

Descubrimiento de nuevos anticonvulsivos que actúan mediante interacciones con canales iónicos

Manuel Augusto Llanos

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”
Directora: Prof. Dra. Luciana Gavernet. Co-director: Prof. Dr. Pedro Martín.

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
e-mail: manu.llanos@gmail.com

Recibido: 29 de septiembre de 2023

Aceptado: 18 de octubre de 2023

La epilepsia es una enfermedad caracterizada por la presencia recurrente de convulsiones, con las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales que esto implica. Esta patología afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo, lo que la convierte en la segunda enfermedad neurológica más común a nivel global. La gran mayoría de los afectados viven en países de bajos ingresos y como consecuencia, casi el 75% de ellos no reciben un tratamiento adecuado. Aun cuando la farmacoterapia es el tratamiento de primera línea para esta patología, aproximadamente un 30% de los pacientes no responden a las terapias farmacológicas existentes. Este contexto motiva la búsqueda constante de nuevos fármacos anticonvulsivos (FACs) más seguros y mejor tolerados que superen el problema de la farmacorresistencia.

Esta Tesis Doctoral se propuso como objetivo identificar compuestos *multitarget* con potencial actividad anticonvulsiva, que actúen simultáneamente sobre el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) y el canal de sodio operado por voltaje isoforma 1.2 (NaV1.2).

Para ello, se recurrió a una estrategia de reposicionamiento de fármacos asistida por computadora. Específicamente, se desarrollaron modelos predictivos basados en la estructura de los ligandos (QSAR) y del receptor (docking molecular) para ambos blancos moleculares. Durante esta etapa, diversas estrategias de modelado y algoritmos fueron evaluados de manera sistemática, poniendo especial énfasis en la validación de los mismos. Finalmente, los mejores

modelos se aplicaron en una campaña de cribado virtual sobre la base de datos DrugBank, con el objetivo de reposicionar fármacos ya aprobados como FACs. Montelukast, Novobiocina y Cinarizina fueron seleccionados para ser evaluados experimentalmente mediante la técnica de Patch Clamp, en un sistema de expresión heterólogo en células HEK293.

Todos ellos demostraron una potente actividad inhibitoria sobre ambos canales iónicos, lo cual valida la capacidad predictiva de los modelos. La combinación de metodologías *in silico*, basadas en la estructura de los ligandos y del receptor demostró ser un enfoque útil para la identificación de compuestos *multitarget*, en el contexto de una enfermedad compleja como la epilepsia. En el caso particular del canal TRPV1, la estrategia de reposicionamiento propuesta permitió identificar tres nuevos quimiotipos de inhibidores, con una potencia nanomolar y sin efecto sobre la temperatura corporal en humanos.

La actividad anticonvulsiva de estos fármacos fue evaluada en tres modelos murinos de crisis agudas (MES, 6-hz y PTZ) y un modelo genético de crisis audiogénicas en hamsters (GASHSal). Todos ellos demostraron actividad en al menos uno de estos ensayos y ninguno presentó signos de neurotoxicidad evidenciada mediante el test de Rotorod.

Aun cuando puedan existir otros mecanismos de acción asociados a la actividad anticonvulsiva reportada para estas moléculas, la modulación conjunta de los canales TRPV1 y NaV1.2 emerge como una estrategia promisoriosa para el desarrollo de nuevos FACs, más eficaces, seguros y mejor tolerados.

--

Discovery of new anticonvulsants that act through interactions with ion channels

Epilepsy is a disease characterized by the recurrent presence of seizures, with the neurobiological, cognitive, psychological and social consequences that this implies. It affects more than 50 million people worldwide, which makes it the second most common neurological disease globally. The vast majority of those affected live in low-income countries and as a consequence nearly 75% of them do not receive appropriate treatment. Pharmacotherapy is the first-line treatment for this pathology.

However, approximately 30% of patients do not respond to existing pharmacological therapies. This motivates the constant search for safer and better tolerated anticonvulsant drugs

(ACDs) that overcome the drug resistance problem. In this regard, this doctoral thesis aims to find multitarget compounds that act simultaneously on TRPV1 and NaV1.2 channels, with potential anticonvulsant activity *in vivo*, through a computer-aided drug repositioning strategy. For both molecular targets ligand- (QSAR) and structure-based (docking and molecular dynamics) predictive models were developed. The ensemble of models was applied in a virtual screening campaign over the DrugBank database, aiming to repurpose already approved drugs as ACDs, and three candidates were selected for experimental testing: Montelukast, Novobiocin and Cinnarizine. All of them demonstrated a potent inhibitory activity on both targets, measured by the patch clamp technique on a heterologous expression system in HEK293 cells. Additionally, the candidates were tested in four animal models of seizures: MES, 6-hz, PTZ, and GASH:Sal. All drugs exhibited anticonvulsant activity in at least one of these models, and none of them showed signs of neurotoxicity in the Rotorod test.

The combination of *in silico* methodologies, based on the structure of the ligands and the receptor, proved to be a useful approach for the identification of *multitarget* compounds in the context of a disease such as Epilepsy. Moreover, the joint modulation of TRPV1 and NaV1.2 channels emerge as a promising strategy for the development of novel ACDs.

—