



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
NUEVOS DERIVADOS DE α -HIDROXIAMIDAS COMO
AGENTES ANTICONVULSIVOS**

Tesista: Lic. Laureano Leonel Sabatier

Directora: Dra. Luciana Gavernet

Codirector: Dr. Pablo Hernán Palestro

2020

El presente trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el LIDeB (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos) bajo la dirección de la **Prof. Dra. Luciana Gavernet** y del **Dr. Pablo Hernán Palestro**.

A mamá y papá

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores **Dra. Luciana Gavernet y Dr. Pablo Palestro**, por la confianza que depositaron en mí, por su apoyo y ayuda en este trabajo.

Al **Dr. Luis Enrique Bruno-Blanch**, por su constante apoyo, tanto en el ámbito académico como personal.

A la **Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y CONICET** por brindarme los medios para llevar a cabo esta tesis.

A los **Dres. Pedro Martin, Andrea Enrique, Valentina Pastore y Maria Laura Sbaraglini** por su colaboración en la realización de los ensayos in-vitro e in-vivo.

A mis **compañeros del LIDeB**, del **Instituto Monseñor Lodigiani** y de la **Universidad Provincial de Ezeiza** por todos los aprendizajes y momentos compartidos.

A mi familia, especialmente a mis padres por todo su apoyo y esfuerzo para permitirme llegar hasta acá.

A **Luna**, por ser mi compañera fiel.

A mis **amigos**, por ser mis andamios.

A los que ya no están, pero me impulsaron a ser mejor.

Índice general

Objetivos.....	1
Capítulo 1: Epilepsia	3
1.1 La Epilepsia en números.....	4
1.2 Comorbilidades	4
1.3 Causas.....	5
1.4 Crisis epiléptica.....	6
1.5 Tratamientos	7
1.5.1 Terapias no farmacológicas	8
1.5.2 Terapias farmacológicas	10
1.6 Epilepsia Farmacorresistente	18
1.7 Cierre del capítulo	20
Capítulo 2: Descubrimiento de fármacos	26
2.1 Introducción	27
2.1.a Origen de los fármacos	28
2.2 Descubrimiento del compuesto líder.....	29
2.2.a Descubrimiento por casualidad (Azar, Serendipia)	29
2.2.b Medicina tradicional	30
2.2.c Aislamiento de productos naturales.....	31
2.2.d Screening de alta performance (<i>High throughput screening</i> , HTS).....	31
2.2.e Búsqueda de fármacos asistida por computadora (Cribado virtual).....	32
2.3 Optimización del compuesto líder	36
2.3.a Variación del sustituyente	37
2.3.b Extensión de la Estructura	37
2.3.c Extensión o contracción de cadenas laterales o anillos.....	38
2.3.d Isómeros.....	39
2.3.e Bioisómeros.....	40
2.3.f Optimización asistida por computadora (in silico).....	41
2.4 Cierre del capítulo	42
Capítulo 3: Síntesis orgánica.....	48
3.1 Consideraciones generales y síntesis típicas de amidas	49

3.1.a Síntesis de amidas a partir de ácidos carboxílicos	52
3.1.b Síntesis de amidas a partir de ésteres	54
3.2 Síntesis de amidas vía radiación microondas.....	55
3.2.a Síntesis de amidas vía microondas a partir de ácidos	58
3.2.b Síntesis de amidas vía microondas a partir de ésteres.....	60
3.3 Síntesis de derivados N-sustituidos de 1,2,3-oxatiazolidin-4-ona 2,2-dióxidos ...	60
3.4 Cierre del capítulo	62
Capítulo 4: Identificación de agentes anticonvulsivos y blancos moleculares	68
4.1 Introducción	69
4.2 Identificación de nuevos agentes anticonvulsivos.....	70
4.3 Identificación de los blancos moleculares	73
4.3.a Patch Clamp	74
4.4 Cierre del capítulo	76
Capítulo 5: Síntesis de amidas y sus derivados cíclicos	80
5.1 Consideraciones generales de síntesis.....	81
5.2 Síntesis de amidas a partir del éster	82
5.2.a Metodología vía radiación microondas	83
5.2.b Metodología vía convencional catalizada por TBD.....	83
5.2.c Resultados de síntesis de amidas a partir del éster.....	84
5.3 Síntesis de amidas a partir del ácido.....	87
5.3.a Metodología vía convencional a partir del ácido.....	88
5.3.b Resultados de síntesis de amidas a partir del ácido	88
5.4 Síntesis de derivados N-sustituidos de 1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxidos ...	89
5.4.a Metodología de reacción de ciclación	89
5.4.b Metodología de reacción de oxidación	90
5.4.c Resultados de la síntesis de derivados N-sustituidos de 1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxidos	90
Capítulo 6: Ensayos biológicos in vivo, in silico e in vitro de amidas y sus derivados cíclicos.....	94
6.1 Evaluación de actividad biológica in vivo	95
6.2 Identificación del blanco molecular	98
Capítulo 7: Diseño y síntesis de nuevos derivados de α -hidroxiamidas	108
7.1 Diseño de α -cloroamidas.....	109

7.1.a Metodología de síntesis	110
7.1.b Resultados de la síntesis de α -cloroamidas	111
7.2 Diseño de éteres simétricos	112
7.2.a Metodología de síntesis de éteres simétricos	115
7.2.b Resultados de la síntesis de éteres simétricos	115
7.3 Evaluación de actividad biológica in vivo	116
Capítulo 8: Análisis de resultados y conclusiones	119
Anexo 1: Glosario y abreviaturas.....	126
Anexo 2: Espectros de RMN	129
Anexo 3: Modelado del canal de sodio Nav1.2	148
Anexo 4: Detalles metodológicos de Patch Clamp.....	157

Objetivos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen más de 50 millones de personas en el mundo con Epilepsia, concentrándose la mayor proporción en países en vías de desarrollo. En Argentina, particularmente, se estima que 1 de cada 100 personas padece esta enfermedad.

El tratamiento de primera elección para controlar la Epilepsia es la farmacoterapia, la cual es sólo eficiente en el 70% de los pacientes. Esta resistencia a fármacos, y los efectos adversos asociados a las drogas antiepilépticas en pacientes responsivos, son problemas de difícil abordaje que no han podido resolverse completamente con la incorporación de nuevas generaciones de compuestos activos. En consecuencia, el descubrimiento de anticonvulsivos más seguros y eficaces constituye un desafío tanto para sectores de la industria como de la academia. En este contexto, la presente tesis doctoral tiene como **objetivo general** aportar nuevas estructuras activas que surgen del empleo exitoso de metodologías de diseño de fármacos, síntesis y evaluación biológica. Para ello se generó una familia de α -hidroxiamidas N-sustituidas, las cuales fueron el punto de partida para la construcción de derivados cíclicos y también otras estructuras que incorporan grupos halógenos o éteres.

A continuación, se listan los **objetivos específicos**:

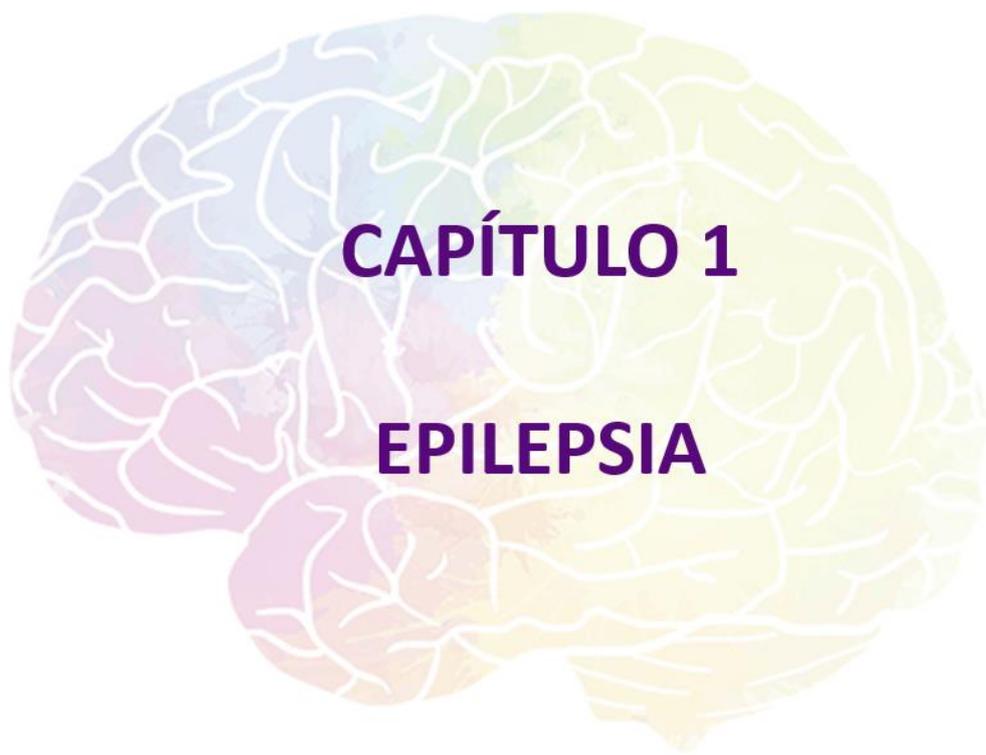
1. Sintetizar α -hidroxiamidas empleando metodologías que incluyen el uso de catalizadores y de radiación microondas.
2. Sintetizar moléculas con esqueleto oxatiazolidina-4-ona-2,2-dióxido (OTZ). Estas estructuras guardan relación biosósterica con Fenitoína, un anticonvulsivo de actual uso clínico.
3. Determinar la actividad anticonvulsiva in vivo de los compuestos obtenidos en los objetivos específicos 1 y 2 utilizando el modelo murino de electrochoque máximo (MES TEST)
4. Estudiar la interacción de los compuestos sintetizados con los canales de sodio operados por voltaje (blanco molecular de anticonvulsivos) mediante ensayos in silico e in vitro.

5. Diseñar y sintetizar mediante metodologías sencillas y asequibles nuevas moléculas activas derivadas de las α -hidroxiamidas: α -cloroderivados y 2,2'-oxibisacetamidas.
6. Evaluar la actividad anticonvulsiva de los compuestos obtenidos en el objetivo específico 5.

La presente tesis se ha ordenado por capítulos. Los primeros cuatro, de índole teórica, posibilitan una contextualización de esta investigación en los aspectos más relevantes de la enfermedad abordada y de las herramientas de descubrimiento de fármacos. Se describe a la Epilepsia y sus tratamientos (1), el proceso de desarrollo y optimización de fármacos (2), las metodologías de síntesis orgánica empleadas (3) y la identificación de la actividad anticonvulsiva y blancos moleculares (4).

Los capítulos 5, 6 y 7 narran las condiciones específicas de las metodologías empleadas y muestran los resultados obtenidos. Para finalizar en el capítulo 8 se desarrolla el análisis de los resultados, juntamente con las conclusiones y perspectivas futuras.

Adicionalmente la tesis cuenta con 4 anexos que complementan el trabajo realizado. El 1 consiste en un glosario de términos y abreviaturas, el 2 permite visualizar los espectros de RMN de los compuestos obtenidos, el 3 brinda información técnica sobre el desarrollo del modelo 3D del canal de sodio y por último el 4 se expone sobre el fundamento y protocolo del método de Patch Clamp.



Capítulo 1

Epilepsia

1.1 La Epilepsia en números

La Epilepsia es una enfermedad neurológica caracterizada por crisis recurrentes, que suelen dar lugar a consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO) más de 50 millones de personas en el mundo sufren Epilepsia,¹ lo que la clasifica entre las enfermedades neurológicas más frecuentes (segunda luego de la enfermedad cerebrovascular).²

Diversos estudios sugieren que la incidencia y prevalencia de la Epilepsia son mayores en los países de escasos recursos, especialmente en las áreas rurales.^{3,4,5} De los 50 millones de personas afectadas, 40 millones viven en países en vías de desarrollo. Particularmente en América Latina y el Caribe se encuentran el 20 por ciento de los enfermos (unos 5 millones de personas).⁶

De acuerdo a los datos de la Liga Argentina Contra la Epilepsia (LACE), en nuestro país la prevalencia oscila entre el 4 al 10 por 1000 habitantes, es decir que aproximadamente una de cada cien personas padece la enfermedad.⁷ Estas cifras evidencian la importancia de la Epilepsia tanto a nivel mundial como local, y justifican el esfuerzo de la industria y de la academia para el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces y seguros.

1.2 Comorbilidades

Tal como se mencionó anteriormente, las consecuencias de la Epilepsia no solo responden a cambios neurobiológicos producto de las reiteradas crisis, sino que también quienes la padecen enfrentan en mayor o menor medida cambios a nivel cognitivo, psicológico y social. En este sentido vale la pena mencionar los trastornos del comportamiento y/o psiquiátricos (hiperactividad con déficit de atención, ansiedad,

problemas de aprendizaje, discapacidad intelectual y autismo),⁸ el mayor riesgo a tener accidentes como caídas, quemaduras o muerte por ahogamiento y el aumento en la probabilidad para desarrollar infecciones respiratorias, trastornos hormonales⁹ y/o accidentes cerebro vasculares.¹⁰

Esta desmejora en la calidad de vida posiciona a la depresión como el trastorno psiquiátrico más frecuente en personas con Epilepsia,¹¹ aumentando el riesgo de suicidio y dificultando las respuestas adecuadas a los diversos tratamientos.

Otras complicaciones menos frecuentes y posiblemente mortales de la Epilepsia pueden ser:

- **Estado epiléptico (status epiléptico):** Este trastorno ocurre si la persona atraviesa un estado de actividad convulsiva continua durante más de cinco minutos, o si luego de crisis recurrentes y frecuentes no recupera el conocimiento por completo. Las personas que experimentan el estado epiléptico tienen un mayor riesgo de sufrir daño cerebral permanente o la muerte.
- **Muerte súbita inesperada en la epilepsia (SUDEP):** Las personas con Epilepsia también tienen riesgo de sufrir muerte súbita. Se desconoce la causa, pero algunas investigaciones indican que puede ocurrir debido a trastornos cardíacos y/o respiratorios.¹²

1.3 Causas

La Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) ha definido seis categorías etiológicas, no jerarquizadas ni autoexcluyentes:¹³

- **Genética:** Las mutaciones en algunos genes pueden causar de manera selectiva Epilepsia o síndromes epilépticos.¹⁴ Las Epilepsias asociadas a estas anomalías muestran una gran heterogeneidad. Se cree que el 70 – 80 % de los casos están asociados a uno o más factores genéticos.¹⁵
- **Estructural:** Se observan alteraciones en las pruebas de neuroimagen, tales como un ictus, un traumatismo craneal o un tumor cerebral.

- **Infecciosa:** Las infecciones son probablemente el factor de riesgo prevenible más común en todo el mundo, particularmente en entornos de escasos recursos.¹⁶ Si bien algunas de las etiologías de este tipo pueden también ser consideradas como estructurales (meningitis, toxoplasmosis cerebral, encefalitis viral), la correcta clasificación impacta sobre el tratamiento y por lo tanto esta clase tiene prioridad sobre la categorización estructural.
- **Metabólicas:** Algunas alteraciones metabólicas pueden dar lugar a la aparición de la Epilepsia como característica central, tal es el caso de las porfirias o las convulsiones dependientes de piridoxina (vitamina B6).¹⁷
- **Inmunes:** Ocurren como resultado de una alteración autoinmune que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC), ejemplos son la encefalitis límbica, de tronco encefálico o cerebelo.¹⁸
- **Desconocida:** Pertenecen a esta clasificación los casos en que, pese a la evolución diagnóstica, la causa de la Epilepsia no está clara o no se conoce.

1.4 Crisis epiléptica

Se denomina crisis epiléptica a la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anómala excesiva o simultánea en el cerebro.¹⁹ Las crisis, según la propuesta de la ILAE,¹³ se clasifican de acuerdo con su inicio en generalizada, focal o desconocida:

- **Crisis generalizadas:** Son aquellas que se inician en algún punto de una red neuronal que rápidamente involucra a redes distribuidas bilateralmente. Pueden pertenecer a estructuras corticales o subcorticales.
- **Crisis focales:** Son aquellas que se originan en redes neuronales limitadas a un hemisferio.
- **Crisis con forma de comienzo desconocido:** La expresión “de comienzo desconocido” se usa en el caso de crisis en las que no está claro si el comienzo es focal o generalizado. El ejemplo típico son los espasmos infantiles, en los que tradicionalmente hubo controversia, y los conocimientos actuales no permiten especificar el modo de inicio como focal o generalizado.

Además, cada una de las crisis puede agruparse en subcategorías de: motoras/no motoras, y en particular para las crisis focales sin/con alteración del nivel de conciencia. Por otra parte, de acuerdo con la cantidad y tipo de crisis, el cuadro clínico general, la información genética, los hallazgos electroencefalográficos (EEG) y pruebas de laboratorio la Epilepsia puede ser clasificada como: focal, generalizada, focal y generalizada y desconocida.²⁰

La tabla 1.1 resume las características principales de cada clasificación.

Clasificación de Epilepsia	Características
Focal	Crisis focales con pérdida de conciencia Crisis focales motoras y no motoras. Crisis bilaterales tónico-clónicas.
Generalizada*	Crisis de ausencia, mioclónicas, atónicas. Crisis tónico-clónicas.
Focal y Generalizada**	Ambos tipos de crisis.
Desconocida	No se dispone de suficiente información. Se desconoce el tipo de crisis, no se dispone de EEG, o no brinda información relevante.

Tabla 1.1: Características principales de las distintas clasificaciones de Epilepsia. Adaptado de Scheffer, I et al. (2017)²¹

*El significado médico de cada término se puede leer en el Anexo 1..

** Algunos ejemplos frecuentes en los que tienen lugar ambos tipos de crisis son el síndrome de Dravet y el síndrome de Lennox-Gastaut.

1.5 Tratamientos

Iniciando la Edad Antigua hasta la actualidad, la Epilepsia ha sido redefinida en cientos de ocasiones. Ha pasado de atribuírsele un origen divino a definirse como una enfermedad cada vez más estudiada y descrita con rigor científico. Por esta razón, los tratamientos históricamente evolucionaron desde pociones herbales, rituales religiosos y trepanaciones hasta las opciones contemporáneas fundamentadas en el conocimiento neurocientífico.

Un tratamiento se considera efectivo cuando logra controlar las crisis sin perder de vista los efectos adversos y las posibles consecuencias psicosociales del mismo. A continuación, se enumeran las terapias más utilizadas en la actualidad.

1.5.1 Terapias no farmacológicas

1.5.1.1 Cirugías

Los tratamientos quirúrgicos incluyen la resección, destrucción o desconexión del tejido cerebral epiléptico junto con la neuroestimulación, que se puede aplicar a varias estructuras cerebrales o a los nervios craneales. El objetivo a lograr es modular las redes cerebrales que generan ataques o abortar los ataques una vez detectados.²²

Dependiendo de la ubicación del foco epiléptico, el tipo de crisis y la edad del paciente, los procedimientos quirúrgicos más comunes varían entre: lobectomía, transección subpial múltiple, callasotomía o hemisferectomía.²³

Si bien los avances en imágenes cerebrales (que ayudan a identificar las causas estructurales y funcionales junto a las consecuencias de las crisis), han permitido mejoras sustanciales en este tipo de tratamiento, los procedimientos quirúrgicos como intento para tratar la Epilepsia no son una innovación reciente.²⁴ Los primeros experimentos de cirugías para la Epilepsia datan de culturas antiguas. En la Imagen 1.1 se pueden apreciar dos expresiones artísticas que evidencian la evolución de este tipo de terapia.



Imagen 1.1 A. Cauterización del cráneo como forma de limpiar el cuerpo de los espíritus malignos. *Tratamiento de la epilepsia del atlas quirúrgico Cerrahiyetül Haniye (cirugía imperial)*. Dibujado en el siglo XV (1465). B. La pintura fue creada en el año 2013 con una secuencia de reloj. En el lado izquierdo se observa una tormenta, la enfermedad está activa y las neuronas están enfermas (negras). En el centro, el paciente está de pie y recibe el apoyo del equipo médico. Después de la cirugía, el paciente está rodeado de neuronas sanas de color blanco. *Tomadas de Ladino, L. et al. (2013)*²⁵

1.5.1.2 Dispositivos

El uso de dispositivos para neuroestimulación es un complemento potencial a la terapia farmacológica fallida en pacientes con Epilepsia resistente a fármacos (o refractaria), sobre todo en casos donde no es posible realizar tratamientos quirúrgicos en el cerebro o no se deseen hacerlos.²⁶ El método consiste en la aplicación de pulsos eléctricos sobre el tejido nervioso con el objeto de alterar el sustrato patológico y de esta forma alcanzar un efecto terapéutico. Durante más de 20 años, la neuroestimulación se ha limitado al nervio vago (Imagen 1.2). En esta técnica un generador, implantado de forma subcutánea en la parte superior izquierda del pecho, envía pulsos eléctricos a un electrodo unido al nervio vago izquierdo cervical. Aunque el mecanismo de acción de la estimulación intermitente vagal se desconoce, se cree que podría inhibir la sincronización de los distintos núcleos que se deben descargar al unísono para que la actividad eléctrica cerebral normal se convierta en una actividad epileptógena.²⁷

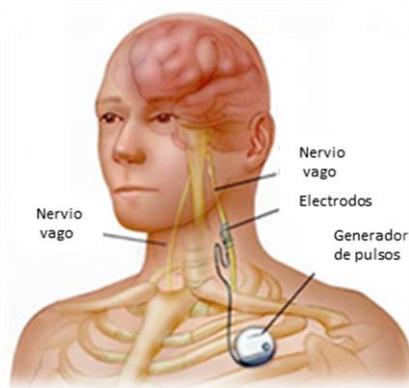


Imagen 1.2: Dispositivo para neuroestimulación del nervio vago.

Imagen adaptada de <http://heatherdane.com/>

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas como la neuroestimulación del cerebro y la estimulación cerebral profunda, las cuales se encuentran en estudios preliminares, pero han arrojado resultados prometedores.²⁸

1.5.1.3 Dieta cetogénica

Las dietas se han utilizado en un intento de controlar las crisis epilépticas a lo largo de los siglos. De hecho, hay una referencia bíblica indicando la oración y el ayuno como tratamiento.²⁹

Durante los últimos 100 años, la dieta cetogénica se ha empleado para controlar las crisis con una alta tasa de éxito, a menudo mayor que los nuevos fármacos anticonvulsivos (FAEs). Si bien es aplicable a todas las edades, es más eficaz en niños en edad escolar.³⁰

La misma se basa en sustituir los hidratos de carbono de la dieta por lípidos, generando cuerpos cetónicos (beta-hidroxibutirato, acetoacetato y acetona en menor medida), que serán la fuente de energía para el cerebro. Además, la dieta cetogénica favorece la síntesis de glutamina (precursora del ácido γ -aminobutírico, GABA, un neurotransmisor inhibitorio) que, al ser estructuralmente similar al GABA, tendría una acción directa antiepiléptica.³¹

Otra dieta alternativa a la cetogénica es la dieta Atkins, que consiste en la ingesta libre de proteínas y grasas y en la restricción de carbohidratos. Ésta también induce a un estado de cetosis, aunque de manera más sencilla debido a que resulta ser menos restrictiva.³²

1.5.2 Terapias farmacológicas

La terapia farmacológica es el método más empleado para tratar la Epilepsia. El objetivo final de todos los FAEs es controlar las crisis lo más rápido posible y sin efectos adversos.³³

La historia de la farmacoterapia antiepiléptica inicia en 1857 con el descubrimiento de que ciertas sales de Bromo disminuían la frecuencia de las crisis en pacientes epilépticos. Pese a los efectos adversos tales como trastornos neurológicos y psicosis, los bromuros fueron la base terapéutica durante 50 años. Fue recién a principios del siglo XX que aparece comercializada una nueva droga que demostraba ser más efectiva y menos tóxica: el Fenobarbital. Posteriormente surgieron el Mefobarbital y la Primidona como nuevos barbitúricos con actividades semejantes a su predecesor. En 1939, el Consejo

de Farmacia y Química de la Asociación Médica Americana, aceptó la difenilhidantoína (Fenitoína) como una opción terapéutica para aquellos pacientes epilépticos que no eran beneficiados por el Fenobarbital o los bromuros, y en aquellos en los cuales estos fármacos provocaban reacciones adversas.³³ Después de la introducción de la Fenitoína, comenzó a comercializarse en Estados Unidos la Trimetadiona en el año 1946, como fármaco de elección para las crisis de ausencia. A este último le siguieron las succimidas: Fensuximida (1953), Methsuximida (1957) y la Etosuximida (1958).

A inicios de los años 60' se incluyeron en los ensayos clínicos una familia de benzodiazepinas, de las cuales Clonazepam, Diazepam y Clobazam fueron los más estudiados. Durante la misma década se aprueba el uso de la Carbamazepina, resultando ser uno de los fármacos más comúnmente prescritos.

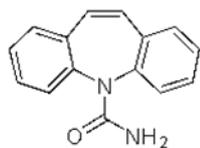
Posteriormente en 1964 se descubren las propiedades anticonvulsivas del Ácido valproico que, con el correr de los años, se consolida como un antiepiléptico de amplio espectro.

Sin grandes desarrollos durante 15 años, fue durante la "década del cerebro" (fines del siglo XX) que surgen nuevos fármacos con algunas ventajas en la farmacocinética, tolerabilidad y potencial de interacción con otros medicamentos. En esta etapa se aprueba el uso de Felbamato, Lamotrigina, Topiramato, Gabapentina, Vigabatrina, Tiagabina, Oxcarbazepina, Levetiracetam y Zonizamida.³⁴

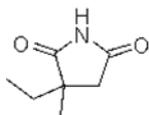
Finalmente durante las últimas dos décadas, las compañías farmacéuticas han creado y licenciado aproximadamente otros 20 nuevos FAEs entre los que se encuentran: Brivaracetam, Lacosamida, Rufinamida, Pregabalina y Talampanel.³⁵

Hoy en día los médicos disponen de tres generaciones de FAEs (Imagen 1.3). Al iniciar un tratamiento se suele recetar una dosis baja de un solo fármaco para posteriormente elevarla progresivamente hasta lograr una dosis óptima. Si las crisis persisten se puede reemplazar el fármaco inicial (monoterapia alternativa) o complementar con otra medicación (terapia de combinación).³⁶

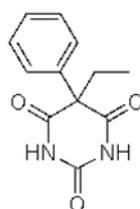
Primera generación



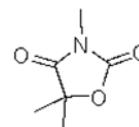
Carbamazepina



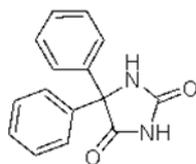
Etosuximida



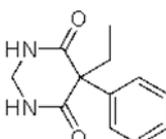
Fenobarbital



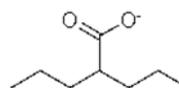
Trimetadiona



Fenitoína

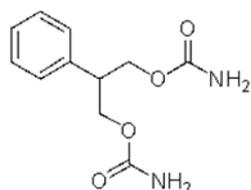


Primidona

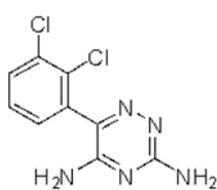


Valproato

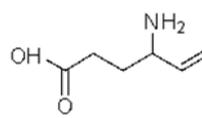
Segunda generación



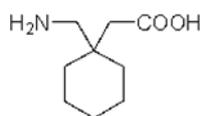
Felbamato



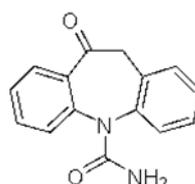
Lamotrigina



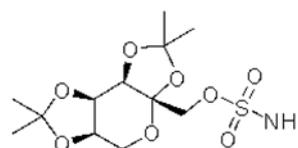
Vigabatrina



Gabapentina

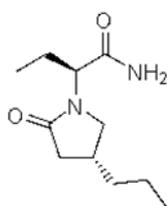


Oxcarbazepina

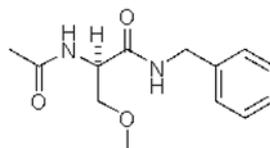


Topiramato

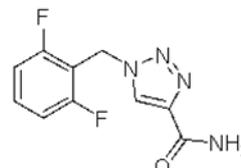
Tercera generación



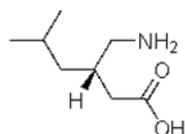
Brivaracetam



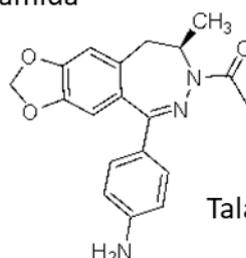
Lacosamida



Rufinamida



Pregabalina



Talampanel

Imagen 1.3. Ejemplos de estructuras de fármacos anticonvulsivos.

1.5.2.1 Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos

Los estudios básicos y clínicos han reconocido al menos cuatro mecanismos de acción de los actuales FAEs:³⁷

- Modulación de canales iónicos operados por voltaje.
- Incremento de la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido γ -aminobutírico.
- Disminución de la transmisión excitatoria, particularmente mediada por glutamato.
- Modulación directa de la liberación sináptica a través de los efectos en los componentes de la maquinaria de liberación.

Todos estos mecanismos conducen a disminuir la excitabilidad neuronal y algunos fármacos pueden actuar a través de más de uno de ellos, ampliando su espectro de acción. En la Imagen 1.4 se resumen los blancos moleculares conocidos junto con algunos de los FAEs más empleados.

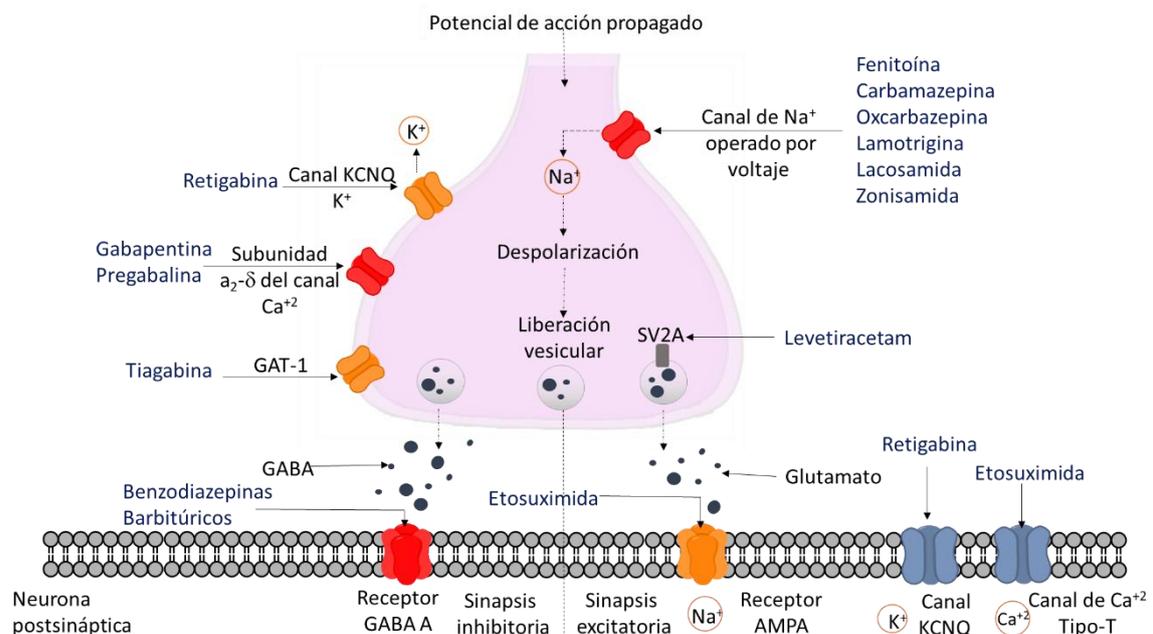


Imagen 1.4 Mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos.

Abreviaturas: AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; GABA, ácido γ -aminobutírico; GAT-1, transportador 1 de GABA dependiente de sodio y cloruro; SV2A, glicoproteína 2A de vesículas sinápticas. *Adaptado de Schimdt, D. et al. (2014)*³⁸

A continuación, se describirán brevemente los mecanismos de acción previamente enunciados, con un mayor detalle en el bloqueo de los canales de sodio operados por voltaje, dado que es el blanco molecular considerado en esta tesis.

1.5.2.1.a Modulación de canales iónicos operados por voltaje

i. Canales de sodio dependiente de voltaje

Los canales de sodio dependientes de voltaje juegan un papel esencial en el inicio y la propagación de potenciales de acción en las neuronas.³⁹ Se encuentran expresados a lo largo de toda la membrana neuronal, en las dendritas, soma, axones y terminales nerviosas. Están compuestos por una subunidad proteica α (de un tamaño de aproximadamente 260 kDa), que constituye la región del poro y el sensor de voltaje; y de una o más subunidades proteicas β (30-40 kDa), que pueden modificar la función de la subunidad α pero no son esenciales para la actividad básica del canal.⁴⁰

Las subunidades α del canal de sodio están codificadas por 10 genes que dan lugar a diferentes isoformas, las cuales se expresan en diferentes tejidos excitables. Las isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 son los canales de sodio primarios en el SNC, mientras que Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 se encuentran en el periférico. La isoforma Nav1.4 es el canal de sodio primario en el músculo esquelético, en tanto que Nav1.5 es primario en el corazón.⁴¹

Desde el punto de vista estructural, las subunidades α del canal de sodio están compuestas aproximadamente por 2000 aminoácidos organizados en cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembrana (Imagen 1.5A).⁴² Los extremos amino y carboxilo de la proteína son intracelulares. Los segmentos transmembrana quinto y sexto (S5 y S6) y el bucle entre ellos forman el poro del canal y confieren selectividad para el catión Na^+ . Los aminoácidos cargados positivamente en S4 sirven como sensor de voltaje, el cual inicia un cambio de conformación que permite abrir el canal tras la despolarización de la membrana. La unión citoplasmática entre los dominios III y IV actúa como compuerta de inactivación (Imagen 1.5 A).⁴²

Una característica interesante de estas macromoléculas es que los canales de sodio dependientes de voltaje poseen tres estados conformacionales: **desactivado**, **abierto** e **inactivado** (Imagen 1.5 B).³⁹

Durante el potencial de membrana en reposo, el canal está desactivado y la compuerta de inactivación abierta. Tras la despolarización de la membrana, el canal se abre permitiendo que Na^+ ingrese a la célula (estado activado). Posteriormente, la compuerta

se cierra ocluyendo el poro en un estado de inactivación y luego finalmente el canal se cierra desactivándose nuevamente. Éste último paso se lleva cabo cuando la membrana se hiperpolariza durante un periodo de tiempo suficiente (tiempo de recuperación).⁴³ En relación con su empleo como blancos moleculares, estas macromoléculas son bloqueadas por drogas de uso clínico como los anestésicos locales, antiarrítmicos y ciertos antiepilépticos.⁴³ Dentro del último grupo los más conocidos son: Fenitoína, Carbamazepina y Lamotrigina. Estas moléculas se unen en un sitio al que principalmente puede accederse durante el estado inactivado y no en el estado de reposo del canal.⁴⁴ Debido a que en condiciones patológicas el canal de sodio adopta el estado inactivado con mayor frecuencia, los fármacos bloqueantes adquieren selectividad funcional y por lo tanto una mayor seguridad terapéutica.

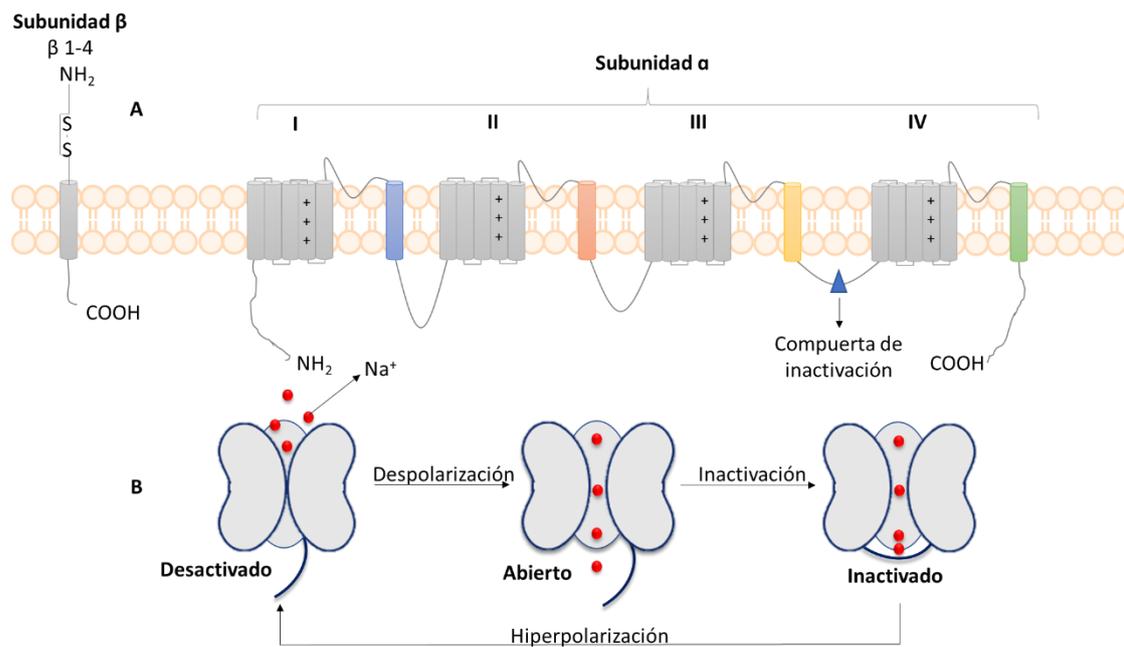


Imagen 1.5 A. Topología de la membrana del canal de sodio dependiente de voltaje. Los segmentos transmembrana se muestran como cilindros. La subunidad α que forma los poros y detecta el voltaje comprende cuatro dominios (etiquetados I - IV), cada uno con seis segmentos transmembrana. Las subunidades β tienen un único segmento transmembrana. $\beta 1$ y $\beta 3$ tienen interacciones no covalentes con la subunidad α , en tanto que $\beta 2$ y $\beta 4$ se encuentran unidas covalentemente mediante puentes disulfuro. B. Estados del canal de sodio dependiente de voltaje. Adaptado Mantegazza, M. et al. (2010).³⁹

ii. Canales de calcio dependiente de voltaje

Se considera que las corrientes de calcio contribuyen al desarrollo de la Epilepsia por el aumento de las respuestas postsinápticas en somas y dendritas durante varios períodos de excitación excesiva. Además, la activación de los canales de calcio desencadena cambios en la expresión génica, lo que sugiere su participación en el desarrollo de la epilepsia de tipo crónico.⁴⁵

Existen canales de calcio de bajo umbral y canales de umbral alto, de acuerdo con el potencial de membrana con el cual son activados.⁴⁶ Los canales de bajo umbral son los del tipo T, que están muy vinculados con la generación de las llamadas crisis de ausencia.⁴⁷ Los fármacos que tienen acción principalmente sobre canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son el Ácido valproico y la Etosuximida, lo que explica por qué estos fármacos son especialmente efectivos en estos tipos de crisis.

iii. Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de potasio participan en la repolarización e hiperpolarización de la membrana. Sus alteraciones pueden provocar un estado de hiperexcitabilidad que facilita la aparición de las crisis.⁴⁸ La Fenitoína puede reducir la corriente de potasio, lo que puede justificar algunos de sus efectos proconvulsivos. Por el contrario, algunos antiepilépticos como la Oxcarbacepina, Retigabina y Topiramato activan canales de potasio, lo que puede explicar, al menos en parte, su efecto anticonvulsivo.⁴⁷

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

El ácido γ -aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio en la corteza cerebral. Las neuronas sintetizadoras de GABA (GABAérgicas) se localizan en prácticamente todas las estructuras del SNC, así como también casi todas las neuronas del SNC poseen receptores para el GABA (neuronas postsinápticas) o autoreceptores (neuronas presinápticas GABAérgicas). La inhibición GABAérgica permite la sincronización de la actividad en redes neuronales y contribuye a la generación de una variedad de patrones de actividad cerebral.⁴⁹

Existen dos familias de estos receptores: los GABA-A (postsinápticos) y los GABA-B (postsinápticos o presinápticos).

Una amplia variedad de experimentos ha demostrado que las sustancias bloqueadoras de la neurotransmisión GABAérgica producen convulsiones en tejidos de control y, por otro lado, que los diversos potenciadores del sistema GABAérgico presentan acciones anticonvulsivas en pacientes humanos. Por lo tanto, se ha sugerido que la actividad GABAérgica evita las convulsiones.⁵⁰

Los fármacos que actúan a nivel del GABA pueden ser clasificados como:

1. Fármacos que aumentan la actividad GABAérgica.
 - Agonistas del receptor GABA-A: barbitúricos y benzodiazepinas.
 - Agonistas del receptor GABA-B: El único fármaco aprobado al momento por la FDA (Food and Drug Administration) que actúa sobre este receptor es el relajante muscular Baclofeno, pero es inactivo en los receptores GABA-A. Este fármaco no está indicado en la Epilepsia, ya que puede empeorar las convulsiones.⁵¹
 - Análogos de GABA: Ácido valproico, Pregabalina, Gabapentina.
2. Fármacos que aumentan la concentración de GABA: Este es el caso de Tiagabina, que inhibe específicamente la GAT-1 (una de las cuatro proteínas transportadoras del GABA sináptico) y de la Vigabatrina que inhibe de manera irreversible la GABA-T (enzima encargada del catabolismo del GABA).⁵²

1.5.2.1.c Disminución de la transmisión excitatoria del SNC mediada por glutamato

El glutamato, uno de los neurotransmisores más abundantes en el sistema nervioso, realiza su acción excitatoria actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Los mismos son clasificados como ionotrópicos y metabotrópicos. Entre los receptores de glutamato ionotrópicos postsinápticos se encuentran los del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), los cuales son críticos para la neurotransmisión excitatoria rápida. Por otra parte, los del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) median gran parte de los potenciales excitatorios sinápticos lentos que son esenciales para el procesamiento global de la información.⁵³

Los receptores AMPA tienen un papel especial en la actividad epiléptica, ya que la sincronización epiléptica no puede ocurrir cuando los receptores AMPA están bloqueados.⁵⁴ Por lo tanto, el bloqueo farmacológico de estos receptores se constituye como una buena estrategia para la generación de fármacos con actividad anticonvulsiva. En este sentido, Perampanel (antagonista no competitivo del receptor AMPA), es hasta el momento el único fármaco anticonvulsivo disponible para uso clínico que se dirige selectivamente a los receptores AMPA.⁵⁵

Por otro lado, la acción antagonista sobre el receptor NMDA parece ser el mecanismo de acción de algunos agentes anticonvulsivos y neuroprotectores novedosos, como el Felbamato, que ejerce sus efectos antiepilépticos mediante el bloqueo del sitio de reconocimiento de la glicina en dicho blanco molecular.⁵⁶

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

La proteína de la vesícula sináptica 2 (SV2) es una glicoproteína integral de membrana. Es necesaria para la neurotransmisión normal y puede intervenir en la regulación de la exocitosis estimulada por el calcio.⁵⁷ Los mecanismos precisos de SV2A en la regulación de la liberación sináptica de neurotransmisores se encuentran aún en estudio.⁵⁸ Sin embargo, SV2 ya se ha incorporado como blanco molecular de anticonvulsivos debido a estudios recientes sobre el fármaco Leviteracetam, los cuales sostienen que su principal mecanismo de acción es su interacción con dicha proteína.⁵⁹

1.6 Epilepsia Farmacorresistente

Si bien la tercera generación de drogas antiepilépticas ha ampliado las opciones terapéuticas, aún hay **un 30 % de los pacientes que no logra controlar las crisis con el tratamiento farmacológico actual.**

La ILAE define la epilepsia refractaria como “aquella en la cual se ha producido el fracaso de 2 ensayos de fármacos antiepilépticos, en monoterapia o en combinación, tolerados, apropiadamente elegidos y empleados de forma adecuada, para conseguir la ausencia mantenida de crisis.”⁶⁰

Desde el punto de vista molecular, se plantean diferentes hipótesis que intentan explicar el fenómeno de farmacoresistencia en Epilepsia.⁶¹ A continuación, se realiza una breve descripción de las más reconocidas:

- **Hipótesis de los transportadores:** Esta hipótesis plantea la posibilidad de que exista una sobreexpresión de transportadores de eflujo (ver Anexo 1) en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, de los astrocitos y de las neuronas, en los pacientes con Epilepsia refractaria. Como consecuencia de esto, muchos fármacos liposolubles, que en teoría tendrían una alta difusión al SNC, presentan baja eficacia y bajas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo. Estas moléculas transportadoras de eflujo pertenecen a un grupo de proteínas transmembrana dependientes de ATP, que se denominan ABC (del inglés ATP-binding cassette). En esta familia, las más estudiadas son la glicoproteína-P (P-gp) y las proteínas de multiresistencia a medicamentos (MRP), específicamente la MRP1, la MRP2 y la MRP5.⁶²
- **Hipótesis farmacocinética:** En este caso también se postula una sobreexpresión de transportadores de eflujo que, a diferencia de la hipótesis anterior, se produce en órganos periféricos (hígado, intestino, riñón). Como consecuencia, los niveles plasmáticos de FAEs se ven disminuidos y por lo tanto se reduce la cantidad de droga capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y alcanzar el foco epiléptico cerebral.⁶³
- **Hipótesis del blanco:** Plantea la posibilidad de que existan alteraciones en el sitio de acción de los FAEs. Estos cambios pueden ser genéticos (por ejemplo, una mutación del gen SCN1B de la subunidad $\beta 1$ del canal de sodio)⁶⁴ o adquiridos (como la internalización de receptores gabaérgicos durante la evolución del status epiléptico).⁶⁵
- **Hipótesis de la red neuronal:** Postula que, como consecuencia de las crisis epilépticas, se producen degeneraciones y remodelaciones sobre las redes neuronales, las cuales suprimen el sistema de control de convulsiones del cerebro.⁶⁶
- **Hipótesis de la gravedad intrínseca:** Propone que la farmacoresistencia es inherente a la enfermedad, por lo que si las crisis se desencadenan fácilmente,

entonces una dosis habitual de una droga determinada no será capaz de controlarla.⁶⁷

1.7 Cierre del capítulo

En el presente capítulo se ha realizado una presentación de la Epilepsia, de sus causas, tipos de crisis y clasificación. Adicionalmente, se llevó a cabo una descripción histórica de los posibles tratamientos, realizando especial hincapié en la terapia farmacológica. Se expusieron los diversos mecanismos de acción de los FAEs, profundizando en el bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje. Por último, se definió la Epilepsia farmacorresistente y se analizaron las diversas hipótesis que pueden explicar este fenómeno. Por todo lo expuesto queda claro que la complejidad intrínseca y heterogeneidad de la Epilepsia justifica la constante búsqueda de nuevos fármacos anticonvulsivos tendientes a lograr mayor potencia, selectividad y menor toxicidad. En el capítulo siguiente se describirán herramientas que pueden emplearse para lograr tan ambicioso objetivo.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. (2018) <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.
2. Muñiz Landeros, C. E. Neurología Clínica de Rangel Guerra, 1^{era} Edición (2015).
3. B Bell, G., et al. The worldwide prevalence of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 958–962 (2014).
4. Forsgren, L., et al. The epidemiology of epilepsy in Europe - A systematic review. *Eur. J. Neurol.* **12**, 245–253 (2005).
5. Banerjee, P. et al. The descriptive epidemiology of epilepsy-A review. *Epilepsy Res.* **85**, 31–45 (2009).
6. Vivir con Epilepsia. ¿La epilepsia es más frecuente en unas zonas que en otras? (2017) <https://vivirconepilepsia.es/la-epilepsia-mas-frecuente-unas-zonas-otras>.
7. Liga Argentina contra la Epilepsia (LACE).
http://www.lace.org.ar/aprendiendo_sobre_la_epilepsia.php
8. Stafstrom, Carl et al. Seizures and epilepsy: An overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 1–18 (2015).
9. Haseitel, M. et al . Trastornos hormonales en pacientes con epilepsia. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.* **52**, 108–112 (2015).
10. Chang, C. S. et al. Patients with epilepsy are at an increased risk of subsequent stroke: A population-based cohort study. *Seizure* **23**, 377–381 (2014).
11. Thomson, A. E. et al. Screening of major depression in epilepsy: The Neurologic Depression Disorders Inventory in Epilepsy. *Epilepsia* **55**, 331–334 (2014).
12. Surges, R. et al. Sudden unexpected death in epilepsy: Mechanisms, prevalence, and prevention. *Curr. Opin. Neurol.* **25**, 201–207 (2012).
13. Falco-Walter, J. et al. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* **139**, 73–79 (2018).
14. Wang, J. et al. Epilepsy-associated genes. *Seizure* **44**, 11–20 (2017).
15. Myers, C. T. et al. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med.* **7**, 1–11 (2015).
16. Vezzani, A. et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol.* **131**,

- 211–234 (2016).
17. Papetti, L. et al. Metabolic epilepsy: An update. *Brain Dev.* **35**, 827–841 (2013).
 18. U Uribe, R. et al. Autoimmune Encephalitis mediated by Antibodies. *Rev. Chil. Epilepsia* **3**, 23–31 (2016).
 19. Fisher, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475–482 (2014).
 20. Marino, E. et al. Epilepsia. *Prensa Med. Argent.* **69**, 840–847 (2015).
 21. Scheffer, I. et. al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 1–10 (2017).
 22. Moshé, S. L., et al. Epilepsy: New advances. *Lancet* **385**, 884–898 (2015).
 23. Noachtar, S. et al. Epilepsy surgery: A critical review. *Epilepsy Behav.* **15**, 66–72 (2009).
 24. Thijs, R. D., et al. Epilepsy in adults. *Lancet* **6736**, (2019) 25. Ladino, L. D., Hunter, G. & Téllez-Zenteno, J. F. Art and epilepsy surgery. *Epilepsy Behav.* **29**, 82–89 (2013).
 25. Ladino, L. D., et al. Art and epilepsy surgery. *Epilepsy Behav.* **29**, 82–89 (2013).
 26. De Giorgio, et al. Neurostimulation for drug-resistant epilepsy. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **19**, 743–755 (2013).
 27. García-March, G., et al. Estimulación eléctrica vagal en el tratamiento de la epilepsia rebelde. Situación actual. *Neurocirugía* **19**, 416–426 (2008).
 28. Benbadis, S. R. Neurostimulation for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav.* 5789 (2018).
 29. Evangelio según San Marcos. *Nuevo testamento* 9:14-29
 30. Sheth, R. D., et al. Nonpharmacological treatment options for epilepsy. *Semin. Pediatr. Neurol.* **12**, 106–118 (2005).
 31. López González, F. J. et al. Epilepsia resistente a fármacos. Concepto y alternativas terapéuticas. *Neurología* **30**, 439–446 (2015).
 32. Kossoff, E. H. et al. A modified Atkins diet is effective for the treatment of intractable pediatric epilepsy. *Epilepsia* **47**, 421–424 (2006).
 33. Eadie, M. J. The Use of Antiepileptic Drugs in Clinical Practice. **45**, 589–614 (1999).
 34. Roussó, T., et al. Aspectos Históricos del Tratamiento Farmacológico de la

- Epilepsia (2003) http://www.medicosecuador.com/revecuatneurol/vol12_n1-2_2003/aspectos_epilepsia.htm.
35. Luszczki, J., et al. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Reports* **61**, 1734–1740 (2009).
 36. Schmidt, D. Drug treatment of epilepsy: Options and limitations. *Epilepsy Behav.* **15**, 56–65 (2009).
 37. Rogawski, M. et al. Mechanisms of action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic diet. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 28 (2016).
 38. Schimidt, D., et al. Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ* **3**, 1–18 (2014).
 39. Mantegazza, M., et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* **9**, 413–424 (2010).
 40. Palestro, P. Búsqueda de nuevos anticonvulsivos a partir de métodos computacionales (2016). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53752>.
 41. Catterall, W. A. Sodium Channels, Inherited Epilepsy, and Antiepileptic Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **54**, 317–338 (2014).
 42. Catterall, W., et al. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol. Pharmacol.* **88**, 141–150 (2015).
 43. Rogawski, M. A, et al. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 553–564 (2004).
 44. Rodríguez, C., et al. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos. *Informed.* **12**, 321-326 (2010).
 45. Medel Matus, J. Participation of voltage-dependent calcium channels in the development of epilepsy. *Acta Bioq. Clínica Latinoamerica.* **44**, 329–35 (2010).
 46. Hofmann, F., et al. Molecular Basis for CA²⁺ Channel Diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 399–418 (1994).
 47. Armijo, J. A., et al. Mecanismo de acción de los antiepilépticos y nuevos antiepilépticos. *Rev. Neurol.* **43**, 17–41 (2006).
 48. Armijo, J. A., et al. Ion channels and epilepsy. *Rev Neurol* **30**, 25–41 (2000).
 49. Khazipov, R. GABAergic synchronization in epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 1–14 (2016).
 50. Vega, C. D. C., et al. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev. Neurol.* **42**, 159–168 (2006).

51. Chen, X., et al. An overview of the CNS-pharmacodynamic profiles of nonselective and selective GABA agonists. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2012**, 3-10 (2012).
52. Herranz, J. L. Tiagabina: Aspectos recientes y recomendaciones para su dosificación. *Rev. Neurol.* **27**, 101–103 (1998).
53. Barker-Haliski, Melissa. et al. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 1–15 (2015).
54. Rogawski, M. A. et al. Revisiting AMPA Receptors as an Antiepileptic Drug Target. *Epilepsy Currents*, **11**, No. 2, 56–63 (2011).
55. T sai, J. J. *et al.* Perampanel, an AMPA receptor antagonist: From clinical research to practice in clinical settings. *Acta Neurol. Scand.* **137**, 378–391 (2018).
56. Li, X., et al. Felbamate produces antidepressant-like actions in the chronic unpredictable mild stress and chronic social defeat stress models of depression. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1–13 (2019).
57. Mendoza-Torreblanca, J. G., et al. Synaptic vesicle protein 2A: Basic facts and role in synaptic function. *Eur. J. Neurosci.* **38**, 3529–3539 (2013).
58. Tokudome, K., et al. Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission. *Nat. Publ. Gr.* 1–11 (2016).
59. Deshpande, L. S. et al. Mechanisms of levetiracetam in the control of status epilepticus and epilepsy. *Front. Neurol.* **5**, 1–5 (2014).
60. Kwan, P. et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* **51**, 1069–1077 (2010).
61. Tang, F., et al. Drug-resistant epilepsy: Multiple hypotheses, few answers. *Front. Neurol.* **8**, 1–19 (2017).
62. Espinosa-jovel, C. A. et al. Farmacorresistencia en epilepsia. Conceptos clínicos y neurobiológicos. *Rev. Neurol.* **61**, 159–66 (2015).
63. Lazarowski, A. et al. ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. *Epilepsia* **48**, 140–149 (2007).
64. Wallace, R.H, et al. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: Mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology* 2000–2003 (2002).
65. Torres Zambrano, M., Bustos Sánchez, J. L. & Granados Llamas, F. Fisiopatología del estatus epiléptico. *J. Clin. Neurophysiol.* **27**, 11–20 (2011).

66. Fang, M., et al. A new hypothesis of drug refractory epilepsy: Neural network hypothesis. *Med. Hypotheses* **76**, 871–876 (2011).
67. Rogawski, M. A. et al. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Curr.* **8**, 127–130 (2008).



CAPÍTULO 2

DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

Capítulo 2

Descubrimiento de fármacos

2.1 Introducción

La historia de la innovación y el descubrimiento de fármacos puede ser dividida, a grandes rasgos, en dos periodos (Imagen 2.1). El primero comienza a principios del siglo XIX y es en donde inicia la era de la Química Farmacéutica. Durante esta etapa se logra aislar y purificar una amplia variedad de productos naturales y se introduce el concepto de receptor. El punto de inflexión lo constituye el desarrollo del Prontosil (primera droga de síntesis con acción bactericida amplia) en los albores de la II Guerra Mundial, iniciándose la edad de oro para el descubrimiento de fármacos. Durante este segundo periodo se introducen tres generaciones de medicamentos, dando lugar a una revolución en la estructura y las prácticas de la industria farmacéutica.¹

Primer Periodo		Segundo Periodo		
1^{ra} Generación (1820 - 1880)	2^{da} Generación (1880-1930)	3^{ra} Generación (1930 - 1960)	4^{ta} Generación (1960 - 1980)	5^{ta} Generación (1980 - actualidad)
				
Alcaloides y otros productos naturales.	Sueros y vacunas. Fármacos antiparasitarios, antipiréticos, analgésicos y somníferos.	Vitaminas, hormonas, sulfamidas, antibióticos y sus derivados.	Antibióticos semisintéticos y fármacos que actúan sobre el SNC y el SNA.	Inhibidores enzimáticos, fármacos de origen biotecnológico.

Imagen 2.1: Generaciones de fármacos. Las abreviaturas SNC y SNA refieren al sistema nervioso central y autónomo respectivamente. Adaptado de Raviña (2008)¹

Se estima que el descubrimiento y desarrollo de un fármaco (Imagen 2.2) requiere aproximadamente entre 10 y 15 años de trabajo y una inversión de 1.75 mil millones de dólares.² El mayor costo en dinero y tiempo se encuentra en las pruebas clínicas en humanos y se calculan valores tan elevados debido en gran medida a la baja tasa de éxitos obtenidos en cada una de las etapas del proceso.

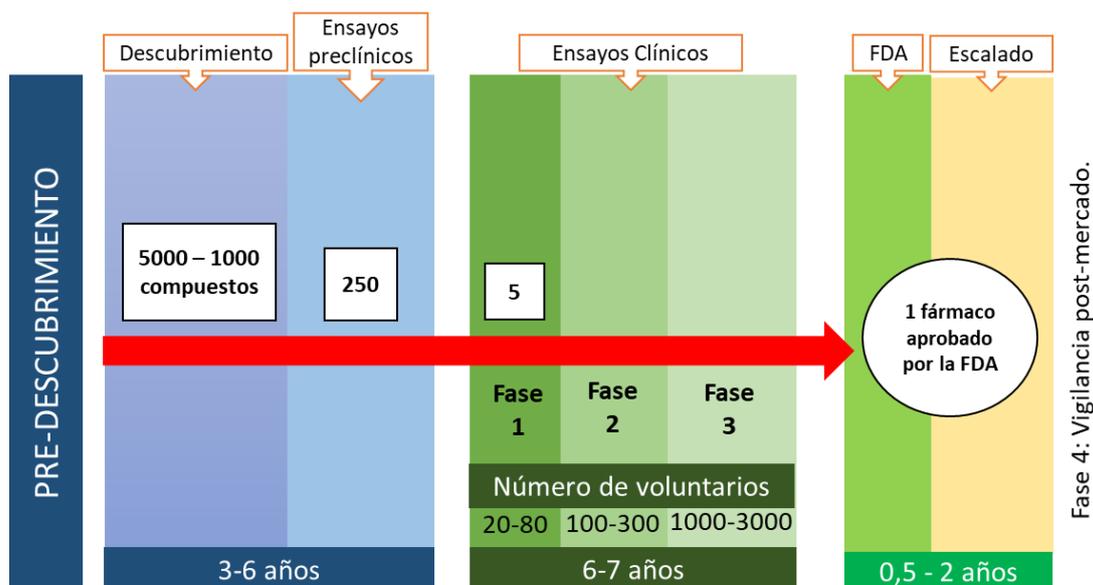


Imagen 2.2: Representación esquemática del proceso del descubrimiento y desarrollo de un fármaco. De 5000 a 10000 compuestos inicialmente descubiertos, 250 avanzan a los ensayos preclínicos y 5 a los clínicos, llegando solo 1 a ser aprobado por la Food and Drug Administration. Adaptado de Pharmaceutical Research and manufacturers of America.³

2.1.a Origen de los fármacos

La estructura química que manifiesta una actividad determinada, no siendo superada por otros compuestos y cuyos cambios estructurales realizados hasta el momento no han mejorado ni disminuido su potencia se la conoce como **compuesto líder o cabeza de serie**. Dicho compuesto resulta de un subconjunto de estructuras que presentan un perfil farmacológico similar y que comparten un esqueleto estructural común. Una vez descubierto, esta entidad química puede convertirse en un nuevo fármaco optimizando sus efectos beneficiosos y minimizando los adversos.⁴ Por lo tanto, la generación de un nuevo candidato a fármaco conlleva dos etapas fundamentales:

- 1 - Descubrimiento del compuesto líder.
- 2 - Optimización racional del compuesto líder.

La Imagen 2.3 presenta las metodologías, más utilizadas, que permiten llevar a cabo el descubrimiento y la optimización del compuesto líder. Las mismas serán detalladas a continuación, haciendo hincapié en las optimizaciones guiadas por isómeros,

biosósteros y las asistidas por computadora ya que son las estrategias empleadas en esta tesis.

DESCUBRIMIENTO del compuesto líder	OPTIMIZACIÓN del compuesto líder
 <ul style="list-style-type: none"> • Descubrimiento al azar. • Medicina tradicional. • Aislamiento de productos naturales. • Screening de alta performance. • Cribado virtual. 	 <ul style="list-style-type: none"> • Variación del sustituyente. • Extensión de la estructura. • Extensión o contracción de las cadenas laterales o anillos. • Isósteros. • Bioisósteros. • Optimización asistida por computadora.

Imagen 2.3: Metodologías de descubrimiento y optimización de compuestos líderes.

2.2 Descubrimiento del compuesto líder

El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo que inicia con la identificación de compuestos que se unen a un blanco terapéutico o que muestran una actividad biológica determinada. Aquellas moléculas que muestran actividad biológica son llamadas **hits o prototipos activos**, los cuales luego a partir de modificaciones químicas dan lugar a la cabeza de serie. A continuación, se detallan algunas de las estrategias empleadas para llegar a moléculas prototipo.⁵

2.2.a Descubrimiento por casualidad (Azar, Serendipia)

El descubrimiento por serendipia (o Serendipity) debe su nombre al descubrimiento, por casualidad, de la isla de Serendib por parte de los árabes (actualmente Sri Lanka). De allí que, en el campo del descubrimiento de fármacos, el término se utiliza para indicar hallazgos accidentales.⁶

Muchos fármacos han sido encontrados al azar, aunque quizás el caso más divulgado sea el descubrimiento de la Penicilina, con su actividad antibiótica, por Alexander Fleming en 1928.⁷

Otro claro ejemplo de serendipia pura lo constituye el descubrimiento de los efectos anticonvulsivantes del Ácido valproico, sustancia sintetizada en 1881 por el químico norteamericano Beverly S. Burton. En 1963, Georg Carraz intentó evaluar la actividad anticonvulsiva experimental de una serie de compuestos de kelina y, conforme a la práctica habitual de esa época, utilizó el Ácido valproico como solvente. Carraz descubrió, casualmente, que todas las soluciones que contenían Ácido valproico, cualquiera fuera la kelina evaluada, poseían actividad anticonvulsivante, y que la mencionada sustancia era la responsable del efecto.⁸

Desde entonces, el Ácido valproico ha sido objeto de estudios para diversas propiedades farmacológicas, generando nuevas indicaciones y también evidenciándose nuevos efectos adversos. Como fármaco antiepiléptico de amplio espectro se ha utilizado para tratar casi todos los tipos de crisis, aunque se prescribe principalmente para el tratamiento de las epilepsias generalizadas.⁹

2.2.b Medicina tradicional

La medicina tradicional (MT) es la forma de atención médica más antigua del mundo y se utiliza en la prevención y el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. Tales formas de medicina como Ayurveda (India), Kampo (Japón), Unani (Grecia) o la medicina tradicional china (MTC) hacen uso de productos naturales derivados de plantas, animales, microorganismos y organismos marinos.¹⁰

La WHO consideró que una gran cantidad de personas en el mundo todavía dependen de MT para la atención de la salud y en particular la MTC ha ganado gradualmente una considerable aprobación como medicina complementaria o alternativa en los países occidentales.¹¹ Adicionalmente, el estudio de los productos naturales empleados en este tipo de tratamientos permitió encontrar los compuestos responsables de la actividad.

2.2.c Aislamiento de productos naturales

La naturaleza es la fuente de compuestos biológicamente activos con un gran potencial de explotación y diversidad; por lo que el aislamiento y estudio de las sustancias naturales ha sido una preocupación central de las Ciencias Químicas y Biológicas por más de 200 años.¹²

Existen muchos ejemplos de fármacos aislados de productos naturales, tales como Morfina, Artemisinina y Dandrona provenientes de *Papaver somniferum*, *Artemisia annua* y de las raíces de ruibarbo respectivamente. Sin embargo, el ejemplo más resonante en Argentina durante los últimos años y relacionado con la Epilepsia es el aceite de cannabis.

Existen registros muy antiguos de literatura árabe e islámica que mencionan explícitamente extractos de Cannabis como tratamiento para convulsiones y Epilepsia.¹³ Con el avance de la ciencia y los métodos de purificación, durante la última década se han generado mayor cantidad de extractos enriquecidos en Cannabidiol (un componente sin los efectos no deseados del THC), posibilitando una mejora en el control de las convulsiones, sobre todo en niños.¹⁴ Pese a que aún existen preocupaciones sobre la calidad y la variabilidad de muchos de los productos utilizados, Argentina cuenta con la Ley 27.350 que posibilita la investigación en torno al Cannabis medicinal así como también la importación del aceite para pacientes con indicación médica y que presenten alguna patología contemplada en la resolución.¹⁵

2.2.d Screening de alta performance (*High throughput screening*, HTS)

El HTS es una técnica que conjuga robótica y microensayos para evaluar biológicamente compuestos mediante ensayos in vitro frente a receptores o enzimas.¹⁶ Este proceso puede automatizarse permitiendo el testeo de una gran cantidad de compuestos en un tiempo muy corto. Es posible detectar hasta 10,000 estructuras por día por medio de HTS típico. Por otro lado, el cribado de ultra alto rendimiento (UHTS) puede realizar

incluso 100.000 ensayos por día.¹⁷ Sin embargo, al ser una metodología de prueba y error, conlleva un gasto económico considerable.

2.2.e Búsqueda de fármacos asistida por computadora (Cribado virtual)

Nuevos prototipos activos pueden encontrarse llevando a cabo análisis exhaustivos tanto de repositorios digitales de bibliografía científica o de bases de datos de estructuras químicas. Existen dos grandes metodologías que posibilitan la realización de un cribado virtual: aquellas que pueden conducirse en base al conocimiento de la estructura molecular del receptor farmacológico de interés (métodos directos) o las fundamentadas en las características estructurales de las moléculas responsables de una determinada actividad biológica común (métodos indirectos).

A continuación, se explicarán ambas herramientas, haciendo hincapié en los métodos directos ya que son los que se implementaron en esta tesis.⁵

Cribado virtual basado en ligandos (métodos indirectos)

Los métodos de cribado virtual basados en el ligando parten de la premisa de que moléculas estructuralmente relacionadas deberían mostrar actividades biológicas similares.¹⁸ El modelado de farmacóforos, la similitud química y el modelado QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) son algunos de los enfoques más populares para llevar a cabo el cribado virtual basado en ligandos.¹⁹

- **Modelado de farmacóforos:** De acuerdo con la definición de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, un farmacóforo es “un conjunto de características estéricas y electrónicas que es necesario para asegurar la óptima interacción supramolecular con un blanco biológico específico y para activar (o bloquear) su respuesta biológica”.²⁰ Dicho de otro modo, un conjunto de características fisicoquímicas en común (tales como residuos ácidos/básicos, grupos donantes/receptores de puente de hidrógeno, etc.) son identificadas en ligandos que comparten una misma actividad biológica frente a un mismo

blanco. De esta manera, un programa es capaz de generar un modelo farmacofórico para un conjunto de estructuras activas. Esta información posibilita posteriormente el cribado de grandes bases de datos de moléculas con el objetivo de rescatar aquellas que cumplan con el modelo y, por lo tanto, se predigan activas.²¹

- **Similitud Química:** En este caso, el cribado se realiza mediante la búsqueda en bases de datos de moléculas similares a las activas. Para realizar comparaciones y estimar la similitud química mediante métodos computacionales es necesario utilizar representaciones moleculares sencillas, por lo que se requiere algún nivel de simplificación o abstracción. Las abstracciones más comúnmente utilizadas son las huellas digitales moleculares o fingerprints, que implican convertir a las moléculas en secuencias de bits (dígitos binarios), que luego se pueden comparar fácilmente entre las moléculas de una biblioteca. Cada bit (0 o 1), ubicado en una posición específica, representa la presencia o ausencia de una subestructura o elemento.²² Existen varios tipos de fingerprints, las cuales se definen según el método mediante el cual la representación molecular se transforma en una cadena de bits. La mayoría de estos usan solo el gráfico molecular 2D y, por lo tanto, se llaman fingerprints 2D; sin embargo, algunos métodos son capaces de almacenar información en 3D.²²
- **Modelado QSAR:** Los métodos QSAR se basan en la búsqueda de correlaciones con significancia estadística entre la actividad biológica y uno o varios descriptores moleculares (la definición completa de descriptores moleculares se encuentra en el anexo 1).²³ De esta manera, una vez construidas y validadas las ecuaciones QSAR, estas pueden usarse para predecir la actividad de nuevos candidatos a fármacos.²⁴

Cribado virtual basado en el receptor (métodos directos)

Los métodos basados en la estructura del receptor, como su nombre lo indica, requieren de modelos tridimensionales del blanco o diana biológica (generalmente una proteína), para posteriormente evaluar su capacidad de interacción con ligandos.²⁵ Esta

metodología se fundamenta en que la capacidad de un compuesto de ejercer un efecto biológico determinado se debe a la interacción favorable con un blanco específico. Por lo tanto, las moléculas capaces de interactuar de manera similar con un determinado blanco deberían presentar efectos biológicos similares.

Tras el desarrollo de los primeros algoritmos en la década de 1980 para describir este fenómeno, el acoplamiento o docking molecular se convirtió en una herramienta muy útil en el descubrimiento de fármacos, permitiendo simular la interacción proteína-ligando desde un punto de vista estructural y energético.²⁶

La Imagen 2.4 presenta un esquema simplificado del proceso de cribado virtual mediante docking molecular. La etapa inicial consiste en la preparación del blanco molecular (etapa A, Imagen 2.4). Como se mencionó anteriormente, para un estudio de docking es necesario contar dicha macroestructura. Los avances en cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN) han permitido un progreso sorprendente en la biología molecular y estructural, posibilitando la resolución de más de 100.000 estructuras de proteínas.²⁷ Sin embargo, aún existe una enorme cantidad de dianas cuyas arquitecturas no se encuentran dilucidadas experimentalmente. En ausencia de estas coordenadas espaciales se puede recurrir a su predicción a partir de la secuencia de aminoácidos de la macromolécula, pudiéndose emplear técnicas de modelado comparativo (homología), threading y/o métodos ab-initio.²⁵

Conseguida la estructura 3D, y dependiendo de su método de obtención, se deben realizar una serie de modificaciones generales como: adición de átomos de hidrógeno (no presentes en los blancos provenientes de rayos X), remoción de moléculas de agua y ligandos y la asignación de cargas de acuerdo con el pH de la simulación. La elección del sitio de unión (región donde se realizará el docking) puede basarse en el análisis del modo de unión de otros ligandos conocidos para el mismo blanco molecular o, en ausencia de información experimental, puede proponerse realizando una exploración del blanco en busca de cavidades con características específicas como tamaño, hidrofobicidad, grupos funcionales, etc.²⁸

Una vez preparado el blanco molecular, se debe contar con la estructura 3D de moléculas orgánicas, las cuales serán analizadas una a una en su interacción con el sitio de unión previamente definido (etapa B, Imagen 2.4). Para esto se recurre a bases de datos, provenientes de sectores públicos o privados, las cuales pueden contener miles

(o millones) de moléculas distintas.²⁹ Por ejemplo, DrugBank contiene en su última versión 13490 moléculas entre las que se incluyen fármacos y productos biológicos aprobados por la FDA, nutracéuticos y drogas experimentales.³⁰ Las moléculas deben prepararse en forma similar a la que se mencionó para el blanco. Generalmente se deben añadir los hidrógenos, darles representación tridimensional y estimarse la carga parcial de cada uno de los átomos. Con el blanco molecular y las moléculas preparadas se procede a la simulación propiamente dicha, esto es, a la identificación de las conformaciones de unión más probables (etapa C, Imagen 2.4). A cada molécula de la base de datos se la ubica en la región del sitio activo y se calcula la energía de unión asociada a la formación del complejo molécula-blanco en distintas conformaciones. Esto se logra empleando un algoritmo de búsqueda que posibilita la exploración de un gran espacio conformacional, representando varios modos potenciales de unión (poses) y un algoritmo de score o puntuación que permite llevar a cabo la predicción de la energía de interacción asociada con cada una de las conformaciones de unión previstas.^{31,32} Debe mencionarse aquí que la selección de los algoritmos de búsqueda y puntuación para cada sistema a estudiar debe basarse en los resultados de los métodos de validación que se utilizan en forma previa y proporcionan un mayor grado de confianza en los resultados obtenidos.³³

A partir de los valores asignados por la función de score es posible clasificar a los compuestos del screening en activos o inactivos. Aquellos compuestos que se predigan con energía de unión más negativa serán candidatos prometedores para síntesis o adquisición. En los capítulos 6 y 7 se profundizará sobre el uso de esta metodología en esta investigación.

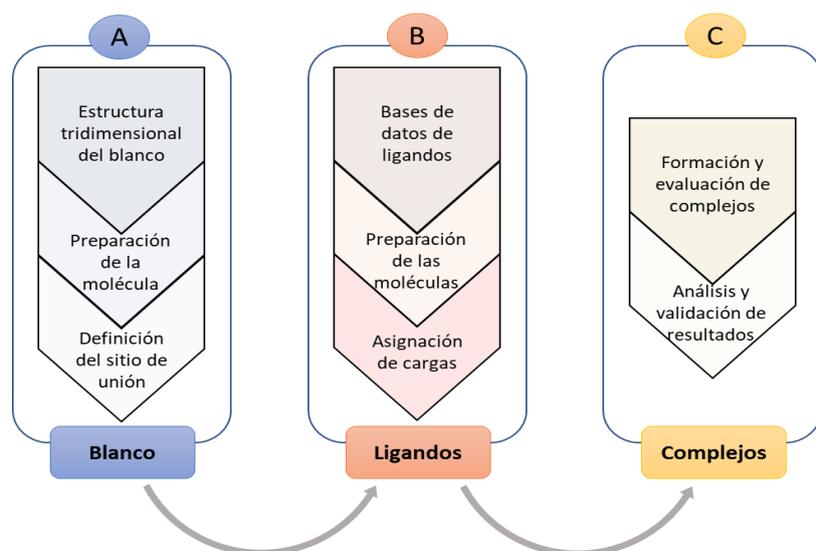


Imagen 2.4: Diagrama simplificado de cribado mediante método directo.

Finalmente debe aclararse que los métodos indirectos y directos no siempre son usados separadamente en una campaña de cribado virtual. De hecho, resulta beneficioso el uso de estas herramientas en forma combinada. Por ejemplo, debido al elevado costo computacional que representa el cribado basado en la estructura, comúnmente se aplica un primer filtro de búsqueda basado en ligandos sobre una base de datos, y los candidatos resultantes son sometidos a docking molecular. Este proceso secuencial reduce drásticamente el espacio químico y por lo tanto acelera la ejecución del screening virtual basado en la estructura.³⁴

2.3 Optimización del compuesto líder

Como se mencionó con anterioridad, la realización de modificaciones químicas sobre el prototipo activo permite obtener el compuesto optimizado. Estos cambios tienen como objetivo aumentar la afinidad de la molécula con el receptor (aumento de potencia) y/o mejorar las propiedades fisicoquímicas que estén vinculadas con las propiedades farmacocinéticas.³⁵

A continuación, se presentan algunas de las estrategias clásicas de optimización.

2.3.a Variación del sustituyente

La sustitución de grupos alquílicos o aromáticos es uno de los métodos más comunes para ajustar la actividad de las moléculas.¹⁸ Los sustituyentes ligados a ésteres, aminas, amidas o éteres son fácilmente intercambiables, mientras que aquellos que forman parte de esqueletos carbonados suelen requerir transformaciones más complejas.

La sustitución impacta sobre las características electrónicas y estéricas, posibilitando un aumento en la actividad biológica y un incremento en la selectividad.

Un ejemplo conocido es el análogo de la Adrenalina, Isoprenalina, en el cual se consigue una selectividad por los receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 , β_3) por sobre los α -adrenérgicos (α_1 , α_2), mediante el intercambio de un grupo metilo por un isopropilo (Imagen 2.5). Este hecho lo convierte en un poderoso agonista β -inespecífico, que al no presentar efectos sobre los receptores α posibilita aumentar la frecuencia cardíaca sin ocasionar una alteración en la presión arterial.³⁶

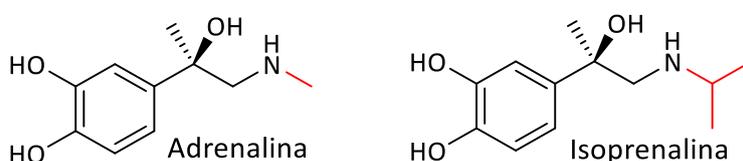


Imagen 2.5: Optimización por cambio del sustituyente.

2.3.b Extensión de la Estructura

La estrategia de extensión involucra el agregado de nuevos grupos funcionales o sustituyentes que posibiliten cambios en el modo de unión con el blanco molecular. Por ejemplo, con esta metodología es posible transformar un compuesto agonista en un antagonista en el caso de que la interacción conduzca a un estado inactivo del receptor, o aumentar la potencia del candidato a fármaco incrementando el número de interacciones en el sitio de unión.

Esta metodología se empleó para el desarrollo de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II. La extensión de la estructura mediante el agregado de un grupo

fenetilo en el compuesto de la Imagen 2.5 A permitió la obtención del Enaprilat (Imagen 2.5 B) mejorando 1000 veces la inhibición.³⁷

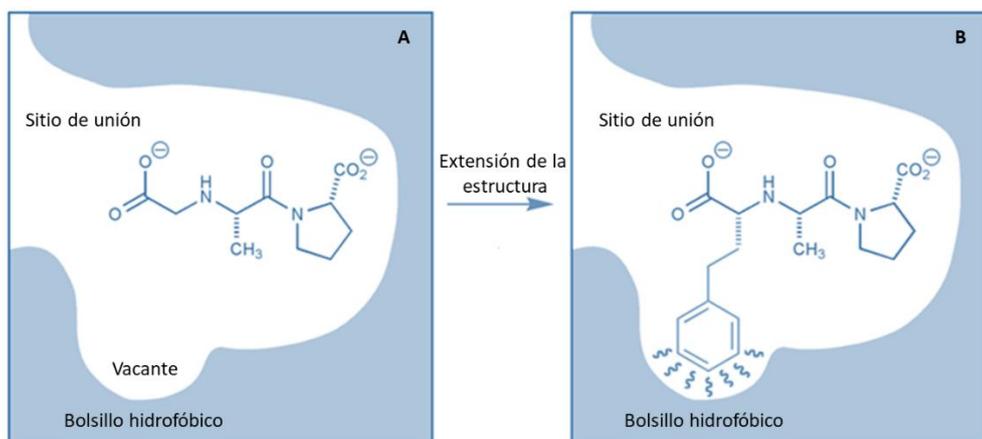


Imagen 2.5: Estrategia de extensión de la estructura. A. El bolsillo hidrofóbico se encuentra vacante. B. La inclusión del anillo adicional en la molécula permite un aumento de la potencia debido a la nueva interacción generada en el bolsillo hidrofóbico del sitio activo de la enzima. Imagen adaptada de *Fundamentals of drug Discovery*.³⁸

2.3.c Extensión o contracción de cadenas laterales o anillos

En algunas ocasiones, modificar la longitud de una cadena lateral o el tamaño de un anillo posibilita la interacción del ligando con más de un sitio de unión del blanco molecular. De esta forma, extensiones o contracciones permiten hacer cambios sobre la actividad biológica.¹⁸ Por ejemplo, la extensión de la cadena de Dietazina, antihistamínico y sedante, por solo un carbono da lugar a la Promazina, sin propiedades sedantes. Este resultado, junto con investigaciones posteriores, condujeron al desarrollo de la Clorpromazina, patentada en 1950, revolucionando el campo de la psicofarmacología moderna (Imagen 2.6).³⁹

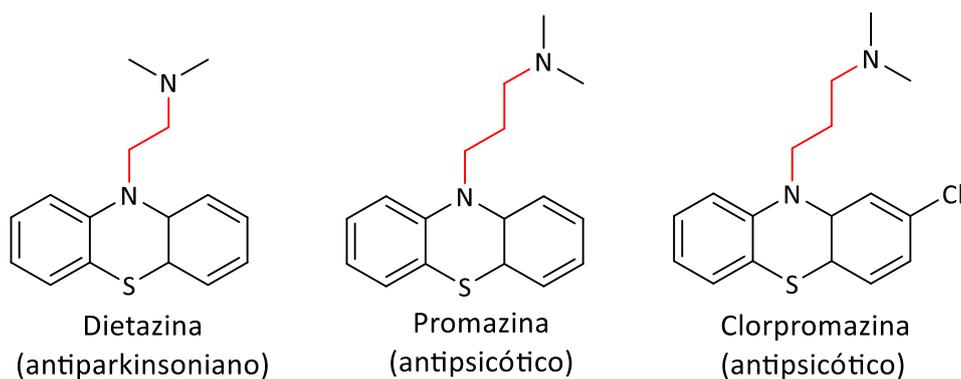


Imagen 2.6: Estrategia de extensión de cadena lateral.

2.3.d Isósteros

El término isótero puede aplicarse a átomos o grupos de átomos similares en su configuración electrónica o, más estrictamente, a grupos con análoga localización de regiones de alta o baja densidad electrónica en moléculas de tamaño y forma comparable.⁴⁰

De acuerdo con su valencia, se los puede clasificar en:

- Clase I: halógenos, OH, SH, NH₂, CH₃.
- Clase II: O, S, Se, Te, NH, CH₂.
- Clase III: N, P, As, CH.
- Clase IV: C, Si, N⁺, P⁺, S⁺, As⁺.
- Clase V: -CH=CH-, S, O, NH (en anillos)

Si bien el concepto de grupos isósteros es puramente químico, el reemplazo isostérico de átomos o grupos en una molécula es frecuentemente usado en el diseño de antimetabolitos o drogas que alteran los procesos metabólicos. Un caso de isósteros por tamaño es el reemplazo de Flúor, el más pequeño de los halógenos, por Hidrógeno para dar fluorouracilo (Imagen 2.7), una potente antimetabolito utilizado en el tratamiento del cáncer.⁴¹

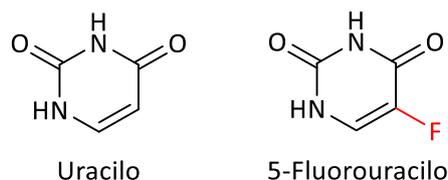


Imagen 2.7: Ejemplo de reemplazo isostérico.

2.3.e Bioisósteros

Los bioisósteros son sustituyentes que pueden reemplazar a los de una molécula biológicamente activa de forma tal que el nuevo compuesto conserva una actividad biológica similar. Por lo general, los grupos a reemplazar tienen propiedades fisicoquímicas similares.⁴²

En el pasado, los reemplazos bioisostéricos se obtenían experimentalmente utilizando el enfoque de prueba y error, lo que resultó en la extensa literatura que hoy en día está disponible para la comunidad de químicos medicinales. Actualmente, existen herramientas online disponibles gratuitamente para obtener estos reemplazos, tales como BoBER⁴³ y SwissBioisostere.⁴³

La Imagen 2.8 presenta dos ejemplos de reemplazos bioisostéricos.

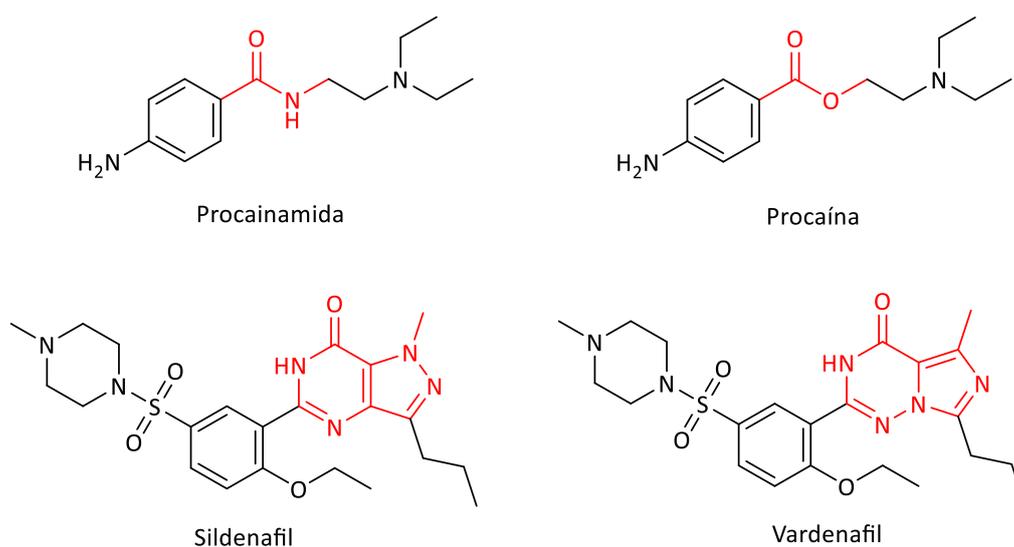


Imagen 2.8: Ejemplos de reemplazos bioisostéricos.

2.3.f Optimización asistida por computadora (in silico)

Como se mencionó con anterioridad, las técnicas computacionales posibilitan el descubrimiento de fármacos. Adicionalmente pueden emplearse para llevar a cabo una optimización in silico de compuestos líderes.

Las herramientas más empleadas son las directas:

- **Docking molecular:** Esta metodología descrita anteriormente para el cribado virtual puede predecir la orientación de una sola molécula a optimizar, mediante la simulación de sus interacciones con un blanco específico. El conocimiento a nivel molecular obtenido de este tipo de investigaciones puede emplearse para desarrollar análogos más potentes, selectivos y eficientes, pues pueden proponerse nuevas estructuras que potencien las interacciones positivas con el blanco, y/o que posibiliten otras.⁴⁵
- **Dinámica molecular:** Consiste en el estudio de un sistema basado en la mecánica clásica, mediante la simulación del movimiento de los átomos en el tiempo. Partiendo de una conformación inicial (por ejemplo, de un complejo fármaco/blanco molecular) se simula el movimiento del sistema en un periodo de tiempo pequeño (usualmente del orden de los femtosegundos, 1×10^{-15} s). En este nuevo estado del complejo se determina la nueva posición y la velocidad de cada átomo en las estructuras. Para ello se calculan las fuerzas que actúan sobre cada átomo, considerando las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y de torsión y las interacciones con los átomos circundantes.¹⁸ Este proceso se repite en el tiempo, logrando un gran número de estados posibles. A diferencia del docking, en este tipo de simulaciones es posible calcular propiedades dinámicas, estructurales y termodinámicas del sistema en estudio. En términos de optimización de líderes, estas simulaciones consideran el movimiento interno tanto el ligando como el receptor, facilitando la relajación del sistema completo y teniendo en cuenta los efectos inducidos. La influencia de las moléculas de disolvente también puede tratarse explícitamente mediante la incorporación de moléculas de agua en la simulación. Además, la evolución del sistema dependiente del tiempo proporciona una imagen dinámica del complejo y ayuda

a discriminar las configuraciones correctamente acopladas de las inestables.⁴⁶ En base a toda esta información es posible proponer nuevas estructuras optimizadas, que permitan mejorar las interacciones con el blanco molecular.

2.4 Cierre del capítulo

Este capítulo inicia su recorrido presentando el descubrimiento de fármacos desde una perspectiva histórica y detallando los costos y tiempos involucrados en el proceso. Se definen conceptos importantes para la Química Medicinal como hit y compuesto líder, a partir del cual se avanza sobre las diversas metodologías aplicadas al descubrimiento y optimización del mismo. Esto permite dar un sustento teórico a las estrategias empleadas durante esta tesis, las cuales son resaltadas a continuación:

Reemplazo bioisotérico: En esta investigación se estudia una familia de moléculas con esqueleto oxatiazolidina-4-ona-2,2-dióxido (OTZ) y sus precursores sintéticos (α -hidroxiamidas) como nuevos candidatos a fármacos anticonvulsivos. La razón para seleccionar dicho scaffold (ver Anexo 1) es la relación bioisotérica con Fenitoína. (Imagen 2.9)

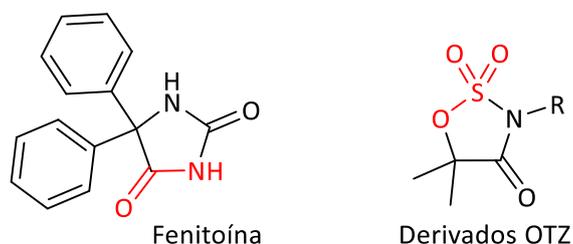


Imagen 2.9: Reemplazo bioisotérico realizado en esta investigación.

Estudios in silico: Para proponer un posible mecanismo de acción de los compuestos, se simula la capacidad de las estructuras para bloquear la isoforma Nav1.2 de los canales de sodio dependientes de voltaje mediante docking molecular. La selección de este blanco como primera hipótesis se fundamenta en el mecanismo de acción de la Fenitoína y en estudios preliminares sobre un compuesto de la familia cíclica, el 3-butil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido, que tiene propiedades bloqueantes de Nav.⁴⁷ Para la simulación se utiliza un Modelo 3D de la isoforma Nav1.2 en estado

abierto (Imagen 2.10) previamente realizado en el laboratorio,⁴⁸ dado que al momento de realizar esta investigación no se disponía de la estructura del blanco elucidada experimentalmente.⁴⁹

Adicionalmente, se emplea el mismo modelo para diseñar nuevas estructuras derivadas de las α -hidroxiamidas que sean candidatas a fármacos anticonvulsivos mediante el mecanismo de bloqueo de canal.

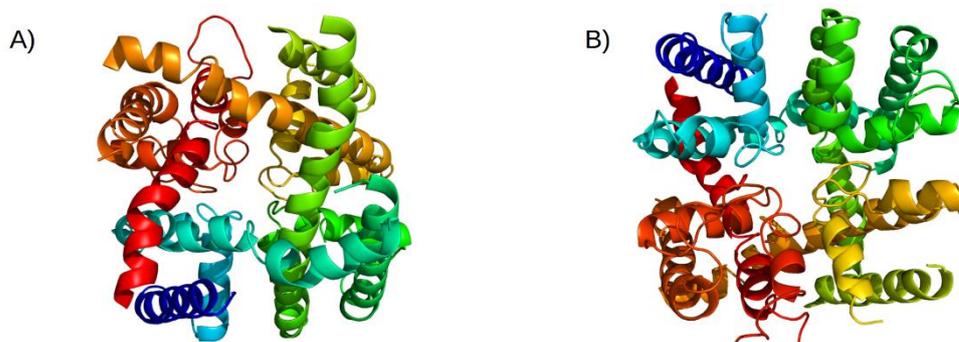


Imagen 2.10: Modelo del canal de sodio (isoforma 1.2) en una conformación abierta. A. Vista extracelular y B. Vista intracelular. Con el permiso de Palestro P. (2018)⁴⁸

Reemplazo isostérico: Con el objetivo de diseñar nuevas estructuras derivadas de las α -hidroxiamidas que posean una mayor lipofilidad se llevará a cabo un reemplazo del Hidroxilo por un Cloro, siendo este un isómero de clase 1 con el mismo número de electrones periféricos. (Imagen 2.11)



Imagen 2.11: Reemplazo isostérico llevado a cabo en esta investigación.

En el próximo capítulo se discutirán las diversas metodologías de síntesis capaces de producir los compuestos involucrados en esta tesis.

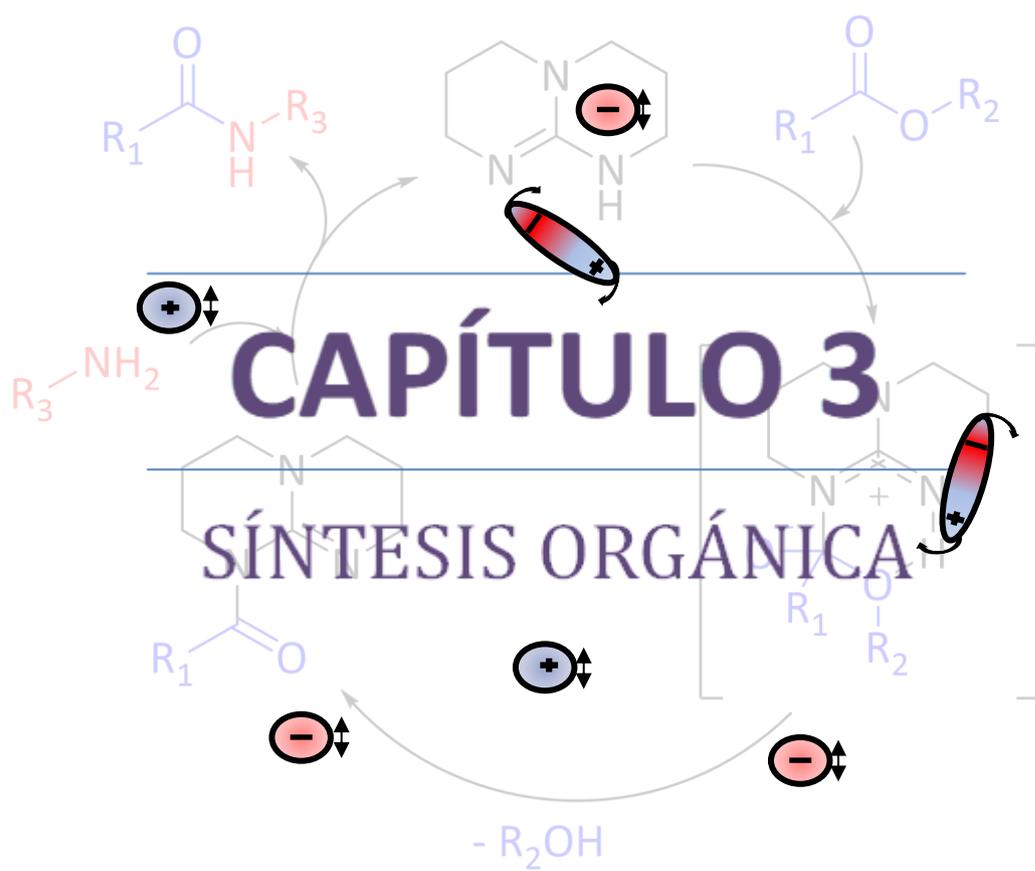
Referencias

1. Raviña Rubira, E. Medicamentos: Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos. *Univ Santiago de Compostela* (2008).
2. Paul, S. M. *et al.* How to improve RD productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 203–214 (2010).
3. Hooft, R. Drug discovery and development for metabolic diseases. *Drug Discov. Today* **8**, 1064–1066 (2003).
4. Beswick, P. *et al.* The role of medicinal chemistry in the drug discovery process. *Elsevier Ltd.* 119-134 (2013).
5. Saldívar-González, F., *et al.* Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educ. Quim.* **28**, 51–58 (2017).
6. De Clercq, Eric. Curious Discoveries in Antiviral Drug Development: The Role of Serendipity. *Medicinal Research Reviews*, **35**, No. 4, 698–719 (2015)
7. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation B influenzae. 226-236 (1929).
8. López-muñoz, F., *et al.* El papel de la serendipia en el descubrimiento de los efectos clínicos de los psicofármacos : más allá del mito. *Actas Esp Psiquiatr*, **40** (1).34-42 (2012)
9. Tomson, T., *et al.* Valproic acid after five decades of use in epilepsy: Time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol.* **15**, 210–218 (2016).
10. Yuan, H., *et al.* The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* **21**, (2016).
11. Parasuraman, S., *et al.* Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. *Pharmacogn. Rev.* **8**, 73–80 (2014).
12. Prieto, S., *et al.* Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **11**, (2014).

13. Russo, E. B. et al. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J. Exp. Bot.* **59**, 4171–4182 (2008).
14. Perucca, E. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last *J. Epilepsy Res.* **7**, 61–76 (2017).
15. De Vito, E. L. Argentina tiene su primera ley sobre el uso medicinal de la planta de cannabis. Historia y perspectivas. *Medicina (B. Aires).* **77**, 388–393 (2017).
16. Talevi, A. & Bruno-Blanch, L. E. Screening virtual: Una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica. *Lat. Am. J. Pharm.* **28**, 141–150 (2009).
17. Fernandes, T. G., et al. High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. *Trends Biotechnol.* **27**, 342–349 (2009).
18. Patrick, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. *Oxford Sed*, 189–413 (2013).
19. Acharya, C., et al. Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **7**, 10–22 (2010).
20. Union, I., Pure, O. F. & Chemistry, A. Glossary of Terms Used in. **70**, 1129–1143 (1998).
21. Langer T, K. et al. Chemical feature-based pharmacophores and virtual library screening for discovery of new leads. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **6**, 370–6 (2003).
22. Muegge, I. et al. An overview of molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **11**, 137–148 (2016).
23. Verma, R. P. et al. A SAR / QSAR Study Camptothecins : A SAR / QSAR Study. *Pharm. Res.* **109**, 213–235 (2009).
24. Beilstein. Computational methods in drug discovery. *J. Org. Chem* **12**, 2694–2718 (2016).
25. Palestro, P. Búsqueda de nuevos anticonvulsivos a partir de métodos

- computacionales (2016). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53752>
26. Lopez-Vallejo, F. et al. Integrating Virtual Screening and Combinatorial Chemistry for Accelerated Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **14**, 475–487 (2011).
 27. Ferreira, L. G., et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **20**, 13384-13421 (2015).
 28. Solomon, A. K. *Molecular Modelling and Drug Design*. 1^{ra} Edition. 1-72 (2008).
 29. Chaudhary, K., et al. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem* **4**, 1029 (2016).
 30. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/>.
 31. Kapetanovic, I., et al. Descubrimiento y desarrollo de fármacos asistidos por computadora. *Chem biol interact* **171**, 165–176 (2008).
 32. Huang, S. Y., et al. Advances and challenges in Protein-ligand docking. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 3016–3034 (2010).
 33. Hevener, K. E. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. *Bone* **23**, 1–7 (2010).
 34. Klebe, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today* **11**, 580–594 (2006).
 35. Gomez de la Oliva, C. Primeros pasos en el descubrimiento de nuevos fármacos anticancerígenos. *Vida científica.* **6**, 77–84 (2013).
 36. Galeano, M. Drogas inotrópicas en el nuevo milenio. *Revista Colombiana de Anestesiología.* **XXVIII**, número 2, (2000).
 37. Roche, V. E. al. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6^{ta}. Edition, part 1 (2008).
 38. Fundamentals of Drug Discovery. *University of Manchester*. https://personalpages.manchester.ac.uk/staff/T.Wallace/20421tw2/20421_lect4.html
 39. Nogrady, T. W. D. Basic Principles of drug design III - Designing Drug molecules to fit receptors in Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach.

- Oxford University Press*. 106–166 (2005).
40. Korolcovas, A; et al. Compendio esencial de Química Farmacéutica. *Reverté*.1-52, (1983).
 41. Heildelberger, C., et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Gr. Nat. Publ.* **179**, 663–6 (1957).
 42. Sun, S. & Fu, J. Methyl-containing pharmaceuticals: Methylation in drug design. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **28**, 3283–3289 (2018).
 43. Lešnik, S. et al. BoBER: Web interface to the base of bioisosterically exchangeable replacements. *J. Cheminform.* **9**, 1–8 (2017).
 44. Klebe, G. Drug Design: Methodology, concepts, and mode-of-action. *Drug Des. Methodol. Concepts, Mode-of-Action* 1–901 (2013).
 45. Shweta, A. An Overview of Molecular Docking. *JSM Chem* **4**, 3–17 (2016).
 46. Alonso, H., et al. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* **26**, 531–568 (2006).
 47. Pastore, V., et al. Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 841–846 (2013).
 48. Palestro, P. H. et al. Searching for New Leads To Treat Epilepsy: Target-Based Virtual Screening for the Discovery of Anticonvulsant Agents. *J. Chem. Inf. Model.* **58**, 1331–1342 (2018).
 49. Pan, X. et al. Molecular basis for pore blockade of human Na⁺ channel Nav1.2 by the μ -conotoxin KIIIA. *Science*. (2019)



Capítulo 3

Síntesis orgánica

3.1 Consideraciones generales y síntesis típicas de amidas

Las amidas son derivados de los ácidos carboxílicos (RCOOH), en los que se ha sustituido el grupo oxhidrilo (-OH) por el grupo amino (-NH₂, -NHR o -NRR', generando las llamadas amidas primarias, secundarias o terciarias respectivamente). Las primarias se nombran reemplazando la terminación -oico por -amida y eliminando la palabra ácido. Si el nitrógeno está sustituido, los sustituyentes se nombran alfabéticamente, precedidos por la letra N y posteriormente se indica la cadena principal (Imagen 3.1).

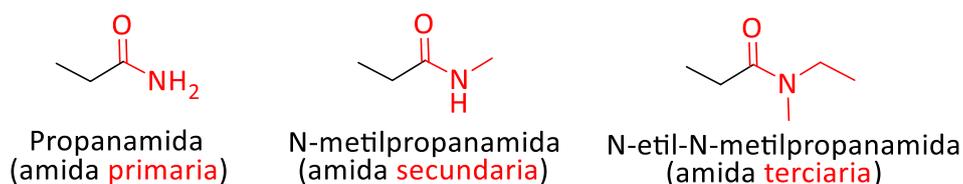
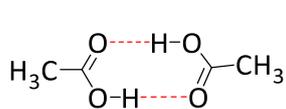


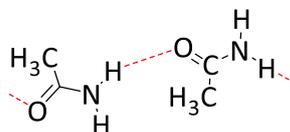
Imagen 3.1: Estructuras de amidas.

El enlace amida es plano y como grupo funcional es polar, por lo que las amidas de bajo peso molecular son solubles en agua. Generalmente son blancas e inodoras. A excepción de la formamida (Pf=2,5 °C), las amidas sencillas son todas sólidas y sus puntos de ebullición son considerablemente más altos que los de los ácidos correspondientes. En la Imagen 3.2 se observa cómo la interacción de puente de hidrógeno permite la formación de dímeros del ácido etanoico, mientras que, para la etanamida la presencia del nitrógeno trans con respecto al carbonilo posibilita la formación de polímeros en cadena. La preferencia en esta forma de asociación por parte de las amidas explica porque sus puntos de ebullición son más elevados que los ácidos carboxílicos relacionados.¹ Como es de esperar, con el aumento de sustitución sobre el nitrógeno hay un incremento del impedimento estérico. La interacción de tipo puente hidrógeno

se ve dificultada y esto se traduce en un descenso de los puntos de fusión y de ebullición de las amidas secundarias respecto a las primarias. Por su parte, las terciarias, al no poder formar este tipo de interacciones, son líquidas en condiciones normales.



Dímero del ácido etanoico



Porción del polímero de etanamida

Imagen 3.2: Representación de la polimerización de ácido etanoico y etanamida en solución. *Imagen adaptada de Alliger (1984).*¹

Desde el punto de vista del comportamiento químico, las amidas presentan baja reactividad frente a las reacciones de sustitución. Además, el par de electrones no compartido no se localiza sobre el átomo de nitrógeno, sino que se encuentra deslocalizado, por resonancia, en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Por lo tanto, a diferencia de las aminas, las amidas son moléculas sin características ácido-base apreciables.¹

Las amidas abundan en los organismos vivos (en proteínas y ácidos nucleicos), en catalizadores, productos farmacéuticos, agroquímicos y materiales poliméricos (como el Nylon 6,6). Este grupo funcional se encuentra en el 100 % de los fármacos más vendidos en el mundo en el 2019² y, de acuerdo con un informe publicado en 2017, sobre los diez medicamentos más vendidos en nuestro país el enlace amida está presente en tres (Imagen 3.3).³

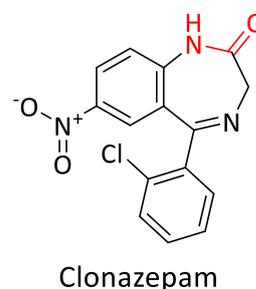
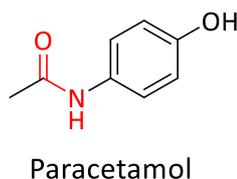
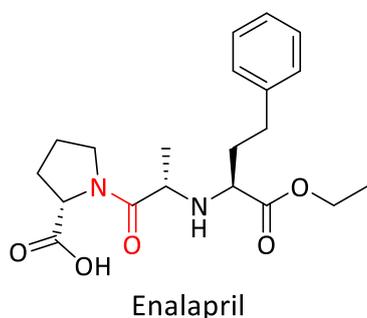
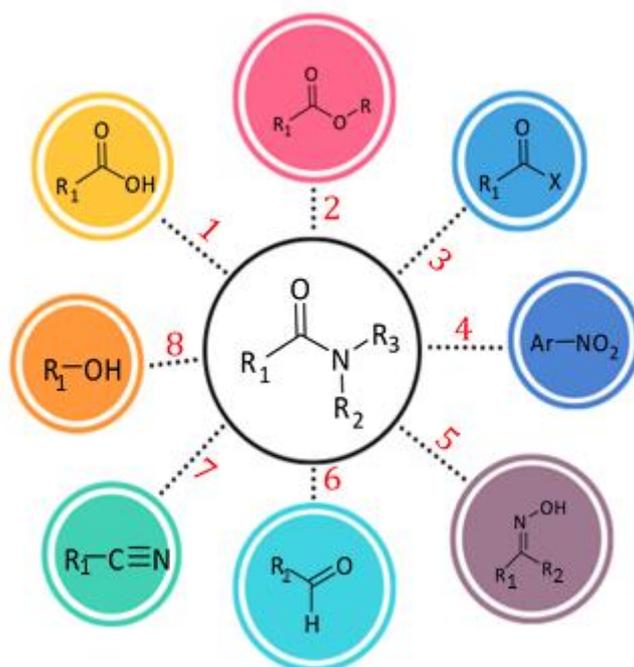


Imagen 3.3: Estructuras de los fármacos más vendidos en 2017 en Argentina que contienen el enlace amida.

El Esquema 3.1 muestra un resumen general de los métodos involucrados en la síntesis de amidas. El empleo de ácidos carboxílicos y sus derivados más reactivos (rutas sintéticas 1, 2 y 3) constituye la vía tradicional de obtención de este tipo de compuestos.⁴ La reducción catalítica de nitroarenos (ruta 4) y subsecuente aminocarbonilación con haluros de arilo posibilita la obtención de una amplia familia de benzamidas N-arilsustituidas.⁵

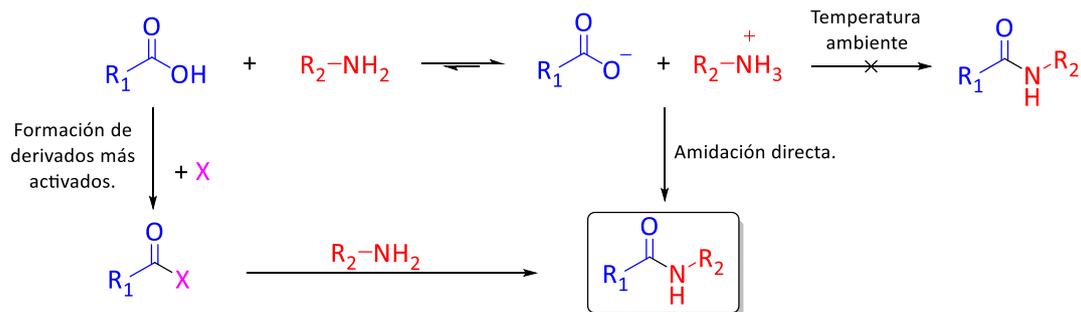
Las oximas (ruta 5) pueden producir amidas primarias o secundarias mediante un mecanismo de deshidratación/rehidratación o a través del reordenamiento de Beckman respectivamente.⁶ Adicionalmente, los aldehídos (ruta 6) pueden derivatizarse en las aldoximas correspondientes mediante reacción con hidroxilamina y de esta manera servir como material de partida.⁷ Por su parte, los nitrilos (ruta 7) se han empleado usualmente en la reacción de Ritter para obtener amidas a partir de alcoholes.⁸ Además, los últimos compuestos mencionados pueden acoplarse oxidativamente con aminas para generar las amidas respectivas (ruta 8).⁹



Esquema 3.1: Metodologías generales para la síntesis de amidas. *Adaptado de Ojeda-Porrás et. al (2016)*¹⁰

Durante este capítulo se desarrollará con más detalle las rutas 1 y 2 ya que son las empleadas en esta tesis. De este modo, se analizan las metodologías de síntesis

involucradas en la amidación directa y en la formación de derivados de ácidos más activados hacia el ataque nucleofílico, ya sea por cambio en el grupo saliente o por uso de agentes de acoplamiento (Esquema 3.2). Las amidas obtenidas serán además utilizadas como bloques constructores para la síntesis de derivados cíclicos (1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxidos), por lo que también se detallan las vías sintéticas más comunes para esta familia de compuestos.



Esquema 3.2: Síntesis de amidas empleando ácidos carboxílicos y sus derivados como reactivos. *X*: Reactivo de acoplamiento o de transformación del ácido en un derivado más reactivo. Adaptado de Figueiredo et al. (2016)¹¹

3.1.a Síntesis de amidas a partir de ácidos carboxílicos

La amidación directa entre ácidos carboxílicos y aminas sin emplear reactivos de acoplamiento es la transformación ideal para la síntesis de amidas porque el agua es el único subproducto. Sin embargo, dicho procedimiento requiere temperaturas elevadas para evitar la formación de sales de carboxilato-amonio no reactivas hacia la formación del enlace,¹² por lo que esta vía de síntesis se encuentra restringida cuando los reactivos son sensibles a condiciones energéticas.

Un enfoque útil para mejorar la situación anteriormente descrita es el uso de catalizadores (sustancias que aceleran una reacción química). Podemos distinguir dos tipos de catalizadores: las enzimas (biológicos) y aquellos provenientes de compuestos orgánicos, inorgánicos o elementos (químicos).

- **Catalizadores biológicos:** El uso de enzimas tiene las ventajas de requerir condiciones de reacción leves, presentar elevada selectividad y economía atómica y no necesitar de reactivos tóxicos.¹³ Sin embargo, solo se han

informado unos pocos ejemplos en donde los ácidos carboxílicos son el sustrato. En todos los casos, el tiempo de reacción es prolongado, la cantidad de enzima es elevada y el rendimiento es bajo.¹⁴ Por esta razón, el uso de ésteres como sustratos es más estudiado, principalmente empleando diversos tipos de serina hidrolasas como catalizadores.¹⁵

- **Catalizadores químicos:** En los últimos 10 años se han implementado una amplia variedad de catalizadores químicos, la mayoría derivados de ácidos organoboránicos y de metales de transición.^{15,16} Sin embargo, el uso de reactivos de Boro para llevar a cabo la síntesis de amidas a partir de ácidos carboxílicos y las aminas es conocido desde 1970.¹⁷ Con el paso del tiempo se ha sustituido uno de los oxhidrilos del Ácido bórico por grupos -R alquílicos o arílicos, dando lugar a una amplia familia de ácidos borónicos (Imagen 3.4). Muchos de estos están disponibles comercialmente y facilitan amidaciones directas con altos rendimientos, a bajas temperaturas y elevada selectividad.¹⁸

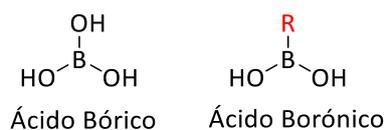
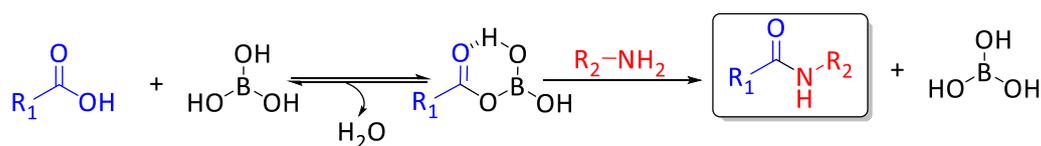


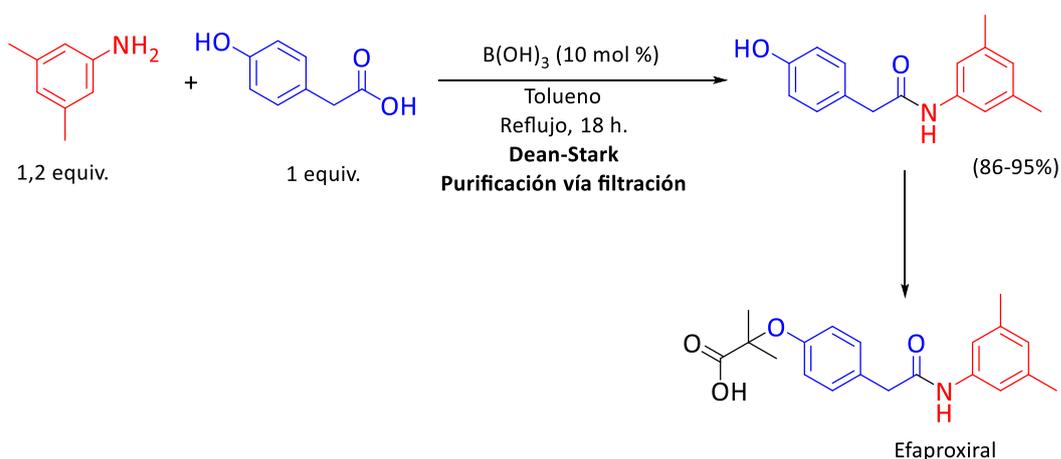
Imagen 3.4: Estructuras de ácido bórico y borónicos. R= *sustituyente alquilo o arilo*.

En esta tesis doctoral, se emplea el ácido bórico para catalizar la formación del enlace amida a temperaturas elevadas.¹⁹ El mecanismo propuesto para la formación de amida catalizado por el ácido bórico se muestra en el Esquema 3.3 y se puede prever un mecanismo similar para los ácidos borónicos.¹¹ La reacción de condensación del ácido carboxílico y bórico conduce a la formación de un anhídrido mixto que posteriormente reacciona con la amina para producir la amida y regenerar el ácido bórico, reiniciando el ciclo catalítico.



Esquema 3.3: Mecanismo de reacción propuesto para la catálisis con ácido bórico de una amidación directa. *Adaptado de Tang et al. (2005).*¹⁹

Para desplazar el equilibrio hacia la formación del intermediario anhídrido, el agua debe eliminarse azeotrópicamente o empleando tamices moleculares. Mediante esta metodología en 2006 se reportó la síntesis de Efaproxiral, desarrollado para el tratamiento del cáncer de mama (Esquema 3.4).²⁰



Esquema 3.4: Síntesis de Efaproxiral. *Adaptado de Anderson et al.(2006).*²⁰

Por otro lado, mientras la catálisis por derivados de boro es la más desarrollada, el uso de metales de transición en la reacción de amidación directa ha tenido gran interés en los últimos años.¹¹ En este sentido, Krause y colaboradores lograron la síntesis one-pot de amidas estructuralmente diversas, empleando alquinos simples y compuestos de rutenio, con una elevada economía atómica.²¹

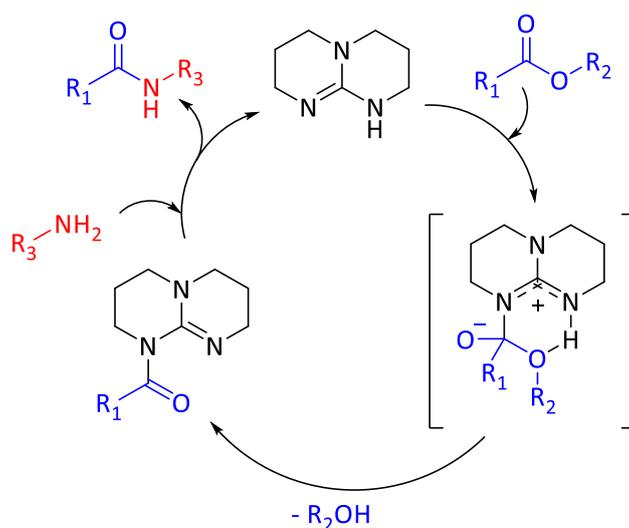
Al igual que el rutenio, también se han explorado algunos otros metales de transición como el niobio²² y el hafnio²³ con resultados menos significativos.

Vale destacar también el reporte de Yang y colaboradores donde se desarrolla la amidación directa de una familia estructuralmente diversa de ácidos y aminas, empleando silicagel como catalizador en condiciones de reflujo con tolueno o xileno, arrojando rendimientos entre el 30 y el 95 %.²⁴

3.1.b Síntesis de amidas a partir de ésteres

Sin lugar a duda, los ésteres constituyen uno de los derivados de los ácidos carboxílicos más empleados y versátiles.¹⁰ Sin embargo, los enfoques sintéticos hacia la transformación de ésteres en amidas todavía tienen inconvenientes significativos, sobre

todo para el caso en que los ésteres estén poco activados (con sustituyentes donadores de electrones). Existe una amplia cantidad de bibliografía que refiere al uso de catalizadores tendientes a suavizar las condiciones de reacción, disminuir los tiempos y aumentar los rendimientos. En este sentido, compuestos derivados de metales como lantano²⁵, circonio²⁶, paladio²⁷, niobio²⁸, plata²⁹ y manganeso³⁰ han sido desarrollados en los últimos años posibilitando amidaciones con alta selectividad y buenos rendimientos. Las bases inorgánicas como el fosfato de potasio³¹, el metóxido de sodio³² y el hidróxido de litio³³ también se han utilizado como catalizadores. Estas reacciones dependen del uso de condiciones anhidras y, en el caso de metóxido de sodio, también la exclusión de aire. Por otro lado, el 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno (TBD), una guanidina cíclica disponible comercialmente, ha sido reportado como un organocatalizador eficiente para la aminólisis de ésteres en presencia de diferentes aminas en condiciones libres de solventes.³⁴ El mecanismo propuesto se detalla a continuación.



Esquema 3.5: Mecanismo propuesto para catálisis por TBD. *Adaptado de Sabot et al.(2007)*³⁴

3.2 Síntesis de amidas vía radiación microondas

El calentamiento por microondas (MW) dentro de la síntesis orgánica se considera un procedimiento de gran relevancia desde sus orígenes en la década del 90, cuando Gedye y Giguere reportaron en forma independiente varias reacciones rápidas y exitosas

gracias a la radiación proveniente de un microondas doméstico.³⁵ En ese entonces, con la ausencia de los reactores disponibles en la actualidad, los experimentos se llevaban a cabo en recipientes de vidrio o teflón sellados, sin controles de seguridad, temperatura y reproducibilidad. Pese a esto, pero gracias al bajo costo de los hornos domésticos, se generó un interés inmenso por la síntesis orgánica asistida por microondas y consecuentemente un incremento exponencial en el número de publicaciones.³⁶ Esto trajo aparejado el desarrollo de instrumentos cada vez más sofisticados y fáciles de usar, posibilitando un control preciso de temperatura, presión, potencia y tiempo, mejorando críticamente la reproducibilidad del trabajo y permitiendo realizar reacciones en fase sólida, con solventes o en ausencia de los mismos (SFC, del inglés solvent free conditions).³⁷

El uso de radiación microondas, en especial en SFC, tiene especial importancia en el contexto del desarrollo de tecnologías químicas más benignas con el medio ambiente, regidas por los doce principios de la Química Verde.³⁸

En relación a los fundamentos de la técnica, en el espectro electromagnético la radiación microondas está situada entre la radiación infrarroja y las ondas de radiofrecuencia (Imagen 3.5). Su longitud de onda está comprendida entre 1 cm y 1 m correspondiendo a frecuencias entre 30 GHz y 300 MHz. La energía es muy baja comparada con la de un enlace químico, por lo que no puede afectar directamente la estructura molecular. Entonces, al ser una radiación no ionizante, el aumento en la excitación de las moléculas es únicamente consecuencia del incremento en la energía cinética.³⁹

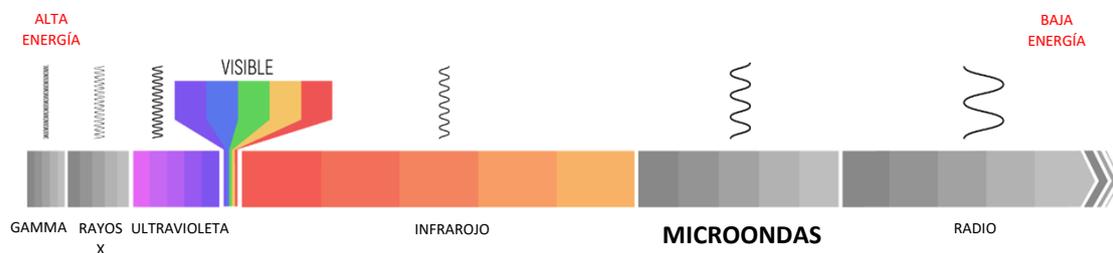


Imagen 3.5: Espectro electromagnético. *Adaptado de Recursos educativos, Anton Paar.*⁴⁰

Al momento se han elucidado dos mecanismos que explican las interacciones entre las sustancias y el componente eléctrico del campo electromagnético: la interacción dipolar y la conducción iónica (Imagen 3.6).⁴¹ De acuerdo con estos mecanismos, la absorción de microondas es altamente dependiente de la polaridad de la mezcla de reacción. Idealmente los reactivos aportan la polaridad para el calentamiento y puede trabajarse en condiciones SFC.⁴² Cuando esto no sucede es habitual el uso de solventes polares como agua, etanol y acetonitrilo que aseguran una rápida generación de calor.⁴³

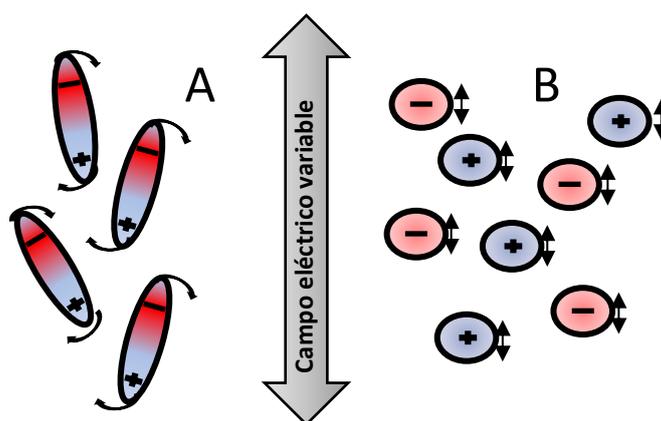


Imagen 3.6 A. **Interacción dipolar:** Cuando moléculas polares son sometidas a un campo eléctrico variable, las mismas intentarán alinearse mediante movimientos rotacionales que producen las fricciones y colisiones responsables del calentamiento. B. **Conducción iónica:** La migración de iones o especies cargadas en una disolución como producto del efecto del campo variable genera pérdidas por fricción que se traducen como calor. Adaptada de Recursos educativos, Anton Paar.⁴⁰

Tradicionalmente la síntesis química se lleva a cabo mediante el calentamiento de una mezcla de reacción empleando un baño de aceite. Este método convencional, desde el punto de vista energético, es lento e ineficiente, ya que el calor se transmite primero a través de las paredes del recipiente para posteriormente alcanzar el solvente y los reactivos. Además, el sobrecalentamiento del material próximo a la superficie del recipiente puede conducir a su descomposición. Por el contrario, como se mencionó anteriormente, la radiación microondas impacta directamente sobre las moléculas, produciendo un gradiente de temperatura invertido al generado en el método convencional (Imagen 3.7). Además, la conversión de energía electromagnética en térmica se produce en forma altamente eficiente, traduciéndose como velocidades de

calentamiento extremadamente rápidas, no comparables con la metodología convencional.⁴⁰

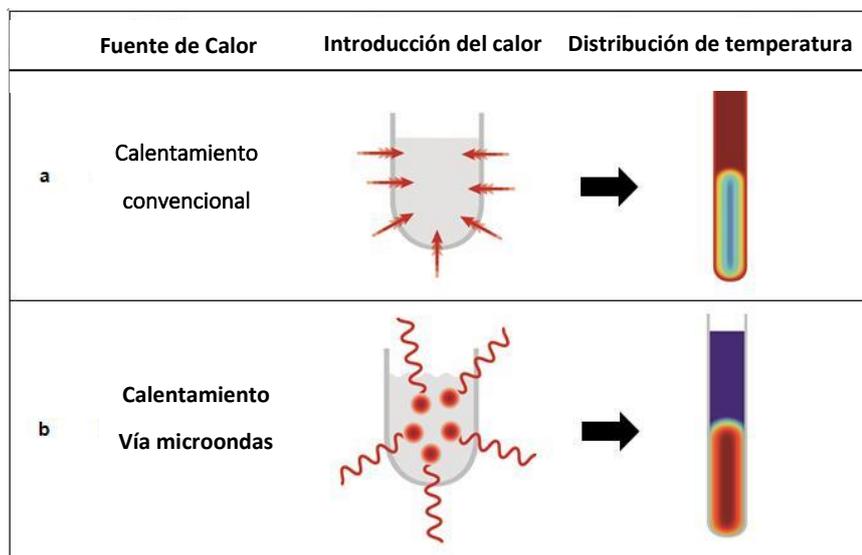
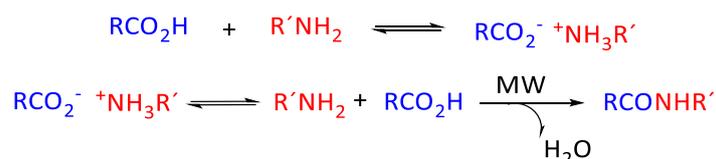


Imagen 3.7: Diferencias entre el calentamiento convencional y la vía radiación microondas. *Adaptada de Recursos educativos, Anton Paar.*⁴⁰

Las microondas se han empleado para llevar a cabo una gran variedad de transformaciones químicas, como sustituciones nucleofílicas, eliminaciones, cicloadiciones, acetilaciones, hidrólisis, oxidaciones, descarboxilaciones, esterificaciones y diversos acoplamientos.⁴¹ A continuación, se describen algunos ejemplos sobre las síntesis de amidas asistida por microondas empleando ácidos y ésteres como reactivos.

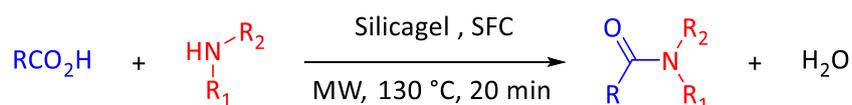
3.2.a Síntesis de amidas vía microondas a partir de ácidos

En 2001, Perreux y colaboradores⁴⁴ reportaron la síntesis de amidas vía pirólisis de sales de amonio, producto de la mezcla de ácidos carboxílicos y aminas primarias. Bajo condiciones SFC y cortos tiempos de reacción lograron obtener 15 amidas con rendimientos aceptables (Esquema 3.6).



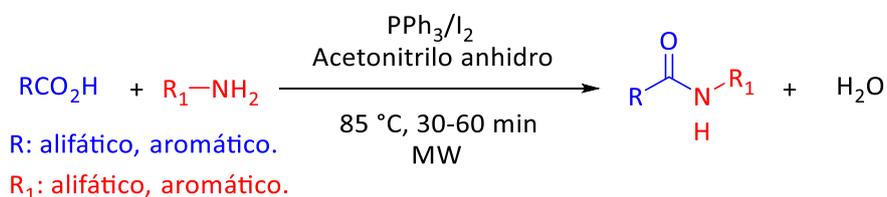
Esquema 3.6: Mecanismo propuesto para la síntesis de amidas vía radiación microondas por pirólisis de sales de amonio. A temperatura ambiente la mezcla de la amina y el ácido carboxílico producen rápidamente la sal de amonio. Posteriormente la pirólisis de esta sal conduce a la formación de la amida por desplazamiento del equilibrio y subsecuente ataque nucleofílico. Este proceso requiere temperaturas superiores a 100 °C para eliminar el agua. Adaptado de Perreux et al. (2002)⁴⁴

En 2015, Ojeda – Porras y colaboradores⁴⁵ emplearon silicagel como soporte sólido y catalizador para llevar a cabo la amidación directa de ácidos alifáticos, aromáticos, insaturados y grasos con diferentes aminas primarias y secundarias. Este procedimiento se constituye como un método simple, eficiente y económico (Esquema 3.7).



Esquema 3.7: Síntesis de amidas vía radiación microondas empleando silicagel como catalizador en condiciones libres de solvente. Adaptado de Ojeda-Porras et al (2015)⁴⁵

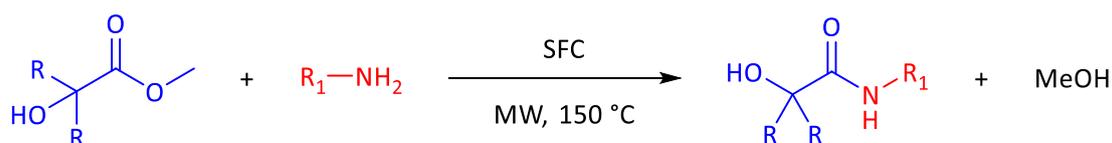
Por último, Pathak y colaboradores⁴⁶ reportaron en 2016 un método que, si bien no es SFC, demuestra ser útil, eficiente y versátil para la síntesis de amidas y de ésteres. Se emplea bajo condiciones suaves de reacción con un catalizador de trifenilfosfina y yodo molecular (Esquema 3.8).



Esquema 3.8: Síntesis de amidas vía radiación microondas empleando catalizador de yodo y trifenilfosfina. Adaptado de Pathak et al (2016)⁴⁶

3.2.b Síntesis de amidas vía microondas a partir de ésteres

Como antecedente directo hemos reportado en 2013 la síntesis de α -hidroxiamidas a partir de ésteres metílicos y aminas primarias.⁴⁷ El procedimiento se lleva a cabo en condiciones SFC, en tiempos que oscilan entre 15 y 30 min y arrojando mayoritariamente rendimientos aceptables (Esquema 3.9).

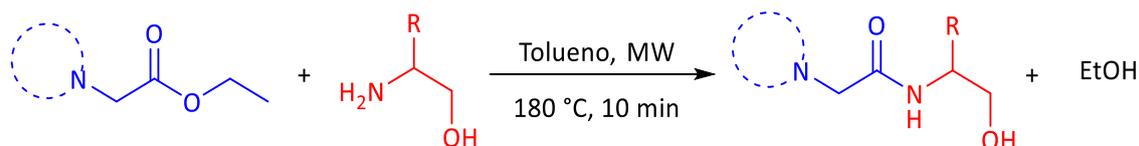


R= Metil, fenil.

R_1 = alifático, aromático.

Esquema 3.9: Síntesis de amidas vía radiación microondas empleando un α -hidroxiéster metílico como reactivo en condiciones libres de solventes. *Adaptado de Pastore et al (2013)*⁴⁷

Posteriormente en 2014, Hernández-Fernández y colaboradores⁴⁸ describieron la amidación de ésteres etílicos no activados con 1,2-aminoalcoholes bajo radiación de microondas. La reacción se lleva a cabo en tolueno y arroja productos con un rendimiento superior a 80 % (Esquema 3.10).



Esquema 3.10: Síntesis de amidas vía radiación microondas empleando ésteres etílicos no activados. Las circunferencias punteadas hacen referencia a diferentes anillos aromáticos que contienen al Nitrógeno. *Adaptado de Hernández-Fernández et al (2014)*⁴⁸

3.3 Síntesis de derivados N-sustituídos de 1,2,3-oxatiazolidin-4-ona 2,2-dióxidos

Como se describió anteriormente, entre los compuestos sintetizados en esta tesis se encuentra una serie de estructuras bioisotéricas a la Fenitoína.

De acuerdo a la nomenclatura sistemática (Hantzsch-Widman) los compuestos monocíclicos deben nombrarse considerando un prefijo que dé cuenta de la identidad del/los heteroátomo/s, una raíz relacionada al número de miembros del anillo y un sufijo que informe respecto a la saturación o no del ciclo. La numeración del anillo comienza con el heteroátomo de mayor prioridad (O > S > N) y prosigue alrededor del anillo para dar los números menores posibles a los otros heteroátomos.⁴⁹ En la Imagen 3.8 se observa el orden asignado de acuerdo con estas reglas al esqueleto estructural de los derivados cíclicos sintetizados, quedando nombrado de la siguiente forma: **5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido**.

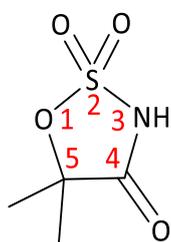
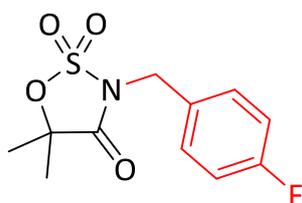
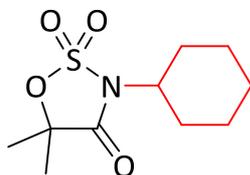


Imagen 3.8: Enumeración de acuerdo con la nomenclatura de Hantzsch-Widman.

Si el átomo de nitrógeno se encuentra sustituido, entonces este se indica al inicio y posterior al número 3-. La Imagen 3.9 ejemplifica esta situación con dos estructuras sintetizadas en esta tesis.



3-(4-fluorobencil)-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido

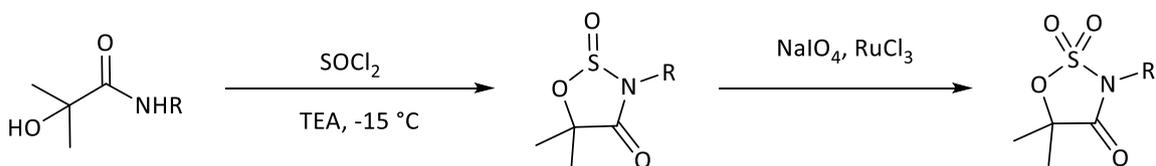


3-ciclohexil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido

Imagen 3.9: Ejemplo de estructuras cíclicas sintetizadas en la tesis.

La síntesis de este tipo de compuestos fue propuesta en nuestro laboratorio utilizando como antecedente el trabajo de Deyrup y colaboradores en 1968.⁵⁰ Estos autores

plantean la obtención de estructuras cíclicas similares, las 2-oxo-1,2,3-oxatiazolidinas mediante la reacción de β -aminoalcoholes con cloruro de tionilo en hexano o benceno y en presencia de trietilamina. En 2001, Posakoni y colaboradores⁵¹ retoman esta metodología, pero empleando β -aminoalcoholes N-protegidos y acetonitrilo o diclorometano como solventes. Adicionalmente proponen la oxidación del sulfamidito cíclico catalizada por tetraóxido de rutenio, arrojando el sulfamidato con rendimientos cercanos al 80%. Un año después Meléndez y Lubell⁵² reportan el uso del par tricloruro de rutenio/peryodato de sodio para llevar a cabo la oxidación del sulfamidito. Esta técnica la hemos empleado con éxito en nuestro laboratorio para la síntesis de un pequeño conjunto de 5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona 2,2-dióxidos N-sustituidos⁴⁷ y será la utilizada en esta tesis (Esquema 3.11).



Esquema 3.11: Esquema de síntesis que se llevó a cabo en la presente investigación.

3.4 Cierre del capítulo

En este capítulo se exponen las características más representativas de las moléculas involucradas en esta investigación. Se presentan las nomenclaturas, reactividad y métodos de obtención generales de amidas y de sus estructuras cíclicas derivadas. Adicionalmente, se fundamenta el uso de radiación microondas en la síntesis orgánica y se ejemplifica con metodologías asociadas a la obtención de dichos precursores químicos. Lo expuesto hasta aquí proporciona los antecedentes necesarios para comprender la elección de las diversas técnicas experimentales que se detallan en los capítulos venideros.

Referencias

1. Allinger, N. L. et al. Química Orgánica. 2da. Edición. *Reverté* (1984).
2. EvaluatePharma. World Preview 2018, Outlook to 2024. 47 (2018).
3. Los medicamentos más vendidos del 2017. <http://edicionesvr.com/notas.php?id=2851>
4. Montalbetti, C. A. et al. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
5. Cheung, C. W., et al. Amide synthesis: Via nickel-catalysed reductive aminocarbonylation of aryl halides with nitroarenes. *Chem. Sci.* **9**, 655–659 (2018).
6. González-Liste, P. J., et al. Catalytic Rearrangement of Aldoximes to Primary Amides in Environmentally Friendly Media under Thermal and Microwave Heating. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 3004–3011 (2015).
7. Crochet, P., et al. Catalytic synthesis of amides via aldoximes rearrangement. *Chem. Commun.* **51**, 2495–2505 (2015).
8. Ritter, J. J., et al. Amides from Alkenes and Mononitriles. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 4045–4048 (1948).
9. Zultanski, S., et al. Practical Synthesis of Amides via Copper/ABNO-Catalyzed Aerobic Oxidative Coupling of Alcohols and Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 6416–6419 (2016).
10. Ojeda-Porras, A., et al. Recent Developments in Amide Synthesis Using Nonactivated Starting Materials. *J. Org. Chem.* **81**, 11548–11555 (2016).
11. De Figueiredo, et al. Nonclassical Routes for Amide Bond Formation. *Chem. Rev.* **116**, 12029–12122 (2016).
12. Cossy, J., et al. A convenient synthesis of amides from carboxylic acids and primary amines. *Tetrahedron Lett.* **30**, 2771–2774 (1989).

13. Van Rantwijk, F., et al. Lipase-catalyzed synthesis of carboxylic amides: Nitrogen nucleophiles as acyl acceptor. *Monatshefte fur Chemie* **131**, 549–569 (2000).
14. Zeng, S. et al. Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase. *ACS Catal.* **8**, 8856–8865 (2018).
15. Allen, C. L., et al. Metal-catalysed approaches to amide bond formation. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 3405–3415 (2011).
16. Lundberg, H., et al. Catalytic amide formation from non-activated carboxylic acids and amines. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2714–2742 (2014).
17. Have, W. E., et al. Some amide forming reactions boron reagents involving. *Tetrahedron.* **26**, 1539–1544 (1969).
18. Mohy El Dine, T., et al. Catalytic chemical amide synthesis at room temperature: One more step toward peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **80**, 4532–4544 (2015).
19. Tang, P. Boric Acid Catalyzed Amide Formation from Carboxylic Acids and Amines: N-Benzyl-4-phenylbutyramide. *Org. Synth.* **81**, 262–272 (2005).
20. Anderson, J., et al. Selective phenol alkylation: An improved preparation of efaproxiral. *Synth. Commun.* **36**, 2129–2133 (2006).
21. Krause, T., et al. Atom-economic catalytic amide synthesis from amines and carboxylic acids activated in situ with acetylenes. *Nat. Commun.* **7**, 1–7 (2016).
22. Hirunsit, P., et al. Origin of Nb₂O₅ Lewis Acid Catalysis for Activation of Carboxylic Acids in the Presence of a Hard Base. *ChemPhysChem* **19**, 2848–2857 (2018).
23. Lundberg, H., et al. H. Hafnium-catalyzed direct amide formation at room temperature. *ACS Catal.* **5**, 3271–3277 (2015).
24. Yang, X. D. et al. Silica gel-mediated amide bond formation: An environmentally benign method for liquid-phase synthesis and cytotoxic activities of amides. *J. Comb. Chem.* **12**, 307–310 (2010).
25. Morimoto, H., et al. Lanthanum(III) triflate catalyzed direct amidation of esters. *Org. Lett.* **16**, 2018–2021 (2014).
26. Han, C., et al. A. Catalytic ester-amide exchange using group (IV) metal alkoxide-

- activator complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10039–10044 (2005).
27. Ben Halima, T., et al. Cross-Coupling Approach to Amide Bond Formation from Esters. *ACS Catal.* **7**, 2176–2180 (2017).
 28. Ali, M. A., et al. A Heterogeneous Niobium(V) Oxide Catalyst for the Direct Amidation of Esters. *ChemCatChem* **7**, 2705–2710 (2015).
 29. Vandavasi, J. K., et al. Silver(I)-catalyzed tandem approach to β -oxo amides. *European J. Org. Chem.* **2015**, 3171–3177 (2015).
 30. Mondal, A., et al. Catalyzed Direct Conversion of Ester to Amide with Liberation of H₂. *Org. Lett.* **20**, 3381–3384 (2018).
 31. Caldwell, N., et al. Development of a sustainable catalytic ester amidation process. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **1**, 1339–1344 (2013).
 32. Ohshima, T. et al. Sodium methoxide: A simple but highly efficient catalyst for the direct amidation of esters. *Chem. Commun.* **48**, 5434–5436 (2012).
 33. Miller, S. A. et al. Direct, rapid, solvent-free conversion of unactivated esters to amides using lithium hydroxide as a catalyst. *RSC Adv.* **5**, 93248–93251 (2015).
 34. Sabot, C., et al. A convenient aminolysis of esters catalyzed by 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD) under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3863–3866 (2007).
 35. Shaikh, A. Application of Microwaves in Sustainable Organic Synthesis. *Green Chemistry: An Inclusive Approach. Elsevier Inc.*, 674-671 (2017).
 36. Alcazar, J., et al. Microwave Assisted Medicinal Chemistry. *Mini-Reviews Med. Chem.* **7**, 345–369 (2007).
 37. Kappe, C. O. et al. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 51–63 (2006).
 38. Bandyopadhyay, D. et al. Microwave-Induced Synthesis of Heterocycles of Medicinal Interests. *Green Synthetic Approaches for Biologically Relevant Heterocycles. Elsevier Inc.* 517-553 (2014).
 39. Paloma, C., et al. El uso de las microondas en la industria farmacéutica. *Rev. Mex.*

- Ciencias Farm.* **42**, 1–21 (2011).
40. Web de recursos educativos de Anton Paar. <https://wiki.anton-paar.com/mx-es/>
 41. Carballido Reboredo, R. Síntesis asistida por microondas de compuestos de interés biológico e industrial, haloarenos, fulvenos, tricloropirrolidonas, azoles y flavonoides. Universidade de Santiago de Compostela, (2008).
 42. Martins, M. A. P., et al. Solvent-free heterocyclic synthesis. *Chem. Rev.* **109**, 4140–4182 (2009).
 43. Loupy, A., et al. Microwave effects in organic synthesis: Mechanistic and reaction medium considerations. *Chim. Oggi* **24**, 36–40 (2006).
 44. Perreux, L., Loupy, A. & Volatron, F. Solvent-free preparation of amides from acids and primary amines under microwave irradiation. *Tetrahedron* **58**, 2155–2162 (2002).
 45. Ojeda-Porras, A., et al. Direct amidation of carboxylic acids with amines under microwave irradiation using silica gel as a solid support. *Green Chem.* **17**, 3157–3163 (2015).
 46. Pathak, G., et al. A microwave-assisted highly practical chemoselective esterification and amidation of carboxylic acids. *RSC Adv.* **6**, 93729–93740 (2016).
 47. Pastore, V., et al. Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 841–846 (2013).
 48. Hernández-Fernández, E. et al. Synthesis of β -hydroxyacetamides from unactivated ethyl acetates under base-free conditions and microwave irradiation. *Tetrahedron Asymmetry* **26**, 73–78 (2015).
 49. Gupta R., et al. Nomenclature of heterocycles. *Heterocyclic chemistry. Springer.* 3-38 (1998).
 50. Deyrup, J. A., et al. 1,2,3-Oxathiazolidines—a New Heterocyclic System. *J. Org. Chem.* **34**, 175–179 (1969).
 51. Posakony, J. J., et al. New routes to N-alkylated cyclic sulfamidates. *J. Org. Chem.*

- 67**, 5164–5169 (2002).
52. Meléndez, R. E., et al. Synthesis and reactivity of cyclic sulfamidites and sulfamidates. *Tetrahedron* **59**, 2581–2616 (2003).



CAPÍTULO 4

IDENTIFICACIÓN DE AGENTES
ANTICONVULSIVOS Y BLANCOS
MOLECULARES

Capítulo 4

Identificación de agentes anticonvulsivos y blancos moleculares

4.1 Introducción

La medicina traslacional describe cuales son las condiciones y requisitos previos para transferir resultados in vitro (ej. cultivo celular) e in vivo (ej. modelo animal) en aplicaciones humanas.¹ Desde esta óptica, el descubrimiento de un nuevo agente terapéutico comienza con la hipótesis de que un modelo experimental se aproxima a la fisiopatología subyacente de los humanos.²

En el caso de la Epilepsia, el uso de modelos animales de convulsiones ha resultado imprescindible para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Históricamente, una variedad de especies han sido utilizadas para el estudio de esta enfermedad, iniciándose la investigación con perros, gatos y primates no humanos, que con el tiempo fueron mayoritariamente reemplazados por roedores.³

La rata noruega (*Rattus norvegicus*) y el ratón doméstico (*Mus musculus*) son ampliamente empleados debido a su pequeño tamaño, docilidad y rápida reproducción en cautiverio. Estos animales poseen correspondencia en humanos en cuanto a los efectos anticonvulsivos, aunque debe señalarse que dicha correspondencia no es total y existen comportamientos no esperados que resultan de las diferencias en la expresión génica y la función de las proteínas.⁴ Además, en cualquier especie existen diferencias entre poblaciones heterogéneas y cepas endogámicas.⁵ Todas estas consideraciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de elegir el modelo para encarar las evaluaciones preclínicas. A continuación, se detallarán los protocolos más utilizados actualmente para la identificación de nuevos compuestos con acción anticonvulsiva.

4.2 Identificación de nuevos agentes anticonvulsivos

Durante más de 40 años, el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares de Estados Unidos ha fijado los lineamientos para la identificación y desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos mediante un Programa de descubrimiento conocido desde 2016 como el Programa de detección de terapias para la Epilepsia (ETSP).⁶

El último enfoque del ETSP para la búsqueda de tratamientos efectivos para la Epilepsia farmacorresistente (Imagen 4.1) consta de dos fases: inicialmente se realiza una identificación, mediante el uso de una importante cantidad de ensayos distintos, para determinar la eficacia potencial de nuevos compuestos; y luego se los somete a una fase de diferenciación, con evaluaciones más costosas en recursos.⁷

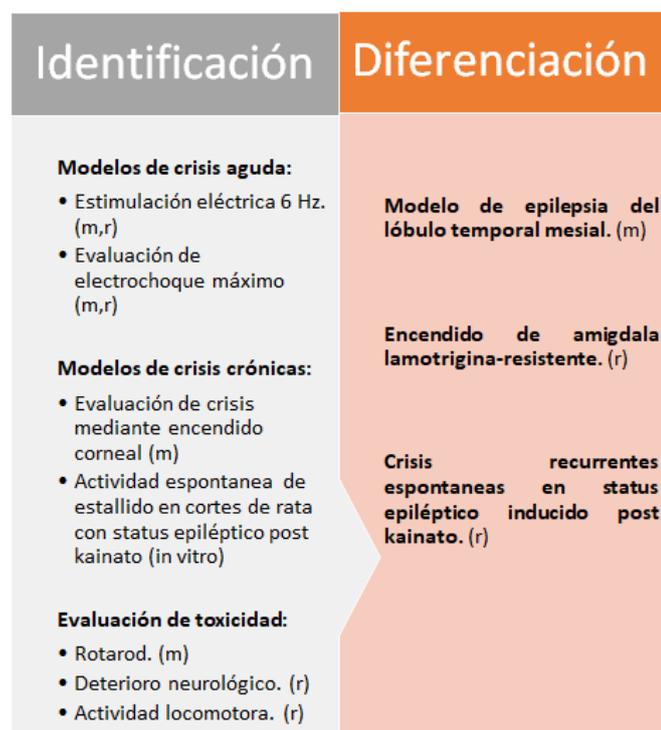


Imagen 4.1: Flujo de trabajo del ETSP para la Epilepsia farmacorresistente. *Los modelos en ratones se indican con “m”, y las ratas con “r”. Adaptado de Löscher et al (2017)*⁸

A continuación, se proporcionará mayor detalle sobre la etapa de identificación, ya que los modelos de electrochoque máximo y Rotarod son las pruebas llevadas a cabo en esta tesis doctoral. Esta fase propone los siguientes modelos:

1. **Modelos de crisis aguda:** Mediante electrochoques aplicados una sola vez, sin requerir implante estereotáxico de electrodos, se inducen convulsiones en los animales. El punto final está determinado por la intensidad del estímulo eléctrico.⁹

- **Estimulación eléctrica 6 Hz:** un pulso rectangular de 6 Hz (ancho de pulso de 1 ms) y una corriente de 44 mA se administran durante 3 s mediante electrodos colocados en la córnea o en las orejas.² Se cree que estas convulsiones modelan las crisis focales observadas en humanos.

El modelo de 6 Hz parece ser predominantemente resistente a los moduladores de los canales de sodio como la Fenitoína o la Lamotrigina, mientras que los fármacos con otros mecanismos, en particular los compuestos GABAérgicos (Retigabina, Fenobarbital, Brivaracetam, Levetiracetam), dan positivo este ensayo.¹⁰

- **Evaluación de electrochoque máximo (MES test, del inglés Maximal Electroshock seizure test):** las convulsiones tónico-clónicas son inducidas por la aplicación transcorneal o, con menos frecuencia, transauricular de un estímulo eléctrico corto (0.2 s) en ratones normales (50 mA) o ratas (150 mA). El punto final en esta prueba es la extensión tónica de las extremidades posteriores del roedor.⁷ El MES Test fue el primer modelo animal validado para crisis convulsivas, permitiendo la identificación de Fenitoína por Merrit y Putnam en 1937.¹¹ La alta correlación demostrada entre la capacidad de un fármaco para inhibir MES en roedores y su efectividad en las crisis tónico-clónicas generalizadas en humanos, además de la facilidad con la que se puede visualizar la actividad anticonvulsiva en estos animales, son probablemente las principales razones de la popularidad de la prueba MES.¹²

A pesar de los numerosos fármacos anticonvulsivos que resultan ser efectivos en estos modelos, se debe tener en cuenta que las crisis son generadas a partir de descargas eléctricas sobre los cerebros sanos de los roedores, por lo que la fisiopatología de la Epilepsia no está representada. Por lo tanto, nuevos agentes anticonvulsivos que mejoren los desequilibrios neuronales pueden llegar a no detectarse.¹³ Para ello aparecen modelos más complejos de implementar como son los de crisis crónicas.

2. **Modelos de crisis crónica:** El objetivo es generar un estado de epileptogénesis persistente. En el modelo de status se imitan las crisis continuas producidas en humanos bajo esta condición y puede ser inducido por la administración repetida de agentes farmacológicos (ácido kaínico) o por estimulación eléctrica.¹⁴ Por otro lado Kindling o “encendido” se refiere al proceso por el cual hay un aumento progresivo en la actividad de crisis electrográficas (ver Anexo 1) en respuesta a la estimulación eléctrica repetida de una región cerebral como la amígdala o el hipocampo.¹⁵

Cada modelo cuenta con sus propias características y como se observa en la Imagen 4.1, el ETSP propone un ensayo in vitro en el que se produce un estallido eléctrico espontáneo en un corte cerebral de corteza de ratas en status por exposición previa al kainato y una evaluación de las crisis mediante encendido corneal de ratón.⁸

3. **Evaluación de toxicidad:** Las evaluaciones in vivo de neurotoxicidad comprenden el rendimiento en el Rotarod en ratones, la actividad locomotora y las puntuaciones neurológicas en la rata, además de las observaciones generales del comportamiento.

La prueba Rotarod está diseñada para detectar un déficit neurológico mínimo. El ratón es colocado sobre un cilindro estriado de 1 pulgada de diámetro que gira a 6 rpm (Imagen 4.2). Los animales sanos pueden permanecer indefinidamente en un cilindro que gira a esta velocidad. El déficit neurológico (expresado por ejemplo como ataxia, sedación, hiperexcitabilidad) está indicado por la

incapacidad del animal para mantener el equilibrio durante al menos 1 minuto en cada una de las tres repeticiones consecutivas.¹⁶

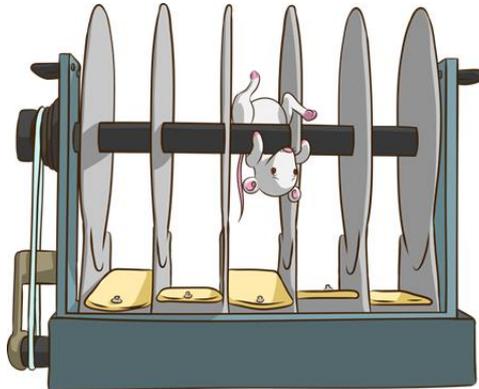


Imagen 4.2: Representación de la prueba Rotarod. Tomado de <https://imgur.com/gallery/44vStxD>

Debe tenerse en cuenta que los modelos animales solo proporcionan herramientas para determinar qué compuestos deben continuar estudiándose, por lo que no predicen directamente la eficacia en el tratamiento de la Epilepsia humana. La prueba definitiva para comprobar la actividad anticonvulsiva requiere continuar con las etapas del descubrimiento del fármaco, hasta llegar al uso en pacientes para validar las conclusiones obtenidas de los modelos preclínicos.²

4.3 Identificación de los blancos moleculares

Los enfoques neurofisiológicos y bioquímicos celulares modernos han permitido identificar los blancos moleculares probables de los FAEs que, como se mencionó en el capítulo 1, incluyen principalmente canales iónicos operados por voltaje, receptores GABA A, receptores de glutamato ionotrópico, transportadores GABA, GABA transaminasa y la proteína vesicular sináptica SV2A.^{17,18}

La realización de un cribado in vitro sobre los diferentes objetivos proteicos a fin de identificar u optimizar potenciales fármacos anticonvulsivos posee algunas desventajas.¹⁹

1. La interacción de una molécula con una diana biológica específica no es condición suficiente para la actividad anticonvulsiva. Por ejemplo, los FAEs que bloquean los canales de sodio como la Fenitoína se unen con una afinidad relativamente baja, sin embargo, existen otras drogas sin actividad anticonvulsiva clínicamente útil (ligandos de receptores adrenérgicos, histamina y receptores de serotonina; neurolépticos; y antidepresivos tricíclicos) que modulan los canales de sodio activados por voltaje de manera más potente que los FAEs que los bloquean.
2. Muchos FAEs actúan en más de un blanco molecular, por lo que favorecer la interacción con un objetivo preferido podría tener efectos impredecibles en otros.
3. El cribado in vitro no brinda información respecto a la biodisponibilidad ni a la accesibilidad de la droga al cerebro.

Sin embargo, la elucidación de los mecanismos de acción de las nuevas moléculas es de gran importancia; no solo desde el punto de vista de la ganancia de conocimientos sino también porque posibilita el descubrimiento de nuevos blancos moleculares o de probables segundos usos de fármacos.

En este sentido, y enmarcado en los objetivos de la presente tesis, se puntualiza a continuación la técnica electrofisiológica Patch Clamp, empleada por investigadores del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (Dres. Pastore y Martin) para testear la posible acción como bloqueantes de canal de sodio de nuevos compuestos desarrollados en este trabajo.

4.3.a Patch Clamp

Desde su introducción en 1976, por Neher y Sakmann,²⁰ esta metodología ha permitido investigar la apertura y cierre de canales, así como medir la conductancia de iones en los mismos.

La técnica de Patch Clamp permite cuantificar las corrientes iónicas de transmembrana manteniendo su potencial en valores prefijados (voltage-clamp), o la variación de potencial de membrana ante un estímulo fijo de corriente (current-clamp).²¹ El primer

protocolo es el utilizado en esta tesis, y consiste en medir la corriente necesaria para mantener una diferencia de potencial constante a través de una diminuta porción de membrana.

La corriente eléctrica generada por el flujo de iones a través de la membrana es medida por medio de un parche (“patch”) y un dispositivo electrónico que fija (“to clamp”) el potencial en un valor definido.

Con el objetivo simultáneo de mantener fijo el potencial y medir la corriente se emplea un único electrodo (filamento de plata recubierto de una capa de cloruro de plata), dentro de una micropipeta de vidrio. Al presionar la pipeta contra la membrana se forma un sello eléctrico de alta resistencia (aproximadamente de 50 M Ω), que garantiza que la mayor parte de las corrientes originadas en el parche circulen por la pipeta y lleguen al circuito de registro. Ejerciendo una suave succión se logra establecer un sello de mayor resistencia (gigasello), del orden de 1-100 G Ω , lo que permite reducir el ruido de registro, evitar el flujo de corriente entre la pipeta y el baño y por lo tanto fijar el potencial del parche.²² Esta configuración recibe el nombre de célula adherida o “cell attached”, que una vez establecida posibilita el registro de la corriente con el parche unido o aislado al resto de la célula. Además, partir de esta configuración (A) es posible disponer de otras tres más (B, C y D),²⁰ como se muestra en la Imagen 4.3:

- A. “On-cell” o “cell-attached”**, se establece a partir de la formación del gigasello. Al ser la técnica más sencilla y menos invasiva con la célula del estudio, presenta la ventaja de que las medidas se realizan en el entorno fisiológico de los canales.
- B. “Inside-out”**, una vez establecida la configuración **A** se retira la pipeta con un pequeño trozo de membrana, quedando el lado intracelular en la parte externa de la pipeta. Esto posibilita el cambio del medio intracelular. A diferencia de la configuración anterior, esta técnica permite conocer la verdadera diferencia de potencial a la que está sometido el parche de membrana.
- C. “Whole-cell”**, partiendo de la configuración **A**, se aplica una presión negativa que consigue romper la membrana debajo de los bordes de la pipeta. Esto permite el contacto entre el medio intracelular y el interior de la pipeta, posibilitando la medida de corrientes macroscópicas. No es posible realizar el cambio del medio citosólico, pero sí el del medio extracelular.

D. “**Outside-out**”, se consigue retirando la pipeta y aplicando una presión negativa a partir de configuración C, provocando así que el lado extracelular de la membrana quede en la parte externa de la pipeta. Esta técnica es empleada para medir los efectos de las sustancias extracelulares en los canales del parche aislado.

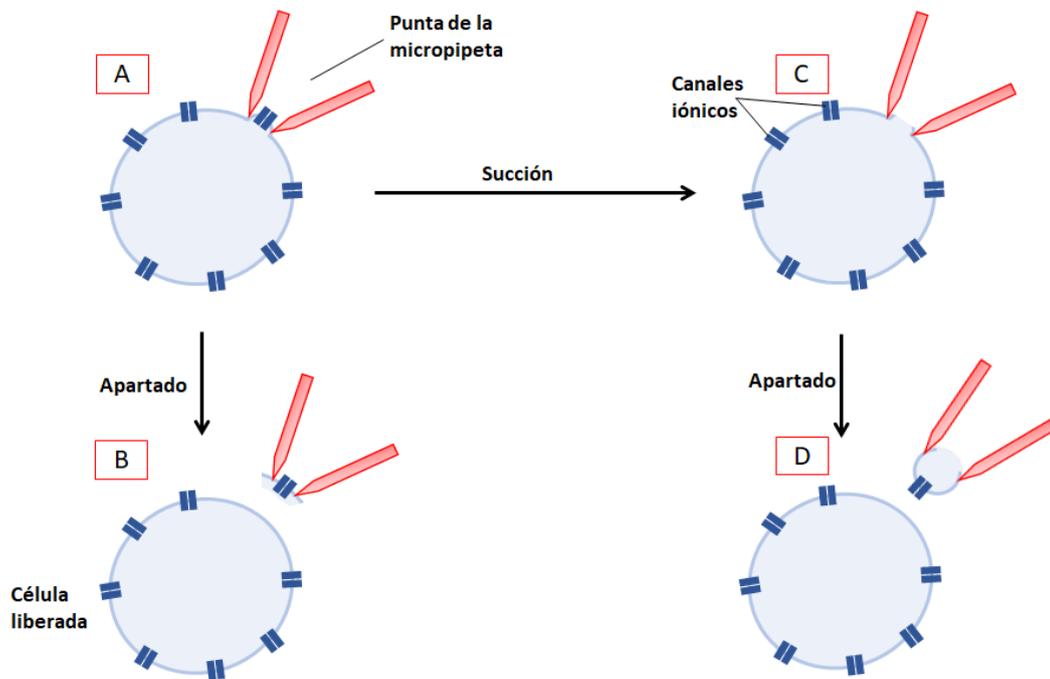


Imagen 4.3: Configuraciones del Patch Clamp. A. “*Cell-attached*”, B. “*Inside-out*”, C. “*Whole-Cell*”, D. “*Outside-out*” Adaptada de Sakmann (1984)²²

4.4 Cierre del capítulo

El presente capítulo describe brevemente los ensayos biológicos utilizados para el descubrimiento de fármacos anticonvulsivos. Particularmente, se presentan los modelos propuestos en el último enfoque del ETSP tendientes a la identificación de nuevos agentes y se expone la metodología Patch Clamp como una estrategia dispuesta para la elucidación experimental de un posible mecanismo de acción de los candidatos a FAEs (bloqueo de canales de sodio).

Hasta aquí se han presentado los aspectos generales de la Epilepsia (Capítulo 1) del descubrimiento de fármacos (Capítulo 2), de la síntesis orgánica de las estructuras vinculadas a esta investigación (Capítulo 3) y de la identificación de agentes

anticonvulsivos y blancos moleculares (Capítulo 4). Todo esto constituye acabadamente el marco teórico de la presente tesis doctoral, dando paso al reporte de los detalles experimentales y resultados obtenidos para cada caso en los capítulos subsiguientes.

Referencias

1. Wehling, M., et al. Drug development in the light of translational science: Shine or shade? *Drug Discov. Today* **16**, 1076–1083 (2011).
2. Kupferberg, H. Animal Models Used in the Screening of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* **42**, 7–12 (2008).
3. Krook-Magnuson, E., et al. Issues in Clinical Epileptology: A View from the Bench. *Adv. Exp. Med. Biol.* **813**, 319–336 (2014).
4. Lynch, V. J. Use with caution: Developmental systems divergence and potential pitfalls of animal models. *Yale J. Biol. Med.* **82**, 53–66 (2009).
5. Schauwecker, P. E. The relevance of individual genetic background and its role in animal models of epilepsy. *Epilepsy Res.* **97**, 1–11 (2011).
6. Kehne, J. H., et al. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). *Neurochem. Res.* **42**, 1894–1903 (2017).
7. Löscher, W., et al. Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res.* **126**, 157–184 (2016).
8. Löscher, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem. Res.* **42**, 1873–1888 (2017).
9. Kandravicius, L. et al. Animal Models of Epilepsy: Utility and Limitations. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **10**, 1693–1705 (2014).
10. Barton, M. E., et al. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res.* **47**, 217–227 (2001).
11. Putnam, T., et al. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science.* **85**, 525–526 (1937).

12. Castel-Branco, M., et al. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **31**, 101–106 (2009).
13. Vezzani, A., et al. Epilepsy and brain inflammation. *Exp. Neurol.* **244**, 11–21 (2013).
14. Reddy, D., et al. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18284–18318 (2013).
15. Klitgaard, H. et al. Animal and Translational Models of the Epilepsies in Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery. Chapter 8. *Elsevier*. 311–335 (2008).
16. Krall RL, et al. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia* 19:409–428 (1978).
17. Kaur, H., Kumar, et al. Antiepileptic drugs in development pipeline: A recent update. *eNeurologicalSci* **4**, 42–51 (2016).
18. Rogawski, M. A. & Löscher, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 553–564 (2004).
19. Rogawski, M. Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res.* **68**, 28–28 (2006).
20. Kornreich, B. G. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *J. Vet. Cardiol.* **9**, 25–37 (2007).
21. Hamill, O. P., et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100 (1981).
22. Sakmann, B. et al. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Ann. Rev. Physiol.* **46**, 455–72 (1984).

CAPÍTULO 5



SÍNTESIS DE AMIDAS Y SUS DERIVADOS CÍCLICOS

Capítulo 5

Síntesis de amidas y sus derivados cíclicos

5.1 Consideraciones generales de síntesis

Las reacciones llevadas a cabo por calentamiento térmico (con baño de aceite) fueron realizadas en equipos de vidrio borosilicatado que, con el objetivo de trabajar en condiciones anhidras, fueron calentados con pistola de calor y posteriormente enfriados y purgados con corriente de nitrógeno seco (contenido de agua \leq 3ppm, marca Linde).

Las síntesis vía radiación microondas se llevaron a cabo en reactor Monowave 300™ marca Anton Paar. Se emplearon tubos de reacción de vidrio de borosilicato (G10) con volumen de reacción de 2,0 ml a 6,0 ml, tapa de seguridad y agitadores magnéticos. El control de temperatura se realizó mediante termómetro IR (incertidumbre en la medición \pm 5 °C). El método seleccionado para todas las reacciones fue el de temperatura constante.

Los solventes de reacción dimetilformamida, diclorometano y tolueno se secaron, destilaron y almacenaron sobre tamiz molecular 4 Å (Merck). Los enfriamientos se realizaron empleando mezcla frigorífica (hielo y cloruro de sodio). Las aminas empleadas como reactivos fueron destiladas y conservadas sobre hidróxido de potasio, en frascos color caramelo y en heladera.

Los avances de reacción y el control de pureza de solventes, reactivos y productos se determinaron mediante cromatografía en capa delgada (TLC, sílica gel 60 con fluorescencia 254 nm marca Merck). Los métodos de revelado empleados fueron: luz UV 254 nm y 366 nm (no destructivo) y una solución ácida de molibdato de amonio 5,5 % con posterior calentamiento del cromatofolio (método destructivo).

Los solventes se evaporaron en rotavapor a una presión aproximada de 30 torr. El secado hasta peso constante se realizó en tambor a temperatura ambiente y a 20 torr.

Las columnas cromatográficas se prepararon con sílica gel 60 (70 – 230 mesh, Merck). Los solventes empleados en las mismas y en las cristalizaciones fueron destilados previamente.

La purificación de los productos se realizó mediante cromatografía en columna y posterior recristalización (en el caso de los sólidos).

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Electrothermal en capilar cerrado y no fue corregida la temperatura por vástago emergente.

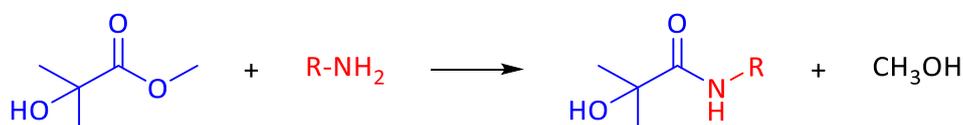
Los espectros ^1H (500 MHz) y ^{13}C (126 MHz) fueron realizados en un espectrómetro BRUKER AVANCE II 500 perteneciente a la Unidad de microanálisis y métodos físicos aplicados a la química orgánica (UMYMFOR) dependiente de CONICET y de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Los datos de corrimiento químico se reportaron en ppm respecto del estándar interno tetrametilsilano, mientras que las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz. Los espectros obtenidos, junto con las asignaciones para cada Carbono e Hidrógeno se muestran en el Anexo 2.

Los análisis elementales se realizaron determinando la composición de C, H, N y S. El porcentaje de O se estimó por diferencia. Se empleó un equipo Carlo Erba EA 1108, aceptándose un error entre +/- 0,2 – 0,3 % respecto a los valores teóricos calculados a partir de las estructuras. Los mismos se realizaron en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) de la FCEyN - UBA.

La determinación de la masa exacta por ESI (electrospray) en modo positivo (inyección directa) se realizó en un equipo Bruker micrOTOF-QII perteneciente al UMYMFOR.

5.2 Síntesis de amidas a partir del éster

A continuación, se muestra un esquema general de obtención de las amidas empleando α -hidroxiisoburitato de metilo como material de partida.



5.2.a Metodología vía radiación microondas

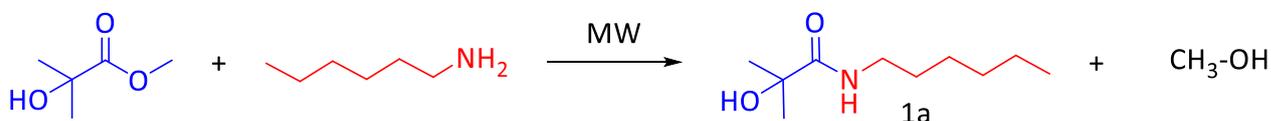
En un tubo de reacción apto para microondas se agregó α -hidroxiisoburitato de metilo (20 mmoles, Aldrich), la amina correspondiente (24 mmoles) y una barra de agitación magnética recubierta de teflón. Previamente a taparlo, se realizó un burbujeo de Nitrógeno seco en la mezcla. El reactor se ajustó a 150 °C, el tiempo de reacción fue de 30 min y el avance se monitoreó por TLC. Al concluir la etapa de síntesis, se añadió diclorometano (30 ml) y la mezcla se lavó con ácido clorhídrico al 5% v/v (10 ml x2) y solución saturada de cloruro de sodio (10 ml x1). Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y posteriormente se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó y luego se secó en tambor de vacío hasta peso constante. Todas las amidas de esta sección fueron obtenidas vía microondas. En algunos casos (compuestos 1b, 1d y 1f) se utilizó además a la estrategia de calentamiento tradicional y el uso de catalizador (TBD)¹ con el fin de mejorar los rendimientos obtenidos previamente.

5.2.b Metodología vía convencional catalizada por TBD

En un tubo de reacción previamente secado con pistola de calor y purgado con Nitrógeno seco se agregó α -hidroxiisoburitato de metilo (20 mmoles), la amina correspondiente (24 mmoles), 30 % de TBD (Aldrich) y una barra de agitación magnética recubierta de teflón. Se tapó y se dejó reaccionando a 70 °C (temperatura de baño) durante 20 h. El aislamiento y purificación se llevaron a cabo de igual forma que en la vía microondas. El TBD se recuperó desde la fase acuosa.

5.2.c Resultados de síntesis de amidas a partir del éster

Síntesis de N-hexil-2-hidroxiisobutiramida (1a)



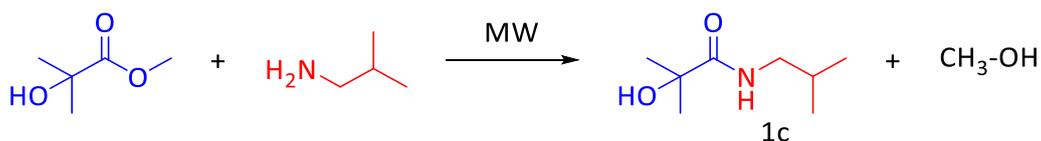
- Rendimiento: 40% (aceite).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.91 (C_1), 73.29 (C_2), 39.48 (C_3), 31.16 (C_4), 29.51(C_5), 27.61 (C_6), 26.54 (C_7), 22.76 (C_8), 13.8 (C_9).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.75 (s, 1H, H_1), 3.26 (m, 2H, H_2), 1.53 (m, 2H, H_3), 1.47 (s, 6H, H_4), 1.32 (s, 6H, H_5), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H_6).
- $[\text{M}+\text{H}]_{\text{predicho}}=188.1650$, $[\text{M}+\text{H}]_{\text{experimental}}=188.1645$

Síntesis de N-isopropil-2-hidroxiisobutiramida (1b)



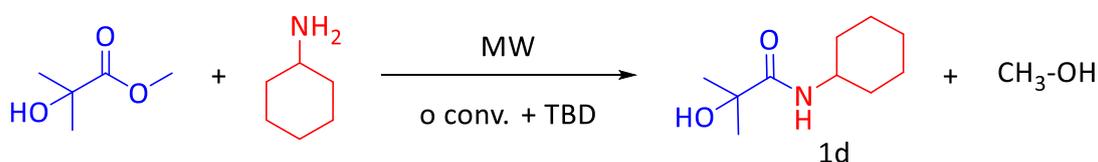
- Rendimiento con MW: 24%
- Rendimiento con calentamiento convencional: 32%
- Punto de fusión: 66–67 °C. (Hexano)
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.96 (C_1), 72.52 (C_2), 40.64 (C_3), 27.54 (C_4), 22.24(C_5).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.71 (brs, 1H, H_1), 4.05 (m, 1H, H_2), 3.40 (brs, 1H, H_3), 1.43 (s, 6H, H_4), 1.16 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H_5).
- Análisis calculado: C, 57.90; H, 10.41; N, 9.65; O, 22.04
Análisis encontrado: C, 57.9 ± 0.3 ; H, 10.3 ± 0.2 ; N, 9.5 ± 0.2 .

Síntesis de N-isobutil-2-hidroxiisobutiramida (1c)



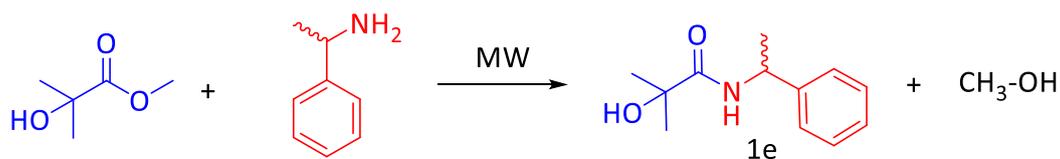
- Rendimiento: 57%
- Punto de fusión: 104–105 °C (hexano).
- ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.23 (C₁), 73.33(C₂), 46.37(C₃), 28.55(C₄), 27.95 (C₅), 20.02(C₆).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.90 (brs, 1H, H₁), 3.08 (dd, 2H, H₂), 2.05 (s, 1H, H₃), 1.77 (m, 1H, H₄), 1.45 (s, 6H, H₅), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, H₆).
- Análisis calculado: C, 60.35; H, 10.76; N, 8.80; O, 20.10
Análisis encontrado: C, 60.2 ± 0.3; 10.9 ± 0.2; N, 8.8 ± 0.2.

Síntesis de N-ciclohexil-2-hidroxiisobutiramida (1d)



- Rendimiento con MW: 5% (Reportado en Pastore, V. et al. (2013)²)
- Rendimiento convencional: 56%
- Punto de fusión: 81-82.5 °C (Acetonitrilo, pf. de literatura: 81-82.5 °C).
- Datos RMN reportados en literatura.²

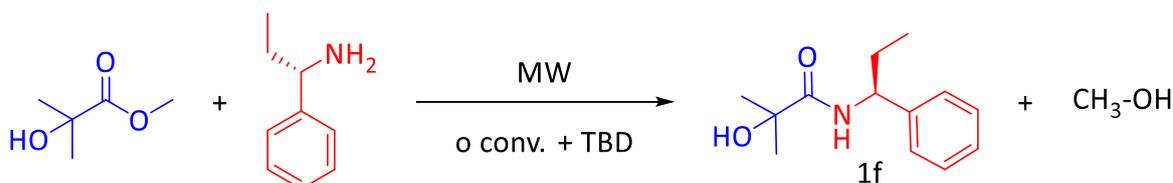
Síntesis de N-((±)-1-metilbencil)-2-hidroxiisobutiramida (1e)



- Rendimiento con MW: 46%.
- Punto de fusión: 67 – 68 °C (diclorometano/hexano).

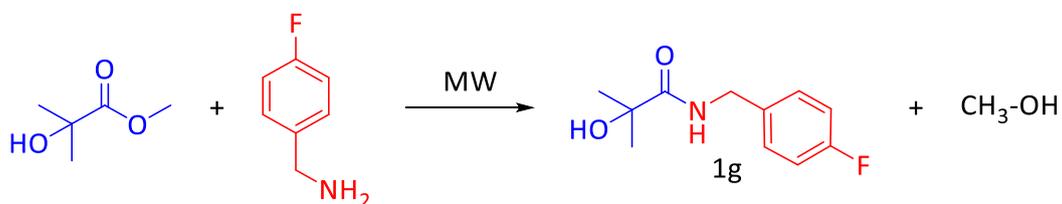
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.75 (C_1), 143.15 (C_2), 128.45 (C_3), 127.30 (C_4), 125.61 (C_5), 73.44 (C_6), 47.99 (C_7), 27.83 (C_8), 21.79 (C_9).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (m, 1H, H_1), 7.04 (brs, 1H, H_2), 7.02-7.00 (m, 2H, $\text{H}_{3,4}$), 4.40 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H_5), 3.79 (s, 1H, H_6), 1.48 (s, 6H, H_7), 1.45 (d, 3H, H_8).
- Análisis calculado: C, 69.54; H, 8.27; N, 6.76; O, 15.44
- Análisis encontrado: C, 69.4 ± 0.3 ; H, 8.3 ± 0.2 ; N, 6.7 ± 0.2 .

Síntesis de N-((S)-1-etilbencil)-2-hidroxiisobutiramida (1f)



- Rendimiento con MW: 18%
- Rendimiento con calentamiento convencional: 47%
- Punto de fusión: 63–64 °C (hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.52 (C_1), 142.16 (C_2), 128.64 (C_3), 127.29 (C_4), 126.50 (C_5), 73.69 (C_6), 54.55 (C_7), 29.38 (C_8), 28.07, 27.86 (C_9), 10.69 (C_{10}).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.27 (m, 5H, H_{1-3}), 7.01 (brs, 1H, H_4), 4.86 (m, 1H, H_5), 2.13 (brs, 1H, H_6), 1.86 (m, 2H, H_7), 1.49 (s, 3H, H_8), 1.44 (s, 3H, H_9), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H_9).
- $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{predicho}}=244.1313$, $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{experimental}}=244.1308$

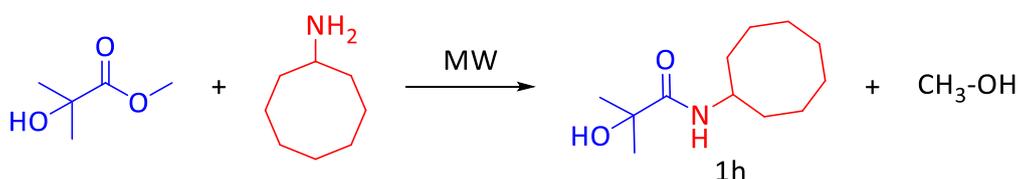
Síntesis de N-(4-fluorobencil)-2-hidroxiisobutiramida (1g)



- Rendimiento: 28%
- Punto de fusión: 73–74.5 °C (Hexano).

- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 176.04 (C_1), 163.17 y 161.22 (C_2), 134.06 (C_3), 129.38 (C_4), 115.49 (C_5), 73.79 (C_6), 42.57(C_7), 28.05 (C_8).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (m, 2H, H_1), 7.07-7.02 (m, 3H, $\text{H}_{2,3}$), 4.43 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_4), 2.24 (brs, 1H, H_5), 1.51 (s, 6H, H_6).
- Análisis calculado: C, 62.55; H, 6.68; F, 8.99; N, 6.63; O, 15.15
Análisis encontrado: C, 62.4 ± 0.3 ; H, 6.6 ± 0.2 ; 6.6 ± 0.2 .

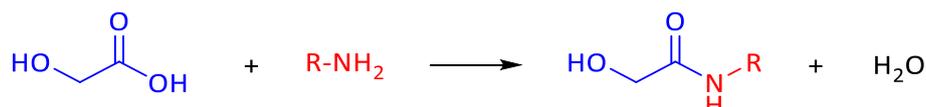
Síntesis de N-ciclooctil-2-hidroxiisobutiramida (1h)



- Rendimiento: 20%
- Punto de fusión: 73–74.5 °C (éter).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 174.97 (C_1), 73.38 (C_2), 49.06 (C_3), 32.31 (C_4), 27.93 (C_5), 27.15 (C_6), 25.49 (C_7), 23.71 (C_8).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (brs, 1H, H_1), 3.95 (m, 1H, H_2), 2.61 (s, 1H, H_3), 1.86-1.51 (m, 14H, H_{4-6}), 1.45 (s, 6H, H_7).
- $[\text{M}+\text{H}]_{\text{predicho}}=214.1807$, $[\text{M}+\text{H}]_{\text{experimental}}=214.1802$

5.3 Síntesis de amidas a partir del ácido

El esquema general de obtención de las amidas empleando ácido glicólico como material de partida es:

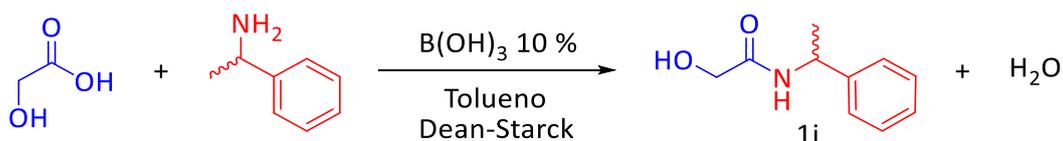


5.3.a Metodología vía convencional a partir del ácido

En un balón previamente secado con pistola de calor se agregó ácido glicólico (2 mmoles, Aldrich), la amina correspondiente (2,4 mmoles), ácido bórico (0,02 mmoles) y tolueno anhidro (250 ml). Se adaptó una trampa de Dean-Stark y se calentó a reflujo durante 18 h. La mezcla resultante se enfrió y el solvente se recuperó en evaporador rotatorio. Se añadió diclorometano (30 ml) y se procedió a realizar la etapa de aislamiento y purificación como en las síntesis anteriores.³

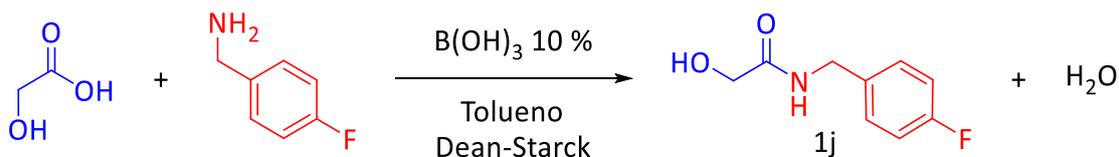
5.3.b Resultados de síntesis de amidas a partir del ácido

Síntesis de N-((±)-1-metilbencil)-2-hidroxiacetamida (1i)



- Rendimiento: 40%
- Punto de fusión: 94-95 °C (Hexano).
- ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 170.75 (C₁), 142.78 (C₂), 128.75 (C₃), 127.53 (C₄), 126.14 (C₅), 62.14 (C₆), 48.46 (C₇), 21.90 (C₈).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.25 (m, 5H, H₁₋₃), 6.81 (brs, 1H, H₄), 5.15 (m, 1H, H₅), 4.05 (s, 2H, H₆), 2.60 (brs, 1H, H₇), 1.51 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H₈).
- [M+H]_{predicho}=180.1024, [M+H]_{experimental}=180.1019

Síntesis de N-(4-fluorobencil)-2-hidroxiacetamida (1j)

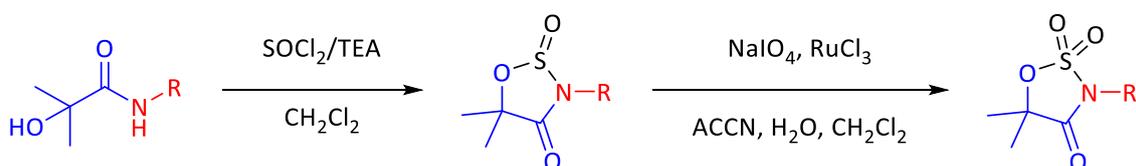


- Rendimiento: 45%
- Punto de fusión: 100-101 °C (Hexano).

- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 171.53 (C_1), 163.25 y 161.29 (C_2), 161.29 (C_2), 133.57 (C_3), 129.53 (C_4), 115.63 (C_5), 62.19 (C_6), 42.35 (C_7).
 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (m, 2H, H_1), 7.02(m, 2H, H_2), 6.89 (brs, 1H, H_3), 4.44 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_4), 4.13 (s, 2H, H_5), 2.46 (brs, 1H, H_6).
- $[\text{M}+\text{H}]_{\text{predicho}}=184.0773$, $[\text{M}+\text{H}]_{\text{experimental}}=184.0768$

5.4 Síntesis de derivados N-sustituídos de 1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxidos

Se prepararon cinco N-derivados del 5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido partiendo de las correspondientes α -hidroxiamidas sintetizadas previamente. Se utilizó la metodología de síntesis descrita para otros N-derivados,² que implica inicialmente la formación de un ciclo 5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2-óxido, para luego ser oxidado al dióxido correspondiente. El esquema general se presenta a continuación.



5.4.a Metodología de reacción de ciclación

Sobre un tubo de reacción que contenía una mezcla homogénea de α -hidroxiamida (2 mmoles) en diclorometano anhidro (4 ml) se agregó mitad de volumen de una solución de trietilamina (7,6 mmoles) en el mismo solvente (4 ml). Se incorporó un agitador magnético, se tapó con septum y se enfrió el sistema a -15 °C. Empleando jeringa se adicionó lentamente una solución de cloruro de tionilo (5,6 mmoles) en diclorometano (5 ml). Finalmente se completó con el agregado de la solución de trietilamina. Se dejó reaccionando durante 14 h. Finalizado este tiempo se evaporó el solvente y el sólido se lo disolvió en diclorometano (30 ml). Se hicieron lavados con solución saturada de cloruro de sodio (10 ml x3). La fase orgánica se la secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y posteriormente se evaporó el solvente. El sólido obtenido (3-derivado-5,5-

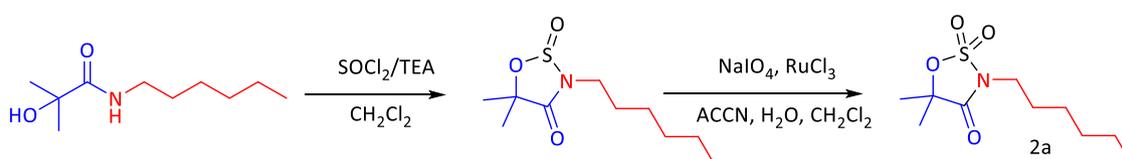
dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2-óxido), se secó a peso constante y se empleó sin purificar en la reacción posterior.

5.4.b Metodología de reacción de oxidación

El sólido sintetizado en el paso anterior se redisolvió en diclorometano (5 ml) y acetonitrilo (5 ml). Se dejó con agitación magnética sobre mezcla frigorífica y se incorporó una solución de peryodato de sodio (Aldrich, relación NaIO_4 /intermediario 1/4 en 5 ml de agua destilada). Se agregó cantidad catalítica de tricloruro de rutenio (Aldrich) y se dejó reaccionar durante 3 h. Para todos los compuestos el aislamiento y la purificación se realizó por cromatografía en columna y adicionalmente 2c, 2d, 2e y 2g fueron recristalizados.

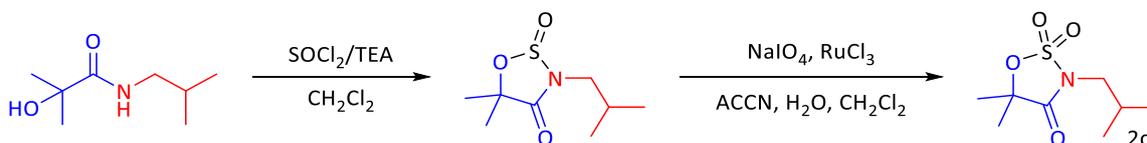
5.4.c Resultados de la síntesis de derivados N-sustituidos de 1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxidos

Síntesis de 3-hexil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2a)



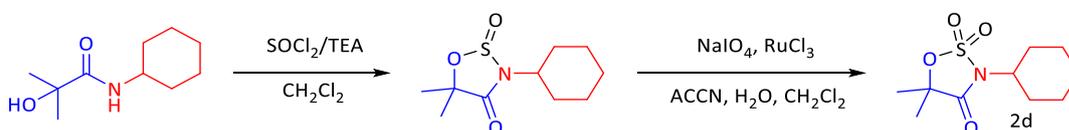
- Rendimiento: 25% (aceite).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.38 (C_1), 93.26 (C_2), 42.03 (C_3), 30.98 (C_4), 27.46 (C_5), 26.09 (C_6), 24.35 (C_7), 22.49 (C_8), 13.85 (C_9).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.67 (*t*, 2H, H_1), 1.79 (*m*, 2H, H_2), 1.76 (*s*, 6H, H_3), 1.45-1.32 (*m*, 6H, H_4), 0.91 (*t*, $J = 6.8$ Hz, 3H, H_5).
- $[\text{M}+\text{H}]_{\text{predicho}}=250.1113$, $[\text{M}+\text{H}]_{\text{experimental}}=250.1108$

Síntesis de 3-(1-isobutil)-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2c)



- Rendimiento: 55%
- Punto de fusión: 40–41 °C (hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.90 (C_1), 93.22 (C_2), 49.00 (C_3), 27.14 (C_4), 24.44 (C_5), 19.72 (C_6).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_1), 2.25 (m, 1H, H_2), 1.77 (s, 6H, H_3), 1.00 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, H_4).
- $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{predicho}}=244.0619$, $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{experimental}}=244.0614$

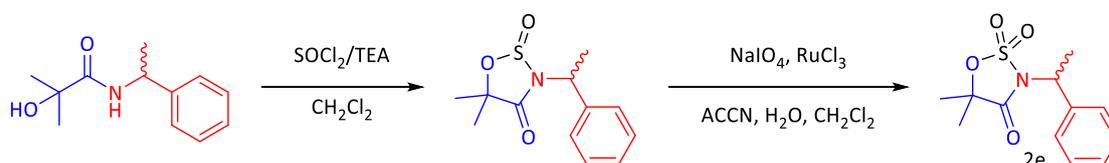
Síntesis de 3-ciclohexil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2d)



- Rendimiento: 71%
- Punto de fusión: 59–60 °C (hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.47 (C_1), 91.82 (C_2), 56.06 (C_3), 29.78 (C_4), 25.72 (C_5), 24.82 (C_6), 24.28 (C_7).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.99 (m, 1H, H_1), 2.08 – 1.87 (m, 6 H, H_2), 1.73 (s, 6H, H_3), 1.45-1.19 (m, 4H, H_4).
- $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{predicho}}=270.0776$, $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{experimental}}=270.0770$

Síntesis de 3-((±)-1-metilbencil)-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2

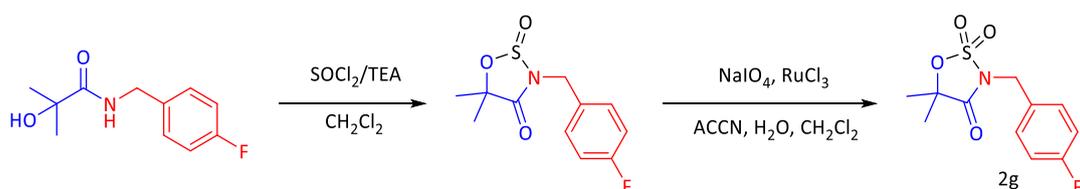
dióxido (2e)



- Rendimiento: 58%
- Punto de Fusión: 66–67 °C (hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 163.06 (C_1), 133.81 (C_2), 129.25 (C_3), 115.61 (C_4), 115.44 (C_5), 73.24 (C_6), 52.36 (C_7), 27.55 (C_8), 27.20 (C_9).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.62 – 7.29 (m, 5H, H_{1-3}), 5.33 (q, 1H, H_4), 1.94 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H_5), 1.73 (s, 6H, H_6).
- Análisis calculado: C, 53.52; H, 5.61; N, 5.20; O, 23.76; S, 11.90
- Análisis encontrado: C, 53.5 \pm 0.3; H, 5.6 \pm 0.2; N, 5.2 \pm 0.2; S, 11.9 \pm 0.2.

Síntesis de 3-(4-fluorobencil)-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-

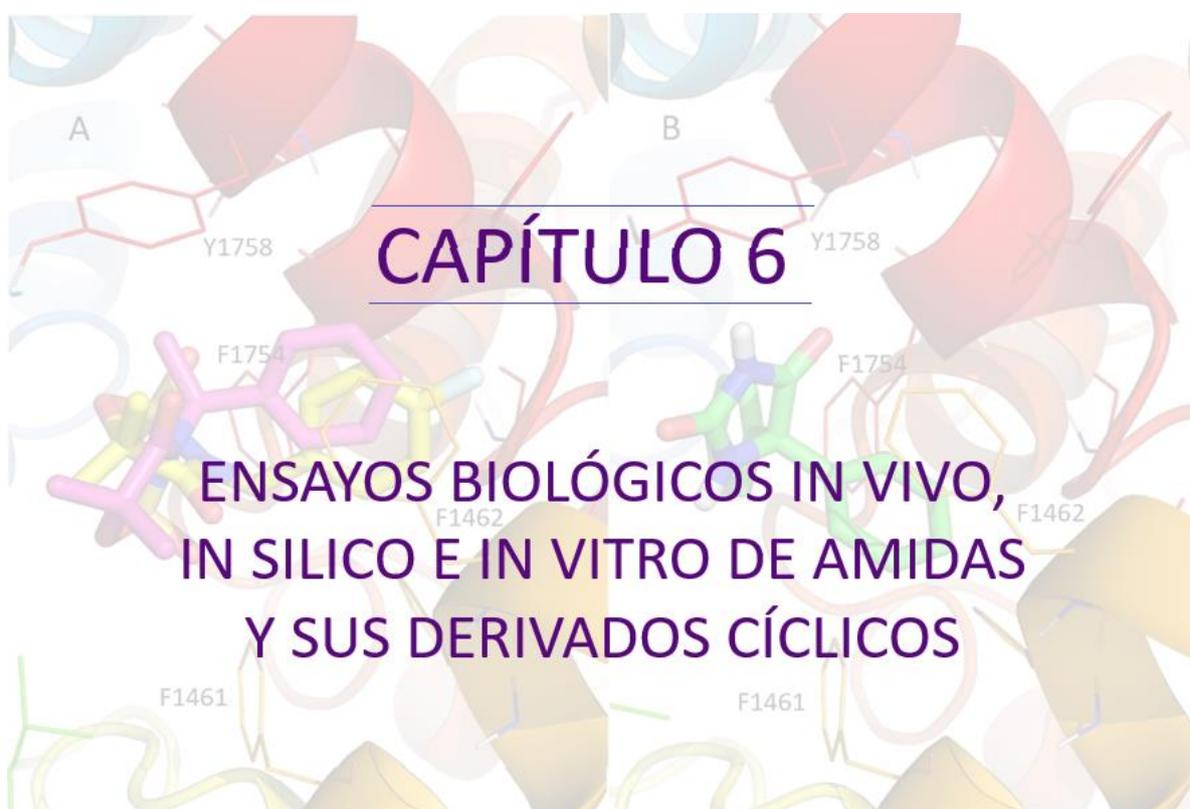
dióxido (2g)



- Rendimiento: 52%
- Punto de fusión: 86–87 °C (diclorometano/ hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.46 (C_1), 163.91 y 161.94 (C_2), 130.86 (C_4), 129.07 (C_3), 115.91 (C_5), 93.57 (C_6), 44.73 (C_7), 24.31 (C_8).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (m, 2H, H_1), 7.08 (m, 2H, H_2), 4.77 (s, 2H, H_3), 1.76 (s, 6H, H_4).
- Análisis calculado: C, 48.35; H, 4.43; F, 6.95; N, 5.13; O, 23.42; S, 11.73
- Análisis encontrado: C, 48.3 \pm 0.2; H, 4.4 \pm 0.2; N, 5.1 \pm 0.2; S, 11.7 \pm 0.2.

Referencias

1. Sabot, C., et al. A convenient aminolysis of esters catalyzed by 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD) under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3863–3866 (2007).
2. Pastore, V., et al. Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 841–846 (2013).
3. Anderson, J., et al. Selective phenol alkylation: An improved preparation of efaproxiral. *Synth. Commun.* **36**, 2129–2133 (2006).



CAPÍTULO 6

ENSAYOS BIOLÓGICOS IN VIVO, IN SILICO E IN VITRO DE AMIDAS Y SUS DERIVADOS CÍCLICOS

Capítulo 6

Ensayos biológicos in vivo, in silico e in vitro de amidas y sus derivados cíclicos

6.1 Evaluación de actividad biológica in vivo

La evaluación anticonvulsiva de los compuestos sintetizados se realizó mediante el ensayo MES con excepción del compuesto 1d, pues su actividad en dicho ensayo ya fue reportada previamente.¹ Los ensayos biológicos fueron realizados en colaboración con investigadores del LIDeB con vasta experiencia en el tema.

Se utilizaron ratones albinos machos (18–23 g) proporcionados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, que se recibieron en el bioterio de tránsito del LIDeB. Se mantuvieron bajo un régimen de ciclo luz /oscuridad de 12 h y se les permitió el libre acceso a alimentos y agua por al menos 72 h desde su llegada. Adicionalmente se les inoculó a diario solución fisiológica vía intraperitoneal (ip). El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las pautas del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio² y fue aprobado por el Comité Ético de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata.

En el día del ensayo, los ratones fueron asignados al azar a diferentes tratamientos. Las soluciones del compuesto a evaluar se realizaron en polietilenglicol 400 (PEG 400) a una concentración de 3 ml/kg de peso corporal y se añadió solución fisiológica hasta un volumen máximo de 7 ml/kg. Los ratones se administraron vía ip. a dosis de 30 o 100 mg/kg y se evaluaron a las 0,5 o 4 h. El control positivo fue realizado con solución de Fenitoína y el negativo con solución PEG/fisiológica sin droga.

Las convulsiones de electrochoque máximas se provocaron en ratones mediante la administración de un estímulo eléctrico de 60 Hz/50 mA durante 0.2 s a través de

electrodos con clip de oreja conectados a un equipo de electrochoque marca UGO Basile. Como se explicó en el capítulo 4, en estas condiciones los ratones sanos experimentan convulsiones máximas, caracterizadas por un período corto de flexión tónica seguido de un período más largo de extensión tónica de las extremidades posteriores y un episodio clónico final.³ Tres minutos antes de la inducción de la convulsión, todos los animales fueron evaluados en la prueba Rotarod. La incapacidad de los animales para mantener el equilibrio durante este test (el cual se repite tres veces), evidencia neurotoxicidad en forma de ataxia y/o sedación.⁴

La Tabla 6.1 muestra los resultados obtenidos de los ensayos biológicos. Según la actividad encontrada, los compuestos se clasificaron en clases, de acuerdo con lo propuesto en literatura:^{5,6}

- **Clase 1:** actividad anticonvulsiva a 100 mg/kg o menos;
- **Clase 2:** actividad anticonvulsiva a dosis superiores a 100 mg/kg;
- **Clase 3:** compuesto inactivo a cualquier dosis hasta 300 mg/kg;
- **Clase 4:** compuesto inactivo a 300 mg/kg y tóxico a 30 mg/kg o menos.

Esta categorización permite identificar rápidamente a las estructuras más potentes, que son las pertenecientes a clase 1 y que usualmente continúan en las siguientes fases de evaluación del programa. Es posible que los compuestos clase 2 también sigan estudiándose, dependiendo esto de lo novedoso de su estructura.

Compuestos	Dosis (mg/Kg)	MES ^a		Rotarod ^b		Clase
		0.5	4 h			
1a	30	1/2	2/3	0/2	0/3	1
	100	2/2	2/2	0/2	0/2	
1b	30	0/2	3/4	0/2	0/4	1
	100	1/2	2/4	0/2	0/4	
1c	30	1/3	1/3	0/3	0/3	1
	100	1/3	2/3	0/3	0/3	
1e	30	0/3	1/3	0/3	0/3	1
	100	3/3	1/3	0/3	0/3	

1f	30	2/5	0/2	0/5	0/2	1
	100	3/5	0/2	0/5	0/2	
1g	30	3/4	0/2	0/4	0/2	1
	100	4/4	0/2	0/4	0/2	
1h	30	0/2	0/2	0/2	0/2	1
	100	0/2	2/4	0/2	0/4	
1i	30	1/2	1/2	0/2	0/2	1
	100	2/2	1/2	0/2	0/2	
1j	30	2/2	1/2	0/2	0/2	1
	100	1/2	0/2	0/2	0/2	
2a	30	0/2	0/2	0/2	0/2	1
	100	2/4	2/4	0/4	0/4	
2c	30	0/2	0/2	0/2	0/2	1
	100	1/2	0/2	0/2	0/2	
2d	30	4/4	1/4	0/4	0/4	1
	100	(-)	(-)	(-)	(-)	
2e	30	1/2	1/2	0/2	0/2	1
	100	0/2	1/2	0/2	0/2	
2g	30	1/5	1/4	0/5	0/4	1
	100	0/2	0/2	0/2	0/2	

Tabla 6.1: Perfil farmacológico de los compuestos sintetizados.
a. Número de animales protegidos en relación con el número total de ratones probados en MES a cada tiempo y concentración.
b. Número de animales que no superaron el test de toxicidad en relación con el número total de ratones probados a cada tiempo y concentración.
El compuesto 2d no se probó a la dosis de 100 mg/kg debido a problemas de solubilidad, referido como (-).

Los resultados obtenidos de los ensayos mostraron que todos los compuestos sintetizados presentan actividad anticonvulsiva en la prueba MES. Esto permitió categorizarlos como clase 1. Estos resultados son alentadores ya que, como se mencionó

previamente, la clase 1 incluye a los candidatos más prometedores para el próximo paso de las pruebas biológicas.⁵

Adicionalmente se determinó el valor de dosis efectiva 50 (DE₅₀, ver Anexo 1) para el compuesto 1g, ya que evidenció una fuerte actividad anticonvulsiva para ambas dosis evaluadas. Este valor se determinó en el tiempo de efecto máximo del compuesto (TEM), el cual se identificó previamente, evaluando la droga a una concentración fija (30 mg/kg) y a diferentes tiempos (15, 30, 60, 120 y 240 min). Se concluyó (Gráfico 6.1) que el TEM= 30 min.

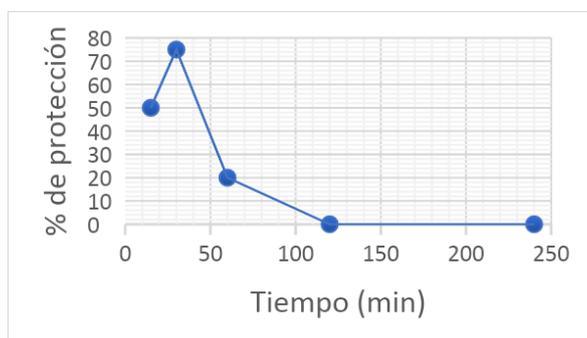


Gráfico 6.1: Determinación del tiempo de efecto a máximo del compuesto 1g a 30 mg/kg.

Posteriormente se evaluaron grupos de 5 ratones a dosis de 3, 15, 30, 60 y 100 mg/kg al TEM. Los resultados obtenidos recibieron el tratamiento estadístico del método de Litchfield y Wilcoxon,⁷ obteniéndose un valor de DE₅₀=29 mg/kg o en forma equivalente 0,106 mmol/kg.

6.2 Identificación del blanco molecular

Los compuestos de síntesis son activos frente a MES test, por lo que fueron analizados como bloqueantes de canales de sodio operados por voltaje, como primera aproximación de un posible mecanismo de acción. La propuesta se basa en que los fármacos anticonvulsivos que interactúan con estos canales dan positivo al ensayo MES.⁸ En particular se estudió el bloqueo de la isoforma Nav1.2, blanco molecular de anticonvulsivos como Fenitoína, Lamotrigina, Carbamazepina, Oxcarbazepina,

Eslicarbazepina, Zonizanima y Lacosamida.⁹⁻¹¹ Además, estudios previos han asociado este mecanismo de acción a un derivado de 5,5-dimetil-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido previamente sintetizado.¹²

Se realizó una simulación por docking de los compuestos obtenidos frente al modelo 3D de Nav1.2, en estado abierto (Imagen 6.1). Esta estructura (mencionada en el capítulo 2) incluye la arquitectura 3D de la subunidad α , que es funcional por sí sola y comprende la región de interacciones con los fármacos anticonvulsivos.

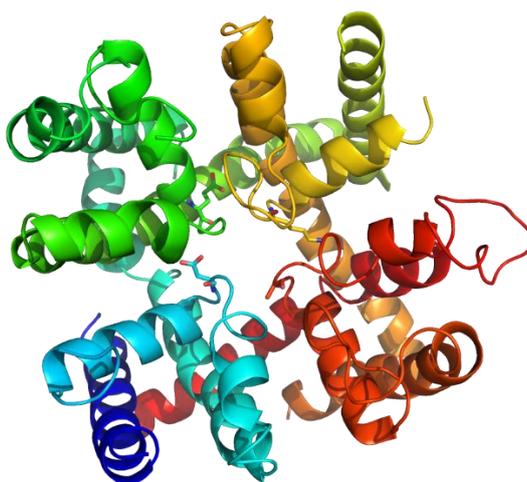


Imagen 6.1: Modelo tridimensional del canal de sodio isoforma Nav 1.2 en conformación abierta.

Se utilizó el software Autodock Vina,¹³ cuya función de puntuación y algoritmos de búsqueda han sido validadas previamente en nuestro laboratorio para este blanco molecular.¹⁴ Se ha demostrado que este software es capaz de discriminar eficientemente estructuras bloqueantes de no bloqueantes de Nav1.2 mediante el valor de sus energías de unión calculadas en la simulación. En concordancia con dichos estudios previos, se definió un valor de corte de -8,1 Kcal/mol para la discriminación de bloqueantes y no bloqueantes del canal de sodio, lo que implica una sensibilidad del 88% y una especificidad del 80 %.¹⁴ Detalles de la arquitectura del blanco, el protocolo de docking usado y la validación del mismo se encuentran en el Anexo 2 de la presente tesis y en la publicación relacionada.¹⁴

La Tabla 6.2 resume los valores de score (energía de unión) asociados a cada una de las moléculas evaluadas.

Compuesto	Score	Compuesto	Score	Compuesto	Score
1a	-6,4	1f	-7,8	2a	-6,7
1b	-5,5	1g	-7,5	2c	-6,5
1c	-6,3	1h	-7,5	2d	-7,2
1d	-6,9	1i	-7,2	2e	-8,2
1e	-7,7	1j	-7	2g	-8,3

Tabla 6.2: Valores de score de docking para los compuestos sintetizados, expresados en kcal/mol.

El modelo computacional clasificó como activos frente al canal de sodio Nav1.2 únicamente a dos compuestos (2e y 2g), indicando que la acción anticonvulsiva de los mismos podría estar asociada al bloqueo de dicho blanco. Ninguna de las amidas logró superar el valor de corte definido en el criterio de clasificación (-8,1 Kcal/mol).

La Imagen 6.2 A muestra los modos de unión de los complejos de menor energía para las estructuras 2e y 2g en el sitio activo, que incluyen los residuos del poro del canal. Las simulaciones sugieren que los compuestos dirigen su anillo aromático hacia la región delimitada por las cadenas laterales aromáticas de F1462 y F1754, estabilizándose mediante interacciones π - π . Esta disposición de apilamiento y apilamiento en T se puede observar también en el acoplamiento de la fenitoína en el sitio de unión (Imagen 6.2 B), cuyo valor de score en el modelo usado es de -9,9 kcal / mmol.

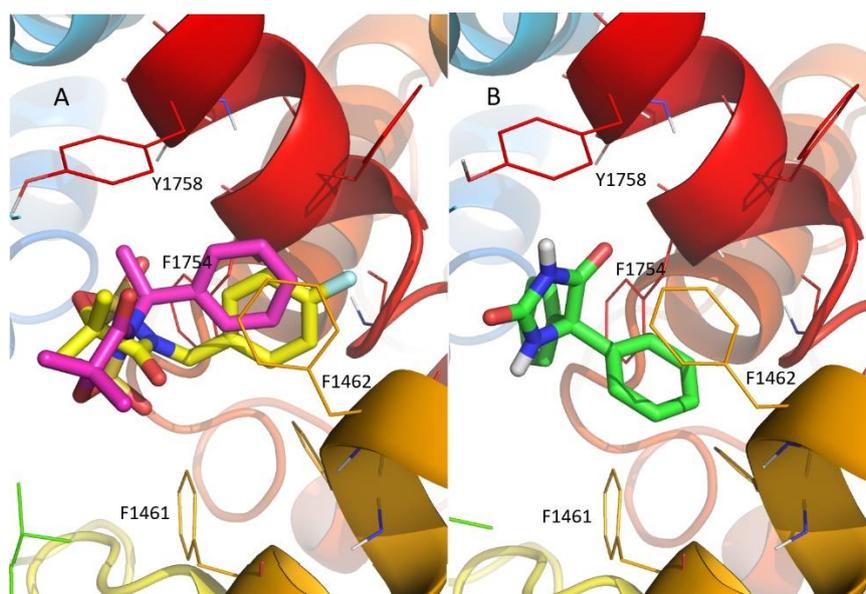


Imagen 6.2 A. Geometría de unión de los compuestos 2e y 2g en el sitio activo Nav1.2 predicho por los algoritmos de docking de Autodock Vina. B. geometría de unión

prevista para Fenitoína.

Los átomos de carbono están resaltados en rosa, amarillo y verde para los compuestos 2e, 2g y Fenitoína, respectivamente. Los átomos de nitrógeno, oxígeno y flúor de los compuestos se destacan en azul, rojo y celeste, respectivamente. Se muestran también las cadenas laterales de los residuos que rodean a los compuestos en un radio de 5 Å de distancia. Los anillos aromáticos de aminoácidos importantes están numerados en la imagen (F: fenilalanina, Y: tirosina). Los átomos de hidrógeno se omiten por simplicidad, excepto los átomos de hidrógeno no aromáticos de Fenitoína.

En relación a las predicciones y la actividad in vivo, los compuestos 2e y 2g evidenciaron acción anticonvulsiva en ratones a la menor dosis ensayada. Por otro lado, el resto de los compuestos (que se pronosticaron como inactivos en el modelo Nav1.2) mostraron protección contra la prueba MES.

Para analizar si el contraste entre las predicciones in silico y los ensayos in vivo podrían explicarse como una falla en la sensibilidad del protocolo de docking, se seleccionaron dos pares de compuestos (1e – 2e y 1g – 2g) para probar el efecto inhibitorio in vitro sobre las corrientes en Nav1.2. La justificación de la selección de compuestos fue evaluar los dos heterociclos pronosticados como activos, y sus correspondientes α -hidroxiamidas, que se clasificaron como no activas en la simulación computacional (Tabla 6.2).

Como se describió en el Capítulo 4, el estudio in vitro se realizó empleando la técnica Patch Clamp. Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Pedro Martin y la Dra. Valentina Pastore del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, CONICET-UNLP), bajo la dirección de la Dra. Verónica Milesi.

La actividad in vitro de los compuestos mencionados (1e, 1g, 2e y 2g), se evaluó en los canales de sodio voltaje operados, Nav 1.2, expresados en manera estable en células HEK 293 (providas por la empresa GlaxoSmithKline, Stevenage, Reino Unido). Detalles de los protocolos utilizados, soluciones y mantenimiento de la línea celular se encuentran en el Anexo 4.

Para el ensayo de los compuestos candidatos se aplicaron protocolos de voltaje en forma de un pulso rectangular, que consisten en un cambio discreto instantáneo del potencial desde un valor determinado (potencial de mantenimiento) a otro valor de

potencial que se mantiene durante un tiempo y luego retorna en forma instantánea a la inicial (Imagen 6.3).¹⁵

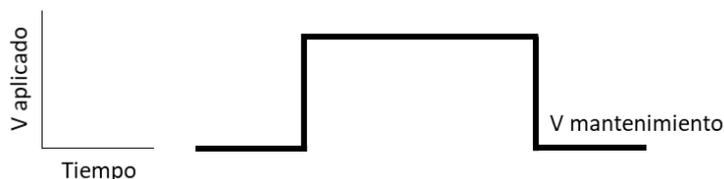


Imagen 6.3: Esquema de protocolo de un pulso de voltaje.

El potencial de membrana de mantenimiento fue fijado en -80mV , potencial donde la mayor parte de los canales de sodio se encuentran en estado de reposo, pero que facilita la observación de bloqueos por fármacos voltaje-dependientes.¹⁶ Las corrientes macroscópicas fueron analizadas en condiciones control (vehículo) y luego del agregado de los distintos candidatos disueltos en DMSO al 0,1 %. Los mismos fueron probados a partir de la aplicación de un pulso de voltaje de 15 ms de duración a -20 mV (potencial de la corriente máxima de los canales Nav1.2) a partir del potencial de mantenimiento (de -80 mV). Se esperaron 10 segundos entre la aplicación de cada pulso para permitir la recuperación de los canales del estado inactivado. El valor de la corriente fue medido al pico, momento en el cual la corriente alcanzó su máximo valor.

Después de la estabilización de la corriente en cada condición, y con el objetivo de evaluar la inhibición dependiente del estado, se probó la capacidad de los compuestos para modificar las curvas de inactivación de estado estacionario (curvas h) para los canales Nav1.2. La curva h muestra la fracción disponible de canales de sodio en condiciones de ser activados (en estado de reposo) en función del potencial de membrana en reposo. La inhibición dependiente del estado, debido a la estabilización del estado inactivado, se observa como un desplazamiento a la izquierda en las curvas h, lo que significa una reducción del número de canales de Na^+ disponibles, que es mayor a un potencial más despolarizado. Los resultados se muestran en las Imágenes 6.4 a 6.7. Se observa que las amidas 1e y 1g no pudieron bloquear la corriente de Na^+ (Imagen 6.4 A y B) y no cambiaron las curvas de inactivación de estado estacionario (Imagen 6.5 A, B y C), mientras que los compuestos cíclicos correspondientes 2e y 2g inhibieron la corriente de Na^+ (Imagen 6.6 A y B) y desplazaron la curva h a potenciales más

hiperpolarizados (Imagen 6.7 A, B y C). Estos resultados son consistentes con las predicciones del modelo de docking.

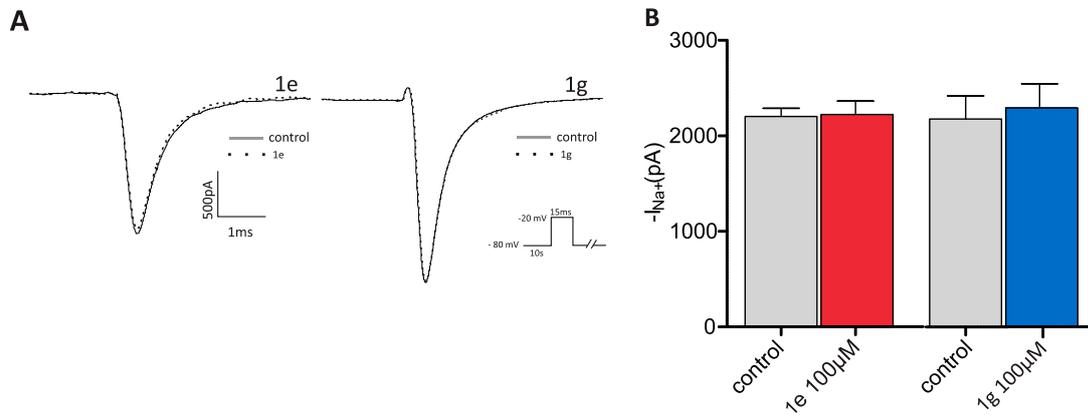


Imagen 6.4. Inhibición del corriente sodio al pico.

A. Trazas típicas de las corrientes de Na⁺ en la isoforma Na_v 1.2, control y compuesto (1e o 1g) a una concentración elegida de 100 μM. el protocolo de voltaje aplicado se encuentra inserto en la imagen.

B. Análisis estadístico que demuestra que no existe diferencia significativa entre el control y el tratado. t-test, p > 0,05, n=4.

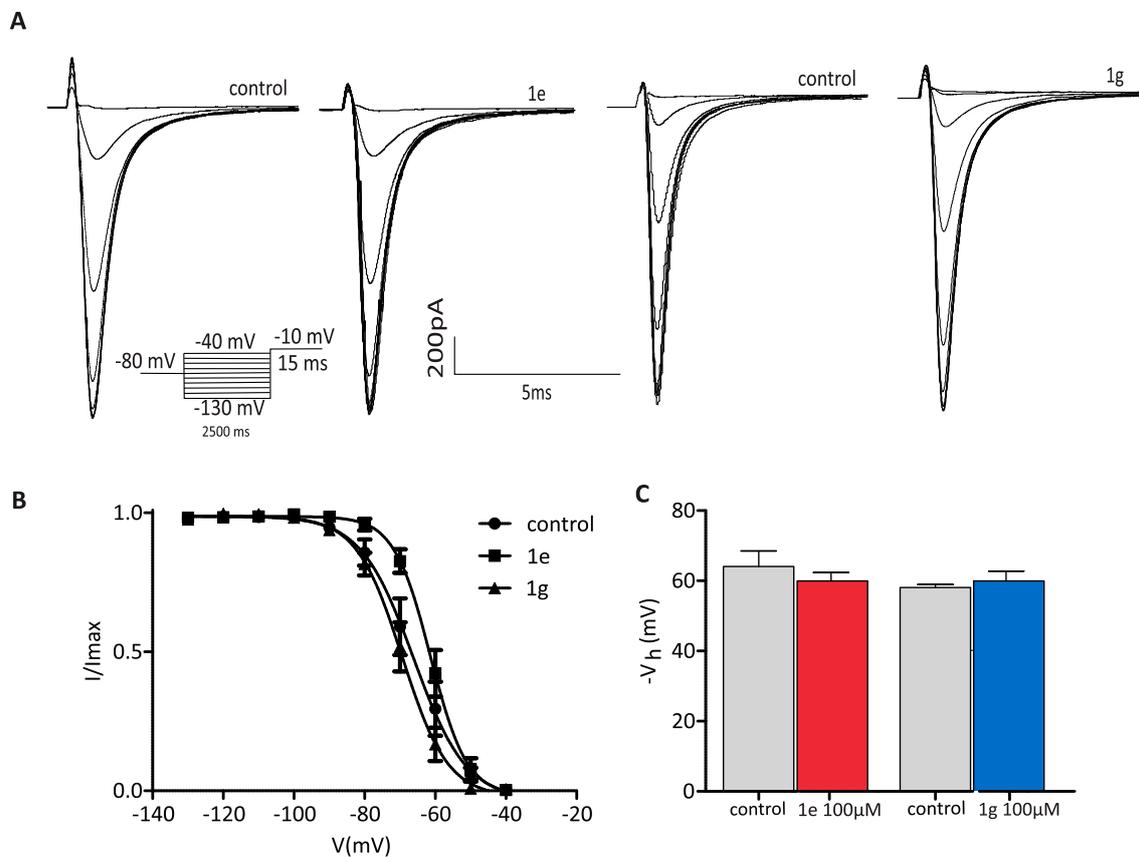


Imagen 6.5. Curvas de inactivación del estado estacionario (curva h)
 A. Trazas típicas del protocolo de inactivación del estado estacionario, en ausencia y en presencia de 1e o 1g a una concentración de 100 μM .

B. Valores medios de fracción disponibles (I/I_{max}) para el compuesto 1e o 1g y su control en función del voltaje de membrana (mV) aplicado y ajustado a la función de Boltzmann (Protocolo de voltaje en la Imagen).

C. Los valores medios expresados como V_h obtenidos de la ecuación de Boltzman. No se observó diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$, $n = 4$ para cada grupo. V_h control (1e) = -62.77 ± 2.5 , V_h (1e) = -60.63 ± 1.40 , $n = 4$. V_h control (1g) = -58.09 ± 0.43 , V_h (1g) = -59.96 ± 1.19 , $n = 4$.

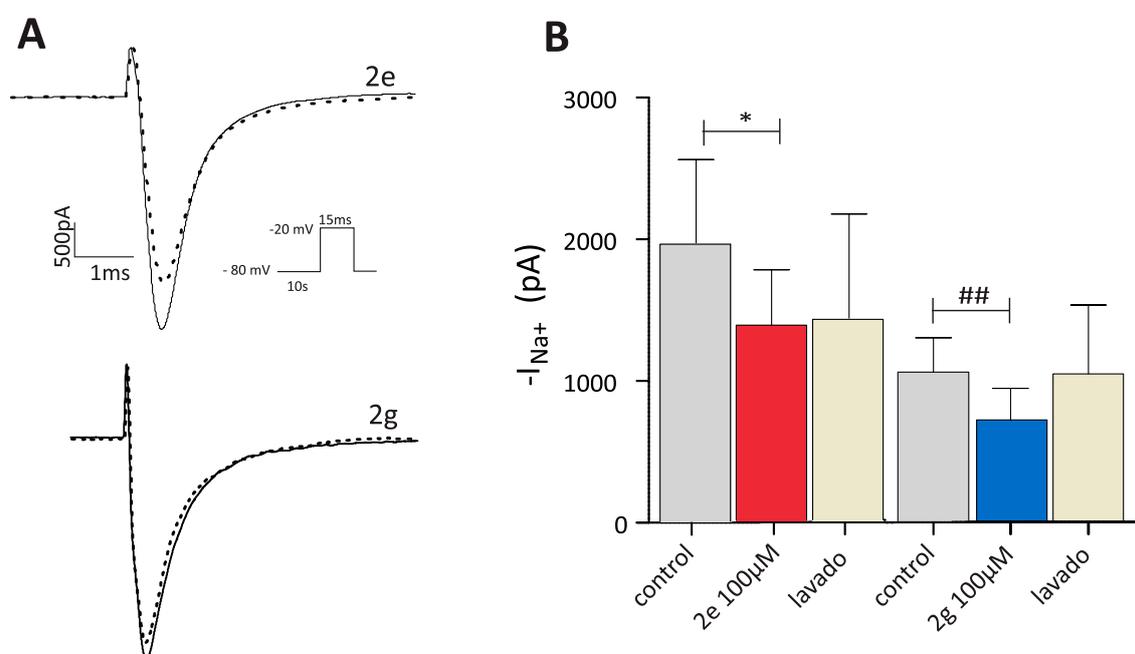


Imagen 6.6. Inhibición de la corriente de sodio al pico.

A. Registro típico de las corrientes en la isoforma Nav1.2 registradas en las células HEK 293 en la configuración de la célula entera antes y después de 2e (arriba) y 2g (abajo) a 100 μM .

B. Los valores medios de corrientes Nav1.2 obtenidos se muestran en A. * $p < 0.05$ indica una diferencia significativa entre el control y el compuesto 3e (% de inhibición= 29.6%); ## $p < 0.005$ indica diferencias significativas entre el control y el grupo compuesto 3g (% de inhibición= 33%). Emparejado t -test $n = 4$, para cada grupo.

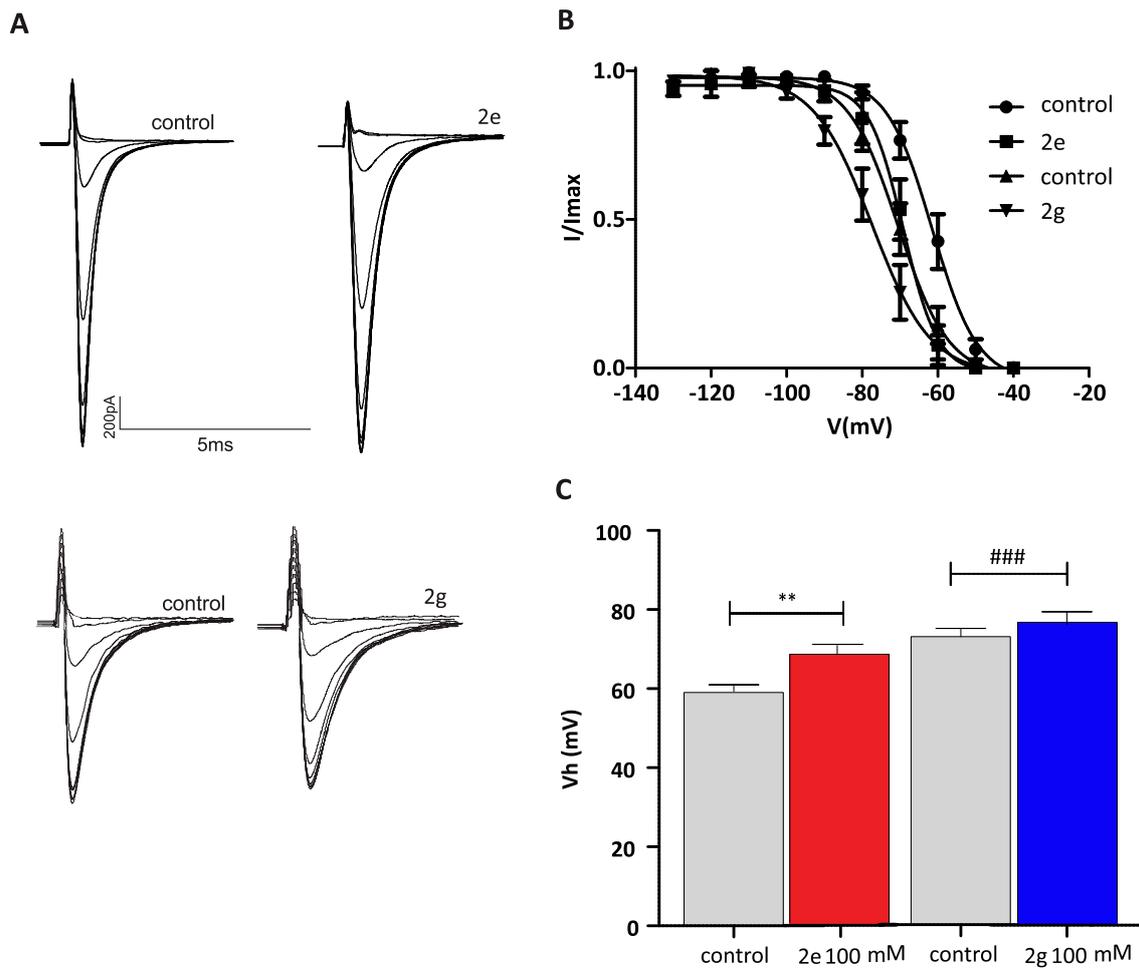


Imagen 6.7. Curvas de inactivación del estado estacionario (curva h). A. Trazas típicas del protocolo de inactivación del estado estacionario, en ausencia y en presencia de 2e o 2g a una concentración de 100 μ M. B. Valores medios de fracción disponibles (I/I_{max}) para el compuesto 2e o 2g y su control en función del voltaje de membrana (mV) aplicado y ajustado a la función de Boltzmann (Protocolo de voltaje en la Imagen). C. Los valores de V_h obtenidos de los gráficos se muestran en (B). $p < 0.05$. **, ### Diferencias significativas entre 2e, 2g y sus respectivos grupos de control, V_h control (2e) = -60.18 ± 1.68 , V_h (2e) = -68.19 ± 2.19 , $n = 5$, V_h control (3 g) = -74.76 ± 1.26 , V_h (2 g) = -80.14 ± 3.08 , $n = 4$.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos electrofisiológicos realizados confirmaron las predicciones del docking, mostrando que los derivados de oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido 2e y 2g inhiben las corrientes de Na^+ en la isoforma del canal Nav 1.2. Esto se deduce a partir de los resultados obtenidos de inhibición de la corriente al pico y estabilización del estado inactivado. Un mayor análisis de esta información se detallará en el capítulo 8.

Referencias

1. Pastore, V., et al. Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 841–846 (2013).
2. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. *The national academies press*. Eight Edition. (2011)
3. Löscher, W., et al. Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res.* **126**, 157–184 (2016).
4. Krall RL, et al. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia* **19**:409–428 (1978).
5. Porter RJ, et al. Antiepileptic drug development program. *Cleve Clin Q.*; **51**(2):293–305 (1984).
6. Khajouei, M. R., et al. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activity of (Z)-4-(2-oxoindolin-3-ylideneamino)-N-phenylbenzamide derivatives in mice. *Research in pharmaceutical sciences*, **13**(3), 262–272 (2018).
7. Litchfield JT, et al. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther.*; **96** 99–113 (1949)
8. Pavel, M., et al. Electrical Stimulation-Induced Models of Seizures. Models of Seizures and Epilepsy. *Elsevier*; 153-159 (2006)
9. Vohora D, et al. Recent Advances in Adjunctive Therapy for Epilepsy: Focus on Sodium Channel Blockers as Third-Generation Antiepileptic Drugs. *Drugs Today*, **46**, 265-277 (2010)
10. Brodie MJ. Antiepileptic Drug Therapy the Story so Far. *Seizure*, **19**, 650–655 (2010).
11. Swinyard, E.A., et al. Experimental detection, quantification and evaluation of anticonvulsants. Antiepileptic Drugs. *Raven Press* 111–126 (1982).
12. Pastore, Valentina; et al.; A synthetic bioisoster of trimethadione and phenytoin elicits anticonvulsant effect, protects the brain oxidative damage produced by

- seizures and exerts antidepressant action in mice; *European Neuropsychopharmacology*; **24**; 8:1405-1414 (2014).
13. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comp Chem*; **31**:455–61. (2010)
 14. Palestro, Pablo Hernán; et al. Searching for New Leads to Treat Epilepsy: Target-Based Virtual Screening for the Discovery of Anticonvulsant Agents. *Journal of Chemical Information and Modeling*; **58**: 7 1331-1342 (2018)
 15. Palestro, P. Búsqueda de nuevos anticonvulsivos a partir de métodos computacionales (2016). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53752>
 16. Qiao, X., et al. Properties of human brain sodium channel α -subunit expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine *British Journal of Pharmacology*. **171**; 1054–1067 (2014)



Capítulo 7

Diseño y síntesis de nuevos derivados de α -hidroxiamidas

En la presente tesis se ha investigado una serie de α -hidroxiamidas y sus derivados OTZ, arrojando resultados muy satisfactorios con relación a su actividad anticonvulsiva. Particularmente interesante resulta el perfil farmacológico en el ensayo MES de las amidas, sustancias sencillas de sintetizar que muestran una potencia en el ensayo in vivo similar o mayor que el de los respectivos heterociclos (ver Tabla 6.1). Este hecho impulsó una segunda etapa de búsqueda de nuevas estructuras activas estructuralmente relacionadas a las amidas. Considerando las diferentes estrategias desarrolladas en el capítulo 2, se diseñaron moléculas prototipo de dos nuevas familias de compuestos: α -cloroamidas y éteres simétricos. A continuación, se describen los procedimientos de diseño y síntesis para cada caso, así como también los resultados obtenidos.

7.1 Diseño de α -cloroamidas

Como se mencionó en el Capítulo 1 (en el contexto de la epilepsia farmacorresistente), la barrera hematoencefálica (BBB) es un término utilizado para describir un sistema de regulación y protección con las propiedades únicas de la microvasculatura del SNC. Esta barrera, altamente restrictiva, es fundamental para permitir una función neuronal adecuada, así como también para proteger el SNC de toxinas, patógenos, inflamación, lesiones y enfermedades. En contraposición, es también un obstáculo para el transporte de fármacos hacia el SNC.¹ En este sentido, la lipofilia es un atributo clave para la penetración de drogas en el cerebro.¹

La actividad anticonvulsiva identificada in vivo para las α -hidroxiamidas nos permite hipotetizar que las moléculas o sus metabolitos lograron atravesar la BBB. Con el

objetivo de evaluar la influencia de un aumento de la lipofilia sobre la actividad anticonvulsiva in vivo se propuso llevar a cabo un cambio isostérico del hidroxilo en posición alfa al carbonilo de la amida. Como se mencionó en el Capítulo 2, el cambio isostérico clásico es similar en términos de número de átomos, valencia, grado de insaturación o carga,² por lo que se propuso reemplazar el oxhidrilo por un halógeno. En esta investigación se desarrollaron cloro derivados debido a la simplicidad sintética y asequibilidad de los reactivos. Además, este átomo es el segundo más frecuente, luego del flúor, en fármacos halogenados de uso clínico.³

Los compuestos obtenidos se presentan en la Imagen 7.1.

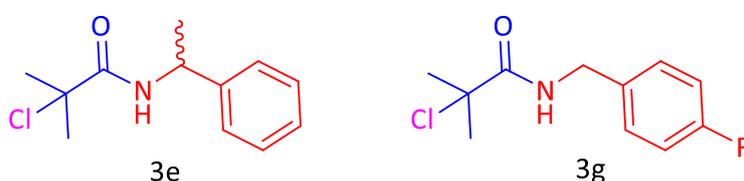


Imagen 7.1: Estructuras de las α -cloroamidas sintetizadas.

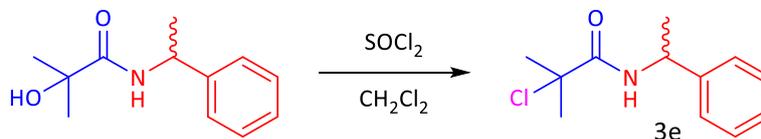
Hasta el momento solo se realizó la identificación de la actividad anticonvulsiva del compuesto 3e y los resultados del perfil farmacológico serán expuestos en la sección 7.3.

7.1.a Metodología de síntesis

En un balón de 200 ml previamente secado con pistola de calor se agregó una solución la α -hidroxiamida correspondiente (2 mmoles) en diclorometano anhidro (20 ml). Se enfrió en baño de hielo y se adaptó un septum. Se incorporó gota a gota, mediante jeringa cloruro de tionilo (5 ml). Se dejó reaccionando durante 15 h y posteriormente se eliminó el exceso de cloruro de tionilo en evaporador rotatorio. Sobre el líquido resultante se agregó diclorometano (30 ml) y se hicieron lavados con agua destilada fría (3 x 10 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se eliminó el solvente en evaporador rotatorio. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica y posterior cristalización.⁴

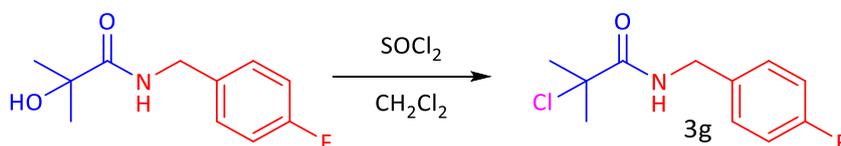
7.1.b Resultados de la síntesis de α -cloroamidas

Síntesis de N-((±)-1-metilbencil)-2-cloroisobutiramida (3e)



- Rendimiento: 26%
- Punto de fusión: 50-51 °C (éter).
- ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171.30 (C₁), 142.82 (C₂), 128.78 (C₃), 127.47 (C₄), 125.95 (C₅), 69.74 (C₆), 49.45 (C₇), 31.00 (C₈), 21.87 (C₉).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40-7.29 (m, 5H, H₁₋₃), 7.07 (brs, 1H, H₄), 5.08 (m, 1H, H₅), 1.84 (s, 3H, H₆), 1.78 (s, 3H, H₆), 1.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H₇).
- [M+H]_{predicho}=226.0998, [M+H]_{experimental}=226.0993

Síntesis de N-(4-fluorobencil)-2-cloroisobutiramida (3g)



- Rendimiento: 32%
- Punto de fusión: 60-61,5°C (hexano).
- ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172.22 (C₁), 163.25 y 161.29 (C₂), 133.57 (C₃), 129.30 (C₄), 115.67 (C₅), 69.66 (C₆), 43.40 (C₇), 31.07 (C₈).
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (m, 2H, H₁), 7.11 (brs, 1H, H₂), 7.03 (m, 2H, H₃), 4.42 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H₄), 1.81 (s, 6H, H₅).
- [M+H]_{predicho}=230.0747, [M+H]_{experimental}=230.0742

7.2 Diseño de éteres simétricos

En este caso se empleó la estrategia de optimización asistida por computadora, para la cual se propusieron nuevas estructuras con un mecanismo de acción probable: el bloqueo de canales de sodio dependiente de voltaje. Dado que las simulaciones por docking proponen que las amidas por sí solas no poseen las condiciones suficientes para interactuar eficientemente con el sitio activo, se propone la extensión de la estructura mediante la formación de éteres, con el fin de incrementar el número de grupos funcionales o sustituyentes capaces de interactuar con el blanco molecular.

Inicialmente se representaron en la computadora éteres simétricos resultantes de la condensación del grupo oxhidrilo en alfa de las hidroxiamidas activas (imagen 7.2).

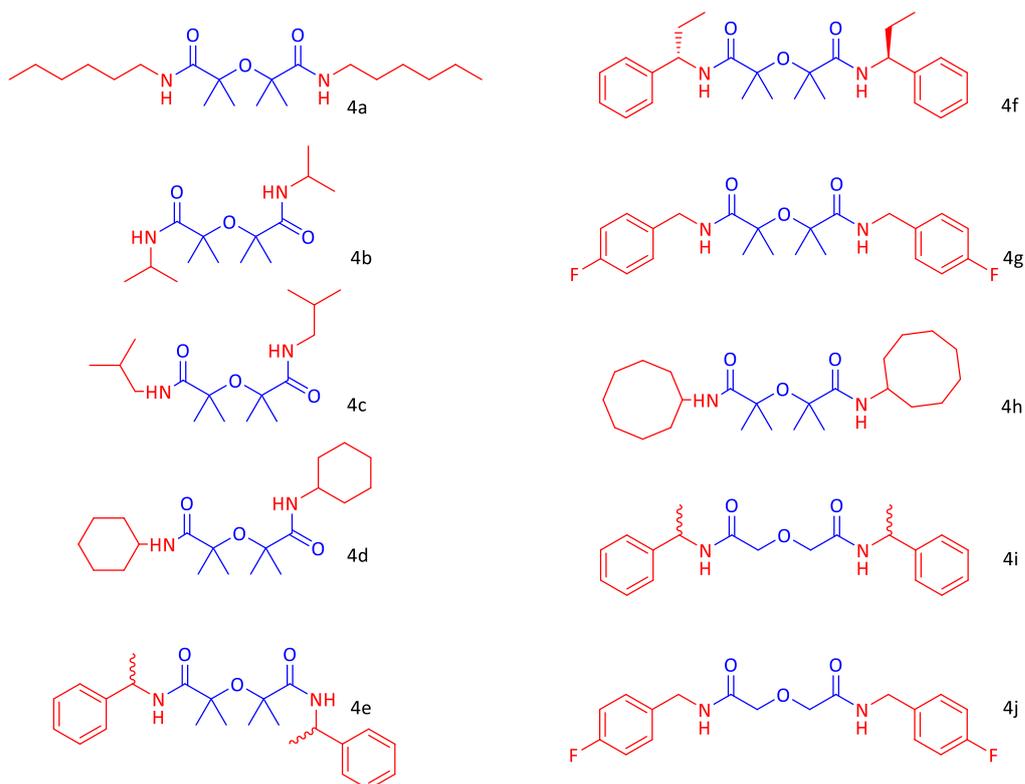


Imagen 7.2: Estructuras diseñadas como posibles candidatos anticonvulsivos bloqueantes de canales de sodio.

Las estructuras fueron sometidas a una campaña de tamizado virtual por docking sobre el modelo del canal Nav1.2 previamente utilizado. La conformación de partida de los éteres fue obtenida mediante optimización geométrica a pH 7.4. Se utilizó el método de minimización por gradiente conjugado con el campo de fuerza GAFF, presente en el

programa Avogadro.⁵ Luego se realizó la simulación sobre Nav1.2 en las mismas condiciones que para el caso de amidas y derivados cíclicos (Capítulo 6) y se definió el mismo valor de corte (-8,1 kcal/mol). Los valores de score asociados a cada compuesto se muestran en la tabla 7.1.

Compuesto	Score	Compuesto	Score
4a	-6,4	4f	-9,8
4b	-6,7	4g	-8,8
4c	-6,9	4h	-10,1
4d	-8,4	4i	-10,4
4e	-10,1	4j	-8,3

Tabla 7.1: Valores de Score para los éteres simétricos candidatos a síntesis.

Los datos muestran que el modelo computacional clasificó como activos frente al canal de sodio Nav1.2 a los compuestos con sustituyentes alifáticos cíclicos 4d y 4h; y a las estructuras aromáticas 4e, 4f, 4g, 4i y 4j.

Al analizar visualmente los resultados de la simulación de los éteres aromáticos, se evidenció que estos compuestos poseen la capacidad de establecer interacciones π - π tipo sándwich⁶ con una región del sitio activo rica en grupos aromáticos.

La Imagen 7.3 muestra este tipo de interacción para dos de los éteres aromáticos (4e y 4i).

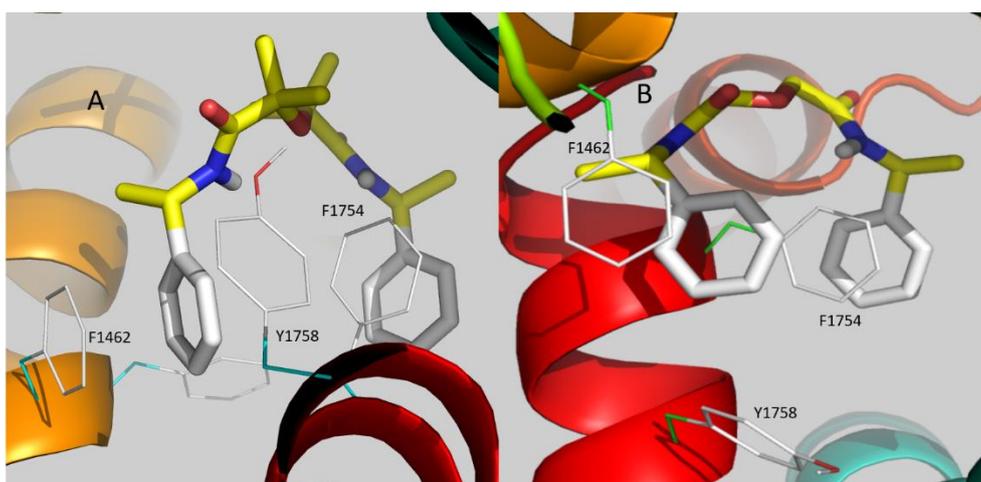


Imagen 7.3 Geometrías de unión en el sitio activo predicha por los algoritmos de docking de Autodock Vina para los compuestos (A): 4e y (B): 4i. Los átomos de carbono no aromáticos están amarillo y los aromáticos en blanco. Los

átomos de Nitrógeno y Oxígeno de los compuestos se destacan en azul y rojo respectivamente. Para el caso A la interacción tipo “sandwich” se da entre los anillos aromáticos del ligando y los residuos F1462, F1754 y Y1758, en B el residuo Y1758 queda alejado, quedando la interacción únicamente conformada por las F.

Respecto a los compuestos alifáticos cíclicos (4d y 4h), se puede apreciar en la Imagen 7.4 que los ciclos hexil y octil muestran una conformación más elongada en el sitio activo, ubicando uno de sus sustituyentes en la misma región aromática antes mencionada y orientando el otro hacia otra zona lipofílica limitada por residuos de V955, I1458 y F1424.

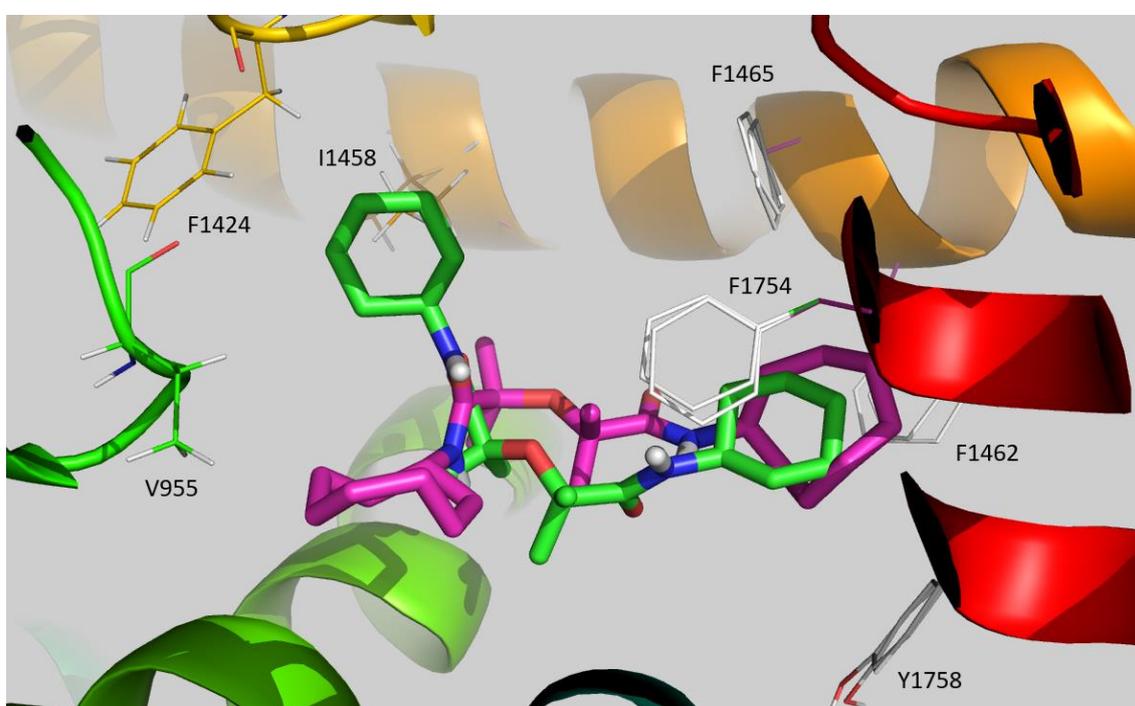


Imagen 7.4 Geometrías de unión en el sitio activo predicha por los algoritmos de docking de Autodock Vina para los compuestos 4d (verde) y 4h (fucsia).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo la síntesis de dos candidatos a anticonvulsivos, posibles bloqueantes de canales de sodio, propuestos por la estrategia virtual. Nuevamente se seleccionaron los compuestos con grupos 4-fluorobencil y metilbencil, con el fin de poder comparar los resultados con los alcanzados por las estructuras de las otras familias que comparten estos sustituyentes.

Dado que los resultados in silico y los perfiles farmacológicos no aportaron evidencia sobre una posible influencia de los metilos α -carbonílicos en la actividad, las estructuras seleccionadas fueron los compuestos aromáticos 4i y 4j por sobre los compuestos 4e y 4f, priorizando la simplicidad en la obtención de los mismos.

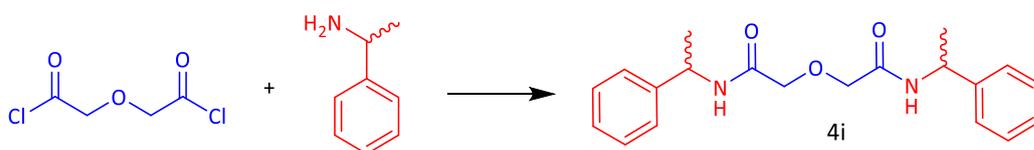
A continuación, se detalla la metodología sintética empleada. Las condiciones generales son las mismas que las detalladas en el apartado 5.1.

7.2.a Metodología de síntesis de éteres simétricos

En un tubo de reacción previamente secado con pistola de calor se agregaron cloruro de diglicolilo (1 mmol, Aldrich) y la amina correspondiente (4 mmoles). Se incorporó un agitador magnético, se tapó y se dejó reaccionar sobre mezcla frigorífica durante 15 h. Finalizado ese tiempo se agregó diclorometano (30 ml) y se hicieron lavados con agua destilada fría (10 ml x 3). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el solvente en evaporador rotatorio. El aceite resultante se pasó por una columna cromatográfica, obteniéndose un sólido que fue purificado mediante cristalización. Finalmente se secó en tambor de vacío hasta peso constante.^{4,6}

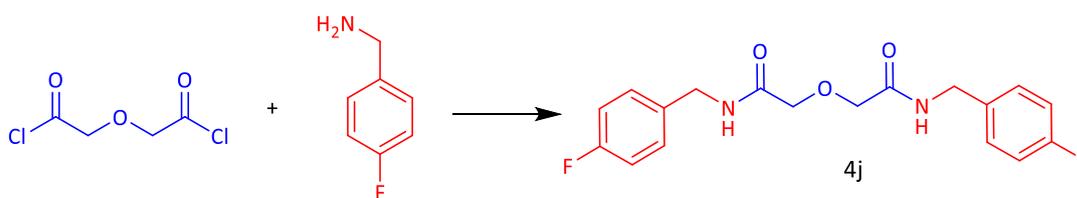
7.2.b Resultados de la síntesis de éteres simétricos

Síntesis de 2,2'-oxibis[N-((±)-1-metilbencil)acetamida] (4i)



- Rendimiento: 57%
- Punto de fusión: 90-91 °C (hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 167.45 (C_1), 142.67(C_2), 128.84 (C_3), 127.64 (C_4), 126.13 (C_5), 71.25 (C_6), 48.45 (C_7), 21.77 (C_8).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 -7.30 (m, 10 H, H_{1-3}), 6.68 (brs,2H, H_4), 5.19 (m, 2H, H_5), 4.05 (s, 4H, H_6), 1.53 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, H_7).
- $[\text{M}+\text{H}]_{\text{predicho}}=341.1865$, $[\text{M}+\text{H}]_{\text{experimental}}=341.1860$

Síntesis de 2,2'-oxibis[N-(4-fluorobencil)acetamida](4j)



- Rendimiento: 60 %
- Punto de fusión: 127-128 °C (hexano).
- ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.29(C_1), 163.27(C_2) y 161.31(C_2), 133.52 (C_3), 129.58 (C_4), 115.77 (C_5), 71.21(C_6), 42.33 (C_7).
- ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (m, 4H, H_1), 7.03 (m, 4H, H_2), 6.78 (brs, 2H, H_3), 4.45 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H, H_4), 4.09 (s, 4H, H_5).
- $[\text{M}+\text{H}]_{\text{predicho}}=349.1363$, $[\text{M}+\text{H}]_{\text{experimental}}=349.1358$

7.3 Evaluación de actividad biológica in vivo

Se logró determinar la actividad anticonvulsiva en la prueba MES para los compuestos 3e, 4i y 4j (Tabla 7.2). De acuerdo a los valores obtenidos, los tres se categorizan como clase 1, lo que también los hace promisorios desde el punto de vista de la potencia. Además, las estructuras no mostraron efectos neurotóxicos evidenciables por el test de Rotarod. En el capítulo siguiente se analizarán estos resultados en conjunto con los obtenidos en los capítulos anteriores.

Compuestos	Dosis (mg/Kg)	MES ^a		Rotarod ^b		Clase
		0,5	4 h			
3e	30	0/2	1/4	0/2	0/4	1
	100	0/2	3/4	0/2	0/4	
4i	30	0/2	2/4	0/2	0/4	1
	100	2/4	2/4	0/4	0/4	
4j	30	1/3	S/D	0/3	S/D	1
	100	0/3	S/D	0/3	S/D	

Tabla 7.2: Perfil farmacológico de los éteres sintetizados.

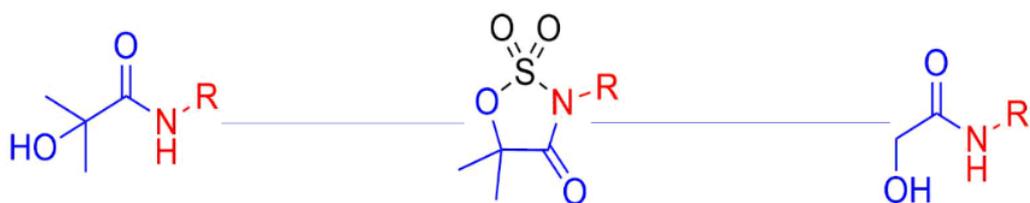
a. Número de animales protegidos en relación con el número total de ratones probados en MES a cada tiempo y concentración.

b. Número de animales que no superaron el test de toxicidad relación con el número total de ratones probados a cada tiempo y concentración.

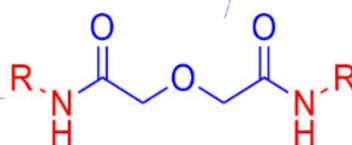
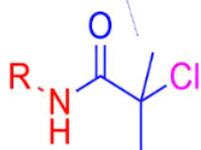
S/D: Sin determinar.

Referencias

1. Daneman, R.; et al. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.***7** (2015)
2. Singh, Y.; et al. A Review Report on Newer Advancement in Bioisosteric Replacement in Drug Design. *International Journal of Pharma Sciences and Research.***6**, 939-947 (2015)
3. Hernandez, M.; et al. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Current Drug Targets*,**11**, 303-314 (2010)
4. Furniss, B.; et al. *Vogel's Textbook of practical organic chemistry*. 5ta. Edition (1989).
5. Hanwell, Marcus; et al. "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform" *Journal of Cheminformatics*, 4-17 (2012)
6. Montalbetti, C. A. et al. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).



CAPÍTULO 8
ANÁLISIS DE
RESULTADOS Y
CONCLUSIONES



Capítulo 8

Análisis de resultados y conclusiones

Aunque actualmente se dispone de más de 25 fármacos anticonvulsivos para uso clínico, la proporción de pacientes resistentes a la terapia farmacológica no se ha reducido en las últimas décadas.¹ Además, el número de personas con Epilepsia es realmente elevado, posicionándola como la segunda enfermedad neurológica más frecuente en el mundo.² Estos hechos marcan la imperiosa necesidad de nuevos FAEs tendientes a superar el problema de la farmacorresistencia, lograr mayor potencia, selectividad y menor toxicidad. En este contexto, la presente tesis doctoral realiza un aporte sustancial de candidatos a fármacos anticonvulsivos.

En primera instancia se sintetizaron 10 α -hidroxiamidas, alifáticas o aromáticas. La selección de estas estructuras se sustentó en investigaciones anteriores que demostraron que tanto estos compuestos como los derivados cíclicos (OTZ) presentaban actividad anticonvulsiva.^{3,4} El método de síntesis predilecto utilizado fue la síntesis orgánica asistida por radiación microondas.

Durante las últimas tres décadas, la radiación MW se ha empleado para acelerar eficientemente varios tipos de reacciones en química orgánica y se ha encontrado que es una técnica eficiente y amigable para la producción de amidas.⁵ Particularmente, en una publicación anterior, se ha demostrado que esta metodología simplifica y mejora la producción de las α -hidroxiamidas en comparación con las síntesis tradicionales, dando mejores rendimientos en tiempos de reacción más cortos.⁴

De esta manera, se obtuvieron 8 amidas por aminólisis de un α -hidroxiéster en condiciones libres de solventes y con rendimientos que oscilan entre un 5% y un 57%. Las reacciones sin disolventes en combinación con el uso de sistemas alternativos de entrega de energía, como MW, contribuyen al desarrollo de nuevas reacciones más ecológicas.⁶

Para el caso de las amidas 1b, 1d y 1f, adicionalmente se empleó TBD como catalizador en la aminólisis convencional del α -hidroxiéster también en SFC. Si bien el tiempo de

reacción se incrementó de 30 min a 20 h, los rendimientos aumentaron en comparación con la síntesis asistida por MW. Particularmente, para el compuesto 1d cuyo rendimiento reportado vía radiación microondas fue del 5 %, ⁴ se logró obtener mediante catálisis con TBD con un rendimiento de 56 %. Este hecho coloca al uso del catalizador en la síntesis convencional como una alternativa razonable y eco-amigable para la obtención de este tipo de compuestos, en los casos en los que la síntesis asistida por MW no arroje buenos rendimientos. ⁷

Adicionalmente se desarrollaron la síntesis de las amidas 1i y 1j mediante aminólisis de ácido glicólico. En este caso, la estrategia empleada fue la síntesis convencional con tolueno como solvente y ácido bórico como catalizador. Los rendimientos fueron cercanos al 40%. La elección de los compuestos 1i y 1j tuvo como objetivo determinar la influencia de los grupos metilos α al carbonilo en la evaluación biológica in vivo, en comparación con los compuestos 1e y 1g.

Posterior a la síntesis de las α -hidroxiamidas se procedió al desarrollo de los derivados cíclicos. Como se describió en el capítulo 2, la familia de moléculas con esqueleto oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido guarda relación biosostérica con la Fenitoína. Se obtuvieron 5 nuevos derivados OTZ, empleando la metodología utilizada anteriormente. ⁴ Los rendimientos oscilaron entre 25 % y 71%.

Los compuestos sintetizados fueron evaluados in vivo como anticonvulsivos en la prueba MES, tomando como criterio los estudios realizados previamente ⁴ y el perfil farmacológico de la Fenitoína, activa en dicho ensayo. ⁸ Como se detalló en el Capítulo 4, el MES test forma parte del último enfoque del ETSP para la búsqueda de tratamientos efectivos para la Epilepsia farmacorresistente. Los resultados mostraron que todos los compuestos evaluados presentaron actividad anticonvulsiva a dosis de 100 mg/kg o menos, pudiendo ser catalogados dentro de la clase más activa (clase 1). De hecho, la mayoría de las estructuras (10/14) evidenciaron protección contra las convulsiones inducidas a la dosis más baja evaluada (30 mg/kg). Adicionalmente, ningún compuesto presentó signos de neurotoxicidad en la prueba Rotarod y los ratones tratados con las drogas de síntesis permanecieron vivos en forma posterior a los ensayos.

Particularmente los compuestos 1a, 1e, 1g, 1i, 1j y 2d presentaron protección total a ciertas dosis/tiempo (ver Tabla 6.1), resultando muy interesantes para continuar con las otras etapas de identificación y/o diferenciación del enfoque del ETSP.

La determinación de la DE₅₀ del compuesto 1g permitió un análisis cuantitativo de su perfil, obteniéndose un valor de DE₅₀=29 mg/kg o en forma equivalente 0,106 mmol/kg. Este resultado es alentador en cuanto a potencia, ya que está en el rango de valores de DE₅₀ medidos para los anticonvulsivos clásicos en la misma prueba (Fenitoína 0,0218 mmol/kg y ácido valproico 1,962 mmol/kg).

En relación a la influencia de los grupos metilos en posición α al carbonilo a la actividad in vivo, los resultados preliminares recogidos al momento no sugieren un rol determinante (ver Tabla 6.1, compuestos 1e, 1g versus 1i, 1j). Sin embargo, deberían realizarse ensayos cuantitativos de la actividad y una mayor cantidad de estructuras para confirmar esta hipótesis.

Como los compuestos presentaron actividad en el ensayo MES, se consideró el bloqueo de canales de sodio como posible mecanismo de acción. A partir de la simulación por docking de los compuestos sintetizados frente al modelo 3D de Nav1.2 en estado abierto, se seleccionaron cuatro estructuras para el ensayo in vitro: las dos estructuras predichas como activas por el modelo (2e y 2g) y sus precursores amidas (1e y 1g) que se clasificaron como inactivas.

Se empleó la metodología Patch Clamp, para probar el efecto inhibitorio in vitro sobre las corrientes en Nav1.2. Los ensayos electrofisiológicos realizados confirmaron las predicciones del docking, mostrando que los derivados de oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido 2e y 2g inhiben las corrientes de Na⁺ al desplazar hacia la izquierda la curva de inactivación de estado estacionario, lo que sugiere la interacción de estos compuestos con los canales de Na⁺ Nav1.2. Adicionalmente, el lavado restablece la corriente sugiriendo que la interacción de los heterociclos con el canal se da manera reversible, hecho concordante con el resto de los FAEs que bloquean los canales de sodio, como la Fenitoína, que se unen con una afinidad relativamente baja a los mismos.⁹

Debe remarcar que, si bien el mecanismo de acción para los compuestos 2e y 2g fue corroborado experimentalmente, esto no significa que sea el único. La interacción en más de un blanco molecular para ejercer el efecto anticonvulsivo es común en los fármacos de uso clínico. Por ejemplo, Topiramato interactúa con los canales de sodio al igual que Fenitoína y Carbamazepina, y además potencia un subconjunto de receptores GABA y también bloquea los receptores de kainato.⁹

El notable perfil farmacológico de las α -hidroxiamidas impulsó la búsqueda de nuevas estructuras relacionadas a las mismas. El reemplazo isostérico y la optimización asistida por computadora se emplearon independiente para diseñar moléculas prototipo de dos nuevas familias. Mediante reacciones sencillas de sustitución nucleofílica se sintetizaron las α -cloroamidas 3e y 3g con rendimientos de 26 % y 32 % respectivamente y los éteres simétricos 4i y 4j con rendimientos respectivos de 57 % y 60 %.

Al igual que lo desarrollado anteriormente, se determinó la actividad biológica in vivo de los compuestos 3e, 4i y 4j y los resultados obtenidos permitieron catalogar a estas estructuras como clase 1. Adicionalmente, ninguno de los ratones falló en la prueba Rotarod ni murió en forma posterior al ensayo.

Respecto a los éteres, los resultados preliminares sugieren que la presencia de los metilos en posición α al carbonilo tampoco influyen categóricamente sobre la acción anticonvulsiva en este ensayo.

En resumen, mediante el desarrollo de la presente tesis doctoral:

- Se han aportado 18 estructuras, pertenecientes a diversas familias de compuestos, cuyas evaluaciones preclínicas resultaron ser exitosas y promisorias como anticonvulsivos. En particular el compuesto 1g posee una potencia calculada que se encuentra en el rango de la encontrada para los anticonvulsivos de uso clínico (ED_{50} 29mg/kg).
- Se han implementado distintas vías sintéticas (asistidas por microondas, libres de solventes o mediante catalizadores) para la preparación de los compuestos.
- Se ha avanzado en la identificación del mecanismo de acción de las estructuras activas, partiendo del uso de herramientas in silico y luego corroborando los resultados in vitro.
- Se ha iniciado un segundo round de optimización mediante la propuesta de derivados halogenados y éteres simétricos de las funciones amidas, las cuales surgen de diferentes estrategias de optimización utilizadas en química medicinal como son el reemplazo isostérico, el aumento de la lipofilia, la extensión de la estructura y los estudios in silico.

Como futuras acciones que se desencadenan de este trabajo se espera lograr la determinación de la actividad anticonvulsiva del compuesto 3g y los ensayos

electrofisiológicos que confirmen las predicciones del docking para las estructuras 4i y 4j.

Además, se propone estudiar la interacción de las amidas con otros blancos moleculares, dado que su interesante actividad in vivo justifica el análisis de su mecanismo de acción. En cuanto a las vías sintéticas, se espera seguir optimizando estas metodologías. Por ejemplo, en el caso de la preparación de las amidas por aminólisis de ácido glicólico. Si bien la síntesis arrojó rendimientos aceptables y el solvente (tolueno) pudo ser mayoritariamente recuperado en evaporador rotatorio, se pretende a futuro adaptar esta síntesis a condiciones de reacción más verdes, como la estrategia propuesta por Ojeda-Porras y colaboradores,¹⁰ desarrollada en el capítulo 3 de este trabajo.

Referencias

1. Yu, N.; et al. How to find candidate drug-targets for antiepileptogenic therapy? *Curr Neuropharmacol* (2020)
2. Organización Mundial de la Salud. (2018) <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.
3. Shapiro, L. α -Hydroxy Amides and Related Compounds. *Org. Synthesis*, **81** 6322-6329 (1959)
4. Pastore, V., et al. Synthesis and anticonvulsant activity of bioisosteres of trimethadione, N-derivative-1,2,3-oxathiazolidine-4-one-2,2-dioxides from α -hydroxyamides. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 841–846 (2013).
5. Gülşen Öztürk, et al. A facile synthesis of amide-based receptors under microwave conditions: investigation of their anion recognition properties by experimental and computational tools. *J Mol Model* **23**: 249 (2017)
6. R. S. Varma, et al. Journey on greener pathways: from the use of alternate energy inputs and benign reaction media to sustainable applications of nano-catalysts in synthesis and environmental remediation *Green Chem.*, **16**, 2027-2041 (2014)
7. Sabot, C., et al. A convenient aminolysis of esters catalyzed by 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD) under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **48**, 3863–3866 (2007).
8. Putnam, T., et al. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science.* **85**, 525-526 (1937).
9. Rogawski, M. Molecular Targets Versus Models for New Antiepileptic Drug Discovery. *Epilepsy Res.* **68**(1): 22–28 (2016).
10. Ojeda-Porras, A., et al. Direct amidation of carboxylic acids with amines under microwave irradiation using silica gel as a solid support. *Green Chem.* **17**, 3157–3163 (2015).

ANEXO 1

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

- **Crisis atónicas:** crisis caracterizada por la relajación de los músculos, donde la persona pierde en forma brusca la fuerza.
- **Crisis de ausencia:** Períodos de alteración del estado de conciencia breves y repentinos. Son más frecuentes en niños que en adultos. Una persona que tiene una crisis de ausencia luce como si estuviera mirando fijo a la nada durante unos segundos. Luego, regresa rápidamente a un nivel de alerta normal.
- **Crisis clónica:** Periodos en que partes del cuerpo tiemblan o se sacuden.
- **Crisis electrográficas:** episodios eléctricos de la corteza, breves, entre dos segundos y dos minutos de duración, con intervalos de crisis de más o menos ocho minutos.
- **Crisis mioclónicas:** Sacudidas cortas en partes del cuerpo.
- **Crisis tónica:** Los músculos del cuerpo se ponen rígidos.
- **Curvas ROC:** La curva ROC es una prueba basada en una variable de decisión, cuyo fin es realizar la clasificación de los individuos de una población en dos grupos: uno que presente un evento de interés y otro que no (por ejemplo, compuestos activos e inactivos). Esta capacidad discriminante se encuentra sujeta al valor de corte elegido de entre todos los posibles resultados de la variable de decisión. La curva es el gráfico resultante de representar, para cada valor umbral, las medidas de sensibilidad y especificidad de la prueba. Por un lado, la sensibilidad cuantifica la tasa de verdaderos positivos, es decir, para el caso de esta tesis, aquellos compuestos que son bloqueantes y se clasificaron como tales. Por otro lado, la especificidad cuantifica la proporción verdaderos negativos, es decir los compuestos que no bloquean y la prueba los clasifica de ese modo.
- **Descriptor molecular:** Es el resultado final de un proceso lógico-matemático que transforma información química en un número a través de un proceso estadístico.
- **Dosis efectiva 50:** Dosis de un fármaco que es efectiva para el 50 % de los animales probados.
- **Gráficos Ramachandran:** Este diagrama es una forma de visualizar las regiones energéticamente permitidas para los ángulos diedros del esqueleto de una proteína. De este modo, es posible determinar cuántos residuos se encuentran formando parte de un elemento de estructura secundaria determinado, y cuántos presentan unos ángulos de torsión “forzados” a adoptar la estructura de

la proteína de la que disponemos como molde. Cuantos más residuos presenten ángulos forzados, más probable será que la estructura de la proteína molde no sea la más adecuada.

- **Scaffold:** Núcleo estructural de un compuesto químico.
- **Transportador de eflujo:** Proteínas de membrana que se encuentran en todos los organismos vivos y que expulsan al exterior de la célula moléculas del interior.

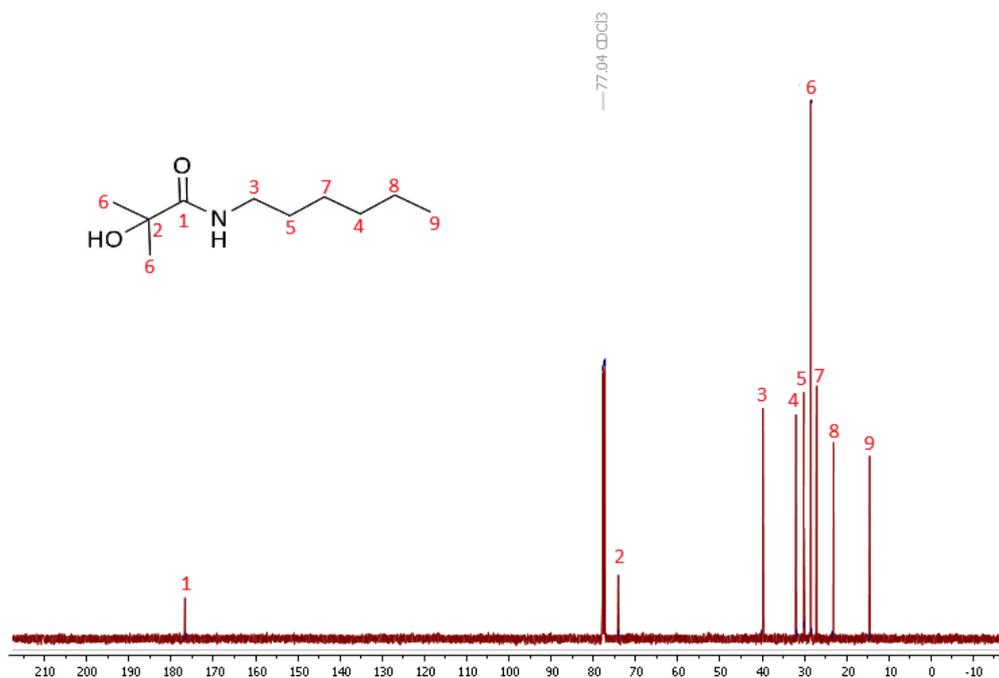
ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
BBB	Barrera hematoencefálica
DE₅₀	Dosis efectiva 50.
ETSP	Programa de detección de terapias para la Epilepsia
FAEs	Fármacos anticonvulsivos
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (Agencia de gobierno de EEUU)
GABA	Ácido g-aminobutírico
GAT-1	Transportador 1 de GABA dependiente de sodio y cloruro
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia
MES	Evaluación de electrochoque máximo
MW	Microondas
Nav	Canal de sodio operado por voltaje
OTZ	Esqueleto oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido
RMN	Resonancia magnética nuclear
SFC	Condición libre de solvente
SNC	Sistema nervioso central
SV2A	Glicoproteína 2A de vesículas sinápticas
WHO	Organización Mundial de la Salud

ANEXO 2

ESPECTROS DE RMN

N-hexil-2-hidroxiisobutiramida (1a)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.91 (C_1), 73.29 (C_2), 39.48 (C_3), 31.16 (C_4), 29.51 (C_5), 27.61 (C_6), 26.54 (C_7), 22.76 (C_8), 13.8 (C_9).

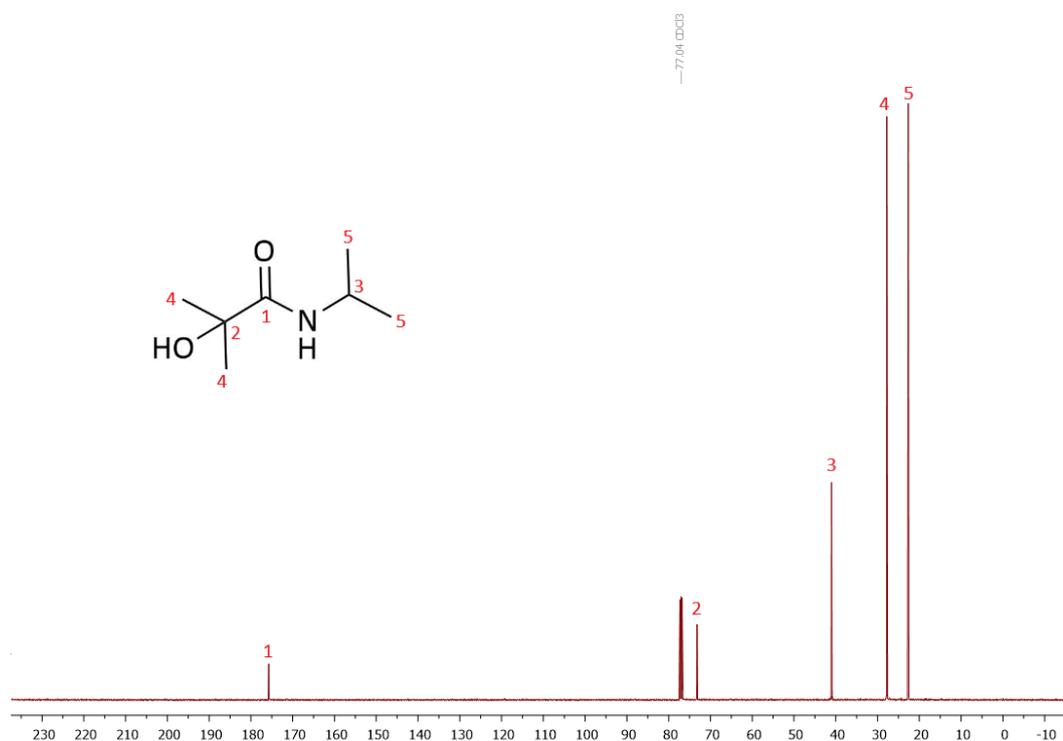


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.75 (s, 1H, H_1), 3.26 (m, 2H, H_2), 1.53 (m, 2H, H_3), 1.47 (s, 6H, H_4), 1.32 (s, 6H, H_5), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H_6).

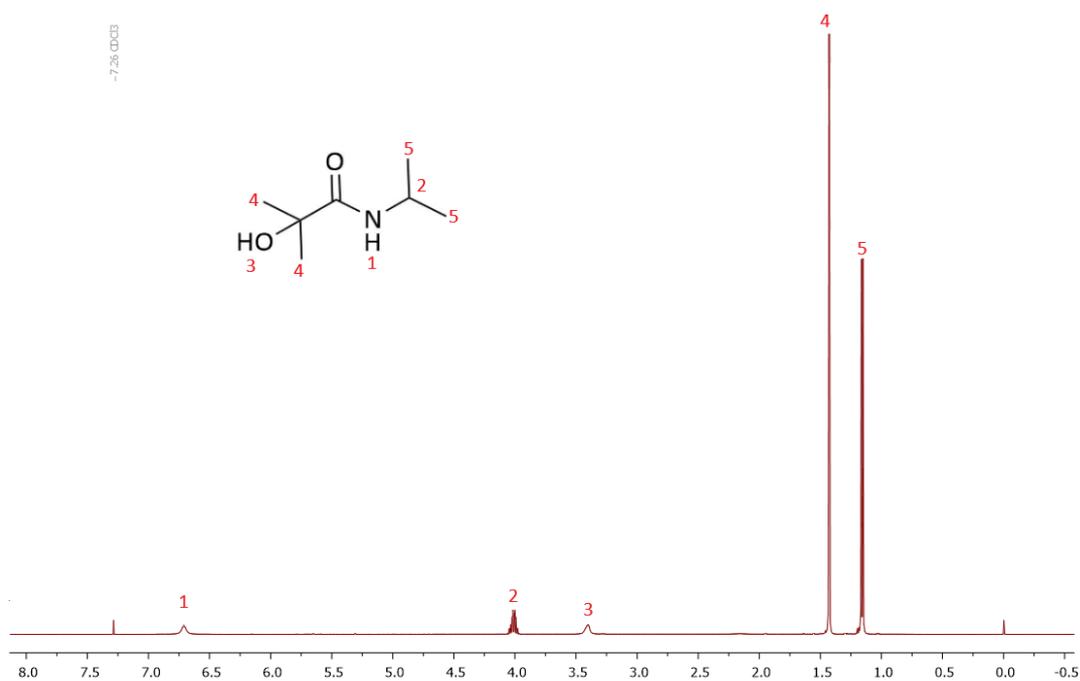


N-isopropil-2-hidroxiisobutiramida (1b)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.96 (C_1), 72.52 (C_2), 40.64 (C_3), 27.54 (C_4), 22.24 (C_5).

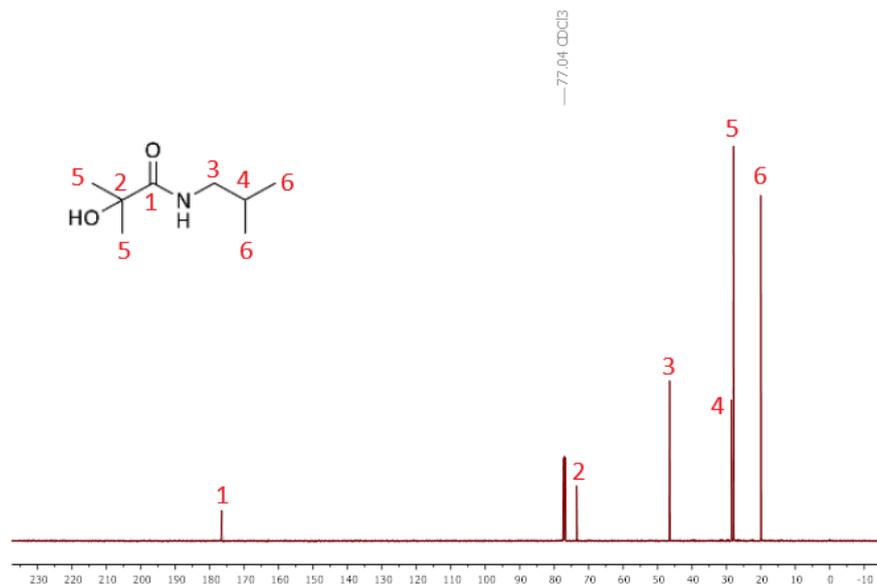


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.71 (brs, 1H, H_1), 4.05 (m, 1H, H_2), 3.40 (brs, 1H, H_3), 1.43 (s, 6H, H_4), 1.16 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, H_5).

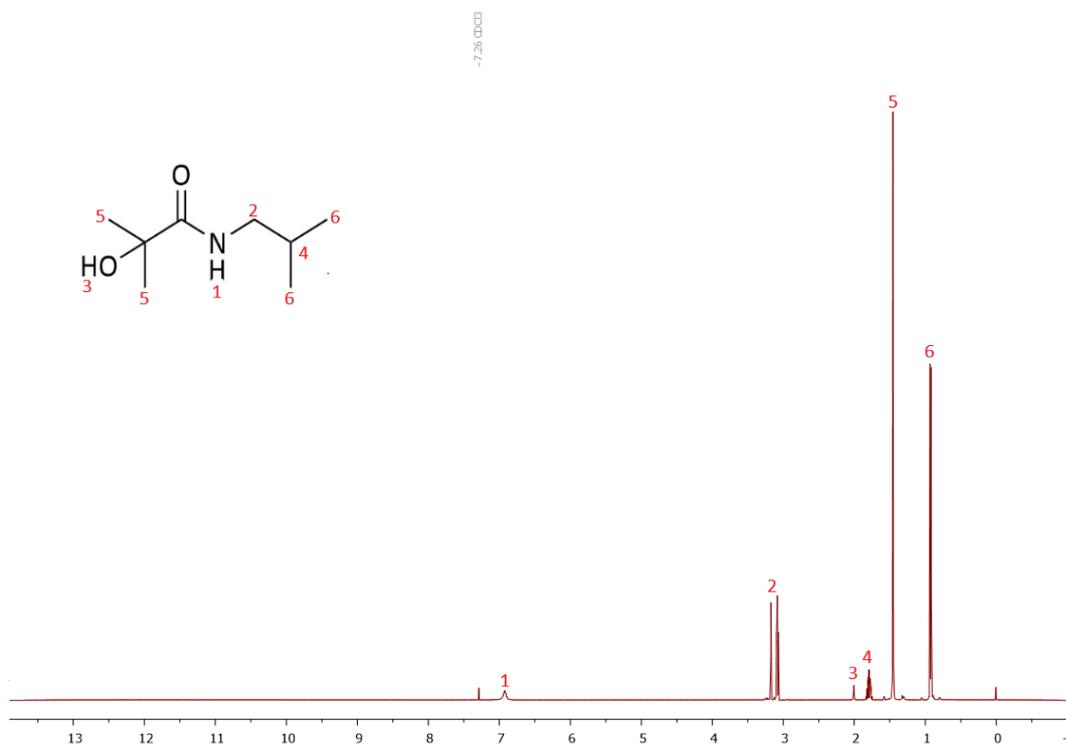


N-isobutil-2-hidroxiisobutiramida (1c)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 176.23 (C_1), 73.33 (C_2), 46.37 (C_3), 28.55 (C_4), 27.95 (C_5), 20.02 (C_6).

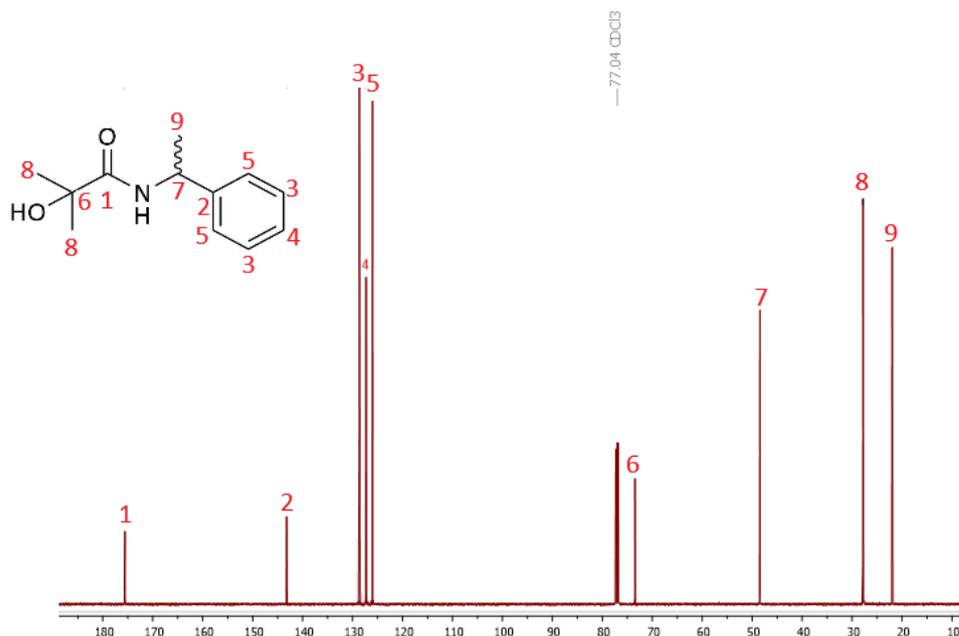


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.90 (brs, 1H, H_1), 3.08 (dd, 2H, H_2), 2.05 (s, 1H, H_3), 1.77 (m, 1H, H_4), 1.45 (s, 6H, H_5), 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, H_6).

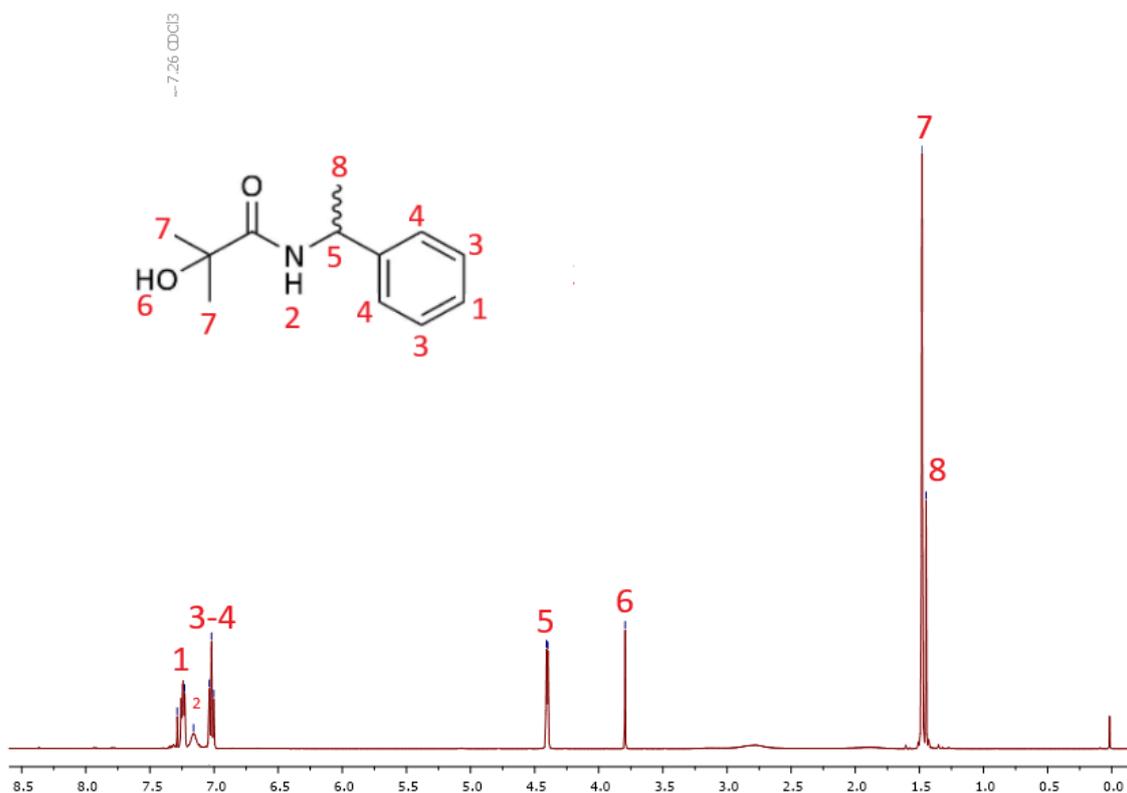


N-((±)-1-metilbencil)-2-hidroxiisobutiramida (1e)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.75 (C_1), 143.15 (C_2), 128.45 (C_3), 127.30 (C_4), 125.61 (C_5), 73.44 (C_6), 47.99 (C_7), 27.83 (C_8), 21.79 (C_9).

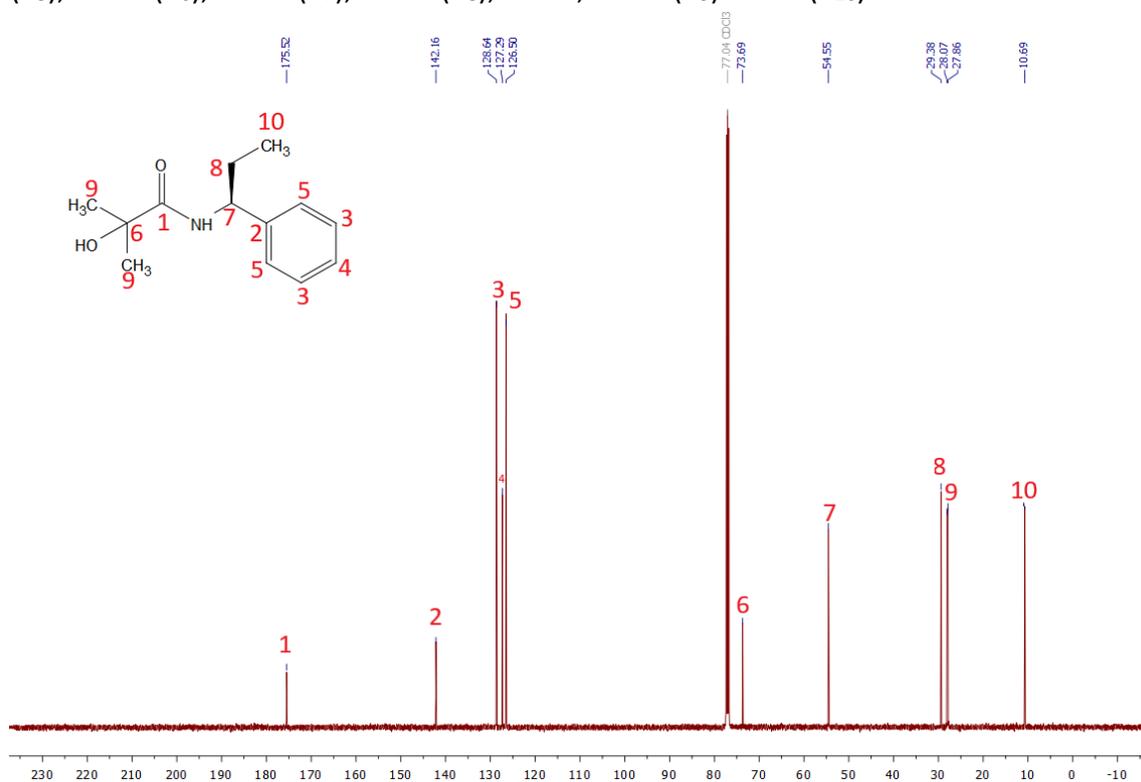


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (m, 1H, H_1), 7.04 (brs, 1H, H_2), 7.02-7.00 (m, 2H, $\text{H}_{3,4}$), 4.40 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H_5), 3.79 (s, 1H, H_6), 1.48 (s, 6H, H_7), 1.45 (d, 3H, H_8).

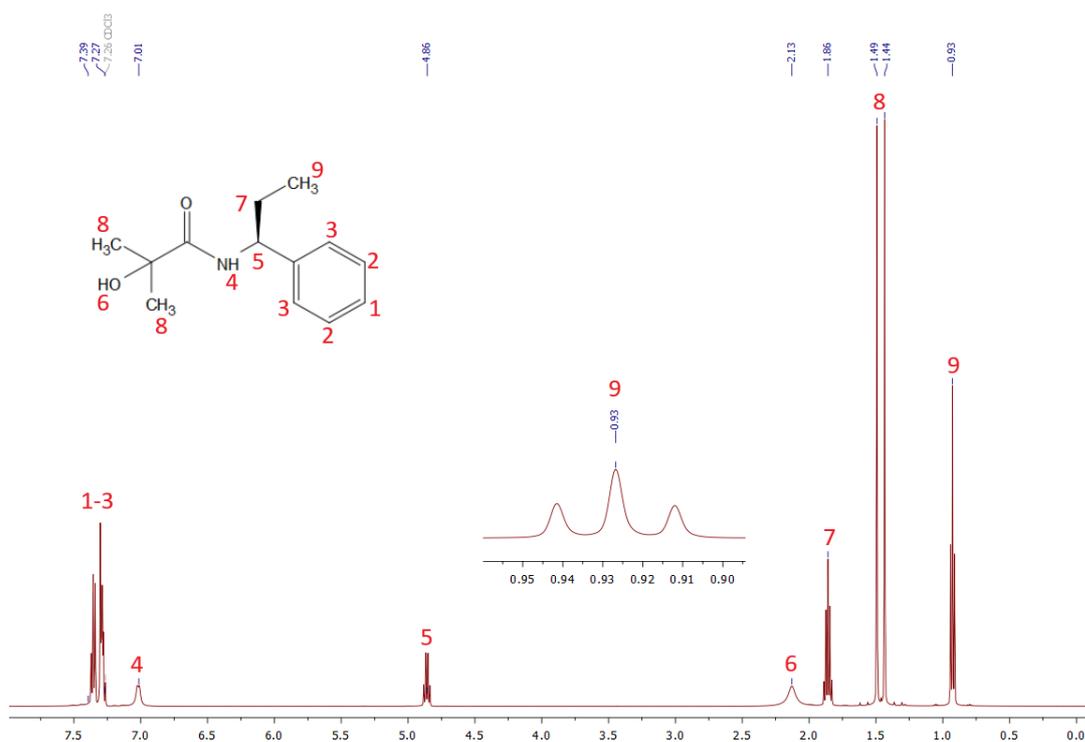


N-((S)-1-etilbencil)-2-hidroxiisobutiramida (1f)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 175.52 (C_1), 142.16 (C_2), 128.64 (C_3), 127.29 (C_4), 126.50 (C_5), 73.69 (C_6), 54.55 (C_7), 29.38 (C_8), 28.07, 27.86 (C_9) 10.69 (C_{10}).

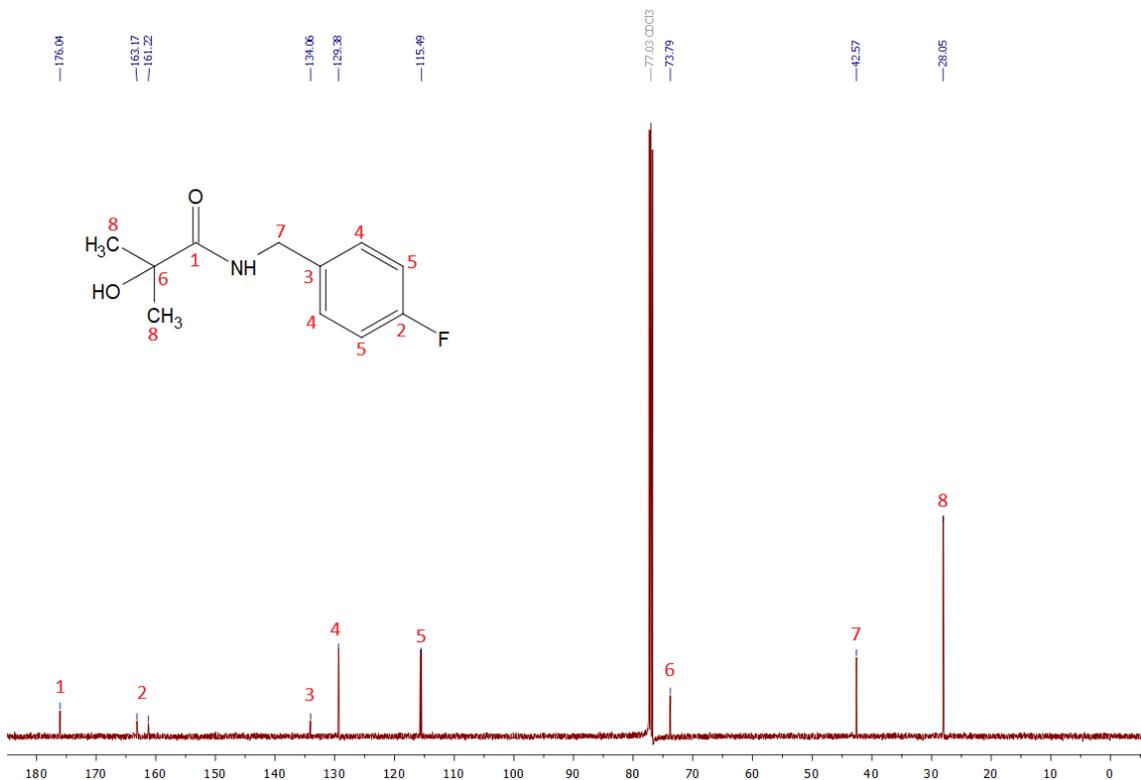


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39-7.27 (m, 5H, H_{1-3}), 7.01 (brs, 1H, H_4), 4.86 (m, 1H, H_5), 2.13 (brs, 1H, H_6), 1.86 (m, 2H, H_7), 1.49 (s, 3H, H_8), 1.44 (s, 3H, H_8), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H_9).

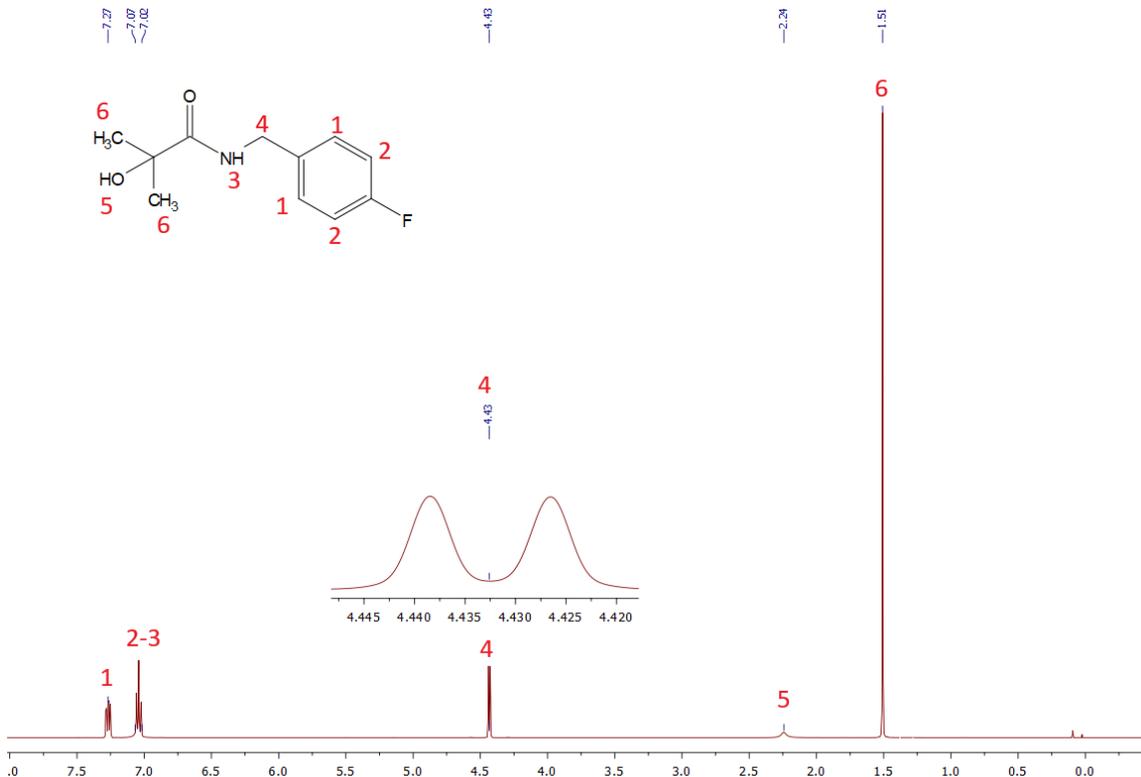


N-(4-fluorobencil)-2-hidroxiisobutirama (1g)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 176.04 (C_1), 163.17, 161.22 (C_2), 134.06 (C_3), 129.38 (C_4), 115.49 (C_5), 73.79 (C_6), 42.57 (C_7), 28.05 (C_8).

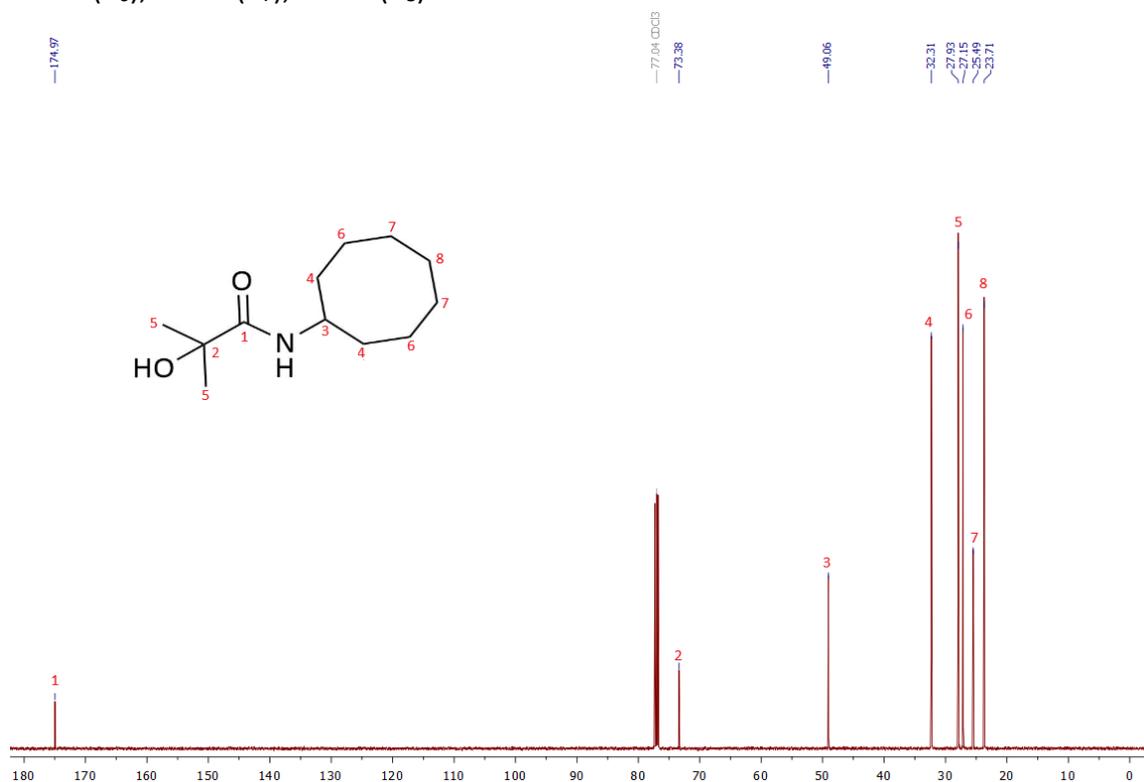


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (m, 2H, H_1), 7.07-7.02 (m, 3H, $\text{H}_{2,3}$), 4.43 (d, $J=6.0$ Hz, 2H, H_4), 2.24 (brs, 1H, H_5), 1.51 (s, 6H, H_6).

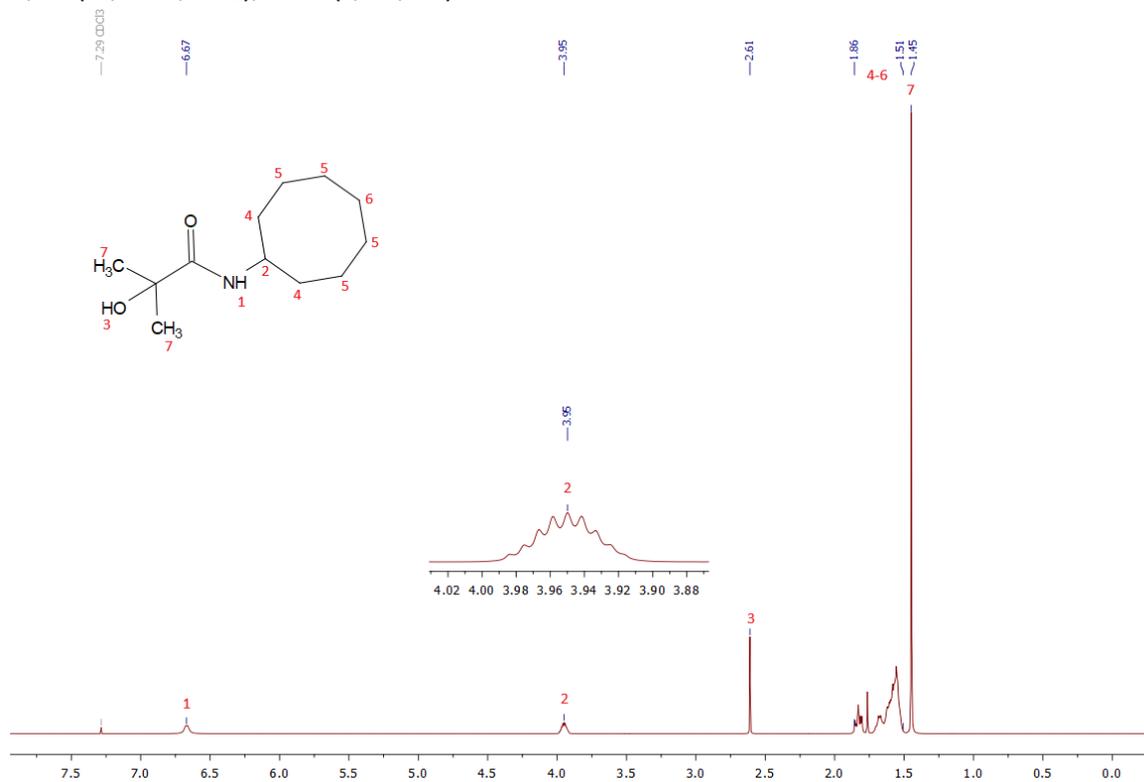


N-ciclooctil-2-hidroxiisobutirama (1h)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 174.97 (C_1), 73.38 (C_2), 49.06 (C_3), 32.31 (C_4), 27.93 (C_5), 27.15 (C_6), 25.49 (C_7), 23.71 (C_8).

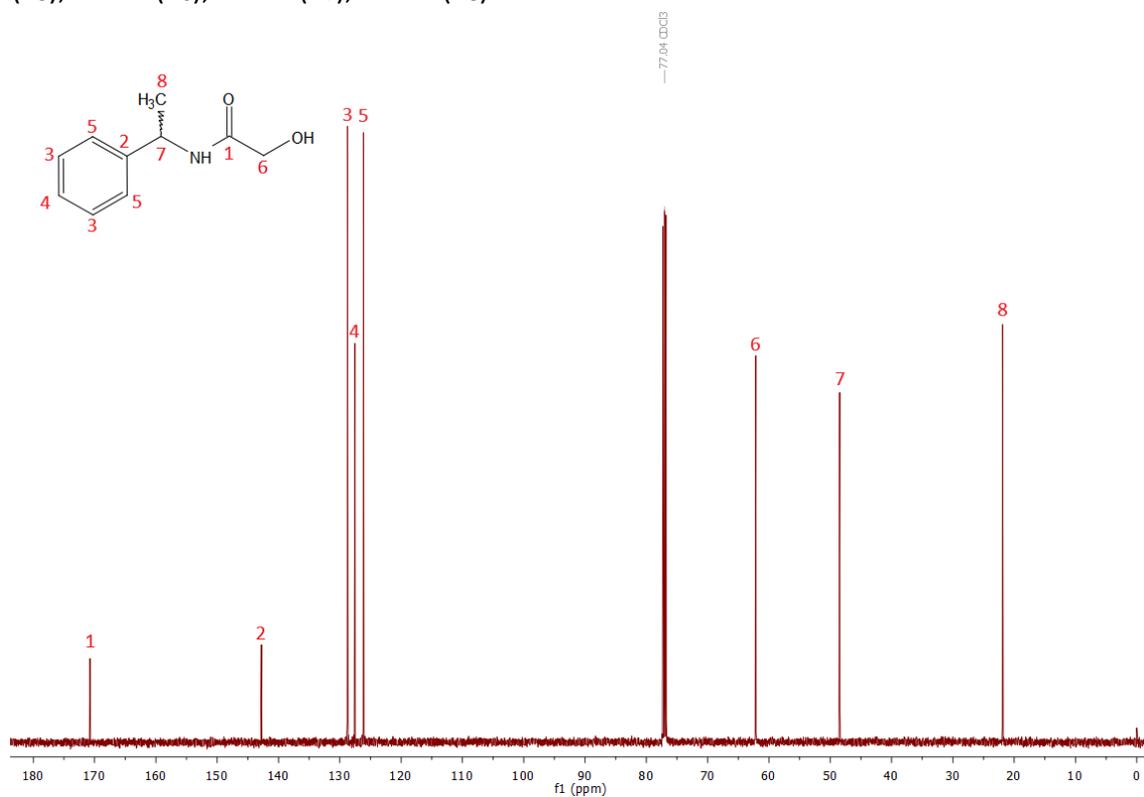


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (brs, 1H, H_1), 3.95 (m, 1H, H_2), 2.61 (s, 1H, H_3), 1.86-1.51 (m, 14H, H_{4-6}), 1.45 (s, 6H, H_7).

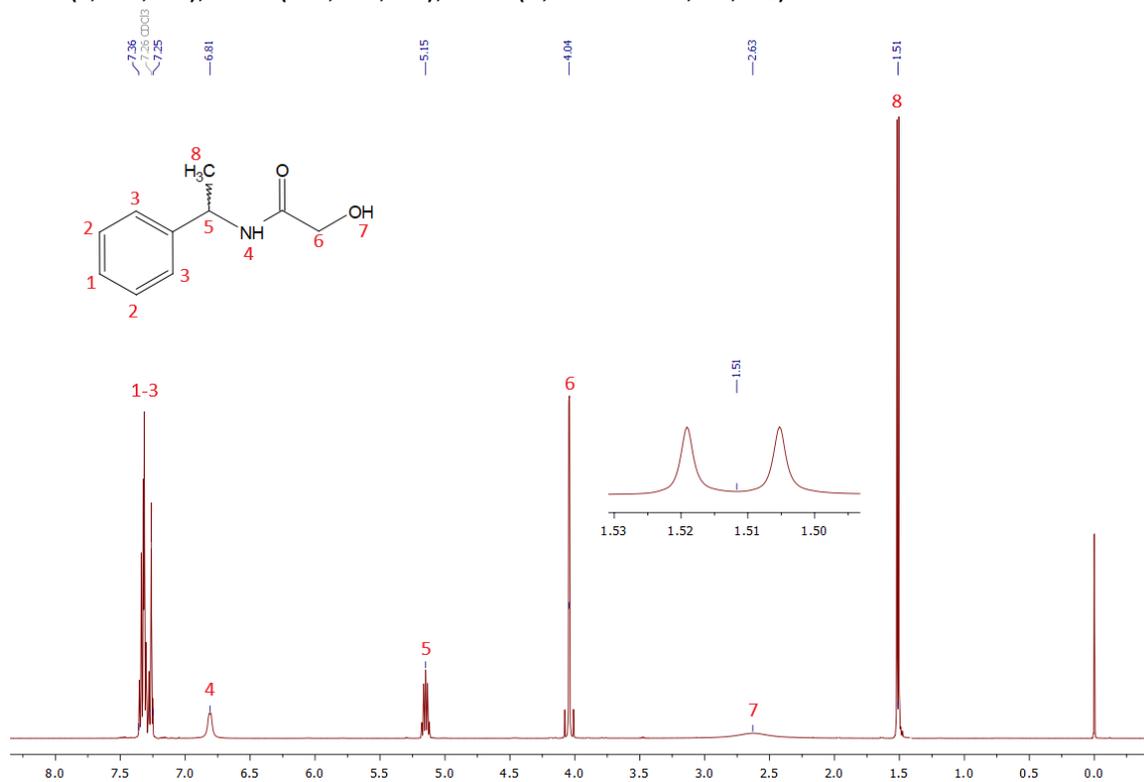


N-((±)-1-metilbencil)-2-hidroxiacetamida (1i)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 170.75 (C_1), 142.78 (C_2), 128.75 (C_3), 127.53 (C_4), 126.14 (C_5), 62.14 (C_6), 48.46 (C_7), 21.90 (C_8).

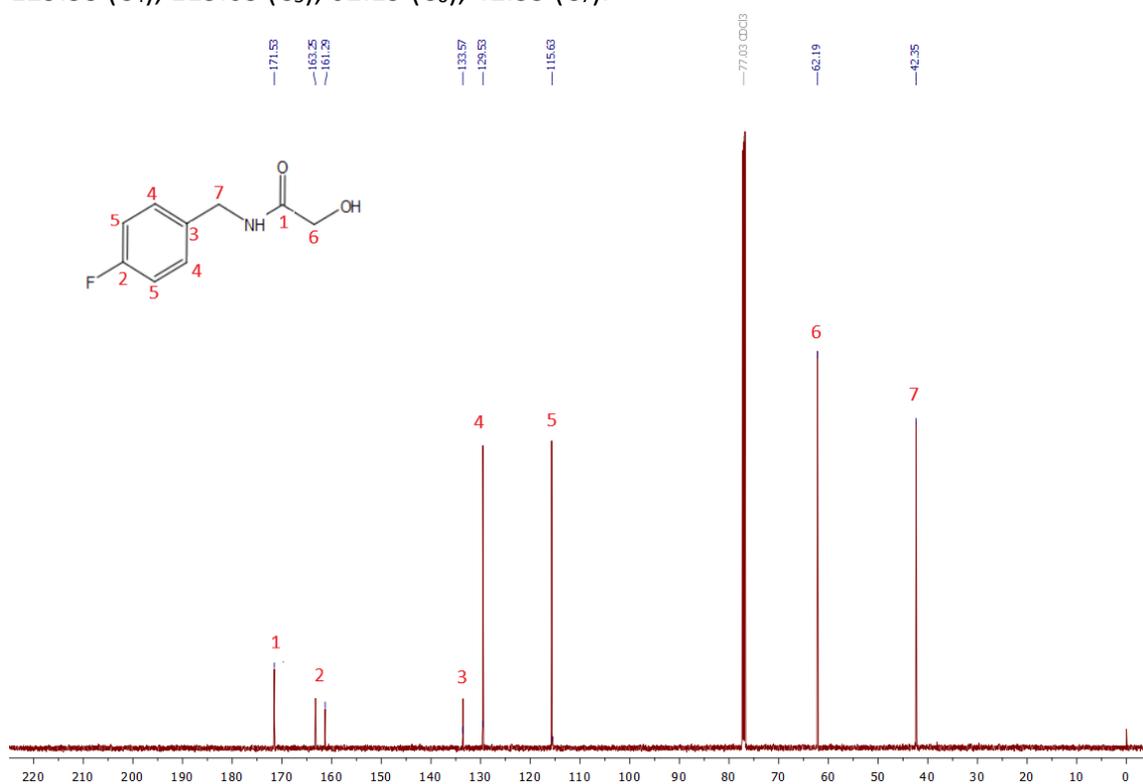


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.25 (m, 5H, H_{1-3}), 6.81 (brs, 1H, H_4), 5.15 (m, 1H, H_5), 4.05 (s, 2H, H_6), 2.60 (brs, 1H, H_7), 1.51 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H_8).

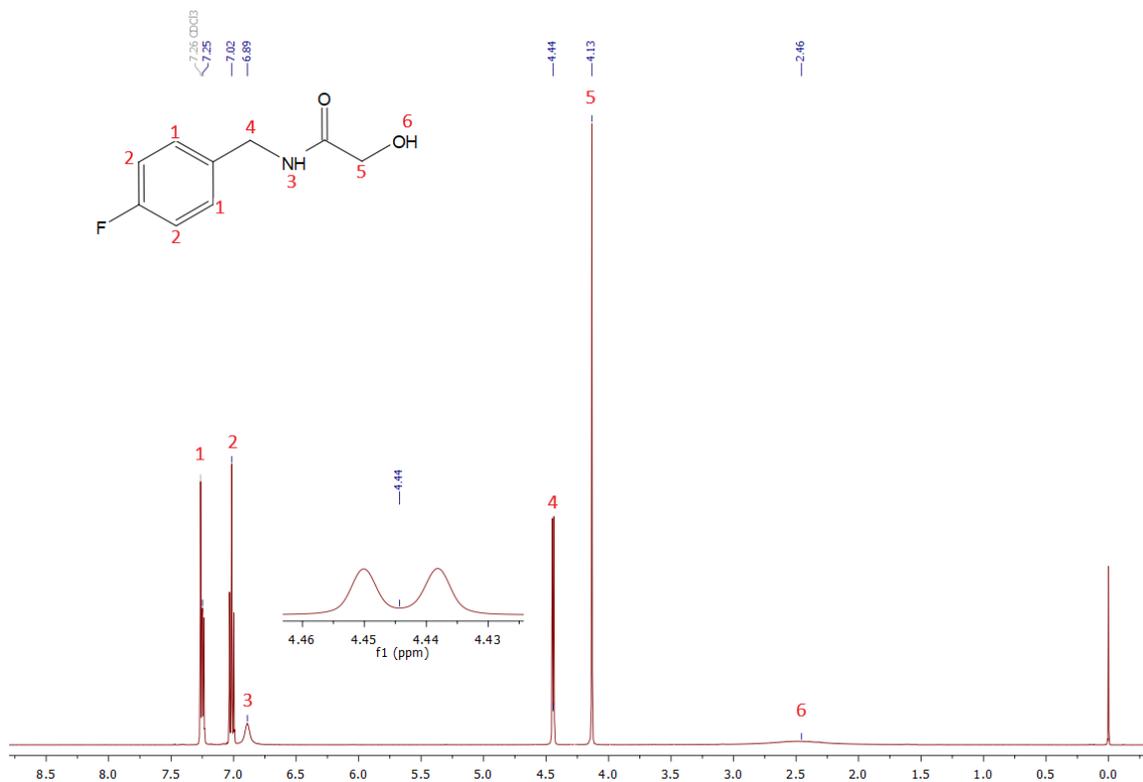


N-(4-fluorobencil)-2-hidroxiacetamida (1j)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 171.53 (C_1), 163.25 y 161.29 (C_2), 161.29 (C_2), 133.57 (C_3), 129.53 (C_4), 115.63 (C_5), 62.19 (C_6), 42.35 (C_7).

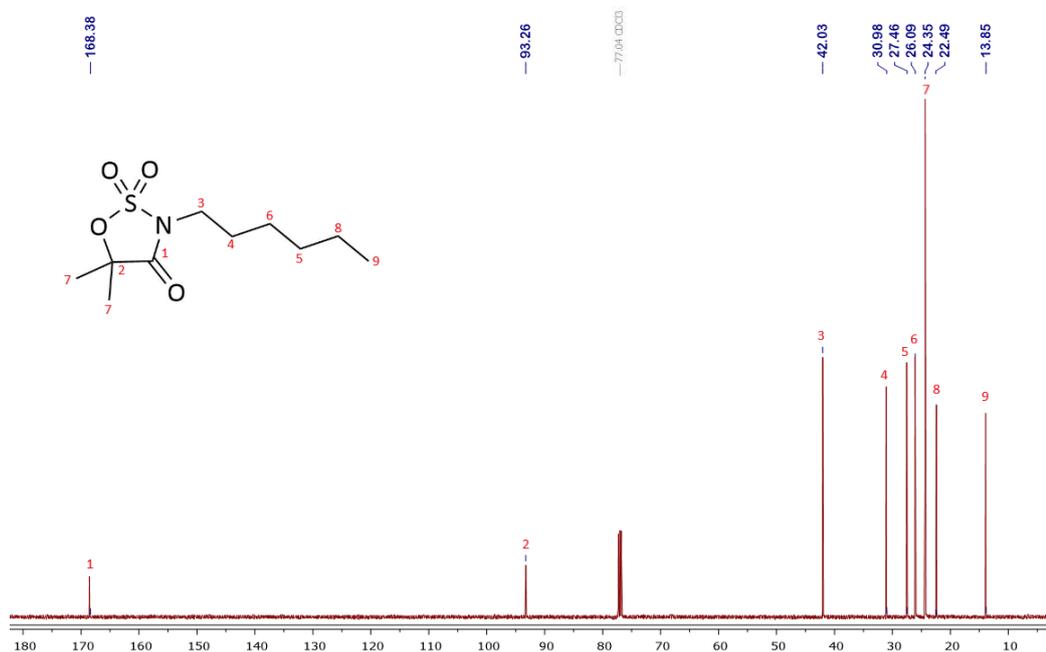


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (m, 2H, H_1), 7.02(m, 2H, H_2), 6.89 (brs, 1H, H_3), 4.44 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_4), 4.13 (s, 2H, H_5), 2.46 (brs, 1H, H_6).

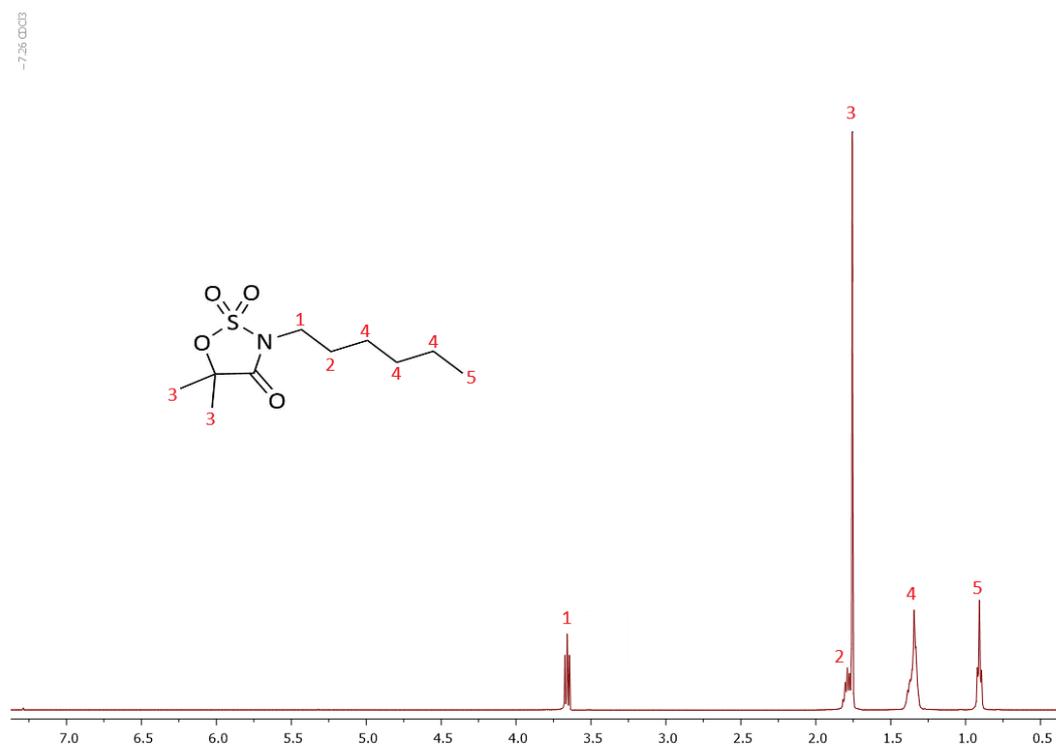


3-hexil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2a)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.38 (C_1), 93.26 (C_2), 42.03 (C_3), 30.98 (C_4), 27.46 (C_5), 26.09 (C_6), 24.35 (C_7), 22.49 (C_8), 13.85 (C_9).

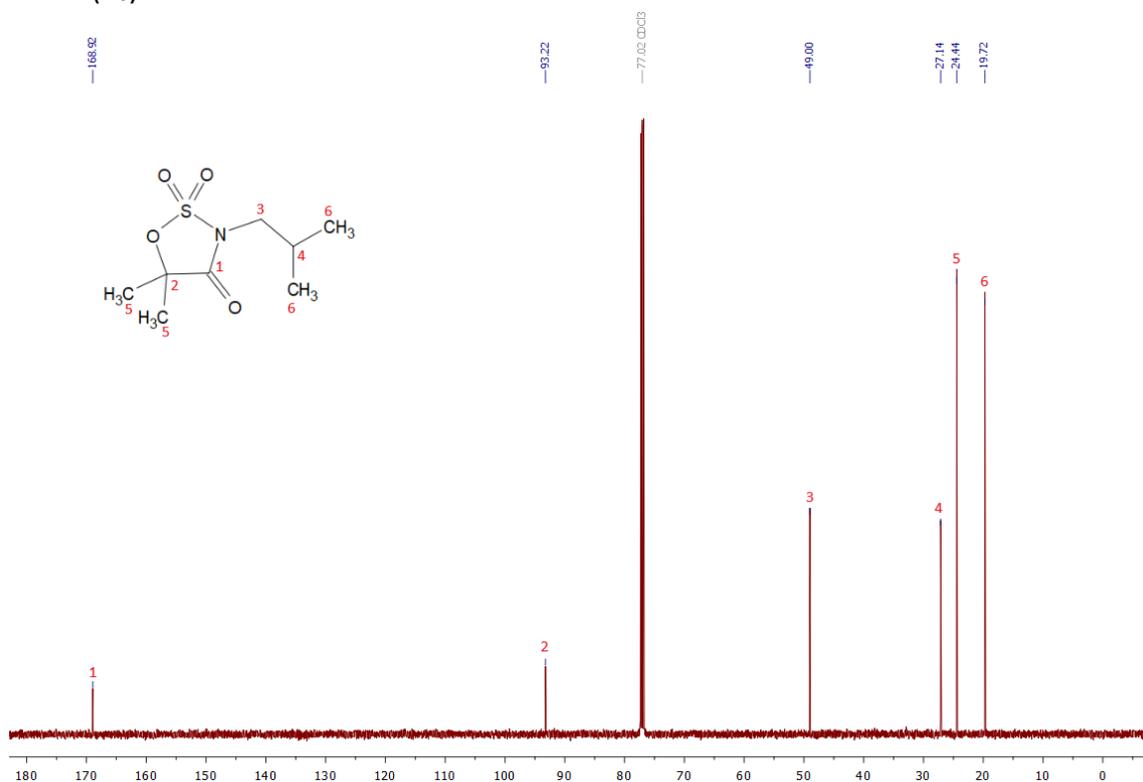


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.67 (*t*, 2H, H_1), 1.79 (*m*, 2H, H_2), 1.76 (*s*, 6H, H_3), 1.45-1.32 (*m*, 6H, H_4), 0.91 (*t*, $J = 6.8$ Hz, 3H, H_5).

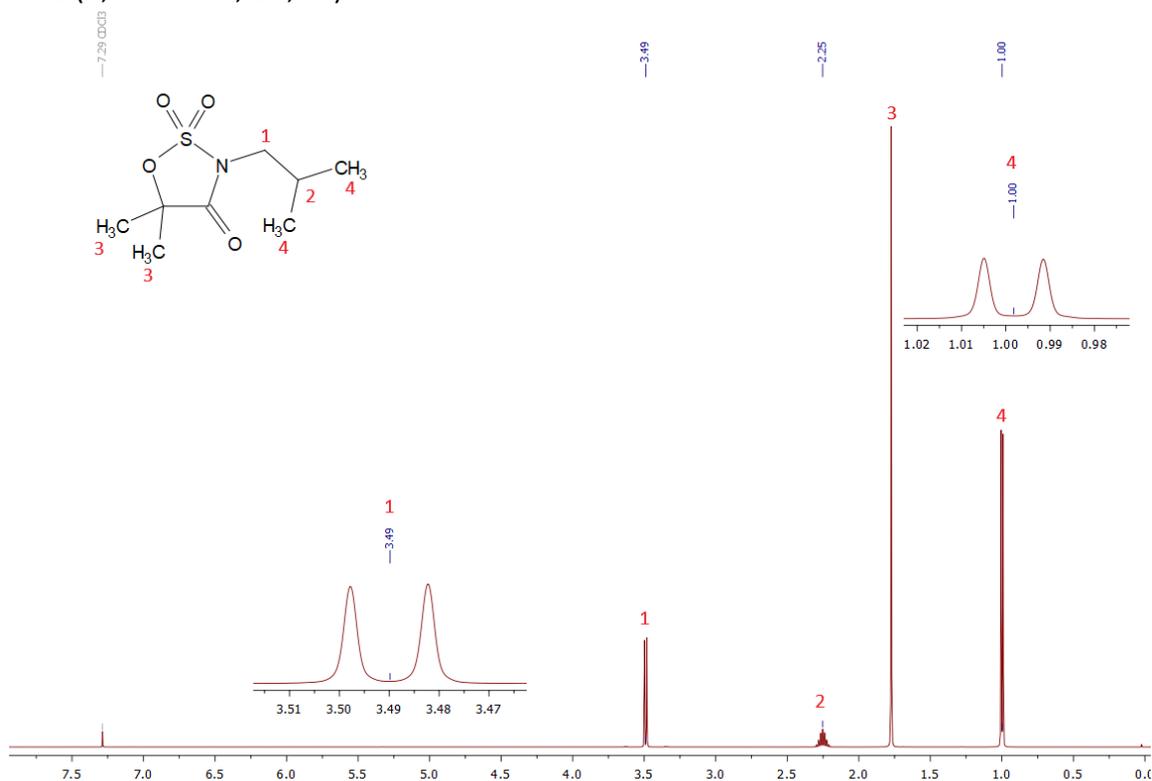


3-(1-isobutil)-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2c)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.90 (C_1), 93.22 (C_2), 49.00 (C_3), 27.14 (C_4), 24.44 (C_5), 19.72 (C_6).

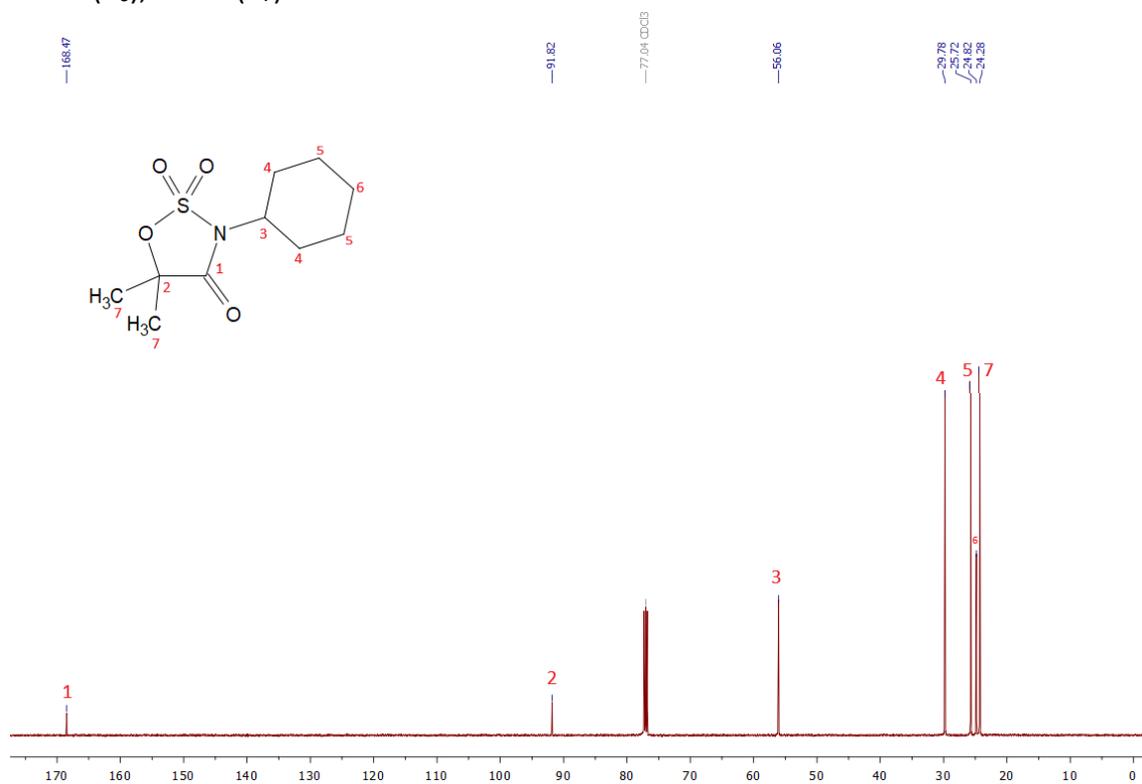


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_1), 2.25 (m, 1H, H_2), 1.77 (s, 6H, H_3), 1.00 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, H_4).

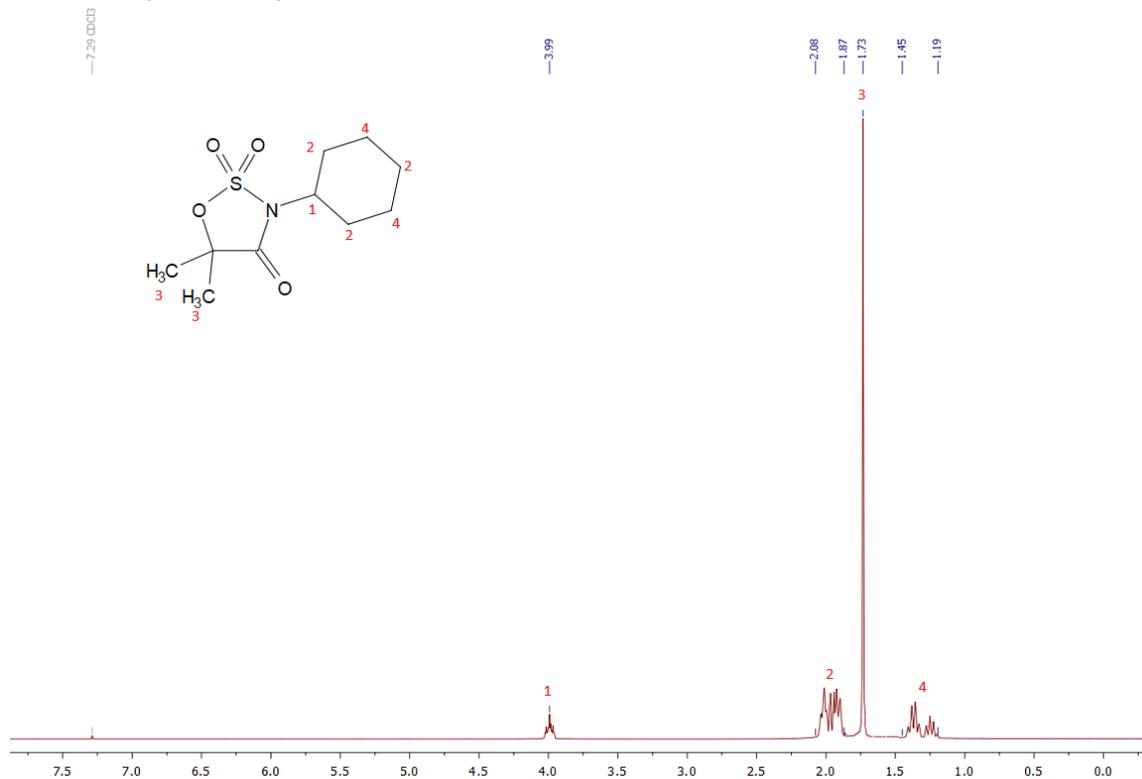


3-ciclohexil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2d)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.47 (C_1), 91.82 (C_2), 56.06 (C_3), 29.78 (C_4), 25.72 (C_5), 24.82 (C_6), 24.28 (C_7).

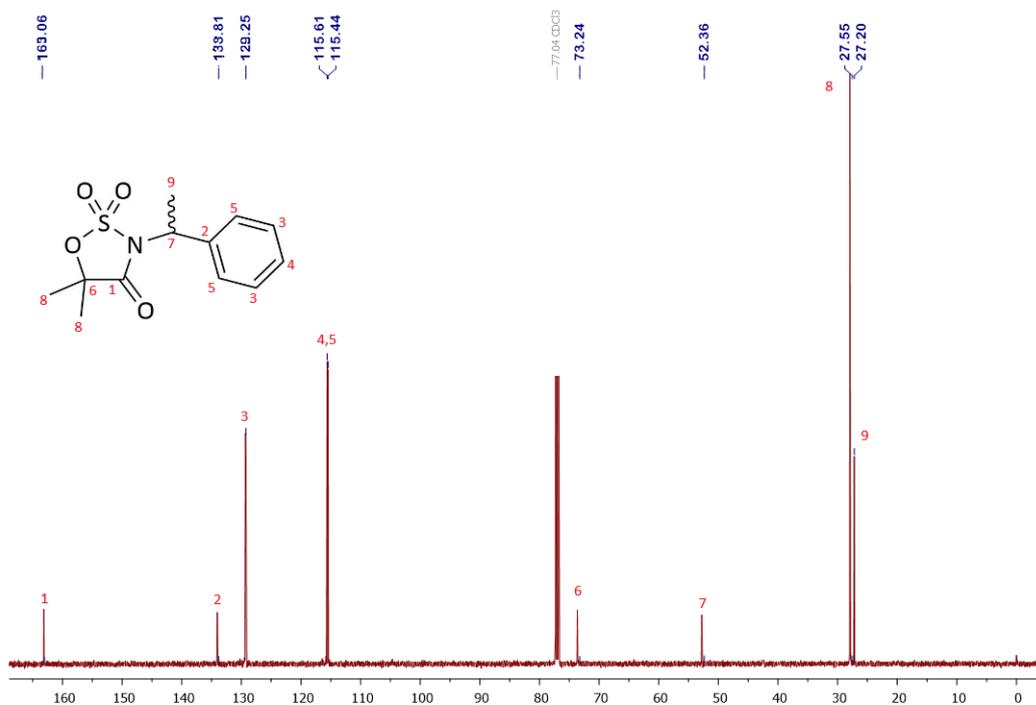


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.99 (*m*, 1H, H_1), 2.08 – 1.87 (*m*, 6H, H_2), 1.73 (*s*, 6H, H_3), 1.45-1.19 (*m*, 4H, H_4).

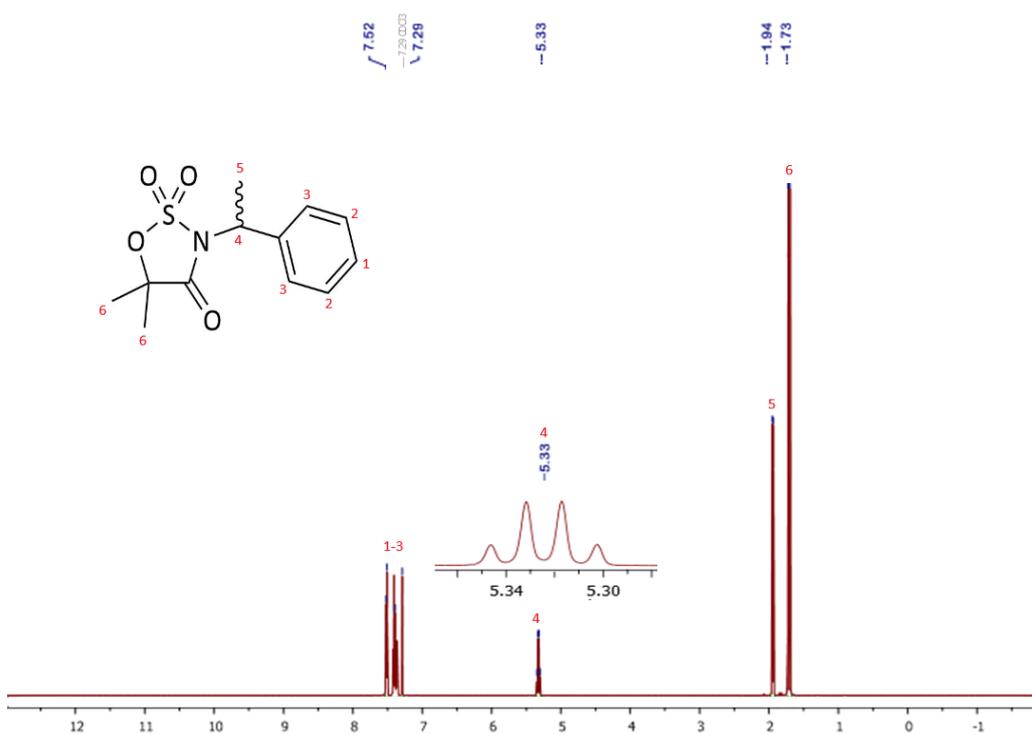


3-(±)-1-metilbencil-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2 dióxido
(2e)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 163.06 (C_1), 133.81 (C_2), 129.25 (C_3), 115.61 (C_4), 115.44 (C_5), 73.24 (C_6), 52.36 (C_7), 27.55 (C_8), 27.20 (C_9).

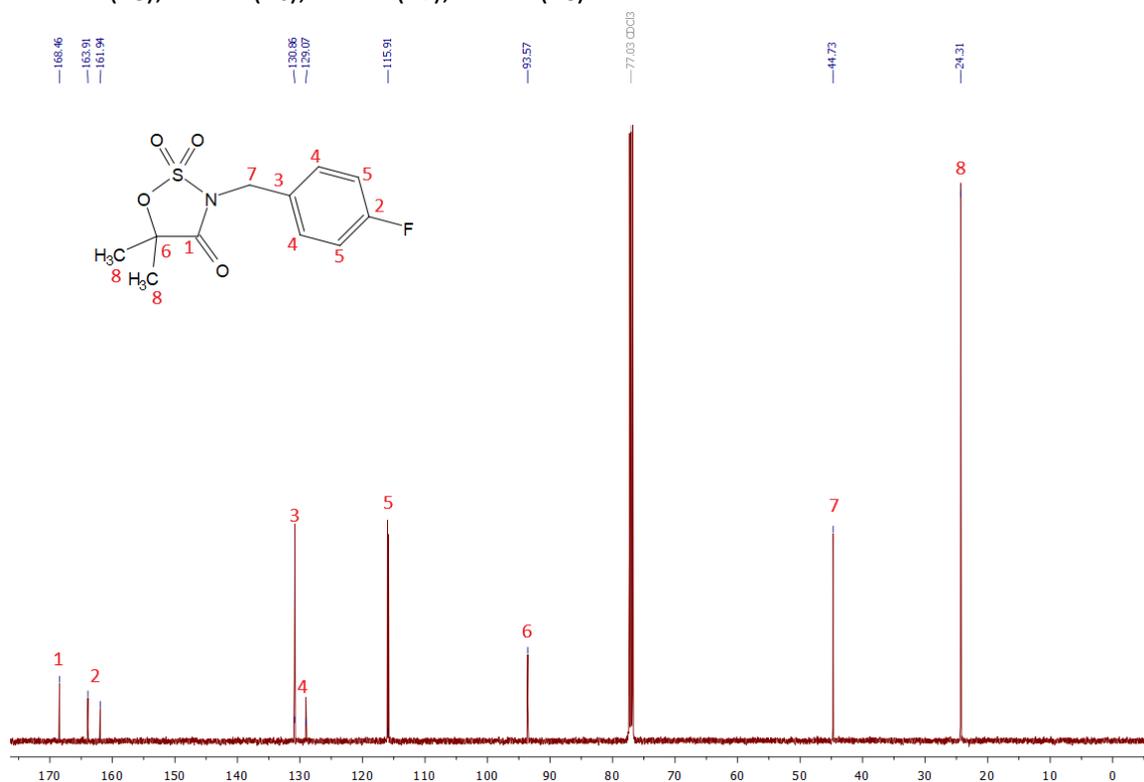


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.62 – 7.29 (m, 5H, H_{1-3}), 5.33 (q, 1H, H_4), 1.94 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H_5), 1.73 (s, 6H, H_6).

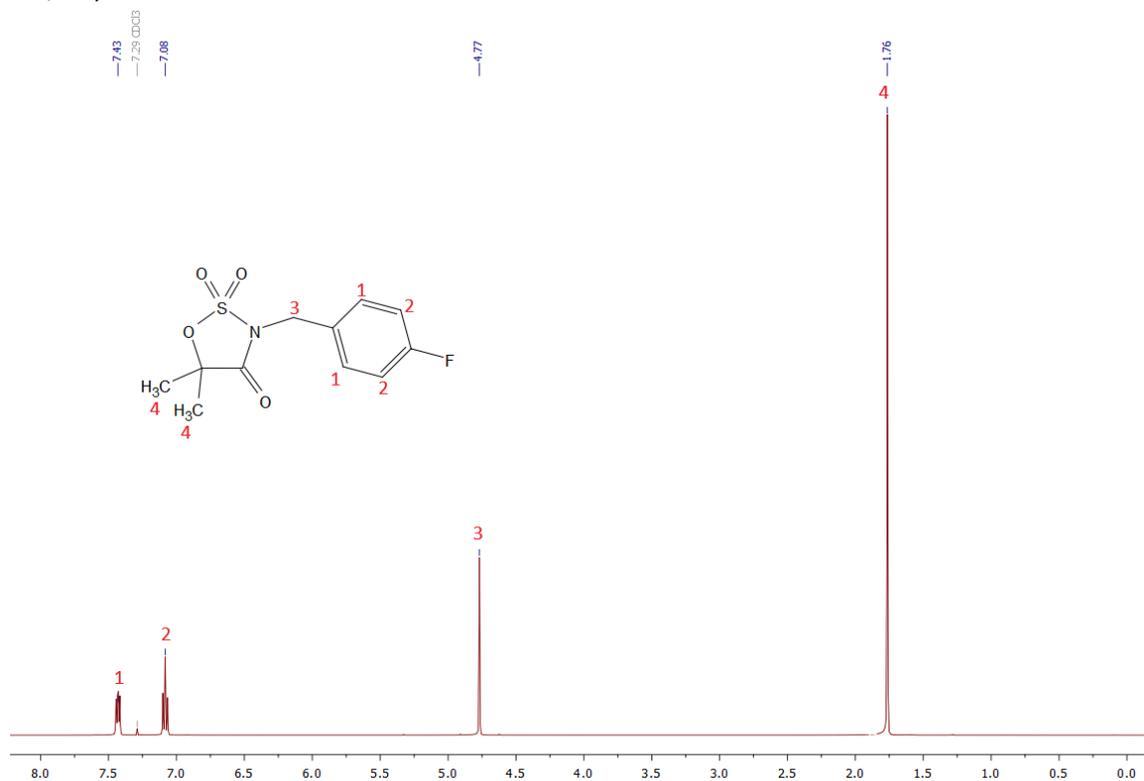


3-(4-fluorobencil)-5,5-dimetil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (2g)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.46 (C_1), 163.91 y 161.94 (C_2), 130.86 (C_4), 129.07 (C_3), 115.91 (C_5), 93.57 (C_6), 44.73 (C_7), 24.31 (C_8).

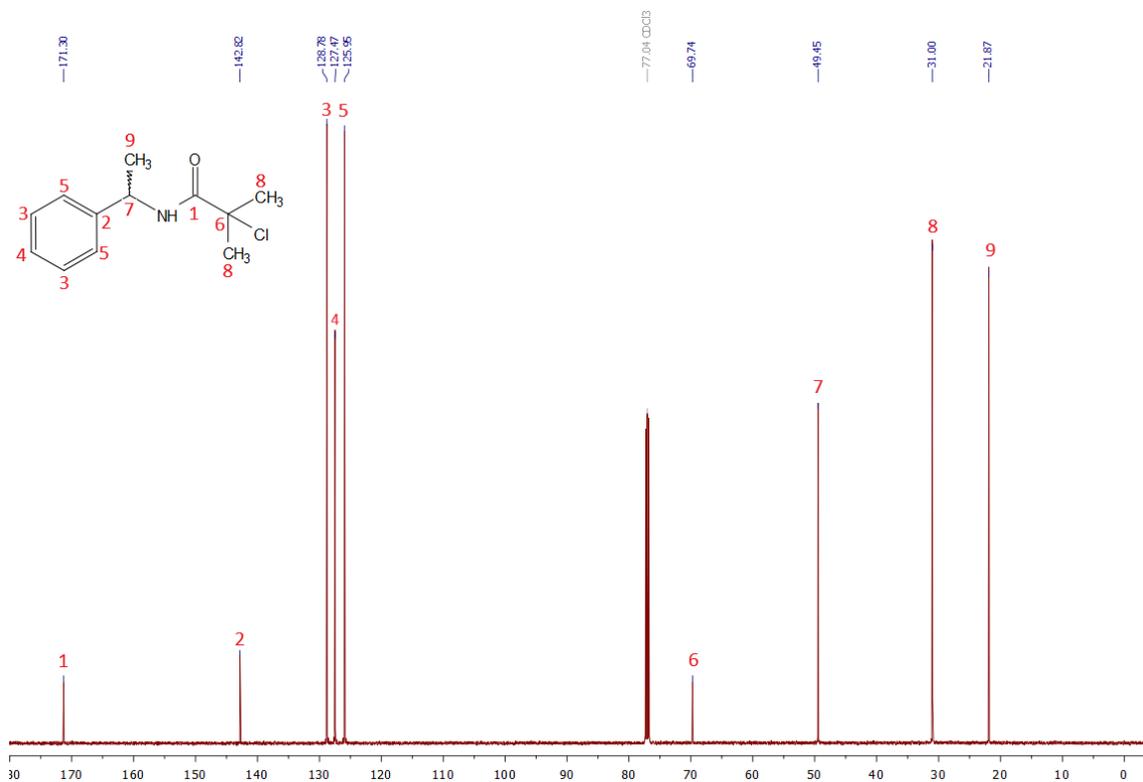


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (*m*, 2H, H_1), 7.08 (*m*, 2H, H_2), 4.77 (*s*, 2H, H_3), 1.76 (*s*, 6H, H_4).

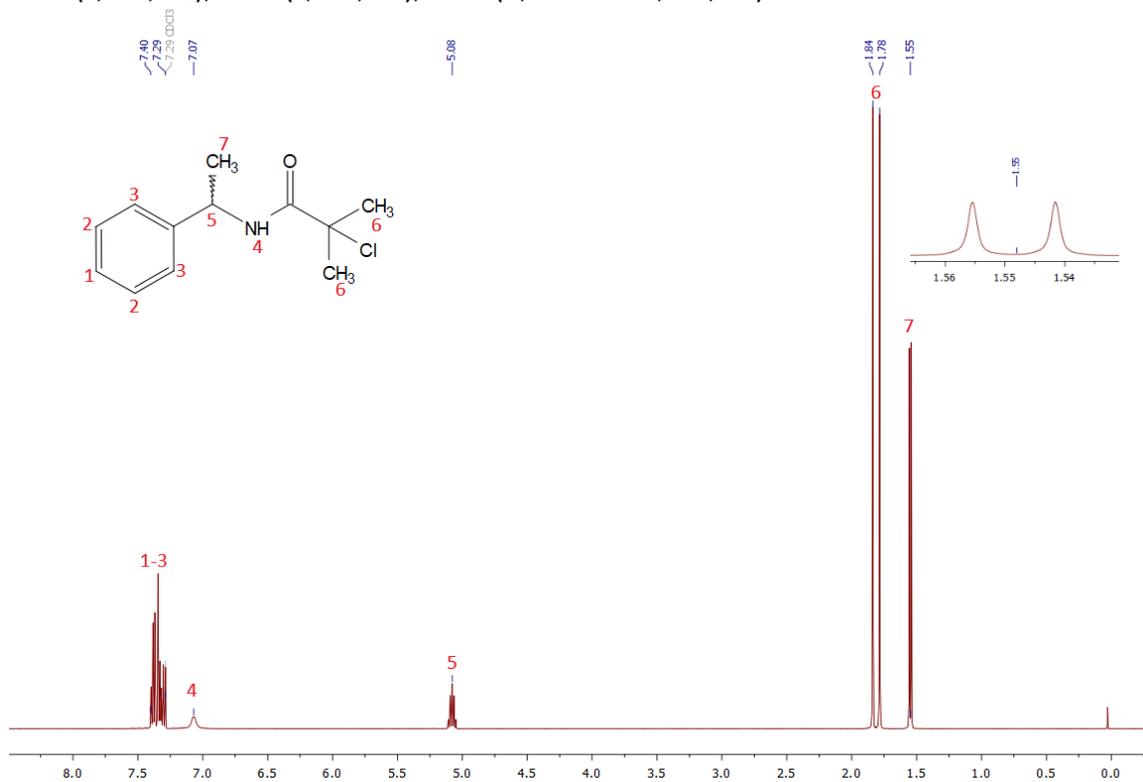


N-((±)-1-metilbencil)-2-cloroisobutiramida (3e)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 171.30 (C_1), 142.82 (C_2), 128.78 (C_3), 127.47 (C_4), 125.95 (C_5), 69.74 (C_6), 49.45 (C_7), 31.00 (C_8), 21.87 (C_9).

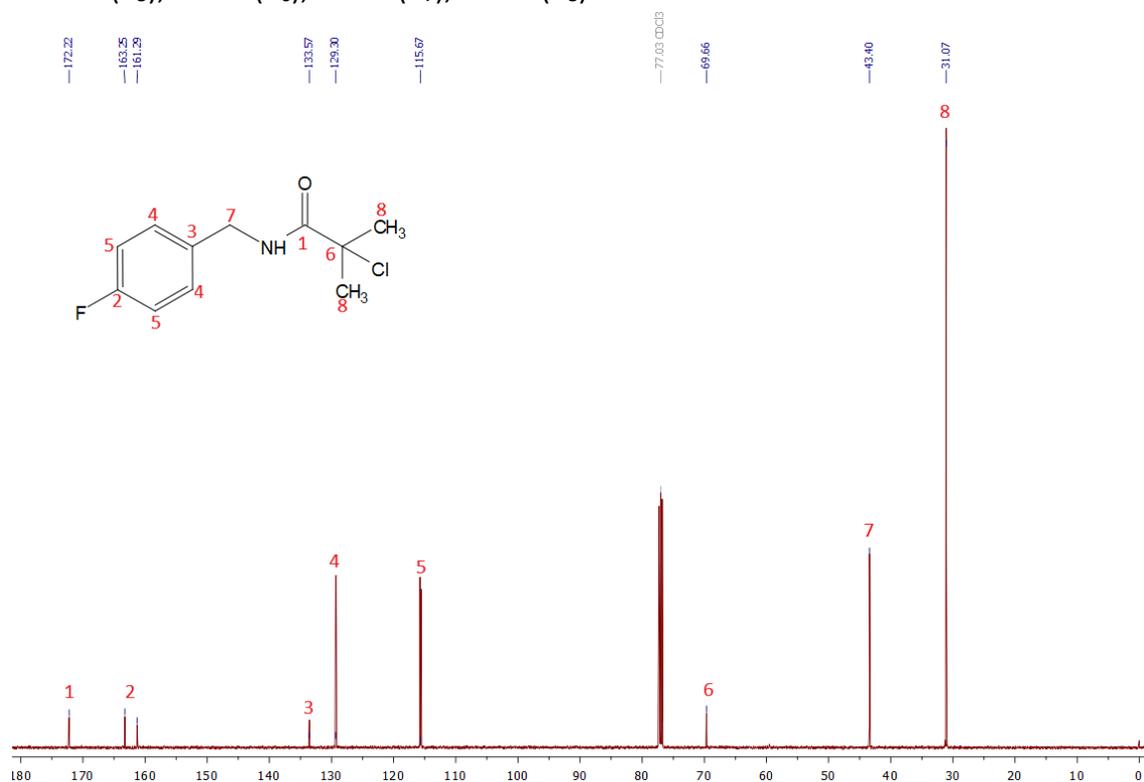


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.40-7.29 (m, 5H, H_{1-3}), 7.07 (brs, 1H, H_4), 5.08 (m, 1H, H_5), 1.84 (s, 3H, H_6), 1.78 (s, 3H, H_6), 1.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, H_7).

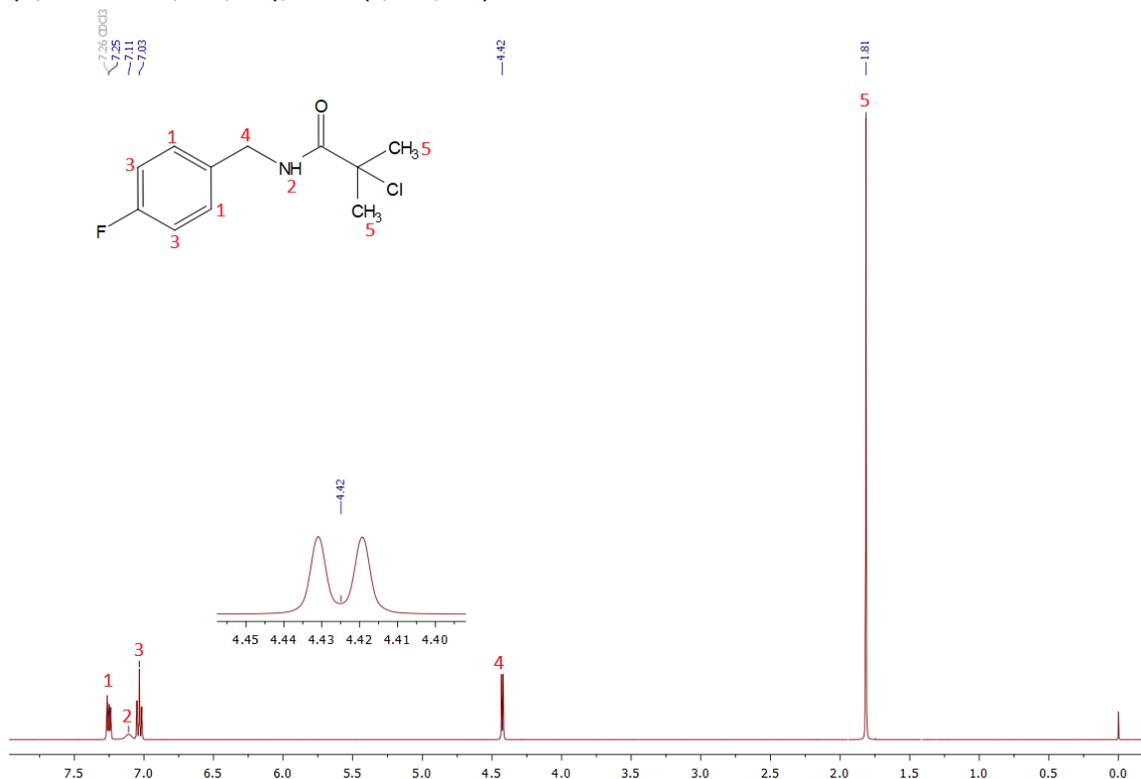


N-(4-fluorobencil)-2-cloroisobutirida (3g)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 172.22 (C_1), 163.25 y 161.29 (C_2), 133.57 (C_3), 129.30 (C_4), 115.67 (C_5), 69.66 (C_6), 43.40 (C_7), 31.07 (C_8).

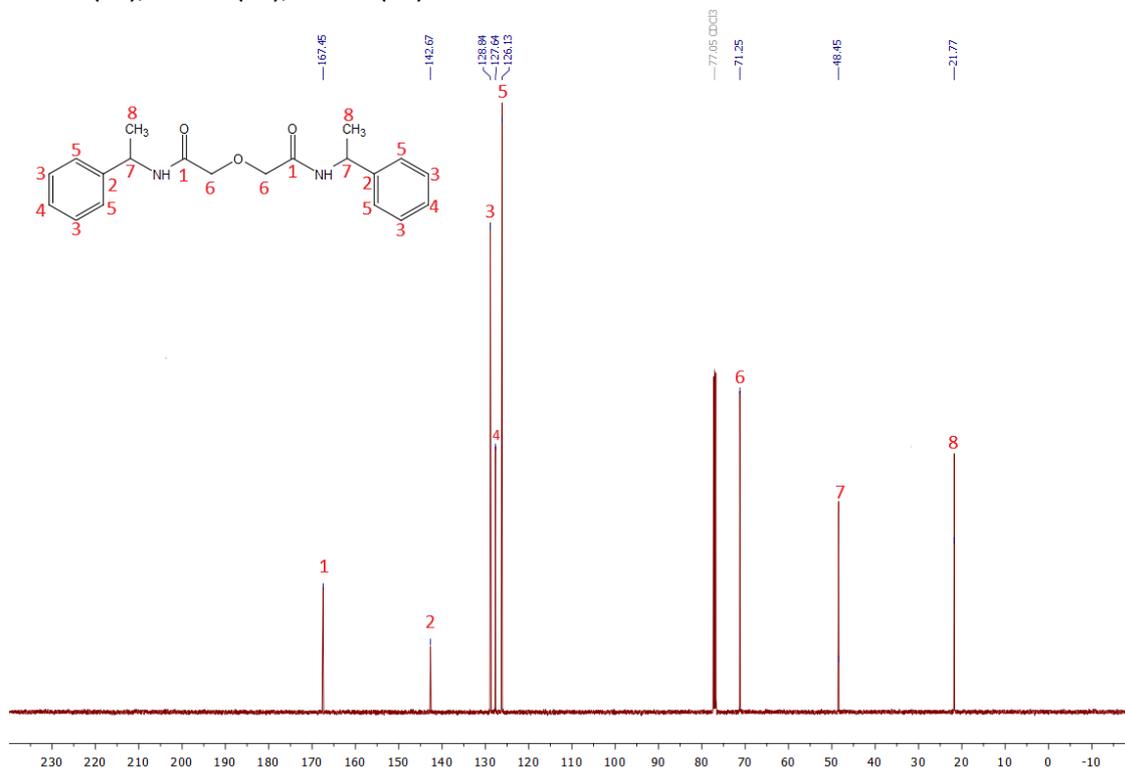


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (m, 2H, H_1), 7.11 (brs, 1H, H_2), 7.03 (m, 2H, H_3), 4.42 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H_4), 1.81 (s, 6H, H_5).

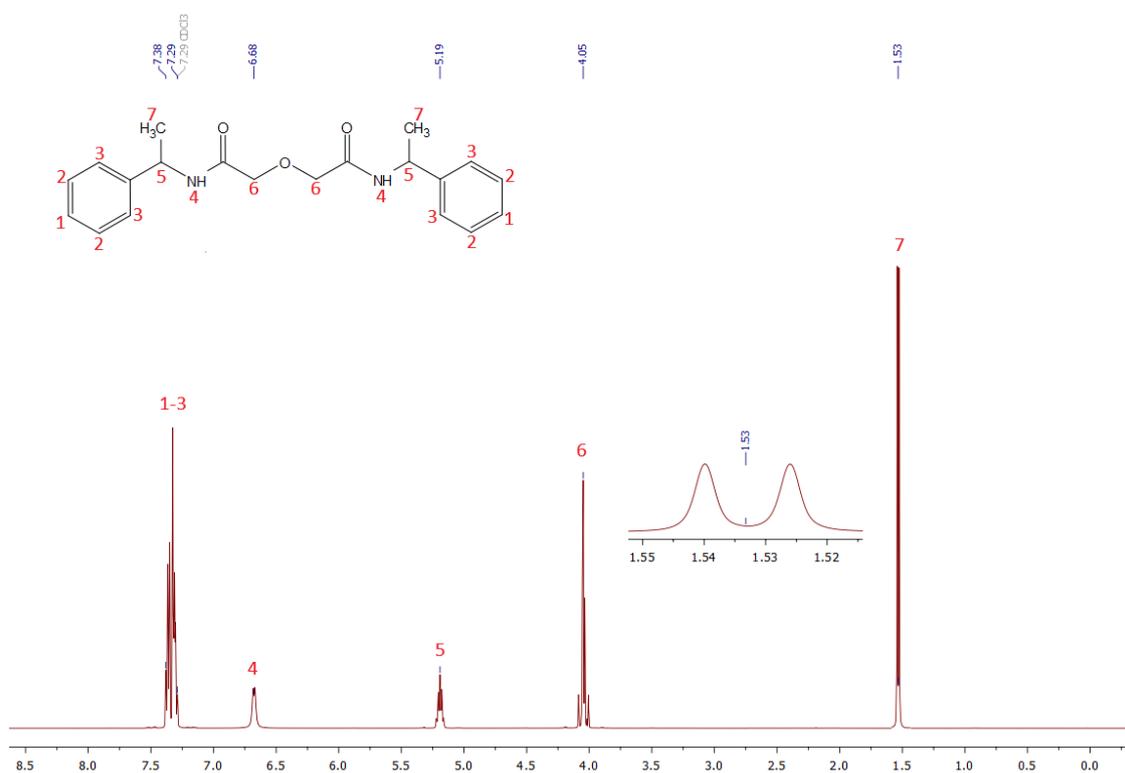


2,2'-oxbis[N-(±)-1-metilbencil]acetamida (4i)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 167.45 (C_1), 142.67 (C_2), 128.84 (C_3), 127.64 (C_4), 126.13 (C_5), 71.25 (C_6), 48.45 (C_7), 21.77 (C_8).

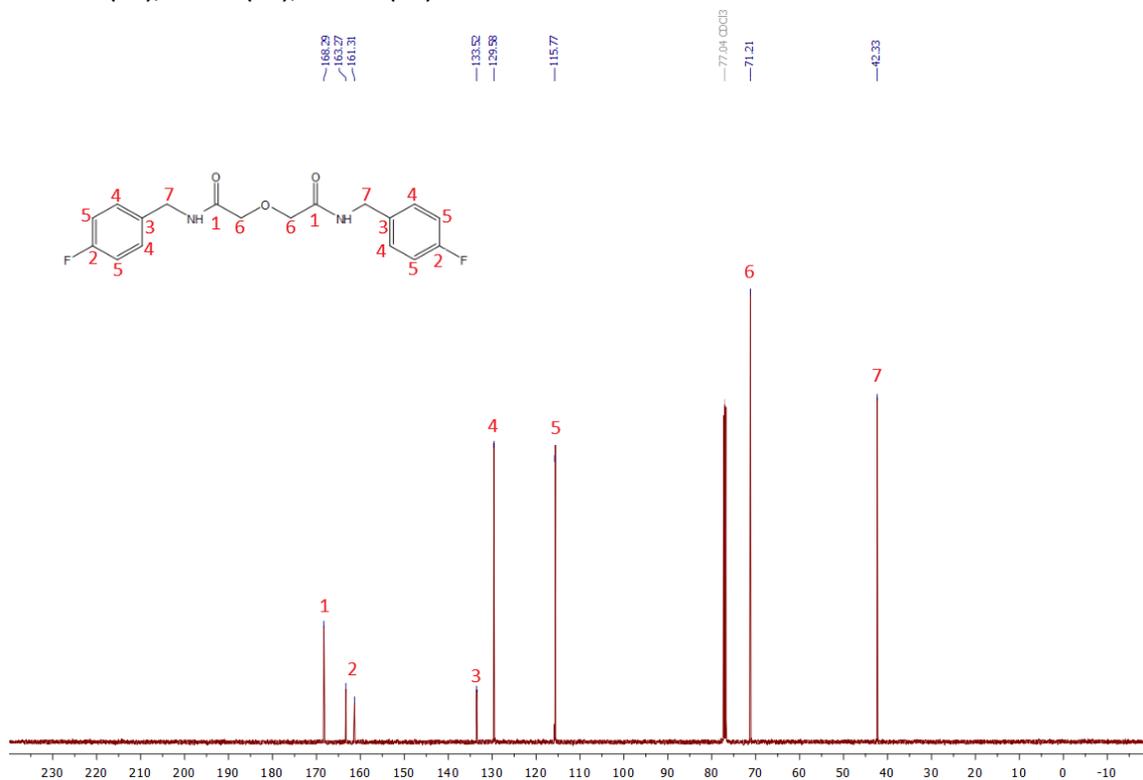


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 -7.30 (m, 10 H, H_{1-3}), 6.68 (brs, 2H, H_4), 5.19 (m, 2H, H_5), 4.05 (s, 4H, H_6), 1.53 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, H_7).

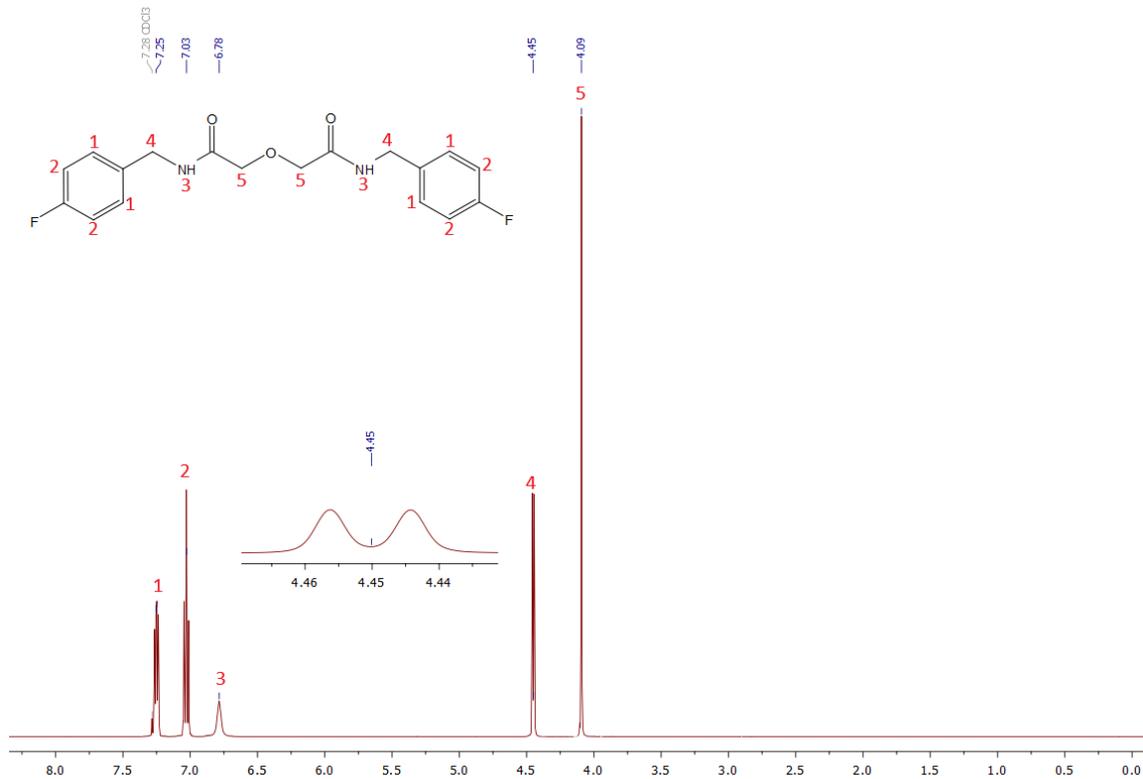


2,2'-oxabis[N-(4-fluorobencil)acetamida](4j)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.29(C_1), 163.27(C_2) y 161.31(C_2), 133.52 (C_3), 129.58 (C_4), 115.77 (C_5), 71.21(C_6), 42.33 (C_7).



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (m, 4H, H_1), 7.03 (m, 4H, H_2), 6.78 (brs, 2H, H_3), 4.45 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H, H_4), 4.09 (s, 4H, H_5).



ANEXO 3

MODELADO DEL CANAL DE SODIO Nav1.2

Modelado del canal de sodio Nav 1.2 humano en conformación cerrada

Al momento de comenzar con esta investigación no se disponía de la estructura tridimensional experimental de canales de sodio humanos, por lo que se procedió a modelar la estructura de la isoforma Nav1.2. Esta tarea fue llevada a cabo por el Dr. Pablo Palestro (codirector de tesis) en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB-FCE-UNLP). A continuación, se resumen los pasos generales para la construcción del modelo, su validación y los protocolos de docking empleados.

Como se detalló en el capítulo 1, el mayor componente estructural de los canales de sodio de mamíferos es una proteína de aproximadamente 260 kDa de peso molecular, llamada subunidad α . La secuencia de aminoácidos de esta subunidad se encuentra depositada en la base de datos UNIPROT (código Q99250).¹ Con la intención de identificar posibles macromoléculas molde para la predicción estructural, la misma se utilizó como patrón de búsqueda de secuencias cuya estructura 3D se encuentra disponible en la base de datos Protein Data Bank (PDB) mediante el servidor NCBI-BLAST.²

El modelo estructural de la subunidad α del canal de sodio humano Nav1.2 se construyó en dos etapas. Primero, cada uno de los cuatro dominios se modeló por separado utilizando el servidor GPCR-I-TASSER,³ empleando un método de comparación de plegamientos (threading). Luego de la generación de cada dominio, el poro del canal fue ensamblado mediante la superposición con la estructura completa del canal de sodio bacteriano (NavAb, código PDB: 3RVY). Finalmente, el modelo estructural completo, compuesto por los cuatro dominios, fue refinado por métodos de minimización geométrica utilizando el programa AMBER 11.⁴

La estructura final obtenida se muestra en la Imagen A2.1.

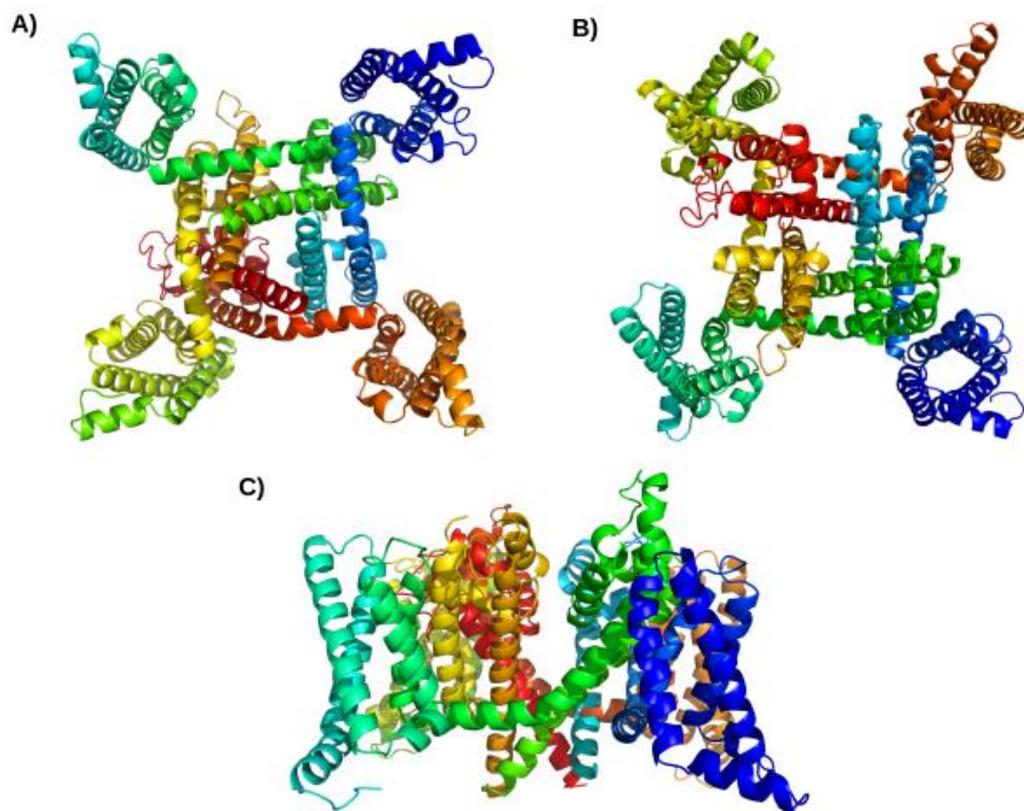


Imagen A2.1: Estructura tridimensional del canal de sodio humano Nav1.2, en su conformación cerrada. A) Vista desde el interior celular. B) Vista desde el espacio extracelular. C) Vista lateral. En tonos azules se muestra el dominio I, en verde el dominio II, en amarillo el dominio III y en rojo el IV.

La calidad del modelo obtenido fue analizada mediante los gráficos de Ramachandran (ver Anexo 1), utilizando el servidor Protein Structure Validation Software (PSVS).⁵ Un 90,6% de los residuos del modelo se encuentran en regiones favorables y un 97,6% en regiones permitidas.

Otro aspecto para considerar en la validación es la presencia en el modelo del “anillo DEKA”. En los canales de sodio eucariotas, existen residuos altamente conservados de Asp (D), Glu (E), Lys (K) y Ala (A), en los dominios I a IV, respectivamente. Estos forman un anillo conocido como anillo DEKA, el cual sería uno de los responsables de la selectividad iónica del canal. Como puede verse en la Imagen A2.2, el modelo reproduce la presencia del anillo DEKA, lo cual aumenta la confianza en la estructura tridimensional obtenida.

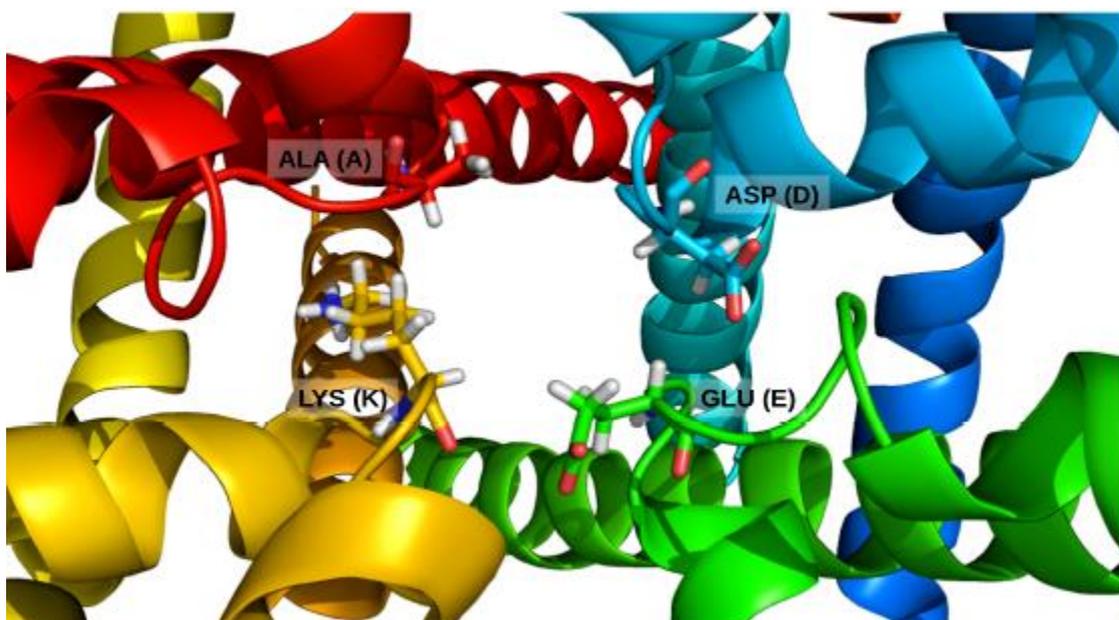


Imagen A2.2: Anillo DEKA presente en el selector de iones del modelo del canal cerrado obtenido con I-TASSER. En tonos azules se muestra el dominio I, en verde el dominio II, en amarillo el dominio III y en rojo el IV.

Modelado del canal de sodio Nav 1.2 humano en conformación abierta

El modelo previamente descrito adopta una conformación cerrada. Dado que los anticonvulsivos conocidos muestran una mayor afinidad por el canal en estado abierto/inactivado,⁶ se consideró importante disponer de dicha conformación para el estudio de las interacciones con los compuestos sintetizados.

Para la construcción de un modelo de conformación abierta, inicialmente se analizó la estructura del canal iónico no específico NaK de *Bacillus cereus*, del cual se encuentra disponible información estructural tanto de su conformación cerrada (código PDB: 2AHY) como abierta (código PDB: 3E86). Mediante un análisis por superposición de estas dos conformaciones, se observó que las mayores diferencias se dan en la zona interna del poro, debajo del filtro de selectividad DEKA.

Por otra parte, las regiones en torno a este último se mantienen en las mismas posiciones. Lo mismo sucede si se compara la estructura experimental del molde de NavAb empleado previamente (código PDB: 3RVY) y la conformación abierta de NaK.

Teniendo en cuenta estas diferencias, se consideró que para la construcción de un modelo abierto debían reemplazarse las coordenadas del segmento S6 (que conforma el poro del canal) de la estructura NavAb (estado cerrado) por el correspondiente a NaK en estado abierto. Por lo tanto, la estructura resultante de la combinación entre 3RVY y 3E86 se utilizó como molde para la generación de los dominios del canal de sodio humano mediante modelado comparativo (empleando el software MODELLER 9.11)⁷ Para la obtención del modelo, la secuencia de la estructura molde se alineó a la correspondiente de cada uno de los dominios utilizando la matriz de puntuación BLOSUM62. A partir de este alineamiento se generaron 30 estructuras de cada uno, eligiéndose aquella con el menor valor DOPE (Discrete Optimized Protein Energy, un potencial estadístico desarrollado para evaluar modelos proteicos).⁷ Una vez seleccionada la estructura a utilizar de cada dominio, se ensambló y minimizó el poro del canal de la misma forma que para el canal cerrado. El modelo final se muestra en la Imagen A2.3.

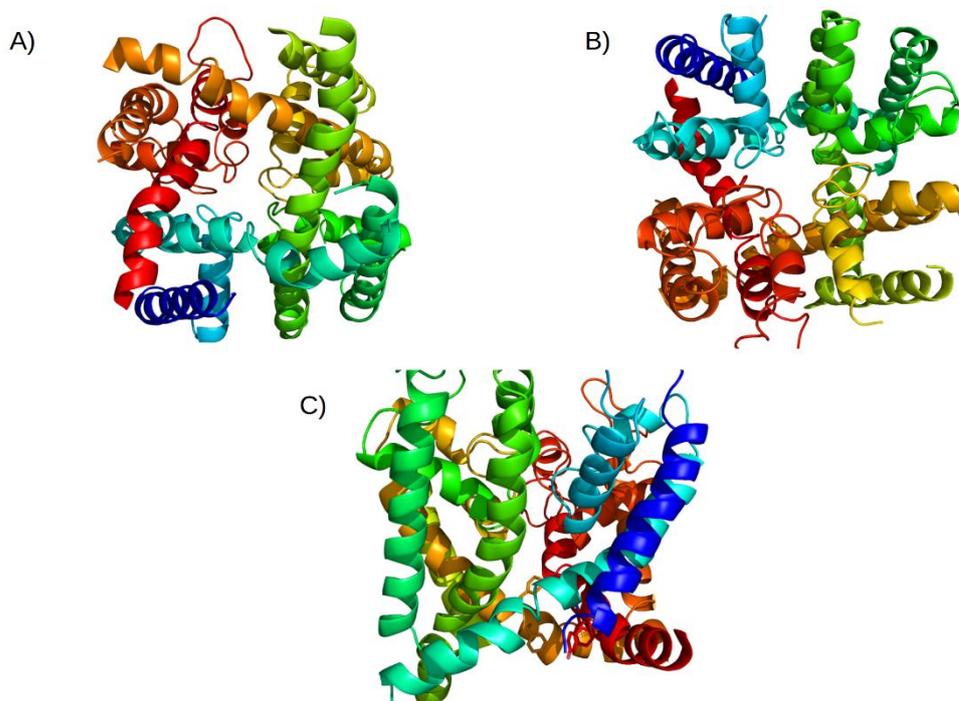


Imagen A2.3: Estructura tridimensional del canal de sodio humano Nav1.2, en su conformación abierta. A) *Vista desde el interior celular.* B) *Vista desde el espacio extracelular.* C) *Vista lateral.*

Al igual que en el modelo cerrado se comprobó la presencia del anillo DEKA (Imagen A2.4).

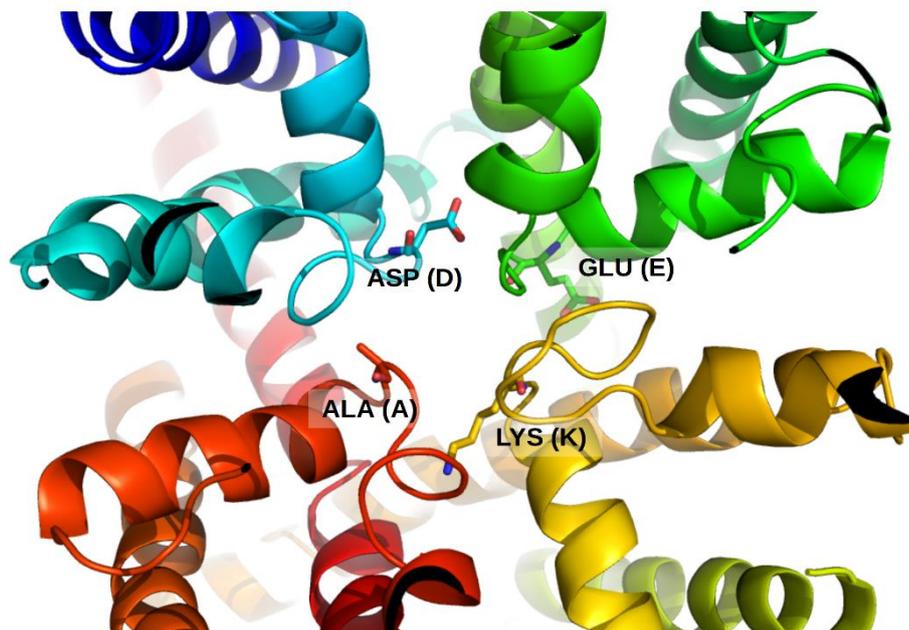


Imagen A2.4: Anillo DEKA presente en el selector de iones del modelo del canal abierto. En azul se muestra el dominio I, en verde el dominio II, en amarillo el dominio III y en rojo el IV.

El gráfico de Ramachandran correspondiente al modelo de la estructura de Nav1.2 abierta muestra un 91.9% de los residuos aminoacídicos dentro de zonas permitidas, mientras que un 76.8% se encuentra en zonas favorables.

Búsqueda bibliográfica, conjunto de evaluación y docking molecular

Una vez obtenida la estructura del blanco, resta seleccionar un protocolo validado de docking para posteriormente utilizarlo en la simulación con los compuestos sintetizados. Para la construcción del conjunto de validación se generaron dos subconjuntos de compuestos: activos e inactivos. Como activos se tomaron 180 estructuras con alta afinidad de unión al canal Nav1.2 proveniente de la base de datos ChEMBL (valores de IC50 menores o iguales a 100 μ M). Además, se agregaron compuestos anticonvulsivos con acción comprobada frente al canal de sodio (Fenitoína, Carbamazepina y Lamotrigina).

El conjunto de inactivos se construyó con compuestos con baja afinidad de unión al canal como: Deprenilo, Gabapentina, Mecamilamina, Moclobemida, Nialamida, Procainamida, Tiaprida y Topiramato. Con el objetivo de ampliar el número de compuestos en este subconjunto se realizó una búsqueda de estructuras similares a las antes mencionadas, asumiendo que estas también serían inactivas. De acuerdo con el número de estructuras similares encontradas para cada compuesto, se fijó el límite de similaridad requerido.

De esta forma el conjunto de evaluación quedó formado por 506 compuestos, 183 activos y 323 inactivos.

Se procedió a desarrollar un modelo de docking molecular capaz de predecir la capacidad de interacción de los compuestos del conjunto de evaluación. Los modelos se generaron utilizando el software AutoDock Vina⁸ definiendo el sitio activo en la zona interna del poro donde interaccionan los anestésicos locales y los antiepilépticos. Se definió el tamaño y ubicación de la grilla y se determinó cuáles serían los residuos flexibles en cada conformación (Imagen A2.5).

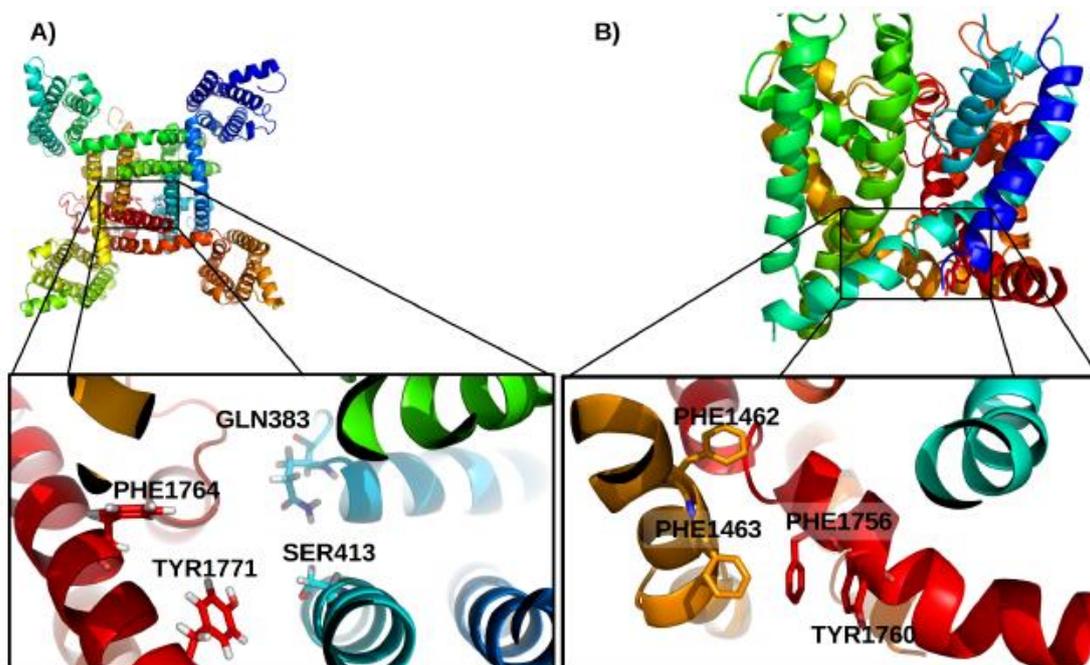


Imagen A2.5: Sitio de unión propuesto y residuos flexibles para el docking molecular. A) Modelo cerrado. B) Modelo abierto.

La comparación de las dos simulaciones (con canal cerrado y abierto) se realizó mediante la evaluación de las curvas ROC generadas (ver Anexo 1). Se utilizó el valor de

la función de evaluación de la conformación más estable de cada molécula del conjunto de evaluación como parámetro. En el caso del canal abierto, el área bajo la curva fue de 0.9125; mientras que para el canal cerrado este valor fue de 0.8779. Estos datos indican que, si bien ambos modelos dan resultados bastante similares, el que mejor se ajusta a la clasificación experimental (área bajo la curva de 1) es el que utiliza la estructura del canal abierto (Imagen A2.6). Estos resultados se encuentran en línea con la conocida preferencia de los anticonvulsivos a una conformación abierta del canal. Por estas razones se decidió utilizar esta última estructura junto con las condiciones de docking antes mencionadas para la búsqueda de nuevos antiepilépticos en bases de datos;⁹ y para predecir la interacción con el blanco de los compuestos sintetizados en la tesis.

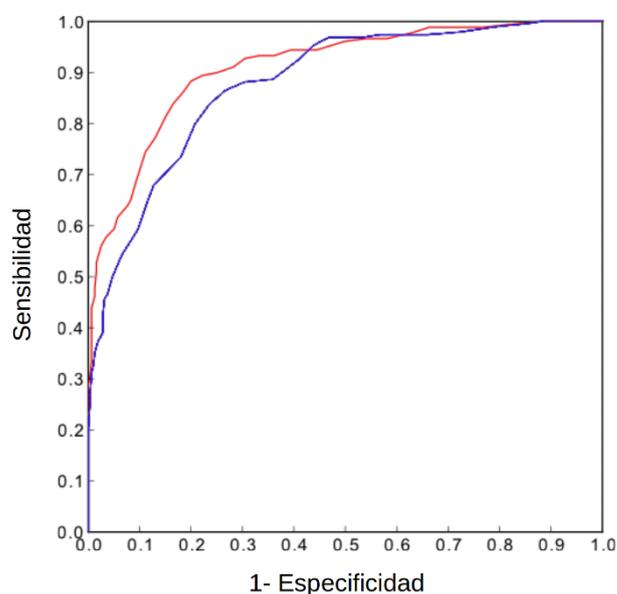


Imagen A2.6: Curvas ROC para los modelos de canal de sodio Nav 1.2. En rojo la correspondiente al estado abierto (Área bajo la curva= 0.9125) y en azul al estado cerrado (Área bajo la curva=0.8779).

Referencias

1. The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Research*, **47**, D506–D515 (2019).
2. Madden, T.L., et al. Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* **266**:131-141(1996)
3. J Zhang, et al. GPCR-I-TASSER: A hybrid approach to G protein-coupled receptor structure modeling and the application to the human genome, *Structure*, **23**: 1538-1549 (2015)
4. Case, D.; Darden, et al. P.A. AMBER 11 Users' Manual. 1–304 (2016).
5. Bhattacharya, A., et al. Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins*, **66**: 778-795 (2007).
6. Rodríguez, C., et al. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos. *Informed.* **12**, 321-326 (2010).
7. Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In *Current Protocols in Bioinformatics*; John Wiley & Sons; p 5.6.1–5.6.37 (2014)
8. Trott O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.*, **31**, 455–461 (2010).
9. Palestro, P. H. et al. Searching for New Leads To Treat Epilepsy: Target-Based Virtual Screening for the Discovery of Anticonvulsant Agents *J. Chem. Inf. Model.* **58**, 1331–1342 (2018).

ANEXO 4

DETALLES METODOLÓGICOS DE PATCH CLAMP

Las células se cultivaron en un medio esencial mínimo (DMEM), que contiene 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Internegocios, Argentina) y 0,5% de sulfato de geneticina G418 (Aldrich) en atmósfera de O₂ al 95% / CO₂ al 5% a 37 °C y con una humedad del 95%.

Uno o dos días antes de los registros electrofisiológicos, las células se colocaron en placas sobre cubreobjetos de vidrio. La observación se realizó empleando un microscopio invertido estabilizado mecánicamente (Telaval 3, Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipado con un lente objetivo 40X. Las soluciones ensayadas fueron perfundidas con una pipeta multivías colocada en la proximidad de la célula investigada. Después de cada experimento en una sola célula, la cámara fue reemplazada por otra que contenía una nueva muestra. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (~ 22 °C). La configuración de whole cell (explicada en el Capítulo 4) se utilizó para registrar las corrientes macroscópicas. Las grabaciones experimentales se almacenaron en el disco duro de una computadora para su posterior análisis.

Las soluciones de registro empleadas fueron:

- Solución extracelular del baño (SE) en mM: NaCl 50, N-metil-D-glucamina 90, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10 y glucosa 11; El pH se ajustó a 7.4 con HCl.
- Solución intracelular de la pipeta (SI) en mM: CsF 100, CsCl 40, EGTA 10, HEPES 10, NaCl 5, MgCl₂ 2, Na₂.ATP 4; El pH se ajustó a 7.3 con CsOH.

Como se mencionó anteriormente, la configuración de Whole Cell permite registrar las corrientes que atraviesan la membrana a través de todos los canales presentes, en respuesta a un estímulo, en este caso, pulso de voltaje. Para la caracterización de la actividad de los compuestos sobre los canales de sodio, se propone evaluar los siguientes protocolos validados por Qiao y colaboradores¹ en el mismo sistema de expresión en ausencia y en presencia de los compuestos de interés.

1- Inactivación de la corriente al pico: una vez obtenida la configuración de Whole Cell se evalúa el efecto de los compuestos en un protocolo de voltaje de -80 mV a -10 mV, que se repite cada 10 seg y tiene una duración de 15ms. El tiempo de estabilización de la corriente variable (alrededor de 10 minutos). El mismo protocolo de voltaje se aplica en presencia y ausencia del compuesto de evaluación en la misma célula. Se espera que los compuestos que actúan en la isoforma evaluada disminuyan la corriente al pico.

2-Curvas de inactivación de estado estacionario (curva h): este registro consiste en un doble protocolo de voltaje. Desde un potencial de mantenimiento de -80mV, se aplica una serie de pulsos pre-condicionantes de 2500 ms desde -130mV hasta -40mV, cada uno seguido de un pulso test de 25 ms a -10mV (valor de voltaje donde la corriente de sodio tiene su máxima activación en estas células). Las curvas h control y en presencia de los compuestos estudiados se construyen graficando el valor del pico de corriente registrado en respuesta al pulso test (normalizado por el valor máximo de corriente) en función del voltaje del pulso pre-condicionante. Esta curva representa la fracción de canales disponibles a cada valor de potencial estudiado y puede ajustarse con una ecuación de Boltzman. En este caso el V_h representa el valor de potencial en el cual el 50% de los canales de sodio están disponibles para ser activados. La recuperación de la inactivación es tiempo y voltaje dependiente. La curva h refleja la dependencia del voltaje.

$$I/I_{\max} = 1 / 1 + \exp^{- (V_h - V/k)} \quad \text{Ec. (A3.1)}$$

En donde I/I_{\max} es la fracción disponible, V_h es el valor medio de voltaje en donde el 50% de los canales está disponible. V es el potencial de clampeo y k es la pendiente.

Los FAEs conocidos que tienen afinidad por el estado inactivado² y que estabilizan el mismo, generan un desplazamiento de esta curva hacia potenciales más negativos, disminuyendo la fracción de canales disponibles en el rango de potenciales de membrana habituales de una neurona en reposo. La reducción de la fracción de canales disponibles por este mecanismo de acción es mayor a potenciales más despolarizados (es voltaje-dependiente), lo que causa una mayor actividad farmacológica sobre aquellas neuronas predispuestas al comportamiento patológico.

Referencias

1. Qiao X; et al. Properties of human brain sodium channel α -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine. *J Pharmacol.*; **171** (4):1054-67 (2014).
2. Rodríguez, C., et al. Mecanismos de acción de fármacos antiepilépticos. *Informed.* **12**, 321-326 (2010).