



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS EXACTAS E
INGENIERÍAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS



ESTUDIO DE RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD
DE ANÁLOGOS DE 4-AMINOPIRIDINA

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN FÍSICA

PRESENTA
FÍS. MARINA SOFIA RODRÍGUEZ RANGEL

DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE E. SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, CUCEI, UDEG.

CODIRECTOR DE TESIS
DR. PEDRO BRUGAROLAS
ESCUELA DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE HARVARD, EE.UU.

GUADALAJARA, JALISCO. MARZO, 2020.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍAS

SECRETARÍA ACADÉMICA

COORDINACIÓN DE PROGRAMAS DOCENTES

CUCEI/CPDOC/0744/2019

Fis. Marina Sofia Rodríguez Rangel

P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito comunicarle que fue aceptado por la Junta Académica correspondiente, el tema de tesis solicitado a esta Coordinación el día 28 de mayo de 2019, bajo el título:

“Estudio de relaciones Estructura-Actividad de análogos de 4-Aminopiridina”

mismo que usted desarrollará, con objeto de dar lugar a los trámites conducentes a la obtención de grado de:

Maestra en Ciencias en Física

Así mismo le comunico que para el desarrollo de la citada tesis le ha sido designado como **Director** al **Dr. Jorge Emmanuel Sánchez Rodríguez** y como **Co-Director** al **Dr. Pedro Brugarolas**.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

“Piensa y Trabaja”

Guadalajara, Jal., 28 de mayo de 2019

Dr. Enrique Michel Valdivia
Coordinador de Programas Docentes



Registro 074/2019

EMV/sijo

Guadalajara, Jalisco. 18 de febrero de 2020

Dr. Luis Guillermo Guerrero Ramírez
Coordinador de Programas Docentes
Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías
Universidad de Guadalajara

Presente

Por medio de la presente, le informamos que hemos revisado la tesis cuyo título es:

“Estudio de relaciones estructura-actividad de análogos de 4-aminopiridina”

elaborado por la Físico MARINA SOFIA RODRÍGUEZ RANGEL para optar por el grado de Maestra en Ciencias en Física. Nos es grato comunicarle que el trabajo cumple con los requerimientos por los que autorizamos su impresión y su posterior defensa.

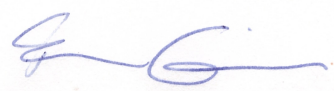
Sin más por el momento agradecemos su atención a la presente y aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente



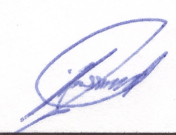
Dr. Jorge Emmanuel Sánchez Rodríguez

Director de tesis



Dr. Thomas Gorin

Lector revisor



Dr. Israel Ceja Andrade

Lector revisor



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍAS

SECRETARÍA ACADÉMICA

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FÍSICA

CUCEI/SAC/CDMCFIS/031/2020

DR. GUILLERMO GUERRERO RAMIREZ

COORDINADOR DE PROGRAMAS DOCENTES DEL CUCEI

P R E S E N T E.-

Por este medio, la Junta Académica del Programa de Maestría, nos permitimos hacer de su conocimiento, que una vez realizada la revisión final y habiendo efectuado las observaciones pertinentes al trabajo de tesis denominado:

“Estudio de relaciones Estructura-Actividad de análogos de 4-Aminopiridina”.

Elaborado por la Lic. en Fis. Marina Sofía Rodríguez Rangel para obtener el grado de **Maestra en Ciencias en Física**, la consideramos apta para su **impresión y presentación**.

Sin más por el momento, agradecemos de antemano su colaboración.

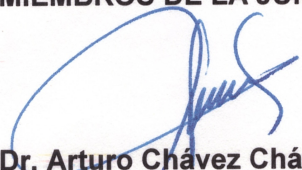
A T E N T A M E N T E

“Piensa y Trabaja”

“Año de la transición energética en la Universidad de Guadalajara”

Guadalajara, Jalisco 24 de Febrero del 2020

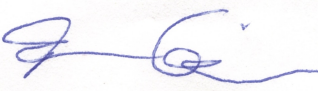
MIEMBROS DE LA JUNTA ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CS. EN FISICA


Dr. Arturo Chávez Chávez
Presidente


Dr. Fermín Aceves de la Cruz
Secretario Técnico


Dr. Gerardo Ramos Larios


Dr. Gilberto Gómez Rosas


Dr. Thomas Gorin

Dr. Bernardo Mendoza Santoyo

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	6
2.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS CANALES DE K^+ DEPENDIENTES DEL VOLTAJE.	6
2.1.1. MODELO FUNCIONAL DE LOS CANALES TIPO K_v	7
2.1.2. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE K^+ DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN LA GENERACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN.	10
2.2. 4-AMINOPIRIDINA: UN BLOQUEADOR ESPECÍFICO DE CANALES K_v . .	12
2.2.1. MECANISMO DE BLOQUEO DE LA 4-AMINOPIRIDINA.	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	15
3.1. HIPÓTESIS.	17
3.2. OBJETIVOS.	17
3.2.1. OBJETIVO GENERAL.	17
3.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1. AMPLIFICACIÓN DE ADN Y SÍNTESIS IN VITRO DE ARN DEL CANAL <i>SHAKER</i>	19
4.2. EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE LA RANA <i>XENOPUS LAEVIS</i> Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL CANAL <i>SHAKER</i> K_v	19
4.3. REGISTRO DE CORRIENTES DE K^+ UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELECTROFISIOLOGÍA FIJACIÓN DE VOLTAJE EN OVOCITO CORTADO.	21
4.4. SOLUCIONES DE REGISTRO.	23
4.5. REGISTRO DE CORRIENTES DE K^+ GENERADAS POR EL CANAL <i>SHAKER</i>	24
4.6. ANÁLISIS DE DATOS.	25
4.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN NECESARIA PARA INHIBIR EL 50% DE CORRIENTE DE K^+ GENERADA POR EL CANAL <i>SHAKER</i> (IC_{50}).	25
4.6.2. ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA CON EL VOLTAJE DE IC_{50}	30
5. RESULTADOS	34

5.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA 4AP Y ANÁLOGOS.....	34
5.1.1.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BLOQUEO DE LA 4AP SOBRE EL CANAL <i>SHAKER</i>	34
5.1.2.	CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BLOQUEO DE ANÁLOGOS DE 4AP SOBRE EL CANAL <i>SHAKER</i>	37
5.2.	ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA CON EL VOLTAJE DE IC_{50}	39
5.3.	ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA CON EL pH DE IC_{50}	42
6.	DISCUSIÓN.....	49
7.	CONCLUSIÓN	51
	REFERENCIAS	52
	GLOSARIO	56
	ANEXOS	58

RESUMEN

La 4-aminopiridina (4AP) es un bloqueador específico de canales de potasio (K^+) dependientes del voltaje de membrana (V) clínicamente aprobado para el tratamiento sintomático en pacientes con esclerosis múltiple (EM). Recientemente, se ha demostrado que el compuesto [^{18}F] 3F4AP, una forma radiofluorada de 4AP, puede utilizarse como una sonda para visualizar regiones desmielinizadas en modelos de roedor de EM mediante la técnica de imagenología conocida como tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés). En este trabajo, se estudiaron relaciones estructura-actividad de nuevos derivados de 4AP que contienen grupos funcionales metil ($-CH_3$), metoxi ($-OCH_3$) y trifluorometil ($-CF_3$) como potenciales candidatos para ser sintetizados como radio-sondas para su uso en procedimientos de PET. Para este fin, se caracterizaron algunas propiedades fisicoquímicas (pK_a , $\log D$), farmacológicas (IC_{50}) y biofísicas (dependencia con V y pH) de ese tipo de compuestos. Su capacidad de bloqueo fue determinada sobre el canal iónico de K^+ dependiente de V (K_v) *Shaker* con inactivación removida (modelo funcional de la familia de canales tipo K_v1) el cual fue expresado exógenamente en ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*. Para este propósito, se registraron corrientes iónicas de K^+ generadas por el canal *Shaker* en respuesta de un estímulo de V utilizando la metodología de fijación de voltaje en ovocito cortado (COVC, por sus siglas en inglés). Los resultados muestran que el análogo de 4AP, 3-metil-4-aminopiridina (3Me4AP), es 7 veces más potente que la 4AP, mientras que los compuestos derivados de 4AP que contienen los grupos funcionales metoxi (3MeO4AP) y 3-trifluorometil (3CF₃4AP) fueron 3 y 4 veces menos potentes, respectivamente. El compuesto 2-trifluorometil-4-aminopiridina (2CF₃4AP) mostró, por otra parte, una baja capacidad de bloqueo siendo 40 veces menos eficiente que la potencia de bloqueo de la 4AP. La dependencia con V del bloqueo de los análogos de 4AP se analizó mediante un modelo de inhibición de dos estados, lo que permitió determinar la distancia eléctrica (δ) que cada análogo de 4AP debe cruzar a través del campo eléctrico que se genera en el poro del canal para colocarse en su sitio de unión y bloquearlo. Se determinó un valor de $\delta \sim 0.4$ para los análogos de 4AP, excepto para el compuesto 2CF₃4AP. Este resultado sugiere que este tipo de compuestos derivados de 4AP se unen en el mismo sitio en el poro del canal tal y como lo hace la 4AP. Con base en los resultados obtenidos en este estudio se

concluye que el análogo 3Me4AP es un candidato con potencial para su desarrollo como radiotrazador de PET para la visualización de regiones desmielinizadas del sistema nervioso central.

ABSTRACT

4-Aminopyridine (4AP) is a specific blocker of voltage-gated potassium channels (K_v family) that is clinically approved for the symptomatic treatment in patients with multiple sclerosis (MS). Recently, it has been shown that [^{18}F]3F4AP, a radiofluorinated form of 4AP, can be used as a positron emission tomography (PET) tracer to detect demyelinated lesions in rodent models of MS [1]. Here, we investigated the structure-activity relationships of novel 4AP derivatives containing methyl ($-\text{CH}_3$), methoxy ($-\text{OCH}_3$) and trifluoromethyl ($-\text{CF}_3$) groups that could be potential candidates for PET imaging. The physicochemical (pK_a , $\log D$), pharmacological (IC_{50}) and biophysical (dependence of the blocking with V and pH) properties were characterized for each compound. The ability to block for each derivative was determined using *Shaker* ion channel with inactivation removed, which is the functional model of the family K_v1 . *Shaker* channel was expressed in *Xenopus laevis* oocytes and voltage-clamped using cut-open voltage-clamp (COVC) methodology. Our findings show that 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP), a methylated analog of 4AP, is 7-fold more potent than 4AP, whereas the methoxy and 3-trifluoromethyl containing compounds are 3- and 4-fold less potent, respectively. The derivative 2-trifluoromethyl-4-aminopyridine (2CF₃4AP) has a low blocking capacity, being 40- fold less potent than 4AP. The voltage-dependence of blocking by 4AP and analogs was analyzed with a one-step model of inhibition which allowed to determine the electric distance (δ) that each 4AP analog has to cross through the electric field generated by the channel to bind to its site. Our analysis produced a $\delta \sim 0.4$, except for 2CF₃4AP, indicating that these analogs bind to the channel in the same location as 4AP. We conclude that 3Me4AP shows good potential for PET radiotracer development.

1. INTRODUCCIÓN

En neuronas sanas, los canales de potasio (K^+) dependientes de voltaje (K_v), K_v 1.1 y K_v 1.2 principalmente [1], se encuentran presentes con una mayor densidad en las regiones cercanas a los *nodos de Ranvier*, los cuales están cubiertos por una capa lipídica denominada mielina. La mielina actúa como un aislante eléctrico a través del axón, lo que permite que la transmisión de las señales eléctricas (potenciales de acción (APs)) ocurra sin atenuaciones y se propague adecuadamente, por ejemplo, a una velocidad (v_p) del orden de 150 m/s en axones aislados de calamar [2]. Cuando ocurre un desprendimiento de las vainas de mielina, los canales K_v quedan expuestos al entorno, redistribuyéndose a lo largo de las regiones desmielinizadas de los axones e incrementando su expresión [1]. Esta redistribución de canales K_v modifica la v_p de los APs, lo que origina diferentes patologías en el sistema nervioso central (SNC) [1,3,4], tal y como lo es la esclerosis múltiple (EM).

La 4-aminopiridina (4AP) es un bloqueador específico de canales de potasio tipo K_v utilizado clínicamente para mejorar la conducción de los APs en pacientes con EM y otras patologías provocadas por la *desmielinización*. En el 2018, Brugarolas y colaboradores [1,5] mostraron que el derivado fluorado de 4AP, 3-fluoro-4-aminopiridina (3F4AP), bloquea los canales K_v tan eficientemente como lo hace la 4AP y que una vez sintetizado con el isótopo ^{18}F puede ser utilizado como una sonda para la visualización de regiones desmielinizadas del SNC mediante la técnica de imagenología de tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés).

Investigaciones previas sobre relaciones estructura-actividad de derivados de 4AP han demostrado que pequeñas modificaciones en la posición número tres de esta molécula son permitidas y que su potencia de bloqueo sobre las corrientes de K^+ está altamente relacionada con su valor de pK_a [1,6]. La 4AP y sus compuestos derivados son moléculas alcalinas ($pK_a \sim 9.6$) que pueden existir en condiciones fisiológicas de pH (~ 7.3) tanto en una forma cargada-positiva (protonada) o neutra. El mecanismo de inhibición de la 4AP describe que su forma protonada es necesaria para bloquear al canal [7], mientras que la forma neutra se requiere para cruzar la *barrera hematoencefálica*, por lo que una molécula con un valor de pK_a cercano al pH fisiológico es ideal. Además, las propiedades

farmacocinéticas de estos compuestos son dependientes de la *lipofilicidad* y de su valor de pK_a . Por ejemplo, la 4AP tiene un $pK_a = 9.58$, lo que resulta en una alta eficiencia de bloqueo del canal, pero una lenta penetración en el SNC, lo que explica el por qué es necesario que la aplicación del compuesto 4AP para uso clínico sea de forma lenta y de manera prolongada. Por otra parte, el compuesto 3F4AP posee un $pK_a = 7.65$, lo que implica una rápida penetración en el SNC, dándole una gran ventaja para ser utilizado como sonda PET [1].

Dada la correlación entre el pK_a , la lipofilicidad y el tamaño de la molécula de 4AP y/o derivados con su actividad *in vivo*, en este trabajo se planteó la hipótesis de que derivados de 4AP, 3-metil-4-aminopiridina (3Me4AP), 3-methoxi-4-aminopiridina (3MeO4AP), 3-trifluorometil-4-aminopiridina (3CF₃4AP) y 2-trifluorometil-4-aminopiridina (2CF₃4AP) bloquean canales K_v tan eficientemente como la 4AP y penetran rápidamente en el SNC y por lo tanto, pueden ser utilizados en métodos de terapia e imagenología. Estas moléculas son particularmente interesantes para este fin ya que, debido a su estructura molecular, podrían ser marcadas con el isótopo de carbono ¹¹C, el cual tiene ciertas ventajas sobre los radioligandos marcados con ¹⁸F. Aunque el ¹¹C tiene un periodo de decaimiento menor al ¹⁸F (20 vs 110 min, respectivamente), las moléculas sintetizadas con ¹¹C tienden a ser más fáciles de radiomarcarse y sus cortos tiempos medios de vida permiten realizar múltiples escaneos en un paciente en un mismo día.

Debido al potencial que poseen ese tipo de derivados de 4AP para su uso como sondas PET para el diagnóstico y/o la visualización de regiones desmielinizadas del SNC ocasionadas por la EM, en este trabajo se estudiaron sus relaciones estructura-actividad. Para ello, se realizó una caracterización bioquímica, farmacológica y biofísica de los derivados de 4AP antes mencionados. Su potencia de bloqueo y su dependencia con el voltaje fue cuantificada en términos de dos modelos empíricos fundamentales que describen el mecanismo de bloqueo canónico de la 4AP [8,9].

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS CANALES DE K⁺ DEPENDIENTES DEL VOLTAJE.

Los canales de potasio son un grupo de proteínas de la membrana celular denominadas *canales iónicos* que permiten el paso selectivo de iones K⁺. Se pueden clasificar dependiendo el estímulo que los activa (o inactiva) o bien por su tipo de cinética [10]. Este tipo de canales contribuyen de forma significativa a una gran cantidad de funciones fisiológicas que se llevan a cabo en nuestro organismo, por ejemplo, la repolarización del potencial de acción, la generación del pulso cardiaco de forma rítmica y la activación neuronal, por mencionar algunas. En general, los canales de K⁺ se pueden identificar en cuatro grupos distintos: 1) canales de K⁺ activados por voltaje, 2) canales de K⁺ activados por calcio (Ca²⁺), 3) canales de K⁺ rectificadores de corriente entrante y, 4) canales de K⁺ de doble poro [10].

En particular, los canales tipo K_v, como su nombre lo indica, son canales cuya activación depende del voltaje de membrana celular (V) [10,11]. Estructuralmente, estos canales están constituidos por cuatro subunidades idénticas (monómeros) las cuales forman un homotetrámero. Cada subunidad contiene 6 segmentos transmembrana (S1-S6). Esos segmentos constituyen dos dominios del canal que son funcionalmente diferentes: 1) el dominio del sensor del voltaje, de S1 a S4 (VSD, por sus siglas en inglés) y, 2) el dominio del poro, S5 y S6. El segmento S4 del dominio VSD contiene un conjunto de cuatro argininas (R1-R4) cargadas positivamente que constituyen un sensor de voltaje que le permite al canal sintonizar las variaciones en V que ocurren en la membrana. Por otra parte, el dominio del poro contiene la estructura molecular necesaria (filtro de selectividad iónica y poro del canal) que permite regular el flujo de iones K⁺ a través del canal [12].

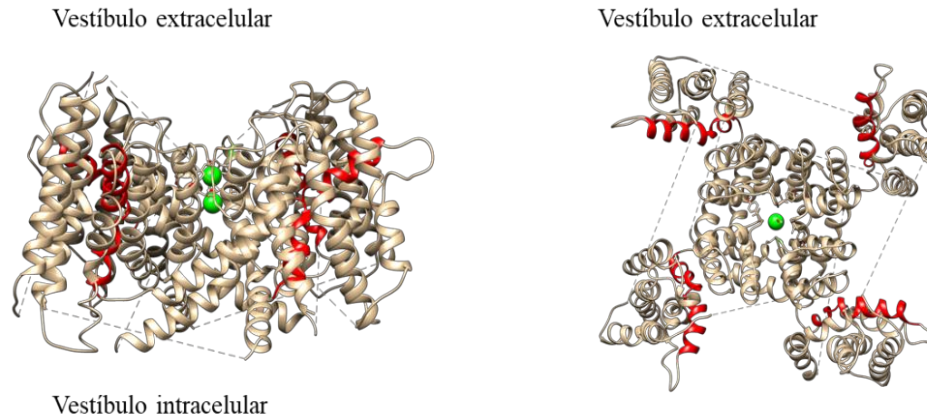


Figura 1. Estructura del canal *Shaker*. Vista lateral (lado izquierdo) y superior (lado derecho) de un modelo molecular construido por homología del canal *Shaker*. Tomado de [13]. En rojo se indica el segmento S4 o sensor de voltaje. Los iones K^+ que transitan a través de la región del poro del canal están representados como esferas de color verde.

2.1.1. MODELO FUNCIONAL DE LOS CANALES TIPO K_v .

El modelo funcional de los canales tipo K_v es el canal de K^+ dependiente de V conocido como *Shaker*. Este canal fue clonado de la larva de la mosca de la especie *Drosophila melanogaster* y es el primer canal K_v clonado en su tipo [14]. Fue llamado así después de observar que las moscas que carecían del gen que lo codifica, agitaban sus cuerpos de manera involuntaria (shake: ing. agitar, sacudir). El canal *Shaker* posee un 69-79% de similitud con los canales de potasio tipo K_v ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.4$ y $K_v1.6$) presentes en las neuronas de los humanos [1]. Dada su gran importancia como modelo funcional en el estudio biofísico de los canales tipo K_v , sus relaciones entre la estructura y su función han sido ampliamente estudiadas [3,10,11,12,15]. La clona que lo codifica puede ser expresado con gran eficiencia en diversos modelos celulares, incluyendo ovocitos *Xenopus laevis* [1,15,16,17,18]. Como se muestran en las figuras 2 y 3, el canal *Shaker* se activa, es decir, transita desde un estado cerrado del canal hacia una configuración abierta, cuando se le aplican estímulos de voltaje despolarizantes (transiciones en V hacia valores positivos).

El canal *Shaker* WT (figura 2) posee un mecanismo intrínseco de inactivación que lo induce a inactivarse desde una configuración abierta. Esta nueva conformación que el canal adopta implica que los iones no pueden fluir a través del poro, aún y cuando, éste está abierto. Este hecho explica porque la corriente iónica que genera el *Shaker* alcanza rápidamente una amplitud máxima y posteriormente decae hasta casi un valor nulo (figura 2A). Dicho mecanismo fue explicado estructural y funcionalmente por Hoshi y Zagotta, [19] quienes demostraron que eliminando la secuencia de aminoácidos desde la glicina en la posición número 6 (G6) hasta la glutamina en la 46 (Q46), cercanos a la región terminal amino de la proteína, el canal lograba no inhibirse. Este hecho se puede apreciar en la figura 2B. Se observa que la corriente generada por el canal *Shaker* con inactivación removida ($\Delta 6-46$) alcanza una amplitud de corriente máxima y logra sostenerse en función del tiempo (corriente en el estado estacionario).

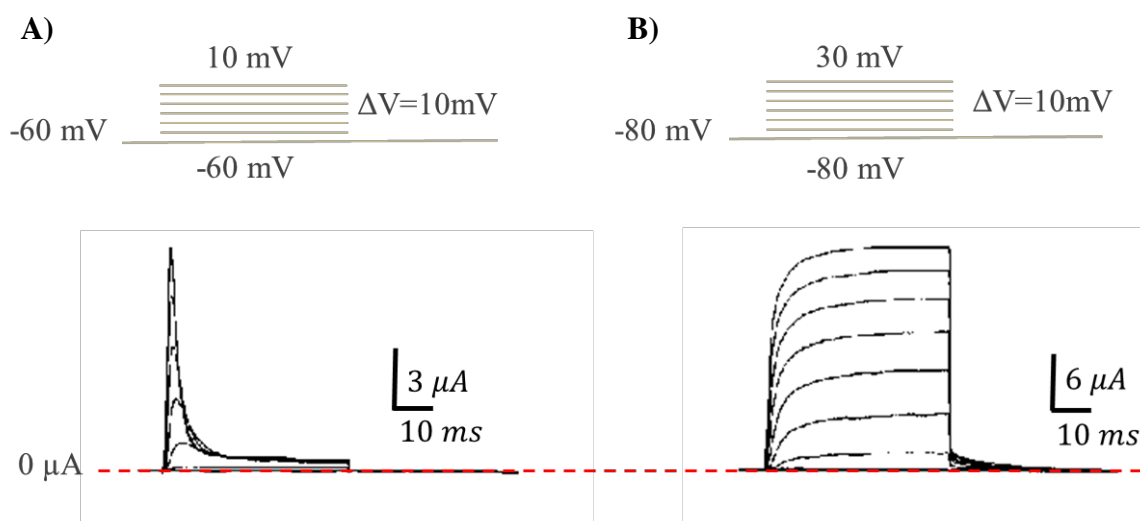


Figura 2. Inactivación en el canal *Shaker*. **A)** Registro de corriente de K^+ generada por el canal *Shaker* silvestre (WT, por sus siglas en inglés). **B)** Registro de corriente de K^+ generada por el canal *Shaker* con inactivación removida ($\Delta 6-46$). Las corrientes fueron generadas mediante el protocolo de estímulos de voltaje que se muestra en la parte superior de cada panel. La línea punteada en color rojo indica el nivel cero de corriente. Tomada y modificada de [16].

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de activación de los canales tipo K_v es regulado por el sensor de voltaje. Este sensor está constituido por aminoácidos cargados positivamente (argininas R1-R4 en S4), que se reorientan dentro de la proteína cuando V cambia. El movimiento de carga del sensor genera una corriente eléctrica que se denomina corriente de compuerta (*gating current*) [12] En 1993, Perozo, et. al. [18] encontraron que una mutación puntual en la región del poro, en la cual se sustituyó el triptófano en la posición número 434 por una fenilalanina, no inducía corriente de K^+ a medida que la proteína se despolarizaba, lo que permitió observar y caracterizar las corrientes de compuerta en presencia de iones K^+ . Este canal se denomina *Shaker W434F*.

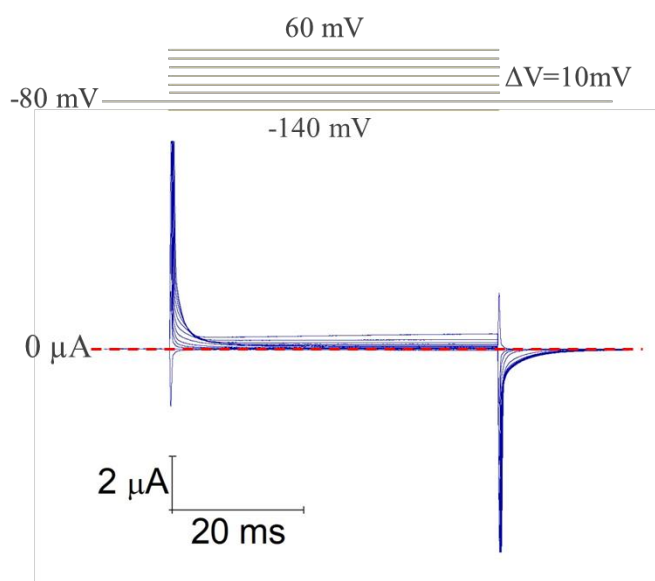


Figura 3. Registro de corrientes de compuerta en el canal *Shaker W434F*. Las corrientes fueron generadas al aplicar el protocolo de estímulos de voltaje que se muestra en la parte superior de la figura. Tomada de [20].

De esta manera, la dependencia con el voltaje de los canales tipo K_v , incluyendo al canal *Shaker*, se determina mediante dos eventos, uno asociado al movimiento de cargas del sensor y otro al movimiento de los iones a través del poro del canal. En la figura 4 se puede observar este hecho en términos de la curva del movimiento de carga asociada a la activación del sensor de voltaje como función de V ($Q(V)$) y la curva de probabilidad de apertura del canal ($P(V)$), la cual es directamente proporcional a la conductancia del canal ($G(V)$). Este hecho implica que la transición desde el estado cerrado del canal al estado abierto debe

ocurrir en una serie de eventos donde primeramente del sensor de voltaje cambia su conformación para que subsecuentemente el poro del canal transite a una configuración abierta a medida que V se despolariza [12].

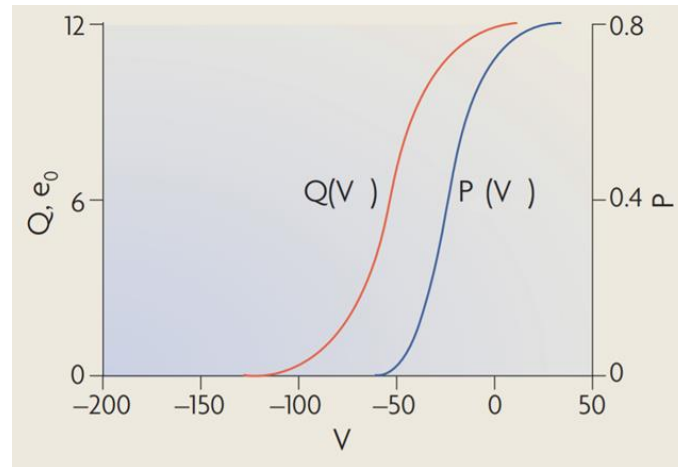


Figura 4. Dependencia de la activación con el voltaje del canal *Shaker*. Curva del movimiento de la carga del sensor de voltaje (Q) y curva de la probabilidad de apertura (P) o conductividad del canal *Shaker* como función del voltaje de la membrana. Un cambio de negativo a positivo en V reorienta las cargas del sensor de voltaje del canal (movimiento de la compuerta) y subsecuentemente, el canal transita a una configuración abierta, en la cual los iones K^+ pueden fluir a través de poro. Tomada y modificada de [12].

2.1.2. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE K^+ DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN LA GENERACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN.

La región hidrofóbica de la *membrana celular* actúa como un capacitor que separa la carga eléctrica acarreada por los iones que permean los canales incrustados en ella, generando un gradiente electroquímico y estableciendo un voltaje de membrana (V). En células excitables, como las neuronas, V tiene un valor aproximado de -100 mV (medido desde la cara intracelular de la membrana) [12]. Este valor en V se denomina potencial de reposo (V_r).

Durante la *sinapsis neuronal*, una neurona puede ser excitada por un reportero químico desencadenando una serie de eventos que posteriormente se traducen en una pequeña variación en V , la cual es capaz de activar los canales de sodio (Na^+) activados por voltaje (Na_v) que se expresan en su membrana, permitiendo así que iones Na^+ transiten en favor de su gradiente electroquímico, es decir, desde el lado exterior de la neurona hacia el

interior ($[Na^+]_e=140\text{ mM}$, $[Na^+]_i=5\text{ mM}$), hecho que provoca una despolarización en V . A medida que la membrana se despolariza, los canales de K_v comienzan a activarse y como consecuencia, iones K^+ fluyen hacia el exterior de la neurona ($[K^+]_e=5\text{ mM}$, $[K^+]_i=140\text{ mM}$), haciendo que V regrese a su valor inicial en $V = V_r$ [2,3,10]. Este cambio en V en función del tiempo (t) se le llama potencial de acción (V_a) y su propagación a través de la neurona se conoce como impulso nervioso (figura 5). Este tipo de señales eléctricas son las responsables de la comunicación neuronal y de la transmisión de información entre diferentes puntos del SNC.

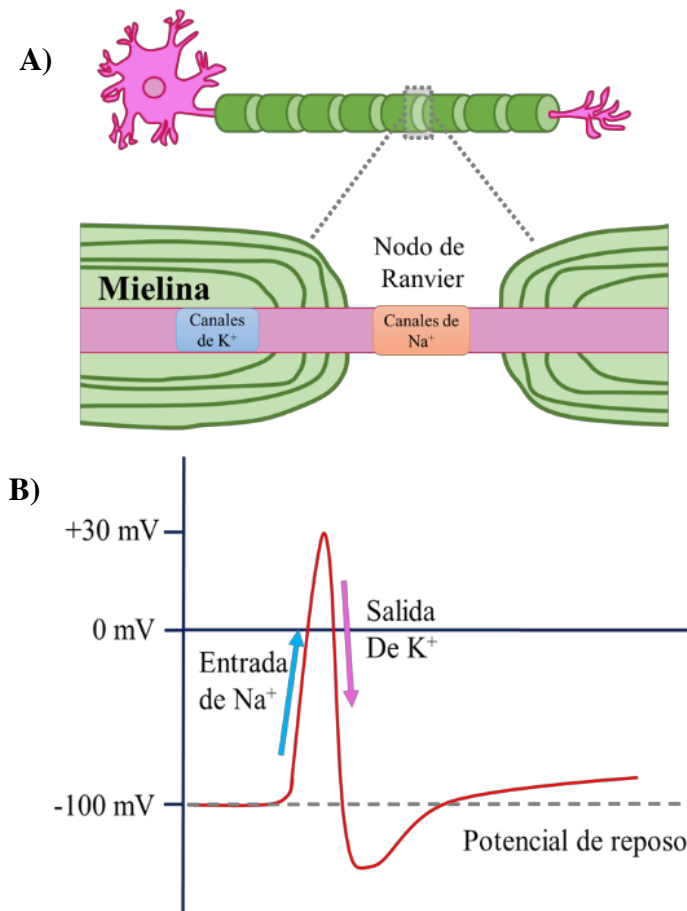


Figura 5. El potencial de acción. A) Representación de una neurona. En verde, se ilustra el recubrimiento de mielina, la cual se distribuye en forma de vainas a lo largo del axón (color fucsia). La densidad de expresión de canales K_v es mayor en las zonas recubiertas por la mielina, mientras que los canales sodio (Na^+) dependientes de V (Na_v) se expresan en mayor cantidad en los *Nodos de Ranvier*. B) Registro de un potencial de acción. La entrada de iones Na^+ por los canales Na_v hace que V cambie a valores $V > 0$, mientras que la salida del ion K^+ permite que el valor $V = V_r$ se restituya.

2.2. 4-AMINOPIRIDINA: UN BLOQUEADOR ESPECÍFICO DE CANALES K_v .

La 4AP, también conocida comercialmente como dalfampridine o ampyra[®], es un bloqueador específico de canales K_v [1,21-23]. La 4AP es un compuesto orgánico cuya fórmula química es $C_5H_5N-NH_2$. Estructuralmente, esta molécula está conformada por una piridina (C_5H_5N) la cual se compone de un anillo de seis átomos, cinco átomos de carbono y un átomo de nitrógeno y en su posición número cuatro (ver figura 6) tiene unido un grupo funcional amino ($-NH_2$).

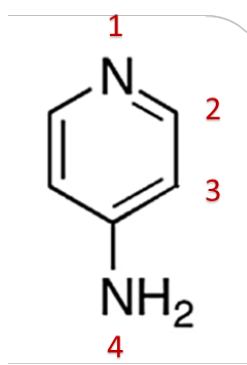


Figura 6. Estructura química de la 4AP.

La 4AP fue desarrollada y utilizada por primera vez como un avicida en la década de 1960 [24]. Se observó que cuando las aves lo consumían, emitían sonidos de alarma provocados por la contracción involuntaria de su diafragma hasta ocasionar su muerte [25,26]. Posteriormente, se demostró que la 4AP promueve la liberación de acetilcolina en las terminales nerviosas [27], incrementa la transmisión de dopamina en el núcleo estriado de la rata y además ha sido utilizada como un agente experimental para inducir convulsiones, bloqueo neuromuscular inducido por anestesia y en el tratamiento de botulismo [28]. Dado su mecanismo de acción sobre los canales K_v , la 4AP es utilizada para el estudio y caracterización de diversas enfermedades derivadas de la deficiente transmisión neuronal. Por ejemplo, en neuronas *desmielinizadas* se ha demostrado que promueve tanto la conducción axonal como la transmisión sináptica [1,4,29].

La 4AP es una molécula susceptible a conjugarse con diversos grupos funcionales como lo son: trifluorometilo ($-\text{CF}_3$), amino ($-\text{NH}_2$), metilo ($-\text{CH}_3$) y metoxilo ($-\text{OCH}_3$), entre otros. Algunos de estos derivados de la 4AP han sido utilizados con propósitos clínicos. Por ejemplo, el derivado 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) es un potente bloqueador de canales tipo K_v [6], con baja permeabilidad en la *barrera hematoencefálica* [30] que es suministrado en pacientes con el síndrome Lambert-Eaton [31], el cual es un desorden en el sistema nervioso periférico. Por otra parte, se ha demostrado que el compuesto 4-aminopiridina-3-metanol (3MeOH4AP) promueve la conducción eléctrica del SNC en modelos de laboratorio con lesión de médula espinal y con EM [32]. Sin embargo, la 3MeOH4AP tiene una baja permeabilidad en la *barrera hematoencefálica* y requiere que sea administrado vía intracraneal.

2.2.1. MECANISMO DE BLOQUEO DE LA 4-AMINOPIRIDINA.

Las moléculas de 4AP, así como sus compuestos derivados, son susceptibles a protonación. Por ejemplo, la 4AP tiene un valor de pK_a de 9.58 [33], este hecho significa que cuando el pH del medio sea igual 9.58, el 50% de moléculas de 4AP se encontrarán cargadas positivamente o protonadas y el otro 50% en una forma neutra. La protonación de este tipo de compuestos ocurre cuando un H^+ se une a su átomo de nitrógeno en la posición 1, tal y como se muestra en la figura 7. Por lo tanto, bajo condiciones fisiológicas de pH, la 4AP se encontrará en su forma cargada [1,7,33].

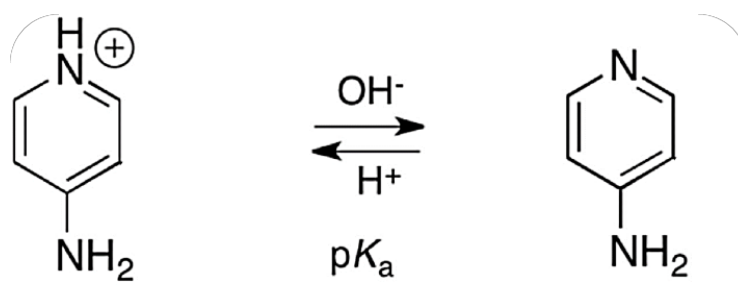


Figura 7. Equilibrio ácido-base de la molécula de 4AP. Esquema de una molécula de 4AP cuando se encuentra en una forma protonada (izquierda) y cuando se encuentra en su forma neutra (derecha). La reacción indicada al centro del esquema representa el estado de equilibrio donde el número de moléculas protonadas es el mismo que el de moléculas neutras.

El mecanismo canónico de inhibición de los canales K_v por 4AP implica que la molécula de 4AP debe encontrarse en su forma activa, es decir su forma cargada, para posteriormente inhibir al canal desde su configuración abierta [5,34,35]. El bloqueo por 4AP puede ocurrir desde el vestíbulo extracelular (baja afinidad) o intracelular (alta afinidad) de la proteína [7]. Este hecho implica que la 4AP podría alcanzar su sitio de unión en el interior del canal mediante dos procesos distintos. Una posibilidad será que la 4AP atraviesa la membrana lipídica de la célula en su forma desprotonada o neutra para posteriormente protonarse y bloquear al canal desde el vestíbulo intracelular. Otra situación podría ocurrir cuando la 4AP en su forma activa cruce a través de la región del poro canal hasta colocarse en su sitio de unión. Ese escenario se describe en la figura 8. Como se muestra en esta figura, ambos mecanismos de inhibición del canal K_v por 4AP implican un movimiento de carga a través del poro del canal. Por consecuencia, el proceso de inhibición de las corrientes de K^+ por 4AP es un mecanismo dependiente de V y del pH del medio.

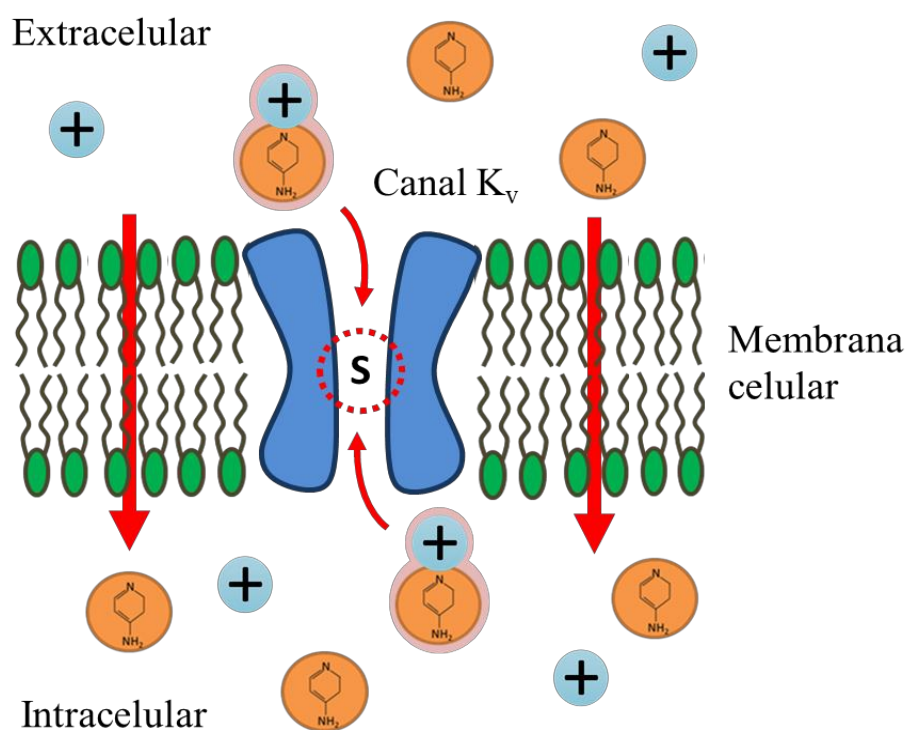


Figura 8. Mecanismo de inhibición del canal K_v por 4AP. En esta representación, el canal tipo K_v se encuentra en su configuración abierta. El contorno circular en color rojo denota el hipotético sitio de unión a la 4AP en la región del poro del canal. La 4AP está representada en círculos color naranja, mientras que los círculos azules son protones.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EM es una enfermedad autoinmune del SNC. Se conoce que en el mundo existen aproximadamente 2.3 millones de personas que padecen esta incurable enfermedad. En México se tienen registrados 15 mil casos, según la Sociedad Nacional de Esclerosis Múltiple [36]. En el 2010 la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE.UU. (FDA, por sus siglas en inglés) autorizó la prescripción del fármaco Ampyra® (nombre comercial para la 4-aminopiridina o 4AP) en pacientes diagnosticados con esta patología con el fin de reducir y/o controlar los síntomas. Las causas moleculares que origina la EM aún son desconocidas. Sin embargo, se conoce que la sintomatología debido a esta enfermedad se debe a la aberrante disrupción de la mielina que recubre a los axones del SNC [4]. Este hecho induce que los canales de K_v presentes en los axones queden expuestos hacia el exterior de la célula (ver figura 5) ocasionando fugas de K^+ desde el interior de la neurona y provocando un enlentecimiento en la velocidad de propagación, la cual puede ser hasta 10 veces menor con respecto a la v_p que se genera en los axones mielínicos [2]. Esta situación ocasiona que los pacientes diagnosticados con esta patología presenten síntomas como lo son el adormecimiento muscular, la parálisis parcial o total, el temblor involuntario y la pérdida sensorial, entre otros [3,4], los cuales son parcialmente disminuidos por la acción de la 4AP.

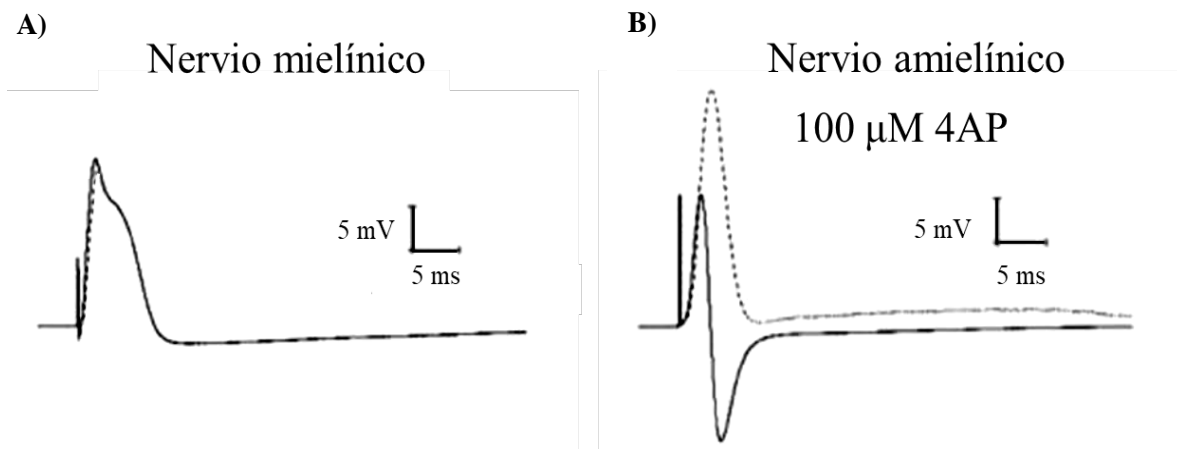


Figura 9. Potencial de acción compuesto en un nervio óptico de ratón. A) Potencial de acción compuesto en un nervio mielínico de ratón. B) Potencial de acción compuesto en un nervio amielínico de ratón antes (línea continua) y después (línea punteada) de agregar 100 μ M de 4AP. En el nervio mielínico, la velocidad de conducción del potencial de acción compuesto es de 1.4 ± 0.3 m/s, mientras que en el nervio amielínico la velocidad es de 0.59 ± 0.1 m/s. Tomada y modificada de [1].

Diversas técnicas de imagenología han sido utilizadas para el diagnóstico y estudio de enfermedades asociadas a la pérdida de mielina en los axones. Una de ellas es la tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), la cual está basada en la detección de la distribución de compuestos radioactivos en actividades metabólicas. Las sondas PET utilizadas en el diagnóstico de EM consisten en compuestos hidrofóbicos que se unen a las proteínas incrustadas en la mielina, provocando una señal basal muy elevada, hecho que dificulta la visualización de áreas amielínicas pequeñas [1]. Para resolver este problema, en el 2018 Brugarolas y colaboradores [1,5] propusieron sintetizar un radiofármaco basado en el mecanismo de inhibición específica de canales axonales K_v por 4AP con el fin de trazar las regiones desmielinizadas del sistema nervioso central ocasionadas por EM. Para ello, realizaron estudios de estructura y actividad de derivados de 4AP que, debido a su estructura molecular, pudieran ser conjugados con Flúor-18 (^{18}F) o Carbono-11 (^{11}C), átomos radioactivos comúnmente utilizados en procedimiento de PET. Sin embargo, este procedimiento no es trivial ya que una mínima modificación en la estructura de la 4AP puede cambiar su potencia de bloqueo de corriente de los canales axonales K_v . Aunado a lo anterior, la realización de estos procedimientos (síntesis, aplicación y distribución del radiofármaco en el paciente), implica que debe realizarse dentro de un periodo de tiempo comprendido entre 2 h y 0.3 h debido a que es el tiempo medio de decaimiento de los isótopos ^{18}F y ^{11}C , respectivamente.

El estudio y la caracterización biofísica de compuestos derivados de 4AP que preserven el mecanismo de inhibición canónica y que puedan ser utilizados como sondas PET, permitirían tener un diagnóstico certero y seguimiento clínico, en principio, más eficiente para la EM. En [1] se encontró que el derivado 3-fluoro-4-aminopiridina (3F4AP), el cual tiene ligado un átomo de flúor en su posición número tres, posee propiedades farmacológicas similares a 4AP. 3F4AP fue sintetizado con el isótopo ^{18}F y fue probado exitosamente como una sonda PET en modelos animales de EM [1,5]. Por las razones antes mencionadas en este trabajo extendemos esta idea para caracterizar nuevos derivados de 4AP con potencial para ser usados como sondas PET para la visualización de regiones desmielinizadas del SNC.

3.1. HIPÓTESIS.

Compuestos metilados (-CH₃), fluorometilados (-CF₃) y metoxilados (-OCH₃) de 4AP, como lo son la 3-metil-4-aminopiridina (3Me4AP), 3-metoxi-4-aminopiridina (3MeO4AP), 3-(trifluorometil)-4-aminopiridina (3CF₃4AP) y 2(trifluorometil)-4-aminopiridina (2CF₃4AP), inhiben mediante el mecanismo molecular canónico las corrientes de K⁺ del canal *Shaker* [14] dependiente de voltaje, y por lo tanto pueden ser sintetizados con ¹¹C o ¹⁸F para su posible uso como radiotrazadores de regiones desmielinizadas del sistema nervioso central.

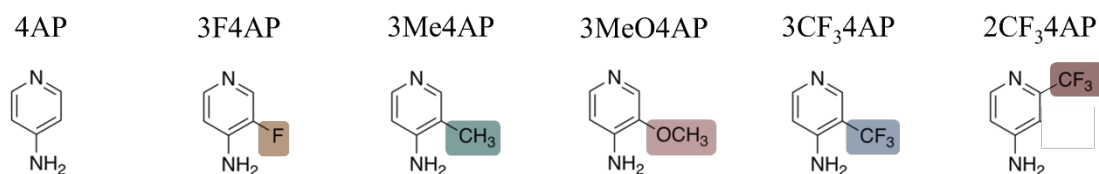


Figura 10. Estructura molecular de 4AP y sus análogos. De izquierda a derecha: 4-aminopiridina (4AP), 3-fluoro-4-aminopiridina (3F4AP), 3-metil-4-aminopiridina (3Me4AP), 3-metoxi-4-aminopiridina (3MeO4AP), 3-(trifluorometil)-4-aminopiridina (3CF₃4AP) y 2(trifluorometil)-4-aminopiridina (2CF₃4AP).

3.2. OBJETIVOS.

3.2.1. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar bioquímicamente (pK_a y logD), farmacológicamente (IC₅₀) biofísicamente (dependencia con V y pH) los compuestos metilados, fluorometilados y metoxilados de 4AP (figura 10) para su posible uso como radiotrazadores de regiones desmielinizadas del sistema nervioso central.

3.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Caracterización bioquímica de los derivados de 4AP metilados, fluorometilados y metoxilados de 4AP (figura 10).
- Determinación del valor de la concentración necesaria de derivados metilados, fluorometilados y metoxilados de 4AP (figura 10) para bloquear el 50% de la corriente de K^+ (IC_{50}) generada por el canal de potasio *Shaker* dependiente de V expresado en ovocitos *Xenopus laevis*.
- Determinar la dependencia de la IC_{50} en función de V ($IC_{50}(V)$) y el pH de los derivados de 4AP (figura 10).

4. METODOLOGÍA

4.1. AMPLIFICACIÓN DE ADN Y SÍNTESIS IN VITRO DE ARN DEL CANAL *SHAKER*.

Una muestra de ADN que codifica para el canal *Shaker* con inactivación removida [17] fue donada generosamente por el laboratorio del Prof. Francisco Bezanilla de la Universidad de Chicago. El ADN fue amplificado mediante protocolos estándar de biología molecular. Para este fin se utilizaron *células competentes* de la cepa *Escherichia coli* XL10-Gold. Un vial que contenía 20 µL de esta cepa fue donada por la Dra. Angélica López Rodríguez de la Universidad de Durango. La transfección de las células con el ADN que codifica para el canal *Shaker* se realizó mediante un choque térmico a 42°C por 45 s. Subsecuentemente, las células transfectadas fueron incubadas en placas de agar (LB Agar Ultrapure, USB® Corporation, Cleveland, OH, USA) con Ampicilina (20 µL a 0.1% P/V) a una temperatura de 37°C por 12 horas hasta que crecieron colonias de bacterias. Posteriormente, se inoculó una colonia de bacterias a 37° por 16 horas en 10 mL de medio LB Broth Ultrapure (Affymetrix, Inc. Cleveland, OH, USA) para posteriormente extraer y purificar el ADN amplificado mediante el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific. Germany). Finalmente, el ADN amplificado fue linealizado con la enzima Not I (NewEngland Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) y posteriormente se sintetizó el ARN que codifica para el canal *Shaker* mediante un procedimiento estándar de transcripción *in vitro* utilizando el kit promotor T7 mMESSAGE cRNA (Ambion™, MEGAscript®, Austin, Tex., USA).

4.2. EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE LA RANA *XENOPUS LAEVIS* Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL CANAL *SHAKER K_v*.

Los ovocitos extraídos de la rana *Xenopus laevis* son un modelo celular ampliamente utilizado en el estudio estructural y funcional de canales iónicos [15] ya que son capaces de expresar gran cantidad de proteínas de manera heteróloga. En el Laboratorio de Biofísica Molecular se mantienen en cautiverio una colonia de 16 ranas *Xenopus laevis* adquiridas de

las empresas NASCO (Modesto, CA, USA) y Aquanimals S.A. de C.V. (Santiago de Querétaro, Qro, Méx.). Estos ejemplares se encuentran bajo los protocolos internacionales de cuidado y bioética del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular establecidos por la Universidad de Chicago, USA y la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999 para animales de laboratorio.

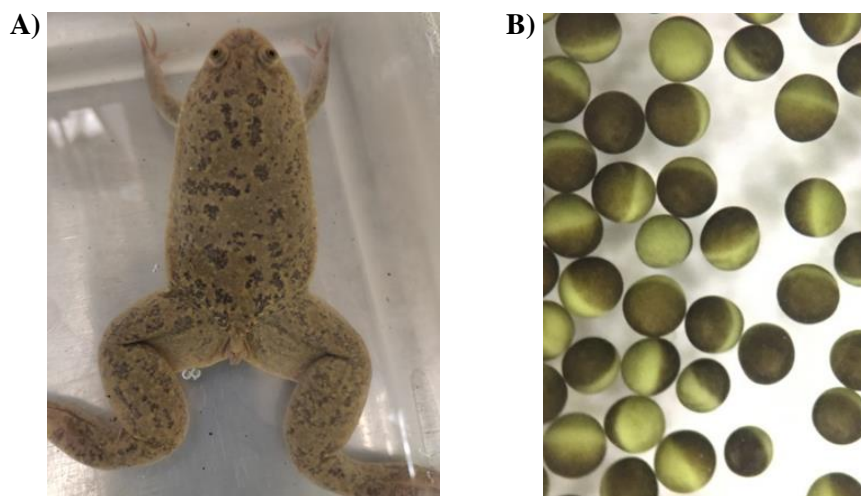


Figura 11. Rana *Xenopus Laevis*. **A)** Ejemplar de rana africana *Xenopus Laevis* del Laboratorio de Biofísica Molecular del Departamento de Física, Universidad de Guadalajara. **B)** Ovocitos obtenidos por procedimiento quirúrgico de la rana *Xenopus laevis*. Estas células se encuentran en etapa de maduración 6, es decir, en este punto están completamente desarrollados, alcanzando un diámetro que varía entre 1.2 a 1.5 mm, aproximadamente [37,38]. En esta etapa, los ovocitos están claramente divididos en dos mitades: el hemisferio marrón oscuro ("polo animal") y el hemisferio amarillento o verde claro ("polo vegetal"). El color oscuro del polo animal es consecuencia de la mayor concentración de gránulos de pigmento que contienen melanina. Esta fotografía fue tomada una vez terminado el protocolo de digestión.

Para este estudio, el canal de potasio *Shaker* con inactivación removida fue expresado en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Los ovocitos fueron extraídos realizando una cirugía a la rana, de la cual se obtuvo un volumen entre 1 y 3 mL del folículo ovárico. Posteriormente, fueron aislados mediante un proceso de agitación mecánica y digestión enzimática por la acción de colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corp., NJ, USA). Subsecuentemente, los ovocitos se mantuvieron vivos bajo incubación a una temperatura de 17° C y en una

solución salina denominada SOS (del inglés Survivor Oocyte Solution) compuesta por (en mM): 100 NaCl (Cloruro de Sodio), 1 MgCl₂ (Cloruro de Magnesio), 10 HEPES (ácido 4-(hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico), 2 KCl (Cloruro de Potasio) y 1.8 CaCl₂ (Cloruro de Calcio) ajustada a un valor de pH de 7.5 con MES (Ácido Metanosulfónico). Estas células pueden permanecer vivas y en condiciones adecuadas para realizar experimentos hasta por 7 días. Los reactivos utilizados en la preparación de solución SOS y soluciones de registro fueron adquiridos de las empresas Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y Chem-Impex International (Chem-Impex Int'l Inc., Wood Dale, IL, USA).

Posterior a la digestión, en cada ovocito aislado se procedió a depositar entre 20 y 40 ng de ARN que codifica para el canal *Shaker* mediante un proceso de inyección de nanovolumen utilizando una micropipeta de vidrio (3.5" Drummond modelo 3-000-203-G/XX) en un nano-inyector Nanoinject II Auto-Nanoliter Injector (Drummond Scientific Company, Broomall, PA). Una vez realizado el protocolo de nanoinyección, los ovocitos fueron incubados a una temperatura de 17°C por un periodo de tiempo de 8 a 12 horas antes de cada medición.

4.3. REGISTRO DE CORRIENTES DE K⁺ UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELECTROFISIOLOGÍA FIJACIÓN DE VOLTAJE EN OVOCITO CORTADO.

Para medir corrientes de K⁺ generadas por el canal *Shaker* se utilizó la metodología de Fijación de Voltaje en Ovocito Cortado (COVC, por sus siglas en inglés), la cual permite registrar con gran resolución temporal las corrientes iónicas generadas por los canales expresados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* [15]. Mediante esta tecnología se logra fijar rápidamente el voltaje de la membrana celular del ovocito ($t \sim 20\text{-}40 \mu\text{s}$) y registrar la corriente iónica asociada a la función de un canal iónico presente en la membrana con una resolución y capacidad de muestreo simultánea de hasta 1 mega muestra por segundo (MS/s) y 1.33 MS/s, respectivamente. El Laboratorio de Biofísica Molecular del CUCEI cuenta con los aparatos e instrumentación necesarios para este fin.

El arreglo experimental de COVC se muestra en la figura 12. COVC consiste en tres compartimientos aislados eléctricamente entre sí: 1) una cámara superior, 2) una media y 3) una inferior. En COVC, un ovocito que expresa el canal iónico de interés para su estudio es colocado entre cámaras superior e inferior como se muestra en la figura 12. La cámara superior posee un orificio de aproximadamente 0.6 mm de diámetro que permite aislar una pequeña región de la membrana del ovocito ($\sim 1/5$ de su superficie) permitiendo que únicamente esta área esté en contacto con la solución externa de registro. En este segmento de la membrana del ovocito se establece un sello de muy alta resistencia ($\sim G\Omega$), asilando eléctricamente esta región del resto y es justo aquí donde se aplica el estímulo variable de voltaje durante el experimento. El medio citoplasmático o intracelular del ovocito se conecta eléctricamente con el resto del sistema abriendo el circuito que se establece entre el electrodo I y su membrana. Para este fin, el hemisferio inferior de la membrana del ovocito es cortado por la acción rápida de saponina (< 1 min) diluida al 2% (P/V) que se agrega a la solución de registro intracelular. La saponina es un detergente que, al entrar en contacto con la membrana del ovocito, produce poros abriendo el circuito eléctrico (ver figura 12). Durante el tiempo de perfusión con saponina, se aplicaron pulsos de voltaje a $V = -40$ mV por un intervalo de tiempo de 50 ms, lo que permitió monitorear el comportamiento eléctrico de la membrana del ovocito en términos de la corriente transitoria capacitiva que se genera. De esta manera, este arreglo experimental permite tener control sobre las concentraciones iónicas internas y externas de la membrana del ovocito y como consecuencia de los canales que se expresan en ella.

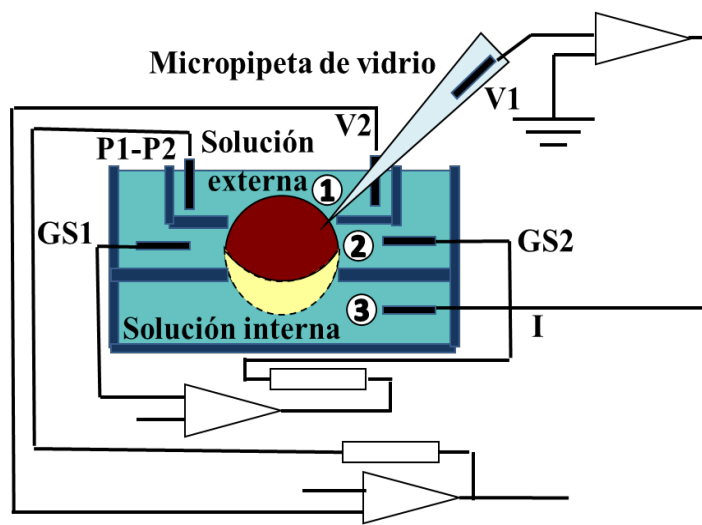


Figura 12. Esquema experimental de la técnica COVC.

La diferencia de potencial aplicada a la membrana ovocito es establecida por $V_1 - V_2$. V_1 regula el voltaje en la membrana de la célula (V) mediante un electrodo inmerso en una micropipeta de vidrio que contiene una solución de KCl (Cloruro de Potasio) a una concentración de 3 M (Molar = mol/Litro). La micropipeta fue fabricada estirando un tubo capilar de vidrio modelo TW150F-4 (World Precision Instruments, Inc.), con diámetro interno y externo de 1.12 y 1.50 mm, respectivamente, utilizando el módulo estirador PC10 (Narishige Group). Este procedimiento permitió obtener micropipetas de vidrio cuya resistencia varió entre 0.5 y 1 K Ω una vez que fueron llenadas con KCl. La punta de la micropipeta es introducida en la parte expuesta de la membrana del ovocito en la cámara superior (ver figura 12) para de esta manera imponer el voltaje V_1 . V_2 es el voltaje de referencia que por simplicidad se mantiene en cero. I es el electrodo encargado de inyectar o sustraer corriente al sistema para mantener a V_2 siempre en el valor de referencia. Los electrodos $GS1$ y PI sintonizan el valor del voltaje que se establece entre las cámaras media y superior, respectivamente, mientras que $GS2$ y $P2$ inyectan o sustraen la corriente necesaria para mantener la diferencia de voltaje $V1-V2$ que se desea imponer sobre la membrana del ovocito.

4.4. SOLUCIONES DE REGISTRO.

Para la implementación de la metodología COVC y el desarrollo experimental de este proyecto de tesis, se prepararon soluciones salinas de registro de electrofisiología, interna y externa, a tres valores de pH: 6.8, 7.4 y 9.1. La solución interna estuvo compuesta (en mM) por: 120 KOH (Hidróxido de Potasio), 2 EGTA (Ácido etileno glicol-bis(2-aminoetil éter)- N,N,N',N' -tetraacético) y 20 mM HEPES. La solución externa, a su vez tuvo la siguiente composición química (en mM): 12 KOH, 2 Ca(OH) $_2$ (Hidróxido de calcio), 105 NMDG (N-Metil-D-Glucamina)-MES y 20 mM HEPES. Para soluciones interna y externa a pH 9.1 se utilizó 20 mM CAPS (Ácido N-cicloetil-3-aminopopanosulfónico) sustituyendo al amortiguador de pH HEPES. El pH de todas las soluciones fue ajustado con MES (Ácido Metanosulfónico).

El arreglo experimental de COVC, permite realizar intercambios de soluciones salinas de registro, tanto interna como externa, sin comprometer la estabilidad del ovocito. Para registrar la acción de la 4AP y los compuestos derivados sobre las corrientes de K^+ generadas por el canal *Shaker*, se preparó solución externa a distintas concentraciones de cada compuesto (en mM): 0, 0.0001, 0.01, 0.1, 0.3, 1 y 10. La 4AP y los compuestos derivados son adquiridos en forma cristalina, por lo que primero se disolvieron utilizando el solvente orgánico DMSO (Dimetilsulfóxido) a una concentración de 1 M. Posteriormente, cada compuesto se diluyó a cada concentración mencionada utilizando como solvente solución externa de registro.

4.5. REGISTRO DE CORRIENTES DE K^+ GENERADAS POR EL CANAL *SHAKER*.

Las corrientes iónicas de K^+ fueron registradas, amplificadas y digitalizadas utilizando el amplificador CA-1A (Dagan Corp) conectado a la tarjeta multifunción (convertidor AD/DA) USB-1604-HS-2AO (Measurement Computing) y controlados por una PC mediante el programa GpatchMC64 (Dept. of Physiology, UCLA). Los ovocitos que expresaron exitosamente el canal *Shaker* fueron sometidos a un protocolo de activación del canal que consistió en estímulos de voltaje con amplitud constante en el tiempo (función escalón) que variaron desde -100 mV hasta 50 mV en incrementos de 10 mV durante un intervalo de tiempo de 50 ms aplicando un voltaje de sostenimiento de -80 mV antes y después del pulso variable de voltaje. Ese valor de voltaje de sostenimiento permitió mantener a los canales en una conformación cerrada justo antes de la aplicación de cada pulso de V para la activación del canal. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (20-25°C).

Para cuantificar el mecanismo de inhibición sobre la corriente de K^+ por la 4AP y los derivados estudiados en este trabajo (ver objetivos), las corrientes iónicas de K^+ fueron registradas en cada intercambio de solución de la cámara superior (solución externa) a cada concentración de los compuestos de 4AP, la cual fue variada desde 0 hasta 10,000 μ M. Debido a que estos compuestos inhiben al canal en su configuración abierta, los ovocitos

fueron estimulados por pulsos continuos de voltaje, a $V = 10 \text{ mV}$, durante un periodo de tiempo entre 5 a 10 min justo antes de cada registro de corriente para todo el rango de V medido. La estabilidad del cada ovocito fue monitoreada de forma continua durante todo el experimento.

4.6. ANÁLISIS DE DATOS.

Los registros de corriente iónica fueron analizados utilizando los programas *Analysys* (Dept. of Physiology, UCLA) y *OriginPro 8* (®OriginLab Corporation). Para describir el mecanismo canónico de bloqueo del canal *Shaker* por 4AP se utilizaron dos modelos empíricos, el modelo de Hill [8] y el de Woodhull [9]. El modelo de Hill permite determinar el valor de la concentración necesaria para inhibir el 50% de la corriente de K^+ (IC_{50}) mientras que el modelo de Woodhull describe la interacción entre la molécula de 4AP y el campo eléctrico que se genera en la membrana, lo que permite cuantificar la dependencia de la IC_{50} en función de V ($IC_{50}(V)$).

4.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN NECESARIA PARA INHIBIR EL 50% DE CORRIENTE DE K^+ GENERADA POR EL CANAL *SHAKER* (IC_{50}).

En 1910, Archibald Vivian Hill propuso un modelo empírico para describir cuantitativamente la relación que existe entre la cantidad de un compuesto y la respuesta que produce un sistema, como por ejemplo la unión de oxígeno a las moléculas de hemoglobina [8,39]. Las relaciones compuesto-sistema que pueden ser descritos bajo este modelo poseen un comportamiento no lineal, un estado de equilibrio y en un tiempo $t \rightarrow \infty$ deben llegar a un estado de saturación donde la respuesta del sistema al compuesto no cambia. En el área de biofísica, este modelo llamado ecuación de Hill, ha sido utilizado para describir el efecto de la unión de un ligando sobre la conductancia de canales iónicos dependientes del voltaje [39,40].

La forma general de la ecuación de Hill está descrita de la siguiente manera:

$$E = E_0 + \frac{E_{m\acute{a}x}[C]^i}{IC_{50}^i + [C]^i}$$

donde E es el efecto causado por la presencia de un compuesto C en un medio, $[C]$ es la concentración del compuesto, $E_{m\acute{a}x}$ es el efecto máximo medido, E_0 es el valor basal del efecto cuando se tiene 0 M de C , IC_{50} es la concentración de C en el medio a la cual se tiene el 50% del efecto e i es el coeficiente de Hill. Este coeficiente es una medida de cuán sigmoidea es una curva de actividad de la relación compuesto-sistema, siendo este grado de sigmoidicidad un parámetro de cuán cooperativo podría ser el fenómeno estudiado. Si $i = 1$, la ecuación de Hill describe una parábola y se indica que la reacción de fijación del ligando es no cooperativa. Si $i > 1$, la unión se describe como positivamente cooperativa, es decir, la unión un ligando incrementa la probabilidad de que se una otro ligando. Si $i < 1$, la reacción se denomina negativamente cooperativa, es decir, la unión de un ligando reduce la afinidad del siguiente ligando [41]. El coeficiente de Hill se obtiene tras el ajuste de la ecuación a los datos experimentales. Bajo nuestras condiciones experimentales, este coeficiente tiene un valor de $i = 1.0 \pm 0.1$.

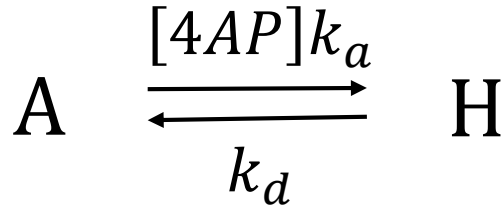


Figura 13. Modelo de inhibición de dos estados del canal *Shaker* por 4AP. A y H representan el estado abierto y el estado inhibido del canal *Shaker*, respectivamente. La rapidez de la transición desde el estado A al estado H está dada por la constante cinética $[4AP]k_a$, mientras que la velocidad de transición de H a A está representada por k_d . En el modelo k_a/k_d son funciones de V.

La ecuación de Hill se obtiene a partir de la solución de un modelo cinético de dos estados. Para este caso particular (figura 13), estos estados describen la conformación de los canales *Shaker* expresados en ovocitos *Xenopus laevis* al estar presentes en un medio con 4AP. El primer estado representa al canal en su conformación abierta, que se denotará por

“A” y el segundo representa la configuración inhibida del canal, es decir, cuando este ha sido bloqueado por una molécula de 4AP. Este estado se denotará como “H”.

Cada uno de los estados del sistema tiene una probabilidad asociada. Se denotará P_A como la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado abierto y P_{4AP} , la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado inhibido. La probabilidad P_{4AP} , dependerá de la cantidad de compuesto presente en el medio: al haber mayor cantidad de moléculas de 4AP, la posibilidad de que una de ellas interactúe con un canal *Shaker* incrementará. Por lo tanto, la velocidad a la cual el canal transita desde el estado A al estado H debe ser proporcional a la concentración de 4AP:

$$v_a = -k_a[4AP] \quad (1)$$

donde k_a es el coeficiente de la velocidad de transición $A \leftrightarrow H$, el cual es función de V. El signo negativo de la ecuación 1 denota que la cantidad de moléculas de 4AP libres en el sistema disminuye al transitar de un estado a otro. Dado que el modelo descrito en la figura 13 asume que la transición $A \leftrightarrow H$ es reversible, la rapidez de la transición $H \leftrightarrow A$ está representada con la constante cinética k_d . Entonces, la transición del canal *Shaker* desde su forma abierta a su forma inhibida estará descrita en términos de:

$$\frac{dP_A}{dt} = -[4AP]k_a \cdot P_A + k_d \cdot P_{4AP} \quad (2)$$

de forma análoga, el cambio de probabilidad de que un canal *Shaker* transite del estado H al estado A estará dado por:

$$\frac{dP_{4AP}}{dt} = -k_d \cdot P_{4AP} + [4AP]k_a \cdot P_A \quad (3)$$

En el estado estacionario, lo que ocurre en el límite cuando $t \rightarrow \infty$, las transiciones $A \leftrightarrow H$ y $H \leftrightarrow A$ son equiparables e independientes del tiempo. Este hecho implica que el bloqueo de canales *Shaker* por 4AP en ese límite permanece invariante y por lo tanto los cambios de probabilidad son iguales a cero:

$$\frac{dP_{4AP}}{dt} = \frac{dP_A}{dt} = 0$$

lo que implica que:

$$-[4AP]k_a \cdot P_A + k_b \cdot P_{4AP} = -k_d \cdot P_{4AP} + [4AP]k_a \cdot P_A \quad (4)$$

Simplificando la ecuación 4, se encuentra:

$$P_{4AP} \cdot k_d + P_A \cdot [4AP]k_a = 0 \quad (5)$$

a saber, que:

$$P_A + P_{4AP} = 1 \quad (6)$$

entonces las ecuaciones 5 y 6 forman un sistema de ecuaciones algebraicas de dos variables.

Por lo tanto, resolviendo este sistema es posible obtener una expresión para P_{4AP} :

$$P_{4AP} = \frac{[4AP]}{[4AP] + \frac{k_d}{k_a}} \quad (7)$$

Definiendo $K = \frac{k_d}{k_a}$ como la constante de equilibrio de la transición $A \leftrightarrow H$ la ecuación

7 se puede reescribir como:

$$P_{4AP} = \frac{[4AP]}{[4AP] + K} \quad (8)$$

La ecuación 8 es la forma de la ecuación de Hill (para $i=1$) y relaciona la probabilidad de que el canal se encuentre en su configuración inhibida con la cantidad de compuesto de 4AP presente en el sistema. De forma general, se pueden definir dos macroestados o estados globales en este sistema, un macroestado $\{A\}$ compuesto por el conjunto de canales abiertos y un macroestado $\{H\}$ compuesto por el conjunto de canales inhibidos. Asumiendo que la

corriente generada por el flujo de iones K^+ a través de un canal *Shaker* es constante para todos los canales presentes en la membrana del ovocito, entonces la corriente total medida por el sistema debe ser proporcional al número de canales en configuración abierta o no bloqueados por la 4AP, es decir, a $\{A\}$ [9]. Entonces, P_{4AP} será igual a la razón de la corriente inhibida (I_{4AP}) entre la corriente total medida por el sistema en ausencia de compuesto ($I_{m\acute{a}x}$):

$$\frac{I_{4AP}}{I_{m\acute{a}x}} = \frac{[4AP]}{[4AP] + K} \quad (9)$$

De 9 se observa que cuando K es igual a la concentración de $[4AP]$, entonces $I/I_{m\acute{a}x} = 1/2$. Por lo tanto, la constante de equilibrio K se interpretará como la concentración de 4AP necesaria para inhibir el 50% de la corriente de K^+ generada por el canal *Shaker*. Este valor de concentración será denotado como la constante de inhibición IC_{50} . Un valor basal de respuesta del sistema (I_0) será incluido en la expresión analítica, el cual representa el efecto de la droga a una concentración de 0 mM [39]. Esto modifica la ecuación 9 en una expresión de Hill de 4 parámetros:

$$\frac{I_{4AP}}{I_{m\acute{a}x}} = \frac{[4AP]}{[4AP] + IC_{50}} + I_0 \quad (10)$$

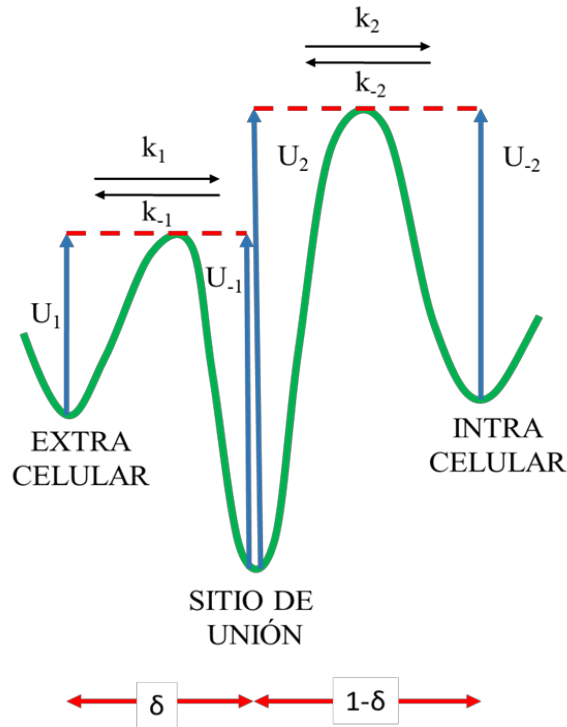
La corriente I_{4AP} no puede ser medida de forma directa. Por lo tanto, la ecuación 10 se reescribirá de tal manera que el efecto de inhibición de 4AP pueda ser descrito en función en la corriente medida (I) en presencia de distintas concentraciones de 4AP. Así pues, se definió la corriente relativa como $I_{rel}=I/I_{m\acute{a}x}$ y se reescribió la ecuación 10 como:

$$I_{rel} = I_1 + \frac{I_1 - I_2}{1 + 10^{(\log IC_{50} - \log[4AP])}} \quad (11)$$

donde I_1 e I_2 son el valor máximo y mínimo de la corriente relativa I_{rel} , respectivamente. Los datos ajustados con esta ecuación 11 son reportados junto con el intervalo de confianza del 95% debido a su no linealidad.

4.6.2. ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA CON EL VOLTAJE DE IC₅₀.

A)



B)

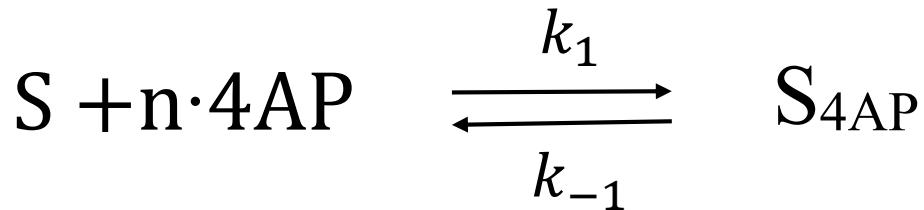


Figura 14. Modelo de Woodhull. A) Esquema empírico de energía en un canal iónico descrito desde la perspectiva de un ion o molécula eléctricamente cargada, que puede bloquear al canal. La amplitud de las barreras de energía U_i están denotadas por flechas de color azul y las constantes cinéticas por k_i , las cuales son funciones de V . δ es la distancia eléctrica que el ion tiene que atravesar para llegar al sitio de unión. Imagen tomada y modificada de [9]. B) Modelo cinético de inhibición del canal *Shaker* por 4AP. En el primer estado, se tiene un canal en el estado abierto denotado con la letra “S” y n moléculas de 4AP, las cuales representan la concentración de 4AP presente en el medio. En el segundo estado S_{4AP} , la 4AP se ha unido al sitio de unión en el canal *Shaker*. Las frecuencias de transición entre los estados están denotadas como k_1 y k_{-1} .

En 1973, Anne M. Woodhull propuso un modelo empírico para describir el bloqueo de un canal iónico dependiente de V que resulta de la unión de un catión X a un sitio dentro de la región del poro del canal denominado sitio de unión (ver figura 14). Cuando esta unión ocurre, este hecho impide que los iones a los cuales es selectivo el canal, no puedan pasar a través de él y por tanto se inhiba la corriente iónica. En el modelo de Woodhull, un catión X debe atravesar una barrera de energía U_i ($i=\pm 1,2$) para colocarse en su sitio de unión, el cual corresponde a un mínimo de energía entre las barreras U_{-1} y U_2 (panel A, figura 14) [9]. El modelo plantea también que el catión X puede bloquear al canal tanto del lado extracelular como intracelular con constantes de equilibrio K_1 (k_1/k_{-1}) y K_2 (k_2/k_{-2}), respectivamente. Las constantes cinéticas k_i (en s^{-1}) están definidas de la siguiente manera [42]:

$$k_i = \kappa_i \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (12)$$

donde κ_i es el coeficiente de transición, k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura del sistema y ΔG es el cambio de la energía libre de Gibbs del sistema. El coeficiente de transición contiene la información de las barreras energéticas U_i , las cuales son componentes constantes intrínsecos del canal y son independientes del voltaje de membrana. La razón $\frac{k_B T}{h}$ es llamada frecuencia universal [43,44,45] y representa la frecuencia promedio de vibración de las moléculas X . Esta frecuencia se deduce al encontrar el número de estados vibracionales del sistema a partir de la función de partición y se asume que es directamente proporcional a la frecuencia del modo vibracional en el estado de transición [44,45].

Cuando un voltaje V es aplicado y el canal iónico se encuentra en su conformación abierta, X se mueve a través de la región del poro del canal, atravesando una distancia eléctrica δ o $1-\delta$, para poder arribar al sitio de unión (panel A, figura 14). La probabilidad de que X se coloque en su sitio de unión desde el lado intracelular (o extracelular) dependerá de las condiciones del sistema como lo son las magnitudes de la concentración interna y externa del catión X , las cuales definen la dirección del gradiente electroquímico de X . Entonces, será más probable que X alcance su sitio desde el lado extracelular si la concentración de

externa del catión es mucho mayor que la concentración interna y si, además, la trayectoria de X a través del canal está a favor del gradiente electroquímico del ion permeante.

A continuación, se explica la aplicación del modelo del Woodhull para el caso donde una molécula de 4AP bloquea el canal *Shaker*. En este sistema, la 4AP se aplica desde el lado extracelular, por lo tanto, solo se considerará la transición del panel B, figura 14. Tal y como se mencionó en la deducción de la ecuación de Hill, el bloqueo del canal *Shaker* por 4AP puede describirse mediante una transición global que consta de dos estados, el primero, representa la cantidad de canales *Shaker* en un estado abierto “A” y el segundo, se refiere a la cantidad de canales bloqueados por 4AP, es decir el estado inhibido “H”. Por lo tanto, el trabajo necesario que describe la transición $A \leftrightarrow H$ descrito en términos de la energía libre de Gibbs [46] (ecuación 12) es:

$$G_A = G_A^0 + RT \ln(S) \quad (13)$$

$$G_H = G_H^0 + RT \ln(S_{4AP}) \quad (14)$$

donde (S) es la cantidad de canales *Shaker* en el estado abierto y (S_{4AP}) es la cantidad de canales *Shaker* que han sido bloqueados por una molécula de 4AP. Entonces, el cambio de energía para que el sistema transite de su configuración abierta a una configuración inhibida según las ecuaciones 13 y 14 está dada como:

$$\Delta G = G_A - G_H = G_A^0 - G_H^0 - RT \ln \frac{(S_{4AP})}{(S)}$$

En el estado equilibrio el cambio de energía debe ser nulo, $\Delta G = 0$, por lo tanto:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{(S_{4AP})}{(S)} \quad (15)$$

Denotando la razón $(S_{4AP})/(S) = K$, entonces la ecuación 15 toma la forma:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (16)$$

La ecuación 16 representa el trabajo necesario para llevar al sistema a la configuración de equilibrio, donde 50% de los canales están en el estado no inhibido y el otro 50% en el estado inhibido. Si se considera que la transición $A \leftrightarrow H$ es dependiente de V , entonces ΔG^0 será una función de V [46]. Dado que en este modelo se asume que el campo eléctrico E es constante en la región del poro, entonces:

$$\Delta G^0(V) = \Delta G_{(V=0 \text{ mV})}^0 + z_x \delta FV \quad (17)$$

donde $\Delta G_{(V=0 \text{ mV})}^0$ es la energía intrínseca de unión cuando el voltaje aplicado sobre la membrana es nulo, F es la constante de Faraday, z_x es la carga aparente del catión X que para este caso, X representa la 4AP o cada análogo de 4AP y δ es una fracción del potencial V que X siente en el sitio de unión S . Igualando las ecuaciones 16 y 17, se encuentra una expresión para K en términos de V :

$$K = e^{\frac{\Delta G^0}{RT}} = e^{\frac{\Delta G_{(V=0 \text{ mV})}^0 + z_x \delta FV}{RT}}$$

En una condición inicial para $V = 0 \text{ mV}$ y asumiendo que la energía basal $\Delta G_{(V=0 \text{ mV})}^0$ se mantiene constante entonces se puede reescribir la expresión para K como:

$$K = K_{(V=0 \text{ mV})} e^{\frac{z_x \delta FV}{RT}} \quad (18)$$

donde $K_{(V=0 \text{ mV})} = e^{\Delta G^0(V=0 \text{ mV})/RT}$. De forma análoga a la interpretación en el modelo de Hill, la constante de equilibrio termodinámico K puede ser interpretada en términos de la IC_{50} . Por lo tanto, la ecuación 18, brinda información sobre la inhibición del canal *Shaker* en función de V . Desarrollando 18 para la IC_{50} se tendrá:

$$\log IC_{50}(V) = \log IC_{50(V=0 \text{ mV})} + \frac{1}{2.303} \frac{z_x \delta VF}{RT} \quad (19)$$

donde $IC_{50(V=0 \text{ mV})}$ es el valor de IC_{50} para $V = 0 \text{ mV}$.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA 4AP Y ANÁLOGOS.

En este proyecto de tesis se midieron corrientes iónicas de K^+ que produce el canal *Shaker* expresado en ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis* mediante la técnica de electrofisiología COVC con el fin de cuantificar la capacidad de inhibición del canal *Shaker* por 4AP y algunos derivados de 4AP (figura 10). A continuación, se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

5.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BLOQUEO DE LA 4AP SOBRE EL CANAL *SHAKER*.

En el panel A de la figura 15 se muestran registros representativos de corriente de K^+ generada por el canal *Shaker* en ausencia y presencia de 1 mM de 4AP. Para cuantificar la capacidad de bloqueo de cada derivado de 4AP sobre el canal *Shaker*, la amplitud máxima de corriente (I) obtenida para cada una de las concentraciones medidas de cada compuesto (en mM: 0.0001, 0.01, 0.1, 0.3, 1 y 10) fue dividida entre la amplitud máxima de la corriente registrada a 0 μ M de 4AP o derivados ($I_{m\acute{a}x}$) (control o referencia). Las líneas punteadas de color rojo de la figura 15A indican la amplitud de corriente máxima que se registra en el estado estacionario. Esos valores de corriente fueron utilizados para determinar la corriente relativa: $I_{rel}=I/I_{m\acute{a}x}$. En el panel B de la figura 15 se observan las curvas I vs V para los valores de $I([4AP]=1\text{ mM})$ y $I_{m\acute{a}x}$ que se obtienen a partir de los registros representativos mostrados en el panel A. I_{rel} se determinó en un rango de V entre 0 y 50 mV. El panel C de la figura 15 se muestra la curva I_{rel} vs $[4AP]$ para un valor de $V = 40$ mV. La línea continua representa el ajuste con la función de Hill (ecuación 11). El valor de IC_{50} obtenido mediante este análisis para este valor de V fue de 293 μ M. Este dato es comparable con el reportado por Brugarolas y colaboradores ($IC_{50} = 290$) [1] utilizando la misma metodología experimental, hecho que permite definirlo como experimento de referencia o control.

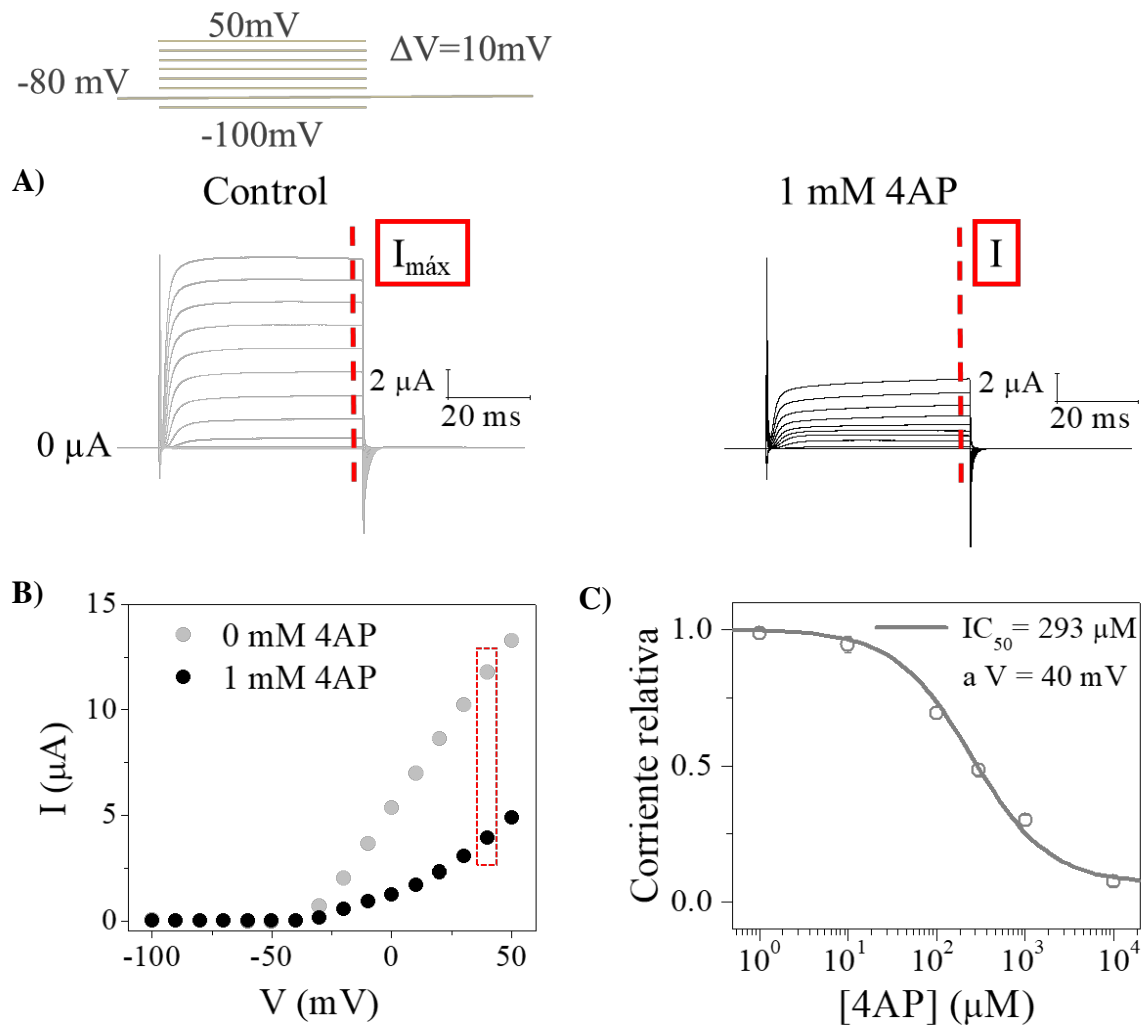


Figura 15. Determinación de la IC_{50} para la 4AP. A) Registros representativos de corriente iónica registrada en ovocitos que expresaron el canal *Shaker* antes (trazos grises) y después (trazos negros) de añadir 1 mM de 4AP. Los registros se obtuvieron al aplicar el protocolo de estímulos de voltaje que se muestra en la parte superior izquierda del panel en la misma célula. B) Gráfica de la amplitud corriente en función del voltaje antes (gris) y después (negro) de aplicar 1 mM de 4AP. C) Gráfica de la corriente relativa en función de la concentración de 4AP obtenida a $V = 40 \text{ mV}$. La línea continua muestra el ajuste realizando con la ecuación de Hill (ecuación 11) el cual produce un valor de IC_{50} de 293 μM .

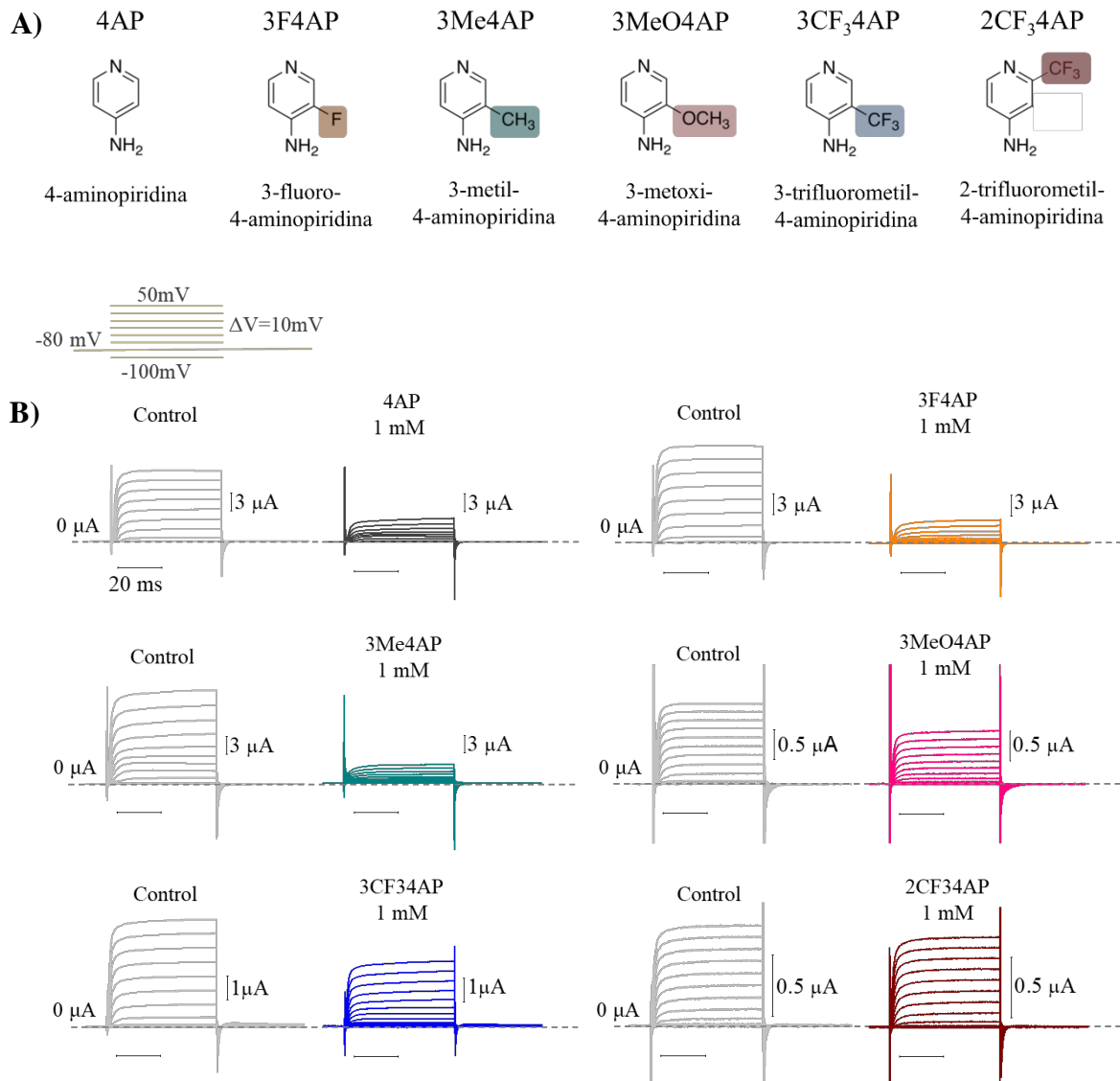


Figura 16. Inhibición de la corriente de K⁺ por análogos de 4AP. **A)** Estructuras químicas de 4AP y análogos de 4AP. De izquierda a derecha: 4-aminopiridina (4AP), 3-fluoro-4-aminopiridina (3F4AP), 3-metil-4-aminopiridina (3Me4AP), 3-metoxi-4-aminopiridina (3MeO4AP), 3-(trifluorometil)-4-aminopiridina (3CF₃4AP) y 2(trifluorometil)-4-aminopiridina (2CF₃4AP). **B)** Registros representativos de corrientes de K⁺ generadas por el canal *Shaker* expresado en ovocitos *Xenopus laevis*, en ausencia (trazos grises) y en presencia (trazos de color) de 1 mM de cada análogo de 4AP. Las corrientes fueron generadas mediante el protocolo de estímulos de voltaje que se muestra en la parte superior izquierda del panel B de la figura. La línea punteada en color gris indica el nivel cero de corriente.

5.1.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BLOQUEO DE ANÁLOGOS DE 4AP SOBRE EL CANAL *SHAKER*.

Para determinar la potencia de bloqueo de cada derivado de 4AP: 3F4AP, 3Me4AP, 3MeO4AP, 3CF₃4AP y 2CF₃4AP (ver figura 16A), se realizó un análisis sobre cada curva I_{rel} que se obtiene de cada derivado de 4AP utilizando la ecuación de Hill. Como se mencionó anteriormente, la corriente I_{rel} , se determinó como la razón entre las amplitudes máximas de corriente de K⁺ en ausencia (control) y en presencia de cada análogo de 4AP para el rango de V comprendido entre 0 y 50 mV.

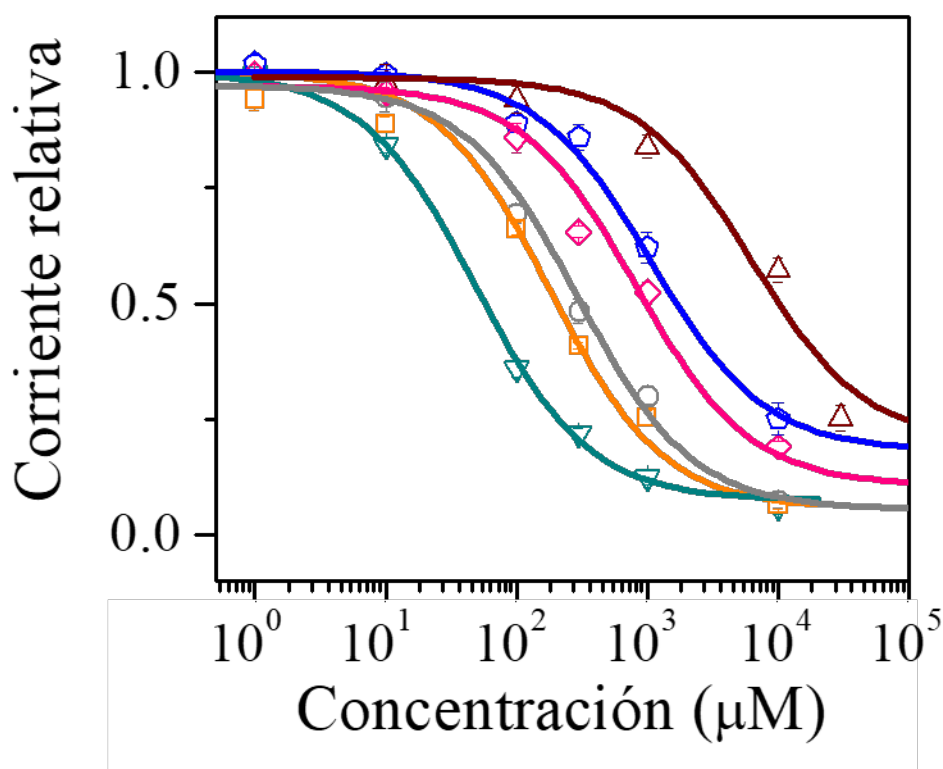


Figura 17. Curvas dosis-respuesta de los análogos de 4AP. Se grafica la corriente relativa en función de la concentración de cada análogo de 4AP obtenida a $V = 40$ mV. La línea continua representa el ajuste de la corriente relativa realizado con la ecuación de Hill (ecuación 11) para cada compuesto de 4AP: 3F4AP (naranja), 3Me4AP (verde), 3MeO4AP (rosa), 3CF₃4AP (azul) y 2CF₃4AP (café). Por comparación también se grafican los datos obtenidos para la 4AP (gris). Los valores de los parámetros obtenidos del ajuste con la ecuación 11 se muestran en la Tabla 1.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	95% I.C. (μM)	n
4AP	293	258-328	6
3F4AP	244	185-303	5
3Me4AP	40	36-43	4
3MeO4AP	807	762-853	4
3CF ₃ 4AP	1,061	914-1,209	6
2CF ₂ 4AP	12,776	8,838-16,714	3

Tabla 1. Valores de IC₅₀ y el intervalo de confianza del 95% obtenidos mediante el ajuste con la ecuación de Hill (ecuación 11) de las curvas I_{rel} de los análogos de 4AP de la figura 17. n indica el número de experimentos independientes realizados para cada compuesto.

La figura 17 muestra las curvas de la corriente relativa como función de la concentración de cada derivado de 4AP obtenidas a $V = 40$ mV. En la Tabla 1 se indican los valores de la IC₅₀ determinados mediante el análisis con el modelo de Hill. Los datos analizados se denotan por n y su valor promedio fue graficado junto con su respectivo error estándar del promedio ($n \pm$ SEM). De acuerdo con los resultados de la figura 17, el análogo de 4AP que presenta una mayor eficiencia de bloqueo sobre el canal *Shaker* fue el derivado 3Me4AP cuya potencia de bloqueo fue 7 veces mayor que el de la 4AP bajo las mismas condiciones experimentales. Por otra parte, los análogos 3MeO4AP y 3CF₃4AP fueron 3 y 4 veces menos potentes que la 4AP, respectivamente. Debido a que la curva I_{rel} obtenida para el análogo 2CF₃4AP no mostró un comportamiento sigmoideo en el rango de la [2CF₃4AP] medido (<10 mM) la respectiva curva I_{rel} para este compuesto se determinó hasta una concentración de 30 mM. El valor de la IC₅₀ determinado para este derivado fue 12,776 μM, siendo aproximadamente 40 veces menos potente que el valor obtenido en la 4AP. Por otra parte, la IC₅₀ de la 3F4AP fue ligeramente menor que la que se obtiene para la 4AP (244 y 293 μM respectivamente). Estos resultados son consistentes con el hecho de que pequeñas

modificaciones en la posición 3 de la estructura de la 4AP son permitidas mientras que modificaciones mayores (tamaño de la estructura del grupo funcional) disminuyen su potencia de inhibición [1].

5.2. ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA CON EL VOLTAJE DE IC_{50} .

El mecanismo canónico de bloqueo de los canales K_v por 4AP implica un cambio conformacional en la estructura del canal. Este mecanismo describe que el canal debe transitar, en primer lugar, hasta su configuración abierta, lo cual es un proceso dependiente del voltaje. Posteriormente, la 4AP en su forma cargada puede introducirse a través del poro del canal hasta colocarse en su sitio de unión [7,34]. Este hecho implica un movimiento de carga eléctrica a través de la región del poro del canal donde existe un campo eléctrico intenso [12]. Como consecuencia, la molécula de 4AP puede, además de bloquear el poro del canal, sintonizar el campo eléctrico a través del canal y por consecuencia es esperado que este tipo de inhibición del canal por 4AP sea un mecanismo dependiente de V . Para verificar este hecho y además comprobar que los derivados de 4AP bloquean al canal *Shaker* mediante el mismo mecanismo de la 4AP, en este estudio se determinó la IC_{50} para cada derivado en un rango de voltaje que vario de 0 a 50 mV. En la figura 18 se muestran las gráficas de la I_{rel} en función de la concentración de 4AP y de cada análogo de 4AP. En esta figura se puede observar que las curvas I_{rel} obtenida para la mayoría de los análogos de 4AP se corren hacia la derecha sobre el eje de la concentración conforme V incrementa de 10 a 50 mV. Este hecho implica que la IC_{50} determinada para compuesto de 4AP incrementa en función de V . Es decir, IC_{50} aumenta (en μM): de 200 a 350 para 4AP, de 160 a 304 para 3F4AP, de 37 a 50 para 3Me4AP, de 310 a 992 para 3MeO4AP y de 690 a 1150 para 3CF₃4AP conforme V cambia de 10 a 50mV. Este resultado muestra que el mecanismo de inhibición es un proceso dependiente del voltaje y que se requiere una mayor cantidad de moléculas de 4AP (y/o derivados) para bloquear el canal a valores de V más positivos. Este resultado es razonable ya que conforme V se despolariza, la cantidad de canales abiertos incrementa. Aunado a lo anterior, se observó un menor corrimiento en la curva I_{rel} vs [2CF₃4AP] lo cual indica una menor dependencia con V (IC_{50} cambió de 11,689 a 13,223 para este compuesto).

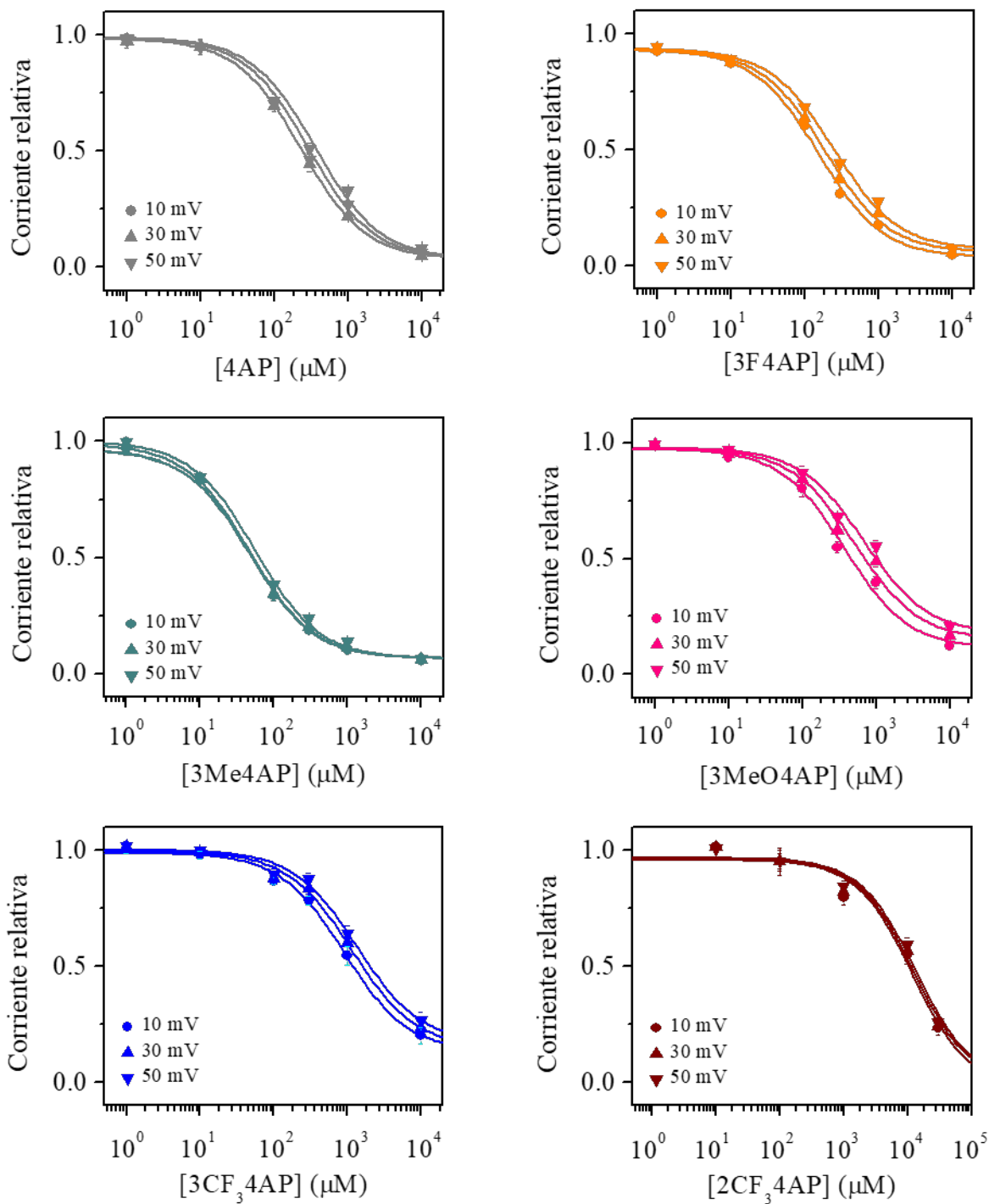


Figura 18. Dependencia de la IC_{50} con el voltaje. Gráfica de corriente relativa en función de la concentración de 4AP y análogos de 4AP obtenida a $V = 10, 30$ y 50 mV. La línea continua en color indica el ajuste realizado con la ecuación de Hill (ecuación 11) para cada compuesto: 4AP (gris), 3F4AP (naranja), 3Me4AP (verde), 3MeO4AP (rosa), 3CF₃ 4AP (azul) y 2CF₃ 4AP (café).

Para analizar la dependencia con V de la IC_{50} , los valores determinados para la 4AP fueron graficados en función de V . La figura 19 muestra este hecho para el rango de voltaje de 10 a 50 mV. Estos datos fueron ajustados utilizando el modelo de Woodhull (ecuación 20). Este modelo explica una posible dependencia de la IC_{50} con V . Además, permite determinar la fracción de campo eléctrico δ que la molécula de 4AP, o cada compuesto de 4AP, debe de atravesar para unirse en su sitio de unión a través del poro del canal para bloquearlo (ver sección de metodología). Los valores de δ y de IC_{50} a $V = 0$ mV ($*IC_{50}$) determinados mediante el ajuste de las curvas IC_{50} vs V con la ecuación 20 se muestran en la Tabla 2. Se puede notar que los valores de δ para la 4AP y sus derivados, a excepción del derivado $2CF_34AP$, varían entre 0.41 a 0.56. Este resultado implica que estas moléculas deben atravesar aproximadamente la mitad del campo eléctrico que se genera en la membrana para colocarse en el sitio de unión tal y como lo hace la 4AP.

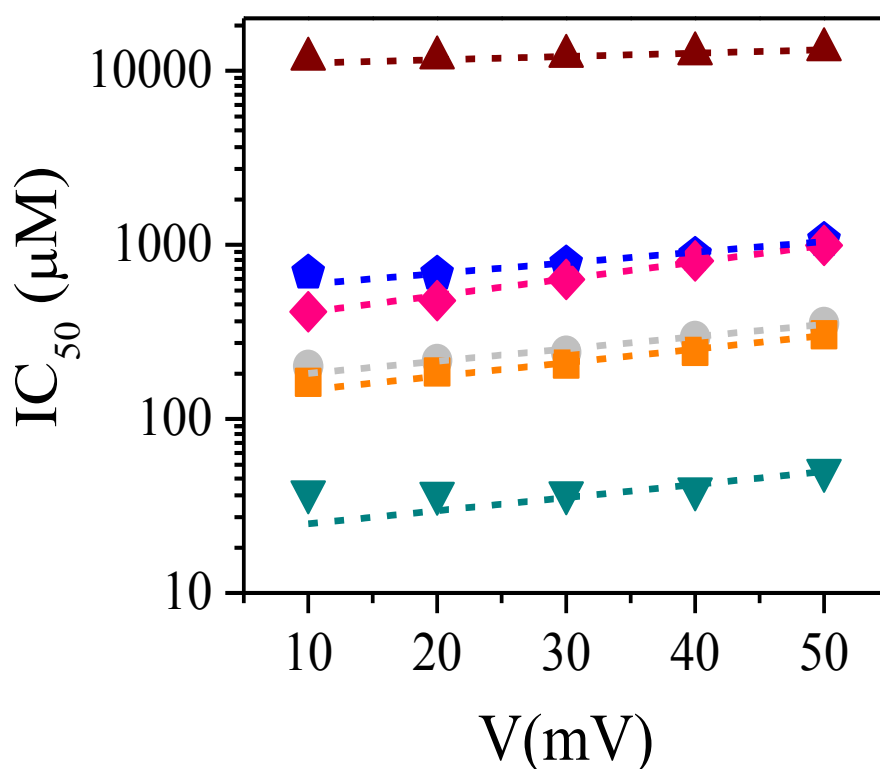


Figura 19. Dependencia de IC_{50} con el voltaje para 4AP y análogos. Grafica de IC_{50} en función de V para la 4AP y los derivados determinados en un rango de voltaje de 10 a 50 mV. Las líneas punteadas indican el ajuste con el modelo de Woodhull (ecuación 19) para cada compuesto: 4AP (gris), 3F4AP (naranja), 3Me4AP (verde), 3MeO4AP (rosa), 3CF₃4AP (azul) y 2CF₃4AP (café). Los valores del ajuste con el modelo de Woodhull se muestran en la Tabla 2.

Compuesto	*IC ₅₀ (μM)	δ	n
4AP	155±12	0.41±0.08	6
3F4AP	122.40±4.03	0.46±0.10	5
3Me4AP	21±1.0	0.43±0.10	4
3MeO4AP	328.50±17.17	0.56±0.02	4
3CF ₃ 4AP	516.00±51	0.46±0.10	6
2CF ₃ 4AP	10,583±2,093	0.117±0.032	3

Tabla 2. Parámetros de Woodhull a pH 7.4. Valores de IC₅₀ a V= 0 mV y δ obtenidos mediante el ajuste con el modelo de Woodhull para 4AP y análogos. *n* indica el número de experimentos independientes realizados para cada compuesto. *Los valores promedios de IC₅₀ se muestran ± DS.

5.3. ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA CON EL pH DE IC₅₀.

La 4AP es una base ($pK_a=9.6$) la cual puede existir en su forma cargada (protonada) o neutra (no protonada) dependiendo del pH del medio. En la Tabla 3 se muestran, en orden decreciente de su *basicidad*, los valores medidos de pK_a de la 4AP y sus derivados. Estos valores indican que a un pH fisiológico (~7.3), las moléculas de 4AP, 3Me4AP y 3MeO4AP se encontrarán, en su mayoría, en la forma protonada. Por otro lado, 3F4AP y 3CF₃4AP pueden existir tanto en su forma protonada como en su forma neutra a ese mismo valor de pH. La *lipofilidad* de los compuestos de 4AP fue determinada en términos del *coeficiente de partición octanol/agua* (logD) a un pH de 7.4 (Tabla 3). Se puede observar que los compuestos 4AP, 3Me4AP y 3MeO4AP tienen un valor de logD de -1.48, -1.23 y -0.76, respectivamente, lo que indica que se disuelven de manera más eficiente en un medio hidrófilo y, por lo tanto, poseen una baja permeabilidad en la *barrera hematoencefálica* (BBB, por sus siglas en inglés). Por otra parte, los compuestos 3F4AP, 3CF₃4AP y 2CF₃4AP tienen un logD de 0.41, 1.48 y 0.90 respectivamente, indicando que estas moléculas se

pueden diluir de manera más eficiente en un medio hidrofóbico (como lo es el octanol) y por lo tanto permean mejor la BBB.

Compuesto	pK_a	logD
3Me4AP	9.82 ± 0.06	-1.232 ± 0.008
4AP	9.58 ± 0.07	-1.478 ± 0.014
3MeO4AP	9.18 ± 0.02	-0.76 ± 0.03
3F4AP	7.65 ± 0.15	0.414 ± 0.002
3CF ₃ 4AP	7.17 ± 0.04	1.484 ± 0.009
2CF ₃ 4AP	7.0 ± 0.4	0.906 ± 0.006

Tabla 3. Valores de pK_a y logD determinados a pH = 7.4 de la 4AP y sus análogos. Se muestra el valor medio $\pm$ DS de $n = 4$ mediciones independientes para cada compuesto. Los datos fueron medidos por Alyssa D. Bravin & Karla M. Ramos-Torres, del Hospital General de Massachusetts y la Escuela de Medicina de Harvard [33].

Dado que el mecanismo de bloqueo de canales K_v por 4AP [7,9,34] describe que solo moléculas eléctricamente cargadas (protonadas) de 4AP bloquean al canal y como se mencionó anteriormente, la protonación de las moléculas de 4AP (y sus derivados) depende del pH del medio donde se encuentren disueltas, entonces esto implica que este tipo de bloqueo será dependiente del pH. Por esta razón, en este trabajo también se estudió la dependencia del bloqueo del canal *Shaker* variando el pH (interno y externo) de 6.8 a 9.1. Como se mencionó, la IC_{50} fue determinada a distintos valores de pH variando la concentración de 1 a 10,000 μ M, a excepción de los compuestos 3CF₃4AP a pH 9.1 y 2CF₃4AP a pH 6.8, 7.4 y 9.1, para los cuales se tuvo que incrementar el rango de la concentración hasta 30,000 μ M para poder ser determinada.

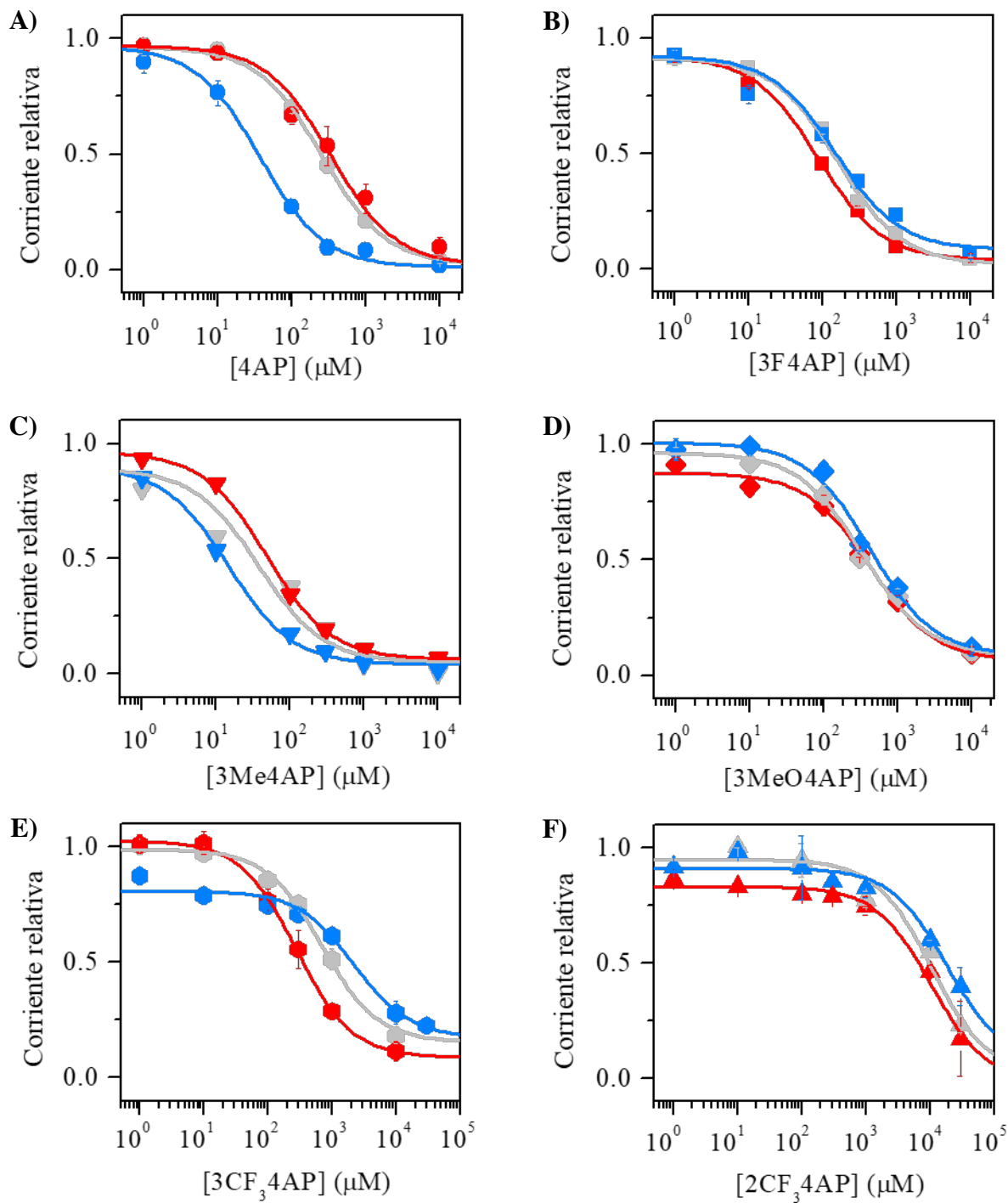


Figura 20. Dependencia de la IC_{50} con el pH. Corriente relativa a $V = 0$ mV en función de la concentración de los compuestos de 4AP a pH 6.8 (rojo), 7.4 (gris) y 9.1 (azul) de: (A) 4AP, (B) 3F4AP, (C) 3Me4AP, (D) 3MeO4AP, (E) 3CF₃4AP y (F) 2CF₃4AP. Las líneas continuas indican el ajuste con la ecuación de Hill (ecuación 11). Los parámetros de los ajustes se muestran en la Tabla 4.

En la figura 20 se muestran las curvas de corriente relativa (a $V = 0$ mV) en función de la concentración de 4AP y sus análogos a diferentes valores de pH. Se puede observar que los compuestos 4AP y 3Me4AP ($pK_a = 9.58$ y 9.82 , respectivamente) muestran una mejor capacidad de inhibición sobre el canal *Shaker* a un pH 9.1, mientras que los compuestos 3F4AP, 3CF₃4AP y 2CF₃4AP ($pK_a = 7.65$, 7.17 y 7.0 , respectivamente), muestran mejor capacidad de bloqueo a un pH 6.8. Los valores de IC_{50} obtenidos de los ajustes de la figura 20 se muestran en la Tabla 4.

	pH 6.8			pH 7.4			pH 9.1		
Compuesto	IC_{50} (μM)	95% I.C. (μM)	n	IC_{50} (μM)	95% I.C. (μM)	n	IC_{50} (μM)	95% I.C. (μM)	n
4AP	210	176-244	4	199	190-207	6	38	33-44	4
3F4AP	82	76-88	5	160	140-179	5	185	144-226	4
3Me4AP	66	56-76	6	39	36-42	4	15	13-17	5
3MeO4AP	357	325-390	4	355	327-382	4	492	446-538	5
3CF ₃ 4AP	249	150-348	5	690	633-747	6	2,188	1,317-3,057	4
2CF ₃ 4AP	10,448	7,909-12,985	4	11,903	5,111-18,695	3	18,215	2,776-33,653	2

Tabla 4. Parámetros del ajuste de I_{rel} con el modelo de Hill. Valores de IC_{50} de 4AP y el intervalo de confianza del 95% obtenidos mediante el ajuste de Hill (ecuación 11) para 4AP y análogos a $V = 0$ mV a distintos valores de pH. n indica el número de experimentos independientes realizados para cada compuesto.

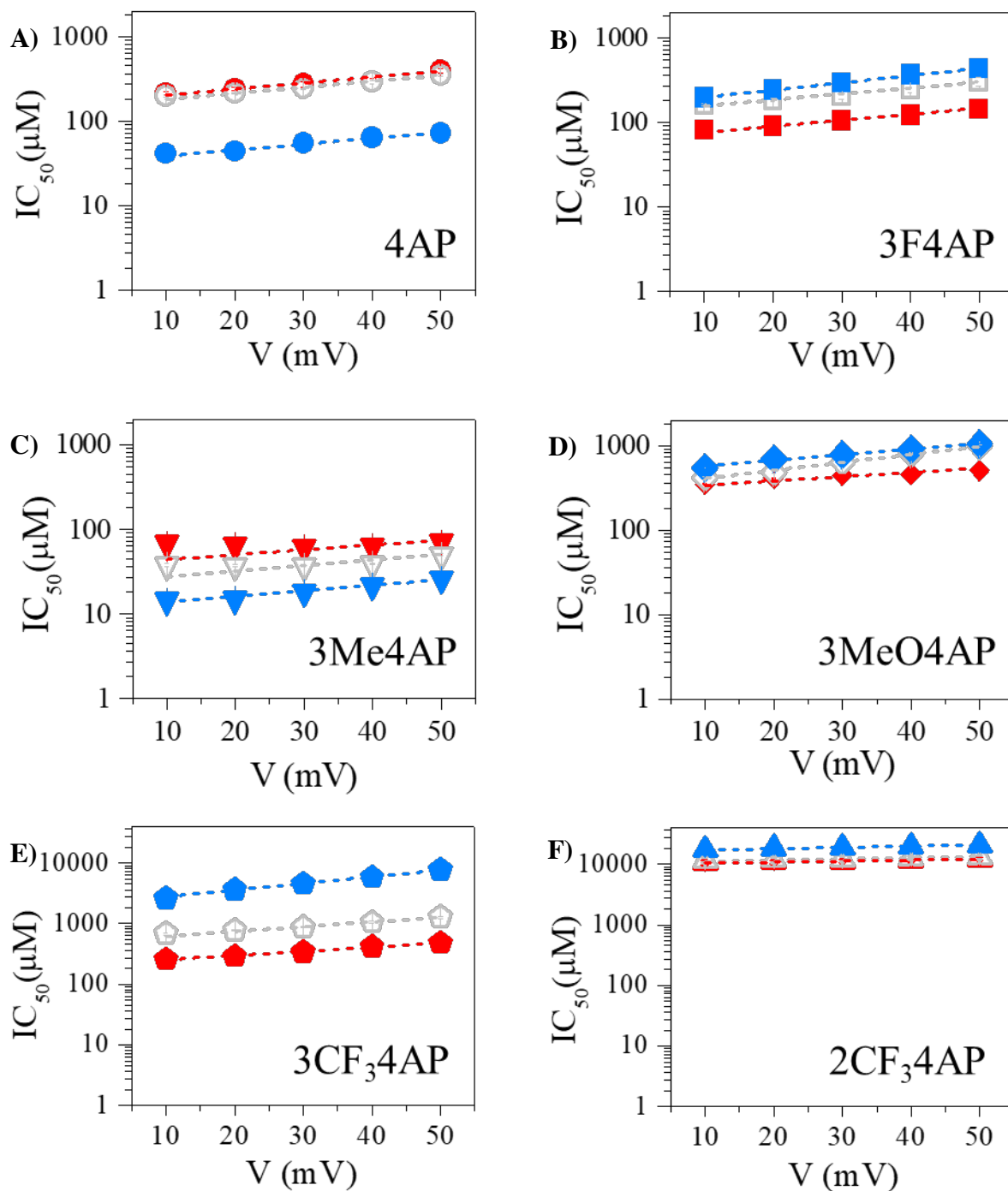


Figura 21. Dependencia simultanea de la IC_{50} con V y el pH. Gráfica de la IC_{50} de la 4AP y sus derivados en función de V a pH 6.8 (rojo), 7.4 (gris) y 9.1 (azul) de: (A), 4AP, (B), 3F4AP, (C), 3Me4AP, (D), 3MeO4AP, (E), 3CF₃4AP y (F) 2CF₃4AP. Las líneas punteadas indican el ajuste de la IC_{50} de cada compuesto utilizando el modelo de Woodhull (ecuación 19). Los parámetros de los ajustes se muestran en la Tabla 5. A modo de comparación, los valores de IC_{50} que se muestran en la figura 17 también son incluidos en estas gráficas (símbolos vacíos en color gris).

La dependencia de bloqueo con el voltaje de los derivados de 4AP también fue estudiada a diferentes valores de pH. En la figura 21 se muestran las gráficas de la IC_{50} en función de V para la 4AP y cada análogo de 4AP a pH 6.8, 7.4 y 9.1 en un rango de voltaje de 10 a 50 mV. Estos datos fueron analizados utilizando el modelo de Woodhull. Los valores obtenidos para la $*IC_{50}$ y δ se muestran en la Tabla 5. Se puede observar que los valores de δ varían en el rango de ~ 0.4 a ~ 0.5 . Este resultado sugiere que los compuestos de 4AP estudiados aquí se unen en el mismo sitio de unión dentro del poro del canal *Shaker* tal y como lo hace la 4AP. Finalmente, cabe hacer mención que para los ajustes realizados con el modelo de Woodhull a los datos medidos del derivado 2CF₃4AP se encontraron valores de δ alrededor de ~ 0.1 para las tres condiciones de pH, esto hecho se podría deber a la poca dependencia con el voltaje de la IC_{50} determinada de este derivado (figura 17).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se estudiaron las relaciones entre la estructura y actividad de los derivados de 4AP: 3-fluoro-4-aminopiridina (3F4AP), 3-metil-4-aminopiridina (3Me4AP), 3-metoxi-4-aminopiridina (3MeO4AP), 3-(trifluorometil)-4-aminopiridina (3CF₃4AP) y 2(trifluorometil)-4-aminopiridina (2CF₃4AP) (figura 16A). Para este fin, se realizó un estudio exhaustivo para caracterizar algunas de sus propiedades fisicoquímicas (pK_a y $\log D$), farmacológicas (IC_{50}) y biofísicas (dependencia de la IC_{50} con V y el pH). Se encontró que estos compuestos inhiben, aunque con una potencia distinta, las corrientes de K^+ generadas por el canal *Shaker*, el cual es el canal modelo funcional de la familia de canales tipo K_v . La capacidad de bloqueo de los análogos de 4AP fue cuantificada en términos de la IC_{50} . Primeramente, se determinó la IC_{50} a $V = 40$ mV de todos los compuestos de 4AP, incluyendo la 4AP. De forma específica, se encontró que el análogo 3Me4AP es aproximadamente 7 veces más potente que la 4AP, mientras que los compuestos 3MeO4AP y 3CF₃4AP son 3 y 4 veces, menos potentes, respectivamente. El derivado 2CF₃4AP mostró una baja capacidad de bloqueo sobre el canal *Shaker* al ser 40 veces, aproximadamente, menos potente que la 4AP.

La capacidad de bloqueo de los compuestos de 4AP también fue estudiada en función del pH. Se observó que para compuestos con un valor de pK_a más bajo, 3F4AP, 3CF₃4AP y 2CF₃4AP, mostraron una mejor capacidad de bloqueo a pH 6.8. Este resultado es consistente con el hecho de que bajo esta condición de pH la mayoría de esas moléculas se encuentran en su forma activa, es decir, su forma cargada-protonada. Por otra parte, los compuestos con un valor de pK_a mayor a 9, como lo son la 4AP y 3Me4AP, inhibieron de manera más efectiva la corriente de K^+ a un pH básico, lo que es congruente con la idea de que la forma neutra de este tipo de moléculas facilita su permeabilidad a través de la membrana celular y una vez que la han cruzado son capaces de protonarse y bloquear al canal desde el vestíbulo intracelular (ver figura 22).

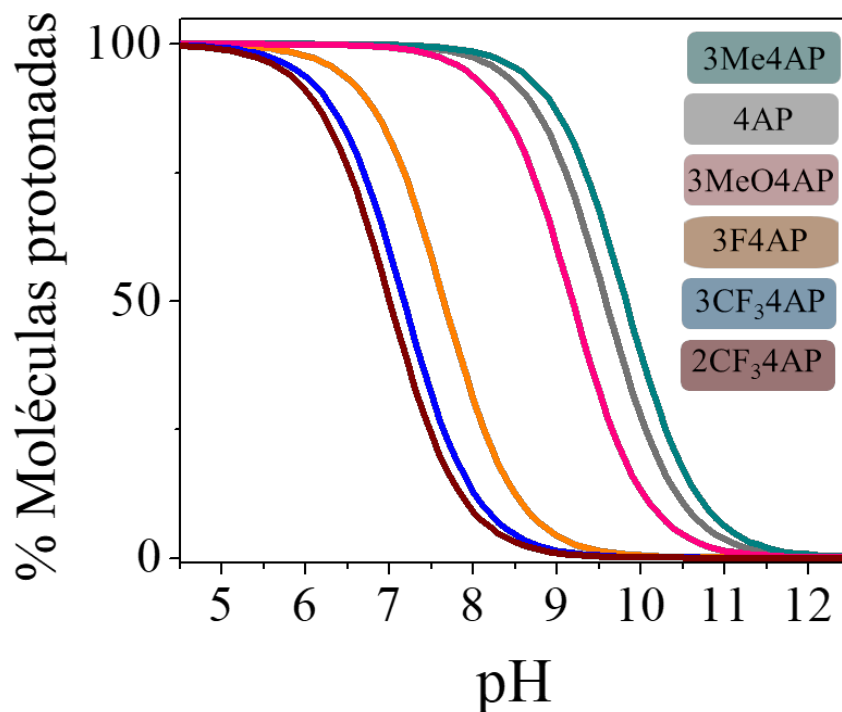


Figura 22. Protonación de moléculas de 4AP y sus derivados. Gráfica del porcentaje de protonación de 4AP y compuestos de 4AP en función del pH. Se grafica (en orden decreciente de su valor de pK_a): 3Me4AP (verde), 4AP (gris), 3MeO4AP (rosa), 3F4AP (naranja), 3CF₃4AP (azul) y 2CF₃4AP (café). Las curvas fueron modeladas utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch [49]. Cuando el valor del pH del medio es igual al valor del pK_a del compuesto, el porcentaje de moléculas cargadas es igual al 50%.

Al analizar la dependencia con V de la IC_{50} se observó que, para todos los compuestos, excepto 2CF₃4AP la cual mostró una baja capacidad de bloqueo comparado con la capacidad de la 4AP, la IC_{50} incrementa conforme V se va despolarizando. Este hecho se debe a que la cantidad de canales abiertos incrementa bajo estas condiciones de V y, por lo tanto, se requiere una mayor cantidad de moléculas de 4AP, o de sus derivados, para bloquear una mayor cantidad de canales abiertos. Estas observaciones fueron analizadas mediante el modelo de Woodhull [9] para determinar los valores de δ para cada derivado de 4AP (figura 19). Los valores encontrados de δ sugieren que la 4AP y/o derivados de 4AP deben atravesar aproximadamente el 50% del campo eléctrico que se genera dentro de la región del poro del canal. Este resultado, además, indica que estos compuestos comparten el mismo sitio de unión en el poro del canal *Shaker*, resultado que es consistente con el mecanismo canónico de bloqueo de los canales tipo K_v por 4AP [47,48].

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo se realizó una caracterización bioquímica, farmacológica y biofísica de algunos compuestos derivados de 4AP como posibles candidatos para ser utilizados en técnicas de imagenología y diagnóstico de EM mediante procedimientos de PET. Las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas determinadas permitieron seleccionar los compuestos con mayor potencial para desarrollarse como una sonda PET y explicar sus diferencias en términos de cinética y capacidad de bloqueo. En base a estos resultados, se concluye que el derivado 3Me4AP inhibe las corrientes de K^+ generadas por el canal *Shaker* de acuerdo al mecanismo de acción canónico de la 4AP y que dado su alta eficiencia de bloqueo este derivado muestra un gran potencial para ser desarrollado como radiotrazador y ser empleado en procedimientos de PET.

REFERENCIAS

- [1] Brugarolas, P., Sánchez-Rodríguez, J. E., Tsai, H. M., Basuli, F., Cheng, S. H., Zhang, X., ... & DeJesus, O. (2018). Development of a PET radioligand for potassium channels to image CNS demyelination. *Scientific reports*, 8(1), 1-16.
- [2] Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., McNamara, J., & Williams, S. (2001). Neuroscience 2nd edition. Sunderland (ma) sinauer associates. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10921/>
- [3] Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological reviews*, 52(4), 557-594.
- [4] Waxman, S. G. (1989). Demyelination in spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences*, 91(1-2), 1-14.
- [5] Brugarolas, P., Reich, D. S., & Popko, B. (2018). Detecting demyelination by PET: the lesion as imaging target. *Molecular imaging*, 17, 1536012118785471.
- [6] Kirsch, G. E., & Narahashi, T. (1978). 3, 4-diaminopyridine. A potent new potassium channel blocker. *Biophysical journal*, 22(3), 507. doi: 10.1016/S0006-3495(78)85503-9
- [7] Howe, J. R., & Ritchie, J. M. (1991). On the active form of 4-aminopyridine: block of K⁺ currents in rabbit Schwann cells. *The Journal of Physiology*, 433(1), 183-205. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018421
- [8] Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. physiol.*, 40, 4-7.
- [9] Woodhull, A. M. (1973). Ionic blockage of sodium channels in nerve. *The Journal of general physiology*, 61(6), 687-708.
- [10] Latorre, R., & Miller, C. (1983). Conduction and selectivity in potassium channels. *The Journal of membrane biology*, 71(1-2), 11-30. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01870671>.
- [11] Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A., ... & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*, 57(4), 473-508.
- [12] Bezanilla, F. (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(4), 323-332.
- [13] Sánchez-Rodríguez JE*, Hyde* HC, Sandtner* W, Lacroix JJ, Luk LYP, Frezza L, Bezanilla F. & Correa A., Structural Rearrangement of the Shaker K⁺ Channel Voltage Sensor in its Three Major Conformations (In preparation, to Biophysical J). *Equal contribution.

- [14] Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science*, 237(4816), 770-775.
- [15] Stefani, E., & Bezanilla, F. (1998). [17] Cut-open oocyte voltage-clamp technique. In *Methods in enzymology* (Vol. 293, pp. 300-318). Academic Press.
- [16] Olcese, R., Latorre, R., Toro, L., Bezanilla, F., & Stefani, E. (1997). Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K⁺ channels. *The Journal of general physiology*, 110(5), 579-589.
- [17] MacKinnon, R., Aldrich, R. W., & Lee, A. W. (1993). Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, 262(5134), 757-759.
- [18] Perozo, E., MacKinnon, R., Bezanilla, F., & Stefani, E. (1993). Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron*, 11(2), 353-358.
- [19] Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, 250(4980), 533-538.
- [20] Rodríguez-Rangel, S. & Sánchez-Rodríguez, J.E. (octubre, 2017). Caracterización biofísica de una membrana celular mediante un circuito equivalente. Presentado en la sesión de Posters del LX Congreso Nacional de Física. Monterrey, Nuevo León. México.
- [21] Choquet, D., & Korn, H. (1992). Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *The Journal of general physiology*, 99(2), 217-240.
- [22] Hermann, A., & Gorman, A. L. (1981). Effects of 4-aminopyridine on potassium currents in a molluscan neuron. *The Journal of general physiology*, 78(1), 63-86.
- [23] Kirsch, G. E., & Drewe, J. A. (1993). Gating-dependent mechanism of 4-aminopyridine block in two related potassium channels. *The Journal of general physiology*, 102(5), 797-816.
- [24] King, A. M., Menke, N. B., Katz, K. D., & Pizon, A. F. (2012). 4-aminopyridine toxicity: a case report and review of the literature. *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*, 8(3), 314-321. doi:10.1007/s13181-012-0248-9
- [25] Schafer Jr, E. W., Brunton, R. B., & Cunningham, D. J. (1973). A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicology and applied pharmacology*, 26(4), 532-538. doi: 10.1016/0041-008X (73)90291-3.
- [26] Bischoff, K., Morgan, S., Chelsvig, J., & Spencer, D. (2001). 4-aminopyridine poisoning of crows in the Chicago area. *Veterinary and human toxicology*, 43(6), 350-352.

- [27] Buyukuysal, R. L., & Wurtman, R. J. (1990). 4-Aminopyridine increases acetylcholine release without diminishing membrane phosphatidylcholine. *Journal of neurochemistry*, 54(4), 1302-1309. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb01963.x.
- [28] Simpson, L. L. (1986). A preclinical evaluation of aminopyridines as putative therapeutic agents in the treatment of botulism. *Infection and immunity*, 52(3), 858-862.
- [29] Sherratt, R. M., Bostock, H., & Sears, T. A. (1980). Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *Nature*, 283(5747), 570-572. doi: 10.1038/283570a0.
- [30] Lemeignan, M., Millart, H., Letteron, N., Lamiabie, D., Josso, J., Choisy, H., & Lechat, P. (1982). The ability of 4-aminopyridine and 3, 4-diaminopyridine to cross the blood-brain barrier can account for their difference in toxicity. In *Aminopyridines and Similarly Acting Drugs: Effects on Nerves, Muscles and Synapses* (p. 222). Pergamon.
- [31] Keogh, M., Sedehizadeh, S., & Maddison, P. (2011). Treatment for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2). doi: 10.1002/14651858.CD003279.
- [32] Leung, G., Sun, W., Brookes, S., Smith, D., & Shi, R. (2011). Potassium channel blocker, 4-aminopyridine-3-methanol, restores axonal conduction in spinal cord of an animal model of multiple sclerosis. *Experimental neurology*, 227(1), 232-235. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.11.004.
- [33] Rodríguez-Rangel, S., Bravin, A. D., Ramos-Torres, K. M., Brugarolas, P., & Sánchez-Rodríguez, J. E. (2020). Structure-activity relationship studies of four novel 4-aminopyridine K⁺ channel blockers. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. doi:10.1038/s41598-019-56245-w
- [34] Armstrong, C. M., & Loboda, A. (2001). A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action. *Biophysical journal*, 81(2), 895-904.
- [35] McCormack, K., Joiner, W. I., & Heinemann, S. H. (1994). A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent Shaker K⁺ channels. *Neuron*, 12(2), 301-315.
- [36] National Multiple Sclerosis Society (2019-2020) Recuperado de: <https://www.nationalmssociety.org/>
- [37] Miyamoto, K., Simpson, D., & Gurdon, J. B. (2015). Manipulation and in vitro maturation of *Xenopus laevis* oocytes, followed by intracytoplasmic sperm injection, to study embryonic development. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (96), e52496. doi:10.3791/52496
- [38] Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channel. *Critical Reviews in Biochemistry*, 22(4), 317-387. doi: 10.3109/10409238709086960
- [39] Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., & Maire, P. (2008). The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22(6), 633-648.

- [40] Haynes, L. W., Kay, A. R., & Yau, K. W. (1986). Single cyclic GMP-activated channel activity in excised patches of rod outer segment membrane. *Nature*, 321(6065), 66-70.
- [41] Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.
- [42] Chay, T. R. (1983). Eyring rate theory in excitable membranes: application to neuronal oscillations. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(15), 2935-2940.
- [43] Eyring, H. (1935). The activated complex in chemical reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 3(2), 107-115.
- [44] Eyring, H. (1938). The theory of absolute reaction rates. *Transactions of the Faraday Society*, 34, 41-48.
- [45] Ptáček, P., Šoukal, F., & Opravil, T. (2018). Introduction to the Transition State Theory. *Introducing the Effective Mass of Activated Complex and the Discussion on the Wave Function of this Instanton*, 27.
- [46] Heginbotham, L., & Kutluay, E. (2004). Revisiting voltage-dependent relief of block in ion channels: a mechanism independent of punchthrough. *Biophysical journal*, 86(6), 3663-3670. doi:10.1529/biophysj.103.039412
- [47] Kirsch, G. E., Shieh, C. C., Drewe, J. A., Vener, D. F., & Brownt, A. M. (1993). Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron*, 11(3), 503-512.
- [48] Caballero, N. A., Meléndez, F. J., Niño, A., & Muñoz-Caro, C. (2007). Molecular docking study of the binding of aminopyridines within the K⁺ channel. *Journal of molecular modeling*, 13(5), 579-586. doi: 10.1007/s00894-007-0184-9.
- [49] Po, H. N., & Senozan, N. M. (2001). The Henderson-Hasselbalch equation: its history and limitations. *Journal of Chemical Education*, 78(11), 1499. doi: 10.1021/ed078p1499
- [50] Li Di Edward H. Kerns (2016) Drug-Like Properties (Second Edition) Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization, 141-159. doi.org/10.1016/B978-0-12-801076-1.00010-1
- [51] D. A. Smith, L. Cucurull-Sanchez. (2007) Comprehensive Medicinal Chemistry II. Volume 5, 957-969. doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00160-7.

GLOSARIO

Basicidad. Que tan básico es un compuesto, es decir, la capacidad que tiene para ser aceptor de protones.

Barrera hematoencefálica. Es una entrada anatómica esencial para el mantenimiento del homeostasis y el entorno fisiológico del sistema nervioso central [50]. Esta barrera altamente selectiva está formada por células endoteliales y separa al cerebro de fluidos extracelulares y de la sangre que circula alrededor de él.

Canales iónicos. Son proteínas transmembrana que se especializan en el transporte selectivo de iones. De acuerdo a su capacidad selectiva existen canales de sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), cloruro (Cl^-) y protones (H^+).

Células competentes. Bacterias que permiten el paso de plásmidos a través de su membrana celular.

Coefficiente de partición octanol/agua: Este coeficiente simula el carácter hidrófobo de una sustancia o la afinidad hacia lípidos de una sustancia disuelta en agua. Para ello se mide la solubilidad de una sustancia en dos disolventes, el octanol, un compuesto orgánico que simula un material lipídico, y agua.

Esclerosis Múltiple. Enfermedad autoinmune neurodegenerativa, en la cual la mielina que recubre a los axones se desprende causando daño axonal en el sistema nervioso central.

Farmacocinética. Describe la serie de procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por un organismo.

In vitro. Experimento realizado en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Lipofilidad.: es el parámetro fisicoquímico clave que vincula la solubilidad, la permeabilidad de la membrana y, por lo tanto, la absorción y distribución de un fármaco con la ruta y la tasa de depuración (metabólica o renal) [51].

Membrana celular. Es una estructura laminar constituida por una bicapa lipídica que define el límite de la célula y separa el medio acuoso extracelular y del intracelular. En ella se encuentran incrustadas diferentes tipos de proteínas, las cuales realizan una gran variedad de funciones importantes para la vida celular.

Mielina. Estructura multilaminar formada en su mayoría de lípidos (70%) que recubre al axón de la neurona.

Nervio amielinico. Nervio o fibra nerviosa carente de mielina.

Nervio desmielinizado. Que ha perdido la mielina.

Nervio mielinico. Nervio o fibra nerviosa que tiene mielina.

Nodo de Ranvier. Separación entre dos vainas de mielina, donde el axón queda expuesto al líquido extracelular.

pH. Logaritmo negativo base 10 de la cantidad de protones o iones hidrógeno presentes en un medio:

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$

pKa. Logaritmo negativo base 10 de la constante de equilibrio K.

$$pKa = -\log_{10} K$$

Sinapsis neuronal. Transmisión de información entre dos neuronas o más neuronas. A través de la sinapsis se propaga el impulso nervioso.

Sistema nervioso central. Parte del sistema nervioso compuesto por el cerebro y la medula espinal. Procesa y emite señales de información proveniente de todo el organismo.

ANEXOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Rodríguez-Rangel, S., Bravin, A. D., Ramos-Torres, K. M., Brugarolas, P., & Sánchez-Rodríguez, J. E. (2020). Structure-activity relationship studies of four novel 4-aminopyridine K⁺ channel blockers. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. doi:10.1038/s41598-019-56245-w.

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

Rodríguez-Rangel, M.S., Brugarolas, P. & Sánchez-Rodríguez, J.E. (octubre, 2018) Análisis biofísico del mecanismo de inhibición de la corriente de potasio del canal *Shaker* dependiente del voltaje por 4-aminopiridina y derivados fluorizados. Presentado en la sesión de Posters del LXI Congreso Nacional de Física. Puebla, Puebla, México.

Rodríguez-Rangel, M.S., Bravin, A.D., Ramos-Torres, K., Brugarolas, P. & Sánchez-Rodríguez, J.E. (septiembre, 2019) Screening the blocking capacity of novel 4-aminopyridine analogs towards Shaker potassium channel. Presentado en la sesión de Posters del SGP 73rd annual symposium / SOBLA annual meeting “Structural basis of electrical signaling in the nervous system and heart”. Valparaíso, Chile.

OPEN

Structure-activity relationship studies of four novel 4-aminopyridine K⁺ channel blockers

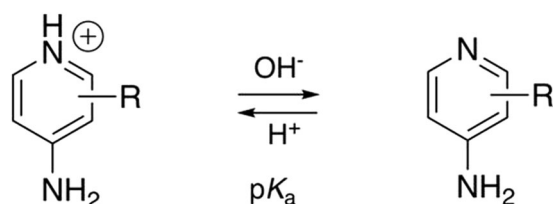
Sofia Rodríguez-Rangel¹, Alyssa D. Bravin², Karla M. Ramos-Torres², Pedro Brugarolas^{2*} & Jorge E. Sánchez-Rodríguez^{1*}

4-Aminopyridine (4AP) is a specific blocker of voltage-gated potassium channels (K_v1 family) clinically approved for the symptomatic treatment of patients with multiple sclerosis (MS). It has recently been shown that [¹⁸F]3F4AP, a radiofluorinated analog of 4AP, also binds to K_v1 channels and can be used as a PET tracer for the detection of demyelinated lesions in rodent models of MS. Here, we investigate four novel 4AP derivatives containing methyl (-CH₃), methoxy (-OCH₃) as well as trifluoromethyl (-CF₃) in the 2 and 3 position as potential candidates for PET imaging and/or therapy. We characterized the physicochemical properties of these compounds (basicity and lipophilicity) and analyzed their ability to block Shaker K⁺ channel under different voltage and pH conditions. Our results demonstrate that three of the four derivatives are able to block voltage-gated potassium channels. Specifically, 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP) was found to be approximately 7-fold more potent than 4AP and 3F4AP; 3-methoxy- and 3-trifluoromethyl-4-aminopyridine (3MeO4AP and 3CF₃4AP) were found to be about 3- to 4-fold less potent than 4AP; and 2-trifluoromethyl-4-AP (2CF₃4AP) was found to be about 60-fold less active. These results suggest that these novel derivatives are potential candidates for therapy and imaging.

In normally myelinated neurons, voltage-gated potassium (K⁺) channels K_v1.1 and K_v1.2 are clustered near the nodes of Ranvier beneath the myelin sheath^{1,2}. Upon demyelination, these channels become exposed, migrate through the demyelinated segment and concomitantly increase in expression several fold^{3–9}. This aberrant redistribution of K⁺ channels impairs conduction of action potentials, which leads to neurological deficits^{3,10–14}. 4-aminopyridine (4AP) is a selective blocker of K_v channels^{15–21} used clinically to improve neurological conduction in people with multiple sclerosis (MS)^{22–26} and other demyelinating diseases^{27,28}. Mechanistically, 4AP blocks the exposed K⁺ channels and therefore enhances conduction^{16,17,19,20,29–32}. Recently, it has been shown that the fluorinated derivative 3-fluoro-4-aminopyridine (3F4AP) also binds to these channels³³ and, once labeled with ¹⁸F, can serve to detect areas of demyelination using positron emission tomography (PET)^{33–37}. Given the potential of these molecules as therapeutic and imaging agents, we set out to investigate four new 4AP derivatives and their structure-activity relationships.

Prior work on the structure-activity relationship studies of 4AP derivatives has shown that small modifications on the 3 position are permitted^{33,38–40} and that the *in vivo* potency is highly correlated with the pK_a^{29,31}. 4AP and derivatives are basic compounds that exist in the protonated or neutral form depending on the pH of the medium (Fig. 1). The protonated form mimics a large K⁺ ion and is required to block the channel⁴¹, while the neutral form is required for the drug to get across the blood-brain barrier (BBB)⁴². In addition, the pharmacokinetic properties are largely dependent on the lipophilicity and pK_a of these molecules. For example, 4AP has a pK_a of 9.6, resulting in high potency but slow penetration into the CNS, which explains why a slow release formulation is required for therapy^{22,23,43}. 3F4AP, on the other hand, has a pK_a of 7.6 which results in a faster CNS penetration, which is favorable for PET imaging³³. Additional aminopyridine derivative examples include 3, 4-diaminopyridine (3, 4-DAP), a potent K_v channel blocker⁴⁰ with low BBB permeability⁴², used clinically

¹Departamento de Física, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, 44430, Mexico. ²Gordon Center for Medical Imaging, Department of Radiology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, 02114, USA. *email: pbrugarolas@mgh.harvard.edu; jorge.srodriguez@academicos.udg.mx



R: H, F, CH₃, OCH₃, CH₂OH, CF₃, NH₂

Figure 1. Acid-base equilibrium of 4-aminopyridine derivatives.

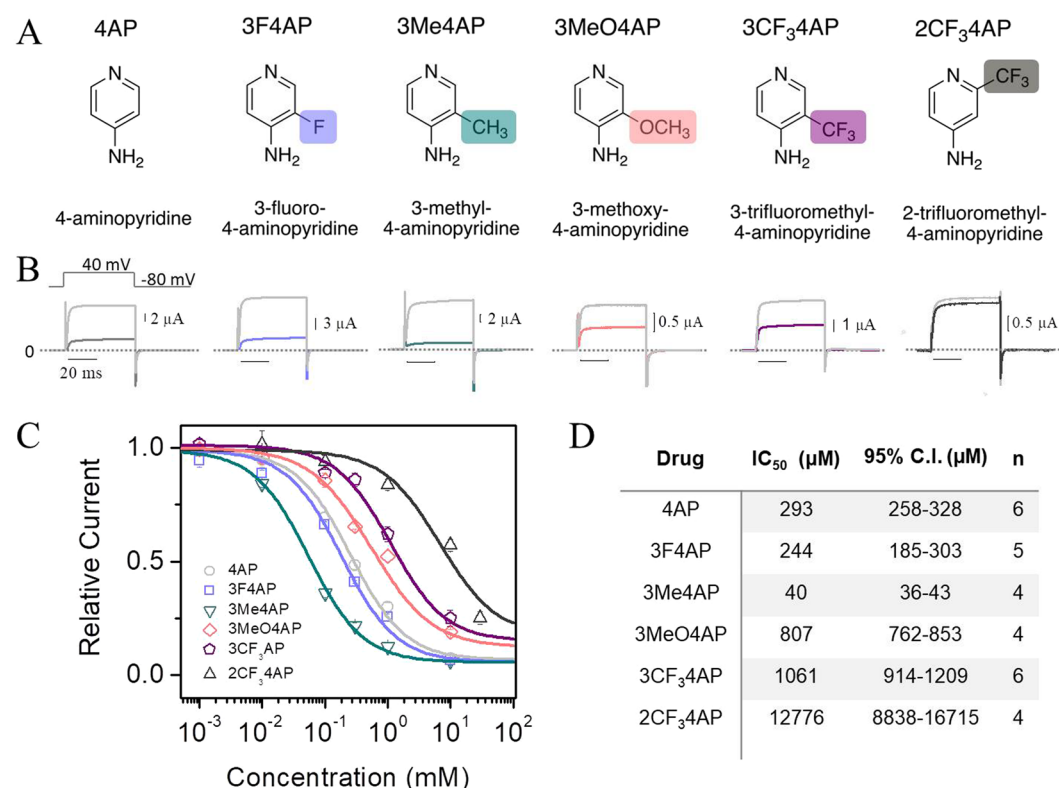


Figure 2. Inhibition of K⁺ currents by 4AP analogs. (A), Chemical structures of studied 4AP analogs. From left to right: 4-aminopyridine (4AP), 3-fluoro-4-aminopyridine (3F4AP), 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP), 3-methoxy-4-aminopyridine (3MeO4AP), 3-trifluoromethyl-4-aminopyridine (3CF₃4AP), 2-trifluoromethyl-4-aminopyridine (2CF₃4AP). (B), Representative recordings of K⁺ current acquired from four to six different oocytes expressing the Shaker K_v ion channel before (gray) and after (colored line) addition of 1 mM of each 4AP analog. Currents were elicited by 50 ms depolarization steps from −100 to 50 mV in increments of 10 mV. For clarity, only the inhibition of K⁺ current by cumulative concentration of 4AP and derivatives recorded at 40 mV is shown. The dashed line indicates current at a value of zero and the 20 ms horizontal bar represents the time scale for all recordings. (C), Relative current as a function of the concentration of 4AP analogs obtained at 40 mV and pH 7.4. (D), IC₅₀ of each 4AP analog and 95% confidence interval obtained by fitting the data with the Hill equation (Eq. 1). n represents the number of times each drug was tested in separate oocytes.

for Lambert-Eaton syndrome⁴⁴, a disorder of peripheral nervous system, and 4-aminopyridine-3-methanol (4AP3MeOH) which has been shown to enhance conduction in laboratory models of spinal cord injury and MS^{39,45} but that has minimal permeability to the BBB and requires intrathecal administration.

Given the correlations between the pK_a, lipophilicity and molecular size with *in vivo* activity, we hypothesized that the derivatives 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP), 3-methoxy-4-aminopyridine (3MeO4AP), 3-trifluoromethyl-4-aminopyridine (3CF₃4AP) and 2-trifluoromethyl-4-aminopyridine (2CF₃4AP) would be permeable to the CNS and be suitable candidates for therapy and/or imaging (Fig. 2A). These molecules are particularly interesting as potential PET radioligands since they are amenable to labeling with ¹¹C, which provides

Drug	pK _a	logD
3Me4AP	9.82 ± 0.06	−1.232 ± 0.008
4AP	9.58 ± 0.07	−1.478 ± 0.014
3MeO4AP	9.18 ± 0.02	−0.76 ± 0.03
3F4AP	7.65 ± 0.15	0.414 ± 0.002
2CF ₃ 4AP	7.0 ± 0.4	0.906 ± 0.006
3CF ₃ 4AP	7.17 ± 0.04	1.484 ± 0.009

Table 1. pK_a and logD (at pH = 7.4) values of the 4AP analogs.

some advantages over ¹⁸F-labeled radioligands. While ¹¹C has a significantly shorter half-life compared to ¹⁸F (20 vs. 110 min) limiting its use to sites with a cyclotron, ¹¹C-labeled tracers tend to be easier to radiolabel and their short half-life allows for multiple scans on the same subject and day; an important advantage during tracer development and validation. In fact, methods to produce radiolabeled [¹¹C]3MeO4AP, [¹¹C]2CF₃4AP and [¹¹C]3CF₃4AP^{46,47} have recently been communicated but evidence that these compounds are able to bind to K_v channels is lacking.

Results

Basicity and lipophilicity of 4AP analogs. The chemical structures and the abbreviations of the 4AP analogs studied are shown in Fig. 2A. Table 1 shows the pK_a values of these compounds in order of decreasing basicity. As shown on the table: 4AP, 3Me4AP, and 3MeO4AP are more basic with pK_a values higher than 9, while 3F4AP, 3CF₃4AP and 2CF₃4AP are less basic with pK_a values lower than 8. This indicates that the former are mostly protonated at physiological pH, while the latter exist both in the protonated and neutral forms at physiological pH.

In terms of lipophilicity 4AP, 3Me4AP, and 3MeO4AP were found to have octanol/water partition coefficient values at pH 7.4 of −1.48, −1.23 and −0.76 (Table 1). This indicates that these compounds preferably partition in the aqueous layer and may have lower penetration of the BBB by passive diffusion. In contrast, 3F4AP, 2CF₃4AP and 3CF₃4AP show partition coefficient values of 0.41, 1.48 and 0.91 (Table 1) indicating that these compounds preferably partition in the octanol layer and may have a faster permeation of the BBB. In fact, 4AP is known to have a slow penetration of the BBB while 3F4AP has a fast BBB penetration.

Both pK_a and logD trends can be rationalized by the electron-donating or electron-withdrawing nature of the substituent. As the electron-withdrawing strength of the group increases, the dipole of the pyridine nitrogen decreases resulting in a more acidic proton. When comparing the 2CF₃4AP with 3CF₃4AP, substitution in the 2 position results in more polar molecule. In general, the lower basicity (lower pK_a) the greater the lipophilicity (higher logD) as the lower basicity results in a greater fraction of the neutral form which preferably partitions in the octanol layer. In the case of 3Me4AP, this compound is more basic than 4AP (higher pK_a) and yet more lipophilic (lower logD), likely due to the lipophilicity of the methyl group compared to a proton.

Blocking capacity of 4AP analogs. K⁺ currents were measured in *Xenopus* oocytes expressing the commonly studied voltage-gated K⁺ channel Shaker from *D. melanogaster*. In order to determine the relative blocking capacity, each drug was applied to the same oocyte at increasing concentrations ranging from 1 to 10,000 μM. Then, the relative current was determined as the ratio between the maximal amplitude of the K⁺ current in the absence and in the presence of each drug. Figure 2B shows five representative K⁺ current traces from Shaker elicited at 40 mV, before and after addition of 1,000 μM of each drug. Figure 2C shows the relative current as a function of the concentration of each 4AP analog tested. The Hill equation (Eq. 1) was fitted to the dose-response curves and used to calculate the IC₅₀ for each drug at pH 7.4. Hill parameters are summarized in Fig. 2D. Our results indicate that the relative potency of blocking, from highest to lowest, of these 4AP analogs is: 3Me4AP, 3F4AP, 4AP, 3MeO4AP, 3CF₃4AP and 2CF₃4AP. Specifically, our results show that at pH 7.4 and voltage 40 mV 3Me4AP is approximately 7-fold more potent than 4AP, 3F4AP is comparable to 4AP, and 3MeO4AP and 3CF₃4AP are approximately 3- and 4- fold less potent than 4AP, respectively, and 2CF₃4AP was found to have very little capacity of blocking the channel (~50% at 10 mM). These results are in agreement with the prior observation that small modifications in the 3 position of 4AP are permitted, whereas large modifications significantly diminish the potency of blockage³³.

Dependence of the blocking on pH. Since the canonical mechanism describes that only positively-charged molecules can block the channel⁴¹ and protonation of the drug is dependent on the pH, we studied the blocking of the channel (IC₅₀) at pH 6.8, 7.4 and 9.1. To avoid a gradient in pH, both internal and external solutions were replaced.

Panels A to E of Fig. 3 show the effects on the relative current as a function of concentration for each 4AP derivative at the different pH values. Interestingly, the analogs with high pK_a (4AP, 3Me4AP and 3MeO4AP) showed higher blocking ability (lower IC₅₀) at higher pH, whereas the analogs with lower pK_a showed higher blocking ability at lower pH. Since 4AP and derivatives bind from the intracellular side¹⁶, we hypothesize that in the case of the compounds with high pK_a the limiting factor is the permeability of the drug through the oocyte membrane at low pH. In the case of the compounds with low pK_a, these drugs are able to permeate through the membrane even at low pH and the limiting factor is the fraction of protonated or active form of the drug. Table 2 summarizes the IC₅₀ values of each analog at different pH values calculated by fitting the Hill equation to the data.

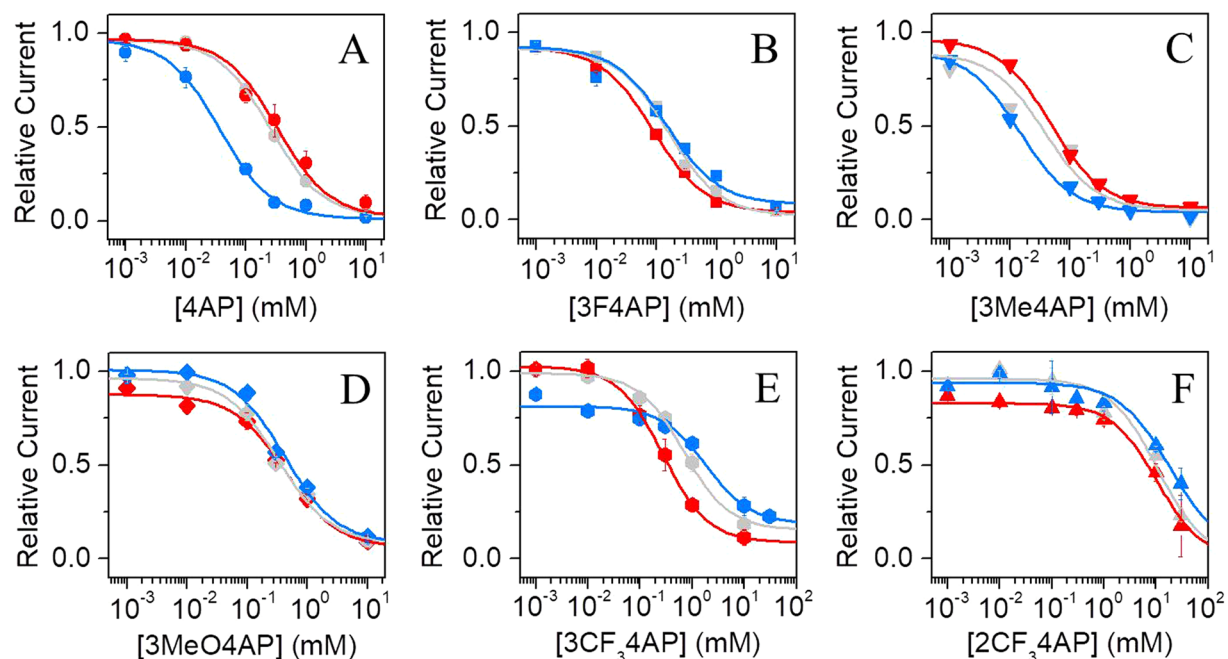


Figure 3. IC_{50} at 0 mV and pH dependence. Relative current vs. concentration at 0 mV at pH of 6.8 (red), 7.4 (gray) and 9.1 (blue) of: (A), 4AP; (B), 3F4AP; (C), 3Me4AP; (D), 3MeO4AP and, (E), 3CF₃4AP; (F), 2CF₃4AP. Continuous lines in panels A to E represent the fits with the Hill equation (Eq. 1). Hill parameters are summarized on Table 2.

Drug	pH 6.8			pH 7.4			pH 9.1		
	IC_{50} (μ M)	95% C.I. (μ M)	n	IC_{50} (μ M)	95% C.I. (μ M)	n	IC_{50} (μ M)	95% C.I. (μ M)	n
4AP	210	176–244	4	199	190–207	6	38	33–44	4
3F4AP	82	76–88	5	160	140–179	5	185	144–226	4
3Me4AP	66	56–76	6	39	36–42	4	15	13–17	5
3MeO4AP	357	325–390	4	355	327–382	4	492	446–538	5
3CF ₃ 4AP	249	150–348	5	690	633–747	6	2188	1317–3057	4
2CF ₃ 4AP	10,448	7,909–12,985	4	11,903	5,111–18,695	4	18,215	2776–33,653	2

Table 2. IC_{50} values of 4AP analogs at 0 mV: Hill parameters.

Dependence of the blocking on voltage. It is known that blocking of K_V channels by 4AP involves sequential voltage-dependent rearrangements of the protein³¹. During this process, K_V channels must transition to the open conformation before 4AP can bind to its site inside the channel pore. Therefore, it is expected that the blocking of the studied 4AP derivatives will be voltage-dependent as it has been shown for 4AP⁴⁸. For this reason, we studied the IC_{50} at several voltage values. We recorded K^+ currents from Shaker channel in the range of voltage from -100 to 50 mV (see Fig. S1) and calculated the IC_{50} of each drug and voltage as described above. Panels A to E of Fig. 4 show the measured relative current as a function of the concentration of each 4AP analog at several voltage values. For clarity, only representative curves at $+10$, $+30$ and $+50$ mV are shown. From Fig. 4, it can be observed that the calculated IC_{50} for each 4AP analog increased with voltage (in μ M): from 200 to 350 for 4AP, from 160 to 304 for 3F4AP, from 37 to 50 for 3Me4AP, from 310 to 992 for 3MeO4AP, and from 690 to 1150 for 3CF₃4AP. These results confirm that blocking of the channel is voltage-dependent and that it is more difficult to block the passage of K^+ ions at higher voltages than at lower voltages.

Furthermore, this experiment allowed us to calculate the fractional distance through the membrane electrical field that each molecule travels to bind to its site during the experiment⁴⁹. The Woodhull equation (Eq. 2) describes that the relationship between IC_{50} and voltage is dependent on δ . By fitting the IC_{50} vs. V curves shown in Fig. 4D to the Woodhull equation, we were able to calculate δ for each 4AP analog. The fitted parameters from this analysis are shown on Table 3. Since δ values varied between 0.41 and 0.56, we conclude that these molecules have to travel approximately across one half of the membrane electric field. The similarity of the δ values between 4AP and the other derivatives suggests that these drugs share a common binding site.

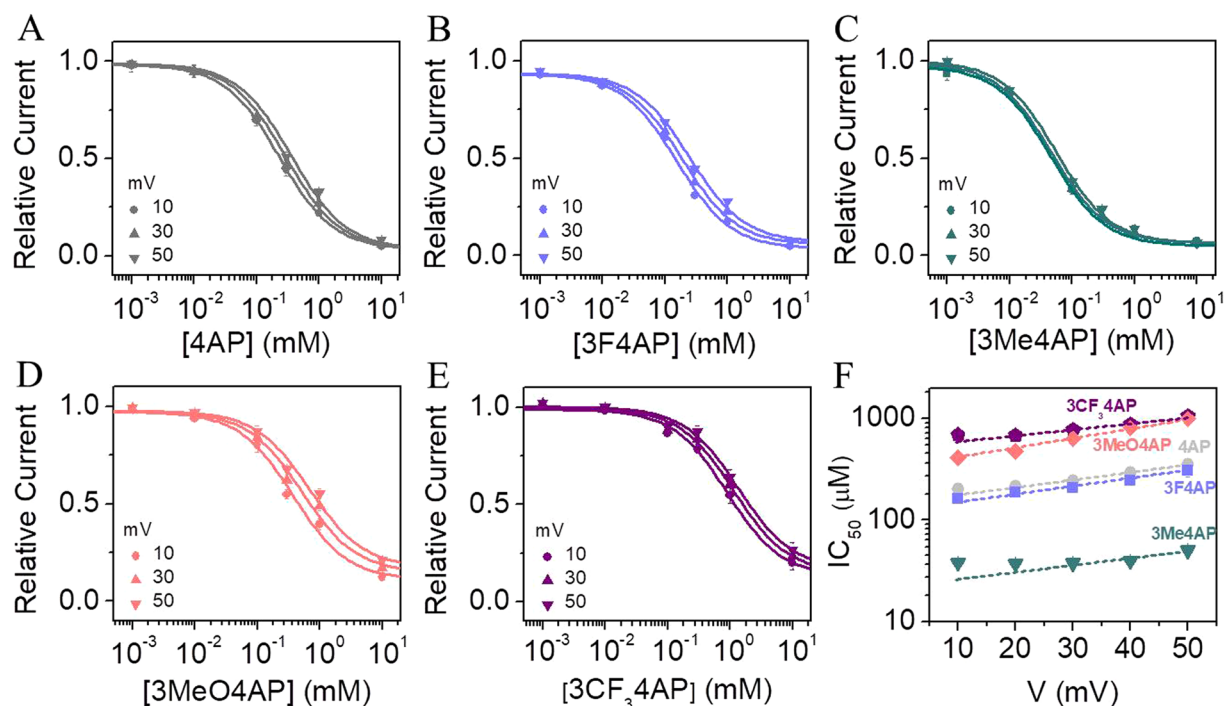


Figure 4. Voltage-dependence of the IC_{50} for each 4AP analog. Relative current as a function of concentration of (A) 4AP, (B) 3F4AP, (C) 3Me4AP, (D) 3MeO4AP, and (E) 3CF₃4AP, obtained at different values of voltage. For clarity only the curves obtained at 10, 30 and 50 mV are shown. Solid lines represent the fits of the data with the Hill equation (Eq. 1). (F) IC_{50} vs. voltage curves of 4AP analogs determined in the range of voltage from 10 to 50 mV. IC_{50} values were obtained from the analysis of the data of the panels A to E. Dashed lines represent the fits with the Woodhull model (Eq. 2). Woodhull parameters δ and IC_{50} at $V = 0$ mV are shown on Table 3.

Drug	* IC_{50} (μ M)	δ	n
4AP	155 $\pm$ 12	0.41 $\pm$ 0.08	6
3F4AP	122 $\pm$ 4	0.46 $\pm$ 0.10	5
3Me4AP	21 $\pm$ 1	0.43 $\pm$ 0.10	4
3MeO4AP	329 $\pm$ 17	0.56 $\pm$ 0.02	4
3CF ₃ 4AP	516 $\pm$ 51	0.46 $\pm$ 0.10	6

Table 3. IC_{50} and δ values of 4AP analogs at 0 mV: Woodhull parameters. *Mean values are given $\pm$ SD.

Discussion

Screening the ability of fluorinated analogs of 4AP to block K⁺ currents in *Xenopus* oocytes expressing Shaker K⁺ channel facilitated the identification of 3F4AP as a potential PET radioligand for demyelination. Subsequent labeling of 3F4AP with ¹⁸F and PET imaging studies in rodent models of MS confirmed the capacity of this compound to detect demyelinated lesions using PET^{33,37}. This compound is in progress to clinical studies and has the potential to advance the imaging of demyelinating diseases.

In PET tracer development, similar to drug development, it is useful to explore multiple derivatives and compare their properties. This process provides confirmation of the target and may result in radioligands with enhanced characteristics. In addition, it is convenient to have ¹⁸F and ¹¹C versions of the same tracer, as each radiolabeling method provides certain advantages that the other lacks. For example, while ¹⁸F-labeled tracers can be used in sites remote from a cyclotron because of its longer half-life, ¹¹C-labeled tracers enable multiple scans (be it more than one ¹¹C-scan or a combination of ¹¹C/¹⁸F-scans) on the same subject and the same day.

Here, we studied the efficiency of blocking K⁺ currents of four novel 4AP analogs under steady-state, namely: 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP), 3-methoxy-4-aminopyridine (3MeO4AP), 3-(trifluoromethyl)-4-aminopyridine (3CF₃4AP), 2-(trifluoromethyl)-4-aminopyridine (2CF₃4AP) (see chemical structures in Fig. 1A). We selected these compounds as they are predicted to be permeable to the BBB and are amenable to labeling with ¹¹C. During our studies, we found that all of these compounds are able to block Shaker (homolog of mammalian K_v1.2) channel albeit with different potencies (IC_{50} s ranging from 160 to 12,000 μ M). Specifically, 3Me4AP was found to be ~7 times more potent than 4AP and 3F4AP, 3MeO4AP and 3CF₃4AP were about 3–4 times less potent and 2CF₃4AP was around 60 times less potent. This study is timely given that methods to label 3MeO4AP and 2- and 3-CF₃4AP have recently been reported but the capacity of these compounds to bind to the K_v channels is unknown. Thus, this study may help decide which compounds to take for further imaging development.

The values obtained in this study represent the potency of the tested drugs towards Shaker channel expressed in *Xenopus* oocytes, which as discussed by A. L. Goldin is typically lower than the potency measured in mammalian cells or even native tissues⁵⁰. These differences in potency typically arise from the large number of intussusceptions around the oocyte, the presence of the vitelline membrane, the follicles surrounding the membrane, and the intracellular yolk structures, which may act as a sink for the drug. Nevertheless, Goldin also states that the relative efficacies of drugs against channels expressed in *Xenopus* oocytes are generally representative of those in native tissues. Thus, this study provides strong evidence that the *in vivo* affinity of the inhibitors will be as follows: 3MeO4AP > 3F4AP > 4AP > 3MeO4AP > 3CF₃4AP ≫ 2CF₃4AP.

Furthermore, the physicochemical characterization of these compounds in terms of basicity and lipophilicity provided here are also informative for future prioritization in drug or tracer development as many critical properties for successful pharmaceuticals and radiopharmaceuticals are related to these properties including brain penetration, clearance rate and metabolic stability.

Finally, we studied the voltage- and pH-dependence of the compounds blocking ability, as these results can provide valuable mechanistic information. From the pH-dependence, we observed that the compounds with lower pK_a (i.e., 3F4AP, 3CF₃4AP and 2CF₃4AP) are less active at basic pH, presumably because not enough of the protonated/active form is present. At the same time, the compounds with high pK_a (i.e., 4AP, 3MeO4AP and 3Me4AP) are more active at basic pH as it facilitates membrane permeability. Regarding the voltage-dependence, we found that blocking is more effective at lower voltages than at higher voltages, as the voltage provides a greater driving force to the K⁺ ions than to the drugs. From the voltage-dependence analyses, we were able to estimate using the Woodhull equation that these drugs travel about 50% of the membrane electrical field in order to bind. This is consistent with prior studies about 4AP binding site^{16,29} and strongly suggests that these drugs share a common binding site.

In summary, we have characterized four novel derivatives of 4AP as potential candidates for therapy and imaging. The physicochemical and pharmacological properties described here will be useful for selecting the compounds with most potential and to explain the differences in terms of drug efficacy and tracer sensitivity.

Methods

pK_a determination. The pK_a of each compound was measured by acid titration. Briefly, 5 mg of each compound were dissolved in 5 mL of water and titrated with 0.01 M HCl solution (0.01 M NaOH solution for 2CF₃4AP). pH was monitored with a pH meter and plotted as a function of volume of acid added to make a titration curve. pK_a was then found using Gran plot analysis for each replicate. This procedure was repeated 4 times for each compound.

Partition coefficient determination. The octanol-water partition coefficient (logD) at pH 7.4 was determined using a modified version of the shake flask method. Briefly, PBS (900 µL), 1-octanol (900 µL) and a 10 mg/mL aqueous solution of each compound (2 µL) were added to a 2 mL HPLC vial. The compounds were partitioned between the layers via vortexing and centrifuged at 1,000 g for 1 min to allow for phase separation. A portion (10 µL) was taken from each layer (autoinjector was set up to draw volume at two different heights) and analyzed by HPLC. The relative concentration in each phase was determined by integrating the area under each peak and comparing the ratio of the areas from the octanol and aqueous layers. A calibration curve was performed to ensure that the concentrations detected were within the linear range of the detector. This procedure was repeated 4 times for each compound.

Synthesis of Shaker K⁺ channel RNA. A sample of cDNA clone encoding for Shaker voltage-gated K⁺ channel from *D. melanogaster* with inactivation removed⁵¹ was generously provided by the laboratory of Prof. Francisco Bezanilla at The University of Chicago. The DNA was amplified, linearized with *Not I* enzyme (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) and transcribed *in vitro* using the T7 promoter mMESSAGE cRNA kit (Ambion, Austin, Tex., USA).

Expression of Shaker K⁺ channels in *Xenopus* oocytes. Shaker channel was heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Only mature *Xenopus laevis* frogs (Aquanimals SA de CV, Queretaro, Mexico) were used as oocytes suppliers. A volume of 1–3 mL from the ovary lobes was extracted via survival surgery under anesthesia. All methods involving live animals were performed in accordance with relevant guidelines and regulations and with the approval of the Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales en el Laboratorio (CICUAL-CUCEI-UDG). Subsequently, oocytes were isolated with the treatment of collagenase type II (Worthington Biochemical Corp., NJ, USA) under mechanical agitation. After the isolation with collagenase, each oocyte was injected with 15–25 ng of RNA encoding for the Shaker ion channel and incubated for 8–12 h at 17°C in a Standard Oocytes Saline (SOS) solution containing (in mM): 100 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 2 KCl and 1.8 CaCl₂ with 50 µg/mL gentamycin at pH 7.5.

Recording of K⁺ currents using cut-open voltage clamp. All chemical compounds for this study were acquired from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and Chem-Impex International (Chem-Impex International, Inc. Wood Dale, IL, USA) unless otherwise indicated. Electrophysiology measurements were conducted using the methodology of cut-open oocyte voltage clamp (COVC)⁵². For COVC procedures, the internal recording solution contained (in mM): 120 KOH, 2 EGTA, and 20 HEPES. The external recording solution was composed (in mM) by: 12 KOH, 2 Ca(OH)₂, 105 NMDG (N-methyl-D-glucamine)-methylsulfonate (MES), and 20 mM HEPES. For measurements carried out at pH of 6.8 and 7.4, the pH of both solutions was adjusted with MES. For measurements carried out at pH = 9.1, HEPES was replaced by 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES).

To quantify the effects upon K^+ currents of 4AP and 4AP analogs, oocytes that successfully expressed the Shaker channel were voltage-clamped in a COVC station. K^+ currents were recorded in the same oocyte, first in absence (I_K) and then in presence of each drug (I_I). I_K was elicited by depolarizing the oocyte membrane with a voltage protocol that consisted in steps of 50 ms from -100 to 50 mV in increments of 10 mV. Then, I_I was achieved by replacing the external solution (top and guard chambers) with a solution containing increasing concentrations of each drug (4AP), 3-fluoro-4-aminopyridine (3F4AP), 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP), 3-methoxy-4-aminopyridine (3MeO4AP), 2-trifluoromethyl-4-aminopyridine (2CF₃4AP) and 3-trifluoromethyl-4-aminopyridine (3CF₃4AP). Because 4AP and 4AP analogs block the K_V channels in its open conformation³¹, the oocytes were pulsed 5 to 10 times at 10 mV (1 min pulse) until a stable I_I was achieved. The integrity and stability of each oocyte were continuously monitored throughout the experiment.

Ionic currents were amplified and digitized with the Oocyte Clamp Amplifier CA-1A (Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA) and the USB-1604-HS-2AO Multifunction Card (Measurement Computing, Norton, MA, USA), respectively, and controlled with the GpatchMC64 program (Department of Anesthesiology, UCLA, Los Angeles, CA, USA) via a PC. Data were sampled at 100 kHz and filtered at 10 kHz. All the experiments were performed at room temperature (21 – 23°C).

Electrophysiology data analysis. Ion currents recordings were analyzed with Analysis (Department of Anesthesiology, UCLA, Los Angeles, CA, USA) and OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.) programs. The half-maximal inhibitory concentration of 4AP and 4AP analogs (IC_{50}) was determined by fitting the relative current ($I_{Rel} = I_I/I_K$) as a function of the cumulative concentration of each drug ($[X]$) with the Hill equation:

$$I_{Rel} = I_{max} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - \log [X])h}} \quad (1)$$

where I_{max} and I_{min} are the maximal and minimal value of I_{Rel} , respectively, and h is the Hill coefficient, which was typically 1.0 ± 0.1 under our experimental conditions.

The voltage-dependence of blocking by 4AP and 4AP analogs was analyzed in terms of the IC_{50} as a function of V ($IC_{50}(V)$). $IC_{50}(V)$ curves were fitted with a one-step model of inhibition^{49,53}, which allowed to determine the fractional distance through the membrane electrical field (δ) that each 4AP analog has to cross to reach its binding site:

$$\log IC_{50}(V) = \log IC_{50}(V=0) + \frac{1}{2.303} \frac{z\delta FV}{RT} \quad (2)$$

where $IC_{50}(V=0)$ is the value of IC_{50} at $V = 0$ mV, F is the Faraday constant, R is the gas constant, T is the ambient temperature, and z is the apparent charge. Mean values of data $\pm$ standard deviation (s.d.) are given or plotted and the number of experiments is denoted by n . The 95% of confidence interval (IC_{95}) is denoted as [Upper limit-Lower limit]; where Upper limit = $10^{(\log IC_{50} + s.d.)}$ and Lower limit = $10^{(\log IC_{50} - s.d.)}$.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 20 August 2019; Accepted: 4 December 2019;

Published online: 09 January 2020

References

- Waxman, S. G. & Ritchie, J. M. Molecular dissection of the myelinated axon. *Annals of neurology* **33**, 121–136, <https://doi.org/10.1002/ana.410330202> (1993).
- Trimmer, J. S. & Rhodes, K. J. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* **66**, 477–519, <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.113328> (2004).
- Jukkola, P. I., Lovett-Racke, A. E., Zamvil, S. S. & Gu, C. K^+ channel alterations in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiology of disease* **47**, 280–293, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.04.012> (2012).
- Vacher, H., Mohapatra, D. P. & Trimmer, J. S. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* **88**, 1407–1447, <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2008> (2008).
- Coman, I. *et al.* Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology* **129**, 3186–3195, <https://doi.org/10.1093/brain/awl144> (2006).
- Arroyo, E. J., Sirkowski, E. E., Chitale, R. & Scherer, S. S. Acute demyelination disrupts the molecular organization of peripheral nervous system nodes. *The Journal of comparative neurology* **479**, 424–434, <https://doi.org/10.1002/cne.20321> (2004).
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E. & Fehlings, M. G. Temporal and spatial patterns of Kv1.1 and Kv1.2 protein and gene expression in spinal cord white matter after acute and chronic spinal cord injury in rats: implications for axonal pathophysiology after neurotrauma. *The European journal of neuroscience* **19**, 577–589 (2004).
- Rasband, M. N. *et al.* Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 36–47 (1998).
- Wang, H., Allen, M. L., Grigg, J. J., Noebels, J. L. & Tempel, B. L. Hypomyelination alters K^+ channel expression in mouse mutants shiverer and Trembler. *Neuron* **15**, 1337–1347 (1995).
- Sinha, K., Karimi-Abdolrezaee, S., Velumian, A. A. & Fehlings, M. G. Functional changes in genetically dysmyelinated spinal cord axons of shiverer mice: role of juxtaparanodal Kv1 family K^+ channels. *Journal of neurophysiology* **95**, 1683–1695, <https://doi.org/10.1152/jn.00899.2005> (2006).
- Fehlings, M. G. & Nashmi, R. Changes in pharmacological sensitivity of the spinal cord to potassium channel blockers following acute spinal cord injury. *Brain research* **736**, 135–145 (1996).
- Eng, D. L., Gordon, T. R., Kocsis, J. D. & Waxman, S. G. Development of 4-AP and TEA sensitivities in mammalian myelinated nerve fibers. *Journal of neurophysiology* **60**, 2168–2179, <https://doi.org/10.1152/jn.1988.60.6.2168> (1988).

13. Kocsis, J. D. Aminopyridine-sensitivity of spinal cord white matter studied *in vitro*. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* **57**, 620–624 (1985).
14. Ritchie, J. M., Rang, H. P. & Pellegrino, R. Sodium and potassium channels in demyelinated and remyelinated mammalian nerve. *Nature* **294**, 257–259 (1981).
15. McCormack, K., Joiner, W. J. & Heinemann, S. H. A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent Shaker K⁺ channels. *Neuron* **12**, 301–315 (1994).
16. Kirsch, G. E., Shieh, C. C., Drewe, J. A., Vener, D. F. & Brown, A. M. Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron* **11**, 503–512 (1993).
17. Choquet, D. & Korn, H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *The Journal of general physiology* **99**, 217–240 (1992).
18. Kirsch, G. E. & Narahashi, T. Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **226**, 174–179 (1983).
19. Bostock, H., Sears, T. A. & Sherratt, R. M. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *J Physiol* **313**, 301–315 (1981).
20. Yeh, J. Z., Oxford, G. S., Wu, C. H. & Narahashi, T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophysical journal* **16**, 77–81, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(76\)85663-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85663-9) (1976).
21. Gutman, G. A. *et al.* International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* **57**, 473–508, <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10> (2005).
22. Jensen, H., Ravnborg, M., Mamoei, S., Dalgas, U. & Stenager, E. Changes in cognition, arm function and lower body function after slow-release Fampridine treatment. *Mult Scler* **20**, 1872–1880, <https://doi.org/10.1177/1352458514533844> (2014).
23. Goodman, A. D. *et al.* Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* **373**, 732–738, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60442-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60442-6) (2009).
24. Davis, F. A., Stefoski, D. & Rush, J. Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **27**, 186–192, <https://doi.org/10.1002/ana.410270215> (1990).
25. Stefoski, D., Davis, F. A., Faut, M. & Schauf, C. L. 4-Aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **21**, 71–77, <https://doi.org/10.1002/ana.410210113> (1987).
26. Jones, R. E., Heron, J. R., Foster, D. H., Snelgar, R. S. & Mason, R. J. Effects of 4-aminopyridine in patients with multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* **60**, 353–362 (1983).
27. Hayes, K. C. *et al.* Preclinical trial of 4-aminopyridine in patients with chronic spinal cord injury. *Paraplegia* **31**, 216–224, <https://doi.org/10.1038/sc.1993.40> (1993).
28. Iaci, J. F. *et al.* Dalfampridine improves sensorimotor function in rats with chronic deficits after middle cerebral artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **44**, 1942–1950, <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000147> (2013).
29. Caballero, N. A., Melendez, F. J., Nino, A. & Munoz-Caro, C. Molecular docking study of the binding of aminopyridines within the K⁺ channel. *Journal of molecular modeling* **13**, 579–586, <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0184-9> (2007).
30. Devaux, J., Gola, M., Jacquet, G. & Crest, M. Effects of K⁺ channel blockers on developing rat myelinated CNS axons: identification of four types of K⁺ channels. *Journal of neurophysiology* **87**, 1376–1385, <https://doi.org/10.1152/jn.00646.2001> (2002).
31. Armstrong, C. M. & Loboda, A. A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action. *Biophysical journal* **81**, 895–904, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75749-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75749-9) (2001).
32. Sherratt, R. M., Bostock, H. & Sears, T. A. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *Nature* **283**, 570–572 (1980).
33. Brugarolas, P. *et al.* Development of a PET radioligand for potassium channels to image CNS demyelination. *Sci Rep* **8**, 607, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18747-3> (2018).
34. Basuli, F., Zhang, X., Brugarolas, P., Reich, D. S. & Swenson, R. E. An efficient new method for the synthesis of 3-[(18)F]fluoro-4-aminopyridine via Yamada-Curtius rearrangement. *J Labelled Comp Radiopharm* **61**, 112–117, <https://doi.org/10.1002/jlcr.3560> (2018).
35. Brugarolas, P., Bhuiyan, M., Kucharski, A. & Freifelder, R. Automated Radiochemical Synthesis of [18F]3F4AP: A Novel PET Tracer for Imaging Demyelinating Diseases. *J Vis Exp*, e55537, <https://doi.org/10.3791/55537> (2017).
36. Brugarolas, P., Freifelder, R., Cheng, S. H. & DeJesus, O. Synthesis of meta-substituted [(18)F]3-fluoro-4-aminopyridine via direct radiofluorination of pyridine N-oxides. *Chem Commun (Camb)* **52**, 7150–7152, <https://doi.org/10.1039/c6cc02362b> (2016).
37. Brugarolas, P., Reich, D. S. & Popko, B. Detecting Demyelination by PET: The Lesion as Imaging Target. *Mol Imaging* **17**, 1536012118785471, <https://doi.org/10.1177/1536012118785471> (2018).
38. Berger, S. G., Waser, P. G. & Hofmann, A. Effects of new 4-aminopyridine derivatives on neuromuscular transmission and on smooth muscle contractility. *Arzneimittelforschung* **39**, 762–765 (1989).
39. Sun, W. *et al.* Novel potassium channel blocker, 4-AP-3-MeOH, inhibits fast potassium channels and restores axonal conduction in injured guinea pig spinal cord white matter. *Journal of neurophysiology* **103**, 469–478, <https://doi.org/10.1152/jn.00154.2009> (2010).
40. Kirsch, G. E. & Narahashi, T. 3, 4-diaminopyridine. A potent new potassium channel blocker. *Biophysical journal* **22**, 507–512, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85503-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85503-9) (1978).
41. Howe, J. R. & Ritchie, J. M. On the active form of 4-aminopyridine: block of K⁺ currents in rabbit Schwann cells. *J Physiol* **433**, 183–205, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018421> (1991).
42. Lemeignan, M. *et al.* The ability of 4-aminopyridine and 3, 4-diaminopyridine to cross the blood-brain barrier can account for their difference in toxicity. *Advances in the Biosciences* **35**, 222 (2013).
43. Acorda Therapeutics, I. Vol. Application No.: 02250 (http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022250s000TOC.cfm, 2010).
44. Maddison, P. & Newsom-Davis, J. Treatment for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003279, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003279> (2003).
45. Leung, G., Sun, W., Brookes, S., Smith, D. & Shi, R. Potassium channel blocker, 4-aminopyridine-3-methanol, restores axonal conduction in spinal cord of an animal model of multiple sclerosis. *Experimental neurology* **227**, 232–235, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.11.004> (2011).
46. Neelamegam, R. *et al.* In *Society of Nuclear Medicine Annual Meeting*. 486.
47. Brugarolas, P., Yang, B. Y., Sanchez-Rodriguez, J., Telu, S. & Pike, V. W. In *255th American Chemical Society National Meeting*. FLUO 55.
48. Lewis, M. J., Laber, E. & Olby, N. J. Predictors of Response to 4-Aminopyridine in Chronic Canine Spinal Cord Injury. *Journal of neurotrauma* **36**, 1428–1434, <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5975> (2019).
49. Woodhull, A. M. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *The Journal of general physiology* **61**, 687–708, <https://doi.org/10.1085/jgp.61.6.687> (1973).
50. Goldin, A. L. In *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels* 1–25.
51. Hoshi, T., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533–538 (1990).
52. Stefani, E. & Bezanilla, F. Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Methods Enzymol* **293**, 300–318 (1998).
53. Hermann, A. & Gorman, A. L. Effects of 4-aminopyridine on potassium currents in a molluscan neuron. *The Journal of general physiology* **78**, 63–86, <https://doi.org/10.1085/jgp.78.1.63> (1981).

Acknowledgements

J.E.S.R. thanks Dr. Oscar Blanco Alonso, Dr. Jorge Arreola and Dr. Francisco Bezanilla for their support to the Biophysics Laboratory at the University of Guadalajara. We thank Roberto Gastélum Garibaldi for his help with the care and preparation of *Xenopus* oocytes. We thank Professor Francisco Bezanilla for kindly providing the software for the USB-1604-HS-2AO multifunction card. S.R.R. was supported by a fellowship from CONACyT, Mexico (886951), A.D.B. was partially supported by the Faculty Aide Program and the Harvard College Research Program from Harvard University. K.M.R.T. was supported by NIH T32EB013180 (Prof. G. El Fakhri, PI). This work was partially supported by R00EB020075 and R01NS114066 (P.B.) and PROSNI-UdeG 2017-18 and PRODEP-SEP-2018 (J.E.S.R.).

Author contributions

S.R.R. performed the COVC experiments and analyzed the data. A.D.B. and K.M.R.T. performed the pK_a and logD experiments and analyzed the data. P.B. and J.E.S.R. conceived and supervised the project and wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Competing interests

The University of Chicago has obtained patents related to the compounds described here where P.B. is listed as inventor (U.S. Patent: US10160695B2 and US9617215B2). Other authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56245-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.B. or J.E.S.-R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Abstract

4-Aminopyridine (4AP) is a specific blocker of voltage-gated potassium channels (K_v family) that is clinically approved for the symptomatic treatment in patients with multiple sclerosis (MS). Recently, it has been shown that [¹⁸F]3F4AP, a radiofluorinated form of 4AP, can be used as a PET tracer to detect demyelinated lesions in rodent models of MS (P. Brugarolas, et al., 2018, Sci. Rep., 8:607). Here, we investigated the structure-activity relationships of three novel 4AP derivatives containing methyl (-CH₃), methoxy (-OCH₃) and trifluoromethyl (-CF₃) groups as they are potential candidates for PET imaging. We characterized the physicochemical properties of these compounds (basicity and lipophilicity) and analyzed their ability to block K_v channels in terms of the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀). To this end, Shaker potassium channel, with inactivation removed, was expressed in *Xenopus* oocytes and voltage-clamped using cut-open voltage-clamp (COVC) methodology. Our findings show that 3-methyl-4-aminopyridine (3Me4AP), a methylated analog of 4AP, is approximately 7-fold more potent than 4AP, whereas the methoxy and trifluoromethyl containing compounds are 3- and 4- fold less potent, respectively. The blockage of Shaker by these compounds was voltage (V) and pH dependent. IC₅₀(V) curves were analyzed with a one-step model of inhibition (A. Woodhull, 1973, JGP, 61(6):687-708; A. Hermann & A. L. F. Gorman, 1981, JGP, 78:63-86) which allowed to determine the electric distance (δ) that each 4AP analog has to cross through the electric field generated by the membrane to bind to its site. Woodhull fits produced a δ of 0.4-0.5, indicating that these analogs bind to the channel in the same location as 4AP. We conclude that 3Me4AP shows good potential for PET radiotracer development. Supported by PROSNI-UdeG 2017-18 and PRODEP-SEP-2018 Mexico to JESR, MSRR hold Fellowships from CONACyT, Mexico (886951) and NIH grant R00EB020075 to PB.

Introduction

- 4-Aminopyridine (4AP) is a specific blocker of voltage-gated potassium channels (K_v1 family) clinically approved for the symptomatic treatment of patients with multiple sclerosis (MS).
- We investigate three novel 4AP derivatives containing methyl (-CH₃), methoxy (-OCH₃) and trifluoromethyl (-CF₃) in position 3 as potential candidates for PET imaging and/or therapy.

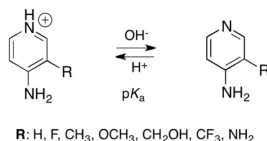


Figure 1. Acid-base equilibrium of 4-aminopyridine derivatives.

Methods

- pK_a of each 4AP compound was measured by acid titration.
- Octanol-water partition coefficient (logD) at pH 7.4 was determined using a modified version of the shake flask method.
- We analyzed its ability to block the Shaker K⁺ channel under different voltage and pH conditions by using the cut-open oocyte voltage clamp (COVC) methodology.

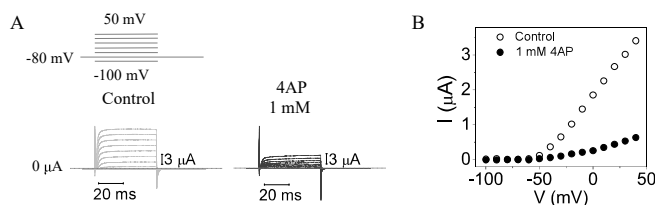


Figure 2. Inhibition of K⁺ currents by 4AP

Results

Basicity and lipophilicity of 4AP analogs

- pK_a values indicate that: at physiological pH 4AP, 3Me4AP and 3MeO4AP are mostly protonated, whereas 3F4AP and 3CF₃4AP exist in the protonated and neutral forms.
- logD values indicate that: 4AP, 3Me4AP, and 3MeO4AP may have lower penetration of the blood-brain barrier (BBB) while 3F4AP and 3CF₃4AP may have a faster permeation of the BBB.

Drug	pK _a	logD
3Me4AP	9.82 ± 0.06	-1.232 ± 0.008
4AP	9.58 ± 0.07	-1.478 ± 0.014
3MeO4AP	9.18 ± 0.02	-0.76 ± 0.03
3F4AP	7.65 ± 0.15	0.414 ± 0.002
3CF ₃ 4AP	7.17 ± 0.04	1.484 ± 0.009

Table 1. pK_a and logD (at pH 7.4) values of 4AP and analogs.

Blocking capacity of 4AP analogs

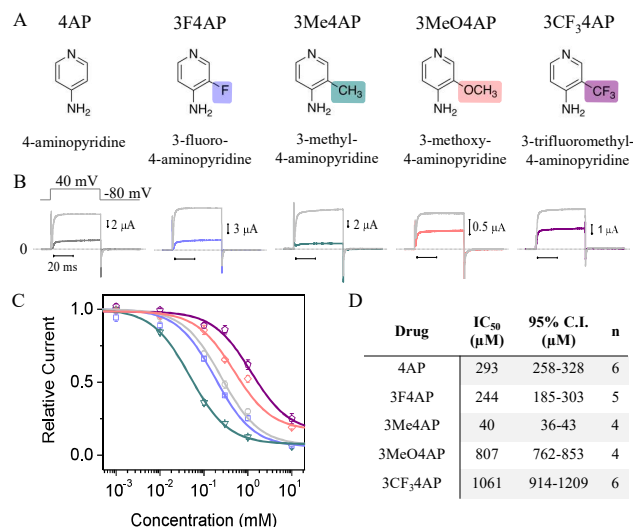


Figure 3. Inhibition of K⁺ currents by 4AP analogs.

Dependence of the blocking on pH

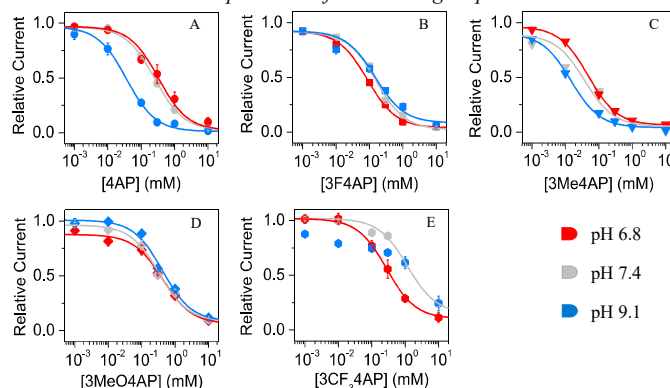


Figure 4. IC₅₀ at 0 mV and pH dependence.

Drug	pH 6.8			pH 7.4			pH 9.1		
	IC ₅₀ (μM)	95% C.I. (μM)	n	IC ₅₀ (μM)	95% C.I. (μM)	n	IC ₅₀ (μM)	95% C.I. (μM)	n
4AP	210	176-244	4	199	190-207	6	38	33-44	4
3F4AP	82	76-88	5	160	140-179	5	185	144-226	4
3Me4AP	66	56-76	6	39	36-42	4	15	13-17	5
3MeO4AP	357	325-390	4	355	327-382	4	492	446-538	5
3CF ₃ 4AP	249	150-348	5	690	633-747	6	*	*	4

Table 2. IC₅₀ values of 4AP and analogs at 0 mV: Hill parameters.

* Not determined. Relative current vs. concentration did not exhibit a sigmoidal behavior.

Dependence of the blocking on voltage

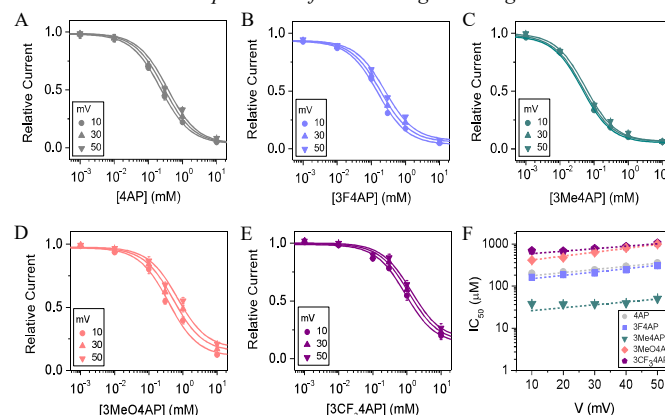


Figure 5. Voltage-dependence of the IC₅₀ for each 4AP analog.

Conclusions

We have characterized three novel derivatives of 4AP as potential candidates for therapy and imaging. The physicochemical and pharmacological properties described here will be useful for selecting the compounds with most potential and to explain the differences in terms of kinetics and binding. We conclude that 3Me4AP shows good properties as a potential for PET radiotracer development.

Drug	IC ₅₀ (μM)	δ	n
4AP	155±12	0.41±0.08	6
3F4AP	122±4	0.46±0.10	5
3Me4AP	21±1	0.43±0.10	4
3MeO4AP	329±17	0.56±0.02	4
3CF ₃ 4AP	516±51	0.46±0.10	6

Table 3. IC₅₀ and δ values of 4AP and analogs at 0 mV: Woodhull parameters.

References

- [1] Rodríguez-Rangel, S., et al., (2019) bioRxiv 731943; doi: <https://doi.org/10.1101/731943>
- [2] Brugarolas, P., et al., (2018) Scientific Reports, 8, 607.
- [3] Brugarolas, P., et al., (2018), Molecular Imaging, 17, 1-4.
- [4] A. Hermann & A. L. F. Gorman (1981), J. Gen. Physiol., 78, 63-86.
- [5] G. E. Kirsch & J. A. Drewe (1993), J. Gen. Physiol., 102, 797-816.
- [6] D. Choquet & H. Korn (1992), J. Gen. Physiol., 99, 217-204.
- [7] Woodhull A.M. (1973), Ionic Blockage of Sodium Channels in Nerve, J. Gen. Physiol., 6, 687-708.
- [8] Stefani E, Bezanilla F. (1998). Cut-Open Voltage-Clamp Technique. Methods in Enzymology. Elsevier, 293:300-318.
- [9] Brugarolas, P., et al., (2017) J Vis Exp, e55537.

Acknowledgments

M.S.R.R. was supported by a fellowship from CONACyT, Mexico (886951). A.D.B. was partially supported by the Faculty Aide Program and the Harvard College Research Program from Harvard University. K.M.R.T. was supported by NIH T32EB013180 (Prof. G. El Fakhr, PI). This work was partially supported by R00EB020075 (P.B.) and PROSNI-UdeG 2017-18 and PRODEP-SEP-2018 (J.E.S.R.).



Análisis biofísico del mecanismo de inhibición de la corriente de potasio del canal *Shaker* dependiente del voltaje por 4-aminopiridina y derivados fluorizados.



M. Sofía Rodríguez-Rangel^a, Pedro Brugarolas^b, Jorge E. Sánchez-Rodríguez^a

^a Departamento de Física, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México. ^b Massachusetts General Hospital.

Resumen

La 4-aminopiridina (4-AP) es un bloqueador específico de corriente de canales de potasio (K^+) dependientes del voltaje (V). La afinidad de unión de 4-AP a canales de K^+ en términos de la constante de inhibición IC_{50} , es un mecanismo dependiente de V. Se determinó la IC_{50} a diferentes valores de V para 4-AP y 4-Amino-3-(trifluorometil)piridina (3-4-AP) mediante la inhibición de corriente de K^+ del canal *Shaker* expresado en ovocitos *Xenopus*. IC_{50} fue obtenida por el ajuste de la ecuación de Hill de las curvas de corriente vs la concentración del inhibidor en el rango de -20 a 40 mV. Los resultados preliminares muestran una menor eficiencia de bloqueo por 3-4-AP en comparación a 4-AP. Este tipo de estudio pretende encontrar derivados fluorizados de 4-AP para su posible uso como sondas de PET.

Motivación

- La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa que padecen más de 2.3 millones de personas en todo el mundo.
- La EM es causada por la destrucción de células de la capa de mielina que rodea a las neuronas imposibilitando la transmisión adecuada de los impulsos nerviosos.
- No existe una cura para EM. Sin embargo, fármacos como la **Ampyra®** (4-Aminopiridina o **4-AP**) son prescritos por especialistas en pacientes con EM para combatir sus síntomas.
- La 4-AP actúa como un bloqueador de canales de potasio (K^+).

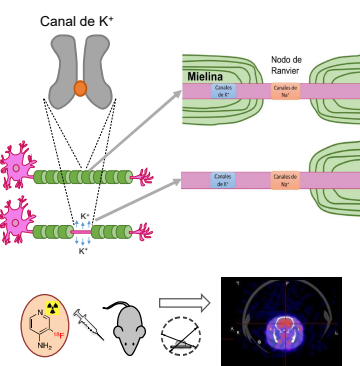


Figura tomada y modificada de Brugarolas, P. (2018) [2]

La idea

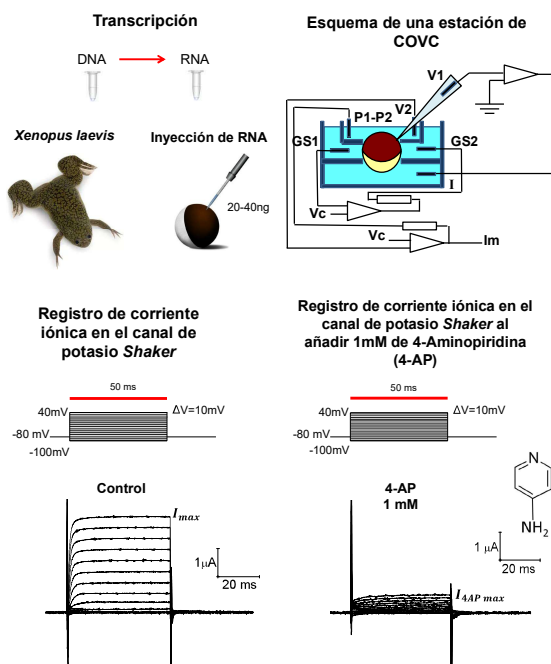
- Las técnicas de imagen, permiten saber si la terapia remielinizante es eficaz en EM.
- La tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) es una técnica de imagen no invasiva utilizada en procedimientos de diagnóstico/investigación de patologías, por ejemplo, que ocurren en el ser humano.
- Diseñar y caracterizar sondas PET que podrían ser utilizadas para el tratamiento y seguimiento de enfermedades neurodegenerativas.

Objetivo

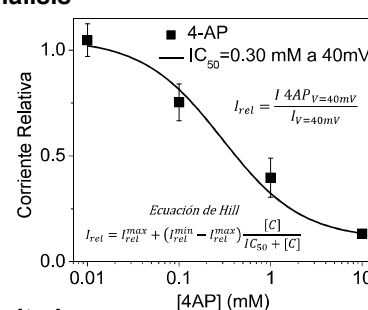
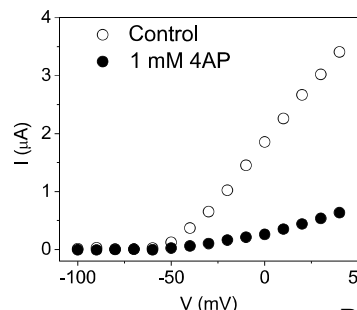
Caracterizar biofísicamente algunos compuestos derivados de 4-AP para su posible uso como trazadores de canales de K^+ en los axones.

Metodología

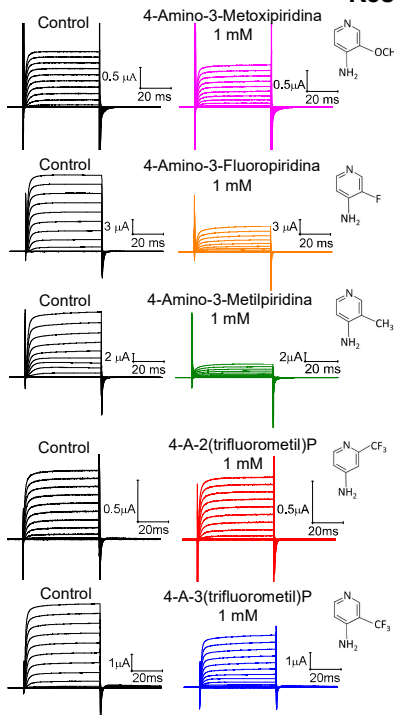
- Se utilizó la metodología de fijación de voltaje en membrana de ovocito cortado (COVC, por sus siglas en inglés).
- Mediante COVC se registraron corrientes de K^+ generadas por el canal K_v *Shaker* expresado en ovocitos *Xenopus laevis*.
- Se determinó el valor de concentración necesaria de 4-AP y algunos de sus derivados para bloquear el 50% de la corriente de K^+ generada por el canal *Shaker*.



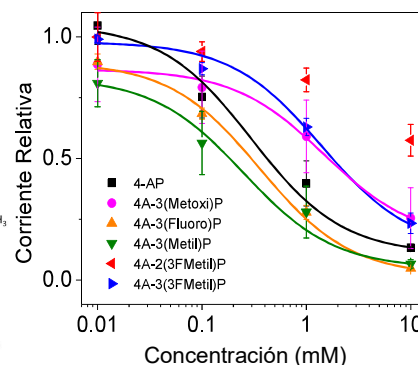
Análisis



Resultados

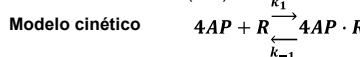
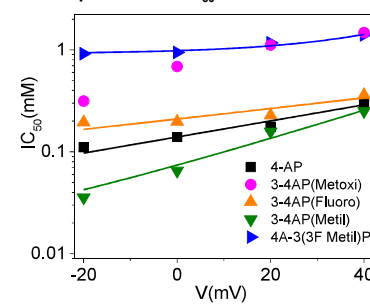
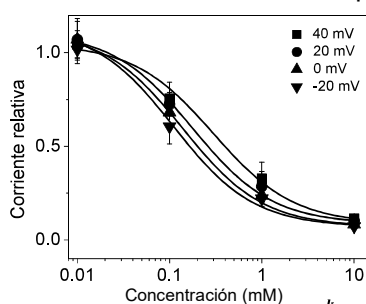


Determinación de IC_{50} para compuestos derivados de 4-AP



Compuesto	IC_{50} (mM) a 40 mV	n
4-AP	0.30	5
4-Amino-3-Metoxipiridina	1.48	2
4-Amino-3-Fluoropiridina	0.36	2
4-Amino-3-Metilpiridina	0.25	3
4-A-2(trifluorometil)P	1.94	2
4-A-3(trifluorometil)P	1.40	5

Análisis de la dependencia respecto a V de IC_{50}



Conclusión

La IC_{50} que se determinó para los compuestos i) 4-Amino-3-Fluoropiridina y ii) 4-Amino-3-Metilpiridina fue similar al valor que se obtiene para la 4-AP. Este hecho sugiere que los derivados de 4-AP i y ii podrían ser utilizados como sondas PET para el tratamiento y seguimiento de enfermedades neurodegenerativas como la EM.

Referencias

[1] Brugarolas, P., et al., (2018) Scientific Reports, 8, 607. [2] Brugarolas, P., et al., (2018), Molecular Imaging, 17, 1-4. [3] A. Hermann & A. L. F. Gorman (1981), J. Gen. Physiol., 78, 63-86. [4] G. E. Kirsch & J. A. Drewe (1993), J. Gen. Physiol. 102, 797-816. [5] D. Choquet & H. Korn (1992), J. Gen. Physiol., 99, 217-204.