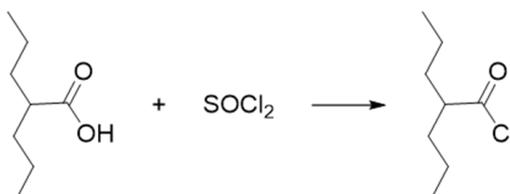
A los productos sólidos, crudos, se le realizaron ensayos de cristalización en distintos solventes o mezclas de solventes (mediante el uso de tubos Craig), seleccionando aquellos sistemas que favorecieron la pureza y el rendimiento del producto luego del ensayo.



4.2 Trabajo experimental de Síntesis

4.2.1 Síntesis de Cloruro de 2-propilpentanoílo (Cloruro de Valproílo)

En un balón de 2 bocas provisto de ampolla de compensación y trampa de agua para retención de gases se agregan 32 mL (202 mmol) de Ácido Valproico (Ácido 2-propilpentanoico). Se adapta agitación magnética, baño a 0°C y, desde ampolla de compensación, se agregan gota a gota 20,5 mL (347 mmol) de Cloruro de tionilo (SOCl₂) destilado inmediatamente antes. Una vez finalizado el agregado, se adapta refrigerante para calentamiento a reflujo y se deja reaccionar durante 1 h en un baño de glicerina a 80°C.



Aislamiento: Se concentra la mezcla de reacción en evaporador rotatorio (temperatura de baño de agua 65°C) y el líquido obtenido se purifica por destilación fraccionada a presión reducida colectando una fracción cuerpo de destilación de punto de ebullición 77-79°C (23 mm Hg). Se obtienen 31 mL (27,61 g, 169,7 mmol). Rto. 84%

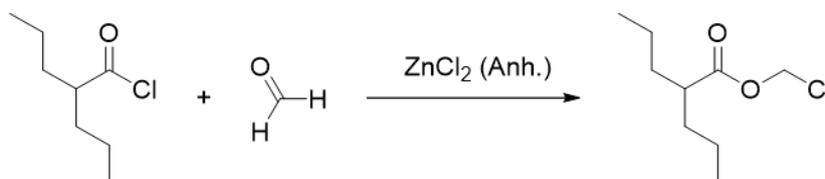
4.2.2 Preparación de cloruro de zinc anhidro (ZnCl₂ anh.)

En un tubo de reacción se agregan 5,36 g de Cloruro de zinc hidratado (mezcla líquido incoloro y sólido blanco cristalino) seguido de 5,4 mL (1 vez en peso) de Cloruro de tionilo recién destilado. Se adapta refrigerante, trampa de agua para retención de gases, agitación magnética y se lleva a ebullición durante 1 h. Se elimina Cloruro de tionilo en evaporador rotatorio (temperatura del baño 65°) hasta peso constante y se hace circular una corriente de nitrógeno seco durante 1 h. El sólido blanco cristalino obtenido es muy higroscópico, se almacena en desecador en presencia de sílica gel con indicador de humedad como agente desecante.



4.2.3 Síntesis de 2-Propilpentanoato de clorometilo (Valproato de Clorometilo)

En un balón se agregan 1,4 g (10,27 mmol) de Cloruro de Zinc anhidro (ZnCl_2 anh.) y 3,63 g (120,87 mmol) de Paraformaldehído (reactivo generador de formaldehído *in-situ*). Se adapta agitación magnética y se agregan 18 mL (103.69 mmol) de Cloruro de Valproílo (0,937 g/mL). Se adapta refrigerante para calentamiento a reflujo y se deja reaccionar durante 24 h sobre un baño de glicerina a 65°C y luego durante 24 h a temperatura ambiente.

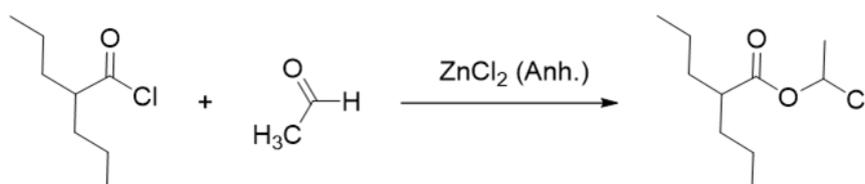


Aislamiento: La mezcla de reacción se disuelve en 20 mL de Diclorometano y se separa el Cloruro de zinc insoluble por centrifugación, el cual se lava con 2 porciones de 5 mL de Diclorometano. Se juntan las fases orgánicas y se lavan con 2 porciones de 20 mL de Sc. NaHCO_3 5% y 2 porciones de 20 mL de agua destilada. Se seca la fase orgánica con $\text{Mg}_2\text{SO}_4(\text{anh.})$, se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 19,63 g de un líquido levemente amarillo. La purificación se lleva a cabo mediante destilación a presión reducida con corriente de nitrógeno seco ($P= 10$ torr). Se obtienen 7,76 g (40,27 mmol) de líquido incoloro. Rto.: 39%. R_f Hexano:Diclorometano (3:1) = 0,51. Para pequeñas cantidades el producto puede purificarse por columna cromatográfica utilizando 30 veces en peso de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla de Hexano:Diclorometano de proporción 3:1 como fase móvil.



4.2.4 Síntesis de 2-Propilpentanoato de 1-cloroetilo (Valproato de 1-cloroetilo)

En un tubo de reacción se agregan 600 mg (4,4 mmol) de ZnCl_2 (anh.), 8 mL (7,6 g; 46,72 mmol) de cloruro de valproílo y 2,2 mL (2,05 g; 15,5 mmol) de Paraldehído (reactivo generador de acetaldehído *in-situ*). Se adapta agitación magnética, refrigerante para reflujo y trampa de CaCl_2 para la retención de humedad. Se deja reaccionar sobre baño de glicerina a 70°C durante 2 h seguido de 24 h a temperatura ambiente.

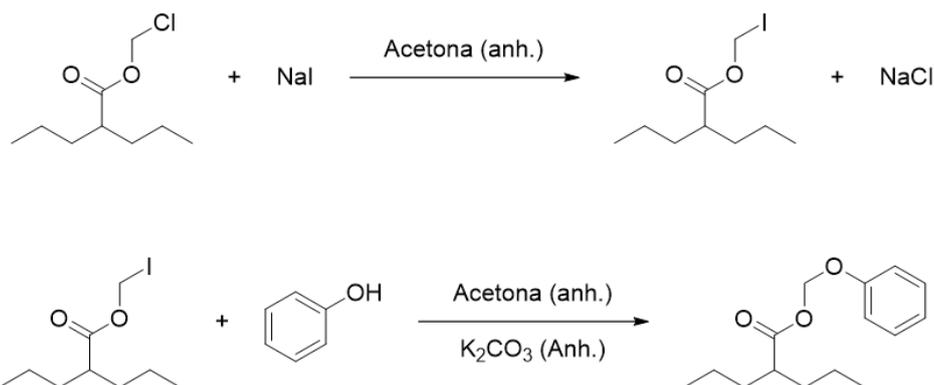


Aislamiento: Se centrifuga el medio de reacción, se separa el líquido sobrenadante y se disuelve en 15 mL de Diclorometano. La fase orgánica se lava 3 veces con 15 mL de agua destilada y se seca con Na_2SO_4 (anh.). Se filtra el desecante y la fase líquida se concentra en evaporador rotativo para luego llevar a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 6,83 g de un líquido levemente amarillo. Se efectúa una destilación fraccionada a presión reducida ($P=10$ torr) y con corriente de nitrógeno seco. Se obtienen 3,7 g (17,9 mmol) de fracción cuerpo incolora de punto de ebullición $57-58^\circ\text{C}$ a la presión de trabajo. Rto: 38% $R_{f \text{ Hex:DCM } 3:1} = 0,57$



4.2.5 Síntesis de 2-Propilpentanoato de fenoximetilo (1)

En un tubo de reacción se agregan 385 mg (2 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 5 mL de Acetona destilada inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética, se agregan 303 mg (2 mmoles) de NaI y se deja reaccionar durante 24 h en atmósfera de nitrógeno seco y protegido de la luz. En otro tubo de reacción se agregan 188 mg (2 mol) de Fenol, 270 mg (2 mmol) de K_2CO_3 (Anh.) y 3 mL de Acetona. Se deja reaccionar 24 h con agitación magnética en atmósfera de nitrógeno seco. Transcurridas 24 h se filtra el medio de reacción (que contiene Valproato de iodometilo disuelto) lavando con dos porciones de 4 mL de Acetona el sólido remanente. Se juntan las fases líquidas y se agregan sobre el medio de reacción que contiene Fenol. Se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente protegido de la luz y en atmósfera de nitrógeno seco.



Aislamiento: Se concentra el medio de reacción en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se realizan extracciones con 3 porciones de Diclorometano de 5 mL cada una. Se juntan las fases líquidas, se concentran en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 470 mg de un aceite levemente amarillo el cual se somete a una separación por columna cromatográfica utilizando 15 gr de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano: Diclorometano de proporción 5:2 como fase móvil. Se obtienen 193 mg (0.772 mmol) de un aceite incoloro. Rto: 39%. R_f Hex:DCM (1:1) = 0.5

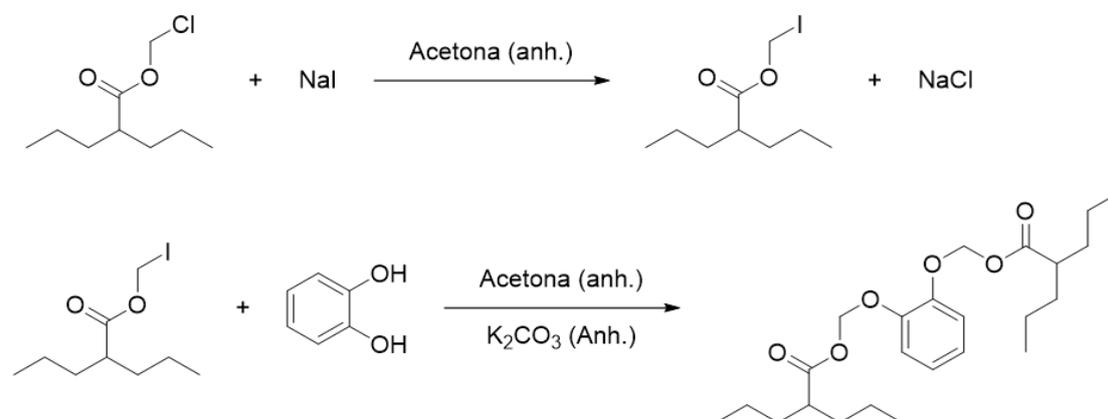
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 7,36-7,03 (m,5H, aromáticos), 5,80 (s,2H, -O-CH₂-O-), 2,46-2,40 (m,1H, -CH-), 1,68-1,21 (m,m,8H, CH₂CH₂CH₃), 0,87-0,84 (t, 12H, -CH₃).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 175.45, 156.85, 129.54, 122.66, 116.09, 85.30 (O-CH₂-O), 45.06, 34.36, 20.49, 13.97



4.2.6 Síntesis de bis(2-propilpentanoato) de (1,2-fenilenobis(oxi))bis(metileno) (2)

En un tubo de reacción se agregan 130 mg (1,18 mmol) Pirocatecol seguido de 5 mL de Acetona destilada inmediatamente antes y 358 mg (2,6 mmol) de K_2CO_3 (Anh.). Se adapta agitación magnética y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h protegido de la luz y en atmósfera de nitrógeno seco. En otro tubo de reacción se agregan 450 mg (2,36 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 5 mL de Acetona. Se adapta agitación magnética, protección de la luz y se agregan 353 mg (2,36 mmoles) NaI. Se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente. Transcurridas 24 h se filtra el medio de reacción (que contiene Valproato de iodometilo disuelto), lavando con dos porciones de 4 mL de Acetona el sólido remanente. Se juntan las fases líquidas y se agregan sobre el medio de reacción que contiene Pirocatecol. Se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente con agitación y protección de la luz sobre atmósfera de nitrógeno seco.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se extrae la mezcla sólida obtenida con 4 porciones de 3 mL de Diclorometano, se juntan los extractos, se los concentra en rotavapor y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 545 mg de aceite color marrón. Se realiza una separación por columna cromatográfica utilizando 17 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla de Hexano:Diclorometano de proporción 1:1 como fase móvil. Se obtienen 98 mg (0,23 mmol) de aceite incoloro. Rto= 20%. R_f Diclorometano:Hexano (2:1)= 0,33



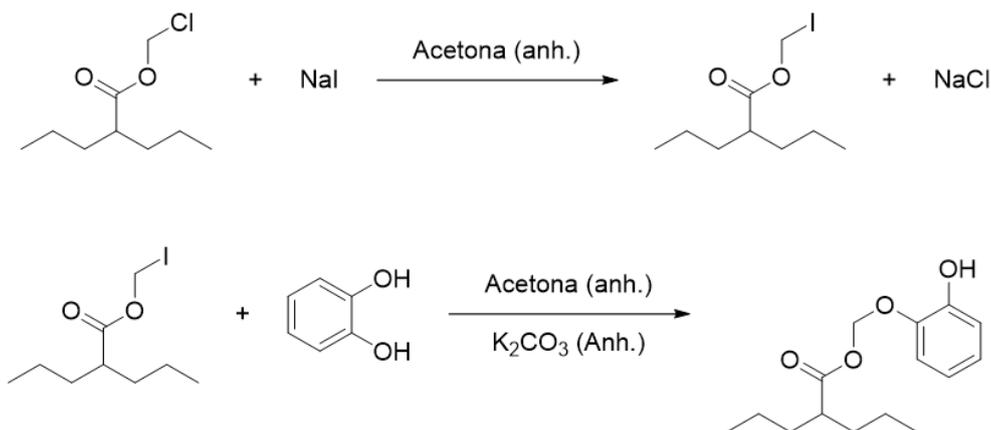
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 7,12-7,02 (m,4H, aromáticos), 5,81 (s,4H, -O-CH₂-O-), 2,45-2,40 (m,2H, -CH-), 1,66-1,24 (m,m,16H,CH₂CH₂CH₃), 0,89-0,86 (t, 12H, -CH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175.28, 147.11, 123.58, 117.77, 86.41 (O-CH₂-O), 77.28, 77.03, 76.77, 45.23, 34.32, 20.50, 13.94.

HRMS m/z (ESI) calc. 445.2569 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado: 445.2561

4.2.7 Síntesis de 2-propilpentanoato de (2-hidroxifenoxi)metilo (3)

En un tubo de reacción se agregan 270 mg (1,96 mmol) K_2CO_3 (anh.), 215 mg (1,97 mmol) de Pirocatecol y 5 mL de Acetona destilada inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. En otro tubo de reacción se agregan 380 mg (1,97 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 5 mL de Acetona, se adapta agitación magnética y protección de la luz y se agregan 295 mg (1,97 mmol) de NaI. Se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. Se filtra el medio de reacción (que contiene al Valproato de iodometilo disuelto), se lava el residuo sólido remanente con dos porciones de 3 mL de Acetona, se juntan las fases líquidas y se agregan sobre el medio de reacción que contiene Pirocatecol. Se deja reaccionar durante 24 h protegido de la luz, con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno seco.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se realizan 3 extracciones de 5 mL de Diclorometano cada una, se juntan los extractos, se los concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 488 mg de un aceite color caramelo. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 15 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla



Diclorometano:Hexano de proporción 5:1 como fase móvil. Se obtienen 101 mg (0.379 mmol) de aceite incoloro. Rto: 19.2%. $R_f_{\text{DCM:Hex (5:1)}} = 0,42$.

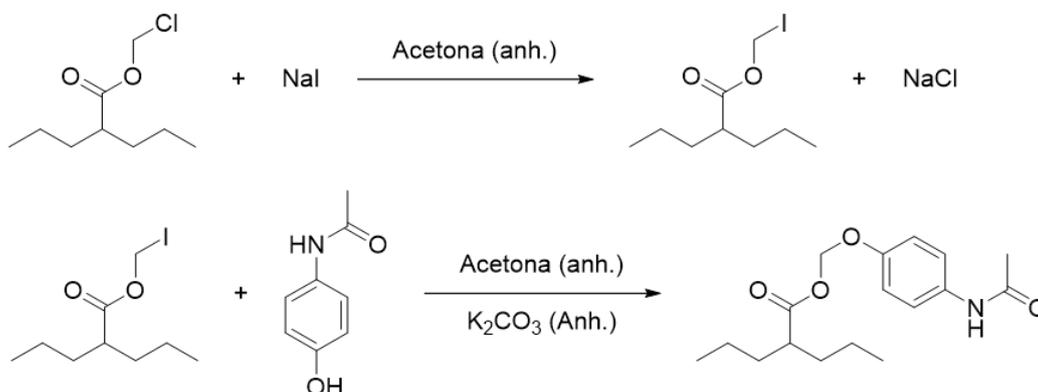
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 7,09-6,87 (m,4H, aromáticos), 5,79 (s,2H, O- CH_2 O), 2,44 (m,1H,- CH -), 1,60-1,28 (m,m,8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,89-0,87(t, 6H, - CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 175.2, 146.84,143.37, 124.14, 120.24, 115.77, 115.36, **86.4 (O- CH_2 -O)**, 45.3, 34.3, 20.50, 13.84

HRMS m/z (ESI) calc 289.1414 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado. 289.1410

4.2.8 Síntesis de 2-propilpentanoato de (4-acetamidofenoxi)metilo (4)

En un tubo de reacción se agregan 828 mg (4,3 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 10 mL de Acetona destilada inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se agregan 777 mg (5,16 mmol) de NaI. Se deja reaccionar 24 h en atmósfera de nitrógeno seco. Se filtra el medio de reacción, se lava el residuo de filtración con 2 porciones de 2 mL de Acetona, se juntan las fases líquidas y se agregan sobre un tubo de reacción que contiene 1.443 g (4,7 mmol) de N-(4-hidroxifenil)acetamida (Paracetamol), 649 mg (4,7 mmol) de K_2CO_3 (anh.) y 10 ml de Acetona. Se protege de la luz y se deja reaccionar en atmósfera de nitrógeno seco con agitación magnética durante 24 h.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se realizan extracciones con 3 porciones de 5 mL de Diclorometano, se juntan las fases líquidas, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 838 mg de un aceite amarillo. Se realiza una separación por cromatografía en columna usando 25 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano:Acetato de etilo de proporción 3:1 como



fase móvil. Se obtienen 425 mg de aceite amarillo pálido. El aceite obtenido se mezcla con 12 mL de Hexano y se lleva a ebullición en un tubo de Craig con refrigerante, se centrifuga en caliente y separa la fase hexánica superior con pipeta pasteur. Se extrae la fase remanente repitiendo el proceso con dos porciones más de 12 mL de Hexano. Se juntan los extractos y se concentran en evaporador rotativo. El sólido obtenido se cristaliza desde Hexano. Se obtienen 210 mg (0.68 mmol). Rto: 14.55%. Sólido blanco Pf: 58,5-60. $Rf_{\text{Hexano:Acetato de etilo (1:1)}} = 0.59$

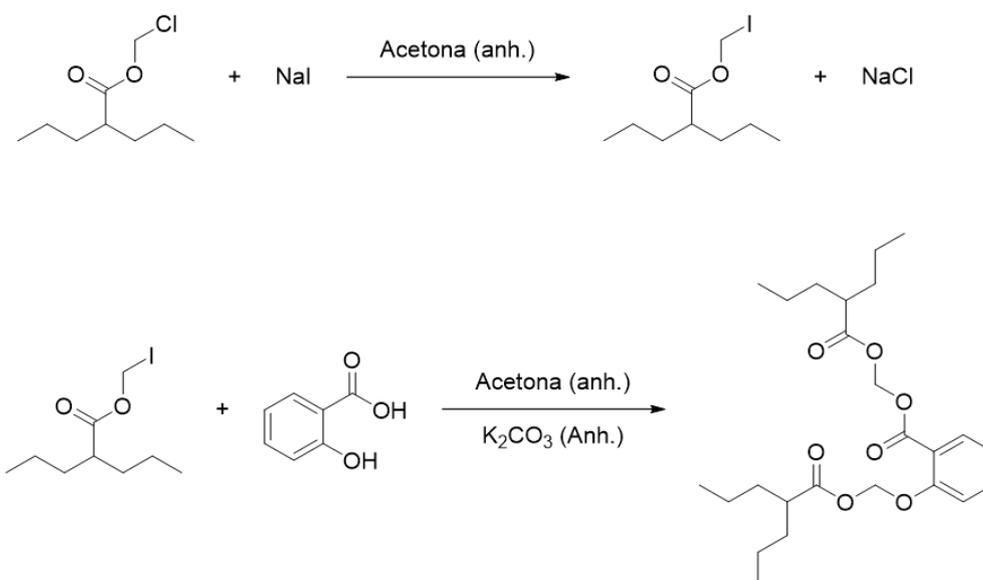
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 7,45-6,99 (m,4H, aromáticos), 5,75 (s,2H, O- CH_2 -O), 2,44 (m,1H,- CH -), 2,17 (s, 3H, CH_3 -CO-NH-)1,64-1,23 (m,m,8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,87-0,84(t, 6H, - CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 175.49, 168.31, 153.53, 132.92, 121.53, 116.60, **85.64(O- CH_2 -O)**, 45.28, 34.35, 24.39, 20.49, 13.92.

HRMS m/z (ESI) calc. 308.1856 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 308.1856

4.2.9 Síntesis de 2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)metil 2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (5)

En un tubo de reacción se agregan 1,01 g (5,24 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 5 mL de Acetona recién destilada y 983 mg (6,56 mmol) de NaI. Se protege de la luz, se adapta agitación magnética y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno seco. Se centrifuga el medio de reacción y se separa el líquido sobrenadante, el residuo de centrifugación se lava con 2 porciones de 3 mL de Acetona, se juntan las fases líquidas y se reserva la solución de Valproato de iodometilo protegida de la luz y en atmósfera de nitrógeno seco. En otro tubo de reacción se agregan 360 mg (2,6 mmol) de Ácido Salicílico (Ácido 2-hidroxibenzoico), 718 mg (5,2 mmoles) de K_2CO_3 (anh.) y 5ml de Acetona. Se adapta agitación magnética, corriente de nitrógeno seco, protección de la luz y se agrega la solución de Valproato de iodometilo. Se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente.



Aislamiento: La mezcla de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. El sólido obtenido se extrae con 3 porciones de 5 mL de Hexano. Se juntan las fases líquidas, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 1,150 g de un aceite levemente amarillo. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 35 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano: Acetato de etilo de proporción 25:1 como fase móvil. Se obtienen 186 mg (0,42 mmol) de aceite incoloro. Rto: 16%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 7,86-7,12 (m,4H, aromáticos), 5,90 (s,2H, O- CH_2 -O), 5,85 (s,2H, O- CH_2 -O), 2,50-2,40 (m,2H,- CH -), 1,69-1,23 (m,m,16H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,91-0,86(doble triplete, 12H, - CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175.24, 175.12, 163.89, 156.87, 134.04, 131.97, 122.78, 117.06, **86.41** (-CO-O- CH_2 -O-OC-), **79.41** (-CO-O- CH_2 -O-Ar), 45.22, 45.02, 34.30, 20.50, 20.48, 13.93.

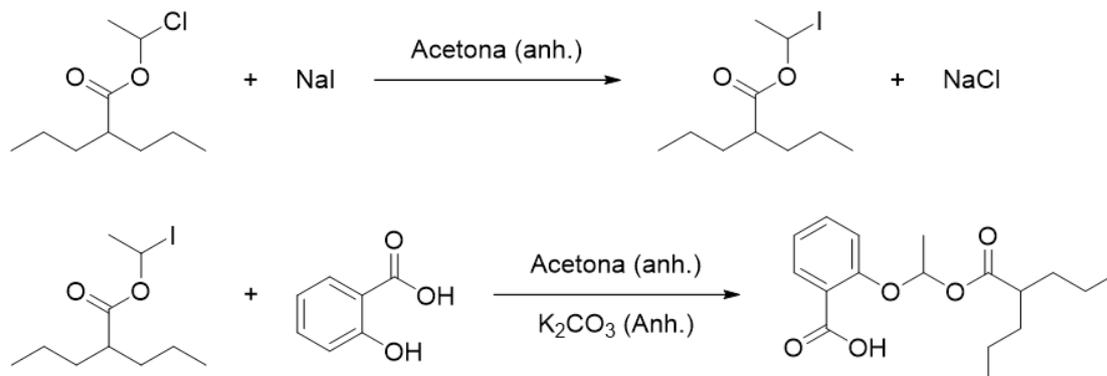
HRMS m/z (ESI) calc. 473.2508 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 473.2510

4.2.10 Síntesis de ácido 2-(1-((2-propilpentanoil)oxi)etoxi)benzoico (6)

En un tubo de reacción se agregan 670 mg (3,24 mmol) de Valproato de 1-cloroetilo disueltos en 5 mL de Acetona destilada inmediatamente antes y 468 mg (3,24 mmol) de NaI. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno seco. Se centrifuga el medio de reacción, se separa el líquido sobrenadante y se lava el residuo de centrifugación sólido con 2 porciones de 3 mL de Acetona. Se juntan las fases líquidas y se agregan sobre otro tubo de reacción que contiene 447 mg (3,24 mmol) de K_2CO_3 (anh.), 448 mg (3,24



mmoles) de Ácido Salicílico y 5 mL de Acetona. Se adapta agitación magnética y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente con el sistema protegido de la luz y bajo corriente de nitrógeno seco.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. A la mezcla sólida obtenida se le realizan 3 extracciones de 4 mL de Diclorometano. Se juntan los extractos, se lavan con 4 mL de solución saturada de Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y 2 veces con 4 mL de agua destilada. Se trata a la fase orgánica con Na₂SO₄ (anh.), se filtra el agente desecante, se concentra la solución en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 310 mg de aceite anaranjado. Se realiza una separación en columna cromatográfica utilizando 10gr de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano: Diclorometano de proporción 3:1 como fase móvil. Se obtienen 101 mg (0.343 mmol) de aceite incoloro. Rto: 10.6%. Rf_{DCM:Hex (1:1)} = 0,70. Rf_{Tolueno} = 0.59

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 10,57 (s, 1H, -COOH), 7,84-6,89 (m, 4H, aromáticos), 7,19-7,16 (c, 1H, O-CH-O), 5,85 (s, 2H, O-CH₂-O), 2,45-2,39 (d, 3H, CH₃-CH), 1,69-1,27 (m, m, 8H, CH₂CH₂CH₃), 0,94-0,90 (t, 6H, -CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 174.45, 168.32, 162.13, 136.21, 129.97, 119.22, 117.75, 111.71, **88.79** (O-CH-O), 45.11, 34.41, 34.37, 20.56, 20.41, **19.60** (CH₃-CH), 13.96, 13.94

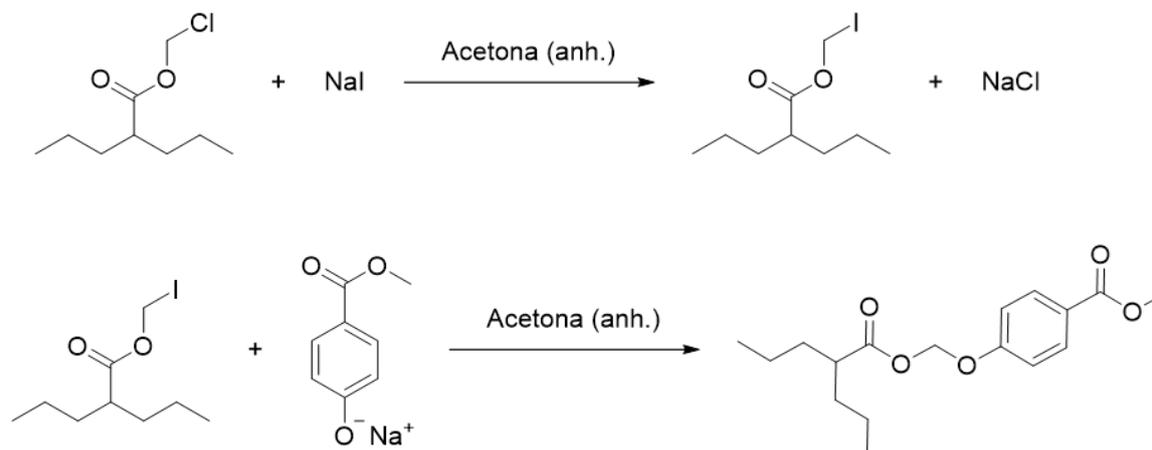
HRMS m/z (ESI) calc. 331.1516 para [M+Na]⁺, encontrado 331.1516

4.2.11 Síntesis de metil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (7)

En un tubo de reacción se agregan 300 mg (1,56 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 5 mL de Acetona recién destilada y 287 mg (1,87 mmol) de NaI. Se adapta agitación magnética, protección de la luz y se deja reaccionar 24 h a temperatura



ambiente y sobre corriente de nitrógeno seco. Transcurridas las 24 h de formación del Valproato de iodometilo se agregan sobre el medio de reacción 300 mg (1,72 mmol) de Metilparabeno sódico y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con protección de la luz y bajo atmósfera de nitrógeno seco.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. La mezcla sólida obtenida se extrae con 3 porciones de Hexano de 5 mL cada una, se juntan los extractos, se evapora el solvente en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 364 mg de aceite incoloro. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 11 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano:Acetato de Etilo de proporción 25:1 como fase móvil. Se obtienen 98 mg (0,318 mmol) de aceite incoloro que cristaliza como un sólido blanco a -20°C .

R_f Hex:AcOEt (10:1) = 0.38. Rto: 21%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 8,04-7,06 (m,4H, aromáticos), 5,84 (s,2H, O- CH_2 -O), 3,92 (s,3H, CH_3 -CO-), 2,46-2,41 (m,1H, -CH-), 1,64-1,22 (m,m,8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,85-0,83(t, 6H,- CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175.20, 166.61, 160.35, 131.59, 124.46, 115.43, 84.32 (-O- CH_2 -O-), 52.01, 45.23, 34.33, 20.46, 13.88.

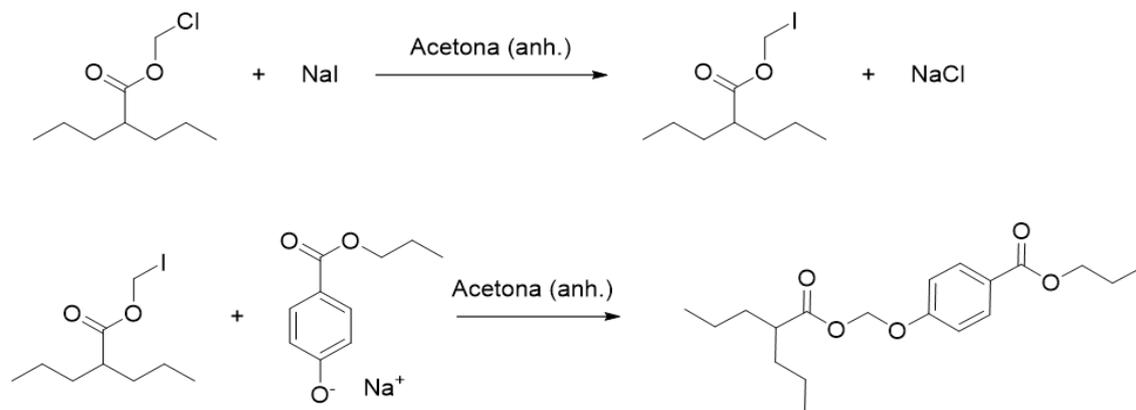
HRMS m/z (ESI) calc. 331.1517 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 331.1516

4.2.12 Síntesis de propil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (8)

En un tubo de reacción se agregan 414 mg (2,15 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 6 mL de Acetona destilada inmediatamente antes y 388 mg (2,58 mmol) de NaI. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se deja reaccionar 24 h a



temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno seco. Una vez transcurridas las 24 h se agregan 455 mg (2,25 mmol) de Propilparabeno sódico y 4 mL de Acetona. Se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con agitación magnética, protegido de la luz y en atmósfera de nitrógeno seco.



Aislamiento: La mezcla de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se realizan 3 extracciones con 5 mL de Hexano cada una, se juntan los extractos, se concentra en rotavapor y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 560 mg de un aceite color amarillo. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 17 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano: Acetato de etilo de proporción 20:1 como fase móvil. Se obtienen 140 mg (0,423 mmol) de un aceite incoloro que cristaliza como un sólido blanco a -20°C . R_f (Hex:AcOEt 10:1) = 0,46. Rto: 19.6%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 8,06-7,06 (m,4H, aromáticos), 5,84 (s,2H, O- CH_2 -O), 4,29-4,27 (t,2H, - CH_2 - CH_2 -O-CO-), 2,46-2,41 (m,1H, -CH-), 1,87-1,84 (m, 2H, CH_3 - CH_2 - CH_2 -O-CO-) 1,68-1,19 (m,m,8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,08-1,03 (t,3H, CH_3 - CH_2 - CH_2 -O-CO-), 0,88-0,83(t, 6H, - CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175.22, 166.19, 160.29, 131.53, 124.84, 115.41, 84.37 (-O- CH_2 -O-), 66.43, 45.23, 34.33, 22.14, 20.47, 13.88, 10.53

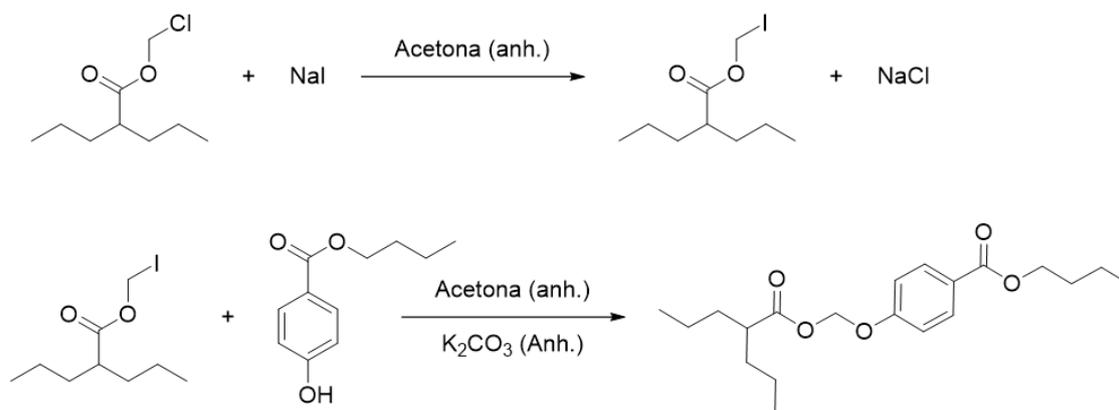
HRMS m/z (ESI) calc. 359.1828 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 359.1829

4.2.13 Síntesis de butil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (9)

En un tubo de reacción se agregan 440 mg (2,28 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 7 mL de Acetona destilada inmediatamente antes, se adapta agitación magnética y se agregan 412 mg (2,74 mmol) de NaI. Se deja reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente protegido de la luz y en atmósfera de nitrógeno seco. Una vez



transcurridas las 24 h de formación del derivado yodado se agregan 485 mg (2,5 mmol) de Butilparabeno seguidos de 3 mL de Acetona y 345,5 mg (2,5 mmol) de Carbonato de potasio K_2CO_3 (anh.). Se deja reaccionar durante 24 h con agitación magnética, corriente de nitrógeno seco y protección de la luz.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio, se lleva a peso constante en tambor de vacío y el residuo obtenido se extrae con 3 porciones de 4 mL de Hexano cada una. Se juntan los extractos, se concentran en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 670 mg de un aceite incoloro. Se realiza una separación en columna cromatográfica utilizando 30 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Diclorometano:Hexano de proporción 1:1 como fase móvil. Se obtienen 182 mg (0.519 mmol) de aceite incoloro. Rto: 23% $R_f_{Hex:AcOEt 10:1} = 0.59$

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 8,05-7,06 (m,4H, aromáticos), 5,84 (s,2H, O- CH_2 -O), 4,34-4,31 (t,2H, - CH_2 - CH_2 -O-CO-), 2,46-2,41 (m,1H, -CH-),1,79-1,74 (m, 2H, CH_3 - CH_2 -CH₂-O-CO-) 1,64-1,22 (m,m,10H, CH_2), 1,01-0,98 (t,3H, CH_3 -CH₂-CH₂-O-CO-), 0,86-0,83(t, 6H,- CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 175.21, 166.22, 160.28, 131.53, 124.85, 115.41, 84.37 (-O- CH_2 -O-) , 66.73, 45.23, 34.33, 30.81, 20.47, 19.29, 13.88, 13,73.

HRMS m/z (ESI) calc. 373.1986 para $[M+Na]^+$, encontrado 373.1985

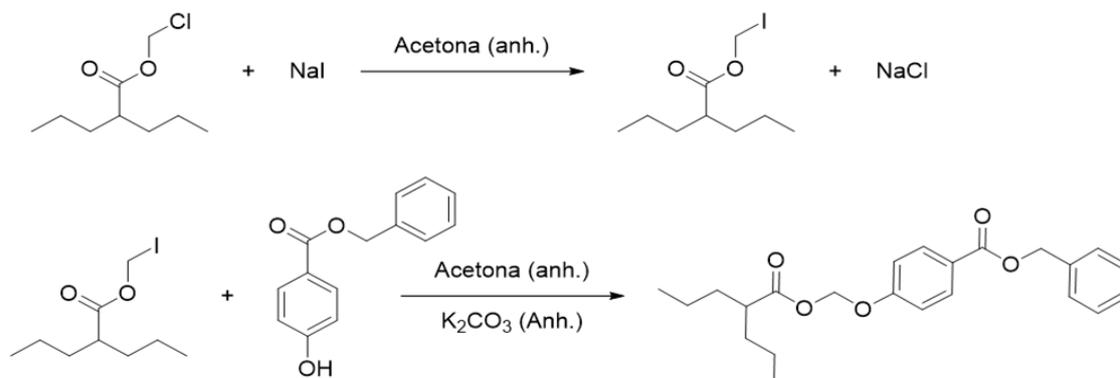
4.2.14 Síntesis de bencil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (10)

En un tubo de reacción se agregan 414 mg (2,15 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 6 mL de Acetona destilada inmediatamente antes y 388 mg (2,58 mmol) de NaI. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno seco. Sobre la mezcla de reacción se



Capítulo 4 Trabajo experimental de síntesis

agrega 534 mg (2,34 mmol) de Bencilparabeno seguido de 324 mg (2,34 mmol) de K_2CO_3 (anh.) y se deja reaccionar 24 h con agitación magnética, protección de la luz y corriente de nitrógeno seco.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se extrae el medio de reacción seco con 3 porciones de 6 mL de Hexano, se juntan los extractos, se concentran en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 685 mg de un aceite color amarillo pálido. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 20 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano:Acetato de etilo de proporción 20:1 como fase móvil. Se obtienen 204 mg (0,531mmol) de aceite incoloro. R_f Hex: AcOEt 10:1 = 0.47. Rto 24%.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 8,09-7,07 (m,9H, aromáticos), 5,84 (s,2H, O- CH_2 -O), 5,84 (s,2H, Ar- CH_2 -O), 2,46-2,41 (m,1H, -CH-), 1,64-1,22 (m,m,8H, $CH_2CH_2CH_3$), 0,86-0,83(t, 6H, - CH_3).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 175.19, 165.93, 160.48, 136.15, 131.74, 128.61, 128.24, 128.16, 124.42, 115.47, 84.33 (-O- CH_2 -O-), 66.59, 45.23.

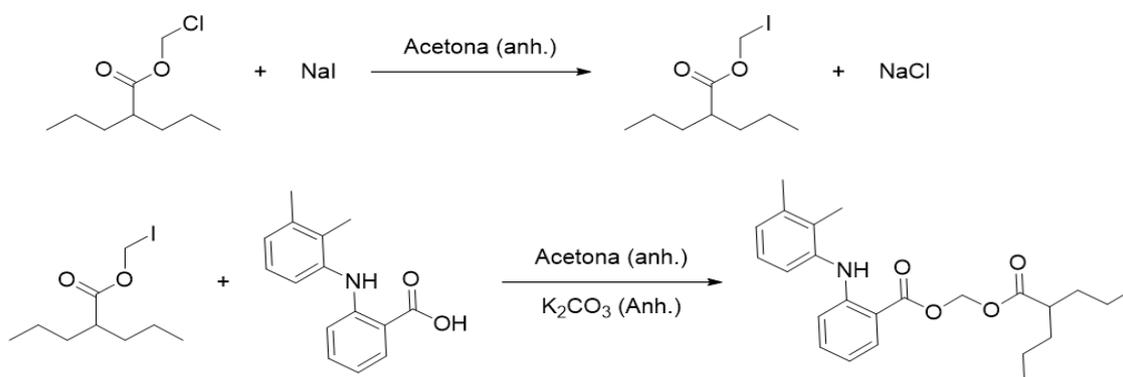
HRMS m/z (ESI) calc. 407.1822 para $[M+Na]^+$, encontrado 407.1829

4.2.15 Síntesis de 2-((2,3-dimetilfenil)amino)benzoato de ((2-propilpentanoil)oxi)metilo (11)

En un tubo de reacción se agregan 450 mg (2,33 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 3 mL de Acetona destilada inmediatamente antes y 432 mg (2,88 mmol) de NaI. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno seco. Sobre la mezcla de reacción se agregan 650 mg (2,68 mmol) de Ácido Mefenámico, 370 mg (2,68 mmol) de K_2CO_3 (anh.)



y se deja reaccionar 24 h con agitación magnética, protección de la luz y corriente de nitrógeno seco.



Aislamiento: La mezcla de reacción se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se realizan 3 extracciones de 3 mL utilizando Diclorometano. Se juntan las fases orgánicas y se lavan con 3 mL de sc. de Tiosulfato de sodio saturada, seguido de 3 mL de sc. de NaHCO₃ saturada y por último 3 mL de agua destilada. Se seca la fase orgánica con MgSO₄ (anh.), se concentra en rotavapor y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 746 mg de un aceite color amarillo oscuro. Se realiza una separación en columna cromatográfica utilizando sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano: Acetato de etilo de proporción 10:1 como fase móvil. Se obtienen 98mg (0,247mmol) de aceite amarillo. Rto.: 11%. Rf_{Hex:AcOEt (9:1)} = 0.79

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 9,16 (s,1H, -NH-), 7,99-6,66 (m,7H, aromáticos), 6,05 (s,2H, O-CH₂-O), 2,51-2,45(m,1H,-CH-),2,36(s,3H,Ar-CH₃),2,19(s,3H,Ar-CH₃),1,70-1,28(m,m,8H,CH₂CH₂CH₃), 0,92-0,88(t, 6H,-CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.35, 167.17, 150.20, 138.38, 138.30, 134.94, 132.77, 131.77, 127.14, 126.01, 123.50, 116.11, 113.66, 109.34, 79.04(-O-CH₂-O-), 45.10, 34.36, 20.62, 20.50, 14.00, 13.95.

HRMS m/z (ESI) calc. 420.2149 para [M+Na]⁺, encontrado 420.2145

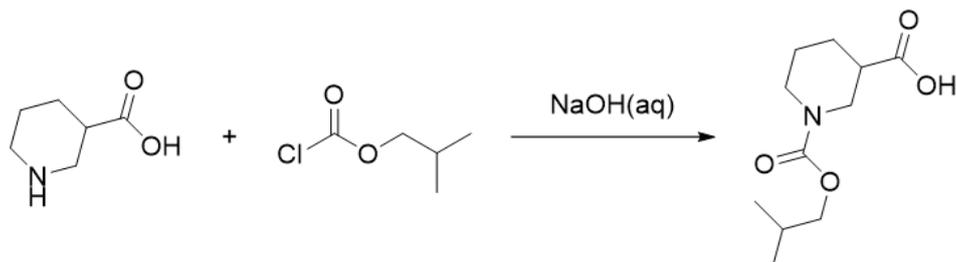
4.2.16 Síntesis de 1-isobutilo 3-(((2-propilpentanoil)oxi)metil) piperidina-1,3-dicarboxilato (12)

Inicialmente se realizó la protección del grupo amino del Ácido nipecótico, mediante la preparación del Ácido 1-(isobutoxicarbonil) nipecótico. Para ello, en un tubo de reacción y sobre baño de agua/hielo se agrega una solución de 2 g (50 mmol) de Hidróxido de



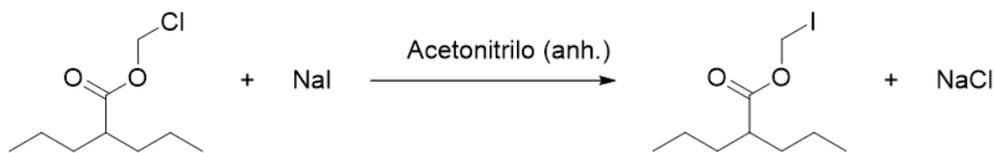
Capítulo 4 Trabajo experimental de síntesis

Sodio (NaOH) en 50 mL de agua destilada y 5,5 gr (42,6 mmol) de Ácido Nipecótico. Se adapta agitación magnética y desde ampolla de compensación se agregan gota a gota 8,4 mL/8,85 g (64,8 mmol) de Cloroformiato de Isobutilo. La mezcla de reacción se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente.

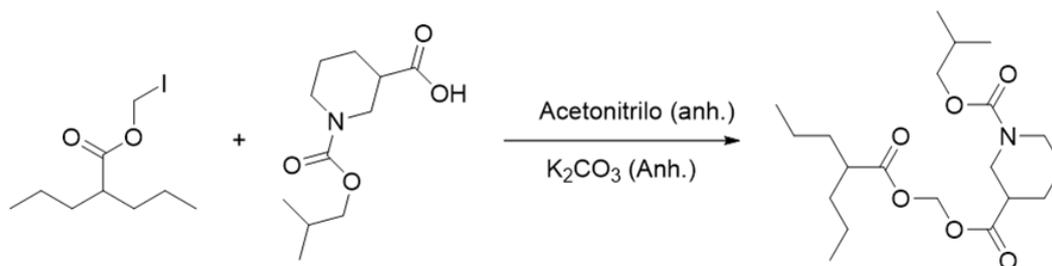


El medio de reacción se extrae con 3 porciones de 20 mL de Acetato de Etilo. Se juntan los extractos y se secan con $\text{MgSO}_4(\text{anh.})$. Se filtra el desecante, concentra en evaporador rotativo la fase orgánica y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 4,784 g (20,87 mmol) de un sólido blanco que presenta un solo *spot* en cromatografía de capa delgada de sílica gel utilizando una mezcla Diclorometano:Metanol de proporción 9:1 como fase móvil. $R_f_{\text{DCM-MeOH (9:1)}} = 0,61$

Por otra parte, se prepara el Valproato de iodometilo según la técnica usual: en un tubo de reacción se agregan 310 mg (1,61 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 5 mL de Acetonitrilo destilado inmediatamente antes, se adapta agitación magnética y se agregan 306 mg (2,04 mmol) de NaI. Se deja reaccionar 24 h con protección de la luz, a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno seco.



Finalmente, una vez transcurridas las 24 h de formación del iodometil derivado, se agregan sobre el medio de reacción 250,3 mg (1,09 mmol) de Ácido 1-(isobutoxicarbonil)nipecótico, 196,7 mg (1,42 mmoles) de K_2CO_3 (anh.) y 5 mL de Acetonitrilo. Se deja reaccionar 24 h con agitación magnética, a temperatura ambiente, protegido de la luz y en atmósfera de nitrógeno seco.



Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se realizan 3 extracciones de 6 mL cada una utilizando Hexano como solvente. Junta los extractos, concentra en evaporador rotativo y lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 632 mg de aceite levemente amarillento. Se realiza una separación en columna cromatográfica utilizando 20 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano:Acetato de Etilo de proporción 15:1 como fase móvil. Se obtienen 112 mg (0.29 mmol) de aceite incoloro. Rto: 26%. $R_{f \text{ Hex: AcOEt } 6:1} = 0,33$

Se puede observar en cromatografía en capa delgada que el compuesto se descompone con la temperatura al concentrar en evaporador rotativo a temperaturas entre 40-45°C.

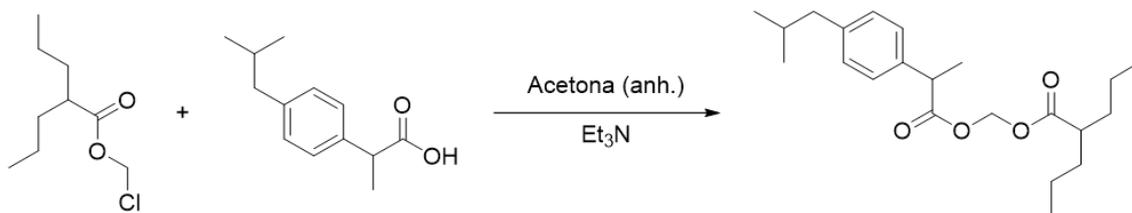
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 5,81-5,76 (dd, 2H, O- CH_2 -O), 3,99-4,02 (d, 1H), 3,91-3,85 (m, 2H, - CH_2 -CH-(CH_3) $_2$), 2,90-2,84 (m, 1H), 1,99-1,91 (m, 1H), 1,77-1,71 (m, 1H), 1,68-1,58 (m, 3H), 1,49-1,42 (m, 3H), 1,35-1,27 (m, 4H), 0,95-0,94 (d, 6H, -CH-(CH_3) $_2$), 0,93-0,89 (triplete (t, 6H, CH_2 - CH_3))

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 175.04, 171.96, 155.44, **78.98** (-O- CH_2 -O-), 71.66, 45.31, 44.94, 44.02, 34.30, 27.99, 27.19, 20.49, 19.10, 13.94.

HRMS m/z (ESI) calc. 408.2352 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 408.2357

4.2.17 Síntesis de 2-propilpentanoato de ((2-(4-isobutilfenil)propanoil)oxi)metilo (13)

En un tubo de reacción se agregan 500 mg (2,42 mmol) de ibuprofeno y 466 mg (2,42 mmol) de Valproato de clorometilo disueltos en 2 mL de Acetona destilada inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética y se agregan 6 mL de Trietilamina (43 mmol/4,356 g) observando aparición de un sólido blanco en suspensión. Se adapta refrigerante para calentamiento a reflujo y se deja reaccionar 3 h a ebullición seguido de 24 h a temperatura ambiente.



Aislamiento: La mezcla de reacción se concentra en rotavapor y el sólido remanente se extrae con 3 porciones de 6 mL de Hexano cada una. Se juntan los extractos, se concentran en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 835 mg de un aceite incoloro. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 34 g de Sílica Gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano: Acetato de etilo de proporción 20:1 como fase móvil. Se obtienen 606 mg de un aceite incoloro que presenta impurezas detectables en cromatografía en capa delgada. Realiza una nueva separación en columna cromatográfica con 20gr de sílica gel 60 y una mezcla Hexano: Acetato de etilo de proporción 30:1 como fase móvil. Se obtienen 303 mg (0,836 mmol) de un aceite incoloro. Rto= 34%. $R_f_{\text{Hex:AcOEt (25:1)}} = 0,54$

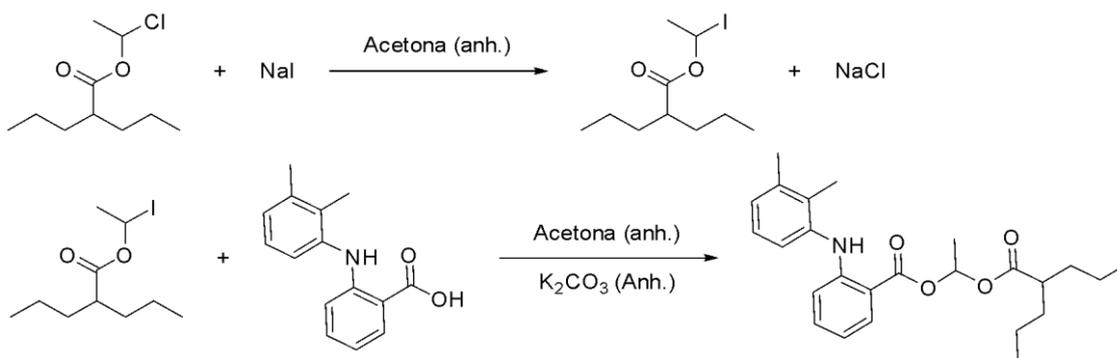
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 7,22-7,10 (m, 4H, arom), 5,76 (s, 2H, O-CH₂-O), 3,76-3,72 (c, 1H, -CO-CH-Ar), 2,47-2,45 (d, 2H, -CH₂-CH(CH₃)₂), 2,40-2,35 (m, 1H, -CH-), 1,9-1,82 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂), 1,58-1,54 (m, 2H, -CH₂-), 1,53-1,51 (d, 3H, -CH₃-), 1,44-1,36 (m, 2H, -CH₂-), 1,30-1,21 (m, 4H, -CH₂-), 0,92-0,86 (m, 12H, -CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 175.06, 173.41, 140.78, 136.81, 129.39, 127.21, **79.09(O-CH₂-O)**, 45.05, 44.91, 34.25, 30.17, 22.39, 20.43, 18.33, 13.94.

HRMS m/z (ESI) calc. 385.2343 para $[\text{M}+\text{Na}]^+$, encontrado 385.2349

4.2.18 Síntesis de 1-((2-propilpentanoil)oxi)etil 2-((2,3-dimetilfenil)amino)benzoato (14)

En un tubo de reacción se agregan 320 mg (1,54 mmol) de Valproato de 1-cloroetilo, 5 mL de Acetona destilada inmediatamente antes y 230 mg (1,54 mmol) de NaI. Se adapta agitación magnética y protección de la luz y se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente sobre corriente de nitrógeno seco. Luego de 24 h de formación del Valproato de 1-iodometilo se agregan 337 mg (1,39 mmol) de Ácido mefenámico, 3 mL de Acetona y 194 mg (1,4 mmol) de K_2CO_3 (anh.). Se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con agitación magnética, protección de la luz y corriente de nitrógeno seco.

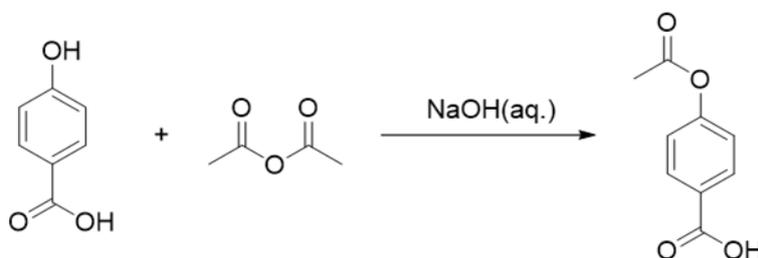


Aislamiento: El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se extrae el sólido remanente con 4 porciones de 5 ml de Hexano cada una. Se juntan los extractos, se concentran en rotavapor y se lleva a peso constante en tambor de vacío. Se obtienen 557 mg de un aceite amarillo. Se intentó la purificación del producto por cromatografía en columna utilizando 20 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y mezclas Hexano:Acetato de Etilo en diferentes proporciones, sin obtener el producto puro. El compuesto se identificó de la mezcla por espectroscopia de masas.

HRMS m/z (ESI) calc. 434.2295 para $[M+Na]^+$, encontrado 434.2302

4.2.19 Síntesis de Ácido 4-Acetoxibenzoico

En un Erlenmeyer de 50 mL sumergido en un baño de agua/hielo se agregan 985 mg (24,65 mmol) de NaOH disueltos en 15 mL de agua destilada y 1 g (8,25 mmol) de Ácido 4-hidroxibenzoico. Se adapta agitación magnética y se agregan 1,6 mL (16,3 mmol) de Anhídrido Acético . Se deja reaccionar 2 h a temperatura ambiente.



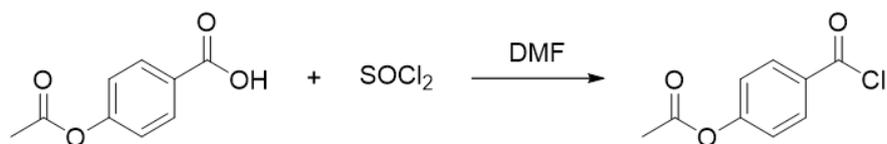
Aislamiento: El medio de reacción se lleva a pH neutro mediante el agregado de sc. HCl 1N hasta pH=1 con papel indicador. Se filtra al vacío el sólido blanco obtenido y se lava con 2 porciones de 5 mL de agua destilada fría. Se lleva a peso constante en tambor de



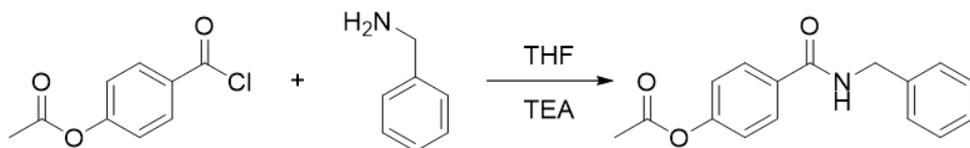
vacío a 40°C y se cristaliza 2 veces desde Metanol. Se obtienen 1,114 g (6,18 mmol). Rto.: 75%. Pf (MeOH) = 185-186.5°C

4.2.20 Síntesis de N-bencil-4-hidroxiacetamida (15)

En un tubo de reacción seco y sobre baño de agua hielo se agregan 580 mg (3,21 mmol) de Ácido 4-Acetoxibenzoico y 2 mL (27.57 mmol) de Cloruro de tionilo (SOCl₂) destilado inmediatamente antes y 0,2 mL de Dimetilformamida (DMF). Se adapta agitación magnética, refrigerante para calentamiento a reflujo, trampa de agua para retención de gases y se deja reaccionar durante 5 h sobre un baño de glicerina a 70°C. Se concentra en evaporador rotatorio para ácidos sobre baño de agua a 40°C obteniendo el cloruro de ácido como un aceite incoloro.



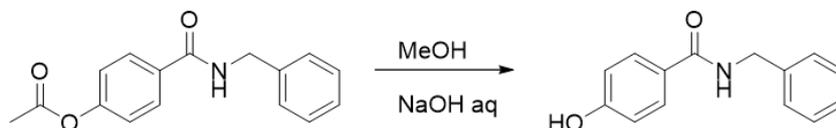
En otro tubo de reacción se agregan 0,48 mL (4,15 mmol) de Bencilamina, 1,55 mL (11,07 mmoles) de Trietilamina y 8 mL de THF (anh.). Se adapta agitación magnética, baño de agua hielo y, desde ampolla de compensación, se agrega gota a gota una solución del cloruro de ácido obtenido disuelto en 7 mL de THF (anh.). Se deja reaccionar 72 h a temperatura ambiente, con agitación magnética y corriente de nitrógeno seco.



El medio de reacción se centrifuga y se separa la fase líquida sobrenadante lavando el sólido remanente con dos porciones de 4 mL de THF (anh.). Se juntan los extractos, se concentran en evaporador rotativo y se disuelve en 15 mL de Acetato de etilo. La fase orgánica se lava con 5 mL de sc. 5% de HCl y 2 veces con 5 mL de agua destilada. Se seca la fase orgánica con MgSO₄ (anh.), se filtra el desecante, y se concentra en evaporador rotativo llevando a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 660 mg de un aceite espeso levemente amarillento.



El aceite obtenido se somete a hidrólisis en un tubo de reacción agregando 16 mL de Metanol, 6,25 mL de agua destilada, y 260 mg (6,5 mmol) de NaOH. Se deja reaccionar 1 hora a temperatura ambiente y con agitación magnética.



Aislamiento: La mezcla de reacción se lleva a evaporador rotatorio hasta mitad de volumen, se lleva a pH neutro por el agregado de sc. HCl 1N midiendo el pH con papel indicador y se extrae con 3 porciones de 4 mL de Acetato de etilo. La fase orgánica se seca con MgSO₄ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a 40°C. Se obtienen 590 mg de un sólido que se cristaliza dos veces desde Isopropanol. Se obtienen 517 mg (2.28 mmol). Rto 71%. R_f

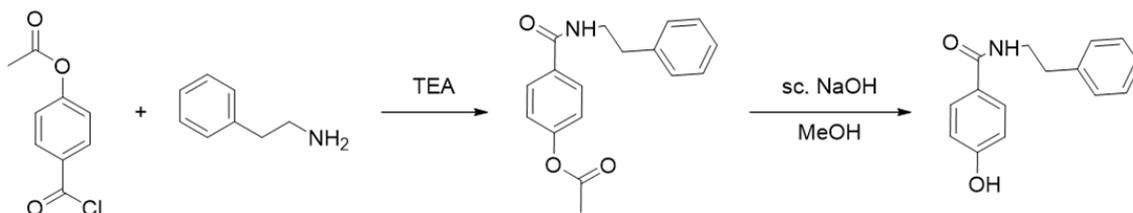
Hex:AcOEt (20:1) = 0,53. Pf (iPrOH) = 165-166,5°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO) 9,98 (s,1H, **OH-**), 8,79-8,77 (t,1H, **-NH-**), 7,78-6,79 (m,9H, aromaticos), 4,46-4,45 (d,2H, **-CH₂-**)

¹³C NMR (DMSO) δ 166.36, 160.61, 140.50, 129.63, 128.69, 127.62, 127.09, 125.51, 115.27, 42.93.

4.2.21 Síntesis de 4-Hidroxi-N-fenetilbenzamida (16)

En un tubo de reacción sumergido en un baño de agua/hielo se agregan 880 mg (4,74 mmol) de Ácido 4-Acetoxibenzoico y 2 mL (27.57 mmol) de SOCl₂ destilado inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética, refrigerante para calentamiento a reflujo, trampa de agua para retención de gases y se hace reaccionar durante 4 h sobre baño de glicerina a 75°C. El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio sobre baño de agua a 40°C obteniendo el cloruro de ácido como un aceite incoloro. En otro tubo de reacción se agregan 0,83 mL (6,6 mmol) de Fenetilamina, 2,3 mL (16 mmol) de Trietilamina y 15 mL de THF (anh.). Se adapta agitación magnética, baño de agua/hielo y, desde ampolla de compensación, agrega gota a gota una solución del cloruro de ácido obtenido disuelto en 12 mL de THF(anh.) . Una vez completado el agregado se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con agitación magnética y corriente de nitrógeno seco.



El medio de reacción se concentra en evaporador rotativo y se disuelve en 45 mL de Acetato de etilo. La fase orgánica se lava con 15 mL de sc. HCl 5%, 2 veces con 15 mL de agua destilada, se seca con Na₂SO₄ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 1,327 g de un sólido color naranja que se somete a hidrólisis en un tubo de reacción agregando 40 mL de Metanol y una solución de 582 mg (14,54 mmol) de NaOH disueltos en 14,5 mL de agua destilada. Se hace reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación magnética.

Aislamiento: Se concentra la mezcla de reacción en evaporador rotatorio hasta mitad de volumen, se lleva a pH neutro por el agregado de sc. HCl 1N midiendo el pH con papel indicador y se extrae con 3 porciones de 4 mL de Acetato de etilo. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a 40°C. Se obtienen 1,194 g de un sólido que se cristaliza cuatro veces desde Isopropanol. Se obtienen 430 mg (1,78 mmol) de sólido blanco. Rto.: 38%. Pf (iPrOH)= 152-154°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO) 9,96 (s,1H, **OH-**), 8,32-8,29 (t,1H, **-NH-**), 7,70-6,78 (m,9H, aromaticos), 3,47-4,43 (d,2H, **-NH-CH₂-**), 2,81-2,84 (d,2H, **-CH₂-Ar**)

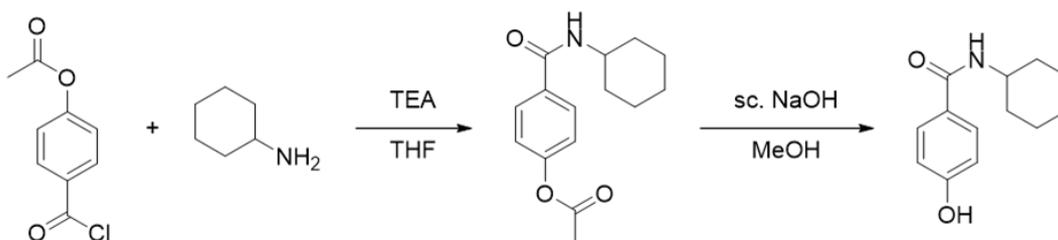
¹³C NMR (DMSO) δ 166.33, 160.46, 140.12, 129.47, 129.10, 128.79, 126.51, 125.77, 115.20, 41.26, 35.74.

4.2.22 Síntesis de 4-Hidroxi-N-ciclohexilbenzamida (17)

En un tubo de reacción sumergido en un baño de agua/hielo se agregan 900 mg (4,98 mmol) de Ácido 4-Acetoxibenzoico y 4,3 mL (59,73 mmol) de SOCl₂ destilado inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética, refrigerante para calentamiento a reflujo, trampa de agua para retención de gases y se deja reaccionar durante 2 h a 70°C. El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio sobre baño de agua a 40°C obteniendo el cloruro de ácido como un aceite incoloro. En otro tubo de reacción



se agregan 0,8 mL (7 mmol) de Ciclohexilamina, 2,4 mL (17,21 mmol) de Trietilamina y 14 mL de THF (anh.). Se adapta agitación magnética, baño de agua hielo y, desde ampolla de compensación, se agrega gota a gota una solución del cloruro de ácido obtenido disuelto en 12 mL de THF (anh.). Se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con agitación magnética y corriente de nitrógeno seco.



Se concentra en evaporador rotatorio y se disuelve en 25 mL de Diclorometano. La fase orgánica se lava con 8 mL de sc. HCl 5% y dos veces con 10 mL de agua destilada. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 1,143 g de un sólido blanco que se somete a hidrólisis en un tubo de reacción agregando 30 mL de Metanol y una solución de 462 mg (11,55 mmol) de NaOH disueltos en 11,5 mL de agua destilada. Se adapta agitación magnética y se deja reaccionar 2 h a temperatura ambiente.

Aislamiento: La mezcla de hidrólisis se lleva a evaporador rotatorio hasta mitad de volumen y se lleva a pH=3 agregando sc. HCl 1N midiendo el pH con papel indicador. Se filtra al vacío y se lava el sólido con agua destilada fría. El sólido obtenido se lleva a peso constante en tambor de vacío a 40°C. Se obtienen 870 mg de un sólido que se cristaliza 3 veces desde isopropanol. Se obtienen 782 mg (3,56 mmol). Rto= 72%. Rf_{DCM:MeOH} (20:1) = 0,57. Pf_(iPrOH) = 255-256,5°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO) 9,90 (s,1H, **OH-**), 8,20-8,17 (t,1H, **-NH-**), 7,73-7,70(m,2H, aromaticos), 6,79-6,76 (m,2H,aromaticos), 3,75-3,69 (m,1H, **-CH-**), 1,81-1,08 (m,10H,**-CH₂-**)

¹³C NMR (DMSO) δ 165.47, 160.32, 129.61, 126.03, 115.07, 48.59, 33.02, 25.77, 25.48.

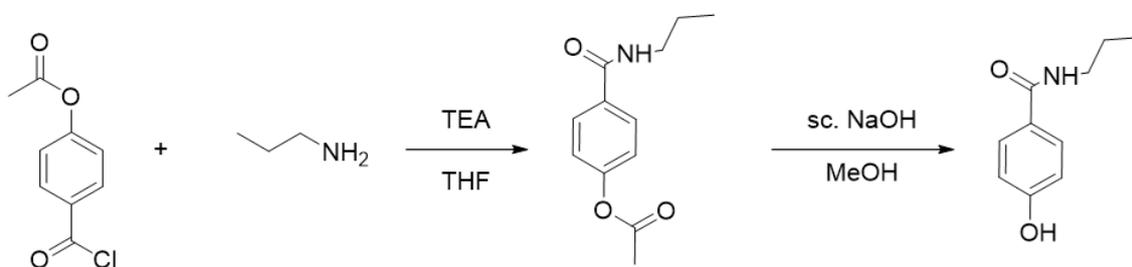
4.2.23 Síntesis de 4-Hidroxi-N-propilbenzamida (18)

En un tubo de reacción seco y sobre baño de agua/hielo se agregan 900 mg (4,98 mmol) de Ácido 4-Acetoxibenzoico y 4,3 mL (59.73mmol) de SOCl₂ destilado inmediatamente



Capítulo 4 Trabajo experimental de síntesis

antes. Se adapta agitación magnética, refrigerante para calentamiento a reflujo, trampa de agua para retención de gases y se deja reaccionar durante 2 h a 70°C. El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio sobre baño de agua a 40°C obteniendo el cloruro de ácido como un aceite incoloro. En otro tubo de reacción se agregan 0,6 mL (7,29 mmol) de Propilamina, 2,4 mL (17,21 mmol) de Trietilamina y 14 mL de THF (anh.). Se adapta agitación magnética, baño de agua/hielo y, desde ampolla de compensación, se agrega gota a gota una solución del cloruro de ácido obtenido disuelto en 12 mL de THF (anh.). Se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con agitación magnética y corriente de nitrógeno seco.



El medio de reacción se concentra en evaporador rotativo y se disuelve en 30 mL de Diclorometano. La fase orgánica se lava con 10 mL de sc. HCl 5% y 2 veces con 10 mL de agua destilada. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 941 mg de un aceite amarillo que se somete a hidrólisis en un tubo de reacción agregando 28 mL de Metanol y una solución de 448 mg (11,2 mmol) de NaOH disueltos en 11,2 mL de agua destilada. Se adapta agitación magnética y se deja reaccionar 2 h a temperatura ambiente.

Aislamiento: Concentra el medio de hidrólisis en evaporador rotatorio hasta mitad de volumen y lleva a pH neutro por el agregado de sc. HCl 1N midiendo el pH con papel indicador. La solución acuosa se extrae con 3 porciones de 15 mL de Acetato de etilo. Se seca la fase orgánica con K₂CO₃ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a 40°C. Se obtienen 640 mg de un aceite color caramelo. Se realiza una separación por cromatografía en columna utilizando 20 g de sílica gel 60 como fase estacionaria y una mezcla Hexano:Acetato de Etilo de proporción 1:1 como fase móvil. Se obtienen 537 mg de un sólido que se



cristaliza desde Diclorometano. Se obtienen 370 mg (2,06 mmol) de un sólido blanco.

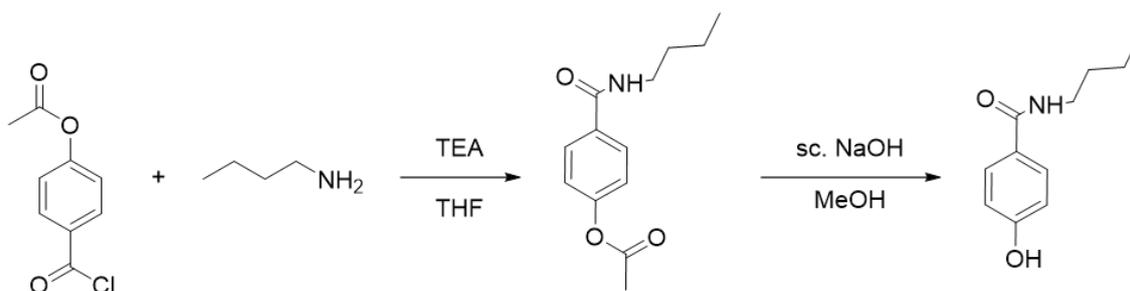
Rto= 41%. Rf_{DCM:MeOH (20:1)} = 0,26. Pf_(DCM) = 75-77°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO) 9,95 (s,1H, **OH-**), 8,20-8,17 (t,1H, **-NH-**), 7,72-7,69 (m,2H, aromáticos), 6,80-6,77 (m,2H, aromáticos), 3,20-3,16 (m,2H, **-NH-CH₂-**), 1,47-1,54 (m,2H, **-CH₂-CH₃**), 0,89-0,86 (**-CH₃**)

¹³C NMR (DMSO) δ 166.33, 160.37, 129.46, 125.89, 115.16, 41.32, 22.98, 11.93.

4.2.24 Síntesis de N-butil-4-hidroxibenzamida (19)

En un tubo de reacción sumergido en un baño de agua/hielo se agregan 900 mg (4,98 mmol) de Ácido 4-Acetoxibenzoico y 4,3 mL (59.73 mmol) SOCl₂ destilado inmediatamente antes. Se adapta agitación magnética, refrigerante para calentamiento a reflujo y trampa de agua para retención de gases y se deja reaccionar durante 2 h a 70°C. El medio de reacción se concentra en evaporador rotatorio para ácidos sobre baño de agua a 40°C obteniendo el cloruro de ácido como un aceite incoloro. En otro tubo de reacción se agregan 0,7 mL (6,6 mmol) de Butilamina, 2,4 mL (16,7 mmol) de Trietilamina y 12 mL de THF (anh.). Se adapta agitación magnética, baño de agua hielo y, desde ampolla de compensación, se agrega gota a gota una solución del cloruro de ácido obtenido disuelto en 14 mL de THF (anh.). Se deja reaccionar 24 h a temperatura ambiente, con agitación magnética y corriente de nitrógeno seco.



Aislamiento: La mezcla de reacción se concentra en evaporador rotativo y se disuelve en 20 mL de Diclorometano. Se lava la fase orgánica con 7 mL de sc. HCl 5% y 2 veces con 7 mL de agua destilada. Se seca con Na₂SO₄ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotativo y se lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 1,231 g de un aceite color amarillo que se somete a hidrólisis en un tubo de reacción agregando 35 mL de Metanol (MeOH) y una solución



Capítulo 4

Trabajo experimental de síntesis

de 552 mg (13,8mmol) de NaOH disueltos en 14 mL de agua destilada. Se adapta agitación magnética y se deja reaccionar 1 h a temperatura ambiente.

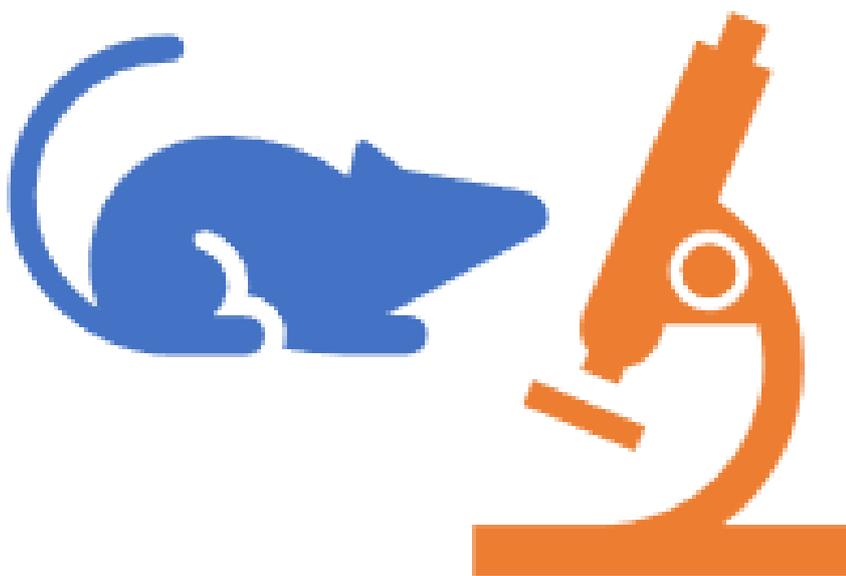
Aislamiento: Se concentra la mezcla de reacción en evaporador rotatorio hasta mitad de volumen, se lleva a pH neutro por el agregado de sc. HCl 1N midiendo el pH con papel indicador y se extrae con 3 porciones de 15 mL de Acetato de etilo. Se seca la fase orgánica con K₂CO₃ (anh.), se filtra el desecante, se concentra en evaporador rotatorio y se lleva a peso constante en tambor de vacío a 40°C. Se obtienen 1,194 g de un sólido que se cristaliza tres veces desde Diclorometano. Se obtienen 537 mg (2,78 mmol) de sólido blanco. Rto 56%. Rf_{DCM:MeOH (20:1)} = 0,4. Pf_(DCM) = 115-116

¹H NMR (500 MHz, DMSO) 9,92 (s,1H, **OH-**), 8,14-8,17 (t,1H, **-NH-**), 7,71-7,68 (m,2H, aromaticos), 7,79-7,76 (m,2H, aromaticos), 3,24-3,20 (m,2H, **-NH-CH₂-**), 1,45-1,41 (m,2H, **-CH₂-**), 1,27-1,35 (m,2H, **-CH₂-CH₃**), 0,91-0,88 (**-CH₃**)

¹³C NMR (DMSO) δ 166.24, 160.37, 129.46, 125.91, 115.15, 39.19, 31.87, 20.14, 14.22.

Capítulo 5

Evaluación Biológica



5.1 Estudios *in vivo* en modelos de epilepsia

5.1.1 Introducción

Durante los últimos 80 años, los modelos animales han sido la base sobre la que se han identificado muchas nuevas terapias para el tratamiento de la epilepsia. Según el Instituto nacional de salud de Estados Unidos (*USA National institutes of Health, NIH*), un modelo animal es una especie no humana que se utiliza en investigaciones biomédicas para replicar aspectos de un proceso biológico o de una enfermedad, presentes en los seres humanos (**Van der Staay, 2006**). Los modelos animales (por ejemplo, ratón, rata, pez cebra, entre otros) tienen una anatomía, fisiología o respuesta a un patógeno lo suficientemente similares como para poder extrapolar los resultados de los estudios y así comprender mejor la fisiología y patología en los seres humanos. En epilepsia, se consideran modelos animales válidos aquellos que son capaces de reproducir algunas de las características clínicas de la enfermedad, de manera de que los resultados obtenidos puedan trasladarse a un sistema más complejo como el ser humano (**Denayer et al., 2014**). Actualmente existen diferentes modelos animales de epilepsia y se pueden clasificar en modelos agudos y crónicos. En los **modelos agudos** se provoca una convulsión en animales sanos mediante un estímulo físico o químico, para luego observar si el compuesto en evaluación, previamente administrado, es capaz de evitar las crisis convulsivas (**Giardina & Gasior, 2009**). Estos modelos agudos son de gran utilidad para la detección rutinaria de actividad anticonvulsiva de nuevos candidatos, tienen bajo costo (en cuanto a economía y tiempo, comparando con los modelos crónicos) y existen bases de datos con una gran cantidad de datos de este tipo de evaluaciones. Numerosos FACs han sido descubiertos a través de este tipo de tests sobre un gran número de compuestos, lo que ha aumentado sin dudas las posibilidades terapéuticas, sobre todo para aquellos pacientes que son refractarios al tratamiento con los FACs convencionales. A diferencia de los modelos de convulsiones agudas o de crisis inducidas, los **modelos de epilepsia crónica** son poco frecuentes debido al mayor requerimiento de tiempo y a los elevados costos. Estos modelos permiten obtener una



mejor comprensión respecto a aquellos mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad (**Garcia Garcia et al., 2010**) y comprenden todos aquellos modelos donde se utilizan animales capaces de tener crisis espontáneas repetidas. En los últimos años se han desarrollado un gran número de modelos crónicos que tienen como foco principal la farmacoresistencia, entre ellos el modelo en ratones de kainato intrahipocampal (**Löscher, 2017**).

Si bien los primeros modelos de crisis convulsivas en animales reportados datan de fines del siglo XIX, hasta la década de 1930 el descubrimiento de FACs se caracterizó por la observación y la serendipia, en lugar del uso de un enfoque racional y específico para el desarrollo de fármacos. El control de las convulsiones era considerado el objetivo principal de la terapia, con mucho menos énfasis en la seguridad y la **tolerancia (Löscher, 2017)**. Fue recién en esta década que Tracy Putnam y Houston Merritt descubren las propiedades anticonvulsivas de la Fenitoína mediante la utilización de un modelo agudo de convulsiones inducidas por electroshock en gatos (**Putnam & Merritt, 1937**). Este fármaco se identificó mediante el estudio sistemático de más de 700 compuestos, encontrándose entre los candidatos más potentes y efectivos en comparación con los FACs en uso de la época (como los bromuros y el fenobarbital). Además, debido a que los estudios de toxicidad en animales mostraron buena tolerancia, la Fenitoína fue seleccionada rápidamente para ensayos clínicos, llegando al mercado en 1938 (**Merritt, 1938**).

La identificación de la actividad anticonvulsiva de la Fenitoína fue un evento clave, no sólo porque dio lugar a una terapia sin efectos sedantes y exitosa para muchos pacientes resistentes, sino también por su impacto en el proceso de desarrollo y descubrimiento de este tipo de fármacos (**Krall, Penry, Kupferberg, et al., 1978**). Los testeos por electroshock fueron luego modificados para el uso de roedores (ratas y ratones), desarrollándose la prueba de convulsiones por electrochoque máximo (MES-test, del inglés *maximal electroshock seizure test*). Este ensayo agudo es el más utilizado actualmente como primer test para la búsqueda de nuevos FACs, siendo eficaz para la identificación de fármacos para el tratamiento de convulsiones del tipo tónico-clónicas generalizadas en humanos (**Bialer & White, 2010**).

En el año 1944, con el conocimiento de que los modelos de convulsiones inducidas por electroshock en animales podían ser usados para identificar FACs clínicamente efectivos, se desarrolló el modelo de convulsiones agudas inducidas por Pentilentetrazol (PTZ). En este test las crisis convulsivas se generan por la acción de esta sustancia química (**Socafa & Wlaź, 2021**). Utilizando el modelo PTZ en ratones se identificó el efecto anticonvulsivo de la Trimetadiona, la cual demostró luego una buena actividad frente a las crisis de ausencia en humanos. Este compuesto fue introducido al mercado para esta indicación sólo dos años después, en 1946. Además, también se demostró que la Fenitoína no era efectiva en el modelo de PTZ, lo cual estaba en línea con la poca eficacia que mostraba para el tratamiento de las crisis de ausencia en humanos. Por lo tanto, dos modelos animales simples como MES test y PTZ test, podían usarse para diferenciar los FACs útiles para el tratamiento de diferentes tipos de epilepsia. Esta conclusión posteriormente sentó las bases para el desarrollo de las pruebas de convulsiones MES y PTZ subcutáneas (s.c.) en ratones y ratas, como procedimientos estándar para predecir la actividad anticonvulsiva a nivel clínico de los fármacos en investigación (**Swinyard et al., 1952**). Como resultado de esta evaluación sistemática se identificaron numerosos FACs clínicamente efectivos que se comercializaron entre las décadas de 1950 y 1960, como por ejemplo Carbamazepina y Etosuximida (**Löscher & Schmidt, 2011**).

A principios de la década de 1970 se observó que pocos candidatos nuevos lograban ingresar a la etapa de ensayos clínicos. Como consecuencia, la rama dedicada a la epilepsia del *National Institute Of Neurological Disorders And Stroke* (NINDS) del NIH desarrolló e implementó en 1975 un programa para la identificación a nivel preclínico de nuevos compuestos activos denominado Proyecto de Detección de Anticonvulsivos (*ASP del inglés Anticonvulsant Screening Project*) (**Krall, Penry, Kupferberg, et al., 1978**). El programa del ASP renovó el interés de la industria farmacéutica por la epilepsia y los fármacos utilizados para tratarla, y desde su creación ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de varios FACs aprobados por la FDA-, incluidos Felbamato, Topiramato, Lacosamida y Retigabina (**Kehne et al., 2017**). El programa consistía



principalmente en 3 pruebas *in vivo* para los nuevos candidatos a anticonvulsivos: los ensayos MES-test y PTZ y la prueba de neurotoxicidad Rotarod (**Krall, Penry, White, et al., 1978**). En este marco, las nuevas entidades químicas eran probadas en los 3 ensayos mencionados y sólo aquellas moléculas cuyos perfiles resultaban favorables pasaban a la siguiente etapa de cuantificación de la actividad biológica. Para la cuantificación se determinaban diferentes parámetros como tiempo de efecto máximo, dosis efectiva media y dosis tóxica media, y estos datos se utilizaban como criterio de selección de las estructuras que pasaban a la 3ra etapa del programa, donde se estudiaban, entre otros, los resultados de actividad mediante la administración oral del candidato.

En 2015 el ASP fue modificado, denominándose Programa de Detección de Terapias para la Epilepsia (**ETSP**, del inglés *Epilepsy Therapy Screening Program*). A diferencia del anterior, este protocolo pone énfasis en la identificación de nuevos agentes capaces de abordar las necesidades médicas no satisfechas en epilepsia, principalmente para aquellos pacientes que no son capaces de llevar a cabo un tratamiento favorable con la farmacoterapia actual (**Kehne et al., 2017**).

Uno de los principales objetivos de la ETSP es identificar fármacos con eficacia contra las crisis farmacorresistentes. Como se muestra en la Figura 1, el ETSP utiliza una batería de ensayos *in-vivo* e *in-vitro*, los cuales se pueden clasificar en una fase inicial de "Identificación", seguida de una fase de "Diferenciación" (**Kehne et al., 2017**). Se observa que, a pesar de los avances que han permitido la identificación de distintos blancos moleculares para los FACs, no es posible independizarse de las evaluaciones *in vivo*. Actualmente los sistemas *in vitro* no son capaces de modelar en su totalidad los procesos subyacentes específicos requeridos para la protección de las crisis, los cuales, además de la modulación de los blancos moleculares pertinentes, incluyen la participación de distintas biomoléculas, como por ejemplo aquellas involucradas en el pasaje a través de las barreras biológicas que existen en un organismo vivo hasta llegar al sitio de acción (**Castel-Branco et al., 2009**).

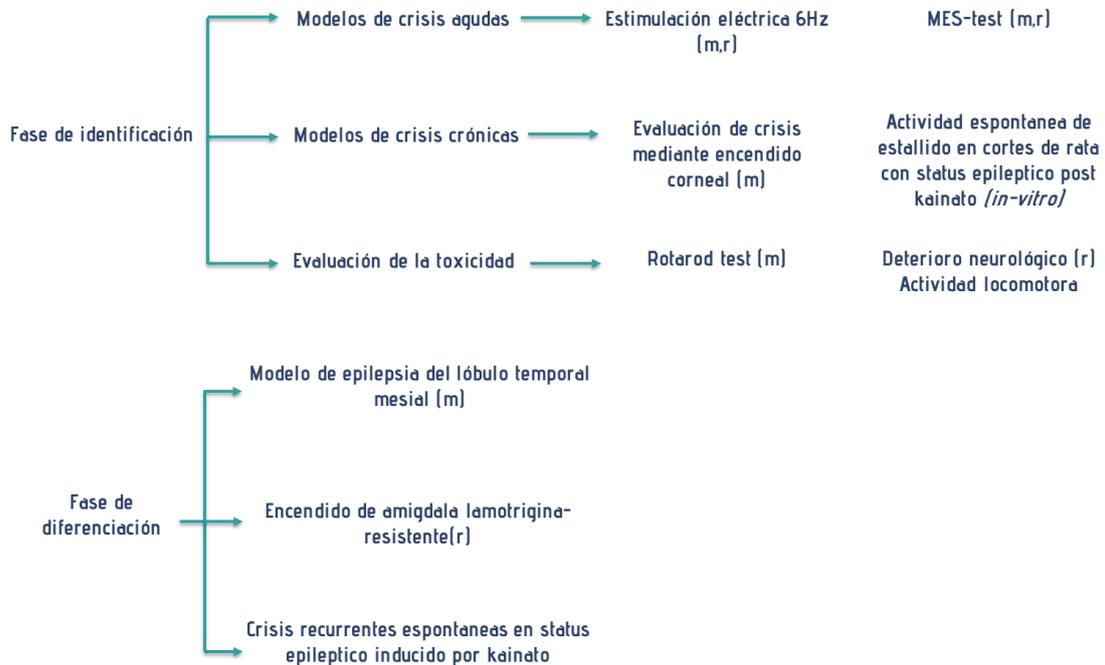


Figura 5.1.1 Flujo de trabajo del ETSP. Los modelos en ratón están indicados con “m” y los modelos en rata con “r”. Adaptado de Kehne et al., 2017.

5.1.2 Fase de identificación

La evaluación de los compuestos comienza con el empleo de dos modelos de convulsiones agudas en ratones sanos, la prueba MES y la prueba de 6 Hz. Este último es un modelo de inducción eléctrica para convulsiones parciales, que se realiza a una intensidad de corriente de 44 mA. Dado que muchos FACs utilizados en clínica dan negativo el ensayo de 6 Hz (es decir, no logran suprimir las convulsiones inducidas en la evaluación) algunos autores lo consideran como un modelo *in-vivo* de farmacorresistencia (Barton et al., 2001; Löscher, 2016). La inclusión de este ensayo de convulsiones agudas de "alto obstáculo" en la etapa inicial de la fase de identificación tiene como objetivo elevar el umbral para el avance de los compuestos, aumentando así la probabilidad de que se detecten candidatos con una eficacia mejorada en relación con los fármacos existentes (Kehne et al., 2017).



En la descripción del procedimiento experimental del presente capítulo se realizará una explicación más detallada del MES test, utilizado en este trabajo de tesis. Nótese que el ETSP, a diferencia del ASP, no incluye el modelo PTZ en los primeros ensayos del programa. Para evitar la posibilidad de que se pasen por alto compuestos con nuevos mecanismos de acción que no son efectivos en las pruebas MES o 6 Hz 44 mA, pero que puedan tener potencial como agentes anticonvulsivos novedosos, existen opciones de modelos crónicos disponibles en la fase de identificación (Figura 5.1). Estas evaluaciones incluyen: el ensayo de convulsiones generadas por encendido corneal (*Corneal Kindled seizure test*) y un ensayo *in vitro* en el que se produce un estallido eléctrico espontáneo en una porción extraída del cerebro de ratas con epilepsia crónica (generada por exposición previa a kainato). Finalmente, además de la actividad anticonvulsiva, se obtienen evaluaciones *in vivo* de neurotoxicidad mediante Rotarod test (en ratones, Figura 5.1) (Deacon, 2013) y ensayos de actividad locomotora (Ehlers et al., 1982) y deterioro neurológico (en ratas) (Carron et al., 2019), además de las observaciones generales del comportamiento de los animales (Kehne et al., 2017) (Figura 5.1). En la descripción del procedimiento experimental del presente capítulo se explicará en más detalle el test de Rotarod, utilizado en este trabajo de tesis.

La cuantificación de la actividad anticonvulsiva es determinada en ratones a través de diferentes parámetros. En particular, el valor de la dosis efectiva media (o dosis efectiva 50, DE50) es un valor muy utilizado para describir la potencia de los nuevos compuestos con acción anticonvulsiva. De manera similar, se utiliza la dosis tóxica media (DT50), para cuantificar la toxicidad. Estos parámetros constituyen la primera cuantificación preclínica de la capacidad anticonvulsiva de un compuesto para un determinado tipo de convulsión en humanos. Además, al ser cuantitativo, permite una comparación válida de potencias anticonvulsivas e índices terapéuticos entre compuestos nuevos y drogas antiepilépticas ya establecidas. Para los cálculos de ED50 (o TD50) previamente debe determinarse el tiempo de efecto máximo (TEM) para cada prueba (Finney, 1952). En resumen, en la etapa de identificación se determina la dosis efectiva media (DE50), el tiempo de efecto máximo (TEM), el tiempo de toxicidad máxima (TTM) y la dosis tóxica media (DT50) en el test de Rotorod. Las DE50 y DT50 se utilizan para estimar el Índice de Protección definido como $IP = DE50/DT50$ (Enrique, 2016).

5.1.3 Fase de diferenciación

Los compuestos que superan la fase de identificación pasan a la fase de diferenciación. En esta fase se utilizan modelos crónicos de crisis. Estos modelos se obtienen mediante diferentes métodos de estimulación química o eléctrica, tienen las ventajas de replicar numerosos aspectos clínicos de la epilepsia y proporcionan una mayor caracterización de la actividad anticonvulsiva de los compuestos de prueba. Todos los modelos de esta etapa son considerados modelos de farmacoresistencia, por lo que comprenden un “filtro” más refinado en la búsqueda de nuevos fármacos de eficacia superior y capaces de sortear fenómenos de farmacoresistencia. Como se indica en el diagrama de flujo de **ETSP** (Figura 5.1) esta etapa consta actualmente de tres ensayos, uno en ratones y dos en ratas, los cuales se enumeran a continuación:

- Modelo de kainato intrahipocampal de epilepsia del lóbulo temporal mesial (ELT) en ratones (**Bouilleret et al., 1999; Duveau et al., 2016**).
- Modelo de encendido de amígdala resistente a Lamotrigina en ratas (**Srivastava et al., 2013; Srivastava & White, 2013**).
- Modelo de epilepsia crónica en ratas, desarrollado mediante la inducción de *status epileptico* por Kainato (**Grabenstatter et al., 2007**).

Finalmente, un hito importante para el ETSP ha sido el lanzamiento de una base de datos de acceso público denominada PANACHE (acceso público a evaluaciones químicas neuroactivas y anticonvulsivas; <http://panache.ninds.nih.gov>) (**Kehne et al., 2017**), el cual proporciona información detallada sobre pruebas, procedimientos y diagramas de flujo utilizados por la ETSP, tanto en la actualidad como históricamente. Además, proporciona un repositorio de información no confidencial relacionada con la actividad anticonvulsiva de compuestos probados en el programa.

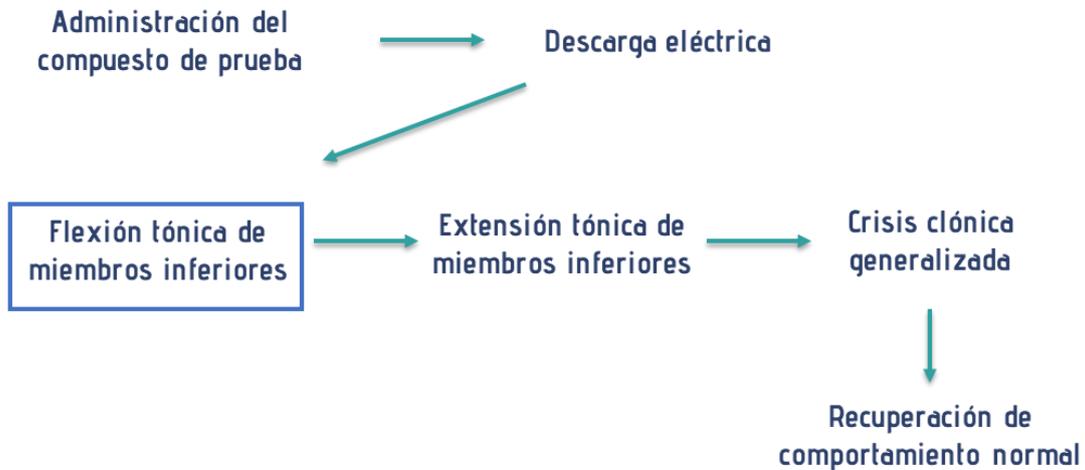
A continuación, se detallan los modelos utilizados para la determinación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica de los compuestos sintetizados en esta tesis.



5.1.4 Modelo de Maximal Electroshock Seizure (MES)

El modelo MES es un modelo agudo desarrollado hace más de 70 años, a través del cual puede predecirse la actividad de aquellos compuestos capaces de prevenir crisis del tipo tónico-clónico generalizadas (**Toman et al., 1946**), donde las convulsiones tónicas se caracterizan por la rigidez e hipertonia en los miembros y las convulsiones clónicas por movimientos rápidos en forma de sacudidas.

En el MES-test se induce el episodio convulsivo mediante la aplicación de una descarga eléctrica controlada a animales sanos. En roedores este estímulo genera un cuadro convulsivo que consta de 3 fases: un período corto de flexión tónica de los miembros posteriores (de unos 3 segundos de duración), seguida de un período prolongado de extensión tónica y, finalmente, un episodio clónico. Se considera que un compuesto es efectivo en este modelo cuando es capaz de suprimir la etapa de extensión tónica. Los FACs que actúan a través de la modulación de canales de sodio operados por voltaje, como la Fenitoína, dan positivo en este ensayo. Sin embargo, debe aclararse que este no es el único mecanismo de acción de los compuestos activos en MES test, pues la actividad puede originarse también mediante la modulación de otros blancos moleculares implicados en la generación de las crisis, como los canales activados por potasio o los receptores NMDA o AMPA (**Bialer & White, 2010**). Este modelo ofrece ciertas ventajas, entre las que podemos destacar la observación clara del punto final del experimento y la demostrada correlación que existe entre la actividad de un fármaco en MES-test en roedores y la capacidad de ser efectivo en crisis tónico-clónicas generalizadas en humanos (**Kandratavicius et al., 2014**).



Esquema 5.1.4.1 Ensayo MES. Fases/estadios que atraviesa un animal luego de la descarga eléctrica. Un compuesto se considera inactivo en este ensayo si sigue el proceso desde la administración hasta la recuperación del animal pasando por las 3 fases de crisis. Para considerar un compuesto como activo es necesario que el proceso no avance más allá de la flexión tónica de miembros inferiores inicial (recuadro azul, Esquema 5.1.4.1), es decir, no presentar la extensión tónica de los miembros inferiores. Además, para compuestos activos el episodio de flexión tónica inicial podría no ocurrir.

5.1.5 Ensayo de Rotorod

El ensayo de Rotorod se encuentra en la primera etapa del ETSP y permite una primera evaluación de la toxicidad del compuesto a testear a partir de su efecto sobre la función motora (evidenciada como sedación o ataxia) (**Dunham & Miya, 1957**). El procedimiento implica el uso de un cilindro estriado con compartimentos separados donde se ubica al animal, y se lo hace girar sobre su eje axial (Figura 5.1.5.1). En el ensayo clásico el cilindro rota a una velocidad de 6 rpm. Si luego de administrado el candidato a ensayar el animal mantiene su equilibrio sin caídas durante un período de 1 minuto, puede concluirse que no existe toxicidad asociada. Por el contrario, si el animal no puede mantener el equilibrio sobre el rodillo, al cabo de tres caídas se considera que el compuesto ensayado presenta rasgos de toxicidad (**Deacon, 2013**).

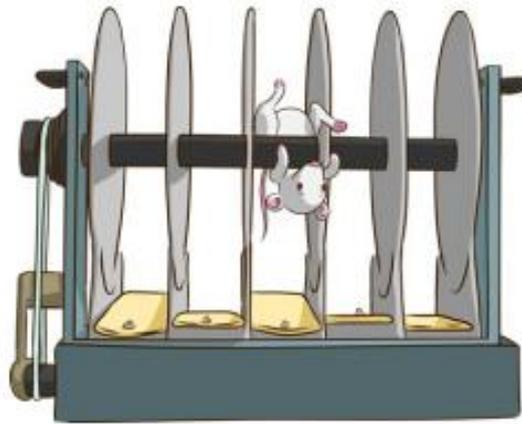


Figura 5.1.5.1 Representación esquemática de la prueba Rotarod test. Tomado de <https://imgur.com/gallery/44vStxD>.

5.2 Evaluación de la Actividad Anticonvulsiva de los compuestos sintetizados

El descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica depende de la elección de modelos biológicos apropiados, definidos en la etapa inicial de diseño de acuerdo con el tipo de acción buscada. La evaluación de la actividad anticonvulsiva de los compuestos sintetizados se realizó mediante el ensayo MES test y la toxicidad asociada a los mismos por el test Rotarod. Estos estudios implican el manejo de animales de laboratorio y estuvieron a cargo de la Dra. Maria Laura Sbaraglini, la Lic. Emilia Barrionuevo y la Lic. Estefanía Peralta, pertenecientes al LIDeB. Durante esta etapa se siguieron los lineamientos propuestos por el NIH en cuanto al cuidado y manejo de animales de experimentación (**National Research Council (U.S.) et al., 2011**) .

En este trabajo de tesis además de los ensayos *in vivo* que se mencionan previamente en este capítulo, una serie de compuestos fueron evaluados en ensayos *in vitro* para analizar la capacidad inhibitoria frente a un blanco molecular específico, los canales de sodio hNav 1.2 voltaje operados. Esta tarea fue realizada por los Dres Nicolas Enrique y Pedro Martin, pertenecientes al Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP-UNLP-CONICET).

5.2.1 Procedimiento experimental

5.2.1.1 Animales de laboratorio

Para la evaluación de las moléculas sintetizadas frente al ensayo MES descrito anteriormente, se utilizaron ratones albinos Swiss y/o Balb/c adultos de entre 18-23 g de peso. Se eligieron animales machos de la misma edad y similar peso en cada ensayo para minimizar la variabilidad biológica. Los animales de experimentación fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP) y mantenidos en el bioterio de experimentación del LIDeB de la Facultad de Ciencias Exactas de la misma Universidad (FCE-UNLP) en una habitación exclusiva para el acondicionamiento de ratones ubicada en forma contigua a



la sala de ensayos biológicos. A los animales recién recibidos se les permitió estabilizarse durante un periodo de al menos 72 horas antes de destinarlos a algún experimento de manera de compensar las restricciones de alimentación y el estrés asociado al traslado. Se mantuvieron en jaulas colectivas de hasta 7 individuos, con alimento balanceado y agua *ad libitum*, bajo un régimen de ciclos día-noche de 12 horas y 22 +/- 2°C. En el momento de realizar los ensayos, los ratones se colocaron en compartimientos individuales hasta la finalización de los mismos. Una vez concluido el experimento, los animales retornaron a las jaulas colectivas y cada lote de animales correspondiente a cada ensayo se mantuvo en observación durante 72 horas, a fin de detectar posibles efectos tóxicos a largo plazo.

5.2.1.2 Preparación y administración de los compuestos para los ensayos *in vivo*

Para una correcta evaluación de los compuestos, estos deben administrarse en solución, suspensión o emulsión homogénea. Los compuestos ensayados en este trabajo se solubilizaron utilizando mezclas de PEG 400 y solución fisiológica. En los casos en que estas mezclas de solventes no funcionaron, los compuestos se evaluaron en Dimetilsulfoxido (DMSO) (**Jacob & Rosenbaum, 1966**), trabajando a dosis considerablemente por debajo de las dosis tóxicas para este solvente y realizando los controles correspondientes para el vehículo. Para favorecer la disolución, en los casos que fue necesario, se utilizó ultrasonido y cuando no fue posible la obtención de una solución límpida, se calentó a 37 °C. Respecto a la administración de los compuestos a ensayar, se utilizó la vía intraperitoneal (i.p), utilizada generalmente en esta etapa de identificación de agentes anticonvulsivos. Los máximos utilizados para cada vehículo fueron: 10 mL/kg para la solución fisiológica, 2 mL/Kg para PEG 400, y 2 mL/Kg para el DMSO Para la administración se sujetó al animal cuidadosamente orientando su abdomen hacia arriba y, formando un ángulo de aproximadamente 30° con la aguja, se administró entre uno de los miembros posteriores y la línea media del cuerpo del animal. Mediante esta técnica se busca que el compuesto administrado ingrese a la cavidad abdominal para alcanzar rápidamente el torrente sanguíneo.

5.2.1.3 MES-test

Para la realización de este ensayo nuestro laboratorio cuenta con un equipo Ugo Basile (Biological Research Apparatus, Varese, Italia), uno de los modelos de aparatos de electroshock internacionalmente usados en las pruebas MES-test (**Löscher, 2011**). La descarga eléctrica llega al animal a través de electrodos, que pueden ser corneales o auriculares. En este trabajo se utilizaron electrodos auriculares que se humedecieron con un gel de conducción en la zona de contacto para favorecer la conducción eléctrica. Los parámetros establecidos para este ensayo son: una corriente de 50 mA, con una frecuencia de 60 Hz, durante 0,2 segundos y con un ancho de pulso de 28 milisegundos. Con estas magnitudes se obtiene un tren de ondas rectangulares correspondientes a un estímulo aplicado 4-5 veces mayor que el necesario para llegar al umbral de convulsión (**Castel-Branco et al., 2009**). Como establece el protocolo de identificación, se determinó la respuesta a dos tiempos distintos después de administrado el compuesto, 0,5 y 4 horas y a las dosis de 30 y 100 mg/Kg. Estos datos de actividad son lo que se denomina “perfil de actividad anticonvulsiva”; ensayando a dos dosis y tiempos distintos puede obtenerse una primera aproximación en cuanto a las condiciones en que los compuestos muestran protección, como así también indicios sobre toxicidad asociada.

Inicialmente se administró el compuesto en el ratón y, al tiempo estipulado en el ensayo, se produjo el estímulo eléctrico. Se observó el comportamiento del animal y se determinó la capacidad del candidato administrado de prevenir la descarga convulsiva. Los criterios utilizados son los siguientes: - Se clasificó al compuesto ensayado como activo en MES-test cuando no se observaron manifestaciones de extensión tónica luego de la descarga eléctrica (Esquema 5.1.4.1). - Se clasificó al compuesto ensayado como inactivo en MES-test cuando los animales presentaron extensión tónica y/o un episodio clónico. Los resultados se expresaron como: número de animales protegidos / número de animales ensayados. En cada ensayo se seleccionó un conjunto de animales a los cuales se les administró 15 mg/ Kg de ratón en Fenitoína (ED50: 5.6 mg/Kg (4.7–6.5), TEM 2 h (**Bialer et al., 2004**)) y se evaluó como control de protección a 2 horas de administrado. Además, a otro conjunto de animales se les administró sólo el vehículo



utilizado para las determinaciones, y fue utilizado como grupo control negativo de protección ensayando con descarga eléctrica a 0,5 y 4 horas.

5.2.1.4 Ensayo Rotorod

Luego de la administración de los compuestos a evaluar y antes de cada ensayo MES los animales se colocaron sobre un cilindro estriado de 1 pulgada de diámetro que gira a 6 rpm. Se concluye la existencia de algún déficit neurológico (expresado por ataxia, sedación o hiperexcitabilidad) cuando el animal es incapaz de sostener el equilibrio en el rodillo durante al menos 1 minuto. Los resultados de esta prueba están expresados como cantidad de animales con signos de neurotoxicidad/cantidad de animales ensayados para cada evaluación de actividad anticonvulsiva.

5.2.2 Resultados de la evaluación de los compuestos sintetizados

En la Tabla 5.2.2.1 se muestran los resultados obtenidos mediante la evaluación biológica frente a los ensayos MES-test y Rotorod de los compuestos multiobjetivo derivados de VPA con conector oximetilo, sintetizados en esta tesis. Los compuestos 1, 2 y 3 no fueron incluidos debido a que no pasaron la prueba de neurotoxicidad inicial (test de Rotorod posterior a la administración del compuesto) y por lo tanto no fueron evaluados en el modelo de convulsiones.

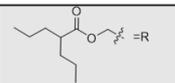
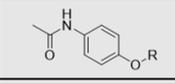
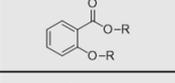
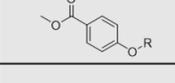
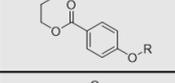
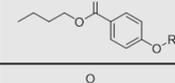
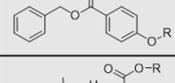
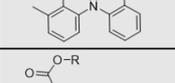
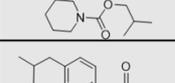
	Código	cc mg/Kg	Mes-test 0,5 h.	Mes-test 4 h.	Rotorod 0,5 h. y 4 h.	
	4	30 100	0/4 0/2	1/2 1/2	0/4 0/2	0/2 0/2
	5	30 100	0/2 0/2	0/2 2/2	0/2 0/2	0/2 0/2
	7	30 100	0/2 0/2	0/2 1/2	0/2 0/2	0/2 0/2
	8	30 100	0/2 0/2	0/2 1/2	0/2 0/2	0/2 0/2
	9	30 100	0/2 2/4	3/4 3/4	0/2 0/4	0/4 0/4
	10	30 100	0/2 0/2	0/2 1/2	0/2 0/2	0/2 0/2
	11	30 100	0/3 1/2	0/3 1/2	0/3 0/2	0/3 0/2
	12	30 100	1/2 0/2	1/2 1/2	0/2 0/2	0/2 0/2
	13	30 100	1/2 1/2	0/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2

Tabla 5.2.2.1 Evaluación farmacológica de moléculas multiobjetivo derivadas de VPA.

Como se observa en la Tabla 5.2.2.1 todos los compuestos ensayados mostraron actividad anticonvulsiva en la prueba MES en alguna de las dosis empleadas, sin signos de neurotoxicidad detectada por Rotorod. Se observa además, en líneas generales, una mayor protección luego de 4 horas de administración (con excepción de los compuestos 11 y 13).



De manera similar, en la Tabla 5.2.2.2 se muestran los resultados de actividad y neurotoxicidad de las 4-hidroxibenzamidas sintetizadas en este trabajo. Todos los compuestos ensayados mostraron actividad anticonvulsiva en alguna de las dosis empleadas y, ninguno de los animales presentó signos de neurotoxicidad en el Rotorod test. Cabe destacar que la mayoría de las 4-hidroxibenzamidas mostraron protección a la dosis más baja ensayada (30 mg/kg). El compuesto 17 no pudo ser evaluado debido a su baja solubilidad. Como se mencionó en el capítulo 3, estos compuestos pueden pensarse como el resultado del reemplazo bioisostérico de los parabenos, fragmentos activos complementarios al VPA, utilizados para la preparación de compuestos multiobjetivo. Los signos de actividad anticonvulsiva encontrados para las 4-hidroxibenzamidas justifican un mayor estudio en lo que refiere a su mecanismo de acción. Dado que se ha demostrado que los parabenos presentan acción bloqueante de los canales de sodio operados por voltaje (isoforma hNav1.2) (Enrique et. al., 2020), este fue el blanco molecular elegido para el estudio de la actividad de las 4-hidroxibenzamidas (compuestos 15, 18 y 19). Los resultados se muestran hacia el final del presente capítulo (Sección 5.3 Estudios in vitro sobre el canal de sodio).

	Código	cc mg/Kg	Mes-test 0,5 h.	Mes-test 4 h.	Rotorod 0,5 h. y 4 h.	
	15	30 100	2/4 0/2	0/2 1/2	0/4 0/2	0/2 0/2
	16	30 100	0/2 0/4	0/2 1/4	0/2 0/4	0/2 0/4
	18	30 100	1/4 0/2	0/4 0/2	0/4 0/2	0/4 0/2
	19	30 100	1/4 0/2	0/2 -	0/2 0/2	0/2 -

Tabla 5.2.2.2 Resultados del MES-test de 4-hidroxibenzamidas.

En lo que refiere al estudio de la potencia de los compuestos, debe recordarse que es necesario realizar la cuantificación de la actividad anticonvulsiva (por ejemplo, mediante la determinación de la DE50), lo cual requiere del uso de un mayor número de animales de experimentación. Es por esto que sólo se avanzó con aquel compuesto que mostró el perfil más promisorio. Esta elección no implica descartar a los demás compuestos en

estudio, ya que en estos primeros experimentos sólo estamos determinando a grandes rasgos si las moléculas objetivo presentan o no actividad en el test de prueba.

A partir de la información obtenida de los perfiles de actividad anticonvulsiva y neurotóxica se seleccionó al compuesto 9 para la cuantificación de su actividad, ya que el mismo mostró un buen perfil de actividad, protegiendo de las crisis convulsivas al 75% de los animales cuando se lo evaluó a 4 horas tanto a 30 mg/Kg como a 100 mg/kg. Además, cuando se ensayó al compuesto a media hora de administrado y a 100 mg/kg de concentración se observó un 50% de protección de los animales testeados.

5.2.3 Cuantificación de la actividad anticonvulsiva: Tiempo de efecto máximo (TEM)

Para la medida del tiempo de efecto máximo del compuesto 9 se evaluó la actividad frente a MES test a distintos tiempos (30, 120, 240 y 480 minutos) y a una concentración fija. Se utilizó el valor de 100 mg/kg, ya que en el perfil preliminar se observó una marcada protección a dicha concentración (Tabla 5.2.3.1). Se emplearon de 3 a 6 animales por tiempo evaluado. Los resultados se muestran en la Tabla 3, donde se observa una mayor protección a 6 y 8 horas luego de la administración. Por lo tanto, se definió un tiempo de efecto máximo para el cálculo de la DE50 de 6 hs.

Código	Dosis	Tiempo	Protección	Rotorod
9	100 mg/Kg	0,5 h.	1/4	0/4
9	100 mg/Kg	2 h.	3/4	0/4
9	100 mg/Kg	4 h.	1/4	0/4
9	100 mg/Kg	6 h.	4/4	0/4
9	100 mg/Kg	8 h.	4/4	0/4

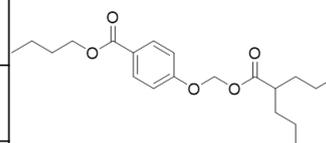


Tabla 5.2.3.1 Resultados del MES-test para el cálculo del tiempo de efecto máximo (TEM) del compuesto 9.



5.2.4 Cuantificación de la actividad anticonvulsiva: Dosis efectiva media (DE50)

Para el cálculo de DE50 se realizó el análisis de los resultados de la evaluación del compuesto 9 a 5 dosis distintas y al TEM determinado previamente. Se utilizaron grupos de 5 ratones por dosis ensayando a 0,1 , 1, 15, 30 y 50 mg/Kg (Tabla 5.2.4.1). Los resultados obtenidos recibieron el tratamiento estadístico del método de Litchfield y Wilcoxon (**Litchfield & Wilcoxon, 1949**) obteniendo un valor de DE50= 8,265 mg/kg (0,0236 mmol/kg) $IC_{95\%}=0,0201-33,86$ mg/kg. Este valor resulta muy prometedor ya que supera ampliamente la dosis encontrada para el VPA (1,824 mmol/Kg), como se discutirá en el capítulo siguiente.

Código	Dosis	Tiempo	Protección	Rotorod
9	0,1 mg/Kg	6 h.	3/5	0/5
9	1 mg/Kg	6 h.	2/5	0/5
9	15 mg/Kg	6 h.	4/5	0/5
9	30 mg/Kg	6 h.	5/5	0/5
9	50 mg/Kg	6 h.	4/5	0/5

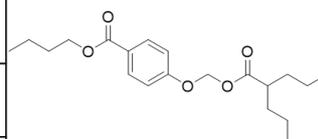


Tabla 5.2.4.1 Datos experimentales obtenidos en el MES-test para el cálculo de ED50. Se incluye también la prueba de Rotorod realizada para cada concentración.

5.3 Estudios *in vitro* sobre el canal de sodio

5.3.1 Introducción

La actividad eléctrica a nivel biológico es el resultado de la separación y el movimiento de partículas con carga, las cuales se encuentran separadas por una membrana lipídica. El movimiento de cargas a través de la membrana requiere de una fuerza impulsora, y un camino para el flujo de corriente. Esta ruta suele ser un canal de iones y la facilidad con que la carga se mueve a través del canal está relacionada con la resistencia del mismo por la ley de Ohm ($I=V.R$) (Kornreich, 2007). Mediante la técnica de *patch clamp* es posible registrar las corrientes transmembrana que se generan a través de dichos canales a un potencial invariante, así como cambios en el potencial de membrana celular frente a un estímulo fijo de corriente. En el primer caso el experimento se denomina *voltage-clamp*, mientras que en el segundo *current-clamp* (Sakmann & Neher, 1984). Para este trabajo de tesis se utilizó la variante de *voltage-clamp*, la más comúnmente utilizada para el estudio de canales iónicos.

El experimento consiste en presionar una micropipeta de vidrio contra la membrana celular mediante el uso de un micromanipulador, con el fin de lograr un sello eléctrico de alta resistencia (del orden de 10 G Ω), de modo que la corriente generada en el interior de la pipeta pueda ser medida en un circuito de registro. Este circuito, necesario para mantener una diferencia de potencial constante y a la vez medir la corriente, está formado por un electrodo de plata recubierto de una capa de cloruro de plata ubicado en el interior de la pipeta y otro localizado en la solución que contiene a las células. En el instante que la micropipeta toca la membrana celular se observa un aumento de la resistencia, en comparación con la observada cuando la corriente fluye entre ambos electrodos (Sakmann & Neher, 1984). En ese momento se construye el sello mediante una succión suave, generando una configuración de registro denominada *cell-attached* (CA). A partir de esta configuración pueden lograrse otras, denominadas *whole-cell* (WC), *inside-out* (IO) u *outside-out* (OO), las cuales presentan diferencias en la región en



contacto con la solución de la micropipeta o en la capacidad de mantener la integridad celular (Kornreich, 2007). En esta investigación se utilizó la configuración WC, lo que permitió registrar las corrientes de la totalidad de los canales expresados en la membrana celular (Figura 5.3.1.1). Para lograr dicha configuración se realiza una nueva succión, de modo de eliminar la porción de membrana ubicada sobre la pipeta.

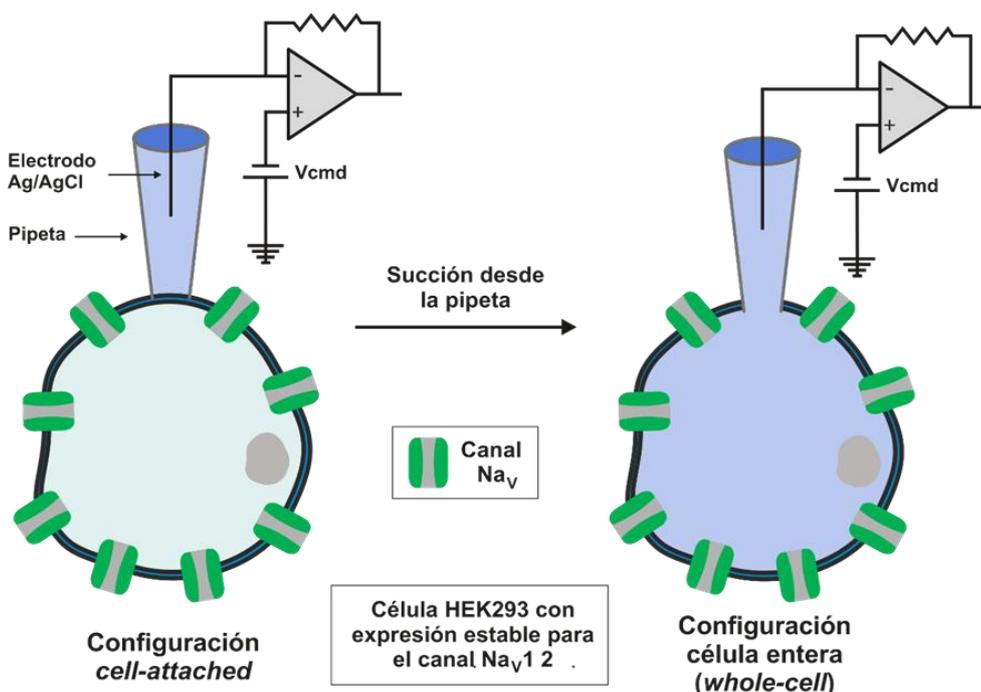


Figura 5.3.1.1 Generación de la configuración de *patch clamp* (*whole-cell*) utilizada en este trabajo de tesis.

5.3.2 Procedimiento experimental

La capacidad de los compuestos para interactuar con hNaV1.2 fue evaluada mediante el análisis de su efecto sobre las corrientes en dicho canal, expresado en forma heteróloga estable en células HEK 293 (provistas por la empresa GlaxoSmithKline, Stevenage, Reino Unido). Las células se cultivaron en un medio esencial mínimo (DMEM), que contiene 10% de Suero Fetal Bovino (SFB GIBCO Thermofisher) y 0,5% de sulfato de geneticina G418 (Santa Cruz), en atmósfera de O_2 al 95% / CO_2 al 5%, a 37 °C y con una humedad del 95%. Las células se separaron utilizando TrypLE (GIBCO Thermofisher). Un volumen apropiado de suspensión de células se añadió a un tubo cónico y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en

5 mL de solución extracelular. Inmediatamente antes de los registros electrofisiológicos, se permitió que las células se asentaran en el fondo del cubreobjetos de una cámara experimental. Los datos se recopilaron dentro de 4 a 6 horas después del aislamiento celular y fueron observados mediante un microscopio invertido (Zeiss) equipado con un lente objetivo 40X y estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria (Newport) recubierto con una caja de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente. Después de cada experimento, sobre una sola célula, la cámara experimental fue reemplazada por otra que contiene una nueva muestra de células. Se utilizaron pipetas de vidrio WPI PG52165-4 las cuales se adaptaron a un micromanipulador. La resistencia de dichas pipetas fue entre 1,5 y 2 M Ω . Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (~ 22 °C). La señal de corriente iónica se registró en función del tiempo con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA), filtradas adecuadamente con un filtro de tipo Bessel de 8 polos a una frecuencia de 2 kHz y se digitalizo con una frecuencia de muestreo de 200 kHz con el equipamiento apropiado (Digidata 1400 Axon Instruments, Foster City, CA). Se utilizó el paquete de software pClamp 10 para el registro y análisis de las corrientes iónicas (Clampex 10 y Clampfit 10, Molecular Devices LLC).

Las células se colocaron en una cámara de registro y se perfundieron con solución extracelular que contiene (en mM): NaCl, 140; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; HEPES, 10; glucosa, 11. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH. Los electrodos se llenaron con solución intracelular, de composición (en mM): CsF, 100; CsCl, 40; EGTA, 10; HEPES, 10; NaCl, 5; MgCl₂, 2; Na₂ATP, 4; el pH se ajustó a 7,3 con CsOH. Los compuestos a evaluar se incorporaron disueltos en solución de DMSO al 0,1 %.

Como se mencionó anteriormente, se utilizó la configuración WC para el registro de las corrientes. La estabilidad del sistema fue monitoreada mediante la aplicación de pasos sucesivos de voltaje de 10 ms (desde un potencial de mantenimiento de -80 mV a un potencial de prueba de -20 mV), descartando células en las que la amplitud de corriente máxima no permaneció constante en el tiempo. Después de lograr estabilización de la



corriente (~10 minutos), se aplicó el protocolo de voltaje que se encuentra validado previamente en literatura (Qiao et al., 2014) y se detalla a continuación.

5.3.3 Protocolo de evaluación: Curvas de inactivación de estado estacionario (curva h).

El registro de la curva h consiste en un doble protocolo de voltaje. Partiendo de un potencial de mantenimiento de -80mV, se aplica una serie de pulsos pre-condicionantes durante 2500 ms que cubren un voltaje desde -130 mV hasta -40 mV, en saltos de 10 mV, cada uno seguido de un pulso test de 25 ms a -10 mV . Este último valor de voltaje asegura que la corriente de sodio tenga su máxima activación en estas células (Figura 5.3.3.1). Posteriormente se grafica el valor del pico de corriente que se genera por estímulo del pulso test (normalizado por el valor máximo de corriente) en función del voltaje del pulso pre-condicionante. Esta curva permite conocer la fracción de canales disponibles a cada valor de potencial estudiado y puede ajustarse con una ecuación de tipo Boltzmann .

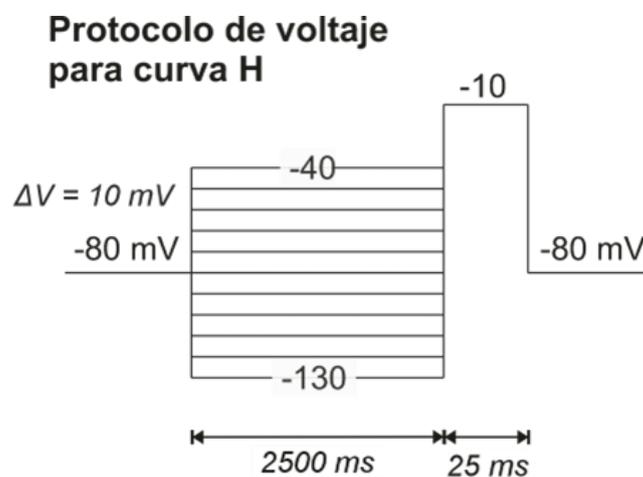


Figura 5.3.3.1. Protocolo de voltaje utilizado para la construcción de las curvas h.

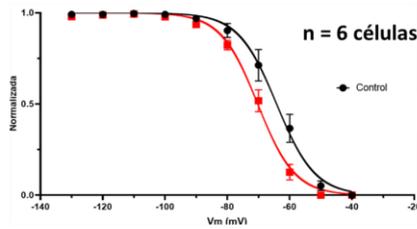
Una característica interesante de los canales de sodio es que poseen al menos tres estados funcionales: cerrado, abierto e inactivado (Mantegazza et al., 2010). Mediante cambios conformacionales, esta macroestructura pasa de un estado cerrado a uno abierto (luego de un proceso de despolarización de la membrana celular), permitiendo el ingreso de iones sodio a la célula en favor de su gradiente. Luego de este evento, el

canal queda en un estado abierto no conductor, denominado inactivado. En el estado inactivado el canal no es capaz de responder rápidamente a una nueva despolarización de la membrana, es decir, presenta una refractariedad a nuevos estímulos que le permiten regular la frecuencia de disparos de los potenciales de acción **(Mantegazza et al., 2001)**.

Los bloqueantes de canales de sodio actúan en su mayoría mediante la estabilización del estado inactivado. Debido a que en condiciones patológicas el canal adopta este estado con mayor frecuencia, los fármacos bloqueantes adquieren selectividad funcional y por lo tanto una mayor seguridad terapéutica **(Rogawski & Löscher, 2004)**. El corrimiento de la curva *h* hacia potenciales más negativos es un efecto detectado en los FACs conocidos que tienen afinidad por el estado inactivado del canal (y que estabilizan el mismo), por lo que resulta interesante observar si existe dicho comportamiento en los compuestos estudiados. Otro parámetro relacionado es el valor $V_{1/2}$, que representa el valor de potencial en el cual el 50% de los canales de sodio están disponibles para ser activados.

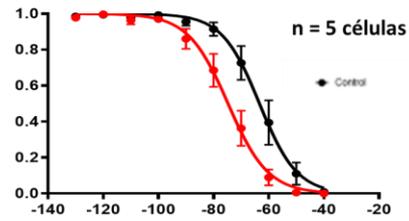
5.3.4 Resultados de la evaluación de los compuestos sintetizados

La Figura 5.3.4.1 muestra los resultados obtenidos para las 4-hidroxibenzamidas ensayadas. Se observa que todas ellas son capaces de desplazar la curva *h* a potenciales más hiperpolarizados, cambiando en forma significativa el valor de $V_{1/2}$ respecto a las células control. Estos datos resultan interesantes, ya que muestran que las estructuras son capaces de generar un bloqueo dependiente del estado del canal, característica previamente mencionada para muchos FACs que actúan mediante el bloqueo de NaV1.2 **(Rogawski & Löscher, 2004)**. Por lo tanto, los resultados sugieren que el bloqueo de dicho blanco molecular podría explicar, al menos en parte, el efecto anticonvulsivo observado *in vivo* para las 4-hidroxibenzamidas ensayadas.



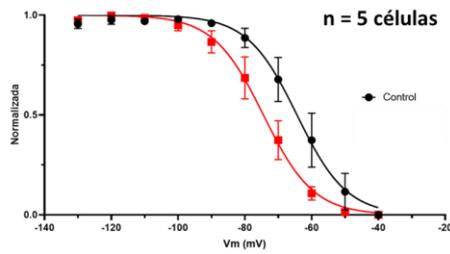
N-Bencil-4-hydroxibenzamida (15)
Corrimiento de V1/2 **significativo**

Control	100 uM	Delta V1/2
-64.20	-70.24	-6.04



N-Propil-4-hydroxibenzamida (18)
Corrimiento de V1/2 **significativo**

Control	100 uM	Delta V1/2
-63.32	-74.72	-11.40



N-Butil-4-hydroxibenzamida (19)
Corrimiento de V1/2 **significativo**

Control	100 uM	Delta V1/2
-64.20	-70.24	-6.04

Figura 5.3.4.1. Efecto de los compuestos sobre el estado estacionario en canales NaV1.2. Se muestran las curvas h obtenidas para las condiciones control y luego de perfundir las estructuras a la concentración de 100 μ M.

5.4 Referencias

Barton, M. E., Klein, B. D., Wolf, H. H., & Steve White, H. (2001). Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research*, 47(3), 217-227. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(01\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(01)00302-3)

Bialer, M., Twyman, R. E., & White, H. S. (2004). Correlation analysis between anticonvulsant ED50 values of antiepileptic drugs in mice and rats and their therapeutic doses and plasma levels. *Epilepsy & Behavior*, 5(6), 866-872. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.08.021>

Bialer, M., & White, H. S. (2010). Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(1), 68-82. <https://doi.org/10.1038/nrd2997>

Bouilleret, V., Ridoux, V., Depaulis, A., Marescaux, C., Nehlig, A., & Le Gal La Salle, G. (1999). Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: Electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 89(3), 717-729. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00401-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00401-1)

Carron, S., Dezsai, G., Ozturk, E., Nithianantharajah, J., & Jones, N. C. (2019). Cognitive deficits in a rat model of temporal lobe epilepsy using touchscreen-based translational tools. *Epilepsia*, 60(8), 1650-1660. <https://doi.org/10.1111/epi.16291>

Castel-Branco, M. M., Alves, G. L., Figueiredo, I. V., Falcao, A. C., & Caramona, M. M. (2009). The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 31(2), 101. <https://doi.org/10.1358/mf.2009.31.2.1338414>

Deacon, R. M. J. (2013). Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 75, 2609. <https://doi.org/10.3791/2609>

Denayer, T., Stöhr, T., & Roy, M. V. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001>

Dunham, N. W., & Miya, T. S. (1957). A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice**College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, 46(3), 208-209. <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>

Duveau, V., Pouyatos, B., Bressand, K., Bouyssières, C., Chabrol, T., Roche, Y., Depaulis, A., & Roucard, C. (2016). Differential Effects of Antiepileptic Drugs on Focal Seizures in the Intrahippocampal Kainate Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 22(6), 497-506. <https://doi.org/10.1111/cns.12523>

Ehlers, C. L., Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1982). Post-ictal locomotor activity in three different rat models of epilepsy. *Brain Research*, 250(1), 178-182. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90966-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90966-0)



Enrique, A. V. (2016). *Desarrollo de un modelo de convulsiones farmacorresistentes en ratones: Evaluación de nuevos fármacos para el control de la farmacorresistencia* [Doctor en Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/58631>

Enrique, A., Martín, P., Sbaraglini, M. L., Talevi, A., & Milesi, V. (2020). Parabens inhibit hNaV 1.2 channels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110250. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110250>

Finney, D. J. (1952). *Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge university press, Cambridge.

Garcia Garcia, M. E., Garcia Morales, I., & Matías Guiu, J. (2010). Modelos experimentales en epilepsia. *Neurología*, 25(3), 181-188. [https://doi.org/10.1016/S0213-4853\(10\)70007-4](https://doi.org/10.1016/S0213-4853(10)70007-4)

Giardina, W. J., & Gasior, M. (2009). Acute Seizure Tests in Epilepsy Research: Electroshock- and Chemical-Induced Convulsions in the Mouse. *Current Protocols in Pharmacology*, 45(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0522s45>

Grabenstatter, H. L., Clark, S., & Dudek, F. E. (2007). Anticonvulsant Effects of Carbamazepine on Spontaneous Seizures in Rats with Kainate-induced Epilepsy: Comparison of Intraperitoneal Injections with Drug-in-food Protocols. *Epilepsia*, 0(0), 070818014144003-???. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01263.x>

Jacob, S. W., & Rosenbaum, E. E. (1966). THE TOXICOLOGY OF DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO). *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 6(3), 127-136. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.1966.hed0603127.x>

Kandratavicius, L., Balista, P., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R., Umeoka, E., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L., & Leite, J. (2014). Animal models of epilepsy: Use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 1693. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>

Kehne, J. H., Klein, B. D., Raeissi, S., & Sharma, S. (2017). The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). *Neurochemical Research*, 42(7), 1894-1903. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2275-z>

Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2007.02.001>

Krall, R. L., Penry, J. K., Kupferberg, H. J., & Swinyard, E. A. (1978). Antiepileptic Drug Development: I. History and a Program for Progress. *Epilepsia*, 19(4), 393-407. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1978.tb04506.x>

Krall, R. L., Penry, J. K., White, B. G., Kupferberg, H. J., & Swinyard, E. A. (1978). Antiepileptic Drug Development: II. Anticonvulsant Drug Screening. *Epilepsia*, 19(4), 409-428. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1978.tb04507.x>

Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20(5), 359-368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>

Löscher, W. (2016). Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Research*, 126, 157-184. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.05.016>

Löscher, W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*, 42(7), 1873-1888. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>

Löscher, W., & Schmidt, D. (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma: Ways Out of the Current Dilemma with New AEDs. *Epilepsia*, 52(4), 657-678. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x>

Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D. S., & Avoli, M. (2010). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 9(4), 413-424. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70059-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70059-4)

Mantegazza, M., Yu, F. H., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15348-15353. <https://doi.org/10.1073/pnas.211563298>

Merritt, H. H. (1938). SODIUM DIPHENYL HYDANTOINATE IN THE TREATMENT OF CONVULSIVE DISORDERS. *Journal of the American Medical Association*, 111(12), 1068. <https://doi.org/10.1001/jama.1938.02790380010004>

National Research Council (U.S.), Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), & National Academies Press (U.S.) (Eds.). (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed). National Academies Press.

Putnam, T. J., & Merritt, H. H. (1937). Experimental Determination of the Anticonvulsant Properties of Some Phenyl Derivatives. *Science*, 85(2213), 525-526. <https://doi.org/10.1126/science.85.2213.525>

Qiao, X., Sun, G., Clare, J. J., Werkman, T. R., & Wadman, W. J. (2014). Properties of human brain sodium channel α -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine: Properties of brain Na channel α -subunits. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 1054-1067. <https://doi.org/10.1111/bph.12534>

Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553-564. <https://doi.org/10.1038/nrn1430>

Sakmann, B., & Neher, E. (1984). Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Annual Review of Physiology*, 46(1), 455-472. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.46.030184.002323>

Socała, K., & Wlaź, P. (2021). Acute Seizure Tests Used in Epilepsy Research: Step-by-Step Protocol of the Maximal Electroshock Seizure (MES) Test, the Maximal Electroshock Seizure Threshold (MEST) Test, and the Pentylentetrazole (PTZ)-Induced Seizure Test in Rodents. En D. Vohora (Ed.), *Experimental and Translational Methods to Screen Drugs Effective Against Seizures and Epilepsy* (Vol. 167, pp. 79-102). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1254-5_5



Srivastava, A. K., Alex, A. B., Wilcox, K. S., & White, H. S. (2013). Rapid loss of efficacy to the antiseizure drugs lamotrigine and carbamazepine: A novel experimental model of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsia*, 54(7), 1186-1194. <https://doi.org/10.1111/epi.12234>

Srivastava, A. K., & White, H. S. (2013). Carbamazepine, but not valproate, displays pharmaco-resistance in lamotrigine-resistant amygdala kindled rats. *Epilepsy Research*, 104(1-2), 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.10.003>

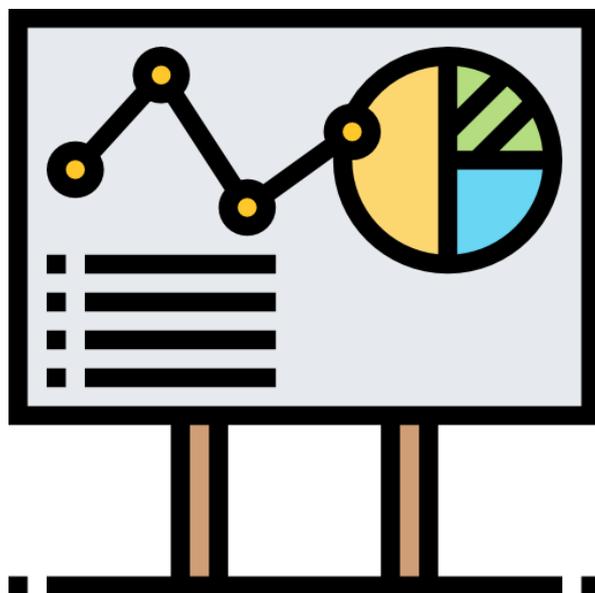
Swinyard, E. A., Brown, W. C., & Goodman, L. S. (1952). Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 106(3), 319-330.

Toman, J. E. P., Swinyard, E. A., & Goodman, L. S. (1946). PROPERTIES OF MAXIMAL SEIZURES, AND THEIR ALTERATION BY ANTICONVULSANT DRUGS AND OTHER AGENTS. *Journal of Neurophysiology*, 9(3), 231-239. <https://doi.org/10.1152/jn.1946.9.3.231>

Van der Staay, F. J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, 52(1), 131-159. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.01.006>

Capítulo 6

Análisis de resultados, conclusiones y perspectivas





La Epilepsia es una enfermedad compleja y multifactorial. Su abordaje terapéutico ha implicado principalmente el uso de fármacos anticonvulsivos, los cuales han sido descubiertos en su gran mayoría mediante el empleo de modelos animales de crisis convulsivas (Löschner, 2017). En estos casos, los mecanismos de acción han sido elucidados en forma posterior al descubrimiento de la actividad y en líneas generales se han encontrado más de uno de ellos para explicar el origen de la acción terapéutica (Löschner et al., 2020). En este trabajo de tesis se aplicó el enfoque multiobjetivo para la generación de nuevas estructuras con acción anticonvulsiva de manera racional. Para ello se construyeron moléculas que contienen andamiajes especialmente seleccionados para potenciar la actividad. Las estructuras comparten el fragmento de VPA, un anticonvulsivo clásico que presenta por sí mismo características multiobjetivo para su acción. Por el otro, una segunda molécula que contiene el grupo funcional fenol o ácido carboxílico y algún mecanismo de acción relevante en epilepsia. Finalmente, un grupo conector derivado de formaldehído o acetaldehído, encargado de la unión de ambos fragmentos.

En cuanto a la síntesis química, el primer desafío de este trabajo fue obtener dos intermediarios de síntesis derivados de ácido valproico, que incorporan una función del tipo halogenuro de alquilo que servirá como conector para el segundo fragmento. Específicamente se prepararon el 2-Propilpentanoato de clorometilo y 2-Propilpentanoato de 1-cloroetilo (también denominados Valproato de clorometilo y Valproato de 1-cloroetilo respectivamente) (Figura 6.1), lo cual se logró exitosamente luego de probar diferentes métodos de síntesis y aislamiento.

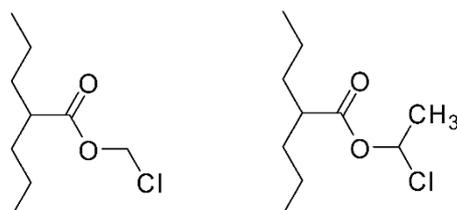
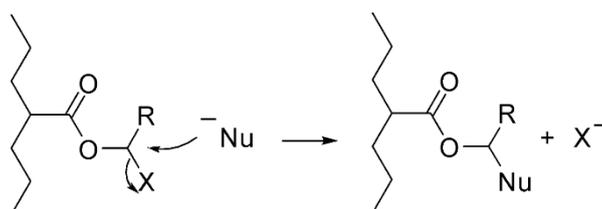


Figura 6.1. Derivados cloro alquil ésteres de VPA preparados en esta investigación.



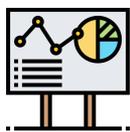
Los rendimientos alcanzados son similares a los reportados en literatura (39% y 38% respectivamente) (**Berkovitch et al., 2008**). Estos intermediarios resultan valiosos ya que pueden dar lugar a un gran número de derivados de VPA, como profármacos y moléculas multiobjetivo, mediante el reemplazo del átomo de halógeno por un grupo nucleofílico (Esquema 6.1) (**Hamada, 2017**). La experiencia adquirida en este trabajo de tesis en la preparación de este tipo de intermediarios con VPA posibilitará continuar trabajando esta línea, con la incorporación de otros fragmentos interesantes para mejorar la acción anticonvulsiva de dicho fármaco, ya sea en cuanto a su potencia o su farmacocinética.



Esquema 6.1 Propuesta de ataque nucleofílico para la generación de derivados de ácido valproico utilizando grupos conectores. R= -H o -CH₃ X= -Cl o -I Nu= Ph-OH o R-COOH

La etapa siguiente implicó el estudio y la selección de los nucleófilos capaces de reaccionar con el intermediario en forma eficiente. Como se mencionó anteriormente, los compuestos deben presentar la acción deseada para complementar la actividad del VPA (anticonvulsivos o antiinflamatorios) pero también una compatibilidad química. Según literatura, el grupo nucleofílico para la sustitución puede derivar de un grupo funcional fenol o ácido carboxílico, aunque también pueden encontrarse ejemplos no explorados en esta tesis en los que el grupo nucleofílico es de otra naturaleza química (**Franssen et al., 1998; Iyer et al., 1995; Rasmussen & Leonard, 1967; Sanrame et al., 2014**).

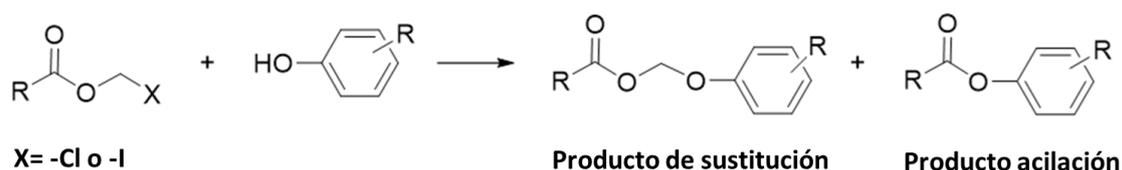
La incorporación de grupos fenoles y ácidos carboxílicos resultó exitosa en el presente trabajo, logrando experiencia en las reacciones de síntesis de estas estructuras nuevas. *Una conclusión relevante obtenida en esta investigación es que, en concordancia con lo encontrado por otros investigadores para el caso de fenoles (**Ouyang et al., 2002**), es necesario el intercambio del ion cloro por ion iodo en la reacción, de manera de generar*



Capítulo 6

Análisis de resultados, conclusiones y perspectivas

un mejor grupo saliente y de esta manera minimizar posibles subproductos de acilación (Esquema 6.2). Cabe destacar que la mayoría de los productos puros obtenidos en esta tesis presentan un aspecto de aceite, por lo que los aislamientos/purificaciones debieron ser llevados a cabo por cromatografía en columna con especial énfasis en la pureza de los solventes utilizados como fase móvil. También debió tenerse especial cuidado en la etapa final de evaporación de solventes, dado que se observó que a temperaturas mayores 40-45°C en muchos casos ocurría descomposición. Esto último limita el proceso de aislamiento y purificación a la utilización de solventes de bajo punto de ebullición como fase móvil. Una vez sorteados estos inconvenientes, *los productos planteados pudieron obtenerse en rendimientos que van entre un 20 y un 35%, como se detalla para cada uno de ellos en el Capítulo 4*. Estos valores se calcularon en base a la masa obtenida de producto puro. Los rendimientos podrían ser mayores si se los determinara por un método analítico desde el medio de reacción, ya que no se tiene en cuenta la pérdida inherente de las separaciones en columna cromatográfica. *En total se sintetizaron 14 (catorce) nuevas moléculas multiobjetivo derivadas del ácido valproico.*



Esquema 6.2 Propuestas de ataque nucleofílico utilizando el grupo fenol (Ouyang et al., 2002).

Adicionalmente se prepararon 5 (cinco) 4-hidroxibenzamidas, seleccionadas racionalmente por ser bioisómeros de parabenos, para ser utilizados como nuevos fragmentos activos complementarios. La preparación de estas estructuras se realizó adaptando diferentes técnicas de literatura (Bavetsias et al., 2013; Matsumoto & Koide, 2001), logrando rendimientos aceptables (30% a 70% para el producto puro). Los cuatro compuestos evaluados *in vivo* mostraron signos de actividad anticonvulsiva y en 3 de ellos pudo demostrarse también la interacción con un blanco molecular clásico de anticonvulsivos (hNav1.2), lo que podría explicar, al menos en parte, la acción observada



en animales. *La preparación de este conjunto de compuestos permitió ganar experiencia en la síntesis química de esta familia de moléculas y a la vez generar nuevos conocimientos respecto a la actividad anticonvulsiva in vivo e in vitro de estas estructuras.*

Los compuestos N-bencil-4-hidroxibenzamida, N-propil-4-hidroxibenzamida y N-butil-4-hidroxibenzamida, se utilizarán como fragmentos activos complementarios para la obtención de nuevos compuestos multiobjetivo con ácido valproico utilizando el grupo conector oximetilo, mediante las rutas sintéticas ya conocidas, de manera de seguir explorando la actividad anticonvulsiva de esta familia de compuestos. Resulta particularmente interesante la preparación del derivado con N-butil-4-hidroxibenzamida, ya que es el bioisostero del parabeno que actúa como fragmento en la estructura más promisorio encontrada en este trabajo (compuesto 9, Figura 6.2)

En cuanto a la actividad biológica de los compuestos multiobjetivo derivados de Ácido Valproico, *9 de las 15 estructuras nuevas fueron evaluadas en MES test, encontrando actividad anticonvulsiva y ausencia de toxicidad (medida por el ensayo Rotorod).* Estos resultados confirman nuestra hipótesis de trabajo, pues *se ha logrado en esta tesis aportar nuevas estructuras activas mediante el empleo de estrategias racionales para la generación de compuestos multiobjetivo.* El compuesto más promisorio, el derivado de butilparabeno (compuesto 9, Figura 6.2), fue seleccionado para la determinación del tiempo de efecto máximo (TEM) y la dosis efectiva media (ED50) en ratones, cuyos valores fueron 6 hs y 0.0236 mmol/Kg respectivamente. Esta medida aporta la cuantificación de la actividad anticonvulsiva y permite la comparación con fármacos conocidos. Resulta pertinente entonces la comparación con el VPA, uno de los fragmentos utilizados para la construcción racional del compuesto. Se observa que se obtuvo un compuesto *77 veces más potente* que el anticonvulsivo de partida en el ensayo MES (**Bialer et al., 2004**) (Figura 6.2). Este aumento de la potencia anticonvulsiva puede deberse a diversos factores, entre ellos a un aumento de lipofilia asociado a la formación del éster derivado de ácido valproico y/o la modulación simultánea de un determinado número de blancos moleculares por parte de los fragmentos activos que componen a la molécula sintetizada. Sin embargo, para dar una



respuesta más contundente que explique esta diferencia de actividad deben realizarse mayores estudios principalmente relacionados con la farmacocinética del compuesto. Esta es una tarea a abordar a futuro. Se buscará determinar la presencia de la molécula en estudio a nivel cerebral y en plasma, ya sea en su forma completa o disociada, a fin de iniciar el estudio de los efectos que generan la actividad. Es por esto que se extrajeron los cerebros y el plasma de los animales de experimentación utilizados para el cálculo de ED50 y TEM, a fin de poder realizar determinaciones analíticas de la presencia de fármacos y metabolitos de los mismos en estas muestras biológicas por HPLC, minimizando el empleo de animales de experimentación a utilizar en futuros trabajos. Adicionalmente se propone completar la etapa de identificación propuesta por la ETSP (Kehne et al., 2017).

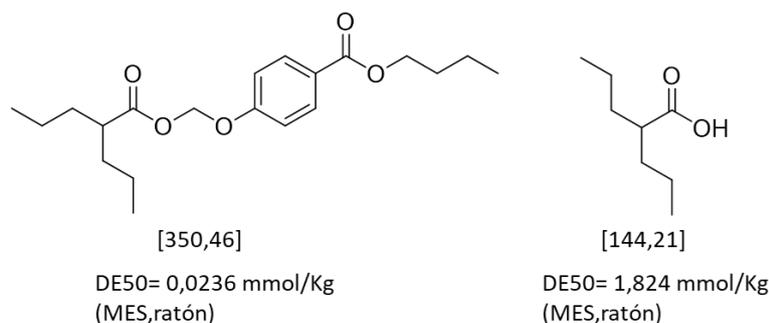


Figura 6.2 Estructura y valor de ED50 (expresada mmoles) del compuesto 9 (derivado de butilparabeno-oximetilo-Ácido valproico). Se incluye también el valor encontrado en literatura del ácido valproico para su comparación. Los pesos moleculares de los compuestos se expresan entre corchetes.

A modo de resumen, en las Figuras 6.3 y 6.4 se muestran las estructuras de todos los compuestos obtenidos en esta Tesis, junto con un código para su identificación.

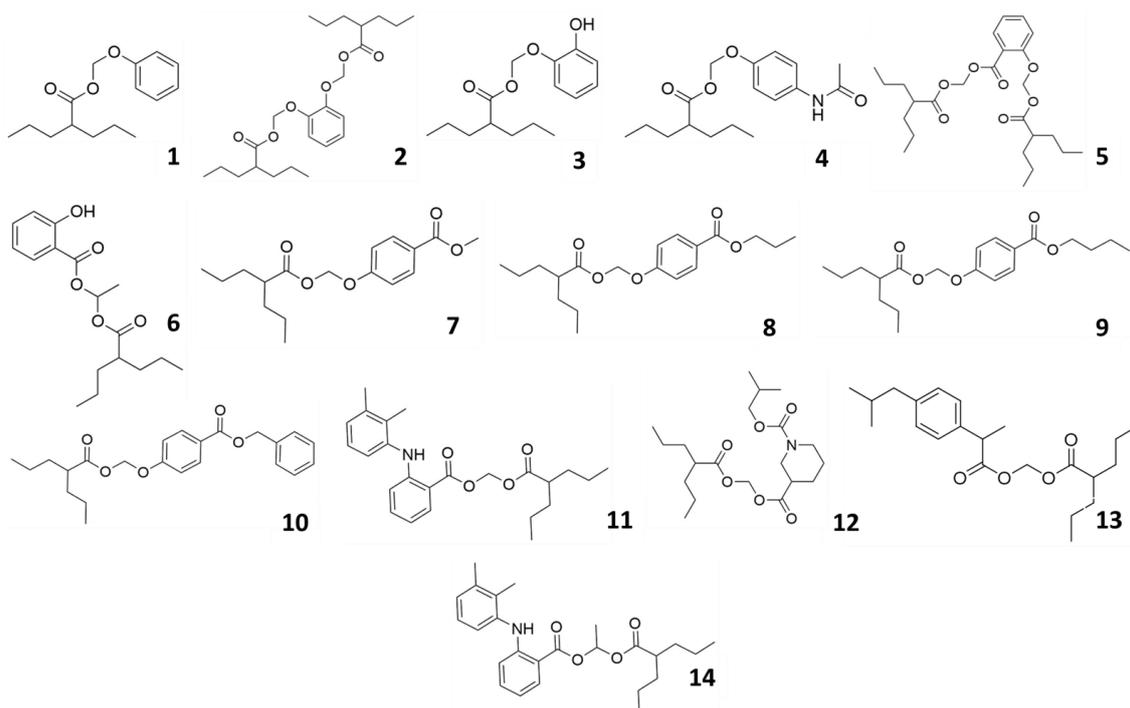


Figura 6.3 Estructuras y códigos de moléculas multiobjetivo derivadas de ácido valproico obtenidas

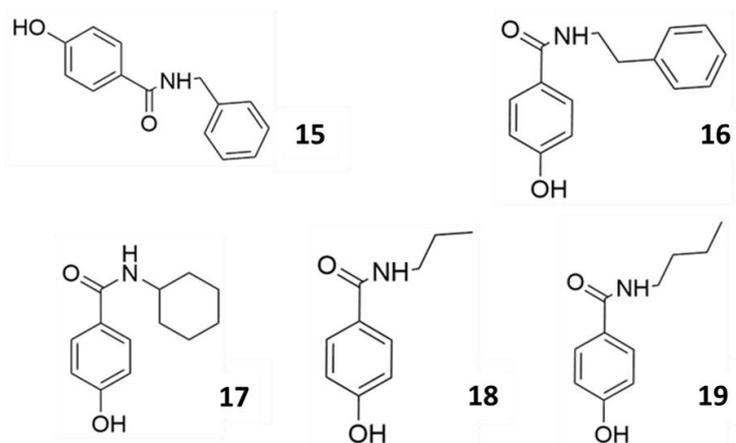


Figura 6.4 Estructuras y códigos de 4-hidroxibenzamidas.



Capítulo 6

Análisis de resultados, conclusiones y perspectivas

Durante el periodo de tesis se realizaron las siguientes **publicaciones científicas**:

Relacionadas con la temática de la tesis:

- “Computational and Synthetic Target-based Approaches to the Discovery of Novel Anticonvulsant Compounds” Melisa Edith Gantner, Manuel Augusto Llanos, Federico Mariano Garofalo, María Luisa Villalba, Luciana Gavernet. *Curr Med Chem.* 2021 Oct 25;28(33):6866-6894. doi: 10.2174/0929867328666210506161234
- “Anticonvulsant activity of 4-hydroxybenzamide derivatives as bioisosteric partners of the Parabens family”. Federico M. Garofalo, Nicolas Jorge Enrique, Maria Laura Sbaraglini, Alan Talevi, Pedro Martin y Luciana Gavernet (enviado)
- “Synthesis and biological evaluation of new hybrid antiseizure compounds derived from valproic acid” Federico M. Garofalo, Maria L. Sbaraglini, Emilia Barrionuevo, Estefanía Peralta, Evelyn Bonifazi, Alan Talevi y Luciana Gavernet. *Future medicinal chemistry.* (en prensa)

Mediante colaboraciones con otros integrantes del grupo de trabajo:

- "Structure-based virtual screening identifies Novobiocin, Montelukast and Cinnarizine as TRPV1 modulators with anticonvulsant activity in vivo." Llanos, Manuel; Enrique, Nicolás; Sbaraglini, María; Garofalo, Federico; Talevi, Alan; Gavernet, Luciana; Martín, Pedro. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00312>



6.1 Referencias

- Bavetsias, V., Faisal, A., Crumpler, S., Brown, N., Kosmopoulou, M., Joshi, A., Atrash, B., Pérez-Fuertes, Y., Schmitt, J. A., Boxall, K. J., Burke, R., Sun, C., Avery, S., Bush, K., Henley, A., Raynaud, F. I., Workman, P., Bayliss, R., Linardopoulos, S., & Blagg, J. (2013). Aurora Isoform Selectivity: Design and Synthesis of Imidazo[4,5-*b*]pyridine Derivatives as Highly Selective Inhibitors of Aurora-A Kinase in Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(22), 9122-9135. <https://doi.org/10.1021/jm401115g>
- Berkovitch, G., Doron, D., Nudelman, A., Malik, Z., & Rephaeli, A. (2008). Novel Multifunctional Acyloxyalkyl Ester Prodrugs of 5-Aminolevulinic Acid Display Improved Anticancer Activity Independent and Dependent on Photoactivation. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(23), 7356-7369. <https://doi.org/10.1021/jm8008794>
- Bialer, M., Twyman, R. E., & White, H. S. (2004). Correlation analysis between anticonvulsant ED50 values of antiepileptic drugs in mice and rats and their therapeutic doses and plasma levels. *Epilepsy & Behavior*, *5*(6), 866-872. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.08.021>
- Franssen, M. C. R., Goetheer, E. L. V., Jongejan, H., & de Groot, A. (1998). Enzymatic alcoholysis of alkoxyethyl alkanoates: A possible approach for the kinetic resolution of tertiary alcohols. *Tetrahedron Letters*, *39*(45), 8345-8348. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01840-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01840-1)
- Hamada, Y. (2017). Recent progress in prodrug design strategies based on generally applicable modifications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *27*(8), 1627-1632. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.075>
- Iyer, R. P., Yu, D., Ho, N., & Agrawal, S. (1995). Synthesis of Iodoalkylacylates and Their Use in the preparation of S-Alkyl Phosphorothiolates. *Synthetic Communications*, *25*(18), 2739-2749. <https://doi.org/10.1080/00397919508011821>
- Kehne, J. H., Klein, B. D., Raeissi, S., & Sharma, S. (2017). The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). *Neurochemical Research*, *42*(7), 1894-1903. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2275-z>
- Löscher, W. (2017). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*, *42*(7), 1873-1888. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>
- Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020). Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacological Reviews*, *72*(3), 606-638. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019539>
- Matsumoto, K., & Koide, N. (2001). Synthesis and Thermal Properties of Liquid Crystalline Compounds Containing Carbazolyl Group. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals*, *365*(1), 81-89. <https://doi.org/10.1080/10587250108025284>
- Ouyang, H., Borchardt, R. T., & Siahhan, T. J. (2002). Steric hindrance is a key factor in the coupling reaction of (acyloxy) alkyl- α -halides with phenols to make a new promoiety for prodrugs. *Tetrahedron Letters*, *43*(4), 577-579. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02241-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02241-9)



Capítulo 6

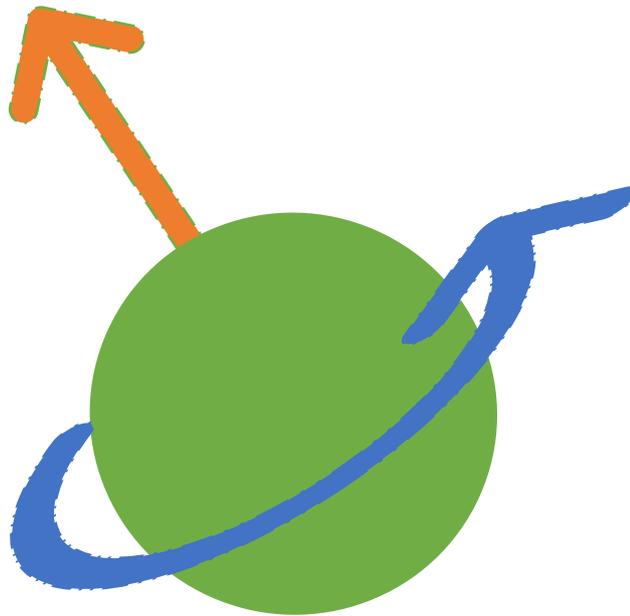
Análisis de resultados, conclusiones y perspectivas

Rasmussen, Malcolm., & Leonard, N. J. (1967). Synthesis of 3-(2'-deoxy-D-erythro-pentofuranosyl)adenine. Application of a new protecting group, pivaloyloxymethyl(Pom). *Journal of the American Chemical Society*, 89(21), 5439-5445. <https://doi.org/10.1021/ja00997a026>

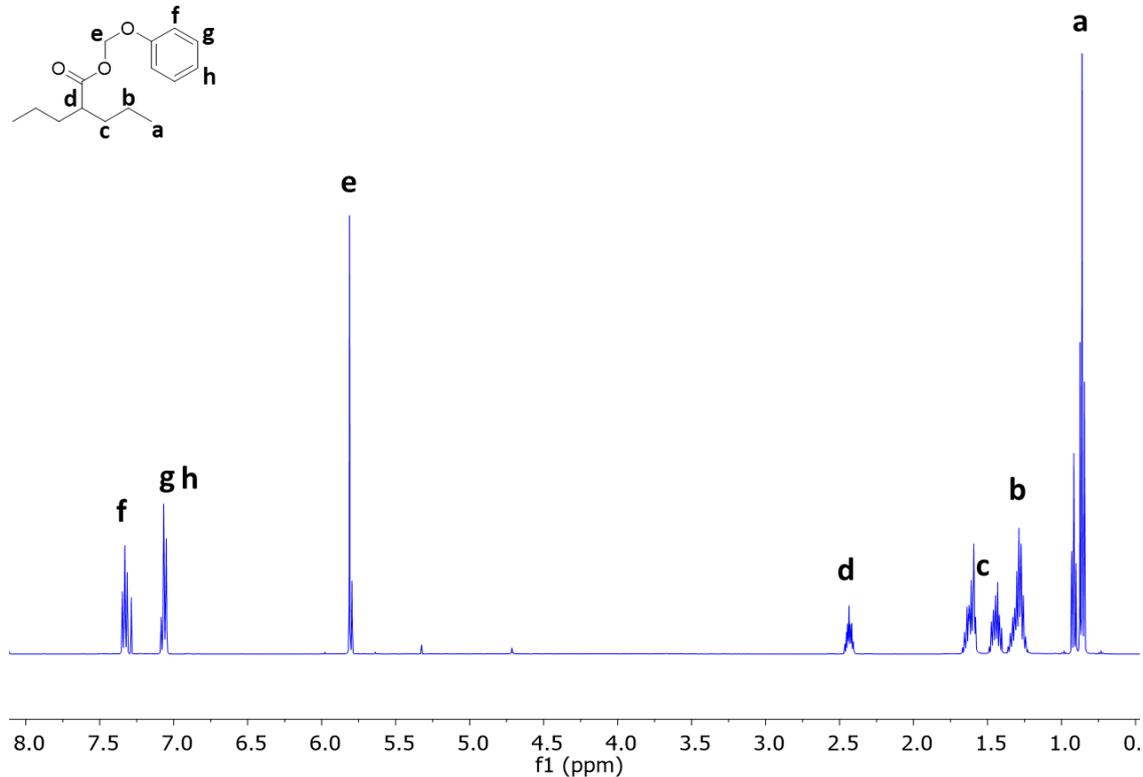
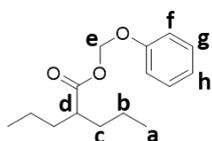
Sanrame, C. N., Remenar, J. F., Blumberg, L. C., Waters, J., Dean, R. L., Dong, N., Kriksciukaite, K., Cao, P., & Almarsson, Ö. (2014). Prodrugs of Pioglitazone for Extended-Release (XR) Injectable Formulations. *Molecular Pharmaceutics*, 11(10), 3617-3623. <https://doi.org/10.1021/mp500359a>

Anexo

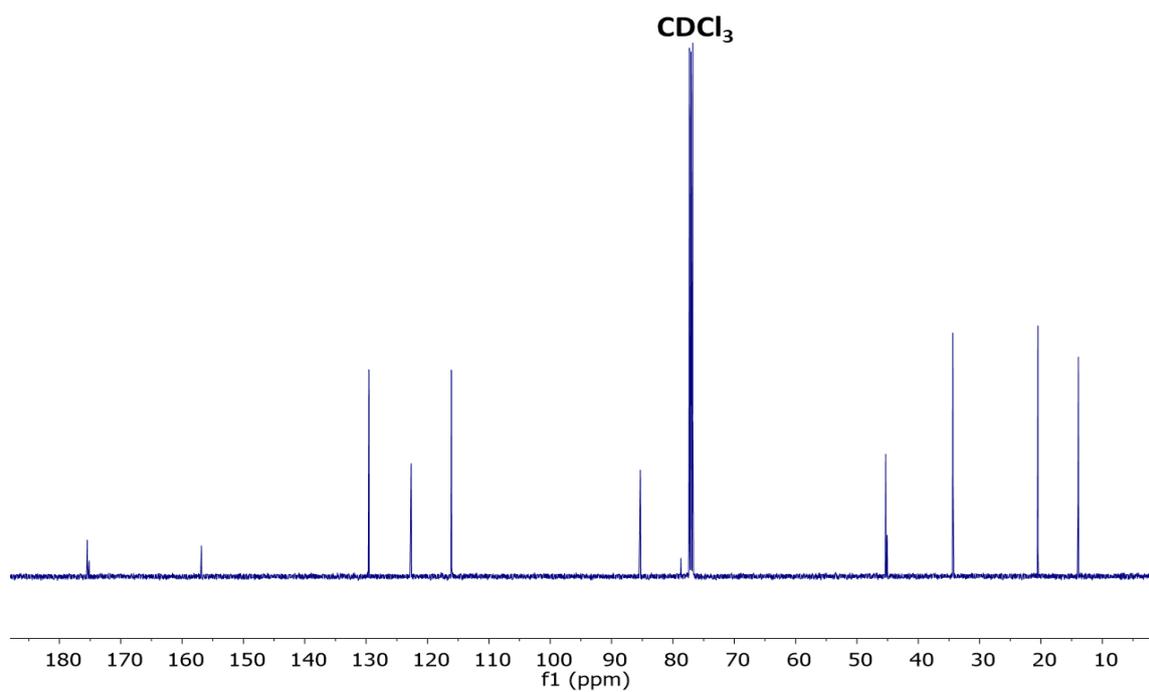
Espectros RMN



2-Propilpentanoato de fenoximetilo (1)



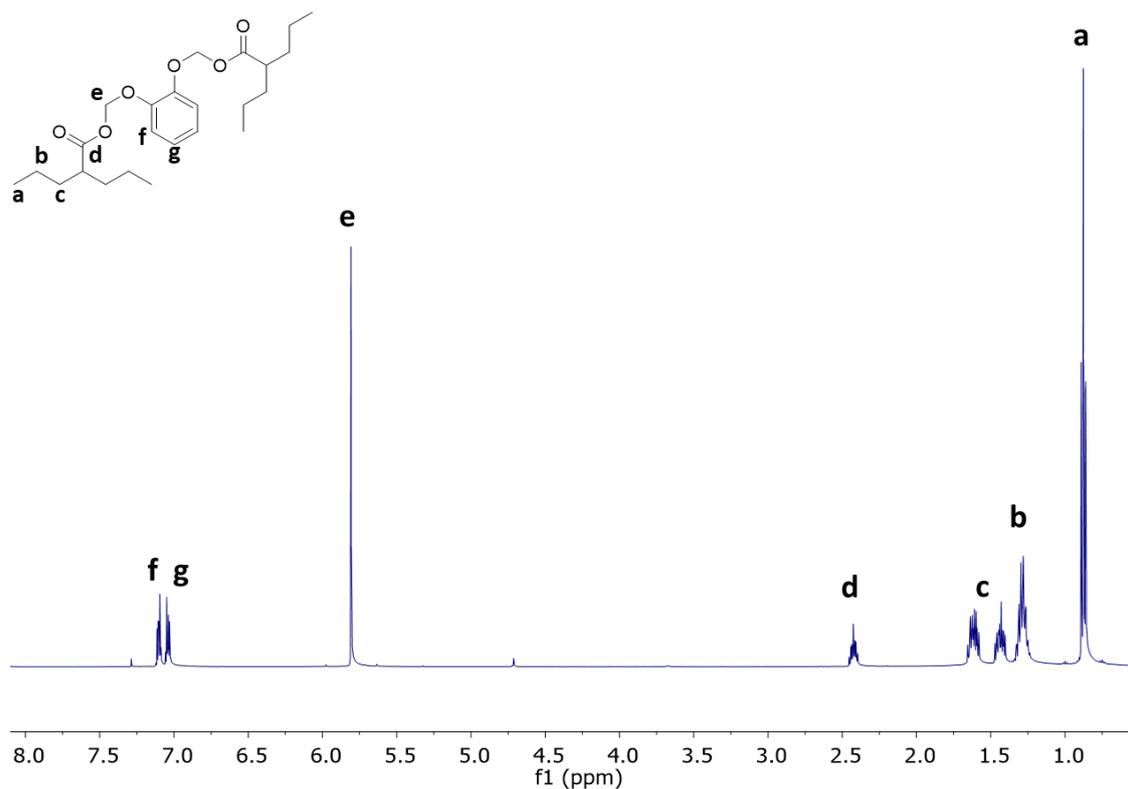
^1H RMN (CDCl_3) δ 7.38 – 7.30 (m, 2H), 7.14 – 7.02 (m, 3H), 5.81 (s, 2H), 2.44 (tt, $J = 9.0, 5.3$ Hz, 1H), 1.69 – 1.55 (m, 2H), 1.50 – 1.38 (m, 2H), 1.37 – 1.21 (m, 4H), 0.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H)



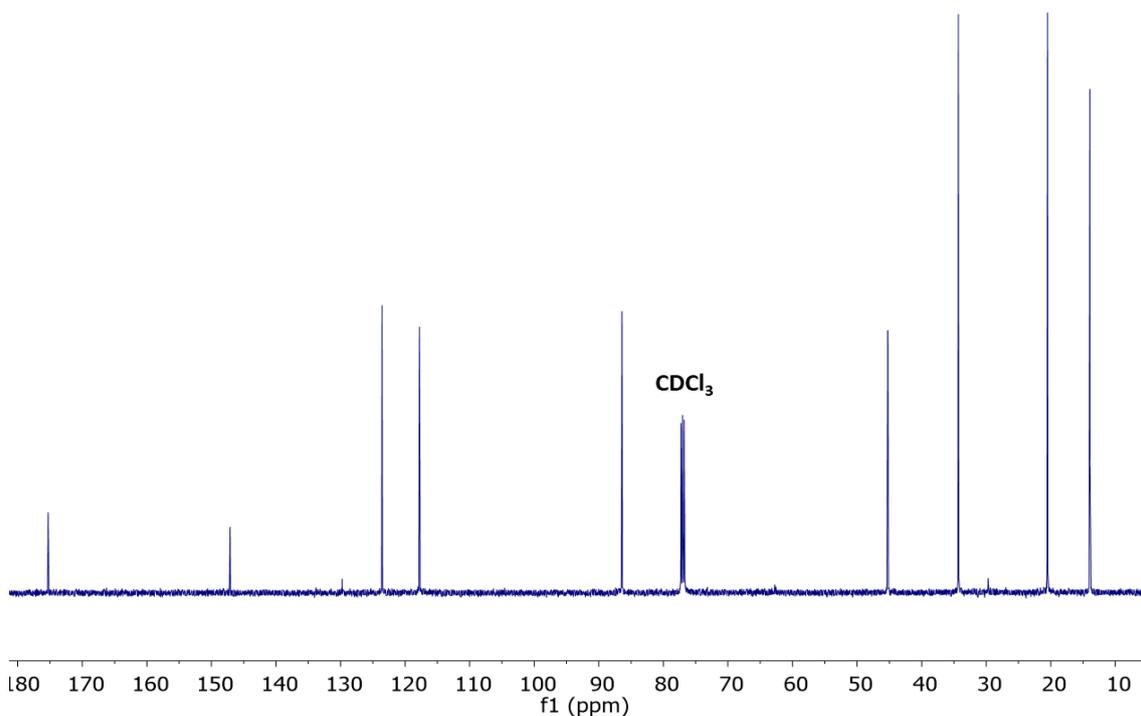
^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.45, 156.85, 129.54, 122.66, 116.09, 85.30(O-CH₂-O), 45.31, 34.36, 20.49, 13.97, 13.92.



bis(2-propilpentanoato) de (1,2-fenilenobis(oxi))bis(metileno) (2)

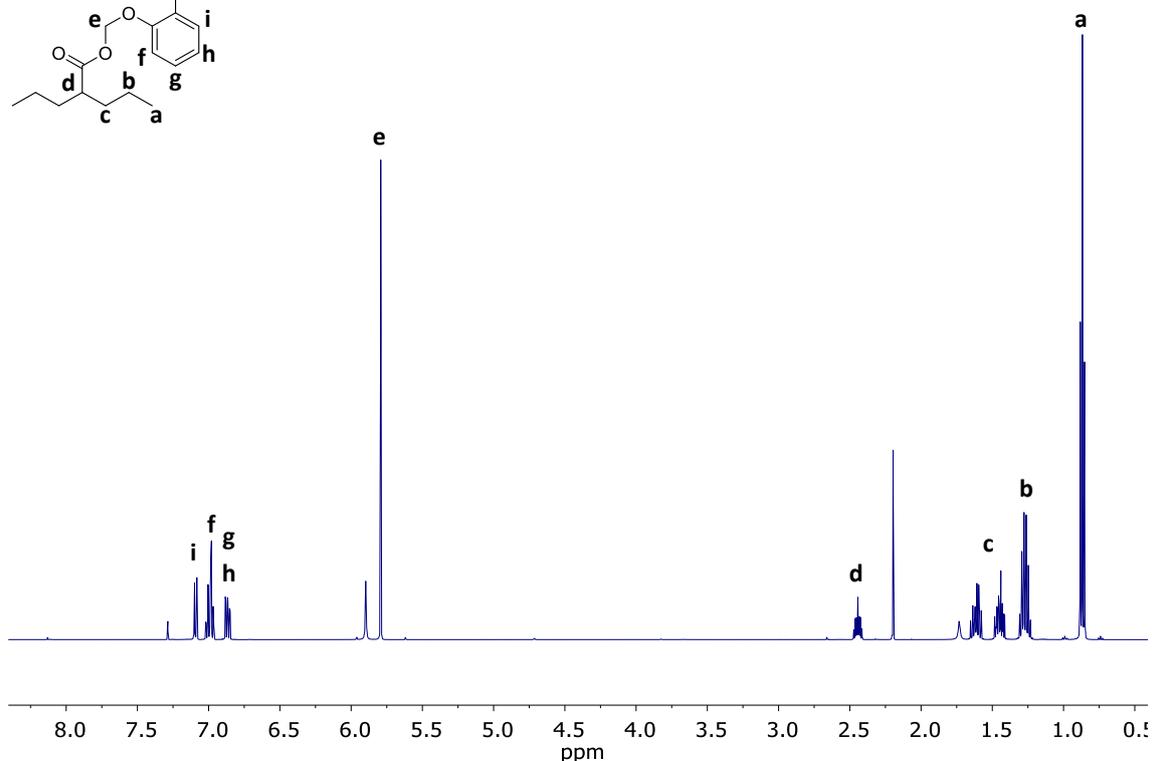
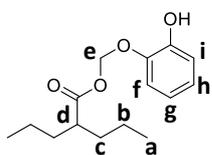


^1H RMN (CDCl_3) δ 7.13 – 7.08 (m, 2H), 7.04 (m, 2H), 5.81 (s, 4H), 2.43 (tt, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.49 – 1.38 (m, 4H), 1.29 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 12H)

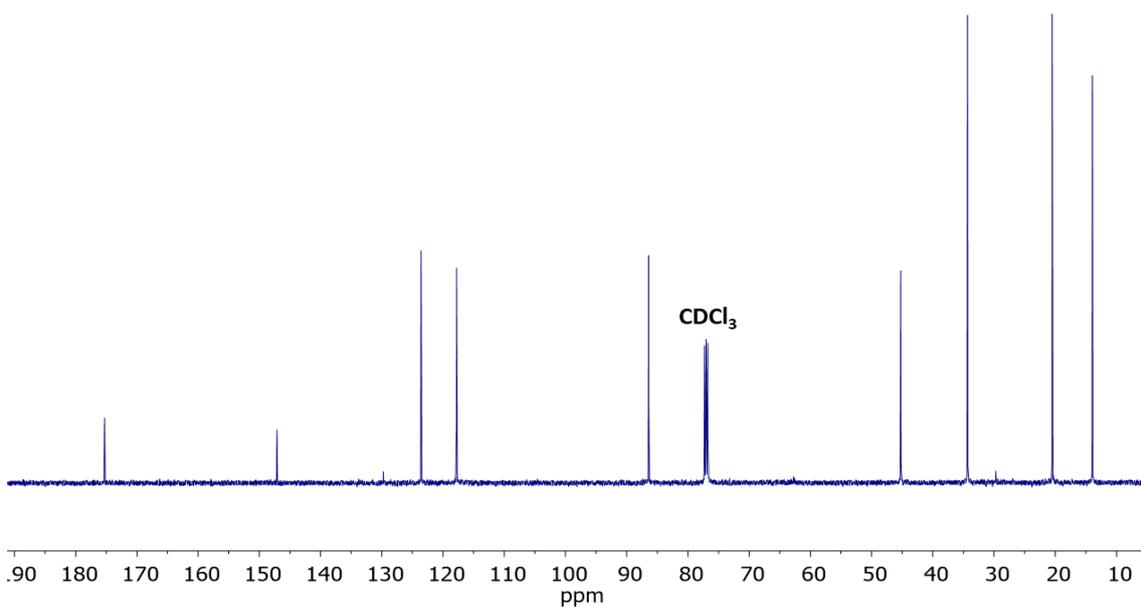


^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.28, 147.11, 123.58, 117.77, 86.41(O-CH₂-O), 45.23, 34.32, 20.50, 13.94

2-propilpentanoato de (2-hidroxifenoxi)metilo (3)



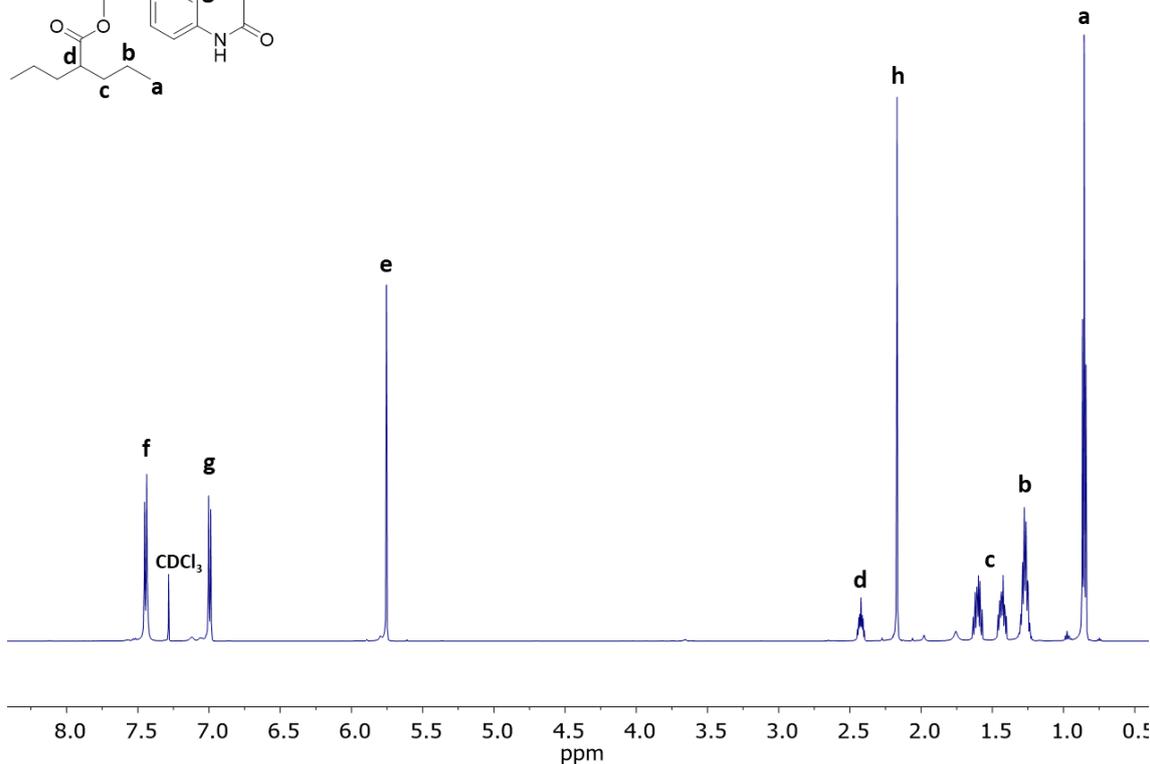
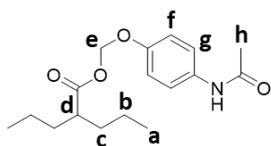
^1H RMN (CDCl_3) δ 7.09 (m, 1H), 7.00 (m, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 5.79 (s, 2H), 2.44 (tt, $J = 8.9, 5.4$ Hz, 1H), 1.62 (m, 2H), 1.49 – 1.41 (m, 2H), 1.31 – 1.23 (m, 4H), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H)



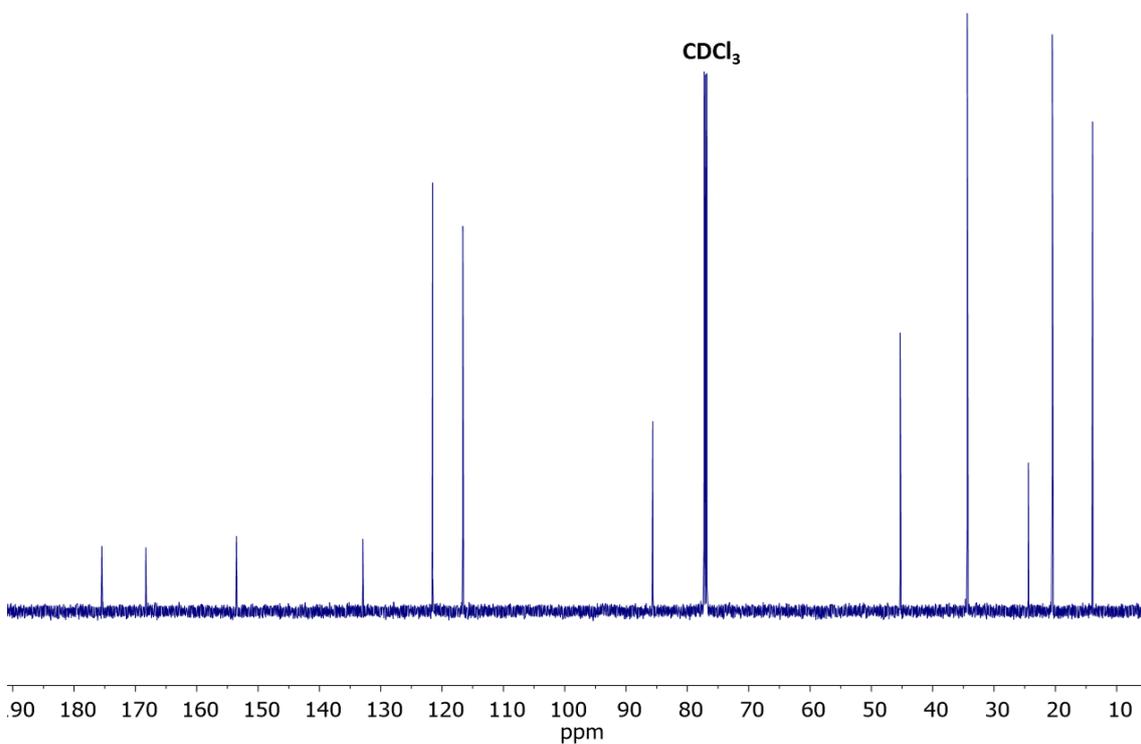
^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.28, 147.11, 129.75, 123.58, 117.77, 86.41(O-CH₂-O), 45.23, 34.32, 20.50, 13.94.



2-propilpentanoato de (4-acetamidofenoxi)metilo (4)

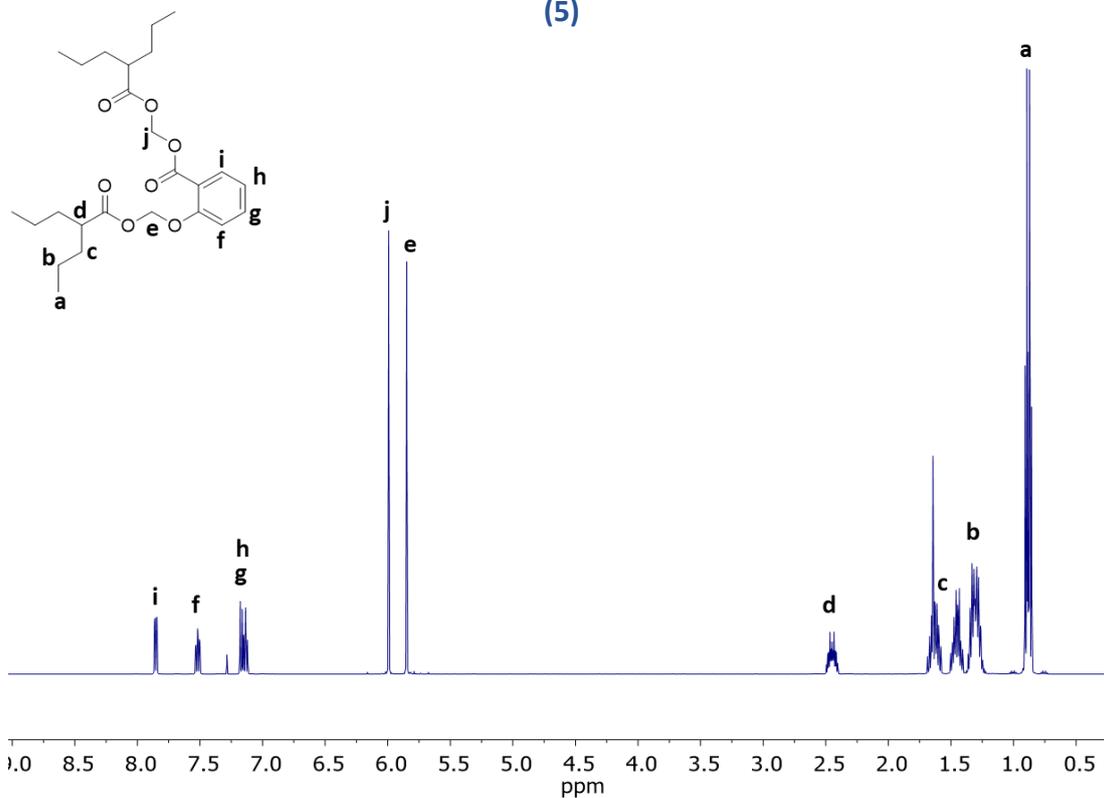


^1H RMN (CDCl_3) δ 7.44 (m, 2H), 7.04 – 6.97 (m, 2H), 5.75 (s, 2H), 2.42 (tt, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.60 (m, 2H), 1.47 – 1.39 (m, 2H), 1.27 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H).

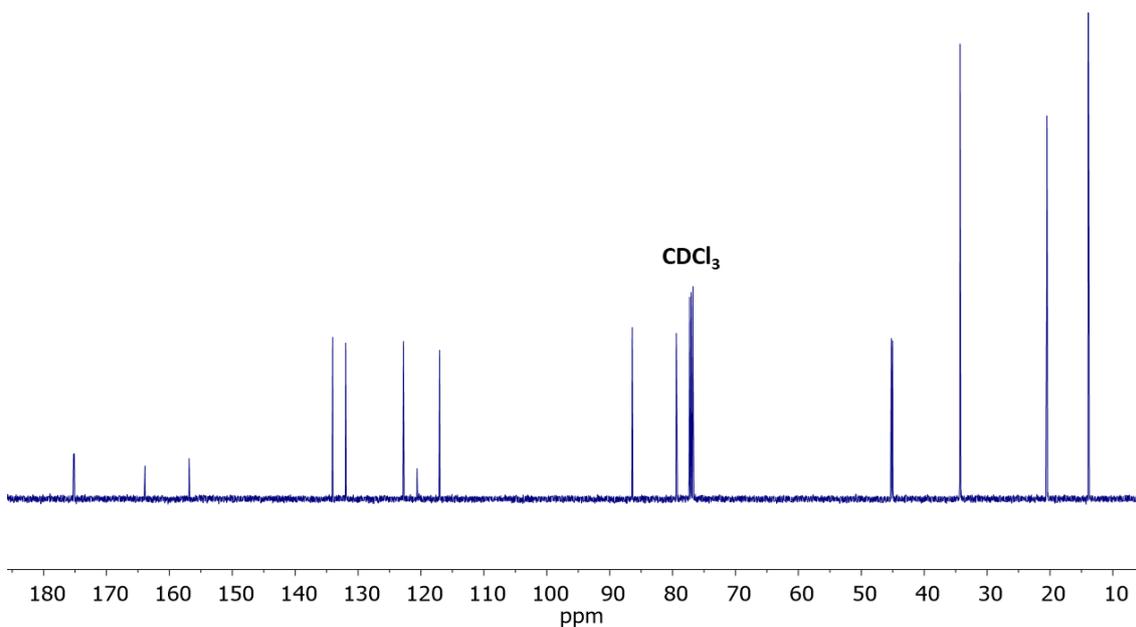


^{13}C RMN(CDCl_3) δ 175.49, 168.31, 153.53, 132.92, 121.53, 116.60, 85.64 (O- CH_2 -O), 45.28, 34.35, 24.39, 20.49, 13.92.

2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)metil 2-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato
(5)



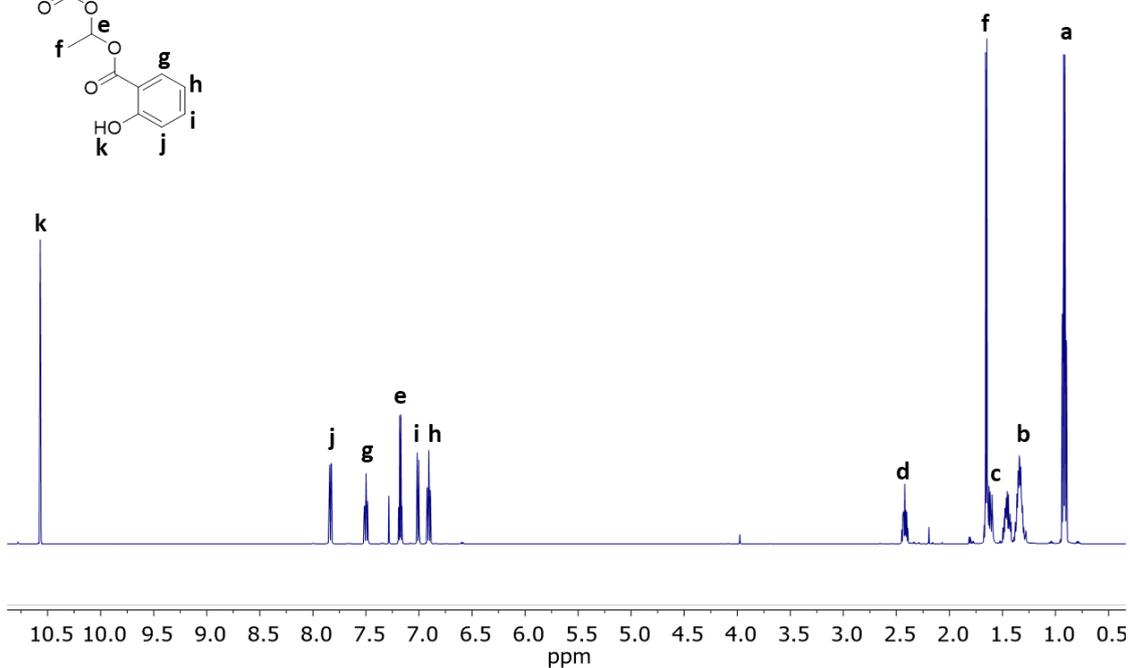
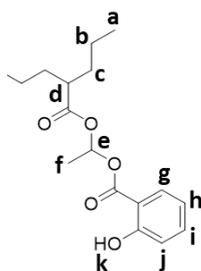
^1H RMN (CDCl_3) δ 7.85 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.20 – 7.10 (m, 2H), 5.99 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 2.45 (dt, $J = 16.7, 8.9, 5.3$ Hz, 2H), 1.71 – 1.56 (m, 4H), 1.46 (m, 4H), 1.39 – 1.22 (m, 8H), 0.88 (dt, $J = 11.1, 7.3$ Hz, 12H).



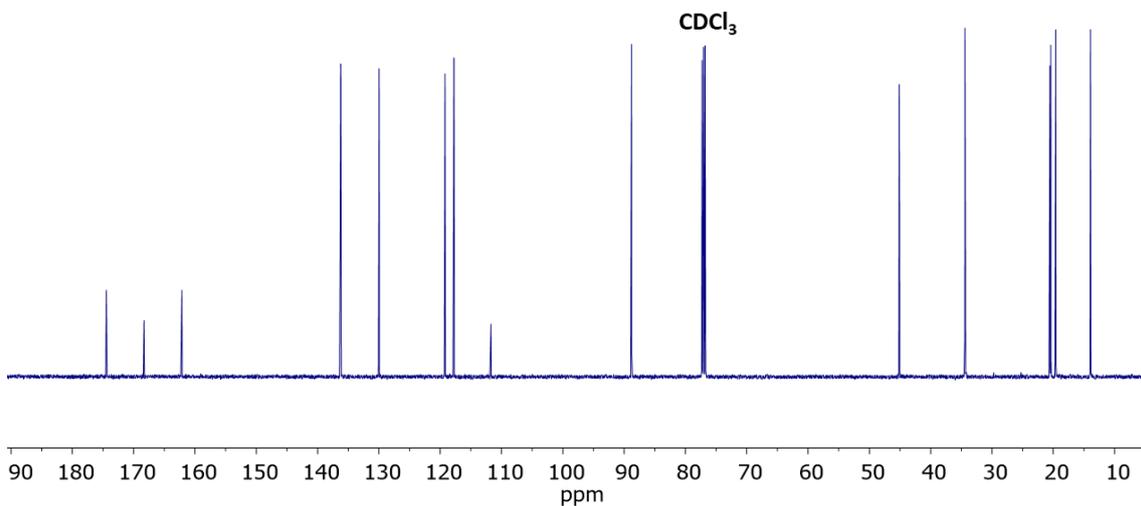
^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.24, 175.12, 163.89, 156.87, 134.04, 131.97, 122.78, 117.06, 86.41 (-CO-O- CH_2 -O-CO-), 79.41(-CO-O- CH_2 -O-Ar), 45.22, 45.02, 34.30, 20.50, 20.48, 13.93.



Ácido 2-(1-((2-propilpentanoil)oxi)eto)benzoico (6)

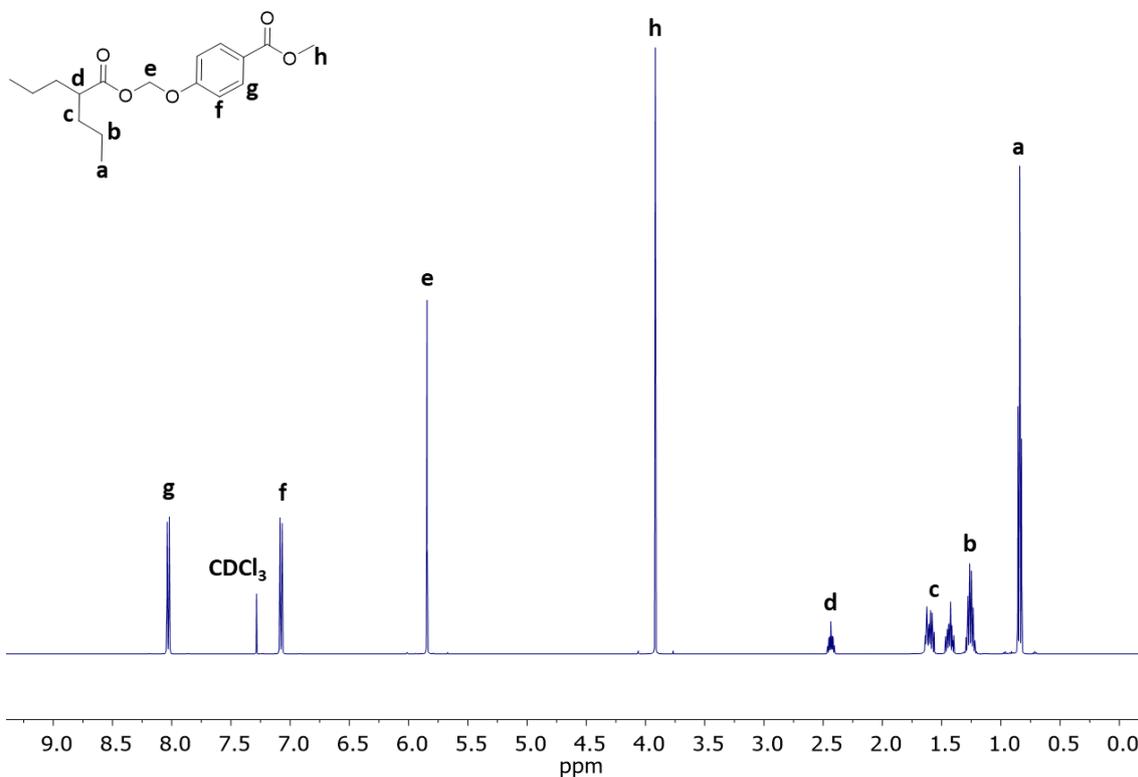


^1H RMN (CDCl_3) δ 10.57 (s, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.18 (q, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.01 (m, 1H), 6.91 (m, 1H), 2.42 (tt, $J = 9.0, 5.2$ Hz, 1H), 1.67 – 1.64 (d, 3H), 1.69 -1.58 (m, 2H), 1.51 – 1.40 (m, 2H), 1.40 – 1.26 (m, 4H), 0.92 (td, $J = 7.3, 5.3$ Hz, 6H).

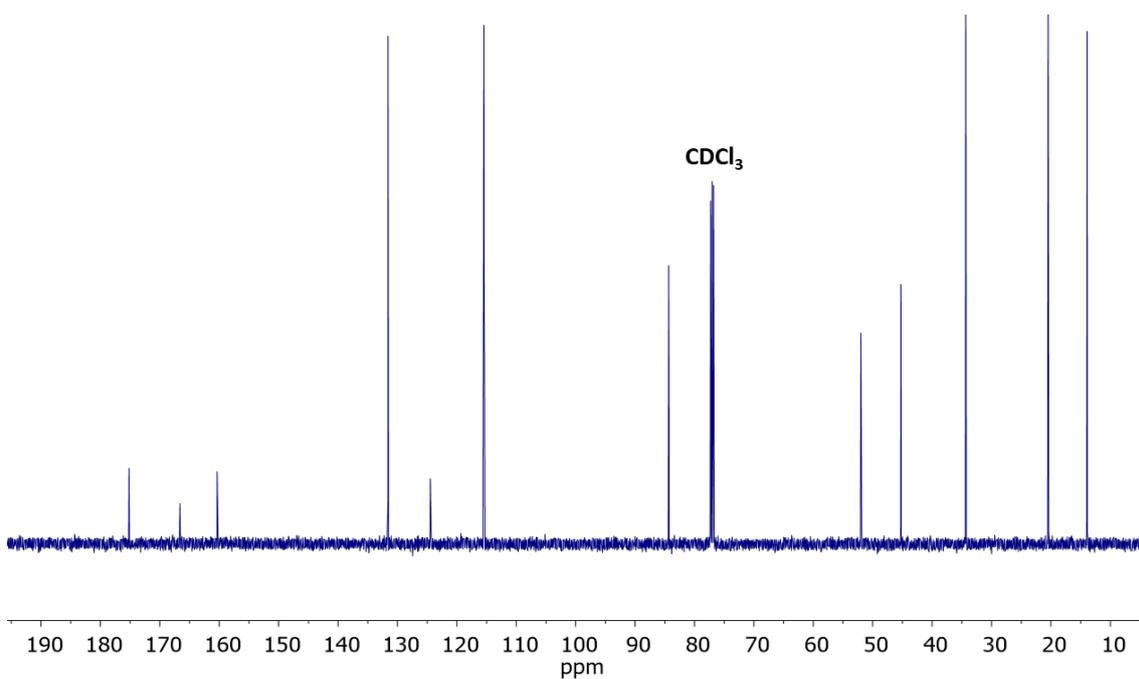


^{13}C RMN (CDCl_3) δ 174.45, 168.32, 162.13, 136.21, 129.97, 119.22, 117.75, 111.71, 88.79(O-CH-O), 45.11, 34.41, 34.37, 20.56, 20.41, 19.60(CH_3CH), 13.96, 13.94.

Metil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (7)



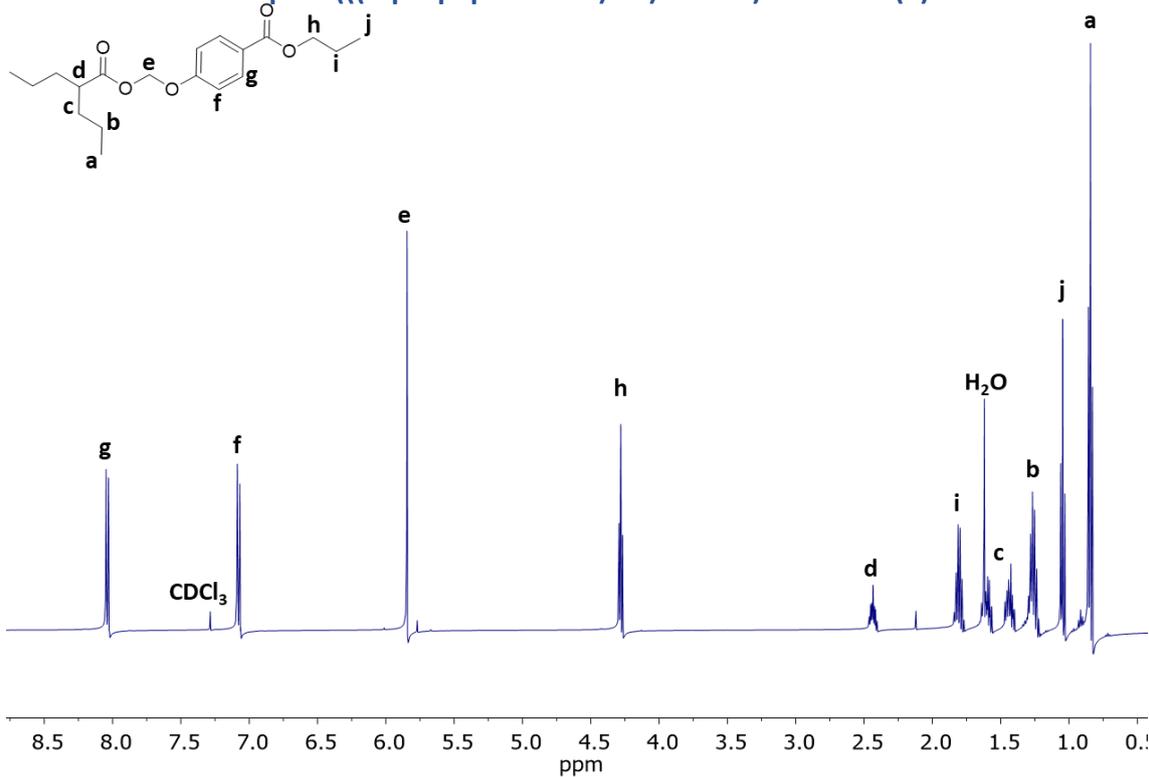
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.06 – 8.00 (m, 2H), 7.11 – 7.04 (m, 2H), 5.84 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.43 (tt, J = 8.9, 5.3 Hz, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 1.33 – 1.19 (m, 4H), 0.84 (t, J = 7.3 Hz, 6H).



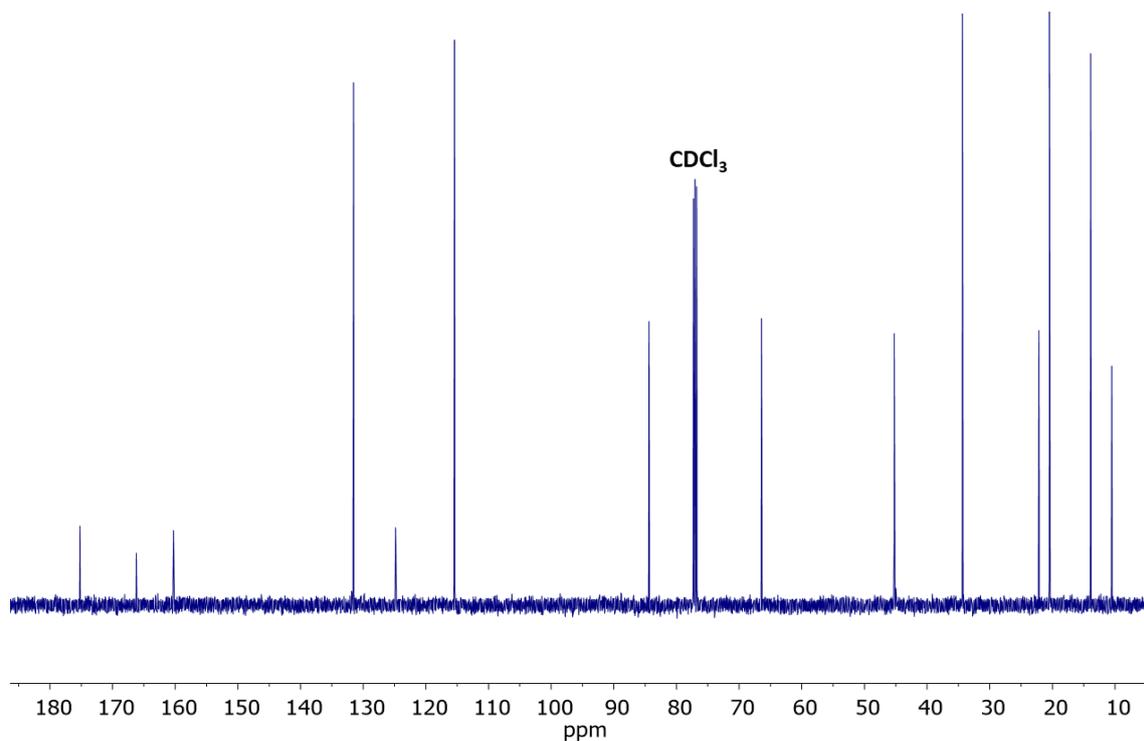
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 175.20, 166.61, 160.35, 131.59, 124.46, 115.43, 84.32 (O-CH₂-O), 52.01, 45.23, 34.33, 20.46, 13.88.



Propil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (8)

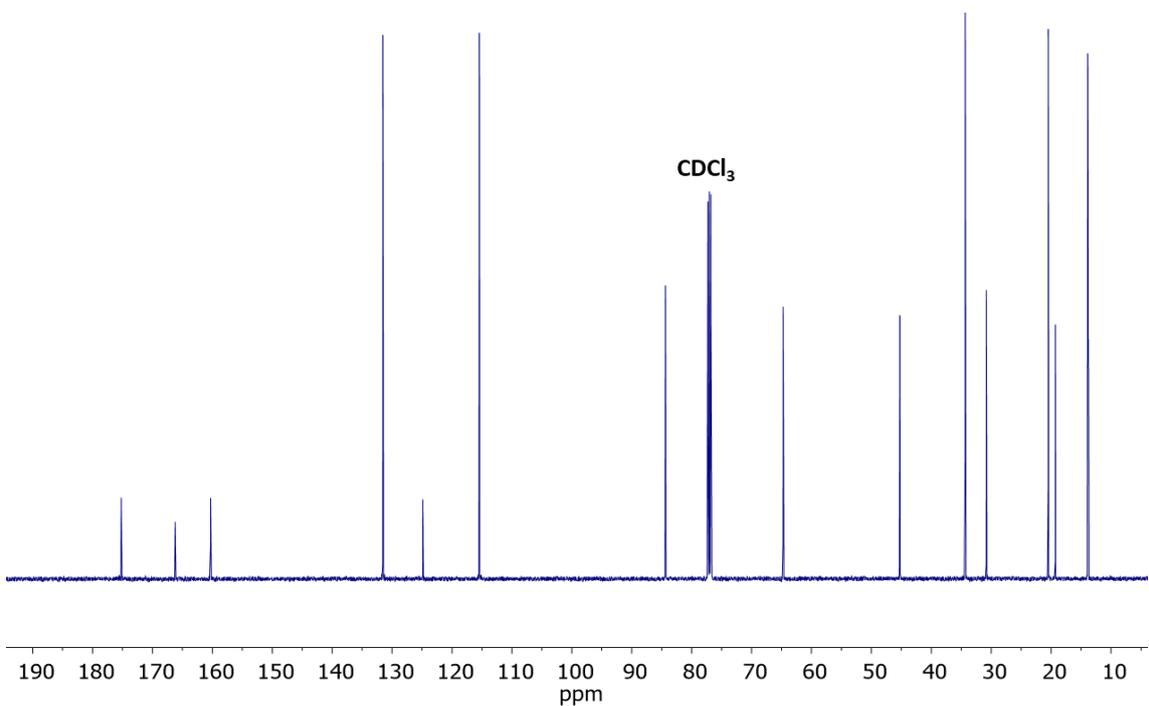
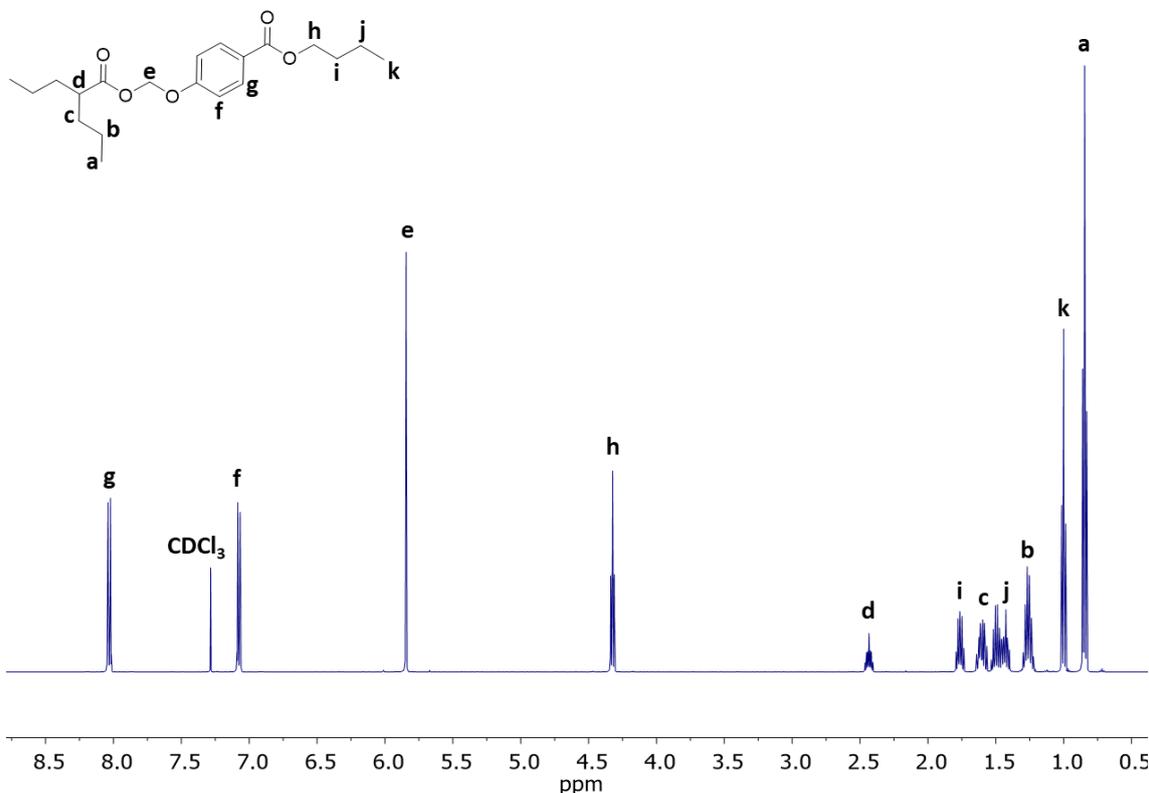


^1H RMN (CDCl_3) δ 8.08 – 8.01 (m, 2H), 7.12 – 7.05 (m, 2H), 5.84 (s, 2H), 4.28 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.43 (tt, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 1.81 (m, 2H), 1.67 – 1.55 (m, 2H), 1.50 – 1.38 (m, 2H), 1.36 – 1.19 (m, 4H), 1.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.84 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H).



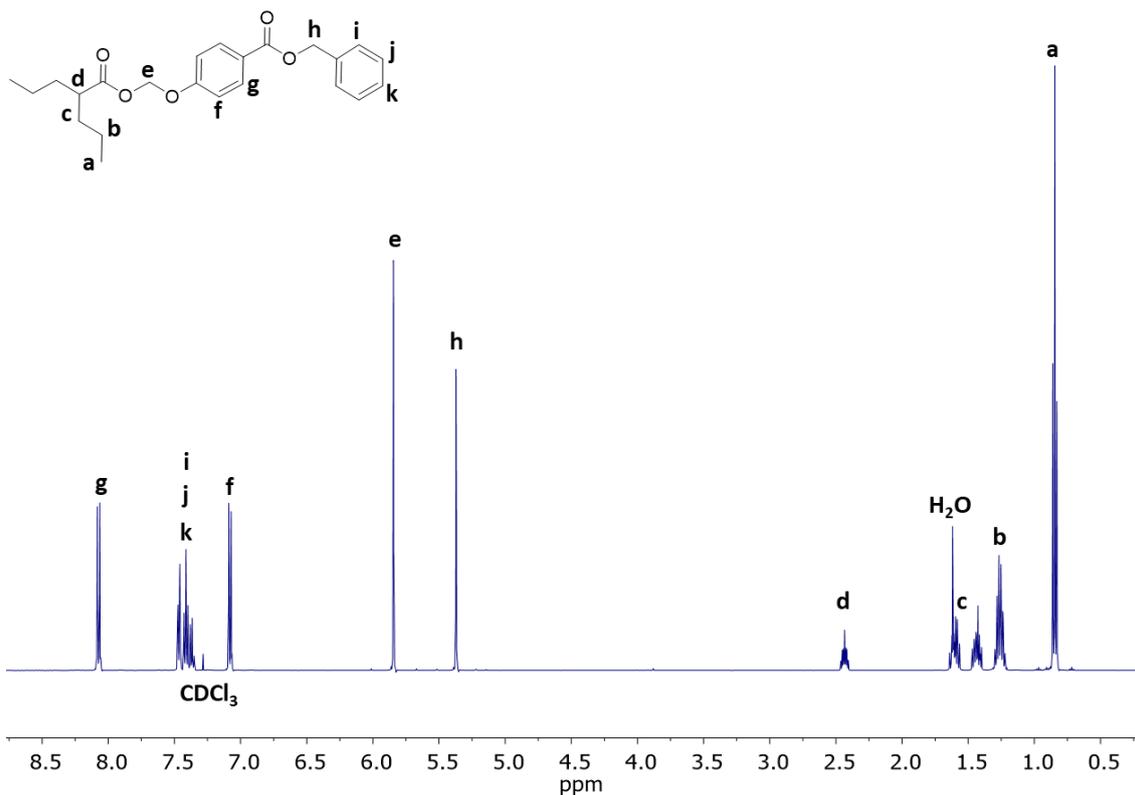
^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.22, 166.19, 160.29, 131.53, 124.84, 115.41, 84.37 (O- CH_2 -O), 66.43, 45.23, 34.33, 22.14, 20.47, 13.88, 10.53

Butil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (9)

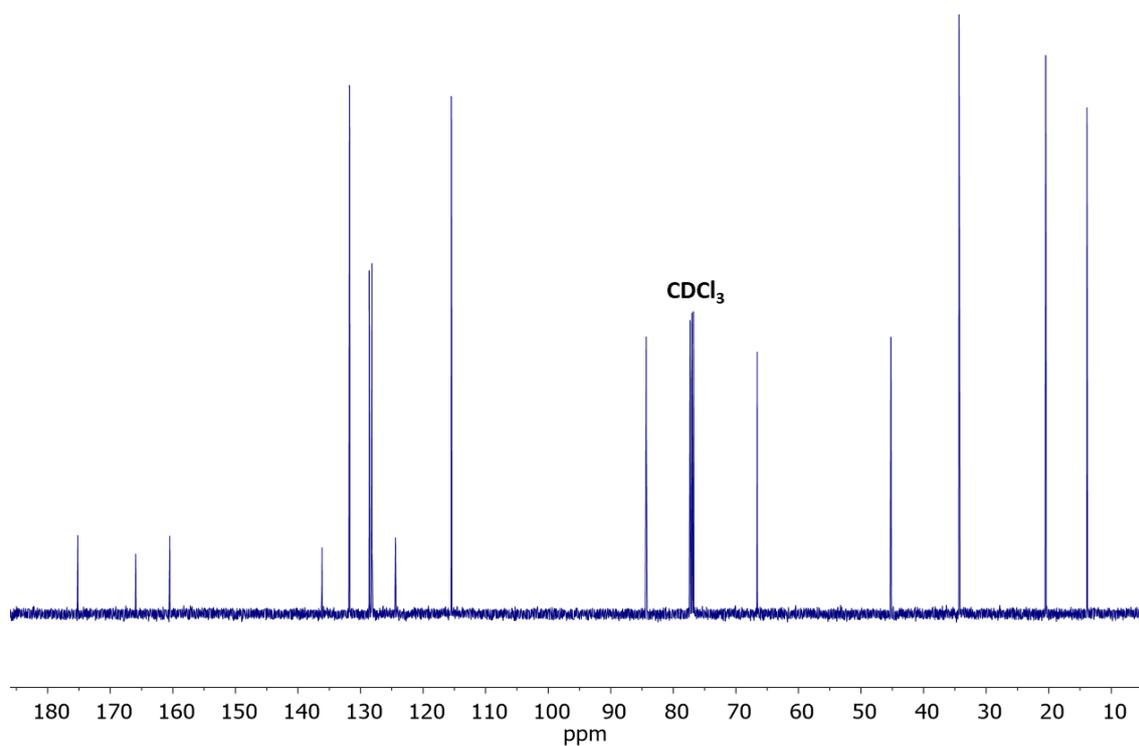




Bencil 4-(((2-propilpentanoil)oxi)metoxi)benzoato (10)

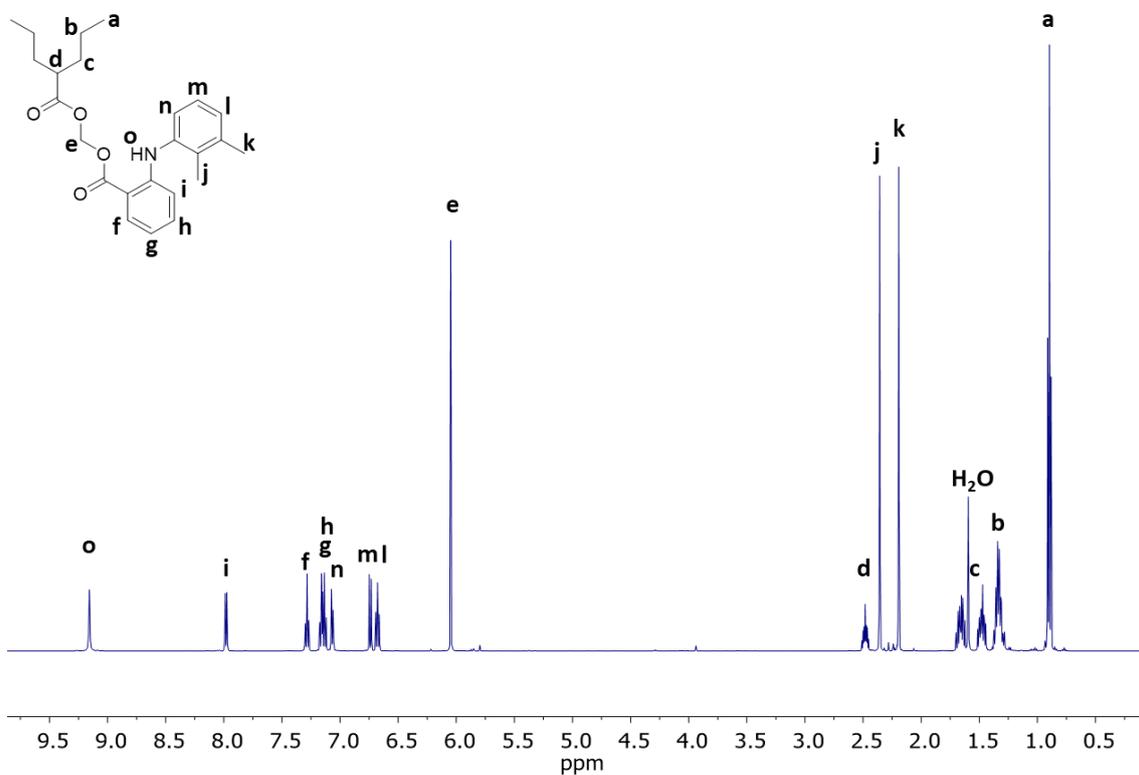


^1H RMN (CDCl_3) δ 8.12 – 8.04 (m, 2H), 7.50 – 7.33 (m, 5H), 7.13 – 7.05 (m, 2H), 5.84 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 2.43 (tt, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 1.33 – 1.19 (m, 4H), 0.85 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H).

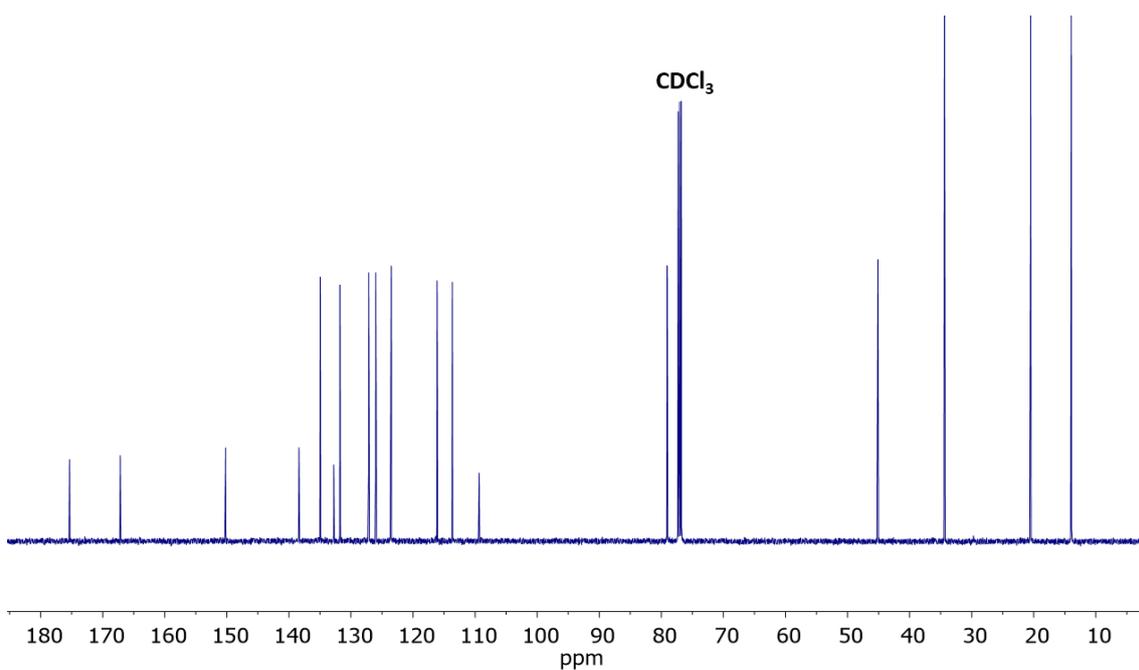


^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.19, 165.93, 160.48, 136.15, 131.74, 128.61, 128.24, 128.16, 124.42, 115.47, 84.33(O- CH_2 -O), 66.59, 45.23, 34.33, 20.47, 13.89.

2-((2,3-dimetilfenil)amino)benzoato de ((2-propilpentanoil)oxi)metilo (11)



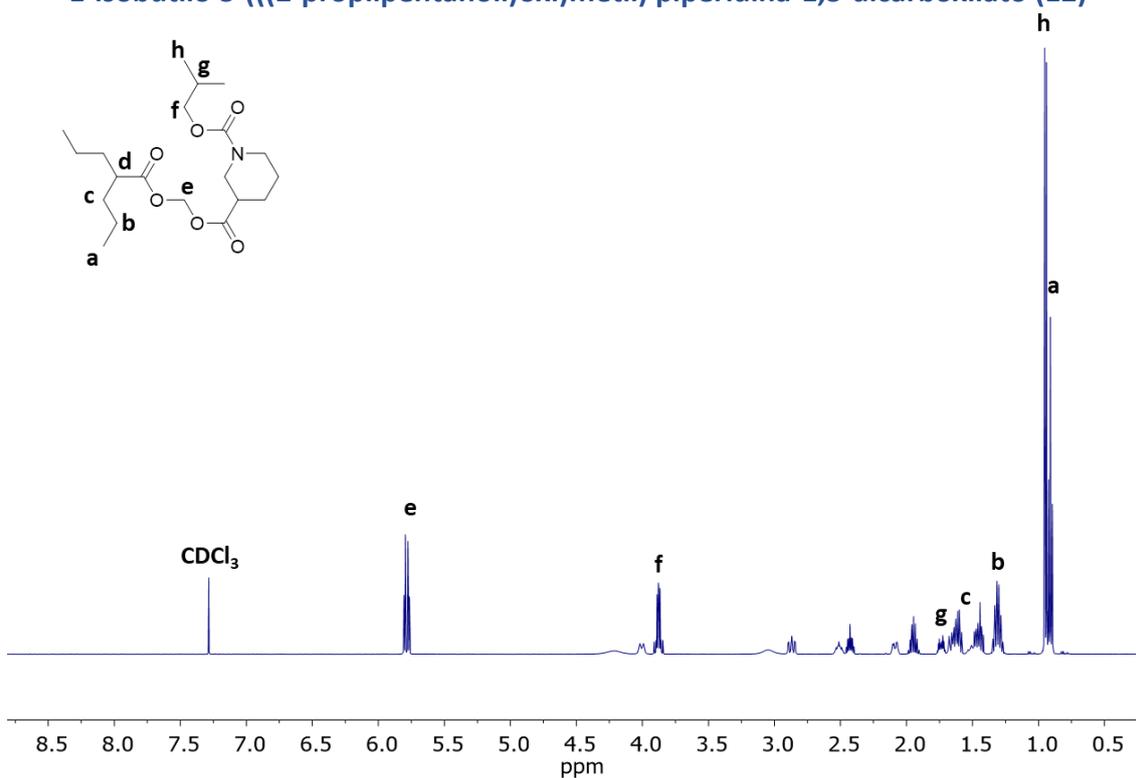
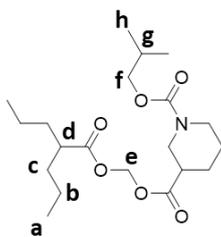
^1H RMN (CDCl_3) δ 9.16 (s, 1H), 7.98 (m, 1H), 7.32 – 7.25 (m, 1H), 7.19 – 7.11 (m, 2H), 7.07 (m, 1H), 6.74 (m, 1H), 6.68 (m, 1H), 6.05 (s, 2H), 2.48 (tt, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.66 (m, 2H), 1.53 – 1.41 (m, 2H), 1.41 – 1.26 (m, 4H), 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H).



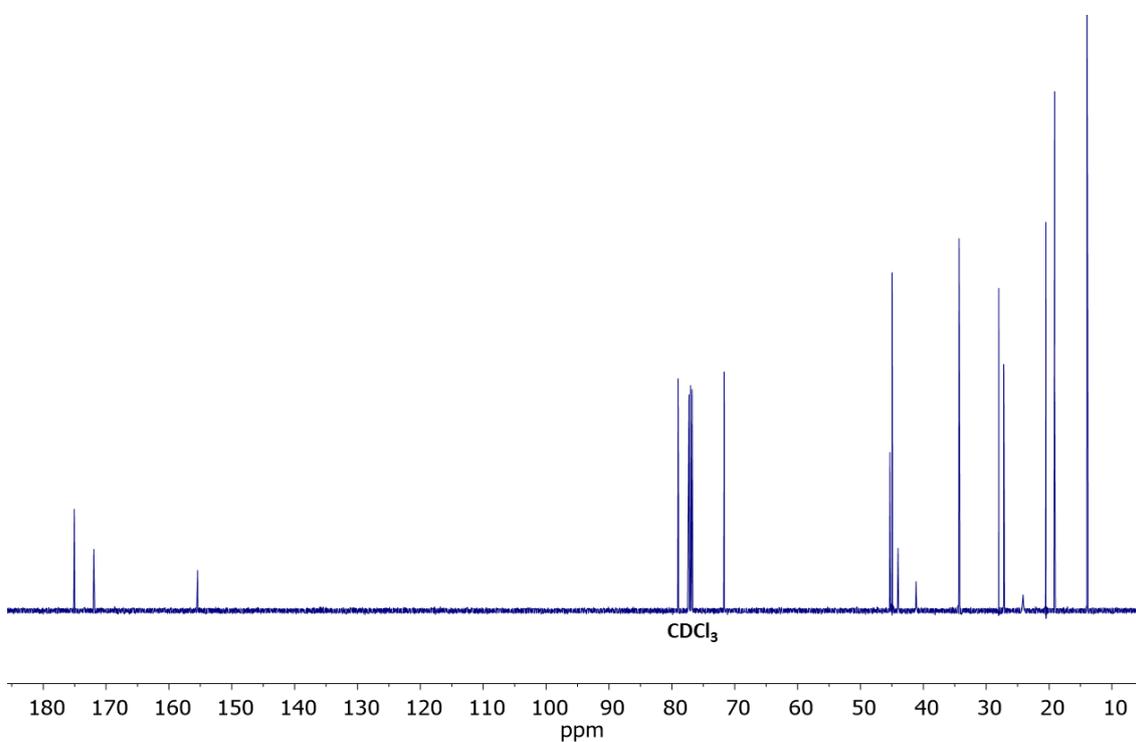
^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.35, 167.17, 150.20, 138.38, 138.30, 134.94, 132.77, 131.77, 127.14, 126.01, 123.50, 116.11, 113.66, 109.34, 79.04 (O-CH₂-O), 45.10, 34.36, 20.62, 20.50, 14.00, 13.95.



1-isobutilo 3-(((2-propilpentanoil)oxi)metil) piperidina-1,3-dicarboxilato (12)

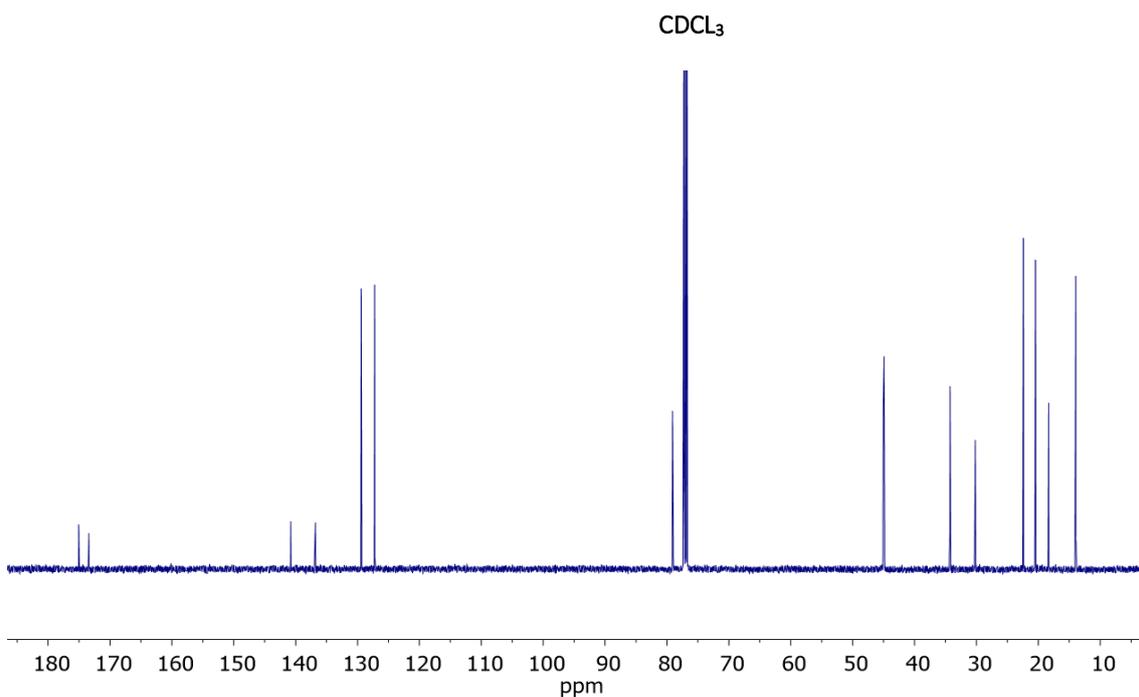
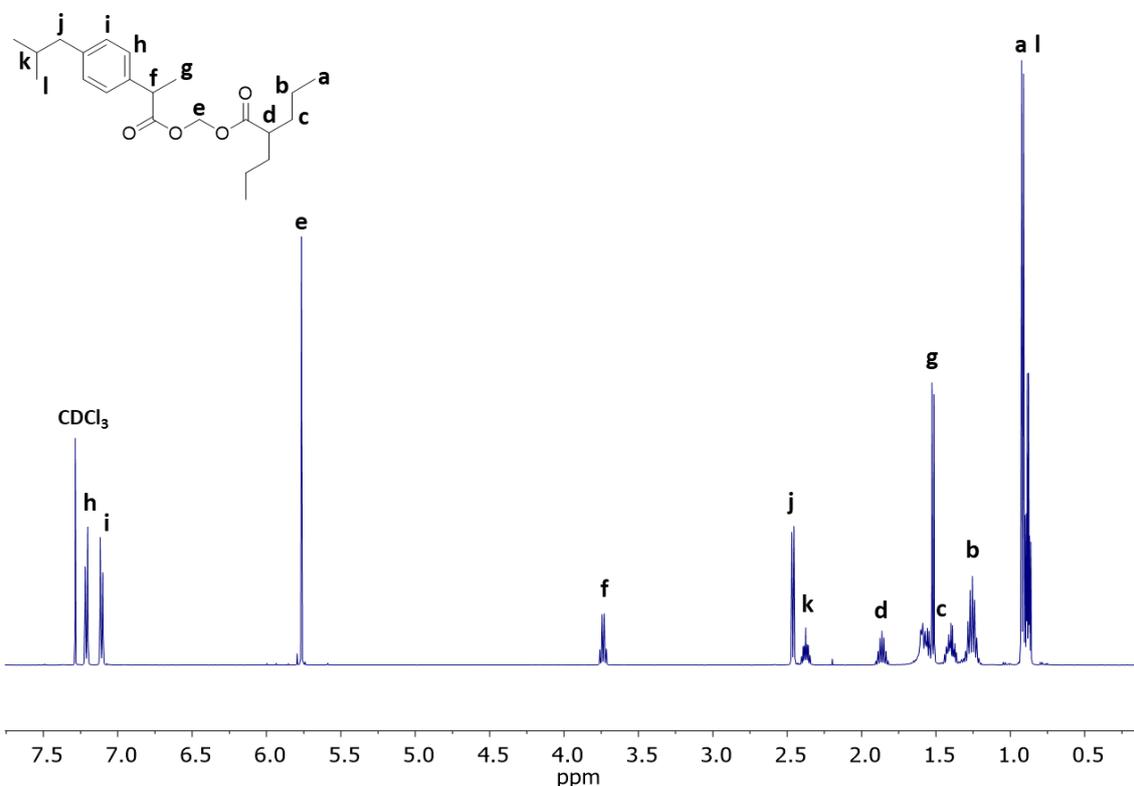


^1H RMN (CDCl_3) δ 5.82 – 5.75 (m, 2H), 4.01 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 3.93 – 3.83 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.43 (tt, $J = 9.0, 5.3$ Hz, 1H), 2.12 – 2.05 (m, 1H), 2.00 – 1.89 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.70 – 1.56 (m, 3H), 1.56 – 1.39 (m, 3H), 1.38 – 1.24 (m, 4H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H), 0.91 (t, $J = 7.3, 0.7$ Hz, 6H).



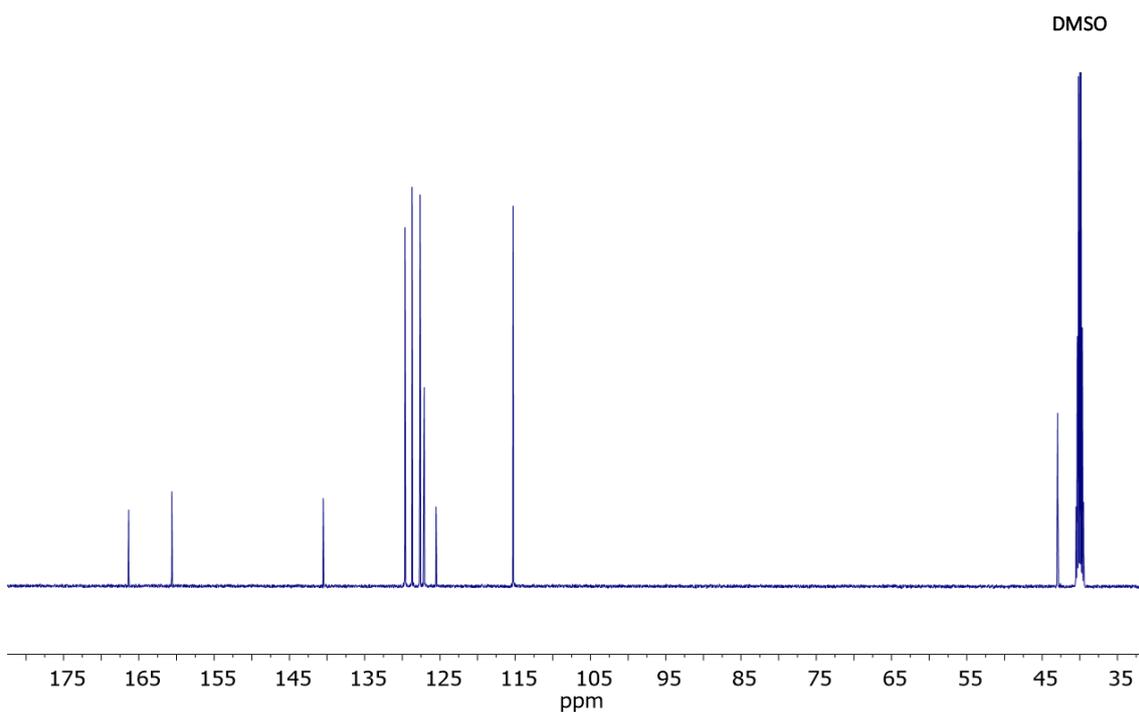
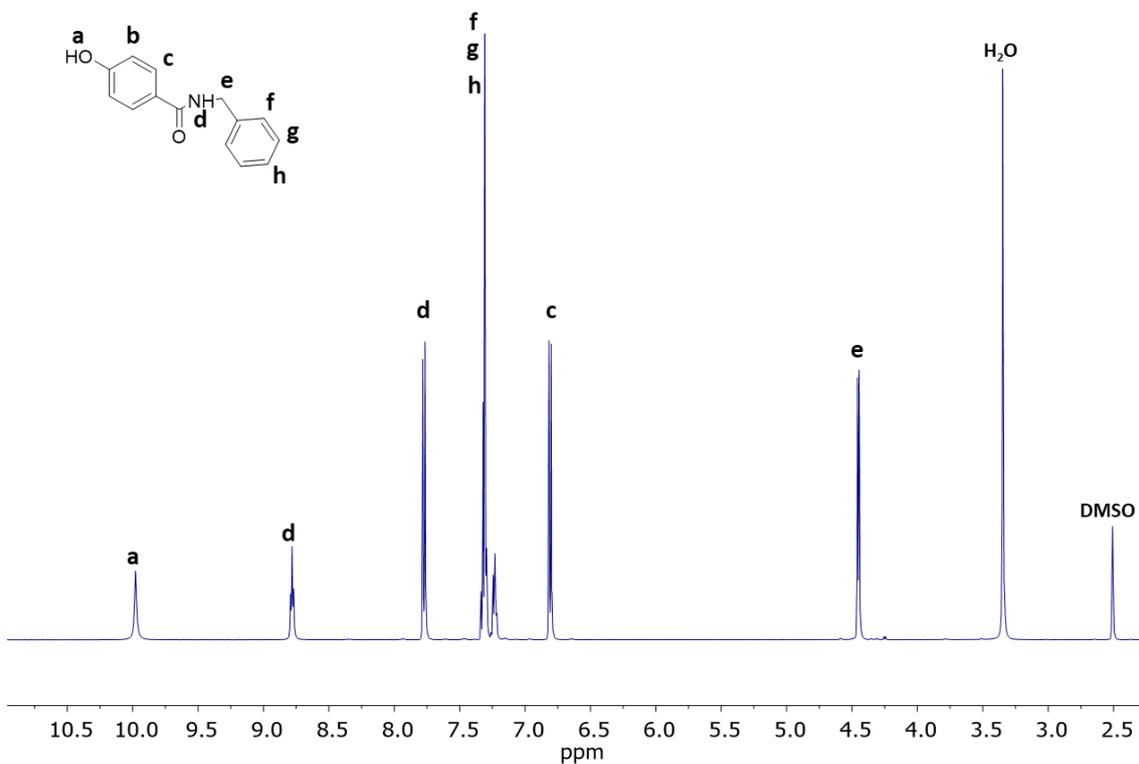
^{13}C RMN (CDCl_3) δ 175.04, 171.96, 155.44, 78.98(O-CH₂-O), 71.66, 45.31, 44.94, 44.02, 34.30, 27.99, 27.19, 20.49, 19.10, 13.94

2-propilpentanoato de ((2-(4-isobutilfenil)propanoilo)oxi)metilo (13)

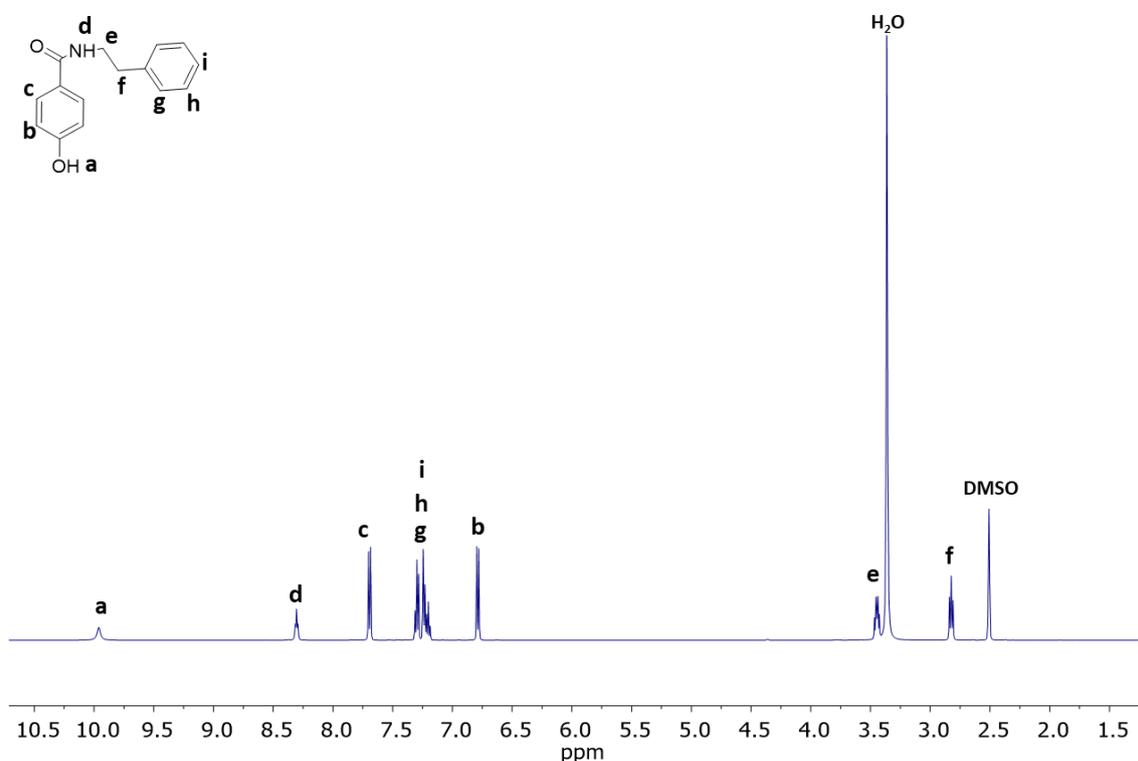
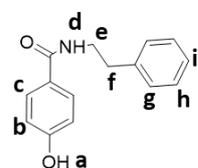




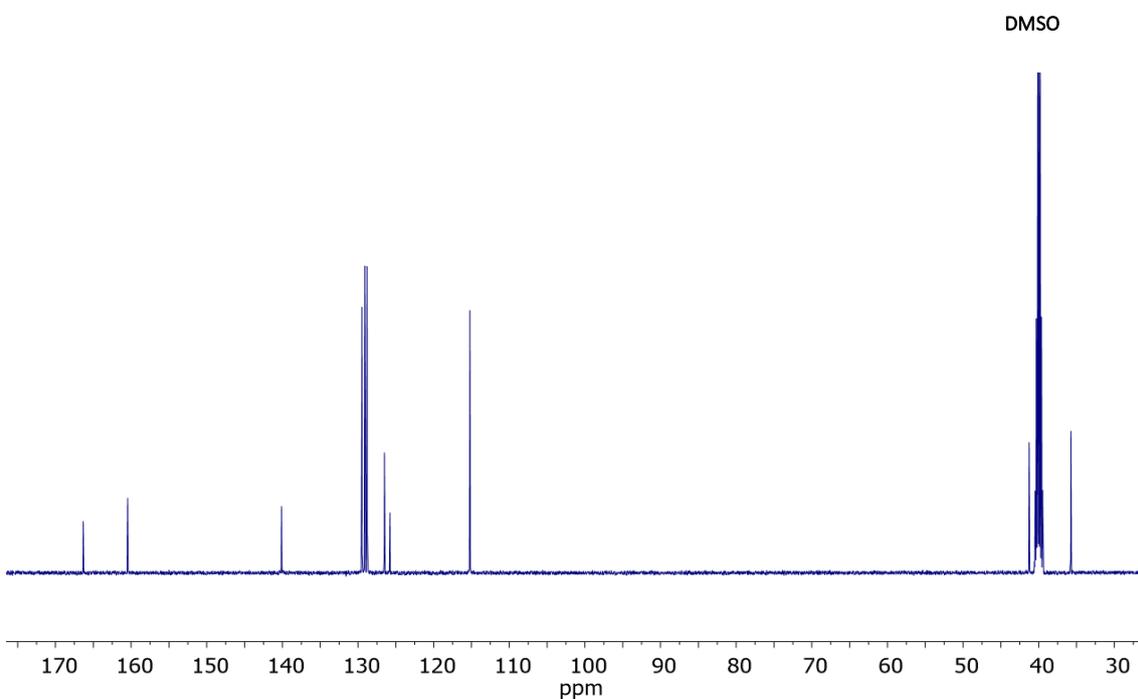
N-bencil-4-hidroxibenzamida (15)



4-Hidroxi-N-fenetilbenzamida (16)



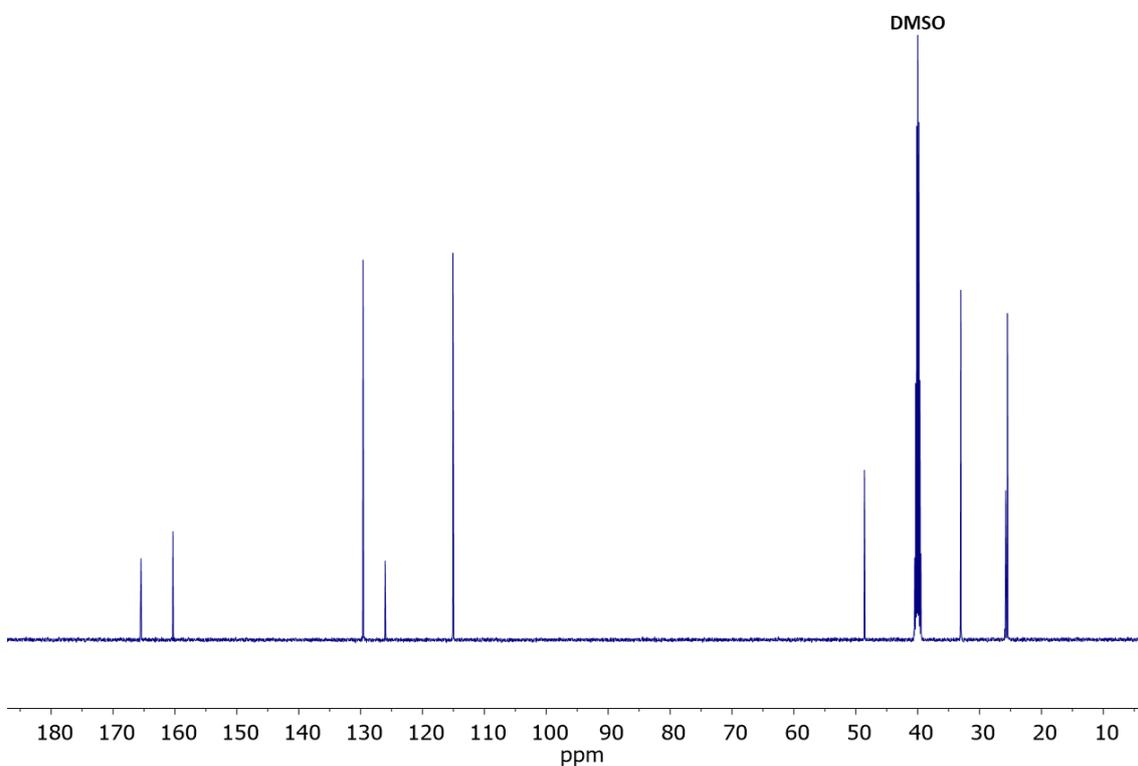
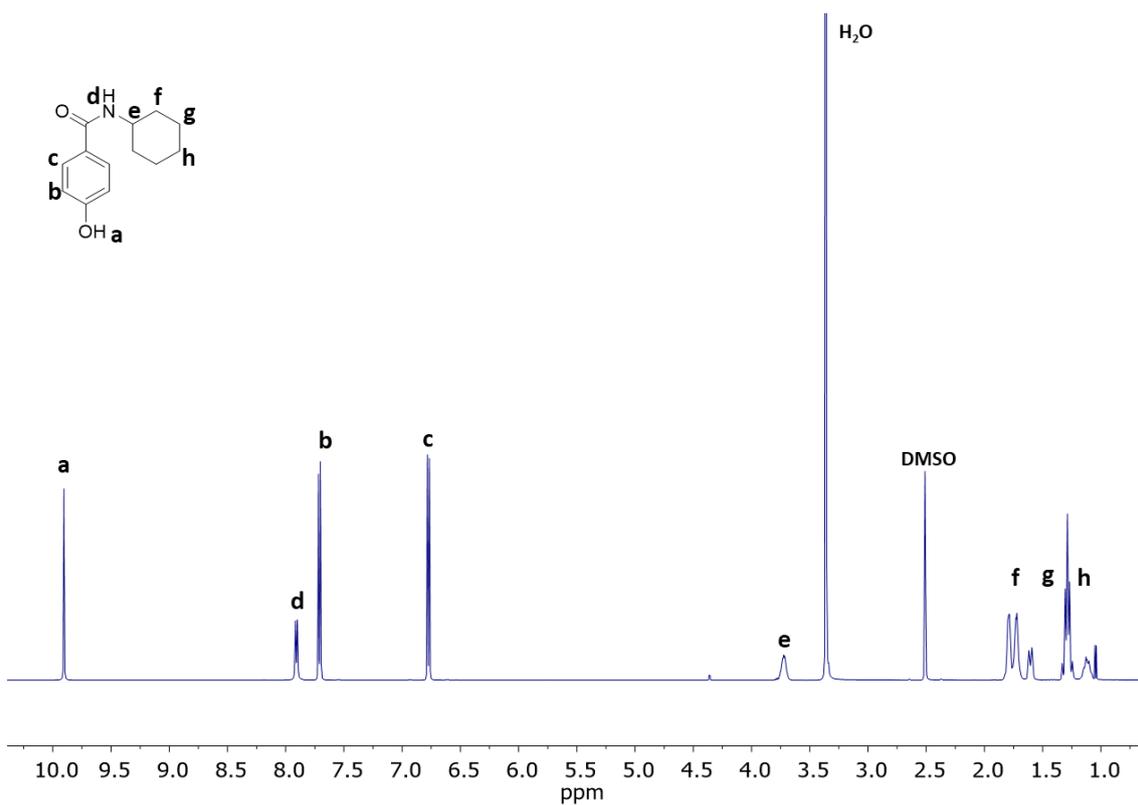
^1H RMN (DMSO- d_6) δ 9.96 (s, 1H), 8.30 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.73 – 7.67 (m, 2H), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.26 – 7.17 (m, 3H), 6.81 – 6.75 (m, 2H), 3.45 (dt, J = 8.1, 6.0 Hz, 2H), 2.82 (t, J = 7.5 Hz, 2H).



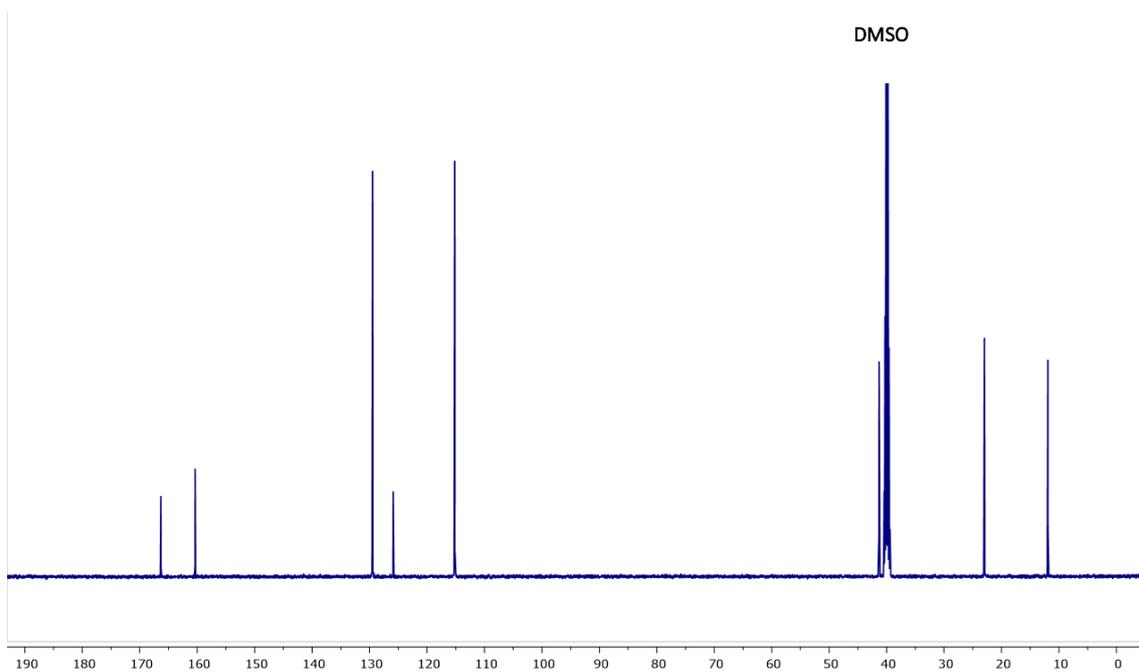
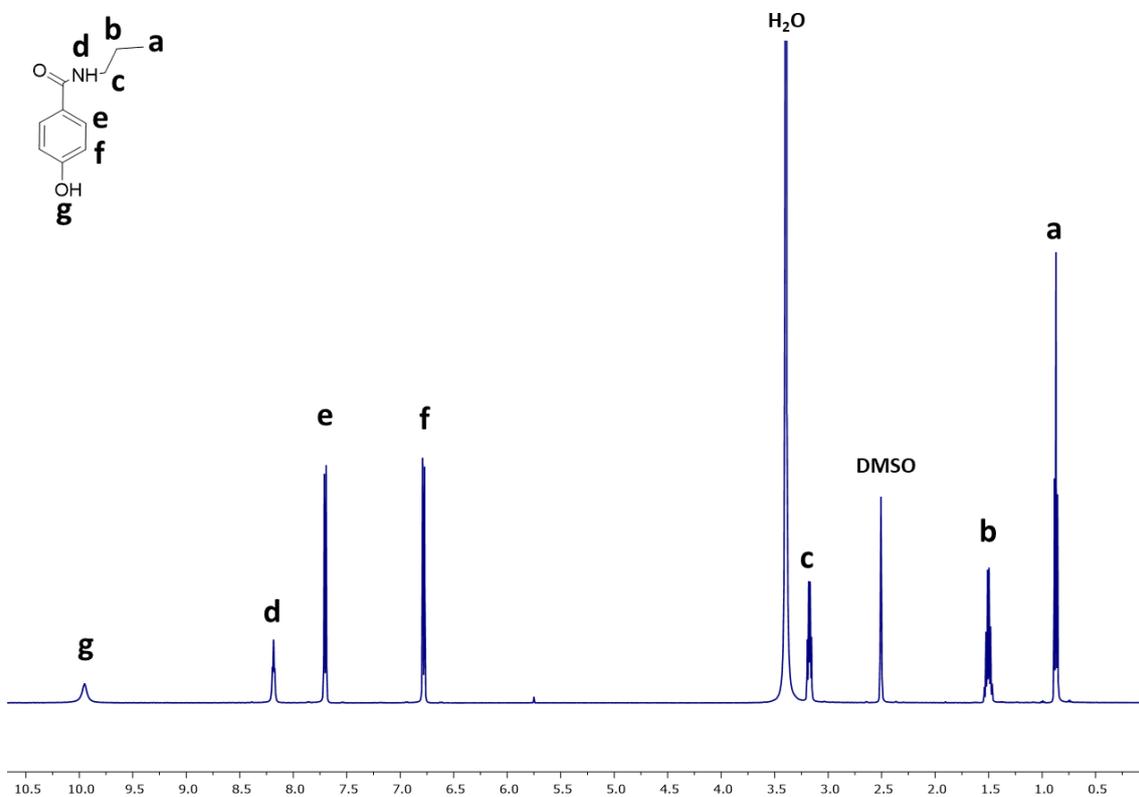
^{13}C RMN (DMSO) δ 166.33, 160.46, 140.12, 129.47, 129.10, 128.79, 126.51, 125.77, 115.20, 41.26, 35.74.



4-Hidroxi-N-ciclohexilbenzamida (17)

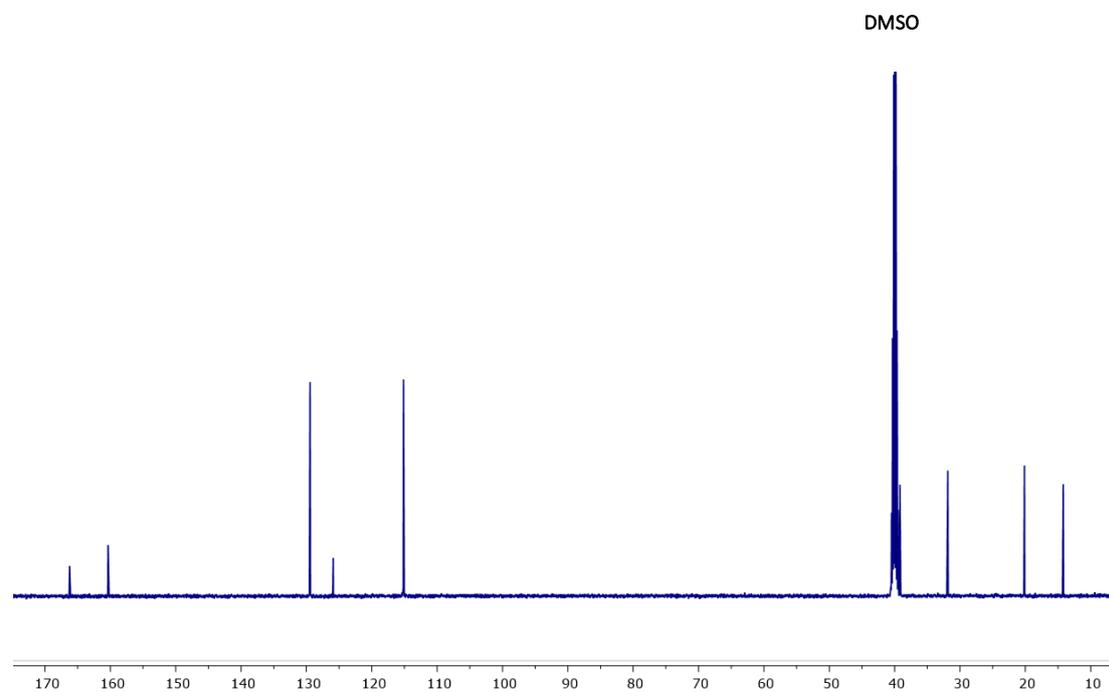
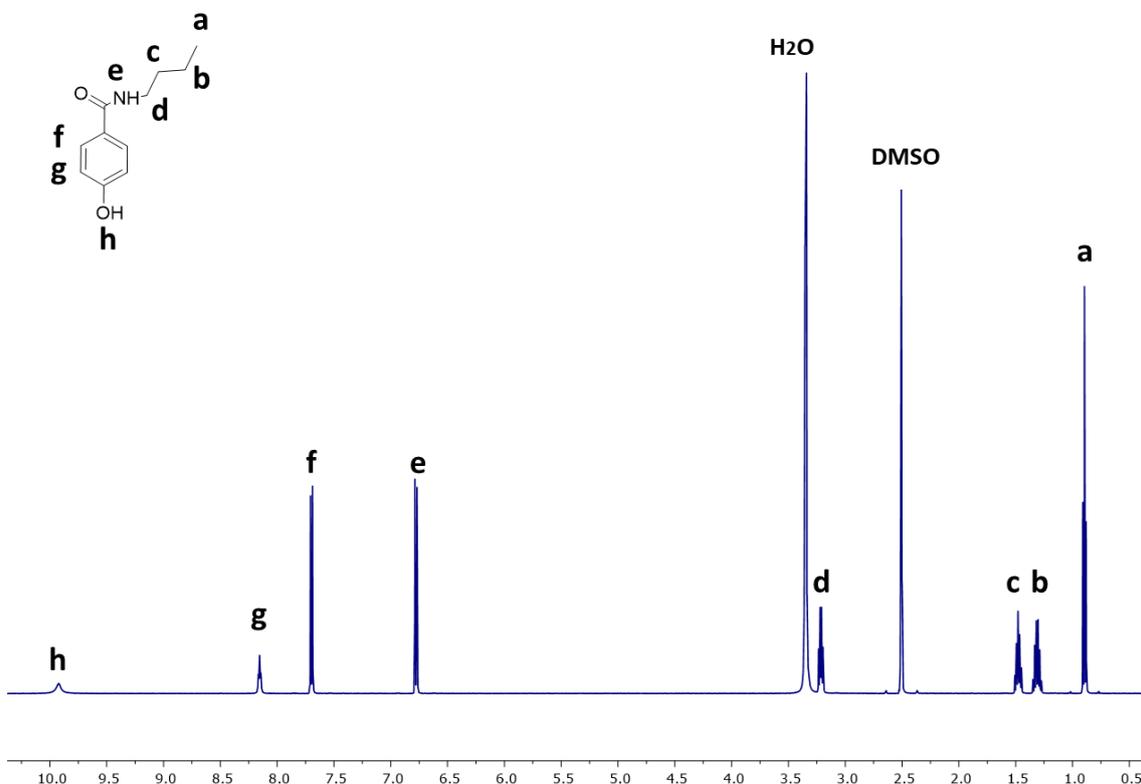


4-Hidroxi-N-propilbenzamida (18)





N-butil-4-hidroxi-benzamida (19)



¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 166.24, 160.37, 129.46, 125.91, 115.15, 39.19, 31.87, 20.14, 14.22.