

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor

Diseño y síntesis de fármacos con acción en el sistema nervioso central. Sulfamidas anticonvulsivas.

Lic. Luciana Gavernet

Directores:

Dra. Guillermina Lucía Estiú
Dr. Luis Enrique Bruno Blanch

Agradezco al Dr. Eduardo Castro por su colaboración para la realización de esta investigación. A mis directores por sus aportes, en particular al Dr. Bruno Blanch por brindarme su apoyo y estímulo cotidiano. A mis compañeros de laboratorio, porque hacen que ir a trabajar sea divertido. Quisiera dedicar este trabajo, como cada cosa en mi vida, a mi familia. En especial a mis abuelos, a mis padres, a mis hermanas y a Mariano.

Objetivos de esta Investigación

Este trabajo de tesis tiene como objetivo principal el *descubrimiento de nuevos fármacos antiepilépticos*. El elevado número de personas en el mundo que padecen epilepsia, así como la ineficacia de los tratamientos disponibles en un alto porcentaje de pacientes, justifica ampliamente el esfuerzo invertido en esta investigación. Dentro de este contexto surge la idea de abordar el problema mediante una metodología interdisciplinaria, haciendo uso de herramientas provenientes de diferentes áreas de la ciencia como son la química computacional, la química orgánica, y la farmacología.

En los primeros dos capítulos de este trabajo se consideran aspectos generales; ya sea relacionados con el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas (capítulo 1) o con análisis del objetivo terapéutico planteado, la epilepsia, y los problemas de su tratamiento actual (capítulo 2).

En los capítulos subsiguientes se detallan las metodologías aplicadas, los resultados obtenidos y el análisis de los mismos.

En cuanto a los objetivos particulares, estos pueden enunciarse de la siguiente manera:

- ❖ Planteo y aplicación de una metodología indirecta de diseño racional basada en las relaciones estructura-actividad cuantitativas. Elección del conjunto inicial de trabajo y del tipo de acción antiepiléptica buscada.
- ❖ Definición de las características electrónicas y estructurales necesarias para la actividad (farmacóforo).
- ❖ Diseño de nuevas estructuras en base al farmacóforo propuesto y a la aplicación de estrategias tendientes a la optimización estructural de compuestos activos (reemplazo bioisostérico y simplificación de estructura)
- ❖ Síntesis de los compuestos.
- ❖ Evaluación biológica.
- ❖ Análisis de las estructuras activas. Planteo de nuevas relaciones estructura-actividad que incluyen las nuevas estructuras.

INDICE

CAPITULO 1. DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE DROGAS.	1
Descubrimiento de fármacos.	1
Modificación estructural de una molécula activa.	4
Bioisosterismo	6
Química Computacional como herramienta para el descubrimiento de nuevas drogas.	9
Referencias del capítulo 1	11
CAPITULO 2. EPILEPSIA Y DROGAS ANTIEPILEPTICAS.	13
Terminología.	13
Consecuencias Sociales.	13
Algunos números.	14
Causas de la epilepsia.	15
Tipos de crisis epilépticas.	16
Diagnóstico.	18
Tratamiento.	20
Drogas Antiepilépticas.	23
Historia.	23
Segunda generación de drogas antiepilépticas.	28
Drogas en desarrollo.	30
Mecanismos de acción de las drogas antiepilépticas.	32
Canales iónicos.	32
Canales de sodio.	33
Canales de calcio.	34
Canales de potasio.	34
Neurotransmisores excitatorios.	35
Procesos de inhibición sináptica.	35
Referencias del capítulo 2.	37
CAPITULO 3. DISEÑO RACIONAL DE NUEVAS DROGAS CON ACCION ANTICONVULSIVA	40
Diseño racional de fármacos.	40
Patrón farmacofórico.	41

Análisis QSAR.	42
Análisis 3D-QSAR: CoMFA.	45
Optimización de geometría.	48
DISEÑO RACIONAL DE DROGAS ANTICONVULSIVAS	49
Perfil farmacológico buscado.	51
Identificación del patrón farmacofórico. Antecedentes	52
Conjunto de trabajo y alineamiento.	56
Parámetros usados en CoMFA	60
Análisis PLS.	61
Visualización de los resultados QSAR.	62
Diseño racional y reemplazo bioisostérico.	67
Peptidomiméticos.	69
Compuestos sintetizados.	71
Referencias del capítulo 3.	73
CAPITULO 4. SÍNTESIS DE SULFAMIDAS	79
Consideraciones generales.	80
Antecedentes químicos: métodos de Síntesis.	81
Trabajo experimental de síntesis.	90
Referencias del capítulo 4	118
CAPITULO 5. EVALUACIÓN ANTICONVULSIVA Y NEUROTRÓXICA	121
Consideraciones generales.	121
Programa de ensayos preclínicos.	124
Trabajo experimental de evaluación biológica. Animales.	128
Soluciones a ensayar: preparación y administración.	129
Ensayo MES.	130
Ensayo PTZ.	131
Ensayo PIC.	132
Ensayo de Rotorod.	133
Fase 1. Identificación de la acción anticonvulsiva y neurotóxica de sulfamida y derivados.	133
Fase 2. Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica.	136
Referencias del capítulo 4.	143
CAPITULO 6. RESULTADOS.	145
Análisis SAR de los compuestos evaluados	145
Validación del farmacóforo propuesto	148
Análisis QSAR de los compuestos más activos	150
Consideraciones energéticas	155

Referencias del capítulo 6	157
CAPITULO 7. CONCLUSIONES	160
ANEXO. ESTUDIO MECANISTICO DE LA SÍNTESIS DE SULFAMIDAS.	163
Consideraciones generales.	163
Rutas sintéticas.	163
Métodos de cálculo.	164
Reacción mediada por el uso de Py.	165
Reacción directa.	169
Conclusiones.	171
Referencias del anexo.	172

Referencias del capítulo 6	157
CONCLUSIONES	160
ANEXO. ESTUDIO MECANISTICO DE LA SÍNTESIS DE SULFAMIDAS.	163
Consideraciones generales.	163
Rutas sintéticas.	163
Métodos de cálculo.	164
Reacción mediada por el uso de Py.	165
Reacción directa.	169
Conclusiones.	171
Referencias del anexo.	172

CAPITULO 1

DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE DROGAS

Descubrimiento de fármacos.

Los medicamentos han contribuido extraordinariamente a mejorar la calidad de vida desde los comienzos de la humanidad. Actualmente contamos con gran diversidad de fármacos como resultado del exitoso empleo de distintas metodologías de búsqueda de nuevas drogas, las cuales se han ido mejorando a través del tiempo.

En la historia han existido *hechos fortuitos o accidentales* que han derivado en el descubrimiento de compuestos activos.¹⁻³ Sin embargo, grandes avances deben reconocerse a mentes preparadas para interpretar y tomar ventaja de una observación o hecho casual. Como ejemplo podemos citar el descubrimiento de la penicilina por *Alexander Fleming*, resultado de la observación de un cultivo bacteriano expuesto al aire por varias semanas e infectado por una colonia de hongos.⁴

Actualmente se cuenta con nuevas y diversas tecnologías aptas para el descubrimiento de nuevos compuestos activos, que reemplazan a la intuición o la mera observación. Nuevas técnicas experimentales relacionadas principalmente con la química orgánica y la biología molecular, así como el uso de las aplicaciones de la informática son, hoy por hoy, prácticas corrientes en los laboratorios de química medicinal. Sin embargo, los *productos naturales* fueron por muchos años la mayor fuente de nuevas drogas.⁵⁻⁹ En la mayoría de los casos, el conocimiento de la actividad biológica de algún producto natural parte de la medicina popular dado que, en el pasado, las civilizaciones dependían enormemente de su ecosistema para curar sus enfermedades. Numerosas pociones y brebajes fueron analizados tras observar el efecto que causaban. Se encontraron así compuestos no activos, peligrosos o que actuaban como

observación de agentes antibacterianos e hipoglicemicos, debido a que presentan este efecto a altas dosis (figura 1.2).⁴

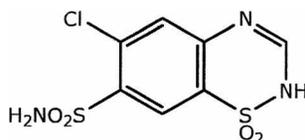


Figura 1.2. Estructura de la clorotiazida.

Por otra parte, los *ligandos naturales o moduladores de un receptor* dado han sido utilizados en algunos casos como compuestos de partida para el diseño de fármacos. Los neurotransmisores naturales adrenalina y noradrenalina, por ejemplo, fueron usadas como estructuras de partida que iniciaron el desarrollo de compuestos adrenérgicos β -agonistas como el salbutamol, la dobutamina y el xamoterol.⁴ En forma semejante pueden usarse los ligandos naturales, o el sustrato de la enzima, para el diseño de inhibidores.⁴

Las nuevas drogas pueden surgir sin la necesidad de conocer a priori el mecanismo de acción por el cual funcionan. Un ejemplo de esto es el uso de la *exploración sistemática*: Un conjunto de compuestos arbitrariamente elegidos por su diversidad se somete a una serie de evaluaciones biológicas a fin de determinar que actividad biológica poseen. Esta estrategia se utilizó inicialmente con productos naturales, y actualmente se aplica tanto a compuestos de origen natural como sintéticos

Las industrias farmacéuticas sintetizan miles de compuestos que luego no son incluidos en el mercado, pero que quedan almacenados en sus bancos de moléculas y disponibles para el testeo de diferentes actividades. Estas librerías de datos se emplean actualmente en forma rutinaria en las primeras etapas del diseño de nuevos fármacos. La metodología de síntesis que origina estos bancos de datos emplea química combinatoria,¹¹ que permite la

La química combinatoria ha sido una de las áreas más rápidamente desarrolladas por la industria farmacéutica, y constituye en si misma una rama de la química moderna. Una de sus técnicas mas importantes es la síntesis en fase sólida, donde la reacción química se produce sobre un soporte sólido. Esto facilita enormemente las etapas de aislamiento y purificación; además de permitir la automatización del proceso.¹¹

Capítulo 1

preparación simultánea y rápida de una gran cantidad de compuestos.

En contrapartida a la exploración sistemática, la tendencia actual para el descubrimiento de fármacos se orienta a un *diseño racional*, basado en principio en el conocimiento a nivel molecular de la causa de la disfunción patológica. Este tipo de enfoque está basado en fundamentos lógicos, a diferencia de otros métodos fundamentados en estrategias de prueba y error. En este trabajo se emplea esta metodología, por lo que esta se describirá en mayor detalle en el capítulo 3.

El diseño racional se inicia usualmente en el conocimiento estructural del receptor responsable de la enfermedad o de las drogas que manifiestan acción sobre este, lo que permite diseñar compuestos capaces de interactuar con él. El compuesto así diseñado, si algo activo, debe mejorarse en su potencia, especificidad y/o disminuir sus efectos secundarios. La *modificación estructural de una molécula activa* se basa en la preparación de estructuras relacionadas, mediante transformaciones químicas.¹² Modificaciones estructurales se utilizan también con objetivos más estrechamente vinculados a la industria farmacéutica, como el uso de vías sintéticas más convenientes, o la mejora en la formulación del medicamento para su mejor manejo o administración.⁴ Esto no se lleva a cabo mediante cambios efectuados al azar: se cuenta con una serie de criterios establecidos durante años de investigación que orientan la sustitución de determinados grupos de la estructura modelo.¹³

A continuación se enumeran las herramientas más usadas para la transformación estructural de compuestos que ya presentan la actividad deseada.

Modificación estructural de una molécula activa.

Existen numerosas estrategias que pueden usarse para aumentar las interacciones entre una droga y su receptor. Entre ellas, la *variación de sustituyentes* accesibles desde el punto de vista sintético es una herramienta muy común.

El análisis del efecto de la sustitución de grupos alquilo da información acerca de la influencia de la longitud, tamaño y volumen de las cadenas carbonadas en la actividad. Si estas interactúan con un bolsillo lipofílico del receptor, su variación dará idea de las dimensiones del mismo.

La sustitución sobre compuestos aromáticos también resulta sencilla. Puede implicar, por ejemplo, el reemplazo de grupos donadores por aceptores de electrones y viceversa; así como cambios de posición en los anillos. De este modo

diferentes propiedades estéricas, electrónicas e hidrofílicas pueden alterarse para detectar su influencia en la actividad.

Otra estrategia es la modificación de la *extensión de la estructura*, que involucra la inclusión de grupos alquilo o arilo, para encontrar nuevas interacciones con el receptor mediante regiones lipofílicas adicionales. También pueden incluirse otras funciones o grupos capaces de generar uniones adicionales del tipo puentes de hidrógeno y/o iónicas con el receptor (figura 1.3).

Cuando las drogas poseen dos sitios de unión, es posible buscar una interacción óptima mediante un *cambio en la longitud de la cadena* que los une.

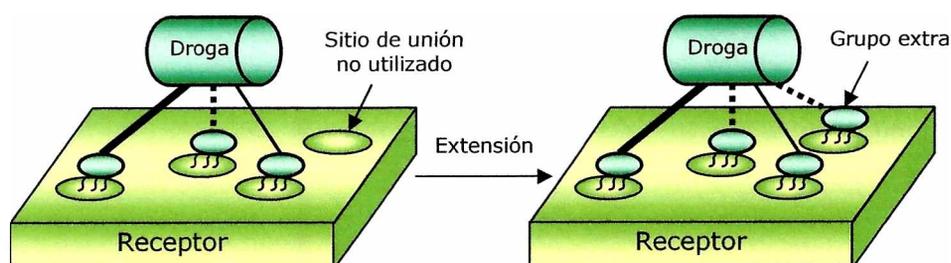


Figura 1.3. Extensión de la estructura para inclusión de nuevos sitios de unión.

Del mismo modo, la *expansión o contracción de anillos aromáticos* mediante una alteración del tamaño del grupo aromático localiza a los átomos en posiciones relativas diferentes, afectando la eficiencia de la interacción con el sitio activo. Además, la extensión de la aromaticidad mediante la *fusión de anillos* puede resultar en un incremento de la interacción y la selectividad.

Otra modificación que puede hacerse con este tipo de estructuras es la *inclusión o cambio de posición de heteroátomos* en los anillos. Esto trae como ventaja la posibilidad de nuevas uniones del tipo puente de hidrógeno.

La *rigidización de la molécula* es otra opción para el aumento de la actividad y la disminución de efectos secundarios. En este caso se fija la molécula o una parte de ella en una conformación incapaz de cambiar. Como consecuencia de esto se eliminan las interacciones que adquirirían otras conformaciones posibles en un compuesto más flexible y pueden eliminarse efectos no deseados. Además, la actividad se incrementara si la droga ejerce su acción con el receptor en esa conformación, evitando el costo energético asociado a adoptarla.

La *simplificación de la estructura* es una estrategia que suele utilizarse cuando la droga es muy compleja. El conocimiento de los requerimientos mínimos necesarios para la actividad permite el descarte de las porciones no esenciales sin

Capítulo 1

perdida de la acción buscada. La ventaja del manejo de compuestos más sencillos radica en la factibilidad y disponibilidad de la síntesis en laboratorios y a escala industrial. En general se utiliza cuando el compuesto activo proviene de una fuente natural, y su síntesis es impracticable dada la complejidad en su estructura.

El concepto de bioisosterismo también ha sido usado en el diseño y optimización de compuestos, con el objetivo de variar las propiedades de la molécula como tamaño, polaridad, distribución electrónica y afinidad. En este trabajo se recurrió tanto a la simplificación estructural como a este tipo de estrategia, por lo que se explicara más detalladamente a continuación.

Bioisosterismo.

Ciertos átomos o grupos funcionales presentan propiedades fisicoquímicas comunes. En 1919 Langmuir observó que las propiedades físicas de compuestos como N_2 y CO eran similares y dedujo mediante la teoría del octeto que esto se debe a que presentan el mismo arreglo de electrones.¹⁴ Aplicando este concepto identificó 21 grupos de isósteros, algunos de los cuales se listan en la tabla 1.1.

Esta idea inicial fue extendida posteriormente por Grimm, quien enunció *la ley de desplazamiento del hidruro*.¹⁵⁻¹⁶ Según esta ley, un átomo es isótero de la especie que forma mediante la adición de un hidrógeno y dos electrones (un hidruro) al átomo que le precede en el sistema periódico.

Grupo	Isótero
1	H^- , He, Li^+
2	O^{2-} , F^- , Ne, Na^+ , Mg^{+2} , Al^{+3}
3	S^{2-} , Cl^- , Ar, K^+ , Ca^{+2}
8	N_2 , CO, CN^-
9	CH_4 , NH_4^+
10	CO_2 , N_2O , N_3^- , CON^-

Tabla 1.1. Algunos grupos de isósteros identificados por Langmuir.¹³

En la tabla 1.2 se representan los isósteros de acuerdo la definición de Grimm.

C	N	O	F	Ne	Na
	CH	NH	OH	FH	-
		CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺
			CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺
				CH ₄	NH ₄ ⁺

Tabla 1.2. Grupos de isómeros según la ley de desplazamiento del hidruro de Grimm.¹⁴⁻¹⁵

Más tarde, Erlenmeyer¹⁷ reformuló este concepto considerando isómeros a átomos, iones y moléculas que son idénticos en su capa electrónica externa ("isoelectronicidad periférica"). En la tabla 1.3 se listan algunos ejemplos.

Número de electrones periféricos				
4	5	6	7	8
N ⁺	P	S	Cl	ClH
P ⁺	As	Se	Br	BrH
S ⁺	Sb	Te	I	IH
As ⁺		PH	SH	SH ₂
Sb ⁺			PH ₂	PH ₃

Tabla 1.3. Algunos grupos de isómeros según Erlenmeyer.¹⁶

Todas estas ideas se encuadran dentro del isosterismo clásico. Cuando se incluyen otros criterios para la definición (como geometría, solubilidad, acidez, reactividad química, polaridad, capacidad de formar puentes de hidrógeno) se llega a equivalencias correspondientes a un isosterismo no clásico.¹⁸

En cuanto a la vinculación con la actividad biológica, resulta razonable pensar que compuestos con una misma acción deban poseer también alguno de estos tipos de similitud, al menos en las agrupaciones comunes a todos que se muestran responsables de la actividad.

Capítulo 1

Juntando todos los conceptos previos, se definen como grupos *bioisósteros* a moléculas o grupos que producen una respuesta biológica semejante o antagónica, por poseer propiedades físicas y/o químicas análogas.¹⁹

El bioisosterismo es una herramienta muy usada en la química medicinal para la optimización estructural y el diseño de nuevas moléculas. La aplicación de sus principios ha conducido al descubrimiento de un gran número de fármacos.^{18, 20-23} Como ejemplos podemos citar las oxazolidinadionas y las hidantoínas que son bioisósteros clásicos con acción anticonvulsiva (figura 1.4).¹⁸



Figura 1.4. Ejemplo de fármacos diseñados por aplicación de los principios del isosterismo. Compuestos anticonvulsivantes.

En este trabajo se aplicará el concepto de bioisósterismo para el diseño de nuevos compuestos anticonvulsivos, en conjunto con el empleo de otras metodologías indirectas como son las relaciones cuantitativas entre estructura y actividad (ver capítulo 2 de esta tesis).

Además de las características puramente estructurales también deben tenerse en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los compuestos para optimizar la estructura. Se espera que las drogas presenten un equilibrio entre sus propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas. Las drogas demasiado polares se excretan muy fácilmente por el riñón y no son capaces de atravesar eficientemente las membranas celulares. Los compuestos muy lipofílicos son absorbidos en el tracto gastrointestinal, dada su baja solubilidad en agua. Además, si alcanzan el torrente sanguíneo es posible que sean removidas en los tejidos grasos del cuerpo.

La experiencia muestra que la búsqueda de una eficiente biodisponibilidad vía oral de un compuesto ya optimizado en su potencia, es una de las etapas más lentas y laboriosas del proceso de comercialización de un compuesto nuevo. Estas observaciones llevaron a la creación de la *regla de los 5* de Lipinski.²⁴ Esta determina que las estructuras más propensas a presentar problemas de solubilidad y/o permeabilidad son las que poseen:

- a) valores de log P mayores a 5
- b) pesos moleculares mayores a 500
- c) mas de 5 grupos donores de enlaces hidrógeno (expresados como la suma de grupos NH y OH)
- d) mas de 10 grupos aceptores de enlaces de hidrogeno (expresados como la suma de atomos de N y O)

Esta regla cuantifica de algún modo el compromiso que debe existir entre los efectos hidrofóbicos e hidrofílicos. Una alternativa para un transporte más eficiente lo constituyen las prodrogas, las cuales favorecen la distribución y localización de la droga en el sitio de acción. Esto trae aparejado una disminución de la dosis necesaria para lograr el mismo efecto y, consecuentemente, menores efectos colaterales.

En los procedimientos experimentales, usualmente miles de compuestos deben ser sintetizados para lograr identificar un líder, el cual puede posteriormente ser descartado por sus propiedades toxicológicas y farmacológicas. En este contexto, las metodologías de diseño basadas en cálculos computacionales resultan una alternativa muy útil y rápida, tanto para el descubrimiento de nuevas drogas como para su posterior optimización estructural. En este trabajo se hizo uso de esta herramienta, cuyas características se detallan a continuación.

Química Computacional como herramienta para el descubrimiento de nuevas drogas.

El avance de la biología molecular (particularmente de las técnicas de secuenciación y de ADN recombinante) en conjunto con la espectroscopia de rayos X y RMN, han permitido un mayor conocimiento de los sistemas biológicos a escala microscópica. Mediante algoritmos o programas computacionales estos sistemas pueden simularse obteniéndose mayor información, algunas veces inaccesible mediante un método experimental. La química computacional permite también calcular datos relacionados con la estructura y las propiedades de las moléculas activas, como son las energías conformacionales, cargas, momentos dipolares, calores de formación, etc.

Los procedimientos computacionales involucrados en los cálculos se sustentan en principios de la mecánica clásica (métodos de Mecánica Molecular) o de la mecánica cuántica (métodos Químico Cuánticos).

Capítulo 1

En los métodos de *Mecánica Molecular* (MM) se considera que los átomos interactúan mediante potenciales parametrizados previamente, que definen un "campo de fuerza". Los electrones de las moléculas no están definidos explícitamente, por lo que esta metodología no permite el cálculo de propiedades electrónicas o en el análisis de cualquier proceso que involucre transferencias de carga.

La MM tiene especial aplicación en sistemas con un gran número de átomos como son las biomoléculas, donde un tratamiento químico cuántico implicaría un muy elevado costo computacional.

Por otra parte, los métodos *Químico Cuánticos* (QM) se basan en las leyes de la física cuántica,²⁵ aportando resultados de mayor calidad que los basados en la metodología MM.

La resolución de la ecuación de Schöedinger aplicada a una molécula brinda información sobre su energía y su estructura, así como sus características electrónicas, magnéticas y espectroscópicas. Sin embargo para resolver esta ecuación en sistemas de más de un electrón deben hacerse aproximaciones.

Cuando esas aproximaciones derivan de la teoría cuántica y no implican la incorporación de parámetros ajustables se dice que el método utilizado es del tipo ab-initio. La simplificación paramétrica de la ecuación de Schöedinger y la sola consideración de electrones de valencia define las aproximaciones más importantes de los métodos semiempíricos.

En los métodos ab-initio pueden usarse funciones base de distinta calidad para representar la función de onda del sistema. Una descripción relativamente buena la proporciona la función determinantal de Slater, la cual tiene en cuenta las condiciones de normalización y antisimetría.²⁵ Esta función incluye orbitales moleculares que son funciones del tipo exponencial para cada electrón; por lo que su resolución matemática resulta compleja. Es por eso que estas se pueden aproximar mediante funciones de Gauss. Las bases 6-31G** son un ejemplo para este tipo de aproximación, en las cuales se incluyen 6 gaussianas para la descripción interna, 3 para la capa de valencia interna, 1 para la externa, 6 funciones d para los átomos no hidrogenoides y funciones p para cada hidrógeno.

Otra alternativa de cálculo es la teoría de funcionales de la densidad (DFT), basada en los formalismos que involucran los efectos de correlación electrónica de forma más simple que en los métodos ab initio tradicionales; obteniéndose mejores resultados que estos últimos a igual esfuerzo computacional.²⁶

Se han definido una gran variedad de funcionales, entre los cuales se encuentran los funcionales híbridos resultantes de la formulación triparamétrica

de Becke (B3LYP); los cuales han demostrado ser mejores que los funcionales locales de intercambio o los no locales corregidos por gradiente.

La aplicación de QM a sistemas biológicos se encuentra limitada por la velocidad de cálculo, aun con la constante evolución de la industria informática. Es por eso que comenzó a utilizarse para estos sistemas una combinación de ambos formalismos.²⁷⁻²⁸ Las metodologías mixtas (QM-MM) consisten en el tratamiento QM de una region de la molécula, que contiene usualmente el sitio activo, el cual debe describirse cuánticamente debido a la posibilidad de transferencia de electrones, efectos de polarización, transferencia de protones, ruptura y formación de enlaces, etc. El resto de la molécula (generalmente la region más grande) se trata a nivel MM. De este modo se puede acceder a un conocimiento más profundo de las biomoléculas a un costo computacional accesible.

Referencias del capítulo 1.

1. Stevens, G. D., *Prog. Drug Res.* **1986**, 30, 189.
2. Roberts, R. R., En *Serendipity. Accidental Discoveries in Science*. Wiley Science eds.; John Wiley & Sons Inc., New York, **1989**.
3. Sneader, W., General Principles, Vol.1. En: *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compound*, Hansch, C., eds.; Pergamon Press, Oxford, **1990**, 7.
4. Patrick G. L., Chapter 8: Drug discovery and drug development, En: *An Introduction to Medicinal Chemistry.*, 2nd Ed., Oxford University Press, New York, **2001**, 142.
5. Hylands, P.J.; Nisbet, L.J., *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1991**, 26, 259.
6. Tempesta, M.S.; King, S.R., *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1994**, 29, 325
7. Buss, A.D.; Waigh, R.D., En *Burguer's Medicinal Chemistry*, 5th Ed., vol.1, Wolf, M.E., eds.; John Wiley & Sons Inc., New York, **1995**, 983.
8. Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Coggon, P.; McPhail, A.T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2325.
9. Suffness, M., *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1993**, 28, 305.
10. Avendaño, C., Capítulo 2: Evolución de los métodos de búsqueda y descubrimiento de fármacos. En *Introducción a la Química Farmacéutica* 1^{ra} Ed.; editorial Edigrafos S. A. , Madrid, **1993**, 43-44.
11. Czarnik A. W.; DeWitt, S. H., *En A practical guide to combinatorial Chemistry*, 1st Ed.; American Chemical Society, **1997**.

Capítulo 1

12. Avendaño, C., Capítulo 3: La modificación molecular como método de búsqueda de nuevos fármacos. En *Introducción a la Química Farmacéutica* 1^{ra} Ed.; editorial Edigrafos S. A., Madrid, **1993**, 47-63.
13. Patrick G. L., Chapter 9: Drug design and drug-target interactions, En: *An Introduction to Medicinal Chemistry.*, 2nd Ed., Oxford University Press, New York, **2001**, 191.
14. Langmuir, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **1919**, 41, 1543.
15. Grimm, H. G., *Z. Electrochem.*, **1925**, 31, 474.
16. Grimm, H. G., *Naturwissenschaften*, **1929**, 17, 557.
17. Erlenmeyer, H.; Leo, M., *Helv. Chim. Acta*, **1932**, 15, 1171.
18. Avendaño, C., Capítulo 3: La modificación molecular como método de búsqueda de nuevos fármacos. En *Introducción a la Química Farmacéutica* 1^{ra} Ed.; editorial Edigrafos S. A., Madrid, **1993**, 56.
19. Friedman, H. L., *NASNRS*, **1951**, 206, 295.
20. Thornber, C. W., *Chem. Soc. Rev.*, **1979**, 8, 563.
21. Lipinski, C. A., *Annu. Rep. Med. Chem.*, **1986**, 21, 283.
22. Burger, A., *Prog. Drug Res.* **1991**, 37, 287.
23. Patani, G. A.; LaVoie E. J., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 3147.
24. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, 3.
25. Szabo, A.; Ostlund, N.S., En *Modern Quantum Chemistry*, 1st Ed.; Mc Graw-Hill Publishing Company, New York, **1989**.
26. Foresman, J.B.; Frisch, A., Chapter 6: Selecting an Appropriate Theoretical Method. En: *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2nd Ed.; Gaussian Inc., Pittsburgh PA, **1996**, 111-140.
27. Monar, G.; Merz, K. M. Jr., *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 904.
28. Orozco, M.; Luque, F. J., *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4187.

CAPITULO 2

EPILEPSIA Y DROGAS ANTIEPILEPTICAS

Terminología.

La *epilepsia* no es una enfermedad específica, sino un conjunto heterogéneo de trastornos neurológicos.¹ Las *crisis epilépticas* son la manifestación clínica de la epilepsia. Estas se originan por una descarga neuronal excesiva e incontrolada que tiene como consecuencia sensaciones, emociones y conductas extrañas; o a veces convulsiones, espasmos musculares y pérdidas de conocimiento.^{1,2}

Durante la epilepsia, el cuidadoso equilibrio entre la actividad inhibitoria y excitatoria dentro de los circuitos neuronales se ve alterado debido a ciertos tipos de agresión dirigidas al sistema nervioso central.^{1,2}

Vale aclarar que muchas personas (alrededor del 5% de la población mundial)³ han tenido una crisis epiléptica en forma aislada. Esto no se considera epilepsia, dado que no se asocia a una patología neuronal subyacente. Este término se reserva para los casos donde estas aparecen en forma recurrente e impredecible; y al conjunto de síntomas asociados se le llama *síndrome epiléptico*.¹

Las neuronas normalmente emiten señales del orden de 80 veces por segundo. Durante una crisis epiléptica este número puede llegar hasta 500 veces por segundo.² En ciertas personas esto solo ocurre ocasionalmente, pero en otras puede ocurrir hasta cientos de veces en un día.

Consecuencias Sociales.

El comportamiento causado por algunas crisis epilépticas ha contribuido a fomentar muchas supersticiones y prejuicios. Aunque Hipócrates en el año 400

Capítulo 2

AC ya sugirió que la epilepsia podía ser un desorden iniciado en el cerebro, existen creencias vigentes respecto a su origen sobrenatural.

Los efectos sociales que esto desencadena varían de acuerdo a los países y culturas, pero la discriminación a los enfermos de epilepsia es usualmente más difícil de combatir que la enfermedad misma. Por ejemplo: Según la organización mundial de la salud,⁴ en Camerún se piensa que el ataque epiléptico lo causa el demonio cuando invade el cuerpo de una persona; mientras que en Indonesia es considerada un castigo propiciado por fuerzas oscuras.

Las crisis epilépticas severas constituyen una experiencia dramática: la persona se puede caer al piso inconsciente, gritar, babear, realizar movimientos descontrolados y hasta perder el control de la vejiga.

Luego del ataque, que dura unos minutos, el paciente recobra el conocimiento, pero está agotado y aturdido.²

En Nepal se asocia con debilidad y posesión demoníaca; y los testigos del ataque epiléptico usualmente rocían agua sobre la frente de la persona o le hacen oler un zapato de cuero. En Uganda, como en muchos otros países, se piensa que la epilepsia es transmitida a través de la saliva, por lo que no se permite a los enfermos ir a restaurantes por miedo al contagio.⁴

Estos prejuicios y malas interpretaciones han influenciado en la legislación de ciertos países.⁴ Hasta 1956 en Estados Unidos se permitía la esterilización eugénica a personas con epilepsia. Además en China e India era una razón frecuente para prohibir o anular matrimonios. En Inglaterra se derogó la ley que prohibía que las personas con epilepsia se casaran recién en 1970. En Estados Unidos esta ley prevaleció hasta 1980 y en ese país hasta 1970 era legal denegar la entrada de epilépticos a restaurantes, teatros y edificios públicos.

Algunos números.

Considerada uno de los desórdenes cerebrales más comunes, la epilepsia afecta a aproximadamente 50 millones de personas en el mundo.⁵ Sin restricciones geográficas, raciales o sexuales, puede manifestarse a cualquier edad aunque es más frecuentemente diagnosticada en la infancia, la adolescencia o en la vejez.

Su incidencia es superior en países en vías de desarrollo, debido a la mayor probabilidad de experimentar daño cerebral permanente como consecuencia de algunas enfermedades, malnutrición o complicaciones prenatales.³ Se estima que el 80% de los enfermos viven en estos países.⁶

En cuanto al tratamiento, se calcula que aproximadamente el 75% de los pacientes diagnosticados pueden controlar las crisis epilépticas mediante el uso de drogas antiepilépticas o técnicas quirúrgicas.² Sin embargo, las tres cuartas partes de las personas enfermas no reciben el tratamiento adecuado por razones económicas o sociales.³

Causas de la epilepsia.

Las causas de la epilepsia están relacionadas con la alteración en el patrón de actividad neuronal normal. Cualquier factor que perturbe el equilibrio entre la actividad inhibitoria y excitatoria de estos circuitos puede ser responsable de una crisis epiléptica. En aproximadamente la mitad de los casos se desconoce su origen y se dice que estas son *idiopáticas*.²

No obstante, el resto de las crisis pueden relacionarse con problemas identificables. Uno de los más importantes son las anomalías genéticas.¹ Se cree que los genes influyen en el desarrollo de la enfermedad ya sea por la anomalía de un gen específico o por la participación de una cantidad mayor, de acuerdo al tipo de trastorno. Algunos investigadores estiman que más de 500 genes podrían intervenir en algunos casos; aunque se les atribuye un rol parcial relacionado con un aumento en la predisposición de la persona a tener convulsiones desencadenadas por factores ambientales.

Otras enfermedades asociadas al anormal funcionamiento del cerebro que también son causas de epilepsia son tumores cerebrales, hidrocefalia, alcoholismo y la enfermedad de Alzheimer. En menor medida pueden incluirse los accidentes cerebro-vasculares, los ataques cardíacos y otras condiciones médicas que privan de oxígeno al cerebro; así como enfermedades infecciosas como la meningitis, el SIDA, la encefalitis viral entre otras.

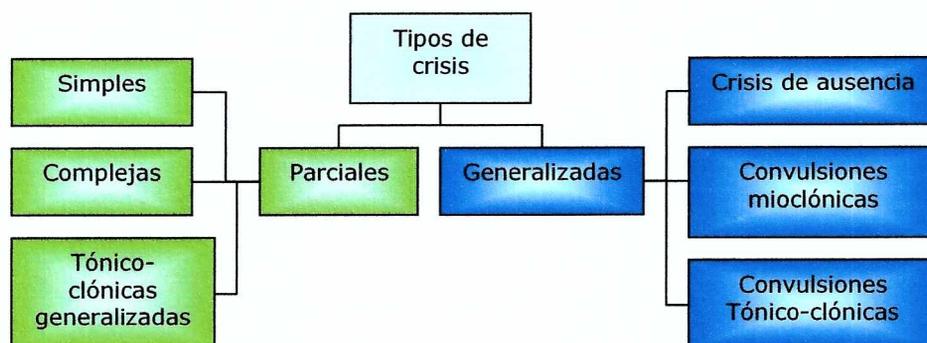
Deben destacarse las lesiones prenatales (infecciones en el embarazo, malnutrición o carencia de oxígeno), y con trastornos metabólicos y del desarrollo, como parálisis cerebral, neurofibromatosis, esclerosis tuberosa, síndrome de Landau-Kleffner y autismo como causas primarias de las crisis epilépticas.²

La falta de sueño no causa directamente epilepsia, pero es un disparador capaz de desencadenar una crisis epiléptica por primera vez, u ocasionarla en personas que de otra forma las controlan mediante medicamentos.

Otros desencadenantes externos son las lesiones cerebrales ocasionadas por accidentes, la exposición a compuestos tóxicos como plomo, dióxido de carbono o a sobredosis de fármacos como por ejemplo de antidepresivos.²

Tipos de crisis epilépticas.

Las crisis epilépticas se generan en la corteza cerebral, y de acuerdo a su origen pueden clasificarse en dos grandes grupos:⁷⁻⁸ *crisis parciales (o focales)* y *crisis generalizadas*. También suelen denominarse convulsiones parciales y convulsiones generalizadas respectivamente. Las primeras se inician de manera focal en un sitio cortical y las segundas abarcan ambos hemisferios desde un principio. A su vez éstas se subdividen de acuerdo a las manifestaciones conductuales en las crisis convulsivas, las cuales dependen de las funciones que ejerza normalmente el sitio de la corteza afectado. En el esquema 2.1 se representa esta clasificación.



Esquema 2.1. Clasificación de las crisis epilépticas.

Una *convulsión parcial simple* dura aproximadamente 20 a 60 segundos y se caracteriza por la conservación del estado de conciencia durante el episodio.

Una *convulsión parcial compleja* implica un trastorno del conocimiento que dura aproximadamente de 30 segundos a 2 minutos donde se producen conductas repetitivas (automatismos).

Tanto las convulsiones parciales simples como complejas pueden evolucionar secundariamente hasta una *convulsión tónico-clónica generalizada*. En estos casos hay pérdida de conocimiento y los músculos del cuerpo se contraen (contracción tónica). Luego le siguen períodos de contracción y relajación muscular (convulsiones clónicas) que duran 1 o 2 minutos.

En humanos las convulsiones parciales representan la forma de convulsión predominante (cerca del 60%) y se considera que se deben principalmente a una lesión en alguna parte de la corteza y en mucha menor frecuencia se relacionan con un origen genético.⁷

En las convulsiones *generalizadas* las causas suelen ser genéticas. Estas se dividen en 3 tipos principales:⁷ *crisis de ausencia*, *convulsiones mioclónicas* y *convulsiones tónico-clónicas*. Las primeras consisten en pérdidas de conciencia durante pequeños lapsos de tiempo (menores a 30 segundos) durante la cual la persona interrumpe las actividades que estaba realizando. En las convulsiones mioclónicas hay una contracción muscular breve (alrededor de 1 segundo de duración) de tipo choque eléctrico. Por último en las convulsiones tónico-clónicas el comportamiento es similar al desencadenado en las convulsiones parciales que desarrollan convulsión tónico-clónica generalizada, excepto que no van precedidas por una convulsión parcial.

En la figura 2.1 se muestra un grabado francés del siglo diecinueve, que ilustra a un hombre sufriendo una convulsión. En esa época, a estos ataques se les llamaba crisis de gran mal, una denominación que ya no se utiliza y que ha sido reemplazada por el término convulsión tónico-clónica.



Figura 2.1. Grabado del siglo diecinueve que ilustra una persona teniendo una convulsión.²

Así como hay muchos tipos diferentes de crisis, también existen muchos tipos diferentes de epilepsia. Una clasificación distinta es aquella que especifica los *síndromes epilépticos*, donde además de incluir el tipo de convulsión, se tiene en cuenta la causa, la edad de inicio y otros factores que describen el trastorno en su totalidad.

Se han identificado más de 40 tipos de síndromes epilépticos,⁷ los cuales pueden categorizarse a su vez como crisis parciales o generalizadas mencionadas anteriormente.

Diagnóstico.

No siempre es fácil determinar si una persona tiene epilepsia, si bien la ciencia médica posee diferentes medios para el diagnóstico. Otros desórdenes pueden causar síntomas que son parecidos a una crisis epiléptica y estos pueden confundir, lo que hace necesario realizar una observación cuidadosa y pruebas intensivas para confirmar el diagnóstico.

Por otra parte, la precisión en la identificación del tipo (o tipos) de crisis epilépticas resulta clave para la elección del tratamiento a seguir, por lo que no sólo debe determinarse si el paciente tiene epilepsia sino de cual de ellas se trata.

Recién en las últimas décadas los científicos han tenido la posibilidad de observar directamente la estructura y la función del cerebro en humanos vivos. Esto ha sido gracias al desarrollo de instrumentos que actualmente se usan para el diagnóstico de la epilepsia, entre otras enfermedades.

La prueba diagnóstica más común utilizada es el *monitoreo por electroencefalograma* (EEG), donde se registran las ondas cerebrales que son detectadas por los electrodos colocados en el cuero cabelludo.²

Se observa frecuentemente que las personas con epilepsia tienen cambios en los patrones normales de sus ondas cerebrales (figura 2.2), aunque no estén experimentando una convulsión en ese momento. Sin embargo pueden existir complicaciones en la detección: muchas personas que no tienen epilepsia también presentan cierta actividad inusual en el EEG.

De ser posible, se debe hacer el EEG dentro de las 24 horas posteriores a la primera crisis del paciente. Idealmente también debería hacerse este tipo de estudios mientras la persona duerme, dada la diferente actividad cerebral durante el sueño.

Por otro lado, algunos pacientes muestran ondas cerebrales normales aún después de haber tenido una crisis epiléptica, dado que en esos casos las ondas anormales se generan a un nivel profundo en el cerebro donde el EEG no las puede detectar.

Esto puede subsanarse mediante un estudio relacionado, el *magnetoencefalograma* (MEG) que revela las señales magnéticas de las neuronas, permitiendo detectar ondas que se originan más profundamente en el cerebro, a donde el EEG no puede llegar. El MEG no necesita electrodos y registra la actividad cerebral en diferentes puntos del cerebro a lo largo del tiempo.

Capítulo 2

a las características y la duración de las crisis epilépticas. También el médico puede efectuar pruebas para testear las habilidades motoras, el comportamiento y la capacidad intelectual del paciente.

Resultan de rutina también el análisis de sangre, que sirve para detectar trastornos metabólicos o genéticos; así como infecciones, intoxicación por plomo, anemia y diabetes que pueden ser causa de la crisis epiléptica.

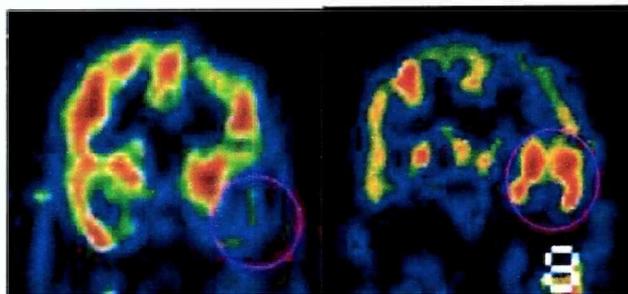


Figura 2.4. Imágenes logradas por SPECT. La de la izquierda fue obtenida en un paciente asintomático. La de la derecha, en el mismo paciente durante una crisis. La región señalada muestra el foco epiléptico (tomado del sitio web: www.infodoctor.org).

Tratamiento.

Una vez diagnosticada, es importante comenzar a tratar la epilepsia lo más rápido posible. Las investigaciones han mostrado que los tratamientos pueden ser menos exitosos una vez que las crisis y sus efectos se hayan consolidado en el paciente.

Existen muchos tratamientos actualmente, por lo que alrededor del 80 % de las personas afectadas pueden dominar sus ataques con el uso de medicamentos o mediante la práctica quirúrgica. Sin embargo, para el 20% restante las prácticas actuales resultan inútiles o insuficientes, dejando en claro la necesidad de nuevas formas de tratar estas crisis.

Los medicamentos para evitar las convulsiones son típicamente el primer paso del tratamiento. No curan la epilepsia, pero en muchas personas evitan o reducen las convulsiones. En la actualidad, el 70% de los pacientes son controlados con este tipo de terapias.⁹ Los anticonvulsivos pueden disminuir el número de ataques, y la droga recetada depende del tipo de crisis. No obstante, debe tenerse en cuenta que la respuesta por parte del paciente es individual y usualmente las dosis deben ajustarse repetidamente. Además, los efectos secundarios de los compuestos administrados deben ser monitoreados, así como su nivel en sangre.

Cuando los medicamentos no pueden controlar adecuadamente la epilepsia, se evalúa la posibilidad de una cirugía. Generalmente se considera esta alternativa cuando se han probado sin éxito diferentes drogas. También se elige si se ha localizado una lesión cerebral, exceso de fluido o un tumor que se cree causante de las crisis.

Por otra parte, si existe una causa subyacente (como por ejemplo una infección), ésta se trata y se espera que esto evite la ocurrencia de las convulsiones.

Los beneficios en el uso de una cirugía deben sopesarse cuidadosamente con respecto a los riesgos, dado que no hay garantía absoluta de que este tratamiento resulte exitoso en el control de los ataques y puede ocasionar cambios cognitivos o de personalidad. Sin embargo los avances recientes en tecnologías de diagnóstico y quirúrgicas han contribuido al uso cada vez mas frecuente de este tipo de técnicas. En el pasado los pacientes utilizaban tratamientos farmacológicos durante muchos años (o décadas) con malos resultados antes de considerar la cirugía. Actualmente ésta se considera antes (luego de uno o dos años de administración infructuosa de drogas), dado que estudios han mostrado que los resultados son más favorables cuanto antes se practica.

Para decidir si un paciente es candidato a la cirugía debe considerarse el tipo de crisis y la región involucrada. Se evita operar las áreas del cerebro implicadas en el habla, la audición, el lenguaje u otras habilidades importantes.

En cuanto al tipo de epilepsia, puede considerarse la cirugía cuando las convulsiones se originan en sólo una parte del cerebro (convulsiones parciales), cuando comienzan como crisis parciales antes de extenderse al resto del cerebro o si la epilepsia es multifocal unilateral con hemiplejía infantil (tal como en el caso de la encefalitis de Rasmussen).

Las *técnicas quirúrgicas* para tratar la epilepsia incluyen aquellas que tratan condiciones subyacentes (tumores cerebrales o hidrocefalia), las que extirpan el lugar de origen de la convulsión, o aquellas donde se realizan cortes en las terminales nerviosas para evitar la extensión de los impulsos convulsivos (llamadas Transección Subpial Múltiple y Callostomía). También existe la Hemisferectomía, que consiste en la extracción de la mitad de la capa externa del cerebro. Se practica en niños no mayores de 13 años de edad dado que es un procedimiento muy radical e implica una recuperación completa, más probable en niños pequeños.

Capítulo 2

Aun cuando este tipo de operaciones detenga por completo las crisis epilépticas, es importante que se sigan tomando medicamentos durante un cierto tiempo, para darle tiempo al cerebro de readaptarse. Los médicos generalmente recomiendan que se sigan tomando los medicamentos durante 2 años después de una cirugía exitosa, para evitar la ocurrencia de nuevas crisis.²

Otra alternativa es el *implante quirúrgico* de dispositivos. El más conocido es aquel que evita las convulsiones mediante el envío al cerebro de impulsos pequeños y regulares de energía eléctrica a través del nervio vago (un nervio situado en el cuello). Este aparato, denominado *estimulador del nervio vago*, funciona a pilas y se implanta quirúrgicamente bajo la piel del pecho en forma similar a un marcapasos, conectándose con el nervio vago en la parte baja del cuello. En general los pacientes disminuyen la frecuencia de las convulsiones con el dispositivo, aunque su uso no los independiza de la medicación y favorece efectos secundarios leves (como ronquera, dolor de oídos, dolor de garganta o náuseas). Otros dispositivos se encuentran en investigación. Entre ellos podemos mencionar la *estimulación magnética transcraneal (EMT)*, que es un procedimiento donde se intenta influir sobre la capacidad cerebral del paciente mediante el uso de un poderoso campo magnético, generado por un imán ubicado en la parte externa de la cabeza; o el diseño de un implante capaz de administrar drogas en forma directa a partes específicas del cerebro.

Por otra parte, se ha mostrado que una dieta con alto contenido graso y bajo contenido de proteínas y carbohidratos produce un cambio en la química del organismo, dado que éste tiene que descomponer grasas en vez de carbohidratos para sobrevivir (cetosis). La *dieta cetogénica* controla o disminuye la frecuencia de las convulsiones en algunos niños por lo que se utiliza en casos donde las convulsiones no puedan controlarse con medicación, o cuando existen efectos colaterales negativos a raíz de las drogas administradas.

No se conoce al momento la manera en que se inhiben las crisis con este tratamiento, aunque se cree que el β -hidroxibutirato formado como subproducto de la cetosis es uno de los responsables. Tampoco resulta claro si esta dieta funciona para adultos. La alimentación prolongada con tan alto contenido graso propicia efectos secundarios relacionados con el retardo en el crecimiento y la acumulación de ácido úrico en la sangre, lo que puede causar cálculos renales.

Los avances médicos y de investigación alcanzados en las últimas décadas han contribuido a un mayor entendimiento de las convulsiones. El uso de nuevas tecnologías en los estudios de imágenes cerebrales y otras técnicas ha permitido diagnosticar con mayor precisión y, por lo tanto, encontrar más rápidamente el tratamiento adecuado. Una gran variedad de medicamentos y de técnicas

quirúrgicas se encuentran disponibles para controlar las crisis de una persona con epilepsia.

Sin embargo, las técnicas de diagnóstico y de tratamiento para combatir la epilepsia pueden mejorarse. La investigación actual se enfoca en avanzar en el conocimiento de los mecanismos que generan las crisis epilépticas, cuál es la mejor forma de tratarlas o prevenirlas y cómo influyen otras actividades cerebrales.

Para promover el interés por el desarrollo de nuevas terapias, en Estados Unidos se generó un programa de análisis exploratorio a nivel preclínico de drogas anticonvulsivantes (*Anticonvulsant Screening Program* o ASP) avalado por el sector dedicado a la epilepsia del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NINCDS-NIH) en Estados Unidos.²

Desde su inicio en 1975, se han creado más de 390 asociaciones público-privadas que han permitido contar con los últimos avances tecnológicos para el análisis de más 25.000 compuestos con el objeto de determinar su posible uso como antiepilepticos. Como resultado de este esfuerzo se han desarrollado medicamentos que tienen ahora aprobación para su uso en los Estados Unidos y de otros que se encuentran en la etapa de evaluación clínica.²

Además, en el marco de este programa hay investigadores que se encuentran diseñando y validando nuevos modelos para descubrir terapias que intervengan en la enfermedad misma, así como ensayos relacionados con la epilepsia resistente o refractaria.²

DROGAS ANTIEPILEPTICAS

Historia.

Los primeros medicamentos antiepilepticos eficaces fueron los bromuros, en particular el *bromuro de potasio*, usado por Locock en 1857.¹⁰ Este médico inglés se dio cuenta de que estos compuestos tenían un efecto sedante, y parecían reducir el número de las crisis en algunos pacientes. Aunque usados en los siguientes 55 años, se encontró que causaban erupción y psicosis, factores que promovieron la búsqueda de nuevas drogas.

En reemplazo, Hauptmann introdujo el *fenobarbital* (figura 2.5), el primer compuesto orgánico sintético en el que se reconoció actividad anticonvulsiva, y que marcó el inicio de la historia moderna de las drogas antiepilepticas (AED) con

Capítulo 2

su comercialización en 1912.¹¹ Este compuesto es menos tóxico y más efectivo que los bromuros, por lo que se convirtió en la droga de elección, prevaleciendo su uso hasta la actualidad. Posteriormente se sintetizaron compuestos análogos al fenobarbital, destacándose el *mefobarbital* (figura 2.52), presente en el mercado de EEUU desde 1935.¹²

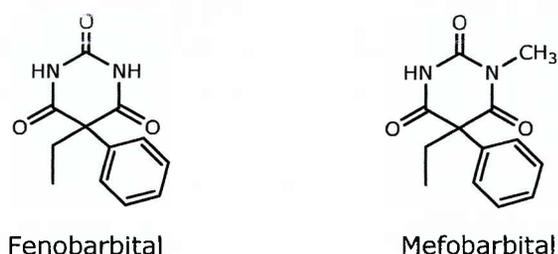


Figura 2.5. Estructura del primer compuesto orgánico de origen sintético comercializado como antiepiléptico (fenobarbital) y su derivado metilado (mefobarbital).

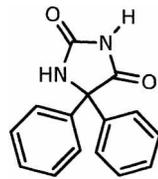
La acción anticonvulsiva tanto de los bromuros como del fenobarbital se descubrió con la ayuda del azar, dado que en ese momento no se contaba con modelos experimentales adecuados, capaces de testear la actividad antiepiléptica de los compuestos.

En un descubrimiento de gran importancia, Merrit y Putnam idearon en 1937 una prueba de este tipo basada en una técnica de electroshock para animales (ver capítulo 5 de actividad biológica).¹³ La confiabilidad y capacidad de dar resultados cuantificables que ofrece este test demostró su viabilidad para la evaluación de nuevos compuestos en animales. Con este ensayo se evitó la prueba directa en humanos de los fármacos, reservándose estas evaluaciones sólo con los que se muestran más promisorias en los test previos. Esto trajo aparejado ventajas principalmente relacionadas con el costo y los riesgos que implica el estudio en personas.

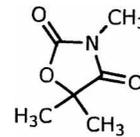
Como resultado de la investigación de Merrit y Putnam, se encontró que la *fenitoína* suprimía las convulsiones sin generar efectos sedantes, por lo que se comercializó en 1938 (figura 2.6).¹³ La ausencia de efecto sedativo y su gran capacidad para controlar las crisis epilépticas fueron los factores determinantes para la tan rápida inclusión de esta droga en el mercado. Además, los requerimientos regulatorios para la comercialización no eran tan estrictos en ese entonces: Por ejemplo, no se consideraban necesarias las pruebas de seguridad o eficacia.¹⁴

Posterior a ese descubrimiento, la industria farmacéutica y las entidades académicas encaminaron sus esfuerzos en la modificación estructural de estos compuestos activos, así como en el desarrollo de nuevos modelos experimentales de epilepsia. Es por eso que las estructuras químicas de la mayor parte de los medicamentos que aparecieron antes de 1965 guardan alguna relación estructural con el fenobarbital y la fenitoína, es decir, son derivados de hidantoínas, oxazolidindionas, succinimidas y acetil ureas.

Puede destacarse la *trimetadiona* (figura 2.6), analgésico reportado por su capacidad anticonvulsiva en 1944 por Richards y Everett,¹⁵ particularmente por su capacidad de evitar las convulsiones provocadas por el convulsivante químico pentilentetrazol (PTZ) en modelos animales. Detalles de este test se describirán en el capítulo 5 de actividad biológica.



Fenitoína



Trimetadiona

Figura 2.6. Estructuras de la fenitoína y la trimetadiona, compuestos activos en los modelos animales de electroshock y PTZ respectivamente.

Asimismo, este compuesto resulta inactivo en la prueba de electroshock,¹⁶ mostrando una diferencia significativa en su acción anticonvulsiva respecto a los medicamentos presentes en el mercado.

Dos años más tarde esta droga se convirtió en el primer medicamento para las crisis de ausencias. Posteriormente, mediante el análisis de aproximadamente 65 fenilsuccinimidas frente al test de PTZ, se detectaron la *fensuccinimida* y la *mesuccinimida*, aprobadas para el tratamiento de crisis de ausencias en 1953 y 1957 respectivamente (figura 2.7).¹⁷ Otro compuesto relacionado, la *etosuccinimida*, apareció en 1960 con el mismo propósito (figura 2.7).¹²

Capítulo 2

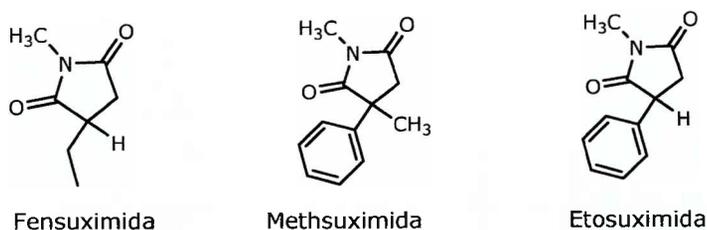


Figura 2.7. Estructura de medicamentos derivados de fenilsuccinimidas detectados por su actividad frente al test de PTZ.

Nuevos derivados encontrados en este período son la *mefenitoína*, la *etotoína*, el *metharbital*, la *pirimidona* y la *parametadiona*.¹² Los dos primeros son análogos de la fenitoína, los dos siguientes del fenobarbital y el último de la trimetadiona (figura 2.8). Todos presentan una actividad comparable a la del compuesto de que derivan y se comercializaron para un uso similar.

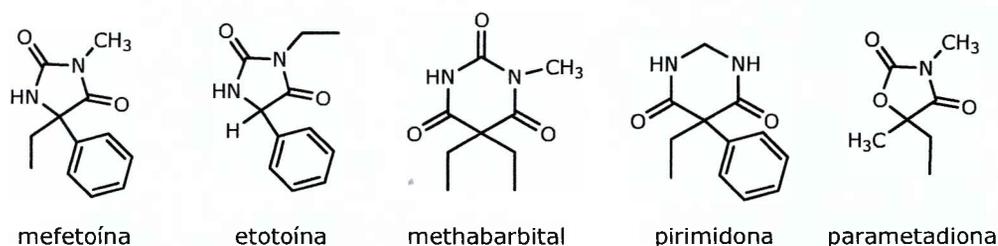


Figura 2.8. Estructura de medicamentos derivados de fenitoína, fenobarbital y trimetadiona.

Otras drogas como *fetenilato*, *benzocloropropamida* y *aminoglutetimida* se introdujeron al mercado en esa época, pero fueron posteriormente retiradas debido a su toxicidad demostrada a largo plazo.¹²

Luego de 1962, el ente regulatorio de los medicamentos de Estados Unidos (FDA*) se volvió más estricto en cuanto a los requerimientos necesarios para que una nueva droga sea incorporada al mercado. No sólo se exigía determinar la seguridad de una droga sino también su eficacia, previa a la comercialización.¹⁸

Este factor, junto con la opinión de los médicos de que las mejoras en los tratamientos dependían exclusivamente de un mejor uso de las drogas ya existentes, redujo considerablemente el interés de la industria por el desarrollo de nuevos compuestos. El proceso de investigación y desarrollo de nuevos AED resultaba entonces muy costoso y poco redituable, teniendo en cuenta el

* FDA (*Food and Drug Administration*): organismo estadounidense encargado del control de alimentos y drogas.

relativamente bajo volumen de ventas que tenía respecto a otro tipo de drogas de acción en el SNC, como los tranquilizantes y sedantes-hipnóticos.

Como resultado de esta situación, entre 1960 y 1974 un único compuesto, el *diazepam* (figura 2.9), fue aprobado para el tratamiento de la epilepsia. Otras drogas desarrolladas por la industria en esa época no lograron ser certificadas por la FDA debido a la falta de pruebas de eficacia adecuadas.

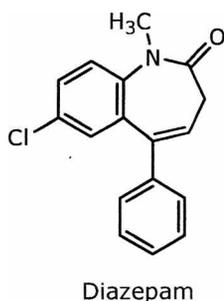


Figura 2.9. Estructura del diazepam, único aprobado para su comercialización entre 1960 y 1974.

Para revertir esta situación, en 1968 el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NINCDS-NIH) en Estados Unidos mediante su división dedicada a la Epilepsia condujo los ensayos clínicos de siete drogas que necesitaban ser sometidas a pruebas de eficacia para poder ser comercializadas. De estos análisis surgen cuatro nuevas AED: la *carbamazepina*, el *ácido valproico*, el *clorazepam* y el *clorazepato dipotásico* (figura 2.10).¹²

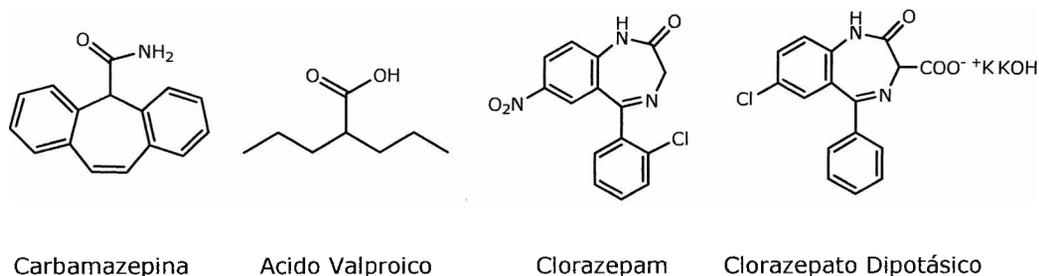


Figura 2.10. Estructuras de los primeros medicamentos desarrollados mediante el apoyo de NINCDS-NIH a la industria farmacéutica.

Esta política no sólo disminuyó los costos para la industria farmacéutica, sino que permitió el desarrollo de una metodología y una estandarización de las evaluaciones. Entre los protocolos se incluyó formalmente en 1975 el programa de ensayos preclínicos para el desarrollo de nuevas drogas (ASP) mencionado anteriormente en el presente capítulo. Detalles de este programa se puntualizarán en el capítulo 5 del presente trabajo.

Capítulo 2

A modo de resumen, en la tabla 2.1 se enumeran las AED comercializadas en Estados Unidos entre 1912 y 1981, denominadas "clásicas" para el tratamiento de la epilepsia.

Año de comercialización	Droga	Nombre comercial	Compañía farmacéutica
1912	Fenobarbital	Luminal	WINTHROP
1935	Mefobarbital	Mebaral	WINTHROP
1938	Fenitoína	Dilantin	PARKE-DAVIS
1946	Trimetadiona	Tridione	ABBOTT
1947	Mefenitoína	Mesantoin	SANDOZ
1949	Parametadiona	Paradione	ABBOTT
1950	Fentencilato ^a	Thiantoin	LILLY
1951	Fenacemida	Phenurone	ABBOTT
1952	Metharbital ^a	Gemonil	ABBOTT
1952	Benzoclorpropamida	Hibicon	LEDERLE
1953	Fensuximida	Milontin	PARKE-DAVIS
1954	Primidona	Mysoline	AYERST
1957	Methsuximida	Celontin	PARKE-DAVIS
1957	Etotoína	Peganone	ABBOTT
1960	Aminoglutetimida ^a	Elipten	CIBA
1960	Etosuximida	Zarontin	PARKE-DAVIS
1968	Diazepam	Valium	ROCHE
1974	Carbamazepina	Tegretol	GEIGY
1975	Clonazepam	Clonopin	ROCHE
1978	Ácido valproico	Depakene	ABBOTT
1981	Clorazepato dipotásico ^b	Tranxene	ABBOTT

Tabla 2.1. Drogas antiepilépticas comercializadas en los Estados Unidos hasta fin de los años 70. Tomado de Porter y colaboradores¹². ^a retirada del mercado. ^b aprobada como droga auxiliar para el tratamiento de la epilepsia.

Segunda generación de drogas antiepilépticas.

Si bien en algunos casos las drogas clásicas continúan siendo de primera elección para el tratamiento de ciertas crisis epilépticas, la necesidad de nuevos compuestos continúa hoy dada la incapacidad de las terapias disponibles para controlar el 20% de las convulsiones.² Además, los efectos secundarios subyacentes de las AED clásicas pueden ser leves, pero muchas veces tienen serias implicancias, agravadas por la necesidad del uso prolongado del medicamento. Entre los más comunes se encuentran: ataxia, diplopía, embotamiento, erupciones cutáneas, discrasias sanguíneas, y hepatotoxicidad.¹⁹

Luego de la introducción del ácido valproico y de las benzodiazepinas, y aun con el impulso otorgado por el NINCDS-NIH; tuvo lugar otra pausa en el desarrollo de nuevos medicamentos que se prolongó hasta 1993. A partir de ese año varios compuestos fueron aprobados, marcando el comienzo de una nueva serie de AED, denominadas de segunda generación.

Este conjunto incluye drogas como *gabapentin, felbamato, oxcarbazepina, lamotrigina, levetiracetam, tiagabina, topiramato, vigabatrin* y *zonisamida*.²⁰ Estos compuestos son utilizados actualmente por aproximadamente el 16% de los pacientes que reciben un tratamiento con drogas antiepilépticas.²¹

La estructura química de estas AED se muestra en la figura 2.11. Se observa que la mayoría de las moléculas son estructuralmente novedosas, sin derivar de la modificación estructural de una droga preexistente. Esta singularidad sugiere la posibilidad de que los mecanismos a nivel molecular y celular por el cual actúan sean diferentes entre sí, lo que los hace efectivos en diferentes tipos de terapia.

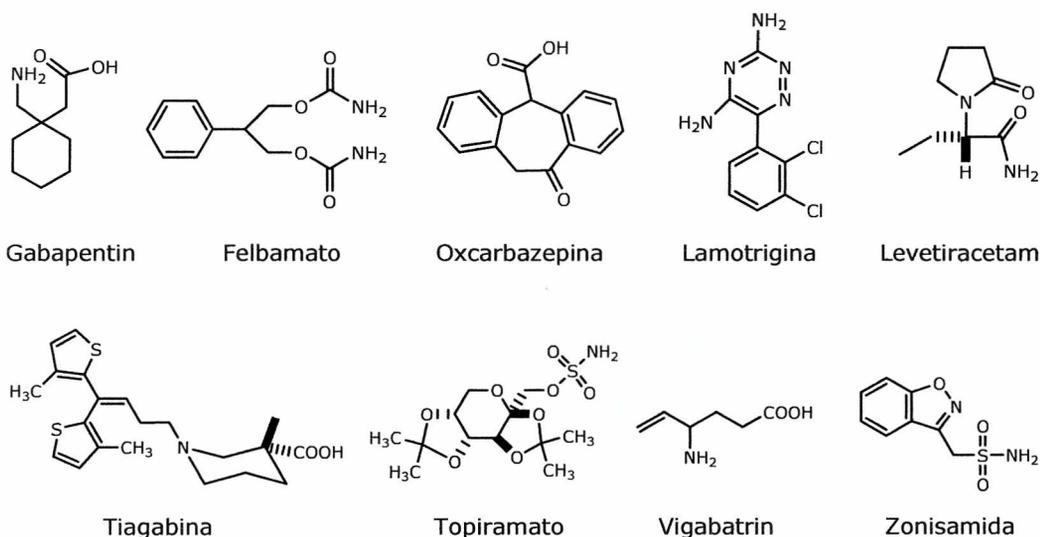


Figura 2.11. Estructuras de los antiepilépticos de segunda generación.

Felbamato, lamotrigina, gabapentin, topiramato y tiagabina se usan en tratamientos auxiliares de convulsiones parciales, refractarias a otros anticonvulsivos en tratamientos con una sola droga. A su vez, los dos primeros también están aprobados para terapia como única droga¹⁹.

En general los nuevos medicamentos han ocasionado un avance significativo en el tratamiento de la epilepsia. Compuestos como gabapentin, lamotrigina y oxcarbazepina poseen efectividad similar pero mejor tolerancia que

Capítulo 2

las AED clásicas como fenitoína y carbamacepina. Además gabapentin, levetiracetam, y tiagabina poseen una mejor farmacocinética, y en general estas nuevas drogas presentan menos efectos secundarios que las clásicas.

Una salvedad debe hacerse en este punto con el felbamato, que se usa sólo en casos complejos, debido al riesgo de anemia aplásica fatal o hepatotoxicidad que resulto de su uso crónico.²²

Del tipo de crisis epiléptica depende el fármaco que se elija para el tratamiento. En la tabla 2.2 se ofrece una clasificación de las drogas usadas de acuerdo al tipo de convulsión.

Tipo de Convulsión		Anticonvulsivos clásicos	Anticonvulsivos de segunda generación
Convulsiones Parciales	Parciales simples	Carbamazepina, Fenitoína, Valproato	Gabapentin, Lamotrigina, Levetiracetam, Tiagabina, Topiramato, Zonizamida
	Parciales Complejas	Carbamazepina, Fenitoína, Valproato	Gabapentin, Lamotrigina, Levetiracetam, Tiagabina, Topiramato, Zonizamida
	Tónico-Clónicas generalizadas	Carbamazepina, Fenitoína, Valproato, Fenobarbital, Pirimidona	Gabapentin, Lamotrigina, Levetiracetam, Tiagabina, Topiramato, Zonizamida
Convulsiones Generalizadas	Crisis de ausencia	Etosuximida, Valproato	Lamotrigina
	Convulsiones mioclónicas	Valproato	Lamotrigina, Topiramato
	Convulsiones Tónico-Clónicas	Carbamazepina, Fenitoína, Valproato, Fenobarbital, Pirimidona	Lamotrigina, Topiramato

Tabla 2.2. Clasificación de las drogas utilizadas según el tipo de convulsiones epilépticas. Tomado de McNamara, J. O.⁷

Drogas en desarrollo.

Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, el tratamiento más utilizado para combatir la epilepsia son los medicamentos. Además de otras consideraciones, se espera que los compuestos administrados inhiban rápida y completamente las crisis epilépticas. Conjuntamente deben presentar una acción prolongada con alta tolerancia y efectividad, sin mostrar efectos secundarios. Un largo camino se ha recorrido en la búsqueda de este tipo de compuestos y continúa hasta la actualidad.

El progreso en el descubrimiento de nuevos compuestos se reporta en resúmenes de las conferencias sobre drogas antiepilépticas denominadas EILAT (por la ciudad israelí donde se realizaban inicialmente).^{20,23-26} En estos documentos se compila en forma detallada la información sobre nuevas AEDs en diferentes etapas de desarrollo; así como nuevos estudios relacionados con compuestos recientemente incluidos en el mercado.

Según el último reporte (EILAT VII),²⁰ las drogas más prometedoras que se encuentran en desarrollo son: atipamezol, BIA-2-093, fluorofelbamato, NPS 1776, pregabalin, retigabina, safinamida, SPM 927, stiripentol, talampanel, UCB34714 y valroceida. En la figura 2.12 se presentan las estructuras de estos compuestos.

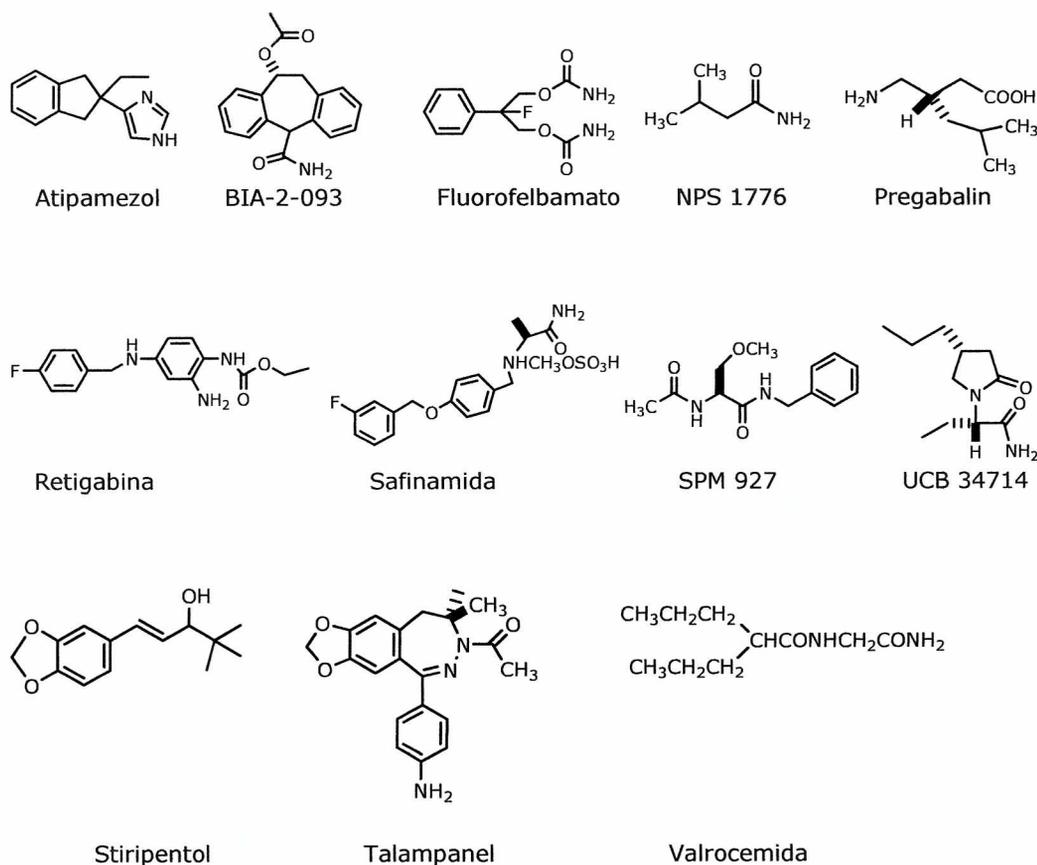


Figura 2.12. Estructuras de los antiepilépticos en desarrollo según el último EILAT.²⁰

MECANISMOS DE ACCION DE LAS DROGAS ANTIEPILEPTICAS

Al presente no existen drogas que actúen previniendo la formación de focos convulsivos, sino que los compuestos disponibles parecen actuar principalmente suprimiendo o evitando la propagación de una crisis epiléptica. Esto puede suceder a partir de diversos procesos, a veces simultáneos.

Los mecanismos de acción de las AED no son completamente conocidos. Sin embargo, estudios relativamente recientes de neurotransmisores y receptores específicos sirvieron para definir los principales modos de acción farmacológica de las AED.

Los modelos utilizados para el análisis del mecanismo de acción de las drogas son diferentes a los usados para identificar nuevos agentes antiepilépticos. Mientras la epilepsia debe ser estudiada in-vivo, el estudio del modo en que se produce la acción antiepiléptica requiere ensayos in-vitro. Estos últimos presentan la ventaja de poder controlar la concentración de la droga en forma precisa, y se evitan las complicaciones relacionadas con los cambios metabólicos y con la localización en el sitio de acción.

La influencia de las AED sobre la conductancia iónica se ha estudiado principalmente en cultivos neuronales. Actualmente, el uso de la técnica de patch-clamp ha permitido analizar los efectos de las AED sobre las propiedades cinéticas en canales iónicos.²⁷ La respuesta de las membranas a neurotransmisores y su modificación por la presencia de AED puede estudiarse en cultivos celulares y organotípicos.²⁷

Los mecanismos propuestos involucran la habilidad de una droga de modelar la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria. Esto puede suceder mediante un efecto sobre los canales iónicos, o sobre los receptores y metabolismo de los neurotransmisores.⁵

Canales iónicos.

Los canales iónicos son enzimas que atraviesan la membrana plasmática, y que catalizan la difusión selectiva y pasiva de iones. Estas proteínas forman poros que sufren cambios conformacionales rápidos entre estados cerrados, no permeables y abiertos. En esta última conformación es que seleccionan y dejan pasar iones antes de volver a cerrarse.

El funcionamiento anómalo de canales da lugar a patologías del sistema nervioso central, entre las que se encuentra la epilepsia. Es por ello que uno de los objetivos en el desarrollo de nuevas AED es encontrar compuestos que modulen

selectivamente la regulación iónica de la excitabilidad neuronal. Esto fue posible luego del descubrimiento y caracterización, aunque incompleta, de estos canales.²⁷

Los canales catiónicos dependientes del voltaje son una superfamilia de este tipo de proteínas de membrana excitables. Existe evidencia de que algunos agentes anticonvulsivos interactúan con los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{+2} , mediante su unión a sitios receptores ubicados en sus subunidades.²⁸

Canales de sodio.

Los *canales de sodio* son responsables de la propagación de los potenciales de acción en las fibras mielinizadas y no mielinizadas.²⁹ Los tres estados conformacionales de estos canales se denominan activos, de reposo e inactivo. Cada uno de ellos es capaz de conducir una señal eléctrica y de permitir una permeabilidad diferente (o ninguna) de los iones Na^+ .³⁰

En general, luego de que una membrana se despolariza aumenta la permeabilidad a los iones Na^+ y estos entran a la célula, que luego retorna a su estado normal.²⁹

Los análisis electrofisiológicos de neuronas individuales durante una crisis convulsiva parcial muestran que las neuronas presentan despolarización y potenciales de acción de activación a frecuencias altas. Este comportamiento es característico de las convulsiones y es infrecuente durante la actividad neuronal fisiológica.⁷ Por tanto, se esperaría que una inhibición selectiva de este modelo de activación redujera las convulsiones. Se cree que esto se produce mediante un decremento de la capacidad de los canales de Na^+ de recuperarse de dicha activación.⁷ Esto es, se requiere la abertura desencadenada por la despolarización de los canales de Na^+ en la membrana axoniana de una neurona para que se origine un potencial de acción.

Después de esa abertura los canales se cierran de modo espontáneo (inactivación). Se piensa que esta inactivación da origen a un período refractario durante el cual es imposible evocar otro potencial.

Luego de este lapso los canales de Na^+ quedan de nuevo preparados para participar en otro potencial de acción. El decremento de la velocidad de recuperación limitaría la capacidad de una neurona para activar a frecuencias altas, efecto que tal vez sea la base de la acción de la carbamazepina, lamotrigina, fenitoína, topiramato, ácido valproico y zonisamida (figura 2.10).⁷ En cuanto al sitio de acción de este tipo de anticonvulsivos, se postula que se encuentra en el lado intracelular del canal (figura 2.10).

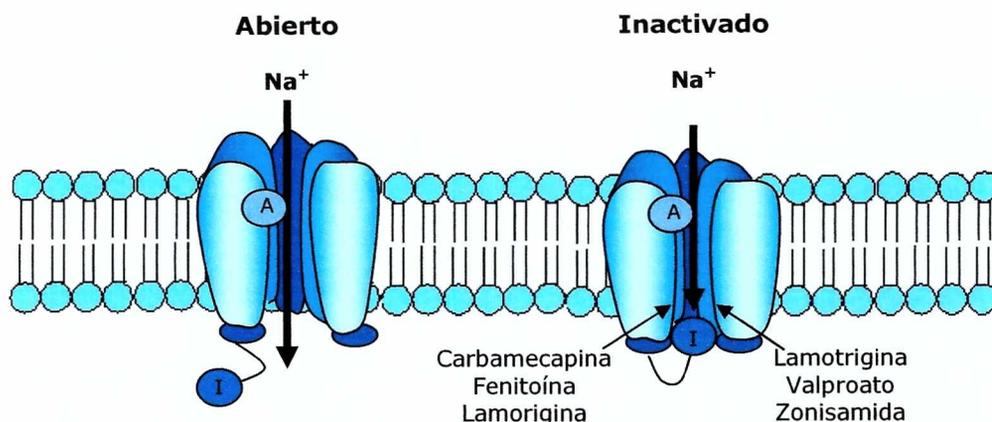


Figura 2.10. Inactivación del canal de Na^+ intensificado por el anticonvulsivo, que reduce la capacidad de las neuronas para efectuar activación a frecuencias altas. A: compuerta de activación. I: compuerta de inactivación (tomado de McNamara, J. O. ⁷)

Canales de calcio.

Una propiedad intrínseca de las neuronas talámicas es una forma particular de corriente de Ca^{+2} regulada por voltaje, la corriente de umbral bajo (corriente T).³¹ El mecanismo principal por medio del cual parece actuar la mayor parte de los fármacos usados en la crisis de ausencias (etosuximida, ácido valproico, trimetadiona) es la inhibición de esta corriente T (figura 2.11).⁷

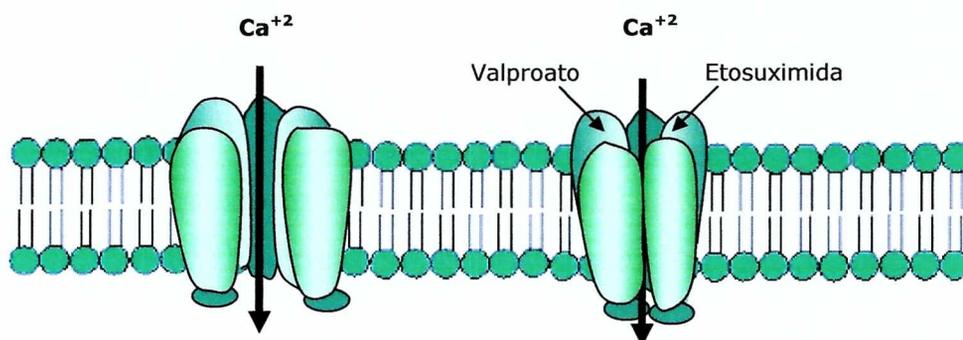


Figura 2.11. Reducción de la corriente por los canales de Ca^{+2} del tipo T inducida por los anticonvulsivos (tomado de McNamara, J. O. ⁷).

Canales de potasio.

Se cree que la activación de los canales de K^+ hiperpolarizan las neuronas y por lo tanto las inhiben. Se han desarrollado drogas selectivas para este tipo de

canales, pero no fueron exitosas debido a su incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.³²

Neurotransmisores excitatorios.

Los aminoácidos glutamato y aspartato son considerados los principales neurotransmisores excitatorios presentes en el sistema nervioso central de los mamíferos.³³ Los receptores de los aminoácidos excitatorios se clasifican usualmente en base a los agonistas selectivos para cada uno. De este modo se identificaron 5 subtipos de receptores, donde los tres más importantes se clasifican como receptores del N-metil-D-aspartato (NMDA), del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), y kainato.³³⁻³⁷

Cada uno de estos tres subtipos son canales iónicos regulados por ligando y probablemente están acoplados a un canal catiónico que se abre en respuesta a la unión de agonistas, lo cual despolariza a la célula. Sin embargo, el complejo receptor-canal NMDA posee un conjunto de características únicas que lo distinguen de los otros subtipos.³⁴ Este receptor consta de un sitio de unión de glutamato y uno para el co-agonista glicina, debiendo estar ambos sitios ocupados para que se produzca la apertura del canal. De este modo se permite el pasaje de Ca^{+2} y Na^{+} hacia el interior de la célula y de K^{+} hacia el exterior.³¹

Los antagonistas del receptor NMDA, tanto competitivos como no competitivos, han demostrado ser efectivos como anticonvulsivos en varios modelos animales de epilepsia.³⁸ AED como fenitoína, carbamazepina y ácido valproico bloquean en cierta medida las respuestas mediadas por el NMDA.³⁹⁻⁴⁰

En la práctica, el desarrollo de antagonistas de este receptor con el objeto de encontrar nuevas AED no ha resultado tan exitoso como se esperaba, debido a los efectos adversos encontrados en los compuestos diseñados.⁵

Procesos de inhibición sináptica.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio, el cual se forma en el cerebro por descarboxilación del glutamato.⁴¹ El incremento de la inhibición sináptica mediada por el GABA reduce la excitabilidad neuronal y eleva el umbral convulsivo.⁷

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. Compuestos como barbituratos, benzodiazepinas y el ácido valproico parecen mostrar este mecanismo de acción (figura 2.12).⁴²

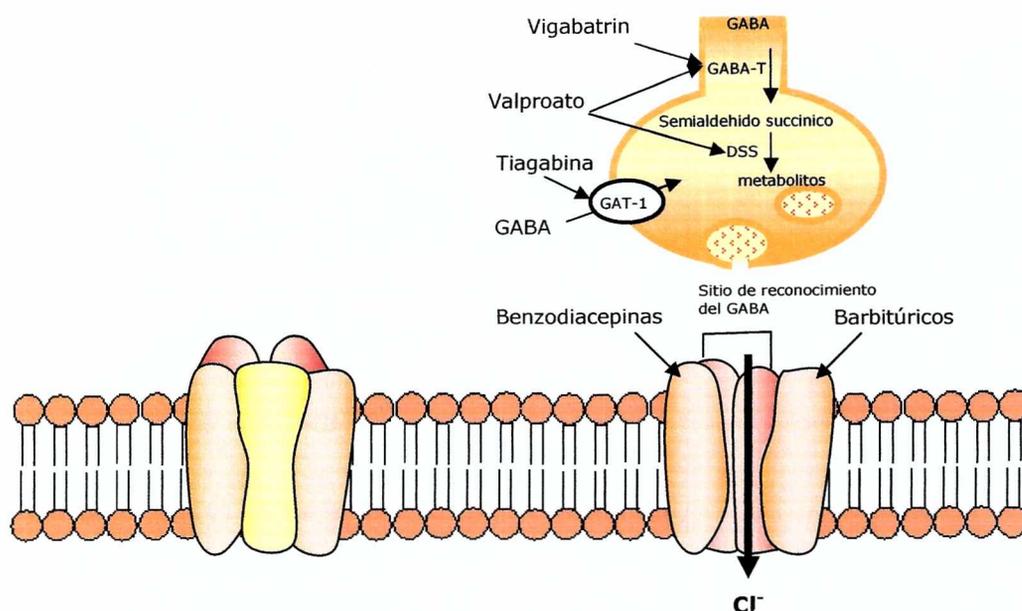


Figura 2.12. Transmisión sináptica incrementada del GABA. En presencia del GABA el receptor $GABA_A$ (estructura del lado izquierdo) se abre, lo cual permite la entrada de Cl^- . Algunas AED actúan mediante la reducción del metabolismo del GABA, otros a nivel del receptor $GABA_A$. GABA-T : GABA transaminasa, GAT-1: transportador de GABA, DSS: deshidrogenasa succínica de semialdehído (tomado de McNamara, J. O.).⁷

La glutamato decarboxilasa (GAD) es la enzima que cataliza la síntesis de GABA en las neuronas gabaérgicas a partir de glutamato.⁸ Se sabe que una de las acciones del ácido valproico es la de aumentar los niveles de GABA mediante el incremento de la actividad de la enzima GAD.⁴³

El GABA actúa mediante sitios en receptores postsinápticos, los cuales regulan los canales Cl^- de membrana. El principal receptor denominado $GABA_A$ inhibe a la célula postsináptica mediante un incremento en el flujo de iones Cl^- hacia el interior de la célula. Las benzodiacepinas y los barbitúricos pueden intensificar esta inhibición.⁷ Ese mecanismo tal vez sea la base de la eficacia de estos compuestos contra convulsiones parciales y tonicoclónicas (figura 2.12).

Un fármaco de segunda generación, el γ -vinil GABA (vigabatrin) parece actuar mediante la inhibición irreversible de una enzima que degrada el GABA (GABA transaminasa o GABA-T), originando mayor cantidad de GABA disponibles para la descarga sináptica. La tiagabina, en cambio, inhibe un transportador de GABA (GAT-1), y reduce la captación neuronal y glial del mismo (figura 2.12).⁷ La gabapentina tiene al nivel presináptico el efecto de promover la descarga de GABA; en la actualidad se investiga su objetivo molecular.

En la tabla 2.3 se enumeran algunos fármacos clásicos y de nueva generación de acuerdo a sus mecanismos de acción. En muchos casos las drogas

poseen varios procesos involucrados simultáneamente en la respuesta biológica, lo que dificulta su clasificación es este sentido.

Mecanismo de acción propuesto	Anticonvulsivos clásicos	Anticonvulsivos de segunda generación
Bloqueo de los canales de Na ⁺ voltaje-dependientes	fenitoína carbamazepina valproato	felbamato gabapentin lamotrigina topiramato oxcarbazepina zonisamida
Incremento de la inhibición mediada por GABA	benzodiazepinas fenobarbital valproato (?)	vigabatrin tiagabina gabapentin felbamato topiramato zonisamida
Bloqueo de los canales de Ca ⁺⁺ voltaje-dependientes	etosuximida valproato (?)	gabapentin zonisamida felbamato lamotrigina oxcarbazepina
Disminución de la excitación mediada por glutamato		felbamato topiramato

Tabla 2.3. Clasificación de las AEDS según su mecanismo de acción (tomado de White H. S.)⁵

Referencias del capítulo 2

1. Contreras D., *Rev. Neurol.*, **2000**, 30, 370.
2. Frazin, N. En: *Seizures and Epilepsy: Hope Through Research*. NIH Publication N°00-156, **2000**. Sitio web: <http://www.ninds.nih.gov>
3. Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis. WHO Fact Sheet N°165, **2001**. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165>
4. Epilepsy: social consequences and economic aspects. WHO Fact Sheet N°166, **2001**. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs166>
5. White, H.S., *Epilepsia*, **1999**, 40, 2.
6. Mental and neurological disorders. WHO Fact Sheet N°265, **2001**. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs265>
7. McNamara, J. O., Capítulo 21: Fármacos Eficaces para el Tratamiento de las Epilepsias. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Hardman, J.G.;

Capítulo 2

- Limbird, L.E.; Goodman, L. S.; Gilman, A., Eds.; 10^{ma} Ed.; McGraw-Hill Interamericana, México, **2001**, 529-556.
8. Edafigho, I.; Scott, K., Chapter 39: Anticonvulsants. En: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th Ed., Vol.3: *Therapeutic Agents*; John Wiley & Sons Inc., **1996**, 175-254.
9. Epilepsy: scientific and medical advances. WHO Fact Sheet N°167, **2001**. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs167>
10. Locock, L., *Lancet*, **1857**, 1, 528.
11. Hauptmann, A., *Munch Med. Wochenschr.*, **1912**, 59, 1907.
12. Porter, R. J.; Cereghino, J. J.; Gladding, G. D.; Hessie, B. J.; Kupferberg H. J., Scoville, B.; White, B. G., *Clev. Clin. Q.*, **1984**, 51, 293.
13. Putnam T. J.; Merrit G. H., *Science*, **1937**, 85, 525.
14. *Federal Food and Drugs Act*, Public Law 384, 56th Congress, EEUU, **1906**.
15. Richards R. K.; Everett G. M., *Fed. Proc.*, **1944**, 3, 39.
16. Goodman L. S.; Grewal M. S.; Brown W. C.; Swinyard E. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1953**, 108, 168.
17. Chen G.; Portman, R.; Ensor C. R., Bratton A. C. Jr., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1951**, 103, 54.
18. *Drug Amendments Act*, Public Law 87-781, 21 USC 355, EEUU, **1962**.
19. Taylor, Ch. P., Chapter 69: Mechanisms of New Antiepileptic Drugs. En: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsia*, 3rd Ed.: *Advances in Neurology*, Vol.79, Delgado-Escueta, A.V.; Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, 1011-1026.
20. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson T., *Epilepsy Res.*, **2004**, 61, 1.
21. Fisher, R., Vickrey, B.G., Gibson, P., Hermann, B., Penovich, P., Scherer, A., Walker, S., *Epilepsy Res.* **2000**, 41, 53.
22. Bebin, E.M.; Sofia, R.D.; Dreifuss, F.E., Felbamate: Toxicity. En: *Antiepileptic Drugs*, Levy, R.H.; Mattson, R.H.; Meldrum, B.S. Eds.; Raven Press, New York, **1995**, 823-7.
23. Stables, J.P.; Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. *Epilepsy Res.*, **1995**, 22, 235.
24. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. *Epilepsy Res.* , **1996**, 25, 299.
25. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. *Epilepsy Res.*, **1999**, 34, 1.
26. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. *Epilepsy Res.*, **2001**, 43, 11.

27. Macdonald R. L.; Meldrum B. S., Principles of Antiepileptic Drug Action. En: *Antiepileptic Drugs*. Levy, R. H.; Dreifuss, F. E.; Mattson, R. H.; Meldrum B. S.; Penry, J. K., Eds.; Raven Press, Ltd., New York, **1989**, 59.
28. Faingold, C.L., Overview of ion channels, antiepileptic drugs, and seizures. En: *Drugs for Control of Epilepsy: Actions on Neuronal Networks Involved in Seizure Disorders*. Faingold, C.L.; Fromm, G.H., Eds.; CRC Press, Boca Ratón, Florida , **1992**, 57-68
29. Brown, G. B., *Int. Rev. Neurobiol.*, **1991**, 29, 81.
30. Catterall, W. A., *Trends Pharmacol. Sci.*, **1987**, 8,57.
31. Loscher, W.; Schmidt, D., *Epilepsy Research* **1994**, 17, 95.
32. Porter, R.J.; Rogawski, M.A. *Epilepsia*, **1992**, 33, S1-S6.
33. Williams, K.; Romano, C.; Dichter, M. A.; Molinoff, P. B., *Life Sci.*, **1991**, 48, 469.
34. Foster, A. C.; fagg, G. E., *Brain Res. Rev.*, **1984**, 7, 103.
35. Mayer, M. L.; Westbrook, G. L., *Prog. Neurobiol.*, 1987, 28, 197.
36. Collingridge, G. L., Lester, R. A. J., *Pharmacol. Rev.*, **1989**, 41, 143.
37. Watkins, J. C.; Krogsgaard-Larsen, P. Honoré, T., *Trends Pharmacol Sci.*, **1990**, 11, 25.
38. Meldrum, B.S. En: *Excitatory Amino Acid Transmission, Neurology and Neurobiology*, Hicks, T.P.; Lodge, D.; McLennan, H., Eds.; Alan R. Liss, Inc., New York, **1987**, 189-96.
39. McLean, M.J., *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*,1992, 44, 46-7
40. Wamil, A.W.; McLean, M.J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, 267, 218.
41. Meldrum B. S., En: *New Anticonvulsant Drugs*, B. S. Meldrum; R. J. Porter Eds; Libbey J. and Company Ltd, London, **1986**, 17.
42. Loscher, W. GABA and the Epilepsies. Experimental and Clinical Considerations. En: *GABA. Basic Research and Cellular Applications*. Bowery, N.G.; Nisticó, G., Eds.; Pythagora Press, Rome, **1989**, 260.
43. Loscher, W., *Neurochem. Res.*, **1993**, 18, 485.

CAPITULO 3

DISEÑO RACIONAL DE NUEVAS DROGAS CON ACCION ANTICONVULSIVA

Diseño racional de fármacos.

El *diseño racional* de fármacos es un conjunto de métodos orientados al descubrimiento de nuevas drogas (estructuras) que se basa en el conocimiento a nivel molecular de los procesos bioquímicos que median el proceso patológico.

Como se ha expresado anteriormente, el desarrollo de tecnologías tales como la genómica y la informática han sido de gran importancia para el avance de este campo de investigación. En particular, estos han impulsado metodologías que se fundamentan en el estudio del sitio activo a nivel atómico. De este modo, empleando técnicas directas o indirectas (figura 3.1) puede obtenerse información sobre las características del ambiente químico en el sitio de unión creado por el receptor:

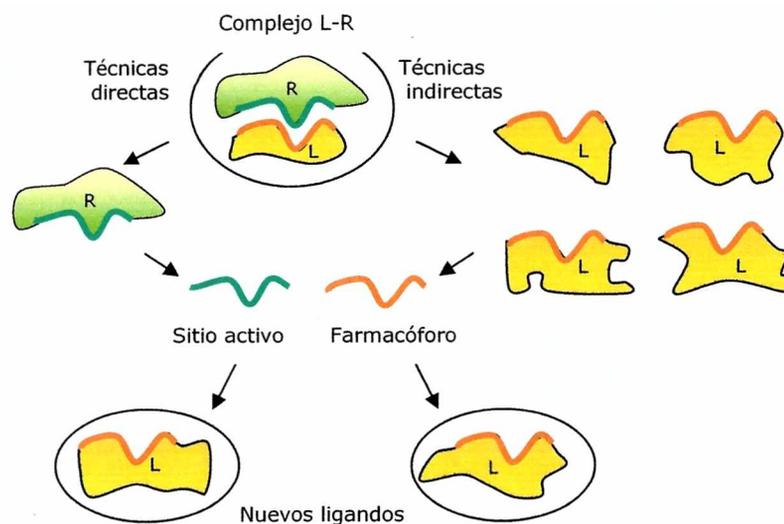


Figura 3.1. Esquema general de la secuencia de pasos en las técnicas directas e indirectas. R: Receptor, L: ligando.

Técnicas directas: Parten del conocimiento del receptor derivado de la información estructural de la proteína, de porciones proteicas o incluso del complejo ligando-receptor (por medio de rayos X, NMR, modelado molecular, etc.).

Técnicas indirectas: En ausencia de información estructural del receptor, se consideran los distintos ligandos que dan el mismo tipo de respuesta biológica, pudiendo inferirse que se unen al mismo sitio de unión. Con esta información se pueden proponer las mínimas características estructurales y electrónicas comunes que permiten interactuar con el sitio activo. Esta técnica, para ser eficiente, debe contar con un número suficiente de ligandos.

Patrón farmacofórico.

Uno de los métodos indirectos más utilizados es la determinación del *patrón farmacofórico* o *farmacóforo* vinculado a una actividad dada. Este está definido por el conjunto de grupos funcionales o porciones moleculares y su posición relativa en el espacio, los cuales determinan los requerimientos necesarios para la interacción con el sitio de unión, representables por medio de un mapeo tridimensional.

La principal dificultad en la identificación del farmacóforo se asocia a encontrar las porciones comunes de los ligandos, especialmente cuando se analiza un conjunto de compuestos estructuralmente disímiles. Este mapa tridimensional característico para una actividad biológica surge generalmente de la superposición gráfica o analítica de las conformaciones activas de las moléculas que poseen una misma respuesta biológica y la posterior identificación de porciones comunes. En general la superposición no es exacta y se definen regiones en el espacio asociadas a un grupo importante.¹

La naturaleza tridimensional de la interacción requiere un exhaustivo análisis conformacional, a fin de conocer la conformación que adoptan los ligandos en el sitio de unión denominada *conformación bioactiva*. Por otro lado, el concepto de similitud no debe limitarse a igualdad de átomos o grupos funcionales, sino que debe referirse a las propiedades electrónicas y/o estructurales en el espacio. En este contexto, un átomo de azufre en una molécula puede ser considerado similar a un átomo de carbono de otra, por presentar semejante electrofilia. Del mismo modo, los átomos de nitrógeno de dos compuestos pueden considerarse diferentes en el caso en que uno actúa como nucleófilo y otro como electrófilo, ya que estos influyen de distinta manera en la actividad comparada

La identificación del farmacóforo provee el punto de partida para el diseño de otras moléculas con actividad biológica semejante. Por otro lado, su conocimiento permite inferir propiedades del sitio activo, considerando que serán complementarios en cuanto a la forma y a la distribución de cargas.

Muchos fármacos poseen estructuras flexibles y pueden acceder a diferentes conformaciones sin mayor costo energético. Es por esto que para la definición se incluyen en el conjunto compuestos activos que poseen una rigidez estructural tal que presentan una sola conformación posible. Estas moléculas se denominan *análogos rígidos* y son de utilidad para la definición del farmacóforo porque aumentan la precisión del modelo. Los compuestos flexibles pueden adoptar la conformación definida por el análogo rígido, de modo que los puntos importantes para la definición del farmacóforo se ubiquen en la misma posición relativa.

Si no se cuenta con este tipo de análogo en el conjunto, pueden superponerse diferentes compuestos que posean rigidez parcial en su estructura, de forma de generar el análogo rígido por la superposición de estas porciones.

Cuando no se conocen estructuras rígidas de ligandos que se unan a un receptor, se hace una búsqueda de las conformaciones óptimas; o se incluyen en principio todas las conformaciones posibles. Luego se hace un mapeo de las mismas y se resuelve gráficamente cuales son las conformaciones accesibles para la determinación del farmacóforo.²

Análisis QSAR.

La identificación del farmacóforo define la primer etapa de diseño, pero no da una idea cuantitativa de la variación de actividad asociada a una modificación dada. Este dato cuantitativo se logra mediante un análisis QSAR * (Relaciones Estructura-Actividad Cuantitativas).

El análisis QSAR es una aproximación "in-silico" (mediante cálculos computacionales) basada en un tratamiento estadístico que relaciona, mediante algoritmos matemáticos, a la actividad biológica con parámetros estructurales y/o electrónicos de los ligandos (descriptores). El tratamiento puede considerar las propiedades de la molécula (ligando) completa³ pero gana en poder de descripción si el análisis se centra en la comparación cuantitativa de las propiedades de la porción farmacofórica. En una forma u otra la etapa inicial se centra en la construcción del conjunto de compuestos de actividad biológica conocida. De acuerdo a los resultados de este estudio pueden deducirse qué

* Quantitative Structure Activity Relationships: Relaciones Estructura-Actividad Cuantitativas.

Capítulo 3

propiedades o características resultan clave para la actividad. Con esto pueden diseñarse, sintetizarse y ensayarse nuevas estructuras, logrando nuevos compuestos activos.

Los métodos QSAR fueron aplicados inicialmente a compuestos congéneres, (moléculas que poseen un esqueleto común), con el fin de optimizar la actividad biológica mediante variaciones en los sustituyentes.⁴ La idea original fue desarrollada por Corwin Hansch, quien demostró que existe una correlación lineal entre términos relacionados con la energía libre de unión ligando-receptor y la actividad biológica.⁵ A partir de este modelo extratermodinámico pueden expresarse constantes de inhibición, de afinidad u otros términos cuantificadores de la actividad biológica en función de *descriptores*. Estos últimos pueden ser parámetros fisicoquímicos, como lipofilicidad, refractividad molar; y/o términos electrónicos o estéricos, los cuales pueden obtenerse tanto en forma experimental como teórica. En forma independiente pero simultánea, Free y Wilson desarrollaron un modelo matemático estructura-actividad basado en el concepto de aditividad estructural.⁶ Consideraron que la contribución a la actividad de los sustituyentes en una molécula es aditiva y que cada grupo aporta un valor determinado e independiente de la presencia de otros, el cual no se expresa mediante descriptores fisicoquímicos, sino estructurales. Los sustituyentes se codifican como presentes o ausentes (mediante 1 o 0 respectivamente) asignándosele a éste la actividad biológica experimental. La solución de la matriz obtenida, una ecuación de regresión lineal múltiparamétrica, permite expresar la actividad biológica del conjunto de compuestos, en términos de contribuciones de los sustituyentes.

Estas ideas originales dieron lugar a diferentes formas de interpretar la influencia de la estructura química en la actividad biológica, llevando al desarrollo de numerosas modelos. Los distintos métodos se clasifican de acuerdo a las características de los descriptores.⁷⁻¹³

Las aproximaciones desarrolladas inicialmente se denominan metodologías 2D-QSAR dado que, como ya se ha dicho, dan como resultado una ecuación matemática que relaciona cuantitativamente parámetros estructurales con la actividad biológica, asignada a la molécula como un todo. Sin embargo, el diseño de una nueva molécula en base a los resultados 2D-QSAR requiere un importante conocimiento de fisicoquímica orgánica; dado que la interpretación de los resultados no incluye un análisis de las interacciones espaciales que están ocurriendo entre el ligando y el sitio activo.

Esta limitación esta superada en los modelos 3D-QSAR, donde se tienen en cuenta la forma de la molécula y se incorpora el análisis conformacional para

la identificación de la conformación activa.¹⁴ La consideración previa de las características conformacionales del farmacoforo define ya una aproximación 3D-QSAR. Recientemente se han reportado análisis 4D-QSAR donde se tiene en cuenta un conjunto de conformaciones, orientaciones y estados de protonación posibles para cada molécula, llegando a postularse modelos 6D.¹⁵

Análisis 3D-QSAR: CoMFA

Los procedimientos de QSAR tridimensionales han ganado importancia en el diseño racional de nuevas drogas. El método más usado es el análisis comparativo de campos moleculares (*CoMFA**). Desde su inicio, relativamente cercano,¹⁶ este tipo de estudios ha constituido una herramienta muy poderosa por la calidad de la información obtenida.

Los descriptores CoMFA se encuentran asociados a campos estéricos y electrostáticos generados por las moléculas y se independizan así de parámetros relacionados con la identidad de los átomos. Por lo tanto, en este estudio, el concepto de similaridad se utiliza en un sentido amplio, no restringido a compuestos que compartan el mismo tipo de átomos. Se comparan, por el contrario, los espacios comunes de los átomos que constituyen los ligandos. Esta metodología se basa en dos observaciones:¹⁶

- (1) A nivel molecular, las interacciones que usualmente producen un efecto biológico observable son del tipo no covalente.
- (2) Las interacciones no covalentes generadas por campos de fuerza estéricos y electrostáticos son suficientes para describir adecuadamente una gran variedad de propiedades moleculares.¹⁷

Mediante el análisis de estas interacciones en el entorno de cada molécula perteneciente al conjunto de estudio, es posible obtener la información necesaria para la interpretación de la propiedad biológica: Las diferencias de actividad se relacionan con las diferencias en la forma de los campos de fuerza asociados a las moléculas.

Para cuantificar estas diferencias, las magnitudes del campo estérico (Van der Waals del tipo 6-12) y electrostático (Coulombico) son muestreadas en intervalos regulares (usualmente de 2 Å). Los puntos del intervalo están determinados por las intersecciones de una grilla que atraviesa una región del

* Del inglés : *Comparative Molecular Field Analysis*

Capítulo 3

espacio que contiene a una molécula. Esto se mide para cada compuesto del conjunto y se tabula.

En la tabla resultante, cada fila caracteriza a una molécula, mientras que cada columna representa a un descriptor. Este tiene magnitud de campo eléctrico o estérico, y representa el campo ejercido por los átomos de las moléculas tabuladas, sobre un átomo de prueba localizado en un punto de la grilla en este espacio cartesiano. En general se utiliza un átomo de carbono sp^3 con carga +1 y radio de Van der Waals de 1.52 Å (figura 3.2). En el cálculo se establece una cota superior de energía generalmente de 30Kcal/mol. Esto significa que los valores de energía estérica o electrónica mayores son truncados a este valor y de esa forma se evitan valores de energía tendiendo a infinito en el interior de la molécula.

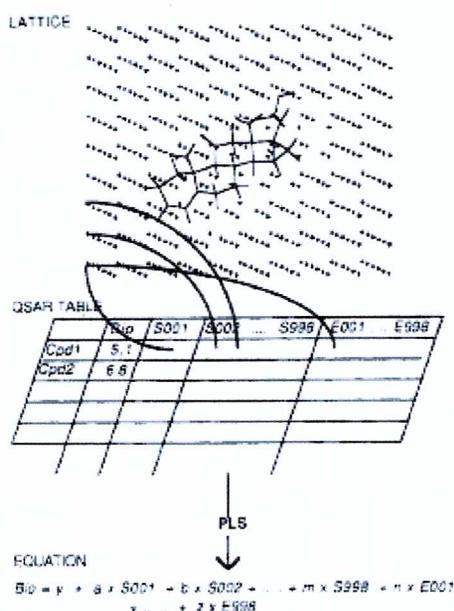


Figura 3.2. Representación esquemática del procedimiento ComFA. Tomado Bunce y colaboradores.¹⁴

El éxito de ComFA se debe, en gran parte, a la utilización del método *Partial Least Squares* (PLS) para el tratamiento de los datos.¹⁸ Esta técnica es capaz de describir o predecir diferencias en los valores de una o más columnas de una tabla (la/s variable/s dependiente/s) a partir de las diferencias en los valores de las otras columnas (descriptores). PLS es una extensión del método de regresión múltiple tradicional, capaz de generar ecuaciones lineales robustas a partir de una tabla con más columnas que filas. Además implementa el tratamiento de los resultados mediante gráficos moleculares, lo que resulta muy útil para este tipo de análisis: la ecuación QSAR, con cientos o miles de términos,

se representa mediante un mapa de contorno tridimensional para facilitar la interpretación.

En contraste con la estadística clásica, donde se espera que los datos asuman una cierta distribución, en CoMFA se usa una validación cruzada en conjunción con PLS.¹⁶ Se trata de una herramienta que nos permite discernir si existe una dependencia real entre los descriptores y la actividad o si solo se trata de un mero ajuste numérico. En la validación cruzada se llega a una ecuación QSAR tomando un subconjunto de compuestos y se predice con esa ecuación la actividad biológica de los compuestos no incluidos. En particular, puede usarse el procedimiento *leave-one-out* (LOO), donde se reconstruye el modelo PLS omitiendo un compuesto del conjunto por vez, en forma tanto sistemática como al azar, y se compara el dato predicho para el compuesto por este modelo con el dato real. Esto se repite hasta que cada dato haya sido omitido una vez. Para acelerar los cálculos se determina un filtro que solo considera valores de la energía de los descriptores estéricos y electrónicos mayores a 2 kcal/mol. La calidad de este modelo se puede expresar mediante el coeficiente de correlación de la validación cruzada (q^2):

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

donde y_i e \hat{y}_i son las actividades observadas y predichas respectivamente, mientras que \bar{y} corresponde al valor promedio de actividad de los compuestos del conjunto. Este valor es un equivalente estadístico de r^2 y puede ser considerado como una medida del poder predictivo de la ecuación de regresión: cuanto mayor es q^2 , mayor capacidad predictiva tiene el modelo. Mientras r^2 puede aumentarse "artificialmente" mediante la adición de más descriptores, el valor de q^2 decrece si esta sobreparametrizado, de allí el valor de este coeficiente. Se acepta un valor $q^2 = 0,5$ o mayor; dado que $q^2 = 1$ corresponde a predicción perfecta, y $q^2 = 0$ indica que la capacidad predictiva no difiere de la resultante de no usar modelo alguno.

Mediante el procedimiento LOO se determina la mejor correlación (mayor q^2) y se establece el número óptimo de componentes para la ecuación QSAR. De esta manera los primeros componentes que se incluyen en la ecuación pueden mostrar una relación QSAR consistente entre la actividad y los descriptores pero, eventualmente, un número mayor de datos no aporta claridad al modelo. Este número óptimo es empleado en el modelo QSAR final, el cual se calcula sin

validación; arrojando los parámetros finales del modelo entre los cuales se destaca el coeficiente de correlación r^2 .

Por tratarse de modelos en un espacio 3D, son muchos los parámetros que pueden ser ajustables en CoMFA, pero sin dudas el más importante es el relacionado con la etapa inicial: la disposición relativa de las moléculas en la grilla. Como en otros estudios 3D-QSAR, la conformación y el alineamiento molecular afectan directamente los resultados CoMFA y, por lo tanto, al éxito del modelo.

El requerimiento de alineación implica analizar las moléculas en su conformación bioactiva, información que no siempre es accesible. En la mayoría de los casos, las interacciones del complejo droga-receptor no son conocidas, y debe desarrollarse un método computacional para determinar la alineación y la conformación a usar en el modelo CoMFA.

Optimización de geometría.

El análisis del espacio conformacional de una molécula es generalmente el punto de partida para el estudio teórico de la misma. La relación matemática entre conformación y energía puede interpretarse como una superficie de energía potencial, con tantas dimensiones como grados de libertad presente la molécula.¹⁹

La optimización de la geometría de un compuesto consiste en la minimización de la energía del sistema a través de programas computacionales.

Partiendo de una conformación dada se varían parámetros estructurales (principalmente ángulos de torsión) a modo de lograr una nueva geometría, cuya energía asociada se calcula y se compara con la relacionada a la conformación inicial. El programa repite este proceso realizando cambios conformacionales que conducen a estructuras de menor energía que la anterior, hasta llegar a un mínimo energético. En este punto el cálculo se detiene, dado que otro cambio generaría una geometría menos estable. Matemáticamente, encontrar un punto mínimo representa llegar a la convergencia, es decir tener un gradiente igual a cero. El programa puede utilizar otros criterios adicionales como: la raíz cuadrada media (RMS) del gradiente igual a cero, el desplazamiento calculado para el siguiente paso igual a cero, la raíz cuadrada media del desplazamiento (RMSD) igual a cero. Prácticamente no se espera llegar a estos valores, sino que se establece una cota superior para considerar convergencia.

Esta minimización no necesariamente lleva a la conformación más estable. Con esta metodología se alcanzará el mínimo más cercano (o más parecido) a la

conformación de partida, pero puede tratarse de un mínimo relativo. La figura 3.3 muestra una curva de energía potencial sencilla para ilustrar este punto.

Para encontrar el mínimo absoluto, que representa a la conformación más estable, es necesario generar diferentes conformaciones de partida para luego comparar la energía de los puntos estacionarios que a partir de ellas se encuentran.

Esto se realiza mediante dos metodologías: *dinámica molecular* o *rotación sistemática de enlaces*.¹

En el primer caso se simula un calentamiento de la molécula permitiendo que esta sufra estiramientos y torsiones en su estructura superando de este modo las barreras energéticas entre las distintas conformaciones estables.

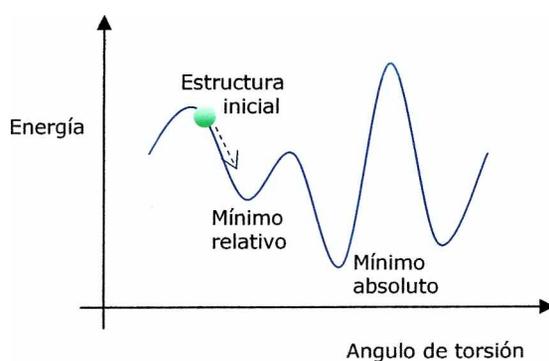


Figura 3.3. Curva hipotética de energía potencial en función de un ángulo de torsión.

Posteriormente "se enfría" el sistema y se obtiene una estructura final que posteriormente se optimiza. Este proceso se repite tantas veces como se desee.

En la rotación sistemática de enlaces se generan diferentes conformaciones de partida mediante rotación de los enlaces un determinado número de grados. Generalmente se exceptúan las rotaciones en torno a enlaces con átomos de hidrógeno o grupos metilo dado que no se generan conformaciones muy diferentes.

DISEÑO RACIONAL DE DROGAS ANTICONVULSIVAS.

En la mayoría de los casos, las drogas anticonvulsivas clásicas han sido descubiertas por azar, mediante metodologías de screening o a través de la variación estructural de drogas conocidas. Por ejemplo, las drogas antiepilépticas desarrolladas entre 1912 y 1960 se basaron en una estructura heterocíclica simple común (Figura 3.4). Durante este período, no se crearon compuestos genuinamente novedosos, sino que la atención se centró en las hidantoínas, barbituratos, oxazolindionas, succinimidias y acetilureas.

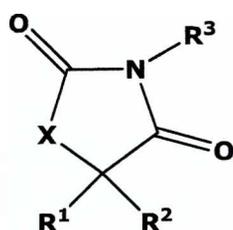


Figura 3.4. Estructura general de las drogas antiepilépticas comercializadas entre 1912 y 1960s. R1, R2 y R3 indican distintas cadenas laterales. X = -NH- en hidantoínas, X = -CO-NH- en barbitúricos, X = -O- en oxazolidinodionas, X = -CH₂- en succinimidas, X = -NH₂- en acetilureas.

El conocimiento de los mecanismos de acción de las drogas anticonvulsivas y de las patofisiologías presentes en las enfermedades cerebrales ha incrementado notoriamente en los últimos 20 años. A partir de esta información se han implementado estrategias de diseño racional directas, basadas en la comprensión de estos procesos.

Un ejemplo exitoso de la aplicación de esta metodología es el desarrollo de compuestos miméticos del GABA, como son el vigabatrin y la tiagabina, disponibles comercialmente en la actualidad.²⁰ La estrategia en este caso está sustentada en propiciar un aumento de los niveles de GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. Esto se logra mediante la inhibición tanto de la enzima GABA-transaminasa (vigabatrin) como de su recaptación (tiagabina). Otro caso es el diseño racional enfocado a la reducción o bloqueo de la neurotransmisión mediada por glutamato, uno de los principales neurotransmisores excitatorios. Algunas drogas de uso clínico, entre las que se encuentra la fenitoína, han mostrado acción bloqueante de sus receptores.²¹ Detalles de los mecanismos de acción de estos compuestos se encuentran en el capítulo 2 de este trabajo.

Sin embargo, hasta el momento, las metodologías racionales directas han fallado en la generación de nuevas terapias, dada la limitada eficacia de las drogas encontradas y los serios efectos adversos detectados en algunos casos.²²⁻²³

Prueba de esto es que la mayoría de las nuevas drogas comercializadas (como lamotrigina, topiramato, gabapentin y levetiracetam), fueron descubiertas mediante screening de compuestos sintetizados.²⁰

Una desventaja intrínseca de las metodologías directas es que falla en la identificación de drogas capaces de actuar por nuevos mecanismos. El screening in vivo usando nuevos modelos animales de epilepsia es una herramienta alternativa muy útil en este sentido (ver capítulo 5 de este trabajo).

Por otro lado, el diseño de nuevos compuestos activos se ve obstaculizado por el hecho de que las drogas usualmente poseen más de un mecanismo de acción, involucrando interacciones con más de un sitio de unión. En otros casos no se conoce un receptor específico asociado.

Se espera que el conocimiento creciente respecto de los mecanismos de las disfunciones patológicas, de los procesos de acción de las drogas y de las características de los receptores facilite el diseño racional en forma directa, incrementando el número de nuevos y más beneficiosos compuestos disponibles. Hasta entonces, el empleo de estrategias indirectas resulta una alternativa muy útil, sobre todo si el mecanismo de acción esperado para las drogas no es completamente conocido. En ambos casos la identificación de los compuestos activos se conduce con la ayuda de test biológicos, ya sea mediante metodologías in-vivo o in-vitro.

Perfil farmacológico buscado.

Como se ha detallado anteriormente, las drogas antiepilépticas presentan una amplia variedad de mecanismos de acción. El mecanismo principal por el cual estos compuestos actúan se encuentra estrechamente relacionado con el perfil farmacológico que muestran en la etapa preclínica de su evaluación.

El uso adecuado de modelos biológicos preclínicos evita seguir avanzando en los estudios de aquellos compuestos que no manifiestan efectos terapéuticos aceptables. Además, la determinación del comportamiento farmacológico en animales junto con los estudios in vitro, funcionales o de binding, permiten el reconocimiento temprano de los posibles mecanismos de acción de las drogas.

Existe una importante batería de ensayos que han sido desarrollados para detectar la actividad anticonvulsiva.²⁴ El empleo de los distintos modelos de evaluación preclínica, así como su relación con la eficacia que presentan los compuestos en humanos, han sido considerados en el capítulo 5 del presente trabajo. Entre los más usados se encuentra la inducción eléctrica (ensayo MES) y la inducción química por administración de pentilentetrazol (ensayo PTZ o Met). Estos test han detectado la actividad de muchas drogas en uso en la actualidad.²⁵ Se sabe que las drogas que actúan mediante el bloqueo de los canales de sodio son activas frente al MES test, además de presentar un comportamiento característico en estudios in-vitro; mientras que el ensayo de PTZ responde bien para compuestos GABA-érgicos.²⁶

Una cantidad importante de fármacos anticonvulsivos estructuralmente diversos presentes en el mercado muestran un perfil farmacológico similar: son

Capítulo 3

activos frente al ensayo MES e inactivos frente al ensayo PTZ. Entre ellos se encuentra la fenitoína (PHE), la carbamacepina (CZ), topiramato (TOP), zonisamida (ZON), oxcarbamacepina (OCZ),²⁷ drogas que presentan el bloqueo de canales de sodio como mecanismo de acción asociado.²⁸⁻³⁰

En este trabajo se ha encarado *el estudio de las características electrónicas y estructurales espaciales necesarias para que los compuestos presenten actividad frente al MES test*. Para ello se han seleccionado fármacos con el mismo perfil farmacológico, en relación a su actividad frente a este ensayo (ver conjunto de trabajo, pag. 54 del presente capítulo). La mayoría de los compuestos elegidos presenta el bloqueo de canales de sodio como uno de los mecanismos de acción farmacológica asociado. Esto es de esperarse, dado que la actividad frente a este test es una de las características de las drogas que actúan por esta vía.

El empleo de una metodología indirecta se fundamenta en la falta de información sobre el sitio activo en el/los receptor/es, por lo que solo se dispone de la información asociada a las drogas capaces de producir la misma respuesta biológica.

Identificación del patrón farmacofórico. Antecedentes.

En los últimos años, se han reportado en la literatura algunos modelos de farmacóforos para la actividad antiepiléptica, los cuales derivan principalmente de la comparación de compuestos activos estructuralmente relacionados.

Se han estudiado de esta manera las N-bencilamidas del ácido γ -hidroxibutírico,³¹ asociando los requerimientos de actividad con la presencia del fragmento de N-bencilamida, una unidad hidrofóbica (anillo aromático) como un sitio de unión distante y un grupo capaz de formar puentes de hidrógeno (figura 3.5):

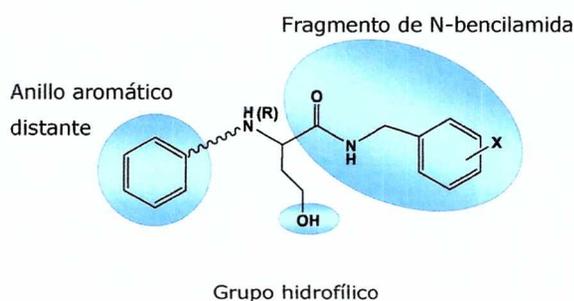


Figura 3.5. Farmacóforo propuesto para N-bencilamidas α -sustituídas del ácido γ -hidroxibutírico.³¹

Para derivados de la urea y semicarbazonas también se propuso un farmacóforo, formado por un grupo que puede formar puentes de hidrogeno ubicado entre dos regiones hidrofóbicas (figura 3.6):³² Este modelo sirvió posteriormente para el diseño de nuevas semicarbazonas con propiedades anticonvulsivas.³³

Los derivados de fenilureas anticonvulsivas (particularmente bloqueantes del canal de sodio) se compararon en otro estudio con anestésicos locales, suponiendo que estos dos conjuntos de compuestos se unen al canal de sodio en la misma región.³⁴

Se postulo un patrón farmacofórico y un sitio de unión común, considerando que los anestésicos tienen tres puntos de interacción con el receptor mientras que este tipo de anticonvulsivos poseen solo dos (figura 3.7). Esta diferencia se debe a que estos últimos carecen del grupo amino terminal (presente en los anestésicos considerados en este estudio).

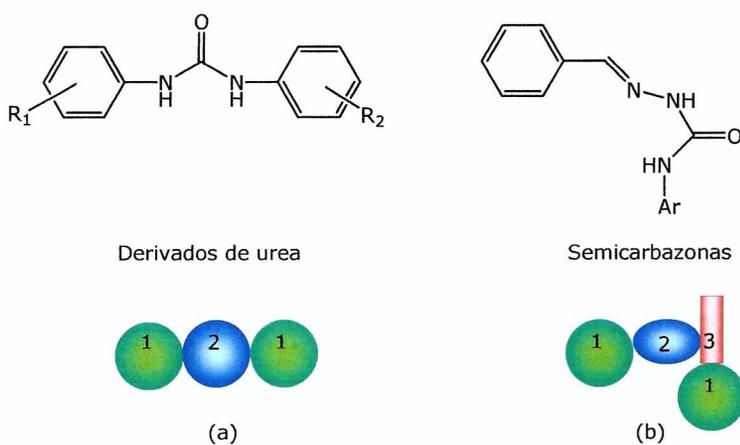


Figura 3.6.(a) Representación esquemática de los derivados de la urea estudiados y del farmacóforo sugerido para este tipo de compuestos.³² (b) Representación esquemática de las semicarbazonas estudiadas y del farmacóforo sugerido para este tipo de compuestos.³²

1-Regiones hidrofobicas. 2-Grupos capaces de formar enlaces puente de hidrógeno, 3-Grupos dadores de electrones.

También se han usado estudios computacionales para el diseño de nuevas drogas anticonvulsivas, aplicados a compuestos pertenecientes a una misma familia.³⁵⁻³⁷ Sin embargo, el número de trabajos relacionados con farmacóforos más generales, es decir, que involucran antiepilépticos de estructuras totalmente disímiles es menor.

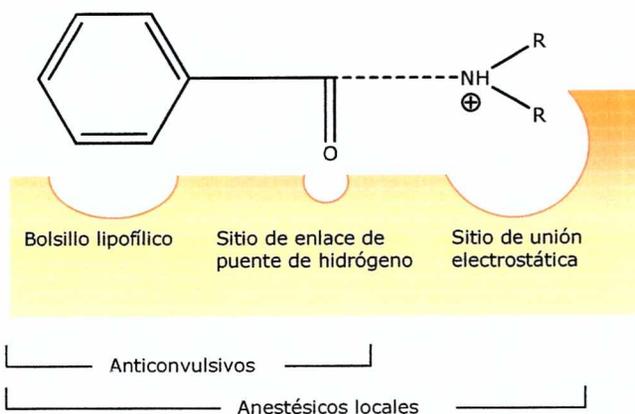


Figura 3.7. Representación esquemática del farmacóforo y del sitio de unión para anestésicos locales y anticonvulsivos que actúan por bloqueo del canal de sodio derivados de fenilureas.

A través de estudios topológicos de screening virtual Estrada y Peña propusieron fragmentos estructurales responsables para la actividad e inactividad anticonvulsiva.³⁸ Otros autores también utilizaron esta metodología para predecir la actividad antiepiléptica de compuestos químicamente diversos que presentan otra actividad biológica.³⁹

Unverferth y colaboradores reportaron un modelo general para la actividad bloqueante de canales de sodio en base a la comparación estructural de 5 moléculas disímiles como son la CZ, PHE, lamotrigina (LAM), ZON y rufinamida (RUF) (figura 3.8). Este último compuesto es un derivado de triazol que se encuentra en la etapa de ensayos clínicos.⁴⁰ Estos autores identificaron tres grupos necesarios para la actividad, ubicados a distancias definidas. Se involucra un anillo aromático, un átomo dador de electrones cercano a un grupo NH capaz de conformar una unidad dadora/aceptora por puente de hidrógeno y un segundo átomo donador de electrones.⁴¹

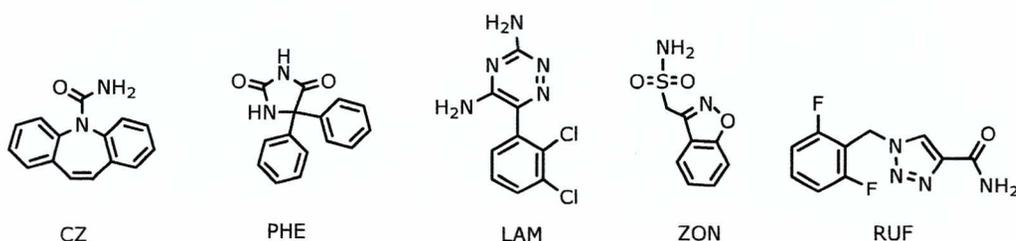


Figura 3.8. Moléculas consideradas en el modelo de Unverferth y colaboradores.⁴¹

En nuestro grupo de trabajo se han analizado exhaustivamente los requerimientos que definen al patrón farmacofórico de drogas antiepilépticas activas frente al MES test, utilizando para esto un conjunto de compuestos disímiles mayor que el antes mencionado.^{27,42-44} El farmacóforo así identificado muestra similitudes con el propuesto por Unverferth y colaboradores, pero difiere en la necesidad de que se encuentren presentes en la molécula el segundo grupo dador de electrones y el anillo aromático.

De esta forma, la definición del farmacóforo incluye (figura 3.9) :

- (a) Una porción polar constituida por dos unidades donoras de electrones (átomos 1 y 2 en la figura) y un grupo aceptor de electrones (átomo 3 en la figura) situadas en una determinada disposición espacial.
- (b) Una región lipofílica cuya posición, relativa a la porción polar, esta definida por 3 ángulos de torsión y una distancia (átomos 4 a 7 en la figura).

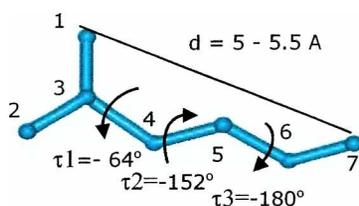


Figura 3.9. Representación esquemática del farmacóforo encontrado por nuestro grupo de trabajo. Se incluyen los ángulos de torsión y la distancia al grupo polar que lo caracterizan.

Empleando la información contenida en el farmacóforo se logró diseñar nuevas drogas antiepilépticas derivadas del ácido valproico, que presentan el perfil farmacológico buscado y son más activas que el ácido mencionado.²⁷

Como parte de este trabajo de tesis se realizó un estudio comparativo de campos moleculares (CoMFA) de drogas anticonvulsivas activas frente a MES test. Al incluirse información 3D en el análisis, es de esperar que los resultados tengan una marcada dependencia con la conformación. Es por eso que en estos estudios debe tenerse especial cuidado en la elección de la conformación activa y en el alineamiento de las moléculas. Se utilizó como punto de partida el patrón farmacofórico previamente determinado en nuestro laboratorio,^{27,42-44} basando la alineación molecular en las características electrónicas y estructurales definidas por este. En base a este análisis se identificó un nuevo requerimiento asociado a

la importancia de la presencia de un grupo voluminoso unido a la porción polar. Este resultado contribuyó al diseño de nuevos compuestos activos, sulfamidas, teniendo en cuenta la ubicación de las cadenas lipofílicas respecto de la parte polar.

Conjunto de trabajo y alineamiento.

Para la selección de compuestos se procuró un número de moléculas significativo que formaran un conjunto estructuralmente diverso, pero con similar acción biológica en el modelo experimental: actividad en MES test. Además, se constató que los datos de actividad biológica encontrados en literatura hubieran sido determinados en las mismas condiciones experimentales y mediante la misma metodología.

De este modo se seleccionaron 27 compuestos (figura 3.10) donde se incluyeron drogas clásicas como PHE, CZ, primidona (PRM), fenobarbital (PB) y methsuximida (METS); junto con drogas de segunda generación como felbamato (FLB), topiramato (TOP), zonisamida (ZON) y oxcarbamacepina (OCZ).²⁰ También se incluyeron derivados del topiramato con actividad anti-MES reportada y mayor a la de este precursor: el sulfamato de 2,3-O-isopropiliden-4,5-O-sulfonil- β -fructopiranososa (TOP2), el sulfamato de N-metil 2,3-O-isopropiliden-4,5-O-sulfonil- β -fructopiranososa (TOP2Me) y el sulfamato de N-metil 2,3-O-isopropiliden-4,5-O-sulfonil- β -fructopiranososa (TOP2Me).⁴⁵ Se incorporaron además drogas en desarrollo pero con actividad anti-MES medida, como son retigabina (RET) y valrocemida (VAL);²⁰ así como compuestos en estudio por su capacidad bloqueante de canales de sodio y marcada actividad anti-MES: la remacemida (RMC), y la vinpocentina (VIN).^{40, 46} También se incluyeron en el conjunto valpramidas N-sustituídas y un éster del ácido valproico (valproato), los cuales presentan en su estructura sustituyentes con diferentes características de polaridad y tamaño. Estos son: N-butilvalpramida (BUVPD), N-ciclohexilvalpramida (CHVPD), N,N-dimetilvalpramida (DMVPD), N-etilvalpramida (ETVPD), N-isopropilvalpramida (IPVPD), ácido 4-valproilcarboxamido benzoico (CPVPD), N-(sulfonamidofenil)valpramida (SUVDP) y valproato de propilo (PRVP). Estos derivados han sido previamente diseñados a partir de la consideración de la actividad anticonvulsiva encontrada en la valpramida (VPD) (contenida en el conjunto de análisis), la cual presenta mayor potencia que ácido valproico; teniendo en cuenta los cambios que se producen en la actividad debido a la N-sustitución.²⁷ El perfil farmacológico de estos derivados es similar al que presenta la PHE en los test MES y PTZ. El conjunto se completa con derivados de la

Diseño de nuevas drogas antiepilépticas

acetazolamida como la 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (HATS) y la 5-terbutoxicarbonilamino-1,3,4-tiadiazol-2-sulfonamida (B-HATS) que presentan actividad anti-MES mayor a la de su precursor.⁴⁷

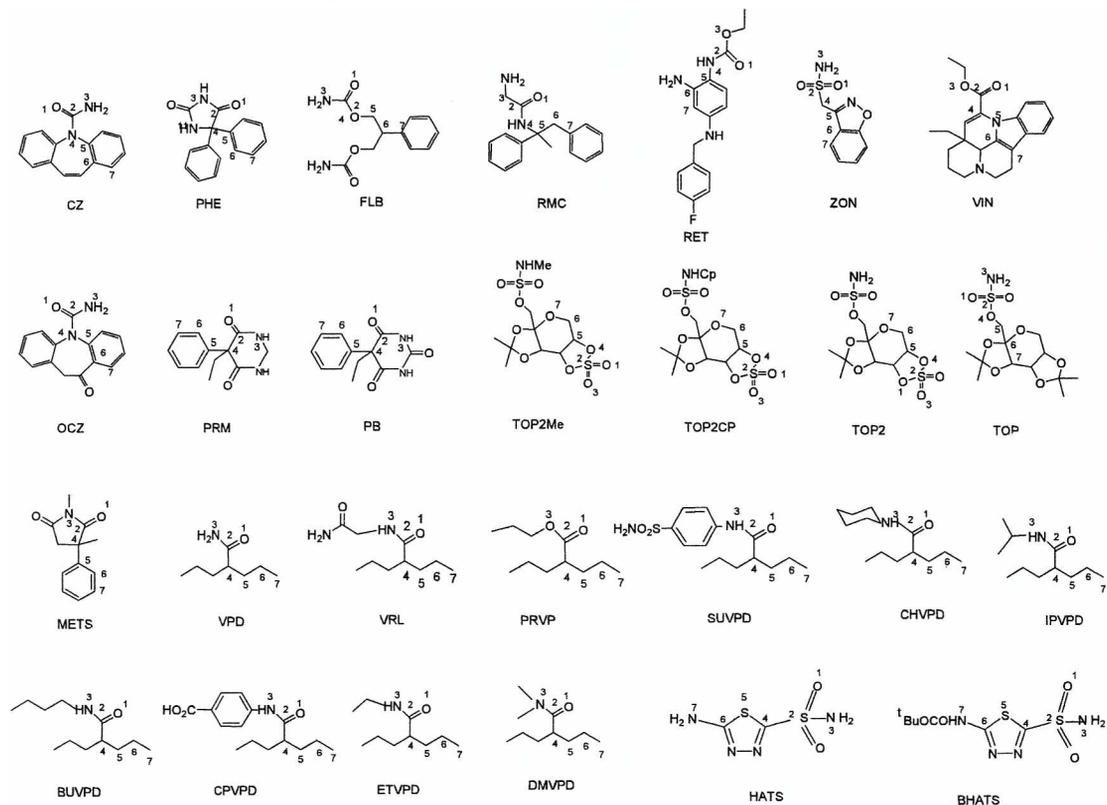


Figura 3.10. Conjunto de drogas con acción anticonvulsiva seleccionadas para el estudio. Los átomos numerados son los que definen el patrón farmacofórico.

Como ya se ha comentado, para el análisis CoMFA se requiere que las moléculas se encuentren alineadas de acuerdo a su conformación activa. Para esto se ha usado como referencia la disposición espacial del farmacóforo asociado con las drogas activas frente al MES test (figura 3.9).

En el conjunto de drogas (Fig. 3.10) existen compuestos que presentan estructuras rígidas que fijan las principales características conformacionales. Moléculas como CZ y PHE contribuyeron previamente en la determinación del farmacóforo debido a su rigidez estructural (análogos rígidos),^{27,42-44} definiendo las características de la conformación activa tanto para la parte polar (PHE) como la no polar (CZ) (figura 3.11). Los átomos asociados a dicho farmacóforo son los que se presentan numerados en la figura 3.10 para cada una de las moléculas.

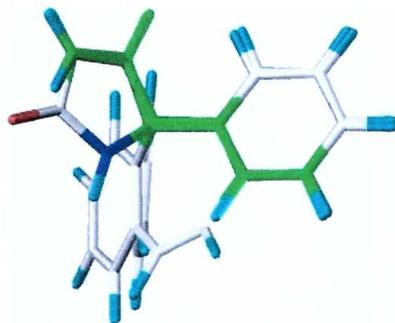


Figura 3.11. Superposición de las moléculas de CZ y PHE. Los átomos en verde representan el farmacóforo.

En una primera etapa, previa a la determinación de la conformación activa, cada una de las 27 estructuras se optimizó en su geometría a través de un cálculo químico cuántico, empleando funcionales de la densidad (B3LYP) con bases 6-31G** (ver capítulo 1), utilizando el programa Gaussian 98.⁴⁸ Con ello se encontró la conformación de menor energía de cada uno de los compuestos. A partir de esta conformación, los átomos asociados al farmacóforo (numerados de 1 a 7 en la figura 3.10) se alinearon con este mediante métodos de superposición, usando la herramienta *fit atoms* presente en el programa Sybyl 6.6.⁴⁹ Como una medida de la habilidad de las moléculas para adoptar la conformación activa se midieron los valores de RMS para cada molécula y el farmacóforo mediante la ecuación:

$$RMS = \left(\frac{\sum d^2}{n} \right)^{1/2}$$

donde *d* es la distancia entre los dos átomos superpuestos y *n* es el número de pares que fueron considerados en la superposición. La tabla 3.1 muestra los valores obtenidos, incluyendo también los datos de actividad biológica tomados de literatura.^{24, 28, 36, 45, 47, 50-53} Estos últimos datos se expresan como dosis efectiva media en ratones frente al MES test, es decir, la dosis de anticonvulsivo a la cual se observa protección en el 50% de los animales (ver capítulo 5).

Compuesto	ED50 ^a	RMS	Compuesto	ED50 ^a	RMS
CZ	37	0.000	METS	377.5	0.062
PHE	38	0.104	VPD	353	0.222
FLB	210	0.213	VRL	759.5	0.091
RMC	292	0.118	PRVP	96	0.089
RET	30.67	0.094	SUVPD	53	0.088
ZON	92	0.499	CHVPD	61	0.088
VIN	77	0.706	IPVPD	384	0.088
OCZ	79	0.142	BUVPD	487	0.088
PRM	52.3	0.200	CPVPD	1225	0.088
PB	93.9	0.308	ETVPD	200	0.087
TOP2ME	22.3	0.846	DMVPD	347	0.088
TOP2CP	20.4	0.846	HATS	90	0.493
TOP2	19.8	0.846	B-HATS	74	0.493
TOP	112	0.276			

Tabla 3.1. Valores de los RMS que resultan de la superposición de los compuestos con el farmacóforo.

^a ED50: Valores de dosis efectiva media (ED50, $\mu\text{mol/kg}$) encontrados para el MES test de drogas antiepilépticas (tomado de literatura).

Las moléculas del conjunto analizado, cumplen con los requerimientos del farmacóforo y poseen además otras porciones no incluidas en este, caracterizadas por su flexibilidad rotacional. Diversas conformaciones pueden ser generadas por rotación alrededor de enlaces no pertenecientes al farmacóforo, que pueden a-priori ser consideradas como activas. En estos casos se eligieron aquellas conformaciones activas cuyo valor de q^2 sea máximo.

La búsqueda de las características de la interacción de un receptor con moléculas flexibles resulta muy interesante en el sentido de que muchas conformaciones son energéticamente accesibles y coexisten en equilibrio. El objetivo en estos casos es la identificación de la disposición estructural y electrónica común que resulta determinante para el reconocimiento o la activación del receptor.

En la figura 3.12 se muestra el resultado de la superposición de la totalidad de las moléculas con la conformación considerada como activa.

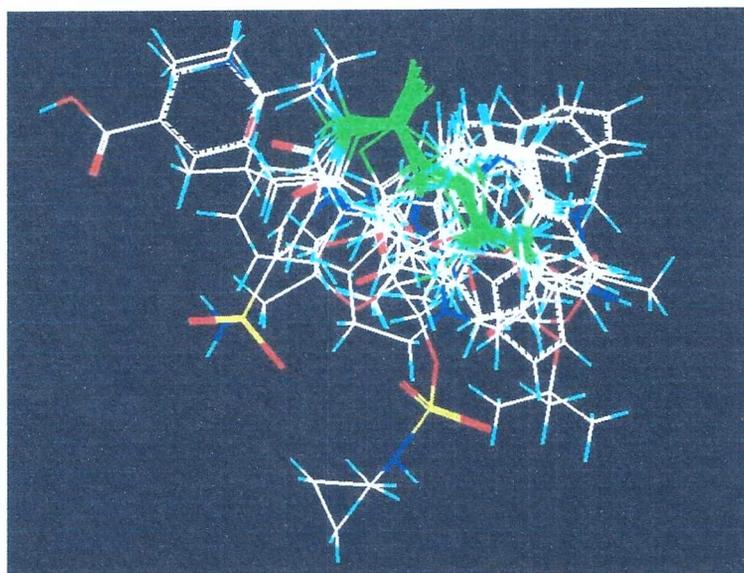


Figura 3.12. Moléculas superpuestas con la conformación considerada en CoMFA. Los átomos usados para la superposición se muestran en color verde.

Parámetros usados en CoMFA.

Se utilizaron los parámetros standard para el análisis. Las moléculas alineadas se colocaron en una grilla tridimensional cuyos puntos se encuentran separados por longitudes de 2 Å en las direcciones x,y,z.

Los descriptores calculados automáticamente son las energías resultantes de las interacciones electrónicas (del tipo Van der Waals 6-12) y electrostáticas (del tipo coulombicas, con un dieléctrico $1/r$) entre cada compuesto y el átomo de prueba ubicado en las intersecciones de la grilla que contiene la molécula.¹⁴ Los valores de las constantes de Van der Waals A/B se tomaron de los campos de fuerza estándar generados por el programa.⁵⁴

Se utilizó como átomo de prueba un carbono sp^3 con carga +1.0 y radio de Van der Waals de 1.52 Å, usando una energía de 30 kcal/mol como valor de corte en los campos estéricos y electrostáticos. Estos descriptores fueron usados como variables independientes, mientras que como variable dependiente se utilizó el logaritmo negativo de la ED50.

Análisis PLS.

El análisis de regresión se realizó a través de la estimación PLS.¹⁴ Inicialmente se utilizó el método de validación cruzada LOO para testear la solidez del modelo y la capacidad de predicción interna del mismo. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 3.2. El coeficiente de regresión obtenido mediante la validación cruzada (q^2) es 0.748, con un valor aceptable de error estándar: 0.107. Este último valor se calcula como:

$$SEE = \left(\frac{\sum (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - c - 1} \right)^{1/2}$$

siendo y_i e \hat{y}_i son las actividades observadas y predichas respectivamente, n es el número de compuestos y c el número de componentes.

En la tabla se reporta además el número óptimo de componentes, el cual fue usado para derivar la ecuación final sin validación cuyo coeficiente de regresión (r^2) es 0.960. Se reportan otros datos, como la contribución relativa a la ecuación de los campos estéricos y electrostáticos; y un promedio del valor absoluto de los residuos. Estos se definen como la diferencia entre el valor experimental de la actividad y el valor predicho por la ecuación final.

En base a estos resultados se puede considerar que el modelo usado es muy bueno y con una capacidad predictiva significativa.

Resultados estadísticos	
q^{2a}	0.748
ONC ^b	4
SEE ^c	0.107
r^{2d}	0.960
Sf ^e	0.672
Ef ^f	0.328
Res ^g	0.079

Tabla 3.2. Resultados estadísticos obtenidos a partir de CoMFA. ^a q^2 : coeficiente de la regresión con validación cruzada. ^bONC: Número óptimo de componentes. ^cSEE: Error estándar. ^d r^2 : coeficiente de

Capítulo 3

la regresión sin validación cruzada r^2 . ^e Sf: Contribución relativa del campo estérico. ^f Ef: Contribución relativa del campo electrostático. ^g Res: Promedio de los residuos.

Visualización de los resultados QSAR.

La tabla 3.3 lista las actividades medidas y predichas, expresadas en forma logarítmica, y los valores de los residuos calculados. Se ve que estos últimos son menores a 0.25 en valor absoluto, con solo 8 de ellos mayores a ± 0.1 (30% del total).

Los resultados obtenidos pueden interpretarse gráficamente en términos de mapas de contorno (figura 3.13), los cuales han permitido un mayor conocimiento de los requerimientos que deben cumplir los ligandos para manifestar la actividad buscada.

Se encuentra que los descriptores fisicoquímicos, como son las propiedades estéricas y electrostáticas, presentan diferentes contribuciones al modelo CoMFA. La primera es más de dos veces mayor a la segunda (tabla 3.2), indicando una mayor influencia en la modulación de la actividad.

Dado que este modelo fue construido en base a la actividad biológica determinada mediante ensayos in-vivo, la información que deriva de este estudio no se encuentra relacionada solo con los requisitos del sitio activo. También se asocia con otros factores como son los fenómenos de adsorción, distribución y metabolismo de la droga, los cuales resultan críticos en el diseño integrado de un compuesto activo.

Como ya se ha detallado, la metodología de alineamiento utilizada en este trabajo se encuentra basada en la superposición de los átomos que definen al farmacóforo para cada molécula. Por lo tanto estos se encuentran ubicados aproximadamente en las mismas coordenadas espaciales de la grilla que se usa en el modelo.

Compuesto	-LogED50 Experimental	-LogED50 predicho	Residuos
CZ	-1.57	-1.64	0.07
PHE	-1.58	-1.72	0.14
FLB	-2.32	-2.22	-0.10
RMC	-2.47	-2.47	0.00
RET	-1.49	-1.53	0.04
ZON	-1.96	-1.89	-0.07
VIN	-1.89	-1.91	0.02
OCZ	-1.90	-1.73	-0.17
PRM	-1.72	-1.83	0.11
PB	-1.97	-1.89	-0.08
TOP2ME	-1.35	-1.36	0.01
TOP2CP	-1.31	-1.33	0.02
TOP2	-1.30	-1.38	0.08
TOP	-2.05	-1.98	-0.07
METS	-2.58	-2.33	-0.25
VPD	-2.55	-2.49	-0.06
VRL	-2.88	-2.93	0.05
PRVP	-1.98	-2.07	0.09
SUVPD	-1.72	-1.64	-0.08
CHVPD	-1.79	-1.95	0.16
IPVPD	-2.58	-2.69	0.11
BUVPD	-2.69	-2.74	0.05
CPVPD	-3.09	-3.09	0.00
ETVPD	-2.30	-2.17	-0.13
DMVPD	-2.54	-2.65	0.11
HATS	-1.95	-1.94	-0.01
B-HATS	-1.87	-1.83	-0.04

Tabla 3.3. Actividad biológica medida y predicha para los compuestos del conjunto, expresada en forma logarítmica. También se incluyen los valores de los residuos.

Además, presentan entre si características electrónicas similares, las que han sido comparadas e identificadas al definir el farmacóforo.^{24, 39-41} Es por ello que se espera que los átomos que forman parte del patrón farmacofórico en las moléculas contribuyan de manera similar a los descriptores del análisis CoMFA; y que las variaciones electrónicas y estructurales del conjunto se encuentren relacionadas principalmente a porciones de la molécula no incluidas en el farmacóforo. Estas diferencias son las responsables de generar variaciones de los campos moleculares en regiones del espacio que no pertenecen al farmacóforo.

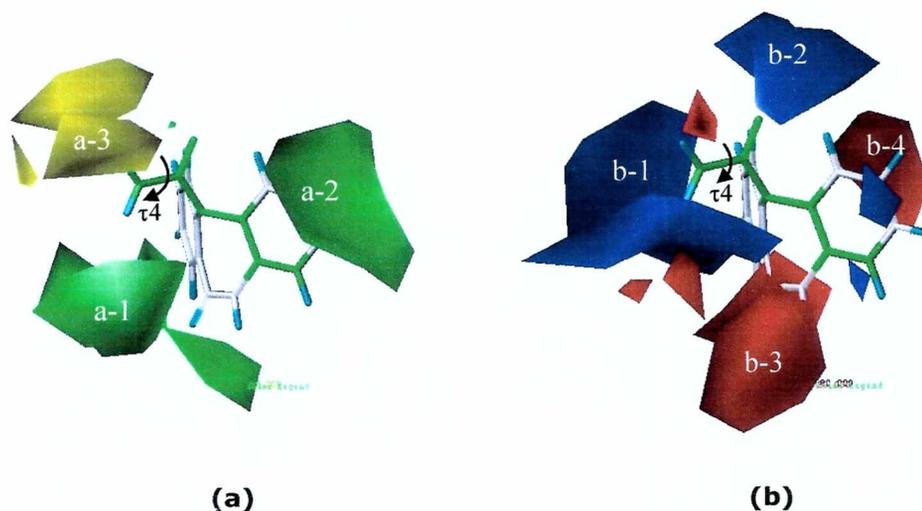


Figura 3.13. Mapas de contorno de los campos estéricos y electrostáticos asociados al análisis CoMFA, con la molécula de CZ como referencia. El patrón farmacofórico se muestra en verde.

a- Las superficies en verde indican las regiones donde la actividad aumenta por la ubicación de grupos voluminosos. Las zonas amarillas representan las regiones donde la actividad decrece por la adición de estos grupos. b- Las superficies en azul indican las regiones donde la actividad aumenta por la ubicación de grupos con carga positiva. Las zonas rojas representan las regiones donde la actividad aumenta por la adición de grupos con carga negativa. Las regiones más importantes se indican con números.

A partir de la correlación encontrada en este estudio entre la actividad y la estructura, y mediante la observación de las "cadenas laterales" al farmacóforo, en este trabajo hemos encontrado un *nuevo requerimiento* para incrementar la actividad antiepiléptica como se describe a continuación.

- El mapa de contorno de los campos estéricos presenta dos regiones (en verde), donde la adición de grupos voluminosos pueden aumentar la actividad. En particular hemos prestado atención a la región verde cercana al extremo polar del farmacóforo (a-1). Esta se ubica cerca del átomo 3 de la figura 1, y puede asociarse a un grupo voluminoso unido en una orientación definida al extremo polar del farmacóforo, determinada mediante el valor del ángulo de torsión τ_4 (Figura 3.11).

Respecto a los compuestos del conjunto, se observa que la mayor actividad se encuentra en moléculas como PB, PHE, PRM, las cuales poseen un sustituyente voluminoso en la región mencionada. Estos compuestos presentan un valor de τ_4 cercano a 0, el cual es fijo debido a la rigidez de estas moléculas.

La zona verde a-2 puede ser considerada una extensión de la porción no polar del farmacóforo de partida, de acuerdo a la posición que presenta respecto a este.

- En amarillo se representa la zona donde la adición de un grupo voluminoso puede disminuir la actividad (región a-3). Esta se encuentra localizada cerca del extremo polar del farmacóforo, opuesta a la región verde considerada previamente (a-1).

Este análisis por zonas sugiere una explicación de la baja actividad de la molécula METS comparada con PB, PHE y PRM. Estas presentan una porción rígida ubicada la región verde a-1 y con un ángulo de torsión τ_4 cercano a cero, pero el sustituyente metilo unido al átomo de nitrógeno de METS se encuentra en la región amarilla, justificando la menor actividad para este compuesto (figura 3.14).

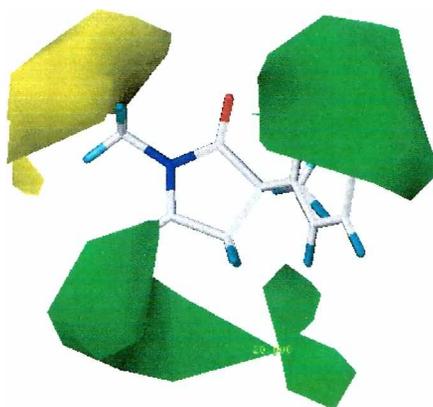


Figura 3.14. Orientación espacial de la molécula METS en relación al mapa de contorno de los efectos estéricos derivados de CoMFA.

- Otras moléculas del conjunto presentan grupos voluminosos cercanos al extremo polar, pero con un valor de τ_4 variable debido a que el compuesto presenta libre rotación sobre dicho enlace. En estos casos, la influencia de estas regiones fue examinada en detalle a través de la inspección de los valores obtenidos para el coeficiente de correlación de la validación cruzada (q^2). Se concluyó que la mejor correlación se obtiene para valores de τ_4

cercanos a 0 para los compuestos mas activos (ED50 menor a 200 mmol/kg) y cercano a 180 en los menos activos (ED50 mayor a 200 mmol/kg).

En base a esta observación, hemos definido un requerimiento adicional para la actividad anticonvulsiva: *una porción voluminosa unida al extremo polar del farmacóforo, orientada de modo que el valor de τ_4 sea cercano a 0*. La figura 3.15 muestra el nuevo farmacóforo propuesto:

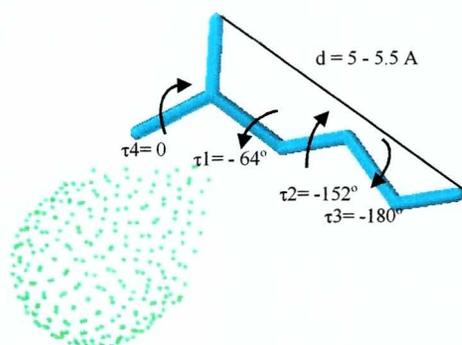


Figura 3.15. Estructura del nuevo patrón farmacofórico propuesto. El requerimiento adicional puede describirse como una región lipofílica definida a través de τ_4 .

Este nuevo requerimiento ha permitido explicar, por ejemplo, las diferencias en los valores de actividad entre el TOP y sus derivados. En estos últimos, el alineamiento se realizó utilizando la función sulfato como porción polar del farmacóforo; mientras que se usó la función sulfamato para el TOP (figura 3.10). Este alineamiento genera el mejor valor de q^2 en el método LOO de la validación cruzada.

De este modo, la orientación espacial de los derivados del TOP (figura 3.16) coloca los grupos metilo del esqueleto de 2,3-O-isopropilideno-4,5-O-sulfonil- β fructopiranososa en la porción verde (a-1, figura 3.13); mientras que en TOP, estos grupos no pueden alcanzar dicha posición.

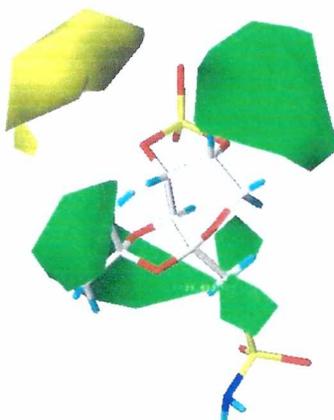


Figura 3.16. Orientación espacial de la molécula TOP2 en relación al mapa de contorno de los efectos estéricos derivados de CoMFA.

La interpretación del mapa de contorno de los campos electrónicos (figura 3.11-b) no es sencilla. Existen varias zonas que indican regiones donde los grupos negativos pueden aumentar la actividad (en rojo) y otras donde este efecto lo ejercen los sustituyentes positivos (azul). La posición de las regiones en azul (b1 y b2) se complementan perfectamente con los extremos negativos del farmacóforo (átomos 1 y 3 de la figura 3.1). La presencia de una carga positiva cercana a estas, o de una carga negativa para las regiones rojas (b3 y b4) pueden ser factores a considerar en el diseño de compuestos activos, pero no se han tomado en cuenta en este trabajo dado que el factor estérico parece tener mayor peso en la actividad, según los parámetros encontrados (tabla 3.2).

Diseño racional y reemplazo bioisostérico.

Los resultados del modelo CoMFA se usaron para el diseño de nuevos prototipos activos. Para ello se consideró el nuevo patrón farmacofórico definido mediante este estudio (figura 3.15). Dado que se trata de un farmacóforo determinado en el espacio (farmacóforo en 3D) e independiente de identidades químicas, pueden buscarse compuestos con estructuras completamente diferentes.

En base a ello, se planteó el diseño de compuestos con diferentes tipos de cadenas hidrocarbonadas (lineales, ramificadas o cíclicas; alifáticas o aromáticas) capaces de adoptar la conformación correspondiente a la porción no polar del farmacóforo y de presentar un grupo voluminoso unido al grupo polar en la

región definida (figura 3.15). También se consideraron compuestos incapaces de cumplir con estos requerimientos, a fin de tener elementos de testeo negativo en el análisis posterior que incluya los compuestos diseñados.

En cuanto a la porción polar (átomos 1-3 en la figura 3.10), se observa que las drogas estudiadas poseen en esta región similaridad bioisósterica (capítulo 1). Los grupos CH₂, NH, y O son isósteros de acuerdo a la ley de desplazamiento de Grimm⁵⁵⁻⁵⁶ y son considerados bioisósteros clásicos.⁵⁷ Adicionalmente, los grupos sulfoxidos y sulfonas han sido reconocidos como bioisósteros no clásicos del grupo carbonilo.⁵⁷ La diferencia de electronegatividad entre el átomo de carbono y de oxígeno presente en este último resulta en una carga positiva parcial sobre el carbono y una negativa sobre el oxígeno. Es por ello que los bioisósteros de esta función son generalmente grupos atractores de electrones y con un tamaño relativamente grande, como los mencionados.⁵⁸⁻⁶³

Por inspección de los anticonvulsivos estudiados se ve que las porciones polares del farmacóforo forman parte de funciones *amida*, *carbamato*, *ester*, *urea*, *sulfonamida*, *sulfamato* y *sulfato* (figura 3.10), las cuales podrían considerarse bioisósteros entre si. Se propone entonces la inclusión de la función *sulfamida* para el grupo polar, considerándolo como una opción adecuada para el reemplazo bioisostérico de las demás funciones (Figura 3.17).

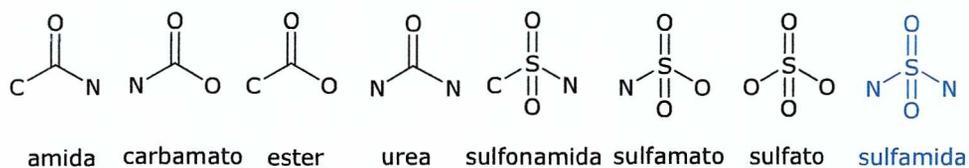


Figura 3.17. Funciones presentes en las drogas antiepilépticas estudiadas que se corresponden con la porción polar del farmacóforo (en negro). Se incluye la función sulfamida (en azul) como nuevo bioisósteros propuesto.

Resulta interesante examinar si diferentes moléculas con esta funcionalidad y las condiciones derivadas del modelo reflejan la actividad esperada frente al MES test. Compuestos que presentan este grupo han sido estudiados en química medicinal como inhibidores de proteasa de HIV,⁶⁴⁻⁶⁸ agonistas del receptor 5-HT_{1D},⁶⁹ análogos activos de epinefrina,⁷⁰ e inhibidores de anhidrasa carbónica.⁷¹⁻⁷⁷ También han sido considerados como componentes no hidrolizables de péptidomiméticos (ver pagina 67).⁷⁸⁻⁸³

Debe aclararse que el concepto cualitativo de bioisósteros resulta muchas veces demasiado amplio. Es por eso que solo ha sido utilizado como una herramienta inicial y adicional en el diseño de nuevos anticonvulsivos,

contribuyendo a la elección de la porción polar de el farmacóforo. Sin embargo, lo que se ha tenido en cuenta principalmente para la selección de compuestos son los requerimientos específicos para la actividad anti-Mes que han quedado definidos con el nuevo patrón farmacofórico.

Peptidomiméticos.

Como etapa posterior al diseño de sulfamidas que presenten diferentes sustituyentes hidrocarbonados, se pensó en incluir en el conjunto moléculas que contengan, además de esta funcionalidad, grupos aminoácidos.

Los aminoácidos, junto con sus derivados funcionarizados, han sido objeto de estudio por presentar en algunos casos una marcada acción antiepiléptica.⁸⁴ Prueba de esto es la llamativa cantidad de esta clase de estructuras presentes tanto en drogas de segunda generación (gabapentin, levetiracetam, tiagabina y vigabatrin), como en fármacos en desarrollo (NPS1776, pregabalin, SPM927 y UCB34714).²⁰

En un sentido más amplio, los aminoácidos son considerados como las unidades fundamentales de los péptidos; compuestos de gran interés dentro de la química medicinal. En particular, los péptidos pequeños representan un excelente punto de partida para el diseño de nuevas drogas. Esto se debe a su potencial habilidad para superar las dificultades inherentes a su farmacocinética (presentes en los péptidos de gran peso molecular), sin pérdida de las características necesarias para el reconocimiento molecular.⁸⁵⁻⁸⁷ Con esta idea en mente, un significativo número de dipéptidos han sido desarrollados, convirtiéndose en nuevos agentes farmacéuticos.⁸⁸⁻⁹⁴ Desafortunadamente, aún los péptidos pequeños sufren limitaciones relacionadas con su inestabilidad frente a la proteólisis, su baja biodisponibilidad y alta solubilidad o por su rápida eliminación. La disminución del carácter peptídico mediante modificaciones que logren características fisicoquímicas y fisiológicas más deseables, ayuda a evitar los efectos antes mencionados

Se define como *peptidomimético* a aquella molécula que posee una semejanza identificable con un péptido pero que, cuando actúa como ligando de un receptor biológico, es capaz de imitar o inhibir el efecto que ocasionaría este último. Las principales ventajas encontradas en el uso de peptidomiméticos como potenciales fármacos se resumen en la tabla 3.4:

Desventajas de los péptidos

Ventajas de los peptidomiméticos

Estabilidad limitada hacia la proteólisis de las peptidasas en el tracto gastrointestinal y en el suero.

Los grupos isósteros, retroinversopéptidos^a y los péptidos cíclicos reducen la velocidad de degradación por peptidasas y por otras enzimas.

Propiedades de transporte pobre desde los intestinos a la sangre, y a través de la barrera hematoencefálica; debido a su alto peso molecular y la falta de transportadores específicos.

La adición de residuos hidrofóbicos y/o el reemplazo de los grupos amida ha mejorado las propiedades de transporte a través de las membranas celulares.

Excreción rápida a través del hígado y/o riñones.

Las estructuras restringidas conformacionalmente pueden minimizar las interacciones con otros receptores y aumentar la actividad en el receptor deseado.

Gran flexibilidad, lo que permite la interacción con múltiples receptores además del esperado y ocasiona efectos secundarios.

Tabla 3.4. Ventajas del uso de peptidomiméticos en el diseño de fármacos. ^aretroinversopeptidomiméticos: péptidos lineales cuya secuencia de aminoácidos se invierte, así como la quiralidad de los estereocentros.

En relación con la construcción de peptidomiméticos, la función urea ha sido recientemente centro de atención. Se ha usado como conector no-hidrolizable de aminoácidos, así como de grupo aceptor en la formación de enlaces hidrógeno con el receptor. Un ejemplo de esto son las ureas que contienen aminoácidos y son inhibidores de la HIV proteasa.⁹⁵⁻¹⁰¹ Análogamente, la función sulfamida ha servido como componente no-hidrolizable en peptidomiméticos, mostrando selectividad y actividad inhibitoria para diferentes proteasas.⁷⁸⁻⁸³ Nuevamente puede encontrarse una relación bioisósterica entre la función urea y sulfamida, si se considera la acción frente a la HIV proteasa.

En este trabajo no se trata de imitar la actividad antiepiléptica de algún péptido en particular, sino que se pretende analizar el perfil farmacológico de compuestos pequeños que muestren una clara semejanza con los dipéptidos, pero sin la unión peptídica presente.

En otras palabras, se utilizó la sulfamida como función no hidrolizable conectora de dos aminoácidos, para la construcción de compuestos capaces de presentar acción antiepiléptica. Los aminoácidos se eligieron considerando el farmacóforo previamente descrito.

Capítulo 3

bencil-N'-terbutoxicarbonil-sulfamida (10c), N,N-dipropil-N'-terbutoxicarbonil-sulfamida (11c), N,N'-sulfonil bis-L-Alanina dimetil ester (7b), N,N'-sulfonil bis-L-Valina dimetil ester (8b), N,N'-sulfonil bis-L-Prolina dibencil ester (6b), N,N'-sulfonil bis-β-Alanina dimetil ester (9b), (S)(-)[N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-alaninato de metilo (12d), [N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-β-alaninato de metilo (13d), [N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (14d), [N-(N'-terbutoxicarbonil, N'-valproil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (16e), [N-(N'-bencil, N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (17e), [N-(N'-terbutoxicarbonil, N'-valproil)-sulfamoil]-β-alaninato de metilo (15e), [N-(N'-bencil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (20f),), [N-(N'-valproil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (21f).

Considerando que las sulfamidas de aminoácidos posiblemente puedan carecer de lipofilia suficiente para presentar la acción buscada con potencia considerable, se prepararon sulfamidas formadas por un aminoácido y una cadena alifática. Esta última se eligió de acuerdo a los requerimientos propuestos, considerándose promisorio la inclusión de la cadena alifática que comparten el ácido valproico y la valpromida.

También se prepararon sulfamidas cuya estructura no puede adoptar la conformación activa propuesta en el farmacóforo, a modo de validar, mediante un test negativo, los requerimientos necesarios para presentar actividad.

Las rutas sintéticas elegidas varían de acuerdo a la disposición relativa de los sustituyentes en la función sulfamida; y si se incluyen aminoácidos o no en la estructura. Algunas de las síntesis implican la preparación de sulfonilcarbamatos como productos intermedios, los cuales se han considerado también posibles estructuras activas, por lo que fueron evaluadas. En el siguiente capítulo se detallan las vías de preparación empleadas.

Referencias del capítulo 3.

1. Patrick, G.L., Chapter 8: Computers in Medicinal Chemistry. En *Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2001**, 319-374.
2. Bernard, D; Coop, A.; MacKerell, A. D., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7773.
3. Patrick, G.L., Chapter 11: Quantitative structure-activity relationships. En *Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2001**, 258-288.
4. Hansch, C.; Maloney, P. P.; Fujita, T.; Muir, R. M., *Nature*, **1962**, *194*, 178.
5. Hansch, C.; Fujita, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 1616.
6. Free, S. M.; Wilson, J. W., *J. Med. Chem.*, **1964**, *7*, 395.
7. Topliss, D. J., En *Quantitative Structure-Activity Relationships of Drugs*, Academic Press, New York, **1983**.

8. Hansch, C.; Fujita, T. En *Classical and Three-Dimensional QSAR in Agrochemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, **1994**.
9. Fujita, T., En *QSAR and Drug Design: New Developments and Applications*, Elsevier, Amsterdam, **1995**.
10. Parrill, A. L.; Reddy, M. R., En *Rational Drug Design -Novel Methods and Practical Applications*, American Chemical Society, Washington, DC, **1999**.
11. Hansch, C.; Leo, A., En *Exploring QSAR Fundamentals and applications in chemistry and biology*, American Chemical Society, Washington, DC, **1995**.
12. Zahradnik, P.; Foltinova, P.; Halgas, J., *SAR QSAR Environ. Res.*, **1996**, 5, 51.
13. Debnath, A. K., *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2001**, 1, 187.
14. Hopfinger, A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7196.
15. Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Jin, B.; Albuquerque, M.; Madhav, P. J.; Duraswami, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10509.
16. Cramer, R.D.; Patterson, D.E.; Bunce, J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 5959.
17. Burkert, U.; Allinger, N. L., En: *Molecular Mechanics*, American Chemical Society, Washington, DC, **1982**.
18. Lindberg, W.; Persson, J.-A.; Wold, S., *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 643.
19. Foresman, J.B.; Frisch, A., Chapter 3: Geometry Optimizations. En *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 2nd Ed.; Gaussian Inc., Pittsburgh PA, **1996**, 39-60.
20. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson T., *Epilepsy Res.*, **2004**, 61, 1.
21. Wamil, A. W.; McLean, M. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 267, 218.
22. Sveinbjornsdottir, S.; Sander J.; Upton, D.; Thompson, P. J.; Patsalos, P. N.; Hirt, D.; Emre, M.; Lowe D.; Duncan, J. S. *Epilepsy Research*, **1993**, 16, 165.
23. Kälviäinen R., Nousiainen I., Mantyjärvi M., Nikoskelainen E., Partanen J., Partanen K., Riekkinen P., *Neurology*, **1999**, 53, 922.
24. Fisher, R. S, *Brain Res. Rev.*, **1989**, 14, 245.
25. Loscher, W.; Schmidt, D., *Epilepsy Res.*, **1994**, 17, 95.
26. Ragsdale, D. S.; Avoli, M., *Brain Research Reviews*, **1998**, 26, 16.
27. Tasso, S. M.; Moon, S. Ch.; Bruno-Blanch, L. E.; Estiú, G. L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 3857.
28. Vamecq, J; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P; Delcourt, P.; Stables, J., *J. Med. Chem*, **2000**, 43, 1311.
29. White, H. S., *Epilepsia*, **1999**, 40, 2.

Capitulo 3

30. White, H. S., *Epilepsia*, **2003**, 44, 2.
31. Malawska, B.; Kulig K.; Spiewak A.; Stables, J.P., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 625.
32. Pandeya, S. N.; Raja, A. S., *J. Pharm. Sci.*, **2002**, 266.
33. Aggarwal N., *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **2004**, 7, 260.
34. Carter, M.; Stephenson, V. C.; Weaver, D.F., *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **2003**, 638, 57.
35. Cox, B.; Nobbs, M. S.; Shah, G. P.; Edney, D. D.; Loft, M. S., US Patent **1998**, 9838174
36. Shen, M.; Le Tiran, A.; Xiao, Y.; Golbraikh, A.; Kohn H.; Tropsha, A., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2811.
37. Andurkar, S. V.; Béguin, C.; Stables, J. P.; Khon H., *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1475.
38. Estrada, E.; Peña, A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2000, 8, 2755.
39. Bruno Blanch, L.; Gálvez, J.; García-Domenech R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2749.
40. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E., *Epilepsy Res.*, **2001**, 43, 11.
41. Unverferth, K.; Engel, J.; Höfgen, N.; Rostock, A.; Günther, R.; Lankau, H.-J.; Menzer, M.; Rolfs A.; Liebscher, J.; Müller, B.; Hofmann, H.-J., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 63.
42. Tasso, S. M.; Bruno-Blanch, L. E.; Moon, S.Y; Estiú, G. L., *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **2000**, 504, 229.
43. Tasso, S.; Bruno-Blanch, L.; Estiú, G.L., *J. Mol. Model.*, **2001**, 7, 231.
44. Barrios, I. A.; Bruno-Blanch, L. E., Estiú, G. L.; *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **2002**, 580, 243.
45. Maryanoff, B.; Costanzo, M.; Nortey, S.; Greco, M.; Shank, R.; Schupsky, J.; Ortegon, M.; Vaught, J., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1315.
46. Zhou, X.; Dong, X.; Crona J.; Maguire M.; Priestley T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, 306, 498.
47. Chufan, E. E.; Pedregosa, J. C.; Baldini, O. N.; Bruno Blanch, L. E., *II Fármaco*, **1999**, 54, 838.
48. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.;

Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; and Pople, J. A., **1998** Gaussian 98, Revision A.9 Gaussian Inc., Pittsburgh PA.

49. SYBYL 6.6; Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144 USA.

50. Gladding, G. D.; Kupferberg, H. J.; Swinyard, E. A. En: *Handbook of experimental pharmacology*; Frey, H.; Janz, D., Eds.; Springer, Berlin, **1985**. Vol. 74.

51. Rogawski, M.; Porter, R., *Pharmacol. Rev.* **1990**, 49, 223.

52. Porter, M.; Cereghino, M.; Gladding, R.; Hessie, B.; Kupferberg, D.; Scoville, M.; White, D., *Cleveland Clin. Q.*, **1984**, 51, 293.

53. Molnar, P.; Erdo S. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **1995**, 273, 303.

54. Vinter, J. G.; Davis, A.; Saunder, M. R., *J. Comp-Aided Mol. Design*, **1987**, 1, 31.

55. Grimm, H. G., *Z. Electrochem.*, **1925**, 31, 474.

56. Grimm, H. G., *Naturwissenschaften*, **1929**, 17, 557.

57. Patani, G. A.; LaVoie E. J., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 3147.

58. Calhoun, W.; Carlson, R. P.; Crossley, R.; Datko, L. J.; Dietrich, S.; Heatherington, K.; Marshall, L. A.; Meade, P. J.; Opalko, A.; Shepherd, R. G., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 1473.

59. Chihiro, M.; Nagamoto, H.; Takemura, I.; Kitano, K.; Komatsu, H.; Sekiguchi, K.; Tabusa, F.; Mori, T.; Tominaga, M.; Yabuuchi, Y., *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 353.

60. Hanna, N. B.; Bhattacharya, B. K.; Robins, R. K.; Avery, T. L.; Revankar, G. R., *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 177.

61. Shah, S. K.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Finke, P. E.; Ashe, B. M.; Weston, H.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Doherty, J. B., *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2529.

62. Rizzi, J. P.; Schnur, R. C.; Hutson, N. J.; Kraus, K. G.; Kelbaugh, P. R., *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 1208.

63. Muchowski, J. M.; Galeazzi, E.; Greenhouse, R.; Guzman, A.; Perez, V.; Ackerman, N.; Ballaron, S. A.; Roviti, J. R.; Tomolonis, A. J.; Young, J. M.; Rooks, W. H., *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 1202.

64. Bäckbro, K.; Lowgren, S.; Osterlund, K.; Atepo, J.; Unge, T.; Hulten J.; Bonham, N. M.; Schaal, W.; Hallberg, A., *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 898.

Capitulo 3

65. Hulten, J.; Bonham, N. M.; Nillroth, U.; Hansson, T.; Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Aqvist, J.; Classon, B.; Danielson, U. H.; Karlen, A.; Kvarnstrom, I.; Samuelsson, B.; Hallberg, A., *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 885.
66. Jadhav, P. K.; Woerner, F. J., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 6383.
67. Hulten, J.; Andersson, H. O.; Schaal, W.; Danielson, H. U.; Classon, B.; Kvarnstrom, I.; Karlén, A.; Unge, T.; Samuelsson, B.; Hallberg, A., *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4054.
68. Lam, P. Y. S.; Jadhav, P. K.; Eyermann, C. J.; Hodge, C. N.; De Lucca, G. V.; Rodgers, J. D., US Patent **1997**, 5610294.
69. Castro, J. L.; Baker, R.; Giublin, A. R.; Hobbs, S. C.; Jenkins, M. R.; Russell, M. G. N.; Beer, M. S.; Stanton, J. A.; Scholey, K.; Hargreaves, R. J., *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3023.
70. Acheson, R. M.; Bite, M. G.; Kemp, J. E. G., *J. Med. Chem.*, **1981**, 24, 1300.
71. Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T.; Klebe, G., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3583.
72. Winum, J.-Y.; Innocenti, A.; Nasr, J.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Vullo D.; Supuran C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 2353.
73. Casini, A.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 837.
74. Winum, J.-Y.; Cecchi, A.; Montero, J.-L.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 3302.
75. Maryanoff, B. E.; McComsey, D. F.; Costanzo, M. J.; Hochman, C.; Smith-Swintosky, V.; Shank, R. P., *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 1941.
76. Supuran, C. T.; Scozzafava, A., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2000**, 10, 575.
77. Supuran, C. T.; Scozzafava, A., *Curr. Med. Chem.: Imm., Endocr., Metab. Agents* **2001**, 1, 61.
78. Groutas, W. C.; Kuang, R.; Venkataraman, R. Epp, J. B.; Ruan, S.; Prakash, O., *Biochemistry*, **1997**, 36, 4739.
79. Kuang, R.; Epp, J. B.; Ruan, S.; Yu, H.; Huang, P.; He, S.; Tu, J.; Schechter, N. M.; Turbov, J.; Froelich, C. J.; Groutas, W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 8128.
80. Groutas, W. C.; Kuang, R.; Ruan, S.; Epp, J. B.; Venkataraman, R.; Truong, T. M., *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 661.
81. Boudjabi, S.; Dewynter, G.; Voyer, N.; Toupet, L.; Montero, J.-L., *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 2275.
82. Regainia, Z.; Abdaoui, M.; Aouf, N.-E.; Dewynter, G.; Montero, J.-L., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 381.

83. Dougherty, J. M.; Probs, D. A.; Robinson, R. E.; Moore, J. D.; Klein, T. A.; Snelgrove, K. A.; Hanson, P.R., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9781.
84. Malawska, B., *Curr. Top. In Med. Chem.*, **2005**, 5, 69.
85. Horwell, D. C.; Howson, W.; Ratcliffe, G. S.; Rees, D. C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 799.
86. Boden, P.; Eden, J. M.; Hodgson, J.; Horwell, D. C.; Howson, W.; Hughes, J.; McKnight, A. T.; Meecham, K.; Pritchard, M. C.; Raphy, J.; Ratcliffe, G. S.; Suman-Chauhan, N.; Woodruff, G. N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 1679.
87. Chatterjee, S.; Ator, M. A.; Bozyczko-Coyne, D.; Josef, K.; Wells, G.; Tripathy, R.; Iqbal, M.; Bihovsky, R.; Senadhi, S. E.; Mallya, S.; O'Kane, T. M.; Kenna, B. A.; Siman, R.; Mallamo, J. P., *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 3820.
88. Higaki, J. N.; Chakravarty, S.; Bryant, C. M.; Cowart, L. R.; Harden, P.; Scardina, J. M.; Mavunkel, B.; Luedtke, G. R.; Cordell, B., *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3889.
89. Blackburn, C.; Pingali, A.; Kehoe, T.; Herman, L. W.; Wang, H.; Kates, S. A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 823.
90. Ramsland, P. A.; Movafagh, B. F.; Reichlin, M.; Edmundson, A. B., *J. Mol. Rec.*, **1999**, 12, 249.
91. Schullek, J. R.; Butler, J. H.; Ni, Z.-J.; Chen, D.; Yuan, Z., *Anal. Biochem.*, **1997**, 246, 20.
92. Huang, H.; Martasek, P.; Roman, L. J.; Masters, B. S. S.; Silverman, R. B., *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3147.
93. Long, R. D.; Moeller, K. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 12394.
94. Moree, W. J.; van der Marel, G. A.; Liskamp, R. M. J., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 6389.
95. Lam, P. Y. S.; Jadhav, P. K.; Eyermann, C. J.; Hodge, C. N.; Ru, Y.; Bachelor, L. T.; Meek, J. L.; Otto, M. J.; Rayner, M. M.; Wong, Y. N.; Chang, C.-H.; Weber, P. C.; Jackson, D. A.; Sharpe, T. R.; Erickson-Vittanen, S., *Science*, **1994**, 263, 380.
96. Patel, M.; Kaltentbach III, R. F.; Nugiel, D. A.; McHugh Jr., R. J.; Jadhav, P. K.; Bachelor, L. T.; Cordova, B. C.; Klabe, R. M.; Erickson-Viitanen, S.; Garber, S.; Reid, C.; Seitz, S. P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 1077.
97. De Lucca, G. V.; Kim, U. T.; Liang, J.; Cordova, B.; Klabe, R. M.; Garber, S.; Bachelor, L. T.; Lam, G. N.; Wright, M. R.; Logue, K. A.; Erickson-Viitanen, S.; Ko, S. S.; Trainor, G. L., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 2411.
98. De Lucca, G. V.; Lam, P. Y. S., *Drugs of the Future*, **1998**, 23, 987.

Capitulo 3

99. Stone, B. R. P.; Harris, G. D.; Cann, R. O.; Smyser, T. E.; Confalone, P. N., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6127.

100. Dax, S. L.; Cook, S. C., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 797.

101. Hodge, C. N.; Lam, P. Y. S.; Eyermann, C. J.; Jadhav, P. K.; Ru, Y.; Fernandez, C. H.; De Lucca, G. V.; Chang, C.-H.; Kaltenbach III, R. F.; Holler, E. R.; Woerner, F.; Daneker, W. F.; Emmett, G.; Calabrese, J. C.; Aldrich, P. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4570.

CAPITULO 4

SÍNTESIS DE SULFAMIDAS

Consideraciones generales.

El azufre presenta una química covalente, esencialmente no metálica.¹⁻² Su electronegatividad es diferente a la del oxígeno y muy similar a la del carbono. Es capaz de formar enlaces fuertes con sí mismo y de establecer uniones puente de hidrógeno débiles. Puede emplear orbitales d en sus enlaces, por lo que accede a estados de oxidación de 2, 4 o 6 y números de coordinación que van de 0 a 7 (tabla 4.1).

Compuestos de azufre

Estado de Oxidación	S(II)			S(IV)		S(VI)		
	0	1	2	3	4	4	6	7
Número de Coordinación								
Ejemplo	S_2^-	RS^-	R_2S	R_2SO	SF_4	R_2SO_2	SF_6	SF_7^-

Tabla 4.1. Estados de oxidación y números de coordinación posibles para el átomo de azufre.

Entre los derivados de oxo-ácidos posibles para el azufre como átomo central, existen compuestos donde este se encuentra directamente unido a un radical alquilo o arilo; y otros en los que se une mediante átomos de nitrógeno y/o oxígeno (Tabla 4.2).³

Las uniones S-S aparecen frecuentemente en los sistemas biológicos, por ejemplo en la cisteína y en ciertas proteínas o encimas.

En particular, las sulfamidas estudiadas en este trabajo se clasifican como derivados sustituidos del ácido sulfámico (NH_2SO_3H).

Capítulo 4

Los átomos de azufre se encuentran presentes en una amplia variedad de moléculas con acción farmacológica. Podemos citar a modo de ejemplo a la función sulfonamida como parte de compuestos antibacterianos, donde este grupo funcional pertenece a la porción estructural propuesta como farmacóforo para este tipo de actividad.⁴

Formula Empírica	Denominación
R-SO ₃ H	Acido sulfónico
R-SO ₂ H	Acido sulfínico
R-SOH	Acido sulfénico
R-SO ₂ -O-R'	Sulfonato
-R-SO ₂ -O-R' - (cíclicos)	Sultona
R-SO-O-R'	Sulfinato
R-SO ₂ -NH-R'	Sulfonamida
R-SO-NH-R'	Sulfinamida
-R-SO-NH-R' - (cíclicos)	
R-S(OH)=NH	Acido sulfinimídico
R-S(O)(OH)=NH	Acido sulfonimídico
R-S(OH)=N-NH ₂	Acido sulfinohidrazónico
R-S(O)(OH)=N-NH ₂	Acido sulfonohidrazónico
R-S(OH)=NOH	Acido sulfinohidroxímico
R-S(O)(OH)=NOH	Acido sulfonohidroxímico
R-NH-SO ₃ H	Acido sulfámico
R-NH-SO ₂ -NH-R'	<i>Sulfamida</i>
R-NH-SO ₂ -O-R'	Sulfamato
R-O-SO ₂ -O-R	Sulfato
R-N=SO	Sulfinilamina
R-N=SO ₂	Sulfonilamina

Tabla 4.2. Derivados de ácidos que tienen azufre. R puede ser alquilo o arilo, y ser igual o distinto a R'. Los átomos de nitrógeno saturados pueden unirse a dos átomos de hidrógeno, estar N-sustituídos (como figura en la tabla) o N,N-disustituídos.

Otro caso son los tioeteres incluidos en los anillos fusionados de los antibióticos beta-lactámicos más conocidos, como son la amoxicilina y la cefuroxima.⁴ De igual manera el grupo tiol aparece en el antitumoral 6-mercaptopurina, como resultado del reemplazo bioisostérico del grupo hidroxilo de la molécula de hipoxantina.⁵

Respecto a drogas antiepilépticas usadas actualmente y que presentan en su estructura funciones que involucren átomos de azufre; se conocen el topiramato⁶ (función sulfamato), la zonisamida⁶ (función sulfonamida) y la tiagabina⁶ (anillos de tiofeno). Estos agentes fueron aprobados y comercializados a partir de 1993, por lo que pueden considerarse antiepilépticos de nueva generación (ver capítulo 2). Adicionalmente, compuestos conocidos desde hace muchos años, como la acetazolamida y sus derivados (que poseen una función

sulfonamida unida a un anillo 1,3,4-tiadiazol), populares por su potente acción diurética e inhibitoria de anhidrasa carbónica, también fueron testeados como antiepilépticos.⁷⁻⁹

Antecedentes químicos: métodos de Síntesis.

Las metodologías de síntesis de sulfamidas han sido reunidas y discutidas por distintos autores.¹⁰⁻¹¹ La sulfamida propiamente dicha ($\text{NH}_2\text{SO}_2\text{NH}_2$) fue preparada en 1892 por Traube¹² usando como reactivos cloruro de sulfurilo y amoniaco gaseoso. Posteriormente fueron estudiados una amplia variedad de procedimientos para la obtención de este compuesto, los cuales han sido recopilados por Audrieth y Sveda.¹⁰

Respecto a las sulfamidas simétricas $\text{N,N}'$ -disustituidas (RNHSO_2NHR , con R alquil, cicloalquil y aril), en 1963 Sowada resumió en un trabajo las tres rutas sintéticas principales para la obtención de este tipo de moléculas:¹³

- (a) reacción de aminas primarias (alquil o arilaminas) con cloruro de sulfurilo.
- (b) reacción de aminas primarias con ácido clorosulfónico.
- (c) reacción de sulfamida con aminas primarias (alquil, cicloalquil, aril)

Asimismo, las alquilsulfamidas tetrasustituidas fueron sintetizadas en 1964 a partir de arilclorosulfamidas¹⁴ y sulfatos de arilo.¹⁵ Más tarde se obtuvo este tipo de compuestos a partir de sulfamidas $\text{N,N}'$ -disustituidas.¹⁶⁻¹⁷

Estos métodos, (así como el empleado para la preparación de N -alquil- N -acetilsulfamidas)¹³ también fueron usados en la obtención de sulfamidas N -sustituidas y N,N -disustituidas.¹⁸⁻²⁰

Otra reacción utilizada es la que involucra haluros de sulfamoilo ($\text{RR}'\text{NSO}_2\text{Cl}$, por ejemplo) y aril o alquilaminas.²¹⁻²⁶ Este procedimiento fue exitoso en la obtención N -aril-sulfamidas monosustituidas²⁷⁻²⁹ y sulfamidas derivadas del triazol.³⁰ También se han utilizado sales de sulfamatos para la preparación de sulfamidas $\text{N,N}'$ -disustituidas.³¹

Más recientemente se desarrolló una alternativa sintética para la síntesis de sulfamidas simétricas y asimétricas $\text{N,N}'$ -disustituidas, mediante las reacciones de transaminación de sulfamidas con aminas.³²

Por otra parte, se observó que a partir de los estudios de hidrólisis ácida de ciertas N -terbutil- N' alquil o aril sulfamidas se obtienen las sulfamidas

Capítulo 4

primarias. Esto sucede mediante la pérdida del grupo *terbutilo*, previa protonación del átomo de nitrógeno al que se encuentra unido dicho grupo.³³⁻³⁴

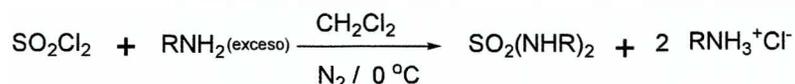
A pesar de la amplia experiencia existente sobre la preparación de este tipo de compuestos, las sulfamidas fueron olvidadas hasta hace relativamente poco tiempo. Recientemente han sido reconsideradas en el campo de la química supramolecular,³⁵⁻⁴⁰ pero principalmente fueron redescubiertas por la química medicinal.

Su popularidad creciente en los últimos años se debe, por ejemplo, a su capacidad de actuar como bioisómero de la unión peptídica (ver capítulo 3).⁴¹⁻⁴⁸ Además, los átomos de nitrógeno de las sulfamidas son lo suficientemente básicos como para coordinarse con iones metálicos, por lo que han sido estudiadas, por ejemplo, como inhibidores de enzimas de Zn.⁴⁹⁻⁵³

En relación a este trabajo de tesis, la función sulfamida surge como resultado de un reemplazo bioisostérico no clásico de diferentes funciones químicas utilizadas para la definición de la porción polar del farmacóforo previamente propuesto (ver capítulo 3).

En este trabajo se diseñaron y sintetizaron un conjunto de sulfamidas, para su posterior evaluación biológica. Los compuestos fueron elegidos de acuerdo a los requerimientos de actividad derivados del diseño racional.

La ruta elegida para la síntesis de sulfamidas simétricas *N,N'*-disustituidas fue la reacción de aminas con cloruro de sulfurilo (esquema 4.1):¹³



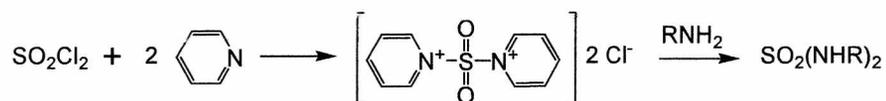
Esquema 4.1. Reacción general utilizada en este trabajo para la síntesis de sulfamidas simétricas *N,N'*-disustituidas, ejemplificado para aminas primarias.

Este compuesto es un reactivo incoloro que vira a amarillo por exposición al aire o a la luz. Se descompone en presencia de humedad generando cloro y dióxido de azufre, para finalmente producir ácido sulfúrico y cloruro de hidrógeno.

El cloruro de sulfurilo también ha sido utilizado como reactivo en otro tipo de reacciones. Actúa principalmente como agente clorante, pero se lo usó además como oxidante de tioéteres, como catalizador de reacciones de esterificación y para la deshidratación de alcoholes entre otros usos.

Para estabilizarlo, Ohme y Preuschhof⁵⁴ consideran útil la adición de piridina a la mezcla de reacción, postulando la formación de un aducto de piridina y cloruro de sulfurilo. Posteriormente este intermediario es el que reaccionaría

con la amina correspondiente (esquema 4.2). Estos autores no proporcionaron ningún estudio o evidencia experimental sobre la existencia del aducto propuesto.



Esquema 4. 2. Esquema general de la síntesis de sulfamidas propuesta por Ohme y Preuschhof, ejemplificado para aminas primarias.

Sin embargo, y en acuerdo con lo expuesto por Danek y Nelly,⁵⁵ en este trabajo de tesis se observó que experimentalmente el uso de la misma amina como base para neutralizar el HCl formado resulta más eficiente que el agregado de piridina, pues el producto crudo obtenido de la reacción es superior en pureza, por lo que aumenta el rendimiento final de la misma.

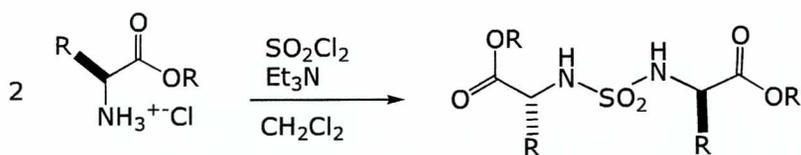
Para una mayor comprensión de la reacción elegida y para analizar la factibilidad de la existencia del intermediario propuesto por Ohme y Preuschhof, se realizó un estudio teórico de los mecanismos de reacción posibles para la formación de sulfamidas con y sin piridina en el medio de reacción.⁵⁶ Se utilizó como referencia la síntesis de la N,N'-dibutilsulfamida. Los resultados y conclusiones se encuentran en el anexo de esta tesis.

Por otra parte, para la preparación de sulfamidas simétricas de derivados de aminoácidos se siguieron los lineamientos propuestos por otros autores,^{13, 41, 55, 57-58} y la ruta sintética que se utilizó es similar a la usada para las sulfamidas simétricas simples: condensación del éster del aminoácido y cloruro de sulfuro en presencia de trietilamina (esquema 4.3). Este último reactivo se usa para liberar el clorhidrato del éster del aminoácido, el cual se encuentra disponible comercialmente.

En el caso de sulfamidas N,N-disustituidas, los métodos de síntesis mencionados anteriormente resultan ser, en general, no selectivos. Estos compuestos fueron preparados mediante la amonólisis de cloruro de sulfamilo,^{26,59} el cual se obtiene previamente a partir de cloruro de sulfuro y una amina secundaria.

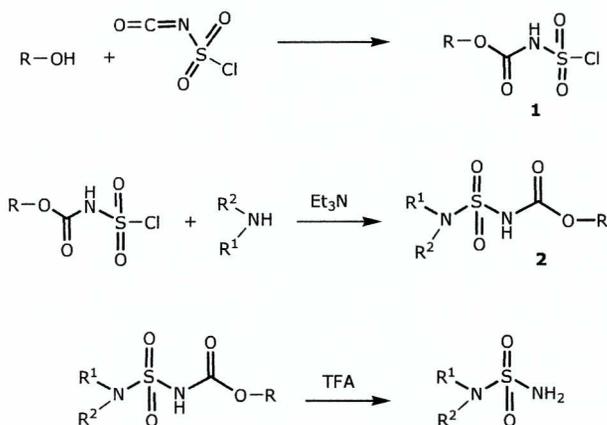
Esta opción resulta viable si se usan aminas secundarias alifáticas pero no aromáticas²⁶ y los rendimientos son aceptables, pero no muy buenos dada la falta de control y la alta reactividad del cloruro de sulfuro. Una alternativa a esta ruta sintética es la utilizada en este trabajo de tesis (esquema 4.4), mediante la cual se prepararon sulfamidas N,N-disustituidas y monosustituídas.

Capítulo 4



Esquema 4.3. Reacción general utilizada en este trabajo para la síntesis de sulfamidas simétricas de derivados de aminoácidos, ejemplificada para α -aminoácidos.

Consta de la inserción del grupo sulfamoilo a través de una reacción en un solo paso de clorosulfonil isocianato (CSI), un alcohol y la amina.^{51,60-68} La amina utilizada puede ser primaria o secundaria, alifática o aromática. La reacción se inicia cuando el alquil o aril N-(clorosulfonil)carbamato (compuesto **1**, esquema 4.4) reacciona con la amina para dar una sulfamida protegida como sulfonilcarbamato (compuesto **2**, esquema 4.4).



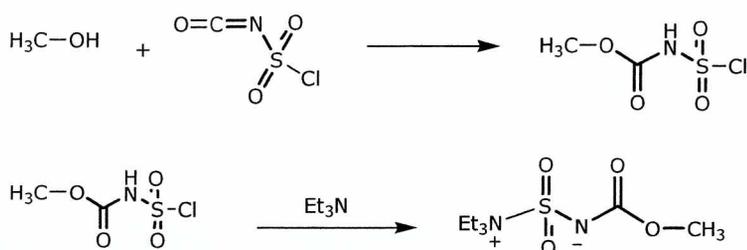
Esquema 4.4. Reacción general utilizada en este trabajo para la síntesis de sulfamidas, ejemplificada para sulfamidas *N,N*-disustituidas.

El grupo protector puede luego ser removido de acuerdo a las características del alcohol utilizado (por ejemplo mediante hidrólisis en medio ácido).⁶⁶ La obtención de (**2**) es posible realizarla en un solo paso debido a la diferencia de reactividad que existe entre el grupo isocianato y el clorosulfonico del CSI.⁶⁹

El alquil o aril N-(clorosulfonil)carbamato (**1**), es un intermediario inestable. La literatura reporta que solo se encontraron aislados compuestos formados con el CSI y algunos derivados del fenol⁶⁸. Esta inestabilidad constituye una desventaja desde el punto de vista químico, sobre todo para la introducción de grupos sulfamoilo en moléculas polifuncionales o para su uso en química de fase sólida.

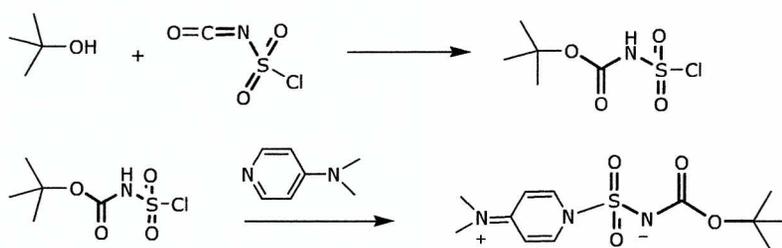
Una forma de estabilizar este tipo de compuestos es mediante la reacción del N-(clorosulfonyl)carbamato de metilo con trietilamina, la que genera una sal interna, el N-(trietilamoniosulfonyl)carbamato de metilo, conocida como el reactivo de Burgess (esquema 4.5).⁷⁰⁻⁷⁴

El clorosulfonyl isocianato es un compuesto muy reactivo y versátil, descubierto en 1952 por Graf.⁷⁵⁻⁷⁶ Es un electrófilo fuerte, que presenta dos posiciones de ataque nucleofílico: El grupo SO₂ y la función C=O. Además de adiciones nucleofílicas simples, es capaz de reaccionar mediante cicloadiciones y reacciones con enlaces múltiples.



Esquema 4.5. Reacción de formación del reactivo de Burgess.

Otros autores lograron sintetizar un intermediario del tipo de Burgess, formado con terbutanol y dimetilaminopiridina (esquema 4.6):⁶⁹



Esquema 4.6. Reacción de formación del reactivo tipo Burgess aislado por Montero y colaboradores.⁶⁹

Este nuevo agente sulfamoylante puede ser aislado fácilmente, es estable a temperatura ambiente y reemplazo al CSI en la síntesis en fase sólida, dado que este último causaba degradación de la resina.⁷⁷ En este trabajo de tesis no se utilizó esta vía sintética porque no se consideró necesario el aislamiento del intermediario para la formación de la sulfamida protegida como sulfonilcarbamato (compuesto 2, esquema 4.4).

Sin embargo, y en acuerdo con otros autores,^{61, 70-74} se utilizó trietilamina en el medio de reacción para generar el reactivo de Burgess y posteriormente obtener el producto (**2**) en un solo paso (esquema 4.4). La ventaja de esta secuencia se traduce en mejores rendimientos de la reacción, especialmente cuando se combinan aminas terciarias (como trietilamina) y alcoholes alifáticos voluminosos (como el terbutanol) en la formación del intermediario (**1**).⁷⁴ Por otra parte, si se utiliza terbutanol, como se indicó previamente, el clorosulfonilcarbamato que se forma contiene al grupo N-terbutoxicarbonil (N-Boc), el cual es conocido y ampliamente utilizado en química orgánica como grupo protector.⁷⁸ El uso de este alcohol resulta conveniente si se realiza una posterior hidrólisis de la función carbamato, para obtener el producto buscado, básicamente porque las condiciones de hidrólisis son ampliamente conocidas.

Consecuentemente, las hidrólisis se realizaron sobre sulfonil carbamatos preparados a partir de terbutanol, mediante soluciones de ácido trifluoroacético.^{51,69} Las sulfamidas que se obtienen son estables en este medio de reacción.

Del mismo modo que con las reacciones con cloruro de sulfurilo, este tipo de síntesis con CSI puede extenderse a aminoácidos protegidos en reemplazo de aminas simples, para formar acil-sulfamidas monosustituidas.^{41,49,66, 79-80} Puede agregarse el ester del aminoácido en forma de clorhidrato,⁷⁹⁻⁸⁰ el cual se libera mediante el uso de trietilamina en exceso. Por otra parte se prepara el clorosulfonil carbamato y se agrega al medio de reacción (esquema 4.7). Dada la presencia de trietilamina es posible que también se forme un reactivo tipo Burgess y que este reaccione in situ con el aminoácido liberado.

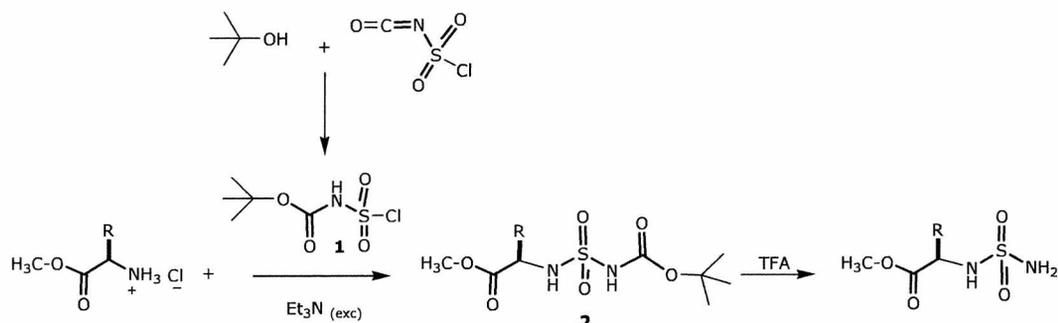
En general, la función sulfamida puede considerarse desde el punto de vista químico como un grupo versátil, aunque existen estudios del reordenamiento de ciertas sulfamidas en presencia de aminas.⁸¹

Es resistente a la hidrólisis ácida de sulfonil carbamatos, a ambientes reductores, a mezclas $\text{CH}_3\text{NH}_2/\text{MeOH}$ y a reactivos de dihidroxilación como OsO_4 .⁴¹

En este trabajo no se presentan estudios respecto al aislamiento e identificación de este intermediario durante la reacción.

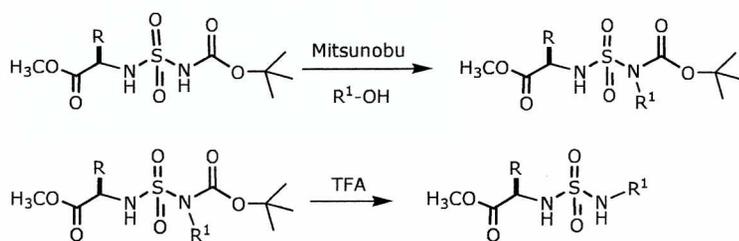
Otra de las ventajas implícitas en el uso del CSI para la preparación de sulfamidas provenientes de aminas simples o de aminoácidos es que, en los productos protegidos formados previamente (compuestos **2**, esquemas 4.4 y 4.7), los átomos de nitrógeno poseen una marcada diferencia en cuanto a su reactividad química. Esto genera, por ejemplo, la posibilidad una N-alquilación

selectiva del nitrógeno correspondiente al sulfonil carbamato mediante la reacción de Mitsunobu.⁸²



Esquema 4.7. Reacción general utilizada en este trabajo para la síntesis de sulfamidas N-sustituidas proveniente de derivados de aminoácidos, ejemplificada para L- α -aminoácidos.

La N-alkilación del sulfonil carbamato y la posterior hidrólisis del grupo N-Boc da origen a sulfamidas no simétricas N,N' disustituidas.⁶¹ En este trabajo se aplicó esta reacción para incorporar restos alquílicos a sulfonil carbamatos preparados con ésteres de aminoácidos (esquema 4.8).^{42,49,66,79-80} La posterior remoción del grupo N-Boc se realiza en condiciones ácidas tales que no se produce la hidrólisis del éster.

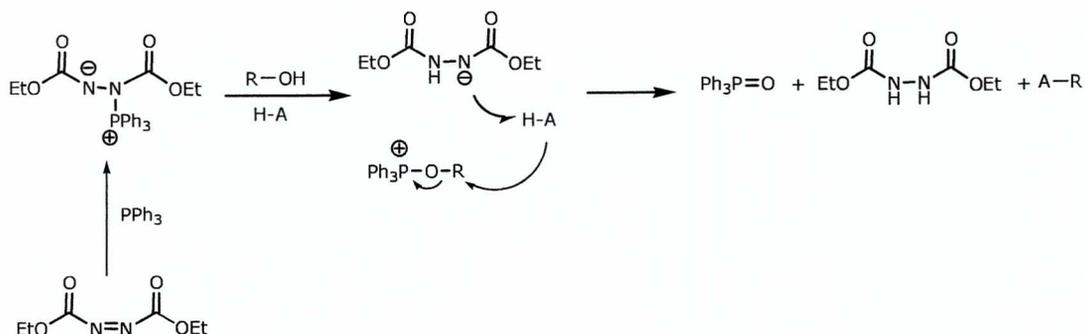


Esquema 4.8. Reacción general utilizada en este trabajo para la alquilación de sulfamidas N-sustituidas proveniente de derivados de aminoácidos, ejemplificada para α -aminoácidos.

La reacción de Mitsunobu es un método de síntesis muy utilizado. Inicialmente fue descrito en la literatura como una deshidratación intermolecular entre un grupo alcohol (ROH) y un sustrato lo suficientemente ácido (HA), mediante el tratamiento con dietilazodicarboxilato (DEAD) y trifenilfosfina (PPh₃).⁸² De este modo se logra la conversión del grupo hidroxilo en un buen grupo saliente, bajo condiciones suaves de reacción (esquema 4.9).⁸⁵

Capítulo 4

El desplazamiento del alcohol procede vía un mecanismo S_N2 , hecho que resulta muy atractivo para las reacciones con sustratos ópticamente activos.⁸⁵



Esquema 4.9. Mecanismo aceptado para la reacción de Mitsunobu.

Más tarde esta reacción fue utilizada para la construcción de otro tipo de enlaces.⁸⁶ Quizás la limitación más importante de las reacciones de Mitsunobu sea el requerimiento de acidez del sustrato HA: en condiciones normales, este debe tener un pK_a menor a 11 para que la reacción proceda con buen rendimiento.⁸⁶ Itô y colaboradores⁸⁵ encontraron otro sistema redox: 1,1'- (azodicarbonil)dipiperidina/tributilfosfina, para aplicar esta reacción a compuestos HA con pK_a mayor a 11.

Otro método de alquilación factible es mediante el tratamiento de la sulfamida con una base mineral y un haluro de alquilo o arilo, lo que origina productos N,N'-dialquilados o (en los casos más favorables) de monoalquilación, pero con menor rendimiento que la reacción de Mitsunobu.^{67, 83-84}

En la alquilación de N-sulfonilcarbamatos de esteres de aminoácidos, esta limitación resulta en realidad, una ventaja. Si consideramos el mecanismo de reacción general propuesto (esquema 4.9), en este caso el sustrato ácido HA es la sulfamida protegida como sulfonilcarbamato (compuestos **2**, esquemas 4.4 y 4.7).

Estos compuestos poseen dos grupos NH susceptibles, en principio, a sufrir alquilación, lo que generaría más de un producto final. Sin embargo, solo se promueve la alquilación selectiva al átomo de nitrógeno correspondiente al grupo N-acilo, dado que el otro grupo no es lo suficientemente ácido.^{49,61,66,79-80,83} En algunos ejemplos presentes en literatura se observa el reemplazo del DEAD por el diisopropilazodicarboxilato (DIAD), que junto con la PPh_3 dan el mismo tipo de reacciones.^{49,61,79-80, 83}

A fin de comparar la eficiencia de la síntesis, se intentó la alquilación de Mitsunobu usando la cupla redox 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina/tributilfosfina. Se usó como testigo la reacción de obtención de N-(N'-terbutoxicarbonil, N-valproil)sulfamoilglicinato de metilo, pero no se obtuvo el producto esperado ni ningún otro producto mayoritario. Lo mismo sucedió con la cupla 1,1'-(azodicarbonil)dipiperidina/ PPh₃ para la misma reacción testigo, la cual fue exitosa con la cupla DIAD/PPh₃ (ver parte experimental) .

En este trabajo se prepararon un conjunto de sulfamidas, elegidas de acuerdo a los requerimientos de actividad derivados del diseño racional. Los compuestos sintetizados presentan en su estructura los requisitos electrónicos y estructurales necesarios para la acción farmacológica según predice el análisis previamente realizado. También se prepararon moléculas cuya estructura carece de tales requerimientos, a modo de validarlos mediante un test negativo de actividad.

En la tabla 4.3 se presentan los compuestos sintetizados y la ruta sintética utilizada. La síntesis específica de cada compuesto se detalla posteriormente (trabajo experimental).

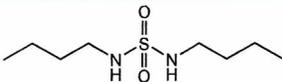
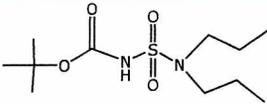
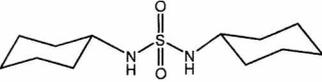
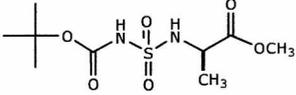
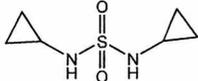
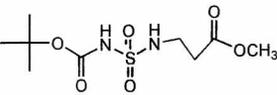
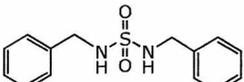
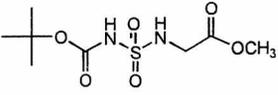
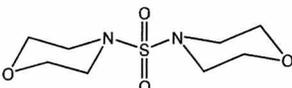
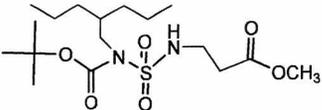
Compuesto	Método de síntesis	Compuesto	Método de síntesis
	Método a (1a)		Método c (11c)
	Método a (2a)		Método d (12d)
	Método a (3a)		Método d (13d)
	Método a (4a)		Método d (14d)
	Método a (5a)		Método e (15e)

Tabla 4.3 (continuación)

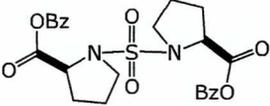
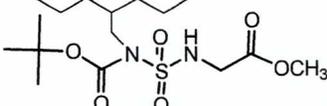
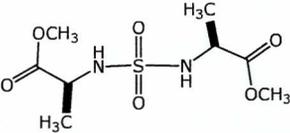
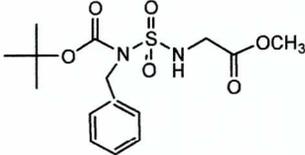
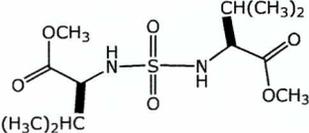
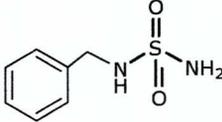
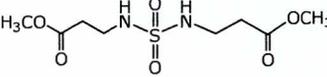
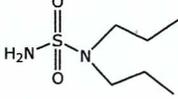
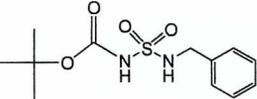
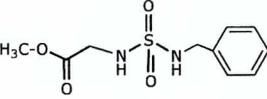
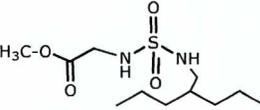
	Método b (6b)		Método e (16e)
	Método b (7b)		Método e (17e)
	Método b (8b)		Método f (18f)
	Método b (9b)		Método f (19f)
	Método c (10c)		Método f (20f)
			Método f (21f)

Tabla 4.3. Compuestos sintetizados. Método a: Síntesis de sulfamidas N,N' -disustituídas (esquema 4.1). Método b: Síntesis de sulfamidas N,N' -disustituídas con ésteres de aminoácidos (esquema 4.3). Método c: Síntesis de sulfonil carbamatos de alquil y arilaminas (esquema 4.4 primer y segundo paso de reacción). Método d: Síntesis de sulfonil carbamatos de ésteres de aminoácidos (esquema 4.7 primer paso de reacción). Método e: Alquilación selectiva de sulfonil carbamatos de ésteres de aminoácidos (esquema 4.8 primer paso de reacción). Método f: Hidrólisis de sulfonilcarbamatos (esquemas 4.4 y 4.8 segundos pasos de reacción).

TRABAJO EXPERIMENTAL DE SÍNTESIS.

Los puntos de fusión de los productos sintetizados se efectuaron en un equipo Electrothermal y no fueron corregidos.

El diclorometano y el tetrahidrofurano (THF) usados como solventes de reacción previamente se secaron, destilaron y almacenaron sobre tamiz molecular 4 A marca Merck. Los enfriamientos a 0°C se realizaron mediante baños de agua-hielo. Las síntesis se llevaron a cabo en equipos primeramente flameados bajo corriente de argón o nitrógeno para evitar la presencia de humedad. Se tomó

como criterio para el punto final de las reacciones la no presencia de reactivo y presencia de nuevos productos según controles por cromatografía en capa delgada (TLC).

La eliminación del solvente se realizó en evaporador rotatorio a temperatura ambiente y a una presión aproximada de 30 torr. El secado a peso constante se hizo en tambor a 20 torr y en pistola Abderhalden mediante bomba de vacío a 1-2 torr.

Las columnas cromatográficas se prepararon con sílica gel 60, 70-230 mesh, marca Merck (ref. 1.07734.1000). Las TLC se realizaron en cromatofolios de sílica gel 60 con fluorescencia a 254 nm marca Merck (ref. 1.05554). Se utilizó luz UV 254 y 366 nm como revelador no destructivo de las TLC. Como revelador destructivo de las TLC se utilizó una solución ácida al 5.5 % p/v de molibdato de amonio (VI) tetrahidratado, las cuales posteriormente fueron calentadas a 110 °C durante 10 minutos como técnica de revelado.

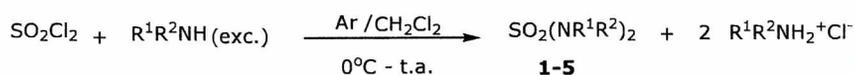
Los solventes utilizados para las cromatografías fueron previamente destilados y su pureza se verificó mediante cromatografía en capa delgada o cromatografía gaseosa. Se utilizaron solventes de grado analítico para las cristalizaciones.

Los espectros ¹H NMR (200 MHz) y ¹³C NMR (50 MHz) fueron realizados en un espectrómetro Bruker AC-200. Los datos de corrimiento químico se reportan en ppm respecto del estándar interno tetrametilsilano, mientras que las constantes de acomplamiento se expresan en Hertz.

Los espectros infrarrojos se realizaron en un equipo FT/IR Bruker IFS 66, usando pastillas de KBr en todos los casos. Se reportan solo los valores correspondientes a las bandas de absorción consideradas significativas para la caracterización de grupos funcionales, las cuales se expresan en función del número de onda.

Se realizaron análisis elementales de C, H, N y S. El porcentaje de O se calculó por diferencia. Se utilizó un equipo Carlo Erba EA 1108, aceptándose un error de ±0.4% respecto a los valores calculados a partir de las estructuras propuestas.

Método a: Síntesis de sulfamidas N,N'-disustituídas (esquema 4.10).



Esquema 4.10. Método a: R¹ = butil, R² = H; R¹ = ciclohexil, R² = H; R¹ = ciclopropil, R² = H; R¹ = bencil, R² = H; R¹, R² = morfolin

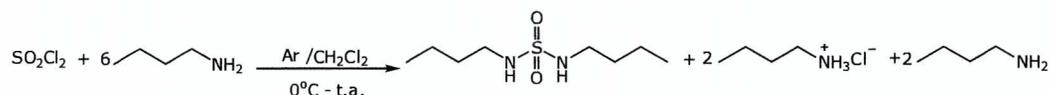
Capítulo 4

Las sulfamidas 1-5 fueron sintetizadas de acuerdo a los procedimientos descritos en literatura¹² y detallados anteriormente.

Las aminas utilizadas fueron destiladas y almacenadas sobre hidróxido de potasio con atmósfera de nitrógeno a 4°C. El cloruro de sulfurilo se destilo y se guardo en ampollas bajo atmósfera de nitrógeno a 4°C. Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de argón mediante adición gota a gota de una solución de cloruro de sulfurilo en diclorometano a una solución de 6 equivalentes de la amina correspondiente en el mismo solvente a 0 °C (baño de agua-hielo). Durante el agregado los equipos se cubrieron con papel aluminio para evitar el contacto del reactivo con la luz. Se observo desprendimiento gaseoso durante el agregado.

La mezcla de reacción se llevo a temperatura ambiente y se agito durante 5-30 hs. El crudo de reacción se lavo con solución de acido clorhídrico y luego con solución saturada de NaCl (compuestos 2-4), hasta pH neutro, se completo el aislamiento mediante cromatografía en columna (compuestos 1,5). Los productos finales se purificaron mediante cristalización.

Síntesis de N,N'-dibutilsulfamida (1a).



En un tubo de reacción y bajo atmósfera de argón se agregaron 5.70 ml. (57.6 milimoles; 6 miliequivalentes) de n-butilamina (p.eb. 69 °C, Δ: 0,74 gr/ml) y 5 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C. Se agrego gota a gota desde ampolla de compensación una solución compuesta por 0.77 ml (9.6 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo (p.eb. 69 °C, Δ: 1.68 gr/ml) en 5 ml de diclorometano. Se observo desprendimiento de vapores blancos durante el agregado. Posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente. Se dejo reaccionar durante 5 hs. Es una solución incolora.

Se elimino el solvente en evaporador rotatorio y se agregaron 2 ml de diclorometano. Posteriormente se adicionaron 5 ml de éter etílico, observándose la aparición de un sólido blanco que se separo por centrifugación. La fase eterea se concentro en rotovapor y seco a peso constante en tambor de vacio a temperatura ambiente, obteniéndose 4.108 gr de un aceite incoloro El aceite fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel usando diclorometano como solvente de elusión. Se uso siembra liquida. Se recogieron primero dos fracciones de 100 ml.

cada una y luego 45 de 8 ml cada una. Posteriormente se aumento la polaridad con mezcla de solventes diclorometano:metanol hasta llegar a una relación 25:1. Se recogieron 12 fracciones más de 8 ml cada una. La columna se controló mediante cromatografía en capa delgada.

Se juntaron las fracciones 8-11, obteniéndose 1.989 gr de un sólido blanco, el cual se cristalizó 2 veces de diclorometano. Se obtuvieron 1.498 gr de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 127-127.5 °C.

Rf producto: 0.36 (diclorometano)

Rendimiento: 75%

Rendimiento de literatura:¹² 57%

Pf literatura:¹² 126.5 °C

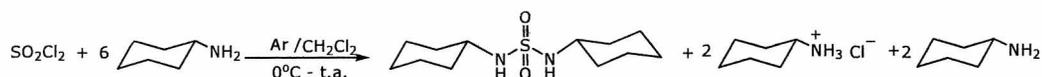
IR (KBr), cm^{-1} : 3286 (NH), 2956, 2932, 2870 (alquilo), 1313, 1142 (SO_2).

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 4.55 (t ancho, $J \approx 6.0$, 2H: NH), 3.02 (sistema AM_2X_2 , $J \approx 6.0$, 6.8, 4H: $\alpha\text{-CH}_2$) 1.52 (m, 4H: $\beta\text{-CH}_2$), 1.37 (m, 4H: $\gamma\text{-CH}_2$), 0.93 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H: CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 43.10 ($\alpha\text{-C}$), 31.80 ($\beta\text{-C}$), 20.11 ($\gamma\text{-C}$), 13.89 (CH_3).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: PM: 208.3, C: 46.6, H: 8.8, N: 13.6, O: 15.5, S: 15.5, encontrado C: 46.4, H: 9.1, N: 13.2, O: 15.9, S: 15.4.

Síntesis de *N,N'*-diciclohexilsulfamida (**2a**).



En un tubo de reacción y bajo atmósfera de argón se agregaron 5.25 ml (46.2 milimoles; 6 miliequivalentes) de ciclohexilamina (p.eb. 135 °C, Δ : 0,87 gr/ml) y 5 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0 °C. Se agregó gota a gota desde ampolla de compensación una solución compuesta por 0.62 ml (7.7 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo (p.eb. 69 °C, Δ : 1.68 gr/ml) en 5 ml de diclorometano. Se observó desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 20 hs. Se obtuvo un sólido blanco en contacto con una solución incolora.

Se filtró la mezcla de reacción y se extrajo 3 veces el sólido con diclorometano. Se reunieron las fases líquidas provenientes del filtrado y de los lavados. Se agregó diclorometano hasta llegar a un volumen de solución aproximado de 10 ml y se lavó 2 veces solución de ácido clorhídrico al 5% y dos veces con solución saturada de cloruro de sodio. Se secó la fase orgánica con

Capítulo 4

sulfato de sodio, se filtro y se elimino el solvente en evaporador rotatorio. Se seco en tambor de vacío a temperatura ambiente.

Se obtuvieron 1.689 gr de un sólido blanco.

Se cristalizó en diclorometano obteniéndose 622 mgsólido blanco con punto de fusión 154-155 °C.

Rf producto: 0.38 (diclorometano)

Rendimiento: 31%

Rendimiento de literatura:¹² 50-53%

Pf de literatura:¹² 153-154 °C

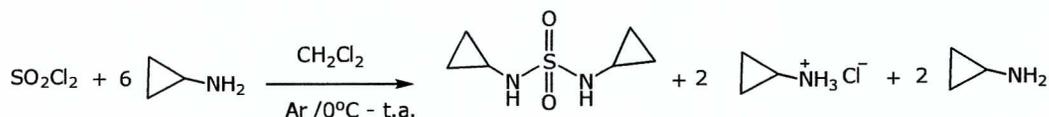
IR (KBr), cm^{-1} : 3283 (NH), 2925, 2900, 2850 (alquilo), 1337, 1138 (SO_2).

¹HNMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 4.35 (d, J= 7.6, 2H: NH), 3.16 (m, 2H: CH), 2.01-1.12 (m, 20 H: 2 (CH_2)₅).

¹³CNMR (CDCl_3), δ , ppm: 52.63 (α -C), 34.01 (β -C), 25.27 (δ -C), 24.78 (γ -C).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: PM: 260.4, C:55.8, H:8.6, N:10.8, O:12.4, S:12.4, encontrado C:55.4, H:8.9, N:10.5, O:12.8, S: 12.4.

Síntesis de *N,N'*-diciclopropilsulfamida (**3a**).



En un tubo de reacción y bajo atmósfera de argón se agregaron 4.75 ml (68.4 milimoles; 6 miliequivalentes) de ciclopropilamina (p. eb. 49 °C, Δ : 0.82 gr/ml) y 5 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C. Se agrego gota a gota desde ampolla de compensación una solución compuesta por 0.91 ml (11.4 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo (p. eb. 69 °C, Δ : 1.68 gr/ml) en 5 ml de diclorometano. Se observo desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente. Se dejo reaccionar durante 30 hs.

Se agrego diclorometano a la mezcla de reacción, donde se observa presencia de sólido, hasta llegar a un volumen final de solución aproximado de 20 ml disolviéndose el sólido presente. Se lavo 2 veces con solución de ácido clorhídrico al 3% y dos veces con solución saturada de cloruro de sodio. Se seco la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtro y se elimino el solvente en evaporador rotatorio. Se seco en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 1,689 gr de un sólido blanco.

Se cristalizó con mezcla de solventes (hexano/diclorometano) obteniéndose 965 mg. de un sólido blanco con punto de fusión 147-149 °C.

Rf producto: 0.36 (diclorometano)

Rendimiento: 48 %

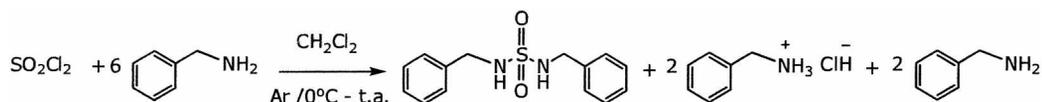
IR (KBr), cm^{-1} : 3271 (NH), 1316, 1142 (SO_2).

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 5.01 (s ancho, 2H: NH), 1.98 (m, 2H: α -CH), 0.71 (multiplete, 8H: β - CH_2).

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 24.15 (α -C), 6.02 (β -C).

Análisis elemental: calculado para $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: PM: 176.2, C: 41.4, H: 5.8, N:16.1, O:18.4, S:18.4, encontrado C:41.1, H:6.2, N:15.8, O:18.7, S:18.2

Síntesis de N,N'-dibencilsulfamida (4a).



En un tubo de reacción y bajo atmósfera de argón se agregaron 4,70 ml (43.2 milimoles; 6 miliequivalentes) de bencilamina (p. eb. $70^\circ\text{C}/8\text{ mmHg}$, Δ : 0.99 gr/ml) y 5 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla a 0°C . Se agregó gota a gota desde ampolla de compensación una solución compuesta por 0.58 ml. (7.2 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo (p. eb. 69°C , Δ : 1.68 gr/ml) en 5 ml de diclorometano. Se observó desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 22 hs. Se observa formación de sólido blanco.

Se filtró el sólido, la fase líquida se lavó 2 veces con solución de ácido clorhídrico al 3% y dos veces con solución saturada de cloruro de sodio. Se secó con sulfato de sodio. Se filtró y se eliminó el solvente en evaporador rotatorio. Se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente. El sólido obtenido se reunió con el sólido del filtrado inicial.

Se obtuvieron 804 mg. de un sólido blanco. Se cristalizó de metanol obteniéndose 716 mg sólido blanco con punto de fusión $181\text{-}183^\circ\text{C}$.

Rf producto: 0.36 (diclorometano)

Rendimiento: 36%

Pf de literatura:¹² $180\text{-}182^\circ\text{C}$.

IR (KBr), cm^{-1} : 3277 (NH), 3088, 3065, 3033 (CH Ar), 1321, 1148 (SO_2).

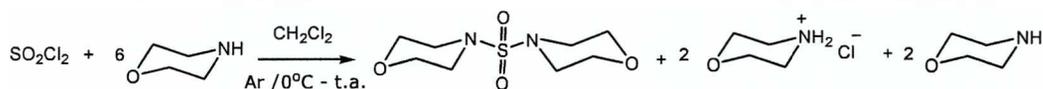
Capítulo 4

^1H NMR (DMSO- d_6), δ , ppm; J, Hz: 7.47 (s ancho, 2H: NH), 7.31 (m, 10H: Ar-H), 4.01 (s ancho, 4H: CH $_2$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6), δ , ppm: 138.36 (C 1 -Ar), 128.25, 127.72, 127.06 (C 2,3,4 -Ar), 45.81(CH $_2$).

Análisis elemental: calculado para C $_{14}$ H $_{16}$ N $_2$ O $_2$ S: PM: 176.4, C:61.3, H:5.1, N:10.2, O:11.7, S:11.7, encontrado C:60.9, H:5.5, N:9.9, O:11.8, S: 11.9.

Síntesis de *N,N'*-sulfonil- bis- tetrahidro-1,4-oxazina (**5a**).



En un tubo de reacción y bajo atmósfera de argón se agregaron a 4.42 ml (50.8 milimoles; 6 miliequivalentes) de tetrahidro-1,4-oxazina (p. eb. 129 $^\circ\text{C}$, Δ : 1.00 gr./ml) 5 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C . Se agrega gota a gota desde ampolla de compensación una solución compuesta por 0.68 ml (8.5 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo (p. eb. 69 $^\circ\text{C}$, Δ : 1.68 gr/ml) en 5 ml de diclorometano. Se observó desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Concluido el agregado se deja al sistema alcanzar temperatura ambiente durante 17 hs. Se obtiene una solución amarilla pálida en contacto con un sólido blanco.

Se eliminó el solvente en evaporador rotatorio y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente, obteniéndose 6.1 gr de un aceite amarillo. Se purificó en cromatografía en columna de sílica gel, usando diclorometano como solvente de elusión. Se recogieron 90 fracciones de 5 ml cada una. La columna se controló mediante TLC.

Se juntaron las fracciones 22-87, obteniéndose 1.658 gr de un sólido blanco, el cual se cristalizó en tetracloruro de carbono.

Se obtuvieron 1.466 gr un sólido cristalino blanco con punto de fusión 141-142.5 $^\circ\text{C}$.

Rf producto: 0.72 (acetato de etilo)

Rendimiento: 73%

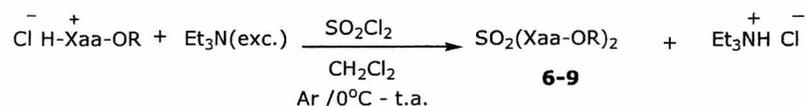
IR (KBr), cm^{-1} : 1334, 1131 (SO_2)

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 3.73 (t, $J \approx 4.9$, 8H: CH $_2$ -O), 3.25 (t, $J \approx 4.9$, 8H: CH $_2$ -N)

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 66.32 (C-O), 46.55 (C-N)

Análisis elemental: % calculado para C $_8$ H $_{16}$ N $_2$ O $_4$ S: PM: 176.4, C:40.7, H:6.8, N:11.9, O:27.1, S:13.6, encontrado C:40.9, H:6.6, N:12.3, O:26.9, S: 13.3

Metodo b. Síntesis de sulfamidas N,N'-disustituidas con ester de aminoácidos (esquema 4.12).



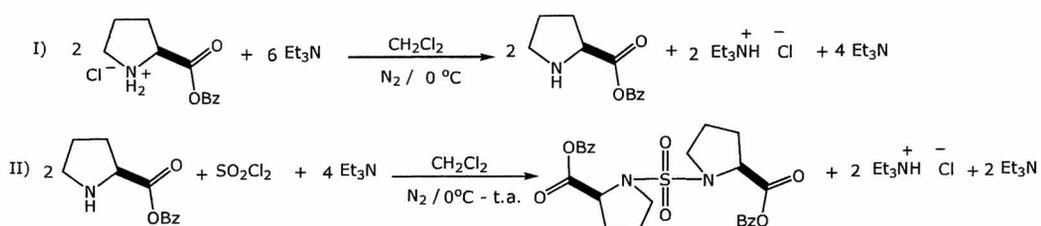
Esquema 4.11. Método b: Xaa= Prolina, R= bencil; Xaa= L-alanina, R= metil; Xaa= L-valina, R=metil; Xaa = β-alanina, R= metil.

Las sulfamidas 6-9 fueron sintetizadas de acuerdo a los procedimientos detallados en literatura^{12, 40, 54-56} y descriptos previamente.

Las reacciones se llevaron a cabo en 2 etapas. I) En atmósfera de nitrógeno se enfriaron a 0°C, 2 equivalentes del clorhidrato del ester del aminoácido correspondiente en diclorometano. Se agrega gota a gota, con agitación magnética, 6 equivalentes de trietilamina y se dejó reaccionar 15 minutos a esa temperatura. II) Se agrega gota a gota 1 equivalente de cloruro de sulfurilo en 5-10 ml de diclorometano. Durante el agregado los equipos se cubrieron con papel aluminio para evitar el contacto del reactivo con la luz. Concluido el agregado se mantuvo 1-2 hs a 0°C y posteriormente se permitió a mezcla de reacción llegar a temperatura ambiente y se continuo la agitación durante 3.5-8 hs.

El crudo de reacción se extrajo con solvente orgánico (compuestos 6,9), se lavo con solución ácida y con solución saturada de NaCl (compuesto 8) o, en los casos que este procedimiento general no dio los resultados esperados, se hizo una cromatografía en columna (compuesto 7). Los productos posteriormente se purificaron mediante cristalización.

Síntesis de N,N'-sulfonil bis-L-Prolina dibencil ester (6b).



I) En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se agregaron 1.010 gr (4.1 milimoles; 2 miliequivalentes) de clorhidrato de bencil ester de L-Prolina 98% y 25 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C y se agrego gota a gota desde

Capítulo 4

ampolla de compensación 1.73 ml (12.4 milimoles; 6 miliequivalentes) de trietilamina. Se agrego gota a gota desde ampolla de compensación a solución de 0.18 ml (2.1 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo en 10 ml de diclorometano. Se observo desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco. Se dejo reaccionar durante 2 hs y posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente, continuando la reacción durante 1,5 hs. Se obtiene una solución amarilla pálida en contacto con un sólido blanco.

Se elimino el solvente y el exceso de trietilamina en evaporador rotatorio. Se extrae del medio de reacción dos veces con éter etílico y se elimina el solvente a presión reducida. Se seco en tambor hasta peso constante. Peso obtenido: 421 mg, sólido cristalino blanco. Se observa descomposición de la muestra cuando esta expuesta aproximadamente 1 a temperatura ambiente. Por cristalización del producto con tetracloruro de carbono se obtuvieron 121 mg de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 121-123 °C. Rf producto: 0.58 (metanol)

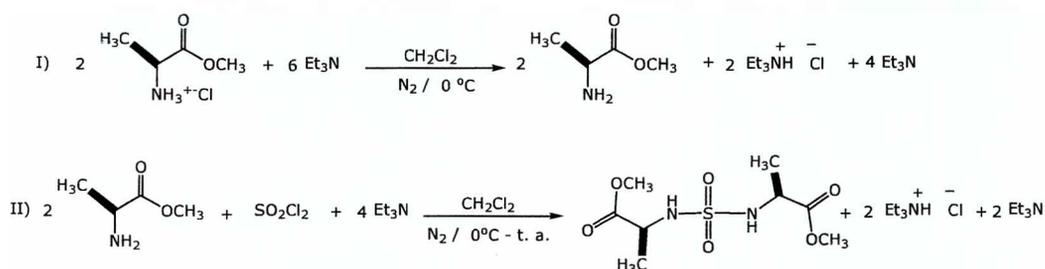
Rendimiento: 47% (sin considerar la cristalización).

IR (KBr), cm^{-1} : 3035, 3065, 3089 (CH Ar), 1750 (C=O), 1315, 1142 (SO_2)

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 7.32 (m, 10H: Ar-H), 5,16 (m, 4H: CH_2 bencilo), 4.44 (dd, J= 8.9, 3.7, 2H: CH), 3.43 (m, 4H: $\delta\text{-CH}_2$), 2.25-1.80 (m, 8H: $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$).

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 172.46 (C=O ester), 135.64 ($\text{C}^1\text{-Ar}$), 128.58, 128.32, 128.17 ($\text{C}^{2,3,4}\text{-Ar}$), 66.88(CH_2 bencilo), 60.68 ($\alpha\text{-C}$), 48.54 ($\delta\text{-C}$), 31.04 ($\beta\text{-C}$), 24.90 ($\gamma\text{-C}$).

Síntesis de *N,N'*-sulfonil bis-L-Alanina dimetil ester (**7-b**).



I) En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se agregaron 2.080 gr (14.8 milimoles; 2 miliequivalentes) de clorhidrato de metil ester de L-Alanina 99% y 50 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C. Se agrego gota a gota desde ampolla de compensación 6.27 ml (44.3 milimoles; 6 miliequivalentes) de trietilamina. Se obtiene una solución incolora en contacto con un sólido blanco.

II) Se agrego gota a gota desde ampolla de compensación una solución de 0.59 ml (7.4 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo disueltos en 5 ml de diclorometano. Se observo desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Se dejo reaccionar durante 1 hora a 0°C y posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente durante 4 hs más. Es una solución amarilla pálida en contacto con un sólido blanco.

Se elimino el solvente en evaporador rotatorio y se extrajo con eter etílico. Se elimina el solvente en evaporador rotatorio y se seco en tambor de vacío a temperatura ambiente, obteniéndose 1.463 gr de un sólido amarillo. Se realizo una cromatografía en columna de sílica gel, usando diclorometano:metanol 30:1 como solvente de elusión. La columna se controló mediante TLC. Se recogieron 80 fracciones de aproximadamente 10 ml. cada una. Se juntaron las fracciones 6-11, obteniéndose 501 mg de un sólido blanco, el cual se cristalizó de tetracloruro de carbono, obteniéndose 323 mg. un sólido cristalino blanco con punto de fusión 125-126 °C.

Por una purificación por columna de las fracciones impuras se obtuvo 112 mg más de producto puro por TLC y con igual punto de fusión.

Rf producto: 0.64 (diclorometano:metanol 30:1)

Rendimiento: 22 %

Rendimiento de literatura: 31%

Pf de literatura:⁴⁰ 91-92

IR (KBr), cm⁻¹: 3271 (NH), 1738 (C=O), 1348, 1132 (SO₂)

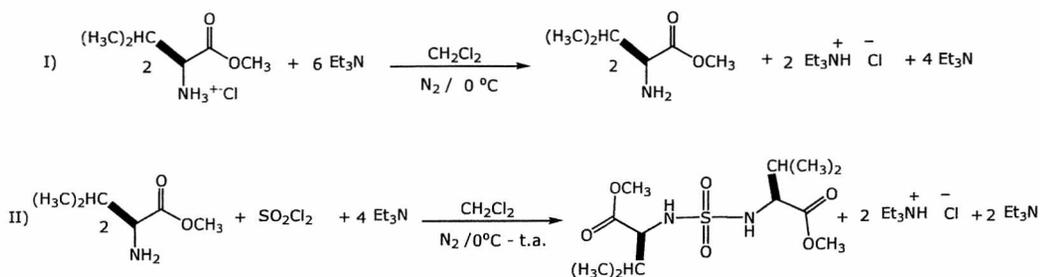
¹HNMR (CDCl₃), δ, ppm; J, Hz: 5.26 (d ancho, J≈ 7.0, 2H: NH), 4.10 (m, 2H: CH), 3.77 (s, 6H: O-CH₃), 1.45 (d, J= 7.1, 6H: CH₃).

¹³CNMR (CDCl₃), δ, ppm: 173.66 (C=O), 52.69 (CH), 51.81 (O-CH₃), 19.24 (CH₃)

Análisis elemental: % calculado para C₈H₁₆N₂O₆S: PM:268.3, C: 35.8, H:6.0, N:10.4, O: 35.8, S:12.0, encontrado C:35.7, H:6.1, N:10.3, O:35.9, S: 12.0

Descrito en literatura mediante espectroscopia de masa de alta resolución.⁴⁰

Síntesis de N,N'-sulfonil bis-L-Valina dimetil ester (8-b).



Capítulo 4

I) En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se agregaron 1,030 gr (6.09 milimoles; 2 miliequivalentes) de clorhidrato del metil ester de L-Valina a 40 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C. Se agregó gota a gota desde ampolla de compensación 2,55 ml (18.3 milimoles; 6 miliequivalentes) de trietilamina. Se obtiene una solución incolora en contacto con un sólido blanco.

II) Posteriormente se agregó gota a gota desde ampolla de compensación una solución de 0.25 ml (3.1 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo disueltos en 5 ml de diclorometano. Se observó desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Se dejó reaccionar durante 1 hora y posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente y se continuó la reacción durante 8 hs. Se obtiene una solución amarilla pálida en contacto con un sólido blanco.

Se redujo el volumen de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 5 ml y se agregaron 100 ml de acetato de etilo. Se observó la presencia de una pequeña cantidad de sólido insoluble que se separó por centrifugación. Se lavó la fase orgánica 2 veces con solución saturada de cloruro de sodio, 1 vez con solución de fosfato diácido de potasio 0.2 M y luego nuevamente con solución saturada de cloruro de sodio. Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtró y se eliminó el solvente en rotavapor. Se obtuvieron 970 mg de un sólido blanco, el cual se purificó por cristalización en hexano.

Se obtuvieron 534 mg un sólido cristalino blanco con punto de fusión 78-79 °C.

Rf producto: 0.51 (hexano:acetato de etilo 2:1)

Rendimiento: 54 %

Rendimiento de literatura:⁴⁰ 83%

Pf de literatura:⁴⁰ 76-77°C

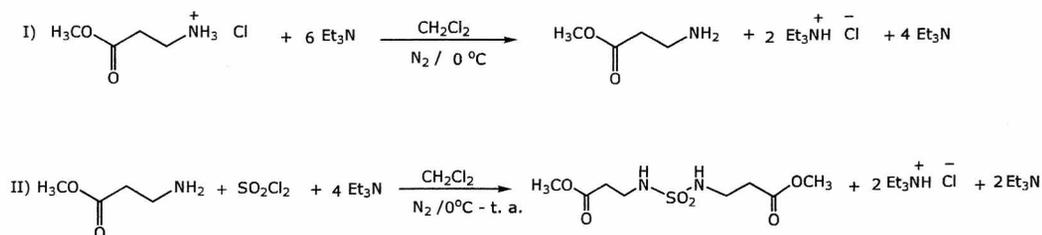
IR (KBr), cm^{-1} : 3321, 3268 (NH), 1738 (C=O), 1327, 1138 (SO₂)

¹HNMR (CDCl₃), δ , ppm; J, Hz: 5.10 (d, J= 9.5, 2H: NH), 3.88 (dd, J= 9.5, 4.5, 2H: CH-N), 3.77 (s, 6H: O-CH₃), 2.13 (m, 2H: CH isopropilo), 1.01 (d, J=6.83, 6H: CH₃ isopropilo), 0.90 (d, J=6.83, 6H: CH₃ isopropilo).

¹³CNMR (CDCl₃), δ , ppm: 172.85 (C=O), 61.13 (C-N), 52.39 (O-CH₃), 31.47 (CH isopropilo), 18.78 (CH₃ isopropilo), 17.43 (CH₃ isopropilo).

Análisis elemental: % calculado para C₁₂H₂₄N₂O₆S: PM: 324.4, C:44.4, H:7.5, N:8.6, O:29.6, S:9.9, encontrado C:44.7, H:7.4, N:8.3, O:29.9, S:9.7

Descrito en literatura mediante espectroscopia de masa de alta resolución.⁴⁰

Síntesis de *N,N'*-sulfonil bis- β -Alanina dimetil ester (**9-b**).

I) En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se agregaron 2,080 gr (14.6 milimoles; 2 miliequivalentes) de clorhidrato del metil ester de β -alanina a 50 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla a 0°C. Se agregó gota a gota desde ampolla de compensación 6.12 ml (43.8 milimoles; 6 miliequivalentes) de trietilamina y se dejó enfriar la mezcla durante 20 minutos. Se obtiene una solución incolora en contacto con un sólido blanco.

II) Posteriormente se agregó gota a gota desde ampolla de compensación una solución de 0.59 ml (7.31 milimoles; 1 miliequivalente) de cloruro de sulfurilo disueltos en 5 ml de diclorometano. Se observó desprendimiento de vapores blancos y formación de un sólido blanco durante el agregado. Se dejó reaccionar durante 2 hs y posteriormente se permitió al sistema alcanzar temperatura ambiente continuando la reacción durante 2 hs. Se obtiene una solución amarilla pálida en contacto con un sólido blanco. Se concentró en evaporador rotatorio y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó 2 veces con solución saturada de cloruro de sodio, 1 vez con solución buffer pH 6 y luego con solución saturada de cloruro de sodio. Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtró y se eliminó el solvente en evaporador rotatorio. Se obtuvieron 510 mg (crudo) de un aceite marrón claro, y, por cristalización en éter etílico, se obtuvieron 411 mg de un sólido blanco cristalino con punto de fusión 40.5-41°C. Rf producto: 0.51 (hexano:acetato de etilo 2:1)

Rendimiento: 21%

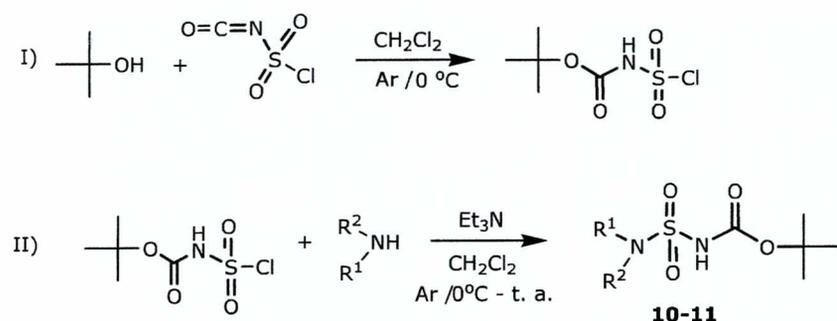
IR (KBr), cm^{-1} : 3301 (NH), 1736 (C=O), 1323, 1153 (SO_2).

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 5.01 (t, J=6.4, 2H: NH), 3.72 (s, 6H: O-CH₃), 3.31 (sistema AM_2X_2 , J=6.4, 6.1, 4H: N-CH₂), 2.03 (t, J=6.1, 4H: CH₂-CO)

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 172.55 (C=O), 51.94 (O-CH₃), 38.72 (C-N), 33.76 (C-CO).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: PM:268.3, C:35.8, H:6.0, N:10.4, O:35.8, S:12.0, encontrado C:35.6, H:5.7, N:10.5, O:36.0, S:12.2

Método c. Síntesis de sulfonil carbamatos de alquil y arilaminas (esquema 4.13).



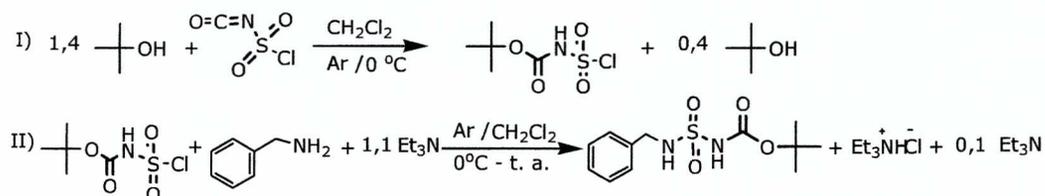
Esquema 4.13. Método c: R¹ = bencil R² = H; R¹ = n-propil, R² = n-propil.

Los productos 10-11 fueron sintetizados de acuerdo a los procedimientos descriptos en literatura^{59,68-72} y detallados anteriormente. La reacción puede dividirse en dos etapas: I) reacción de formación del clorosulfonil carbamato y II) reacción de formación del sulfonilcarbamatos de aril y alquil aminas.

I) Inicialmente se dejó reaccionar 1 hora a 0°C una solución de clorosulfonil isocianato en diclorometano a la que se le agregaron gota a gota 1.4 equivalentes de terbutanol.

II) Posteriormente esta solución se agregó desde ampolla de compensación a 1.1 equivalentes de trietilamina y 1 equivalente de la amina correspondiente, en el mismo solvente a 0 °C. Concluido el agregado se dejó reaccionar a 0 °C durante 1-2 hs. Se permitió a la mezcla de reacción llegar a temperatura ambiente y reaccionar durante 1 hora más en el caso del compuesto 11. Los productos obtenidos, por lo general, fueron purificados por cromatografía en columna y posterior cristalización.

Síntesis de N-bencil-N'-ter-butoxicarbonil-sulfamida (10c).



I) En un balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 2.13 ml (24.0 milimoles; 1 miliequivalente) de clorosulfonilisocianato a 25 ml de diclorometano.

Se enfrió la mezcla 0°C. y se agregó gota a gota desde jeringa 2.4 ml (33.6 milimoles; 1.4 miliequivalentes) de terbutanol y se dejó reaccionar 1 hora.

II) Esta solución se transfirió rápidamente en una ampolla de compensación bajo atmósfera de argón y se agregó gota a gota a una solución que contiene 3.78 ml (26.9 milimoles, 1.1 miliequivalentes) de trietilamina y 2.60 ml (24 milimoles, 1 miliequivalente) de bencilamina disueltos en 50 ml de diclorometano y enfriada a 0°C. La reacción continuó durante 2 hs. a temperatura ambiente. Se obtiene una solución incolora en contacto con un sólido blanco. Se eliminó el solvente en evaporador rotativo y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 10.158 gr de un sólido blanco (crudo).

Se purificó en cromatografía en columna de sílica gel, usando diclorometano como solvente de elución. Se recogieron 42 fracciones de 10 ml cada una. La columna se controló mediante TLC.

Se juntaron las fracciones 10-30, obteniéndose 8.485 gr de un sólido blanco, el cual se cristalizó en diclorometano. Se obtuvieron 4.667 gr de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 129.5-130°C.

Rf producto: 0.52 (diclorometano:metanol 60:1)

Rendimiento: 68%

Rendimiento de literatura:⁵⁹ 94%

Pf literatura: 137-139 °C⁶⁷ y 111-113⁵⁹

IR (KBr), cm⁻¹: 3300, 3273 (NH), 3068, 3033 (CH Ar), 1713 (C=O), 1358, 1148 (SO₂).

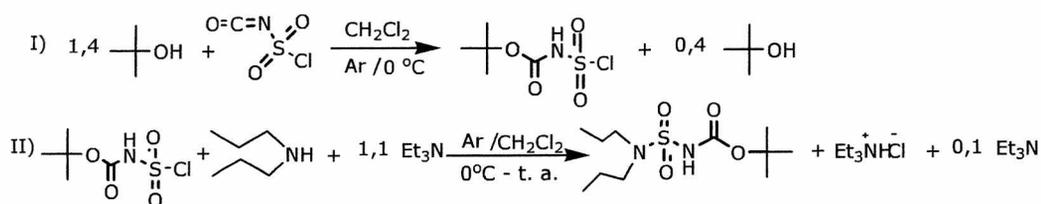
¹HNMR (CDCl₃), δ, ppm; J, Hz: 7.35-7.26 (m, 6H: Ar-H + NH-Boc), 5.61 (t ancho, J≈6.1, 1H: NH bencilico), 4.25 (d, J= 6.1, 2H: CH₂), 1.44 (s, 9H: CH₃ terbutilo).

¹³CNMR (CDCl₃), δ, ppm: 150.37 (C=O), 135.88 (C¹-Ar), 129.09, 128.36, 128.33 (C^{2,3,4}- Ar), 84.09 (C(CH₃)₃), 45.81(CH₂), 28.20 (CH₃ terbutilo).

Análisis elemental: % calculado para C₁₂H₁₈N₂O₄S: PM: 286.1, C:50.3, H:6.3, N:9.8, O:22.4, S:11.2, encontrado C:50.4, H:6.1, N:9.5, O:22.8, S: 11.2

Descrito en literatura para C e H y mediante espectroscopia de masa de alta resolución.⁶⁷

Síntesis de N, N-(dipropil)-N'-(ter-butoxicarbonil)-sulfamida (11-c).



Capítulo 4

I) En un balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 2.21 ml (25.0 milimoles; 1 miliequivalente) de clorosulfonilisocianato 98% a 25 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla a 0°C. y se agregó gota a gota, desde jeringa, 2.5 ml (35.0 milimoles; 1.4 miliequivalentes) de terbutanol y se continuó la reacción por 1 hora.

II) Esta solución se transfirió rápidamente a una ampolla de compensación bajo atmósfera de argón. Posteriormente se agregó gota a gota a una solución que contiene 3.86 ml (27.5 milimoles, 1.1 miliequivalentes) de trietilamina y 3.48 ml (25 milimoles, 1 miliequivalente) de dipropilamina disueltos en 50 ml de diclorometano y enfriada a 0°C. Se dejó reaccionar durante 1 hora a esa temperatura y adicionalmente 1 hora a temperatura ambiente. Se obtiene una solución amarilla pálida en contacto con un sólido blanco. Se eliminó el solvente en evaporador rotatorio y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 10.294 gr de un sólido blanco.

Se realizó una cromatografía en columna de sílica gel, usando hexano como solvente de elución. Se recogieron 117 fracciones de 10 ml cada una. La columna se controló mediante TLC. Se juntaron las fracciones 35 a 115 obteniéndose 4.523 gr de un aceite incoloro que se solidificó al ponerlo en la heladera (aproximadamente a 5°C). Es un sólido blanco con punto de fusión 52-53 °C, puro cromatográficamente.

R_f producto: 0.57 (diclorometano)

Rendimiento: 65%

Pf literatura:⁵⁷ 62-63 °C.

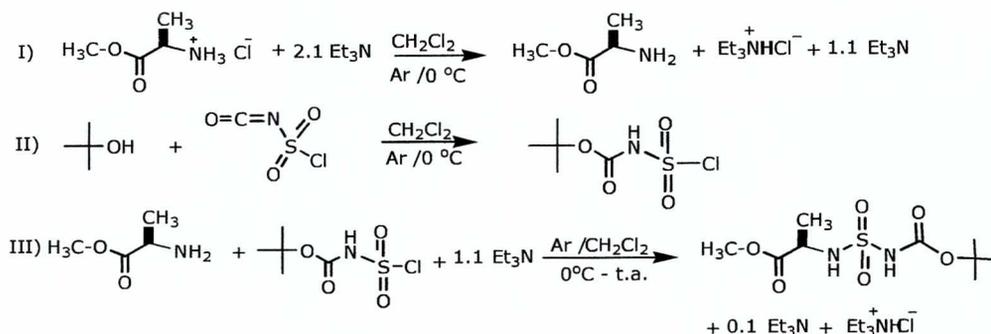
IR (KBr), cm⁻¹: 3272 (NH), 2975, 2940, 2881 (alquilo), 1736 (C=O), 1350, 1130 (SO₂)

¹HNMR (CDCl₃), δ, ppm; J, Hz: 7.26 (s, 1H: NH-Boc), 3.27 (t, J= 7.6, 4H: α-CH₂), 1.62 (m, 4H: β-CH₂), 1.47 (s, 9H: CH₃ terbutilo), 0.91 (t, J= 7.4, 6H: CH₃)

¹³CNMR (CDCl₃), δ, ppm: 150.20 (C=O), 83.38 (C(CH₃)₃), 50.97 (α-CH₂), 28.26 (CH₃ terbutilo), 21.75 (β-CH₂), 11.32 (CH₃).

Análisis elemental: % calculado para C₁₁H₂₄N₂O₄S: PM: 280.4, C:47.1, H:8.6, N:10.0, O:22.8, S:11.4, encontrado C:47.5, H:8.6, N:9.7, O:23.2, S: 11.0

Síntesis de (S)(-)[N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-alaninato de metilo (12-d).



I) En un balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 3.002 gr (21.3 milimoles; 1 miliequivalente) del clorhidrato de L-alaninato de metilo a 55 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C con un baño de agua-hielo. Se agregaron con agitación y desde jeringa 6.3 ml (44.7 milimoles; 2.1 miliequivalentes) de trietilamina y se dejó reaccionar durante 1.5 hs a esa temperatura.

II) En otro balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 22 ml de diclorometano y se enfriaron a 0°C. Se adicionaron con agitación y desde jeringa 1.9 ml (21.2 milimoles; 1 miliequivalente) de clorosulfonilisocianato y luego gota a gota y con agitación 3.75 ml (53.2 milimoles; 2.5 miliequivalentes) de terbutanol. Se dejó reaccionar durante 1 hora a esa temperatura.

III) Se agregó gota a gota bajo atmósfera de argón la solución proveniente de II) en el balón que contiene I) enfriado a 0°C y con agitación energética.

Se dejó reaccionar durante 2 hs y luego se permitió que el sistema tome temperatura ambiente y se continuó la reacción durante 16 hs. Se obtiene un líquido incoloro en contacto con un sólido blanco.

Se agregaron 20 ml de diclorometano a la mezcla de reacción, la fase orgánica se lavó 2 veces con 10 ml de solución de ácido acético al 10% y luego con 10 ml de solución saturada de cloruro de sodio.

Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtró y se eliminó el solvente en evaporador rotatorio. Se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 4.616 gr de un sólido blanco.

Se cristalizó en diclorometano obteniéndose 3.604 gr del producto, sólido blanco con punto de fusión 126-127 °C.

Rf producto: 0.63 (diclorometano:metanol 30:1)

Rendimiento: 60%

Rendimiento de literatura: 85%⁷⁷ y 90%⁷⁸

Pf literatura: 82-83⁷⁷ y 72-74⁷⁸

IR (KBr), cm^{-1} : 3296, 3267 (NH), 1745 (C=O ester), 1720 (C=O Boc), 1371, 1150 (SO_2)

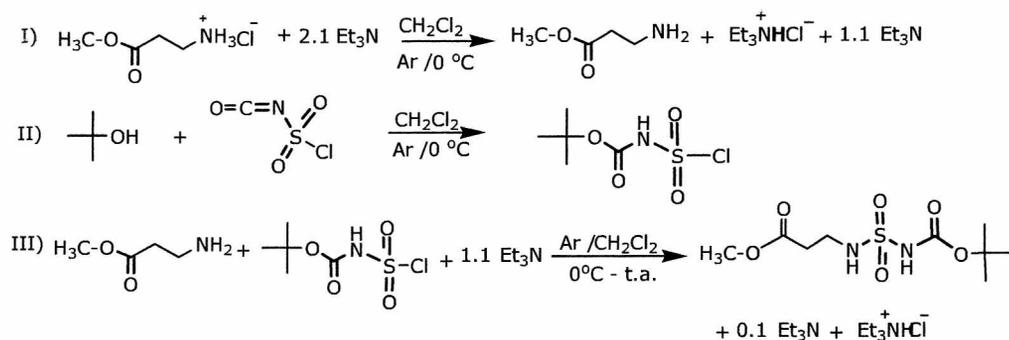
¹HNMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 7.56 (s, 1H: NH-Boc), 5.91 (d, J= 8.1 1H: NH alanina), 4.26 (m, 1H: CH), 3.77 (s, 3H: O- CH_3), 1.50 (s, 9H: CH_3 terbutilo), 1.47 (d, J= 7.3, 3H: CH_3 alanina).

¹³CNMR (CDCl_3), δ , ppm: 172.44 (C=O ester), 149.95 (C=O Boc), 83.92 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.73 (CH), 52.39 (O- CH_3), 27.91 (CH_3 terbutilo), 19.31 (CH_3 alanina).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: PM:282.3, C:38.3, H:6.4, N:9.9, O:34.0, S:11.4, encontrado C:38.2, H:6.4, N:9.8, O:34.1, S: 11.5

Descrito en literatura para C, H, N, S y mediante espectroscopia de masa.^{77,78}

*Síntesis de [N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]- β -alaninato de metilo (**13-d**).*



I) En un balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 3.019 gr (21.2 milimoles; 1 miliequivalente) del clorhidrato de β -alaninato de metilo a 55 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla a 0°C. Se agregaron con agitación y desde jeringa 6.3 ml (44.5 milimoles; 2.1 miliequivalentes) de trietilamina y se dejó reaccionar durante 1 hora manteniendo la temperatura.

II) En otro balón y bajo atmósfera de argón se agregan 22 ml de diclorometano y se enfriaron a 0°C. Se adicionaron con agitación y desde jeringa 1.9 ml (21.2 milimoles; 1 miliequivalente) de clorosulfonilisocianato y luego gota a gota y con agitación 3.74 ml (53.0 milimoles; 2.5 miliequivalentes) de terbutanol. Se dejó reaccionar durante 1 hora a esa temperatura.

Capítulo 4

III) Se agrego gota a gota bajo atmósfera de argón la solución proveniente de II) en el balón que contiene I) enfriado a 0°C y con agitación enérgica.

Se permitió que el sistema tome temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante 40 hs. Se obtuvo un líquido incoloro en contacto con un sólido blanco. Se agregaron 20 ml de diclorometano, se lavo la fase orgánica 2 veces con 10 ml de solución de ácido acético al 10% y luego con 10 ml de solución saturada de cloruro de sodio.

Se seco la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtro y se elimino el solvente en evaporador rotatorio. Se seco en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 5.2104 gr de un sólido blanco. Se cristalizó en tetracloruro de carbono y posteriormente con mezcla de solventes (hexano/diclorometano) obteniéndose 3.527 gr del producto, un sólido blanco con punto de fusión 103-105 °C.

Rf producto: 0.63 (diclorometano:metanol 50:1)

Rendimiento: 59%

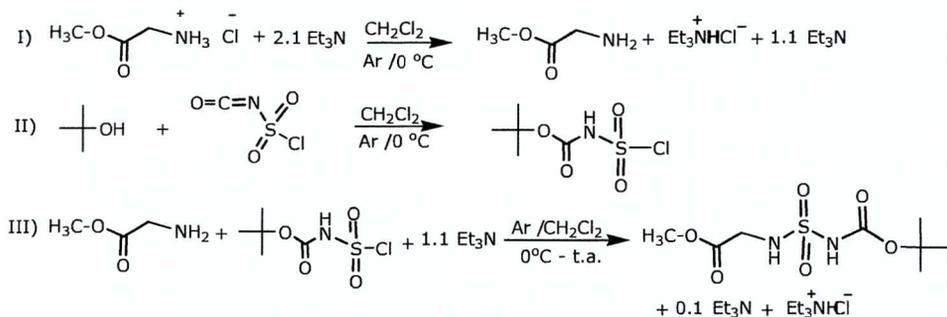
IR (KBr), cm^{-1} : 3279, 3208 (NH), 1736 (C=O ester), 1701 (C=O Boc), 1370, 1147 (SO_2)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 7.39 (s, 1H: NH-Boc), 5.74 (t, J=6.1, 1H: NH β -alanina), 3.72 (s, 3H: O- CH_3), 3.38 (sistema AM_2X_2 , J=6.1, 6.1, 2H: N- CH_2), 2.64 (t, J=6.1 2H: CH_2 -CO), 1.51 (s, 9H: CH_3 terbutilo).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3), δ , ppm: 172.05 (C=O ester), 150.07 (C=O Boc), 84.02 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 51.98 (O- CH_3), 39.34 (C-N), 33.46 (C-CO), 27.94 (CH_3 terbutilo).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: PM:282.3, C:38.3, H:6.4, N:9.9, O:34.0, S:11.4, encontrado C:38.5, H:6.3, N:9.7, O:34.0, S: 11.5

Síntesis de [N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (**14-d**).



I) En un balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 2.840 gr (22.4 milimoles; 1 miliequivalente) del clorhidrato de glicinato de metilo a 25 ml de diclorometano. Se enfrió la mezcla 0°C. Se agregaron con agitación y desde

jeringa 6.6 ml (47.0 milimoles; 2.1 miliequivalentes) de trietilamina y se dejó reaccionar durante 2 hs a esa temperatura.

II) En otro balón y bajo atmósfera de argón se agregaron 55 ml de diclorometano, que se enfriaron a 0°C en baño de agua-hielo. Se adicionaron con agitación y desde jeringa 2.0 ml (22.4 milimoles; 1 miliequivalente) de clorosulfonilisocianato y luego gota a gota y con agitación 3.96 ml (56.0 milimoles; 2.5 miliequivalentes) de terbutanol. Se dejó reaccionar durante 1 hora a esa temperatura.

III) Se agregó gota a gota bajo atmósfera de argón la solución proveniente de II) en el balón que contiene I) enfriado a 0°C con un baño de agua-hielo y con agitación enérgica. Se permitió que el sistema tome temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante 17 hs. Se obtuvo un líquido incoloro en contacto con un sólido blanco.

La fase líquida se separa, y se lava con 10 ml de solución de ácido acético al 10%, luego con 10 ml de solución saturada de cloruro de sodio hasta reacción neutra en papel indicador. Se seca la fase orgánica con sulfato de sodio, se filtra y se elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 6.293 gr de un sólido blanco (crudo).

Se cristalizó la muestra con mezcla de solventes (hexano/diclorometano) obteniéndose 3.722 gr de un sólido blanco con punto de fusión 106-108 °C.

Rf producto: 0.62 (diclorometano:metanol 15:1)

Rendimiento: 62%

Rendimiento de literatura:⁷⁸ 87%

Pf literatura:⁷⁸105-107°C.

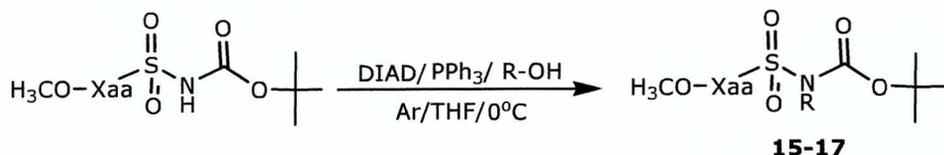
IR (KBr), cm^{-1} : 3264 (NH), 1748 (C=O ester), 1720 (C=O Boc), 1364, 1148 (SO_2)
¹HNMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 7.52 (s ancho, 1H: NH-Boc), 5.79 (s ancho, 1H: NH-glicina), 3.99 (d, J= 5.4, 2H: CH_2), 3.78 (s, 3H: O- CH_3), 1.50 (s, 9H: CH_3 terbutilo).

¹³CNMR (CDCl_3), δ , ppm: 169.25 (C=O ester), 149.97 (C=O Boc), 84.06 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.61 (O- CH_3), 44.91 (CH_2), 27.96(CH_3 terbutilo).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: PM:268.3, C:35.8, H:6.0, N:10.4, O:35.8, S:12.0, encontrado C:35.8, H:6.1, N:10.2, O:35.9, S: 12.0

Descrito en literatura para C, H, N, S y mediante espectroscopia de masa.⁷⁸

Método e. Alquilación selectiva de sulfonil carbamatos de esteres de aminoácidos (esquema 4-15).

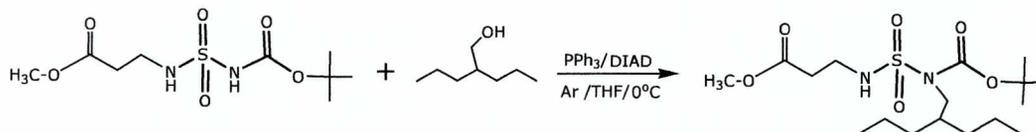


Esquema 4-15: Xaa = β -alanina, R = (2-propil)pentil; Xaa = glicina, R = (2-propil)pentil; Xaa = glicina, R = bencil.

Los productos 15-17 fueron sintetizados de acuerdo a los procedimientos descritos en literatura^{48,77-78} y detallados anteriormente. La reacción se llevo a cabo usando cantidades estequiométricas de reactivos.

El procedimiento general consistió en preparar una solución del sulfonil carbamato del ester de aminoácido, obtenido previamente y el DIAD disuelto en THF. Esta solución se agrego gota a gota a una solución enfriada a 0°C con un baño de agua-hielo que contiene la PPh₃ y el alcohol correspondiente, dejando reaccionar durante 1 hora a esa temperatura. Se purifica por cromatografía en columna y por cristalización.

Síntesis de [N-(N'-terbutoxicarbonil, N'valproil)-sulfamoil]- β -alaninato de metilo (15-e).



En un balón y bajo atmósfera de argón se preparo una solución usando 1.607 gr (5.7 milimoles; 1 miliequivalente) de [N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]- β -alaninato de metilo preparado previamente y 1.2 ml (5.7 milimoles, 1 miliequivalente) de DIAD y 7.0 ml de THF, obteniéndose una solución color naranja intenso.

Esta solución se agrego gota a gota desde jeringa a una solución previamente enfriada a 0°C compuesta por 1.508 gr (5.7 milimoles; 1 miliequivalente) de trifenilfosfina y 0.9 ml (5.7 milimoles; 1 miliequivalente) de 2-propil-1-pentanol en 7.0 ml de THF. Se observo decoloración parcial de la solución de DIAD durante el agregado. Se dejo reaccionar 1 hora a 0°C.

Se eliminó el solvente en evaporador rotatorio y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 4.874 gr de un aceite amarillo.

Se realizó una cromatografía en columna de sílicagel, usando diclorometano como solvente de elución. Se obtuvieron 1.507 gr de un aceite incoloro, el cual se solidifica al colocarlo en la heladera (aproximadamente 5°C) pero funde a temperatura ambiente. Se realizó una segunda cromatografía en columna de sílica gel, usando diclorometano como solvente de elución. La columna se controló mediante TLC.

Se obtuvieron 1.311 gr de un sólido blanco, y se cristalizó de hexano., dando 922 mg de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 36-37°C.

Rf producto: 0.57 (diclorometano)

Rendimiento: 41%

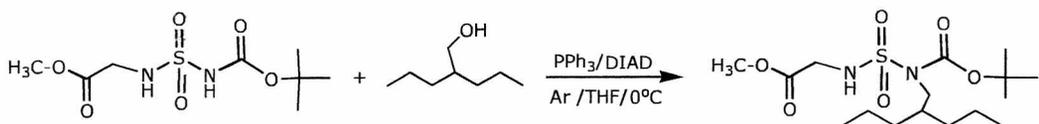
IR (KBr), cm^{-1} : 3368 (NH), 2960, 2933, 2872 (alquilo), 1762 (C=O ester), 1704 (C=O Boc), 1358, 1141 (SO_2)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 5.89 (t, J=6.6, 1H: NH- β -alanina), 3.71 (s, 3H: O- CH_3), 3.57 (d, J=7.3, 2H: N- CH_2 valproilo), 3.25 (sistema AM_2X_2 , J=6.6, 6.1, 2H: N- CH_2 β -alanina), 2.60 (t, J=6.1, 2H: CH_2 -CO), 1.81 (m, 1H: CH valproilo), 1.54 (s, 9H: CH_3 terbutilo), 1.39-1.22 (m, 8H: CH_2 - CH_2 valproilo), 0.89 (t, J=6.6, 6H: CH_3 valproilo)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3), δ , ppm: 172.19 (C=O ester), 153.31 (C=O Boc), 84.33 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.20 (O- CH_3), 52.10 (N-C valproilo), 39.4 (N- CH_2 β -alanina), 37.81 (β -C valproilo), 34.13, (CH_2 -CO), 33.67 (γ -C valproilo), 28.20 (CH_3 terbutilo), 19.62 (δ -C valproilo), 14.63 (CH_3 valproilo).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: PM:394.5, C:51.8, H:8.7, N:7.1, O:24.3, S:8.1, encontrado C:51.5, H:8.9, N:7.5, O:23.9, S:8.2

Síntesis de [N-(N'-terbutoxicarbonil, N'valproil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (16-e).



En un balón y bajo atmósfera de argón se preparó una solución usando 1.001 gr (3.7 milimoles; 1 miliequivalente) de [N-(N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo preparado previamente y 0.8 ml (3.7 milimoles, 1 miliequivalente) de DIAD y 4.0 ml de THF, solución de color naranja intenso.

Capítulo 4

Esta solución se agrego gota a gota desde jeringa a una solución previamente enfriada a 0°C compuesta por 968 mg (3.7 milimoles; 1 miliequivalente) de trifenilfosfina y 0.6 ml (3.7 milimoles; 1 miliequivalente) de 2-propil-1-pentanol en 4.0 ml de THF. Se observo decoloración parcial de la solución de DIAD durante el agregado. Se dejo reaccionar 1 hora a 0°C. Se obtiene una solución amarilla. Se elimino el solvente en evaporador rotatorio y se seco en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 4.389 gr de un aceite amarillo. Se realizo una cromatografía en columna de sílica gel, usando diclorometano como solvente de elusión. La columna se controló mediante TLC.

Se obtuvieron 1.343 gr de un sólido blanco que se cristalizó de hexano. Se obtuvieron 1.034 gr de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 57.5-58°C.

Rf producto: 0.47 (diclorometano)

Rendimiento: 74%

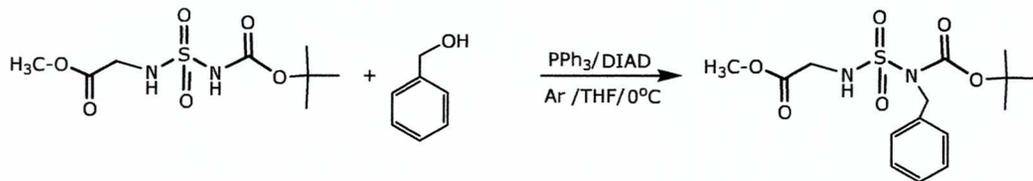
IR (KBr), cm^{-1} : 3368 (NH), 2960, 2932, 2870 (alquilo), 1733 (C=O ester), 1706 (C=O Boc), 1358, 1142 (SO_2)

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 5.88 (t, J=5.4, 1H: NH-glicina), 3.87 (d, J=5.4, 2H: N- CH_2 glicina), 3.78 (s, 3H: O- CH_3), 3.54 (d, J=7.3, 2H: N- CH_2 valproilo), 1.79 (m, 1H: CH valproilo), 1.54 (s, 9H: CH_3 terbutilo), 1.39-1.19 (m, 8H: CH_2 - CH_2 valproilo), 0.89 (t, J=6.7, 6H: CH_3 valproilo)

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 168.90 (C=O ester), 152.09 (C=O Boc), 84.19 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.62 (O- CH_3), 52.00 (N-C valproilo), 44.82 (N- CH_2 glicina), 37.56 (β -C valproilo), 33.23 (γ -C valproilo), 27.93 (CH_3 terbutilo), 19.34 (δ -C valproilo), 14.38 (CH_3 valproilo)

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: PM:380.5, C:50.5, H:8.5, N:7.4, O:25.2, S:8.4, encontrado C:50.5, H:8.6, N:7.1, O:25.5, S:8.3

Síntesis de [N-(N'-bencil, N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (17-e).



En un balón y bajo atmósfera de argón se preparo una solución usando 1.002 gr (3.7 milimoles; 1 miliequivalente) de [N-(N'-terbutoxicarbonil)-

sulfamoil]- glicinato de metilo preparado previamente y 0.8 ml (3.7 milimoles, 1 miliequivalente) de DIAD en 4.0 ml de THF, solución color naranja intenso.

Esta solución se agrego gota a gota desde jeringa a una solución previamente enfriada a 0°C compuesta por 987 mg (3.7 milimoles; 1 miliequivalente) de trifenilfosfina y 0.4 ml (3.7 milimoles; 1 miliequivalente) de alcohol bencílico en 4.0 ml de THF. Se observo decoloración parcial de la solución de DIAD durante el agregado. Se dejo reaccionar 1 hora a 0°C, obteniéndose una solución amarilla. Se elimino el solvente en evaporador rotatorio y se seco en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 3.955 gr de un aceite amarillo.

Se realizo una cromatografía en columna de silicagel, usando diclorometano como solvente de elusión. La columna se controlo mediante cromatografía en capa delgada.

Se obtuvo 1.308 gr de un sólido blanco, puro cromatográficamente, y se cristalizó de mezcla de solventes (hexano/diclorometano), obteniendose 1.080 gr de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 114-115°C.

Rf producto: 0.57 (diclorometano)

Rendimiento: 80%

Rendimiento de literatura: 82%⁷⁸

Pf literatura: 61-62⁷⁸

IR (KBr), cm⁻¹: 3331 (NH), 3091, 3035 (CH Ar), 1734 ancho (C=O ester y C=O Boc), 1369, 1154 (SO₂).

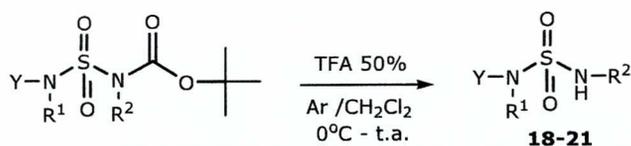
¹HNMR (CDCl₃), δ, ppm; J, Hz: 7.38-7.24 (m, 5H: Ar-H), 5.74 (t, J= 5.4, 1H: NH-glicina), 4.83 (s, 2H: CH₂ bencilo), 3.69 (s, 3H: O-CH₃), 3.62 (d, J= 5.4, 2H: CH₂ glicina), 1.52 (s, 9H: CH₃ terbutilo).

¹³CNMR (CDCl₃), δ, ppm: 168.81 (C=O ester), 151.67 (C=O Boc), 137.48 (C¹-Ar), 128.49, 128.11, 127.75 (C^{2,3,4}-Ar), 84.71 (C(CH₃)₃), 52.50 (O-CH₃), 50.59 (CH₂ bencilo), 44.43 (CH₂ glicina), 27.95 (CH₃ terbutilo).

Análisis elemental: % calculado para C₁₅H₂₂N₂O₆S: PM:358.4, C:50.3, H:6.2, N:7.8, O:26.8, S:8.9, encontrado C:50.5, H:6.5, N:7.5, O:26.5, S:9.0

Descrito en literatura para C, H, N, S y mediante espectroscopia de masa.⁷⁸

Método f. Hidrólisis de sulfonilcarbamatos (esquema 4.16).



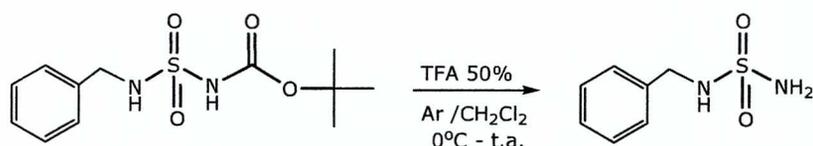
Esquema 4.16. Y= bencil, R¹= H, R²=H; Y= propil, R¹= propil, R²= H; Y, R¹= glicina-o -Met, R²= bencil ; Y, R¹= glicina-o -Met, R²=valproil.

Los productos 18-21 fueron sintetizados de acuerdo a los procedimientos descritos en literatura^{59,64,77-78} y detallados anteriormente. El diclorometano usado como solvente de reacción y el ácido acético se secaron previamente con pentóxido de fósforo, se destilaron y se utilizaron en el momento.

Inicialmente se preparo una solución con 1 equivalente de sulfonilcarbamató en diclorometano y enfriado a 0°C con un baño de agua-hielo. Con agitación enérgica se agrego gota a gota sobre una solución de ácido trifluoroacético al 50% en diclorometano.

Se dejo reaccionar a 0°C durante 2 hs y posteriormente 6-35 hs a temperatura ambiente. En algunos casos se coloco un burbujeo continuo de argón sobre la mezcla de reacción para favorecer la formación del producto. Se concentro la mezcla de reacción en evaporador rotatorio. Se purifico por cromatografía en columna y por cristalización. En el caso 19 no se realizo cromatografía en columna sino que se cristalizó directamente, dadas las características del producto crudo obtenido.

Síntesis de bencilsulfamida (18-f).



En un balón y bajo atmósfera de argón se preparo una solución de 1.487 gr (5.2 milimoles, 1 miliequivalente) de N-bencil-N-ter-butoxicarbonil-sulfamida preparada previamente disuelta en 10 ml de diclorometano enfriado a 0°C. Con agitación enérgica se goteo sobre esta una solución al 50% de 1.16 ml (15.6 milimoles, 3 miliequivalentes) de ácido trifluoroacético y diclorometano. Se dejo

reaccionar a 0°C durante 2 hs. y posteriormente 14 hs a temperatura ambiente. Se adaptó burbujeo continuo de argón para favorecer el desplazamiento de la reacción y esta se continuó 4 hs más. Se obtuvo una solución incolora. Se concentró la mezcla de reacción en evaporador rotatorio. Se secó usando bomba de alto vacío hasta peso constante. Se obtuvieron 1.129 gr de un sólido blanco.

Se realizó una cromatografía en columna de sílica gel usando mezclas de solventes diclorometano:metanol con polaridad creciente hasta llegar a una relación 25:1. La columna se controló mediante TLC.

Se obtuvieron 912 mg de un sólido blanco, el cual se cristalizó de diclorometano, dando 601 mg de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 104-105°C.

Rf producto: 0.50 (diclorometano:metanol 30:1)

Rendimiento: 62%

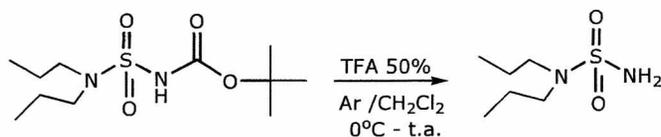
IR (KBr), cm^{-1} : 3325, 3273 (NH, NH₂), 3039 (CH Ar), 1334, 1153 (SO₂)

¹HNMR (DMSO-d₆), δ , ppm; J, Hz: 7.41-7.19 (m, 5H: Ar-H), 7.00 (t, J=6.6, 1H: NH-bencilo), 6.59 (s, 2H: NH₂), 4.05 (d, J=6.6, 2H: CH₂).

¹³CNMR (DMSO-d₆), δ , ppm: 139.361 (C¹-Ar), 128.85, 128.35, 127.61 (C^{2,3,4}-Ar), 46.79 (CH₂).

Análisis elemental: % calculado para C₇H₁₀N₂O₂S: PM: 186.1, C:45.2, H:5.4, N:15.0, O:17.2, S:17.2, encontrado C:45.3, H:5.6, N:15.0, O:16.8, S:17.3

Síntesis de N,N-dipropilsulfamida (**19-f**).



En un balón y bajo atmósfera de argón se preparó una solución de 1.407 gr (5.0 milimoles, 1 miliequivalente) de N,N-dipropil-N-ter-butoxicarbonil-sulfamida preparada previamente disuelta en 10 ml de diclorometano enfriado a 0°C. Con agitación enérgica se goteó sobre esta una solución al 50% preparada con 1.11 ml (15.0 milimoles, 3 miliequivalentes) de ácido trifluoroacético (p.eb. 72.4°C, Δ : 1.54 gr/ml) y diclorometano. Se dejó reaccionar a 0°C durante 2 hs. y posteriormente 6 hs a temperatura ambiente, obteniendo una solución incolora. Se concentró la mezcla de reacción en evaporador rotatorio. Se secó usando bomba de alto vacío hasta peso constante. Se obtuvieron 824 mg de un sólido

Capítulo 4

blanco. Se cristalizó de hexano y obtuvieron 442 mg de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 67-68°C.

Rf producto: 0.67 (diclorometano: metanol 30:1)

Rendimiento: 49%

Pf literatura:⁵⁷62-63 °C

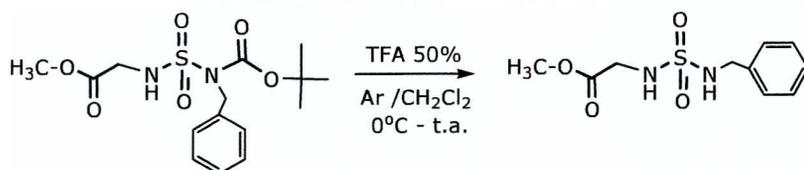
IR (KBr), cm^{-1} : 3358, 3270 (NH_2), 2972, 2934 (alquilo), 1335, 1152 (SO_2)

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 4.65 (s, 2H: NH_2), 3.12 (t, J= 7.6, 4H: $\alpha\text{-CH}_2$), 1.62 (m, 4H: $\beta\text{-CH}_2$), 0.92 (t, J= 7.3, 6H: CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 50.38 ($\alpha\text{-CH}_2$), 21.70 ($\beta\text{-CH}_2$), 11.44 (CH_3).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: PM: 180.1, C:40.0, H:8.9, N:15.5, O:17.8, S:17.8, encontrado C:40.1, H:9.0, N:15.5, O:17.5, S: 17.9

Síntesis de [N-(N' bencil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (**20-f**).



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se preparó una solución de 801 mg (2.2 milimoles, 1 miliequivalente) de [N-(N' bencil, N' -terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo preparado previamente y disuelto en 22.4 ml de diclorometano enfriado a 0°C. Con agitación enérgica se goteó sobre esta una solución al 50% preparada con 0.5 ml (6.7 milimoles, 3 miliequivalentes) de ácido trifluoroacético y diclorometano.

Se dejó reaccionar a 0°C durante 2 hs y posteriormente 4 hs a temperatura ambiente. Al no observarse avance de la reacción se agregaron 2 miliequivalentes más de ácido trifluoroacético y se colocó un burbujeo continuo de argón para favorecer el desplazamiento de la reacción. Se dejó reaccionar 31 hs más a temperatura ambiente. Es una solución incolora.

Se concentró la mezcla de reacción en evaporador rotativo y se secó usando bomba de alto vacío hasta peso constante. Se obtuvieron 572 mg de un sólido blanco.

Se realizó una cromatografía en columna de sílica gel, usando mezclas de solventes diclorometano: metanol con polaridad creciente hasta una relación 25:1. La columna se controló mediante TLC.

Se obtuvieron 327 mg de un sólido blanco, el cual se cristalizó de mezcla de solventes (hexano/diclorometano) dando 239 mg de un sólido cristalino blanco con punto de fusión 72 -72.5°C.

Rf producto: 0.55 (diclorometano:metanol 40:1)

Rendimiento: 41%

Rendimiento de literatura:⁷⁸ 89%

Pf literatura:⁷⁸ espuma

IR (KBr), cm⁻¹: 3297, 3280 (NH), 3064, 3034 (CH-Ar), 1741 (C=O) 1359, 1154 (SO₂)

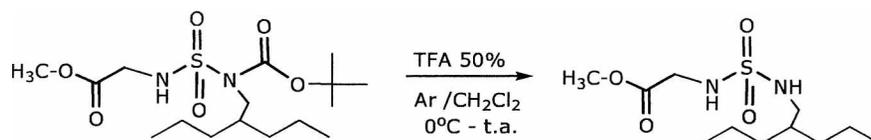
¹HNMR (CDCl₃), δ, ppm; J, Hz: 7.26 (m, 5H: Ar-H), 5.02 (t, J≈5.5, 1H: NH-glicina), 4.81 (t, J≈6.0, 1H: NH-bencilo), 4.17 (d, J=6.0, 2H: CH₂ bencilo), 3.73 (d, J= 5.5, 2H: CH₂ glicina), 3.67 (s, 3H: O-CH₃).

¹³CNMR (CDCl₃), δ, ppm: 170.44 (C=O ester), 136.86 (C¹-Ar), 128.99, 128.27, 128.18 (C^{2,3,4}-Ar), 52.83 (O-CH₃), 47.50 (CH₂ bencilo), 44.46 (CH₂ glicina).

Análisis elemental: % calculado para C₁₀H₁₄N₂O₄S: PM:258.3, C:46.5, H:5.5, N:10.8, O:24.8, S:12.4, encontrado C:46.4, H:5.6, N:11.1, O:24.5, S: 12.4

Descrito en literatura para C, H, N, S y mediante espectroscopia de masa.⁷⁸

Síntesis de [N-(N'valproil)-sulfamoil]-glicinato de metilo (21-f).



En un balón y bajo atmósfera de argón se preparó una solución de 789 mg (2.1 milimoles, 1 miliequivalente) de [N-(N' bencil, N'-terbutoxicarbonil)-sulfamoil]-glicinato de metilo preparado previamente y disuelto en 22.4 ml de diclorometano enfriado a 0°C. Con agitación energética se goteó sobre esta una solución al 50% preparada con 0.5 ml (6.3 milimoles, 3 miliequivalentes) de ácido trifluoroacético (p.eb. 72.4°C, Δ: 1.54 gr/ml) y el mismo volumen de diclorometano.

Se dejó reaccionar a 0°C durante 2 hs. y posteriormente 4 hs a temperatura ambiente. Al no observarse avance de la reacción se agregaron 6 miliequivalentes más de ácido trifluoroacético y se colocó un burbujeo continuo de argón para favorecer el desplazamiento de la reacción. Se dejó reaccionar 17 hs más a temperatura ambiente. Es una solución incolora con una pequeña cantidad de sólido blanco.

Capítulo 4

Se concentro la mezcla de reacción en rotativo y luego se coevaporo con 10 ml de eter etilico 4 veces. Se seco usando bomba de alto vacío hasta peso constante.

Se obtuvieron 576 mg de un sólido blanco.

Se realizo una cromatografía en columna de sílica gel (40 veces el peso), usando Diclorometano como solvente de elusión. Se uso siembra líquida. Se recogieron 260 fracciones de 10 ml cada una. La columna se controló mediante cromatografía en capa delgada.

Se juntaron las fracciones 88-254, obteniéndose 402 mg de unaceite levemente amarillo. Se realizo una segunda columna cromatografía en las mismas condiciones que la anterior, obteniendose 66 fracciones de 5 ml ccada una. Se juntaron las fracciones 23-36 obteniendose 243 mg de un solido blanco puro cromatograficamente de punto de fusion 41-42 °C.

Rf producto: 0.39 (diclorometano:metanol 100:1)

Rendimiento: 41%

IR (KBr), cm^{-1} : 3350, 3285 (NH), 2971, 2928 (alquilo), 1734 (C=O) 1328, 1143 (SO_2)

^1H NMR (CDCl_3), δ , ppm; J, Hz: 5.06 (s ancho, 1H: NH-glicina), 4.40 (s ancho, 1H: NH-valproilo), 3.83 (s, 3H: O- CH_3), 3.80 (s ancho, 2H: CH_2 glicina), 2.97 (d, J= 5.9 2H: N- CH_2 valproilo), 1.55 (m, 1H: CH valproilo), 1.37-1.20 (m, 8H: CH_2 - CH_2 valproilo), 0.88 (t, J= 6.7, CH_3 valproilo)

^{13}C NMR (CDCl_3), δ , ppm: 170.56 (C=O ester), 52.83 (O- CH_3), 46.49 (N-C valproilo), 44.51 (N- CH_2 glicina), 37.44 (β -C valproilo), 34.01 (γ -C valproilo), 19.86 (δ -C valproilo), 14.38 (CH_3 valproilo)

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: PM:280.4, C:47.1, H:8.6, N:10.0, O:22.8, S:11.4, encontrado C:47.0, H:8.7, N:10.2, O:22.6, S: 11.5

Referencias del capítulo 3

1. Cotton, A. F.; Wilkinson, G., Capítulo 16: Los elementos del grupo VI: S, Se, Te, Po. En *Química Inorgánica Avanzada*, 1^{ra} Ed.; editorial Limusa de Noriega Editores, Mexico D.F., **1995**, 609-657.
2. Calyden, J.; Greeves N.; Warren S.; Wothers P., Chapter 46: Organo-main-group Chemistry: sulfur. En *Organic Chemistry*, 1^{ra} Ed.; Oxford University Press, New York, **2001**, 1247-1249.
3. Rigaudy, J.; Klesney, S. P., Section C: Characteristic groups containing Carbon, Hydrogen, Oxygen, Nitrogen, Halogen, Sulfur, Selenium, and/or Tellurium. En

Nomenclature of Organic Chemistry 3rd Ed.; editorial Pergamon Press, New York, **1979**, 229-246.

4. Avendaño, C.; Menéndez, J. C., Capítulo 1: Conceptos básicos en química farmacéutica y nomenclatura de fármacos. En *Introducción a la Química Farmacéutica* 1^{ra} Ed.; editorial Edigrafos S. A., Madrid, **1993**, 2-3.

5. Avendaño, C.; Menéndez, J. C., Capítulo 3: La modificación molecular como método de búsqueda de nuevos fármacos. En *Introducción a la Química Farmacéutica* 1^{ra} Ed.; editorial Edigrafos S. A., Madrid, **1993**, 59.

6. Bialer, M.; Johannessen, S. I.; Kupferberg, H. J.; Levy, R. H.; Perucca, E., Tomson, T., *Epilepsy Research*, **2004**, 61, 1-48.

7. Woodbury, D. M., Sulfonamides and derivatives: Acetazolamide. En *Antiepileptic Drugs*, 3rd Ed., Levy, R. H.; Dreifuss, F. E.; Mattson, R. H.; Meldrum B. S.; Penry J.K., Eds.; Raven Press, New York, **1989**, 855-875.

8. Masereel, B.; Rolin, S.; Abbate, F.; Scozzofava, A.; Supuran, C. T., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 312.

9. Chufan, E. E.; Pedregosa, J. C.; Baldini, O. N.; Bruno Blanch, L. E., *Il Farmaco* **1999**, 54, 838.

10. Audrieth, L. F.; Sveda, M.; Sisler, H. H.; Butler, M. J., *Chem. Rev.*, **1940**, 26, 49.

11. Benson, G.A.; Spillane, W. J., *Chem. Rev.*, **1980**, 80, 151.

12. Traube, W., *Ber.* **1892**, 25, 2472-2475.

13. Sowada, V., *J. Prakt. Chem.*, **1963**, 4, (20) 310.

14. Forster, D. L.; Gilchrist, T. L.; Rees, C. W., *J. Chem. Soc. C*, **1971**, 993.

15. Sowada R., *J. Prakt. Chem.*, **1964**, (25), 88.

16. Sowada R., *J. Prakt. Chem.*, **1966**, (33), 240.

17. Sowada R., *J. Prakt. Chem.*, **1966**, (33), 247.

18. Lafferty, J. J.; Loev, B., *US Patent*, **1964**, 3147305.

19. McManus, J. M.; McFarland, J. W.; Gerber, C. F.; McLamore, W. M.; Laubach, G. D., *J. Med. Chem.*, **1965**, 8, 766.

20. Ciba Ltd., *Belgian Patent* **1964**, 640160.

21. Vandi, A.; Moeller, T.; Audrieth, L. F. *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 1136.

22. Paget, C. J.; Chamberlain, J. W.; Wikel, J. H., *German Patent* **1977**, 2638551.

23. Arya, V. P.; Fernández, F.; Ghate, S. P.; Costa-Pereira, F. X. R.; Wasalawalla, Y. H., *Indian J. Chem.*, **1972**, 10, 686.

24. Kamlya, T.; Tanka, K.; Salto, Y., Japanese Patent **1976**, 52151. *Chem. Abstr.*, 85 177072 (1976).

25. Atkins, G. M. Jr.; Burgués, E. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2502.

Capitulo 4

26. Vandi, A.; Moeller, T.; Audrieth, L. F., *J. Org. Chem. Soc.*, **1961**, 26, 3478.
27. Catt, J. D.; Matler, W. L., German Patent **1975**, 2444192.
28. Metzger, C.; Merz, W. German Patent **1978**, 2646884.
29. Day, C. E.; Schurr, P. E.; Emmert, D. E.; TenBrink, R. E.; Lednicer, D., *J. Med. Chem.* **1975**, 18, 1065.
30. Alt, G. H.; Kloek, J. A., U. S. Patent **1977**, 4013448.
31. Yamaguchi, H.; Fukuno, H., *Nippon Kagaku Kaishi*, **1977**, 1349.
32. McDermott, S. D.; Spillane W. J., *Synthesis*, **1983**, 192.
33. Sowada, R., *Z. Chem.*, **1968**, 8, 25.
34. Catt, J. D.; Matier, W. L., *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 566.
35. Gong, B.; Zheng, C.; Skrzypczak-Jankun, E.; Yan, Y.; Zhang, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 11194.
36. Martín, T.; Obst, U.; Rebek, J., *Science*, **1998**, 281, 1842.
37. Gong, B.; Zheng, C.; Zeng, H.; Zhu, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 9766.
38. Nuckolls, C.; Hof, F.; Martín T.; Rebek, J., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 10281.
39. Hof, F.; Nuckolls C.; Craig, S. L.; Martín, T.; Rebek, J., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 10991.
40. Hof, F.; Nuckolls C.; Rebek, J., Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4251.
41. Dougherty, J. M.; Probst, D. A.; Robinson, R. E.; Moore, J. D.; Klein, T. A.; Snelgrove, K. A.; Hanson, P. R., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9781.
42. Aouf, N.; Dewynter, G.; Montero, J. L., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 45, 6545.
43. Dewynter, G.; Ubaldi, S.; Voyer, N.; Toupet, L. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 7434.
44. Boudjabi, S.; Dewynter, G.; Voyer, N.; Toupet, L., *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 9, 2275.
45. Hulten, J.; Bonham, N. M.; Nillroth, U.; Hansson, T.; Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Aqvist, J.; Classon B.; Danielson, H.; Karlen, A.; Kvarnstrom, I.; Samuelsson, B.; Hallberg, A. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 885.
46. Backbro, K.; Lowgren, S.; Osterlund, K.; Atepo, J.; Unge, T.; Hulten, J.; Bonham, N. M.; Schaal, W.; Karlen, A.; Hallberg, A. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 898.
47. Hogberg, M.; Engelhardt, P.; Vrang, L.; Zhang, H., *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 265.

48. Schaal, W.; Karlsson, A.; Ahlsen, G.; Lindberg, J.; Andersson, H. O.; Danielson, U. H.; Classon, B.; Unge, T.; Samuelsson, B.; Hultén, J.; Hallberg, A.; Karlen, A., *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 155.
49. Park, J. D.; Kim, D. H.; Kim, S. J.; Woo, J. R.; Ryu, S. E. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5295.
50. Park, J. D.; Kim, D. H.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 2349.
51. Casini, A.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 837.
52. Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T.; Klebe, G., *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3583.
53. Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schaferb, S.; Supuran, C. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 841.
54. Ohme, R; Preuschhof, H., *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *713*, 74.
55. Danek, K. S.; Kelly D. P., *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2031.
56. Gavernet, L.; Saraví Cisneros, H.; Bruno-Blanch, L. E.; Estiú, G. L. *Theor. Chem. Acc.* **2003**, *110*, 434.
57. Mc. Dermot, S. D.; Spillane, W. J., *Org. Prep. Proc. Int.*, **1984**, *16*, 49.
58. Hanson, P. R.; Dougherty, J. M.; Probst D. A., *U.S. Patent* **2002**, 6359129.
59. Hirai, H.; Naito H.; Hara H.; Sato K., *U.S. Patent* **1984**, 4473631.
60. Dewynter, G-F; Montero J.L. C-R, *Acad. Sci. Paris Ser. II*, **1992**, *315*, 1675.
61. Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; Morere, A.; Montero, J.-L. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1227.
62. Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Montero, J.-L. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5695.
63. Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Montero, J.-L. *Phosphorus, Sulfur Silicon* **1996**, *118*, 39.
64. Dewynter, G.; Abdaoui, M.; Regainia, Z.; Montero, J.-L. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14217.
65. Regainia, Z.; Abdaoui, M.; Aouf, N. E.; Dewynter, G.; Montero, J.-L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 381.
66. Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Toupet, L.; Montero, J.-L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2427.
67. Winum, J.-Y.; Barragan, V.; Montero, J.-L. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 601.
68. Picard, J. A.; O'Brien, P. M.; Sliskovic D. R.; Anderson M. K.; Bousley R. F.; Hamelhele, K. L.; Krause B. R.; Stanfield R. L., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 6, 1243.
69. Winum, J.-Y.; Toupet, L.; Barragan, V.; Dewynter G.; Montero J.-L., *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 14, 2241.
70. Atkins, G. M.; Burgess, E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 4744

Capítulo 4

71. Atkins, G. M.; Burgess, E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6135;
72. Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 26
73. Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A.; Williams, W. M. *Org. Synth.*, **1977**, 56, 40.
74. Masui, Y.; Watanabe, H.; Masui T., *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 1853.
75. Ulrich H.; *Chem. Rev.*, **1965**, 65, 369.
76. Graf R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1968**, 7, 172.
77. Esteve C.; Vidal B., *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 1019.
78. Greene, T. W.; Wuts P. G. M.. Chapter 7: Protection for the Amino Group. En *Protective Groups in Organic Synthesis 2nd Ed.*; editorial Wiley-Interscience, USA, **1991**, 327-330.
79. Dewynter, G.; Aouf, N.; Criton M.; Montero, J.-L., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 65.
80. Dewynter, G.; Aouf, N.; Regainia Z.; Montero, J.-L., *Tetrahedron*, **1996**, 52, 993.
81. Scott, F. L.; Barry, J. A.; Spillane, W. J., *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1972**, 2666.
82. Mitsunobu, O, *Synthesis*, **1981**, 1.
83. Regainia Z.; Winum J.-Y.; Smaine F.-Z.; Toupet L.; Aouf N.-E.; Montero J.-L., *Tetrahedron*, **2003**, 59, 6051.
84. Jun J.H.; Dougherty, J.; Jiménez M. S.; Hanson P. R., *Tetrahedron*, **2003**, 59, 8901.
85. Tsunoda, T. ; Yamamiya, Y.; Itô S., *Tetrahedron letters*, **1993**, 34, 1639.
86. Simon, D.; Hosztafi, S.; Makleit, S., *J. Heterocycl. Chem.*, **1997**, 334, 349.

CAPITULO 5

EVALUACIÓN ANTICONVULSIVA Y NEUOTRÓXICA

Consideraciones generales.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica depende marcadamente de la elección de modelos biológicos apropiados, definidos en la etapa inicial de diseño de acuerdo al tipo de acción buscada.

En particular, los estudios preclínicos en animales han jugado un rol fundamental en el desarrollo de los fármacos anticonvulsivos presentes actualmente en el mercado.

Este tipo de modelos evalúan la actividad y toxicidad de nuevos candidatos, lo que permite descartarlos rápidamente si no manifiestan los efectos deseados. Además, proveen información inicial sobre la farmacocinética del compuesto y respecto al posible mecanismo por el cual actúan.

Frente a los modelos animales, los test in-vitro presentan la desventaja de no poder modelar la acción farmacodinámica de la droga estudiada, ni aseguran la

Inevitablemente, cualquier compuesto exitosamente identificado en la etapa preclínica debe ser sometido a la evaluación en humanos. Es por ello que se espera que los experimentos en animales tengan una gran capacidad predictiva respecto a la eficacia y seguridad de la droga en la etapa clínica.

Un modelo ideal de epilepsia debe ser capaz de manifestar convulsiones en el animal de experimentación en total correspondencia con las convulsiones en humanos. Esto implica una equivalencia no solo en el tipo de convulsión, sino en características como son la frecuencia, las manifestaciones observadas en el EGG y la farmacocinética del compuesto usado. No existe, hasta hoy, un modelo experimental que contemple todos estos requerimientos; aunque los test desarrollados han permitido el descubrimiento de la mayoría de las actuales drogas antiepilépticas.

Capítulo 5

Los estudios preclínicos en animales pueden clasificarse de acuerdo a dos grandes categorías:¹

- (a) modelos de ataques agudos.
- (b) modelos de epilepsia crónica.

En los test de ataques agudos, se provoca la convulsión en animales no epilépticos mediante un estímulo físico o químico. Los mas ampliamente usados son la inducción eléctrica (Maximal Electroshock Seizure test o ensayo MES) y la inducción química por administración de pentilentetrazol (ensayo PTZ o Met).

En el ensayo MES se induce el episodio convulsivo mediante la aplicación de una descarga eléctrica controlada. En el test de PTZ, este se provoca mediante la administración de un agente convulsivo: el pentilentetrazol (PTZ). En ambos casos se mide la capacidad de un fármaco, administrado previamente, de evitar la convulsión.

Por otra parte, en los modelos de epilepsia crónica se promueve que los animales manifiesten los ataques epilépticos en forma espontánea, o que sean más susceptibles al mismo. Aquí se incluyen los modelos genéticos, donde los animales poseen epilepsia congénita, capaz de asemejar la epilepsia idiopática en humanos mejor que cualquier otro modelo experimental.^{2, 3} Existen estudios que han mostrado que ciertas drogas antiepilépticas interactúan en forma distinta en presencia de disfunciones cerebrales causadas por la epilepsia que no están presentes en el cerebro normal.³ Es por eso que los modelos genéticos, junto con los experimentos de encendido de amígdala,⁴ son los mas precisos a la hora de definir un perfil preclínico. El mérito del trabajo con modelos de epilepsia crónica para la identificación de nuevos compuestos se ilustra usualmente con el descubrimiento de levetiracetam, fármaco recientemente incorporado al mercado.⁵ Este compuesto es inactivo en MES y PTZ pero es muy activo cuando se testea frente a modelos genéticos o de encendido de amígdala.⁶⁻⁹ La eficacia de este compuesto parece deberse a que actúa por un nuevo mecanismo de acción, dado que muestra un comportamiento electrofisiológico atípico relativo a las otras drogas conocidas.^{5,10-11} Los ensayos clásicos con animales no epilépticos (como MES y PTZ) fallan en la identificación de nuevos mecanismos, por lo que se dificulta el descubrimiento de drogas que actúan de forma diferente a las conocidas

Por razones prácticas, los ensayos mas usados no son modelos de epilepsia crónica. Estos son extremadamente laboriosos como para un testeo inicial, requieren mayor cantidad de recursos y demandan mucho mayor tiempo.

Por el contrario, los ensayos MES y PTZ se realizan fácilmente, requieren animales no epilépticos y un bajo costo en equipamiento. Además, estos tests proveen información valiosa respecto a la potencial actividad anticonvulsiva de un compuesto: pueden dar una idea inicial acerca de su biodisponibilidad en el sistema nervioso central y no son selectivos respecto de un único mecanismo de acción. Estos dos ensayos han jugado un rol predominante en el desarrollo de los antiepilépticos de uso en la actualidad, formando parte de los protocolos de evaluación anticonvulsiva tanto en las industrias farmacéuticas como el sector académico.¹²⁻¹⁴

Resulta ventajoso entonces evaluar primeramente los nuevos compuestos frente a MES y PTZ, para utilizar los resultados en la comparación con otras drogas de actividad conocida. Sin embargo, no existe razón para limitar la búsqueda de drogas en base a los resultados en estos tests, dado que no se puede asumir que todas las nuevas drogas anticonvulsivas deban ser activas en alguno de ellos.

La elección del ensayo biológico es importante, además, en el estudio del perfil farmacológico de los compuestos ensayados. Los resultados obtenidos deben servir para indicar en que tipo de crisis convulsivas en humanos estos serán eficaces. Merritt y Putnam identificaron la fenitoína (PHE) mediante el uso del MES test.¹⁵ Esta droga posteriormente fue exitosa en el tratamiento de convulsiones tónico-clónicas generalizadas, validando el MES como modelo para este tipo de crisis en humanos.¹⁶ Análogamente, Everett y Richards demostraron que compuestos como la trimetadiona (TM) y el fenobarbital (PB) eran capaces de proteger frente a PTZ, no así la PHE.¹⁷ Este fue el punto de partida para establecer este test como modelo de crisis de ausencias generalizadas y/o convulsiones mioclónicas en humanos.¹⁸ Las crisis epilépticas parciales no son fácilmente asociables a un modelo animal. Inicialmente se propuso que el ensayo MES podría ser indicativo de este tipo de convulsiones, pero esto fue refutado en estudios posteriores.¹⁹ Los modelos de encendido de hipocampo o de amígdala resultaron ser los mas adecuados para probar específicamente la eficacia contra este tipo de crisis.^{19, 20}

En la tabla 5.1 se comparan las respuestas frente a estos modelos experimentales y la eficacia clínica en humanos de algunas drogas antiepilépticas. Debe tenerse en cuenta que para la determinación previa del perfil farmacológico de un nuevo compuesto debe usarse más de un modelo biológico, dados los diferentes tipos de convulsiones epilépticas con los que pueden correlacionarse.

Existen otros tests pertenecientes a las dos categorías descriptas que son menos usados, como son el modelo de electroshock de 6Hz, la crisis audiogénica

en animales susceptibles, o la administración de otros agentes convulsivos.^{1, 22} Este último grupo incluye el PTZ como principal estimulante químico, pero muchos otros compuestos han sido utilizados en roedores como por ejemplo: la estriquina, la picrotoxina, la bicuculina, la pilocarpina, y el kainato.²³

Modelo experimental	Tipo de crisis en la etapa clínica		
	tónico-clónicas generalizadas	ausencias generalizadas y/o mioclónicas	parciales
MES test	CZ, PHE, VPA, PB, FLB, GBP, LAM, TOP, ZON.		
PTZ test		ESM, VPA, PB, BZD, FLB, GBP, TGB, VGB.	
Encendido de amígdala			CZ, PHE, VPA, PB, BZD, FLB, GBP, LAM, TGB, ZON, LVT, VGB.

Tabla 5.1. Comparación entre las respuestas frente a algunos modelos experimentales y la eficacia clínica en humanos de algunas drogas antiepilépticas clásicas y de segunda generación. CZ: carbamacepina, PHE: fenitoína, VPA: valproato, PB: fenobarbital, FLB: felbamato, GBP: gabapentin, LAM: lamotrigina, TOP: topiramato, ZON: zonizamid, ESM: etosuximida, BZD: benzodiazepina, TGB: tiagabina, VGB: vigabatrin, LVT: levetiracetam. Datos tomados de White.²¹

A diferencia del gran número de modelos aceptados para determinar la potencia y eficacia antiepiléptica de nuevos compuestos en la etapa preclínica, un único tipo de ensayo se utiliza habitualmente para evaluar efectos adversos en ratones. Este es el test de Rotorod, el cual mide la posible capacidad neurotóxica de la nueva droga. Recientemente se ha realizado un estudio de toxicidad mas detallado utilizando animales epilépticos,³ el cual se demostró importante cuando se evalúan los efectos adversos de compuestos con nuevos mecanismos de acción o desconocidos.

Programa de ensayos preclínicos.

Predominantemente por razones financieras, hacia 1967 muchas empresas farmacéuticas discontinuaron la búsqueda de nuevas drogas con actividad antiepiléptica (ver capítulo 2).¹⁹

Para fomentar el interés por el descubrimiento de este tipo de compuestos, tanto en el sector industrial como el académico, se desarrolló el Antiepileptic Drug Development Program (ADD).²⁴⁻²⁵ Este programa fue impulsado por el sector dedicado a la epilepsia del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NINCDS-NIH), e incluye una serie de fases experimentales destinadas a la evaluación preclínica, que se agrupan dentro del Anticonvulsant Screening Program (ASP).

En la actualidad, prácticamente todos los laboratorios en el mundo siguen los lineamientos propuestos por el ASP del ADD en la búsqueda de nuevas drogas antiepilépticas. Este consta de siete fases, las cuales han sido descritas en la tabla 5.2. La información que resulta de la aplicación de esta metodología incluye características y magnitud de la acción anticonvulsiva, de la neurotoxicidad y de la tolerancia luego de la administración repetida de la droga.

La fase 1 del programa consiste en la identificación de los compuestos con actividad significativa y baja neurotoxicidad mediante el testeo en ratones de los ensayos MES, PTZ y Rotorod (tabla 5.2). Actualmente se realiza midiendo la respuesta frente MES test a 0.5 y 4 horas, administrando el compuesto a concentraciones de 30, 100 y 300 mg/kg para cada tiempo. Se usan tres animales para las dosis de 100 mg/kg y uno para las otras. El mismo esquema se sigue para PTZ y todos los ratones usados se someten al test de Rotorod, previa y post administración del compuesto a ensayar.²⁶

De acuerdo a los resultados obtenidos los compuestos pueden clasificarse en cuatro categorías:²⁶

Clase 1: Compuestos activos a dosis de 100 mg/Kg o menos

Clase 2: Compuestos activos a dosis mayores a 100 mg/Kg

Clase 3: Compuestos inactivos a dosis inferiores a 300 mg/Kg

Clase 4: Compuestos inactivos a 300 mg/Kg y tóxicos a 30 mg/Kg o menos

De este modo aquellos compuestos que no manifiesten actividad apreciable o alta neurotoxicidad pueden descartarse rápidamente (categoría 3 y 4), mientras que las más activas (categoría 1) pasan a la siguiente fase del programa. Las drogas con actividad intermedia (categoría 2), pueden considerarse o no de acuerdo a lo novedoso de su estructura.

Capítulo 5

La fase 2 implica la cuantificación de la acción anticonvulsiva en ratones. En esta segunda etapa se determina la dosis efectiva media (ED50) en MES y PTZ. Asimismo se calcula la dosis tóxica media (TD50) y con ella el índice terapéutico (PI) que presenta el compuesto (Tabla 4.2). Para ello inicialmente se establece el tiempo de efecto máximo (TPE), el cual surge de la evaluación de la droga a distintos tiempos; generalmente a 30, 60, 120 y 240 minutos (o hasta que el tiempo de mayor actividad o neurotoxicidad haya pasado). Las dosis mencionadas en fase 2 se calculan al TPE determinado. Detalles de estos cálculos se explican mas adelante en este trabajo.

La dosis efectiva media y la dosis toxica media son parámetros muy importantes por tratarse de los indicadores mas usados en el análisis de la potencia de un compuesto en la etapa preclínica. Además permiten la comparación con los correspondientes a drogas antiepilépticas ya conocidas. Para la determinación de

En este trabajo se aplicaron las dos primeras fases de este programa para la evaluación anticonvulsiva y neurotóxica de varias sulfamidas y sus derivados sintetizados. A continuación se describen las condiciones experimentales y la metodología específica utilizada, tanto para la clasificación de los compuestos de acuerdo a la fase 1, como para el cálculo de las dosis indicadas en la fase 2 de los compuestos más activos. Las especies más promisorias se testearon frente a su capacidad de inhibir la convulsión provocada por otro agente químico, la picrotoxina (PIC). La realización de este test, no incluido en estas fases del programa, se oriento a indagar los posibles mecanismos de acción de las drogas.

En el ensayo de PIC el ataque epiléptico se induce mediante una inhibición no competitiva del receptor del ácido α -aminobutirico (GABA).²⁷ La aplicación de la picrotoxina (antagonista de este tipo de receptores) rompe el balance entre la actividad inhibitoria y excitatoria, generando un foco epileptogénico. El resultado de este test resulta valioso, ya que los datos obtenidos en las fases 1 y 2 sugirieron que los compuestos activos podrían tener asociado el bloqueo de canales de sodio como modo de acción (ver conclusiones).

	Descripción	Especie animal	Vía de admin.^a
Fase 1	Identificación del nivel de actividad anticonvulsiva y neurotóxica. ensayo MES ensayo PTZ ensayo Rotorod	ratón	i.p.
Fase 2	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica como ED50, TD50 y PI. ensayo MES ensayo PTZ ensayo Rotorod	ratón	i.p.
Fase 3	Perfil de toxicidad. LD50 HD50	ratón	i. p.
Fase 4	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva por vía oral para determinar las características de absorción y metabolismo.	ratón	p.o.
Fase 5	Diferenciación y comparación con drogas antiepilépticas conocidas para la determinación del mecanismo de acción. ensayo de umbral convulsivo por PTZ ensayo de umbral convulsivo por picrotoxina ensayo de umbral convulsivo por bicuculina ensayo de umbral convulsivo por estriquina estudios in vitro de unión a receptores	ratón	i. p.
Fase 6	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica como ED50, TD50 y PI de otras especies.	rata	p.o.
Fase 7	Estimación de la LD3 y de los efectos de administración prolongada. LD3 luego de administración diaria durante 3 días. Administración durante 5 días Ensayo de duración de sueño por hexobarbital Estudios in vitro de enzima microsomal (mutagenicidad)	rata	p.o.

Tabla 5.2. Descripción de las fases del programa ADD. ^a vía de administración: intraperitoneal (i.p.) u oral (p.o.). ED50: dosis efectiva media, TD50: dosis toxica media, PI: índice terapéutico, LD50: dosis letal media, HD50: dosis hipnótica media, LD3: dosis letal mínima. Información tomada de Porter y colaboradores²

TRABAJO EXPERIMENTAL DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA.

Animales.

Para todos los ensayos biológicos se utilizaron ratones albinos Swiss adultos (18 a 23 gr de peso) de ambos sexos (figura 5.1). Se eligieron animales de la misma edad y similar peso en cada ensayo, para minimizar la variabilidad biológica.

Los animales fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y mantenidos en el bioterio de experimentación del Área diseño de Fármacos de la Facultad de Ciencias Exactas de la misma universidad.

Se permitió que los animales se estabilizaran en el bioterio durante al menos 24-48 hs antes del ensayo biológico, para evitar la influencia en el mismo del estrés que sufren durante el traslado y cambio de habitat. Para esto se los colocó en una habitación exclusiva para la mantenimiento de ratones, diferente a la de ensayos biológicos. En esta etapa se mantuvieron en jaulas colectivas de hasta 12 animales, con alimento balanceado y agua ad-libitum (figura 4.2), bajo un régimen de ciclos día-noche. Los animales se separaron en estas jaulas por sexo y por peso.

Los ensayos se realizaron siempre a la misma hora del día. Los ratones seleccionados, que se utilizaron por única vez, se trasladaron a la sala de ensayos biológicos y se aislaron en compartimientos individuales (figura 5.2).



Figura 5.1. Tipo de animal usado en los ensayos.



Figura 5.2. Jaulas colectivas (izquierda) e individuales (derecha,) utilizadas antes y durante los ensayos, respectivamente.

Luego del test, los animales se colocaron nuevamente en jaulas colectivas y se mantuvieron en observación durante 72 horas para detectar posibles efectos tóxicos que ocasionen la muerte.

Soluciones a ensayar: preparación y administración.

Para una correcta evaluación de los compuestos, estos deben administrarse a los animales en una solución, suspensión o emulsión homogénea. Para ello se acepta la disolución de las drogas en solución fisiológica, metilcelulosa, ciclodextrina y polietilenglicol 400 (PEG 400), de acuerdo a su solubilidad.^{25,28}

Los compuestos ensayados en este trabajo no son solubles en agua, por lo que se prepararon soluciones con PEG 400. Se considera que este agente no interfiere en los resultados biológicos.^{25,29} Cuando la solubilidad lo permitió, se utilizaron mezclas de PEG 400 y agua.

El programa de ADD recomienda que los solventes usados no superen en concentración a un cuarto de su dosis letal media (LD50).²⁹ Esto equivale a un máximo de 3 ml/Kg cuando se emplea PEG 400 solo, o proporciones no mayores a 30% PEG y 70% de agua. Es por eso que los volúmenes de solución administrada variaron entre 3 y 10 ml/Kg, de acuerdo a la relación de PEG 400/agua utilizada (la cual depende de la solubilidad de la sustancia a ensayar).

Inicialmente los compuestos, que son sólidos, se pulverizaron mediante el uso de espátula o mortero. Posteriormente se agregó la cantidad de PEG 400 admitida y se sometió la mezcla a ultrasonido durante 20 minutos. Cuando no se vio disolución completa luego de este proceso, se repitió el sonicado calentando a 37°C. Si no se observó una solución límpida o una suspensión homogénea, se consideró al compuesto insoluble a esa concentración y no se evaluó a esa dosis.

En los casos en que la disolución fue posible, se incorporó agua hasta observar opalescencia (teniendo en cuenta no exceder el máximo admitido) y se aplicó ultrasonido durante 20 minutos. Nuevamente se calentó y sonicó cuando no se observó homogeneidad en la mezcla. En algunas sustancias, la adición de una gota de agua generó una opalescencia que no fue posible eliminar mediante el procedimiento descrito. En esos casos se volvió a preparar la solución solo con PEG 400 y no se agregó agua.

Para el cálculo de los volúmenes de inyección para cada ratón se tuvieron en cuenta tanto el peso de cada animal, como las proporciones de PEG y agua utilizadas. Los valores oscilaron entre 0.05 y 0.23 ml, y se aplicaron por medio de jeringas graduadas al 0.01 de ml.

Capítulo 5

Se emplearon dos vías para la administración de las drogas, la intraperitoneal (i.p.) y la subcutánea (s.c.). La primera se utiliza en general tanto para la administración de agentes anticonvulsivos como convulsivos; mientras que la segunda se usa solo para convulsivos (figura 5.3).

En este trabajo las drogas a ensayar se administraron vía i.p. y los agentes convulsivos mediante inyección s.c..

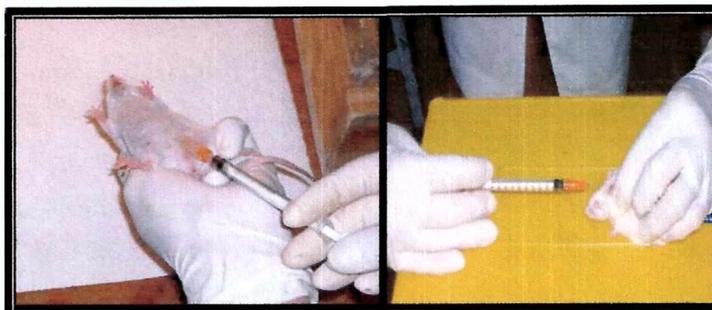


Figura 5.3. Vías de administración utilizadas: intraperitoneal (izquierda) y subcutánea (derecha).

La inyección vía i.p. se realizó en el abdomen del ratón utilizando agujas del tipo 27G 1/2 para soluciones, y 25G 5/8 para suspensiones o emulsiones. Estas deben formar un ángulo de 30° con el plano del cuerpo del animal durante la aplicación y al retirarla se presiona suavemente con un algodón para verificar posibles pérdidas de volumen administrado o sangrado.

La vía s.c. implica la inyección en un pliegue suelto de la piel de la línea media de la nuca del ratón mediante agujas del tipo 27G 1/2. Debe controlarse visualmente que no haya pérdidas de la solución de la droga.

Ensayo MES.

Como se detalló anteriormente, en este ensayo debe inducirse la convulsión mediante una descarga eléctrica controlada. Es por eso que inicialmente se administró el compuesto a ensayar al ratón y, al tiempo estipulado en el ensayo, se produjo el estímulo eléctrico. Se midió entonces la capacidad de la droga de prevenir la descarga convulsiva.

El equipo utilizado fue diseñado y construido especialmente en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata. Es un generador de pulsos de corriente desarrollado en base al aparato más usado actualmente para este

tipo de experimentos: la unidad ECT*, y que sigue los lineamientos planteados en el diseño original de este tipo de dispositivos.³⁰

Los parámetros a fijar en el equipo son: la corriente a aplicar, la frecuencia del estímulo, la duración total de la descarga y el ancho de pulso de corriente. Estos valores se eligieron de acuerdo a lo que establece la literatura como parámetros típicos a utilizar con ratones para provocar una convulsión máxima.¹⁶ Esto significa: una corriente de 50 mA, con una frecuencia de 60Hz, durante 0.2 seg y con un ancho de pulso de 2.8 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.

La descarga eléctrica llega al animal a través de electrodos (figura 4.4). En este trabajo se emplearon electrodos de oreja que, junto con los electrodos corneales, son los más usados para este tipo de ensayos. Para asegurar el contacto y favorecer la conducción eléctrica, estos se humedecieron con solución fisiológica en la zona de contacto con la oreja del ratón.

Como se describe en la literatura,¹⁶ se consideró que la droga protegió frente a MES cuando en el ensayo no se observó convulsión máxima luego del estímulo. Una convulsión máxima provocada por este equipo implica 3 fases que incluyen una flexión tónica por un corto tiempo, seguida de un período mas largo de extensión tónica y finalmente un episodio clónico (figura 5.4).¹⁶ Si en el test no se produce la extensión tónica de los miembros posteriores, se considero protección. Esto es, se entiende que hay supresión de esta fase si la extensión tónica no es mayor a 90 grados con respecto al eje del cuerpo del animal.

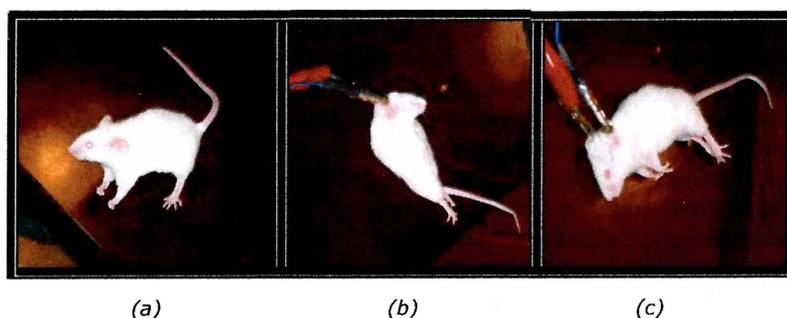


Figura 5.4. Fases de la convulsión máxima: (a) flexión tónica, (b) extensión tónica y (c) fase clónica. En la figura también se observan los electrodos de oreja empleados en el ensayo.

Ensayo PTZ.

* Electro Convulsive Treatment: Unidad de Tratamiento Electroconvulsivo. Ugo Basile-Biological Research Apparatus, Varese, Italia.

Capítulo 5

En este ensayo se induce la convulsión mediante la administración de un agente convulsivo como es el PTZ.

El test utiliza una dosis de PTZ correspondiente a la dosis convulsiva 97 (CD97), es decir, la concentración que produce espasmos clónicos en el 97% de los animales normales durante un período mayor a 5 segundos. Estas crisis pueden finalmente conducir a un episodio tónico clónico.^{16,24} Para los ratones usados el valor de CD97 es de 85 mg/Kg.^{16,24}

Se administro el PTZ con solución fisiológica al 9%, considerando una concentración 5 ml/Kg. Se determinó este valor en nuestro laboratorio por observar que la inyección de mayores volúmenes aumenta la probabilidad de derramamiento al retirar la aguja. Mediante el testeado con drogas de actividad conocida, se comprobó que con esta concentración se reproducen los valores reportados en literatura.

La solución se preparo en el momento en un frasco opaco para evitar fotodegradación del compuesto. La administración fue en forma s.c., la mas usada para este agente, aunque existen trabajos donde se emplea vía i.p.³¹ o intravenosa (i.v.).³²

Inicialmente se inyecto el compuesto a ensayar al ratón y, al tiempo determinado para el ensayo, se administro una solución de PTZ para inducir la convulsión. Se midió entonces, para la droga a ensayar, la capacidad de elevar el umbral convulsivo del PTZ. Para esto se observaron los animales durante los 30 minutos posteriores a la inyección de PTZ. La ausencia de espasmos clónicos sostenidos al menos durante 5 segundos dentro del período de observación se consideró protección frente a este test.

Ensayo PIC.

Como en el ensayo PTZ, en este test se induce la crisis convulsiva mediante la administración de un convulsivante químico, la PIC. En este caso la CD97 corresponde a un valor de 3.15 mg/Kg. La dosis se administro en solución fisiológica al 9% en una concentración de 10 ml/Kg según lo descrito en literatura.³³

Inicialmente se inyecto la droga a ensayar al ratón y, al tiempo determinado para el ensayo, se administro una solución de PIC vía s.c. para inducir la convulsión. Posteriormente se evaluó la capacidad de la droga a ensayar de elevar el umbral convulsivo de PIC, mediante la observación de los animales durante los 45 minutos posteriores su inyección. El tiempo de observación es mayor debido a la absorción más lenta relativa al PTZ. La ausencia

de episodios convulsivos clónicos dentro del período de observación se consideró protección frente a este test.

Ensayo de Rotorod

La toxicidad inducida por los compuestos a ensayar se midió mediante el uso del ensayo de Rotorod. Se busca detectar efectos neurotóxicos que se manifiestan como sedación o ataxia.

Un ratón normal situado en un cilindro que gira a 6 r.p.m. puede mantener el equilibrio durante un período prolongado de tiempo. Teniendo en cuenta esto, este ensayo mide la capacidad del animal de mantener una caminata en el cilindro giratorio durante 1 minuto durante 3 instancias sucesivas.²⁴

En el test se utilizó un aparato construido especialmente en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata (figura 5.5), en analogía con el diseñado por Dunham y Miya³⁴ y con el equipo Rota-Rod treadmill for mice.* El equipo consiste en un cilindro estriado de 3 cm de diámetro capaz de girar a una determinada velocidad, que puede graduarse en forma continua.

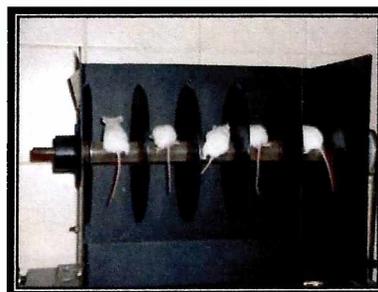


Figura 5.5. Aparato de Rotorod.

Los ratones se ubican en el cilindro en movimiento, separados por paneles circulares. Los animales que no mantienen el equilibrio caen en una bandeja

*Ugo Basile – Biological Research Apparatus, Varese, Italia.

a la administración de las drogas a evaluar, a fin de verificar el estado de los animales. Se repite la misma evaluación, posterior a la administración del compuesto a evaluar y previo a la inducción convulsiva, con el objeto de verificar si se ha producido una depresión del sistema nerviosos central (ataxia).

Fase 1. Identificación de la acción anticonvulsiva y neurotóxica de sulfamida y derivados.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos mediante la evaluación biológica frente a los ensayos MES, PTZ y Rotorod de los compuestos sintetizados, correspondientes a la primera fase del programa ADD.²⁴

En MES y PTZ los resultados de actividad se expresan como la relación entre el número de animales que son protegidos respecto al número de animales totales usados en el ensayo:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{número de animales protegidos}}{\text{número total de animales}}$$

En Rotorod los resultados se formulan en función de la toxicidad de la droga; que es la relación entre el número de animales que caen del cilindro respecto al número de animales totales usados en el ensayo:

$$\text{Toxicidad} = \frac{\text{número de animales que caen}}{\text{número total de animales}}$$

Siguiendo los lineamientos del programa ADD,²⁴ se midió la respuesta frente a estos tests luego de 0.5 y 4 hs de administrado el compuesto; a concentraciones de 30, 100 y 300 mg/kg para cada tiempo. Tanto los ensayos como la administración se realizaron de la forma previamente detallada. Se efectuó una única modificación al programa relacionada con el número de animales utilizados. El uso de un animal para el testeo a dosis de 30 y 300 mg/Kg se considero insuficiente para obtener resultados confiables. Al tratarse del ensayo inicial para la detección de actividad de compuestos, que es el que determina si se continúa la evaluación del mismo, el uso de un único animal puede no ser significativo. Buscando un resultado mas seguro, se utilizaron generalmente 3 ratones por dosis en el ensayo MES.

En el ensayo PTZ, se utilizaron 2 ratones por dosis. Esto se fundamenta en la experiencia recabada en nuestro laboratorio, que muestra que este test es muy concluyente y a la vez muy cruento. Una vez administrado el PTZ, si la droga testada no es efectiva, el animal comienza a sufrir episodios convulsivos rápidamente y estos duran mucho tiempo (generalmente más de media hora). En base a esto se eligió trabajar con dos ratones por dosis en esta fase.

Todos los ratones usados en MES y PTZ fueron previamente sometidos al test de Rotorod para cada tiempo y dosis. Con esta información se evaluó la neurotoxicidad, dado que este ensayo es independiente del test al que preceden.

En la tabla 5.3 se expresan los datos obtenidos en esta etapa de evaluación, incluyéndose la clasificación de los compuestos de acuerdo a la actividad observada. No se ensayo la N,N'-sulfonil bis-L-Prolina dibencilester (6b) por su rápida descomposición a temperatura ambiente. En otros casos (1a, 2a, 4a

y 5a) no fue posible completar el análisis por problemas de solubilidad que imposibilitaron la obtención de soluciones, emulsiones o suspensiones homogéneas en los preparados a altas concentraciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se identificaron 11 compuestos activos, de los cuales 8 corresponden a clase 1 en MES test. Esta clase comprende a las especies con mayor actividad antiepiléptica: 1a, 2a, 4a, 8b, 9b, 18f, 19f, 21f; que presentan protección a dosis de 100 mg/Kg o menores.

En cuanto al ensayo PTZ, las moléculas no mostraron actividad a las dosis y tiempos ensayados.

El compuesto 19f presentó neurotoxicidad aun a las menores dosis ensayadas. La administración de este compuesto generó por sí misma convulsiones en los ratones a 300 mg/Kg.

Si bien la clasificación expuesta considera promisorios compuestos activos en dosis hasta 100 mg/kg, en este trabajo se eligieron solo las moléculas muy activas frente a MES test (a 30 mg/Kg) e inactivas frente a PTZ a las dosis ensayadas. Esta decisión se orienta a limitar la búsqueda a compuestos con marcada actividad, de elección frente a las drogas antiepilépticas actuales. Por lo tanto, los compuestos elegidos para la siguiente fase son: 1a, 2a, 4a y 18f.

Compuesto	clase en test MES	Dosis (mg/Kg)	Test MES		Test PTZ		Test Rotorod	
			0.5 h	4 h	0.5 h	4 h	0.5 h	4 h
1a	1	30	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	2/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	nt	nt	nt	nt	nt	nt
2a	1	30	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	3/4	0/4	0/2	0/2	0/6	0/6
		300	nt	nt	nt	nt	nt	nt
3a	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/4	0/2	0/7	0/5
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
4a	1	30	1/3	0/3	0/3	0/3	0/6	0/6
		100	3/3	0/3	0/3	0/3	0/6	0/6
		300	nt	nt	nt	nt	nt	nt
5a	-	30	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8	0/8
		100	0/4	0/4	0/4	0/4	0/8	0/8
		300	nt	nt	nt	nt	nt	nt
7b	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/4	0/4	0/4	0/3	0/8	0/7
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
8b	1	30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6	0/6
		100	1/4	0/3	0/3	0/3	0/7	0/6
		300	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
9b	1	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	1/4	0/4	0/2	0/2	0/6	0/6

		300	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
10c	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/3
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
11c	2	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
12d	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
13d	2	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
14d	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
15e	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3
16e	2	30	0/4	0/3	0/2	0/2	0/4	0/3
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3
		300	0/3	1/3	0/2	0/2	0/3	0/3
17e	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
18f	1	30	1/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	3/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	3/3	3/3	0/2	0/2	5/5	0/5
19f	1	30	0/3	0/3	0/2	0/2	5/5	0/5
		100	0/3	1/3	0/2	0/2	5/5	0/5
		300	0/0 ^a					
20f	3	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	0/2	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
21f	1	30	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	1/3	1/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		300	1/2	2/3	0/2	0/2	0/5	0/5

Tabla 5.3. Evaluación farmacológica de los compuestos sintetizados, según lo determinado para la fase 1 del programa ADD. nt: no testeado por problemas de solubilidad. ^apresentan convulsión tónico-clónica con la sola administración de la droga, por lo que no pudieron testearse.

Fase 2. Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica.

Para la determinación cuantitativa de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica, se calcularon inicialmente los tiempos de efecto máximo de las drogas (TPE). De acuerdo a las etapas del programa ADD, cada compuesto debe ensayarse a distintos tiempos frente a los tests de MES, PTZ y Rotorod; a fin de determinar el momento de mayor actividad o neurotoxicidad. Generalmente los TPE son coincidentes, es decir que los picos de máxima acción anticonvulsiva y neurotóxica se alcanzan simultáneamente. El TPE en MES test se determinó mediante la evaluación de cada compuesto a diferentes tiempos, graficando la respuesta en función del mismo. Se emplearon al menos 4 animales por tiempo. Una vez graficado, se determinó el TPE por inspección visual. Definido este, se procedió a la determinación de la ED50. Se emplearon grupos de

aproximadamente 6 ratones por dosis. Las dosis se calcularon de modo de tener al menos 4 puntos comprendidos entre ausencia de protección y protección total.

Los resultados se analizaron mediante el método estadístico de Litchfield y Wilcoxon.³⁵ Este procedimiento es el más usado debido a su alta capacidad de respuesta en experimentos biológicos de tipo dosis-efecto.

Los datos experimentales se cuantifican como % de protección, que es la relación porcentual entre el número de animales que son protegidos respecto al número de animales totales:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\text{número de animales protegidos}}{\text{número total de animales}} \cdot 100$$

Estos valores se convierten en probits³⁶ y se grafican en función del logaritmo de la dosis. Se elige la recta más adecuada y se interpola a probit 5, que es el valor de la ED50. El peso estadístico de la función propuesta se evalúa en base a los valores esperados y observados, obteniendo un valor de $(\text{Chi})^2$ para la recta. Se considera que los datos no son significativamente heterogéneos si la suma de los valores de $(\text{Chi})^2$ para cada dosis no sobrepasa un límite que depende de los grados de libertad del sistema.

Se define, además, una función pendiente (S). Esta incluye las concentraciones que predice la recta a fin obtener un % actividad de 16%, de 50% y de 84% (ED16, ED50 y ED84 respectivamente):

$$S = \frac{1}{2} \cdot (\text{ED84}/\text{ED50} + \text{ED50}/\text{ED16})$$

Para el cálculo del intervalo de confianza de la ED50 debe tenerse en cuenta el valor obtenido para S, el número de dosis y la cantidad de animales testeados involucrados en los puntos que caen dentro de los valores esperados de probit entre 4 y 6. También puede calcularse un intervalo de confianza para S, el cual depende de los parámetros anteriores así como de la relación entre la dosis más alta y la más baja usadas. Detalles estadísticos y la deducción completa de las fórmulas usadas en este método pueden encontrarse en literatura.³⁵

Los compuestos elegidos no resultaron activos frente a PTZ a las dosis ensayadas, en acuerdo con lo observado en fase 1, por lo que no se continuó en fases posteriores.

Capítulo 5

El cálculo de la TD50 solo pudo realizarse para 18f, dado que los otros compuestos de mayor actividad (1a, 2a y 4a) no presentaron este tipo de efecto en los ensayos preliminares, y no son solubles a dosis mayores.

Este cálculo se realizó en forma equivalente al de ED50. En este caso los datos que se convierten a probit son los % de toxicidad, que es la relación porcentual entre el número de animales que caen del cilindro en el test respecto al número de animales totales del ensayo:

$$\% \text{ Toxicidad} = \frac{\text{número de animales que caen} \cdot 100}{\text{número total de animales}}$$

Con los datos de TD50 y ED50 pueden calcularse el índice terapéutico (PI), que se expresa como el cociente entre estos dos últimos valores:

$$\text{PI} = \frac{\text{TD50}}{\text{ED50}}$$

Por lo explicado anteriormente, la TD50 y, por lo tanto el PI, pudo determinarse solo para el compuesto 18f. En el resto de los casos solo se informan los porcentajes de neurotoxicidad encontrados a las dosis más altas ensayadas, y con estos datos se definen cotas inferiores para los valores de PI. A continuación se detallan los cálculos realizados para cada compuesto. Para ello se muestran las curvas que determinaron los TPE y los porcentajes de protección o toxicidad que se utilizaron. Los valores de ED50 se expresan en micromoles por kilo de ratón ($\mu\text{mol/kg}$), a fin de facilitar las comparaciones.

N, N'-dibutilsulfamida (1a)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo (figura 5.6) utilizando una dosis de 73 mg/Kg para la evaluación, con 4 ratones para cada tiempo. TPE encontrado: **2 hs**.

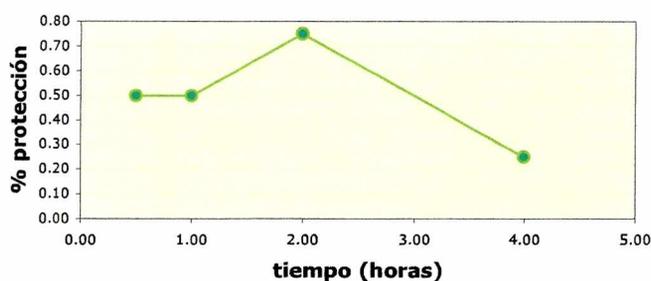


Figura 5.6. Estimación del tiempo de efecto máximo para la *N,N'*-dibutilsulfamida.

La potencia anticonvulsiva se cuantificó entonces a 2 hs frente al ensayo MES, midiendo el porcentaje de protección a 5 dosis distintas (tabla 5.4).

Dosis [$\mu\text{mol/Kg}$]	Tiempo [hs]	Animales protegidos/totales	% protección
200	2	1/6	16.7
250	2	2/6	33.3
300	2	2/6	33.3
350	2	3/4	75.0
400	2	5/6	83

Tabla 5.4. Resultado de la actividad anticonvulsiva de la *N,N'*-dibutilsulfamida en el ensayo MES.

Con estos valores se realizó el análisis estadístico de los datos, obteniéndose una **ED50 = 295 [246-355] $\mu\text{mol/kg}$** y $S = 1.42 [1.02-1.97]$. Esta dosis efectiva media es equivalente a **61.4 mg/Kg**.

N, N'-diclohexilsulfamida (2a)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo en MES test (figura 5.7) utilizando una dosis de 78 mg/Kg para la evaluación, con 4 ratones para cada tiempo. En este caso se midió también a 15 minutos, para corroborar que el TPE es media hora. TPE encontrado: **0.5 hs**.

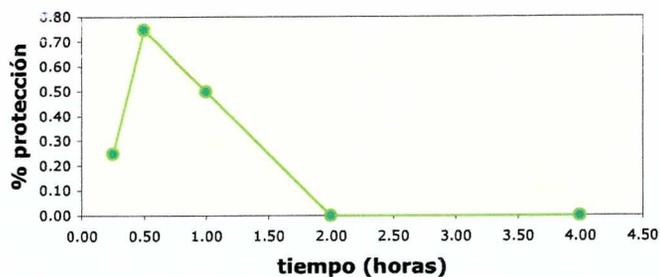


Figura 5.7. Estimación del tiempo de efecto máximo en MES test para la *N,N'*-dichlohexilsulfamida

Los resultados de la medida de la potencia anticonvulsiva a media hora se expresan en la tabla 5.5, realizada para 4 dosis diferentes.

Dosis [μ mol/Kg]	Tiempo [hs]	Animales protegidos/totales	% protección
75	0.5	1/5	20
100	0.5	2/6	33.3
200	0.5	4/6	66.7
300	0.5	3/4	75

Tabla 5.5. Resultado de la actividad anticonvulsiva de la *N,N'*-dichlohexilsulfamida en el ensayo MES.

Con estos valores se realizó el análisis estadístico de los datos, obteniéndose una **ED50= 151 [91-253] μ mol/kg** y **S = 2.44 [0.93-6.37]**. Esta dosis efectiva media es equivalente a **39.3 mg/Kg**.

N, N'-dibencilsulfamida (4a)

Se realizó la grafica para la determinación del tiempo de efecto máximo en MES test (figura 5.8). Se utilizo una dosis de 83 mg/Kg para la evaluación y se utilizaron 4 ratones para cada tiempo. TPE encontrado: **2 hs**.

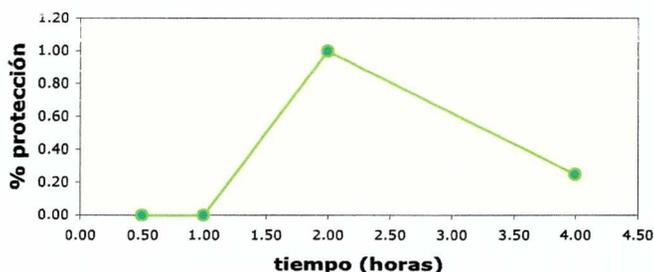


Figura 5.8. Estimación del tiempo de efecto máximo en MES test para la *N,N'*-dibencilsulfamida.

Se efectuó entonces la medida de la potencia anticonvulsiva a 2 hs. Para ello se midió el porcentaje de protección a 4 dosis diferentes (tabla 5.6).

Dosis [$\mu\text{mol/Kg}$]	Tiempo [hs]	Animales protegidos/totales	% protección
100	2	1/6	16.7
200	2	2/6	33.3
250	2	2/6	33.3
300	2	4/5	83.3

Tabla 5.6. Resultado de la actividad anticonvulsiva de la *N,N'*-dibencilsulfamida en el ensayo MES.

Con estos valores se realizó el análisis estadístico de los datos, obteniéndose una **ED50=238 [153-371] $\mu\text{mol/kg}$** y $S = 2.15 [0.43-10.8]$. Esta dosis efectiva media es equivalente a **65.7 mg/Kg**.

Bencilsulfamida (18f)

Se realizó la gráfica para la determinación del tiempo de efecto máximo en el ensayo MES (figura 5.9). Se utilizó una dosis de 50 mg/Kg para la evaluación y se utilizaron 4 ratones para cada tiempo. En este caso se midió también a 15 minutos, para corroborar que el TPE es media hora. TPE encontrado: **0.5 hs**.

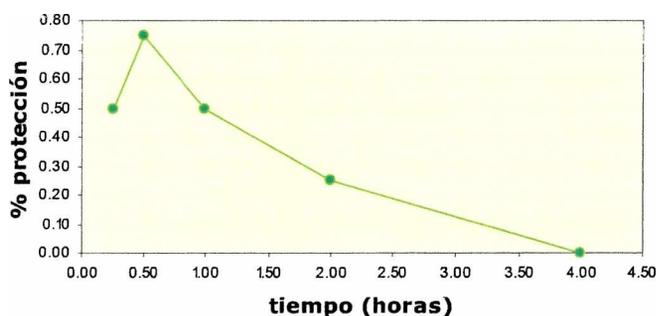


Figura 5.9. Estimación del tiempo de efecto máximo en el ensayo MES para la bencilsulfamida.

La potencia anticonvulsiva se cuantificó entonces a media hora frente al ensayo MES, midiendo el porcentaje de protección a 4 dosis distintas (tabla 5.7).

Dosis [$\mu\text{mol/Kg}$]	Tiempo [hs]	Animales protegidos/totales	% protección
108	0.5	1/6	16.7
215	0.5	1/6	16.7
269	0.5	3/4	75.0
430	0.5	5/6	83.3

Tabla 5.7. Resultado de la actividad anticonvulsiva de la bencilsulfamida en el ensayo MES.

Con estos valores se realizó el análisis estadístico de los datos, obteniéndose una **ED50= 239 [156-367] $\mu\text{mol/kg}$** y $S = 1.93 [1.06-3.50]$. Esta dosis efectiva media es equivalente a **44.5 mg/Kg**.

Como se procede generalmente, se considero el tiempo de efecto máximo del MES test para la determinación de la TD50. En este caso se utilizaron 3 ratones por dosis y se midió a 4 concentraciones diferentes (Tabla 5.8) a media hora.

Dosis [$\mu\text{mol/Kg}$]	Tiempo [hs]	Animales caídos/totales	% protección
1075	0.5	0/3	0
1344	0.5	1/3	33
1505	0.5	2/3	66
1613	0.5	3/3	100

Tabla 5.8. Resultado de la actividad neurotóxica de la bencilsulfamida en el ensayo Rotorod.

Como se obtuvieron resultados de 0 y 100 % de neurotoxicidad, se corrigieron estos valores según lo indicado en el método estadístico de Litchfield y Wilcoxon.³⁵

Finalmente se calculo una **TD50= 1422 [1227-1649] $\mu\text{mol/kg}$** equivalente a **265 mg/Kg**.

Resultados obtenidos en fase 2.

En la tabla 5.9 se resumen los resultados de los análisis provenientes de la aplicación de la fase 2 del programa ADD a los compuestos que resultaron más promisorios en fase 1.

Compuesto	MES test		Rotorod test		PI	PTZ test	
	TPE [hs]	ED50 [$\mu\text{mol/Kg}$]	TPE [hs]	TD50 [$\mu\text{mol/Kg}$]		TPE [hs]	ED50 [$\mu\text{mol/Kg}$]
1a	2	295	-	0% (481)	>1.6	-	0% (481)
2a	0.5	151	-	0% (385)	>2.5	-	0% (385)
4a	2	238	-	0% (362)	>1.5	-	0% (362)
18f	0.5	239	2	1422	5.9	-	0% (1613)

Tabla 5.9. Resultado de los análisis provenientes de la aplicación de la fase 2 del programa. Se colocan entre paréntesis las máximas dosis ensayadas cuando se observa inactividad.

Ensayos con PIC

Las moléculas 1a, 2a y 4a fueron ensayadas frente al test de PIC, al tiempo de efecto máximo encontrado para MES test y con una dosis equivalente a la ED50 encontrada para este ensayo. Se utilizaron 6 ratones en cada experimento. Los resultados mostraron inactividad en los tres casos.

Referencias del capítulo 4.

1. Rogawski, M. A., *Epilepsy Res.* **2006**, 68: 19.
2. Goldstein, A.; Aronow, L.; Kalman, S., En: *Principles of drug Action: The basis of Pharmacology*; 2nd Ed.; J. Wiley & Sons, New York, **1974**, 449-70.
3. Klitgaard H.; Matagne A.; Lamberty Y., *Epilepsy Res.*, **2002**, 50, 55.
4. Goodard, G. V.; McIntyre D. C.; Leech, C. K., *Exp. Neurol.*, **1969**, 25, 295.
5. Bialer M.; Johannessen S. I.; Kupferberg H. J.; Levy R. H.; Perucca E.; Tomson T., *Epilepsy Research*, **2004**, 61, 1.
6. Löscher W.; Honack D., *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, 232, 147.
7. Klitgaard H.; Matagne A.; Gobert J., Wulfert E., *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**, 353, 191.
8. Klitgaard H., *Epilepsia*, **2001**, 42 (suppl. 4), 13.
9. Matagne A.; Klitgaard H., *Epilepsy Res.* **1998**, 31, 59.
10. Niespodziany I.; Klitgaard H., Margineanu D. G., *Neurosci. Lett.* **2001**, 306, 5.
11. Klitgaard H., *Acta Neurol. Scand.*, **2005**, 112 (suppl. 181), 68.
12. White H. S.; Woodhead J. H.; Franklin M. R.; Swinyard E. A.; Wolf H. H., General principles: experimental selection, quantification, and evaluation of antiepileptic drugs. En *Antiepileptic drugs*, 4th Ed; Levy R. H., Mattson R. H., Meldrum B. S., eds., Raven Press Ltd, New York, **1995**, 99-110.
13. White H. S., Mechanism of antiepileptic drugs. En *Epilepsies II*, Porter R., Chadwick D., eds. Butterworth-Heinemann, Boston, **1997**, 1.
14. White H. S.; Woodhead J. H.; Wilcox K. S.; Stables J. P.; Kupferberg H. J.; Wolf H. H., Discovery and preclinical development of antiepileptic drugs. En *Antiepileptic drugs*, Levy R. H., Mattson R. H., Meldrum B., Perucca E., eds. Lippincott, Philadelphia, **2002**, 36.
15. Putnam T. J.; Merrit G. H., *Science*, **1937**, 85, 525.
16. Fisher, R. S., *Brain Research Reviews*, **1989**, 14, 245.
17. Richards R. K.; Everett G. M., *Federation Proceedings*, **1944**, **3**, 39.

Capitulo 5

18. Löscher, W.; Schmidt, D., *Epilepsy Res.*, **1988**, 2, 145.
19. Löscher, W.; Schmidt, D., *Epilepsy Res.*, **1994**, 17, 95.
20. Löscher, W., *Epilepsy Res.*, **2002**, 50, 105.
21. White, H. S., *Epilepsia*, **2003**, 44 (suppl. 7), 2.
22. Barton, M. E.; Klein, B. D.; Wolf H. H., White S., *Epilepsy Res.*, **2001**, 47, 217.
23. Edafiogo, I. O.; Scott, K. R., Chapter 39: Anticonvulsants. En: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th Ed. Vol3: *Therapeutic Agents*; Wolff M., eds., John Wiley & Sons Inc., **1996**, 175-254.
24. Stables, J. P.; Kupferberg H. J., Chapter 16: The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. En *Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*; Avanzani, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P.; Avoli, M., eds., John Libbey & Company Ltd, **1997**, 191-198.
25. Porter, R. J.; Cereghino, J. J.; Gladding, G. D.; Hessie, B. J.; Kupferberg H. J., Scoville, B.; White, B. G., *Clev. Clin. Q.*, **1984**, 51, 293.
26. Malawska B.; Kulig, K.; Spiewak A.; Stables, J. P., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 625.
27. Loscher, W., GABA and the Epilepsies. Experimental and Clinical Considerations. En *GABA. Basic Research and Cellular Applications*, Bowery, N.G.; Nisticó, G., eds.; Pythagora Press: Rome **1989**, 260-300.
28. Swynyard, E. A.; Woodhead, J. H.; White, H. S.; Franklin, M. R., Chapter 5: Experimental Selection, Quantification, and Evaluation of anticonvulsant. En *Antiepileptic Drugs*, 3rd Ed., Levy, R.; Mattson, R.; Meldrum B.; Penry, J. K.Dreifuss, F. E., eds., Raven Press Ltd, New York, **1989**, 85-102.
29. Bartsch, W.; Sponer, G.; Dietmann, K.; Fuchs, G., *Arzneimittel Forschung (Drug Research)*, **1976**, 26, 1581.
30. Woodbury, L. A.; Davenport, V. D., *Arch. Int. Pharmacodyn*, **1952**, XCII, 97.
31. Stone, W. E., *Pharmacology*, **1970**, 3, 367.
32. Little, H. J.; Nutt, D. J.; Taylor, S. C., *Br. J. Pharmacol.*, **1986**, 88, 326.
33. Foye, W. O., Anticonvulsant. En *Principles of Medicinal Chemistry*, 3rd Ed. Foye W. O., eds, Lea & Febiger, Philadelphia, **1989**, 173-188.
34. Dunham, N. M.; Miya, T. S., *J. Am. Pharmaceut. Assoc.*, **1957**, 46, 3.
35. Litchfield, J. T.; Wilcoxon, F., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **1949**, 96, 99.

CAPITULO 6

RESULTADOS

Análisis SAR de los compuestos evaluados.

Según se explico anteriormente, los resultados obtenidos en el modelo CoMFA fueron usados para el diseño de nuevos prototipos activos. La información derivada de ese análisis mostró que los efectos estericos influyen en la actividad más intensamente que los electrónicos (contribuciones de un 67% y 33% respectivamente - ver capitulo 3). El estudio comparativo permitió identificar una región del espacio conveniente de ser ocupada por grupos voluminosos, la cual fue incorporada al patrón farmacofórico (figura 6.1).

El farmacóforo identificado muestra características electrónicas y estructurales 3D claramente definidas, pero independientes de la identidad de los átomos que la componen. Esto posibilita la búsqueda de compuestos funcionalmente diferentes a los que generaron el modelo, con la única condición de satisfacer los requisitos planteados.

Una vez definida la orientación espacial de los grupos no polares, se utilizo el concepto de bioisosterismo para elegir una nueva función, sulfamida, capaz de constituir una nueva cabeza polar para el farmacóforo (átomos 1 a 3 en figura 6.1). Se diseñaron compuestos que contengan este grupo funcional y cumplan con los requisitos impuestos. Estos compuestos definen un conjunto de sulfamidas que presentan cadenas aromáticas y alifáticas (lineales y cíclicas); y pueden incluir, o no, aminoácidos esterificados en su estructura. De este modo la porción polar del farmacóforo esta presente en todos los compuestos (mediante la función sulfamida). La presencia de esta agrupación no asegura, sin embargo, el cumplimiento de los otros requerimientos

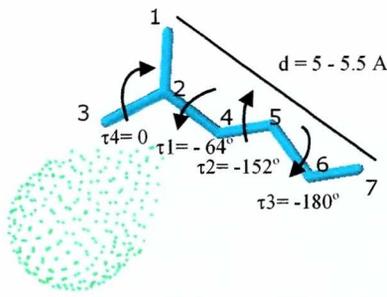


Figura 6.1. Farmacóforo propuesto derivado del modelo CoMFA.

Los requerimientos espaciales de la porción no polar están especificados por los ángulos τ_1 a τ_3 (átomos 5 a 7 de la figura 6.1). Estos ángulos pueden alcanzar los valores óptimos en los compuestos 1a, 4a, 8b, 9b, 10c, 11c, 13d, 15e, 16e, 17e, 18f, 19f, 20f y 21f (figura 6.2).

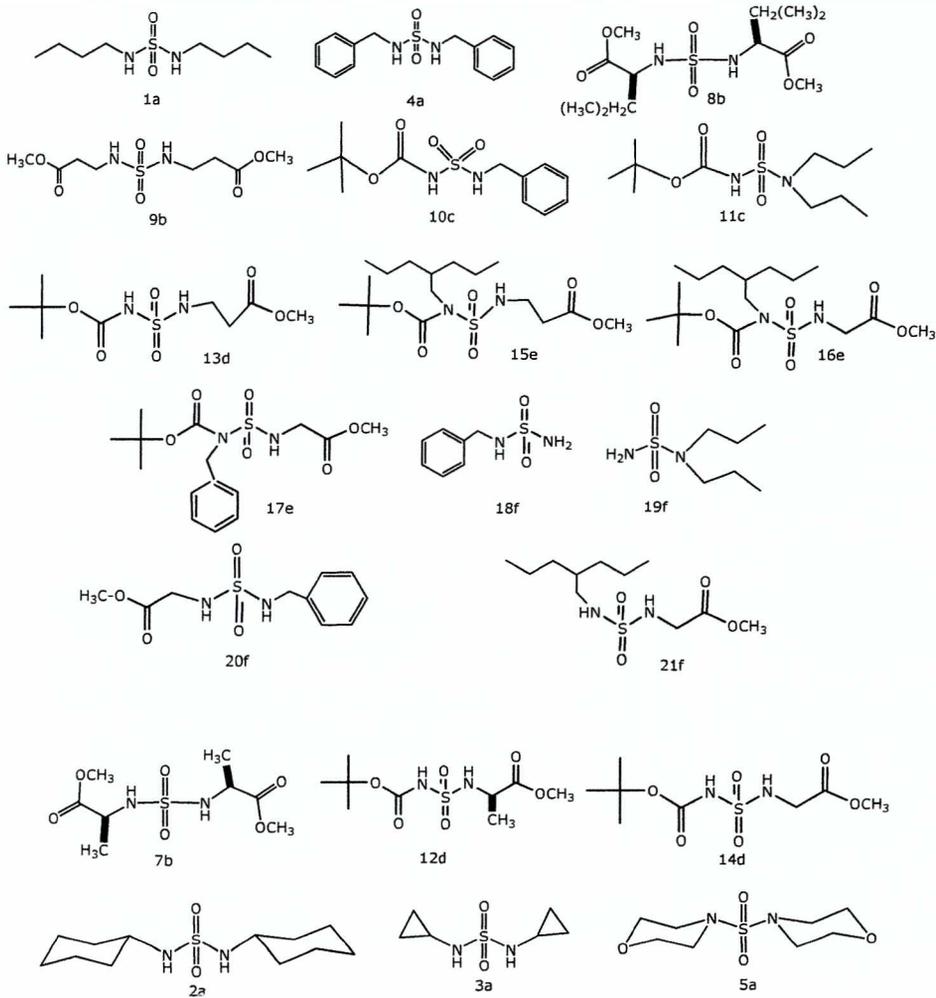


Figura 6.2. Compuestos sintetizados a los que se les midió actividad frente al MES test. Se enumeran los átomos correspondientes al farmacóforo en los compuestos que presentaron actividad.

Las otras estructuras no poseen una porción hidrocarbonada capaz de satisfacer los requisitos impuestos por el farmacoforo, (moléculas 7b, 12d y 14d; figura 6.2) ya sea por su tamaño o por presentar una rigidez estructural que imposibilita adquirir la conformación activa (compuestos 2a, 3a y 5a; figura 6.2). En base a esto, se espera que solo los compuestos del primer conjunto resulten activos. Dentro de este conjunto se espera además que aquellos compuestos activos del primer conjunto que adicionalmente presenten un grupo voluminoso en una posición determinada por un valor de τ_4 próximo a cero, ejerzan mejor acción protectora.

La tabla 6.1 resume la clasificación resultante de los análisis en fase 1 frente al MES test de los compuestos sintetizados. El compuesto 5a no se clasificó por no ser soluble a 300mg/Kg, pero no fue activo a la mayor dosis ensayada (100 mg/Kg). Se incluyen los valores de logP (-log del coeficiente de partición octanol:agua) determinados para cada molécula, dado que este es el descriptor más usado para el efecto hidrofóbico.¹ Los cálculos se realizaron mediante el programa Hyperchem.²

Compuesto	clase	logP	Compuesto	Clase	logP
1a	1	1.23	18f	1	0.98
4a	1	1.45	19f	1	0.74
8b	1	1.38	20f	3	0.77
9b	1	-1.07	21f	1	1.79
10c	3	2.07	7b	3	-0.36
11c	2	1.83	12d	3	0.41
13d	2	0.05	14d	3	-0.13
15e	3	3.10	2a	1	2.59
16e	2	2.92	3a	3	0.21
17e	3	1.89	5a	-	-1.44

Tabla 6.1. Clasificación de los compuestos evaluados de acuerdo a la fase 1 del programa de evaluación biológica frente a MES test.

Los resultados han mostrado que de los 14 compuestos que se esperan activos según lo propuestos por el diseño 10 presentan la acción buscada, y 7 de ellos pertenecen a la clase más potente (clase 1). Las moléculas que se supusieron inactivas mostraron este comportamiento a las dosis ensayadas, con excepción de 2a, que manifestó actividad. Teniendo en cuenta la cantidad

relativamente pequeña de compuestos ensayados, no resulta prudente formular una explicación general que relacione los resultados encontrados con la estructura. Sin embargo, un análisis cualitativo muestra que los compuestos más promisorios (activos a 30 mg/Kg) corresponden a sulfamidas alifáticas y aromáticas. No se logro alcanzar este valor de actividad con las estructuras testeadas que contienen aminoácidos. Del mismo analisis se deriva que la presencia del grupo carbamato disminuye la acción protectora. Los carbamatos activos presentan una actividad menor a sus análogos hidrolizados: 21f es mas activo que 16e (clases 1 y 2 respectivamente), 18f es mas activo que 10c (clases 1 y 3 respectivamente), 19f es más activo que 11c (clases 1 y 2 respectivamente).

Validación del farmacóforo propuesto.

Como forma de validación del farmacoforo propuesto, se analizaron las estructuras activas y no activas en relación a los requerimientos impuestos por este. En una primera etapa, se optimizaron las estructuras mediante un calculo semiempírico PM3 utilizando el programa Hyperchem,² a fin de encontrar la conformación de menor energía de cada uno de los compuestos. Posteriormente los átomos asociados al farmacóforo (numerados de 1 a 7 en la figura 6.3) se alinearon con este mediante métodos de superposición, usando la herramienta *fit atoms* presente en el programa Sybyl 6.6.³

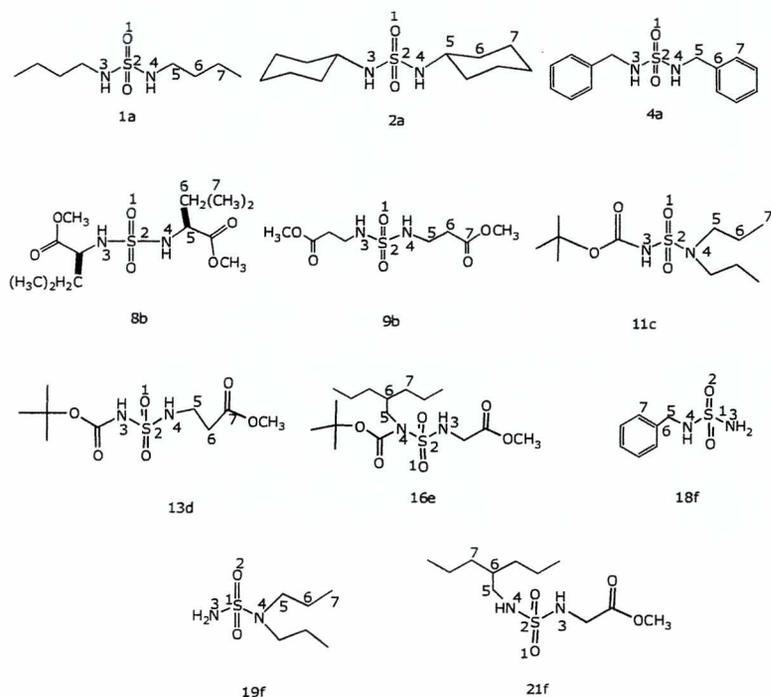


Figura 6.3. Moléculas activas utilizadas en la superposición. Los átomos involucrados en la superposición se numeran según el farmacóforo.

Se determinaron los valores de RMS para cada molécula (tabla 6.2) relativos al farmacóforo. La inspección de los datos de la tabla 2 muestra valores de RMS bajos para los compuestos activos. El valor de RMS alto del compuesto 2^a se origina en su rigidez estructural, que impide que se alcance el valor óptimo del ángulo de torsión τ_3 . Sin embargo la conformación de los átomos que corresponderían a la porción no polar del farmacóforo no difiere marcadamente de los valores definidos por este. Adicionalmente esta molécula presenta un extremo voluminoso capaz de ubicarse en la región definida por τ_4 , capaz de incrementar la actividad.

Compuesto	RMS	Compuesto	RMS
1a	0.296	13d	0.263
2a	0.601	16e	0.351
4a	0.293	18f	0.340
8b	0.277	19f	0.348
9b	0.270	21f	0.337
11c	0.280		

Tabla 6.2. Valores de RMS obtenidos de la superposición de las moléculas activas.

La figura 6.3 muestra la superposición de las estructuras activas. Para esta superposición se fijó el valor de τ_4 en cero para corroborar que los extremos voluminosos sean, en principio, capaces de ocupar la región verde determinada en el análisis 3DQSAR (capítulo 3), dejando libre la zona donde la inclusión de grupos voluminosos es desfavorable (región amarilla, figura 6.4).

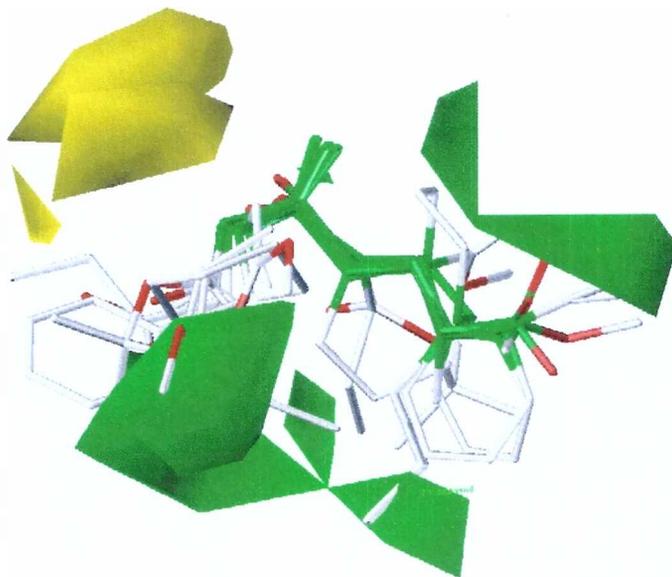


Figura 6.4. Moléculas activas superpuestas según el farmacóforo (en verde). Se incluyeron las regiones encontradas en CoMFA para los efectos estéricos. Se omitieron los átomos de H para una mejor visualización.

También se observó actividad en dos sulfamidas que no poseen sustituyentes capaces de ubicar un grupo voluminoso en la región definida (18f y 19f), pero ambos presentaron neurotoxicidad a las dosis ensayadas.

En total acuerdo con las características de los compuestos empleados para el diseño las nuevas drogas sintetizadas y ensayadas son inactivas frente al test de PTZ, aun los compuestos activos frente a MES test. Muchas drogas ya comercializadas de probada acción anticonvulsiva (como la PHE) presentan este comportamiento frente a los test biológicos: son activas en MES test e inactivas frente a PTZ. Para muchos compuestos caracterizados por este perfil farmacológico se ha identificado un mecanismo de acción por bloqueo de los canales de sodio. Sobre esta base puede sugerirse un mecanismo semejante para las sulfamidas activas encontradas en este trabajo. El hacer de esto una afirmación requiere la realización de tests in-vitro específicos.

Las sulfamidas ensayadas frente al test de PIC tampoco resultaron activas, mostrando selectividad para el ensayo MES.

Análisis QSAR de los compuestos más activos.

Con el objeto de centrar la atención en moléculas con una actividad importante y que resulte ventajosa respecto a las drogas conocidas, se analizaron

en mayor profundidad los compuestos más activos. Esto es, los compuestos que presentaron acción a 30mg/kg en la fase 1 del programa de ensayos (capítulo 5). Estos compuestos son *1a*, *2a*, *4a* y *18f*. Para esto se realizó un segundo análisis 3D-QSAR empleando un conjunto aumentado en el número de compuestos, construido mediante la adición de estas sulfamidas al conjunto original de drogas antiepilépticas del modelo CoMFA inicial (referir a fig. 6.5). Los valores de ED50 usados para estos compuestos fueron los determinados en este trabajo para MES test (capítulo 5).

En este nuevo estudio CoMFA se utilizó el mismo procedimiento para el alineamiento y el análisis estadístico que en el anterior (detallado en el capítulo 3). Los átomos numerados en la figura 6.2 son los que se usaron para la superposición con el farmacóforo. Previamente se calcularon los mínimos de energía de estas moléculas utilizando el mismo nivel de cálculo empleado para los otros compuestos del set (funcionales de la densidad B3LYP con bases 6-31G**, Gaussian 98⁴). Las moléculas superpuestas se muestran en la figura 6.5.

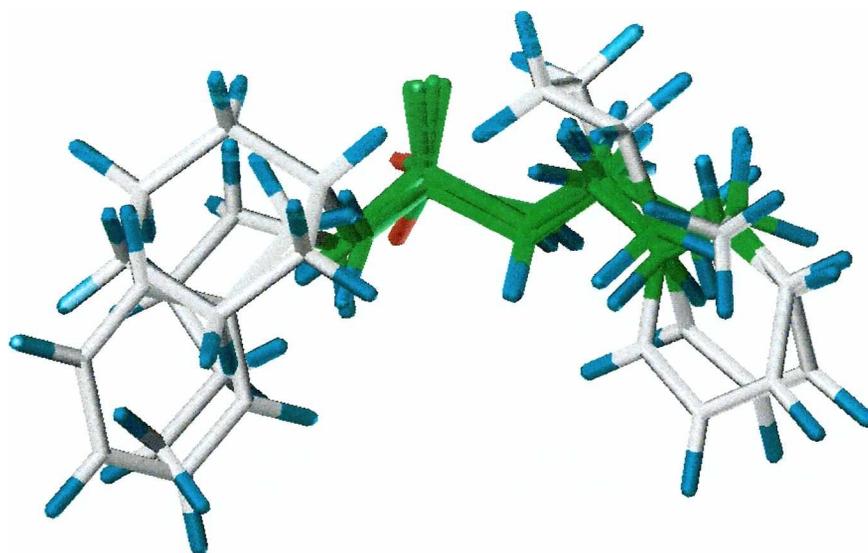


Figura 6.5. Moléculas superpuestas con la conformación considerada en CoMFA. Los átomos usados para la superposición se muestran en color verde.

En este caso se compararon dos descriptores diferentes del efecto electrostático. En un caso se calcularon las cargas en base al método de Gasteiger-Huckel implementadas en el programa Sybyl (modelo 1) y en otro se obtuvieron mediante el uso de la aproximación de Merz-Kollman en el programa Gaussian 98 (modelo 2). Los parámetros estadísticos de estos análisis se resumen en la tabla 6.3, donde se ve que no existe una diferencia significativa

entre los dos modelos. Los valores de q^2 confirman la dependencia real entre los descriptores elegidos (campos estéricos y electrostáticos) y la actividad biológica.

Los resultados encontrados son comparables a los del modelo original. Esto era de esperarse dado que los compuestos incluidos en el nuevo conjunto fueron resultado del diseño a partir del primer análisis. Nuevamente la contribución de los campos estéricos resulto mayor que la de los electrostáticos (aproximadamente 60 a 70% del total).

Método	Modelo 1	Modelo 2
q^{2a}	0.743	0.656
ONC ^b	3	3
SEE ^c	0.131	0.129
r^{2d}	0.930	0.933
Sf ^e	0.681	0.590
Ef ^f	31.9	0.410
Res ^g	0.096	0.095

Tabla 6.3. Resultados estadísticos obtenidos a partir de CoMFA para ambos modelos. ^a q^2 : coeficiente de la regresión con validación cruzada. ^bONC: Número óptimo de componentes. ^cSEE: Error estándar. ^d r^2 : coeficiente de la regresión sin validación cruzada r^2 . ^eSf: Contribución relativa del campo estérico. ^fEf: Contribución relativa del campo electrostático. ^gRes: Promedio de los residuos.

Las actividades medidas y estimadas se reportan en la tabla 6.4 para el caso del modelo 1, junto con los valores de los residuos. Estos últimos son menores que 0.33, siendo 9 de ellos mayores o iguales a ± 0.13 (29 % del total).

Compuesto	-LogED50 Experimental	-LogED50 predicho	Residuos
CZ	-1.57	-1.65	0.08
PHE	-1.58	-1.73	0.15
FLB	-2.32	-2.19	-0.13
RMC	-2.47	-2.43	-0.04
RET	-1.49	-1.56	0.07
ZON	-1.96	-1.98	0.02
VIN	-1.89	-1.88	-0.01
OCZ	-1.90	-1.71	-0.19
PRM	-1.72	-1.85	0.13
PB	-1.97	-1.84	-0.12
TOP2ME	-1.35	-1.34	-0.01
TOP2CP	-1.31	-1.30	-0.01

TOP2	-1.30	-1.37	0.07
TOP	-2.05	-2.02	-0.03
METS	-2.58	-2.25	-0.33
VPD	-2.55	-2.47	-0.08
VRL	-2.88	-2.89	0.01
PRVP	-1.98	-2.10	0.12
SUVPD	-1.72	-1.61	0.11
CHVPD	-1.79	-1.96	0.17
IPVPD	-2.58	-2.65	0.07
BUVPD	-2.69	-2.70	0.01
CPVPD	-3.09	-3.04	0.05
ETVPD	-2.30	-2.17	-0.13
DMVPD	-2.54	-2.61	0.07
HATS	-1.95	-2.01	0.06
B-HATS	-1.87	-1.94	0.07
1a	-2.47	-2.58	0.11
2a	-2.18	-2.44	0.26
4a	-2.38	-2.40	0.02
18f	-2.38	-2.14	0.24

Tabla 6.4. Actividad biológica medida y predicha para los compuestos del conjunto según el modelo 1, expresada en forma logarítmica. También se incluyen los valores de los residuos.

Los mapas de contorno para este modelo se muestran en la figura 6.5. La distribución de las regiones que describen los parámetros electrostáticos se asemeja al obtenido con el conjunto original. Se observan dos regiones principales donde la actividad se beneficia con la adición de átomos con carga positiva (b-1 y b-2, en color azul) y dos regiones principales donde se favorece con la presencia de carga negativa (b-3 y b-4, en rojo). En términos de los campos estéricos la similitud es aun mayor, porque ambos modelos presentan las mismas regiones.

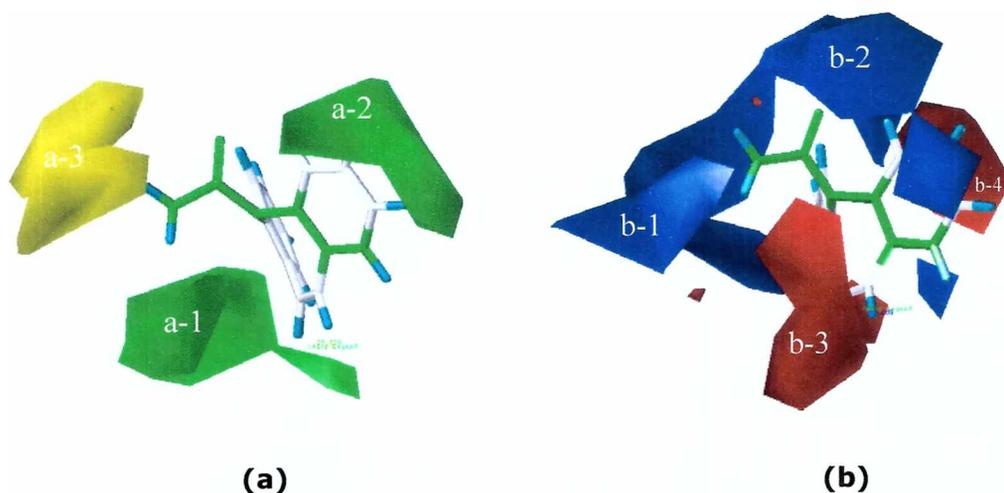


Figura 6.6. Mapas de contorno de los campos estéricos y electrostáticos asociados al análisis CoMFA, con la molécula de CZ como referencia. El patrón farmacofórico se muestra en verde.

a- Las superficies en verde indican las regiones donde la actividad aumenta por la ubicación de grupos voluminosos. Las zonas amarillas representan las regiones donde la actividad decrece por la adición de estos grupos. b- Las superficies en azul indican las regiones donde la actividad aumenta por la ubicación de grupos con carga positiva. Las zonas rojas representan las regiones donde la actividad aumenta por la adición de grupos con carga negativa. Las regiones más importantes se indican con números.

Por ultimo también se recopilaron del análisis CoMFA los valores de las cargas correspondientes a los centros atómicos considerados en la porción polar del farmacóforo en las sulfamidas usadas en el modelo 2. Esto permitió una verificación cuantitativa de la correspondencia con el extremo polar de la función sulfamida. Los valores se compararon con los correspondientes a los grupos polares de drogas que poseen diferentes grupos funcionales bioisómeros y que se utilizaron para definir el farmacóforo.

La tabla 6.4 muestra los resultados obtenidos, mostrando que las sulfamidas siguen la misma tendencia que las drogas ya conocidas y cumplen con la distribución de cargas esperada según lo propuesto por el farmacóforo.

	Función	Q ₁	Q ₂	Q ₃
CZ	Urea	-0.563	0.905	-0.928
PHE	Amida	-0.488	0.568	-0.652
FLB	Carbamato	-0.583	0.911	-0.937
TOP	Sulfamato	-0.551	1.433	-1.043
ZON	Sulfonamida	-0.481	0.957	-0.870
VIN	Ester	-0.518	0.742	-0.468
OCZ	Urea	-0.542	0.850	-0.940
1a	Sulfamida	-0.487	1.120	-0.721
2a	Sulfamida	-0.470	1.018	-0.850
4a	Sulfamida	-0.492	0.991	-0.722
13c	Sulfamida	-0.489	1.014	-0.868

Tabla 6.4. Valores calculados de las cargas sobre los átomos que constituyen la porción polar del farmacóforo. Q_n: cargas sobre el átomo n del farmacóforo según figura 6.2.

Consideraciones energéticas.

En la metodología utilizada no se tuvo en cuenta la termodinámica del proceso de unión ligando-receptor en forma directa. Esto implicaría un análisis de los cambios de energía libre para cada compuesto, ya sea por la interacción droga-receptor en sí misma o por los cambios conformacionales que implican el pasar de una conformación estable a la activa. Estos procesos acarrearán una disminución y un aumento de energía libre, respectivamente. Por otra parte se esperaría una disminución entrópica en el proceso de anclaje de la droga, relacionada principalmente con la unión de la misma al receptor. Todas estas consideraciones resultan difíciles, si no imposibles, de tener en cuenta si no se conocen las características del sitio activo estudiado. Es por eso que solo se ha medido la facilidad de los compuestos de adoptar la conformación activa, considerándolo solo uno de los componentes en la energía libre.

Para ello se realizó una optimización restringida de geometría de los compuestos utilizados en el CoMFA extendido, manteniendo invariante los valores de τ_1 , τ_2 , τ_3 , en los valores correspondientes a los definidos en el farmacóforo. También se dejó constante τ_4 , en el valor derivado del análisis CoMFA. En la tabla 6.5 se muestran los valores de energía electrónica calculados para las estructuras optimizadas en su geometría y para las que surgen de la optimización

restringida, así como su diferencia. Todos los cálculos se hicieron usando funcionales de la densidad B3LYP con bases 6-31G**, Gaussian 98.⁴

Compuesto	Energía OR ^a	Energía OC ^b	ΔE^c	Compuesto	Energía OR ^a	Energía OC ^b	ΔE^c
VRL	-653.13	-653.14	2,34	BHATS	-1590.18	-1590.18	1,36
CPVPD	-904.06	-904.06	1,32	OCZ	-838.81	-838.82	5,10
IPVPD	-563.06	-563.07	8,74	CHVPD	-679.78	-679.80	15,07
BUVPD	-602.37	-602.38	5,60	SUVPD	-1280.07	-1280.09	11,68
DMVPD	-523.73	-523.73	0,17	PRM	-725.70	-725.71	1,17
RMC	-844.61	-844.62	5,73	PHE	-838.83	-838.83	1,49
VPD	-445.11	-445.12	6,30	CZ	-763.57	-763.59	7,96
METS	-670.36	-670.36	0,57	RET	-935.89	-935.90	6,20
FLB	-838.05	-838.07	10,69	TOP2ME	-1994.50	-1994.51	3,84
ETVPD	-523.72	-523.75	15,65	TOP2CP	-2071.89	-2071.90	2,54
TOP	-1524.60	-1524.61	5,25	TOP2	-1955.20	-1955.20	3,80
PRVP	-622.21	-622.23	9,59	1a	-975.00	-975.01	3,89
HATS	-1244.34	-1244.35	7,80	2a	-1129.85	-1129.87	12,78
ZON	-1042.93	-1042.94	9,08	4a	-1201.22	-1201.22	1,68
PB	-799.74	-799.75	7,60	18f	930.85	-930.85	3,14
VIN	-1113.95	-1113.97	11,94				

Tabla 6.5. Valores de energía calculadas mediante optimización completa y restringida según la conformación activa para las moléculas estudiadas. ^aValores de energía encontrados para la optimización restringida, expresados en Hartree. ^bValores de energía encontrados para la optimización completa, expresados en Hartree. Diferencias entre estas energías expresadas en Kcal/mol.

Los resultados muestran que en algunos casos los requerimientos para el cambio conformacional son relativamente altos. En estas moléculas es posible que la disminución de energía libre liberada en la unión al receptor de la droga sea suficientemente grande como para contrarrestar este aumento energético que implica la evolución a la conformación activa.

Referencias del capítulo 6.

1. Ooi, T.; Oobatake, M.; Nemethy, G.; Scheraga, H. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1987**, 84, 3086.
2. Hyperchem 7.02; Hypercube Inc., 1115 NW 4th St. Gainesville, FL32601 USA.
3. SYBYL 6.6; Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144 USA.
4. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; and Pople, J. A., **1998** Gaussian 98, Revision A.9 Gaussian Inc., Pittsburgh PA.
5. Stables, J. P.; Kupferberg H. J., Chapter 16: The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. En *Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*; Avanzani, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P.; Avoli, M., eds., John Libbey & Company Ltd, **1997**, 191-198.
6. Porter, R. J.; Cereghino, J. J.; Gladding, G. D.; Hessie, B. J.; Kupferberg H. J., Scoville, B.; White, B. G., *Clev. Clin. Q.*, **1984**, 51, 293.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

Conclusiones.

El objetivo principal de este trabajo es encontrar nuevos compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento de la epilepsia. Esta búsqueda se basa en la necesidad de disponer de nuevas moléculas activas, dada la incapacidad de los medicamentos actuales en lograr una respuesta adecuada para el 100% de los pacientes.

Para ello se abordaron las distintas etapas que implican el descubrimiento de nuevos fármacos: el diseño, la síntesis y la evaluación biológica. Esta forma de trabajo netamente interdisciplinaria requirió mi preparación en distintas áreas de conocimiento, tanto experimentales como teóricas, las cuales forman parte de la química medicinal. Al tratarse de un proceso autoconsistente, es posible que a partir de los resultados y conclusiones elaborados en este trabajo se fije un nuevo punto de partida para la optimización de los compuestos hallados, así como de la metodología empleada (figura 7.1)

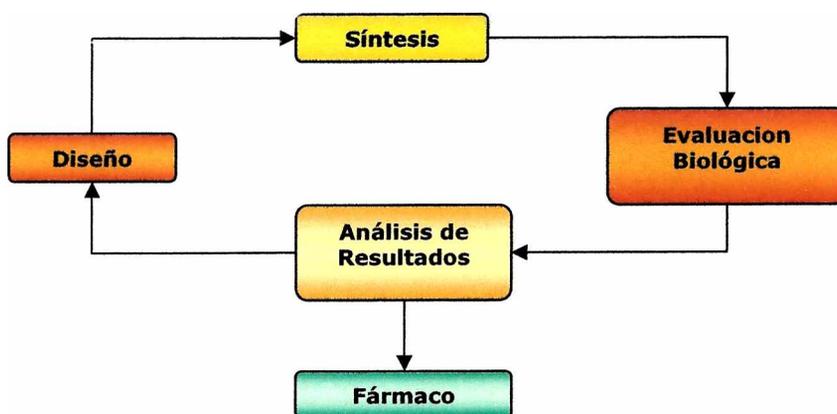


Figura 7.1 Etapas consideradas en el descubrimiento y la optimización de fármacos.

Los aportes de esta investigación se inician en el empleo exitoso de las herramientas de diseño. El patrón farmacofórico para la actividad anti-MES conocido al comienzo de este trabajo sirvió de punto de partida. Estos requerimientos fueron validados, re-definidos y ampliados mediante el uso de una metodología 3D QSAR que permitió encontrar características espaciales adicionales capaces de favorecer la actividad.

El farmacóforo resultante conserva la generalidad de su predecesor, al estar definido considerando diferentes moléculas con diferentes grupos funcionales. Esta independencia en cuanto al tipo de moléculas permitió la elección de las sulfamidas como nueva funcionalidad capaz de cumplir con los requerimientos planteados. Este tipo de compuestos no había sido considerado en su posible acción anticonvulsiva. La decisión de utilizar sulfamidas se sustentó además en el empleo de metodologías para la optimización estructural, como son la simplificación de la estructura y el reemplazo bioisostérico.

Una vez elegidos los compuestos, debió encontrarse un procedimiento de síntesis para cada tipo de sulfamidas diseñadas. Esto no fue trivial en algunos casos y las vías de obtención se eligieron cuidadosamente luego de una búsqueda completa de la información proveniente de literatura. En el caso de las sulfamidas alquílicas N,N'-disustituidas la vía sintética se resolvió mediante un estudio teórico de los posibles mecanismos de reacción (Anexo). Algunas estructuras fueron preparadas por primera vez, proporcionándole un valor agregado a este trabajo desde el punto de vista sintético.

En cuanto a los test biológicos empleados, estos se seleccionaron en la diagramación inicial de la investigación, dado que deben quedar definidos ya en la etapa de diseño. Se espera que las características electrónicas y estructurales especificadas allí estén relacionadas con el modelo animal del que fueron derivadas, en este caso el ensayo MES.

El MES test es uno de los más ampliamente usados en la etapa preclínica y, junto con los ensayos PTZ y Rotorod, forman parte de las primeras fases del programa internacionalmente reconocido para el descubrimiento de nuevas drogas antiepilépticas (programa ADD).⁵⁻⁶ En esta investigación se procedió de acuerdo a los lineamientos metodológicos planteados por este programa, lo que permitió una expresión de los resultados de acuerdo a los estándares internacionales. De ese modo se tiene la posibilidad de realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos con los correspondientes a otras drogas evaluadas de la misma forma en otros laboratorios.

De los 21 compuestos preparados, 20 pudieron ser ensayados en fase 1 dada su estabilidad y solubilidad, encontrándose 11 compuestos activos frente a al ensayo MES e inactivos frente a PTZ. Este perfil farmacológico se encuentra asociado a la fenitoína y otros compuestos cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de canales de sodio por lo que, en principio, se podría sugerir que este tipo de compuestos actúan de la misma manera.

Las estructuras de los compuestos activos cumplen en mayor o menor medida con el patrón farmacofórico planteado para MES test, validando experimentalmente lo propuesto en la etapa de diseño. Entre estas 11 sulfamidas existen 8 que se encuadran en la clase más activa (clase 1) según la clasificación propuesta por el programa.⁵ Esto significa que se han encontrado compuestos no solo con la respuesta biológica esperada, sino con una potencia elevada.

Con la idea de trabajar con las especies más promisorias, se centro la atención en aquellas muy activas, es decir, las que presentaron actividad a 30 mg/Kg en MES test. La mayoría de estas sustancias fueron adicionalmente ensayadas frente a PIC, resultando inactivas en todos los casos y, por lo tanto, mostrando selectividad en el modelo de inducción eléctrica.

En estos compuestos se avanzo hasta la fase 2 del programa, cuantificándose la acción frente al test MES y, en el caso donde la solubilidad lo permitió, frente al test de Rotorod. Los valores de ED50 encontrados son cercanos a los correspondientes a las drogas clásicas y de nueva generación (tabla 6.4), con magnitudes comparables a compuestos como RMC y ETVPD; y menores a las encontradas para METS, VRL, VPD, IPVDP, BUVPD, CPVPD, y DMVPD.

Posteriormente estas sulfamidas se incluyeron en el estudio 3D-QSAR del que derivaron, validándose los resultados propuestos inicialmente. Sin dudas la inactividad de compuestos que se esperaban activos muestran que el modelo generado en la etapa de diseño esta lejos de ser perfecto y puede mejorarse, solo es cuestión de recomenzar con el ciclo de descubrimiento de fármacos en base a los resultados obtenidos.

Todo lo hecho en este trabajo muestra que *las sulfamidas definen un nuevo prototipo activo para la actividad antiepiléptica*, consolidando una línea de investigación en nuestro grupo de trabajo. Compuestos con esta funcionalidad están siendo investigados, sintetizados y evaluados en nuestro laboratorio, con el fin de encontrar drogas más ventajosas que las que se encontraron al momento de finalizar este trabajo.

ANEXO

ESTUDIO MECANISTICO DE LA SÍNTESIS DE SULFAMIDAS

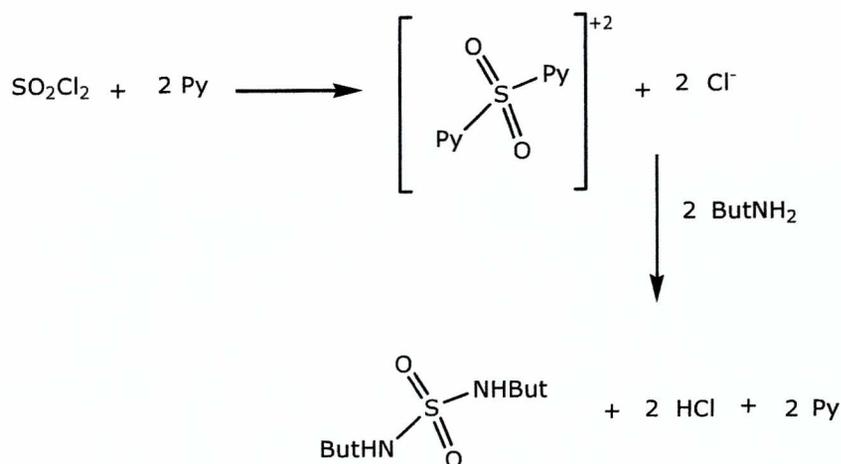
Consideraciones generales.

La elección de un procedimiento de síntesis óptimo desde el punto de vista químico resulta de gran importancia tanto en las etapas preliminares como en la producción a gran escala de un principio activo.

En tal sentido, en este trabajo de tesis se ha centrado la atención principalmente en la elección de las condiciones óptimas para la síntesis de diferentes sulfamidas, teniendo en cuenta la información recabada de la literatura (capítulo 4). Adicionalmente, se han analizado a nivel teórico las rutas sintéticas que conducen a las sulfamidas simétricas N,N'-disustituidas, eligiendo la N,N'-dibutilsulfamida, como reacción de referencia. Mediante este estudio se han modelado dos posibles caminos de obtención de estos compuestos, evaluándose los requerimientos energéticos asociados a los mecanismos de reacción propuestos. De este modo se logró una herramienta adicional para determinar el método de síntesis más apropiado para este tipo de compuestos.

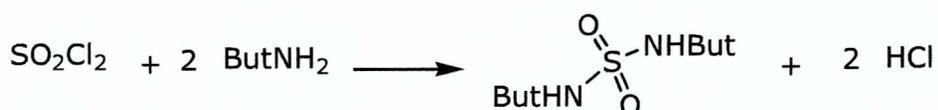
Rutas sintéticas.

Las sulfamidas simétricas N,N'-disustituidas han sido tradicionalmente sintetizadas por el método de Ohme y Preuschhof.¹ Estos autores usaron piridina (Py) como agente nucleofílico iniciador de la reacción, postulando un ataque de este compuesto al átomo de azufre del cloruro de sulfurilo y su posterior reemplazo por la correspondiente amina (Esquema a.1).



Esquema a.1. Propuesta mecanística para la obtención de *N,N'*-dibutilsulfamida en presencia de piridina (Py).¹ But = butilo

Sin embargo, otros investigadores²⁻⁵ han obtenido exitosamente esta clase de sulfamidas sin la participación de la Py en la reacción (Esquema a.2).



Esquema a.2. Reacción de obtención de *N,N'*-dibutilsulfamida sin utilizar piridina. But = butilo

Es por eso que estas dos vías de síntesis han sido estudiadas y comparadas en forma teórica. Al mismo tiempo, ambos métodos fueron usados para la síntesis experimental de *N,N'*-dibutilsulfamida, usando diclorometano como solvente y siguiendo los procedimientos experimentales usuales.

Métodos de cálculo.

Los cálculos fueron realizados a nivel de funcionales de la densidad (B3LYP) con bases 6-31G** (ver capítulo 1), utilizando el programa Gaussian 98.⁶ Inicialmente se realizaron optimizaciones de geometría para los reactivos, productos, intermediarios y estados de transición propuestos. Estos últimos fueron identificados como tales usando aproximaciones cuadráticas de tránsitos sincrónicos (QST2)⁷ y fueron caracterizados mediante el análisis de las frecuencias harmónicas al mismo nivel en teoría.

Los efectos de solvente (diclorometano), fueron simulados mediante una aproximación de modelo de solvente continuo polarizable (IPCM).⁸ Para ello se

efectuaron cálculos puntuales sobre las geometrías optimizadas en vacío. Las cargas atómicas fueron calculadas de acuerdo con la aproximación de Merz-Kollman,⁹ manteniendo el mismo nivel de teoría.

Reacción mediada por el uso de Py.

Dos etapas principales pueden considerarse en la propuesta del mecanismo de reacción que implica el uso de Py: *la sustitución nucleofílica de los iones cloruro por dos moléculas de Py en el cloruro de sulfurilo*; y *la posterior remoción de las Py por la butilaminas*.

De este modo la reacción se inicia a través de un ataque nucleofílico de Py al átomo de azufre que, de acuerdo con nuestros cálculos, posee una carga positiva de 0.7 e.u.. El desplazamiento de un anión cloruro brinda un intermediario estable SI1 (figura a.1). Este proceso no es favorable energéticamente ($\Delta E = 10$ kcal/mol) debido a la desestabilización encontrada para los productos (SI1 + Cl⁻) respecto de los reactivos (esquema a.3).

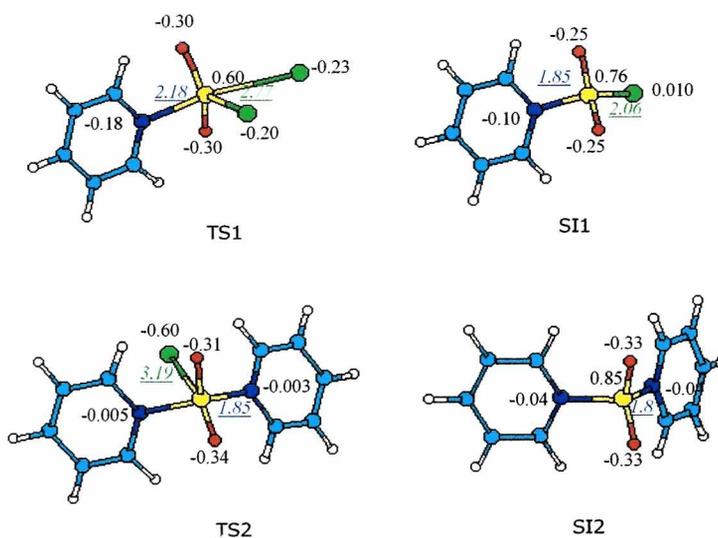
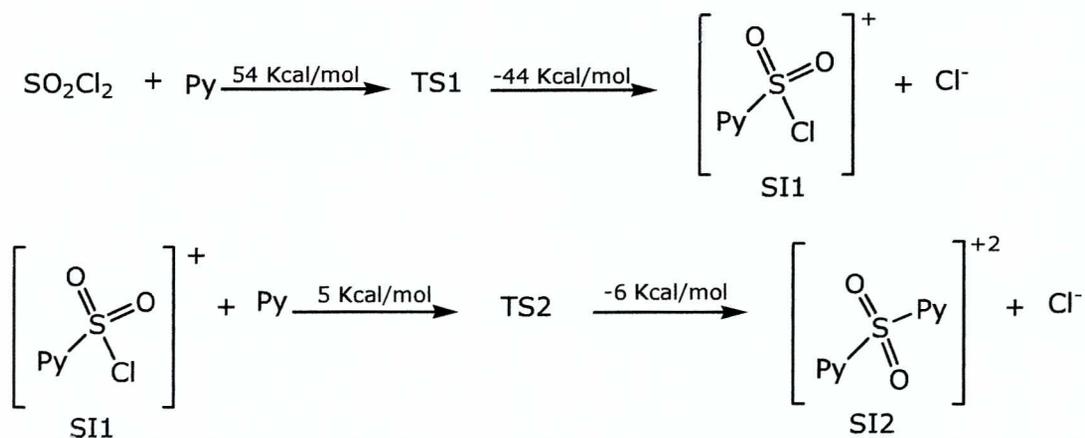


Figura a.1. Geometrías encontradas para los intermediarios estables y los estados de transición asociados con la primera etapa de la reacción en presencia de Py. Se incluyen las cargas atómicas calculadas (expresadas en e.u.) y las distancias interatómicas relevantes (expresadas en Å). (indicar la referencia de colores)

La estructura del estado de transición que resulta de los cálculos QST2 (TS1, figura a.1) es 54 Kcal/mol menos estable que los reactivos. La energía asociada a la reacción depende en gran medida del solvente simulado (Tabla a.1): Un ambiente de diclorometano estabiliza en gran medida las especies con carga positiva. Las geometrías de TS1 y SI1 son características de un mecanismo SN2: TS1 tiene una estructura bipiramide trigonal centrada en el átomo de azufre, en la cual el enlace Cl-S se ha alargado a ... Å y se encuentra en el vértice opuesto al ocupado por la Py entrante. Todos los enlaces S-X (donde X representa los diferentes ligandos) en TS1 son más largos que el correspondiente en los reactivos o productos (figura a.1). SI1 presenta una geometría tetraédrica (T_d) aunque distorsionada en el ángulo N-S-Cl, que se estabiliza en 94° .



Esquema a.3. Mecanismo propuesta para la primera etapa para la reacción en presencia de Py. Se incluyen los datos de energía calculados considerando el solvente para cada etapa.

Posteriormente la reacción continúa mediante el ataque nucleofílico de una segunda molécula de Py, desplazando el ión cloruro remanente y generando un intermediario estable (SI2) a través del estado de transición TS2 (figura a.1). TS2 puede ser descrito como una bipiramide trigonal distorsionada, con los dos átomos de oxígeno y el cloruro delimitando el plano triangular. La distorsión está definida por un ángulo N-S-N de 125° , que se desvía de 180° y se acerca al valor en SI2. SI2 se estabiliza por pérdida del ion cloruro, recuperando una simetría tetraédrica donde el ángulo N-S-N (103°) se ajusta mejor al valor T_d .

El intermediario SI2 ha sido previamente propuesto por Ohme y Preuschhof,¹ sin reportar detalles de su estructura. La segunda sustitución está favorecida energéticamente de acuerdo a nuestros cálculos, requiriendo una energía cercana a los 5 Kcal/mol para proceder a través del estado de transición TS2 (esquema a.3). En este mecanismo, el progreso de la reacción se encuentra

beneficiado por la separación de los productos del medio, por precipitación del catión intermediario con cloruro.

Reaccion con Py					
Especie/s	E ^a [au]	E ^b [au]	Descripción	ΔE ^a [Kcal/mol]	ΔE ^b [Kcal/mol]
SO ₂ Cl ₂	-1468.94198	-1468.94636			
Py	-248.29260	-248.29981			
SO ₂ Cl ₂ + Py	-1717.23458	-1717.24617			
TS 1	-1716.91935	-1717.15980	TS1 - (SO ₂ Cl ₂ + Py)	197.81	54.20
SI1	-1256.78694	-1256.85969			
Cl ⁻	-460.52223	-460.36955			
SI1+Cl ⁻	-1717.30917	-1717.22924	SI1+Cl ⁻ -TS1	-244.62	-43.57
SI1 + Py	-1505.07953	-1505.15950			
TS2	-1505.05806	-1505.15231	TS2 - (SI1 + Py)	13.48	4.51
SI2	-1044.52335	-1044.79233			
SI2 + Cl ⁻	-1505.04558	-1505.16188	SI2 + Cl ⁻ -TS2	7.83	-6.01
H ₂ NBut	-213.81629	-213.82210			
SI2 + H ₂ NBut	-1258.33964	-1258.61443			
SI3	-1258.23179	-1258.48371	SI3- (SI2 + H ₂ NBut)	67.68	82.03
SI3 + Cl ⁻	-1718.75403	-1718.85326			
SI4	-1009.84570	-1009.92570			
HCl	-460.80078	-460.80477			
SI4+ Py + HCl	-1718.93907	-1719.03027	SI4+ Py + HCl - (SI3 + Cl ⁻)	-116.12	-111.07
SI4 + H ₂ NBut + Cl ⁻	-1684.18422	-1684.11734			
SI5	-975.00829	-975.02626			
SI5 + Py + HCl	-1684.10166	-1684.13084	SI5 + Py + HCl - (SI4 + H ₂ NBut + Cl ⁻)	51.81	-8.47

Tabla a.1. Energías electrónicas calculadas para las especies estudiadas. Los cambios energéticos para los diferentes pasos de reacción propuestos se incluyen en las columnas 5 y 6. ΔE^a = cálculos en vacío, ΔE^b = cálculos incluyendo el solvente.

La segunda etapa propuesta esta relacionada con el reemplazo nucleofílico de las Py por la amina primaria (butilamina). El ataque de una primera molécula de butilamina al azufre electrófilo, genera un intermediario estable (SI3, figura a.2). En este caso el átomo de azufre pentavalente se encuentra en el centro de una estructura intermedia entre una pirámide cuadrada y una bipiramide trigonal. En esta ultima, el grupo Py y un átomo de oxígeno definen los vértices. Esta

estructura se forma por distorsión del T_d característica de SI2 luego de la unión con la molécula de amina. En SI3 el átomo de hidrogeno de la butilamina ya se ha transferido al oxígeno. La energía implicada en la formación del intermediario muestra que la reacción no esta favorecida (diagrama a.4), pero puede ser estabilizada mediante la eliminación de un átomo de Py protonado (PyH^+), el cual es separado en forma de sal, generando un intermediario T_d estable, SI4 (figura a.2).

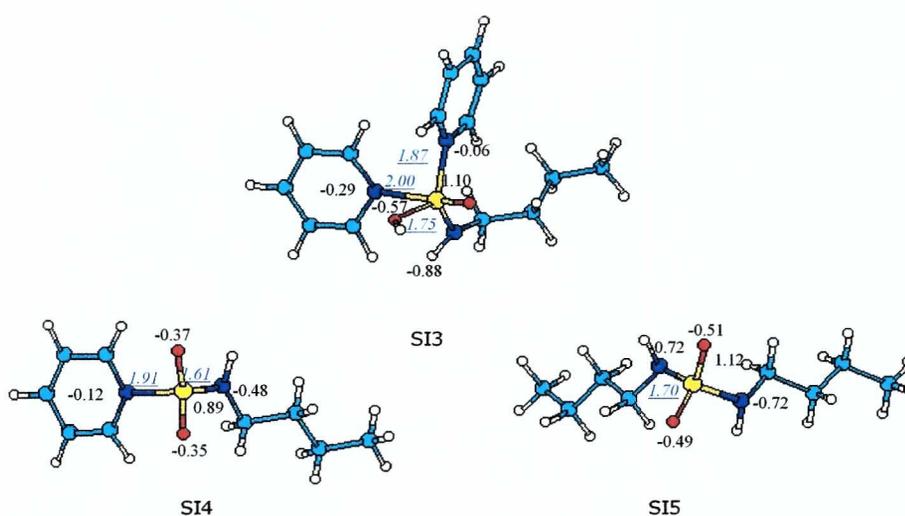
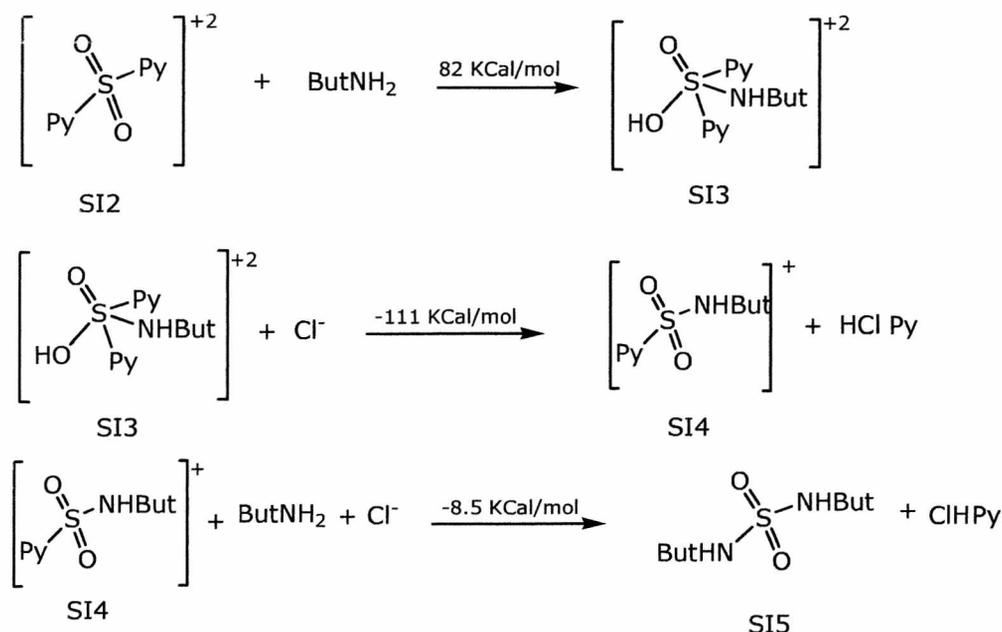


Figura a.2. Geometrías encontradas para los intermediarios estables y los estados de transición asociados con la segunda etapa de la reacción en presencia de Py. Se incluyen las cargas atómicas calculadas (expresadas en e.u.) y las distancias interatómicas relevantes (expresadas en Å).

La sustitución de la Py remanente por una segunda molécula de butilamina para dar el producto SI5 (figura a.2), puede implicar dos pasos consecutivos, de acuerdo a un mecanismo similar al descrito para la coordinación del primer amino al átomo de azufre. Sin embargo, no se ha conseguido identificar un intermediario pentavalente similar al SI3, dado que todos los intentos evolucionaron a los productos de reacción. Las dificultades encontradas en el calculo de este mecanismo y la alta energía involucrada en la formación de SI3, llevan a pensar que no es este el mecanismo a través del cual la reacción pueda ocurrir. La energía de activación de esta etapa debe ser mayor que 82 Kcal/mol y,

por lo tanto, de muy baja probabilidad experimental. Dado que nuestro objetivo es dilucidar de antemano el camino mas eficiente para la síntesis de las sulfamidas simétricas, nos centramos en el análisis de la reacción directa, como otra probable vía d obtención. En lo que sigue del análisis se tiene en cuenta, como punto de referencia, que la energía de activación de la primera etapa, asociada al ataque nucleofílico de py a SO₂, es de 54 Kcal/mol.

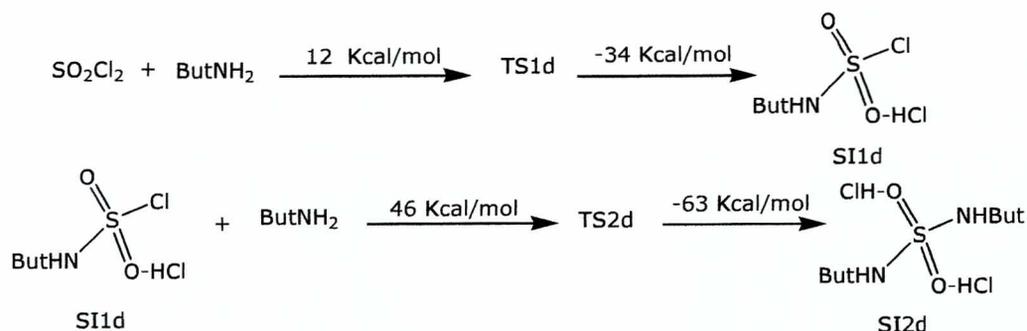


Esquema a.4. Propuesta mecanística para la segunda etapa para la reacción en presencia de Py. Se incluyen los datos de energía calculados considerando el solvente para cada etapa.

Reacción directa.

Como se detallo anteriormente, también fue analizada la reacción de obtención de N,N'-dibutilsulfamida sin utilizar Py como reactivo (esquema a.5). En este caso se postula que el ataque nucleofílico al cloruro de sulfurilo lo efectúa directamente una molécula de butilamina, generando un intermediario estable (SI1d, figura a.3), el cual es 22 kcal/mol mas estable que los reactivos.

La hypersuperficie de energía potencial es menos compleja para esta reacción directa, con un estado de transición calculado para la primera sustitución de la amina (TS1d, figura a.3) que es solo 12 Kcal/mol mayor en energía (tabla a.2).



Esquema a.5. Propuesta mecanística para la reacción directa. Se incluyen los datos de energía calculados considerando el solvente para cada etapa.

La estructura del estado de transición TS1d es similar a la encontrada previamente para el primer paso de la reacción mediada por Py (TS1). Esta puede ser descrita como un bipiramide trigonal distorsionada, en donde el grupo cloruro permanece aun unido al S, el nitrógeno del grupo amino ocupa la posición apical; y los átomos de oxígeno definen con el otro átomo de cloro un triángulo planar.

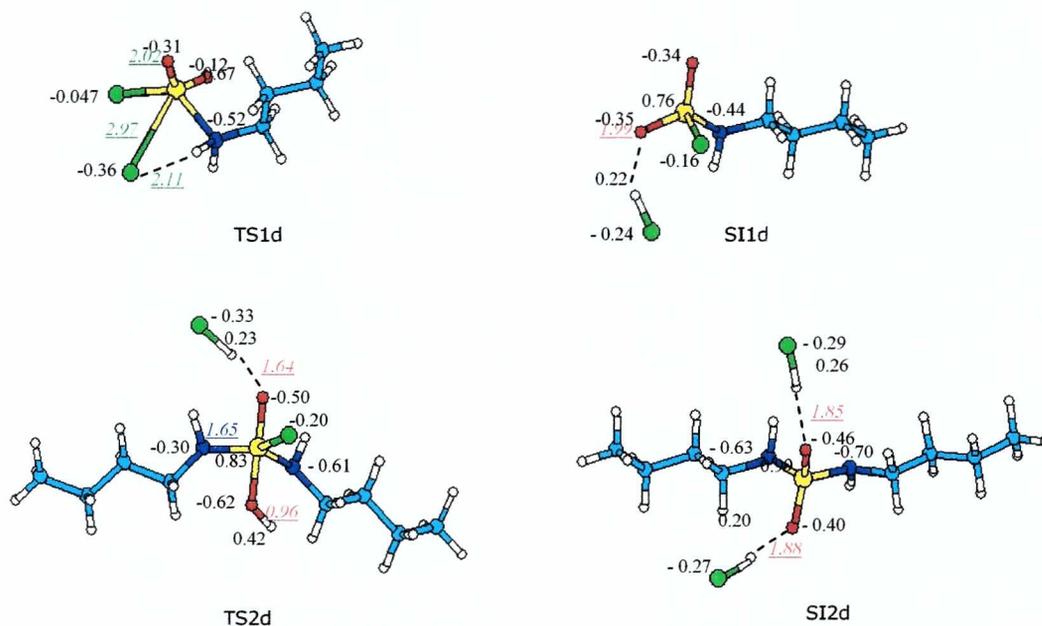


Figura a.3. Geometrías encontradas para los intermediarios estables y los estados de transición asociados a la reacción directa. Se incluyen las cargas atómicas calculadas (expresadas en e.u.) y las distancias interatómicas relevantes (expresadas en Å). (indicar la referencia de colores)

La geometría de TS1d es, sin embargo, más cercana al producto que TS1, con un enlace S-Cl alargado en 2.97Å. Este átomo de cloro ya está unido mediante puentes de hidrógeno a uno de los hidrógenos del grupo amino. La salida del cloruro de hidrógeno para dar SI1d está favorecida mediante la estabilización de un enlace entre el HCl y el oxígeno del grupo sulfurilo, que promueve la formación del producto.

En una segunda etapa, otra molécula de amina actúa como nucleófilo, atacando el átomo de azufre con una transferencia simultánea del protón al oxígeno no protonado del grupo sulfuro. El proceso es similar al previamente descrito, procediendo a través de un estado de transición TS2d (figura a.3) que define una energía de activación de 46 Kcal/mol (esquema a.5). El producto final (SI2d, figura 3) está estabilizado como clorhidrato, y es 17 kcal/mol menor en energía que SI1d.

TS2d presenta un enlace O-H entre el hidrógeno del grupo amino y el oxígeno del grupo sulfurilo. La rotación alrededor del enlace S-O permite la coordinación final de este átomo de hidrógeno con el grupo cloruro, permitiendo la pérdida de HCl para dar el producto final SI2d. Como se describió previamente para SI1d, las moléculas de HCl salientes se encuentran estabilizadas mediante la coordinación de los átomos de oxígeno.

Reacción directa

Especie/s	E ^a [au]	E ^b [au]	Descripción	ΔE ^a [Kcal/mol]	ΔE ^b [Kcal/mol]
SO ₂ Cl ₂	-1468.94198	-1468.94636			
H ₂ NBut	-213.81629	-213.82210			
SO ₂ Cl ₂ + H ₂ NBut	-1682.75827	-1682.76846			
TS1d	-1682.72524	-1682.74970	TS1d-(SO ₂ Cl ₂ + H ₂ NBut)	20.73	11.77
SI1d	-1682.79462	-1682.80348	SI1d-TS1d	-43.54	-33.75
SI1d + H ₂ NBut	-1896.61092	-1896.62558			
TS2d	-1896.53281	-1896.55281	TS2d-(SI1d + H ₂ NBut)	49.01	45.67
SI2d.2HCL	-1896.63277	-1896.65277	SI2d.2HCL - TS2	-62.73	-62.73

Tabla a.2. Energías electrónicas calculadas para las especies estudiadas. Los cambios energéticos para los diferentes pasos de reacción propuestos se incluyen en las columnas 5 y 6. ΔE^a = cálculos en vacío, ΔE^b = cálculos incluyendo el solvente.

Conclusiones.

Los mecanismos propuestos, calculados y discutidos en este trabajo han provisto información acerca de la influencia de la Py en la síntesis de sulfamidas

N,N'-disustituidas. De acuerdo con los resultados encontrados, se ve que la reacción mediada por este compuesto presenta una energía de activación mayor que la directa. Esta diferencia puede deberse a la formación de especies cargadas en el primer caso, generando una mayor demanda energética.

Al considerar el efecto del solvente, se observa que este ejerce una estabilización considerable de las especies cargadas, lo que se traduce en un menor requerimiento energético. Sin embargo, la magnitud de este efecto no es suficiente como para revertir la tendencia observada en vacío: la reacción en presencia de Py resulta desfavorable energéticamente respecto a la reacción directa.

Por otra parte, el desplazamiento del ion cloruro parece tener un comportamiento clave en ambos casos. Para el mecanismo que incluye Py, las sales que forma con los intermediarios catiónicos promueven el desplazamiento de la reacción hacia los productos. En la síntesis directa, el ion cloruro se estabiliza por coordinación con las especie protonadas, disminuyendo el costo energético en los diferentes pasos de reacción. Además estabiliza el producto final mediante su interacción con la moléculas de ácido clorhídrico.

Debe mencionarse que no se pretendió aislar o detectar experimentalmente los intermediarios propuestos en ambas reacciones.

Los resultados indicaron que el procedimiento experimental más directo, (sin la adición de Py) es el más conveniente, y las sulfamidas simétricas se sintetizaron de este modo.

Sin embargo, también se probó la síntesis mediada por Py para el caso de la N,N'-dibutilsulfamida, a modo de establecer una relación entre los resultados experimentales y las predicciones teóricas. Se vio que la presencia de Py en el medio de reacción complica severamente el aislamiento y la purificación del producto dando, en consecuencia, un rendimiento menor (62% y 75% con y sin Py, respectivamente).

Referencias del anexo.

1. Ohme, R; Preuschhof, H., *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 713, 74.
2. Sowada, V., *J. Prakt. Chem*, **1963**, 4, 310.
3. Danek, K. S.; Kelly D. P., *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2031
4. Gong, B. ; Zheng, C. ; Zeng, H. ; Zhu, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 9766.

5. Gong, B.; Zheng, C.; Skrzypczak-Jankun, E.; Yan, Y.; Zhang, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 11194.
6. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; and Pople, J. A., **1998** Gaussian 98, Revision A.9 Gaussian Inc., Pittsburgh PA.
7. Peng C.; Ayala P. Y.; Schlegel H. B.; Frisch M. J., *J Comput Chem*, **1996**, 17, 49.
8. Foresman J.B.; Keith T. A.; Wiberg K. B.; Snoonian J.; Frisch M. J., *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 16098.
9. Besler B. H.; Merz K. M.; Kollman P. A., *J. Comput. Chem.*, **1990**, 11, 431.

