



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Análogos de  
GABA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

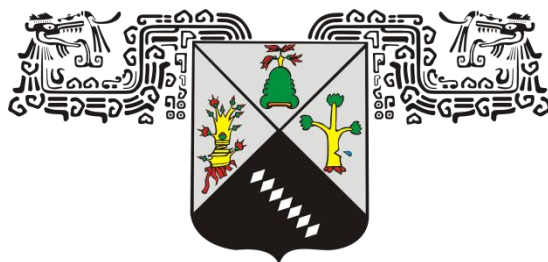
**M.C. Josue Rodríguez Lozada**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Mario Fernández Zertuche**

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2019



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Análogos de  
GABA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M.C. Josue Rodríguez Lozada**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Mario Fernández Zertuche**

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2019

Jurado Asignado.

<b>Jurado</b>	<b>Nombre</b>	<b>Adscripción</b>
Presidente	Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara	Escuela Superior de Medicina- IPN
Secretario	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber	CIQ-UAEM
Vocal	Dr. Hugo Tlahuext Romero	CIQ-UAEM
Vocal	Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama	CIQ-UAEM
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Facultad de Farmacia-UAEM
Suplente	Dr. Jaime Escalante García	CIQ-UAEM
Suplente	Dra. Irma Linzaga Elizalde	CIQ-UAEM

**Candidato al grado**

**Asesor de tesis**

---

M.C. Josue Rodríguez Lozada

---

Dr. Mario Fernández Zertuche

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 203 del Centro de Investigaciones Químicas del Instituto de Investigaciones en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la asesoría del Dr. Mario Fernández Zertuche. Agradezco al CONACYT el apoyo económico para la realización de este proyecto 241088 y por el apoyo económico mediante la beca de posgrado otorgada 266896.

Artículos publicados:

Josué Rodríguez-Lozada; Erika Tovar-Gudiño; Juan Alberto Guevara-Salazar; Rodrigo Said Razo-Hernández; Ángel Santiago; Nina Pastor; Mario Fernández-Zertuche. “*QSAR and Molecular Docking Studies of the Inhibitory Activity of Novel Heterocyclic GABA Analogues over GABA-AT*”. **Molecules** 2018, Volume 23, Issue 11, 2984.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis han sido presentados en congresos nacionales e internacionales:

1.- 5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium

Poster presentation.

Ljubljana, Slovenia, September 6-7, 2018.

2.- XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2018)

“Synthesis and Evaluation of Heterocyclic  $\gamma$ -aminobutyric acid analogues”

Poster presentation.

Ljubljana, Slovenia, September 2-6, 2018.

3.- XIV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica.

“Síntesis y evaluación de análogos del ácido  $\gamma$ -aminobutírico”.

Presentación de cartel.

Mérida, Yucatán, 2018.

4.- XII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica.

“Síntesis y Evaluación de Análogos de GABA”.

Presentación de Cartel.

Silao, Guanajuato. 2016.

## RESUMEN

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central y es responsable de los procesos de regulación fisiológica en los seres vivos, la reducción en las concentraciones de GABA está asociado a trastornos neuronales tales como epilepsia, mal de Parkinson Alzheimer entre otros.

El presente proyecto se centró en la síntesis de nuevas moléculas análogas al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) a partir de una ruta de síntesis que involucró una reacción de *N*-alquilación y adiciones conjugadas 1,4 del reactivo de Grignard a partir de diversos heterociclos de cinco y seis miembros. Estos nuevos análogos fueron diseñados como inhibidores de la  $\gamma$ -aminotransferasa de GABA, encargada de la regulación del GABA.

Se sintetizaron 17 nuevos análogos de GABA; seis análogos estructurales de GABA, 5 análogos  $\beta$ -sustituidos en analogía con (*R*)-baclofen y 6 análogos  $\beta$ -sustituidos en analogía a la (*S*)-pregabalina. Todos los análogos finales se obtuvieron en rendimientos que fueron de buenos a moderados, los análogos se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y experimentos bidimensionales. Se determinó la actividad inhibitoria *in vitro* de los 17 análogos en contra de la enzima GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens*, el análogo **87b** mostró un 73%  $\pm 5.16$  de inhibición contra la enzima de GABA-AT, la cinética enzimática dio como resultado que **87b** es un inhibidor competitivo a bajas concentraciones e inhibidor no competitivo a concentraciones más elevadas. Se realizó el estudio *in vivo* de **87b** mediante el análisis de latencia en el primer ataque, el número de ataques tónico-clónicos generados en el primer periodo de observación y la protección contra la muerte.

Con la finalidad de entender y explicar la actividad biológica presentada por los análogos sintetizados previamente se realizaron los estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) y de acoplamiento molecular (Docking) en dos modelos de homología; GABA-AT de *Pseudomonas* y GABA-AT humano, mostrando que los análogos se unen al sitio activo de la enzima en diferentes afinidades y conformaciones que se asociaron a la actividad biológica presentada.

## Agradecimientos

A mi familia, amigos y seres queridos.

# Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Análogos de GABA.

## CONTENIDO.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Trastornos neurológicos e impacto social.	1
<b>ANTECEDENTES</b>	4
<b>1.</b> Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).	4
<b>1.1.</b> Síntesis y metabolismo de GABA.	5
<b>1.2.</b> Receptores GABA	6
<b>1.3</b> Trastornos neurológicos asociados a deficiencia de GABA.	7
<b>2.</b> Análogos de GABA reportados en la literatura.	7
<b>2.1.</b> Análogos de GABA comercializados: farmacoterapia.	7
<b>2.2.</b> Diseño de análogos de GABA.	9
<b>2.2.1.</b> Análogos de GABA conformacionalmente restringidos	9
<b>2.2.2.</b> Diseño de análogos de GABA conformacionalmente restringidos como inhibidores de GABA-AT.	11
<b>2.2.3.</b> Diseño, síntesis y evaluación de análogos de GABA en el grupo de investigación.	19
<b>HIPOTESIS</b>	21
<b>OBJETIVOS</b>	22
<b>3.1.</b> Objetivo general.	22
<b>3.2.</b> Específicos.	22
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	25
<b>4.1.</b> Diseño de nuevos análogos de GABA, baclofen y pregabalina.	25
<b>4.2.</b> Propiedades moleculares de los análogos de GABA, baclofen y pregabalina.	25
<b>4.3.</b> Análisis retrosintético.	29
<b>4.4.</b> Síntesis de los análogos de GABA.	30



4.4.1.	Reacciones de <i>N</i> -alquilación de los heterociclos <b>89-94</b> con el éster <b>100</b> .	31
4.4.2.	Hidrólisis de los ésteres <b>95a-f</b> .	33
4.5.	Síntesis de análogos de baclofen y pregabalina.	34
4.5.1.	Reacciones de <i>N</i> -alquilación para la obtención de los ésteres $\alpha$ , $\beta$ -insaturados <b>96a-f</b> .	35
4.5.2.	Adición conjugada 1,4 de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo.	39
4.5.3.	Adición conjugada 1,4 de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo.	44
4.5.4.	Hidrólisis de los precursores <b>98a-f</b> de baclofen.	48
4.5.5.	Hidrólisis de los precursores <b>99a-f</b> de pregabalina.	51
4.6.	Estudios de resolución de mezclas racémicas	54
4.7.	Pruebas preliminares de inhibición enzimática sobre GABA-AT de <i>Pseudomonas fluorescens</i> de los análogos sintetizados.	57
4.7.1.	Pruebas preliminares de inhibición enzimática.	60
4.7.2.	Estudio de cinética enzimática del análogo <b>87b</b> .	63
4.7.3.	Estudio in vivo del análogo <b>87b</b> .	65
4.8	Estudios de relación cuantitativa estructura actividad.	69
4.9.	Estudios de acoplamiento molecular (Docking).	73
4.9.1.	Acoplamiento molecular para el modelo de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> .	74
4.9.2.	Acoplamiento molecular para el modelo GABA-AT humano.	78
<b>CONCLUSIONES</b>		82
<b>PERSPECTIVAS</b>		85
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>		86
5.1.	Consideraciones generales.	86
5.2	Síntesis de los análogos de GABA.	87
5.2.1.	Síntesis del 4-bromobutanoato de metilo <b>100</b> .	87
5.3.	Metodología general para la síntesis de los ésteres <b>95a-f</b> .	87
5.3.1	Síntesis de 4-(tiazolidin-3-il)butanoato de metilo <b>95a</b> .	87
5.3.2.	Síntesis de 4-(piperidin-1-il)butanoato de metilo <b>95b</b> .	88
5.3.3.	Síntesis de 4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoato de metilo <b>95c</b> .	88

5.3.4.	Síntesis de 4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoato de metilo <b>95d</b> .	88
5.3.5.	Síntesis de 4-morfolinbutanoato de metilo <b>95e</b> .	89
5.3.6.	Síntesis de 4-tiomorfolinbutanoato de metilo <b>95f</b> .	89
5.4.	Metodología general de hidrólisis de los ésteres metílicos <b>95a-f</b> .	90
5.4.1.	Síntesis del ácido 4-(tiazolidin-3-il)butanoico <b>86a</b> .	90
5.4.2.	Síntesis del ácido 4-(piperidin-1-il)butanoico <b>86b</b> .	90
5.4.3.	Síntesis del ácido 4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoico <b>86c</b> .	91
5.4.4.	Síntesis del ácido 4-(4-methylpiperidin-1-il)butanoico <b>86d</b> .	91
5.4.5.	Síntesis del ácido 4-morfolinbutanoico <b>86e</b> .	91
5.4.6.	Síntesis del ácido 4-tiomorfolinbutanoico <b>86f</b> .	92
5.5.	Metodología general para la síntesis de los ésteres <b>96a-f</b> mediante reacciones de <i>N</i> -alquilación.	92
5.5.1.	Síntesis de ( <i>E</i> )-4-(tiazolidin-3-il)but-2-enoato de etilo <b>96a</b> .	92
5.5.2.	Síntesis de ( <i>E</i> )-4-(piperidin-1-il)but-2-enoato de etilo <b>96b</b> .	93
5.5.3.	Síntesis de ( <i>E</i> )-4-(3-metilpiperidin-1-il)but-2-enoato de etilo <b>96c</b> .	93
5.5.4.	Síntesis de ( <i>E</i> )-4-(4-metilpiperidin-1-il)but-2-enoato de etilo <b>96d</b> .	93
5.5.5.	Síntesis de ( <i>E</i> )-4-morfolinbut-2-enoato de etilo <b>96e</b> .	94
5.5.6.	Síntesis de ( <i>E</i> )-4-tiomorfolinbut-2-enoato de etilo <b>96f</b> .	94
5.6.	5.6. Metodología general para las adiciones conjugadas 1, 4 del reactivo de Grignard a los sistemas $\alpha$ , $\beta$ -insaturados <b>96a-f</b> .	95
5.6.1.	Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-(piperidin-1-il)butanoato de etilo <b>98b</b> .	95
5.6.2.	Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoato de etilo <b>98c</b> .	96
5.6.3.	Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoato de etilo <b>98d</b> .	96
5.6.4.	Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-morfolinbutanoato de etilo <b>98e</b> .	97

5.6.5.	Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoato de etilo	97
	<b>98f.</b>	
5.6.6.	Síntesis de 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil)hexanoato de etilo	98
	<b>99a.</b>	
5.6.7.	Síntesis de 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)hexanoato de etilo	98
	<b>99b.</b>	
5.6.8.	Síntesis de 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il)metil)hexanoato de etilo	99
	<b>99c.</b>	
5.6.9.	Síntesis de 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il) metil)hexanoato de etilo	99
	<b>99d.</b>	
5.6.10.	Síntesis de 5-metil-3-(morfolinmetil)hexanoato de etilo	100
	<b>99e.</b>	
5.6.11.	Síntesis de 5-metil-3-(tiomorfolinmetil)hexanoato de etilo	100
	<b>99f.</b>	
5.7.	Metodología general de hidrólisis de los ésteres etílicos	101
	y <b>99a-f.</b>	
5.7.1.	Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(piperidin-1-il)butanoico	101
	<b>87b.</b>	
5.7.2.	Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoico	101
	<b>87c.</b>	
5.7.3.	Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoico	102
	<b>87d.</b>	
5.7.4.	Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-morfolinbutanoico	102
	<b>87e.</b>	
5.7.5.	Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoico	103
	<b>87f.</b>	
5.7.6.	Síntesis del ácido 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil)hexanoico	103
	<b>88a.</b>	
5.7.7.	Síntesis del ácido 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)hexanoico	104
	<b>88b.</b>	
5.7.8.	Síntesis del ácido 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il)metil)hexanoico	104
	<b>88c.</b>	

5.7.9	Síntesis del ácido 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il)metil)hexanoico <b>88d</b> .	105
5.7.10.	Síntesis del ácido 5-metil-3-(morfolinmetil)hexanoico <b>88e</b> .	105
5.7.11.	Síntesis del ácido 5-metil-3-(tiomorfolinmetil)hexanoico <b>88f</b> .	106
5.8.	Pruebas de actividad biológica.	106
5.8.1.	Pruebas in vitro de potencial inhibitorio.	106
5.8.2.	Pruebas in vivo de actividad anticonvulsiva en el modelo de ataques inducidos por PTZ.	107
5.9.	Estudios computacionales.	108
5.9.1.	Análisis conformacional y optimización de la geometría.	108
5.9.2.	Cálculos de descriptores moleculares.	108
5.9.3.	Construcción y validación del QSAR	108
5.9.4	Cálculos de acoplamiento molecular ( <i>Docking</i> ).	111
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		112
<b>ANEXOS</b>		119
6.1.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de los análogos finales	119
6.1.1.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de los análogos de GABA.	119
6.1.2.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de los análogos de baclofen.	123
6.1.3.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de los análogos de pregabalina.	128
6.2.	Tablas suplementarias	137

## A) Índice de esquemas.

	Título:	Pag
Esquema 1	Ruta bioquímica de síntesis y metabolismo de GABA.	6
Esquema 2	Síntesis de ( <i>R</i> )-(-) y ( <i>S</i> )-(+)-homo-β-prolina como agonistas de GABA.	11
Esquema 3	Mecanismo de inhibición de GABA-AT por acción de vigabatrina <b>2</b> .	12
Esquema 4	Síntesis de los análogos de ciclopentano de GABA <b>15</b> y <b>16</b> .	13
Esquema 5	Síntesis de análogo <b>20</b> conformacionalmente restringido.	13
Esquema 6	Síntesis de análogo <b>27</b> difluoro-sustituído conformacionalmente restringido.	14
Esquema 7	Síntesis del compuesto <b>45a</b> .	16
Esquema 8	Síntesis del compuesto <b>45b</b> .	17
Esquema 9	Síntesis de los compuestos ( <i>2S,4S</i> )- <b>56</b> y ( <i>2R,4S</i> )- <b>56</b> derivados de tetrahidrotiofeno.	18
Esquema 10	Síntesis del compuesto <b>64</b> reportado por Silverman y colaboradores.	19
Esquema 11	Análisis retrosintético de los análogos de GABA.	30
Esquema 12	Análisis retrosintético de los análogos de baclofen y pregabalina.	30
Esquema 13	Ruta general de síntesis de los análogos de GABA <b>86a-f</b> .	31
Esquema 14	Reacción de esterificación del ácido 4-bromobutírico.	31
Esquema 15	Síntesis del compuesto <b>95a</b> .	32
Esquema 16	Síntesis de los compuestos <b>95b-d</b> .	32
Esquema 17	Síntesis de los compuestos <b>95e-f</b> .	33
Esquema 18	Hidrólisis de los compuestos <b>95a-f</b> .	33
Esquema 19	Síntesis de los compuestos <b>86e-f</b> empleando NH <sub>4</sub> Cl como tratamiento ácido.	34

	Título:	Pag
Esquema 20	Ruta de síntesis para la obtención de los análogos de baclofen y pregabalina.	35
Esquema 21	Formación de los cupratos de <i>p</i> -clorofenilo e <i>i</i> -butilo.	39
Esquema 22	Adición conjugada a <b>96e</b> mediante las condiciones descritas por Lipshutz.	42
Esquema 23	Adición conjugada de cupratos de <i>i</i> -butilo al éster <b>96f</b> .	43
Esquema 24	Reacciones secundarias de los reactivos de Grignard generados.	44
Esquema 25	Adición conjugada de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo al éster <b>96d</b> .	46
Esquema 26	Acoplamiento de <b>88b</b> con ( <i>R</i> )-pantolactona <b>104</b> .	55
Esquema 27	Mecanismo de acoplamiento de <b>88b</b> con ( <i>R</i> )-pantolactona <b>104</b> .	55
Esquema 28	Esterificación del ácido mándelico <b>107</b> .	56
Esquema 29	Formación de sales diastereoméricas de <b>110b</b> con ( <i>S</i> )-FEA <b>109</b> .	57
Esquema 30	Procedimiento seguido para determinar actividad inhibitoria.	60

#### B) Índice de figuras.

	Título:	Pag
Figura 1	Ruta de síntesis y metabolismo de GABA a nivel neuronal.	5
Figura 2	Vigabatrina <b>2</b> , baclofen <b>3</b> , pregabalina <b>4</b> y gabapentina <b>5</b> .	8
Figura 3	Estructuras de análogos de GABA, agonistas, agonistas parciales y antagonistas con efectos en los receptores de GABA.	10
Figura 4	Análogos de GABA reportados por Krogsgaard-Larsen.	10
Figura 5	Estructuras de compuestos flourados conformacionalmente restringidos sintetizados por Pan <i>et al.</i>	15
Figura 6	Estructuras aromáticas y heteroaromáticos reportadas por Silverman <i>et al.</i>	16

	Título:	Pag
Figura 7	Análogos de GABA con núcleo de tetrahidrotiofeno.	17
Figura 8	Análogos estructurales de GABA <b>1</b> sintetizados dentro del grupo de investigación.	20
Figura 9	Análogos heterocíclicos y de triazol sintetizados dentro del grupo de investigación.	20
Figura 10	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo <b>87b</b> .	50
Figura 11	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo <b>87b</b> .	50
Figura 12	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo <b>88b</b> .	52
Figura 13	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo <b>88b</b> .	53
Figura 14	2D NMR (HETCOR 400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de <b>88b</b> .	54
Figura 15	a) Forma de la cavidad (malla de color azul) del sitio catalítico de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> . b) Los análogos de GABA ( <b>86a-f</b> ) en el sitio catalítico de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> .	75
Figura 16	a) Los análogos <b>87a-f</b> de ( <i>S</i> )-baclofen en el sitio catalítico de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> . b) Los análogos <b>87a-f</b> de ( <i>R</i> )-baclofen en el sitio catalítico de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> .	76
Figura 17	a) Interacciones del enlace de hidrógeno de ( <i>S</i> )- <b>87b</b> (líneas punteada azules) con GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> . b) Interacciones del enlace de hidrógeno de ( <i>R</i> )- <b>87b</b> (líneas punteada azules) con GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> .	76
Figura 18	a) Los análogos <b>88a-f</b> de ( <i>S</i> )-pregabalina en el sitio catalítico de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> . b) Los análogos <b>88a-f</b> de ( <i>R</i> )-pregabalina en el sitio catalítico de GABA-AT de <i>Pseudomonas</i> .	78

	Título	Pag
Figura 19	a) Forma de la cavidad (malla de color morado) del sitio catalítico GABA-AT humano. b) Los análogos <b>86a-f</b> de GABA en el sitio catalítico GABA-AT humano.	79
Figura 20	a) Los análogos <b>87a-f</b> de ( <i>S</i> )-baclofen en el sitio catalítico GABA-AT humano. b) Los análogos <b>87a-f</b> de ( <i>R</i> )-baclofen en el sitio catalítico GABA-AT humano.	80
Figura 21	a) Los análogos <b>88a-f</b> de ( <i>S</i> )-pregabalina en el sitio catalítico GABA-AT humano. d) Los análogos <b>88a-f</b> de ( <i>R</i> )-pregabalina en el sitio catalítico GABA-AT humano.	81

### C) Índice de tablas.

	Título	Pag
Tabla 1	Propiedades moleculares de los análogos de GABA <b>86a-f</b> .	27
Tabla 2	Propiedades moleculares de los análogos de baclofen <b>87a-f</b> .	27
Tabla 3	Propiedades moleculares de los análogos de pregabalina <b>88a-f</b> .	29
Tabla 4	Condiciones de síntesis de los compuestos <b>95b-d</b> .	32
Tabla 5	Condiciones de síntesis de los compuestos <b>95e-f</b> .	33
Tabla 6	Rendimientos obtenidos de los compuestos <b>86a-f</b> .	34
Tabla 7	Condiciones base para las reacciones de <i>N</i> -alquilación de piperidina <b>90</b> .	36
Tabla 8	Reacciones de <i>N</i> -alquilación de 3-metilpiperidina <b>91</b> .	37
Tabla 9	Reacciones de <i>N</i> -alquilación de 4-metilpiperidina <b>92</b> .	37
Tabla 10	Reacciones de <i>N</i> -alquilación de morfolina <b>93</b> y tiomorfolina <b>94</b> .	38
Tabla 11	Reacciones de <i>N</i> -alquilación de la tiazolidina <b>89</b> .	38
Tabla 12	Reacciones de adición conjugada 1,4 de cupratos de <i>i</i> -butilo al sistema $\alpha, \beta$ -insaturado <b>96b</b> .	40
Tabla 13	Adición conjugada de cupratos de <i>i</i> -butilo al éster <b>96c</b> .	41
Tabla 14	Adición conjugada de cupratos de <i>i</i> -butilo al éster <b>96d</b> .	41
Tabla 15	Adición conjugada de cupratos de <i>i</i> -butilo al éster <b>96e</b> .	42



	Título	Pag
Tabla 16	Adición conjugada de cupratos de <i>i</i> -butilo al éster <b>96a</b> .	43
Tabla 17	Adición conjugada de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo al éster <b>96b</b> .	45
Tabla 18	Adición conjugada de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo al éster <b>96c</b> .	46
Tabla 19	Adición conjugada de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo al éster <b>96e</b> .	47
Tabla 20	Adición conjugada de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo al éster <b>96f</b> .	47
Tabla 21	Adición conjugada de cupratos de <i>p</i> -clorofenilo al éster <b>96a</b> .	48
Tabla 22	Rendimientos de los análogos de baclofen <b>87b-f</b> .	49
Tabla 23	Rendimientos de los análogos de pregabalina <b>88a-f</b> .	51
Tabla 24	Condiciones de reacción para la esterificación de <b>87b</b> .	56
Tabla 25	Concentración inicial (stock) y final (en el experimento) de las soluciones <b>C-G</b> .	59
Tabla 26	Proporción volumétrica requerida en presencia y ausencia de inhibidor.	59
Tabla 27	Parámetros de actividad anticonvulsiva de los compuestos <b>87b</b> y <b>111</b> en el modelo de convulsiones inducidas por PTZ. * $p < 0.05$ .	67
Tabla 28	Valores de los descriptores moleculares, % de inhibición experimental de los análogos <b>86a-f</b> , <b>87b-f</b> y <b>88a-f</b> (Y) y la predicción ( $Y_{pred}$ ) de los análogos de GABA presentes en el modelo QSAR.	70
Tabla 29	Inhibición experimental de GABA-AT% (Y), calculada ( $Y_{cal}$ ) y predicha ( $Y_{pred}$ ) para los análogos <b>86a-f</b> , <b>87b-f</b> y <b>88a-f</b> . También se muestran los valores residuales calculados y predichos ( $residual_{cal}$ y $residual_{pred}$ ).	71
Tabla 30	Estructuras cristalinas de GABA aminotransferasa disponibles en el servidor PDB.	74
Tabla 31	Interacciones de las configuraciones (S) y (R) de <b>87b</b> con GABA-AT en el modelo de homología humano. Energías de interacción en kcal/mol.	80

D) Índice de gráficas.

	Título	Pag
Gráfica 1	Estudio preliminar de potencial inhibitorio de los análogos <b>86a-f</b> .	61
Gráfica 2	Estudio preliminar de potencial inhibitorio de los análogos <b>87b-f</b> .	62
Gráfica 3	Estudio preliminar de potencial inhibitorio de los análogos <b>88a-f</b> .	63
Gráfica 4	Actividad catalítica del inhibidor <b>87b</b> .	64
Gráfica 5	Doble recíproco de Lineweaver-Burk del inhibidor <b>87b</b> .	65
Gráfica 6	Tiempo de latencia del compuesto <b>87b</b> en comparación con <b>111</b> a diferentes dosis (0.50 y 1.00 mmol/kg) a la 1 y 4 h de pretratamiento. * $p < 0.05$ : diferencia significativa al comparar el grupo de control con <b>87b</b> y <b>111</b> como grupo de control positivo.	66
Gráfica 7	Número de ataques tónico-clónicos provocados por el compuesto <b>87b</b> en comparación con <b>111</b> en diferentes dosis (0,5 y 1,00 mmol / kg) a 1 hora y 4 horas de pretratamiento.* $p < 0.05$ : diferencia significativa al comparar el grupo de control con <b>87b</b> y <b>111</b> como grupo de control positivo.	67
Gráfica 8	Porcentaje de protección contra la muerte del compuesto <b>87b</b> en comparación con <b>111</b> a diferentes dosis (0.50 y 1.00 mmol/kg) a 1 h y 4 h de pretratamiento. * $p < 0.05$ : diferencia significativa al comparar el grupo de control con <b>87b</b> y <b>111</b> como grupo de control positivo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher.	68
Gráfica 9	Correlación lineal entre $Y_{cal}$ vs $Y$ .	72
Gráfica 10	Correlación lineal de $Y_{pred}$ vs $Y$ . Los círculos de color azul y rojo representan las moléculas de entrenamiento y de prueba, respectivamente.	72

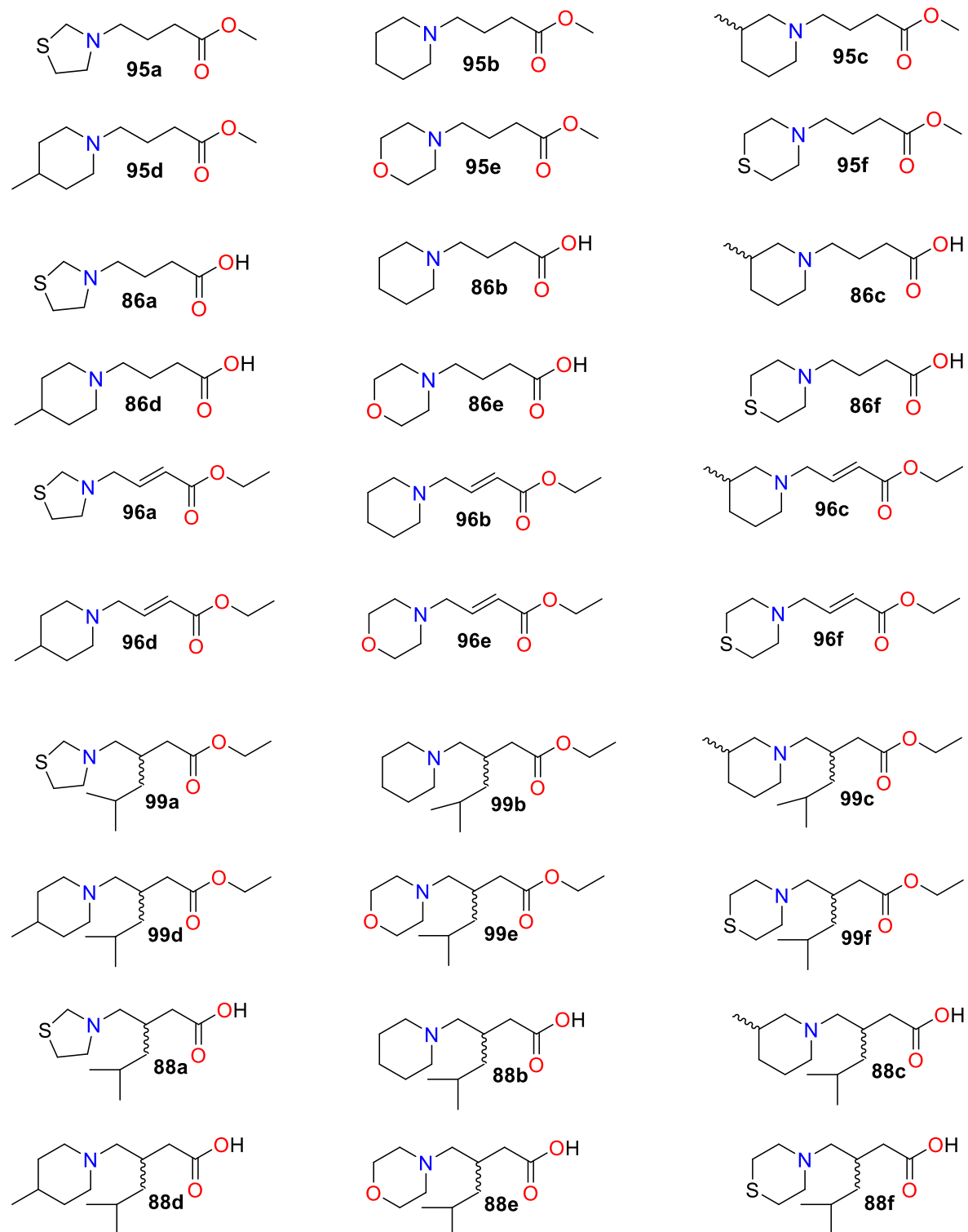
## Abreviaturas, símbolos y formulas

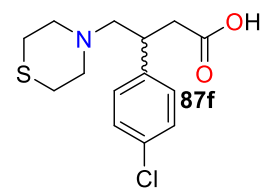
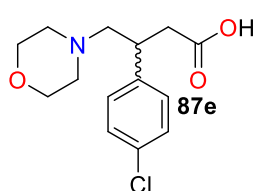
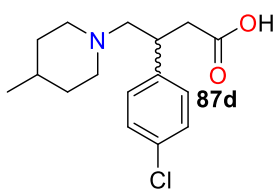
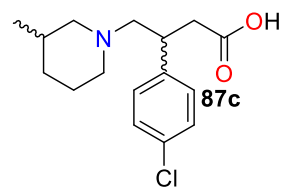
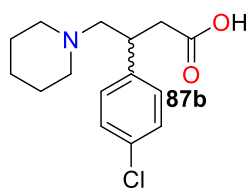
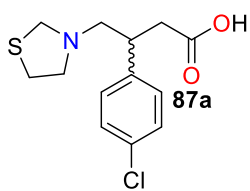
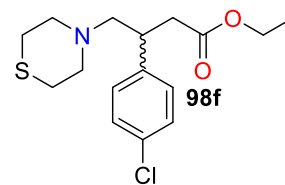
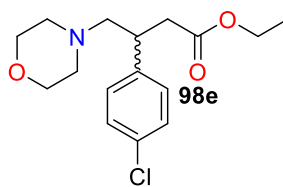
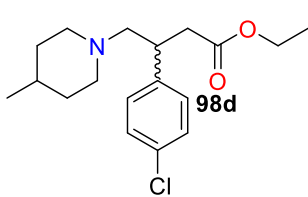
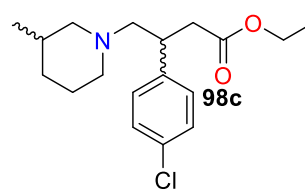
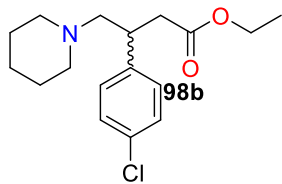
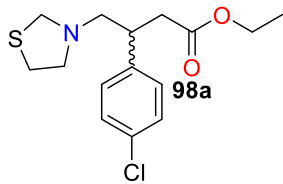
<b>A</b>	Angstrom.	<b>DAST</b>	Trifluoruro de (dietilamino) azufre.
<b>Abs</b>	Absorbancia.	<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina.
<b>AcCl</b>	Cloruro de acilo.	<b>Eq</b>	Equivalentes.
<b>AcOH</b>	Ácido acético.	<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Éter.
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo.	<b>g</b>	Gramos.
<b>AIBN</b>	Azobisisobutironitrilo.	<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamina.
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica.	<b>FAB<sup>+</sup></b>	Fast Atom Bombardment.
<b>BrBn</b>	Bromuro de bencilo.	<b>GAD</b>	Ácido glutámico descarboxilasa.
<b>β-NADP<sup>+</sup></b>	Beta nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado.	<b>GABA</b>	Ácido γ-aminobutírico.
<b>Bu<sub>3</sub>SnH</b>	Hidruro de tributilestaño.	<b>GABA-AT</b>	GABA aminotransferasa.
<b>°C</b>	Grados centígrados.	<b>GAT</b>	Proteína transportadora de GABA
<b>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub></b>	Ácido cítrico.	<b>H<sup>+</sup></b>	Protón.
<b>CuBrSMe<sub>2</sub></b>	Complejo de bromuro de cobre (I) y dimetilsulfuro.	<b>H<sub>ax</sub></b>	Hidrógeno axial.
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano.	<b>H<sub>eq</sub></b>	Hidrógeno ecuatorial
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado.	<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrógeno
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo.	<b>h</b>	Horas.
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Metanol deuterado.	<b>Hex</b>	Hexano.
<b>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl</b>	Clorotrimetilsilano.	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua.
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol.	<b>HF</b>	Ácido fluorhídrico.
<b>CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH</b>	Etanol.	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico.
<b>CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub></b>	Diazometano.	<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico.
<b>CuI</b>	Yoduro de cobre (I)	<b>HWE</b>	Horner-Wadsworth-Emmons.
<b>d</b>	Señal doble.	<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectroscopy.
<b>dd</b>	Señal doble de doble.	<b>Hz</b>	Hertz.
<b>ddd</b>	Señal doble de doble de doble.	<b>I<sub>2</sub></b>	Iodo.
<b>dt</b>	Señal doble de triples.	<b>IRA-400</b>	Amberlite
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada.	<b>J</b>	Constante de acoplamiento.
<b>DCC</b>	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida.	<b>kcal</b>	Kilocalorías.
<b>DBU</b>	1,8-diazabicyclo[5.4.0] undeca-7-eno.	<b>Kd</b>	Constante de disociación.
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina	<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio.
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamida.	<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de potasio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.	<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio

<b>KHMDS</b>	Bis (trimetilsilil) amida de potasio.	<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato ácido de potasio.	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub></b>	Nitrato de cerio y amonio.
<b>K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	Pirofosfato de potasio.	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>OH</b>	Hidróxido de amonio.
<b>LiAlH<sub>4</sub></b>	Hidruro de litio y aluminio.	<b>NiCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de níquel.
<b>LiTMP</b>	2,6,6-tetrametilpiperidida de litio.	<b>PDB</b>	Protein Data Bank.
<b>LiOH</b>	Hidróxido de litio.	<b>p.f.</b>	Punto de fusión.
<b>LDA</b>	Diisopropilamiduro de litio.	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno.
<b>Log P</b>	Coeficiente de partición agua/ <i>n</i> -octanol.	<b>ppm</b>	Partes por millón.
<b>m</b>	Señal multiplete.	<b>PMB</b>	4-metoxibenzil eter.
<b>mg</b>	Miligramos.	<b>PTZ</b>	Pentilentetrazol.
<b>mL</b>	Mililitros.	<b>Pd/C</b>	Paladio sobre carbono
<b>uL</b>	Microlitros.	<b>PLP</b>	Piridoxal 5-fosfato.
<b>mM</b>	Mili molar	<b>PMP</b>	Piridoxiamina 5-fosfato.
<b>min</b>	Minutos.	<b>q</b>	Señal cuarteto.
<b>MHz</b>	Megahertz.	<b>QSAR</b>	Relación cuantitativa estructura-actividad.
<b>mmol</b>	Milimol.	<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
<b>m/z</b>	Masa/carga	<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13.
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno.	<b>s</b>	Señal singulete.
<b>MsCl</b>	Cloruro de metansulfonilo.	<b>sa</b>	Señal ancha.
<b>MeOH</b>	Metanol.	<b>(S)-FEA</b>	(S)-Feniletilamina.
<b>Mg<sup>0</sup></b>	Magnesio metálico.	<b>SSDH</b>	Semialdehído succínico deshidrogenasa.
<b>Na<sup>0</sup></b>	Sodio metálico.	<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central.
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio.	<b>SOCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de tionilo.
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio.	<b>t</b>	Señal triple.
<b>NaIO<sub>4</sub></b>	Peryodato de sodio.	<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente.
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimida	<b>TBAF</b>	Fluoruro de tetra- <i>n</i> -butilamonio.
<b>NaCN</b>	Cianuro de sodio.	<b>TMS</b>	Tetrametilsilano.
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Azida de sodio	<b>TBAI</b>	Bromuro de tetra- <i>n</i> -butilamonio.
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	Borohidruro de sodio	<b>(t-Boc)<sub>2</sub>O</b>	Di- <i>tert</i> -butil dicarbonato.
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio.	<b><i>t</i>-BuOH</b>	Terbutanol
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio.	<b><i>t</i>-BuLi</b>	Tert-butillitio.
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de amonio.	<b>THF</b>	Tetrahidrofurano.

<b>TMSCI</b>	Clorurotrimetilsilano.
<b>TMSOTf</b>	Trimetilsilil trifluorometaesulfonato.
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>VGAT</b>	Neurotransmisor vesicular transportador.
<b>VGB</b>	Vigabatrina.
<b>VPA</b>	Valproato de sodio.
<b>Zn<sup>0</sup></b>	Zinc metálico.
<b>Zn(CN)<sub>2</sub></b>	Cianuro de zinc.
<b>δ</b>	Desplazamiento químico.

## Índice de compuestos sintetizados





## INTRODUCCIÓN

Actualmente, se estima que 47 millones de personas sufren trastornos demenciales a nivel mundial, esta cifra equivale al número de personas de la población actual española y a la tercera parte de la población mexicana. Se estima que este número pase a más de 131 millones para el 2050, a medida que la población envejezca. Los costos mundiales de las implicaciones de esta enfermedad se estiman en \$818 mil millones de dólares.<sup>1,2</sup>

Otro trastorno neurológico preocupante es el mal de Parkinson, se estima que de 7 a 10 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad y se espera que la prevalencia por encima de los 50 años se duplique para 2030, a su vez, se estima que 1 millón de estadounidenses padecen la enfermedad de Parkinson, con 60,000 nuevos casos diagnosticados cada año.<sup>3</sup>

En México, el Estudio Mexicano de Salud y Envejecimiento (MHAS) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT), en un estudio prospectivo de panel de envejecimiento y salud, encontraron que la prevalencia de demencia es del 6.1 por ciento en la población de 60 años o más, con una tasa de incidencia estimada de 27.3 por cada 1000 personas. Además de que la hipertensión, la diabetes y la depresión son factores de riesgo. Las estimaciones de la encuesta ENSANUT 2012 mostraron una prevalencia de demencia del 7.9 por ciento.<sup>1</sup>

Se ha estimado una prevalencia de 7.4 por ciento en áreas urbanas y 7.3 por ciento en áreas rurales, similar a las estimaciones de ENSANUT 2012, y una incidencia de 30.4 por cada 1,000 personas. El World Alzheimer Report estimó que en 2015 había un poco más de 800,000 personas con Alzheimer y otros trastornos neurológicos en México, y de estas, el 64% eran mujeres. Para el 2030, se estima que el número de personas se eleve a 1.5 millones.<sup>1</sup>

Por otra parte, cabe destacar que tan solo en Estados Unidos el sector salud estima que 2.5 millones de personas son tratadas por epilepsia<sup>4</sup>, y que cada año se diagnostican alrededor de 150,000 casos nuevos y otros más permanecen sin diagnosticar.<sup>5</sup>



La gran mayoría de las personas con este tipo de padecimientos no han recibido un diagnóstico, y por lo tanto son incapaces de acceder a la atención y el tratamiento adecuado, incluso cuando se diagnostica la enfermedad, la atención médica brindada a menudo es deficiente, descoordinada e insensible a las necesidades de las personas que viven con demencia, sus cuidadores y sus familias.

Una característica común de estas enfermedades se relaciona estrechamente con la concentración del GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) siendo el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central y responsable de los procesos de regulación fisiológica presente en los seres humanos. Cuando los niveles de este neurotransmisor disminuyen, se presentan algunos de los trastornos neurológicos ya descritos. Actualmente, la clínica dispone de algunos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades, algunos de ellos a través de un mecanismo de acción que logra incrementar los niveles de GABA. Aun así, los fármacos disponibles son muy limitados por lo que cada año cientos de moléculas son sintetizadas y evaluados para este objetivo.

En el presente proyecto de investigación se desarrolló la síntesis, evaluación *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de nuevos análogos heterocíclicos de GABA. Los análogos diseñados se dividieron en dos series (A y B) y se mantuvo el grupo farmacóforo de GABA en donde el átomo de nitrógeno en la posición  $\gamma$  forma parte de sistemas heterocíclicos tales como; tiazolidina, piperidina, piperidinas sustituidas con los grupos metilo, morfolina y tiomorfolina.

Los análogos en la serie A contienen la estructura del GABA sin sustituyentes en las posiciones  $\alpha$  o  $\beta$ . Sin embargo, la serie B incluye un sustituyente *i*-butilo o *p*-Cl-fenilo en la posición  $\beta$  en analogía con la pregabalina y baclofen con la finalidad de incrementar su carácter lipófilo.

Contrariamente a lo que sucede en el caso de los análogos de GABA con grupos amino primarios que les permiten reaccionar con el grupo aldehído de la coenzima Piridoxal 5-fosfato (PLP) de la enzima GABA-AT, la inclusión del átomo de nitrógeno en estos sistemas heterocíclicos no aromáticos los convierte en aminas terciarias con mayor basicidad ( $pK_b \sim 4.2$ ). Esta basicidad incrementada puede favorecer la transferencia del protón del ácido carboxílico a los átomos de nitrógeno de los sistemas heterocíclicos para generar especies

zwitteriónicas que pueden facilitar su interacción de una manera no covalente, con la enzima GABA-AT.

Todos los compuestos diseñados en este trabajo cumplen con la regla de Lipinski de cinco para predecir su probabilidad de convertirse en un pre-fármaco.

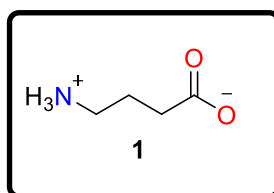
El trabajo previo de nuestro laboratorio ha demostrado que estas modificaciones estructurales conducen a compuestos con actividad inhibidora de la GABA-AT. También se llevó a cabo la determinación del potencial inhibitorio *in vitro* sobre la enzima GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens*, el estudio *in vivo* de uno de los compuestos que resultó mostrar actividad inhibitoria, así como los estudios de acoplamiento molecular y de relación cuantitativa estructura-actividad para explicar su actividad inhibitoria sobre la enzima de GABA-AT.

Además, también llevamos a cabo un estudio de acoplamiento molecular sobre una enzima GABA-AT humana modelada por homología para identificar compuestos como posibles candidatos para futuros estudios *in vivo*.

## ANTECEDENTES

### 1. Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

Los dos mayores neurotransmisores involucrados en la regulación de la actividad neuronal en los seres vivos son el ácido  $\gamma$ -aminobutírico **1** (GABA), un neurotransmisor inhibitorio y el ácido L-glutámico, un neurotransmisor excitatorio.<sup>6</sup> La disminución de los niveles de GABA está asociada a un gran conjunto de trastornos psiquiátricos y neurológicos tales como epilepsia<sup>7</sup>, mal de Parkinson<sup>8</sup>, Alzheimer<sup>9</sup> y enfermedad de Huntington<sup>10</sup>. Sin embargo, la administración de GABA como terapia farmacológica no es posible debido a su deficiente capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica asociado a su hidrofobicidad.

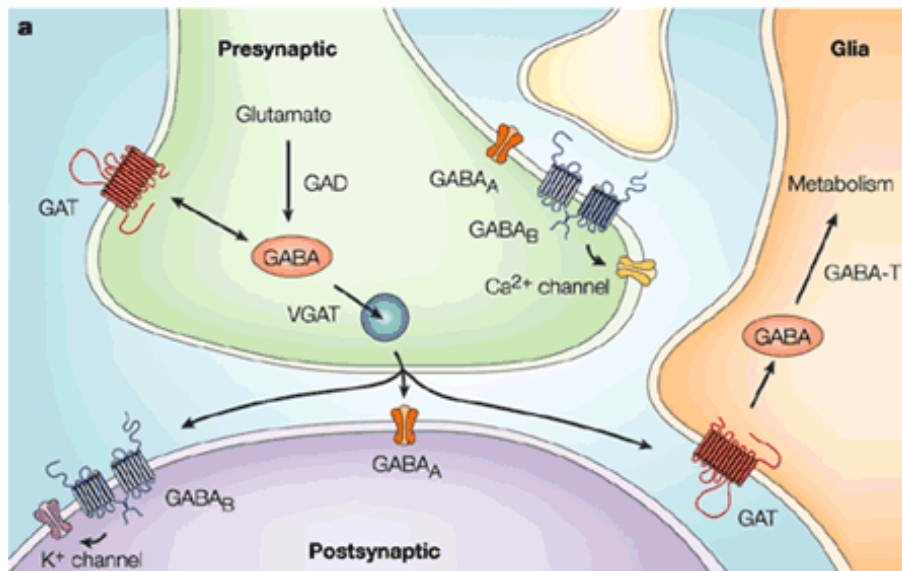


El ácido  $\gamma$ -aminobutírico se encuentra ampliamente distribuido a través del sistema nervioso central (SNC). Las concentraciones altas y distribución de GABA en el cerebro y la médula espinal sugieren un papel importante en la modulación de la mayoría de las funciones del SNC. Este concepto se apoya por el hecho de que los agonistas y antagonistas del receptor GABA muestran una amplia gama de efectos farmacológicos, incluyendo ansiólisis, hipnosis, relajación muscular, amnesia, mejora cognitiva, estimulante, y actividades anticonvulsivantes.<sup>11</sup>

Por esta razón, numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de generar año con año miles de moléculas que son sintetizadas y evaluadas como candidatos a fármacos en el tratamiento de estos trastornos neurológicos. En este contexto, la síntesis de análogos del neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico **1** (GABA) es tema de investigación por su potencial terapéutico. Dentro de la literatura se ha reportado una gran variedad de análogos de GABA y de algunos de los fármacos más representativos que son análogos estructurales de este neurotransmisor.

1.1. Síntesis y metabolismo de GABA.

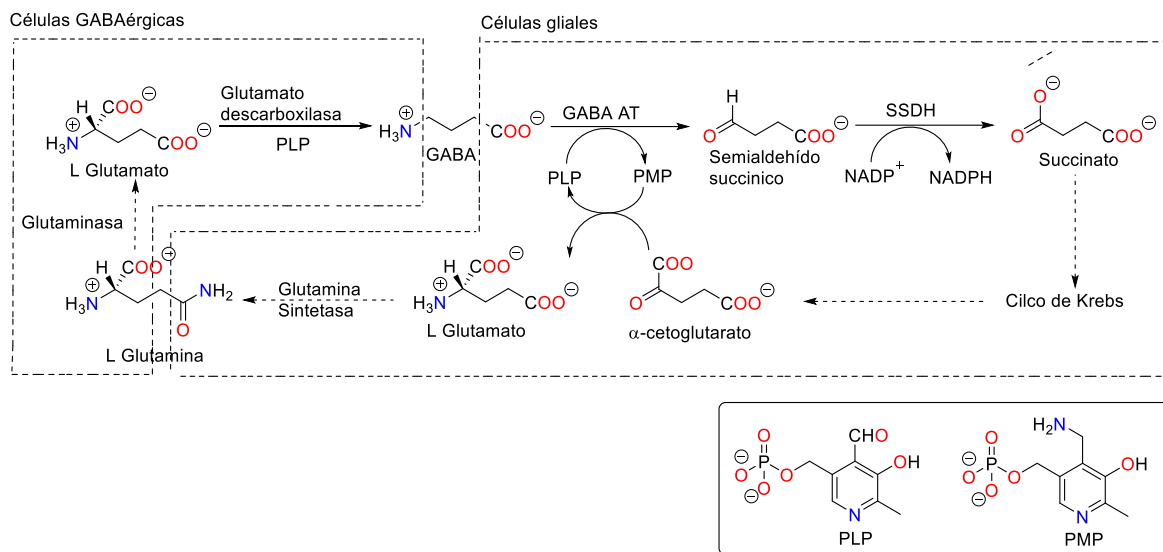
El GABA se sintetiza a nivel biológico en diferentes sitios a partir de la  $\alpha$ -descarboxilación del ácido L-glutámico en una reacción catalizada por dos enzimas ácido glutámico descarboxilasa (GAD65 y GAD67), es almacenado dentro de las vesículas sinápticas por neurotransportador vesicular del GABA y es liberado a las terminales nerviosas por exocitosis dependiente de calcio. Al igual que ocurre con otros neurotransmisores el GABA es recaptado por las neuronas circundantes y las células gliales se produce a través de la actividad de proteínas transportadoras de GABA (GATs)<sup>12</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Ruta de síntesis y metabolismo de GABA a nivel neuronal.

Continuando con su ciclo, el GABA es metabolizado por una reacción de transaminación catalizada por la GABA aminotransferasa (GABA-AT) en presencia de la coenzima piridoxal 5-fosfato (PLP por sus siglas en inglés) generando semialdehído succínico, que por acción de la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa (SSDH) se transforma en ácido succínico, un sustrato importante en el ciclo de Krebs, y posteriormente en  $\alpha$ -cetoglutarato. La degradación del GABA a semialdehído succínico convierte la coenzima piridoxal 5-fosfato (PLP) a piridoxiamina 5-fosfato (PMP).<sup>13</sup>

Finalmente, se regenera el glutamato a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato por acción de la coenzima piridoxiamina 5-fosfato (PMP), comenzando un nuevo proceso cíclico (Esquema 1).



**Esquema 1.** Ruta bioquímica de síntesis y metabolismo de GABA.

### 1.2 Receptores GABA.

Los receptores a GABA se encuentran en los sitios pre- y post-sinápticos, se han identificado tres tipos de receptores;  $\text{GABA}_A$ ,  $\text{GABA}_B$  y  $\text{GABA}_C$ . El receptor  $\text{GABA}_A$  situado generalmente postsinápticamente, a nivel de la membrana plasmática, dendritas o segmento inicial del axón, forma parte de una familia de receptores ionotrópicos. Es un canal de cloruro activado por ligando. Es el receptor GABA más abundante e interviene en los procesos rápidos de transmisión de tipo inhibitorio que conducen a la reducción de la excitabilidad de la membrana celular. Estructuralmente se trata de una glucoproteína formada por cinco subunidades polipeptídicas. El receptor  $\text{GABA}_A$  puede ser modulado alostéricamente por dos importantes fármacos; las benzodiazepinas y los barbitúricos.<sup>14</sup>

Los receptores  $\text{GABA}_B$  son receptores metabotrópicos. Se tratan de un receptor acoplado a proteínas G, cuya activación da lugar a una inhibición de la adenililciclasa, a la inhibición presináptica por supresión del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y reducción de la liberación del neurotransmisor, e inhibición postsináptica por activación de las corrientes de  $\text{K}^+$  que conducen a la hiperpolarización de la membrana celular.

Los receptores  $\text{GABA}_C$  están compuestos por cinco subunidades  $\rho$  que se ensamblan en un complejo de proteínas pentaméricas para formar un canal de cloruro en su centro, muestra distintas propiedades eléctricas (sus corrientes son más pequeñas) en comparación con los receptores  $\text{GABA}_A$ .

Los receptores GABA<sub>C</sub> tienen una mayor sensibilidad para GABA. Son insensibles a los moduladores del receptor GABA<sub>A</sub>, como los barbitúricos, las benzodiazepinas, así como a la bicuculina, y no son activados por el agonista del receptor de GABA<sub>B</sub> baclofeno.<sup>15</sup>

### 1.3. Trastornos neurológicos asociados a la deficiencia de GABA.

La deficiencia del GABA en seres humanos se asocia a severos trastornos de tipo neurológico como lo es el Alzheimer<sup>9</sup>, enfermedad que causa discapacidad de memoria y demencia, caracterizada por un declive progresivo de la memoria y funciones cognitivas, lo que repercute no solo a la persona que la padece, sino a la familia total. Por otro lado, la enfermedad de Parkinson<sup>8</sup> es un trastorno neurodegenerativo progresivo, que se caracteriza por síntomas motores como temblor, rigidez, lentitud de movimiento y problemas al caminar. Los síntomas motores a menudo van acompañados de fatiga, depresión, dolor y problemas cognitivos.<sup>3</sup>

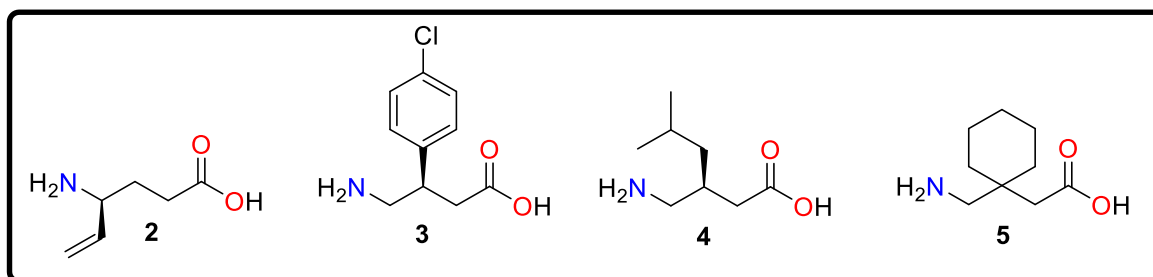
Bajo la misma directriz, la epilepsia<sup>7</sup> (condición neurológica caracterizada por convulsiones recurrentes no provocadas) y trastornos de tipo psiquiátrico como la depresión y la ansiedad, han sido atribuidos a una deficiencia de GABA.

## 2. Análogos de GABA reportados en la literatura.

### 2.1. Análogos de GABA comercializados: farmacoterapia.

Los niveles de GABA no pueden ser incrementados por administración directa de la misma, debido a su bajo grado de lipofilicidad, misma que representa su deficiente capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE)<sup>16</sup>. En consecuencia, se ha originado una extensa investigación en la síntesis y aplicación clínica de análogos de GABA con mayor carácter lipofílico capaces de cruzar la BHE e inhibir la GABA-aminotransferasa (GABA-AT), la enzima que degrada al GABA.<sup>17</sup>

En este sentido, algunos análogos de GABA y que son análogos de  $\gamma$ -aminoácidos han alcanzado el estatus terapéutico para el tratamiento de los trastornos neurológicos descritos previamente, ejemplo de ellos son la vigabatrina **2**, baclofen **3**, pregabalina **4** y gabapentina **5**<sup>18</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Vigabatrina **2**, baclofen **3**, pregabalina **4** y gabapentina **5**.

El ácido (*S*)-4-amino-5-hexenoico ( $\gamma$ -vinil GABA, vigabatrina) **2**, un análogo sintético del GABA, es un importante medicamento anticonvulsivo comercializado en forma racémica como Sabril®. No obstante, sólo el enantiómero (*S*) es el farmacológicamente activo<sup>19</sup> como inhibidor irreversible y selectivo de la GABA-AT, es empleado en casos en donde los antiepilépticos usuales son ineficaces.<sup>20</sup>

Desafortunadamente, el tratamiento con vigabatrina **2** tiene el potencial de tener efectos secundarios, alrededor de 25-50% de pacientes suelen exhibir anomalías irreversibles en la visión periférica luego de una administración crónica<sup>21</sup>, además de presentar una baja permeabilidad hacia la BHE, lo que requiere dosis que van de 1-3 g/día, dejando una clara necesidad por buscar mejores inactivadores de GABA-AT.

El ácido (*R*)-4-amino-3-(*p*-clorofenil) butírico (baclofen) **3** fue el primer agonista de los receptores GABA<sub>B</sub> y fue diseñado originalmente como un análogo lipofílico de GABA con una afinidad hacia la barrera hematoencefálica.<sup>22</sup> El baclofen **3** es comercializado en forma racémica como Lioresal®<sup>23</sup> o Bación®; sin embargo, diversos reportes de la literatura sugieren que la actividad biológica de **3** reside mayoritariamente en el enantiómero (*R*).<sup>23, 24</sup>

Baclofen está prescrito como relajante muscular, agente en el tratamiento de la espasticidad en la esclerosis múltiple (vía oral), desórdenes espásticos de origen cerebral y para la neuralgia del trigémino (vía intratecal). Los efectos secundarios que puede ocasionar este fármaco son somnolencia, mareos, debilidad, confusión, malestar estomacal, dificultad para respirar y crisis convulsivas.

El ácido (*S*)-3-aminometil-5-metilhexanoico (pregabalina) **4**, es un potente anticonvulsivo relacionado con la actividad neurotransmisora del GABA<sup>18</sup> cuya actividad biológica reside en el enantiómero (*S*).<sup>25</sup> La (*S*)-pregabalina está indicada en el tratamiento de epilepsia, dolor

neuropático y trastornos generalizados de ansiedad.<sup>26</sup> La pregabalina causa efectos adversos como reacciones alérgicas graves a mortales, pensamientos o actos suicidas, hinchazón de manos, piernas y pies, mareos y somnolencia.

La gabapentina **5** (Neurontin), es un análogo aquiral de GABA, es empleado para el tratamiento de desórdenes cerebrales, epilepsia, síndrome de piernas inquietas y principalmente en el tratamiento del dolor neuropático periférico.<sup>27</sup>

## 2.2. Diseño de análogos de GABA.

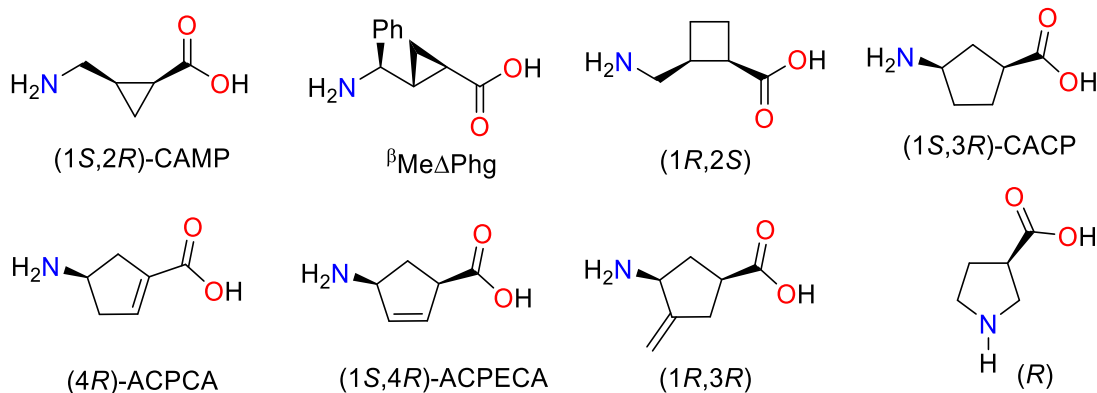
Dentro de la literatura se han reportado la preparación de una gran variedad de análogos de GABA y  $\gamma$ -aminoácidos,<sup>28,29</sup> en la búsqueda de agonistas/antagonistas mejorados, o para modular el metabolismo de GABA. En particular, se han usado análogos conformacionalmente restringidos, en un intento de evaluar la unión óptima de GABA a sus receptores.

En este sentido, diversos grupos de investigación han propuesto una diversidad de modificaciones a la estructura de GABA conservando el grupo farmacológico intacto, que resulta ser exactamente la misma estructura molecular de GABA y cuyas modificaciones contemplan reemplazos bioisostéricos,<sup>30</sup> análogos cíclicos y conformacionalmente restringidos<sup>31</sup> y sustituyentes heterocíclicos aromáticos en la posición  $\beta$  con respecto al grupo carbonilo.<sup>32</sup> Debido a que el GABA es una molécula con múltiples sitios a los que puede unirse, es de esperarse que los análogos actúen como agonistas, inhibidores de la captura de GABA o inhibidores de la degradación de GABA dependiendo del blanco farmacológico para el que fueron diseñados.

### 2.2.1. Análogos de GABA conformacionalmente restringidos.

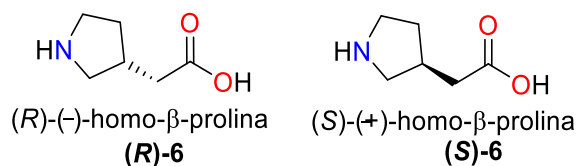
Los análogos cíclicos conformacionalmente restringidos de GABA han sido ampliamente estudiados,<sup>28,29</sup> descritos en una amplia variedad de publicaciones dentro de la literatura, diseñados como agonistas o antagonistas y con actividad terapéutica que muestran una interacción con los receptores de GABA. De forma general estos no presentan modificaciones del grupo amino libre, algunos ejemplos de ellos se muestran en la figura 3.





**Figura 3.** Estructuras de análogos de GABA, agonistas, agonistas parciales y antagonistas con efectos en los receptores de GABA.

En 1990, Krogsgaard-Larsen *et al*<sup>33</sup> reportaron la síntesis de análogos de GABA conformacionalmente restringidos, en donde el grupo amino forma parte de un heterociclo (Figura 4). Adicionalmente, Krogsgaard-Larsen llevó a cabo estudios *in vitro* de la afinidad de dichos compuestos a los receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>.

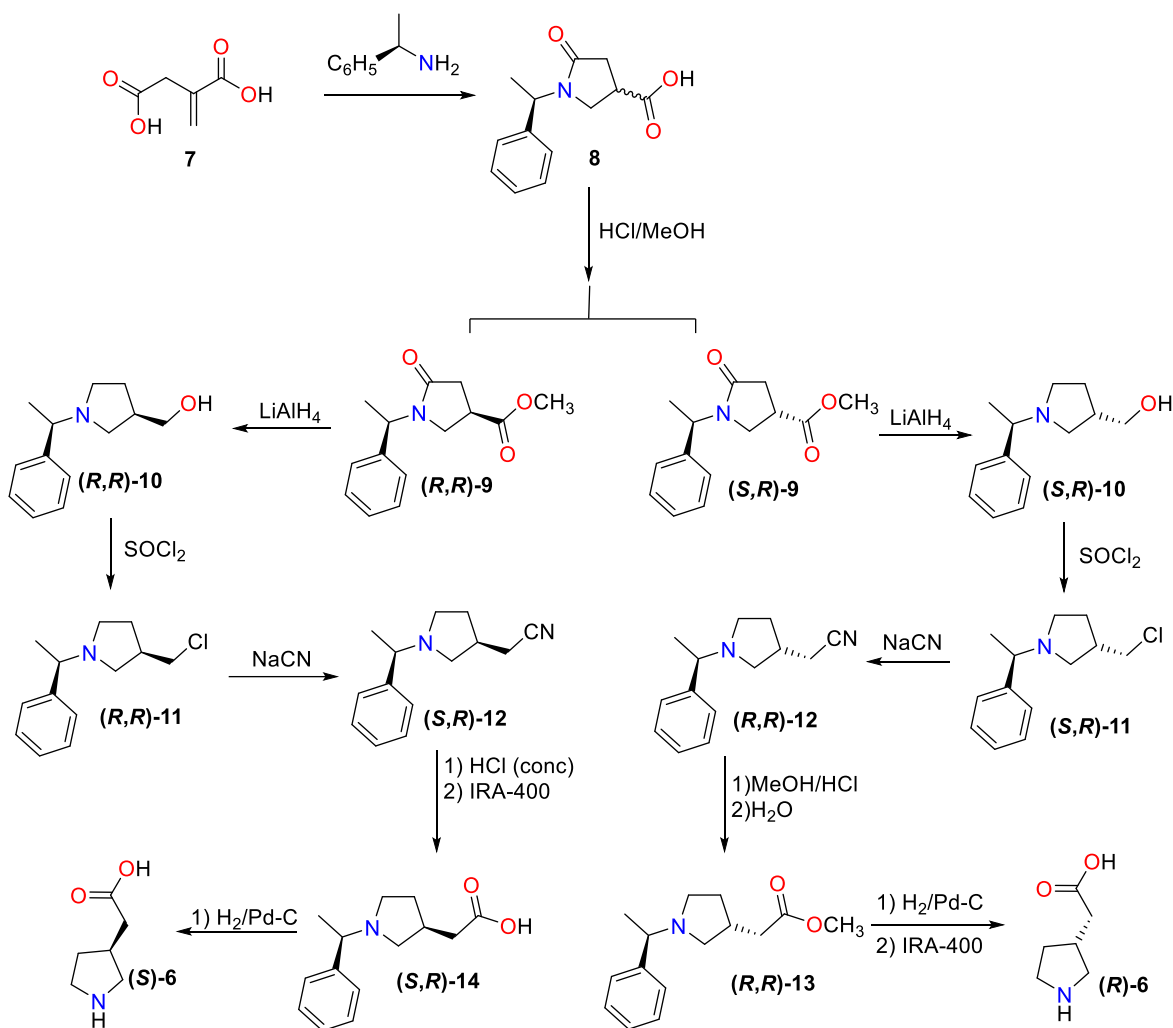


**Figura 4.** Análogos de GABA reportados por Krogsgaard-Larsen.

La síntesis de los análogos cíclicos de GABA (R)-6 y (S)-6 se realizó por la adición conjugada de (R)-1-fenil-etilamina al ácido itacónico 7 y una subsecuente ciclización, generando la mezcla diastereomérica de ésteres (S,R) y (R,R)-9, mismos que se transformaron a ésteres metílicos. Después de su purificación, se realizó la reducción de (S,R) y (R,R)-9 con LiAlH<sub>4</sub>, obteniendo los aminonitrilos (S,R) y (R,R)-12 correspondientes después de dos pasos de reacción. El aminoácido (S,R)-14 fue preparado mediante un tratamiento ácido, seguido de una hidrogenólisis para su desprotección y obtención de (S)-6. La transformación de (R,R)-12 a (R)-6 fue llevada a cabo por la desprotección mediante hidrogenación catalítica e hidrólisis para generar el análogo (R)-6 (Esquema 2).

La moderada afinidad de la mezcla al receptor GABA<sub>B</sub> se debe exclusivamente al enantiómero (S)-6. Además, se encontró que ambos enantiómeros interactúan con el GABA<sub>A</sub>.

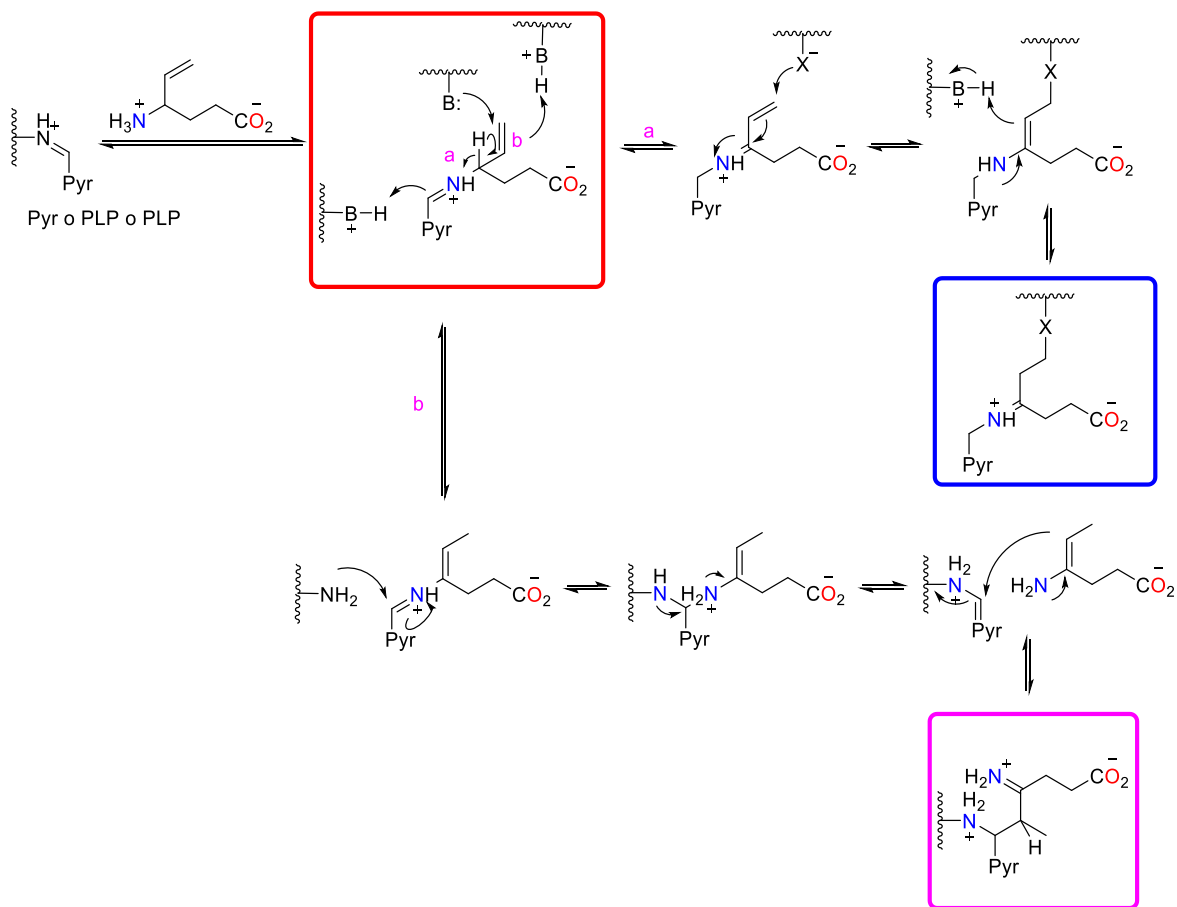
La potencia del enantiómero (*R*)-**6** es mayor que la de (*S*)-**6** por más de un orden de magnitud, mostrando una afinidad comparable a la unión de GABA.



**Esquema 2.** Síntesis de (*R*)-(-) y (*S*)-(+)-homo-β-prolina como agonistas de GABA.

2.2.2. Diseño de análogos de GABA conformacionalmente restringidos como inhibidores de GABA-AT.

El diseño de análogos de GABA conformacionalmente restringidos se ha caracterizado por no realizar modificaciones en el grupo amino libre, debido al importante papel que presenta dentro del mecanismo de inhibición de la GABA-AT. La elucidación de este mecanismo fue descrito por Silverman *et al*<sup>34</sup> en 1991 (Esquema 3), demostrando la inhibición de la GABA-AT por acción de vigabatrina **2**, esto ha sido ampliamente aprovechado en el diseño de nuevos inhibidores de GABA-AT.

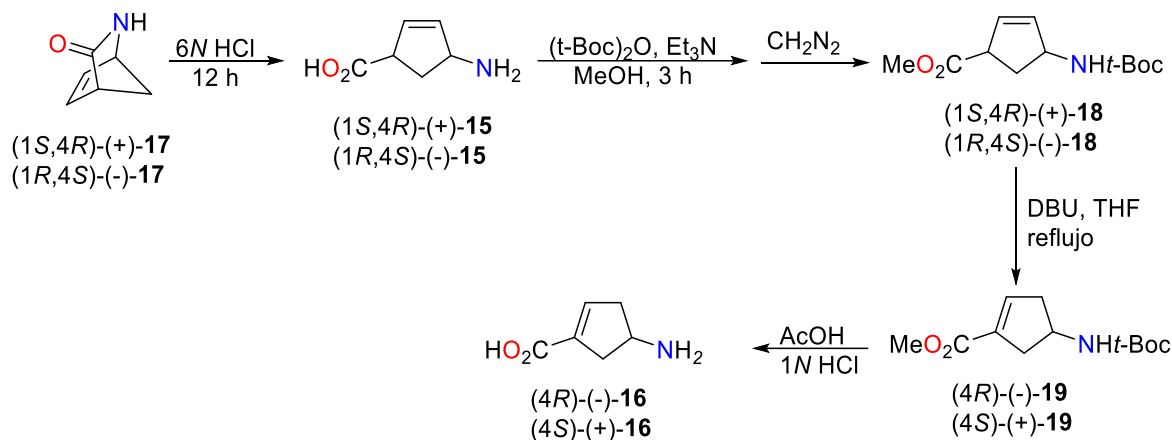


**Esquema 3.** Mecanismo de inhibición de GABA-AT por acción de vigabatrina **2**.<sup>34</sup>

Silverman demostró que la vigabatrina **2** inactiva la GABA-AT mediante dos mecanismos principales: un mecanismo de adición de Michael (*a*) y un mecanismo vía enamina (*b*).<sup>34</sup> Estas dos vías se producen por desprotonación del carbono- $\gamma$  seguido de la tautomerización a través del anillo PLP (*a*, que conduce a la adición de Michael) o tautomerización a través del doble enlace de vinilo (*b*, que conduce a la formación de enamina).

Con la finalidad de inhibir una de las tautomerizaciones posibles e incrementar la otra, Silverman *et al*<sup>35</sup> reportó la síntesis de una serie de análogos de ciclopentano de GABA (**15-16**) y evaluó su actividad frente a la GABA-AT, estos análogos previamente habían demostrado ser excelentes miméticos de GABA durante los estudios del receptor GABA<sub>A</sub> y la absorción de GABA.<sup>36</sup> Ninguno de estos análogos exhibió una inhibición dependiente del

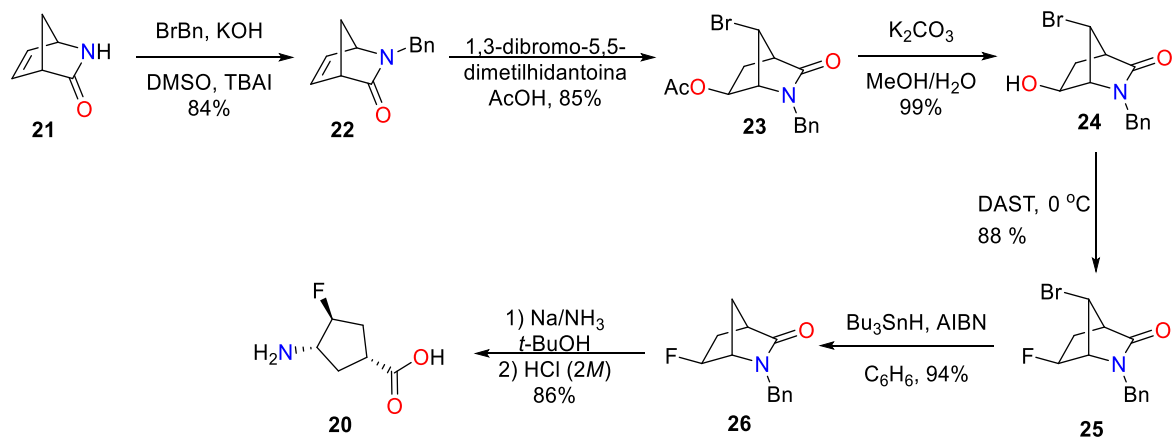
tiempo de GABA-AT; sin embargo, todos los análogos mostraron ser inhibidores competitivos, y los análogos (+)-**15**, (-)-**16** son buenos sustratos para GABA-AT.



**Esquema 4.** Síntesis de los análogos de ciclopentano de GABA **15** y **16**.

Los enantiómeros de **15** se sintetizaron mediante la hidrólisis ácida de las correspondientes lactamas enantiopuras **17** comercialmente disponibles (Esquema 4). Los enantiómeros de **16** se sintetizaron mediante protección con  $(t\text{-Boc})_2\text{O}$  de cada enantiómero de **15**, seguido de la esterificación, tratamiento con DBU y desprotección con HCl 1N para la obtención de **16**.

Silverman *et al*<sup>37</sup> diseñaron y sintetizaron una serie de análogos de ácidos 4-aminociclopentacarboxílicos como inhibidores de GABA-AT, ejemplo de este fue la síntesis del análogo **20** el cual fue un potente inactivador dependiente del tiempo de GABA-AT e inactivador irreversible de la misma.

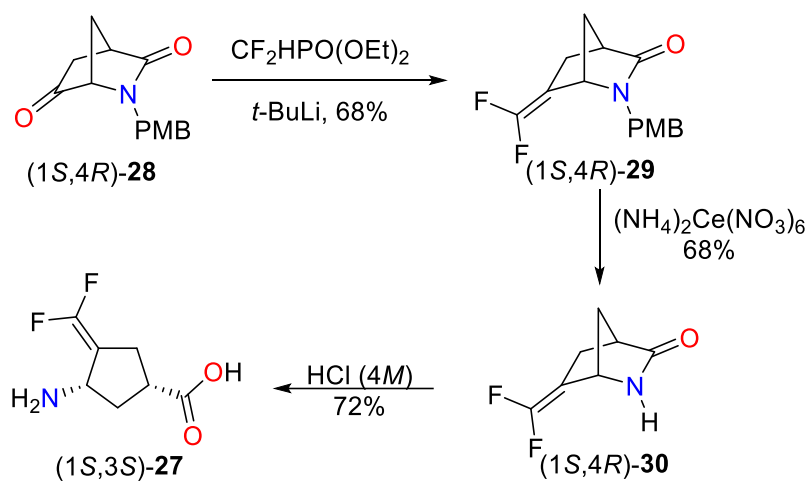


**Esquema 5.** Síntesis de análogo **20** conformacionalmente restringido.

La reacción de la lactama (1*R*,4*S*)-**21** comercialmente disponible con bromuro de bencilo (BrBn) en presencia de KOH generó la lactama bencilada **22** con 84% de rendimiento, que por tratamiento con 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína en ácido acético (AcOH) produjo el derivado de bromo **23** con 85% de rendimiento. La hidrólisis básica de **23** seguida de la fluoración con trifluoruro de (dietilamino) azufre (DAST) produjo **25** con 88% de rendimiento. La deshidrobrominación de **25** con hidruro de tributilestaño (Bu<sub>3</sub>SnH) en presencia de AIBN proporcionó la monofluorolactama **26** con un 94% de rendimiento, la reducción de Birch y subsecuente hidrólisis generó el análogo **20** con 86% de rendimiento (Esquema 5).

A partir de los estudios realizados con análogos conformacionalmente rígidos de vigabatrina **2** y ácidos 4-amino-5-halopentanoicos, parece que la restricción conformacional afecta la inactivación por un mecanismo de adición de Michael más que la inactivación por una vía enamina.<sup>37</sup>

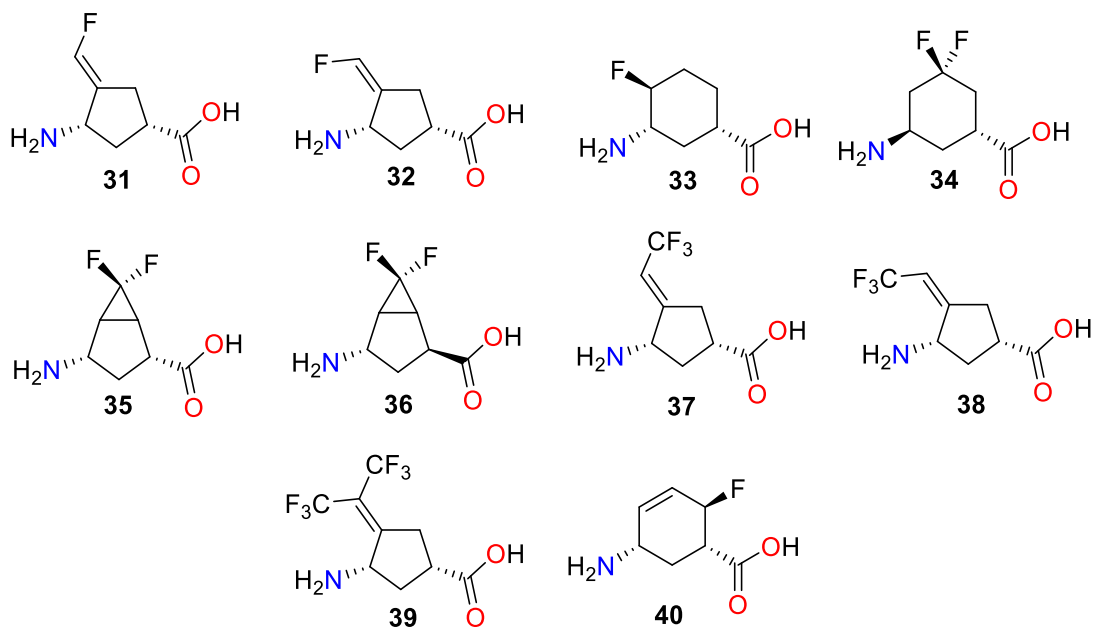
Continuando con el desarrollo de inhibidores conformacionalmente restringidos de GABA-AT, en 2003 Silverman *et al*<sup>38</sup> reportaron la síntesis del análogo difluoro-sustituido conformacionalmente restringido **27**, el cual resultó ser un inhibidor 186 veces más potente que vigabatrina **2** en experimentos *in vitro* y a una misma concentración en la inhibición de la enzima de GABA-AT. Bajo condiciones similares, el análogo **27** fue 52 veces más potente que vigabatrina **2**. La síntesis de **27** se muestra en el esquema 6.



**Esquema 6.** Síntesis de análogo **27** difluoro-sustituido conformacionalmente restringido.

La reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) del (1*S*,4*R*)-**28** enantioméricamente puro con el compuesto dietil (difluorometil) fosfonato genero el derivado de difluorometileno (1*S*,4*R*)-**29** con 68% de rendimiento. La desprotección del grupo *N*-*p*-metoxibencilo (PMB) de **29** con nitrato de cerio y amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>) condujo a lactama (1*S*,4*R*)-**30** con 68% de rendimiento, que por hidrólisis ácida produjo el aminoácido conformacionalmente restringido (1*S*,3*S*)-**27**, que demostró ser un inactivador más potente que vigabatrina **2**.

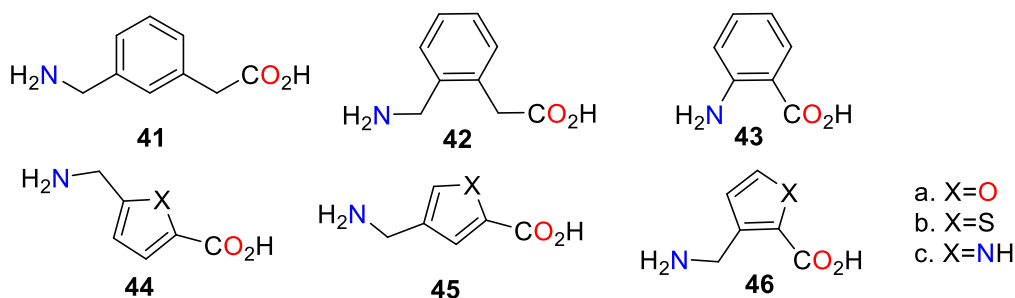
La potente actividad inhibitoria mostrada por **27** representó un área de aprovechamiento para Pan *et al*<sup>39</sup> quienes subsecuentemente continuaron reportando<sup>40</sup> el diseño y síntesis de análogos flourados<sup>41</sup> conformacionalmente restringidos similares a **27**<sup>42</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Estructuras de compuestos flourados conformacionalmente restringidos sintetizados por Pan *et al*<sup>39</sup>.

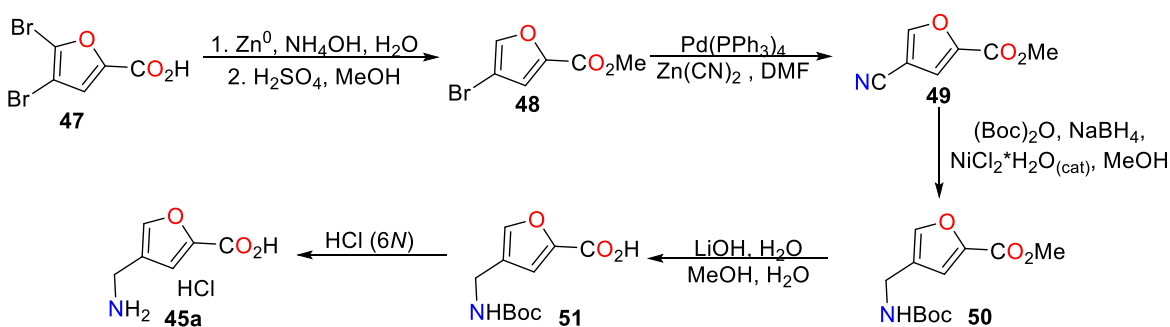
Los análogos **33** y **34** no mostraron actividad frente a la GABA-AT, los compuestos **35** y **36** fueron inhibidores reversibles débiles de la enzima GABA-AT,<sup>41</sup> por otra parte los compuestos **37** y **38** fueron inhibidores reversibles de GABA-AT, mientras que **39** resultó ser inhibidor débil, esto atribuido al segundo grupo de trifluorometilo.<sup>40</sup> El compuesto **40** demostró ser un inhibidor irreversible de la enzima. En general, se determinaron los mecanismos bajo los cuales estos compuestos inhiben a la GABA-AT, sin embargo, ninguno de los análogos flourados sintetizados mostró la potencia del compuesto **27**.

En la búsqueda de nuevos análogos, Silverman *et al*<sup>43</sup> en 2012 continuaron reportando la síntesis y evaluación de una serie de compuestos aromáticos y heteroaromáticos<sup>32</sup> como inhibidores de GABA-AT (Figura 6). Los compuestos **41** y **42** resultaron ser inhibidores competitivos débiles de la enzima, el compuesto **43** no mostró actividad inhibitoria, esto se atribuye a la carencia de un H adyacente al grupo amino que sea capaz de iniciar el mecanismo de inhibición.



**Figura 6.** Estructuras aromáticas y heteroaromáticos reportadas por Silverman *et al*.

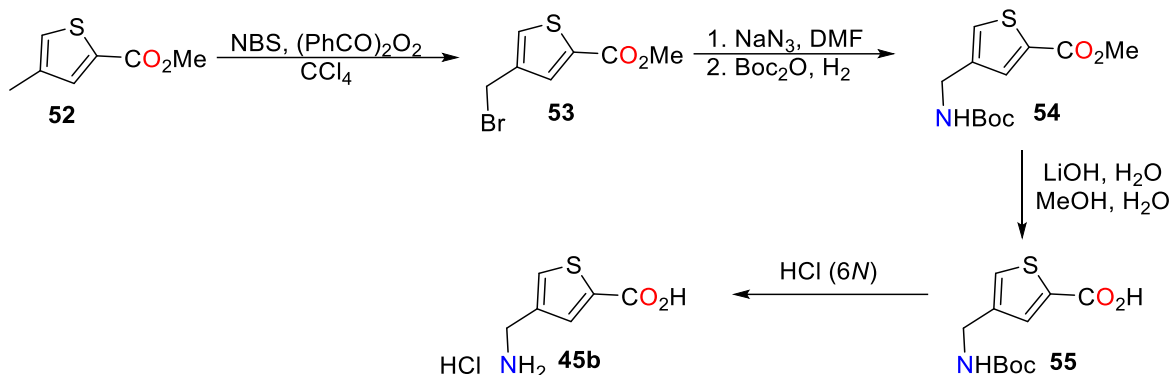
Los compuestos **44a** y **44b** son comercialmente disponibles, sin embargo, los compuestos **45a** (Esquema 7) y **45b** (Esquema 8) fueron sintetizados. La síntesis de **45a** comenzó con ácido 4,5-dibromofuran-2-carboxílico **47**. La deshalogenación selectiva de **47** utilizando zinc metálico, seguido de esterificación, proporcionó **48** con buen rendimiento. La cianación catalizada por paladio de **48** generó el nitrilo **49**, que luego se redujo y protegió con Boc para producir **50**. La saponificación del éster seguida de la desprotección del grupo Boc de **50** dio el compuesto **45a** como la sal de hidrocloreuro.



**Esquema 7.** Síntesis del compuesto **45a**.

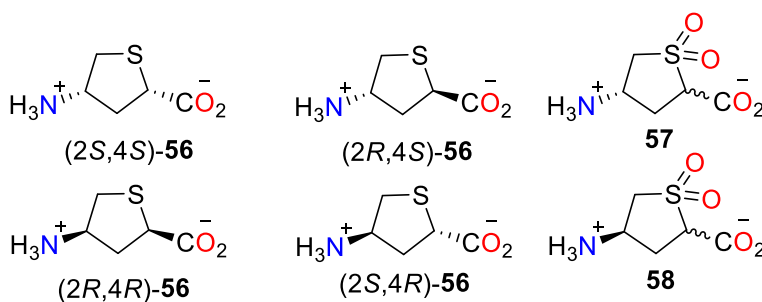
El compuesto **45b** se sintetizó a partir del éster 4-metiltiofeno-2-carboxilato de metilo **52**. La bromación radicalaria de **52** proporcionó el compuesto **53** con buen rendimiento. El

desplazamiento del bromuro por la azida seguida de la hidrogenación catalítica y protección con Boc generó **54**. La saponificación del éster, seguida de la desprotección del grupo Boc produjo el compuesto **45b** como la sal de hidrocioruro.



**Esquema 8.** Síntesis del compuesto **45b**.

De manera general los compuestos **44-46** mostraron ser inhibidores competitivos de la enzima. Posteriormente, el mismo grupo de investigación reportó la síntesis de análogos conformacionalmente restringidos que incluyen en su estructura un núcleo de tetrahidrotiofeno<sup>44</sup> (Figura 7) en la inactivación de la GABA-AT.



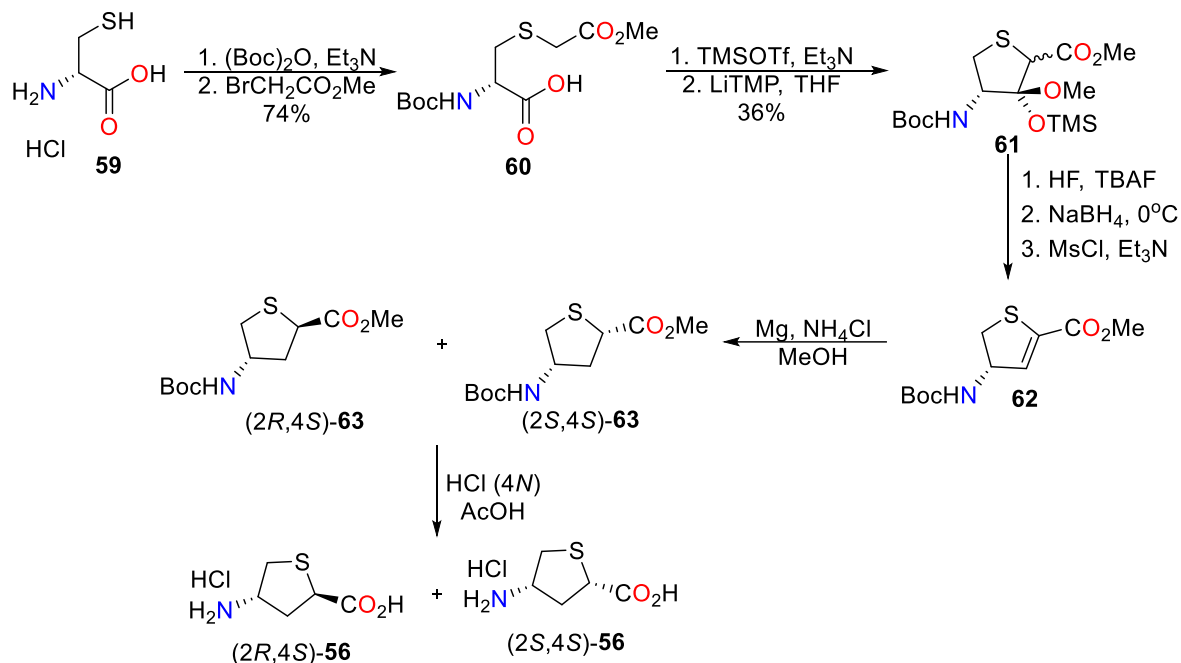
**Figura 7.** Análogos de GABA con núcleo de tetrahidrotiofeno.

Los compuestos (2*S*,4*S*)-**56** y (2*R*,4*S*)-**56** se sintetizaron a partir del éster metílico de la (*R*)-cisteína comercialmente disponible **59** con (Boc)<sub>2</sub>O, seguido de la reacción con bromoacetato de etilo, que produjo el tioéter (*R*)-**60** con 74% de rendimiento, la reacción de TMSOTf/ Et<sub>3</sub>N y posterior tratamiento con el 2,2,6,6-tetrametilpiperidida de litio (LiTMP)/THF proporcionó el compuesto (3*R*, 4*R*)-**61** con 36% de rendimiento. La escisión del enlace O-TMS en (3*R*,4*R*)-**61** con HF/TBAF seguido de la reacción con MsCl/Et<sub>3</sub>N, generó el dihidrotiofeno



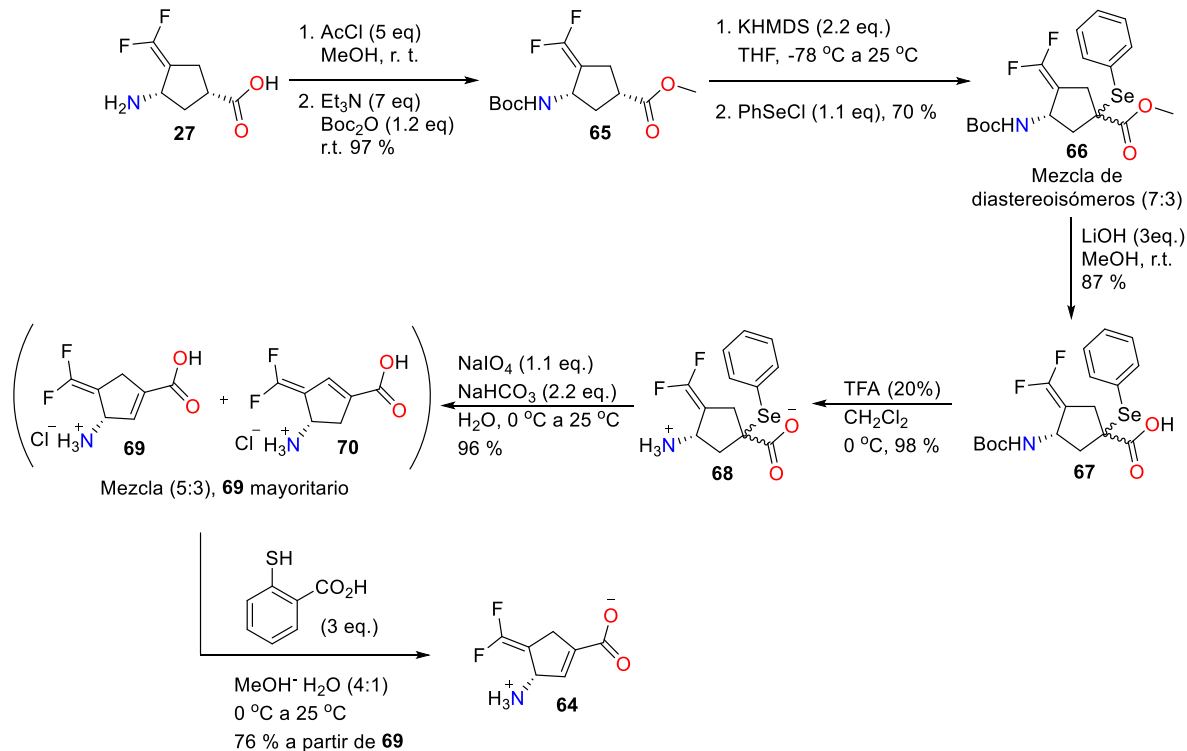
(*S*)-**62**, que por hidrogenación del doble enlace con magnesio en metanol, generó los derivados de tiofeno (*2S,4S*)-**63** y (*2R,4S*)-**63** en 25% y 32% de rendimiento respectivamente.

Finalmente, la desprotección del grupo amino y la hidrólisis del grupo éster en (*2S,4S*)-**63** y (*2R,4S*)-**63** con HCl (4*N*) y AcOH, generó los ácidos 4-aminotetrahidrotiofeno-2-carboxílicos (*2S,4S*)-**56** y (*2R,4S*)-**56** con buen rendimiento, estos compuestos se evaluaron como inactivadores de la aminotransferasa (Esquema 9).



**Esquema 9.** Síntesis de los compuestos (*2S,4S*)-**56** y (*2R,4S*)-**56** derivados de tetrahidrotiofeno.

Recientemente Silverman<sup>45</sup> y colaboradores reportaron la síntesis del ácido (*S*)-3-amino-4-(difluorometileno)ciclopent-1-eno-1-carboxílico **64**, el cual mostró ser al menos 10 veces más efectivo en la inhibición de la GABA-AT que el compuesto **27**. Para esto los grupos ácido carboxílico y amino de **27** se protegieron para generar **65**, seguido de la selenación del carbono  $\alpha$  al grupo éster, dando como resultado una mezcla inseparable en proporción 7:3 de seleniuros diastereoméricos **66**. La eliminación de los grupos protectores de **66**, proporcionó el compuesto **68**; se encontró que la pureza de **68** era crucial para la pureza final de **64**. La eliminación oxidativa del grupo fenilselenilo en **68** bajo condiciones suaves dio una mezcla isomérica (5:3) de **69** y **70** (Esquema 10).

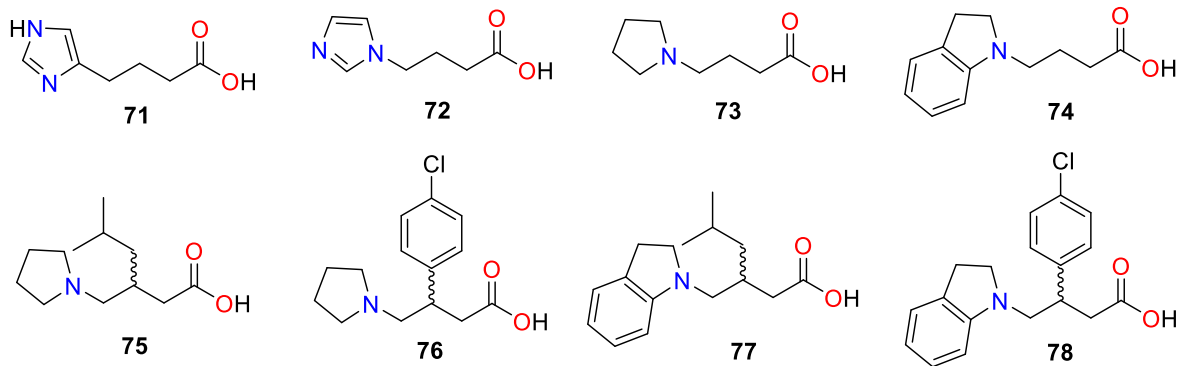


**Esquema 10.** Síntesis del compuesto **64** reportado por Silverman y colaboradores.

La separación de **69** y **70** por cromatografía resultó sin éxito, pero se descubrió en el proceso que **70** era mucho más reactivo que **69**. En consecuencia, se desarrolló con éxito una estrategia que implicaba la modificación selectiva y la eliminación de **70** más reactivo usando un nucleófilo de tiol blando (ácido 2-mercaptobenzoico) para la obtención de **64**.

### 2.2.3. Diseño, síntesis y evaluación de análogos de GABA en el grupo de investigación.

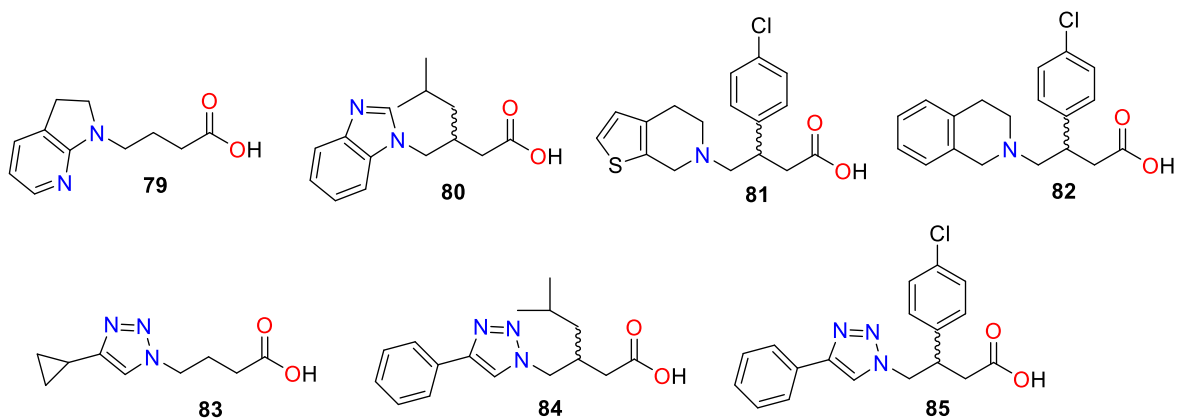
Los trabajos realizados dentro de nuestro grupo de investigación, se han orientado a la síntesis de análogos de GABA que presenten un mayor carácter lipofílico, por esto el átomo de nitrógeno forma parte de un sistema heterocíclico que mantiene una relación  $\gamma$  con respecto al ácido carboxílico, además de la adición de sustituyentes en la posición  $\beta$  en analogía a los sustituyentes presentes en baclofen **3** y pregabalina **4** (Figura 8).



**Figura 8.** Análogos estructurales de GABA **1** sintetizados dentro del grupo de investigación.

De manera general los análogos **71 - 78** han sido evaluados como inhibidores de la GABA-AT y comparados con VGB **2**, los análogos **75** y **76** mostraron un 35% y 32% de inhibición respectivamente, comparable con el control de VGB **2** (43%). El compuesto **75** fue sometido a pruebas de actividad biológica in vivo en un modelo de inducción de convulsiones con pentilentetrazol (PTZ). No se observó reducción en el grado de convulsiones a ninguna de las dosis administradas; sin embargo, se observó un aumento en el tiempo de latencia de 1.5 veces, comparable con el control positivo **2** a la dosis de 2 mmol/kg.<sup>46</sup> Los resultados generados fueron protegidos bajo solicitud de patente.<sup>47</sup>

Recientemente, el grupo de investigación ha incursionado en la síntesis de análogos heterocíclicos<sup>48</sup> de GABA y triazoles<sup>49</sup> como inhibidores de la GABA-AT (Figura 9).



**Figura 9.** Análogos heterocíclicos y de triazol sintetizados dentro del grupo de investigación.

## HIPOTESIS

Las estructuras moleculares análogas al ácido  $\gamma$ -aminobutírico que muestran actividad biológica presentan las siguientes características: 1) Tienen restricción en su conformación dado que el grupo amino se encuentra enlazado a una estructura cíclica. 2) El grupo amino es de tipo primario y en diversos casos se encuentra en su forma zwitteriónica lo cual favorece que sean capaces de actuar como inhibidores de la enzima de aminotransferasa de GABA de una manera irreversible. Además, cuando el grupo amino forma parte de una estructura cíclica se ha demostrado que actúan como agonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> y GABA.

A este respecto en nuestro grupo de investigación se ha estudiado la síntesis, y actividad biológica de análogos de GABA en los que el grupo amino también forma parte de un heterociclo de cinco miembros y se encontró que tienen actividad biológica inhibitoria significativa contra la enzima de GABA-AT. Este hallazgo fue muy importante ya que su mecanismo de acción tiene que ser distinto al de los inhibidores irreversibles. Por ello es de nuestro interés el diseño de nuevas estructuras moleculares que pueden darnos información sobre un mecanismo potencial de inhibición. Por lo que en este proyecto de tesis nos planteamos las siguientes hipótesis:

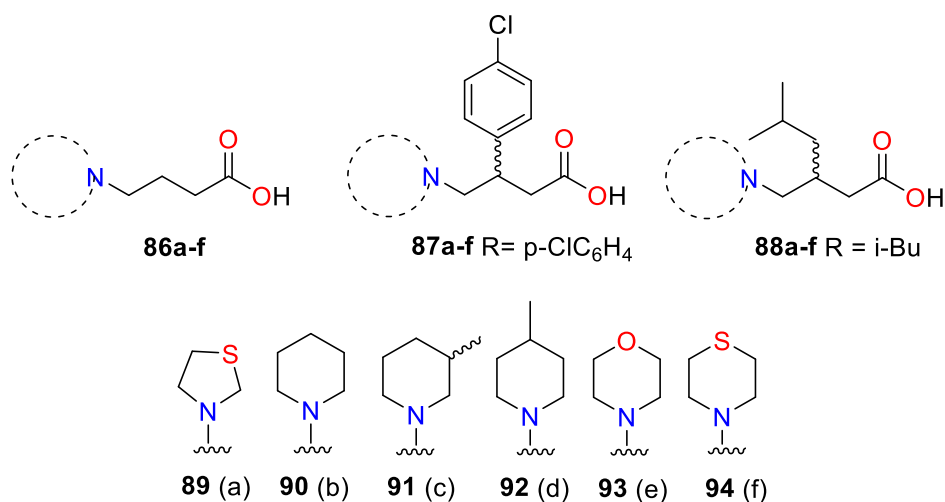
- a) Al incrementar el tamaño del anillo heterocíclico de cinco a seis miembros aumentará la libertad conformacional además de que debe incrementar la liposolubilidad de estos sustratos.
- b) Al introducir sustituyentes metilo en el anillo de seis miembros en las posiciones 3 y 4 la lipofilidad será favorecida la cual es muy importante para que atraviesen la barrera hematoencefálica.
- c) Al incorporar en los anillos de seis miembros los heteroátomos azufre y oxígeno en posición 4 los sustratos adquieren la posibilidad de actuar como bases, favoreciendo la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno.

Por estas modificaciones estructurales se podrían mejorar las interacciones supramoleculares entre las biomoléculas y nuestros análogos del ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Con estas hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

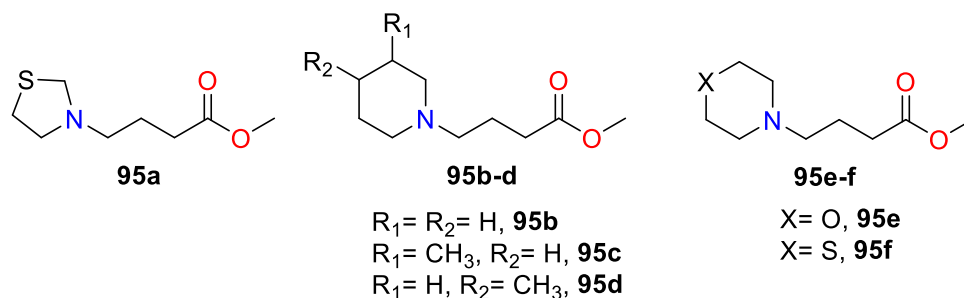
### 3.1. Objetivo general

Realizar el diseño, síntesis, caracterización y evaluación de la actividad biológica de análogos de GABA **1** (**86a-f**), (*R*)-baclofen **3** (**87a-f**) y (*S*)-pregabalina **4** (**88a-f**) en los cuales el átomo de nitrógeno forma parte de un sistema heterociclo y mantiene la posición ( $\gamma$ ) con respecto al grupo ácido carboxílico.

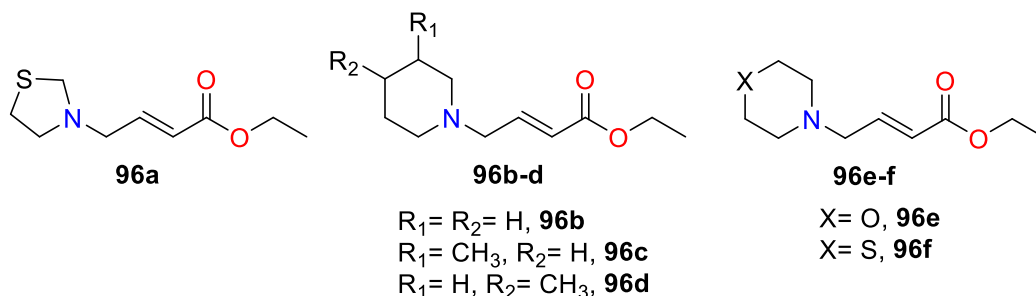


### 3.2. Específicos

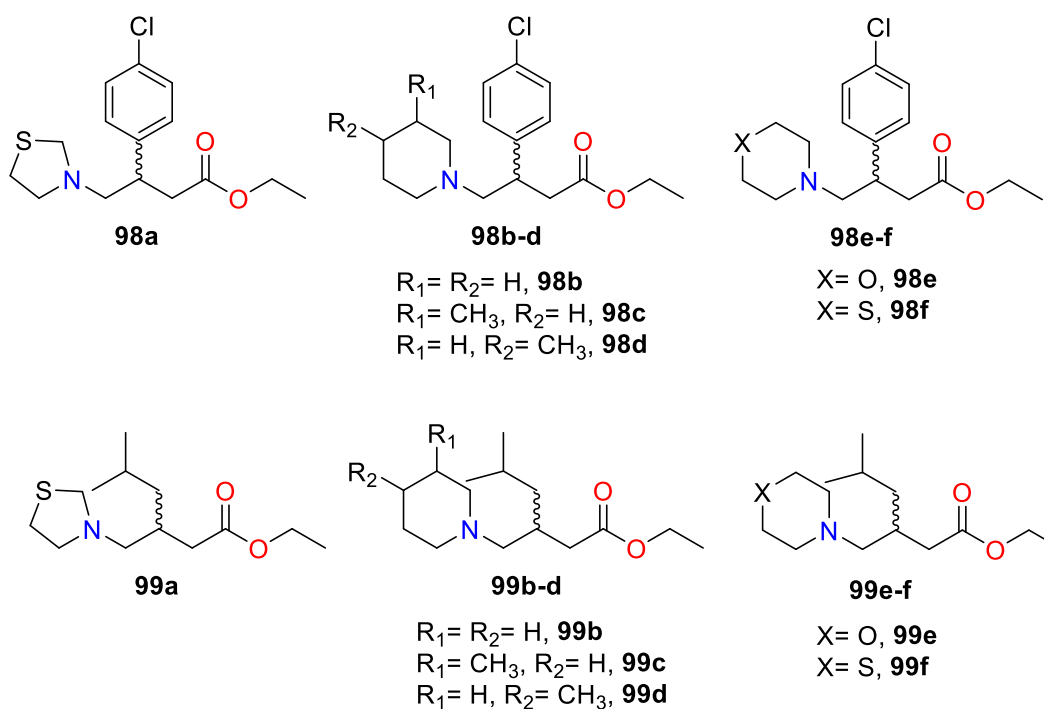
Síntesis de los precursores (**95a-f**) de los análogos estructurales de GABA **1** (**86a-f**).



Síntesis de sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados (**96a-f**) precursores de los análogos de baclofen **3** (**87a-f**) y de pregabalina **4** (**88a-f**), a través de la reacción de *N*-alquilación del 4-bromobutanoato de metilo **97** con los heterociclos seleccionados (**89-94**).



Síntesis de los precursores (**98a-f**) de baclofen **3** y (**99a-f**) de pregabalina **4** en su forma racémica mediante la reacción de adición conjugada 1,4 de cupratos de *i*-butilo y *p*-clorofenilo.



Realizar los estudios de inhibición enzimática *in vitro* de GABA-AT de los análogos de GABA **1** (**86a-f**), baclofen **3** (**87a-f**) y pregabalina **4** (**88a-f**) en forma racémica contra la GABA-AT en colaboración con el grupo de investigación del Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrer de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

En función de los resultados obtenidos de los estudios de inhibición enzimática *in vitro* de GABA-AT, realizar la resolución química de los compuestos con actividad biológica promisoriosa.

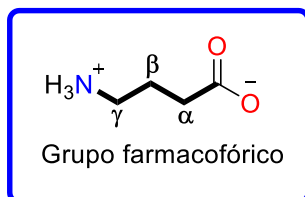
## OBJETIVOS

Llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular (Docking) sobre la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT) de los compuestos que resulten con actividad biológica promisorio, para determinar las características estructurales estereoelectronicas que los hacen activos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Diseño de nuevos análogos de GABA, baclofen y pregabalina.

Dentro del diseño de los nuevos análogos de GABA, baclofen y pregabalina se determinó conservar el grupo farmacóforo dentro de la estructura.



Por otra parte, con la finalidad de incrementar el carácter lipofílico de nuestros análogos, se estableció que el átomo de nitrógeno se encuentre ligado a un sistema heterocíclico, esto en contexto a lo que se ha desarrollado previamente dentro del grupo de investigación.<sup>46,47,48,49</sup> La restricción conformacional del grupo amino constituye la variante más interesante y novedosa de los compuestos a sintetizar, por lo que se vuelve imprescindible determinar su actividad y potencial biológico.

### 4.2. Propiedades moleculares de los análogos de GABA, baclofen y pregabalina.

Los procesos de diseño y optimización de fármacos han permitido establecer de una forma empírica que la mayoría de los fármacos presentan ciertas similitudes en determinados parámetros fisicoquímicos y estructurales. En este sentido, Lipinski *et al.*,<sup>50</sup> analizaron de manera experimental y computacional las propiedades fisicoquímicas de más de 2000 fármacos, y concluyeron que hay mayor probabilidad de que un compuesto y/o “molécula activa” sea permeable a las membranas y fácilmente absorbido por el cuerpo si cumple con las reglas de cinco de Lipinski:

1. Su peso molecular debe ser menor a 500 u.m.a.
2. La liposolubilidad (solubilidad en lípidos) del compuesto, expresada en un valor conocido como logP (el logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el octanol), debe estar en el rango de -1 a 5.
3. El número de grupos que pueden donar átomos de hidrógeno (usualmente la suma de grupos hidroxilos y amino) debe ser menor a 5.

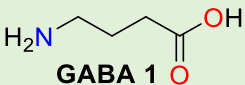
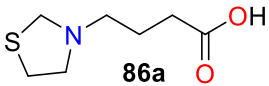
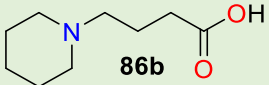
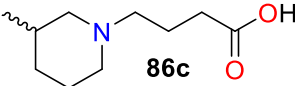
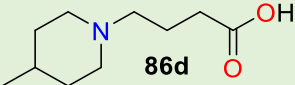
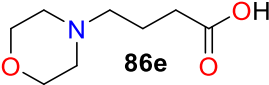
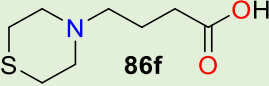


4. El número de grupos que pueden aceptar átomos de hidrógeno para formar enlaces de hidrógeno (estimado por la suma de átomo de oxígeno y nitrógeno) debe ser menor a 10.

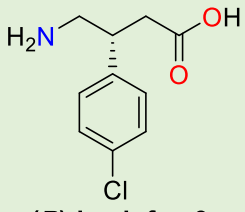
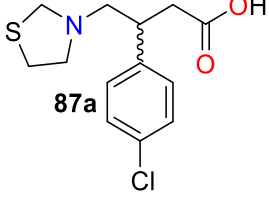
Los compuestos que son sustratos de transportadores biológicos (por ejemplo, proteínas transportadoras) son las excepciones a las reglas. En la actualidad, es posible conocer las propiedades moleculares de un compuesto, con base en su estructura, gracias a programas gratuitos que se encuentran disponibles en línea. Los análogos propuestos para éste proyecto de tesis fueron evaluados con el programa molinspiration,<sup>51</sup> el cual utiliza una base de datos para comparar la estructura del compuesto deseado con la de fármacos existentes, y predecir de esa manera sus propiedades de fármaco.

En las Tablas 1, 2 y 3 se presenta la estructura de los análogos propuestos, para cada uno de ellos se realizó un breve análisis de las propiedades estructurales de cada uno, que incluyen: coeficientes de partición (cLogP), el cual indica, en un rango menor a 5, si el compuesto posee carácter lipofílico; valores mayores a 5 son indicativos de bajo carácter lipofílico. También se muestra un breve análisis de algunos parámetros de las reglas de Lipinski.

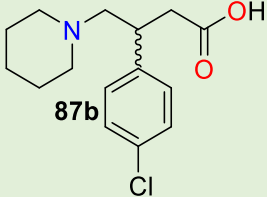
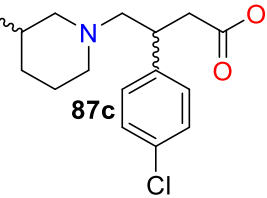
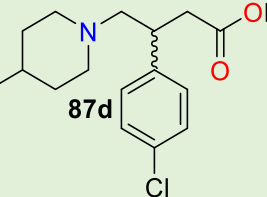
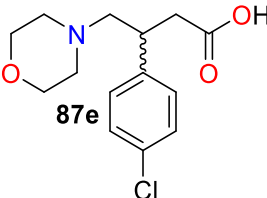
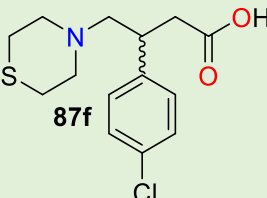
**Tabla 1.** Propiedades moleculares de los análogos de GABA **86a-f**.

Molécula	cLogP	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	Número de violaciones
 <b>GABA 1</b>	-1.10	3	3	103.12	0
 <b>86a</b>	0.500	1	3	175.25	0
 <b>86b</b>	1.040	1	3	171.24	0
 <b>86c</b>	1.280	1	3	185.27	0
 <b>86d</b>	1.280	1	3	185.27	0
 <b>86e</b>	-0.03	1	4	173.21	0
 <b>86f</b>	0.520	1	3	189.27	0

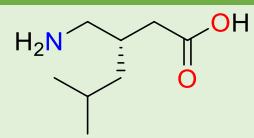
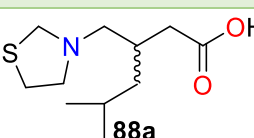
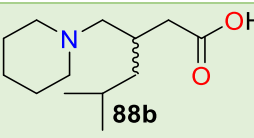
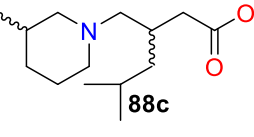
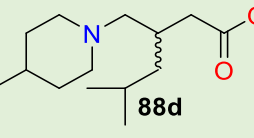
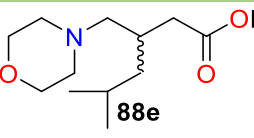
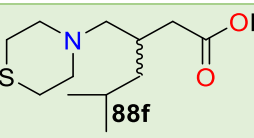
**Tabla 2.** Propiedades moleculares de los análogos de baclofen **87a-f**.

Molécula	cLogP	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	Número de violaciones
 <b>(R)-baclofen 3</b>	-0.42	3	3	213.66	0
 <b>87a</b>	1.18	1	3	285.80	0

**Tabla 2 (continuación).** Propiedades moleculares de los análogos de baclofen **87a-f**.

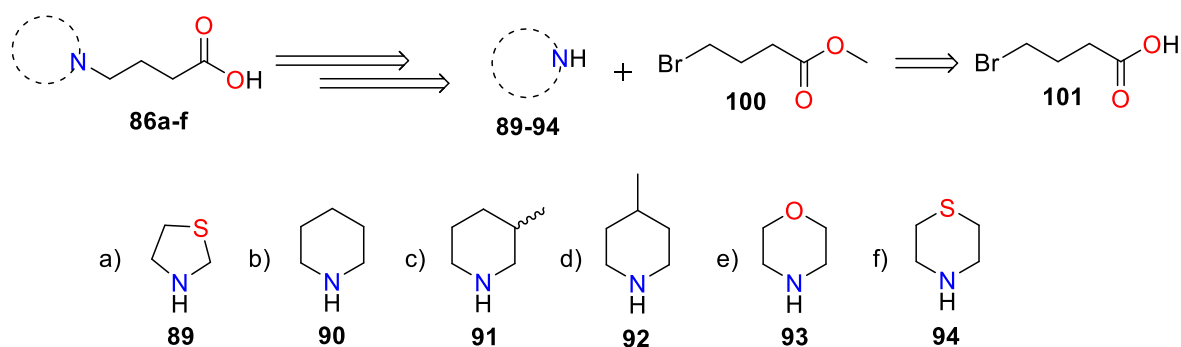
Molécula	cLogP	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	Número de violaciones
 <p><b>87b</b></p>	1.72	1	3	281.78	0
 <p><b>87c</b></p>	1.96	1	3	295.81	0
 <p><b>87d</b></p>	1.96	1	3	295.81	0
 <p><b>87e</b></p>	0.65	1	4	283.75	0
 <p><b>87f</b></p>	1.19	1	3	299.82	0

**Tabla 3.** Propiedades moleculares de los análogos de pregabalina **88a-f**.

Molécula	cLog P	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	Número de violaciones
 <b>(S)-pregabalina 4</b>	0.66	3	3	159.23	0
 <b>88a</b>	2.26	1	3	231.36	0
 <b>88b</b>	2.79	1	3	227.35	0
 <b>88c</b>	3.03	1	3	241.38	0
 <b>88d</b>	3.03	1	3	241.38	0
 <b>88e</b>	1.73	1	4	229.32	0
 <b>88f</b>	2.27	1	3	245.38	0

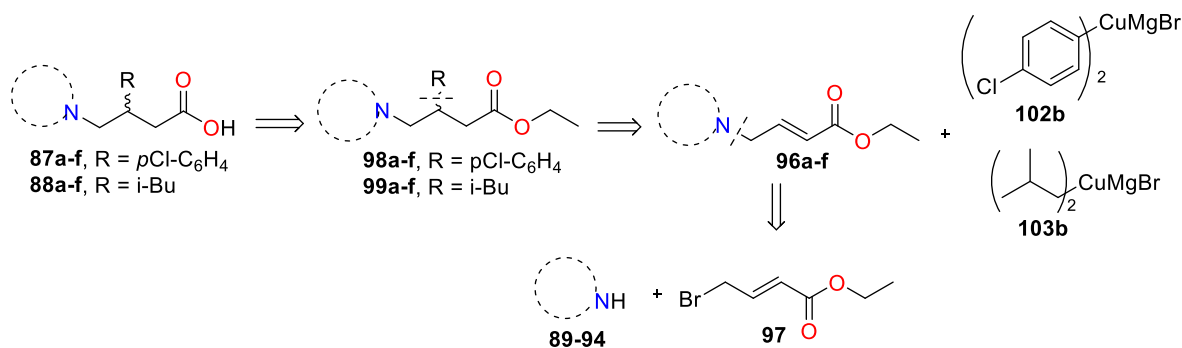
#### 4.3. Análisis retrosintético.

La ruta de síntesis de los análogos objetivo está basada en los análisis retrosintéticos mostrados en los esquemas 11 y 12. Debido a que los análogos de GABA no presentan sustituyente, la ruta es corta. De tal forma que la síntesis de los compuestos **86a-f** inicia a partir de los heterociclos **89-94** y el éster metílico **100**, que a su vez proviene del ácido 4-bromobutanoico **101**. Esta estrategia involucra una reacción de *N*-alquilación entre **100** y las aminas **89-94**.



**Esquema 11.** Análisis retrosintético de los análogos de GABA.

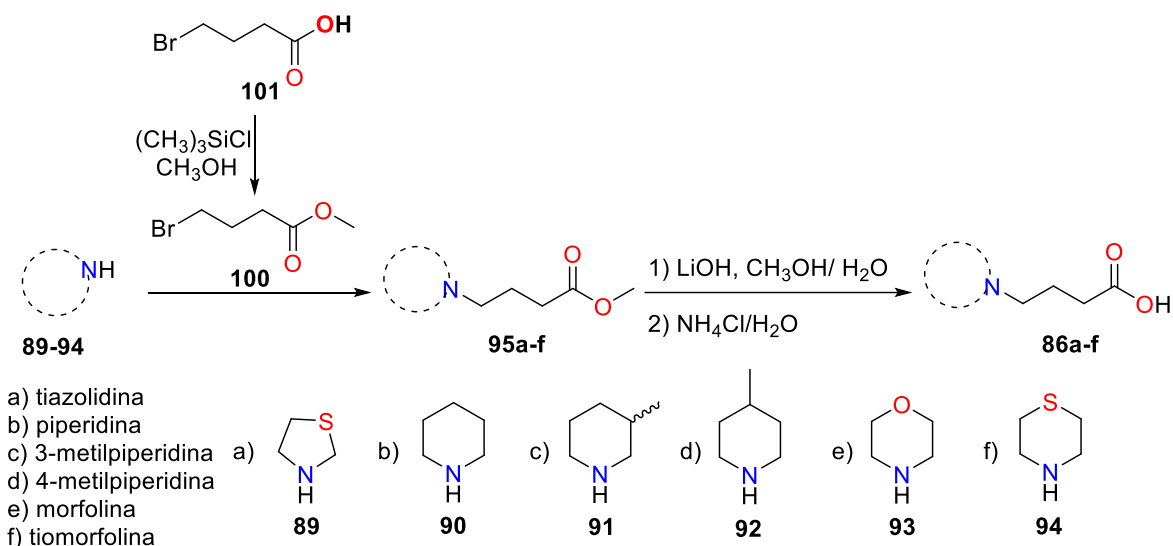
La síntesis de los ácidos **87a-f** y **88a-f** provienen de los ésteres **98a-f** y **99a-f**. Dado que los sustituyentes R se requieren en la posición  $\beta$  con respecto al grupo carbonilo de los ésteres **98a-f** y **99a-f**, la introducción de estos sustituyentes es factible a través de la adición conjugada de cupratos que contienen estos sustituyentes (**102** y **103**) a los ésteres **96a-f**. La síntesis de los ésteres **96a-f** puede llevarse a cabo nuevamente por reacciones de *N*-alquilación entre los heterociclos **89-94** y el 4-bromocrotonato de etilo **97** (Esquema 12).



**Esquema 12.** Análisis retrosintético de los análogos de baclofen y pregabalina.

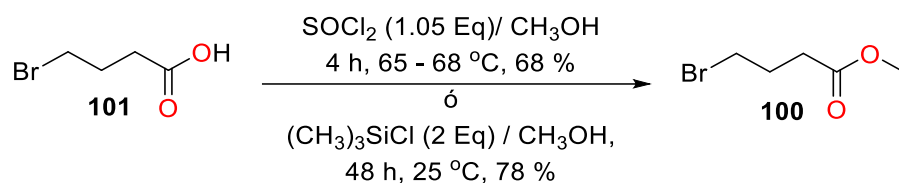
#### 4.4. Síntesis de los análogos de GABA.

Como se describe en el esquema 13, la ruta de síntesis de los análogos de GABA (**86a-f**) inició con la esterificación del ácido 4-bromobutanoico **101**, una vez obtenido el éster **100** se hizo reaccionar con las aminas heterocíclicas **89-94** para obtener los productos de la *N*-alquilación **95a-f**. El último paso de reacción consistió en la hidrólisis de estos compuestos en medio básico para la obtención de los análogos de GABA **86a-f**.



**Esquema 13.** Ruta general de síntesis de los análogos de GABA **86a-f**.

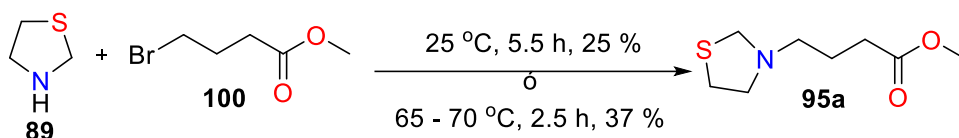
El primer paso en la síntesis de los análogos de GABA, consistió en realizar la correspondiente esterificación del ácido 4-bromobutanoico **101**, se evaluaron dos métodos diferentes. Por un lado, la esterificación con  $\text{SOCl}_2$  en metanol condujo a la obtención de **100** con un 68%, sin embargo, cuando la esterificación se realizó con  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$  en MeOH por 48 h se obtuvo el éster **100** en un 78% de rendimiento (Esquema 14).



**Esquema 14.** Reacción de esterificación del ácido 4-bromobutírico.

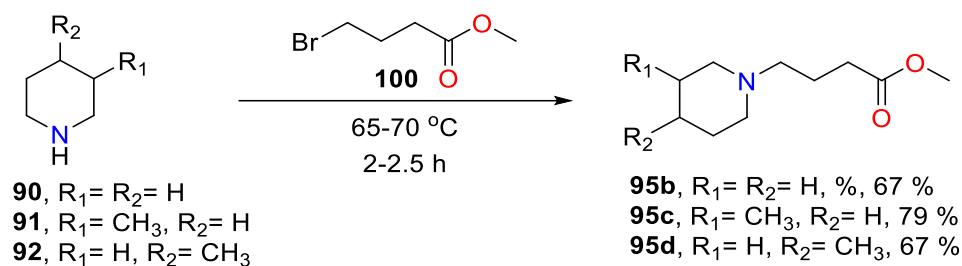
#### 4.4.1. Reacciones de *N*-alquilación de los heterociclos **89-94** con el éster **100**.

La síntesis de los ésteres **95a-f** se llevaron mediante reacciones de *N*-alquilación en ausencia de base y disolvente al observarse previamente dentro del grupo de investigación<sup>46</sup> que estas condiciones disminuían el tiempo de reacción y generaban buenos rendimientos, por lo que el éster **95a** derivado de la tiazolidina **89** se sintetizó a temperatura ambiente, sin embargo, **95a** se obtuvo con solo un 25 % de rendimiento, y cuando la reacción se realizó a 65-70 °C, el éster **95a** se obtuvo con un 37 % como rendimiento máximo (Esquema 15).



**Esquema 15.** Síntesis del compuesto **95a**.

La quimioselectividad observada en la *N*-alquilación de **95a** sobre el átomo de nitrógeno se debe a que la formación de la amina terciaria se ve favorecida por el efecto electrón-donador que un tercer grupo alquilo genera sobre el ión alquil amino intermediario formado y que después de tratamiento básico genera la amina libre terciaria. La síntesis de los ésteres **95b-d** (Esquema 16) se realizó a temperatura ambiente, sin embargo, los rendimientos oscilaron entre 60 % al 67 %. Cuando se incrementó la temperatura de las reacciones (Entrada 2, 4 y 6) no se obtuvo un incremento significativo en el rendimiento de cada éster (Tabla 4).

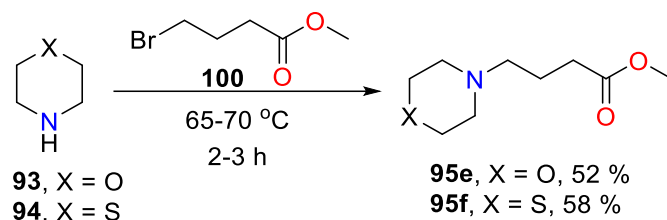


**Esquema 16.** Síntesis de los compuestos **95b-d**.

**Tabla 4.** Condiciones de síntesis de los compuestos **95b-d**.

Entrada	Estructura	Tiempo	Temperatura	Rendimiento
1	<b>90</b> , R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =H	5 h	25 °C	67 %
2	<b>90</b> , R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =H	2 h	65-70 °C	67 %
3	<b>91</b> , R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =H	5.5 h	25 °C	60 %
4	<b>91</b> , R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =H	2 h	65-70 °C	79 %
5	<b>92</b> , R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub>	5 h	25 °C	62 %
6	<b>92</b> , R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub>	2.5 h	65-70 °C	67 %

La síntesis de los compuestos **95e-f** inicialmente se realizó a temperatura ambiente (tabla 5), sin embargo, los rendimientos no superaron el 45 %, por lo que la reacción se llevó a calentamiento, con esto los ésteres se obtuvieron con rendimientos del 52 % y 58 % para los ésteres **95e** y **95f** respectivamente (Esquema 17). De la misma forma, la selectividad de la formación de la amina terciaria se ve favorecida por el efecto electrón-donador de un tercer grupo alquilo presente en las aminas terciarias generadas.



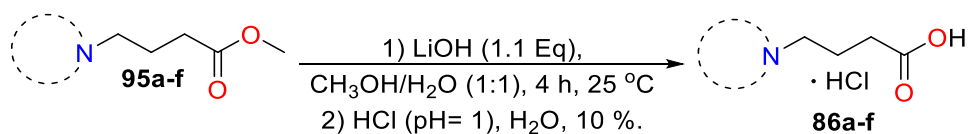
**Esquema 17.** Síntesis de los compuestos **95e-f**.

**Tabla 5.** Condiciones de síntesis de los compuestos **95e-f**.

Entrada	Estructura	Tiempo	Temperatura	Rendimiento (%)
<b>1</b>	<b>93, X=O</b>	4 h	25 °C	45 %
<b>2</b>	<b>93, X=O</b>	2 h	65-70 °C	<b>52 %</b>
<b>3</b>	<b>94, X=S</b>	4 h	25 °C	43 %
<b>4</b>	<b>94, X=S</b>	3 h	65-70 °C	<b>58 %</b>

#### 4.4.2. Hidrólisis de los ésteres 95a-f.

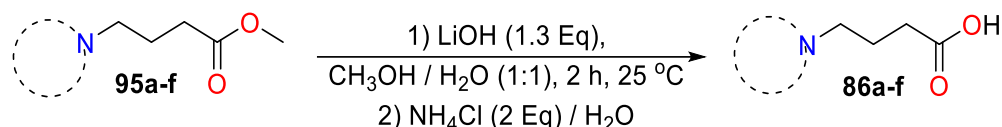
La hidrólisis en medio básico de los ésteres **95a-f** se llevó a cabo en primera instancia con LiOH y tratamiento con HCl, sin embargo, se obtuvieron los compuestos **86a-f** con rendimientos menores al 10% en todos los casos (Esquema 18).



**Esquema 18.** Hidrólisis de los compuestos **95a-f**.

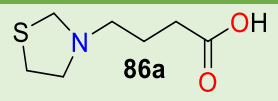
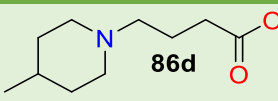
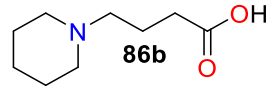
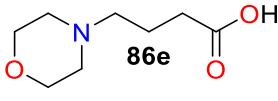
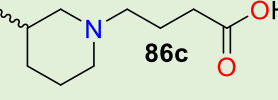
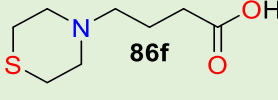


El 10 % de rendimiento obtenido se atribuye a que se alcanzó un pH ácido, en donde el grupo amino terciario es capaz de aceptar un protón y formar la sal, razón por la cual dificulta la extracción del compuesto orgánico de la fase acuosa. Posteriormente, se incrementó el número de equivalentes de la base y se utilizó una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl en lugar de HCl con lo que se obtuvieron los análogos de GABA **86a-f** (Tabla 6, esquema 19) con rendimientos mayores al 80 % y en un tiempo de reacción menor a 2 h.



**Esquema 19.** Síntesis de los compuestos **86e-f** empleando NH<sub>4</sub>Cl como tratamiento ácido.

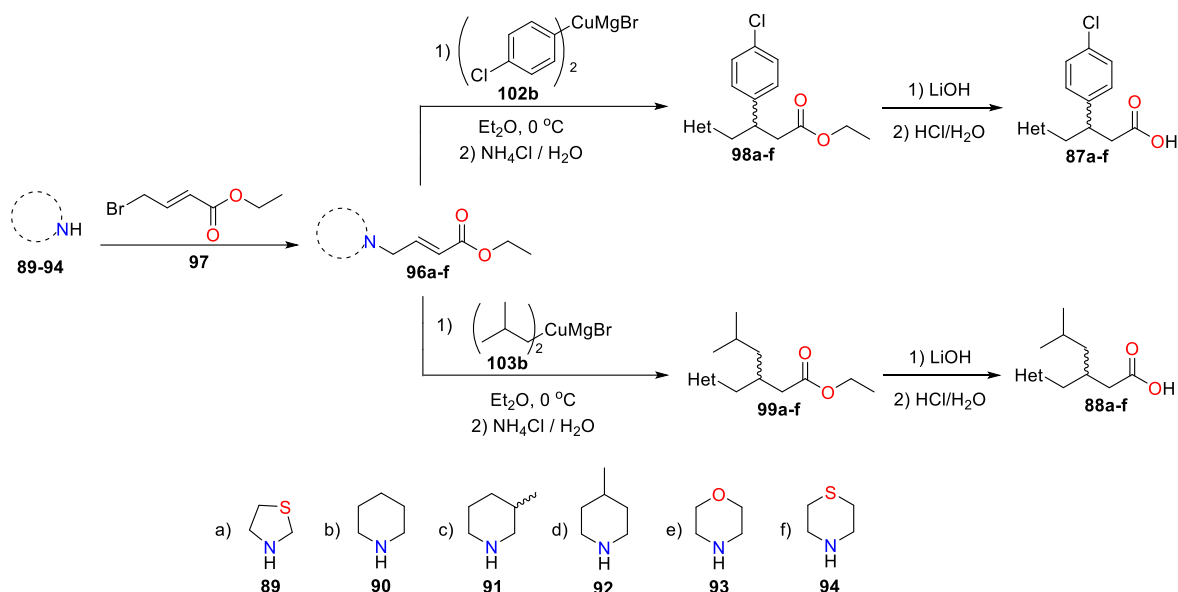
**Tabla 6.** Rendimientos obtenidos de los compuestos **86a-f**.

Ácido	T(h)	%	Ácido	T (h)	%
	1	80 %		2	95 %
	1.5	95 %		2	98 %
	2	95 %		1	86 %

Todos los análogos fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, en los cuales se observó la desaparición de la señal correspondiente al grupo éster (ver parte experimental y anexos). Por otro lado, la técnica de espectrometría de masas de alta resolución mostró el ion molecular en cada uno de los compuestos.

#### 4.5. Síntesis de análogos de baclofen y pregabalina.

Como se describe en el esquema 20, la ruta de síntesis de los análogos de baclofen y pregabalina inició con la *N*-alquilación del 4-bromocrotonato de etilo **97** con los heterociclos **89-94**, generando los sistemas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados **96a-f**, seguido de la adición conjugada 1, 4 a estos sustratos. La hidrólisis de estos **98a-f** y **99a-f** en medio básico para la obtención de los análogos **87a-f** y **88a-f**.



**Esquema 20.** Ruta de síntesis para la obtención de los análogos de baclofen y pregabalina.

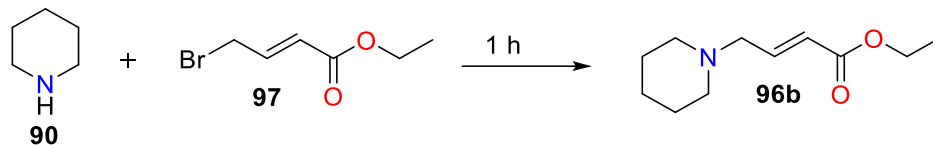
#### 4.5.1. Reacciones de *N*-alquilación para la obtención de los ésteres $\alpha,\beta$ -insaturados **96a-f**.

La síntesis de los ésteres **96a-f** inició con la piperidina **90**, se eligió esto debido al costo accesible del heterociclo. El primer experimento se realizó en ausencia de base y disolvente, sin embargo, no se observó la formación de **96b**. A partir de esto, se planteó mejorar el rendimiento obtenido de esta reacción a través de la modificación de las condiciones de reacción y tomando como modelo base de la reacción de piperidina **90** y el etil-4-bromocrotonato **97** (Tabla 7).

Se encontró en la literatura<sup>52</sup> que las reacciones de estos heterociclos procedían con buenos rendimientos en presencia de  $K_2CO_3$  como base en  $CH_2Cl_2$  y a  $0\text{ }^\circ C$ , sin embargo, experimentalmente estas condiciones (Entrada 2) solo permitieron obtener el compuesto **96b** con rendimientos similares a los obtenidos previamente (Entrada 1). Por ello se optó por emplear  $Et_3N$  como base a  $-50\text{ }^\circ C$  con lo que se obtuvo el compuesto **96b** con un rendimiento del 75 % (Entrada 4) y a su vez este rendimiento se mantuvo cuando se escaló la reacción con 1 g de piperidina **90** (Entrada 5).

Continuando con la revisión de la literatura<sup>53</sup> se encontró que la *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) se ha empleado como base en la *N*-alquilación de aminas secundarias a aminas terciarias, por lo que se procedió a hacer uso de la misma, lo que permitió obtener el compuesto **96b** con un 90 % de rendimiento (Entrada 7).

**Tabla 7.** Condiciones base para las reacciones de *N*-alquilación de piperidina **90**.

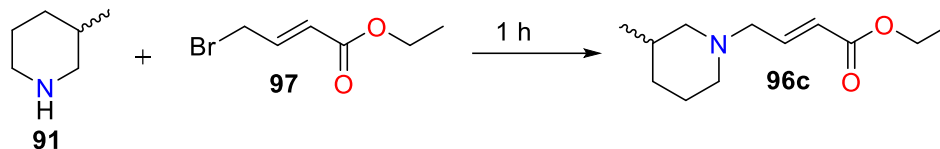


Entrada	97(Eq)	Base (Eq)	Temperatura	Disolvente	Rendimiento
1	1.0	-----	25 °C	-----	35 %
2	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	0 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 %
3	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	-30 °C		35 %
4	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	-50 °C		35 %
5	1.1	Et <sub>3</sub> N (2)	-30 °C		75 %
6	1.1	Et <sub>3</sub> N (2)	-30 °C		75 %
7	1.1	DIPEA (2)	-20 °C		90 %

La preferencia por la sustitución nucleófila (*N*-alquilación) sobre otras posibles reacciones secundarias que se pueden presentar como la adición 1,2 al grupo carbonilo o la adición 1,4 al doble enlace se debe a que el átomo de bromo forma parte de un sistema alílico lo que lo vuelve más reactivo hacia la sustitución nucleófila por la amina secundaria, aunado al efecto estabilizador que genera la formación de una amina terciaria. Esta serie de efectos se ve influenciada por el empleo de una base voluminosa no nucleófila como lo es la DIPEA, la cual reacciona en el transcurso de la reacción con el ácido bromhídrico generado.

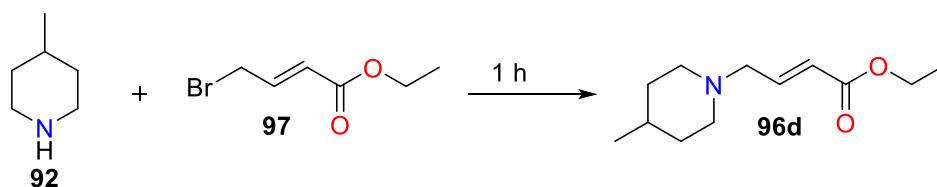
Simultáneamente se realizaron los experimentos correspondientes para la *N*-alquilación de 3-metilpiperidina **91** (Tabla 8) y 4-metilpiperidina **92** (Tabla 9), obteniendo los mejores rendimientos cuando se usó la DIPEA como base.

**Tabla 8.** Reacciones de *N*-alquilación de 3-metilpiperidina **91**.



Entrada	97 (Eq)	Base (Eq)	Temperatura	Disolvente	Rendimiento
<b>1</b>	1.0	-----	25 °C	-----	35 %
<b>2</b>	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	-30 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	27 %
<b>3</b>	1.1	DIPEA (2)	-20 °C		77 %

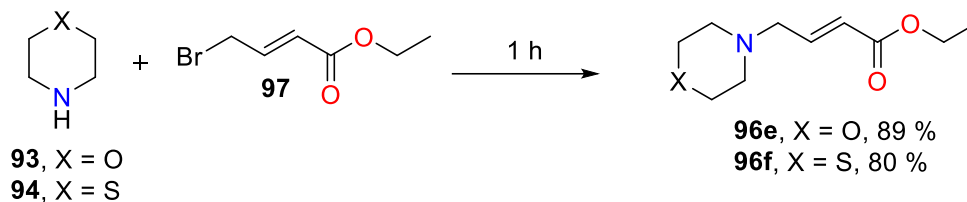
**Tabla 9.** Reacciones de *N*-alquilación de 4-metilpiperidina **92**.



Entrada	97 (Eq)	Base (Eq)	Temperatura	Disolvente	Rendimiento
<b>1</b>	1.0	-----	25 °C	-----	35 %
<b>2</b>	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	0 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 %
<b>3</b>	1.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2)	-30 °C		45 %
<b>4</b>	1.1	DIPEA (2)	-20 °C		80 %

Una vez que se optimizaron las condiciones de reacción para las *N*-alquilaciones, se procedió a hacer uso de las mismas para la síntesis de los ésteres **96e-f**, logrando obtener rendimientos del 89 % para el éster **96e** y del 80 % para el éster **96f** (Tabla 10).

**Tabla 10.** Reacciones de *N*-alquilación de morfolina **93** y tiomorfolina **94**.

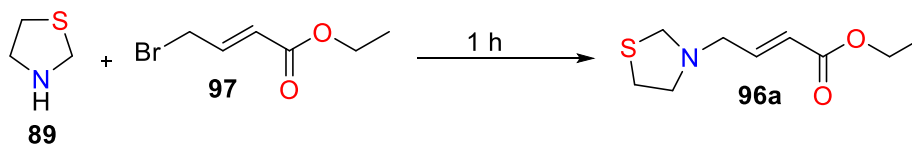


Entrada	97 (Eq)	Base (Eq)	Temperatura	Disolvente	Rendimiento
<b>1</b>	1.0	-----	25 °C	-----	35 %
<b>2</b>	1.1	DIPEA (2)	-20 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	89 %
<b>3</b>	1.0	-----	25 °C	-----	45 %
<b>4</b>	1.1	DIPEA (2)	-20 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80 %

El uso de la DIPEA a -20 °C y en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se estableció como las condiciones ideales para la obtención de los ésteres **89b-f**. Se procedió a emplear estas condiciones de reacción con el heterociclo de tiazolidina **89**, con el cual hasta el momento no se había podido obtener su producto de *N*-alquilación **96a**. Bajo estas condiciones de reacción se obtuvo con un 50 % de rendimiento (Tabla 11, entrada 3).

Cuando se incrementó a 1.3 los equivalentes de 4-bromocrotonato de etilo **97** y se disminuyó a 1.5 equivalentes de la base, **96a** se obtuvo con un 63% de rendimiento.

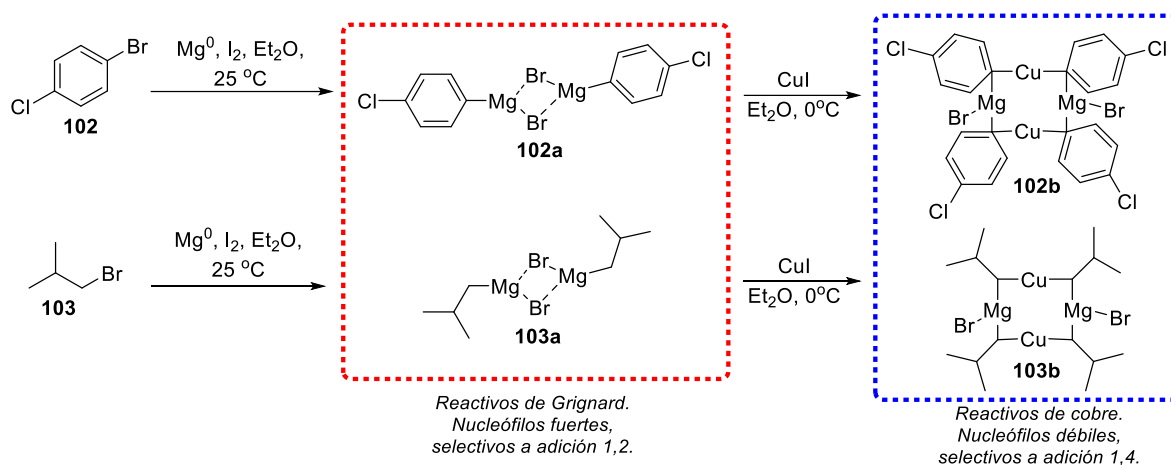
**Tabla 11.** Reacciones de *N*-alquilación de la tiazolidina **89**.



Entrada	97 (Eq)	Base (Eq)	Temperatura	Disolvente	Rendimiento
<b>1</b>	1.0	-----	25 °C	-----	-----
<b>2</b>	1.1	DIPEA (2)	-20 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50 %
<b>3</b>	1.3	DIPEA (1.5)	-20 °C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	63 %

4.5.2. Adición conjugada 1,4 de cupratos de *i*-butilo.

Las adiciones conjugadas con reactivos organometálicos a sustratos orgánicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, son un método de formación de enlaces C-C de suma importancia en síntesis orgánica. Una vez obtenidos los ésteres  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados **96a-f**, se procedió a la síntesis de los precursores de los análogos de baclofen y pregabalina a través de la adición conjugada de los cupratos que contienen a los grupos *p*-clorofenilo e *i*-butilo. La primera etapa de esta reacción consistió en la formación del reactivo de Grignard *in situ*, que en presencia de CuI generó los cupratos correspondientes (Esquema 21), a los cuales, en un paso posterior les fue adicionado los ésteres  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados **96a-f**.

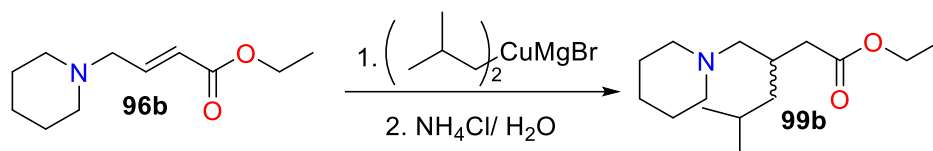


**Esquema 21.** Formación de los cupratos de *p*-clorofenilo e *i*-butilo.

El sistema  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado **96b** se eligió como sustrato base para los respectivos ensayos de adición conjugada. Las condiciones desarrolladas en el laboratorio no permitieron obtener el compuesto **99b** (Tabla 12, entrada 1). Por ello se probaron diferentes condiciones de reacción. Un incremento en los equivalentes de cuprato,<sup>54</sup> utilizando THF (Entrada 2) no tuvo ningún efecto para la obtención de **99b**. Por otra parte, el incrementar el tiempo de reacción para la generación del cuprato (Entrada 3) permitió obtener **99b** en un 35 % de rendimiento. Con base a este resultado se incrementó el tiempo para la formación del reactivo de Grignard (Entrada 4) con el cual el rendimiento de **99b** subió a 52 %, sin embargo, cuando el tiempo de la formación del reactivo de Grignard fue de tres horas no se observó mejora en el rendimiento, esto se atribuye a que el reactivo de Grignard dispuso de más tiempo y reacciono

con el halogenuro de alquilo **103** lo que conlleva a un proceso de dimerización en lugar de generar más reactivo de Grignard para reaccionar con el CuI (Entrada 5).

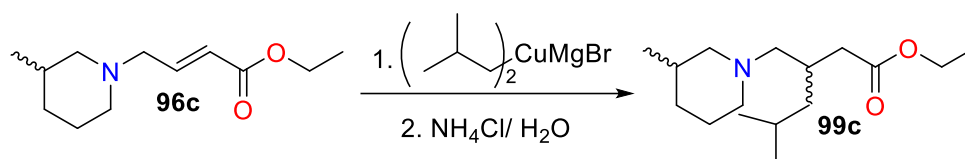
**Tabla 12.** Reacciones de adición conjugada 1,4 de cupratos de *i*-butilo al sistema  $\alpha, \beta$ -insaturado **96b**.



Entrada	Etapas	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Grignard	4	Éter	30 min	25 °C	-----
	Organocuprato	2		15 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	8.5	THF	30 min	25 °C	-----
	Organocuprato	4.25		15 min	- 78 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
3	Reactivo de Grignard	4	Éter	30 min	25 °C	35 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		72 h	25 °C	
4	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	52 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
5	Reactivo de Grignard	4	Éter	3 h	25 °C	30 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

Simultáneamente se exploró la síntesis del compuesto **99c** (Tabla 13) mismo que se llevó a cabo bajo las condiciones descritas previamente. En este caso el rendimiento obtenido fue únicamente del 15 % (Entrada 1). Al utilizar THF o incrementar los tiempos de reacción no se excedió el 20 % de rendimiento (Entradas 2 y 3).

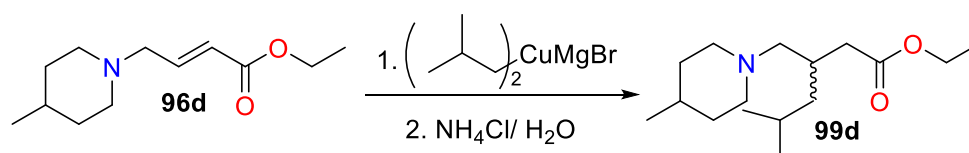
**Tabla 13.** Adición conjugada de cupratos de *i*-butilo al éster **96c**.



Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	15 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	THF	1 h	25 °C	20 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
3	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	19 %
	Organocuprato	2		30 min	-40 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

Por otra parte, la síntesis del éster **99d** se realizó bajo las condiciones encontradas con lo que se obtuvo el mismo con un 37 % de rendimiento (Tabla 14).

**Tabla 14.** Adición conjugada de cupratos de *i*-butilo al éster **96d**.

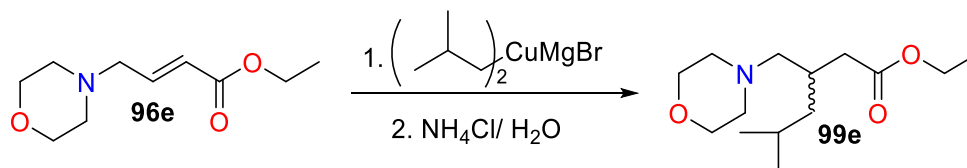


Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	37 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	THF	1 h	25 °C	----
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	



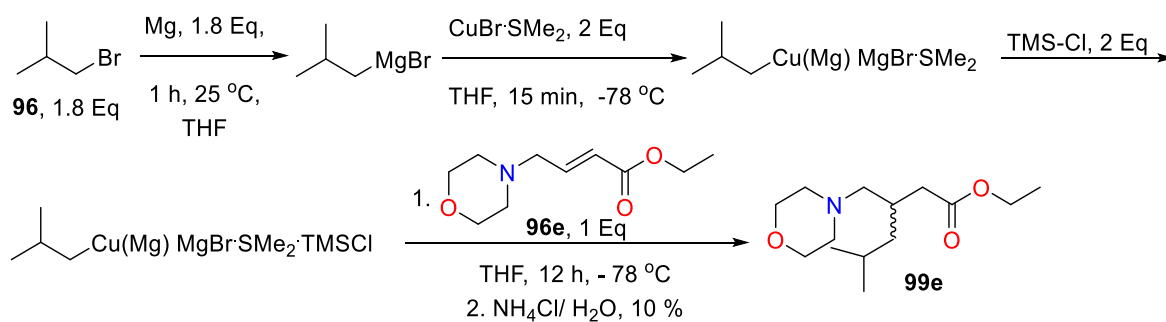
La síntesis del éster **99e** se obtuvo con un rendimiento del 20 % (Tabla 15, entrada 1) aún cuando se bajó la temperatura de la formación del organocuprato (Entrada 3) mientras que en THF (Entrada 2) no se observó el producto.

**Tabla 15.** Adición conjugada de cupratos de *i*-butilo al éster **96e**.



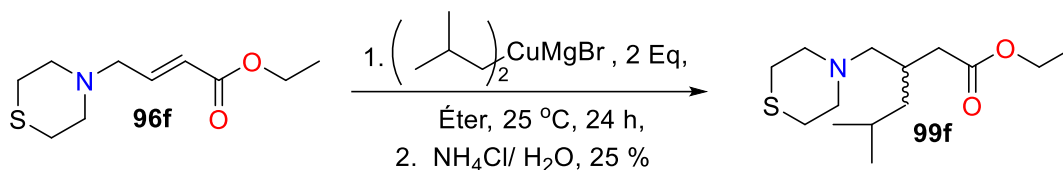
Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	20 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	THF	1 h	25 °C	-----
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
3	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	20 %
	Organocuprato	2		30 min	-40 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

Los bajos rendimientos obtenidos nos llevaron a explorar las condiciones descritas por Lipshutz<sup>55</sup> y colaboradores para las adiciones conjugadas a cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, sin embargo, bajo estas condiciones solo se obtuvo **99e** con un 10 % de rendimiento (Esquema 22).



**Esquema 22.** Adición conjugada a **96e** mediante las condiciones descritas por Lipshutz.

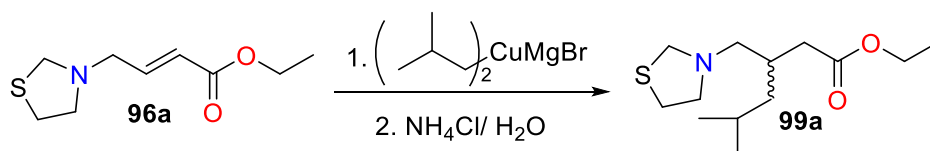
Con el objetivo de preparar el derivado de tiomorfolina **99f**, se llevó a cabo la adición del cuprato sobre el éster  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado **96f**, generando **99f** con un 25 % de rendimiento (Esquema 23).



**Esquema 23.** Adición conjugada de cupratos de *i*-butilo al éster **96f**.

Por último, se abordó la síntesis del compuesto **99a**, por lo que **96a** se hizo reaccionar bajo las condiciones estándar, sin embargo, estas solo permitieron obtener **99a** en un 5 % de rendimiento (Tabla 10, entrada 1), cuando se cambió de disolvente (Entrada 2), no se observó la formación de **99a**, por otro lado, aunque se disminuyeron los equivalentes del organocuprato y la temperatura de la reacción (Entrada 3) la reacción continuó sin proceder, recuperando parte de la materia prima (Tabla 16).

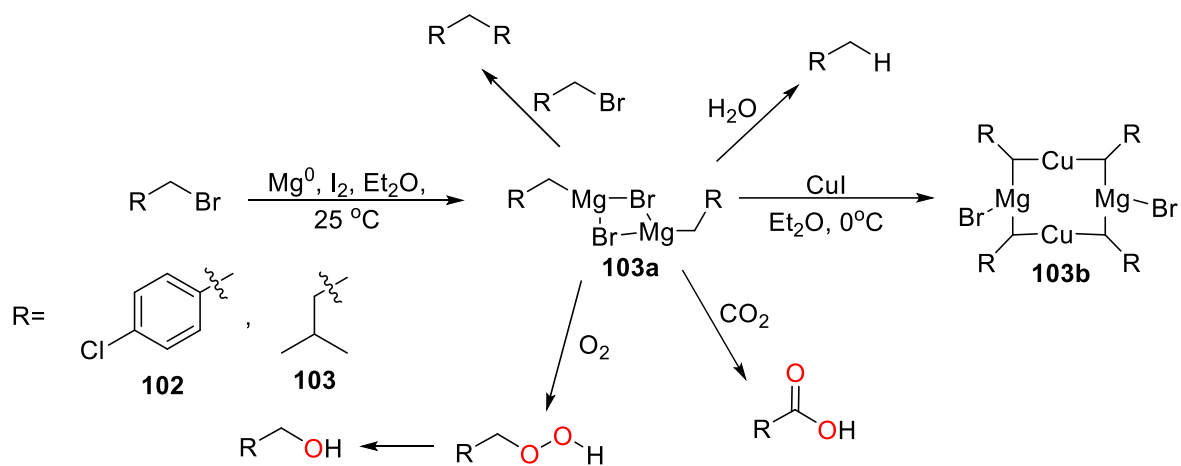
**Tabla 16.** Adición conjugada de cupratos de *i*-butilo al éster **96a**.



Entrada	Etapas	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
<b>1</b>	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	5 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
<b>2</b>	Reactivo de Grignard	4	THF	1 h	25 °C	-----
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
<b>3</b>	Reactivo de Grignard	3	Éter	1 h	25 °C	-----
	Organocuprato	1.5		30 min	-40 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	-40 °C	

Probablemente, los bajos rendimientos con los que procedieron las reacciones con el cuprato derivado del grupo isobutilo se deban a que el reactivo de Grignard generado no se convierte

en su totalidad al organocuprato, además de que en este tipo reacciones los compuestos organometálicos son muy lábiles, por ello las condiciones bajo las cuales se sintetizan deben ser controladas, ya que los reactivos son susceptibles a hidrólisis incluso por la humedad del ambiente, razón por la cual, se generan *in situ* y no es posible su purificación (Esquema 24).

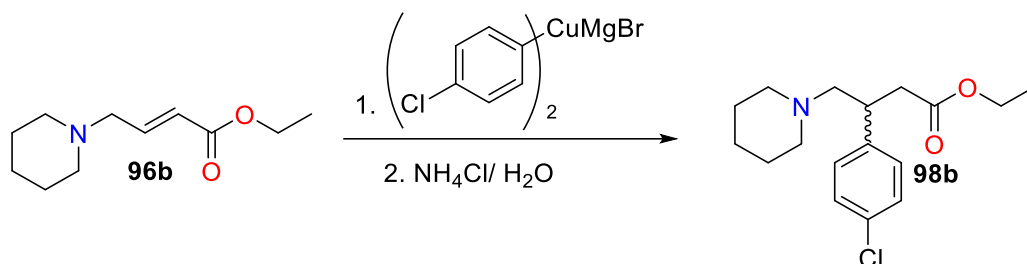


**Esquema 24.** Reacciones secundarias de los reactivos de Grignard generados.

#### 4.5.3. Adición conjugada 1,4 de cupratos de *p*-clorofenilo.

Nuevamente el éster  $\alpha, \beta$ -insaturado **96b**, se empleó como modelo para la evaluación de las condiciones de reacción que generara **98b** con el mejor rendimiento, para esto se empleó primero dos equivalentes de cuprato en éter como disolvente de reacción, esto permitió obtener el compuesto **98b** en un 52 % de rendimiento (Tabla 17, entrada 1), por otro lado, cuando se empleó THF como disolvente el rendimiento de la reacción no mejoro (Entrada 2).

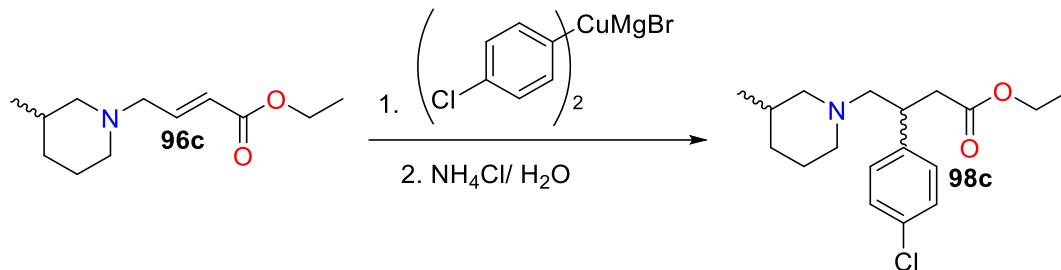
**Tabla 17.** Adición conjugada del reactivo de *p*-clorofenilo al éster **96b**.



Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
<b>1</b>	Reactivo de Grignard	4	Éter	1.5 h	25 °C	52 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
<b>2</b>	Reactivo de Grignard	4	THF	1.5 h	25 °C	31 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
<b>3</b>	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	52 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

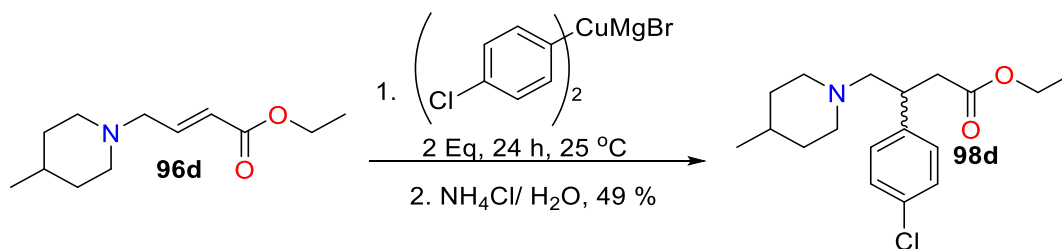
Simultáneamente se exploró la síntesis del compuesto **98c** (Tabla 18) mismo que se llevó a cabo bajo las condiciones encontradas previamente. En este caso el rendimiento obtenido fue del 49 % (Entrada 1), sin embargo, al escalar la reacción a 1 g, el rendimiento disminuyó (Entrada 2).

**Tabla 18.** Adición conjugada de cupratos de *p*-clorofenilo al éster **96c**.



Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	49 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	Éter	1.5 h	25 °C	30 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

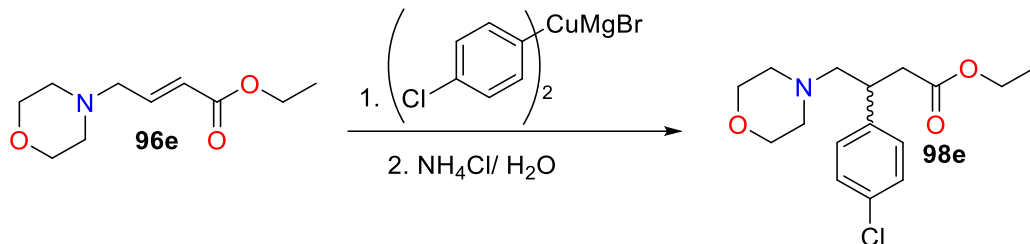
Por otra parte, la síntesis del éster **98d** se realizó bajo las mismas condiciones, con lo que se obtuvo el mismo con un 49% de rendimiento (Esquema 25).



**Esquema 25.** Adición conjugada de cupratos de *p*-clorofenilo al éster **96d**.

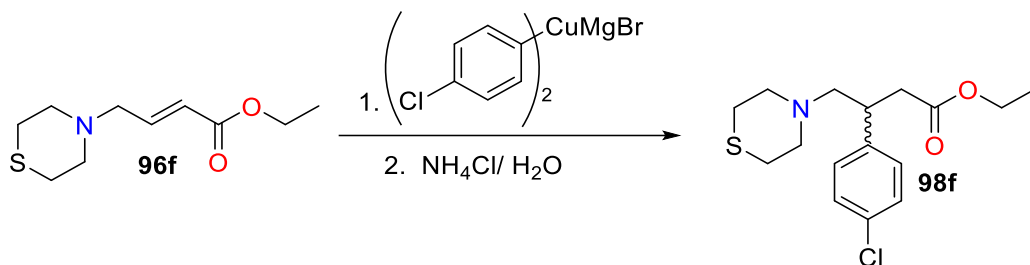
La síntesis del éster **98e** se obtuvo con un rendimiento del 55 % (Tabla 19, entrada 1) aun cuando la reacción se escaló el mismo resultado se mantuvo (Entrada 2).

**Tabla 19.** Adición conjugada de cupratos de *p*-clorofenilo al éster **96e**.



Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	55 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	53 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

**Tabla 20.** Adición conjugada de cupratos de *p*-clorofenilo al éster **96f**.

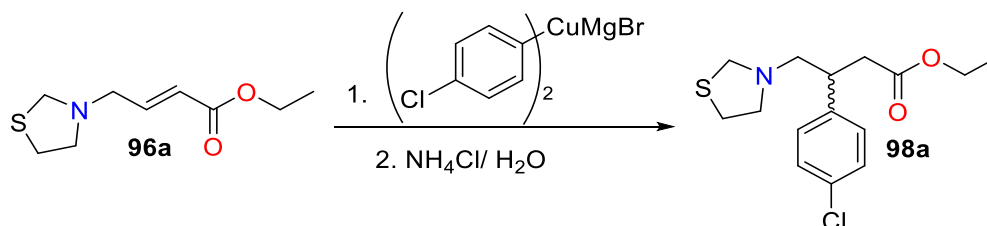


Entrada	Etapa	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	58 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	Éter	1.5 h	25 °C	45 %
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		24 h	25 °C	

De la misma forma, la preparación del derivado de tiomorfolina **98f** se llevó a cabo mediante las condiciones estándar, la adición del cuprato sobre el éster  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado **96e** generó **98f** con un 58 % de rendimiento (Tabla 20, entrada 1), sin embargo, al escalar la reacción a 1 g, el rendimiento disminuyó hasta el 45 % (Entrada 2).

Por último, se abordó la síntesis de compuesto **98a**, para esto se hizo reaccionar el sistema  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado **96a** bajo las condiciones que permitieron obtener previamente los productos **98b-f**, sin embargo, esto no generó el producto **98a** (Tabla 21, entrada 1), por otro lado, se decidió bajar la temperatura de la reacción debido a la reactividad observada en el sustrato, (Entrada 2 y 3), sin embargo, no se observó la formación de **98a**.

**Tabla 21.** Adición conjugada de cupratos de *p*-clorofenilo al éster **96a**.



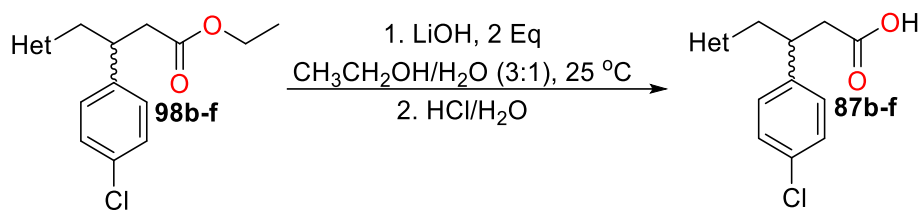
Entrada	Etapas	Eq.	Disolvente	Tiempo	Temp.	Rendimiento
1	Reactivo de Grignard	4	Éter	1 h	25 °C	----
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		6 h	25 °C	
2	Reactivo de Grignard	4	Éter	1.5 h	25 °C	---
	Organocuprato	2		30 min	0 °C	
	Adición 1, 4	1		4 h	0 °C	
3	Reactivo de Grignard	4	Éter	1.5 h	25 °C	----
	Organocuprato	2		30 min	-20 °C	
	Adición 1, 4	1		4 h	-20 °C	

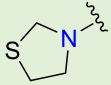
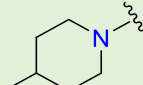
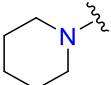
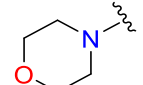
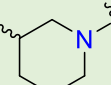
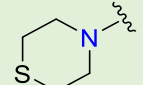
#### 4.5.4. Hidrólisis de los precursores **98a-f** de baclofen.

La obtención de los análogos de baclofen **87b-f** se realizó por medio de la hidrólisis en medio básico de los ésteres **98b-f** (Tabla 22). La reacción se llevó a cabo en presencia de LiOH en una mezcla de EtOH:H<sub>2</sub>O (2:1) por 24 horas para cada uno de ellos. El proceso de

acidificación de las sales de litio obtenidas representó un reto en particular para estos compuestos, debido a la presencia del átomo de nitrógeno que puede ser protonado durante la acidificación, esta acidificación se llevó a cabo con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) y  $\text{HCl}$ , si empleaba un exceso de  $\text{HCl}$  los compuestos **87b-f** no se recuperaban de la fase acuosa, sin embargo, cuando se empleó 1 eq de  $\text{HCl}$  por 1 equivalente de sal de litio obtenida, el proceso de extracción resultaba más sencillo.

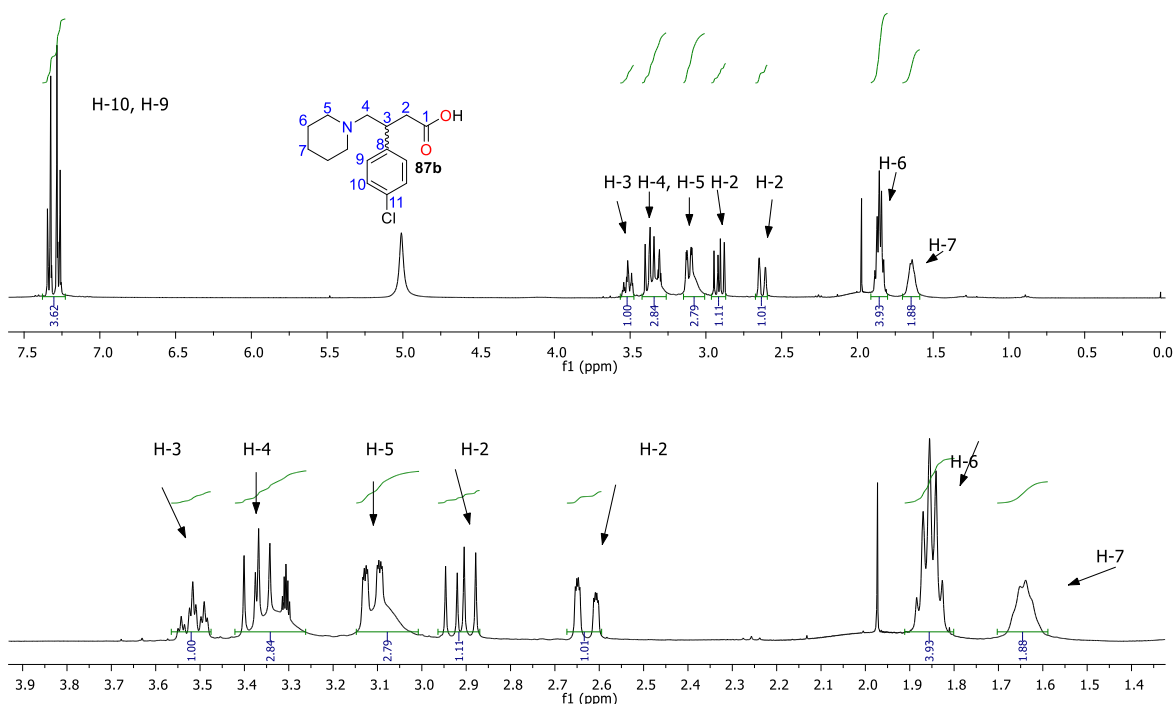
**Tabla 22.** Rendimientos de los análogos de baclofen **87b-f**.



Análogo	T (h)	R (%)	Análogo	T (h)	R (%)
 <b>87a</b>	---	----	 <b>87d</b>	24 h	68 %
 <b>87b</b>	24 h	85 %	 <b>87e</b>	24 h	69 %
 <b>87c</b>	24 h	52 %	 <b>87f</b>	24 h	70 %

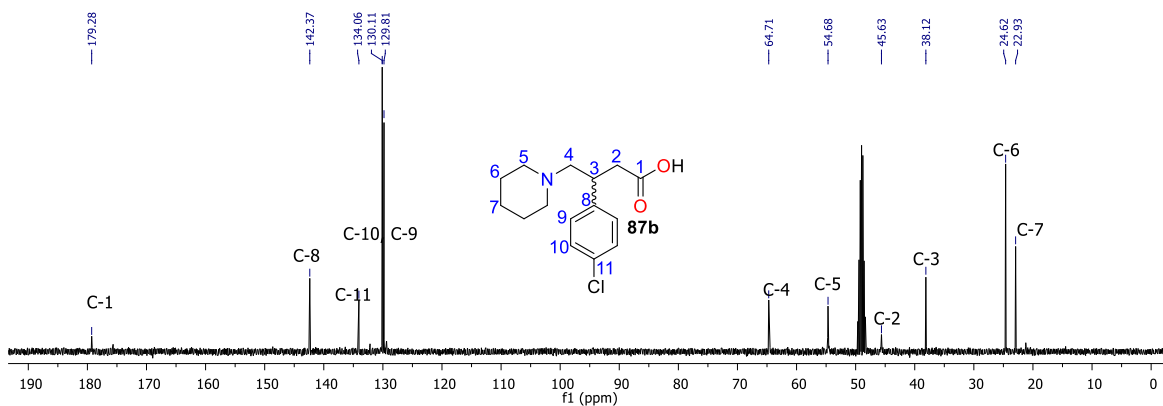
La caracterización de los nuevos análogos de baclofen **87b-f** se realizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y experimentos bidimensionales para corroborar la estructura de los análogos (Ver anexos), ejemplo de esto, es el espectro de **87b** que se muestra en la figura 10.





**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo **87b**.

Las señales desplazadas en campo bajo, 7.34 ppm y 7.27 ppm corresponden al grupo fenilo (H-9 y H-10), a 3.52 ppm el H-3 correspondiente al carbono quiral, hacia campo más alto se muestran las señales de los H-4 y H-5 (3.4 ppm-3.32 ppm) de forma traslapada, además de las señales en 3.14-3.09 restantes correspondientes a H-4 y H-5, por otra parte en 2.91 ppm y 2.63 ppm se observó la señales de hidrógeno adyacentes al grupo carbonilo H-2, en 1.89 ppm-1.82 ppm se encuentran parte de las señales correspondientes a H-6 del heterociclo de piperidina y en 1.64 ppm de H-7.



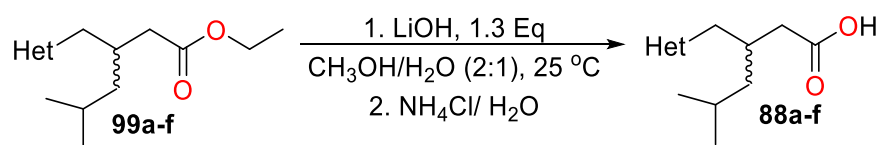
**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo **87b**.


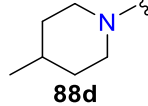
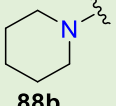
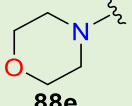
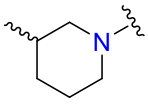
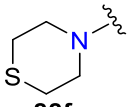
El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró las 11 señales de carbono esperadas para la estructura del análogo **87b**.

#### 4.5.5. Hidrólisis de los precursores **99a-f** de pregabalina.

La obtención de los análogos de pregabalina **88a-f** se realizó por medio de la hidrólisis en medio básico de los ésteres **99a-f** (Tabla 23). La reacción se llevó a cabo en presencia de LiOH en una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1) por 72 horas. Los experimentos realizados mostraron que el empleo de 1 equivalente de HCl para la acidificación resultaba en una extracción manejable.

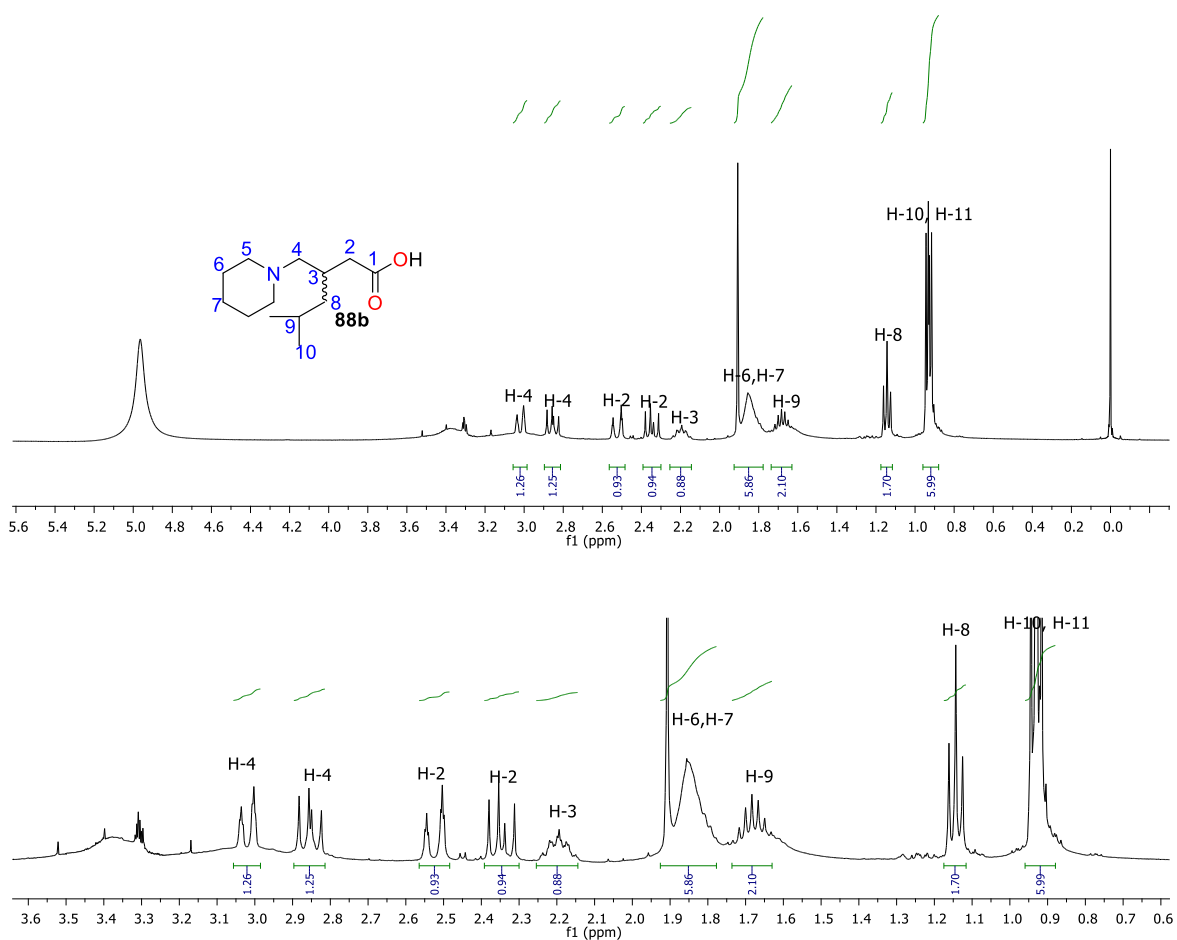
**Tabla 23.** Rendimientos de los análogos de pregabalina **88a-f**.



Condiciones de reacción					
Análogo	T (h)	R (%)	Análogo	T (h)	R (%)
 <b>88a</b>	72 h	77 %	 <b>88d</b>	72 h	90 %
 <b>88b</b>	72 h	90 %	 <b>88e</b>	72h	85 %
 <b>88c</b>	72 h	70 %	 <b>88f</b>	72 h	90 %

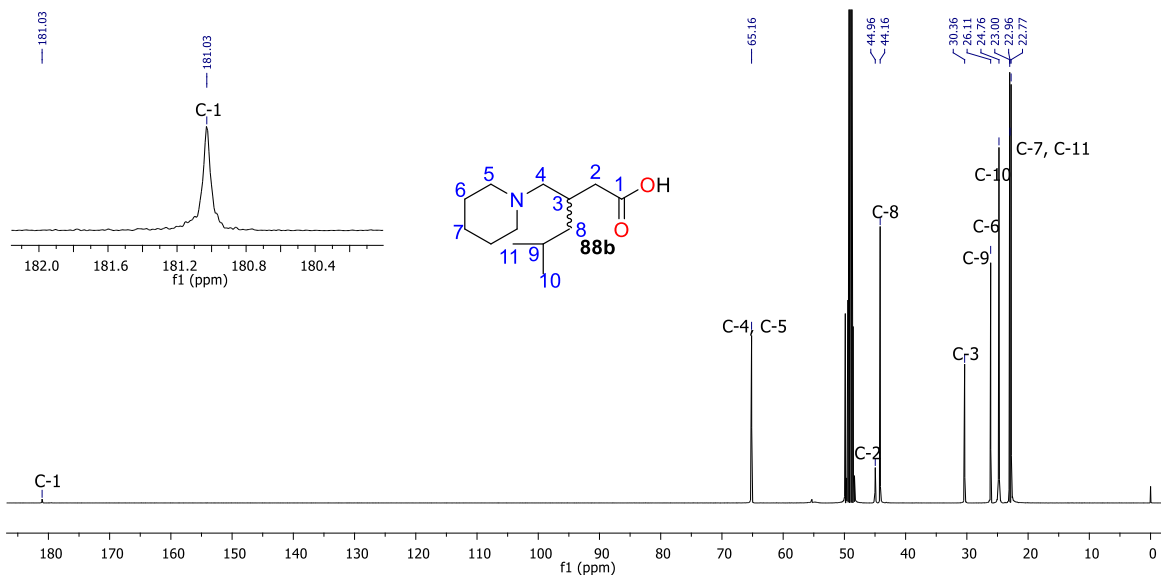
De la misma forma, la caracterización de los nuevos análogos de pregabalina se realizó mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y experimentos bidimensionales. Un ejemplo, fue la elucidación de **88b**. En la figura 12 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$  de **88b**, como se observa, debido a la naturaleza alifática del compuesto fue de esperarse que todas sus señales de hidrógeno se desplazaran en campo alto y debajo de 4 ppm y con multiplicidad no bien definida.

Las señales correspondientes en 3.04- 2.99 ppm y 2.85 ppm (1H, H-4, NCH<sub>2</sub>) correspondientes a los hidrógenos diastereotópicos adyacentes al grupo amino, las señales de 2.52 y 2.35 correspondientes a los hidrógenos adyacentes al ácido carboxílico (H-2), el H-3 en 2.20 ppm correspondiente al hidrógeno del carbono quiral, de 1.86 ppm los hidrógenos de H-6, H-7, y en la región de 1.74 -1.63 ppm de H-7 y H-9, por último en 1.14 (H-8) y de H-10 y H-11 en 0.935 ppm y 0.925 ppm respectivamente (Figura 12).



**Figura 12.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del análogo **88b**.

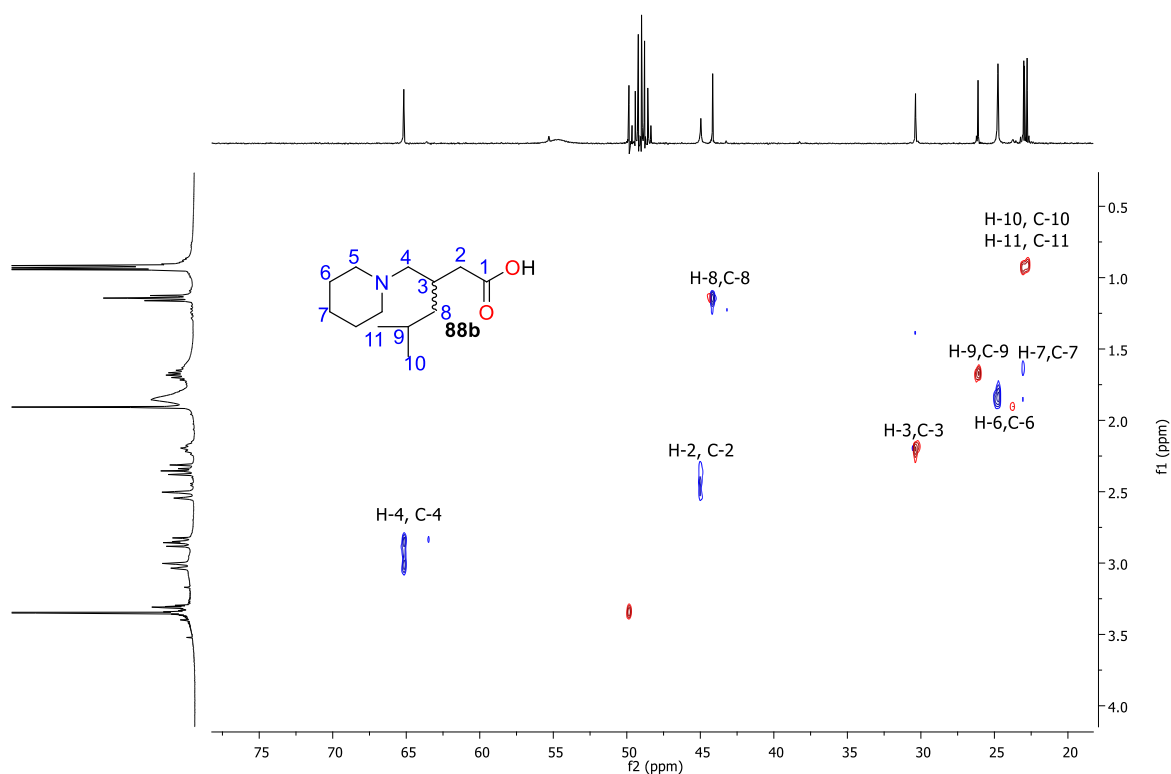
De la misma forma, para el espectro de carbono se observó una sola señal en 181.03 ppm, correspondiente al grupo carbonilo (C-1) del ácido carboxílico y el resto de las señales por debajo de 70 ppm.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del análogo **88b**.

La confirmación de la estructura de **88b** se realizó por el experimento bidimensional HETCOR (figura 14), el C-4 desplazado en 64.5 ppm correlaciona con las señales de hidrógeno de H-4 en 3.03 y 2.87 ppm, a su vez, el C-2 (45 ppm) correlaciona con las señales de H-2 (2.56 - 2.35 ppm), la señal de C-8 (44.2 ppm) correlacionó con los H-8 (1.17 ppm) desplazados hacia campo bajo, estas tres señales son correspondientes a los tres pares de hidrógenos diastereotópicos presentes en la molécula.

Por otra parte, el C-3 (30 ppm) correlaciona con H-3 (2.21 ppm) que corresponden a la señal del carbono quiral (racémico), de la misma forma, la señal de C-9 (26 ppm) correlaciona con las señales en 1.67 ppm del H-9, las señales C-6 (24.75 ppm) con las señales de H-6 (1.86 ppm), las señales en 23 ppm y 22.7 ppm de los carbonos metílicos (C-10 y C-11) correlacionaron con las señales de hidrógeno en 0.81 ppm.



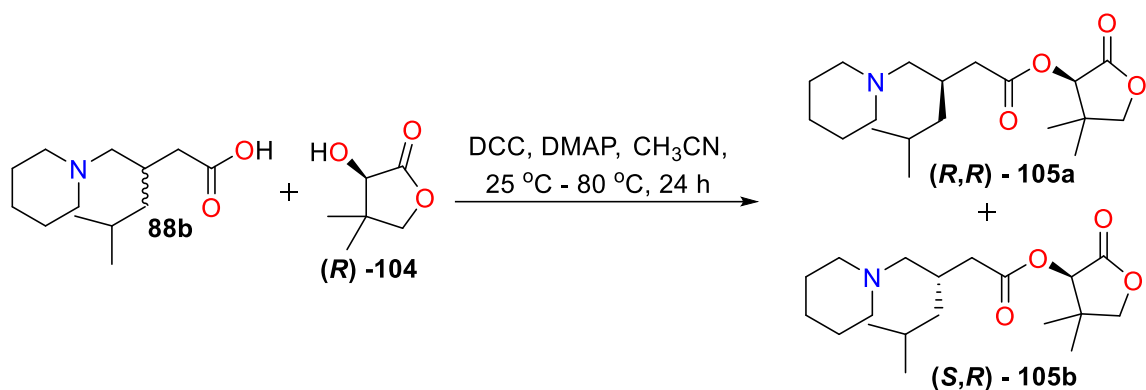
**Figura 14.** 2D NMR (HETCOR 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **88b**.

La elucidación de las moléculas de la misma serie se realizó de manera análoga a la presentada anteriormente. Una vez obtenidos todos los análogos, el siguiente paso fue llevar a cabo la evaluación *in vitro* de estos compuestos para determinar su potencial inhibitorio sobre la enzima GABA-AT y de esta manera identificar que compuestos pueden ser inhibidores de esta enzima y que en complemento con estudios adicionales identificar si los mismos pueden ser considerados candidatos a fármacos potenciales.

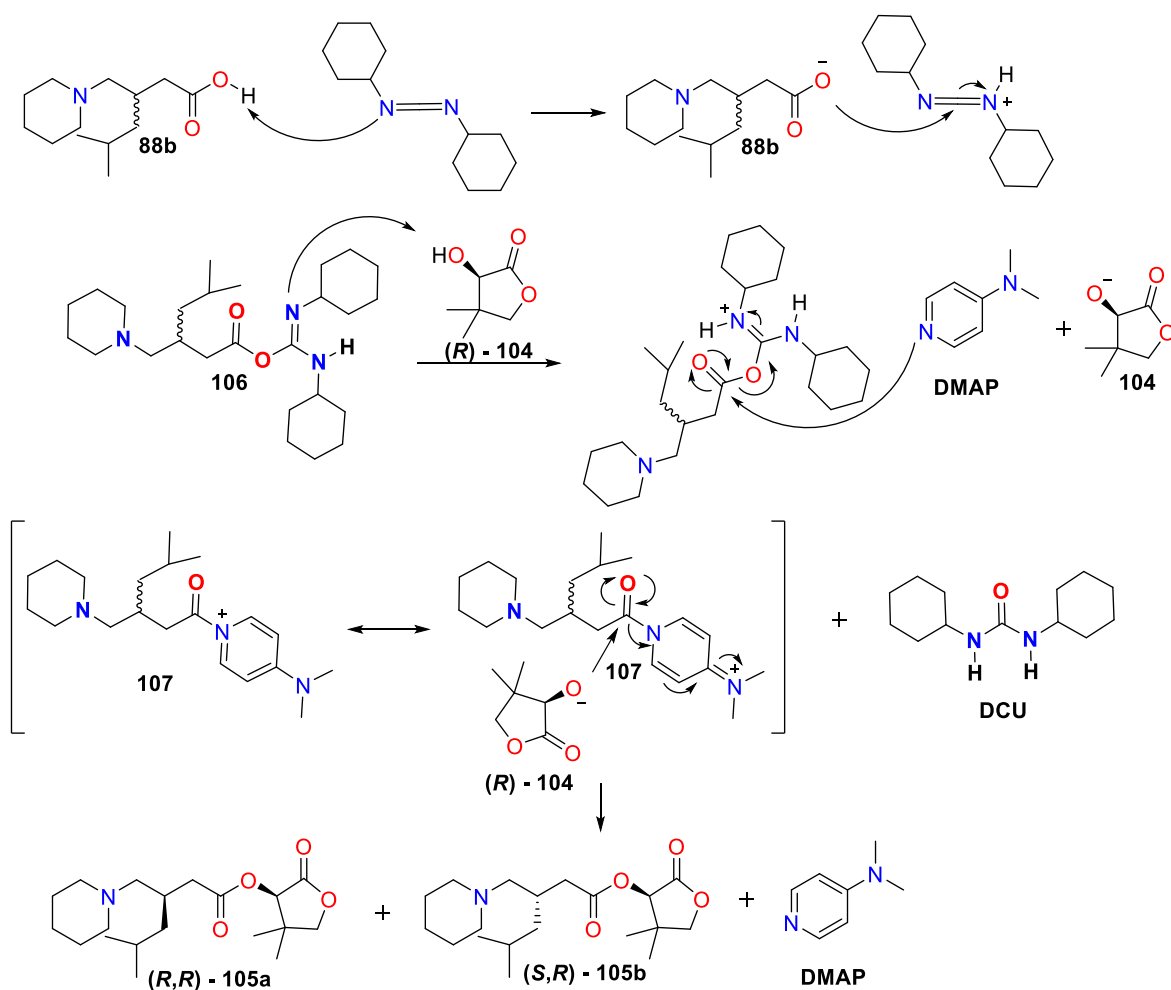
#### 4.6. Estudios de resolución de mezclas racémicas.

Con la finalidad de realizar la resolución de las mezclas racémicas **87b-f** y **88a-f**, y particularmente de los compuestos que posteriormente mostraron una actividad *in vitro* promisorio sobre la enzima de GABA-AT, se exploraron diversas metodologías de resolución. Dentro de la literatura se encontró que la (*R*)-pantolactona<sup>56</sup> **104** puede emplearse para este fin, por lo que **88b** se hizo reaccionar en presencia de *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) por 24 h, sin embargo,

aunque la reacción procedió no se consiguió separar a los diastereoisómeros (*R,R*)-**105a** y (*S,R*)-**105b** (Esquema 26).



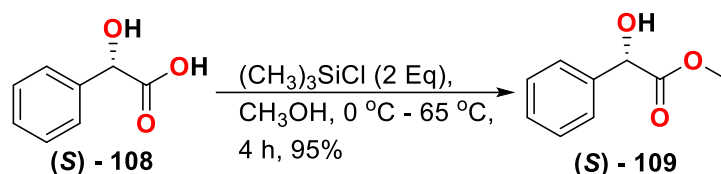
**Esquema 26.** Acoplamiento de **88b** con (*R*)-pantolactona **104**.



**Esquema 27.** Mecanismo de acoplamiento de **88b** con (*R*)-pantolactona **104**.

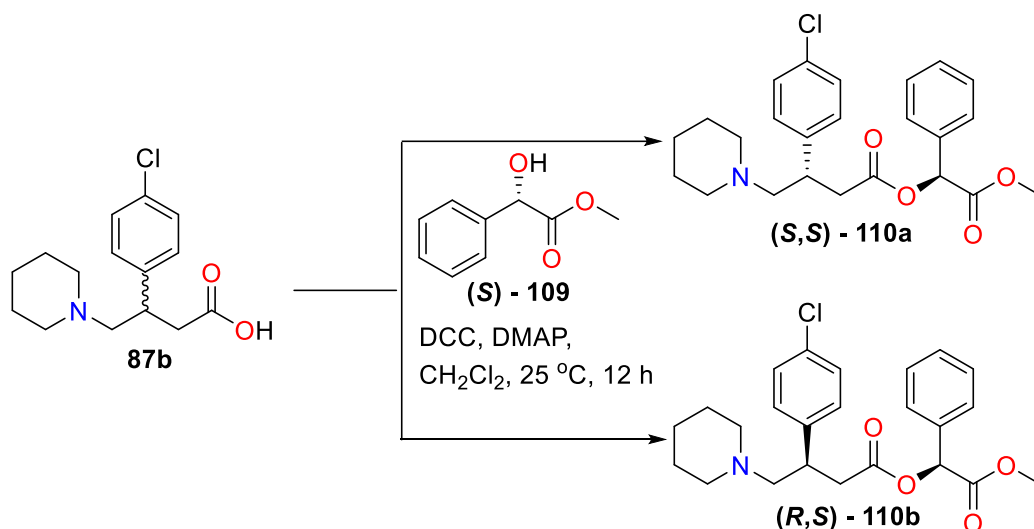
El acoplamiento con DCC y DMAP es un método eficiente para la formación de ésteres, el mecanismo comienza por la activación del grupo carbonilo de **88b** por la DCC para formar el intermediario de O-acilurea **106**, este intermediario es susceptible al ataque nucleofílico de la DMAP que actúa como un nucleófilo más fuerte que el alcohol lo que acelera la reacción para formar una amida reactiva **107**. Este intermedio reacciona rápidamente con **104** para generar los ésteres (*R,R*)-**105a** y (*S,R*)-**105b**.

Por otra parte **87b** se hizo reaccionar con (*S*)-mandelato de metilo<sup>57</sup> **109** (Tabla 24), mismo que se obtuvo primeramente por la esterificación del (*S*)-ácido mandélico **108** (Esquema 28).



**Esquema 28.** Esterificación del ácido mandélico **107**.

**Tabla 24.** Condiciones de reacción para la esterificación de **87b**.

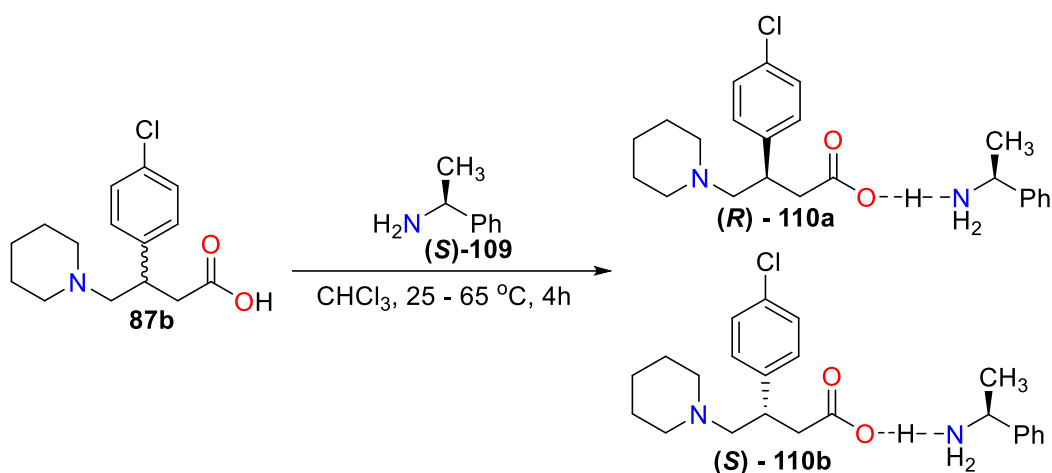


Entrada	Eq (DCC / DMAP)		Eq (( <i>S</i> )-109)	Rendimiento
1	2.0	2.0	1	No determinado
2	2.0	2.0	0.95	No determinado
3	1.1	1	0.95	No determinado

Una vez obtenido el compuesto (*S*)-**109**, se realizaron las primeras pruebas (Tabla 24) para generar los diastereoisómeros (*S,S*)-**110a** y (*R,S*)-**110b**, en donde (*S*)-**109** se hizo reaccionar

en presencia de DCC y DMAP por 12 h, sin embargo, aunque se observó el consumo total de **87b**, la purificación de los diastereoisómeros resultó compleja, debido a que la dicitclohexilurea formada en la reacción como subproducto fue difícil de remover.

Uno de los métodos clásicos para la resolución de mezclas racémicas es el empleo de la (*S*)- $\alpha$ -feniletilamina **109** (*S*)-FEA, seguida de la cristalización fraccionada de las dos sales diastereoméricas formadas, siendo un método ampliamente reportado en la literatura.<sup>58,59,60,61</sup> De acuerdo a esta estrategia, se procedió a hacer reaccionar **87b** con (*S*)-FEA **109**, para formar las sales diastereoméricas (*R*)-**110a** y (*S*)-**110b** (Esquema 29).



**Esquema 29.** Formación de sales diastereoméricas de **110b** con (*S*)-FEA **109**.

La separación de las sales diastereoméricas se realizó mediante recristalización de las mismas a 0 °C en  $\text{CHCl}_3$ , sin embargo, no se lograron separar las sales formadas.

#### 4.7. Pruebas preliminares de inhibición enzimática sobre GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens* de los análogos sintetizados.

Las pruebas de inhibición enzimática se realizaron en colaboración con el grupo de investigación del Dr. José Guadalupe Trujillo Guevara y el Dr. Juan Alberto Guevara Salazar de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. El estudio estableció como sitio blanco la enzima GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens*, debido a que proporciona resultados comparables a los de GABA-AT humana al conservarse el sitio de unión de la enzima. Este ensayo está basado en la reacción del esquema 1.



El principio de la prueba enzimática está fundamentado en el cambio en la absorbancia a 340 nm, correspondiente a la formación de NADPH a partir de NADP<sup>+</sup> a 25°C y pH= 8.6, que es proporcional a la actividad de GABA-AT. De tal manera que al hacer pruebas con compuestos que pudieran actuar como inhibidores enzimáticos, lo que se espera es que disminuya la formación de NADPH en consecuencia a la reducción de la actividad enzimática. Para esto fue necesario llevar a cabo un estudio exploratorio a una concentración de 0.8 mM de los inhibidores sintetizados y determinar el potencial inhibitorio de cada uno, además fue necesario preparar las disoluciones stock de los reactivos que a continuación se mencionan:

- A. Solución buffer de K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1 M a pH= 8.6 en H<sub>2</sub>O desionizada, ajustando el pH con HCl concentrado.
- B. Solución buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.075 M a pH=7.2 con 25% v/v de glicerol, ajustando el pH con KOH 3.0 M.
- C. Solución stock de GABA 0.016 M para las pruebas de potencial inhibitorio y de 0.128 M para la inhibición enzimática en buffer de K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
- D. Solución stock de ácido 2-cetoglutarico 0.04 M.
- E. Solución stock de β-NADP<sup>+</sup> 0.05 M en H<sub>2</sub>O desionizada.
- F. GABA-AT 3.14 mg de sólido/mL en buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (solución B), equivalente a 1.1618 U capaces de convertir 1.1618 μmol de GABA a semialdehído succínico y luego a succinato, con una reducción estequiométrica de 1.1618 μmol de NADP<sup>+</sup>.
- G. Soluciones stock de inhibidores de la serie **86a-f**, **87b-f**, **88a-f** y vigabatrina **2** a concentraciones de 0.008 M para la prueba de inhibición preliminar y a concentraciones de 0.020, 0.010, 0.005 y 0.0025 M para los estudios de inhibición enzimática, estas últimas obtenidas por dilución sucesiva de la disolución 0.020M en buffer de K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (solución A).

En la Tabla 25 se presentan las concentraciones iniciales (stock) de cada reactivo preparado (en mM) y las concentraciones finales en el experimento de cada reactivo en una disolución final de 700 μL:

**Tabla 25.** Concentración inicial (stock) y final (en el experimento) de las soluciones C-G.

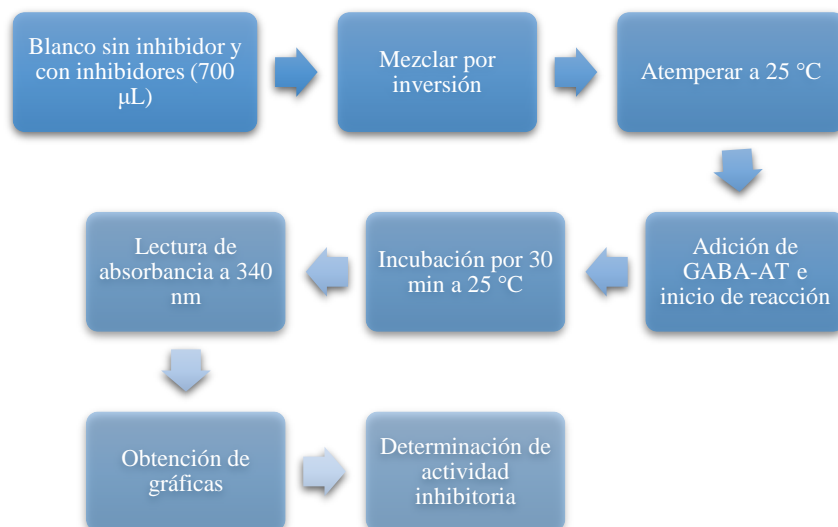
Solución	C	C'	D	E	F	G				
[mM] inicial	16	128	40	50	3.14 mg/mL	2.5	5	8	10	20
[mM] final	0.8	6.4	2.0	1.25	0.0209 mg	0.25	0.5	0.8	1.0	2.0

En la tabla 26 se muestran las proporciones volumétricas utilizadas de los reactivos para realizar las pruebas preliminares de inhibición enzimática y los estudios cinéticos de los compuestos que presentaron mayor inhibición de la enzima, para ello se prepararon soluciones por triplicado para cada concentración, con la finalidad de obtener un buen análisis estadístico de los resultados.

**Tabla 26.** Proporción volumétrica requerida en presencia y ausencia de inhibidor.

	BLANCO SIN INHIBIDOR, $\mu\text{L}$ (0.25, 0.5, 0.8, 1.0 y 2.0 mM)	INHIBIDOR $\mu\text{L}$ (0.25, 0.5, 0.8, 1.0 y 2.0 mM)
Buffer $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$	607.84	537.84
Ácido 2-cetoglutarico	35	35
GABA	35	35
Inhibidor (2, 86a-f, 87b-f, 88a-f y 111)	-----	70
$\beta\text{-NADP}^+$	17.50	17.50
GABA-AT	4.66	4.66
Volumen final en el experimento	700	700

Las disoluciones fueron mezcladas por inversión y mantenidas a una temperatura constante de 25°C, posteriormente se adicionó el volumen requerido de GABA-AT y se mezcló nuevamente por inversión, con un tiempo de incubación de 30 min. Posteriormente, se registró la absorbancia de cada solución a una  $\lambda_{\text{máx}}$  de 340 nm (Esquema 30).



**Esquema 30.** Procedimiento seguido para determinar actividad inhibitoria.

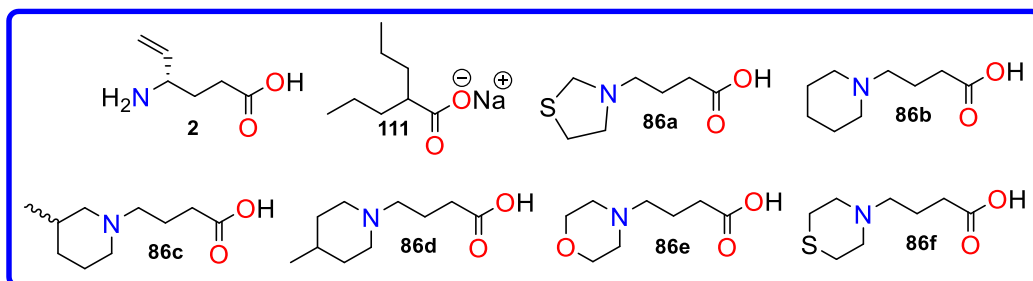
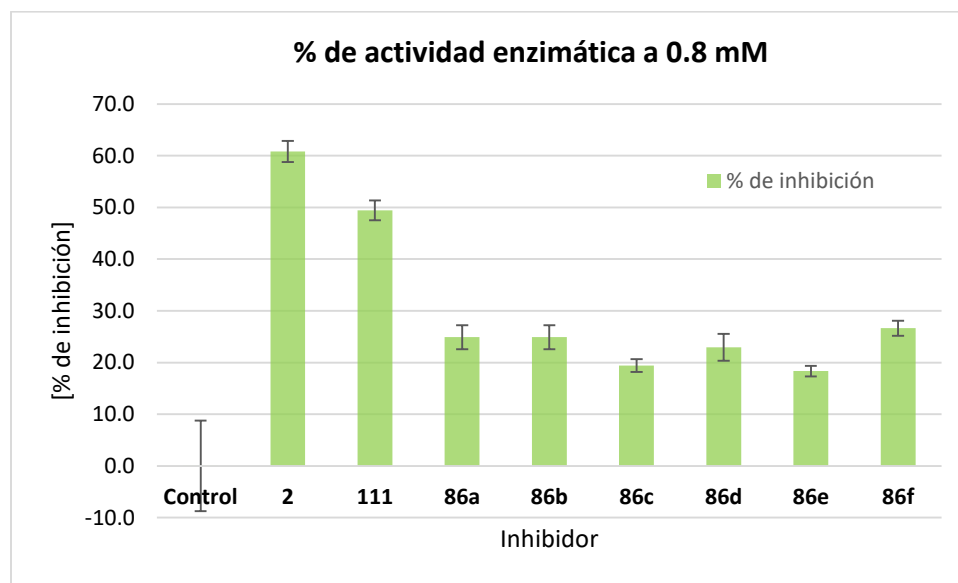
#### 4.7.1. Pruebas preliminares de inhibición enzimática.

Se efectuaron pruebas preliminares para determinar el potencial inhibitorio de los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88b-e** en comparación con el control positivo vigabatrina **2** y valproato de sodio **111** a una concentración final de 0.8 mM, utilizando las proporciones volumétricas establecidas en la Tabla 26 y las mismas condiciones de temperatura y longitud de onda, obteniendo las siguientes lecturas promedio de absorbancia para cada experimento. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA).

Para la obtención de las Gráficas 1, 2 y 3, se tomó el valor promedio de absorbancia mostrado en cada experimento, correspondiente a la formación de NADPH a partir de NADP<sup>+</sup> que es proporcional a la actividad de GABA-AT, la absorbancia promedio del grupo control representa el 100% de actividad catalítica, es decir, la conversión de GABA ( $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ ) a semialdehído succínico transformado por la GABA-AT, por lo que un valor inferior al del control representa un determinado porcentaje de inhibición de la enzima para cada inhibidor (vigabatrina **2**, valproato de sodio **111** y los análogos sintetizados) estudiado.

A partir de las gráficas es posible deducir que la **2** y valproato de sodio **111** tienen una actividad promedio del  $60\% \pm 2.05$  y  $49\% \pm 1.91$  de inhibición de la actividad catalítica de la enzima. En este mismo orden, y de acuerdo a la gráfica 1 los análogos de GABA presentan

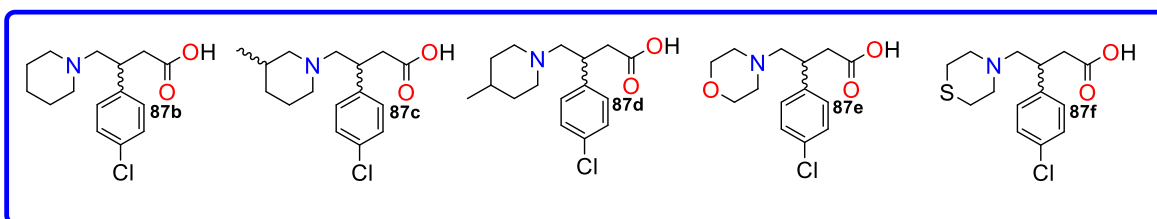
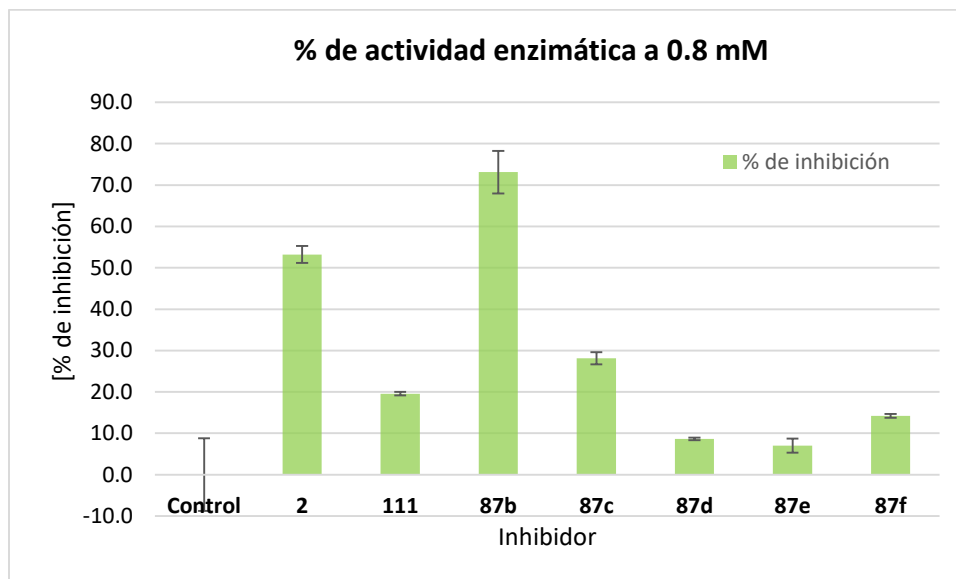
un 20% - 26% de inhibición máxima, y aunque comprueban ser inhibidores, estos no son comparables con **2** y **111**.



Control EEM  $\pm 8.76$ , **2** EEM  $\pm 2.05$ , **111** EEM  $\pm 1.91$ , **86a** EEM  $\pm 2.31$ , **86b** EEM  $\pm 2.31$ , **86c** EEM  $\pm 1.23$ , **86d** EEM  $\pm 2.58$ , **86e** EEM  $\pm 1.04$ , **86f** EEM  $\pm 1.45$ .

**Gráfica 1.** Estudio preliminar de potencial inhibitorio de los análogos **86a-f**.

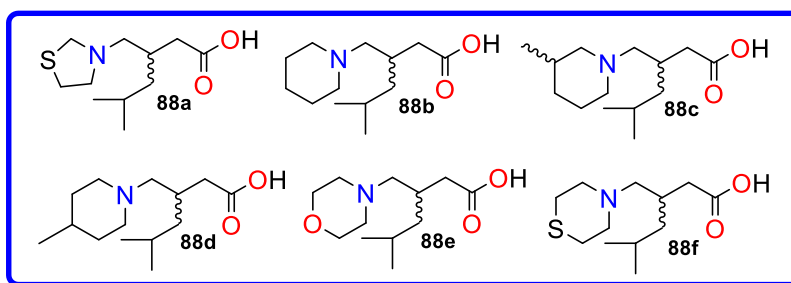
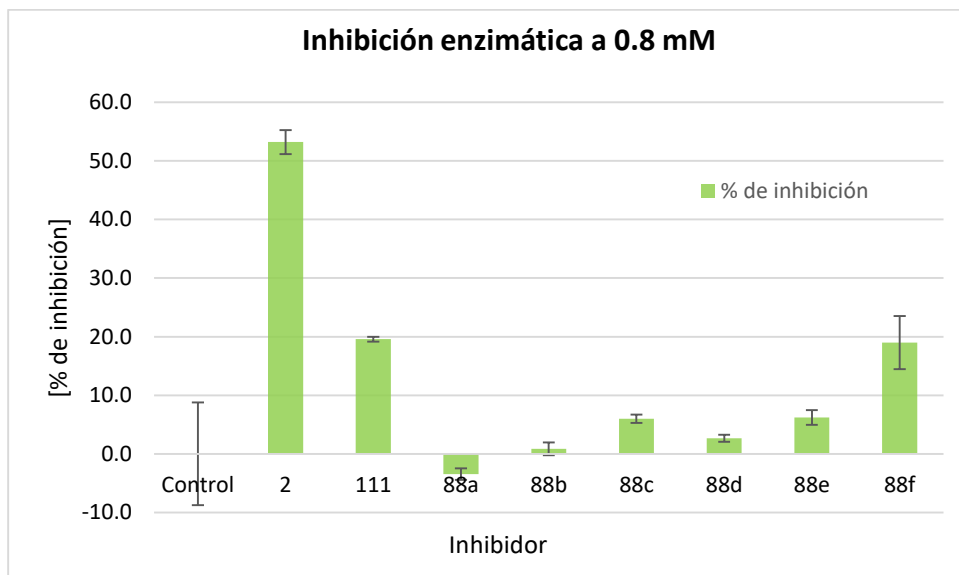
Un análisis similar de la gráfica 2 mostró que el análogo **87b** presentaba un  $73\% \pm 5.16$  de inhibición enzimática, mejor que vigabatrina **2**  $53\% \pm 2.05$ , al realizar un segundo estudio por triplicado el análogo **87b** continuó mostrando el mismo porcentaje de inhibición, mientras que el resto de los inhibidores de la serie evaluados presentaron porcentajes de inhibición de 8% - 30%, inferiores a los valores de vigabatrina **2** y valproato de sodio **111**.



Control EEM  $\pm 8.76$ , **2** EEM  $\pm 2.05$ , **111** EEM  $\pm 0.42$ , **87b** EEM  $\pm 5.16$ , **87c** EEM  $\pm 1.46$ , **87d** EEM  $\pm 0.31$ , **87e** EEM  $\pm 1.72$ , **87f** EEM  $\pm 0.43$ .

**Gráfica 2.** Estudio preliminar de potencial inhibitorio de los análogos **87b-f**.

En este mismo sentido tenemos que los análogos **88a-e** (Gráfica 3) tienen porcentajes de inhibición menores a vigabatrina **2** y valproato de sodio **111**, solo el análogo **88f** presentó un porcentaje de inhibición  $14.2\% \pm 4.54$ .



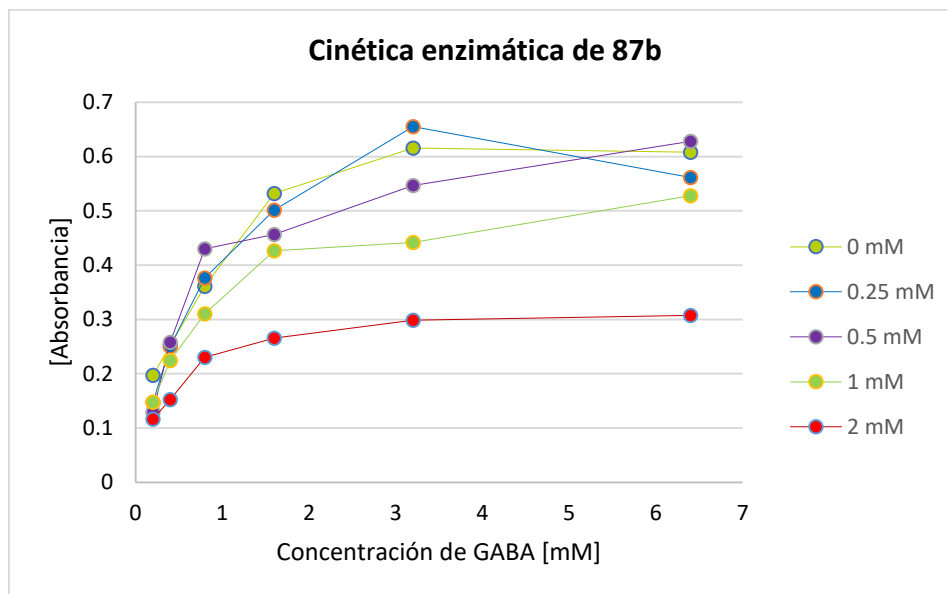
Control EEM  $\pm 8.76$ , **2** EEM  $\pm 2.05$ , **111** EEM  $\pm 0.42$ , **88a** EEM  $\pm 0.98$ , **88b** EEM  $\pm 1.09$ , **88c** EEM  $\pm 0.71$ , **88d** EEM  $\pm 0.61$ , **88e** EEM  $\pm 1.23$ , **88f** EEM  $\pm 4.54$ .

**Gráfica 3.** Estudio preliminar de potencial inhibitorio de los análogos **88a-f**.

Con los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de inhibición enzimática, se decidió que el análogo **87b** era el candidato ideal para realizar el estudio de inhibición enzimática completa evaluando diferentes concentraciones del inhibidor: 2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 mM.

4.7.2. Estudio de cinética enzimática del análogo **87b**.

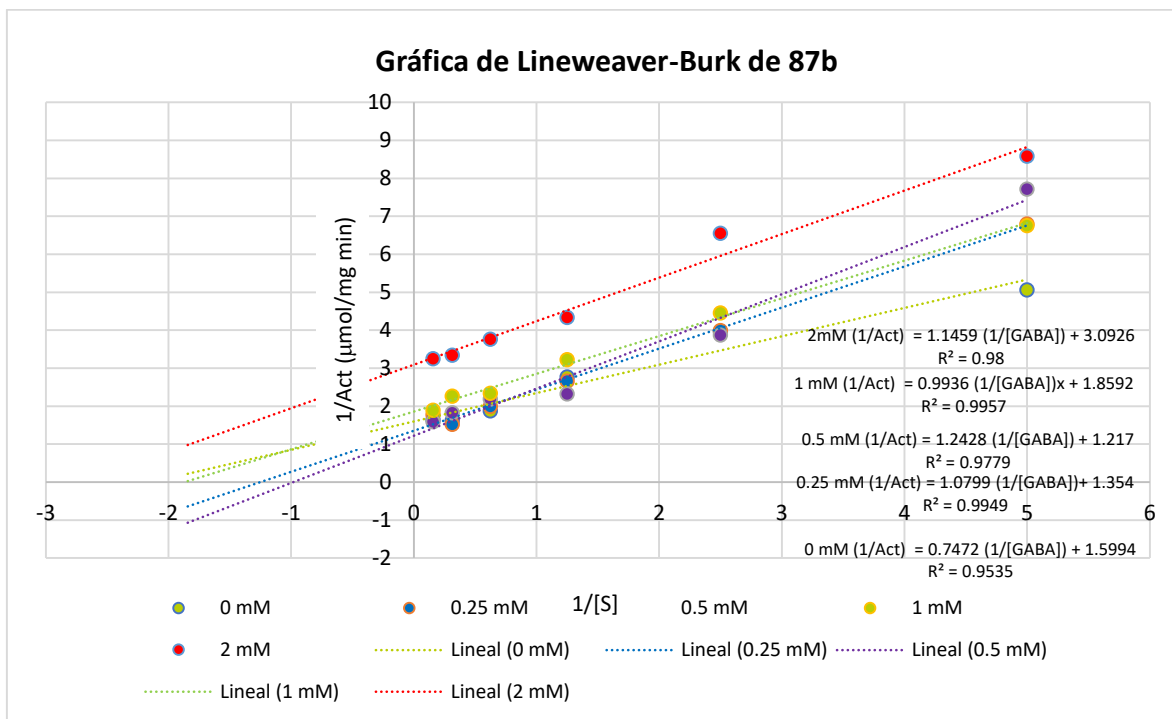
Debido al alto potencial inhibitorio que mostro el análogo **87b** en las pruebas a la concentración de 0.8 mM, **87b** fue evaluado a diferentes concentraciones (0.25 mM, 0.5 mM, 1.0 mM y 2.0 mM) contra diferentes concentraciones de GABA (0.2 mM, 0.4 mM, 0.8 mM, 1.6 mM, 3.2 mM, 6.4 mM) por cuadruplicado, en donde el eje (y) representa los valores promedio de absorbancia observados.



**Gráfica 4.** Actividad catalítica del inhibidor **87b**.

Nuestro blanco a 0 mM nos representa la actividad catalítica de la GABA-AT en ausencia de inhibidor, es decir, la conversión máxima de GABA ( $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ ) que se transforma a semialdehído succínico por acción de la GABA-AT. Al igual que en las inhibiciones preliminares se espera que la actividad enzimática de GABA-AT disminuya conforme aumentan las concentraciones del inhibidor (0.25 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM), es decir que exista una disminución en el valor de absorbancia experimental observado.

Estos valores de absorbancia obtenidos fueron importantes para la determinar el tipo de inhibición que se presenta con **87b** y es que se han descrito varios métodos gráficos para determinar el modo de inhibición de una molécula en particular. De estos, el diagrama de Lineweaver-Burk, es el medio más sencillo para determinar el modo de inhibición, en este una doble gráfica recíproca grafica el valor de la velocidad recíproca en función de la concentración de sustrato recíproco para producir, en la mayoría de los casos, una línea recta. La superposición de las líneas recíprocas dobles para una reacción enzimática llevada a cabo a varias concentraciones fijas de inhibidor producirá un patrón de líneas que es característico de un tipo de inhibidor particular.<sup>62</sup> El gráfico de Lineweaver-Burk de **87b** se muestra en la gráfica 5.



**Gráfica 5.** Doble recíproco de Lineweaver-Burk del inhibidor **87b**.

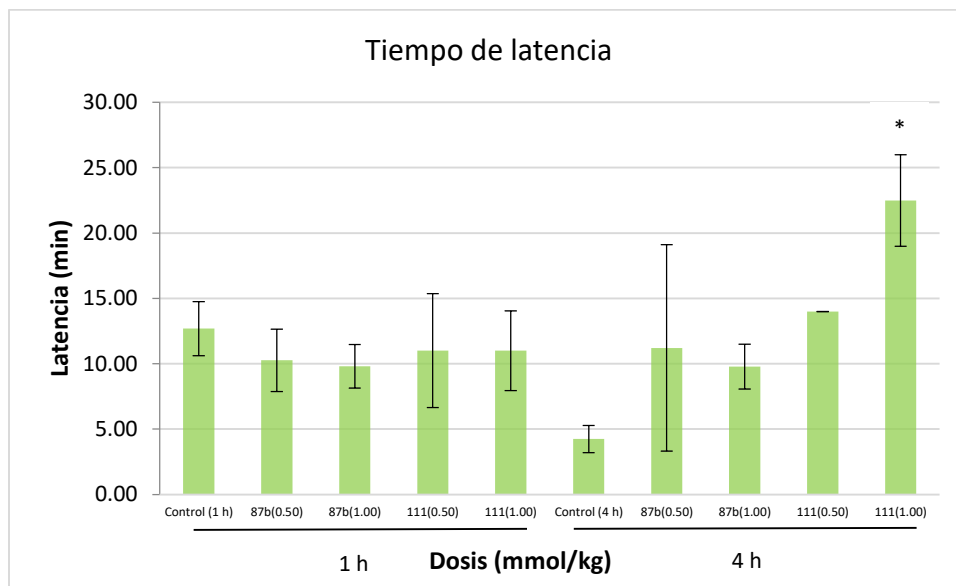
A partir de los patrones de líneas observados, la gráfica 5 mostró que **87b** presentaba dos tipos de inhibiciones, siendo inhibición competitiva a bajas concentraciones e inhibición no competitiva a concentraciones más elevadas.

#### 4.7.3. Estudio *in vivo* del análogo **87b**.

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando ratones CD1 en dos tiempos diferentes de pretratamiento con **87b** y valproato de sodio **111**, que fueron de 1 y 4 h antes de la administración de pentilentetrazol (PTZ). Los resultados obtenidos en estas pruebas consistieron en el análisis de la latencia en el primer ataque, el número de ataques generados en el período de observación y la protección contra la muerte.

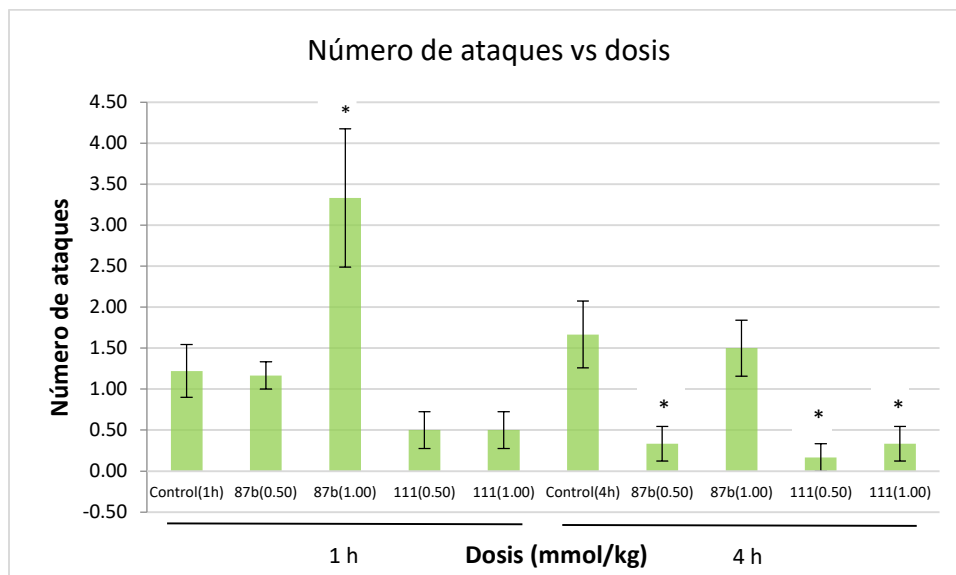
Los experimentos de latencia en el primer ataque del compuesto **87b** y **111** se realizaron con pretratamiento de 1 h y 4 h previo a la administración de pentilentetrazol (PTZ), en relación al experimento llevado a 1 h el compuesto **87b** y **111** con respecto al control no mostraron una diferencia significativa, es decir, al menos a las dosis probadas no hay cambios en el tiempo de generación de la primera convulsión (Gráfica 6). Al analizar los resultados a las 4 h de pretratamiento se observó que **87b** presentó una ligera tendencia al incrementar el número de convulsiones, mientras que con **111** esta tendencia fue mayor.





**Gráfica 6.** Tiempo de latencia del compuesto **87b** en comparación con **111** a diferentes dosis (0.50 y 1.00 mmol / kg) a 1 y 4 h de pretratamiento. \* $p < 0.05$ : diferencia significativa al comparar el grupo de control con **87b** y **111** como grupo de control positivo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba de rango múltiple de Duncan (análisis de medias de Duncan).

Por otra parte, se contó el número de convulsiones que presentaron cada uno de los ratones por cada grupo de experimentación, con el propósito de observar la actividad anticonvulsiva a través de la disminución del número de las mismas, con lo que se observó que a la dosis de 1.00 mmol/kg de **87b** no disminuyó el número de convulsiones, sino que aumentaron de manera significativa, mientras que a la dosis de 0.50 mmol/kg no hubo diferencia significativa comparado con el grupo control. En el caso de las dosis probadas con **111** tampoco hubo diferencia significativa; sin embargo, los resultados muestran una tendencia hacia la disminución del número de convulsiones (Gráfica 7). En el caso del número de ataques generados durante el tiempo de observación, en primer lugar, se observó la disminución esperada en el número de ataques con **111**. Sin embargo, en el caso del compuesto **87b**, hay una disminución muy clara en el número de ataques a una dosis de 0.5 mmol/kg. Por otro lado, con una dosis de 1.00 mmol/kg, no hay diferencia con el grupo control, es decir, el compuesto **87b** no tiene un efecto protector, al menos en la dosis más alta contra el número de convulsiones (Gráfica 7). La tabla 27 muestra algunos parámetros de la actividad anticonvulsiva en este modelo.

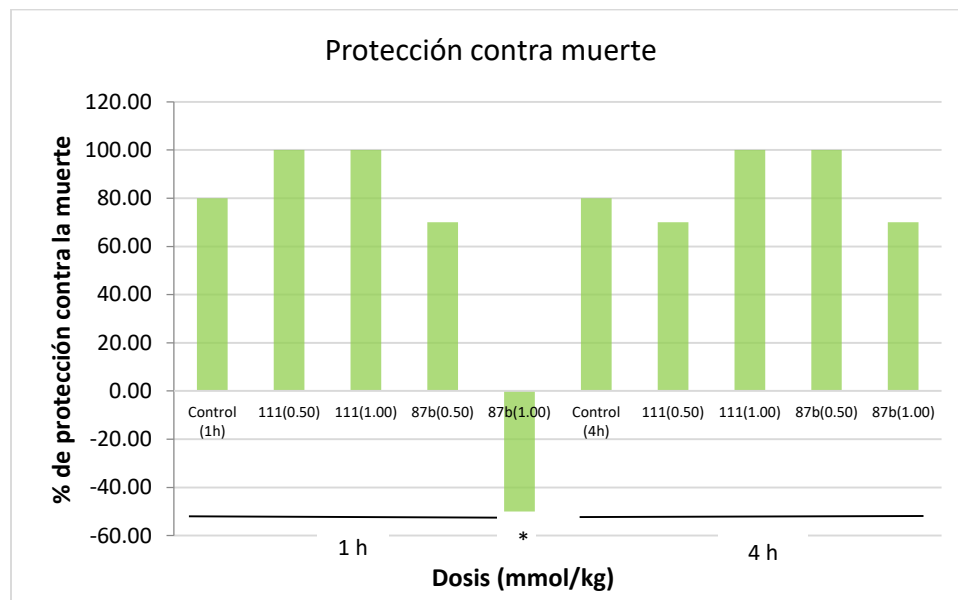


**Gráfica 7.** Número de ataques tónico-clónicos provocados por el compuesto **87b** en comparación con **111** en diferentes dosis (0,5 y 1,00 mmol/kg) a 1 hora y 4 horas de pretratamiento. \* $p < 0.05$ : diferencia significativa al comparar el grupo de control con **87b** y **111** como grupo de control positivo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba de rango múltiple de Duncan (análisis de medias de Duncan).

**Tabla 27.** Parámetros de actividad anticonvulsiva de los compuestos **87b** y **111** en el modelo de convulsiones inducidas por PTZ. \* $p < 0.05$ .

Dosis (mmol/kg)	Pretratamiento (h)	Latencia +- DES (min)	Número de ataques +- DES
<b>Control</b>	<b>1</b>	12.69 ± 2.06	1.22 ± 0.32
<b>87b (0.50)</b>		10.27 ± 2.38	1.16 ± 0.16
<b>87b (1.00)</b>		9.81 ± 1.67	3.33 ± 0.84*
<b>111 (0.50)</b>		11.00 ± 4.36	0.50 ± 0.22
<b>111 (1.00)</b>		11.00 ± 3.06*	0.50 ± 0.22
<b>Control</b>	<b>4</b>	4.24 ± 1.03	1.66 ± 0.40
<b>87b (0.50)</b>		11.22 ± 7.89	0.33 ± 0.21*
<b>87b (1.00)</b>		9.79 ± 1.72	1.50 ± 0.34
<b>111 (0.50)</b>		14.00	0.16 ± 0.16*
<b>111 (1.00)</b>		22.50 ± 3.50	0.33 ± 0.21*

Finalmente, con respecto a la protección contra la muerte, **111**, en ambas dosis, protege contra la acción letal de la PTZ, mientras que en el caso del compuesto **87b**, existe una protección a una dosis de 0.5 mmol/kg; a una dosis de 1.00 mmol/kg, la acción letal aumenta significativamente (Gráfica 8). Finalmente, ni **111** ni **87b** tienen una diferencia significativa, es decir, prácticamente ningún animal muestra un efecto letal desde el punto de vista estadístico (Tabla 27).



**Gráfica 8.** Porcentaje de protección contra la muerte del compuesto **87b** en comparación con **111** a diferentes dosis (0.50 y 1.00 mmol/kg) a 1 h y 4 h de pretratamiento. \* $p < 0.05$ : diferencia significativa al comparar el grupo de control con **87b** y **111** como grupo de control positivo. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher.

Es muy importante mencionar que el compuesto **87b** presenta un comportamiento atípico o no dependiente de la dosis, y eso ocurre sobre todo a la dosis más alta (1.00 mmol/kg) para los experimentos a 1 h y 4 h de pretratamiento antes de la administración de PTZ. En los resultados del número de convulsiones, **87b** en lugar de disminuirlas las aumentó cuando el pretratamiento es de 1 h, cuando es a 4 h a la misma dosis no existió diferencia con el control; sin embargo, en la dosis de 0.50 mmol/kg hay una clara tendencia hacia la disminución de las mismas, este fenómeno probablemente se deba a una respuesta bifásica u hormesis que en muchas sustancias con actividad biológica se ha presentado.<sup>63,64,65,66,67</sup>

#### 4.8. Estudios de relación cuantitativa estructura-actividad.

Con la finalidad de entender la actividad biológica presentada por los análogos sintetizados, se procedió a realizar los estudios de relación cuantitativa estructura-actividad y de acoplamiento molecular, dichos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. Rodrigo Said Razo Hernández del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM. Este estudio busca comprender el mecanismo biológico de nuestros compuestos y conocer que enantiómero mostrará la mayor probabilidad de ser la forma biológicamente activa. Por lo tanto, se emplearon descriptores moleculares geométricos y de carga para la construcción de los modelos QSAR; estos descriptores son sensibles a la posición espacial de los átomos en la molécula y nos permitieron estudiar ambos enantiómeros de cada compuesto. Por lo tanto, la inclusión de al menos uno de estos descriptores en el modelo QSAR final fue un requisito. El mejor modelo matemático que correlaciona el porcentaje de inhibición (Y) de los análogos de GABA con sus descriptores moleculares, fue validado por las reglas de redundancia, quik, sobreajuste y  $Q_{asintótica}^2$ . La ecuación obtenida con los enantiómeros (S) fue la siguiente:

$$Y = 1624.02548[RCI] - 394.09487[HOMT] + 0.4927[T(O \dots S)] + 34.48134[TI2] - 99.99144 \quad (1)$$

$$R^2 = 86.96 \quad Q_{LOO}^2 = 73.03 \quad s = 4.54 \quad F = 21.3 \\ \Delta K = 0.003(0.0) \quad \Delta Q = 0.075(-0.005) \quad R^P = 0.356(0.1) \quad R^N = -0.217(-0.24)$$

Por lo tanto, los descriptores moleculares de los análogos de GABA sintetizados que se relacionan con la inhibición de la GABA-AT son: el índice de Jug RC, el índice de aromaticidad del modelo de oscilador armónico (RCI y HOMAT respectivamente) que pertenecen a la familia de descriptores geométricos. Además, en este modelo matemático, se incluye la suma de la distancia topológica entre los átomos de oxígeno y azufre (O...S) y el segundo índice de Mohar (T (O...S) y TI2 respectivamente) de la familia de descriptores topológicos (Tabla 28). Además, se muestran los valores experimentales de inhibición de los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88a-f** (Y) y los valores pronosticados por el modelo QSAR ( $Y_{pred}$ ) de los derivados de GABA.

**Tabla 28.** Valores de los descriptores moleculares, % de inhibición experimental de los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88a-f** (Y) y la predicción ( $Y_{pred}$ ) de análogos de GABA presentes en el modelo QSAR.

Análogo	$T(O..S)$	$TI2$	$HOMAT$	$RCI$	$Y$	$Y_{pred}$
<b>86a</b>	14	3.435	0	0	24.9	25.35
<b>86b</b>	0	3.483	0	0	24.9	18.62
<b>86c</b>	0	3.503	0	0	19.4	21.27
<b>86d</b>	0	3.532	0	0	22.9	21.8
<b>86e</b>	0	3.483	0	0	18.3	20.67
<b>86f</b>	16	3.483	0	0	26.5	29.65
<b>87b</b>	0	2.897	5.781	1.404	73	-
<b>87c</b>	0	3.08	5.747	1.408	28	27.46
<b>87d</b>	0	3.105	5.781	1.404	8.6	9.34
<b>87e</b>	0	2.897	5.771	1.404	7	5
<b>87f</b>	16	2.897	5.767	1.404	14.2	16.05
<b>88a</b>	14	2.755	0	0	-3.5	5.54
<b>88b</b>	0	2.95	0	0	0.84	2.06
<b>88c</b>	0	3.106	0	0	5.96	7.11
<b>88d</b>	0	3.135	0	0	2.64	9.2
<b>88e</b>	0	2.95	0	0	6.2	0.06
<b>88f</b>	16	2.95	0	0	16.8	6.31
<b>111</b>	0	2.02	0	0	40	-

En la ecuación (1),  $T(O..S)$  posee un coeficiente positivo que indica que si su valor aumenta, la inhibición de GABA-AT también aumentará.  $T(O..S)$  indica que la presencia de un átomo de azufre aumentará la actividad inhibitoria de los análogos de GABA, es decir, aumentar el valor de  $T(O..S)$  se correlaciona directamente con el tamaño de la molécula. Por lo tanto, aumentar la distancia entre estos dos átomos en un compuesto aumentará sus interacciones con la enzima GABA-AT. En cuanto a  $TI2$ , su coeficiente en la ecuación (1) es positivo, lo que indica que el aumento del tamaño y la forma esférica de la molécula aumentará su actividad inhibitoria.

Para el descriptor molecular de  $RCI$ , su coeficiente en la Ecuación (1) indica que, si el valor del descriptor de SPP aumenta, la inhibición de GABA-AT por los análogos de GABA también se incrementará.  $RCI$  se define como un índice de aromaticidad basado en la idea de corriente de anillo, cuya magnitud está determinada por su enlace más débil en el anillo.

El descriptor  $HOMAT$  depende del grado de conjugación de una molécula, así como del número total de enlaces  $\pi$ . De acuerdo con el signo de coeficiente en la ecuación 1 que

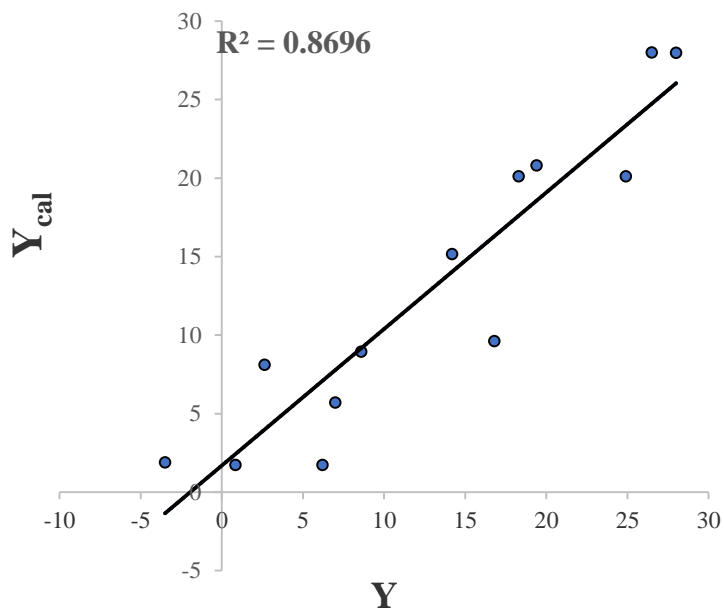
corresponde a este descriptor, si la aromaticidad molecular de los derivados de GABA aumenta, su actividad inhibitoria aumentará.

Los valores de % de inhibición de GABA-AT (Y), calculados y predichos por el modelo QSAR ( $Y_{cal}$  y  $Y_{pred}$ ) se presentan en la Tabla 29, además se muestran las diferencias del valor absoluto entre cada  $Y_{cal}$  y  $Y_{pred}$  y Y.

**Tabla 29.** Inhibición experimental de GABA-AT% (Y), calculada ( $Y_{cal}$ ) y predicha ( $Y_{pred}$ ) para los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88a-f**. También se muestran los valores residuales calculados y predichos ( $residual_{cal}$  y  $residual_{pred}$ ).

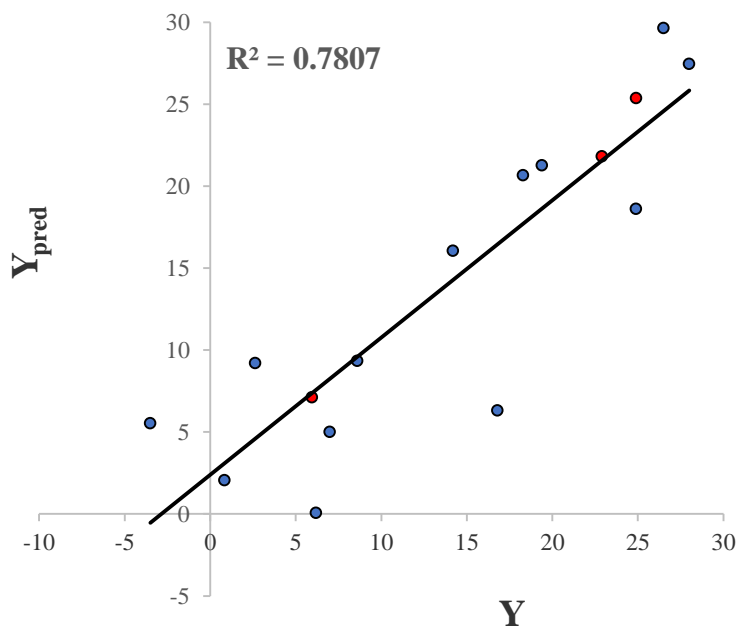
Análogo	Y	$Y_{cal}$	$Y_{pred}$	$Residual_{cal}$	$Residual_{pred}$
<b>86a</b>	24.9	-	25.35	-	0.45
<b>86b</b>	24.9	20.11	18.62	-4.79	-6.28
<b>86c</b>	19.4	20.8	21.27	1.4	1.87
<b>86d</b>	22.9	-	21.8	-	-1.1
<b>86e</b>	18.3	20.11	20.67	1.81	2.37
<b>86f</b>	26.5	27.99	29.65	1.49	3.15
<b>87b</b>	73	-	-	-	-
<b>87c</b>	28	27.98	27.46	-0.02	-0.54
<b>87d</b>	8.6	8.94	9.34	0.34	0.74
<b>87e</b>	7	5.71	5	-1.29	-2
<b>87f</b>	14.2	15.17	16.05	0.97	1.85
<b>88a</b>	-3.5	1.9	5.54	5.4	9.04
<b>88b</b>	0.84	1.73	2.06	0.89	1.22
<b>88c</b>	5.96	-	7.11	-	1.15
<b>88d</b>	2.64	8.11	9.2	5.47	6.56
<b>88e</b>	6.2	1.73	0.06	-4.47	-6.14
<b>88f</b>	16.8	9.61	6.31	-7.19	-10.49
<b>111</b>	40	-	-	-	-

Las moléculas que formaron parte del conjunto de prueba fueron: **86a**, **86d** y **86c**. De la Tabla 29. las moléculas **88a** y **88f** presentaron valores mayores de  $residual_{pred}$ , quizás, esto puede estar relacionado con el hecho de que son las únicas dos moléculas de esa serie que poseen un átomo de azufre en su estructura. Debido al valor residual de **87b** y **111**, estos compuestos se consideraron valores atípicos; ya que su valor es más de tres veces el valor de la desviación estándar. La correlación lineal de  $Y_{cal}$  vs Y con  $R^2=0.87$  se muestra en la gráfica 9.



**Gráfica 9.** Correlación lineal entre  $Y_{cal}$  vs  $Y$ .

La capacidad predictiva del modelo matemático se muestra en la gráfica 10, dado que se muestran todos los valores de inhibición de los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88a-f** obtenidos con la técnica de omisión (LOO) y las moléculas que pertenecen al conjunto de prueba (círculos de color rojo). El valor  $R^2=0.78$  indica que el modelo tiene un buen poder predictivo.



**Gráfica 10.** Correlación lineal de  $Y_{pred}$  vs  $Y$ . Los círculos de color azul y rojo representan las moléculas de entrenamiento y de prueba, respectivamente.

La evaluación de la capacidad predictiva del modelo QSAR se muestra en el anexo (Tabla S1). Las gráficas 9 y 10 muestran la capacidad descriptiva y predictiva del modelo QSAR. En términos generales, el modelo posee un poder descriptivo y predictivo respetable (basado en sus valores  $R^2$  y  $Q^2$ ). Además, los descriptores moleculares en este modelo pueden ayudar a explicar la actividad inhibitoria mostrada por los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88a-f**, en base a las propiedades que pueden ser importantes para la unión a la GABA-AT.

Dado que todos los descriptores moleculares incluidos en el modelo QSAR pueden estar relacionados con la interacción con GABA-AT (forma molecular, tamaño y carácter de aromaticidad), los resultados de acoplamiento son importantes para confirmar el poder descriptivo de nuestro modelo matemático QSAR.

#### 4.9. Estudio de acoplamiento molecular (Docking).

A través de estos estudios se identificaron los sitios alostéricos presentes sobre la enzima de GABA-AT, además del grado de afinidad de los inhibidores hacia la misma. De los 17 análogos sintetizados y evaluados, **87b** y **88f** son los inhibidores con mayor afinidad hacia la enzima de la GABA-AT.

Las estructuras tridimensionales de GABA aminotransferasa de humano y *P. fluorescens* no se encuentran disponible, por lo que se generaron los modelos de homología estructural correspondientes. La búsqueda de las estructuras de GABA aminotransferasa se realizó en el servidor del banco de datos de proteínas (PDB, Tabla 30) y se emplearon como plantillas estructurales. De acuerdo con la alineación de secuencias de GABA aminotransferasas, las de bacterias son similares entre ellas, y lo mismo ocurre para las GABA aminotransferasas de animales (humanos y cerdo).

Se empleó la estructura cristalográfica 4y0h de cerdo, en función de su resolución (1,63 Å) y la mayor secuencia de identidad (~ 95%). Por otra parte, el modelo de *P. fluorescens* se realizó utilizando la estructura cristalográfica 1sf2 de *E. coli*, debido a que presentó una mejor conservación (~74% de identidad).

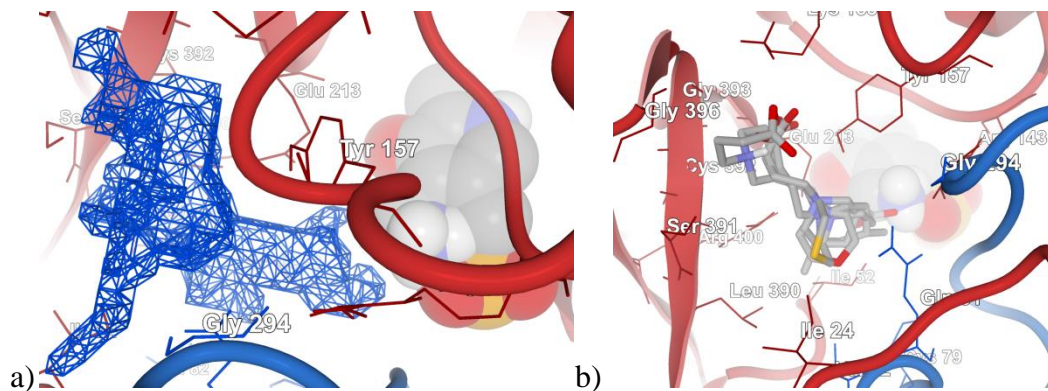


**Tabla 30.** Estructuras cristalinas de GABA aminotransferasa disponibles en el servidor PDB.

PDB_ID	Resolución (Å)	Organismo	% de identidad con respecto a la humana	% de identidad con respecto a <i>P. fluorescens</i>
<b>4zsw</b> <sup>68</sup>	1.70	<i>Cerdo</i>	95.46	27.52
<b>4y0h</b> <sup>69</sup>	1.63	<i>Cerdo</i>	95.46	27.52
<b>4y0i</b>	1.66	<i>Cerdo</i>	95.46	27.52
<b>1ohv</b> <sup>70</sup>	2.30	<i>Cerdo</i>	95.46	27.52
<b>1ohw</b> <sup>70</sup>	2.30	<i>Cerdo</i>	95.46	27.52
<b>1sf2</b> <sup>71</sup>	2.40	<i>E. coli</i>	26.35	73.82
<b>4ffc</b> <sup>72</sup>	1.80	<i>M. abscessus</i>	27.99	42.79

4.9.1. Acoplamiento molecular para el modelo GABA-AT de *Pseudomonas*.

Con el fin de explicar la inhibición de GABA-AT por los análogos de GABA, se realizó el acoplamiento molecular sobre el modelo de homología de *Pseudomonas*. Se analizó los cálculos del modelado molecular por medio de las estructuras de andamio (GABA **1**, baclofen **3** y pregabalina **4**) y considerando sus interacciones ligando-receptor igual y/o menores a 5 ángstroms (Å). En la figura 15 se muestra la forma de la cavidad en la que se realizaron todos los cálculos de acoplamiento, se puede observar que esta cavidad tiene forma de "Y", este hecho puede ayudar a explicar por qué los análogos de GABA (**86a-f**) fueron menos potentes, esto se ve reforzado por el hecho de que el descriptor molecular T(O...S) y TI2, relacionado con el tamaño molecular y que de acuerdo a nuestro modelo QSAR aumenta la actividad inhibitoria resulto ser el de valor más bajo para todos los análogos de GABA (**86a-f**) con respecto a las series de análogos de baclofen (**87a-f**) pregabalina (**88a-f**).

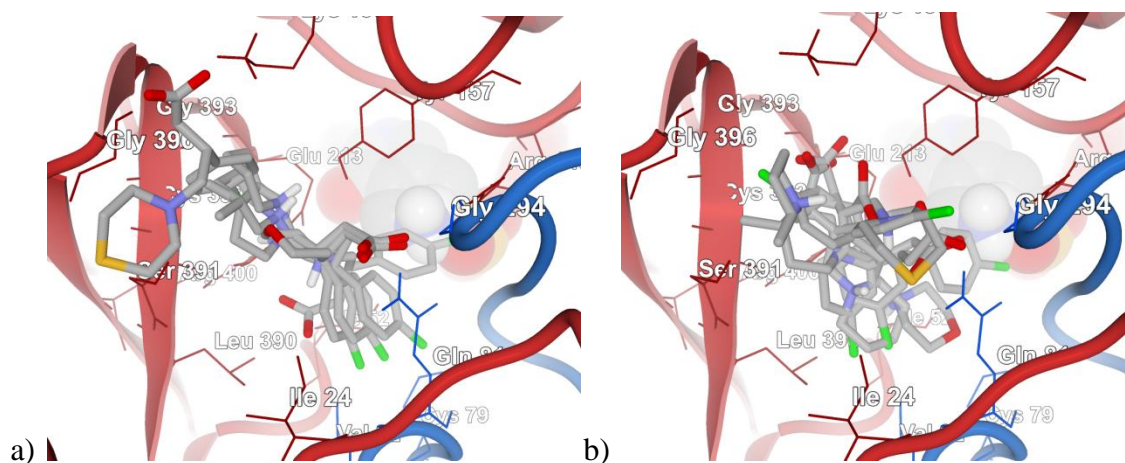


**Figura 15.** a) Forma de la cavidad (malla de color azul) del sitio catalítico de GABA-AT de *Pseudomonas*. b) Los análogos de GABA (**86a-f**) en el sitio catalítico de GABA-AT de *Pseudomonas*.

Debido a la forma lineal y tamaño de los análogos de GABA, estos no pueden interactuar fuertemente con la cavidad de GABA-AT (Figura 15 b). De hecho, son las moléculas que poseen menores energías de interacción (Anexos, Tabla S2). Todas estas moléculas se unen en una forma similar con su parte carboxílica orientada al PLP, con la excepción de **86f**. Además, forman enlaces de hidrógeno con la Lys 153 (a 2.6 Å, -2.5 kcal/mol), con la excepción de **86f** (Lys 270 a 2.59 Å, -2.48 kcal/mol) y **86a** (Arg 143 a 2.8, -1.16 kcal/mol). Esta diferencia en la forma de interacción puede estar relacionada con la presencia del átomo de azufre en su estructura, ya que **87f** y **88f** (que también poseen un átomo de azufre en su estructura) también interactúan de forma diferente que las otras moléculas.

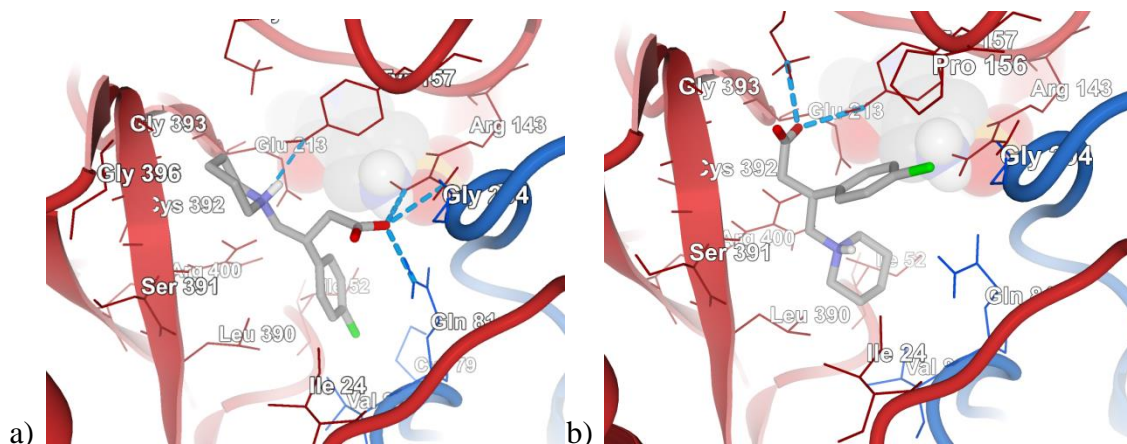
Los análogos de baclofen **87a-f** con configuración (*S*) poseen un mejor modo de unión a la GABA-AT (coincidente con los valores de energía de interacción, anexo, Tabla S2) que los de configuración (*R*) (Figura 16). Debido a su tamaño y forma, estas moléculas interactúan en la parte exterior del sitio catalítico, sin aproximar uno de sus grupos funcionales al PLP. Los análogos **87b-f** de configuración (*S*) interactúan de manera similar, con su grupo carboxílico a través de la formación de enlace de hidrógeno con Arg 143 (2.6 Å, -2.5 kcal/mol), a excepción del análogo **87f** que no forma enlaces de hidrógeno, mientras que únicamente el grupo amino de **87b** interactúa con Tyr 157 (3.39 Å, 0.79 kcal/mol), y el anillo de clorobenceno ubicada en la zona hidrofóbica del sitio catalítico formado por Ile 24, Ile 52, Val 82 y Cys 79.

Los análogos **87b-f** de configuración (*R*) interactúan diferente, de tal forma que el grupo carboxílico de **87b** lo hace con la Try 157 (2.89 Å, -1.78 kcal/mol), **87c** y **87f** no forma enlaces de hidrógeno, **87d** con Arg 143 (2.6 Å, energía: -2.75 kcal/mol) y **87e** con Arg 143 (2.6 Å, -2.49 kcal/mol) mientras que el grupo amino no forma enlaces de hidrógeno en ninguno de los análogos **87b-f** de configuración (*R*), y donde el átomo de oxígeno perteneciente al heterociclo de morfolina de **87e** interactúa con la Cys 79 (3.11 Å, -1.76 kcal/mol).



**Figura 16.** a) Los análogos **87a-f** de (*S*)-baclofen en el sitio catalítico de GABA-AT de *Pseudomonas*. b) Los análogos **87a-f** de (*R*)-baclofen en el sitio catalítico de GABA-AT de *Pseudomonas*.

En la figura 17 (se añaden los valores de energía de interacción (kcal/mol) de los análogos (*S*)-**87b** y (*R*)-**87b** se muestran las interacciones de las moléculas **87b** de configuración (*S*) y (*R*) con GABA-AT. La molécula (*S*)-**87b** se une de una mejor manera y más fuerte que el enantiómero (*R*)-**87b**, debido a la orientación más favorecida de los grupos amino (protonados) y carboxilato para generar interacciones de enlaces de hidrógeno con los residuos GABA-AT (Tyr 157 para amina y Arg 143 y Gln 81 para carboxilato).



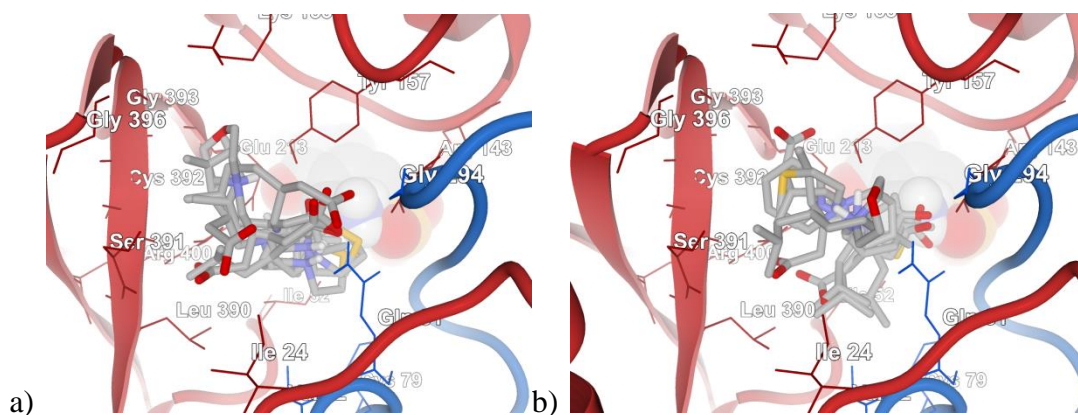
(S)-87b	(R)-87b
$E_t = -94.5623$ kcal/mol Ligando en paralelo con el PLP. No se observan interacciones tipo $\pi$ - $\pi$ del anillo aromático. <b>Enlaces de hidrógeno:</b> Gln 81(B, N-H): H--O a 2.69 Å, -2.5 Arg 143(B, =N-H): O-H a 2.6 Å, -2.5 Arg 143(B, -N-H): O-H a 3.09 Å, -1.83 Try 157(B): H-N a 3.39 Å, -0.79 <b>Electrostáticas:</b> Arg 143(B, =N-H): O-H a 2.6 Å, -3.06 Arg 143(B, -N-H): O-H a 3.09 Å, -2.16 <b>Interacciones estéricas:</b> Gln 81(A): --O a 3.05 Å, 1.54 Val 82(A): --Cl a 2.42 Å, 5.33 Ile 24(B): C (9) a 3.07 Å, 1.41 Ile 24(B): C (10) a 3.04 Å, 1.6 Glu 213(B): C (5) a 3.1 Å, 1.23 Gly 393(B): C (7) a 2.84 Å, 2.8	$E_t = -82.3833$ kcal/mol Ligando en paralelo con el PLP. No se observan interacciones tipo $\pi$ - $\pi$ del anillo aromático. <b>Enlaces de hidrógeno:</b> Try 157(B): H-O a 2.89 Å, -1.78 Lys 153(B): H-O a 2.84 Å, -0.34 <b>Electrostáticas:</b> Arg 400(B, =N-H): O-H a Å, -3.65 Glu 213(B, N-H): O-H 4.41 Å, 1.06 Lys 153(B): H-O a 2.84 Å, -5.11 Lys 153(B): H-O a 3.16 Å, -4.14 <b>Interacciones estéricas:</b> Glu 213(B): --O a 2.84 Å, 2.76 Tyr 157(B): C (9) a 3.07 Å, 1.38 Pro 156(B): -Cl a 2.74 Å, 3.39 Gly 294 (A): -Cl a 2.99 Å, 1.9 Ser 391(B): C (4) a 3.15 Å, 0.93 Ile 24(B): C (5) a 3.01 Å, 1.79 Val 82 (A): C (6) a 3.16 Å, 0.87

**Figura 17.** a) Interacciones del enlace de hidrógeno de (S)-87b (líneas punteada azules) con GABA-AT de *Pseudomonas*. b) Interacciones del enlace de hidrógeno de (R)-87b (líneas punteada azules) con GABA-AT de *Pseudomonas*. Energías de interacción en kcal/mol.

Para los análogos de **88a-f**, los enantiómeros (S) se unen de una mejor manera y similar que los enantiómeros (R) (Figura 18). Los enantiómeros (S) de **88a-e** orientan el grupo amino de la molécula hacia el PLP, de tal forma que solo el grupo amino de **88c** (3.13 Å, -2.31 kcal/mol) y **88d** (2.78 Å, -2.5 kcal/mol) interactúan con Glu 213 y el grupo carboxílico se orienta hacia la parte externa del sitio catalítico, con la excepción de **88f**. El carboxilato de estos enantiómeros interactúa formando enlaces de hidrógeno con Arg 143 (2.60 Å, -2.37

kcal/mol) en **88a**, con Arg 400 (2.3 Å, -3.9 kcal/mol) en **88b**, Gln (2.78 Å, -2.5 kcal/mol) en **88c**, Arg 400 (2.78 Å, -2.5 kcal/mol) en **88e** y Arg 143 (2.78 Å, -2.5 kcal/mol) en **88f**.

Los análogos de (*R*)-pregabalina poseen energías de interacción bajas en comparación con sus enantiómeros (*S*) (Anexos, Tabla S2). Los enantiómeros (*R*) de **88a-e** orientan el grupo amino de la molécula hacia el PLP, de tal forma que el grupo amino de **88a** (2.73 Å, -2.5 kcal/mol), y **88b** (3.06 Å, -2.5 kcal/mol) y **88f** (2.86 Å, -2.5 kcal/mol) interactúan con Glu 213. El carboxilato de estos enantiómeros interactúa formando enlaces de hidrógeno con Arg 143 (2.73 Å, -2.5 kcal/mol) en **88b**, Try 140 (2.76 Å, -2.5 kcal/mol) en **88c**, Try 157 (2.06 Å, -2.04 kcal/mol) en **88d**, Arg 400 (2.29 Å, -3.92 kcal/mol) en **88e** y Arg 143 (2.59 Å, -2.27 kcal/mol) en **88f**.



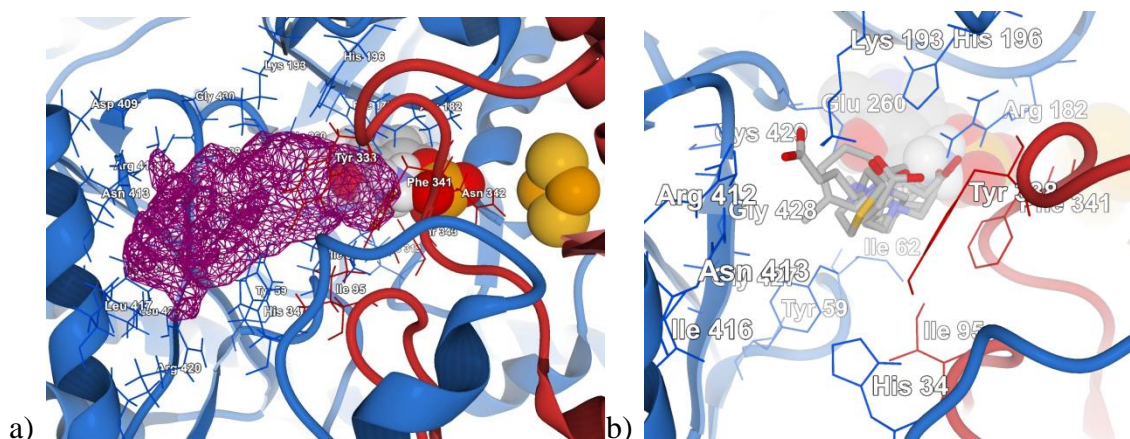
**Figura 18.** a) Los análogos **88a-f** de (*S*)-pregabalina en el sitio catalítico de GABA-AT de *Pseudomonas*. b) Los análogos **88a-f** de (*R*)-pregabalina en el sitio catalítico de GABA-AT de *Pseudomonas*.

#### 4.9.2. Acoplamiento molecular para el modelo GABA-AT humano.

Los estudios de acoplamiento molecular para el modelo de homología en GABA-AT humano se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Nina Pastor del Centro de Investigación en Dinámica Celular, se realizaron los cálculos de acoplamiento molecular de todos los análogos de GABA sintetizados para estudiar su interacción.

En la figura 19 se muestran las interacciones de enlace de todos los análogos de GABA sobre el modelo GABA-AT humano. Además, se muestra la forma de la cavidad en la que se realizaron todos los cálculos de acoplamiento. Se puede observar que esta cavidad posee un mayor volumen que el modelo de *Pseudomonas* y una forma diferente. Sin embargo, los

estudios han demostrado que las moléculas con mayor tamaño poseen los valores de energía de interacción más altos.

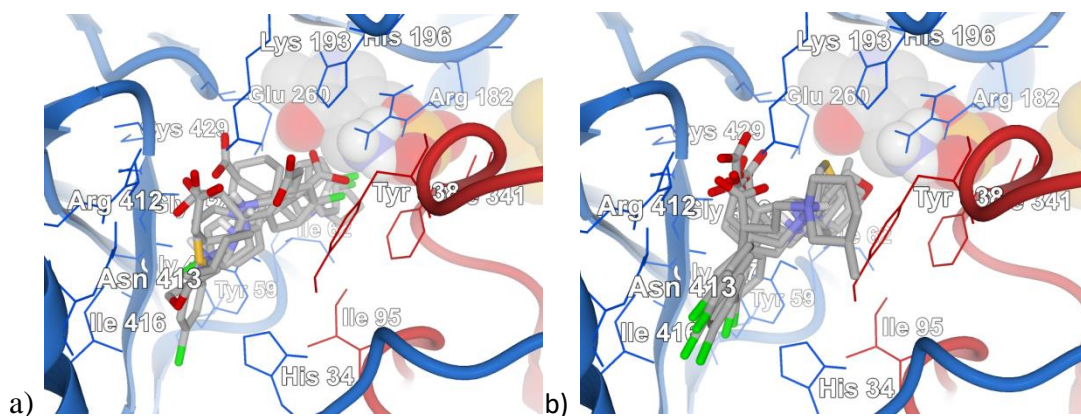


**Figura 19.** a) Forma de la cavidad (malla de color morado) del sitio catalítico GABA-AT humano. b) Los análogos **86a-f** de GABA en el sitio catalítico GABA-AT humano.

En la figura 19b se muestra la interacción de los análogos **86a-f** de GABA. El grupo carboxílico de moléculas **86c**, **86f** se orientan hacia la parte externa de la cavidad (hacia el disolvente), mientras que los análogos **86b**, **86d**, **86e** tienen su grupo amino cercano al PLP. Por otro lado, el carboxilato de **86b** interactúa formando enlaces de hidrógeno con Lys 193 (2.59 Å, -0.5 kcal/mol), **86c** con Arg 182 (2.63 Å, -2.18 kcal/mol), **86d** con Glu 260 (2.85 Å, -2.5 kcal/mol), **86e** con Lys 193 (2.6 Å, -2.01 kcal/mol) y Thr 343 (3.34 Å, -1.28 kcal/mol) por medio del átomo de oxígeno de la morfolina y **88f** con Thr 343 (3.32 Å, -1.35 kcal/mol). Por otra parte, únicamente el grupo amino de **86d** interactúa con Glu 260 (2.85 Å, -2.5 kcal/mol) y de **86f** Glu 260 (2.6 Å, -2.5 kcal/mol).

La figura 20 muestra a los análogos de baclofen, su interacción con GABA-AT humana fue muy similar, su grupo carboxílico se encuentra orientado a la zona positiva del sitio catalítico de la cavidad. Los análogos de configuración (*S*) de **87b**, **87c** y **87e** orientaron la amina heterocíclica al PLP, mientras que en los análogos **87d** y **87f** orientaron el clorobenceno hacia el PLP. El grupo carboxílico de **87b**, **87d**, **87e** y **87f** interactúan a través de la formación de enlace de hidrógeno con Lys 193 (2.59 Å, -1.98 kcal/mol) mientras que **87c** con Arg 182 (2.59 Å, -1.84 kcal/mol), mientras que el grupo amino no formo enlaces de hidrogeno en ningún caso. Por otro lado, todos los análogos de (*R*)-baclofen se unen de manera similar, interactuando su parte de clorobenceno de la molécula con Ile 416 residual, mientras tanto

su grupo amino está orientado hacia el PLP. El grupo carboxílico de estos análogos interactúan a través de la formación de enlace de hidrógeno con Lys 193 (2.59 Å) a excepción de **87d** que lo hace con Arg 412 (3.03 Å, -2.26 kcal/mol), mientras que el grupo amino no formo enlaces de hidrogeno en ningún caso, sin embargo, el átomo de oxígeno presente en la morfolina de 87e interactúa con Arg 182 (3.07 Å, -2.5 kcal/mol).



**Figura 20.** a) Los análogos **87a-f** de (*S*)-baclofen en el sitio catalítico GABA-AT humano. b) Los análogos **87a-f** de (*R*)-baclofen en el sitio catalítico GABA-AT humano.

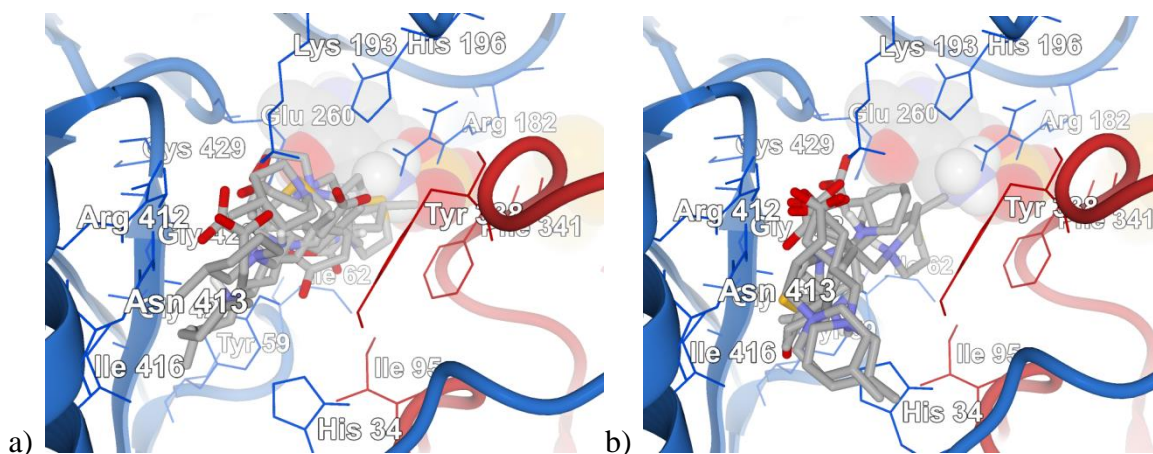
**Tabla 31.** Interacciones de las configuraciones (*S*) y (*R*) de **87b** con GABA-AT en el modelo de homología humano. Energías de interacción en kcal/mol.

( <i>S</i> )-87b	( <i>R</i> )-87b
$E_t = -100.144$ kcal/mol	$E_t = -95.7124$ kcal/mol
No se observan interacciones tipo $\pi-\pi$ del anillo aromático.	Anillo heterocíclico orientado hacia el PLP (90°). No se observan interacciones tipo $\pi-\pi$ del anillo aromático.
<b>Enlaces de hidrógeno:</b>	<b>Enlace de hidrógeno:</b>
Arg 412(A, -N-H): O-H a 2.87 Å, -0.69	Lys 193(A): H-O a 2.59 Å, -0.96
Lys 193(A): H-N a 2.59 Å, energía: -1.98	
<b>Electrostáticas:</b>	<b>Electrostáticas:</b>
Arg 412(A, =N-H): O-H a 4.06 Å, -1.25	Arg 412(A, -N-H): --O a 2.3 Å, -3.92
Arg 412(A, -N-H): O-H a 2.87 Å, -2.5	Arg 412(A, -N-H): --O a 2.3 Å, -3.92
Lys 193(A): H-N a 2.59 Å, -6.16	Lys 193(A): --O a 2.59 Å, -6.15
Lys 193(A): H-N a 3.54 Å, -3.29	<b>Interacciones estéricas:</b>
<b>Interacciones estéricas:</b>	Arg 412(A): --O a 2.7 Å, 3.63
Ile 416: --Cl a 2.99 Å, 1.91	Asn 413(A): --Cl a 2.97 Å, 2.00
Ile 416: C (10) a 3.15 Å, 0.9	Tyr 59(A): C (4) a 2.88 Å, 2.53
Glu 260(A): C (7) a 2.81 Å, 2.95	Gly 428 (A): C (1) a 2.96 Å, 2.07
Gly 428(A): C (5) a 2.73 Å, 3.45	Gly 428 (A): C (2) a 3.14 Å, energía: 1.00

En la tabla 31 se muestran los valores de energía de interacción (kcal/mol) del análogo **87b** en configuración (*S*) y (*R*) con GABA-AT en el modelo de homología humano.

Por último, en la figura 21 los enantiómeros de los análogos de pregabalina **88a-f** interactúan de forma similar, por lo que su grupo carboxílico busca la una zona electrostática altamente positiva de la cavidad. Esta zona está conformada por Lys 193, Lys 429, Arg 412, His 196 y Arg 182. Mientras tanto, el grupo amino se orienta hacia el PLP o interactuando con los residuos de His 34. La energía de interacción de los análogos de (*S*)-pregabalina es en promedio 13.6 kcal/mol más fuerte que la de los enantiómeros (*R*) (Tabla suplementaria S3). El grupo carboxílico de los análogos de configuración (*S*) interactúan a través de la formación de enlace de hidrógeno con Lys 193 (2.85 Å) con **88a-c** y **88f**, a excepción de **88d**, **88e** que lo hace con Glu 260 (2.78 Å, -1.85 kcal/mol) y Glu 260 (3.08 Å, -1.34 kcal/mol).

Los análogos de (*R*)-pregabalina: **88a**, **88c** y **88d** interactúan en una forma diferente que los otros análogos de pregabalina, orientando su grupo amino hacia His 34 en lugar de al PLP. El grupo carboxílico de los análogos **88a**, **88b**, **88d** y **88f** interactúan a través de la formación de enlace de hidrógeno con Lys 193 a 2.6 Å, -2.36 kcal/mol, 3.23 Å, -1.39 kcal/mol, 2.6 Å, -0.37 kcal/mol y 2.6 Å, -0.76kcal/mol respectivamente. **88e** lo hace a través de la Arg 412 (2.87 Å, -0.82 kcal/mol). El grupo amino de 88a interactúa con Gly 428 (3.44 Å, -0.58 kcal/mol), mientras que el de 88f lo hace con Try 59(3.32 Å, -0.48 kcal/mol).

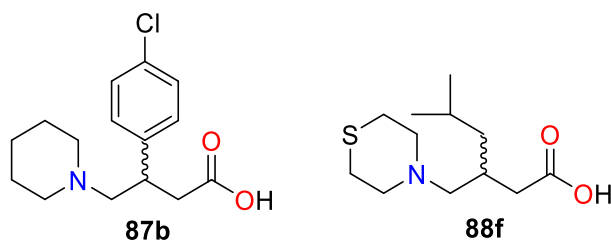


**Figura 21.** a) Los análogos **88a-f** de (*S*)-pregabalina en el sitio catalítico GABA-AT humano. d) Los análogos **88a-f** de (*R*)-pregabalina en el sitio catalítico GABA-AT humano.



## CONCLUSIONES

- La síntesis de una nueva serie de análogos de GABA, pregabalina y baclofen sustituidos en la posición gamma con los sistemas de anillos heterocíclicos de tiazolidina, piperidinas, morfolina y tiomorfolina se realizó mediante rutas de síntesis cortas y eficientes. Las modificaciones químicas logradas por la unión de estos sistemas heterocíclicos al esqueleto de GABA, conducen a compuestos con actividad inhibitoria de GABA-AT como ocurre con los compuestos **87b** y **88f**.
- Los ésteres **95a-f** se sintetizaron mediante reacciones de *N*-alquilación en ausencia de base y disolvente, las reacciones fueron optimizadas y procedieron con rendimientos moderados.
- Se desarrolló un método de síntesis para los sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados **96a-f** a través de la reacción de *N*-alquilación del 4-bromobutanoato de metilo **97** con los heterociclos seleccionados (**89-94**). Estas reacciones procedieron con buenos rendimientos cuando se empleó DIPEA como base y en presencia de diclorometano como disolvente.
- Se llevó a cabo la síntesis de los precursores **98a-f** de baclofen **3** y **99a-f** de pregabalina **4** en su forma racémica mediante la reacción de adición conjugada 1,4 de cupratos de *i*-butilo **103** y *p*-clorofenilo **102** a los sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados **96a-f**. La obtención de estos precursores procedió con rendimientos moderados cuando se usó éter como disolvente de reacción.
- La hidrólisis de los ésteres **95a-f**, **98a-f** y **99a-f** genero los análogos de GABA **86a-f**, baclofen **87a-f** y pregabalina **88a-f** que procedieron con buenos rendimientos, en medio básico. El proceso de acidificación resultó complejo debido a que el empleo de un exceso de medio ácido implicaba que los análogos finales sintetizados permanecieran en la fase acuosa, sin embargo, controlando los equivalentes de ácido empleado permitió que este proceso resultara eficiente.
- Las pruebas preliminares *in vitro* de inhibición enzimática arrojaron que los análogos más promisorios son los compuestos **87b** y **88f**. El análisis de los datos de actividad enzimática se llevó a cabo mediante el análisis gráfico del doble recíproco de Lineweaver-Burk, estableciéndose en ambos casos inhibición no competitiva.



- Los estudios *in vivo* realizados con ratones CD1 muestran que **87b** tiene un efecto neuroprotector dependiente de la dosis. En la cantidad de convulsiones generadas durante el tiempo de observación, hay una disminución en la cantidad de convulsiones a una dosis de 0.5 mmol/kg. Sin embargo, a una dosis de 1.00 mmol/kg, **87b** no tiene ningún efecto protector.
- Todos los análogos de GABA **86a-f**, baclofen **87a-f** y pregabalina **88a-f** fueron evaluados por modelado molecular de las interacciones ligando-enzima, se realizaron 2 modelos de homología; GABA-AT de *Pseudomonas* y GABA-AT humana, se seleccionó la cavidad con base en los resultados de los experimentos cinéticos, donde se demostró que el análogo **87b** presenta un mecanismo de inhibición no competitivo.
- Nuestro modelo QSAR nos permitió encontrar los parámetros estructurales y electrónicos de los análogos de GABA que mejoran su actividad inhibidora sobre GABA-AT. Modificaciones estructurales como la introducción de heteroátomos de azufre, el incremento en tamaño y aromaticidad molecular incrementan la actividad biológica, estos parámetros y en conjunto con los descriptores moleculares encontrados permiten establecer nuevas alternativas a explorar con la finalidad de encontrar inhibidores más potentes contra la enzima de GABA-AT.
- Con base en los valores de energía de interacción, el inhibidor más potente posible fue (*S*)-**87f** (Anexos, tabla S3). Todos los análogos de pregabalina (**88a-f**) y baclofen (**87a-f**) poseen un buen valor de su energía de interacción con GABA-AT humano. También para los análogos de GABA, **86b** tiene un valor de energía de interacción que es uno de los más altos.
- Los estudios acoplamiento molecular sugieren que los enantiómeros (*S*) de los análogos de baclofen **87a-f** y pregabalina **88a-f** pueden tener mayor afinidad hacia la enzima GABA-AT que sus enantiómeros de configuración (*R*), además de que los estudios sugieren que un incremento en el tamaño de los análogos genera mayores

energías de interacción, lo que explica la baja actividad inhibitoria de los análogos de GABA **86a-f** y describe el incremento máximo de esta actividad para los análogos de baclofen **87b-f**.

- A partir de los estudios de estos inhibidores sintetizados y los estudios de acoplamiento molecular se sugiere que la síntesis de los análogos de baclofen **87b-f** y pregabalina **88a-f** en su configuración (*S*) resultan interesantes para un estudio más profundo a nivel experimental, además de que la inclusión de un componente estérico en la posición  $\beta$  de los análogos permitiría incrementar su actividad inhibitoria de manera considerable.
- Los resultados del acoplamiento molecular confirmaron la capacidad descriptiva de nuestro modelo QSAR al correlacionar los descriptores moleculares de análogos de GABA con los elementos de interacción que son clave para unirse a GABA-AT.

## PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la síntesis de los análogos en forma enantioméricamente pura, particularmente de los análogos de configuración (*S*) que de acuerdo a los modelos de acoplamiento molecular presentan valores de energía de interacción altos que les confiere mayor potencial de actividad biológica.
- Diseño de una nueva serie de análogos de baclofen **3** y pregabalina **4** que tienen como característica principal la introducción de un grupo voluminoso que favorezca las interacciones con el sitio activo de la enzima de GABA-AT.
- Llevar a cabo la cinética enzimática de los inhibidores identificados dentro de la investigación, particularmente de los compuestos **87b** y **88f** que han mostrado los mayores porcentajes de inhibición sobre la enzima de GABA-AT.
- Realizar los estudios de actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de los compuestos **87b** y **88f** enantioméricamente puros y evaluar el incremento y/o decremento de la actividad biológica sobre la enzima de GABA-AT.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Consideraciones generales.

El material de vidrio, las barras de agitación magnética, las cánulas, las jeringas y las agujas que se emplearon en las reacciones se secaron en la estufa a una temperatura de 70-80 °C por al menos 12 h.

El THF utilizado en las reacciones anhidras fue secado con sodio metálico empleando benzofenona como indicador bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, hasta adquirir una coloración azul intenso a morado. El CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fue secado con CaH<sub>2</sub> (5% pp/100 mL) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.

Los disolventes empleados (AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Hex, MeOH) fueron destilados y secados en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La purificación de los productos obtenidos se llevaron a cabo por cromatografía en columna siguiendo la técnica descrita por Still,<sup>73</sup> utilizando sílica gel Merk 60 (0.04-0.06 mm), y la cromatografía de capa fina en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, empleando como reveladores UV auxiliados de vainillina, yodo y ninhidrina.

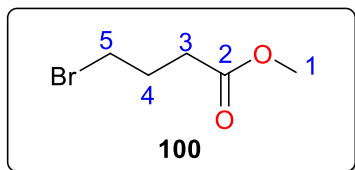
Los puntos de fusión fueron medidos con un equipo Fisher-Jones y para determinar las rotaciones ópticas se empleó un polarímetro Perkin-Elmer.

Los espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN fueron obtenidos con equipos Varian Mercury 200 MHz (4.7 T), Varian Inova 400 MHz (9.4 T, detección inversa), Varian Mercury 400 MHz (9.4 T, detección directa) empleando como disolventes DMSO<sub>d-6</sub>, D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD y TMS como referencia interna, todos obtenidos de la marca Sigma Aldrich.

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de (TMS) para <sup>1</sup>H; las constantes de acoplamiento (*J*) están dadas en Hertz.

## 5.2. Síntesis de los análogos de GABA.

### 5.2.1. Síntesis de 4-bromobutanoato de metilo **100**.



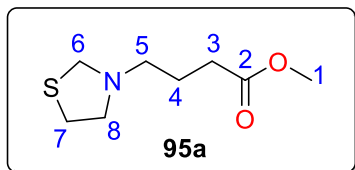
En un matraz redondo de 250 mL provisto de agitación magnética y atmósfera de N<sub>2</sub>, se pesó el ácido-4-bromobutanoico **101** (7.5 g, 45.2 mmol, 1.0 eq) y se disolvió en 50 mL de metanol, se adicionó lentamente (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl (11.4 mL, 90.4 mmol, 2 eq) a 0 °C por 30 min y 72 horas más a 25 °C.

El disolvente fue evaporado en el rotavapor a 45°C, el crudo de reacción obtenido fue purificado por columna cromatográfica en un sistema Hex : AcOEt (90:10) obteniendo 6.78 g de **100** (83.4 % de rendimiento) de un aceite ligeramente amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.68 (s, 3H, H-1), 3.46 (t, J= 6.4 Hz, 2H, H-5), 2.50 (t, J= 7.2 Hz, 2H, H-3), 2.22–2.13 (m, 2H, H-4). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.11 (1C, C-2), 51.85 (1C, C-1), 32.80 (1C, C-5), 32.34 (1C, C-3), 27.87 (1C, C-4). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>BrO<sub>2</sub>: 180.9864, experimental (M+1): 180.9786.

### 5.3. Metodología general para la síntesis de los ésteres **95a-f**.

En un matraz redondo de 25 mL provisto de agitación magnética se pesó 4-bromobutanoato de metilo **100** (1 Eq) y el heterociclo correspondiente (1 Eq) a 25°C, posteriormente se elevó la temperatura a 65-70 °C por 2 h. Al término de la reacción, se adicionó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta la desaparición de efervescencia. La fase acuosa fue extraída con AcOEt (3 x 10 mL) y las fases orgánicas fueron combinadas y secadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentradas en el rotavapor y purificadas por cromatografía en columna.

#### 5.3.1. Síntesis de 4-(tiazolidin-3-il)butanoato de metilo **95a**.

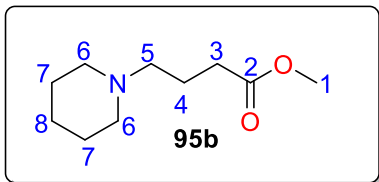


Se empleó 4-bromobutanoato de metilo **100** (1.14, 6.35 mmol, 1 Eq) y tiazolidina **89** (0.5 mL, 6.35 mmol, 1 Eq). El producto fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) obteniendo 0.445 g (37 % de rendimiento) de **95a** como

un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.00 (s, 2H, H-6), 3.63 (s, 1H, H-1), 3.02 (dd, J= 9.5, 3.3 Hz, 2H, H-8), 2.82 (dd, J= 9.3, 3.6 Hz, 1H, H-7), 2.37 (t, J= 7.4, 2H, H-3), 2.35 (t, J= 7 Hz, 2H, H-5), 1.77 (q, J= 7.2 Hz, 1H, H-4). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.94 (1C, C-2), 60.44 (1C, C-6), 58.01 (1C, C-8), 52.07 (1C, C-5), 51.62 (1C, C-1), 31.71 (1C, C-

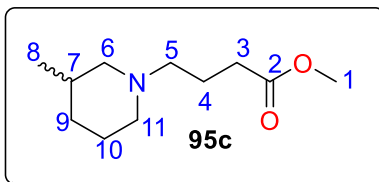
7), 29.61 (1C, C-3), 24.28 (1C, C-4). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>S: 190.0901, experimental (M+1): 190.0904.

### 5.3.2. Síntesis de 4-(piperidin-1-il)butanoato de metilo **95b**.



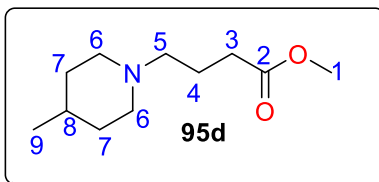
Se empleó 4-bromobutanoato de metilo **100** (0.5469 g, 3.03 mmol, 1 Eq) y piperidina **90** (0.3 mL, 3.03 mmol, 1 Eq) a 25°C. El producto fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1) obteniendo 0.377 g (67 % de rendimiento) de **95b** como un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.62 (s, 3H, H-1), 2.33 (sa, 4H, H-6), 2.28 (t, *J*= 8 Hz, 2H, H-3), 2.27 (t, *J*= 8 Hz, 2H, H-5), 1.77 (q, *J*= 8 Hz, 2H, H-4), 1.55-1.49 (m, 4H, H-7), 1.4-1.37 (m, 2H, H-8). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 174.13 (1C, C-2), 58.49 (1C, C-5), 54.54 (2C, C-6), 51.56 (1C, C-1), 32.23 (1C, C-3), 25.98 (2C, C-7), 24.48 (1C, C-8), 22.24 (1C, C-4). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>, 186.1494, experimental (M+1): 186.1532.

### 5.3.3. Síntesis de 4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoato de metilo **95c**.



Se empleó 4-bromobutanoato de metilo **100** (0.6134 g, 3.4 mmol, 1 Eq) y 3-metilpiperidina **91** (0.4 mL, 3.4 mmol, 1 Eq) a 25°C. El producto fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1) obteniendo 0.537 g (79 % de rendimiento) de **95c** como un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.67 (s, 3H, H-1), 2.84-2.78 (m, 2H, H-6, H-11), 2.35-2.29 (m, 4H, H-5, H-3), 1.87-1.77 (m, 3H, H-4, H-6), 1.71-1.49 (m, 6H, H-7, H-9, H-10, H-11), 0.85 (d, *J*= 6.4 Hz, 3H, H-8). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 174.13 (1C, C-2), 62.08 (1C, C-6), 58.25 (1C, C-5), 54.02 (1C, C-11), 51.54 (1C, C-1), 33.14 (1C, C-9), 32.22 (1C, C-3), 31.18 (1C, C-7), 25.62 (1C, C-10), 22.30 (1C, C-4), 19.83 (1C, C-8). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>, 200.165, experimental (M+1): 200.1636.

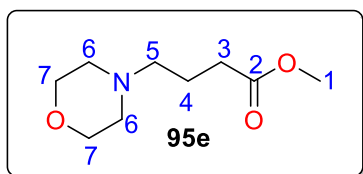
### 5.3.4. Síntesis de 4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoato de metilo **95d**.



Se empleó 4-bromobutanoato de metilo **100** (0.6054 g, 3.36 mmol, 1 Eq) y 4-metilpiperidina **92** (0.4 mL, 3.36 mmol, 1 Eq) a 25°C. El producto fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex: AcOEt (3:1) obteniendo 0.45 g (67 % de rendimiento) de **95d** como un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400

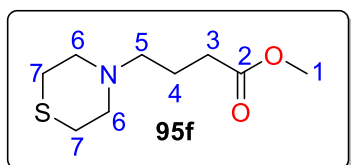
MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.67 (s, 3H, H-1), 2.87-2.84 (m, 2H, H-6), 2.35-2.3 (m, 4H, H-3, H-5), 1.92-1.86 (m, 2H, H-6), 1.85-1.77 (m, 2H, H-4), 1.62-1.58 (m, 2H, H-7), 1.40-1.28 (m, 1H, H-8), 1.28 (m, 2H, H-7), 0.91 (d,  $J$ = 6.4 Hz, 3H, H-9). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.18 (1C, C-1), 58.21 (1C, C-1), 54.05 (1C, C-6), 51.61 (1C, C-5), 34.43 (1C, C-7), 32.30 (1C, C-8), 30.93 (1C, C-3), 22.47 (1C, C-4), 22.02 (1C, C-9). HRMS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  calculado para C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>, 200.165, experimental (M+1): 200.1656.

#### 5.3.5. Síntesis de 4-morfolinbutanoato de metilo **95e**.



Se empleó 4-bromobutanoato de metilo **100** (0.823 g, 4.57 mmol, 1 Eq) y morfolina **93** (0.4 mL, 4.57 mmol, 1 Eq) a 25°C. El producto fue purificado por columna cromatográfica con Hex: AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1) obteniendo 0.445 g (52 % de rendimiento) de **95e** como un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.7 (dd,  $J$ = 4, 4 Hz, 4H, H-7), 3.68 (s, 3H, H-1), 2.43 (dd,  $J$ = 4, 4 Hz, 4H, H-6), 2.36 (t,  $J$ = 8 Hz, 4H, H-5, H-3), 1.82 (q,  $J$ = 8 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.92 (1C, C-2), 66.92 (2C, C-7), 57.97 (1C, C-1), 53.55 (1C, C-6), 51.48 (1C, C-5), 31.87 (1C, C-3), 21.73 (1C, C-4). HRMS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  calculado para C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub>, 188.1286, experimental (M+1): 188.1308.

#### 5.3.6. Síntesis de 4-tiomorfolinbutanoato de metilo **95f**.



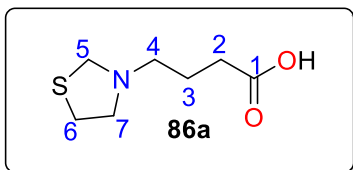
Se empleó 4-bromobutanoato de metilo **100** (0.7158 g, 3.97 mmol, 1 Eq) y tiomorfolina **94** (0.4 mL, 3.97 mmol, 1 Eq) a 25°C. El producto fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1) obteniendo 0.47 g (58 % de rendimiento) de **95f** como un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.60 (s, 3H, H-1), 2.64-2.62 (m, 4H, H-6), 2.6-2.58 (m, 4H, H-7), 2.31 (t,  $J$ = 8 Hz, H-3), 2.26 (t,  $J$ = 8Hz, H-5), 1.73 (q,  $J$ = 8 Hz, H-4). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.93 (1C, C-2), 58.24 (1C, C-1), 54.92 (2C, C-6), 51.47 (1C, C-5), 31.88 (1C, C-3), 27.93 (2C, C-7), 21.78 (1C, C-4). HRMS (FAB<sup>+</sup>):  $m/z$  calculado para C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>S, 204.1058, experimental (M+1): 204.1057.



#### 5.4. Metodología general de hidrólisis de los ésteres metílicos 95a-f.

En un matraz redondo se pesó el éster metílico correspondiente (1 Eq) y se disolvió en 6 mL de MeOH, seguida de la adición de una solución de NaOH (1.1 Eq) disueltos en 2 mL de agua. La reacción se monitoreo hasta el consumo de la materia prima. Al final de la reacción, el MeOH y el agua fueron evaporados. En algunos casos los ácidos fueron tratados con ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 0.33 Eq) hasta un pH=5, posteriormente se adiciono AcOEt para extracción del producto final. El AcOEt fue concentrado a sequedad.

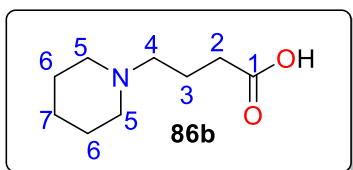
##### 5.4.1. Síntesis del ácido 4-(tiazolidin-3-il)butanoico **86a**.



Se emplearon las siguientes cantidades: 4-(tiazolidin-3-il)butanoato de metilo **95a** (0.22 g, 0.64 mmol, 1 Eq) y NaOH (0.027 g, 1.1 Eq), manteniéndose en agitación por 2 h. **86a** se obtuvo como un aceite viscoso 0.165 g (81 % de rendimiento)

de un líquido amarillo. RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 4.02 (s, 2H, H-5), 3.08 (t, *J*= 5.9 Hz, 2H, H-7), 2.88 (t, *J*= 6.2 Hz, 2H, H-6), 2.54-2.41 (m, 2H, H-4), 2.29 (t, *J*= 7.3 Hz, 2H, H-2), 1.90-1.68 (m, 2H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 180.16 (1C, C-1), 60.29(1C, C5), 58.68 (1C, C-7), 53.73 (1C, C-4.), 35.05 (1C, C-6), 29.94 (1C, C-2), 26.13 (1C, C-3). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>S, 176.0745, experimental (M+1): 176.0769.

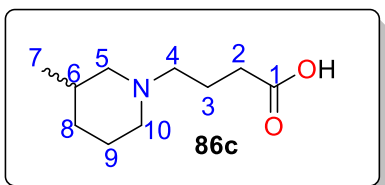
##### 5.4.2. Síntesis del ácido 4-(piperidin-1-il)butanoico **86b**.



Se emplearon las siguientes cantidades: 4-(piperidin-1-il)butanoato de metilo **95b** (0.25 g, 1.35 mmol, 1 Eq) y NaOH (0.059 g, 1.1 Eq) y se mantuvo en agitación por 2 h. **86b** fue obtenido como un líquido amarillo (0.22g) con un 95% de rendimiento.

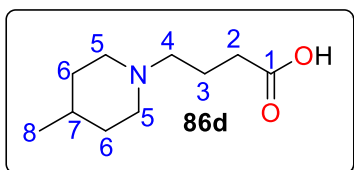
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.3-3.12 (sa, 2H, H-5), 3.08 (t, *J*= 7.2 Hz, 2H, H-4), 2.74 (ddd, *J*= 15.5, 12, 12 Hz, 2H, H-5), 2.41 (t, *J*= 6.6 Hz, 2H, H-2), 2.01-1.92 (m, 2H, H-3), 1.86-1.84 (m, 4H, H-6), 1.66 (sa, 2H, H-7). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 181.22 (1C, C-1), 59.77 (1C, C-4), 54.39 (2C, C-5), 37.50 (1C, C-2), 24.73 (2C, C-6), 23.15 (1C, C-3), 21.54 (1C, C-7). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>, 172.1337, experimental (M+1): 172.1344.

5.4.3. Síntesis del ácido 4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoico **86c**.



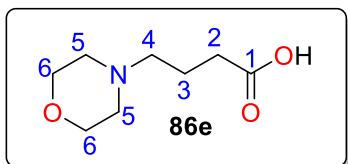
Se empleó 4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoato de metilo **95c** (0.25 g, 1.25 mmol) y NaOH (0.055 g, 1.1 Eq). **86c** fue obtenido como un líquido ligeramente rosa con un rendimiento del 93% (0.21 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.92 (m, 2H, H-5, H-10), 2.46-2.41 (m, 2H, H-4, H-2), 2.09 (td, *J*= 12.4, 2.6 Hz, 1H, H-5), 2.02 (t, *J*= 7.3 Hz, 2H, H-3), 1.81 (t, *J*= **11.4 Hz, 1H**), 1.68-1.47 (m, 5H), 1.46-1.34 (m, 1H), 0.86-0.75 (m, 1H), 0.71 (d, *J*= 6.5 Hz, 3H, H-7). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 182.34 (1C, C-1), 59.72 (1C, C-5), 57.37 (1C, C-4), 52.70 (1C, C-10), 35.20 (1C, C-8), 31.10 (1C, C-2), 29.65 (1C, C-6), 23.62 (1C, C-9), 21.53 (1C, C-3), 18.45 (1C, C-7). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>, 186.1494, experimental (M+1): 186.1532.

5.4.4. Síntesis del ácido 4-(4-methylpiperidin-1-il)butanoico **86d**.



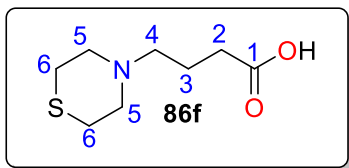
Se empleó 4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoato de metilo **95d** (0.2 g, 1.0 mmol) y NaOH (0.044 g, 1 Eq). **86d** fue obtenido como un líquido ligeramente rosa con un rendimiento del 80% (0.14 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.81 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H, H-5), 2.30-2.22 (m, 2H, H-5), 2.02-1.96 (m, 4H, H-4), 1.63-1.46 (m, 4H, H-3, H-2), 1.28-1.21 (m, 1H, H-7), 1.05-0.95 (m, 2H, H-), 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-8). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 182.67 (1C, C-1), 57.36 (1C, C-6), 52.78 (1C, C-5), 35.41 (1C, C-7), 32.57 (1C, C-8), 29.41 (1C, C-3), 22.13 (1C, C-4), 20.84 (1C, C-9). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>, 186.1494, experimental (M+1): 186.1532.

5.4.5. Síntesis del ácido 4-morfolinbutanoico **86e**.



Se empleó 4-morfolinbutanoato de metilo **95e** (0.29 g, 1.54 mmol) y NaOH (0.068 g, 1.1 Eq). **86e** fue obtenido como un sólido amarillo con un rendimiento del 83% (0.22 g, pf= 73.5 °C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.73-3.66 (m, 4H, H-6), 2.46 (s, 4H, H-5), 2.36 (m, 2H, H-4), 2.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2), 1.79 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 180.87 (1C, C-1), 66.28 (2C, C-6), 58.7 (1C, C-4), 53.41 (2C, C-5), 35.61 (1C, C-2), 22.89(1C, C-3). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>: 174.1178, experimental (M+1): 174.1171.

5.4.6. Síntesis del ácido 4-tiomorfolinbutanoico **86f**.

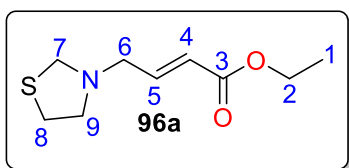


Se pesó 4-tiomorfolinbutanoato de metilo **95f** (0.29 g, 1.4 mmol) y NaOH (0.062 g, 1 Eq). **86f** fue obtenido como un sólido amarillo con un rendimiento del 83% (0.22 g, p.f = 82-83 °C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.77-2.70 (m, 4H, H-5), 2.66-2.65 (m, 4H, H-6), 2.41-2.37 (m, 2H, H-4), 2.14 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2), 1.78 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 182.32 (1C, C-1), 60.37 (1C, C-4), 56.20 (2C, C-5), 36.95 (1C, C-2), 28.37 (2C, C-6), 24.14 (1C, C-3). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>S, 190.0878, experimental (M+1): 190.1053.

5.5. Metodología general para la síntesis de los ésteres **96a-f** mediante reacciones de *N*-alquilación.

En un matraz redondo de 100 mL provisto de agitación magnética se adicionaron 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a -20 °C, seguida de la adición de *N,N*-diisopropiletilamina (1.5 Eq), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (1.3 Eq) y el heterociclo correspondiente **89-94** (1 Eq) gota a gota. La mezcla fue agitada a -20°C por 1 hora. Posteriormente la reacción fue extraída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 X 30 mL) y agua (1x30 mL). Las fases orgánicas fueron combinadas, secadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentradas. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica en un sistema de gradiente Hexano: AcOEt (9:1) y Hexano: AcOEt (3:1).

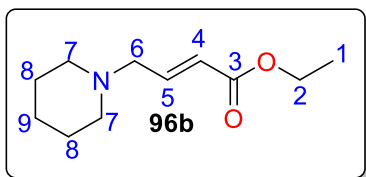
5.5.1. Síntesis de (*E*)-4-(tiazolidin-3-il)but-2-enoato de etilo **96a**.



Se empleó *N,N*-diisopropiletilamina (2.48 mL, 1.5 Eq, 14.27 mmol), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (2.24 mL, 1.3 Eq, 12.36 mmol) y tiazolidina **89** (0.75 mL, 1 Eq, 9.51 mmol). **96a** fue obtenido con un rendimiento del 63 % (1.21g)

de un aceite amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.93 (dt, *J* = 16, 8 Hz, 1H, H-5), 6.01 (dt, *J* = 16, 1.8 Hz, 1H, H-4), 4.18 (q, *J* = 7 Hz, 2H, H-2), 4.03 (s, 2H, H-7), 3.15 (dd, *J* = 8, 1.8 Hz, 2H, H-6), 3.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-9), 2.87 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-8), 1.27 (t, *J* = 7 Hz, 3H, H-1). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166.24 (1C, C-3), 144.94 (1C, H-5), 123.42 (1C, C-4), 60.59 (2C, C-2, C-6), 57.92 (1C, C-7), 53.90 (1C, C-9), 29.62 (1C, C-8), 14.34 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>S: 202.2918, experimental (M+1): 202.2912.

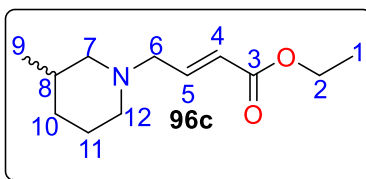
5.5.2. Síntesis de (*E*)-4-(piperidin-1-il)but-2-enoato de etilo **96b**.



Se empleó *N,N*-diisopropiletilamina (1.32 mL, 1.5 Eq, 7.59 mmol), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (1.12 mL, 1.3 Eq, 6.58 mmol) y piperidina **90** (0.5 mL, 1 Eq, 5.06 mmol). **96b** fue obtenido con un rendimiento del 90 % (0.9

g) de un aceite café. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.95 (dt, *J*= 15.7, 6.3 Hz, 1H, H-5), 5.92 (dt, *J*= 15.7, 1.6 Hz, 1H, H-4), 4.16 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H, H-2), 3.07 (dd, *J*= 6.3, 1.6 Hz, 2H, H-6), 2.37 (sa, 4H, H-7), 1.56 (q, *J*= 5.6 Hz, 4H, H-8), 1.44-1.38 (m, 2H, H-9), 1.25 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, H-1). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166.39 (1C, C-3), 145.69 (1C, C-5), 123.34 (1C, C-4), 60.45 (1C, C-2), 60.25 (1C, C-6), 54.84 (2C, C-7), 26.05 (2C, C-8), 24.24 (1C, C-9), 14.39 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>: 198.1494, experimental (M+1): 198.1506.

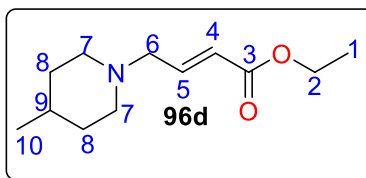
5.5.3. Síntesis de (*E*)-4-(3-metilpiperidin-1-il)but-2-enoato de etilo **96c**.



Se empleó *N,N*-diisopropiletilamina (1.33 mL, 1.5 Eq, 7.66 mmol), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (1.13 mL, 1.3 Eq, 6.64 mmol) y 3-piperidina **91** (0.6 mL, 1 Eq, 5.11 mmol). **96c** puro fue obtenido con un rendimiento del

77 % (0.83 g) de un líquido amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.96 (dt, *J*= 15.7, 6.3 Hz, 1H, H-5), 5.94 (dt, *J*= 15.7, 1.6 Hz, 1H, H-4), 4.17 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H, H-2), 3.09 (dd, *J*= 6.3, 1.6 Hz, 2H, H-6), 2.85-2.74 (m, 2H, H-7, H-12), 1.87 (d, *J*= 11.3, 3.2 Hz, 1H, H-12), 1.71-1.54 (m, 5H, H-7, H-8, H-10, H-11), 1.27 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H, H-1), 0.84 (d, *J*= 6.4 Hz, 4H, H-9, H-10). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 166.44 (1C, C-3), 145.63 (1C, C-5), 123.43 (1C, C-4), 62.22 (1C, C-7), 60.50 (1C, C-2), 60.01 (1C, C-6), 54.32 (1C, C-12), 32.90 (1C, C-10), 31.31 (1C, C-8), 25.65 (1C, C-11), 19.83 (1C, C-9), 14.42 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>: 212.165, experimental (M+1): 212.1651.

5.5.4. Síntesis de (*E*)-4-(4-metilpiperidin-1-il)but-2-enoato de etilo **96d**.

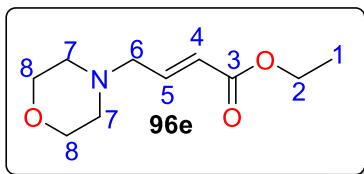


Se empleó *N,N*-diisopropiletilamina (1.31 mL, 1.5 Eq, 7.56 mmol), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (1.12 mL, 1.3 Eq, 6.55 mmol) y 4-piperidina **92** (0.6 mL, 1 Eq, 5.04 mmol). **96d** fue obtenido con un rendimiento del 80 %

(0.85 g) de un aceite café. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.94 (dt, *J*= 15.6, 6.4 Hz, 1H, H-

5), 5.92 (dt,  $J= 15.5, 1.6$  Hz, 1H, H-4), 4.15 (q,  $J= 7.1$  Hz, 2H, H-2), 3.08 (dd,  $J= 6.4, 1.6$  Hz, 2H, H-6), 2.82 (d,  $J= 11.8$  Hz, 4H, H-7), 2.02-1.80 (m, 2H, H-8), 1.65-1.55 (m, 2H, H-8), 1.38-1.31 (m, 1H, H-9), 1.25 (t,  $J= 7.1$  Hz, 3H, H-1), 0.89 (d,  $J= 5.7$  Hz, 3H, H-10). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.46 (1C, C-3), 145.77 (1C, C-5), 123.42 (1C, C-4), 60.53 (1C, C-2), 59.96 (1C, C-6), 54.35 (2C, C-7), 34.45 (2C, C-8), 30.73, (1C, C-9) 22.06 (1C, C-10), 14.46 (1C, C-1). HRMS (FAB $^+$ ):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_2$ : 212.165, experimental (M+1): 212.1651.

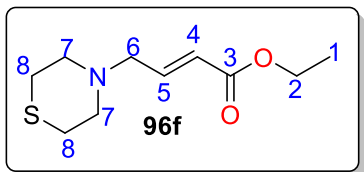
5.5.5. Síntesis de (*E*)-4-morfolinbut-2-enoato de etilo **96e**.



Se empleó *N,N*-diisopropiletilamina (1.49 mL, 1.5 Eq, 8.57 mmol), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (1,27 mL, 1.3 Eq, 7.43 mmol) y morfolina **93** (0.5 mL, 1 Eq, 5.71 mmol). **96e** fue obtenido con un rendimiento del 89 % (1.02

g) de un aceite amarillo. RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.91 (dt,  $J= 15.7, 6.2$  Hz, 1H, H-5), 5.96 (dt,  $J= 15.7, 1.6$  Hz, 1H, H-4), 4.17 (q,  $J= 7.1$  Hz, 2H, H-2), 3.72-3.67 (m, 4H, H-8), 3.1 (dd,  $J= 6.2, 1.6$  Hz, 2H, H-6), 2.49-2.39 (m, 4H, H-7), 1.26 (t,  $J= 7.1$  Hz, 3H, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.05 (1C, C-3), 144.38 (1C, C-5), 123.65 (1C, C-4), 66.83 (2C, C-8), 60.38 (1C, C-2), 59.55 (1C, C-6), 53.64 (2C, C-7), 14.20 (1C, C-1). HRMS (FAB $^+$ ):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ : 200.1286, experimental (M+1): 200.1291.

5.5.6. Síntesis de (*E*)-4-tiomorfolinbut-2-enoato de etilo **96f**.



Se empleó *N,N*-diisopropiletilamina (1.29 mL, 1.5 Eq, 7.45 mmol), de (*E*)-4-bromobut-2-enoato de etilo **97** al 75% (1.1 mL, 1.3 Eq, 6.46 mmol) y tiomorfolina **94** (0.5 mL, 1 Eq, 4.97 mmol). **96f** fue obtenido con un rendimiento del 80 % (0.85

g) de un aceite ligeramente amarillo. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.88 (dd,  $J= 15.7, 6.1$  Hz, 1H, H-5), 5.94 (dd,  $J= 15.7, 1.7$  Hz, 1H, H-4), 4.16 (q,  $J= 7.1$  Hz, 2H, H-2), 3.11 (dd,  $J= 6.1, 1.7$  Hz, 2H), 2.67 (m, 8H, H-6, H-7), 1.25 (t,  $J= 7.1$  Hz, 3H, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.00 (1C, C-3), 144.72 (1C, C-5), 123.43 (1C, C-4), 60.30, (1C, C-2), 59.91 (1C, C-6), 54.97 (2C, C-7), 27.88 (2C, C-8), 14.15 (1C, C-1). HRMS (FAB $^+$ ):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2$ : 216.1058, experimental (M+1): 216.1044.

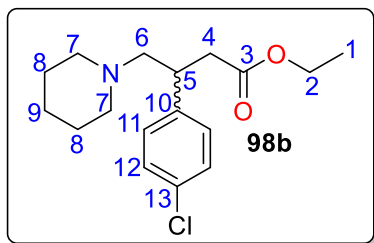
5.6. Metodología general para las adiciones conjugadas 1, 4 del reactivo de Grignard a los sistemas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados **96a-f**.

En un matraz redondo de 50 mL se pesó CuI (2 Eq), se suspendió en éter anhidro y se mantuvo en agitación a 0 °C en atmósfera de N<sub>2</sub>. En un segundo matraz de 25 mL se pesó Mg metálico (4.1 Eq), se añadieron cantidades catalíticas de I<sub>2</sub>, se suspendió en éter anhidro y se mantuvo en agitación a 25°C en atmósfera inerte; se añadió gota a gota 1-bromo-4-clorobenceno **102** disuelto en éter ó 1-bromo-2-metilpropano **103** (4 Eq).

Al término de la adición, se observó el cambio de coloración de la solución de ámbar a gris tenue y la desaparición del Mg metálico en un tiempo de 30 min, posteriormente el reactivo de Grignard formado fue agregado a la suspensión de CuI generando el nucleófilo alquilcuprato a 0 °C.

En otro matraz redondo de 10 mL se pesó el sustrato  $\alpha,\beta$ -insaturado **96f** correspondientes (1 Eq) y se disolvió en éter anhidro. Posteriormente, el compuesto  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado fue adicionado lentamente a la suspensión del cuprato a 0 °C vía cánula. Se mantuvo la agitación a 0 °C por 30 min y a después por un periodo de 24 h a 25°C. Al término de la reacción, se adicionó 30 mL de una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y la fase orgánica fue separada. La fase acuosa fue lavada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x30) y las fases orgánicas fueron combinadas y secadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica.

#### 5.6.1. Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-(piperidin-1-il)butanoato de etilo **98b**.

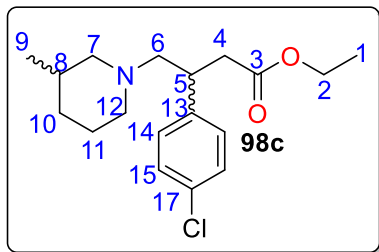


Se empleó 1-bromo-4-clorobenceno **102** (0.97 g, 5.07 mmol, 4 Eq), Mg, (0.126 g, 5.19 mmol, 4.1 Eq), CuI (0.48 g, 2.53 mmol, 2 Eq) y **96b** (0.25 g, 1.26 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **98b** fue obtenido

como un aceite ámbar con un rendimiento del 52% (0.2 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.25 (d,  $J$ = 8.5 Hz, 2H, H-12) 7.13 (d,  $J$ = 8.5 Hz, 2H, H-11), 4.03 (q,  $J$ = 7.1 Hz, 2H, H-2), 3.35 (ddd,  $J$ = 11.9, 9.1, 6.0 Hz, 1H, H-5), 2.87 (dd,  $J$ = 15.5, 6.3 Hz, 1H, H-4), 2.49-2.41 (m, 3H, H-4, H-7), 2.41-2.32 (m, 2H, H-6), 2.31-2.23 (m, 2H, H-7), 1.55-1.46 (m, 4H, H-8), 1.42-1.38 (m, 2H, H-9), 1.16 (t,  $J$ = 7.1 Hz, 3H, H-1). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  172.57 (1C, C-3), 141.72 (1C, C-10), 132.11 (1C, C-13), 128.90 (1C, C-12), 128.47 (1C, C-11), 65.17 (1C, C-6), 60.19 (1C, C-2), 54.87 (2C, C-7), 39.25, (2C, C-4, C-5), 26.00 (1C, C-8),

24.34 (1C, C-9), 14.12 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>ClNO<sub>2</sub>: 310.1574, experimental (M+1): 310.1556.

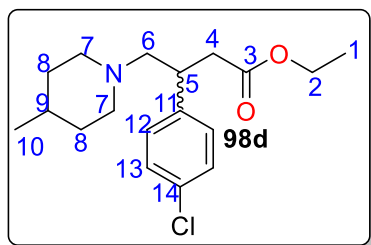
#### 5.6.2. Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoato de etilo **98c**.



Se empleó 1-bromo-4-clorobenceno **102** (1.08 g, 5.67 mmol, 4 Eq), Mg, (0.14 g, 5.89 mmol, 4.15 Eq), CuI (0.54 g, 2.83 mmol, 2 Eq) y **96c** (0.3 g, 1.42 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **98c** fue obtenido

como un aceite ámbar con un rendimiento del 49% (0.22 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.24 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, H-15), 7.13 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, H-14), 4.02 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H, H-2), 3.42-3.32 (m, 1H, H-5), 2.86 (dd, *J*= 15.5, 6.3 Hz, 3H, H-4, H-7, H-12), 2.69 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H-7, H-12), 2.49-2.39 (m, 2H, H-4, H-6), 2.35 (dd, *J*= 12.6, 5.7 Hz, 1H, H-6), 1.96 (ddd, *J*= 11.2, 11.2, 3.0 Hz, 1H, H-12), 1.75 (ddd, *J*= 11.4, 11.4, 2.7 Hz, 1H, H-12), 1.71-1.39 (m, 6H, H-7 (2), H-8 (1), H-10 (1), H-11(2)), 1.15 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H), 0.83 (t, *J*= 6.2 Hz, 3H, H-9, H-10). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.66 (1C, C-3), 141.66 (1C, C-13), 132.14 (1C, C-17), 128.90 (1C, C-16), 128.48 (1C, C-14), 64.93 (1C, C-6), 64.90 (C-6), 63.35 (1C, C-7), 61.42 (1C, C-7), 60.25 (1C, C-2), 55.28 (1C, C-12), 53.40 (1C, C-12), 39.32 (1C, C-5), 39.24 (1C, C-4), 32.92 (1C, C-10), 31.14 (1C, C-8), 30.87 (1C, C-8), 25.52 (1C, C-11), 25.38 (C-11), 19.67 (1C, C-9), 19.63 (C-9), 14.10 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>ClNO<sub>2</sub>: 324.173, experimental (M+1): 324.1734.

#### 5.6.3. Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoato de etilo **98d**.

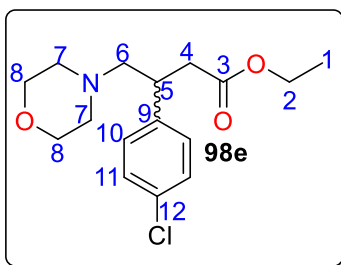


Se empleó 1-bromo-4-clorobenceno **102** (3.62 g, 18.9 mmol, 4 Eq), Mg, (0.477 g, 19.63 mmol, 4.15 Eq), CuI (1.8 g, 9.46 mmol, 2 Eq) y **96d** (1 g, 4.7 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **98d** fue obtenido como

un aceite ámbar con un rendimiento del 49% (0.75 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.24 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, H-13), 7.13 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, H-12), 4.03 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H, H-2), 3.39-3.31 (m, 1H, H-5), 2.94-2.89 (d, *J*= 11.1 Hz, 1H, H-7<sub>ax</sub>), 2.85 (dd, *J*= 15.5, 6.3 Hz, 1H, H-4), 2.74 (d, *J*= 11.1 Hz, 1H, H-7<sub>ax</sub>), 2.50-2.41 (m, 2H, H-4, H-6), 2.36 (dd, *J*= 12.6, 5.7 Hz, 1H, H-6), 2.03 (ddd, *J*= 11.1, 11.1, 2.5 Hz, 1H, H-7<sub>eq</sub>), 1.83 (ddd, *J*= 11.1, 11.1, 2.5 Hz, 1H, H-

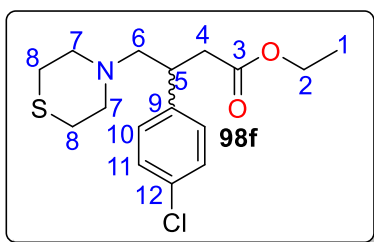
7'eq), 1.59-1.52 (m, 2H, H-8), 1.35-1.24 (m, 1H, H-9), 1.15 (t,  $J=7.1$  Hz, 6H, H-1, H-8), 0.89 (d,  $J=6.4$  Hz, 3H, H-10). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.36 (1C, C-3), 141.75 (1C, C-11), 132.06 (1C, C-14), 128.88 (1C, C-13), 128.42 (1C, C-12), 64.76 (1C, C-6), 60.04 (1C, C-2), 55.34 (1C, C-7), 53.18 (1C, C-7'), 39.38 (1C, C-5), 39.18 (1C, C-4), 34.55 (1C, C-8), 34.28 (1C, C-8), 30.71 (1C, C-9), 21.90 (1C, C-10), 14.11 (1C, C-1). HRMS (FAB $^+$ ): m/z calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{ClNO}_2$ : 324.173, experimental (M+1): 324.1772.

#### 5.6.4. Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-morfolinbutanoato de etilo **98e**.



Se empleó 1-bromo-4-clorobenceno **102** (2.88 g, 15.05 mmol, 4 Eq), Mg, (0.379 g, 15.62 mmol, 4.15 Eq), CuI (1.43 g, 7.52 mmol, 2 Eq) y **96e** (0.75 g, 3.76 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **98e** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 55% (0.645 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.25 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, H-11), 7.13 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, H-10), 4.05 (q,  $J=7.1$  Hz, 2H, H-2), 3.67-3.59 (m, 4H, H-8), 3.43-3.32 (m, 1H, H-5), 2.85 (dd,  $J=15.5, 6.6$  Hz, 1H, H-4), 2.58-2.30 (m, 7H, H-4, H-6, H-7), 1.16 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.25 (1C, C-3), 141.22 (1C, C-9), 132.21 (1C, C-12), 128.82 (2C, C-11), 128.50 (2C, C-10), 66.89 (2C, C-8), 64.71 (1C, C-6), 60.20 (1C, C-2), 53.79 (2C, C-7), 39.12 (1C, C-4), 38.67 (1C, C-5), 14.09 (1C, C-1). HRMS (FAB $^+$ ): m/z calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClNO}_3$ : 311.1366, experimental (M+1): 312.1299.

#### 5.6.5. Síntesis de 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoato de etilo **98f**.

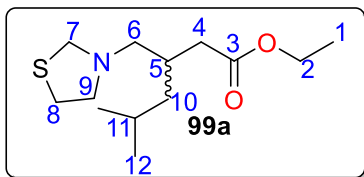


Se empleó 1-bromo-4-clorobenceno **102** (2.66 g, 13.93 mmol, 4 Eq), Mg, (0.35 g, 14.45 mmol, 4.15 Eq), CuI (1.32 g, 3.48 mmol, 2 Eq) y **96f** insaturado (0.75 g, 3.48 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **98f** e fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 58% (0.66 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.25 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-11), 7.12 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H, H-10), 4.05 (q,  $J=7.1$  Hz, 2H, H-2), 3.40-3.30 (m, 1H, H-5), 2.83-2.77 (m, 3H, H-4, H-7), 2.66-2.56 (m, 6H, H-7, H-8), 2.5-2.39 (m, 3H, H-4, H-6), 1.18 (t,  $J=7.1$  Hz, 3H, H-1). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.42 (1C, C-3), 141.23 (1C, C-9), 132.29 (1C, C-12), 128.86 (1C, C-11), 128.55



(1C, C-10), 65.06 (1C, C-6), 60.34 (1C, C-2), 55.39 (2C, C-7), 39.13 (2C, C-4, C-5), 27.92 (2C, C-8), 14.14 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>ClNO<sub>2</sub>S: 328.1138, experimental (M+1): 328.1084.

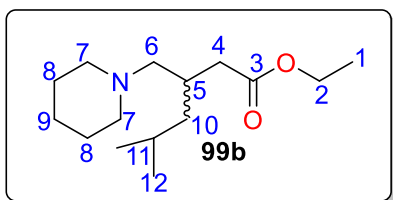
5.6.6. Síntesis de 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil)hexanoato de etilo **99a**.



Se empleó 1-bromo-2-metilpropano **103** (0.75 ml, 6.95 mmol, 4 Eq), Mg, (0.17 g, 7.12 mmol, 4.1 Eq), CuI (0.66 g, 3.47 mmol, 2 Eq) y **96a** (0.35 g, 1.74 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con

Hex : AcOEt (95:5) y 9:1, **99a** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 5% (0.0225 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.16-4.07 (m, 2H, H-7), 4.02 (q, *J*= 9.2 Hz, 2H, H-2), 3.04-3.0 (m, 2H, H-9), 2.90-2.82 (m, 2H, H-8), 2.44-2.36 (m, 2H, H-6, H-4), 2.27 (dd, *J*= 15.1, 5.6 Hz, 1H, H-4), 2.12-2.06 (m, 2H, H-6, H-5), 1.64 (m, 1H, H-11), 1.25 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, H-1), 1.22-1.08 (m, 2H, H-10), 0.89 (t, *J*= 6.4 Hz, 6H, H-12, H-13). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.54 (1C, C-3, CO), 61.44 (1C, C-2), 60.25 (1C, C-7), 58.65 (1C, C-9), 58.14 (1C, C-6), 42.40 (1C, C-10), 38.58 (1C, C-4), 33.28 (1C, C-5), 29.88 (1C, C-8), 25.40 (1C, C-11), 23.02 (1C, C-12), 22.77 (1C, C-13), 14.42 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>2</sub>S: 260.1684, experimental (M+1): 260.1699.

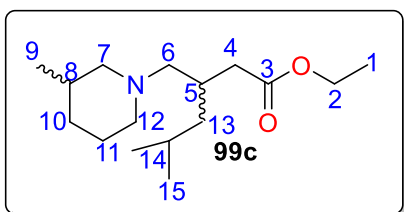
5.6.7. Síntesis de 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)hexanoato de etilo **99b**.



Se empleó 1-bromo-2-metilpropano **103** (0.55 ml, 5.06 mmol, 4 Eq), Mg, (0.1262 g, 5.19 mmol, 4 Eq), CuI (0.48 g, 2.53 mmol, 2 Eq) y **96b** (0.25 g, 1.26 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna

cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hexano: AcOEt (3:1), **99b** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 52% (0.168 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.05 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H, H-2), 2.44-2.32 (m, 3H, H-7, H-4), 2.24-2.11 (m, 5H, H-7, H-6, H-5, H-4), 2.05-1.99 (m, 1H, H-6), 1.68-1.57 (m, 1H, H-11), 1.52-1.46 (m, 4H, H-8), 1.39-1.32 (m, 2H, H-9), 1.19 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H, H-1), 1.11-0.97 (m, 2H, H-10), 0.81 (dd, *J*= 6.5, 5.3 Hz, H-12, 6H, H-12, H-13). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.85 (1C, C-3), 64.54 (1C, C-6), 60.04 (1C, C-2), 55.21 (2C, C-7), 43.00 (1C, C-10), 39.25 (1C, C-4), 30.97 (1C, C-5), 26.23 (2C, C-8), 25.52 (1C, C-11), 24.69 (1C, C-9), 22.95 (2C, C-12), 14.40 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>2</sub>: 256.2276, experimental (M+1): 256.2267.

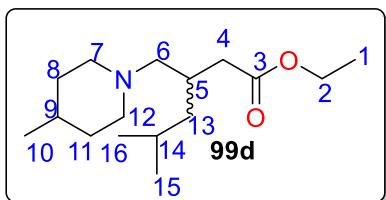
5.6.8. Síntesis de 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il) metil)hexanoato de etilo **99c**.



Se empleó 1-bromo-2-metilpropano **103** (0.72 ml, 6.63 mmol, 4 Eq), Mg, (0.161 g, 6.63 mmol, 4 Eq), CuI (0.63 g, 3.31 mmol, 2 Eq) y **96c** (0.35 g, 1.66 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt

(3:1), **99c** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 20 % (0.09 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.09 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-2), 2.84 - 2.76 (m, 1H, H-7, H-12), 2.68 - 2.61 (m, 1H, H-7, H-12), 2.38 - 2.32 (m, 1H, H-4), 2.21 - 2.09 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 2.08 - 1.99 (m, 1H, H-6), 1.92 - 1.85 (m, 1H, H-12), 1.71 - 1.36 (m, 6H, H-7, H-10, H-11, H-12, H-14), 1.24 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, H-1), 1.17 - 1.02 (m, 2H, H-13), 0.88 - 0.81 (m, 10H, H-9, H-10, H-15, H-16). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.79 (1C, C-3), 64.31 (1C, C-6), 64.27 (1C, C-6), 63.69 (1C, C-7), 62.03 (1C, C-7), 60.01 (1C, C-2), 55.52 (1C, C-12), 53.90 (1C, C-12), 43.10 (1C, C-13), 43.07 (1C, C-13), 39.21 (1C, C-4), 33.33 (1C, C-10), 31.41 (1C, C-8), 31.13 (1C, C-5), 25.80 (1C, C-11), 25.70 (1C, C-11), 25.54 (1C, C-14), 23.03 (1C, C-15), 22.97 (1C, C-16), 19.83 (1C, C-9), 19.81 (1C, C-9), 14.40 (1C, C-1). HRMS (FAB $^+$ ): m/z calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{NO}_2$ : 270.2433, experimental (M+1): 270.2411.

5.6.9. Síntesis de 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il) metil)hexanoato de etilo **99d**.

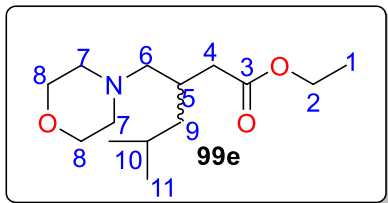


Se empleó 1-bromo-2-metilpropano **103** (0.72 ml, 6.63 mmol, 4 Eq), Mg, (0.165 g, 6.79 mmol, 4.1 Eq), CuI (0.63 g, 3.31 mmol, 2 Eq) y **96d** (0.35 g, 1.66 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna

cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **99d** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 37 % (0.164 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.12 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-2), 2.87 (d,  $J = 11.3$  Hz, 1H, H-12), 2.71 (d,  $J = 11.8$  Hz, 1H, H-7), 2.36 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 1H, H-4), 2.18-2.11 (m, 2H, H-4, H-5), 2.07 (m, 1H, H-6), 1.96 (ddd,  $J = 11.5, 11.5, 2.5$  Hz, 1H, H-7), 1.74 (ddd,  $J = 11.6, 2.4$  Hz, 1H, H-12), 1.64 - 1.6 (m, 1H, H-14), 1.57-1.53 (m, 2H, H-8, H-11), 1.26 (t,  $J = 7.1$  Hz, 4H, H-1, H-9), 1.20-1.03 (m, 4H, H-8, H-11, H-13), 0.91-0.85 (m, 9H, H-10, H-15, H-16). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.89 (1C, C-3), 64.13 (1C, C-6), 60.06 (1C, C-2), 55.56 (1C, C-7), 53.67 (1C, C-12), 42.98 (1C, C-13), 39.27 (1C, C-4), 34.78 (1C, C-11), 34.52 (1C, C-8), 31.05 (1C, C-9), 31.03 (1C, C-5), 25.44 (1C,

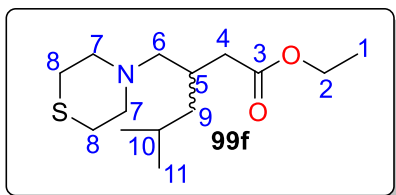
C-14), 22.95 (2C, C-15, C-16), 22.13 (1C, C-10), 14.41 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>2</sub>: 270.2433, experimental (M+1): 270.2429.

5.6.10. Síntesis de 5-metil-3-(morfolinmetil)hexanoato de etilo **99e**.



Se empleó 1-bromo-2-metilpropano **103** (0.76 ml, 7.02 mmol, 4 Eq), Mg, (0.175 g, 7.2 mmol, 4.1 Eq), CuI (0.669 g, 3.51 mmol, 2 Eq) y **96e** (0.35 g, 1.75 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **99e** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 37 % (0.166 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.13 (q, *J*= 7.2 Hz, 2H, H-2), 3.71-3.59 (m, 4H, H-8), 2.50 (m, 2H, H-7), 2.34 (m, 3H, H-4, H-7), 2.26-2.16 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 2.13-2.06 (m, 1H, H-6), 1.71-1.59 (m, 1H, H-10), 1.26 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, H-1), 1.20-1.06 (m, 2H, H-9), 0.89 (d, *J*= 6.3 Hz, 6H, H-11, H-12). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.71 (1C, C-3), 67.23 (2C, C-8), 64.25 (1C, C-6), 60.21 (1C, C-2), 54.16 (2C, C-7), 42.82 (1C, C-9), 39.09 (1C, C-4), 30.42 (1C, C-5), 25.41 (1C, C-10), 22.96 (1C, C-11), 22.86 (1C, C-12), 14.40 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>3</sub>: 258.2069, experimental (M+1): 258. 2077.

5.6.11. Síntesis de 5-metil-3-(tiomorfolinmetil)hexanoato de etilo **99f**.

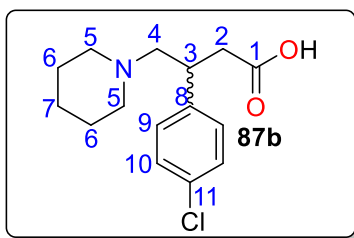


Se empleó 1-bromo-2-metilpropano **103** (0.707 ml, 6.5 mmol, 4 Eq), Mg, (0.162 g, 6.66 mmol, 4.1 Eq), CuI (0.6191 g, 3.25 mmol, 2 Eq) y **96f** (0.35 g, 1.63 mmol, 1 Eq). El crudo de reacción fue purificado por columna cromatográfica con Hex : AcOEt (9:1) y Hex : AcOEt (3:1), **99f** fue obtenido como un aceite ámbar con un rendimiento del 25 % (0.11 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.17-4.07 (m, 2H, H-2), 2.78-2.71 (m, 2H, H-7), 2.63-2.53 (m, 6H, H-7, H-8), 2.32-2.24 (m, 2H, H-6, H-4), 2.2-2.13 (m, 2H, H-4, H-5), 2.04 (dd, *J*= 12.2, 9.0 Hz, 1H, H-6), 1.69-1.57 (m, 1H, H-10), 1.27 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H, H-1), 1.16-1.03 (m, 2H, H-9), 0.88 (d, *J*= 6.2 Hz, 6H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.76 (1C, C-3), 64.60 (1C, C-6), 60.22 (1C, C-2), 55.75 (1C, C-7), 42.82 (1C, C-9), 39.15 (1C, C-4), 30.87 (1C, C-5), 28.18 (1C, C-8), 25.47 (1C, C-10), 23.03 (1C, C-11), 22.91 (1C, C-12), 14.46 (1C, C-1). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>3</sub>S: 274.184, experimental (M+1): 274.1858.

### 5.7. Metodología general de hidrólisis de los ésteres etílicos **98b-f** y **99a-f**.

En un matraz redondo se pesó el éster etílico correspondiente (1 Eq) y se disolvió en 6 mL de MeOH, seguida de la adición de una solución de la base correspondiente (1.1 Eq) disueltos en 2 mL de agua. La reacción se monitoreó hasta el consumo de la materia prima. Al final de la reacción, el MeOH fue evaporado y el sólido obtenido fue redisolto en H<sub>2</sub>O, la fase orgánica se extrajo con AcOEt y la fase acuosa concentrada a sequedad. La fase acuosa fue acidificada con 1 eq de HCl, seguida de la extracción de la fase acuosa nuevamente con acetato de etilo.

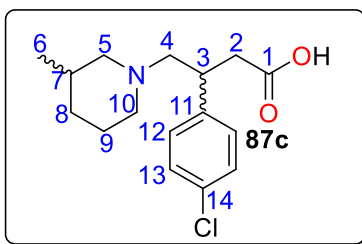
#### 5.7.1. Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(piperidin-1-il)butanoico **87b**.



A una solución de **98b** (0.4 g, 1.29 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 6 mL de una solución acuosa de NaOH (1.42 g, 1.42 mmol, 1.1 Eq) y se mantuvo en agitación por 48 h. **87b** se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 85% (0.3 g, p.f = 146-149 °C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.34

(d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-10), 7.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-9), 3.52 (dddd, *J* = 8, 8, 4, 4 Hz, 1H, H-3), 3.37 (dd, *J* = 14, 8 Hz, 3H, H-4, H-5), 3.11 (ddd, *J* = 13.0, 2.0, 1.2 Hz, 3H, H-4, H-5), 2.91 (dd, *J* = 16.7, 5.2 Hz, 1H, H-2), 2.63 (ddd, *J* = 13.6, 13, 1.2 Hz, 1H, H-2), 1.89-1.82 (m, 4H, H-6), 1.64 (sa, 2H, H-7). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 179.28 (1C, C-1), 142.37 (1C, C-8), 133.06 (1C, C-11), 130.11 (2C, C-10), 129.81 (2C, C-9), 64.71 (1C, C-4), 54.68 (1C, C-5), 45.63 (1C, C-2), 38.12 (1C, C-3), 24.62 (2C, C-6), 22.93 (1C, C-7). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>ClNO<sub>2</sub>: 282.1261, experimental (M+1): 282.1287.

#### 5.7.2. Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(3-metilpiperidin-1-il)butanoico **87c**.

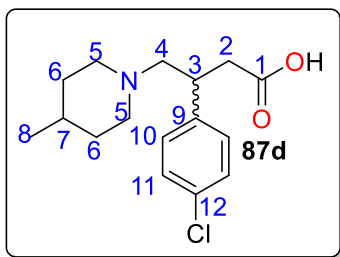


A una solución de **98c** (0.42 g, 1.32 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 6 mL de una solución acuosa de LiOH (0.06 g, 2.64 mmol, 2 Eq) y se mantuvo en agitación por 48 h. **87c** se obtuvo como un sólido café con un rendimiento del 52 % (0.2 g, p.f = 142 -143 °C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.37 -

7.26 (m, 4H, H-12, H-13), 3.76 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, H-7\*), 3.68 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, H-7\*), 3.58 - 3.47 (m, 1H, H-3), 3.43 - 3.36 (m, 2H, H-4, H-5), 3.08 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-4), 2.93 (dd, *J* = 16.7, 10.8 Hz, 1H, H-2), 2.70 - 2.55 (m, 2H, H-2, H-5), 2.41 (t, *J* = 11.7 Hz, 1H, H-10), 1.95 - 1.79 (m, 4H, H-6, H-8, H-9), 1.21 - 1.09 (m, 1H, H-8), 1.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H,

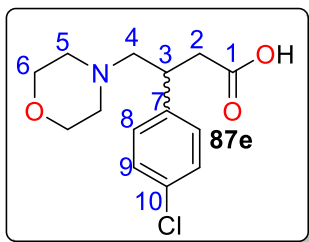
H-7\*), 0.99 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H, H-7\*). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  179.60 (1C, C-1), 179.57 (1C, C-1), 142.62 (1C, C-11), 134.13 (1C, C-14), 130.23 (2C, C-13), 129.97 (1C, C-12), 64.91 (1C, C-4), 64.81 (1C, C-4), 61.19 (1C, C-5), 59.66 (1C, C-5), 54.89 (1C, C-10), 53.48 (1C, C-10), 45.93 (1C, C-2), 38.34 (1C, C-3), 38.19 (1C, C-3), 31.67 (1C, C-8), 31.21 (1C, C-6), 30.85 (1C, C-6), 24.39 (1C, C-9), 24.27 (1C, C-9), 19.13 (1C, C-7), 19.11 (1C, C-7). **HRMS (FAB $^+$ )**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClNO}_2$ : 296.1417, experimental (M+1): 296.1445.

#### 5.7.3. Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il)butanoico **87d**.



A una solución de **98d** (0.42 g, 1.29 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 6 mL de una solución acuosa de NaOH (0.057 g, 1.42 mmol, 1.1 Eq) y se mantuvo en agitación por 48 h. **87d** se obtuvo como un sólido café con un rendimiento del 68% (0.26 g, p.f.=142 -144 °C). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.34 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-11), 7.27 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-10), 3.77 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H-5), 3.54-3.49 (m, 1H, H-3), 3.47-3.34 (m, 2H, H-4, H-5), 3.08 (d,  $J = 12.9$  Hz, 1H, H-4), 3.01-2.95 (m, 1H, H-5), 2.93 (dd,  $J = 16, 16$  Hz, 1H, H-2), 2.78 (dd,  $J = 11.4, 11.4$  Hz, 1H, H-5), 2.62 (dd,  $J = 16, 4$  Hz, 1H, H-2), 1.94-1.85 (m, 2H, H-6), 1.69 (m, 1H, H-7), 1.59-1.45 (m, 2H, H-6), 1.01 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, H-8). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  179.75 (1C, C-1), 142.61 (1C, C-9), 134.00 (1C, C-12), 130.10 (1C, C-13), 129.74 (1C, C-10), 64.59 (1C, C-4), 54.86 (1C, C-5), 53.36 (1C, C-5'), 46.09 (1C, C-2), 38.25 (1C, C-), 32.84 (1C, C-5), 32.57 (1C, C-5'), 29.94 (1C, C-7), 21.22 (1C, C-8). **HRMS (FAB $^+$ )**:  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{ClNO}_2$ : 296.1417, experimental (M+1): 296.1445.

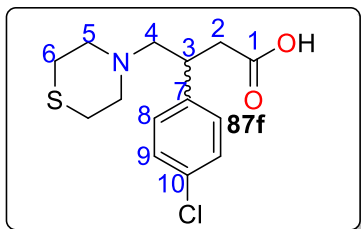
#### 5.7.4. Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-morfolinbutanoico **87e**.



A una solución de **98e** (0.45 g, 1.44 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 4 mL de una solución acuosa de NaOH (0.063 g, 1.58 mmol, 1. Eq) y se mantuvo en agitación por 48 h. **87e** se obtuvo como un sólido café con un rendimiento del 69% (0.28 g, p.f.=166 -168 °C). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.32 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-9), 7.25 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-8), 3.81-3.78 (m, 4H, H-6), 3.5-3.43 (dddd,  $J = 4.8, 4.8, 4, 4$  Hz, 1H, H-3), 3.08-2.98 (m, 3H, H-4, H-5), 2.94-2.81 (m, 4H, H-2, H-4, H-5), 2.57 (dd,  $J = 16.2, 4.5$  Hz, 1H, H-2). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  178.35 (1C, C-1), 142.88 (1C,

C-7), 133.90 (1C, C-10), 130.13 (2C, C-9), 130.00 (2C, C-8), 66.77 (2C, C-8), 65.41 (1C, C-4), 54.26 (2C, C-5), 43.60 (1C, C-2), 38.88 (1C, C-3). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>ClNO<sub>2</sub>: 284.1053, experimental (M+1): 284.1009.

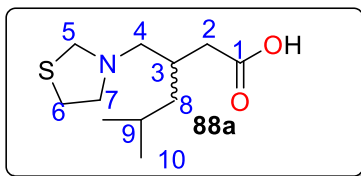
5.7.5. Síntesis del ácido 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoico **87f**.



A una solución de **98f** (0.45 g, 1.37 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 4 mL de una solución acuosa de NaOH (0.6 g, 1.5 mmol, 1.1 Eq) y se mantuvo en agitación por 48 h. **87f** se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 70% (0.288 g, p.f = 144-146 °C). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ

7.32 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-9), 7.25 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-8), 3.53-3.44 (m, 1H, H-3), 3.37 -3.33 (m, 2H, H-5), 3.17-3.06 (m, 3H, H-4, H-5), 2.97-2.85 (m, 2H, H-2, H-4), 2.87-2.85 (m, 4H, H-6), 2.58 (dd, *J* = 16.3, 3.8 Hz, 1H, H-2). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 178.90 (1C, C-1), 142.77 (1C, C-7), 133.79 (1C, C-10), 129.92 (2C, C-9), 129.89 (2C, C-8), 65.79 (1C, C-4), 55.95 (2C, C-5), 44.32 (1C, C-2), 38.78 (1C, C-3), 27.23 (2C, C-6). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>ClNO<sub>2</sub>: 300.0825, experimental (M+1): 300.0811.

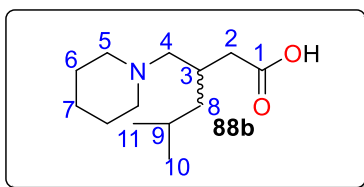
5.7.6. Síntesis del ácido 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil)hexanoico **88a**.



A una solución de **99a** (0.08 g, 0.312 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 2 mL de una solución acuosa de LiOH (0.011 g, 0.468 mmol, 1.5 Eq) y se mantuvo en agitación por 72 h. **88a** se obtuvo como un aceite ámbar con un rendimiento del 77%

(0.055 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.83 (s, 2H, H-5), 3.51-3.42 (m, 1H, H-7), 3.23 (m, 2H, H-6, H-7), 3.10-2.68 (m, 3H, H-4, H6), 2.56-2.44 (m, 1H, H-2), 2.37-2.18 (m, 2H, H-2, H-3), 1.74 -1.63 (m, 1H, H-9), 1.22-1.12 (m, 2H, H-8), 0.94 -0.91 (m, 6H, H-10, H-11). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 180.44 (1C, C-1), 60.81 (1C, C-6), 59.41 (1C, C-5), 51.43 (1C, C-7), 43.92 (1C, C-8), 39.09 (1C, C-2), 31.45 (1C, C-3), 30.39 (1C, C-6), 26.31 (1C, C-9), 23.36 (1C, C-10), 22.65 (1C, C-11). HRMS (FAB<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>S: 232.1371, experimental (M+1): 232.138.

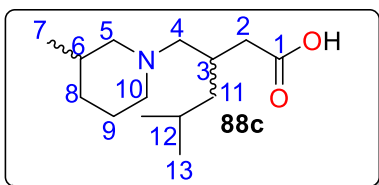
5.7.7. Síntesis del ácido 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil)hexanoico **88b**.



A una solución de **99b** (0.069 g, 0.27 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 2 mL de una solución acuosa de LiOH (0.008 g, 0.35 mmol, 1.3 Eq) y se mantuvo en agitación por 72 h. **88b** se obtuvo como un aceite ámbar con un rendimiento del 90%

(0.055 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.04-2.99 (m, 1H, H-4), 2.85 (dd,  $J= 13.2, 10.4$  Hz, 1H, H-4), 2.52 (dt,  $J= 16.6, 1.8$  Hz, 1H, H-2), 2.35 (dd,  $J= 16.6, 10.3$  Hz, 1H, H-2), 2.20 (m, 1H, H-3), 1.86 (s, 5H, H-6, H-7), 1.74-1.63 (m, 2H, H-7, H-9), 1.14 (dd,  $J= 7.2, 7.2$  Hz, 2H, H-8), 0.935 (d,  $J= 4$  Hz, 3H, H-10), 0.925 (d,  $J= 4$  Hz, 3H, H-11). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  181.03 (1C, C-1), 65.16 (2C, C-4, C-5), 44.96 (1C, C-2), 44.16 (1C, C-8), 30.36 (1C, C-3), 26.11 (1C, C-9), 24.76 (2C, C-6), 23.00 (1C, C-10), 22.96 (1C, C-7), 22.77 (1C, C-11). HRMS (FAB $^+$ ): m/z calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}_2$ : 228.1963, experimental (M+1): 228.1988.

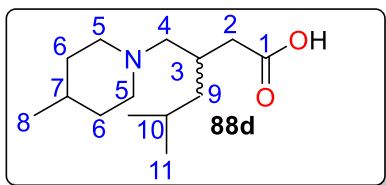
5.7.8. Síntesis del ácido 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il) metil)hexanoico **88c**.



A una solución de **99c** (0.065 g, 0.24 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 2 mL de una solución acuosa de LiOH (0.009 g, 0.36 mmol, 1.5 Eq) y se mantuvo en agitación por 72 h. **88c** se obtuvo como un aceite ámbar con un

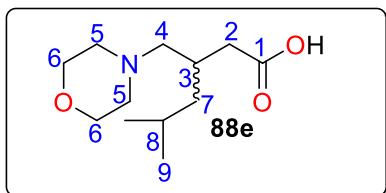
rendimiento del 70 % (0.04 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.61-3.47 (m, 2H, H-5, H-10), 3.28-3.26 (m, 1H, H-5), 3.04 (d,  $J = 13.2$  Hz, 1H, H-4), 2.94-2.85 (m, 2H, H-4, H-10), 2.74-2.59 (m, 1H, H-10), 2.53 (dd,  $J = 16.7$  Hz, 1H, H-2), 2.36 (dd,  $J = 16.6, 10.2$  Hz, 1H, H-4), 2.27-2.17 (m, 1H, H-3), 1.94-1.88 (m, 2H, H-6\*, H-9), 1.88-1.77 (m, 2H, H-8), 1.73-1.64 (m, 1H, H-12), 1.15 (dd,  $J = 7.2, 7.2$  Hz, 2H, H-11), 1.02-0.99 (m, 3H, H-7), 0.95-0.92 (m, 6H, H-13, H-14). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  180.92 (1C, C-1), 65.05 (1C, C-4), 59.38 (1C, C-5), 53.18 (1C, C-10), 44.79 (1C, C-2), 44.70 (1C, C-2), 44.15 (1C, C-11), 44.13 (1C, C-11), 31.54 (1C, C-8), 30.37 (2C, C-6, C-9), 30.26 (1C, C-3), 26.11 (1C, C-12), 23.05 (1C, C-15), 22.99 (1C, C-15), 22.80 (1C, C-16), 22.77 (1C, C-16), 18.95 (1C, C-7). HRMS (FAB $^+$ ): m/z calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{NO}_2$ : 242.212, experimental (M+1): 242.2107.

5.7.9. Síntesis del ácido 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il) metil)hexanoico **88d**.



A una solución de **99d** (0.1356 g, 0.5 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 4 mL de una solución acuosa de NaOH (0.022 g, 0.55 mmol, 1.3 Eq) y se mantuvo en agitación por 72 h. **88c** se obtuvo como un aceite ámbar con un rendimiento del 90% (0.1 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.64-3.56 (m, 2H, H-5), 3.04-3.00 (m, 1H, H-4), 2.88 (dd, *J*= 13.4, 10.3 Hz, 1H, H-4, H-5), 2.57-2.48 (m, 1H, H-2), 2.35 (dd, *J*= 16.8, 10.3 Hz, 1H, H-2), 2.25-2.14 (m, 1H, H-3), 1.91-1.82 (m, 2H, H-6), 1.68 (m, 1H, H-10), 1.53-1.48 (m, 3H, H-6, H-7), 1.14 (ddd, *J*= 7.3 Hz, 2H, H-9), 1.01 (d, *J*= 6.7 Hz, 3H, H-8), 0.93 (d, *J*= 6.7, 6H, H-11). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 180.86 (1C, C-1), 64.63 (1C, C-4), 53.21 (2C, C-5), 44.75 (1C, C-2), 44.07 (1C, C-9), 32.56 (2C, C-6), 30.37 (1C, C-3), 28.50 (1C, C-7), 26.05 (1C, C-10), 22.99 (1C, C-11), 22.76 (1C, C-12), 21.24 (1C, C-8). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>: 242.212, experimental (M+1): 242.2121.

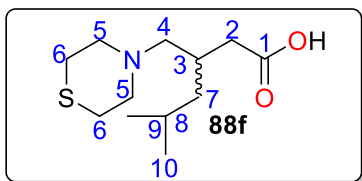
5.7.10. Síntesis del ácido 5-metil-3-(morfolinmetil)hexanoico **88e**.



A una solución de **99e** (0.1338 g, 0.52 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 4 mL de una solución acuosa de LiOH (0.018 g, 0.78 mmol, 1.5 Eq) y se mantuvo en agitación por 72 h. **88e** se obtuvo como un aceite ámbar con un rendimiento del 85 % (0.1 g). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3.89-3.87 (m, 4H, H-6), 3.29-3.24 (m, 2H, H-5), 3.12-3.06 (m, 2H, H-5), 3.05-3.00 (m, 1H, H-4), 2.88 (dd, *J*= 13.1, 10.2 Hz, 1H, H-4), 2.54-2.48 (m, 1H, H-2), 2.41 (dd, *J*= 16.6, 9.6 Hz, 1H, H-2), 2.29-2.18 (m, 1H, H-3), 1.75-1.62 (m, 1H, H-8), 1.16 (dd, *J*= 3.9, 3.9 Hz, 2H, H-7), 0.93 (d, *J*=4.8 Hz, 6H, H-9), 0.92 (d, *J*=4.8 Hz, 6H, H-10). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 180.28 (1C, C-1), 65.80 (2C, C-6), 64.92 (1C, C-4), 53.58 (2C, C-5), 43.95 (2C, C-2, C-7), 29.94 (1C, C-3), 26.12 (1C, C-8), 23.03 (1C, C-9), 22.79 (1C, C-10). HRMS (FAB<sup>+</sup>): *m/z* calculado para C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub>: 230.1756, experimental (M+1): 230.1743.



5.7.11. Síntesis del ácido 5-metil-3-(tiomorfolinmetil)hexanoico **88f**.



A una solución de **99f** (0.084 g, 0.3 mmol, 1 Eq) en metanol se agregaron 4 mL de una solución acuosa de NaOH (0.013 g, 0.33 mmol, 1.1 Eq) y se mantuvo en agitación por 72 h.

**88f** se obtuvo como un aceite ámbar con un rendimiento del 90% (0.067 g). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.51 -3.44 (m, 2H, H-5), 3.35-3.29 (m, 2H, H-5), 3.11-3.02 (m, 1H, H-4), 2.95-2.92 (m, 4H, H-6), 2.88-2.80 (m, 1H, H-4), 2.50 (d,  $J=16.6$  Hz, 1H, H-2), 2.39 (dd,  $J=16.6, 10.0$  Hz, 1H, H-2), 2.25-2.16 (m, 1H, H-3), 1.68 (sept,  $J=8$  Hz, 1H, H-8), 1.14 (dd,  $J=7.2, 7.2$  Hz, 2H, H-7), 0.92 (d,  $J=5.2$  Hz, 3H, H-9), 0.9 (d,  $J=5.2$  Hz, 3H, H-10). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  179.55 (1C, C-1), 64.35 (1C, C-4), 54.31 (2C, C-5), 43.16 (1C, C-2), 42.58 (1C, C-7), 28.83 (1C, C-3), 25.24 (2C, C-6), 24.71 (1C, C-8), 21.72 (1C, C-10), 21.41 (1C, C-9). HRMS (FAB $^+$ ):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{NO}_2$ : 246.1527, experimental (M+1): 246.1524.

5.8. Pruebas de actividad biológica.

Las pruebas *in vitro* e *in vivo* se realizaron en colaboración con el Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrer y el Dr. Juan Alberto Guevara Salazar de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

5.8.1. Pruebas *in vitro* de potencial inhibitorio.

Para llevar a cabo la determinación de la actividad inhibitoria de cada uno de los compuestos, fue necesario preparar las disoluciones stock de los reactivos que a continuación se mencionan:

- A. Solución buffer de  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0.1 M a pH= 8.6 en  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, ajustando el pH con HCl concentrado.
- B. Solución buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.075M a pH=7.2 con 25% v/v de glicerol, ajustando el pH con KOH 3M.
- C. Solución stock de GABA 0.128M en buffer de  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ .
- D. Solución stock de ácido 2-cetoglutarico 0.04M.
- E. Solución stock de  $\beta\text{-NADP}^+$  0.05M en  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada.
- F. GABA-AT 3.14 mg de sólido/mL en buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (solución B), equivalente a 1.1618 U capaces de convertir 1.1618  $\mu\text{mol}$  de GABA a semialdehído succínico y luego a succinato, con una reducción estequiométrica de 1.1618  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NADP}^+$ .

**G.** Soluciones stock de **inhibidores (86a-f, 87a-f y 88a-f y VGB)** 0.020, 0.010, 0.005 y 0.0025 M, obtenidas por dilución sucesiva de la disolución 0.020M en buffer de  $K_4P_2O_7$  (**solución A**).

Las disoluciones fueron mezcladas por inversión y mantenidas a una temperatura constante de 25°C, posteriormente se adicionó el volumen requerido de GABA-AT y se mezcló nuevamente por inversión, con un tiempo de incubación de 30 min. Posteriormente, se registró la absorbencia de cada solución a una  $\lambda_{\text{máx}}$  de 340 nm.

5.8.2. Pruebas *in vivo* de actividad anticonvulsiva en el modelo de ataques inducidos por PTZ.

Se utilizaron ratones CD1 con un peso corporal entre 20 y 26 g. Los compuestos de prueba y los medicamentos de referencia<sup>74,75,76,77</sup> se inyectaron vía intra peritoneal con volumen de inyección de 1.0 ml/100 g de peso para grupos entre 6-9 ratones a 0.50 y 1,00 mmol/kg para **87b** y **111**. Otro grupo entre 6 y 9 ratones sirvió como control, que recibió el vehículo (buffer de fosfato, C= 0.1M a pH = 8.0).

Los ensayos se realizaron a 1 h y 4 h de pretratamiento. 1 hora o 4 horas después, se inyectaron por vía subcutánea 75 mg/kg de PTZ con un volumen de inyección de 1.0 ml/100 g de peso. Cada animal se colocó en una jaula de plástico individual para observación durante 1 h. Se registran convulsiones, convulsiones tónico-clónicas, muerte y latencia. Al menos el 80% de los animales en el grupo de control tienen que mostrar convulsiones.

Todos los experimentos se realizaron con ratones CD1 machos con un peso corporal entre 20 y 26 g, que se encontraban en las mismas condiciones, ciclo natural de luz-oscuridad y temperatura a 22 °C y cuatro días de adaptación a las condiciones de laboratorio.

Todos los resultados de latencia y número de convulsiones se analizaron con una prueba ANOVA de una vía y análisis de medias con la prueba de Duncan. Los valores de  $p < 0.05$  fueron estadísticamente significativos.

Todos los resultados de protección contra la muerte fueron analizados con la prueba exacta de Fisher. Los valores de  $p < 0.05$  fueron estadísticamente significativos.

### 5.9. Estudios computacionales

Los estudios de relación cuantitativa estructura-actividad y de acoplamiento molecular se realizaron en colaboración con la Dra. Nina Pastor y el Dr. Rodrigo Said Razo Hernández del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la UAEM.

#### 5.9.1. Análisis conformacional y optimización de la geometría.

Todas las moléculas en el estudio (en su forma natural y zwitteriónica) se sometieron a un análisis conformacional dentro del nivel de teoría de la mecánica molecular empleando el campo de fuerza SYBIL.<sup>78</sup> Se llevó a cabo una optimización adicional dentro del enfoque de la teoría funcional de la densidad, empleando el funcional híbrido B3LYP<sup>79</sup> y el conjunto de bases 6-31\*G.<sup>80</sup> Todos los cálculos se realizaron en el programa SPARTAN 08.<sup>81</sup> Se obtuvieron tipos de cargas parciales electrostáticas y de Mulliken para usarse adicionalmente como descriptores cuánticos moleculares.

#### 5.9.2. Cálculos de descriptores moleculares.

Obtuvimos un total de 209 descriptores moleculares derivados de los grupos constitucionales, topológicos, geométricos, grupos funcionales, carga molecular y familias de propiedades moleculares de los descriptores (Anexos Tabla S4). La selección de estas familias de descriptores moleculares se basó en encontrar las modificaciones estructurales (grupos funcionales, forma, distribución de carga y propiedades fisicoquímicas) sobre el andamiaje GABA que mejora su potencia como inhibidores GABA-AT. Para estos cálculos se utilizó el software DRAGON 05.<sup>82</sup>

#### 5.9.3. Construcción y validación del QSAR.

La construcción del modelo matemático se llevó a cabo con la técnica de algoritmos genéticos (AG) en el programa MobyDigs 01.<sup>83</sup> Todos los descriptores moleculares de los análogos de GABA se usaron como variables independientes (X) y el porcentaje de inhibición como la variable dependiente (Y). La selección del modelo QSAR se basó en sus valores estadísticos ( $R^2$ ,  $Q^2$ ,  $s$ , y  $F$ ) y que pasó las reglas redundancia, quik, sobreajuste y  $Q^2_{\text{asintótica}}$ . El modelo QSAR final se validó con un grupo de prueba que consistió con el 20% de todas las moléculas en este estudio, estas moléculas se seleccionaron al azar. Este procedimiento se realizó un mínimo de diez veces.

La regla quik permite el rechazo de modelos con descriptores moleculares elevados de co-linearidad que pueden conducir a una correlación casual.<sup>84</sup> Esta regla se basa en el índice de

correlación multivariable  $K$  que mide la correlación total de un conjunto de variables, definido como:

$$K = \frac{\sum_j \left[ \frac{\lambda_j}{\sum_j \lambda_j} - \frac{1}{p} \right]}{\frac{2(p-1)}{p}} \quad j = 1, \dots, p \text{ and } 0 \leq K \leq 1 \quad (2)$$

Donde  $\lambda_j$  son los datos de los valores propios de la matriz  $X(n, p)$  conjunta,  $n$  es el número de objetos y  $p$  es el número de variables en el modelo. La correlación total en el conjunto dada por los descriptores  $X$  más la respuesta  $Y$  ( $K_{XY}$ ) siempre debe ser mayor que la medida solo en el conjunto de descriptores ( $K_X$ ); si  $K_{XY} - K_X < \Delta K$ , el modelo es rechazado;  $\Delta K$  puede tener valores entre 0.0 y 0.05.

El objetivo de la regla sobreajuste detecta los modelos con un exceso de descriptores moleculares "malos". Esta regla estipula que: si  $R^N < t^N(\varepsilon)$  el modelo se rechaza. Los valores de  $t^N(\varepsilon)$  se calculan mediante la siguiente ecuación:

$$t^N(\varepsilon) = \frac{p \cdot \varepsilon - R}{p \cdot R} \quad (3)$$

donde  $p$  es el número de descriptores en el modelo y los valores de  $\varepsilon$  varían de 0.01 a 0.1. Para este estudio  $\varepsilon = 0.01$ .  $R^N$  se define por:

$$R^N = \sum_{j=1}^{p^-} M_j \quad M_j < 0 \text{ and } -1 \leq R^N \leq 0 \quad (4)$$

Donde  $M_j$  se define por la ecuación:

$$M_j = \frac{R_{jY}}{p} - \frac{1}{p} - \frac{1}{p} \leq M_j \leq \frac{p-1}{p} \quad (5)$$

$R_{jY}$  es el valor absoluto del coeficiente de regresión entre el descriptor  $j$ -th y la respuesta  $Y$ . El parámetro  $R^N$  representa un exceso de variables ruidosas o inútiles y puede considerarse como una medida de sobreajuste. Toma el valor máximo igual a cero cuando hay variables no ruidosas en el modelo.

Como se mencionó anteriormente, para probar nuestro modelo de manera más rigurosa en términos del aspecto predictivo, se realizó una evaluación del error estimado en todas las moléculas que se excluyeron del proceso de entrenamiento. Para evaluar la capacidad

predictiva interna de nuestros modelos, se empleó la técnica de omitir uno ( $Q_{LOO}^2$ ). Esta técnica consiste en evaluar cada molécula dentro del conjunto de entrenamiento para determinar cómo corresponde al conjunto de validación.<sup>85</sup> Se evalúa cada molécula individual y se predice su valor  $Y$ :

$$Q_{LOO}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i/i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (6)$$

Otra forma de evaluar la capacidad predictiva de nuestro modelo matemático es mediante la regla de Q cuadrada asintótica  $Q_{asintótica}^2$  que indica que un modelo es predictivo si  $Q_{LOO}^2 - Q_{asintótica}^2 > \Delta Q$ , donde los valores  $\Delta Q$  varían desde -0.005 hasta 0.005.  $Q_{asintótica}^2$  se define como:

$$Q_{ASYM}^2 = 1 - (1 - R^2) \cdot \left(\frac{n}{n - p}\right)^2 \quad (7)$$

Donde  $n$  es el número de objetos y  $p$  es el número de variables en el modelo.

Además, se calcularon los valores de la desviación estándar ( $s$ ) y la prueba de Fisher ( $F$ ), donde el parámetro  $s$  contiene información sobre la correlación entre las actividades experimentales y calculadas y el número de moléculas en el estudio.

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2} \quad (8)$$

$n$  representa el número de moléculas en el estudio,  $\hat{y}_i$  representa la actividad experimental y  $y_i$  es la actividad calculada a partir del modelo QSAR.

Mientras tanto, el parámetro,  $F$  está relacionado con la probabilidad de que el modelo matemático ocurra de manera casual:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / df_M}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / df_E} \quad (9)$$

$df_M$  y  $df_E$  se refieren a los descriptores moleculares del modelo y error, respectivamente. Además,  $\hat{y}_i$ ,  $\bar{y}$  y  $y_i$  se refieren al valor experimental, promedio de las actividades experimentales y calculadas, respectivamente. En el modelo matemático,  $s$  y  $F$  deberían tener

los valores más pequeños y más grandes posibles, respectivamente, para garantizar que el modelo QSAR sea confiable.<sup>86</sup>

#### 5.9.4 Cálculos de acoplamiento molecular (*Docking*)

Los cálculos de acoplamiento molecular de todos los análogos de GABA (incluidos enantiómeros *R* y *S* para moléculas de las series 2 y 3) sobre *Pseudomonas* y estructuras GABA-AT humanas, generados en el proceso de modelado de homología, se realizaron en el software Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0.<sup>87,88</sup> Las cavidades fueron detectadas por el método expandido de esfera de Van der Waals. Los cálculos se realizaron sobre el sitio catalítico; con un volumen de cavidad de 137.73 Å<sup>3</sup> y 339.46 Å<sup>3</sup> para las *Pseudomonas* y el modelo humano, respectivamente.

La selección de la cavidad se basó en los resultados de la alta similitud molecular con el ligando endógeno. Se emplearon las geometrías de energía mínima de todos los análogos de GABA en su forma zwitteriónica y las cargas parciales de Mulliken obtenidas por los cálculos de DFT. Los residuos dentro de 6 Å se establecieron como flexibles, se establecieron 2000 pasos de minimización para cada residuo flexible y 2000 pasos de minimización global por ejecución. Se utilizó la función de búsqueda MolDock Optimizer, basada en un algoritmo evolutivo. Se establecieron un total de 20 carreras con un máximo de 4000 iteraciones con una población de 200 individuos (para el modelo de *Pseudomonas*) y 400 individuos (para el modelo humano) por ejecución.

Para calcular la energía de interacción, utilizamos la función de puntuación Moldock Score [GRID]. La función de puntuación GRID se estableció en 0.2 Å y la esfera de búsqueda se fijó en un radio de 15 Å. Para el análisis energético del ligando, se consideraron las interacciones electrostáticas internas, los enlaces internos de hidrógeno y las torsiones sp<sup>2</sup>-sp<sup>2</sup>. El método se validó mediante la reproducción del modo de unión experimental del inhibidor de referencia dentro de la estructura cristalina 3r4t para validar el modelo de *Pseudomonas*, y 1ohw y 1ohy para validar el modelo humano, con una desviación cuadrada de los medios (RMSD) de 1.7 Å, 1.3 Å y 1.8 Å respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Prince, Martin (King's Collage London, UK) Adelina Comas Herrera (London School of Economics and Political Science, UK), Martin Knapp (King's Collage London, UK), Maelenn Guerchet (King's Collage London, UK), M. K. (The G. O. for A. and D. C. *World Alzheimer Report 2016*; 2016.
- (2) Zanforlin, E.; Zagotto, G.; Ribaud, G. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8 (11), 2356–2368.
- (3) Mahajan, A.; Balakrishnan, P.; Patel, A.; Konstantinidis, I.; Nistal, D.; Annapureddy, N.; Poojary, P.; Nadkarni, G. N.; Sidiropoulos, C. *J. Clin. Neurosci.* **2016**, 31, 162–165.
- (4) Begley, C. E.; Famulari, M.; Annegers, J. F.; Lairson, D. R.; Reynolds, T. F.; Coan, S.; Dubinsky, S.; Newmark, M. E.; Leibson, C.; So, E. L.; Rocca, W. A. *Epilepsia* **2000**, 41 (3), 342–351.
- (5) García-Contreras, F.; Constantino-Casas, P.; Castro-Ríos, A.; Nevárez-Sida, A.; Del Carmen Estrada Correa, G.; Carlos Rivera, F.; Guzmán-Caniupan, J.; Del Pilar Torres-Arreola, L.; Contreras-Hernández, I.; Mould-Quevedo, J.; Garduño-Espinosa, J. *Arch. Med. Res.* **2006**, 37 (3), 376–383.
- (6) American Physiological Society (1887- ), K. *Physiol. Rev.* **1974**, 54 (2), 418–540.
- (7) Treiman, D. M. *Epilepsia* **2001**, 42 (SUPPL. 3), 8–12.
- (8) Gajcy, K.; Lochynski, S.; Librowski, T. *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17 (22), 2338–2347.
- (9) Jo, S.; Yarishkin, O.; Hwang, Y. J.; Chun, Y. E.; Park, M.; Woo, D. H.; Bae, J. Y.; Kim, T.; Lee, J.; Chun, H.; Park, H. J.; Lee, D. Y.; Hong, J.; Kim, H. Y.; Oh, S.-J.; Park, S. J.; Lee, H.; Yoon, B.-E.; Kim, Y.; Jeong, Y.; Shim, I.; Bae, Y. C.; Cho, J.; Kowall, N. W.; Ryu, H.; Hwang, E.; Kim, D.; Lee, C. J. *Nat. Med.* **2014**, 20 (8), 886–896.

- (10) M. Gerlach, W. Kuhn, Th. Muller, R. Winkel, H. L. and H. P. *Eur. J. Neurol.* **1996**, 3 (5), 467–470.
- (11) Petersen, J. G.; Bergmann, R.; Krogsgaard-Larsen, P.; Balle, T.; Frløund, B. *Neurochem. Res.* **2014**, 39 (6), 1005–1015.
- (12) Owens, D. F.; Kriegstein, A. R. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3 (9), 715–727.
- (13) Hear, W. G.; Churchich, J. E. *J. Biol. Chem* **1984**, 259 (18), 11459–11463.
- (14) Naffaa, M. M.; Hung, S.; Chebib, M.; Johnston, G. A. R.; Hanrahan, J. R. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, 174 (13), 1881–1894.
- (15) Enz, R. *Biol. Chem.* **2001**, 382 (August), 1111–1122.
- (16) Shashoua, V. E.; Jacob, J. N.; Ridge, R.; Campbell, A.; Baldessarini, R. J. *J. Med. Chem.* **1984**, 27 (5), 659–664.
- (17) Baxter, F.; Roberts, E. *J. Biol. Chem* **1958**, 5 (233), 1135–1139.
- (18) Sills, G. J. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6 (1), 108–113.
- (19) Lippert, B.; Metcalf, B. W.; Jung, M. J.; Casara, P. *Eur. J. Biochem.* **1977**, 74 (3), 441–445.
- (20) Al-Majed, A. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; 2010; Vol. 35, pp 309–345.
- (21) Maguire, M. J.; Hemming, K.; Wild, J. M.; Hutton, J. L.; Marson, A. G. *Epilepsia* **2010**, 51 (12), 2423–2431.
- (22) Froestl, W. *Adv. Pharmacol.* **2010**, 58, 19–62.
- (23) Olpe, H. R.; Demieville, H.; Baltzer, V.; Bencze, W. L.; Koella, W. P.; Wolf, P.; Haas, H. L. *Eur. J. Pharmacol.* **1978**, 52 (1), 133–136.
- (24) Jennifer Ong, David I.S Kerr, David J Doolette, Rujee K Duke, Ken N Mewett, R. D. A. and G. A. R. J. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, 233 (1), 169–172.
- (25) Hoekstra, M. S.; Sobieray, D. M.; Schwindt, M. A.; Mulhern, T. A.; Grote, T. M.;



- Huckabee, B. K.; Hendrickson, V. S.; Franklin, L. C.; Granger, E. J.; Karrick, G. L. *Org. Process Res. Dev.* **1997**, *1* (1), 26–38.
- (26) Belliotti, T. R.; Capiris, T.; Ekhatto, I. V.; Kinsora, J. J.; Field, M. J.; Heffner, T. G.; Meltzer, L. T.; Schwarz, J. B.; Taylor, C. P.; Thorpe, A. J.; Vartanian, M. G.; Wise, L. D.; Zhi-Su, T.; Weber, M. L.; Wustrow, D. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (7), 2294–2307.
- (27) Lebedyeva, I. O.; Ostrov, D. A.; Neubert, J.; Steel, P. J.; Patel, K.; Sileno, S. M.; Goncalves, K.; Ibrahim, M. A.; Alamry, K. A.; Katritzky, A. R. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (4), 1479–1486.
- (28) Ordóñez, M.; Cativiela, C. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18* (1), 3–99.
- (29) Ordóñez, M.; Cativiela, C.; Romero-Estudillo, I. *Tetrahedron Asymmetry* **2016**, *27* (20–21), 999–1055.
- (30) Bera, K.; Nadkarni, D.; Namboothiri, I. N. N. *J. Chem. Sci.* **2013**, *125* (3), 443–465.
- (31) Winkler, M.; Knall, A. C.; Kulterer, M. R.; Klempier, N. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (19), 7423–7426.
- (32) Hawker, D. D.; Silverman, R. B. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, *20* (19), 5763–5773.
- (33) Nielsen, L.; Brehm, L.; Krogsgaard-larsen, P. *J. Med. Chem.* **1990**, *33* (1), 71–77.
- (34) Nanavati, S. M.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (24), 9341–9349.
- (35) Qiu, J.; Pingsterhaus, J. M.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (22), 4725–4728.
- (36) Journal, E.; Wales, N. S. *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *122* (3), 339–348.
- (37) Qiu, J.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (4), 706–720.
- (38) Pan, Y.; Qiu, J.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (25), 5292–5293.
- (39) Pan, Y.; Calvert, K.; Silverman, R. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (21), 5719–5725.

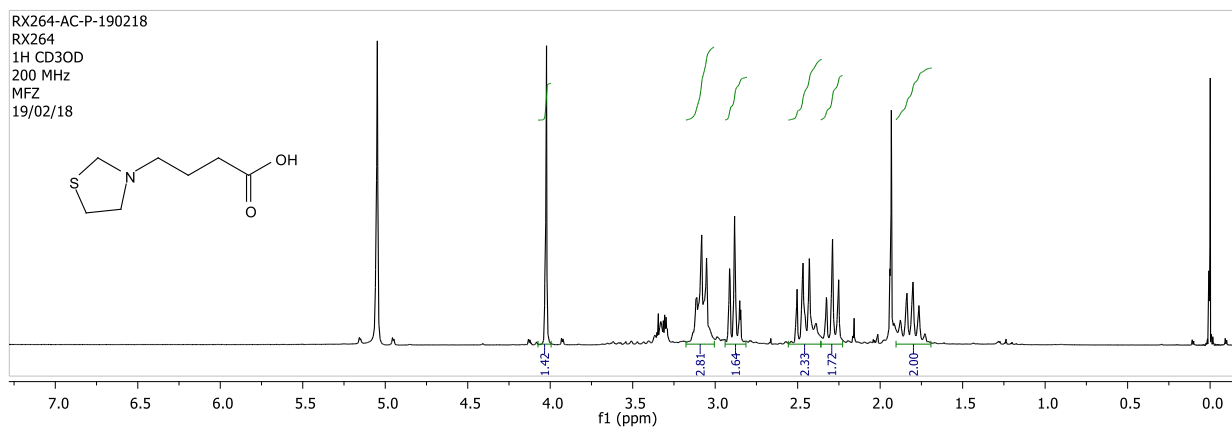
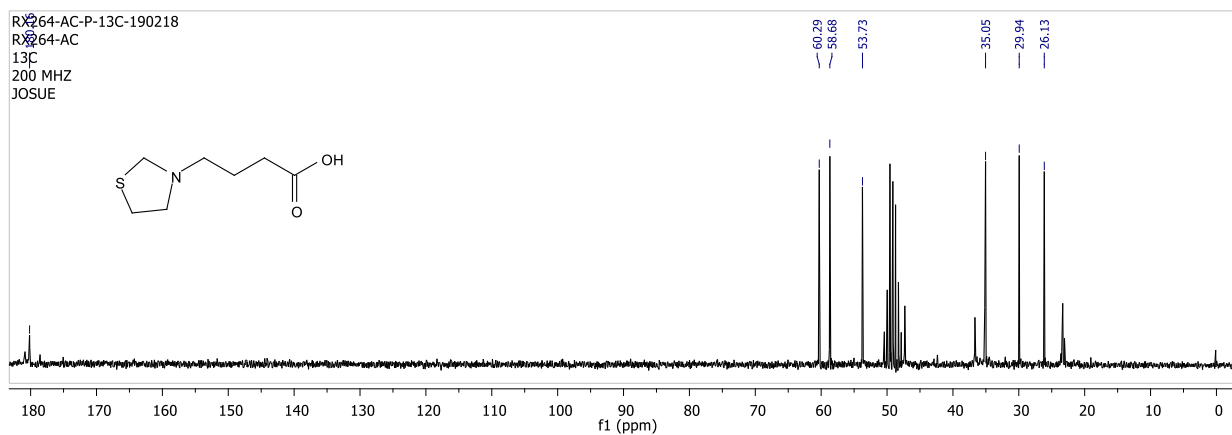
- (40) Lu, H.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (25), 7404–7412.
- (41) Wang, Z.; Silverman, R. B. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (7), 2242–2252.
- (42) Wang, Z.; Yuan, H.; Nikolic, D.; Van Breemen, R. B.; Silverman, R. B. *Biochemistry* **2006**, *45* (48), 14513–14522.
- (43) Clift, M. D.; Silverman, R. B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (10), 3122–3125.
- (44) Le, H. V.; Hawker, D. D.; Wu, R.; Doud, E.; Widom, J.; Sanishvili, R.; Liu, D.; Kelleher, N. L.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (13), 4525–4533.
- (45) Juncosa, J. I.; Takaya, K.; Le, H. V.; Moschitto, M. J.; Weerawarna, P. M.; Mascarenhas, R.; Liu, D.; Dewey, S. L.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (6), 2151–2164.
- (46) Tovar G, E. Diseño, síntesis y evaluación de la actividad biológica de análogos de GABA, pregabalina y baclofen, Tesis doctoral. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor, 2014.
- (47) Fernández Z, M; Tovar G, E; Trujillo F, J. G; Guevara S, J. A. Synthesis of  $\gamma$ -aminoacid analogues and obtained products. MX2014006541, noviembre, 2015.
- (48) Martínez C, Z. Diseño y síntesis de análogos heterocíclicos de GABA, pregabalina y baclofen, Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor, 2016.
- (49) Díaz P, L. Diseño y síntesis de triazoles como inhibidores de la enzima GABA-aminotransferasa, Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor, 2016.
- (50) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (23), 4–17.
- (51) Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. Molinspiration <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- (52) Kaichao, Lin; Guoning, M. Synthesis method of EGFR (epidermal growth factor

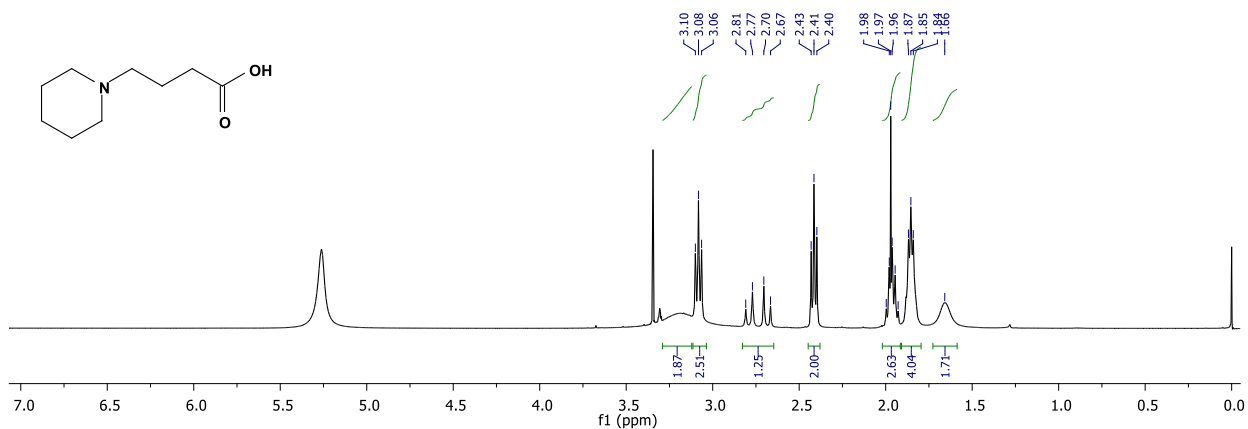
- receptor) inhibitor Dacomitinib. CN103304492, septiembre, 2013.
- (53) Moore, L. J; Taylor, M. S; Soloshonok, A. V. *Arkivoc* **2005**, 6, 287–292.
- (54) Díaz, C. Y. Síntesis de sistemas alfa, beta-insaturados heterocíclicos quirales, como precursores de análogos de gamma-aminoácidos., Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor, 2011.
- (55) Lipshutz, B. H.; Hackmann, C. *J. Org. Chem.* **1994**, 59 (24), 7437–7444.
- (56) Duke, R. K.; Chebib, M.; Hibbs, D. E.; Mewett, K. N.; Johnston, G. A. R. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15 (11), 1745–1751.
- (57) Berhal, F.; Tardy, S.; Pérard-Viret, J.; Royer, J. *European J. Org. Chem.* **2009**, No. 3, 437–443.
- (58) Juaristi, E.; Leon, R. J.L.; Reyes A.; Escalante, J. *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, 10 (13), 2441–2495.
- (59) Juaristi, E; Escalante, J.; Leon, R. J. L. . R. A. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, 9 (5), 715–740.
- (60) Kaboudin, B.; Alaie, S.; Yokomatsu, T. *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, 22 (18–19), 1813–1816.
- (61) Kovalenko, N.V.; Kulinkovich, G. O. *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, 22 (1), 26–30.
- (62) Copeland., R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.*, 2nd ed.; Wiley-VCH, 2000.
- (63) Bruchey, A. K.; Gonzalez-Lima, F. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, 3 (1), 69–76.
- (64) Fukushima, S.; Kinoshita, A.; Puatanachokchai, R.; Kushida, M.; Wanibuchi, H.; Morimura, K. *Carcinogenesis* **2005**, 26 (11), 1835–1845.
- (65) Calabrese, E. J.; Calabrese, V. .; Giordano, J. *Brain Circ.* **2017**, 3 (1), 1.
- (66) Calabrese, E. J. *Crit. Rev. Toxicol.* **2008**, 38 (6), 543–556.
- (67) Calabrese, E. J. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, 66 (5).

- (68) Lee, H.; Le, H. V.; Wu, R.; Doud, E.; Sanishvili, R.; Kellie, J. F.; Compton, P. D.; Pachaiyappan, B.; Liu, D.; Kelleher, N. L.; Silverman, R. B. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 2087–2098.
- (69) Lee, H.; Doud, E. H.; Wu, R.; Sanishvili, R.; Juncosa, J. I.; Liu, D.; Kelleher, N. L.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (7), 2628–2640.
- (70) Storici, P.; De Biase, D.; Bossa, F.; Bruno, S.; Mozzarelli, A.; Peneff, C.; Silverman, R. B.; Schirmer, T. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (1), 363–373.
- (71) Liu, W.; Peterson, P. E.; Carter, R. J.; Zhou, X.; Langston, J. A.; Fisher, A. J.; Toney, M. D. *Biochemistry* **2004**, *43* (34), 10896–10905.
- (72) Baugh, L.; Phan, I.; Begley, D. W.; Clifton, M. C.; Armour, B.; Dranow, D. M.; Taylor, B. M.; Muruthi, M. M.; Abendroth, J.; Fairman, J. W.; Fox, D.; Dieterich, S. H.; Staker, B. L.; Gardberg, A. S.; Choi, R.; Hewitt, S. N.; Napuli, A. J.; Myers, J.; Barrett, L. K.; Zhang, Y.; Ferrell, M.; Mundt, E.; Thompkins, K.; Tran, N.; Lyons-Abbott, S.; Abramov, A.; Sekar, A.; Serbzhinskiy, D.; Lorimer, D.; Buchko, G. W.; Stacy, R.; Stewart, L. J.; Edwards, T. E.; Van Voorhis, W. C.; Myler, P. J. *Tuberculosis* **2015**, *95* (2), 142–148.
- (73) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (14), 2923–2925.
- (74) Huang, R. Q.; Bell-Horner, C. L.; Dibas, M. I.; Covey, D. F.; Drewe, J. A.; Dillon, G. H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298* (3), 986–995.
- (75) Luszczki, J. J.; Ratnaraj, N.; Patsalos, P. N.; Czuczwar, S. J. *Neuropsychopharmacology* **2005**, *7* (4), 639–651.
- (76) Łuszczki, J. J.; Zuchora, M.; Sawicka, K. M.; Kozińska, J.; Czuczwar, S. J. *Pharmacol. Reports* **2006**, *58* (5), 652–659.
- (77) Eiichi Sugaya, Atsushi Ishige, Kyoji Sekiguchi, Susumu Iizuka, Koichi Ito, Akira Sugimoto, Masaki Aburada, and E. H. *Epilepsia* **1986**, *27* (4), 354–358.
- (78) Clark, M.; Cramer, R. D.; Van Opdenbosch, N. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10* (8), 982–1012.

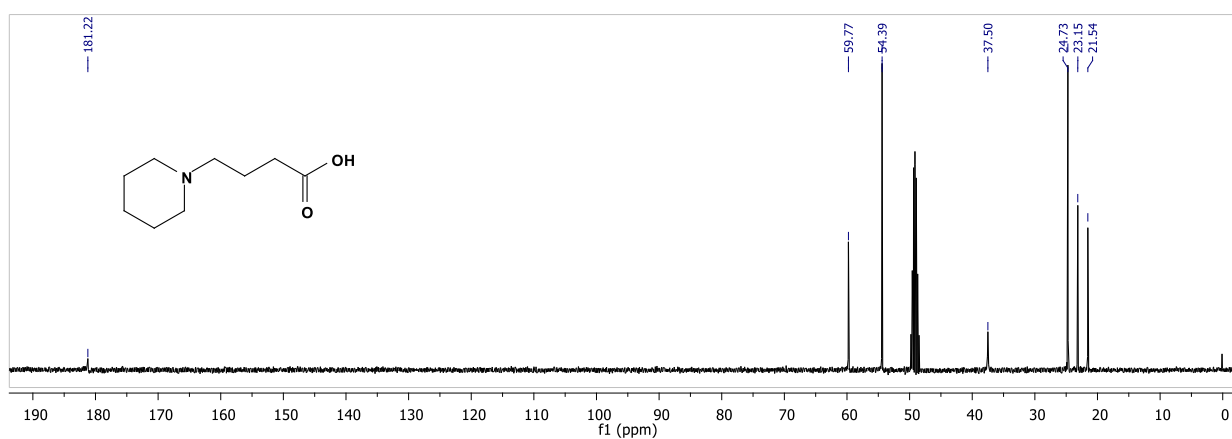
- (79) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (45), 11623–11627.
- (80) Petersson, G. A.; Tensfeldt, T. G.; Montgomery, J. A. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94* (9), 6091–6101.
- (81) Wavefunction. Spartan'08 [www.wavefun.com](http://www.wavefun.com).
- (82) Talete SRI. DRAGON for windows (Software for Molecular Descriptor Calculations), Version 5.4, Italia, M. Dragon <http://www.talete.mi.it/>.
- (83) Todeschini, R.; Ballabio, D.C.; Mauri, V. MobyDigs-Version 1.0, Talete SRL: Milan, Italy 2004.
- (84) Todeschini, R.; Consonni, V.; Mauri, A.; Pavan, M. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *515*, 199–208.
- (85) Razo, H. R. S.; Pineda, U.; Velazco, M. K.; Villanueva, G. M. A.; Sumaya, M. M.; Martínez, M. T.; Gómez, S. F. J. *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, *12* (10), 1067–1080.
- (86) Sarabia, O.; Villanueva, G. M.; Gonzalez, G. J. P.; Pineda, U. J. *Comptes Rendus Chim.* **2016**, *20*, 169–180.
- (87) Yang, J. M.; Chen, C. C. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2004**, *55* (2), 288–304.
- (88) Thomsen, R.; Christensen, M. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (11), 3315–3321.

## ANEXOS

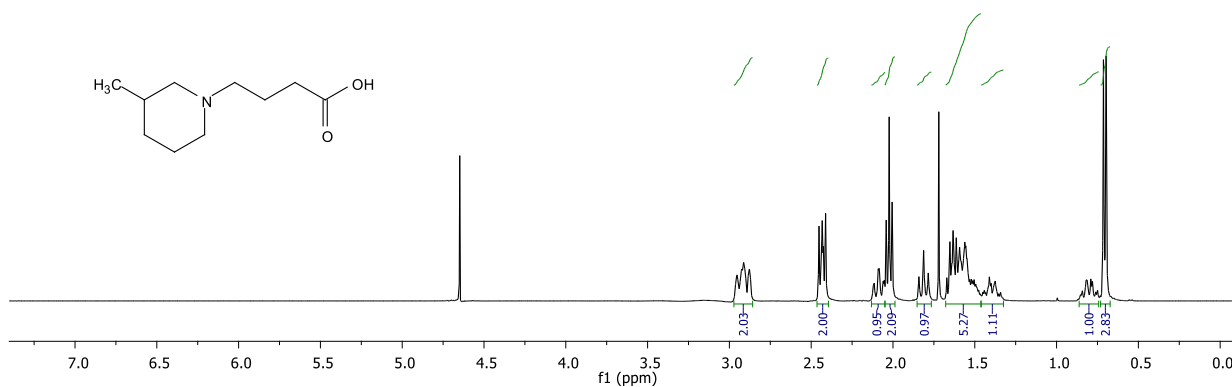
6.1. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los análogos finales6.1.1. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los análogos de GABA.RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-(tiazolidin-3-il) butanoico **86a**.RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-(tiazolidin-3-il) butanoico **86a**.



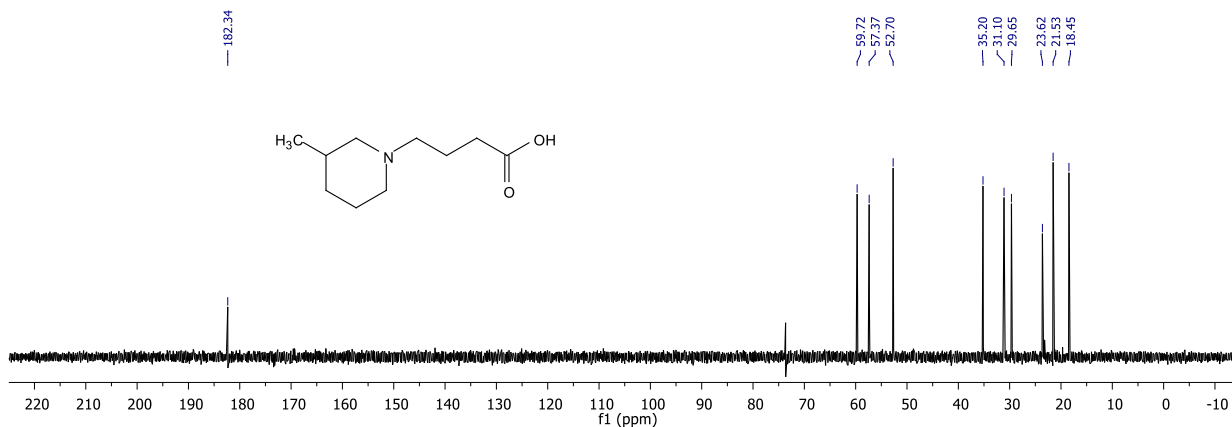
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-(piperidin-1-il) butanoico **86b**.



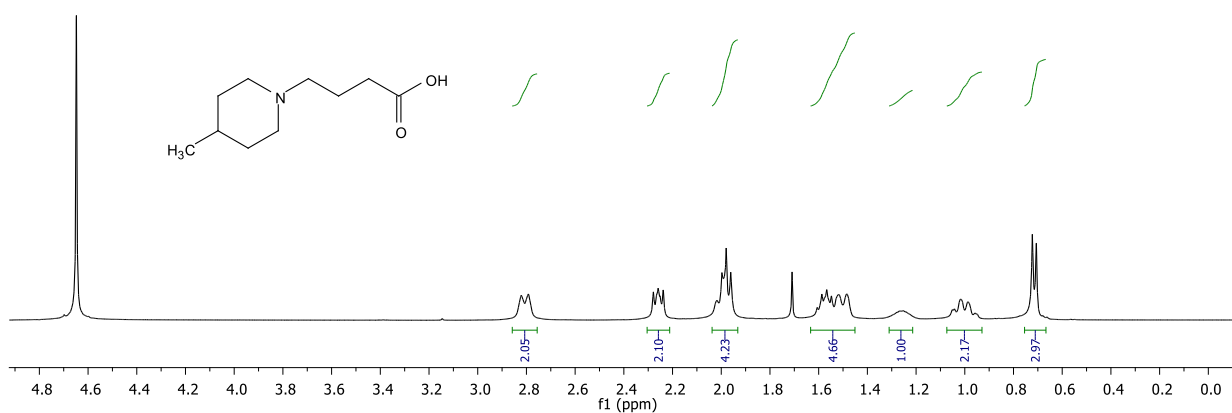
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-(piperidin-1-il) butanoico **86b**.



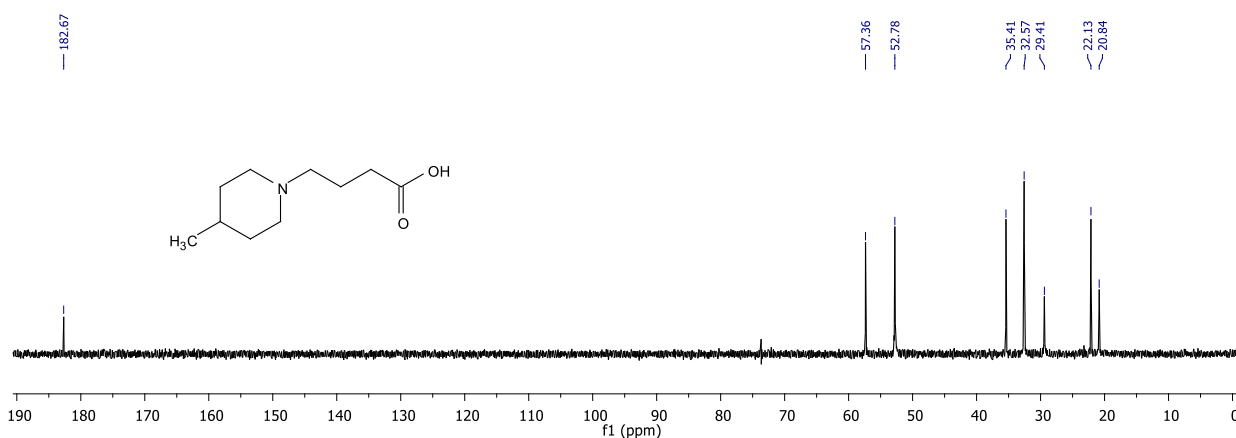
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido 4-(3-metilpiperidin-1-il) butanoico **86c**.



RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido 4-(3-metilpiperidin-1-il) butanoico **86c**.

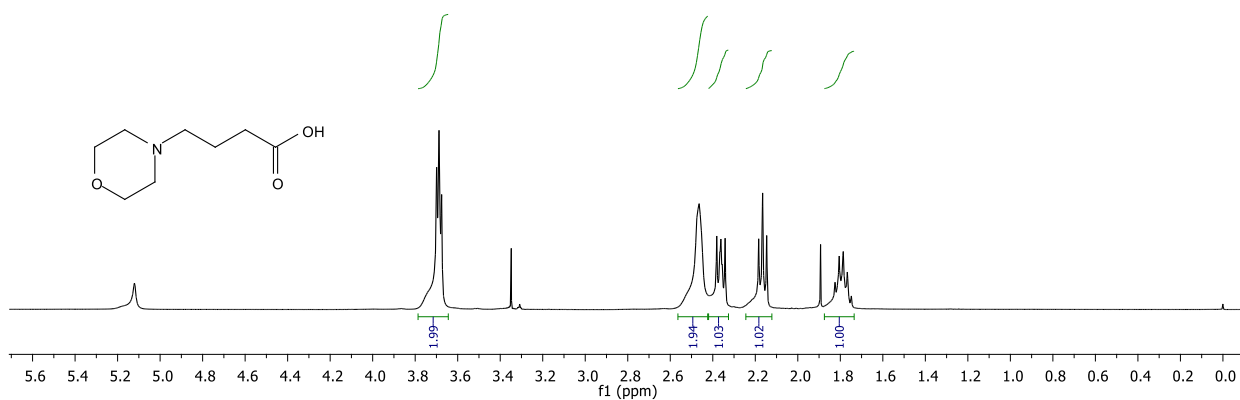
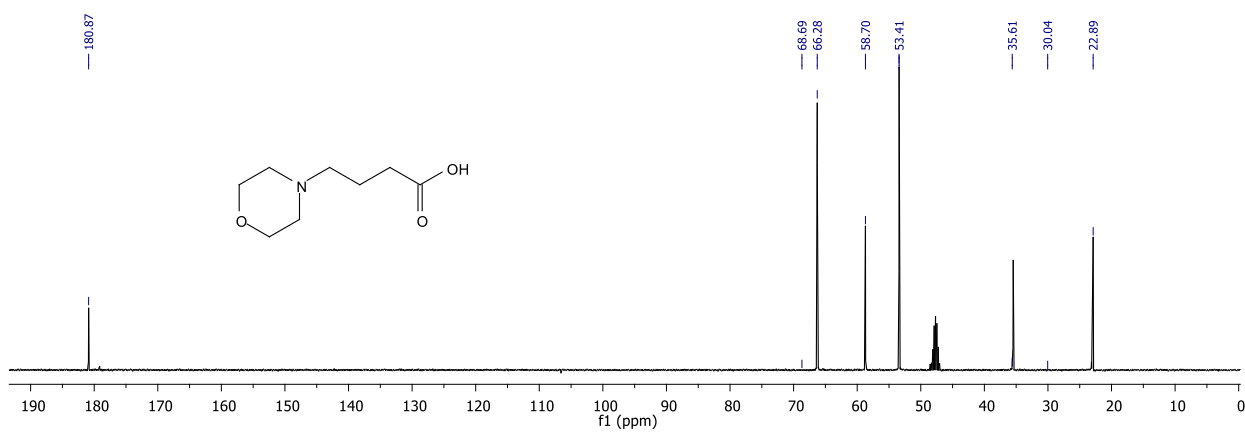
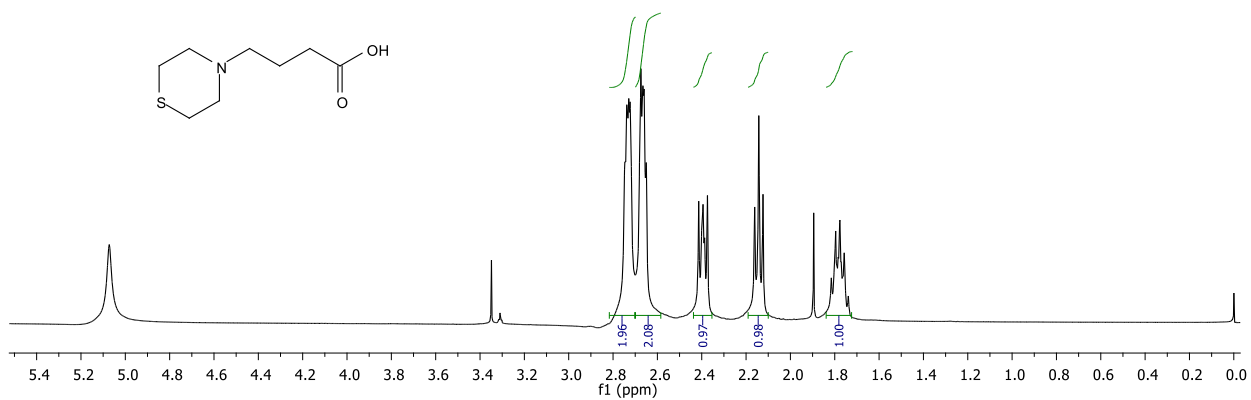


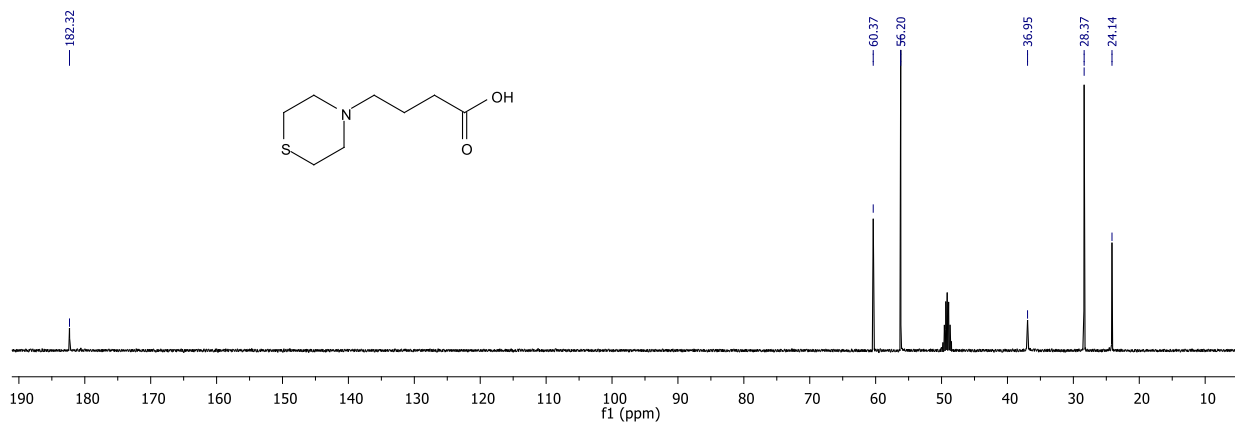
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-(4-metilpiperidin-1-il) butanoico **86d**.



RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-(4-metilpiperidin-1-il) butanoico **86d**.

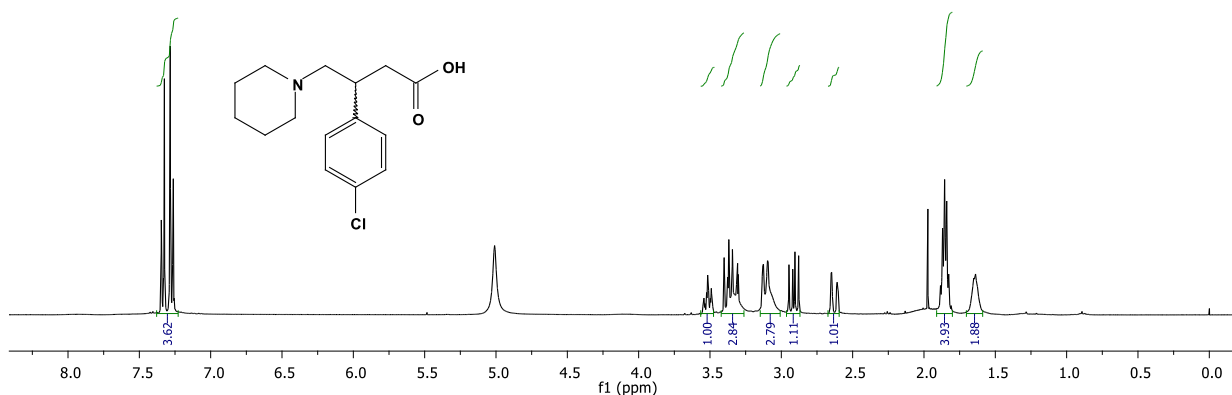


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-morfolinbutanoico **86e**.RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-morfolinbutanoico **86e**.RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-tiomorfolinbutanoico **86f**.

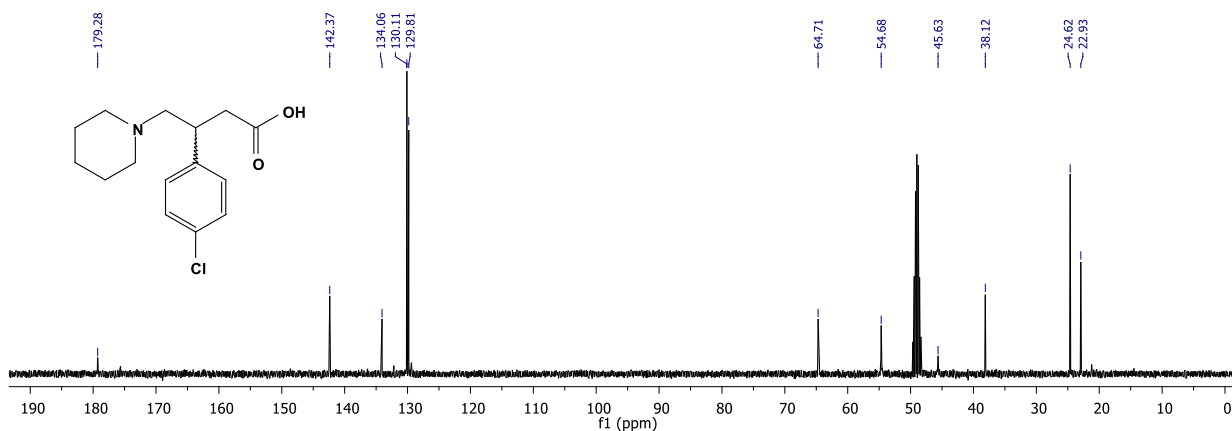


RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 4-tiomorfolinbutanoico **86f**.

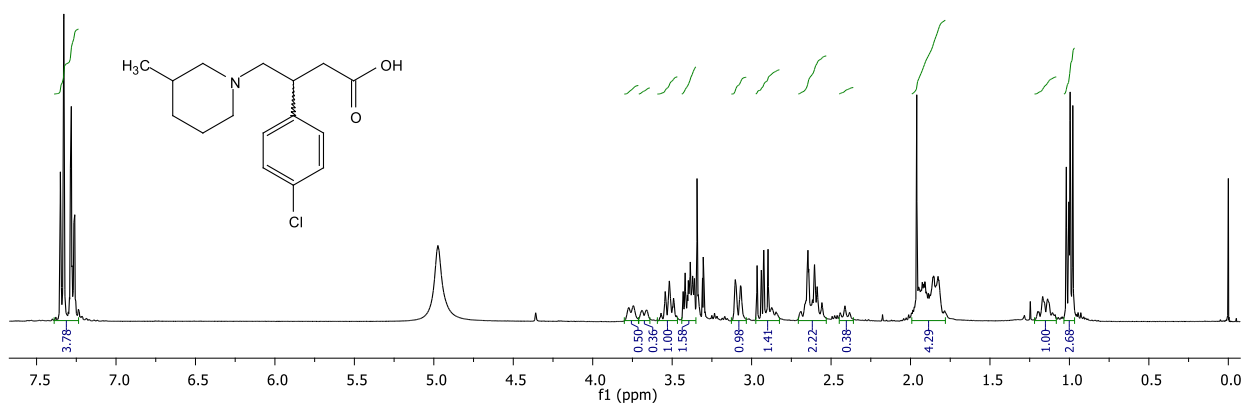
6.1.2. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los análogos de baclofen.



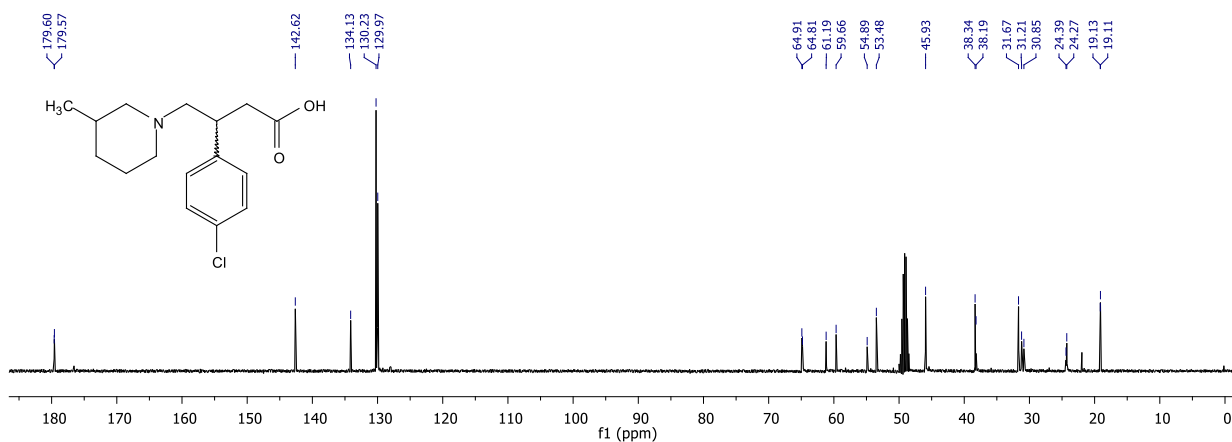
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(piperidin-1-il) butanoico **87b**.



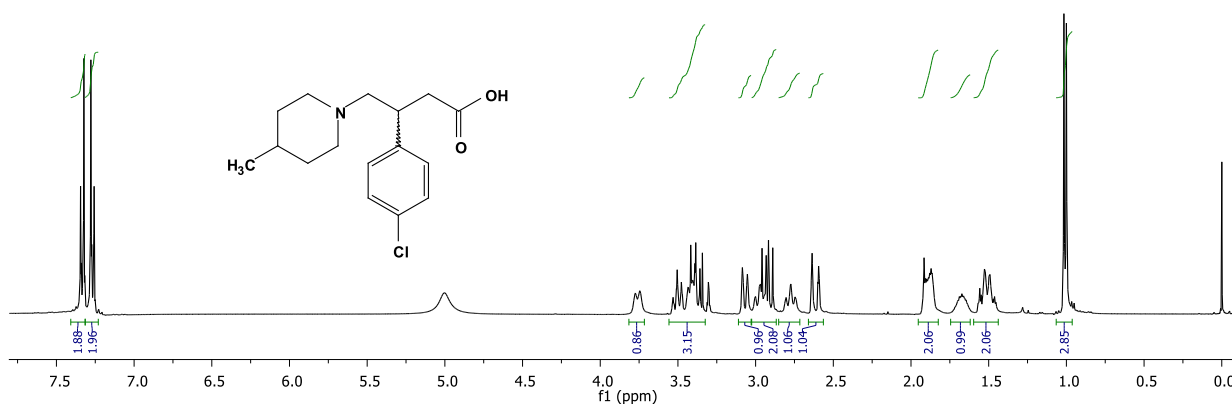
RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(piperidin-1-il) butanoico **87b**.



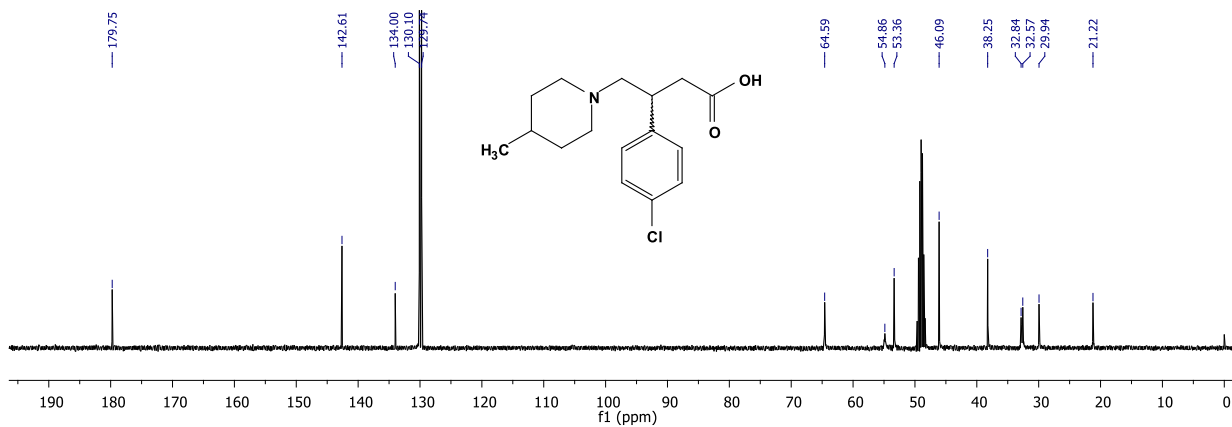
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(3-metilpiperidin-1-il) butanoico **87c**.



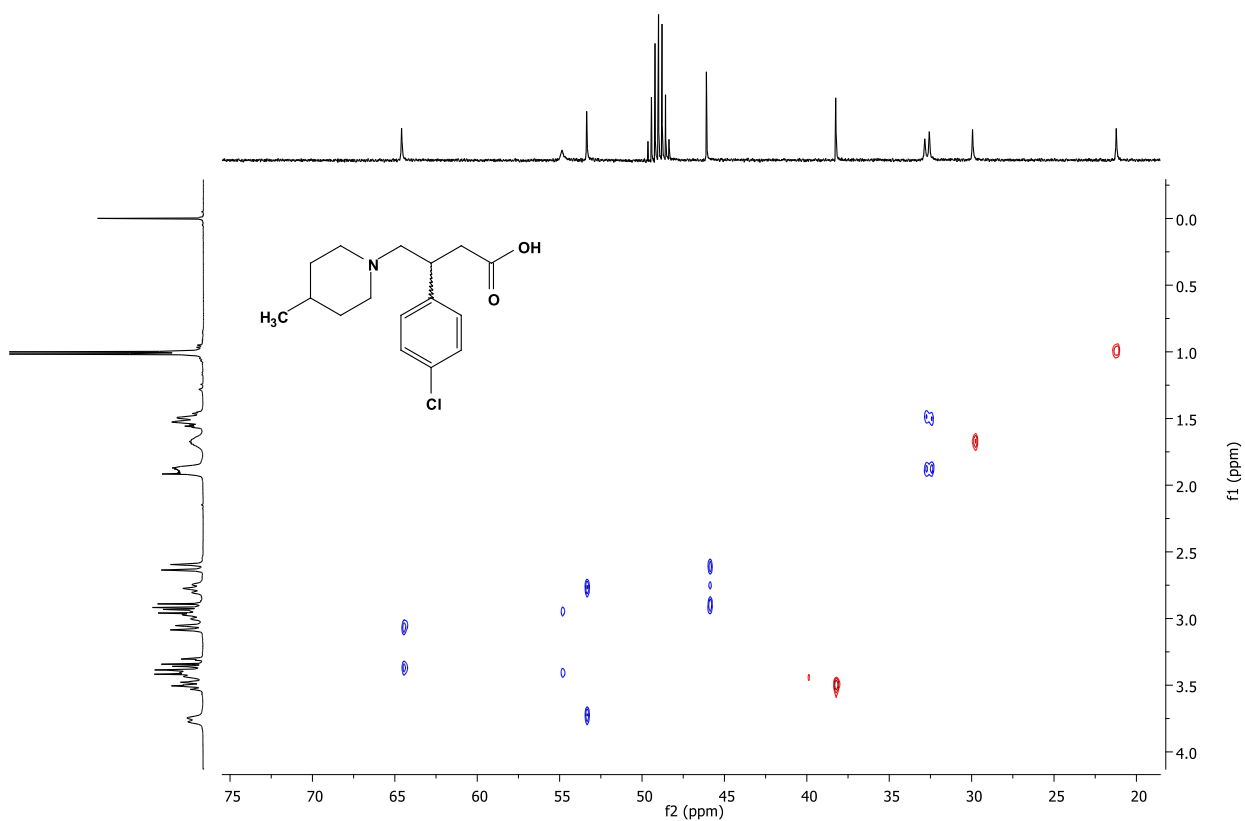
RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(3-metilpiperidin-1-il) butanoico **87c**.



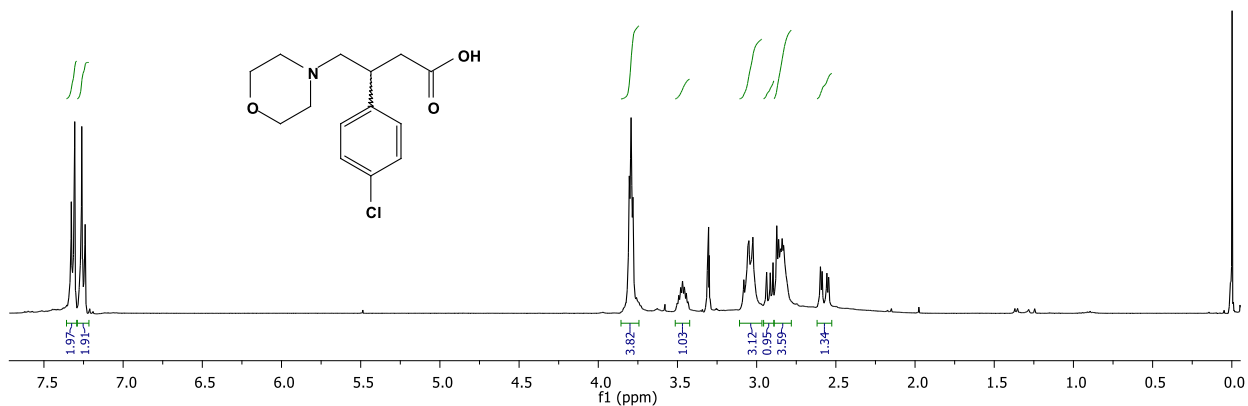
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il) butanoico **87d**.



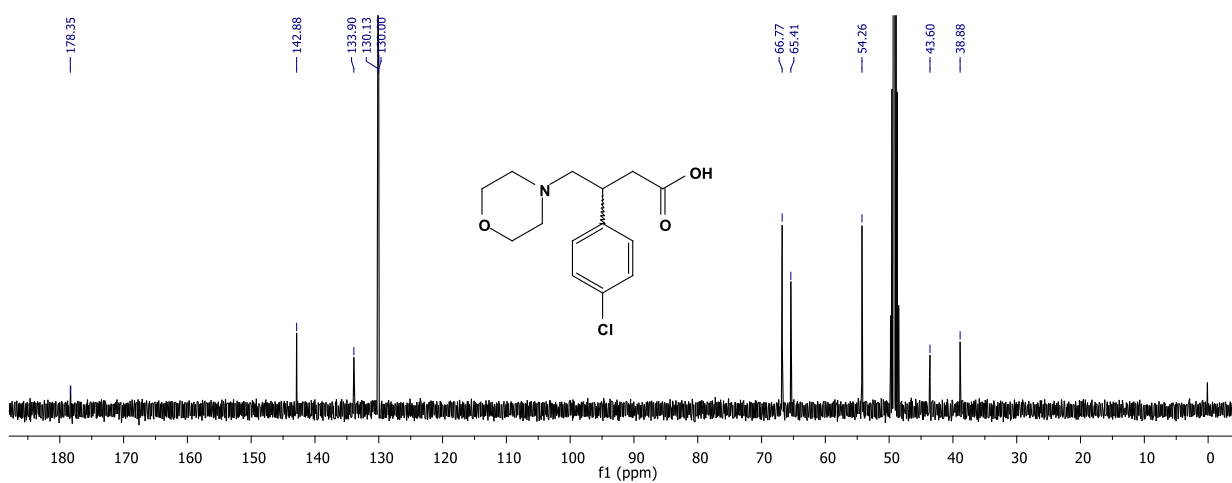
RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il) butanoico **87d**.



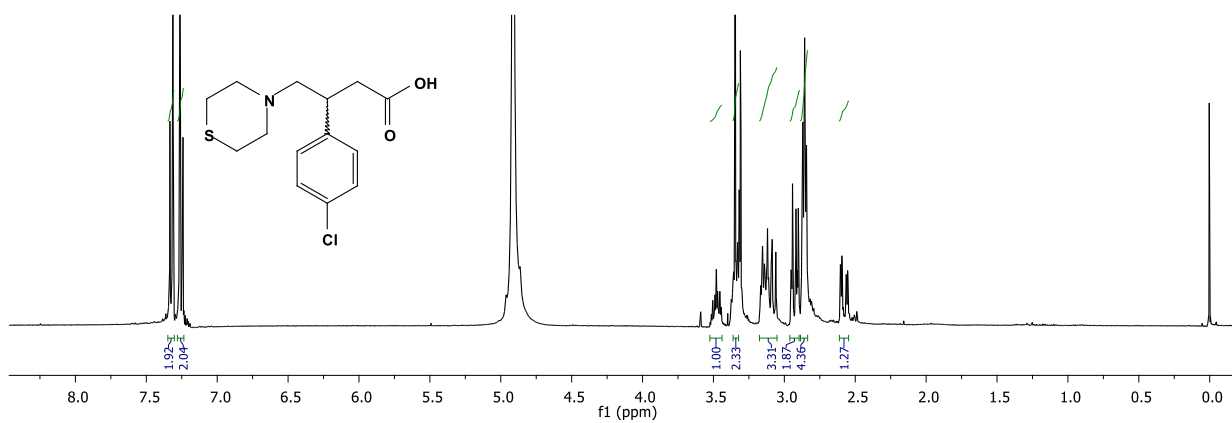
RMN 2D (HETCOR 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-(4-metilpiperidin-1-il) butanoico **87d**.

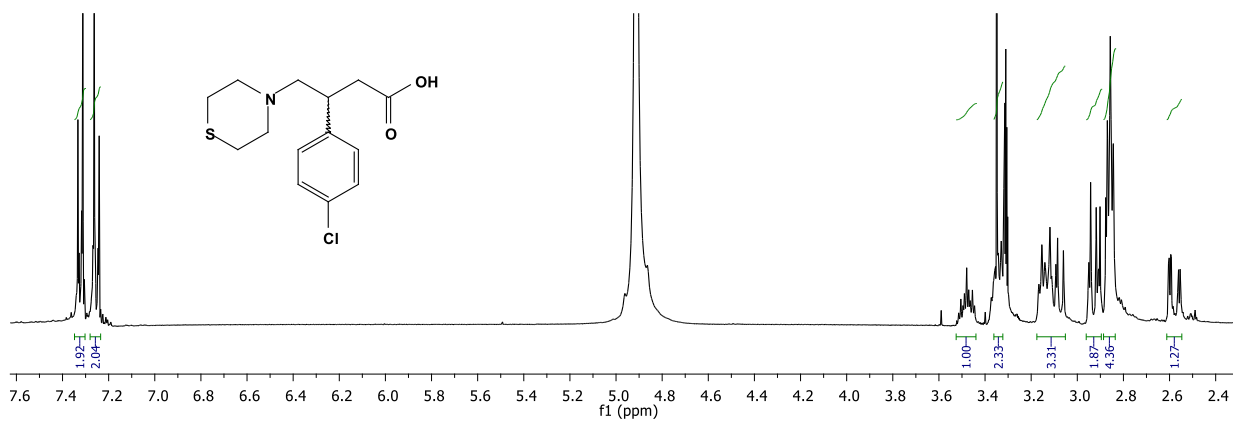


RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-morfolinbutanoico **87e**.

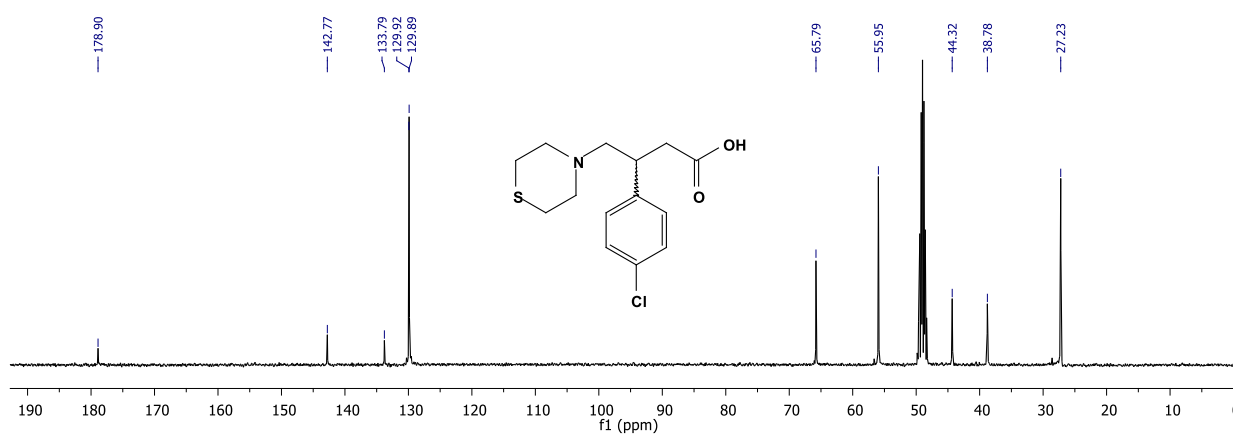


RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-morfolinbutanoico **87e**.

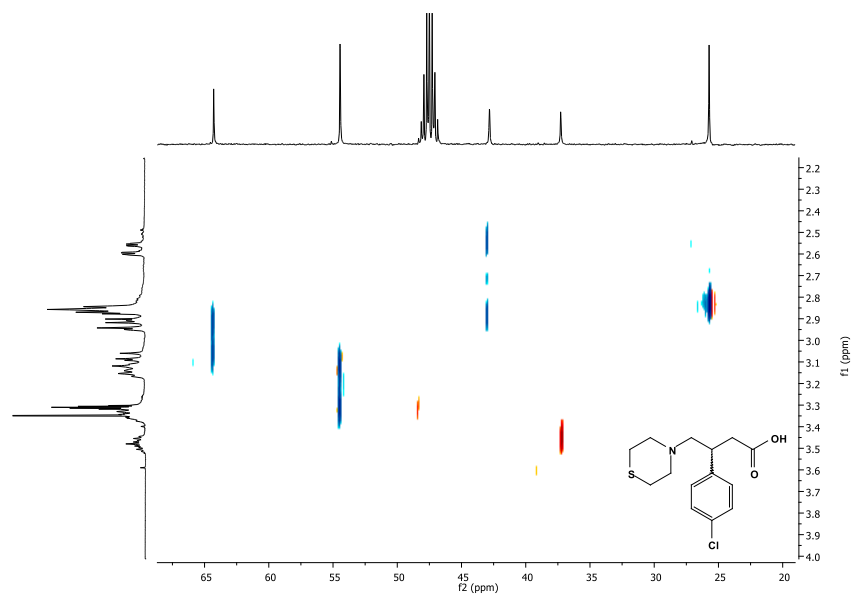




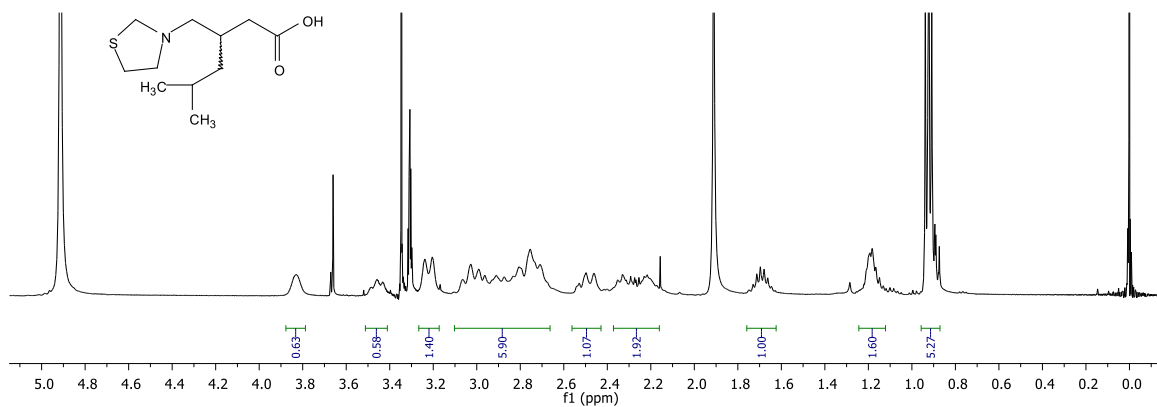
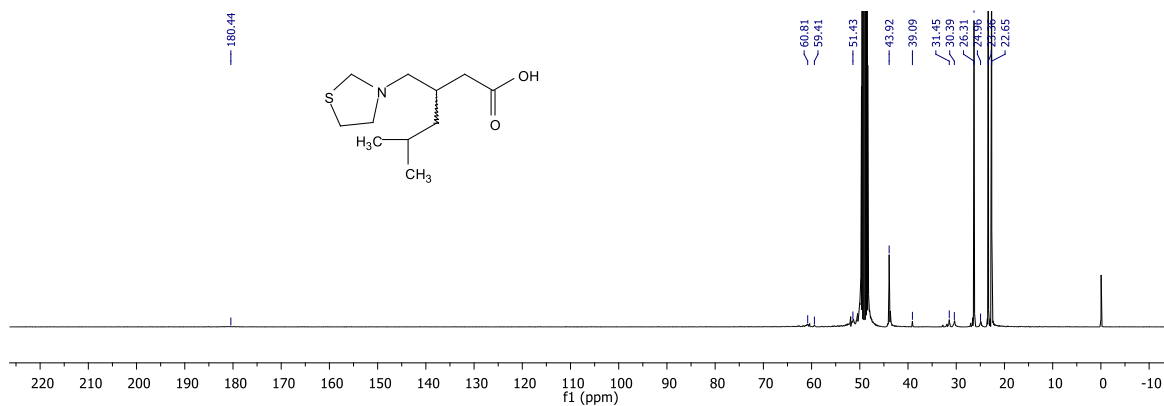
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoico **87f**.

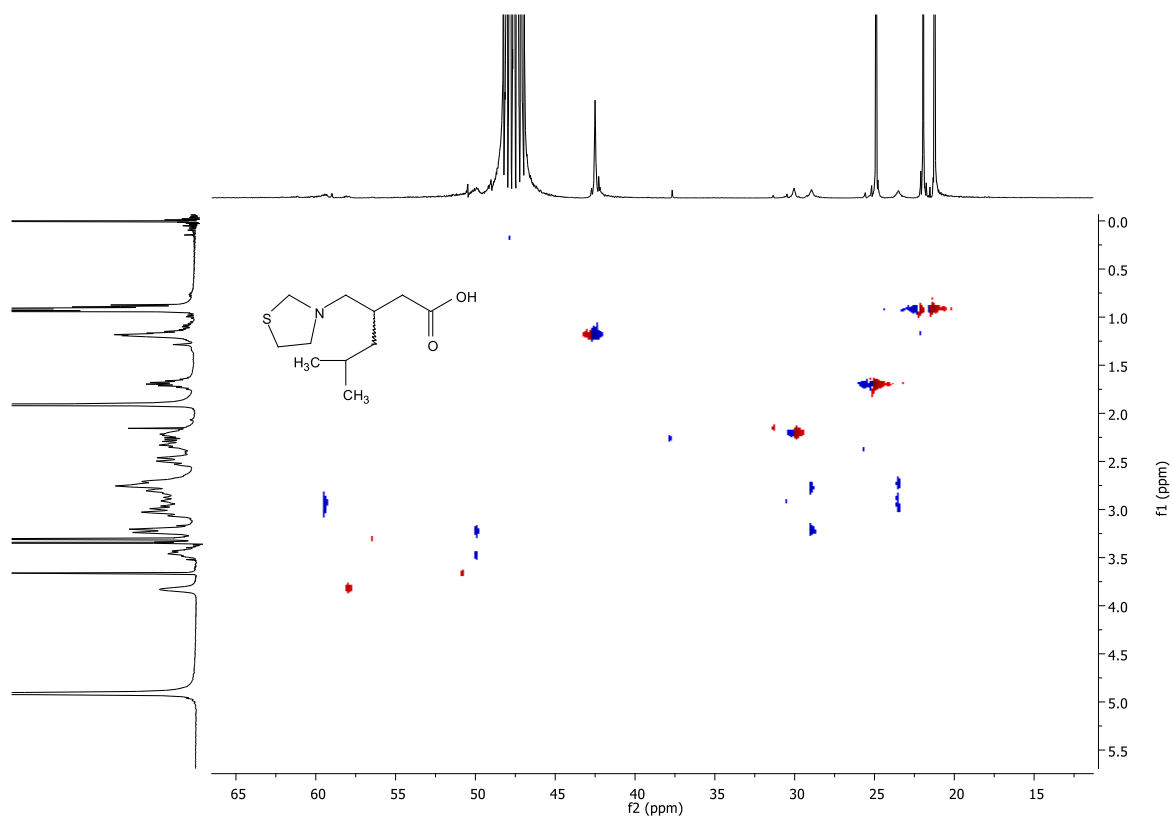


RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoico **87f**.

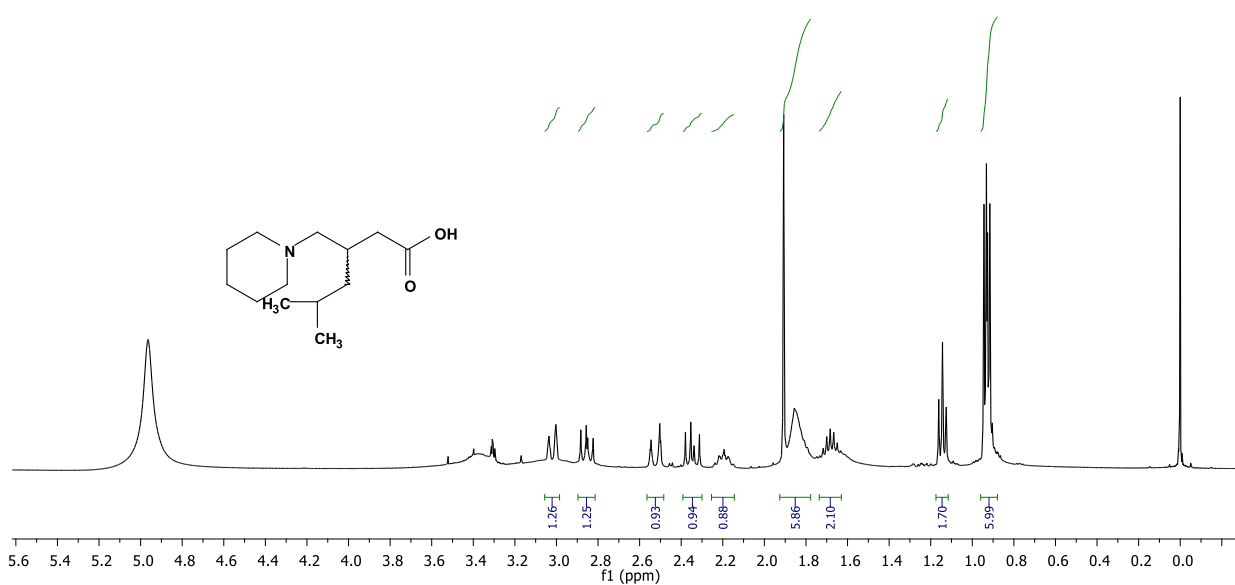


RMN 2D (HETCOR 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 3-(4-clorofenil)-4-tiomorfolinbutanoico **87f**.

6.1.3. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los análogos de pregabalina.RMN  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil) hexanoico **88a**.RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil) hexanoico **88a**.

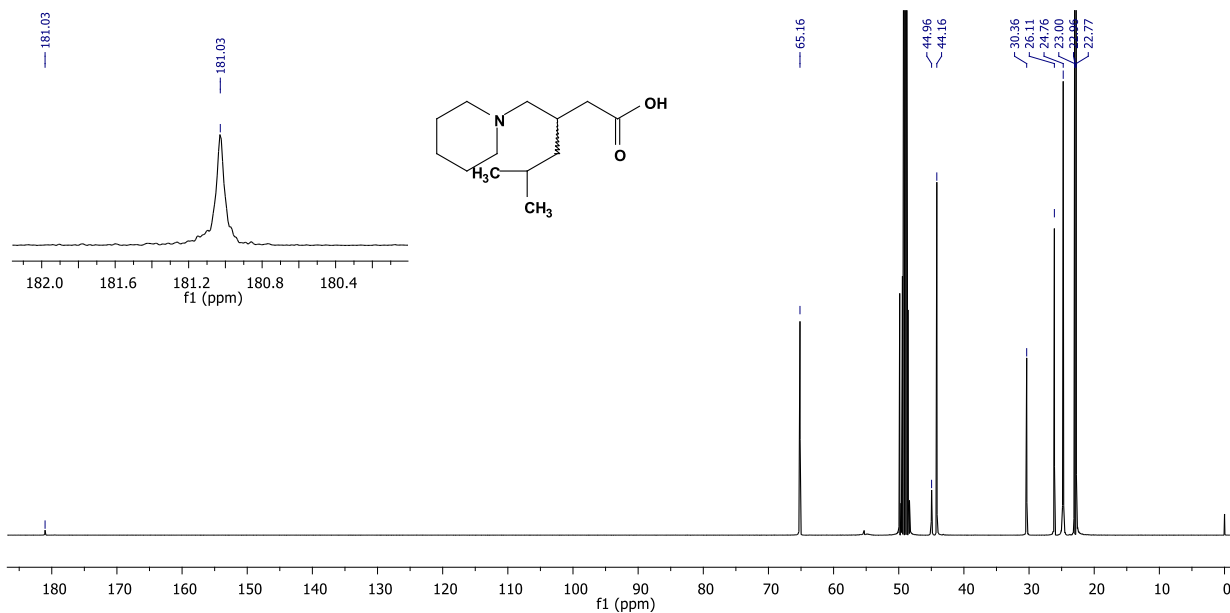


RMN 2D (HETCOR 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-(tiazolidin-3-ilmetil) hexanoico **88a**.

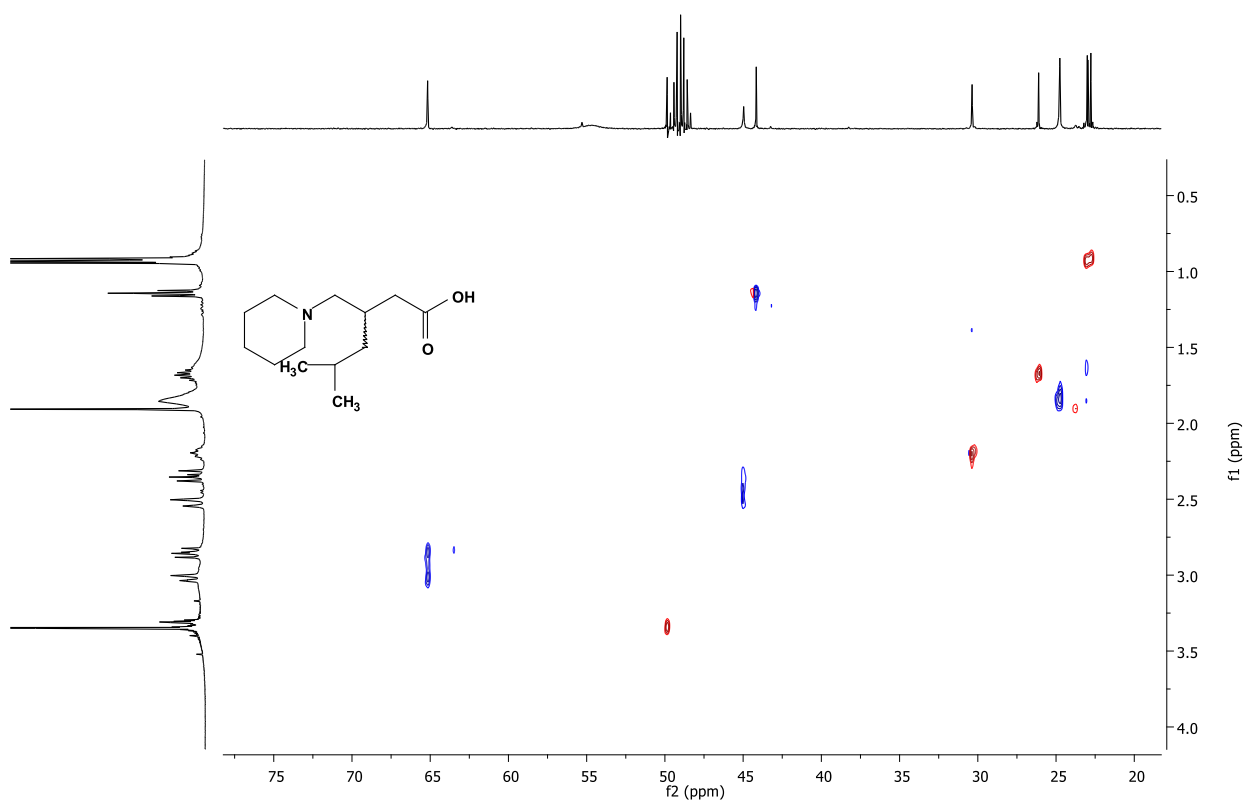


RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil) hexanoico **88b**.

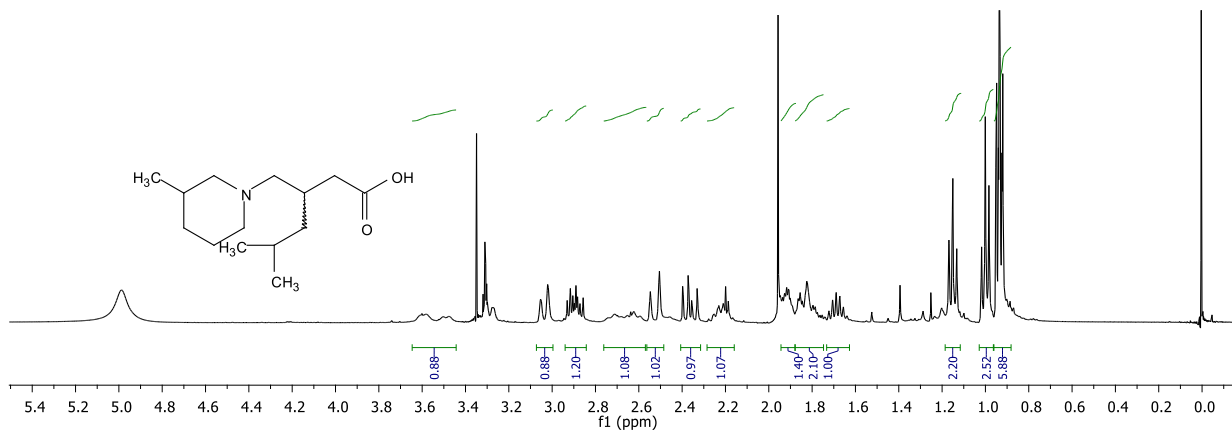




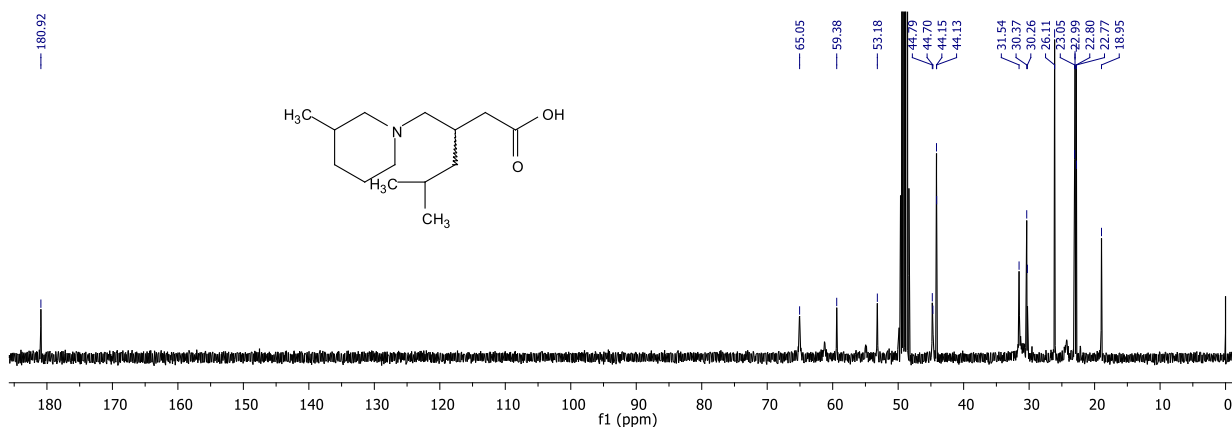
RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil) hexanoico **88b**.



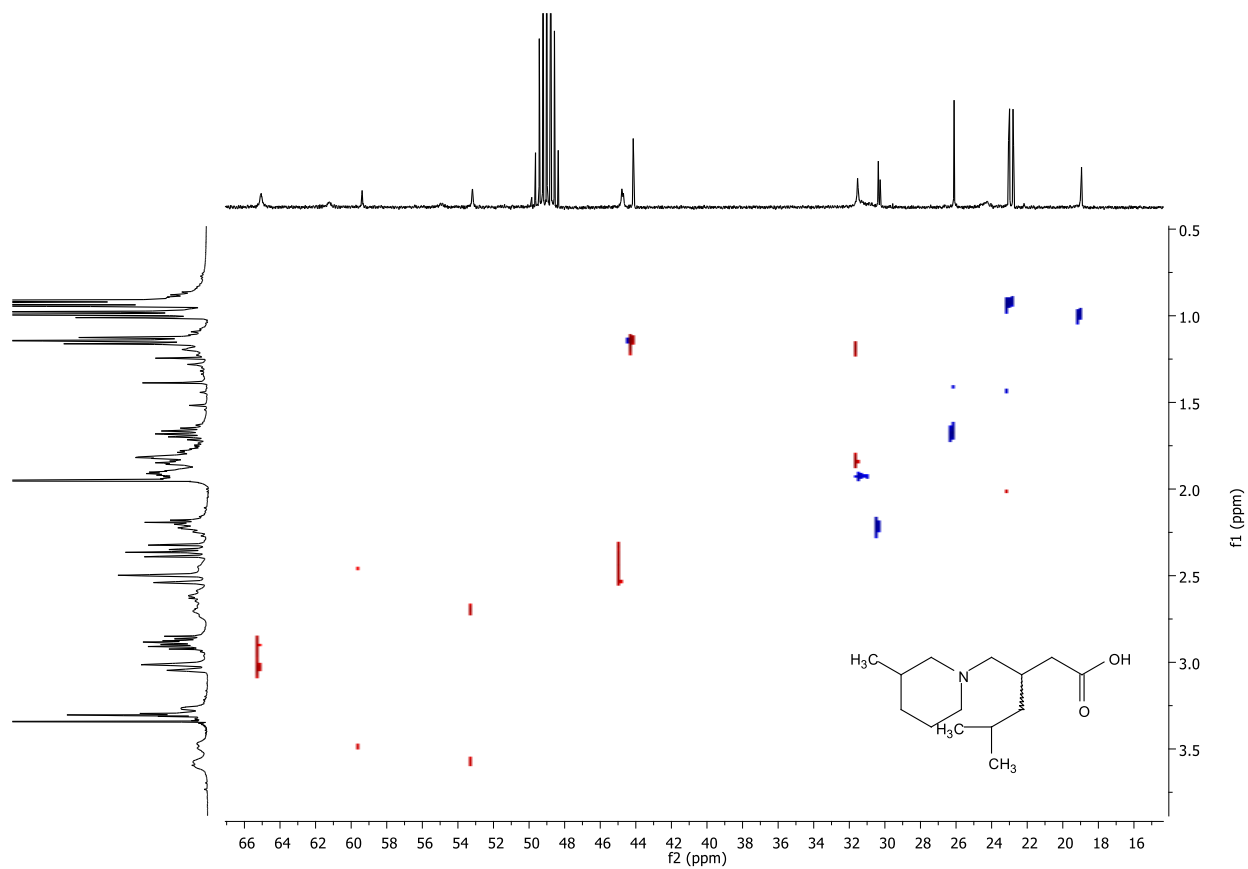
RMN 2D (HETCOR 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(piperidin-1-ilmetil) hexanoico **88b**.



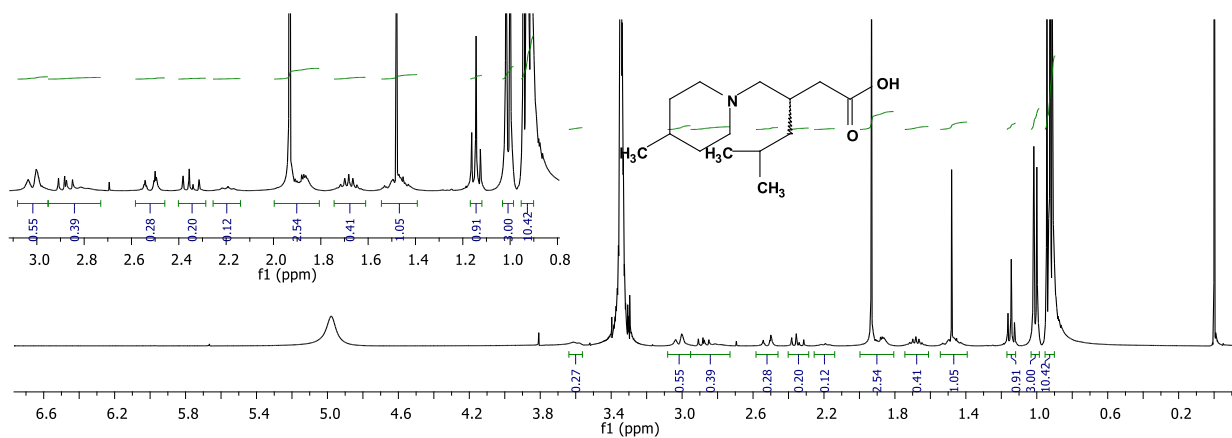
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il) metil) hexanoico **88c**.



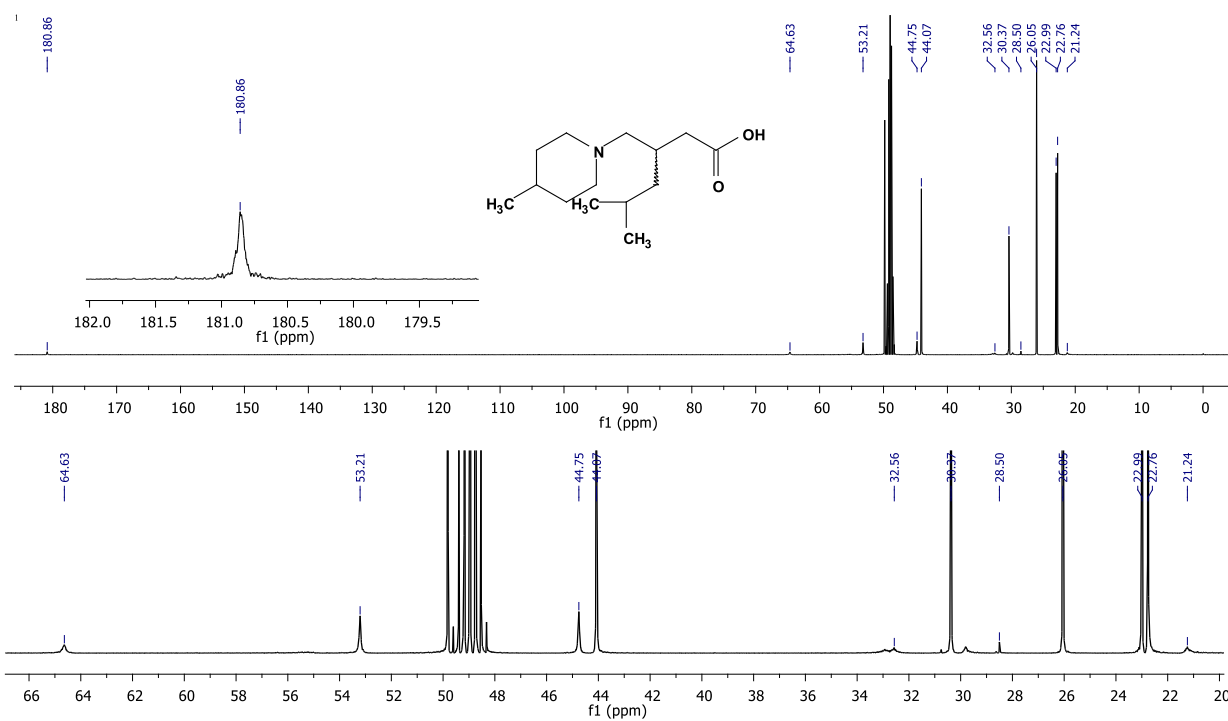
RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il) metil) hexanoico **88c**.



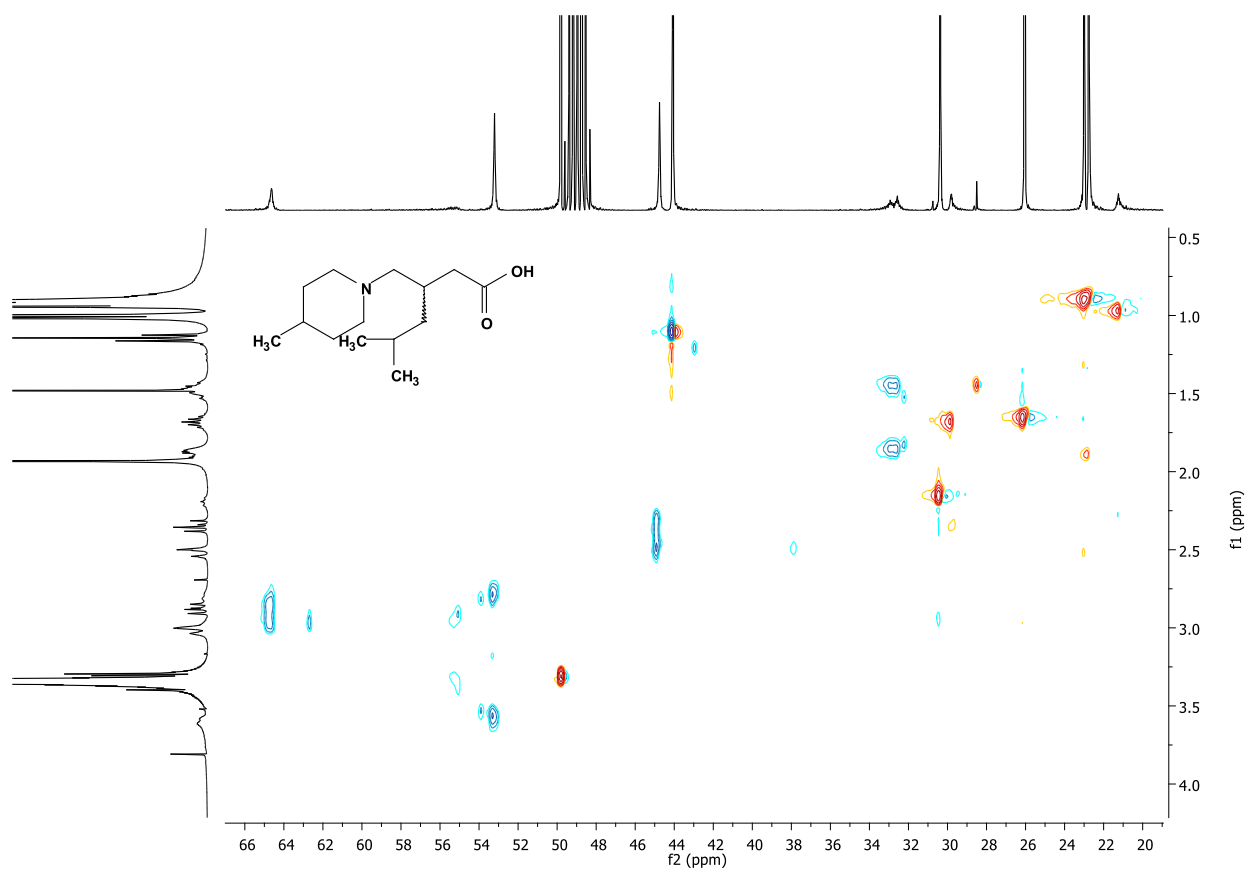
RMN 2D (HETCOR 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-((3-metilpiperidin-1-il) metil) hexanoico **88c**.



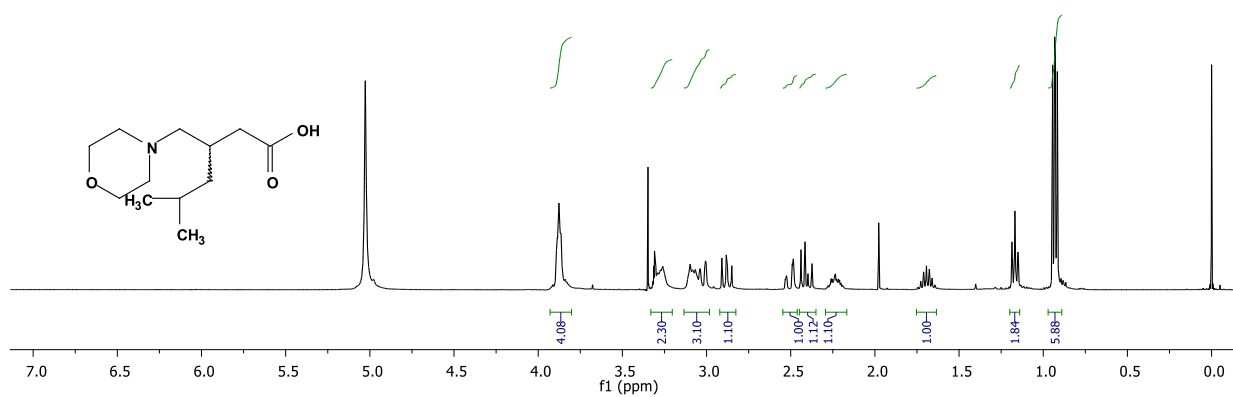
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il) metil) hexanoico **88d**.



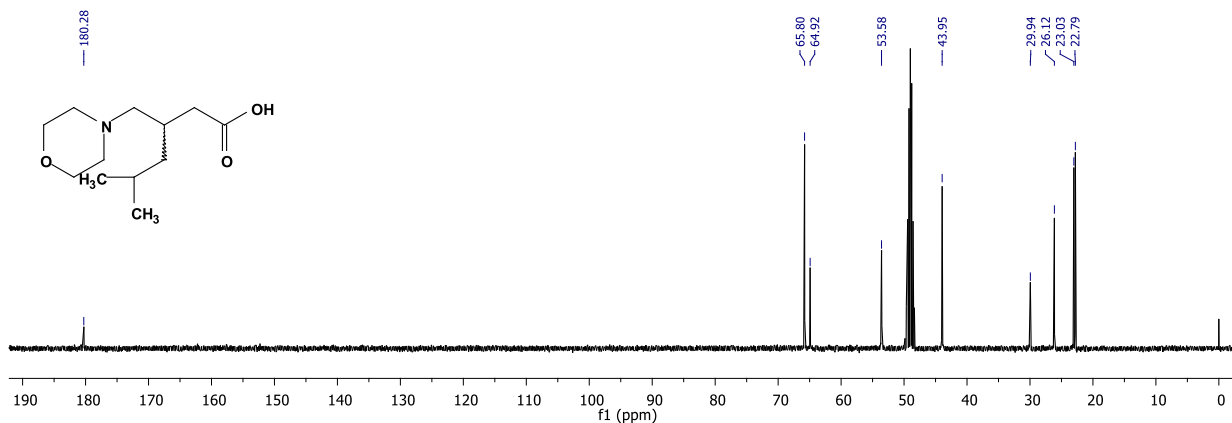
RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il) metil) hexanoico **88d**.



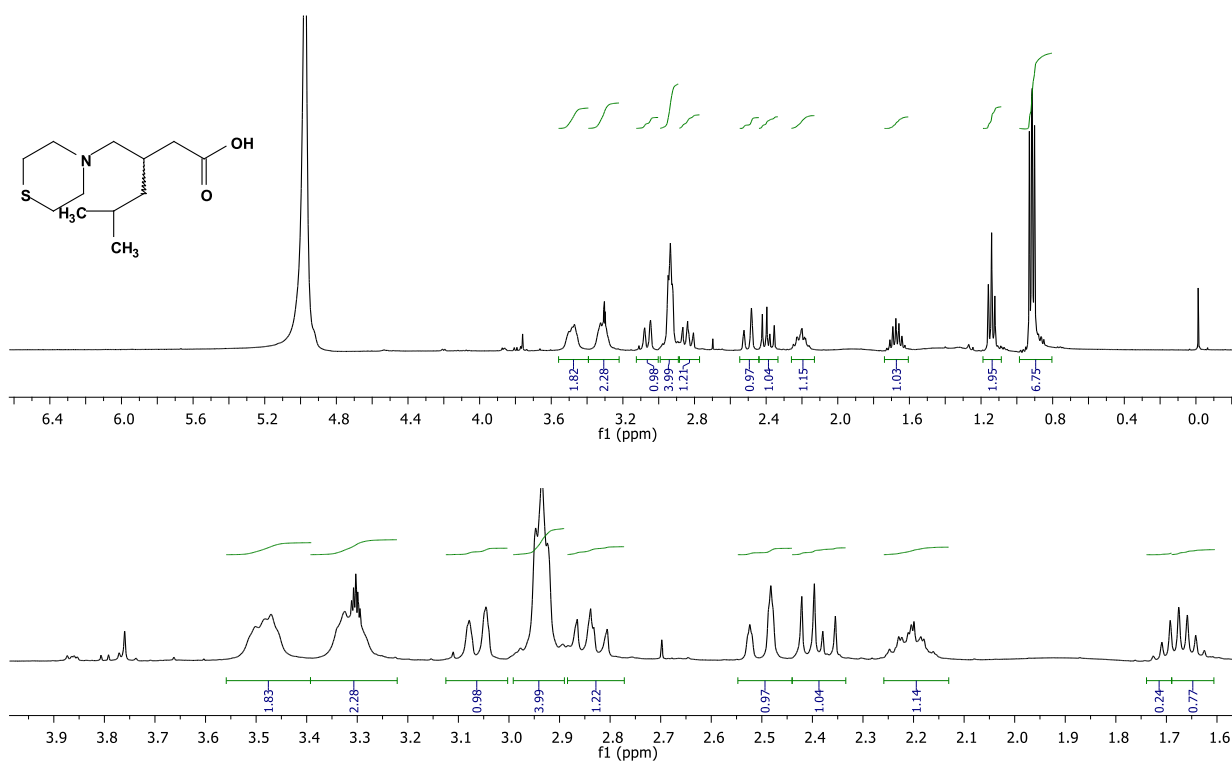
RMN 2D (HETCOR 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-((4-metilpiperidin-1-il) metil) hexanoico **88d**.



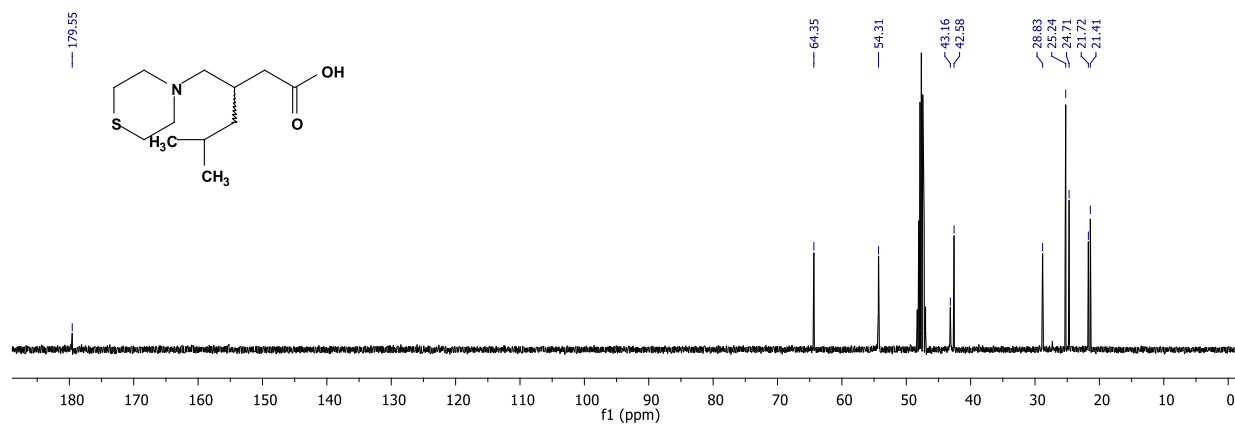
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del ácido 5-metil-3-(morfolinmetil) hexanoico **88e**.



RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(morfolinmetil) hexanoico **88e**.



RMN  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(tiomorfolinmetil) hexanoico **88f**.



RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del ácido 5-metil-3-(tiomorfolinmetil) hexanoico **88f**.

## 6.2. Tablas suplementarias.

**Tabla S1.** V Valores del porcentaje experimental ( $Y_{exp}$ ), calculado ( $Y_{cal}$ ) y predicho ( $Y_{pred}$ ) de inhibición de los análogos **86a-f**, **87b-f** y **88a-f**. Los compuestos que se consideraron de la validación de la prueba están marcados con un símbolo de script.

Mol	$Y_{Calc1}$	$Y_{Pred1}$	$Y_{Calc2}$	$Y_{Pred2}$	$Y_{Calc3}$	$Y_{Pred3}$	$Y_{Calc4}$	$Y_{Pred4}$	$Y_{Calc5}$	$Y_{Pred5}$	$Y_{Calc6}$	$Y_{Pred6}$	$Y_{Calc7}$	$Y_{Pred7}$	$Y_{Calc8}$	$Y_{Pred8}$	$Y_{Calc9}$	$Y_{Pred9}$	$Y_{Calc10}$	$Y_{Pred10}$	$Y_{Exp}$
<b>86a</b>	25.68	26	-	26.91	25.79	26.19	-	26.18	24.28	23.97	23.71	23.19	25.33	25.52	-	25.84	-	27.67	-	25.35	<b>24.9</b>
<b>86b</b>	19.65	18.12	20.76	19.59	20.43	19.15	20.19	19.06	19.9	18.33	21.19	20.34	20.47	19.07	20.67	19.4	21.29	19.88	20.11	18.62	<b>24.9</b>
<b>86c</b>	20.39	20.7	21.49	22.13	-	21.14	20.78	21.14	20.59	21.01	21.92	22.54	21.14	21.73	21.39	22.03	-	22.05	20.8	21.27	<b>19.4</b>
<b>86d</b>	-	21.45	22.55	22.42	22.17	21.92	21.65	21.28	-	21.59	22.99	23.01	-	22.12	22.42	22.25	23.16	23.29	-	21.8	<b>22.9</b>
<b>86e</b>	19.65	20.05	20.76	21.45	20.43	21.04	20.19	20.64	19.9	20.41	21.19	21.85	20.47	21.15	-	20.67	21.29	22.46	20.11	20.67	<b>18.3</b>
<b>86f</b>	28.54	29.91	-	29.8	28.51	29.96	28.67	30.88	26.79	27.01	26.08	25.8	27.87	28.87	28.54	30.86	-	30.67	27.99	29.65	<b>26.5</b>
<b>87b*</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>73</b>
<b>87c</b>	-	26.19	27.89	25.5	27.99	12.55	27.69	20.73	28.12	31.25	28.07	52.09	28.17	35.81	-	28.34	27.9	25.78	27.98	27.46	<b>28</b>
<b>87d</b>	9.21	18.37	8.87	9.17	-	7.64	8.12	7.55	9.23	10.15	-	11.64	9.26	10.4	9.08	16.37	8.96	9.38	8.94	9.34	<b>8.6</b>
<b>87e</b>	5.14	3.56	5.21	4.03	-	4.45	5.95	5.37	6	5.48	7.43	8.27	6.16	5.54	5.63	4.41	4.99	3.68	5.71	5	<b>7</b>
<b>87f</b>	15.45	18.65	15.83	17.97	14.21	29.61	16.04	17.9	14.45	14.81	13.7	13.01	-	15.13	15.09	17.44	15.94	18.12	15.17	16.05	<b>14.2</b>
<b>88a</b>	0.81	4.52	2.05	5.81	1.59	5.43	-	5.91	-	0.95	-1.26	1.59	2.39	6.86	1.52	5.24	1.82	5.33	1.9	5.54	<b>-3.5</b>
<b>88b</b>	0.16	-0.12	1.27	1.47	1.46	1.66	4.29	5.94	1.62	2	1.62	1.91	2.49	3.11	1.61	1.85	1.03	1.1	1.73	2.06	<b>0.84</b>
<b>88c</b>	5.87	5.85	-	6.97	7.01	7.22	8.95	9.64	6.97	7.19	7.35	7.63	7.75	8.17	7.19	7.41	6.96	7.14	-	7.11	<b>5.96</b>
<b>88d</b>	6.93	7.88	8.03	9.08	8.04	9.03	-	9.81	7.96	9	-	8.41	-	8.73	8.22	9.18	8.06	8.97	8.11	9.2	<b>2.64</b>
<b>88e</b>	-	0.16	1.27	-0.99	1.46	-0.06	4.29	3.39	1.62	-0.64	1.62	-0.09	2.49	1.08	1.61	0.17	1.03	-0.9	1.73	0.06	<b>6.2</b>
<b>88f</b>	9.05	5.27	10.31	5.81	9.54	5.85	12.78	9.08	-	8.5	-	6.51	9.89	6.39	9.48	5.49	10.4	5.94	9.61	6.31	<b>16.8</b>
<b>111*</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>40</b>

\* Moléculas consideradas como valores atípicos.

- Compuestos considerados para la validación de la prueba.



**Tabla S2.** Valores de las energías de interacción obtenidas de los cálculos de acoplamiento molecular de todos los análogos de GABA en un modelo GABA-AT de *Pseudomonas*. Valores en kcal/mol.

Ligand	MolDock Score	Electro	HBond
86b	-69.4043	-3.21553	-7.4961
86c	-63.4051	-8.18821	-3.26379
86d	-88.9465	-5.28229	-5.17495
86e	-81.1331	-10.6664	-5.7402
86f	-82.0854	-9.3513	-8.95745
88a_S	-88.4367	-7.59611	-2.37557
88a_R	-80.2747	-4.34932	-1.54938
88b_S	-95.13	-3.82411	-3.42391
88b_R	-82.2497	-1.10123	-9.99797
88c_S	-106.003	-11.4722	-6.60934
88c_R	-84.4955	-2.78647	-5.59387
88d_S	-102.496	-12.1057	-7.491
88d_R	-79.0166	-7.77168	-3.27213
88e_S	-97.1576	-7.49549	-4.62095
88e_R	-85.5462	-5.56573	-1.57816
88f_S	-110.456	-9.48398	-2.62015
88f_R	-80.3773	-1.33976	-5.50014
87b_S	-94.5623	-5.33333	-7.63276
87b_R	-82.3833	-8.45774	-4.99611
87c_S	-105.201	-4.4125	-6.8652
87c_R	-92.4029	0.375594	-4.915
87d_S	-93.087	-3.43971	-3.94599
87d_R	-102.403	-5.70107	-3.30324
87e_S	-97.4871	-4.61057	0
87e_R	-90.7655	-4.02959	-8.75642
87f_S	-92.252	-4.16681	-2.49799
87f_R	-83.726	-0.300184	0
111	-64.703	-5.43962	-6.16675
2	-54.2288	-6.04954	-6.59933


**Tabla S3.** Valores de las energías de interacción obtenidas de los cálculos de acoplamiento molecular de todos los análogos de GABA en un modelo GABA-AT de *humano*. Valores en kcal/mol.

Ligand	MolDock Score	Electro	HBond
86b	-90.0906	-14.3794	-2.70548
86c	-87.1437	-4.79249	-4.66131
86d	-93.3451	-16.3569	-7.2265
86e	-101.729	-10.9936	-4.12353
86f	-83.6899	-11.9784	-3.44067
88a_S	-112.119	-7.99459	-3.85277
88a_R	-97.5094	-6.93326	-3.08695
88b_S	-98.5854	-11.0659	-5.84991
88b_R	-93.2925	-12.0228	-1.80199
88c_S	-113.181	-7.06026	-2.5
88c_R	-89.7572	-13.2412	-3.34681
88d_S	-107.919	-2.81265	-4.36016
88d_R	-93.1624	-5.66396	-2.5
88e_S	-111.347	-2.23916	-0.215018
88e_R	-103.812	-14.4581	-3.64372
88f_S	-105.834	-13.386	-2.83697
88f_R	-89.8468	-13.3805	-2.49901
87b_S	-100.144	-8.84278	-3.14615
87b_R	-95.7124	-11.0181	-2.4786
87c_S	-105.791	-11.6063	-2.11356
87c_R	-91.5724	-8.52886	-3.78333
87d_S	-107.209	-10.6489	-2.5
87d_R	-98.4869	-10.3527	-3.17113
87e_S	-109.605	-9.38255	-2.5
87e_R	-112.69	-10.5368	-8.05182
87f_S	-122.362	-10.3354	-2.5
87f_R	-103.599	-9.33766	-2.4934
111	-73.7153	-7.61745	0
2	-70.0993	-12.3167	-2.50138

Tabla S4. Descriptores moleculares obtenidos de DRAGON 05.

Descriptor molecular	Tipo
<i>MW, AMW, Sv, Se, Sp, Ss, Mv, Me, Mp, Ms, nAT, nSK, nBT, nBO, nBM, SCBO, ARR, nCIC, nCIR, RBN, RBF, nAB, nH, nC, nO, nS, nCL, nX, nR06, nBnz</i>	Constitucional
<i>ZM1, ZM1V, ZM2, ZM2V, Qindex, SNar, HNar, GNar, Xt, Dz, Ram, Pol, LPRS, VDA, MSD, SMTI, SMTIV, GMTI, GMTIV, Xu, SPI, W, WA, Har, Har2, QW, T11, T12, STN, HyDp, RHyDp, w, ww, Rww, D/D, Wap, WhetZ, Whetm, Whetv, Whete, Whetp, J, JhetZ, Jhetm, Jhetv, Jhete, Jhetp, MAXDN, MAXDP, DELS, TIE, S0K, S1K, S2K, S3K, PHI, BLI, PW2, PW3, PW4, PW5, PJI2, CSI, ECC, AECC, DECC, MDDD, UNIP, CENT, VAR, BAC, Lop, ICR, D/Dr06, T(N..O), T(N..S), T(N..Cl), T(O..O), T(O..S), T(O..Cl)</i>	Topológico
<i>W3D, J3D, H3D, AGDD, DDI, ADDD, G1, G2, RGyr, SPAN, SPAM, SPH, ASP, FDI, PJI3, L/Bw, SEig, HOMA, RCI, AROM, HOMT, DISPm, QXXm, QYYm, QZZm, DISPv, QXXv, QYYv, QZZv, DISPe, QXXe, QYYe, QZZe, DISPp, QXXp, QYYp, QZZp, G(N..O), G(N..S), G(N..Cl), G(O..O), G(O..S), G(O..Cl)</i>	Geométrico
<i>nCp, nCs, nCt, nCrs, nCrt, nCar, nCbH, nCb-, nRNH2, nRNR2, nROR, nRSR, nArX, nHDon, nHAcc, C-001, C-002, C-003, C-006, C-024, C-025, C-026, H-046, H-047, H-050, H-052, O-059, N-066, N-068, Cl-089, S-107</i>	Conteo de grupos funcionales
<i>Ui, Hy, AMR, TPSA (NO), TPSA (tot), MLogP, MLogP<sup>2</sup>, ALogP, ALogP<sup>2</sup></i>	Propiedades moleculares
<i>qpmax, qnmax, Qpos, Qneg, Qtot, Qmean, Q2, RPCG, RNCG, SPP, TE1, TE2, PCWTe, LDI</i>	Carga atómica

## Votos aprobatorios

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas	<b>INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS</b>	Coordinación de Programas Educativos
		Posgrado en Ciencias
<b>DR. VICTOR BARBA LÓPEZ</b> <b>COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS</b> <b>PRESENTE</b>		
<p>Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “<b>Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Análogos de GABA</b>” que presenta el alumno <b>Josué Rodríguez Lozada (5620120601)</b> para obtener el título de <b>Doctor en Ciencias</b>.</p>		
Nos permitimos informarle que nuestro voto es:		
<b>NOMBRE</b>	<b>DICTAMEN</b>	<b>FIRMA</b>
Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara Escuela Superior de Medicina-IPN	APROBADO	
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Hugo Tlahuext Romero CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama CIQ-UAEM	Aprobado	
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez FF-UAEM	APROBADO	
Dr. Jaime Escalante García CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. Irma Linzaga Elizalde CIQ-UAEM	APROBADO	
Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209 Tel. (777) 329-70-00, Ext. 6011 / posgradoenciencias@uaem.mx		
Una universidad de excelencia		
<b>UA EM</b>		
P. C. I. C. B. A. 2317-1029		