

TAMIZADO VIRTUAL ORIENTADO A LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS MULTI-OBJETIVO

¹Couyoupetrou, Manuel; ²Goicoechea, Sofía; ³Chuguransky, Sara; ⁴Talevi, Alan; ⁵Pesce, Guido; ⁶Bruno-Blanch, Luis.

^{1,5} Programa Integral de Biodisponibilidad, Bioequivalencia e Intercambiabilidad de Medicamentos, Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^{2,3,4,6} Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos, La Plata, Argentina.

Palabras Clave: Epilepsia refractaria, GABA, glicoproteína-P, MDCKII-MDRI.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Alrededor del 30% de los pacientes epilépticos sufren de epilepsia refractaria, es decir que no logran alcanzar la ausencia de crisis a través de la administración de fármacos antiepilepticos. El estado de resistencia a los fármacos en la epilepsia refractaria puede ser una consecuencia de la hiperactividad de los transportadores del tipo ABC en la barrera hematoencefálica y/o en los sitios de los focos epilépticos, o surgir de modificaciones intrínsecas o adquiridas de los blancos moleculares modulados por los agentes antiepilepticos. Uno de estos blancos es el transportador GAT-1 (Fig. 1), encargado de la recaptación de GABA, la principal molécula inhibitoria de la neurotransmisión en el sistema nervioso central.^{1,2,3}

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar modelos computacionales basados en descriptores topológicos capaces de identificar nuevos fármacos antiepilepticos que

actúen a través de la potenciación de la vía GABAérgica. Aplicar los modelos desarrollados junto con otros ya reportados por el grupo de trabajo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB - UNLP) para identificar nuevos fármacos antiepilepticos multi-objetivo. Evaluar los candidatos seleccionados en distintos modelos animales de crisis epiléptica.

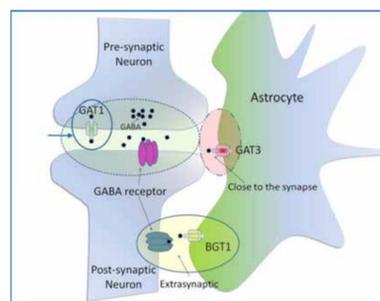


Fig. 1. Transportadores de GABA³

MATERIALES Y MÉTODOS

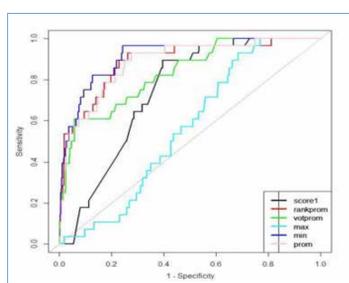
Partiendo de una base de datos de compuestos con y sin actividad inhibitoria contra el transportador de GABA GAT-1, hemos desarrollado un conjunto de algoritmos de aprendizaje automático supervisado para identificar inhibidores de GAT-1 en campañas de tamizado virtual. Se aplicaron estos modelos con otros capaces de identificar sustratos de glicoproteína-P (Pgp, transportador de eflujo

sobreexpresado en pacientes con epilepsia refractaria)⁴ y con modelos que identifican moléculas con actividad antiMES (Maximal Electroshock Seizure)^{5,6}.

Finalmente, la actividad anticonvulsiva de los compuestos seleccionados se evaluó en modelos animales de convulsiones (MES y scPTZ) y se examinó su permeabilidad en el modelo de monocapa de células MDCK II-MDRI.

RESULTADOS

Utilizando la técnica de *bagging* hemos desarrollado y validado modelos computacionales capaces de identificar compuestos inhibidores de GAT-1. Se evaluó el desempeño del mejor modelo (score1) y 5 esquemas de combinación de modelos mediante un análisis de las AUC de las curvas ROC sobre una base de datos con compuestos cuya actividad inhibitoria es conocida (Fig. 2). El análisis de las curvas ROC mostró que la técnica de modelado tuvo éxito en la búsqueda de una combinación de modelos con alta sensibilidad (Se: 0.75) y especificidad (Sp: 0.90)



	AUC	p-valor
score1	0,73995	1,0000
rankprom	0,88896	3,58E-14
votprom	0,83170	3,96E-04
max	0,56263	0,0001
min	0,91440	2,20E-16
prom	0,88417	3,26E-14

Fig. 2. Curvas ROC y las áreas bajo la curva (AUC) de las 5 técnicas de combinación de modelos y del mejor modelo individual. Un área de 0,5 corresponde a un modelo sin capacidad clasificatoria. Por el contrario, un área igual a 1 representa un modelo ideal. Se compara el p-valor del mejor modelo individual con el resto de las técnicas. Un p-valor<0,05 indica que 2 técnicas son diferentes.

La mejor combinación de modelos (*min*) se utilizó para el cribado de dos grandes bases de datos, DrugBank 3,⁷ y SweetLead⁸. Se evaluó la actividad antiepileptica de los compuestos seleccionados en modelos animales de convulsiones (MES y scPTZ) resultando el Donepezilo (DNPZ) como un posible fármaco anticonvulsivo (Tabla 1).

Compuesto	Indicación/Usos	Dosis (mg/kg)	MES Test ^a	scPTZ ^a	Rotorod ^b
Acetato de abiraterona	Anticonceptivo femenino	30	1/4 0/2	1/6 0/2	X X
		100	0/2 0/2	0/2 0/2	X X
Ciproheptadina	Antihistamínico	0.1	0/2 0/2	0/6 X	0/6
		0.5	X X	0/6 X	0/6
		2.5	0/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2
Donepezilo	Alzheimer	5	0/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2
		2.5	3/6 3/6	0/2 0/2	0/6 0/6
Lincomicina	Enfermedad de Parkinson	30	0/2 0/2	0/4 0/4	0/6 0/6
		100	0/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2
Loratadina	Reacciones alérgicas	30	1/2 0/2	1/2 0/2	0/2 0/2
		100	0/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2
Norgestimato	Cáncer de próstata	30	2/2 1/2	1/2 0/2	0/2 0/2
		100	2/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2
Sulpirida	Esquizofrenia	30	0/2 1/2	0/2 0/2	0/2 0/2
		100	3/6 0/2	0/2 0/2	0/4 0/2
Trihexifenidilo	Anticóncito	5	0/2 0/2	0/2 0/2	0/2 0/2

Tabla 1. Ensayos realizados para detectar actividad antiepileptica de los candidatos seleccionados. a Número de animales protegidos / número de animales ensayados. b Número de animales con trastornos motores / número de animales ensayados. X El compuesto no fue ensayado.

Se determinó el coeficiente de permeabilidad aparente (*Papp*) del DNPZ con y sin Inhibidor de la Pgp (amiodarona, AM). Luego se calculó la relación (Ratio, ER) entre los *Papp* en sentido basolateral-apical (BL-AP) y en sentido apical-basolateral (AP-BL). Se observa que no hay diferencias significativas entre el ER con y sin AM ($p>0,5$) lo que indica que el transporte de este compuesto no se ve afectado por la presencia de la P-gp en las condiciones experimentales utilizadas (Fig. 3).

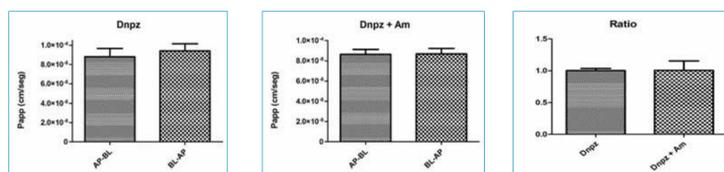


Fig. 3. Resultados de los estudios de permeabilidad.

CONCLUSIÓN

Se desarrollaron modelos computacionales capaces de diferenciar inhibidores de GAT-1 de compuestos sin actividad inhibitoria. De acuerdo al análisis de las curvas ROC, los modelos combinados constituyen una herramienta útil para ayudar al descubrimiento asistido por computadora de nuevos candidatos a fármacos dirigidos a GAT-1. Los resultados de la evaluación biológica y la permeabilidad en el modelo de monocapa de células MDCK II-MDRI parecen confirmar la validez del enfoque de detección virtual implementado para seleccionar nuevos fármacos antiepilepticos como posibles tratamientos contra la epilepsia refractaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Disc.* 2013;12:757-776.
- Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain.* 2006;129(1):18-35.
- Madsen KK, White HS, Schousboe A. Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. *Pharm & Ther.* 2010;125:394-401.
- Di Lanni ME, Talevi A, Castro EA, Bruno-Blanch L. Development of a highly specific ensemble of topological models for early identification of P-glycoprotein substrates. *J Chemometr.* 2011;25:313-322.
- Talevi A, Bellera C, Castro EA, Bruno-Blanch L. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *J of Computed Aided Molecular Design.* 2007;21:527-538.
- Talevi A, Cravero MS, Castro EA, Bruno-Blanch L. Discovery of anticonvulsant activity of abietic acid through application of linear discriminant analysis. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:1684-1690.
- Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Research.* 2001;39: D1035-1041.
- Novick PA, Ortiz OF, Poelman J, Abdulhay YA, Pande VS. SWEETLEAD: an in silico database of approved drugs, regulated chemicals, and herbal isolates for computer-aided drug discovery.