

doi: 10.30827/ars.v62i1.15704

Artículos de revisión

## **Modulación Alostérica Positiva selectiva para el receptor muscarínico M1: descubrimiento y desarrollo del compuesto VU0486846 y su importancia para el desarrollo de tratamientos para el Alzheimer y la Esquizofrenia**

Selective Positive Allosteric Modulation for the M<sub>1</sub> Muscarinic Receptor: discovery and development of compound VU0486846 and its importance for the development of treatments for Alzheimer's and Schizophrenia

Ronny Vargas<sup>1,2</sup>

Jordi Soley<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Costa Rica, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia Industrial, San José, Costa Rica.

<sup>2</sup>Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Físicoquímica, Barcelona, España.

---

### Correspondencia

Ronny Vargas  
ronny.vargas\_m@ucr.ac.cr

---

**Recibido:** 04.09.2020

**Aceptado:** 12.11.2020

**Publicado:** 20.12.2020

---

### Financiación

Este trabajo fue realizado gracias a la beca complementaria de la Oficina de Asuntos Internacionales de la Universidad de Costa Rica (OAI-84-2019).

---

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

---

## Resumen

**Objetivo:** Ejecutar una revisión sistemática sobre las estrategias de desarrollo terapéutico para Alzheimer y esquizofrenia basadas en la modulación alostérica positiva del receptor  $M_1$ .

**Método:** Se realizó una búsqueda sistemática de artículos científicos a partir del año 2015 en *PubMed*, *Ebsco*, y *Science Direct*, siguiendo pautas de palabras clave, criterios de inclusión y exclusión establecidos.

**Resultados:** Un total de 44 artículos cumplieron los criterios establecidos, 20 de ellos son revisiones, y 11 son publicaciones donde se sintetiza uno o más compuestos y se procede a su evaluación farmacológica. La mitad de las publicaciones que realizan una evaluación *in vivo* corresponden a publicaciones del Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt. Su principal descubrimiento, el compuesto VU0486846, es el derivado más novedoso de una línea de avances terapéuticos basada en la activación alostérica del receptor  $M_1$ , que no posee actividad agonista directo, pero si es capaz de modular la actividad de la acetilcolina, demostrando ausencia de efectos adversos colinérgicos severos en modelos animales. La búsqueda de derivados de la molécula con balance de propiedades superiores no proporciona un mejor candidato.

**Conclusiones:** El desarrollo de compuesto VU0486846 corresponde un importante hito en la búsqueda de tratamientos para la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia. El éxito de esta molécula y su ruta de investigación es una validación de la importancia farmacológica de la modulación alostérica en la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas.

---

**Palabras clave:** Receptor Muscarínico  $M_1$ ; Modulación Alostérica; Alzheimer; Esquizofrenia; Descubrimiento de fármacos.

## Abstract

**Objective:** Conduct a systematic review of therapeutic development strategies for Alzheimer's disease and schizophrenia based on positive allosteric modulation of the  $M_1$  receptor.

**Method:** A systematic review of articles on Pubmed, Ebsco and Science Direct was carried out, from 2015, following established guidelines for selecting keywords, inclusion and exclusion criteria

**Results:** A total of 44 articles met the established criteria, 20 of them are reviews and 11 are publications where one or more compounds are synthesized and pharmacologically evaluated. Half of the publications that conduct an *in vivo* evaluation are in publications of the Center for the Discovery of Drugs in Neurosciences of Vanderbilt University. Its main discovery, the compound VU0486846, is the newest and most important derivative result of a line of therapeutic advances based on the allosteric activation of the  $M_1$  receptor, which has no direct agonist activity on muscarinic receptors but if can positively modulate the activity of acetylcholine on the  $M_1$  receptor, demonstrating absence of severe cholinergic adverse effects in animal models. Searching for molecule derivatives with higher property balance does not provide a better candidate.

**Conclusions:** The development of compound VU0486846 corresponds to an important milestone in the search for treatments for Alzheimer's disease and schizophrenia. The success of this molecule and its research route is a validation of the pharmacological importance of allosteric modulation in the search for new pharmacological targets.

---

**Keywords:** Muscarinic Receptor  $M_1$ ; Allosteric Regulation; Alzheimer; Schizophrenia; Drug Discovery.

## Introducción

En las últimas 3 décadas, los desarrollos terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer basados en la hipótesis amiloide han fallado de forma repetitiva<sup>(1)</sup> dejando, hasta ahora, poco espacio para las estrategias basadas en modulación de receptores muscarínicos, y mucho menos a los basados en la modulación alostérica. De 105 agentes terapéuticos con estudios clínicos registrados para la enfermedad de Alzheimer en el año 2017, únicamente dos involucraban al receptor muscarínico, uno por activación agonista directa y otro por modulación alostérica<sup>(2)</sup>. Ninguno de ellos permanecía en la revisión correspondiente al año 2019, en la que se encontraba una molécula adicional en estudio que presentaba actividad agonista directa<sup>(3)</sup>. En el caso de la esquizofrenia, es una enfermedad que no cuenta con alternativas farmacológicas específicas para los síntomas cognitivos de la enfermedad<sup>(4,5)</sup>.

El 7 de mayo de 2020, la empresa ACADIA® *Pharmaceuticals* y la Universidad de Vanderbilt, en Estados Unidos, anunciaron la firma de un acuerdo de licencia exclusiva para la investigación y colaboración del programa de desarrollo de alternativas terapéuticas novedosas del receptor M<sub>1</sub><sup>(6)</sup>, enfocada en el desarrollo terapéutico para el Alzheimer y los síntomas cognitivos de la esquizofrenia<sup>(7)</sup>. La compra de los derechos para continuar la investigación, alcanzó un monto de 10 millones de dólares, mientras que el contrato contempla una serie de pagos adicionales conforme el cumplimiento de varios hitos que, en caso de convertirse en un producto lanzado al mercado, significarán para la Universidad de Vanderbilt un monto total de hasta 516 millones de dólares<sup>(6)</sup>.

Este es un hecho que atrae la atención científica hacia dicha línea de investigación, y hacia los principios bioquímicos y farmacológicos que la sustentan; así como hacia el compuesto más prometedor en dicha línea de investigación, el VU0486846<sup>(7)</sup>.

En el campo de la química medicinal, el éxito de esta línea de desarrollo terapéutico es también una validación del interés científico que ha despertado el cambio de estrategia desde los sitios ortostéricos hacia los alostéricos, estrategia presente en los programas de desarrollo de medicamentos hasta después del año 2000<sup>(8,9)</sup>.

En vista de que se trata de una línea de investigación con un origen reciente, pero de un impacto terapéutico prometedor, es posible que se convierta en un hito para el desarrollo de nuevos medicamentos y el establecimiento de terapias que impacten positivamente en la calidad de vida de los pacientes. La presente revisión pretende ser un punto de referencia para que investigadores en el campo de desarrollo de medicamentos, y para que profesionales en salud en el campo clínico conozcan sobre las estrategias que en un mediano plazo formarán parte del arsenal terapéutico para enfermedades cada vez más prevalentes en la población mundial.

Con el fin de brindar el contexto fisiopatológico apropiado se incluye una breve introducción a la familia de receptores que son la diana terapéutica, y a las dos patologías a tratar y que conforman el eje teórico de la revisión sistemática.

### Receptores Muscarínicos y subtipo de receptor M<sub>1</sub>

Los receptores muscarínicos de acetil colina, son una familia de cinco receptores acoplados a proteínas G que regulan, entre otras funciones, la frecuencia cardíaca, la contracción del músculo liso, secreciones glandulares y muchas funciones fundamentales del Sistema Nervioso central, como por ejemplo funciones cognitivas (aprendizaje y memoria), sensoriales, motoras, regulación de procesos autónomos y el comportamiento, así como también se encuentran involucrados en la regulación de sistemas dopaminérgicos, entre otros<sup>(7,10,11)</sup>. La diversidad de funciones es un reflejo de la variedad de distribución de cada subtipo de receptor muscarínico, la cual se muestra en la Tabla 1 junto con el respectivo mecanismo de señalización.

**Tabla 1.** Distribución tisular, funcionalidad y tipo de proteína G de la familia de receptores muscarínicos. Modificada de<sup>(10,12-14)</sup>.

| Subtipo        | Tipo de proteína G asociada <sup>1</sup> | Tejidos en que se encuentra   | Ejemplos de Funciones asociadas  |
|----------------|--|---|--|
| M <sub>1</sub> | Gα <sub>q</sub>                          | Sistema nervioso central, glándulas del tracto gastrointestinal, ganglios autonómicos, linfocitos | Cognición, salivación y control de secreciones. Regulación del sistema nervioso autónomo y de la respuesta inmune. |
| M <sub>2</sub> | Gα <sub>i/o</sub>                        | Corazón, músculo liso (vías aéreas, vejiga, estómago), Sistema nervioso central                   | Regulación sensorial, inhibición cardíaca, control de la motilidad y tono muscular de vías aéreas y vejiga.        |
| M <sub>3</sub> | Gα <sub>q</sub>                          | Sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, músculo liso, glándulas exocrinas, ojo.        | Contracción vasos sanguíneos, control de la motilidad gastrointestinal, secreción lagrimal                         |
| M <sub>4</sub> | Gα <sub>i/o</sub>                        | Sistema Nervioso central, corteza cerebral.   | Procesos cognitivos (regulación de la función estriatal).  |
| M <sub>5</sub> | Gα <sub>q</sub>                          | Sistema Nervioso central, Músculo liso (esófago), linfocitos, glándulas salivales                 | Modulación en la liberación de dopamina, salivación. Regulación del tono músculo liso y de la respuesta inmune.    |

Nota: 1- Mecanismo de señalización por la vía inositol-fosfato para Gα<sub>q</sub> (M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub>) y por inhibición de adenil-ciclasa para Gα<sub>i/o</sub> (M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub>).

Los últimos 22 años han sido claves para entender la funcionalidad y especificidad de cada receptor. Una de las técnicas utilizadas para dilucidar los mecanismos regulados por cada subtipo de receptor, es la creación de ratones transgénicos que no expresan de forma específica un tipo de subreceptor, ya sea en todo el organismo o incluso en un único tejido específico. De esa manera, los investigadores son capaces de observar los efectos (o falta de ellos) de forma sistemática<sup>(11,15,16)</sup> incluyendo, más recientemente, tecnologías como CRISPR-Cas9<sup>(17-19)</sup> que permiten también realizar estudios en líneas celulares y cultivos primarios humanos<sup>(20)</sup>. El desarrollo de ligandos específicos que, aunque no han prosperado como alternativa terapéutica (quizá por la aparición de efectos adversos), han permitido también entender mejor el rol de cada subtipo<sup>(11)</sup>.

Gracias a estos avances, a día de hoy es posible conocer la funcionalidad e implicación en procesos fisiopatológicos en los que están implicados cada uno de estos receptores. El subtipo M<sub>1</sub> se ha implicado en procesos de Alzheimer y disfunción cognitiva<sup>(7,13,21)</sup>, el subtipo M<sub>2</sub> en disfunción cardíaca y dolor<sup>(13)</sup>, el receptor M<sub>3</sub> en Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, incontinencia urinaria y síndrome intestino irritable<sup>(12,13)</sup>, el M<sub>4</sub> en enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y dolor neuropático<sup>(13,21)</sup>, mientras que el receptor M<sub>5</sub> en procesos de dependencia a drogas, Parkinson y esquizofrenia<sup>(10,13)</sup>.

A pesar del potencial terapéutico detectado para los receptores muscarínicos, su uso es limitado debido principalmente a la falta de especificidad y la implicación que esto conlleva en el impacto a diversos procesos. Actualmente se cuenta con medicamentos cuya diana farmacológica son receptores muscarínicos para diversas patologías incluidas la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, vejiga hiperactiva, enfermedad Sjögren<sup>(11)</sup>, enfermedad de Parkinson<sup>(10)</sup>, intestino irritable<sup>(13)</sup>, entre otras.

De los cinco subtipos de receptores muscarínicos, el M<sub>1</sub> es el que resulta prometedor para el tratamiento de la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer<sup>(7,22)</sup>. La estructura 3D del subtipo de receptor M<sub>1</sub> ha sido recientemente publicada<sup>(23)</sup> y en el sitio web *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) se encuentra únicamente la estructura del receptor solo, acoplado a una toxina, o acoplado al agonista tiotropio<sup>(24-26)</sup>.

## Esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica crónica e inhabilitante que afecta al 1% de la población mundial, con un alto impacto en la calidad de vida y en los sistemas de salud<sup>(5,11)</sup>. Posee una fisiopatología que es compleja e incierta<sup>(27,28)</sup>, y se caracteriza por la presencia de 3 grupos de síntomas: positivos, negativos y cognitivos<sup>(5)</sup>.

Los síntomas positivos consisten en aberraciones conceptuales tales como alucinaciones visuales o auditivas, delirios, falsas creencias, comportamiento errático o lenguaje desorganizado. Los síntomas negativos corresponden a desmotivación, imposibilidad de percibir placer (anhedonia), apatía, falla en la comunicación verbal o en la expresión emocional. Las fallas en el proceso cognitivo pueden estar relacionadas a las áreas verbales, de la memoria, atención, vigilancia, velocidad de procesamiento de información o afectación en la capacidad de resolver problemas<sup>(5,11)</sup>.

Los medicamentos antipsicóticos actuales muestran su capacidad terapéutica principalmente sobre los síntomas positivos<sup>(5,7,11,28)</sup>.

Como ya se ha mencionado, el mecanismo fisiopatológico de la esquizofrenia es desconocido. Sin embargo, los efectos experimentales observados cuando se da la activación o inactivación de estos receptores, en relación a los síntomas de la enfermedad, ha generado la denominada “hipótesis colinérgica” de la esquizofrenia, que respalda el interés terapéutico hacia los receptores muscarínicos<sup>(29,30)</sup>. Se ha observado que en ratones transgénicos que no expresan ciertos subtipos de receptores muscarínicos, se pierde el efecto de algunos medicamentos antipsicóticos<sup>(11)</sup>, mientras que algunos estudios señalan una marcada reducción de receptores  $M_1$  en individuos con esquizofrenia<sup>(29,30)</sup>. Algunos modelos demuestran mejora en la función cognitiva cuando se utilizan agonistas no selectivos de acetilcolina, o potenciadores de su actividad (como acetilcolinesterasa); y una disfunción cuando se utilizan antimuscarínicos (como por ejemplo la escopolamina)<sup>(28)</sup>.

Se ha demostrado que en la esquizofrenia hay una deficiencia de activación glutaminérgica de los receptores ionotrópicos de NMDA<sup>(28,30)</sup>, y que la activación del receptor  $M_1$  en el hipocampo genera una regulación positiva que potencia los receptores de NMDA<sup>(31,32)</sup>. Por otra parte, además de la activación glutaminérgica, los efectos del receptor  $M_1$  sobre los síntomas de la esquizofrenia podrían estar relacionados con la modulación dopaminérgica, ya que la activación del receptor muscarínico provoca un aumento en las concentraciones de dopamina en la corteza frontal<sup>(28,30)</sup>.

## Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia, y es ampliamente reconocida como un problema mayor de salud pública<sup>(11)</sup>. Clínicamente se caracteriza por una pérdida gradual de la memoria<sup>(27)</sup> con los consecuentes aumentos en alteraciones conductuales y desórdenes neuropsiquiátricos tanto cognitivos como funcionales<sup>(33,34)</sup>. Neuropatológicamente se caracteriza por la formación de una placa de depósitos extracelulares de péptido  $\beta$ -amiloide, y acumulación intracelular de una proteína tau hiperfosforilada, con una degeneración progresiva de las neuronas del sistema colinérgico basal del cerebro anterior<sup>(13,30)</sup>.

Estudios con ratones transgénicos han permitido dilucidar que el receptor  $M_1$  se encuentra ampliamente expresado en áreas del cerebro asociadas a la memoria y función cognitiva, y que dichas áreas se ven significativamente afectadas en la enfermedad de Alzheimer<sup>(13)</sup>, así también como se ha determinado que la falta de receptores  $M_1$  exacerba la enfermedad<sup>(11)</sup>. Adicionalmente, la activación del receptor  $M_1$  ha demostrado pre-clínicamente un alivio sintomático del Alzheimer y una reducción en la formación de las proteínas precursoras de la placa amiloide aunque a través de procesos enzimáticos aún inciertos<sup>(28)</sup>.

A pesar de la fortaleza con que cuenta la hipótesis colinérgica y su implicación para el desarrollo de terapias para el Alzheimer y la esquizofrenia, la activación ortoestérica de los receptores muscarínicos no ha prosperado como alternativa terapéutica debido a la falta de selectividad y por lo tanto a la complejidad que esto implica desde una perspectiva química, farmacológica y de seguridad<sup>(7,11,28)</sup>.

## Métodos

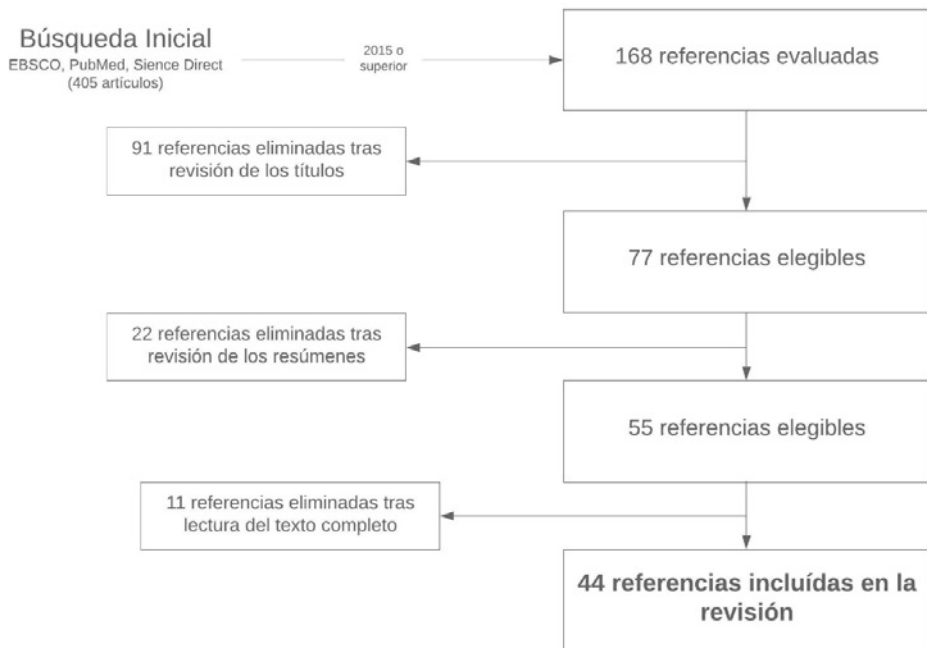
Se realizó una búsqueda sistemática en las bases de datos *PubMed*, *Ebsco*, y *Science Direct*, utilizando las palabras clave: “*Muscarinic*”, “*Allosteric*”, “*Alzheimer*”, y “*Schizophrenia*”, utilizando el operador booleano “AND”. La búsqueda se realizó en junio de 2020, y los resultados se limitaron a aquellos artículos científicos con fecha de publicación de 2015 o posterior.

Se escogieron los artículos que se centraban en los mecanismos de modulación alostérica y sus beneficios farmacológicos, enfocados en el desarrollo de una estrategia terapéutica específica o el establecimiento de pautas farmacológicas para desarrollos futuros.

Como criterios de exclusión, se eliminaron aquellos artículos que:

- Se basaban en el estudio de otros receptores, u otro tipo de subreceptor muscarínico.
- Abordaban otras patologías, u otras rutas de señalización.
- Comprendían estudios de agonistas ortoestéricos conocidos.
- Estudiaban la fisiología cerebral general.
- Comprendían otro tipo de procesos como adicción, sueño o dolor.

El flujo de selección de artículos se presenta en la Figura 1.



**Figura 1.** Flujo de selección de los artículos para la revisión sistemática.

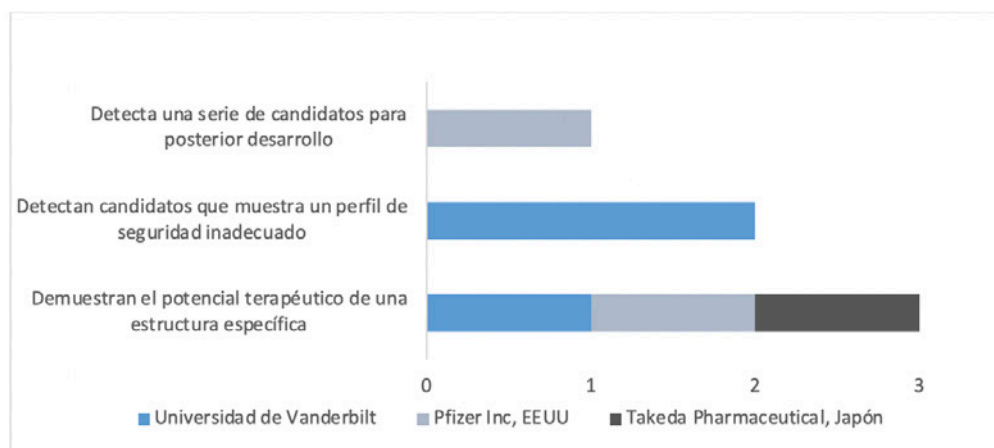
Para la elección de los trabajos, las referencias fueron evaluadas independientemente por 2 evaluadores. En caso de discrepancia, la inclusión o no de las referencias involucradas se discutió entre los dos evaluadores para llegar a consenso.

## Resultados

Los artículos seleccionados se clasificaron según el tipo de publicación en 6 categorías, las cuales se observan en la **Tabla 2**. Por su parte, la distribución de los 6 artículos clasificados en la categoría “Síntesis y evaluación farmacológica tanto *in vitro* como *in vivo*” se observa en la Figura 2.

**Tabla 2.** Distribución de los artículos incluidos según tipo de publicación.

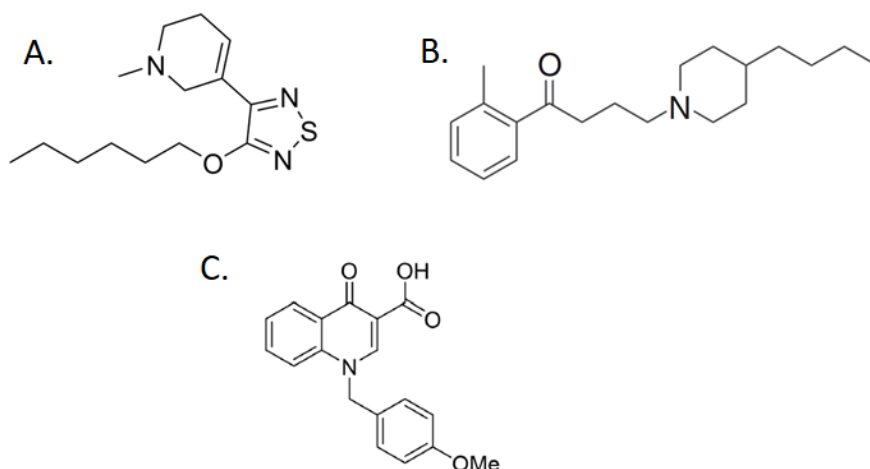
| Tipo de publicación   | Cantidad de artículos | Referencias  |
|---|-----------------------|--|
| Overview o Review   | 20                    | (15)(16)(27)(30)(35)(36)(37)(36)(38)(39)(40)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) |
| Síntesis y evaluación farmacológica tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>                                     | 6                     | (7)(50)(51)(52)(53)(54)  |
| Síntesis y evaluación farmacológica <i>in vitro</i>   | 5                     | (55)(56)(57)(58)(59)   |
| Demostración de actividad farmacológica ( <i>in vivo</i> o <i>in vitro</i> ) de compuestos previamente publicados | 5                     | (60)(61)(62)(63)(64)   |
| Estudio clínico   | 1                     | (65)   |
| Otros   | 7                     | (66)(67)(69)(70)(16)(71)   |
| Total   | 44                    | -  |



**Figura 2:** Distribución de los artículos en los que se realiza una evaluación farmacológica tanto *in vitro* como *in vivo* según conclusión principal del potencial terapéutico y grupo de investigación.

### Antecedentes en las estrategias de activación del receptor M<sub>1</sub>

El compuesto llamado Xanomelina (Figura 3-A) fue fundamental para el desarrollo de la hipótesis colinérgica de la neurodegeneración, el estudio de los subtipos de receptores muscarínicos y en el desarrollo terapéutico que se dio a partir de allí para Alzheimer y posteriormente para esquizofrenia<sup>(27,28)</sup>.



**Figura 3:** Estructura química de los compuestos involucrados en los antecedentes de activación del receptor M1. A: Xanomelina, B: AC-42, y C: BQCA.

Originalmente se descubrió que el compuesto tenía la capacidad de desplazar algunos agonistas muscarínicos en el hipocampo y atrajo el mayor interés al demostrar que mediaba en el metabolismo de los precursores amiloides<sup>(28)</sup>. Se determinó que el compuesto tenía una alta afinidad muscarínica (principalmente por M<sub>1</sub> y M<sub>4</sub> y con actividad antagonista para M<sub>5</sub>), y que actuaba sobre estimulando el sitio ortoestérico del receptor, es decir, uniéndose al mismo sitio donde se une la acetil colina<sup>(27,72)</sup>. Gracias a este compuesto se descubrió que la activación selectiva podría conllevar una mejora en los síntomas cognitivos asociados a Alzheimer y esquizofrenia<sup>(52)</sup>.

El desarrollo clínico de la Xanomelina se vio limitado por eventos adversos severos dosis-dependientes como lo son: salivación, hipotermia, secreción lagrimal, temblores, afectación de la motilidad gastrointestinal, efecto sedante, y alucinaciones<sup>(11,27,28)</sup>; por lo que las desventajas que presenta la xanomelina superan en balance a las ventajas que ésta pueda proporcionar<sup>(28,73)</sup>. Posteriormente, el compuesto llamado AC-42 (Figura 3-B) se convierte en el primer agonista que se une a un sitio alostérico del receptor muscarínico M<sub>1</sub><sup>(28,74)</sup>. A pesar de la prometedora activación del subreceptor, este compuesto demostró unirse también a receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos, lo que lo hacía un mal candidato para las enfermedades estudiadas, donde estos sistemas juegan un rol importante. Adicionalmente, este y otros agonistas alostéricos probados posteriormente, demostraron tener una doble acción alostérica-ortostérica, y una consecuente baja selectividad<sup>(28)</sup>.

Sin embargo, el compuesto AC-42 fue un hito en la demostración de la necesidad de selectividad por el receptor M<sub>1</sub>, y atrajo la atención hacia los sitios alostéricos del receptor<sup>(11,28,74)</sup>.

### Modulación Alostérica Positiva

Los esfuerzos previos en el avance terapéutico mediante la activación de forma selectiva del receptor M<sub>1</sub> demostraron eficacia pro-cognitiva, pero fallaron en mostrar selectividad por el subtipo, y provocando efectos adversos muscarínicos como salivación, lagrimeo y activación del reflejo de orinar y defecar; además de convulsiones<sup>(7)</sup>.

Por este motivo, las estrategias de desarrollo desembocaron en atacar sitios alostéricos del receptor M<sub>1</sub>, a través de moduladores alostéricos positivos (PAM, por sus siglas en inglés: *positive allosteric modulators*)<sup>(7,11,21,22,28)</sup>. Un PAM se une a un sitio alostérico, es decir, a un sitio topográficamente distinto al



sitio de unión del ligando natural, y produce un cambio en la conformación del receptor aumentando su afinidad por el agonista nativo, y esto provoca una actividad aumentada<sup>(11,28,72)</sup>.

Un modulador alostérico negativo posee un mecanismo similar, pero en ese caso reduce la afinidad por el ligando natural. Existen también moduladores alostéricos neutros los cuáles no modifican la afinidad y no despiertan interés terapéutico, si bien es cierto son útiles para estudiar a los moduladores positivos y negativos, sobre todo para validar la especificidad de su unión al sitio alostérico<sup>(11,21,72)</sup>.

Un PAM del receptor  $M_1$  muestra selectividad por el subtipo de receptor y no activa el receptor por sí mismo, por lo que en ausencia de acetil colina no presentará ningún efecto y esto genera respuestas más fisiológicamente similares. Otra característica importante es que su efecto es saturable, y por lo tanto la actividad no incrementa a partir de cierta dosis del PAM<sup>(11,28)</sup>.

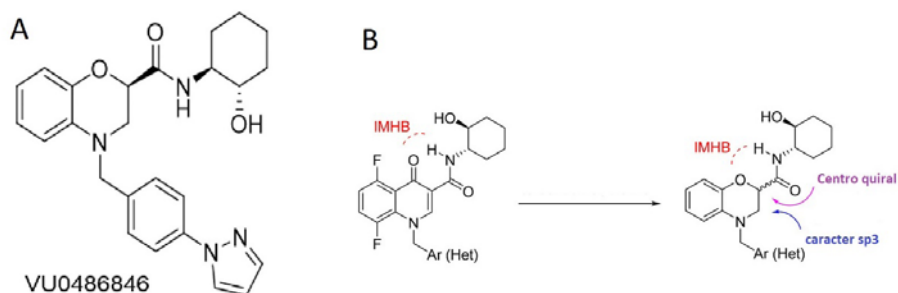
La modulación generada por un PAM podría ir desde una modificación pequeña, hasta alteraciones significativas de la afinidad por el ligando nativo (en varios órdenes de magnitud), además que cuando un receptor tiene diferentes ligandos nativos, es posible que una misma sustancia actúe como PAM para uno, y como un modulador neutro o incluso negativo por otro. Adicionalmente, cuando la activación de un receptor desencadena diferentes vías de señalización intracelular, el PAM puede generar un aumento en la actividad de una vía específica pero no influir en otra<sup>(11)</sup>. Esta serie de características podría tener implicaciones de mayor especificidad en la acción farmacológica, brindando una especificidad no vista en los ligando naturales o análogos y es por esto que la modulación de sitios alostéricos revela un potencial terapéutico oculto hasta ahora, y un amplio horizonte de desarrollos innovadores<sup>(75)</sup>

### Descubrimiento del compuesto VU0486846

El primer PAM agonista selectivo del receptor  $M_1$  utilizado fue el *Benzyl Quinolone Carboxylic Acid* (BQCA), cuya estructura se muestra en la Figura 3-C. El BQCA es una quinolona, cuyo núcleo estructural es el anillo 6-6. Este compuesto y sus análogos inmediatos tienen como desventaja que sobreestiman el receptor  $M_1$ , por lo que a pesar de ser selectivos por el subtipo, provocan graves efectos secundarios dosis-dependientes como son las convulsiones o la disfunción cognitiva<sup>(22,60)</sup>. El desarrollo actual de PAMs para el receptor  $M_1$  parte de la optimización molecular del BQCA y la posterior evaluación de la seguridad farmacológica en esta línea terapéutica, caracterizada por ausencia de efectos adversos colinérgicos<sup>(7,16,21,22,53,65)</sup>.

En esta búsqueda de análogos, el Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt en Estados Unidos aplicó dos estrategias principales: 1- la síntesis por sustitución de *scaffolds* moleculares y exploración de su relación estructura actividad (SAR, *Structure-Activity Relation*), y 2- la evaluación del efecto de la modificación de sustituyentes en distintas posiciones del anillo, por la sustitución sistemática de átomos de Flúor (*Fluorine walk*)<sup>(22)</sup>. Mientras que para esta molécula se obtuvo un SAR plano (sin mejora de actividad tras las modificaciones efectuadas), el *Fluorine walk* permitió determinar los sitios de la molécula implicados en potencia, biodisponibilidad o eficacia terapéutica, y proceder a partir de allí con la reoptimización de la molécula<sup>(7,22)</sup>.

Como resultado de la síntesis y evaluación de análogos bajo las estrategias mencionadas se obtuvo el compuesto identificado como VU0486846, que se muestra en la Figura 4-A, y cuyo cambio más sobresaliente y novedoso se encuentra en el núcleo de la molécula: se pasa de una quinolona a una benzomorfolina (Figura 4-B). Con esta variación el compuesto gana carácter sp<sup>3</sup> debido a que el átomo de oxígeno pasa, de estar fuera del heterociclo, a estar dentro, creándose un centro estereogénico. Además, se mantiene el puente de hidrógeno intramolecular, hecho que se cree que aporta valor añadido a la eficacia terapéutica y la estabilidad del compuesto en esta generación de PAMs.<sup>(7,22)</sup>



**Figura 4:** Compuesto VU0486846. A: Estructura química del compuesto. B: Evolución estructural novedosa a partir del núcleo de quinolona del BQCA. IMHB: Puente de hidrógeno intramolecular. Adaptado de (7) con la autorización American Chemical Society. Copyright (2018).

## Evaluación preclínica del compuesto VU0486846

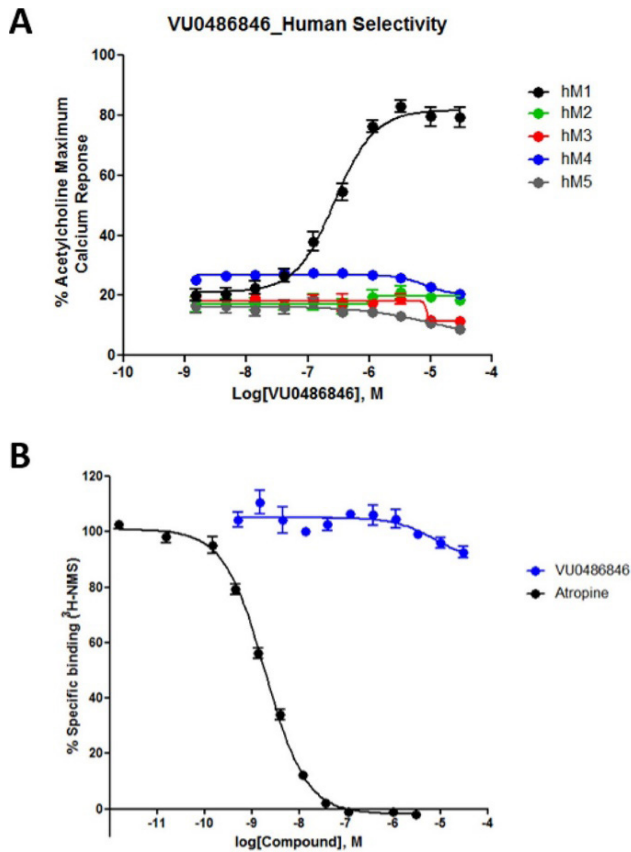
### Estudios de farmacología molecular

Para los estudios de farmacología molecular, el Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt realizó un ensayo de movilización de calcio *in vitro* con diferentes líneas celulares. Para determinar la potencia y eficacia del VU0486846, entre otros parámetros, se midieron: la concentración efectiva media de dicho compuesto como modulador de la acción la acetilcolina (en la liberación de calcio), el porcentaje de respuesta que la EC<sub>20</sub> de acetil colina en presencia de la modulación, y la actividad agonista directo del VU0486846<sup>(7)</sup>. La Tabla 3 muestra dichos resultados en varios cultivos celulares utilizados.

**Tabla 3.** Evaluación de la potencia y eficacia del VU0486846 en ensayo de liberación de calcio en diferentes cultivos celulares<sup>(7)</sup>.

| Especie y nivel de expresión de receptores | Actividad Modulador Alostérico |           | Actividad Agonista Parcial (directo) |           |
|--|--------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------|
|  | EC <sub>50</sub>               | % ACh max | EC <sub>50</sub>                     | % ACh max |
| Humano, Alta expresión M <sub>1</sub>      | 0,31 μM                        | 85 ± 2    | 4,5 μM                               | 29 ± 6    |
| Rata, Alta expresión M <sub>1</sub> Rata   | 0,31 μM                        | 83 ± 1    | 5,6 μM                               | 26 ± 6    |
| Ratón, Baja expresión M <sub>1</sub>       | 0,6 μM                         | 77 ± 4    | ND                                   | 9 ± 1     |
| Perro, Baja expresión M <sub>1</sub>       | 0,38 μM                        | 78 ± 1    | > 10 μM                              | 9 ± 1     |

Adicionalmente, se evaluó la acción PAM del compuesto VU0486846 sobre los diferentes subtipos de receptores muscarínicos, Figura 5-A, y se determinó su falta de unión al sitio ortoestérico por desplazamiento de ligando radiactivo, Figura 5-B.



**Figura 5:** Resultados de estudios de farmacología molecular del copuesto VU0486846. A: Respuesta en la liberación de calcio por efecto de la acetilcolina, mediada por el PAM VU0486846 sobre los 5 subtipos de receptores muscarínicos en cultivos celulares con expresión de receptores humanos. B: Ensayo de inhibición de la unión del ligando radioactivo [<sup>3</sup>H]-NMS al sitio ortoestérico. **Adaptado de**<sup>(7)</sup> con la autorización *American Chemical Society. Copyright* (2018).

En la primera de estas figuras se puede observar que, en función de la movilización de calcio ante el estímulo del subtipo de receptor M<sub>1</sub>, y no de los restante subtipos, se puede concluir que el VU0486846 es más selectivo sobre los receptores M<sub>1</sub> que sobre los M<sub>2</sub>-M<sub>5</sub>. Por otro lado, el experimento cuyo resultado se presenta la Figura 5-B utiliza un ligando radioactivo conocido que posee una afinidad baja al sitio ortoestérico, es decir, es fácilmente desplazable por un ligando que se una a ese mismo sitio. El porcentaje de unión del ligando radiactivo decrece totalmente tras la adición de la atropina, control de unión ortoestérica, pero no así por el VU0486846, demostrándose así que este último no ejerce su acción por dicho tipo de unión.

Estudios en tejido vivo y sistemas nativos confirmaron la ausencia de actividad agonista propia, para el compuesto VU0486846, al demostrar la no activación de la corteza pre-frontal en ausencia de acetilcolina<sup>(7)</sup>.

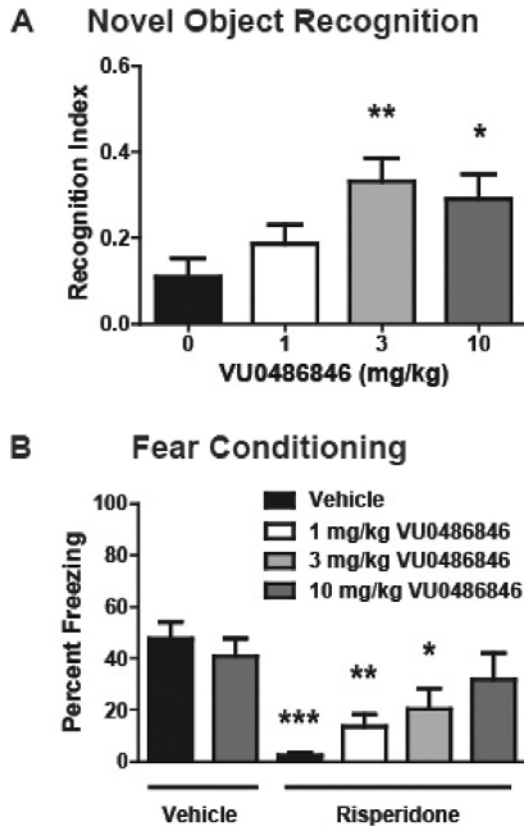
### Evaluación de posibles efectos adversos colinérgicos

Tras la administración en ratones de una dosis oral de 100 mg/kg/día, se generaron concentraciones plasmáticas 30 veces superiores a la EC50 y altos niveles de concentración en cerebro y no se produjo ningún efecto adverso colinérgico, o efectos adversos pronunciados en general <sup>(7)</sup>.

En ratas se administró una dosis de 56 mg/kg/día que mostró una moderada concentración en cerebro con la misma ausencia de efectos adversos. Las características fisicoquímicas del compuesto no permitieron el desarrollo de una formulación que permitiese alcanzar las altas concentraciones plasmáticas en primates y por lo tanto la reproducción del estudio en ratas y ratones. Sin embargo, si se pudo comprobar que a concentraciones moderadas en plasma (50% de las observadas en ratas) no se da la incidencia de ningún efecto adverso <sup>(7)</sup>.

### Evaluación de la eficacia cognitiva

Para la evaluación de la eficacia cognitiva del compuesto VU0486846 se utilizaron dos modelos de comportamiento en ratones distintos: la prueba de reconocimiento de objeto y la prueba de condicionamiento del miedo <sup>(7)</sup>, cuyos resultados se observan en la Figura 6.



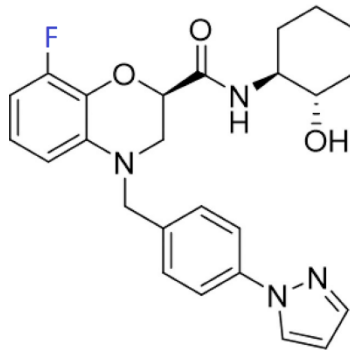
**Figura 6:** Evaluación de la eficacia cognitiva del VU0486846. A: Aumento dosis/dependiente del índice de reconocimiento mediado por VU0486846 en la prueba de reconocimiento de objeto en ratones. B: Efecto dosis dependiente del VU0486846 en el restablecimiento de la adquisición del miedo contextual con y sin la administración de risperidona. Tomado de <sup>(7)</sup> con la autorización American Chemical Society. Copyright (2018).

El índice de reconocimiento demuestra la capacidad de memoria y reconocimiento que el ratón muestra hacia un objeto conocido. Entre menos tiempo pase explorando el objeto conocido (lo que demuestra un mayor grado de reconocimiento), mayor será el índice de reconocimiento obtenido<sup>(76)</sup>. Como se puede observar en la Figura 6-A, la administración oral de 1 mg/kg del VU0486846 provoca un aumento del índice de reconocimiento en comparación del placebo, efecto que muestra una relación directa cuando la dosis se aumenta hasta 3 mg/kg (no así con el aumento hasta 10 mg/kg). Demostrándose así que este compuesto genera un aumento en la capacidad cognitiva de procesamiento de la memoria y reconocimiento de objetos en este modelo.

El test de condicionamiento del miedo se basa en la asociación de una experiencia dolorosa a un estímulo sonoro. Luego de la fase inicial, si el animal ha adquirido ese condicionamiento, se observará una paralización momentánea inusual en el animal al ser sometido de forma posterior únicamente al estímulo sonoro<sup>(77)</sup>. La risperidona es un antipsicótico que produce una disfunción cognitiva que se manifiesta como una pérdida del condicionamiento. En la Figura 6-B se puede apreciar como la administración de risperidona prácticamente hace desaparecer el porcentaje de paralización que se observa cuando no se ha administrado dicho antipsicótico, mientras que la administración concomitante de VU0486846 hace desaparecer ese efecto. De esta manera, se puede observar el restablecimiento del condicionamiento (y por lo tanto de las funciones cognitivas relacionadas) que se da en función de la dosis de VU0486846.

### Optimización molecular del compuesto VU0486846

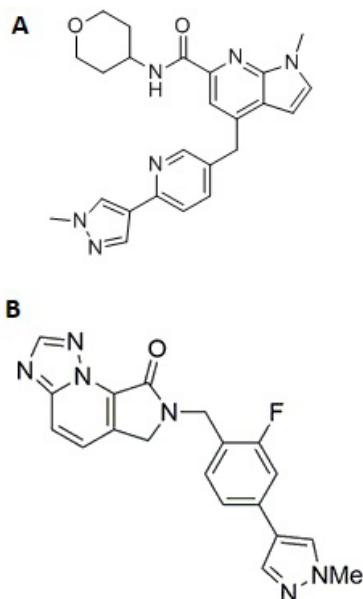
Avances para mejorar aún más el perfil de seguridad/eficacia preclínica observado con el compuesto VU0486846 incluyeron nuevamente la realización de SAR y *Fluorine Walk*, sin que se consiguiera obtener algún candidato con mejor balance de propiedades. Dos observaciones generales se pueden desprender de esa búsqueda: primero, que la vía de metabolismo se ve modificada en función de la naturaleza del ligando cambiado, y que durante el *fluorine walk* se descubrió que el análogo con la sustitución mostrado en la Figura 7 mostraba un aumento significativo en la potencia (x7), pero a costa de un peor perfil farmacocinético<sup>(22)</sup>.



**Figura 7:** Derivado del compuesto VU0484846 por la sustitución de átomo de Flúor en el Flourine walk para la búsqueda de análogos.

Los intentos de optimización molecular deben pasar por SARs más profundos (y con diferentes ligandos) o modificando el núcleo molecular, tal como ocurrió con el cambio señalado en la Figura 4-B. Un ejemplo de ello es la síntesis del compuesto VU6007477, Figura 8-A. En este compuesto, el núcleo de benzomorfolina fue sustituido por una pirrolo[2,3-b]piridina. Esta molécula destaca por una buena potencia frente a receptor  $M_3$  en rata, mínima actividad agonista directa, buena permeación en sistema nervioso central (SNC) y no posee efectos adversos colinérgicos. Los investigadores determinaron que

en humanos muestra baja permeabilidad al SNC y un alto metabolismo, por lo que no continúa como candidato clínico, aunque los autores la remarcan como una herramienta válida para el estudio en ratones<sup>(54)</sup>.



**Figura 8:** Derivados del compuesto VU0486846 con cambio de núcleo. A: Cambio a pirrolo[2,3-b]piridina. Modificado de<sup>(54)</sup> con la autorización American Chemical Society. Copyright (2018). B: Cambio a núcleo de lactama. Modificado de<sup>(66)</sup> con la autorización American Chemical Society. Copyright (2019).

Bajo la misma estrategia el mismo grupo de investigación obtuvo derivados con núcleos de lactamas triazolo- y núcleo de imidazopiridinas. Este hecho es novedoso, pues normalmente los PAM  $M_1$  prometedores hasta ese momento tenían un núcleo bicíclico. De entre esos derivados tricíclicos los autores resaltan principalmente el compuesto VU6005877, Figura 8-B, con buen perfil farmacocinético y una muy buena permeación en el SNC ( $K_p > 2$ ), y lo señalan como un candidato para una caracterización más exhaustiva y estimar así su aptitud para la evaluación pre-clínica<sup>(66)</sup>, si bien es cierto que a la fecha aún no ha acumulado la misma evidencia que el compuesto VU0486846.

## Discusión

Los resultados de la revisión sistemática confirman el interés que ha despertado la modulación alostérica positiva selectiva de receptores muscarínicos en el manejo de síntomas cognitivos en Alzheimer y esquizofrenia, y su importancia como fuente de investigaciones aplicadas a la síntesis y evaluación de compuestos, así como al desarrollo de estrategias terapéuticas.

La mayor cantidad de publicaciones corresponden a revisiones (20 de 44 en total), algunas de las cuales están centradas en los mecanismos neurofisiológicas en los que están implicados los subtipos de receptores  $M_1$ , y las estrategias para la validación de esas funciones. La mayoría de las revisiones están centradas en la importancia de los mismos en el desarrollo terapéutico enfocado al sistema nervioso central y pretenden ser una base teórica, marco de referencia y justificación a la búsqueda de

compuestos que sirvan como moduladores selectivos de dichos receptores por parte de diferentes grupos de investigación.

La siguiente subcategoría más grande de publicaciones (11 de 44) corresponde a aquellas donde se produce la síntesis de un compuesto, o serie de compuestos, y se procede a su evaluación, ya sea *in vitro*, o pasando a evaluaciones *in vivo* en aquellos casos donde las observaciones preliminares resultaran prometedoras. Del análisis de los 6 artículos que cumplen con ese último criterio se hace notable la influencia y el peso que el Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt posee en esta estrategia de búsqueda terapéutica. Como se observa en la Figura 3, la mitad de las publicaciones donde se realizan evaluaciones *in vivo* corresponden a este grupo, así como un tercio de las publicaciones que concluyen poseer un candidato apto para el desarrollo clínico.

Más allá de eso, si se excluyen los artículos que corresponden a una revisión, el Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt es el responsable del 33% de todas las publicaciones efectuadas, y exceptuando a su propia producción académica, al menos uno de los artículos de este grupo es citado en el 21% de los artículos originales. Esto es una muestra de la relevancia de sus hallazgos y el impacto que ha tenido en el desarrollo general de esta estrategia terapéutica.

En la categoría “Demostración de actividad farmacológica (*in vivo* o *in vitro*) de compuestos previamente publicados”, se incluyen artículos donde se realizan pruebas con diferentes compuestos para comparación de mecanismos y efectos, además de una publicación que consiste en el desarrollo de una estrategia analítica para ser aplicada en bibliotecas de compuestos para su evaluación a gran escala<sup>(62)</sup>. En la categoría de otros se encuentran diferentes publicaciones que buscan demostraciones fisiológicas de la unión a sitios alostéricos para comprobar las premisas establecidas. Es importante resaltar que el único artículo que corresponde a un estudio clínico correspondió a un estudio que se canceló pues no demostró mejora respecto al placebo, mientras que hubo un aumento de efectos adversos colinérgicos<sup>(65)</sup>.

La ausencia de efectos adversos colinérgicos es el estándar más importante en el desarrollo actual de PAM para el receptor  $M_1$ . De los 3 artículos que concluyen poseer un candidato apto para posteriores desarrollos clínicos (Figura 2), el artículo publicado por Davoren y colaboradores no hace referencia directa a la evaluación de los efectos adversos<sup>(50)</sup> y mientras que el trabajo de Sako y colaboradores sí lo incluye, reporta la aparición de algunos efectos adversos y recomienda que para reducirlos se aplique a las menores dosis posibles acompañados de un inhibidor de la acetilcolinesterasa<sup>(53)</sup>. En vista de lo anterior, el trabajo de Rook y colaboradores en el Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt, y su conclusión sobre la idoneidad del candidato a evaluación clínica sin necesidad de combinación con otro tratamiento ni la aparición de efectos adversos, demuestra una mayor solidez bajo la premisa de seguridad colinérgica<sup>(7)</sup> y la línea de modulación alostérica.

De manera que el interés despertado el programa de desarrollo de alternativas terapéuticas novedosas del receptor  $M_1$  se justifica en la cantidad de publicaciones generadas, las referencias en otros trabajos, y sobre todo en la solidez y respaldo de sus hallazgos para el que es, hasta el momento, su candidato más prometedor, el VU048646.

### Desempeño preclínico del compuesto VU048646

Bajo el sustento de la hipótesis colinérgica para el tratamiento de síntomas cognitivos en Alzheimer y esquizofrenia, y las consideraciones de seguridad colinérgica, se ha desarrollado una amplia gama de compuestos que han ido modelando el perfil farmacológico deseable para un candidato terapéutico. En ese camino, los compuestos que han ido evolucionando a partir de la Xanomelina, el AC-42 y, más directamente, en el BQCA, deben su aptitud hacia dicho perfil, esto es, modular de forma alostérica sin actividad agonista y de forma selectiva el sub-receptor  $M_1$ .

Para el compuesto VU048646, y como puede observarse en la Tabla 3, demuestra su actividad moduladora positiva al obtenerse una respuesta cercana al 80%, cuando se agrega una dosis de acetilcolina

que en ausencia del PAM daría únicamente un 20% de respuesta, sin importar el grado de expresión del receptor. La poca o nula actividad agonista directa se refleja en que la concentración requerida para el 50% del efecto (EC50) directo (en ausencia del ligando natural, la acetilcolina) es 10 veces superior a la concentración EC50 como PAM.

Debe mencionarse que en este tipo de ensayos, donde el efecto modulador se evalúa con la EC 20 de acetyl colina, no se observan los posibles efectos de una sobreestimulación del receptor *in vivo*, donde la concentración de acetilcolina puede alcanzar la EC 100<sup>(7)</sup>. Los ensayos de modulación alostérica no pueden realizarse a concentraciones del ligando natural cercanas al 100%, pues no sería posible validar el efecto en el aumento de la actividad (no es posible medir respuestas superiores al 100%)<sup>(78)</sup>.

Sin embargo, los autores si determinaron que el efecto PAM es más pronunciado a mayores concentraciones de acetyl colina, ya que la sobreestimulación del receptor M<sub>1</sub> puede provocar la aparición de convulsiones<sup>(7)</sup>, por lo que es un aspecto a tomar en cuenta en los estudios posteriores a llevarse a cabo en organismos vivos.

Otro de los aspectos a demostrar para que un candidato cumpla con el perfil desarrollado para esta línea de investigación es la selectividad por subtipo, y para el caso del compuesto VU0486846 los autores determinaron que únicamente posee acción sobre receptores M<sub>1</sub> y no así en los siguientes 4 subtipos de la familia, como se muestra en la Figura 5-A<sup>(7)</sup>. La demostración de la no interacción con el sitio ortoestérico se muestra en la Figura 5-B<sup>(7)</sup>, donde se demuestra la falta de desplazamiento del ligando marcado radiactivamente [<sup>3</sup>H]-NMS, el cual se une de manera débil al sitio ortoestérico del receptor y puede ser desplazado fácilmente por una sustancia que se una al mismo sitio, como es el caso de la atropina, pero no del VU0486846<sup>(7)</sup>.

De esta manera se puede decir que el VU0486846 muestra un perfil farmacológico óptimo (selectivo, no agonista, sin acción en el sitio ortoestérico) para la estimulación del receptor M<sub>1</sub>, lo que lo convierte en un candidato adecuado para el tratamiento del deterioro cognitivo en esquizofrenia y Alzheimer sin presentar, o al menos en menor medida, efectos adversos colinérgicos severos.

Desde el punto de vista de eficacia, y como se puede observar en la Figura 6-A, la administración de 1 mg/kg provoca un aumento del índice de reconocimiento en comparación del placebo, efecto que muestra una relación directa cuando la dosis se aumenta hasta 3 mg/kg (no así con el aumento hasta 10 mg/kg)<sup>(7)</sup>. De esta forma se demuestra que el compuesto VU0486846 genera un aumento en la capacidad cognitiva de procesamiento de la memoria y reconocimiento de objetos en este modelo.

La prueba de reconocimiento del miedo se llevó a cabo con el uso concomitante de risperidona, el cual es un antipsicótico que produce una disfunción cognitiva que se manifiesta como una pérdida del condicionamiento<sup>(7)</sup>. En la Figura 6-B se puede observar una reducción en la paralización del miedo, y el prometedor restablecimiento de dicho condicionamiento (y por lo tanto de las funciones cognitivas relacionadas) que se da en función de la dosis de VU0486846. La administración de risperidona prácticamente hace desaparecer el porcentaje de paralización que se observa cuando no se ha administrado dicho antipsicótico, mientras que la administración de VU0486846 genera un aumento de la paralización.

La principal desventaja encontrada para dicho compuesto radica en la limitación del compuesto para desarrollar formulaciones de mayor concentración, y es una de las características a tomar en cuenta para el desarrollo de un candidato clínico con un perfil superior, de manera que sea apto para la demostración de eficacia y seguridad en ensayos clínicos (no realizada hasta el momento en esta línea de investigación). En vista de que el principal salto y novedad introducido por el VU0486846 es el cambio en el núcleo, la estrategia que ha generado los derivados de la Figura 8, es consistente con los esfuerzos previos.

A pesar de que los resultados farmacológicos del compuesto VU0486846 son prometedores, la literatura revisada basa sus conclusiones principalmente en experimentos de reconocimiento de objetos y adquisición del miedo. La evaluación de sus derivados generará mayor evidencia y respaldo para su salto a fases clínicas en cuanto se utilicen modelos más complejos como, por ejemplo, modelos animales en los que se evalúe también el mecanismo patológico a nivel tisular.



Si bien es cierto que aún no se puede asegurar que alguno de estos compuestos vaya a convertirse en un producto en el mercado, resulta evidente que su línea de desarrollo cuenta con respaldo científico y estrategias de desarrollo claras. Esta línea de desarrollo puede convertirse en una línea de base para que otros grupos enfoquen su trabajo en la búsqueda de moduladores alostéricos con características similares e incluso, que esta estrategia de modulación pueda ser investigada para otros receptores u otros mecanismos fisiológicos, ampliando así el abanico de dianas farmacológicas que permitan el desarrollo de medicamentos cada vez más específicos y con un mejor perfil de seguridad.

## Conclusiones

- La estimulación selectiva del receptor  $M_1$  ha demostrado efectos prometedores para el tratamiento del deterioro cognitivo en Alzheimer y esquizofrenia.
- Los efectos adversos colinérgicos (salivación, diarrea, convulsiones) son las consideraciones de seguridad más importantes en esa estrategia de estimulación.
- La modulación alostérica positiva es la estrategia de activación del receptor  $M_1$  que ha demostrado un mejor perfil de seguridad.
- Diversos autores han centrado sus intereses en estudiar los mecanismos fisiológicos y las estrategias de modulación alostérica, asimismo como el desarrollo de candidatos que cumplan con los requisitos farmacológicos establecidos.
- La mayor cantidad de artículos que cumplen los criterios de selección de esta revisión corresponden a otras revisiones, lo que demuestra el creciente interés en la divulgación de la teoría y mecanismos detrás de la estrategia terapéutica de búsqueda de PAM.
- Los aportes del Centro para el Descubrimiento de Medicamentos en Neurociencias de la Universidad de Vanderbilt en Estados Unidos destacan dentro de la literatura seleccionada, al ser autores del 50% de los artículos que realizan una evaluación farmacológica *in vivo*.
- El compuesto VU0486846 es el único compuesto dentro de los encontrados en la búsqueda que concluye ser un candidato apto para evaluación clínica de forma individual, y sustentándolo en la no aparición de efectos adversos en las pruebas preclínicas.
- El VU0486846 posee selectividad, especificidad y una acción moduladora alostérica sin actividad agonista ortoestérico, que muestra eficacia cognitiva en modelos animales sin toxicidad colinérgica.
- El novedoso cambio que presenta el compuesto está en el núcleo de benzomorfolina, la búsqueda posterior de candidatos de perfil superior incluye esta estrategia, pero no ha conseguido, a la fecha de la revisión, candidatos con un perfil que sea superior, acorde a los hallazgos del grupo de investigación y la teoría que lo soporta.

## Bibliografía

1. Mullane K, Williams M. Alzheimer ' s disease beyond amyloid : Can the repetitive failures of amyloid-targeted therapeutics inform future approaches to dementia drug discovery ? *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2020;177:113945. Doi:10.1016/j.bcp.2020.113945
2. Cummings J, Lee G, Mortsdorf T, Ritter A, Zhong K. Alzheimer ' s disease drug development pipeline : 2017. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2017;3(3):367-84. Doi:10.1016/j.trci.2017.05.002
3. Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer ' s disease drug development pipeline : 2019. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2019;5:272-93. Doi:10.1016/j.trci.2019.05.008
4. Fond G. Therapeutic strategies for the treatment of schizophrenia. An updated review. *Médecine* [Internet]. 1 de mayo de 2016 [citado 26 de junio de 2020];12(5):205-10. Disponible en: <http://www.jle>.

com/en/revues/med/e-docs/strategies\_de\_prescription\_des\_antipsychotiques\_dans\_la\_schizophrenie\_une\_revue\_actualisee\_307439/article.phtml?tab=texte

**5.** Feifel D, Shilling PD, Macdonald K. A Review of Oxytocin's Effects on the Positive, Negative, and Cognitive Domains of Schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2011;79(3):222-33. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.025.6.

**6.** ACADIA Pharmaceuticals and Vanderbilt University Announce Exclusive License Agreement and Research Collaboration [Internet]. [citado 27 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://finance.yahoo.com/news/acadia-pharmaceuticals-vanderbilt-university-announce-200500843.html?guccounter=1>

**7.** Rook JM, Bertron JL, Cho HP, Garcia-Barrantes PM, Moran SP, Maksymetz JT, et al. A Novel M1 PAM VU0486846 Exerts Efficacy in Cognition Models without Displaying Agonist Activity or Cholinergic Toxicity. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2018;9(9):2274-85. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.8b00131>

**8.** Felder CC. GPCR drug discovery-moving beyond the orthosteric to the allosteric domain [Internet]. 1.ª ed. Vol. 86, *Advances in Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2019. 1-20 p. Doi:10.1016/bs.apha.2019.04.002

**9.** Du J, Guo J, Kang D, Li Z, Wang G, Wu J, et al. New techniques and strategies in drug discovery. *Chinese Chem Lett* [Internet]. 2020;(2019):1-14. Doi:10.1016/j.ccllet.2020.03.028

**10.** Dencker D, Thomsen M, Wörtwein G, Weikop P, Cui Y, Jeon J, et al. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as potential drug targets for the treatment of schizophrenia, drug abuse, and Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2012;3(2):80-9. Doi:10.1021/cn200110q

**11.** Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptors: Novel opportunities for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):549-60. Doi:10.1038/nrd4295

**12.** Tolaymat M, Larabee S, Hu S, Xie G, Raufman J-P. The Role of M3 Muscarinic Receptor Ligand-Induced Kinase Signaling in Colon Cancer Progression. *Cancers*. 2019;11(3):308. Doi: 10.3390/cancers11030308

**13.** Kumar Chintamaneni P, Krishnamurthy PT, Vengal Rao P, Pindiprolu SS. Surface modified nano-lipid drug conjugates of positive allosteric modulators of M1 muscarinic acetylcholine receptor for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*. 2017;101:17-22. Doi:10.1016/j.mehy.2017.01.026

**14.** Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. Vol. 26, *Autonomic and Autacoid Pharmacology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2006. p. 219-33. Doi:10.1111/j.1474-8673.2006.00368.x

**15.** Thomsen M, Sørensen G, Dencker D. Physiological roles of CNS muscarinic receptors gained from knockout mice. Vol. 136, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2018;p. 411-20. Doi:10.1016/j.neuropharm.2017.09.011

**16.** Bradley SJ, Molloy C, Valuskova P, Dwomoh L, Scarpa M, Rossi M, et al. Biased M1-muscarinic-receptor-mutant mice inform the design of next-generation drugs. *Nat Chem Biol*. 2020;16(3):240-9. Doi:10.1038/s41589-019-0453-9

**17.** Niwa Y, Kanda GN, Yamada RG, Shi S, Sunagawa GA, Ukai-Tadenuma M, et al. Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep. *Cell Rep*. 2018;24(9):2231-2247.e7. Doi:10.1016/j.celrep.2018.07.082

**18.** Wang Q, Pronin AN, Levay K, Almaca J, Fornoni A, Caicedo A, et al. Regulator of G-protein signaling Gβ5-R7 is a crucial activator of muscarinic M3 receptor-stimulated insulin secretion. *FASEB J*. 2017;31(11):4734-44. Doi:10.1096/fj.201700197RR

**19.** Sabbir MG, Fernyhough P. Muscarinic receptor antagonists activate ERK-CREB signaling to augment neurite outgrowth of adult sensory neurons. *Neuropharmacology*. 2018;143:268-81.

20. Van Giau vo, Lee H, Hwan Shim K, Bagyinszky eva, Soo An SA. Clinical Interventions in Aging Dovepress Genome-editing applications of CRISPR-Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2018;13-221. Doi:10.2147/CIA.S155145
21. Conn PJ, Lindsley CW, Meiler J, Niswender CM. Opportunities and challenges in the discovery of allosteric modulators of GPCRs for treating CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(9):692-708. Doi:10.1038/nrd4308
22. Bertron JL, Cho HP, Garcia-Barrantes PM, Panarese JD, Salovich JM, Nance KD, et al. The discovery of VU0486846: steep SAR from a series of M1 PAMs based on a novel benzomorpholine core. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2018;28(12):2175-9. Doi:10.1016/j.bmcl.2018.05.009
23. Maeda S, Qu Q, Robertson MJ, Skiniotis G, Kobilka BK. Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science*. 2019;364(6440):552-7. Doi: DOI: 10.1126/science.aaw5188
24. RCSB PDB - 6WJC: Muscarinic acetylcholine receptor 1 - muscarinic toxin 7 complex. Disponible en <https://www.rcsb.org/structure/6WJC>. Doi: 10.2210/pdb6WJC/pdb
25. RCSB PDB - 5CXV: Structure of the human M1 muscarinic acetylcholine receptor bound to antagonist Tiotropium. [citado 16 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/5CXV>
26. RCSB PDB - 6OIJ: Muscarinic acetylcholine receptor 1-G11 protein complex [Internet]. [citado 16 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/6OIJ>
27. Bender AM, Jones CK, Lindsley CW. Classics in Chemical Neuroscience: Xanomeline. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(3):435-43. Doi:10.1021/acscchemneuro.7b00001
28. Melancon BJ, Tarr JC, Panarese JD, Wood MR, Lindsley CW. Allosteric modulation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: Improving cognition and a potential treatment for schizophrenia and Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 2013;18(23-24):1185-99. Doi:10.1016/j.drudis.2013.09.005
29. Scarr E, Udawela M, Thomas EA, Dean B. Changed gene expression in subjects with schizophrenia and low cortical muscarinic M1 receptors predicts disrupted upstream pathways interacting with that receptor. *Mol Psychiatry*. 2018;23(2):295-303. Doi: 10.1038/mp.2016.195
30. Erskine D, Taylor JP, Bakker G, Brown AJH, Tasker T, Nathan PJ. Cholinergic muscarinic M1 and M4 receptors as therapeutic targets for cognitive, behavioural, and psychological symptoms in psychiatric and neurological disorders. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2019. p. 2307-14. Doi:10.1016/j.drudis.2019.08.009
31. Nazarinia E, Rezayof A, Sardari M, Yazdanbakhsh N. Contribution of the basolateral amygdala NMDA and muscarinic receptors in rat's memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;139:28-36. Doi:10.1016/j.nlm.2016.12.008
32. Zwart R, Reed H, Sher E. Oxotremorine-M potentiates NMDA receptors by muscarinic receptor dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):481-6. Doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.036
33. Lanctôt KL, Amatniek J, Ancoli-Israel S, Arnold SE, Ballard C, Cohen-Mansfield J, et al. Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. Vol. 3, *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*. Elsevier Inc; 2017. p. 440-9. Doi:10.1016/j.trci.2017.07.001
34. Cummings J, Lee G, Ritter A, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv*. 2018;4:195-214. Doi: 10.1016/j.trci.2019.05.008
35. Foster DJ, Conn PJ. Allosteric Modulation of GPCRs: New Insights and Potential Utility for Treatment of Schizophrenia and Other CNS Disorders. Vol. 94, *Neuron*. Cell Press; 2017. p. 431-46. Doi:10.1016/j.neuron.2017.03.016
36. Bock A, Schrage R, Mohr K. Allosteric modulators targeting CNS muscarinic receptors. *Neuropharmacology*. 2018;136:427-37. Doi:10.1016/j.neuropharm.2017.09.024

- 37.** Chatzidaki A, Millar NS. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. Vol. 97, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2015. p. 408-17. Doi:10.1016/j.bcp.2015.07.028
- 38.** Congreve M, Oswald C, Marshall FH. Applying Structure-Based Drug Design Approaches to Allosteric Modulators of GPCRs. Vol. 38, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd; 2017:837-47. Doi:10.1016/j.tips.2017.05.010
- 39.** Seyedabadi M, Ghahremani MH, Albert PR. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential. Vol. 200, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2019. p. 148-78. Doi:10.1016/j.pharmthera.2019.05.006
- 40.** Jakubik J, El-Fakahany EE. Current advances in allosteric modulation of muscarinic receptors. *Biomolecules*. 2020;10(2):1-17. Doi:10.3390/biom10020325
- 41.** Felder CC, Goldsmith PJ, Jackson K, Sanger HE, Evans DA, Mogg AJ, et al. Current status of muscarinic M1 and M4 receptors as drug targets for neurodegenerative diseases. Vol. 136, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 449-58. Doi:10.1016/j.neuropharm.2018.01.028
- 42.** Bawa P, Pradeep P, Kumar P, Choonara YE, Modi G, Pillay V. Multi-target therapeutics for neuropsychiatric and neurodegenerative disorders [Internet]. Vol. 21, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2016. p. 1886-914. Doi:10.1016/j.drudis.2016.08.001
- 43.** Dean B, Scarr E. Muscarinic M1 and M4 receptors: Hypothesis driven drug development for schizophrenia. Vol. 288, *Psychiatry Research*. Elsevier Ireland Ltd; 2020. Doi: 10.1016/j.psychres.2020.112989
- 44.** Lebois EP, Thorn C, Edgerton JR, Popielek M, Xi S. Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease. Vol. 136, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 362-73. Doi:10.1016/j.neuropharm.2017.11.018
- 45.** Chan HCS, Li Y, Dahoun T, Vogel H, Yuan S. New Binding Sites, New Opportunities for GPCR Drug Discovery. Vol. 44, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd; 2019. p. 312-30. Doi:10.1016/j.tibs.2018.11.011
- 46.** Yohn SE, Conn PJ. Positive allosteric modulation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential therapeutic treatments for schizophrenia. Vol. 136, *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2018 p. 438-48. Doi:10.1016/j.neuropharm.2017.09.012
- 47.** Lütjens R, Rocher JP. Recent advances in drug discovery of GPCR allosteric modulators for neurodegenerative disorders. Vol. 32, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 91-5. Doi:10.1016/j.coph.2017.01.001
- 48.** Moran SP, Maksymetz J, Conn PJ. Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(12):1006-20. Doi:10.1016/j.tips.2019.10.007
- 49.** Carruthers SP, Gurvich CT, Rossell SL. The muscarinic system, cognition and schizophrenia [Internet]. Vol. 55, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Elsevier Ltd; 2015. p. 393-402. Doi:10.1016/j.neubiorev.2015.05.011
- 50.** Davoren JE, O'Neil S V., Anderson DP, Brodney MA, Chenard L, Dlugolenski K, et al. Design and optimization of selective azaindole amide M1 positive allosteric modulators. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2016;26(2):650-5. Doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.053
- 51.** Davoren JE, Lee CW, Garnsey M, Brodney MA, Cordes J, Dlugolenski K, et al. Discovery of the Potent and Selective M1 PAM-Agonist N-[(3R,4S)-3-Hydroxytetrahydro-2H-pyran-4-yl]-5-methyl-4-[4-(1,3-thiazol-4-yl)benzyl]pyridine-2-carboxamide (PF-06767832): Evaluation of Efficacy and Cholinergic Side Effects. *J Med Chem*. 2016;59(13):6313-28. Doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00544
- 52.** Moran SP, Cho HP, Maksymetz J, Remke DH, Hanson RM, Niswender CM, et al. PF-06827443 Displays Robust Allosteric Agonist and Positive Allosteric Modulator Activity in High Receptor Reserve and Native Systems. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(9):2218-24. Doi: 10.1021/acschemneuro.8b00106./

- 53.** Sako Y, Kurimoto E, Mandai T, Suzuki A, Tanaka M, Suzuki M, et al. TAK-071, a novel M1 positive allosteric modulator with low cooperativity, improves cognitive function in rodents with few cholinergic side effects. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(5):950-60. Doi:10.1038/s41386-018-0168-8
- 54.** Engers JL, Childress ES, Long MF, Capstick RA, Luscombe VB, Cho HP, et al. VU6007477, a Novel M1 PAM Based on a Pyrrolo[2,3- b]pyridine Carboxamide Core Devoid of Cholinergic Adverse Events. *ACS Med Chem Lett*. 2018;9(9):917-22. Doi:10.1021/acsmchemlett.8b00261
- 55.** Mistry SN, Jörg M, Lim H, Vinh NB, Sexton PM, Capuano B, et al. 4-Phenylpyridin-2-one Derivatives: A Novel Class of Positive Allosteric Modulator of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *J Med Chem*. 2016;59(1):388-409. Doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01562
- 56.** Jörg M, Van Der Westhuizen ET, Khajehali E, Burger WAC, White JM, Choy KHC, et al. 6-Phenylpyrimidin-4-ones as Positive Allosteric Modulators at the M1 mAChR: The Determinants of Allosteric Activity. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(3):1099-114. Doi:10.1021/acscchemneuro.8b00613
- 57.** Smith DL, Davoren JE, Edgerton JR, Lazzaro JT, Lee CW, Neal S, et al. Characterization of a novel m1 muscarinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator radioligand, [3H]PT-1284. *Mol Pharmacol*. 2016;90(3):177-87. Doi:10.1124/mol.116.104737
- 58.** Deng X, Hatori A, Chen Z, Kumata K, Shao T, Zhang X, et al. Synthesis and Preliminary Evaluation of 11 C-Labeled VU0467485/AZ13713945 and Its Analogues for Imaging Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype 4. *ChemMedChem*. 2019;14(3):303-9. Doi: 10.1002/cmdc.201800710
- 59.** Kurimoto E, Nakashima M, Kimura H, Suzuki M. TAK-071, a muscarinic M 1 receptor positive allosteric modulator, attenuates scopolamine-induced quantitative electroencephalogram power spectral changes in cynomolgus monkeys. *PLoS One*. 2019;14(3):1-15. Doi: 10.1371/journal.pone.0207969
- 60.** Van Der Westhuizen ET, Spathis A, Khajehali E, Jörg M, Mistry SN, Capuano B, et al. Assessment of the Molecular Mechanisms of Action of Novel 4-Phenylpyridine-2-One and 6-Phenylpyrimidin-4-One Allosteric Modulators at the M 1 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol*. 2018;94(1):770-83. Doi: 10.1124/mol.118.111633
- 61.** Randáková A, Dolejší E, Rudajev V, Zimčík P, Doležal V, El-Fakahany EE, et al. Classical and atypical agonists activate M1 muscarinic acetylcholine receptors through common mechanisms. *Pharmacol Res*. 2015;97:27-39. Doi:10.1016/j.phrs.2015.04.002
- 62.** Flohr A, Hutter R, Mueller B, Bohnert C, Pellisson M, Schaffhauser H. Discovery of the first low-shift positive allosteric modulators for the muscarinic M1 receptor. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2017;27(24):5415-9. Doi:10.1016/j.bmcl.2017.11.008
- 63.** Mandai T, Kasahara M, Kurimoto E, Tanaka M, Suzuki M, Nakatani A, et al. In Vivo Pharmacological Comparison of TAK-071, a Positive Allosteric Modulator of Muscarinic M1 Receptor, and Xanomeline, an Agonist of Muscarinic M1/M4 Receptor, in Rodents. *Neuroscience*. 2019;414:60-76. Doi:10.1016/j.neuroscience.2019.07.003
- 64.** Moran SP, Dickerson JW, Cho HP, Xiang Z, Maksymetz J, Remke DH, et al. M1-positive allosteric modulators lacking agonist activity provide the optimal profile for enhancing cognition. *Neuropsychopharmacology [Internet]*. 2018;43(8):1763-71. DOI:0.1038/s41386-018-0033-9
- 65.** Voss T, Li J, Cummings J, Farlow M, Assaid C, Froman S, et al. Randomized, controlled, proof-of-concept trial of MK-7622 in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv*. 1 de enero de 2018 [citado 30 de junio de 2020];4:173-81. Doi:10.1016/j.trci.2018.03.004
- 66.** Engers JL, Bender AM, Kalbfleisch JJ, Cho HP, Lingenfelter KS, Luscombe VB, et al. Discovery of Tricyclic Triazolo- and Imidazopyridine Lactams as M 1 Positive Allosteric Modulators. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(3):1035-42. Doi:10.1021/acscchemneuro.8b00311
- 67.** Khajehali E, Valant C, Jörg M, Tobin AB, Conn PJ, Lindsley CW, et al. Probing the binding site of novel selective positive allosteric modulators at the M 1 muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem Pharmacol [Internet]*. 1 de agosto de 2018;154:243-54. Doi:10.1016/j.bcp.2018.05.009

- 68.** Ghoshal A, Moran SP, Dickerson JW, Joffe ME, Grueter BA, Xiang Z, et al. Role of mGlu5 Receptors and Inhibitory Neurotransmission in M1 Dependent Muscarinic LTD in the Prefrontal Cortex: Implications in Schizophrenia. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(10):2254-65. Doi:10.1021/acschemneuro.7b00167
- 69.** Thal DM, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder CC, et al. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Nature*. 2016;531(7594):335-40. Doi:10.1038/nature17188
- 70.** Moran SP, Xiang Z, Doyle CA, Maksymetz J, Lv X, Faltin S, et al. Biased M1 receptor-positive allosteric modulators reveal role of phospholipase D in M1-dependent rodent cortical plasticity. *Sci Signal*: 2019;12(610). Doi: 10.1126/scisignal.aax2057
- 71.** Rook JM, Abe M, Cho HP, Nance KD, Luscombe VB, Adams JJ, et al. Diverse Effects on M1 Signaling and Adverse Effect Liability within a Series of M1 Ago-PAMs. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2017;8(4):866-83. Doi:10.1021/acschemneuro.6b00429
- 72.** Abdel-Magid AF. Allosteric Modulators: An Emerging Concept in Drug Discovery. *ACS Med Chem*. 2015;6(2):104-7. Doi:10.1021/ml5005365
- 73.** XANOMELINE [Internet]. [citado 15 de junio de 2020]. Disponible en: <https://drugs.ncats.io/drug/9ORI6L73CJ#structure>
- 74.** Daval SB, Valant C, Bonnet D, Kellenberger E, Hibert M, Galzi JL, et al. Fluorescent derivatives of AC-42 to probe bitopic orthosteric/allosteric binding mechanisms on muscarinic M1 receptors. *J Med Chem*. 2012;55(5):2125-43. Doi:10.1021/jm201348t
- 75.** Lu S, Ji M, Ni D, Zhang J. Discovery of hidden allosteric sites as novel targets for allosteric drug design. *Drug Discov Today*. 2018;23(2):359-65. Doi:10.1016/j.drudis.2017.10.001
- 76.** Lueptow LM. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J Vis Exp*. 2017;(126): 55718. Doi: 10.3791/55718.
- 77.** Rook JM, Xiang Z, Lv X, Ghoshal A, Dickerson JW, Bridges TM, et al. Biased mGlu5-Positive Allosteric Modulators Provide InVivo Efficacy without Potentiating mGlu5 Modulation of NMDAR Currents. *Neuron* [Internet]. 2015;86(4):1029-40. Doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.063
- 78.** Engers DW, Lindsley CW. Allosteric modulation of Class C GPCRs: A novel approach for the treatment of CNS disorders. *Drug Discov Today Technol*. 2013;10(2):e269-76. Doi:10.1016/j.ddtec.2012.10.007