# DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DEL CANAL DE CLORURO LRRC8/VRAC, UN NUEVO ELEMENTO CLAVE EN LA ISQUEMIA

**Dr. Raúl Estévez Povedano**
Institut d'Investigació Biomèdica Hospital de Bellvitge - IDIBELL
**Dr. Rodolfo Lavilla Grifols**
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació - Universitat de Barcelona

## 1. Resumen

Los fenómenos isquémicos, como los accidentes cerebrovasculares, hacen que los astrocitos sufran una hinchazón sostenida, lo que activa el canal de aniones regulado por volumen (VRAC). Esta activación provoca la liberación de glutamato en los espacios extracelulares, lo cual contribuye al aumento observado en las concentraciones de glutamato en los accidentes cerebrovasculares. El glutamato contribuye al daño excitotóxico. La administración de inhibidores del VRAC en modelos animales de accidente cerebrovascular reduce la liberación de glutamato intraisquémico y el área de infarto cerebral. Sin embargo, los inhibidores utilizados carecen de especificidad y muestran poca penetración a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Recientemente se ha identificado que el canal VRAC está formado por heterómeros de proteínas LRRC8. Por lo tanto, ahora es posible medir su función en un sistema simple como ovocitos de Xenopus utilizando una pinza de voltaje de dos electrodos o líneas celulares utilizando citometría de flujo. En este proyecto, proponemos encontrar nuevos inhibidores de LRRC8 específicos y permeables a la BBB que podrían usarse para la terapia del accidente cerebrovascular. Proponemos un enfoque integrado, multidisciplinario e iterativo entre un grupo de química médica, que sintetizará nuevos derivados de dos inhibidores conocidos del VRAC/LRRC8 (DCPIB y carbenoxolona), y un grupo de electrofisiólogos/biólogos celulares que probarán los nuevos compuestos en dos sistemas celulares diferentes. Los dos compuestos seleccionados se prepararán y se modificarán mediante técnicas convencionales buscando mejorar la potencia contra el VRAC y, lo que es más importante, la selectividad. Esto incluirá la modificación estructural programada de fracciones significativas en sus respectivas moléculas a través de transformaciones sintéticas bien establecidas. Además, en una posterior etapa, una vez seleccionados los mejores inhibidores, estos compuestos serán optimizados para su actividad en el sistema nervioso central, apuntando especialmente a un cruce eficiente de la BBB. Aquí, se buscará un enfoque profármaco. Nuestro objetivo es encontrar uno o dos compuestos que inhiban selectivamente el canal LRRC8/VRAC para probar en un modelo de accidente cerebrovascular en roedores.

## 2. Resultados

**Tarea 1. Configuración detallada del sistema de cribado. 1.er año (enero-abril)**

Inicialmente, se propusieron dos sistemas diferentes para detectar inhibidores del canal VRAC. Las células HAP1 deficientes para la proteína LRRC8A (el componente principal del canal VRAC) eran resistentes al antibiótico blasticidina, ya que no puede penetrar las células. Nuestra primera propuesta fue aplicar inhibidores del VRAC y ver si pueden proteger a las células de tipo salvaje de los efectos citotóxicos de la blasticidina. Sin embargo, el inhibidor CBX no pudo proteger las células HAP1 de tipo salvaje e incluso las destruyó. Razonamos que las células HAP1 KO sin VRAC se han adaptado a la falta del canal, mientras que una inhibición aguda matará las células independientemente de la blasticidina. Por lo tanto, no evaluamos los inhibidores usando este ensayo y nos concentramos solo en medir la actividad del canal usando electrofisiología. Por consiguiente, hemos utilizado principalmente ovocitos de Xenopus que expresan proteínas LRRC8 marcadas con GFP, como se planeó inicialmente. Además, hemos realizado algunas mediciones de pinzamiento de membrana de células enteras en células eliminatorias HEK293 LRRC8 que expresan proteínas LRRC8, después de construir diferentes plásmidos de expresión. Finalmente, también hemos realizado algunas mediciones de pinzamiento de membrana de células completas en cultivos primarios de astrocitos que expresan proteínas endógenas, para demostrar que los inhibidores pudieron inhibir la corriente VRAC en los astrocitos. Por lo tanto, concluimos que el sistema de detección se ha configurado correctamente.

**Tarea 2. Cribado de los inhibidores proporcionados por el grupo MedChem**

**Derivados de CBX**

Se han probado con éxito hasta 13 derivados de CBX diferentes (Fig. 1A). Entre ellos, originalmente destacaron el MP037 y el MP075. Ambos compuestos compartían la característica de incorporar anillos aromáticos en la larga cadena carbonada que precede al carboxilo (Fig. 1B). Curiosamente, el MP037 tuvo un efecto activador inesperado sobre la corriente VRAC (Fig. 1A). Por otro lado, y de forma muy interesante, el MP075 mostró un fuerte aumento en la inhibición de la corriente VRAC (Fig. 1A).

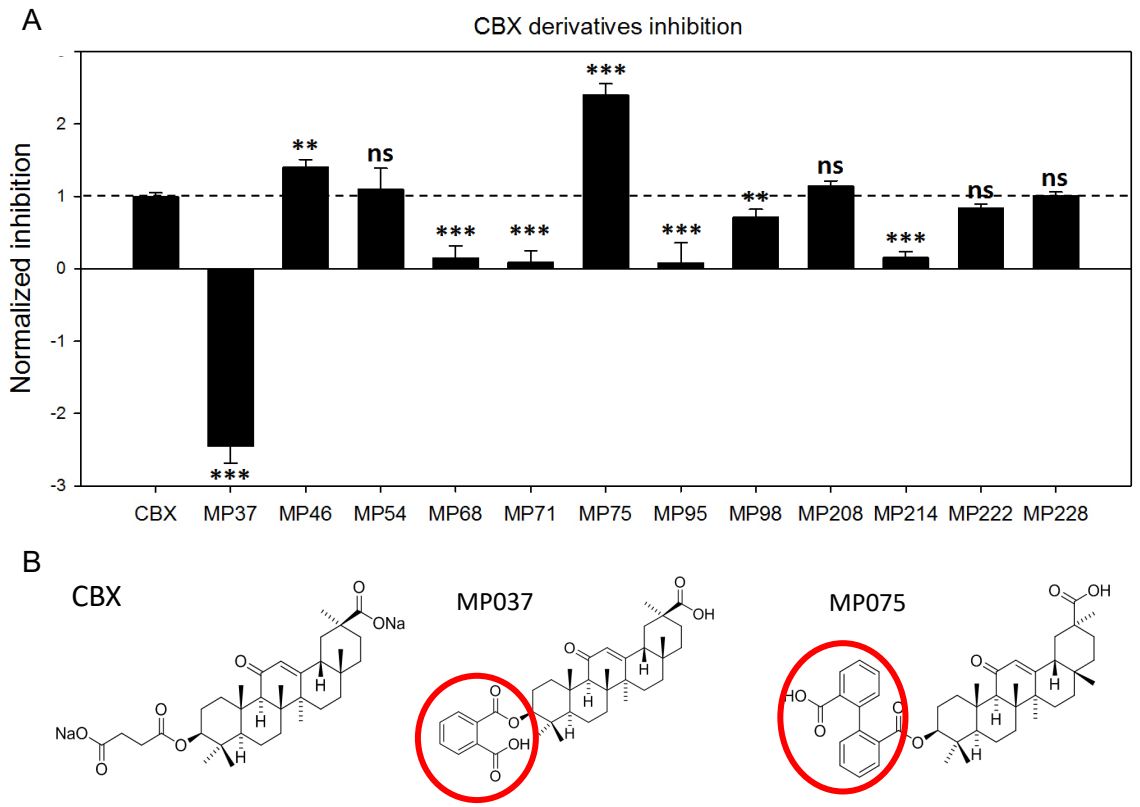



**Fig. 1**: A) Inhibición normalizada de los diferentes derivados de CBX ensayados. Los valores representados están normalizados a CBX. Se realizó la prueba T-student para identificar diferencias de inhibición estadísticamente significativas entre cada derivado individual frente al compuesto CBX original. B) Representación esquemática 2D de diferentes fármacos. El círculo rojo resalta las características especiales.

Tras estos resultados tan prometedores, decidimos realizar nuevos derivados basados en las características del MP037 y el MP075. Para mejorar su uso clínico potencial para el tratamiento de lesiones isquémicas en el cerebro, nuestros colegas incorporaron modificaciones de éster de hidroxilamina con un doble propósito. Por un lado, estas modificaciones deberían aumentar la permeabilidad de la BBB. Por otro lado, una vez en el cerebro, estas modificaciones podrían ser revertidas por hidrólisis. Así, el MP222 y el MP228 se obtuvieron de las estructuras del MP037 y el MP075, respectivamente. Curiosamente, tanto el MP222 como el MP228 mostraron una actividad de bloqueo similar a CBX (Fig. 1A). Sin embargo, dado que las modificaciones del éster son transitorias, es justo suponer un comportamiento similar de estos compuestos a sus respectivos originales (MP037 y MP075).

Como la activación del canal no era el objetivo del presente proyecto, los derivados MP037 y MP222 se descartaron como candidatos, y queda por explorar el interesante efecto de activación del VRAC. Por otro lado, seguimos probando el prometedor derivado MP228.

El MP075 y el MP228 se ensayaron a continuación en líneas celulares HEK293T LRRC8 -/- que sobreexpresan la combinación 8A+8E. Curiosamente, tanto el MP075 como especialmente el MP228 mostraron un gran aumento en la inhibición del VRAC (Fig. 2). Además, el MP228 también se ha probado en astrocitos de cultivo primario e inhibe la actividad del VRAC endógena presente en las células (Fig. 2).

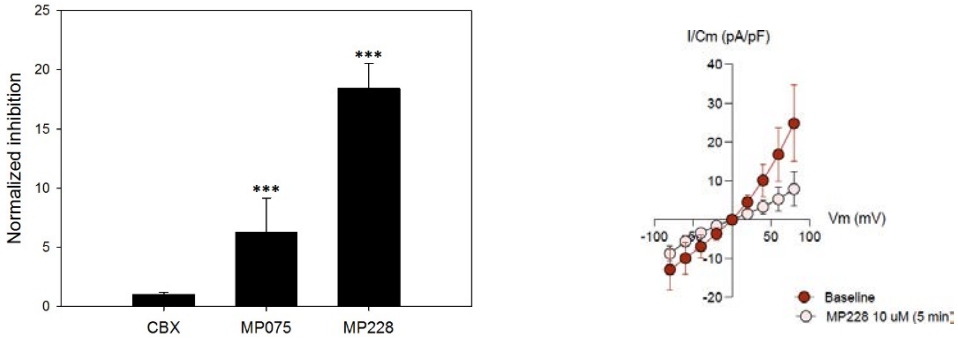



**Fig. 2**. Aumento de la inhibición d'MP075 y MP228 vs. CBX. A la izquierda, experimentos en células HEK293T LRRC8-/- que sobreexpresan LRRC8A+LRRC8E. A la derecha, relación corriente-tensión de la corriente VRAC expresada de manera endógena en astrocitos primarios con o sin aplicación del inhibidor MP228.

## Derivados de DCPIB

Se ha llevado a cabo un segundo conjunto de pruebas de derivados basado en el potente bloqueador de canales DCPIB VRAC. Dada la experiencia previa adquirida en experimentos con derivados de CBX en los que la introducción de grupos bifenilo mejoraba el efecto de bloqueo, se sintetizaron y se probaron diferentes derivados (MP349, MP351 y MP399) siguiendo ese criterio. Desafortunadamente, ninguno de estos compuestos mejoró la inhibición de DCPIB (Fig. 3A).

El resultado prometedor de los experimentos con DCPIB provino del derivado MP286. El proceso de síntesis de DCPIB es difícil, específicamente debido a la presencia de un ciclopentano (Fig. 3B-izquierda). El MP286 simplificó enormemente la síntesis al cambiar el ciclopentano por una cadena de terbutilo (Fig. 3B-centro). Además, el derivado de MP286 retuvo por completo los niveles de inhibición del compuesto DCPIB original (Fig. 3A). Como se indicó anteriormente, otro aspecto importante para la aplicación clínica de estos compuestos es la permeabilidad de la BBB. Para ello, se introdujeron modificaciones de éster en el carboxilo terminal de DCPIB y MP286 y se obtuvieron los nuevos derivados MP277 y MP300 (Fig. 3B-derecha). Tanto el MP277 como el MP300 mostraron una inhibición reducida en comparación con DCPIB (Fig. 3A).

Sin embargo, como se indicó en la sección anterior de derivados de CBX, dado que se espera que las modificaciones de éster se hidrolicen, la actividad funcional no debería verse afectada después del acceso al SNC. Por lo tanto, la síntesis optimizada y las modificaciones de permeabilidad de la BBB del MP300 dieron forma a este derivado como un buen candidato.

Por lo tanto, a partir de estos estudios, decidimos centrarnos en dos compuestos específicos, el derivado de CBX MP228 y el derivado DCPIB MP300. Fueron producidos en cantidades adecuadas para la experimentación *in vivo* por el grupo MedChem.

**Tarea 3. Probar uno o dos inhibidores en un modelo de accidente cerebrovascular en ratas**

Iniciamos una colaboración con Anna Planas (CSIC), que es una experta líder en ictus y ya ha puesto en marcha en su laboratorio el procedimiento para obtener un ictus en ratones tras la oclusión de la arteria media. Los compuestos han sido inyectados y el análisis de los efectos está en progreso. Esperamos obtener los primeros resultados en unos meses.

**Tarea 4. Identificación del sitio de unión del inhibidor**

Como se mencionó en el informe intermedio, la identificación en 2018 de la estructura *cryo-EM* de LRRC8A ofrece la posibilidad de predecir los sitios de unión para los inhibidores del VRAC y predecir otros nuevos basados en el acoplamiento. Aunque se han publicado varias estructuras *cryo-EM* del canal LRRC8-VRAC, aún se desconoce el sitio de unión de los diferentes bloqueadores del canal. Desentrañar el sitio de unión sería importante para el diseño y la optimización de nuevos inhibidores del canal VRAC, al permitir realizar diferentes estrategias, como por ejemplo experimentos de acoplamiento virtual. Por ello, en el presente proyecto muchos esfuerzos se han centrado en abordar la identificación del sitio de unión de los inhibidores VRAC (ATP, DCPIB y CBX).

*Generación de variantes mutantes que alteran la sensibilidad de bloqueo*

Varios estudios sugieren que la región de la hélice del poro (y/o los residuos cercanos) del canal LRRC8-VRAC está involucrada en la unión de diferentes bloqueadores de canales. Según las estructuras publicadas del canal homohexamérico LRRC8A (8A), el residuo R103 forma la constricción más estrecha del poro (1-4). También se sugiere

que esta característica sea compartida por el homohexámero LRRC8D (8D) con el residuo equivalente F143 (5). Curiosamente, la mutación R103F de la subunidad esencial 8A condujo a la insensibilidad a la corriente de salida de ATP en coexpresión con la isoforma 8C (1). Además, una estructura *cryo-EM* del canal 8A VRAC sugirió que la constricción R103 es un actor clave del sitio de unión del inhibidor DCPIB (4). Asimismo, varios estudios en Panx1 (un canal homólogo con un perfil de inhibición relativamente similar) encontraron que la mutación de residuos de esta misma región alteraba la sensibilidad del canal a diferentes fármacos (6, 7).

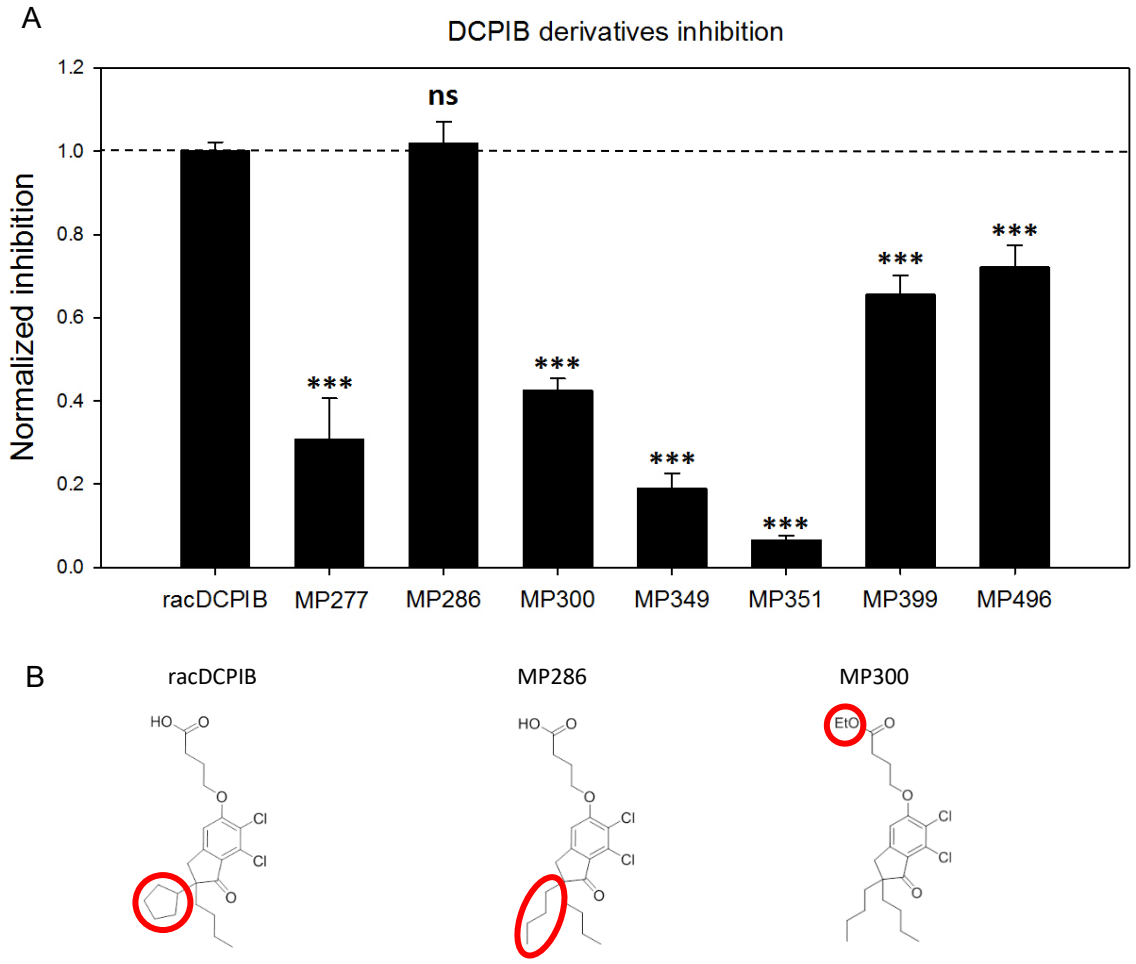



**Fig. 3:** A) Inhibición normalizada de los diferentes derivados de DCPIB ensayados. Los valores representados están normalizados a DCPIB (racDCPIB). Se realizó la prueba T-student para identificar diferencias de inhibición estadísticamente significativas entre cada derivado individual frente al compuesto DCPIB original. B) Representación esquemática 2D de diferentes fármacos. El círculo rojo resalta las características especiales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos probar si la mutación R103F 8A podría alterar la sensibilidad de bloqueo a diferentes inhibidores. Curiosamente, R103F 8A hizo que el canal fuera casi insensible a la inhibición de la corriente de salida de ATP en coexpresión con la subunidad 8E de tipo salvaje (WT) en ovocitos de Xenopus (Fig.

4A). De acuerdo con estudios previos, estos resultados sugirieron que el residuo R103 es crítico para la unión de ATP al canal LRRC8-VRAC. A continuación, decidimos comprobar posibles efectos en la sensibilidad de la mutación 8A R103F a los inhibidores CBX y DCPIB. De forma curiosa, aparentemente ni la inhibición de CBX ni de DCPIB se alteró en el canal VRAC mutado R103F 8A (Fig. 4B). Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos sugirieron que el residuo R103 podría ser crítico para la unión de DCPIB (4). Sin embargo, nuestros resultados en ovocitos de Xenopus sugirieron fuertemente que el residuo R103 no formaba parte del sitio de unión de estos bloqueadores VRAC clásicos.

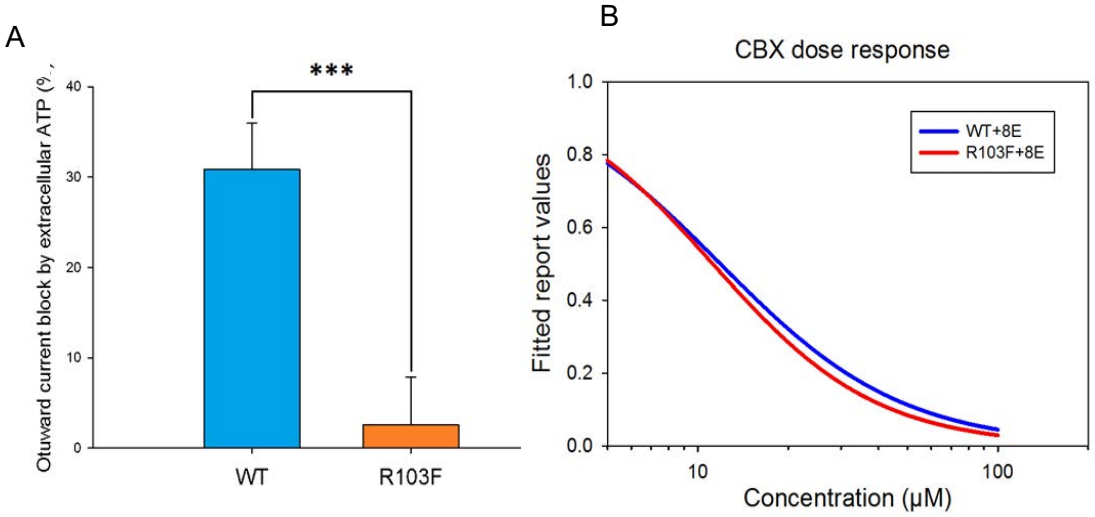



**Fig. 4:** Sensibilidad de bloqueo de la subunidad esencial 8A WT/R103F en coexpresión con 8E. A) Cuantificación a partir de registros de TEVC en ovocitos de Xenopus a una concentración extracelular de 2 mM de ATP. B) Valores ajustados de los experimentos de dosis-respuesta de CBX realizados en la mutación WT 8A (WT) o R103F 8A (R103F), ambas en coexpresión con 8E. Los experimentos de dosis-respuesta se realizaron a concentraciones crecientes de CBX en μM: 10, 20, 50, 100.

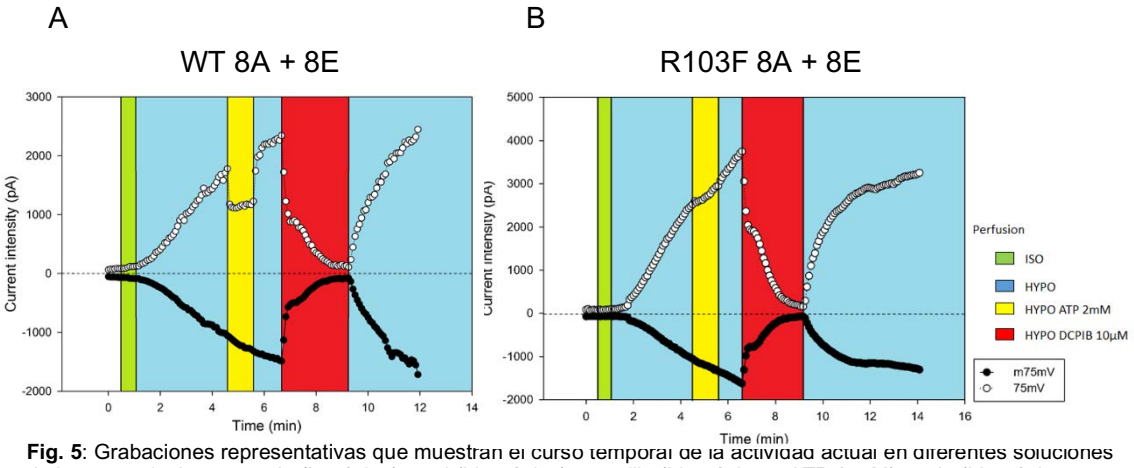



**Fig. 5**: Grabaciones representativas que muestran el curso temporal de la actividad actual en diferentes soluciones de baño que incluyen: verde (isotónica), azul (hipotónica), amarilla (hipotónica + ATP 2 mM) y roja (hipotónica + DCPIB 10 μM). Los puntos corresponden a mediciones a +75 mV (blanco) y -75 mV (negro). A) Combinación WT 8A + 8E VRAC. B) Combinación R103F 8A + 8E VRAC.

Dado que el sistema heterólogo de ovocitos de Xenopus tiene niveles bajos de proteína 8A endógena (8, 9), queríamos excluir la posibilidad de que nuestros resultados se vieran alterados por estos antecedentes. Por lo tanto, decidimos llevar a cabo experimentos similares en líneas celulares HEK293T LRRC8 -/-. Con ese objetivo en mente, el investigador posdoctoral Héctor Gaitán-Peñas realizó una estancia corta de 3

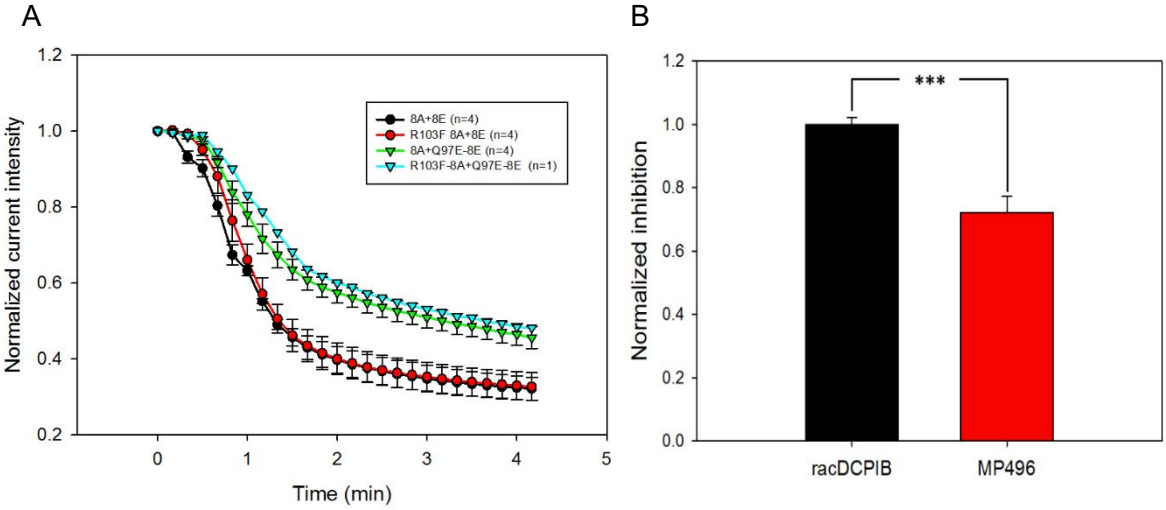



**Fig. 6**: nuevas estrategias para desentrañar el sitio de unión de inhibición del VRAC DCPIB/CBX. A) La variante Q97E-8E disminuye la sensibilidad DCPIB del canal VRAC. B) El derivado de MP496 es un potente inhibidor de la actividad del canal VRAC. La figura muestra valores normalizados al nivel de inhibición de DCPIB (racDPIB).

meses en el Istituto di Biofisica – IBF de Génova (Italia) para aprender a realizar pruebas de inhibidores y experimentos de pinzamiento de membrana en el laboratorio del Dr. Michael Pusch. De acuerdo con los experimentos de ovocitos, las grabaciones en líneas celulares HEK293T LRRC8 -/- que sobreexpresan WT/R103F 8A + 8E produjeron resultados similares (Fig. 5A-B). Mientras que la corriente de salida de WT 8A + 8E estaba bloqueada por ATP extracelular (Fig. 5A-amarillo), la mutación R103F condujo a una insensibilidad de ATP de corriente de salida (Fig. 5B-amarillo). Además, las mutaciones WT 8A y R103F 8A fueron inhibidas de manera similar por los

inhibidores de DCPIB y CBX (comparar Fig. 5A-rojo frente a 5B-rojo).
Nuestros resultados tanto en ovocitos como en líneas celulares sugieren fuertemente que el residuo R103 8A es crítico para la inhibición de ATP. Por otro lado, no se pudo detectar ningún efecto aparente sobre la sensibilidad de DCPIB ni de CBX. Las estructuras CEM publicadas del canal se han elaborado a partir de homohexámeros de la subunidad esencial 8A (1, 2, 3, 4) o la isoforma 8D (5). Además, se sugiere que Panx1 tenga un ensamblaje homoheptamérico y, por lo tanto, se han realizado experimentos de sensibilidad de bloqueo que abordan el sitio de unión en variantes mutantes que afectan a todos los monómeros del canal (6, 7). Se sabe que el canal VRAC es un heterohexámero formado por diferentes combinaciones de isoformas LRRC8. Por lo tanto, es probable que los residuos de diferentes isoformas configuren el sitio de unión del canal VRAC. Estudios recientes de Panx1 identificaron 2 residuos de la hélice del poro (altamente conservados en el canal LRRC8-VRAC) que confieren insensibilidad a CBX cuando mutan (7). Al observar una alineación de homología, estos residuos corresponden a L96 y Q97 en la isoforma 8E del canal VRAC. Curiosamente, L96 corresponde a R103 en 8A. Por lo tanto, es probable que estos residuos estén dando forma a la constricción más estrecha del canal heteromérico 8A+8E VRAC. Teniendo en cuenta esta naturaleza heteromérica, es posible que al mutar solo el residuo R103 de la subunidad 8A, no estemos alterando significativamente la forma del sitio de unión de DCPIB/CBX. Por todo ello, hemos desarrollado dos nuevas variantes mutantes de la subunidad 8E (L96A y Q97E). Los primeros resultados en ovocitos de Xenopus que coexpresan estas nuevas variantes con WT 8A o R103F 8A sugieren una menor sensibilidad a la inhibición de DCPIB/CBX (Fig. 6A). Con el objeto de confirmar estos resultados prometedores, actualmente estamos desarrollando nuevas construcciones para probar la sensibilidad de las variantes L96A y Q97E 8E a la inhibición de CBX/DCPIB en líneas celulares HEK293T LRRC8 -/-. Si se confirman estos resultados, serían una sólida evidencia que apoya la identificación del sitio de unión de inhibición de DCPIB/CBX.

Alternativamente, consideramos otro enfoque para encontrar el sitio de unión. En colaboración con el grupo MedChem, desarrollaron la molécula ditópica MP496, que contiene un núcleo de afinidad para el canal VRAC (DCPIB) más un residuo capaz de fotocruzarse tras una activación adecuada con luz UV. Podríamos probar (Fig. 6B) que el análogo de fotocruce de DCPIB también inhibe el canal VRAC. Se están realizando experimentos bioquímicos.

**Bibliografía**

*1-* Kefauver JM *et al. Structure of the human volume regulated anion channel*. eLife, 2018.

*2-* Deneka D *et al. Structure of a volume-regulated anion channel of the LRRC8 family*. Nature, 2018.

*3-* Kasuya G *et al. Cryo-EM structures of the human volume regulated anion channel LRRC8*. Nat. Struct. & Mol. Biol, 2018.

*4-* Kern DM *et al. Cryo-EM structures of the DCPIB-inhibited volume-regulated anion channel LRRC8A in lipid nanodiscs*. eLife, 2019.

*5-* Nakamura R *et al. Cryo-EM structure of the volume-regulated anion channel LRRC8D isoform identifies features important for substrate permeation*. Nat. Comm. Biology, 2020.

*6-* Michalski K*. Carbenoxolone inhibits Pannexin1 channels through interactions in the first extracellular loop*. Journ. Gen. Physiol., 2015.

*7-* Ruan Z *et al. Structures of human pannexin 1 reveal ion pathways and mechanism of gating*. Nature, 2020.

*8-* Gaitán-Peñas H *et al. Investigation of LRRC8-Mediated Volume-Regulated Anion Currents in Xenopus Oocytes*. Biophysical Journal, 2016.

*9-* Gaitán-Peñas H *et al. Expression of LRRC8/VRAC Currents in Xenopus Oocytes: Advantages and Caveats*. Int. J. Mol. Sci., 2018.

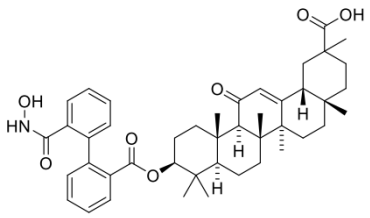
## 3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Durante los últimos tres años se han sintetizado un total de 20 derivados. Entre ellos, dos compuestos específicos, MP228 y MP300, han mostrado un buen valor de inhibición del VRAC en ensayos *in vitro*, por lo que han sido seleccionados y producidos en cantidades adecuadas para experimentación *in vivo* y enviados para experimentación con animales. Además, hemos identificado un posible sitio de unión de los inhibidores, lo que ayudará en el desarrollo de más inhibidores utilizando las estructuras LRRC8 disponibles.

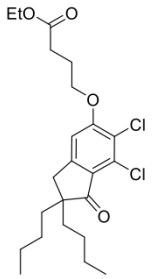
El compuesto MP228 es un derivado de la carbenoxolona. Este nuevo compuesto incorpora en su estructura un motivo difenilo y un ácido hidroxámico que sustituye el ácido carboxílico original de la carbenoxolona. Tal grupo funcional facilitará que el

compuesto cruce la barrera hematoencefálica. El compuesto MP300 es un derivado de DCPIB. En este caso, el nuevo derivado no tiene centros quirales, por lo que hemos mejorado su preparación en comparación con el DCPIB original. Además, la cadena de alquilo superior tiene un grupo éster que reemplaza el ácido carboxílico, lo que ayudaría al compuesto a cruzar la barrera hematoencefálica.

Idealmente, ambos compuestos seleccionados deberían alcanzar el VRAC objetivo en modelos *in vivo* y mostrar actividad en la reducción de la liberación de glutamato de los astrocitos.




MP228
Amount: 88.7 mg
Purity (checked by LC-MS): 90%




MP300
Amount: 100.9 mg
Purity (checked by LC-MS): 98%

## 4. Bibliografía científica generada

### Publicaciones

1 revisión. Elorza-Vidal X, Gaitán-Peñas H, Estévez R. *Chloride channels in astrocytes: structure, roles in brain homeostasis and implications in disease*. Int J Mol Sci. 2019 20:1034.

1 publicación en preparación, sobre la preparación de los compuestos menos activos, sus características biológicas y SAR.

1 publicación en preparación, sobre los detalles estructurales del sitio de unión del inhibidor del canal.

Está prevista 1 patente sobre la protección de las sustancias más activas y su papel en el tratamiento de la isquemia.

1 tesis doctoral (Marina Pedrola, Facultad de Farmacia, UB) íntegramente desarrollada. Tras la aprobación de todas las comisiones, se encuentra en fase de redacción de la memoria definitiva y se prevé que la defensa tenga lugar en torno al 22 de marzo. Versará sobre los estudios químicos relativos a los enfoques sintéticos y la preparación de los compuestos para estudios SAR y pruebas *in vivo*.