

Moduladores del termorreceptor TRPV1 desactivables metabólicamente en la farmacología del prurito

¹Asia Fernández Carvajal, ²Isabel Devesa, ¹Gregorio Fernández Ballester y ¹Antonio Ferrer Montiel[¶].

¹Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Av. de la Universidad s/n, 03202 Elche.

²AntalGenics, SL. Parque Científico de la Universidad Miguel Hernández. Ed. Quorum III, Av. de la Universidad s/n, 03202 Elche.

Presentación

Los moduladores desactivables metabólicamente suponen una nueva estrategia farmacológica para el tratamiento del prurito y de otros síndromes cutáneos. Tras ejercer su acción sobre la excitabilidad de las terminaciones nociceptivas epidérmicas, estos compuestos son hidrolizados (desactivados) por las estererasas de la dermis en metabolitos inertes fácilmente eliminables. Como ejemplo de esta tecnología se presenta una familia de antagonistas del termorreceptor TRPV1 derivados del grupo farmacóforo de la capsaicina. El compuesto AG1529 se ha seleccionado como candidato para el desarrollo preclínico y clínico como anti-pruriginoso psoriásico.

Agradecimientos

Nuestro grupo está financiado por el proyecto RTI2018-097189-B-C21 y RTC-2017-6507-1 de la AEI, con fondos FEDER de la UE "Una manera de hacer Europa; y un intramural de la UMH (PAR). AntalGenics por el desarrollo pre-clínico y clínico del compuesto AG1529, y los ingredientes cosméticos; y Prospera Biotech por el desarrollo del cosmético para pieles sensibles.

[¶]Correspondencia: aferrer@umh.es

Resumen

El prurito es una modalidad sensorial altamente molesta para los humanos y animales. La señal pruriginosa induce al rascado de la zona afectada como método para calmar la sensación desquiciante que produce, llegando a causar heridas. Dependiendo de su duración, el prurito puede ser agudo si dura unos días, o crónico si persiste más de 6 semanas. Atendiendo al desorden que lo causa, se suele clasificar como pruritoceptivo, neuropático, neurogénico y psicogénico. El mecanismo molecular causante del prurito es multifactorial y complejo, implicando componentes periféricos y centrales. Periféricamente, el prurito es producido por una subpoblación de nociceptores que reconocen y transducen las señales pruriginosas. A nivel molecular los nociceptores pruriginosos expresan el termorreceptor TRPV1 que ha sido señalado como un blanco terapéutico para el tratamiento del prurito, por ser una encrucijada de las vías de señalización pruriginosa. Por ello, el desarrollo de antagonistas de TRPV1 de uso tópico es una estrategia farmacológica muy atractiva, especialmente para el tratamiento del prurito dermatológico. A diferencia de la capsaicina, los antagonistas de TRPV1 desactivables metabólicamente presentan como mayor ventaja su hidrólisis enzimática en la dermis, previniendo la aparición de efectos secundarios por acumulación dérmica. Además, estos compuestos no presentan el efecto urente característico de la capsaicina y muy molesto para los pacientes.

Palabras clave

Alloknesis, hiperknesis, picor, termorreceptor, TRP, vaniloide, fármaco blando.

Conflicto de intereses

Los autores son inventores de la patente WO20188206742 (A1) que protege los moduladores desactivables metabólicamente. AFM, AFC y GFB son Fundadores de AntalGenics SL y socios de Prospera Biotech, y IDG es empleada de AntalGenics que actualmente está desarrollando AG1529 para el prurito psoriásico.

Summary

Metabolically deactivatable TRPV1 modulators (soft drugs) in the pharmacology of pruritus

Itching is a highly bothersome sensory modality for humans and animals. The pruritic signal induces scratching of the affected area as a remedy to calm the maddening sensation that it produces, causing injuries. Depending on its duration, pruritus can be acute if it lasts a few days, or chronic if it persists more than 6 weeks. According to the causative disorder, pruritus is usually classified as nociceptive, neuropathic, neurogenic and psychogenic. The molecular mechanism causing pruritus is multifactorial and complex, involving peripheral and central components. Peripherally, pruritus is produced by a subpopulation of nociceptors that recognize and transduce pruritic signals. At the molecular level, pruritic nociceptors express the TRPV1 thermoreceptor, which has been validated as a therapeutic target for the treatment of pruritus, being at the crossroad of different pruritic signaling pathways. Accordingly, the development of TRPV1 antagonists for topical use has been revealed as a highly attractive pharmacological strategy, especially for the treatment of nociceptive or dermatological pruritus. Unlike capsaicin, metabolically deactivatable TRPV1 antagonists (soft drugs) have as an advantage their metabolic deactivation in the dermis, preventing the appearance of side effects due to dermal accumulation. In addition, they do not have the characteristic burning sensation of capsaicin which is very annoying for patients.

Key words

Alloknesis, hiperknesis, itch, thermoreceptor, TRP, vanilloid, soft drug.

Conflict of interests

The authors are inventors of the patent WO20188206742 (A1) which protects metabolically deactivatable modulators. AFM, AFC and GFB are Founders of AntalGenics SL and shareholders of Prospera Biotech, and IDG is an employee of AntalGenics that is currently developing for psoriatic pruritus.

Fisiopatología del prurito

El prurito o picor se define como una sensación desagradable que induce a rascarse para su alivio. Dependiendo de su duración, el prurito se puede catalogar como agudo si dura unos días o crónico si persiste durante más de 6 semanas (Potenzieri y Undem, 2012). El prurito crónico resulta altamente incapacitante para las personas que lo sufren afectando de forma dramática a su calidad de vida. El prurito se ha considerado como un síntoma causado por una picadura o por una enfermedad, aunque existe el debate de si el prurito crónico es por sí una patología ya que frecuentemente persiste una vez superada la patología que lo ocasionaba (Dhand y Aminoff, 2014).

Según su etiología el prurito se puede clasificar como: (i) picor pruritoceptivo, cuando está producido por la activación directa de las terminaciones nociceptivas dérmicas, bien por sustancias exógenas (picadura de insectos) o por un proceso inflamatorio cutáneo. También se le conoce como prurito dérmico o dermatológico; (ii) prurito neuropático, cuando está producido por un daño en el sistema nervioso somatosensorial, que puede ser causado por un virus (varicela, herpes) o por una herida; (iii) prurito neurogénico, cuando se produce la activación del sistema somatosensorial por agentes pruriginosos circulantes, sin necesidad de que se produzca un daño neuronal. El prurito neurogénico (también conocido como sistémico) suele estar asociado a enfermedades de órganos, metabólicas, o a medicamentos. Ejemplos de prurito neurogénico los encontramos en el prurito urémico asociado a la insuficiencia renal o al tratamiento de diálisis, y en el prurito asociado a colestasis o colestásico producido por un defecto en la excreción biliar. Y, por último, (iv) prurito psicogénico que viene causado por una enfermedad mental (Potenzieri y Undem, 2012; Dhand y Aminoff, 2014).

La patogenia del prurito es multifactorial y muy compleja, jugando el sistema somatosensorial un papel fundamental. Mecánicamente, el prurito se puede catalogar como histaminérgico si está mediado por el agente pruriginoso histamina, o como no histaminérgico cuando otros pruriginosos son los desencadenantes (TSL, proteasas, cloroquina, interleucinas, ácidos biliares). El prurito histaminérgico es de tipo pruritoceptivo o dermatológico y se origina por la liberación de histamina contenida en los mastocitos en respuesta a una sustancia externa o un proceso inflamatorio (Patel et al. 2011; Green y Dong, 2016). La histamina activa los receptores H1R y/o H4R en las terminales aferentes provocando la señal pruriginosa. La serotonina es otro agente que provoca picor pruritoceptivo cuya actividad periférica se ha asociado a su capacidad de liberar histamina de los mastocitos (Han et al. 2013, Green y Dong, 2016).

Sin embargo, la falta de eficacia farmacológica de los anti-histaminérgicos en el prurito serotoninérgico ha cuestionado este mecanismo, proponiéndose que la serotonina es capaz de disparar directamente señales pruriginosas en terminales aferentes a través del receptor 5-HT₁ (Patel et al. 2011; Green y Dong, 2016). El picor pruritoceptivo es normalmente un síntoma agudo molesto que dura unos días o semanas.

El prurito no-histaminérgico se puede presentar tanto como pruritoceptivo como sistémico o neuropático y suele ser el prurito crónico más común (Potenzieri y Undem, 2012; Dhand y Aminoff, 2014). Los pruriginosos que disparan este tipo de prurito son muy variados actuando en distintos tipos de neuronas sensoriales (Han et al. 2013). Así, por ejemplo, la cloroquina inicia la señal pruriginosa en las terminaciones aferentes de los nociceptores C que expresan el receptor MrgprA3. Los ácidos biliares activan las aferentes que expresan el receptor TGR5, la triptasa actúa a través del receptor PAR2, el imiquimod del receptor TRL7, y la IL-31 de su receptor IL-31R. La presencia prolongada de estos agentes pruriginosos suele conducir a una sensibilización a nivel central que potencia y cronifica la señal pruriginosa originando el prurito crónico, característico de patologías como la dermatitis, la psoriasis, la insuficiencia renal y la colestasis. La complejidad etiológica del prurito crónico ha sido un reto para en el desarrollo de terapias que ayuden a paliar su impacto en la salud. De hecho, no existen remedios farmacológicos que satisfagan plenamente a los pacientes con prurito crónico, siendo la terapia tradicional de rascarse la que mayor alivio produce. Un motivo por el que el rascarse calma el picor se debe a que activa fibras aferentes nociceptivas implicadas en la transducción del dolor. El mecanismo fisiológico por el que el dolor inhibe la señal pruriginosa no es del todo entendido, aunque parece que podría deberse a una acción a nivel de la médula espinal o a la existencia de una ruta paralela a la nociceptiva (Han et al. 2013, Dhand y Aminoff, 2014).

TRPV1 como blanco terapéutico para el tratamiento del prurito crónico

Una propiedad común tanto para el prurito histaminérgico como el no histaminérgico es que está producido por una subpoblación de nociceptores que expresa el termorreceptor TRPV1. Este termorreceptor pertenece a la familia de los receptores sensoriales TRP (Transient Receptor Potential). Originalmente conocido como el receptor de la capsaicina (ingrediente picante de los chiles/guindillas), fue identificado molecularmente por el grupo del Prof. David Julius en la Universidad de California en San Francisco en 1997 (Caterina et al. 1997). Utilizando la aproximación de la clonación-expresión, y la capsaicina como

sonda específica, el Prof. David Julius fue capaz de aislar de entre los mRNAs de neuronas sensoriales el que codificaba al receptor TRPV1. La caracterización biofísica reveló que es un receptor polimodal que se activa por la acción de la capsaicina, una temperatura $\geq 42^{\circ}\text{C}$, el pH ácido extracelular y por la despolarización de la membrana. El umbral de temperatura de activación de TRPV1 coincide con el umbral de calor nocivo, por lo que se le asignó un papel fundamental como sensor térmico para la detección de temperaturas nocivas, acuñando el término termorreceptor. Tras la validación de TRPV1 como termorreceptor, se identificaron otros receptores TRP que se activaban por calor (TRPV2, TRPV3, TRPV4 y TRPM3), así como, por frío (TRPM8 y TRPA1). Todos ellos, junto con TRPM2, TRPM4 y TRPM5, conforman la familia de termorreceptores que cubren todo el espectro de temperaturas desde el frío al calor nocivo (Figura 1). De entre ellos, los más estudiados en terminales aferentes son TRPV1, TRPM8 y TRPA1

que han sido implicados en la patogénica del dolor y prurito crónicos (Szallasi 2011).

Molecularmente, el termorreceptor TRPV1 es una proteína integral de membrana compuesta por cuatro subunidades idénticas organizadas alrededor de un poro iónico que permite el flujo de los cationes Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Hellmich y Gaudet, 2014). Cada subunidad está organizada en dominios moleculares y funcionales. Así, se distingue un dominio de membrana compuesto de 6 segmentos helicoidales transmembrana (S1-S6) y un lazo anfipático que une los dominios S5 y S6 estructurando el filtro de selectividad iónica del receptor (Hellmich y Gaudet, 2014). Los segmentos S1-S4, contienen el sitio de unión para la capsaicina y antagonistas competitivos de ésta como la capsaicina. El canal dispone de un dominio citosólico en el extremo N-terminal que contiene varios subdominios repetidos de anquirina, cuyo papel está todavía siendo investigado. El extremo C-terminal también es citosólico y en él destaca un segmento de 25

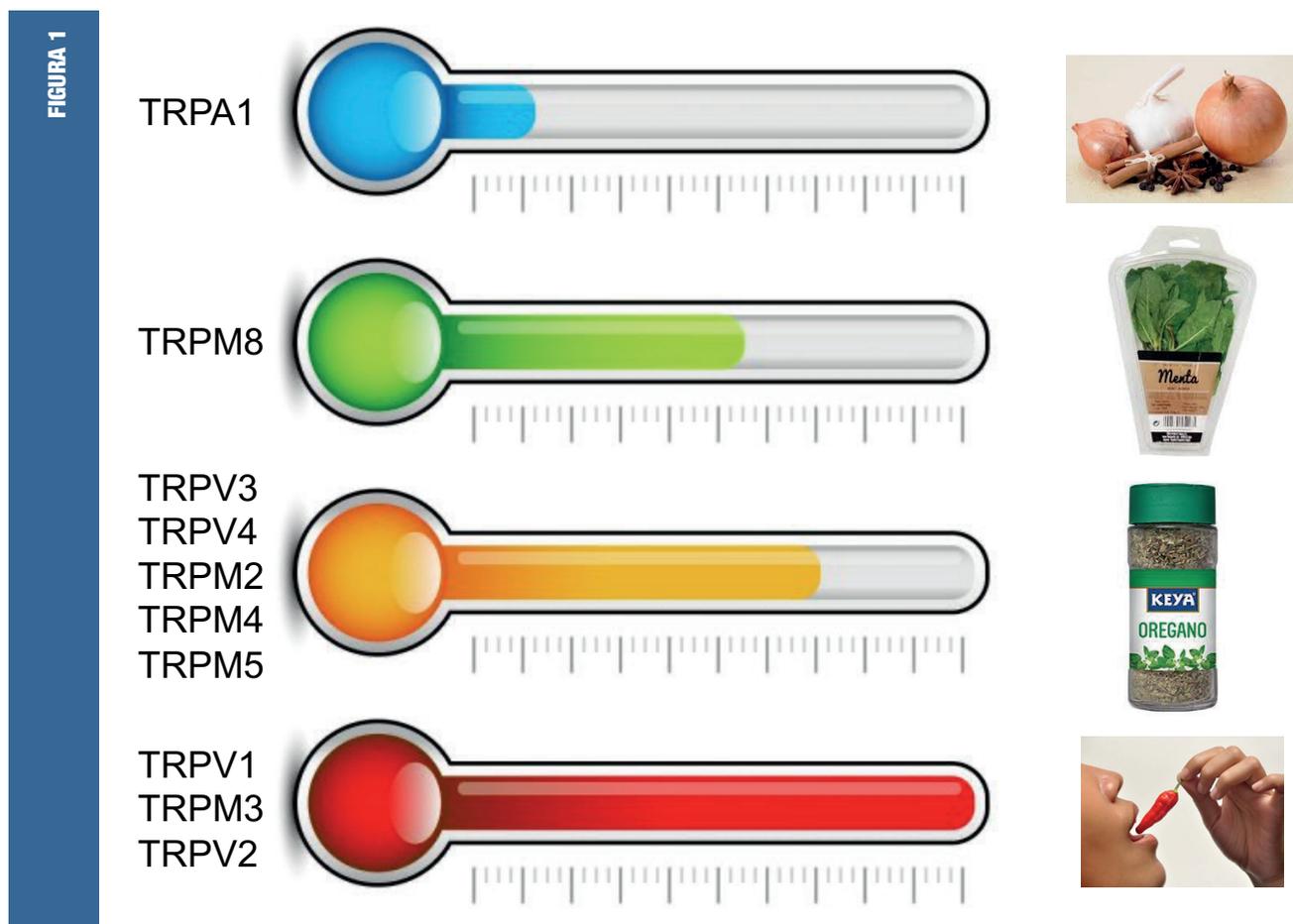


Figura 1. Representación de la familia de termorreceptores cubriendo el espectro de temperaturas de frío nocivo (termómetro azul) a calor dañino (termómetro rojo). El termómetro verde representa la sensación a frío, y el amarillo las temperaturas templadas. Los termorreceptores son también activados por compuestos químicos, muchos utilizados como especias por los humanos. El TRPA1 es activado por ingredientes activos de la cebolla, ajo, wasabi, canela, así como agentes irritantes medioambientales. El receptor TRPM8 es activado por el mentol, lo que confiere a este compuesto la sensación refrescante. El TRPV3 es activado por compuestos activos del orégano y el clavo. El TRPV1 se activa por vanilloides presentes en chiles y pimientos

aminoácidos que se localiza paralelo a la monocapa lipídica interna interaccionando con los fosfoinositoles y el segmento S4-S5, y el denominado dominio TRP (Hellmich y Gaudet, 2014). Este dominio, altamente conservado en la familia de los termorreceptores, juega un papel fundamental en el acoplamiento alostérico de la unión de la capsaicina, el segmento S4-S5, y la compuerta intracelular del canal, facilitando la apertura del poro iónico (Gregorio-Teruel et al. 2015). Además, los dominios citosólicos contienen secuencias de fosforilación para las cinasas PKA, PKC y las cinasas de residuos de tirosina que juegan un papel en la modulación de la actividad funcional del canal, especialmente, en contextos patológicos.

Desde su aislamiento e identificación en neuronas sensoriales, se ha descrito que el receptor TRPV1 también se expresa, entre otros, en el tejido adiposo, el tejido cutáneo (queratinocitos y sebocitos), el sistema inmune y el sistema nervioso central, sugiriendo un papel para TRPV1 mucho más amplio que su actuación como sensor térmico periférico. En este sentido, el receptor TRPV1 también es activado por mediadores lipídicos como la anandamida (araquidonoil-etanolamida) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) que pertenecen al grupo de compuestos conocidos como endocannabinoides por ser también ligandos de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 (Devesa y Ferrer-Montiel, 2014). Que TRPV1 comparta ligandos con CB1 y CB2 abre estrategias terapéuticas novedosas para el tratamiento de patologías complejas como el prurito crónico. En este sentido, moduladores de TRPV1 y de los receptores de cannabinoides muestran una actividad anti-pruriginosa (Hittaka y Tominaga, 2017; Xie y Hu, 2018).

Farmacología del termorreceptor TRPV1

Desde su descubrimiento el receptor TRPV1 atrajo el interés de los departamentos de farmacología y las compañías farmacéuticas para el descubrimiento y desarrollo de antagonistas selectivos y potentes. Este interés estuvo reforzado cuando se divulgó que la delección genética del receptor reducía notablemente la hiperalgesia térmica inflamatoria (Caterina et al. 2000). Se consideró que TRPV1 era una diana terapéutica para el tratamiento del dolor crónico. Desde entonces se han protegido y divulgado un enorme número de antagonistas de TRPV1 que se han testado en diversas patologías en las que el receptor se ha implicado. El primer antagonista en desarrollo clínico fue el compuesto AMG517 (N-[4-[[6-[4-(Trifluorometil)fenil]-4-pirimidinil]oxy]-2-benzothiazolyl]acetamida) desarrollado por la empresa AMGEN. Este compuesto inhibía el receptor con una potencia nanomolar todos los modos de activación del recep-

tor (Ognyanov et al., 2006). Además, presentaba una buena disponibilidad oral y seguridad farmacológica en modelos preclínicos en animales. Sin embargo, en el estudio clínico en fase I en humanos el compuesto AMG517 produjo hipertermia en los voluntarios lo que detuvo su desarrollo clínico. Un efecto similar se observó para prácticamente todos los antagonistas desarrollados por las farmacéuticas que tuvieron que reorientar el desarrollo clínico de sus candidatos (Kort y Kym, 2012). Estudios posteriores han encontrado que el receptor TRPV1 juega un papel importante, todavía no del todo esclarecido, en el control de la temperatura corporal. Por ello, su inhibición indiscriminada en todos los tejidos y modos de activación podía producir una desregulación de la homeostasis térmica corporal. Estos resultados han impulsado la búsqueda de antagonistas que preferentemente actúen sobre uno de los modos de activación, sin afectar los otros, o que actúen sobre sitios de unión que queden expuestos en los receptores hiperfuncionales (antagonistas incompetitivos).

A pesar del aparente fracaso inicial de los programas de descubrimiento de moduladores de TRPV1, la modulación del receptor se ha estado realizando en la clínica con excelentes resultados en el tratamiento de diversas patologías, incluyendo el dolor y el prurito crónico. El compuesto más utilizado en la clínica es la capsaicina aplicada tópicamente, bien en cremas o ungüentos o en parches (Brederson y Szallasi, 2013). En la actualidad, los parches de capsaicina al 8% (Qutenza) se están utilizando para el tratamiento del dolor neuropático resistente a narcóticos, a neuropatías periféricas y también al prurito colestásico (Brederson y Szallasi, 2013). La actividad farmacológica de la capsaicina tópica es muy buena logrando reducir los síntomas de forma notable. Ello se debe a la capacidad de la capsaicina de desensibilizar y eliminar el receptor TRPV1 tras una exposición prolongada. Sin embargo, por su capacidad agonista, la aplicación tópica del vanilloide va acompañada inicialmente de un efecto abrasador muy molesto que limita la adhesión de los pacientes al tratamiento con la capsaicina. Así, por ejemplo, el parche al 8% de capsaicina sólo puede administrarse bajo anestesia local que reduzca la sensación urente del vanilloide. Además, la capsaicina presenta otro efecto secundario derivado de su pobre eliminación que cuestiona su uso prolongado. Se ha observado que la acumulación dérmica de capsaicina, junto con la exposición solar de la piel, puede rendir metabolitos con capacidad carcinogénica (Surh y Lee, 1995). Estos estudios, que requieren ser confirmados, suponen un motivo de preocupación en el tratamiento de síndromes crónicos. Algo similar ocurre con antagonistas como la capsacepina que también presenta una eliminación muy pobre. Por ello, se requiere el desarrollo de análogos de la capsaicina que presente un mejor índice terapéutico, especialmente para

el tratamiento de patologías crónicas, incluyendo el prurito. Uno de estos compuestos en fase clínica es la resiniferatoxina (RTX), un compuesto natural procedente de la *Euphorbia resinifera*, que tiene una potencia activadora y desensibilizadora muy superior a la capsaicina. Otro modulador del receptor TRPV1 en estudios clínicos es Asivatrep (PAC14028) de la compañía Koreana Amore Pacific. Este compuesto se está desarrollando para el tratamiento de la dermatitis atópica con unos buenos resultados de seguridad y eficacia (Lee et al. 2019). Tanto RTX como Asivatrep presentan una baja eliminación dérmica, aunque no hay datos a largo plazo que indiquen una potencial actividad oncogénica.

estrategia está basada en el concepto de pro-fármaco, en que el fármaco es liberado en su lugar de acción tras su conversión metabólica por esterasas hepáticas o tisulares (Rautio et al., 2008). Nuestra estrategia fue diseñar moléculas que tras ejercer su actividad en las terminales aferentes epidérmicas fueran hidrolizadas por las esterasas de la dermis (desactivación metabólica) con el fin de generar metabolitos fácilmente eliminables para evitar su acumulación dérmica (Aprile et al., 2019). Además, los moduladores desactivables aseguran una distribución sistémica nula de los compuestos, evitando así posibles efectos secundarios sistémicos (Figura 2).

El concepto de modulador desactivable metabólicamente (*soft drug*)

Una alternativa terapéutica, explotada por nuestro grupo en colaboración con los Drs. Tracey Pirali y Armando Genazzani del departamento de farmacología de la Universidad del Piemonte Oriental en Novara, ha sido el uso de compuestos desactivables metabólicamente como moduladores del receptor TRPV1 expresado en las terminales aferentes epidérmicas. Esta

Diseño de moduladores desactivables para TRPV1

En el diseño de moduladores desactivables metabólicamente para TRPV1, usamos de partida el grupo farmacóforo de la capsaicina, compuesto por un grupo vanilloide (4-hidroxi-5-metoxi bencil) unido a un octanilo mediante un enlace amida (Serafini et al., 2018). La estrategia consistió en sustituir el enlace amida por un enlace éster que enlazase el grupo vanilloide con la región alifática (Figura 2). La inclusión

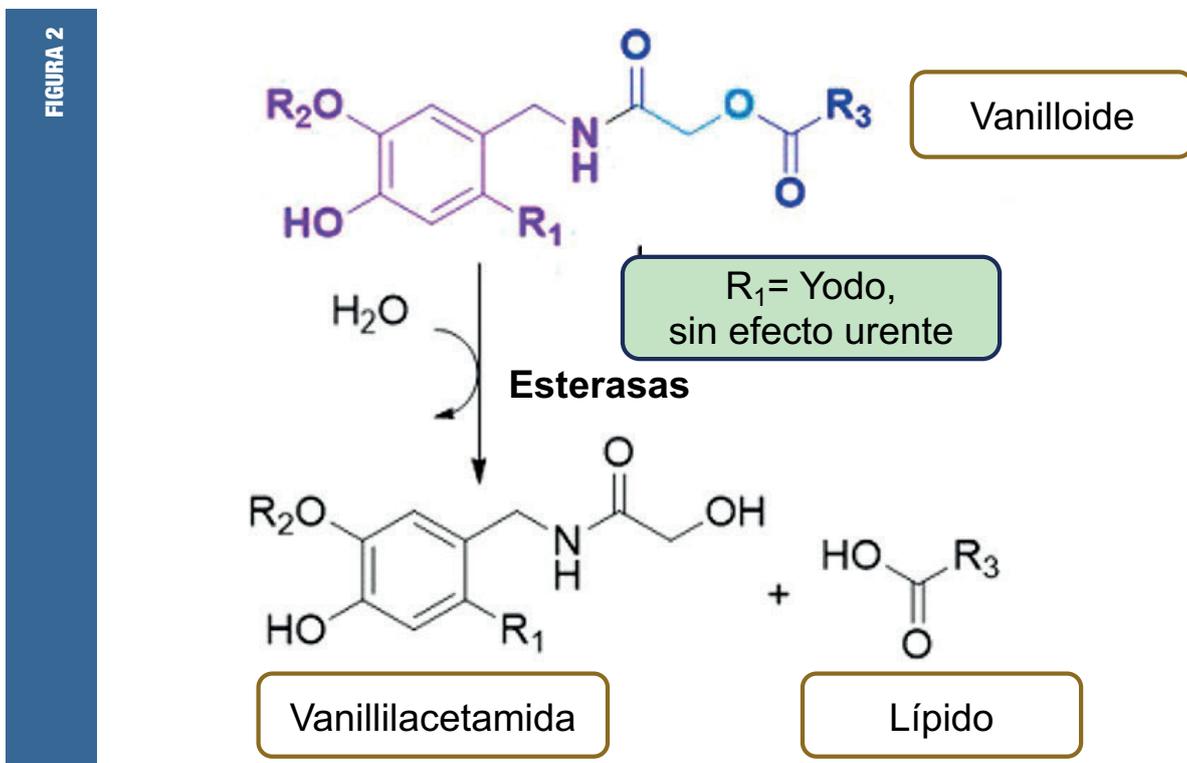


Figura 2. Concepto de vanilloide desactivable metabólicamente (*soft drug*). El vanilloide tiene un enlace éster sensible a la hidrólisis por esterasas cutáneas que producen un metabolito inerte y fácilmente eliminable (vanillilacetamida) y un lípido asimilable por las células. La inclusión de un átomo de yodo en la posición R1 genera antagonistas de TRPV1.

del enlace éster dotó a las moléculas de sensibilidad a la hidrólisis por esterasas, liberando el grupo vanilloide que presenta una elevada tasa de eliminación renal, y un grupo alifático formado por un ácido graso fácilmente asimilable por las células. La diversidad química se incrementó modificando el ácido graso de la región alifática. Además, esta estrategia permitió diseñar tanto agonistas como antagonistas del receptor. Para el diseño de los antagonistas se incorporó un átomo de yodo en la posición 2 del grupo vanilloide (4-hidroxi-2-yodo-5-metoxibencil) (Figura 2). De esta forma, utilizando la reacción multicomponente de Passerini se sintetizó una quimioteca de 42 compuestos, conteniendo 21 agonistas y 21 antagonistas del termorreceptor TRPV1 (Serafini et al., 2018). Se realizó un cribado molecular utilizando la microfluorografía de Ca^{2+} aprovechando la permeabilidad del receptor TRPV1 al catión divalente. El cribado identificó el compuesto 2-((4-hidroxi-2-yodo-5-metoxibencil)amino)-2-oxoetil dodecanoato (inicialmente identificado como compuesto 36, renombrado como AG1529) como el antagonista más potente, con una IC_{50} de $0.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$, y una eficacia de inhibición del $\approx 80\%$ del receptor TRPV1 humano (Serafini et al., 2018). Como era esperable, el compuesto AG1529 es un inhibidor competitivo de la capsaicina que se une al mismo sitio de unión que el vanilloide (Figura 3). La caracterización *in vitro* de su actividad sobre el receptor TRPV1 humano además reveló que AG1529 inhibía parcialmente la activación del receptor TRPV1 por pH ácido extracelular, pero era ineficaz en la activación del receptor por calor

($\geq 43^\circ\text{C}$) y la despolarización de la membrana celular, sugiriendo una moderada modalidad en su actividad inhibitoria (Serafini et al., 2018).

El análisis de su selectividad inhibitoria se realizó en los termorreceptores TRPA1 y TRPM8 humanos expresados recombinantemente *in vitro*, observándose que el compuesto AG1529 mostraba un efecto modesto sobre ambos receptores. A una concentración de $10 \mu\text{M}$ inhibía parcialmente ($\leq 40\%$) la actividad de ambos termorreceptores, pero no alteraba la actividad de los canales de Na^+ y K^+ activados por voltaje. Hay que indicar que la actividad cruzada entre los termorreceptores es conocida. Así, por ejemplo, la capsaicina inhibe parcialmente a ambos receptores y el mentol es capaz de interactuar con el receptor TRPV1 (Takahashi et al., 2016). Además, hay que considerar que, compuestos con actividad preferencial sobre uno de los receptores, y marginal sobre los otros pueden tener un valor farmacológico añadido para el tratamiento de patologías/síntomas multifactoriales como el prurito y el dolor crónicos.

El estudio de la actividad de AG1529 en neuronas sensoriales primarias de rata *in cultivo* reveló que el compuesto no afectaba el disparo de potenciales de acción evocados eléctricamente, inhibiendo fuertemente aquellos provocados por la aplicación de capsaicina y moderadamente los inducidos por acidificación extracelular. Del mismo modo, mostró una actividad inhibitoria modesta sobre los potenciales de acción evocados por la activación de TRPA1. En con-

FIGURA 3

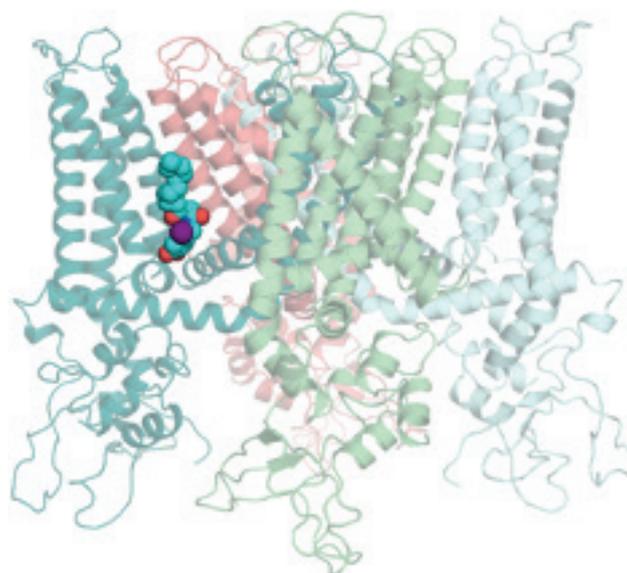


Figura 3. El compuesto AG1529 se une al sitio de unión de la capsaicina en el receptor TRPV1. Modelo molecular del receptor TRPV1 mostrando la interacción del compuesto AG1529. Se muestra sólo la interacción con uno de los sitios de unión de los cuatro disponibles en la estructura del receptor.

junto, las propiedades funcionales exhibidas por el compuesto AG1529 le convirtieron en un compuesto líder para continuar su desarrollo preclínico, siendo un antagonista competitivo de la capsaicina, con un buen perfil farmacológico in vitro tanto en su potencia y eficacia inhibitoria, como en la preferencia inhibiendo las modalidades de activación química del receptor TRPV1, y acción modesta sobre otros termorreceptores presentes en las terminales aferentes.

Validación preclínica de moduladores desactivables de TRPV1

Para estudiar la validación preclínica del compuesto AG1529, en primer lugar, se evaluó in vitro su actividad atenuando la excitabilidad de las neuronas sensoriales primarias estimulada por agentes inflamatorios y, en particular, por la histamina. Es conocido que la histamina incrementa la excitabilidad de las neuronas sensoriales a través de la potenciación de la actividad de TRPV1, por lo que los antagonistas de TRPV1 son candidatos para contrarrestar la acción estimuladora de la histamina. Para estos ensayos se usaron las matrices multielectrodo (MEA) que permiten el registro de la actividad eléctrica de poblaciones de neuronas. El MEA es especialmente útil para el estudio de poblaciones neuronales heterogéneas como son las neuronas sensoriales. Estos estudios mostraron que el compuesto AG1529 reducía nota-

blemente la excitabilidad neuronal aumentada por la exposición de las neuronas sensoriales a la histamina o a una sopa inflamatoria conteniendo histamina, disminuyendo la actividad del receptor TRPV1 potenciada por el pruriginoso.

A continuación, se ensayó la actividad del compuesto AG1529 in vivo en un modelo de prurito provocado por la administración intraplantar de histamina (Figura 4). El compuesto AG1529 (100 μg), también administrado intraplantarmente, redujo significativamente el prurito inducido por el agente pruriginoso (Serafini et al., 2018). Esta actividad se confirmó en un modelo de administración subcutánea de la histamina, en el que el compuesto AG1529 se aplicó formulado en un ungüento al 0.1 y 1%. A ambas dosis se observó una reducción significativa del comportamiento pruritifensivo de los animales, indicando una actividad antipruriginosa de la aplicación tópica del compuesto AG1529. Hay que indicar que estos ensayos mostraron que la aplicación de AG1529 no produce una reacción nocifensiva como la capsaicina, indicando que el compuesto AG1529 no induce un efecto abrasador cuando se administra tópicamente.

Además, hay que destacar que, en experimentos similares, en los que se administró el pruriginoso cloroquina (Figura 4), también se observó un efecto del compuesto AG1529 atenuador del rascado de la región afectada por el pruriginoso, sugiriendo que también puede tener un efecto farmacológico sobre el prurito no histaminérgico, lo que amplía las aplica-

FIGURA 4

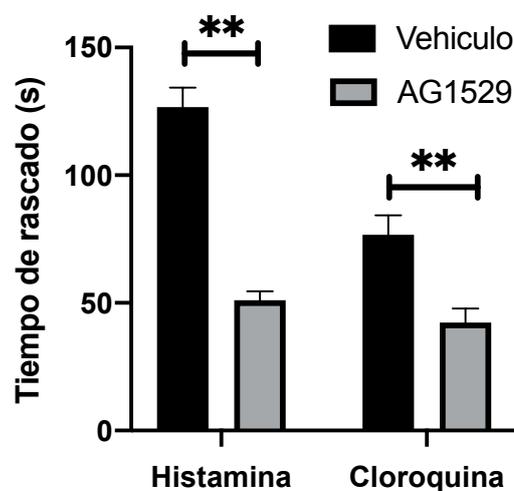


Figura 4. Actividad anti-pruriginosa del compuesto AG1529. Se muestra la actividad anti-pruriginosa evocada por histamina (125 μg) y cloroquina (200 μg) de 100 μg de AG1529. Los compuestos se administraron intraplantarmente. Datos representan la media \pm SD, con $n=6$. $**p<0.01$, ensayo de t-student (Serafini et al. 2018).

ciones terapéuticas de una formulación tópica conteniendo el compuesto AG1529.

Los estudios preclínicos en animales también incluyeron la evaluación de su actividad en un modelo de dolor inflamatorio inducido por la administración intramuscular del adyuvante de Freund (CFA) en una pata del animal (ipsilateral) (Serafini et al., 2018). La administración de CFA produce una inflamación que cursa con hiperalgesia térmica. Estos experimentos revelaron: (i) el compuesto AG1529 administrado intraperitonealmente o intravenosamente eliminó la hiperalgesia térmica en la pata ipsilateral producida por el CFA; (ii) el compuesto AG1529 no afectó el umbral de temperatura de la pata contralateral, corroborando su baja actividad sobre la activación térmica del receptor; y, (iii) la administración intravenosa de una dosis de 20 mg/kg no afectó la temperatura corporal de los animales (i.e. no produjo hipertermia), ni evidenció síntomas de toxicidad. Estos resultados sugieren un efecto farmacológico sobre el dolor inflamatorio y un buen perfil de toxicidad del compuesto.

Por último, también se caracterizó la estabilidad metabólica con el fin de corroborar que el compuesto AG1529 era desactivado por esterasas (Serafini et al., 2018). Estos experimentos contemplaron dos ensayos complementarios. Por una parte, se evaluó la cinética de desactivación del compuesto por las carboxiesterasas humanas CE1 y CE2, obteniéndose una $k = 0,0255 \text{ min}^{-1}$ y $t_{1/2} = 27.2 \text{ min}$ para CE1, y $k = 0,055 \text{ (min}^{-1})$, $t_{1/2} = 12.5 \text{ min}$ para CE2. Por otra parte, la estabilidad del compuesto en un homogenizado de queratinocitos humanos, medida como el porcentaje de compuesto AG1529 residual tras 2h de incuba-

ción, fue del 23%; y para fibroblastos humanos del 13%. Estos resultados confirman que el compuesto es sensible a las esterasas dérmicas, produciéndose su hidrólisis lo que limita y previene su acumulación en la piel.

Además, el compuesto también muestra inestabilidad plasmática y hepática. Por tanto, el compuesto AG1529 es un antagonista del receptor TRPV1, con actividad anti-inflamatoria y anti-pruriginosa in vivo, que es hidrolizado en la dermis, evitando su distribución sistémica, siendo un candidato a desarrollo clínico para una aplicación dermatológica como es el picor pruritoceptivo o inflamatorio.

Desarrollo clínico de moduladores desactivables en TRPV1

Por lo expuesto anteriormente, el compuesto AG1529 se seleccionó como candidato a desarrollo clínico para el tratamiento del prurito psoriásico, una patología que afecta al 3% de la población. En 2019, la spin-off AntalGenics, comenzó el desarrollo preclínico de seguridad farmacológica y estabilidad, así como de la caracterización química del compuesto. Actualmente, se están concluyendo los estudios preclínicos que muestran un buen perfil de seguridad farmacológica y estabilidad química, con el fin de solicitar un IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier) a la EMA (European Medicines Agency) para el inicio de los estudios clínicos en 2021.

Conclusiones

En este artículo hemos presentado una estrategia farmacológica traslacional dirigida al desarrollo antagonistas del termorreceptor TRPV1 como dermofarmacéuticos. La hipótesis de partida se basó en la modificación del grupo farmacóforo de la capsaicina, un vanilloide usado en clínica, para eliminar sus efectos secundarios más notables, a saber, el efecto abrasador que produce su aplicación, y su acumulación dérmica que puede ocasionar en el tiempo carcinogénesis. La sustitución del enlace amida por uno éster generó moléculas con sensibilidad a la hidrólisis por esterasas cutáneas, eliminando su acumulación dérmica. La introducción de un átomo de yodo en la posición 2 del grupo 4-hidroxi-5-metoxibenzil generó antagonistas del receptor carentes

del efecto abrasador de la capsaicina (Figura 5). El compuesto AG1529 se seleccionó por sus propiedades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* en modelos de picor pruritoceptivo para su desarrollo preclínico y clínico para el tratamiento del prurito psoriásico. La aplicación tópica de este producto se mostró segura en animales y ha demostrado un efecto antipruriginoso provocado por histamina y cloroquina, sugiriendo en diversas modalidades de prurito. Nuestros resultados muestran que la reducción / eliminación de efectos secundarios de farmacóforos clínicamente útiles es una estrategia válida en farmacología traslacional. Por último, hay que destacar que análogos del compuesto AG1529, con una potencia farmacológica modesta, han sido paralelamente desarrollados como ingredientes cosméticos (Calmapsin® y Capsilence®) para el cuidado de las pieles sensibles (Nocisens®).

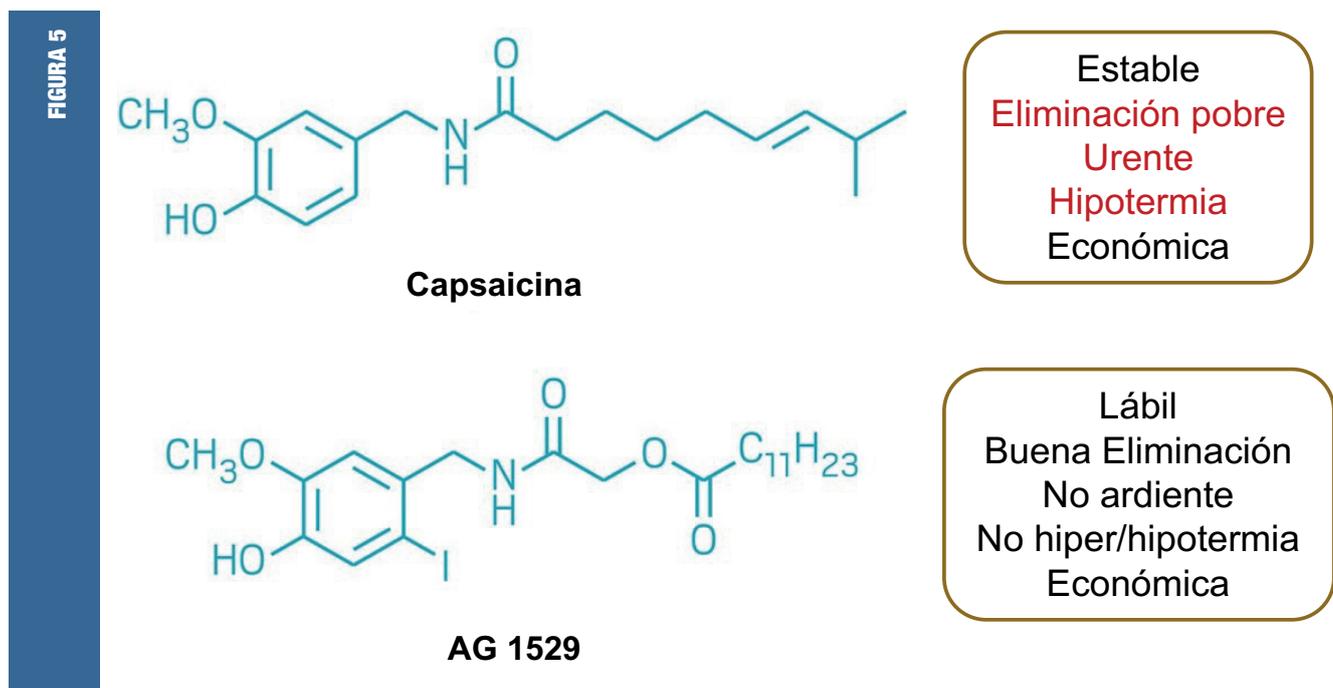


Figura 5. Comparación de AG1529 con la capsaicina. Se muestra la comparación de las estructuras químicas, observándose que ambas son vanilloides, y se indican las propiedades mejoradas por parte del compuesto AG1529. Este compuesto se encuentra en desarrollo preclínico/clínico para el tratamiento del prurito psoriásico.

Referencias

- Aprile, S, Serafini, M, Pirali, T. Soft drugs for dermatological applications: recent trends. *Drug Discov. Today*, 2109; 24: 2234-2246.
- Arpad Szallasi (Ed) TRP channels in Health and Disease. Nova Science Publishers, 2011.
- Brederson, JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol*, 2013; 716: 61-76.
- Caterina, MJ, Schumacher, MA, Tominaga, M, Rosen, TA, Levine JD, Julius, D. *Nature*, 1997; 389: 816-824.
- Caterina, MJ, Leffler, A, Malmberg, AB, Martin, WJ, Trafton, J, Petersen-Zeitz, KR, Koltzenburg, M, Basbaum, AI, Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 2000; 288: 306-313.
- Devesa, I, Ferrer-Montiel, A. Neurotrophins, endocannabinoids and thermo-transient receptor potential: a threesome in pain signalling. *Eur J Neurosci*, 2014; 39: 353-362.
- Dhand, A, Aminoff, MJ. The neurology of itch. *Brain*, 2014; 137: 313-322.
- Green, D, Dong, X. The cell biology of acute itch. *J. Cell Biol*, 2016; 213: 155-161.
- Gregorio-Teruel, L, Valente, P, Liu, B, Fernández-Ballester, G, Qin, F, Ferrer-Montiel, A. The integrity of the TRP domain is pivotal for correct TRPV1 channel gating. *Biophys J*, 2015; 109: 529-541.
- Han, L, Chao, M, Liu, Q, Weng, H-J, Cui, Y, Tang, Z, Kim, Y, Nie, H, Qu, L, Patel, KN, Li, Z, McNeil B, He, S, Guan Y, Xiao, B, LaMotte RH, Dong, X. *Nat Neurosci* 2013, 174-182.
- Hellmich, UA, Gaudet R. Structural Biology of TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*, 2014; 223: 963-990.
- Hittaka, H, Tominaga, M. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. *Allerg Int*, 2017; 66: 22-30.
- Lee, YW, Won, C-H, Jung K, Nam, H-J, Choi G, Park, Y-H, Parl, M, Kim, B. Efficacy and safety of PAC-14028 cream-a novel, topical, nonsteroidal, selective TRPV1 antagonist in patients with mild-to-moderate atopic dermatitis: a phase IIb randomized trial. *Br J Dermatol*, 2019; 180: 1030-1038.
- Kort, ME, Kym, PR. TRPV1 antagonists: clinical setbacks and prospects for future development. *Prog Med Chem*, 2012; 51: 57-70.
- Ognyanov, VI, Balan, C, Bannon, AW, Bo, Y, Dominguez, C, Fotsch, C, Gore, VK, Klionsky, L, Ma, VV, Qian, YX, Tamir, R, Wang, X, Xi, N, Xu, S, Zhu, D, Gavva, NR, Treanor, JJ, Norman, MH. Design of potent, orally available antagonists of the transient receptor potential vanilloid I. Structure-activity relationships of 2-piperazin-1-yl-1Hbenzimidazoles. *J. Med Chem*, 2006; 49: 3719-3742.
- Patel, KN, Dong, X. Itch: Cells, molecules and circuits. *ACS Chem Neurosci* 2011, 2, 17-25.
- Potenzieri, C, Udem BJ. Basic mechanisms of itch. *Clin Exp Allergy*, 2012; 42: 8-19.
- Rautio, J, Kumpulainen, H, Heimbach, T, Oliyai, R, Oh, D, Järvinen, T, Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Drug Discov*, 2008; 7: 255-270.
- Serafini, M, Griglio, A, Aprile, S, Seiti, F, Travelli, C, Pattarino, F, Grosa, G, Sorba, G, Genazzani, GA, González-Rodríguez, S, Butron, L, Devesa, I, Fernández-Carvajal, A, Pirali, T, Ferrer-Montiel, A. Targeting transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel softly: the discovery of Passerini adducts as a topical treatment of inflammatory skin disorders. *J. Med Chem*, 2018; 61: 4436-4455.
- Surh, Y-J, Lee, SS. Capsaicin, a double-edge sword: toxicity, metabolism and chemopreventive potential. *Life Sci*. 1995; 56, 1845-1855.
- Takahashi, M, Uchida, K, Suzuki, Y, Matsui, H, Shimada, T, Fujita, F, Tominaga, M. Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. *J. Physiol Sci*, 2016; 66: 143-155.
- Xie, Z, Hu, H. TRP channels as drug targets to relieve itch. *Pharmaceuticals*, 2018; 11, 100.