



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Diseño y síntesis de análogos del donepecilo derivados de aminoácidos

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. Fernando Rivera Sánchez

TUTOR: Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Ciudad de México, Mayo 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL DONEPECILO DERIVADOS DE  
AMINOÁCIDOS**

**TESIS**  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. FERNANDO RIVERA SÁNCHEZ**



Ciudad de México, Mayo 2022

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara	ESM, IPN
<b>Vocal</b>	Dr. Jaime Escalante García	UAE Morelos
<b>Vocal</b>	Dr. José Luis Medina Franco	Facultad de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Marcos Hernández Rodríguez	Instituto de Química, UNAM
<b>Secretario</b>	Dr. Fernando León Cedeño	Facultad de Química, UNAM

Asesor:

Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez

Sustentante:

Q.F.B. Fernando Rivera Sánchez

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Síntesis Farmacéutica, L-4 primer piso de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM, bajo la dirección del Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez y con financiamiento de DGAPA-UNAM (proyecto IN218721), además de una beca CONACyT (1023579).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez por su confianza y el gran apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado por su tiempo invertido y sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Gabriel Cuevas y al Dr. David Contreras por su apoyo en la obtención de los espectros de RMN y masas de alta resolución de los compuestos obtenidos en este trabajo.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera y al M. en C. Jesús Aguilar Castro por su apoyo en la realización de la evaluación enzimática de los compuestos obtenidos en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (1023579) para la realización de mis estudios de maestría.

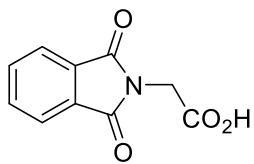
A mis padres.

## CONTENIDO

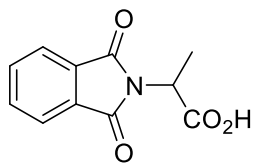
ÍNDICE DE COMPUESTOS.....	i
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	ii
1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Enfermedad de Alzheimer .....	2
2.2 Acetilcolinesterasa .....	2
2.3 Inhibidores de AChE .....	4
2.4 Modelo de farmacóforo .....	7
2.5 Acoplamiento molecular.....	7
2.6 Similitud molecular.....	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
4. HIPÓTESIS .....	9
5. OBJETIVOS .....	10
6. METODOLOGÍA.....	11
6.1 Modelo de farmacóforo .....	11
6.2 Acoplamiento molecular.....	11
6.3 Similitud molecular .....	12
6.4 Procedimiento experimental.....	12
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
7.1 Modelo de farmacóforo y diseño de análogos .....	13
7.2 Acoplamiento molecular.....	18
7.3 Similitud molecular .....	23
7.3 Síntesis de compuestos.....	25
7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de la AChE .....	34
8. CONCLUSIONES .....	37
9. PERSPECTIVAS .....	38
10. REFERENCIAS .....	39
11. ANEXOS.....	44
Anexo 1. Interacciones de los compuestos <b>2a-d</b> y <b>3a-d</b> con la AChE. ....	44
Anexo 2. Metodología sintética.....	50
Anexo 3. Espectros de RMN y EMAR de los compuestos <b>1a-c</b> , <b>2a-c</b> y <b>4a</b> .....	56



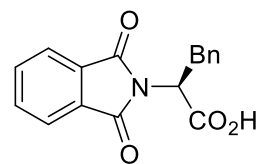
## ÍNDICE DE COMPUESTOS



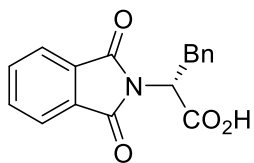
**1a**



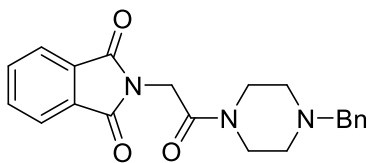
**1b**



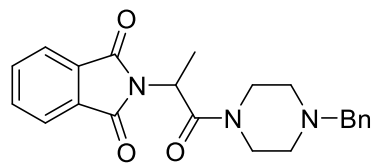
**1c**



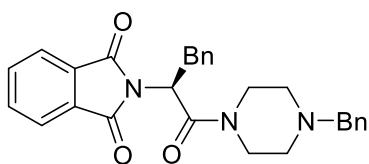
**1d**



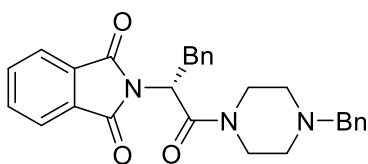
**2a**



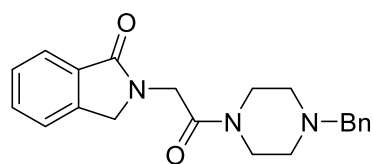
**2b**



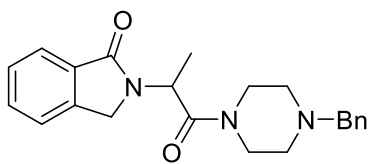
**2c**



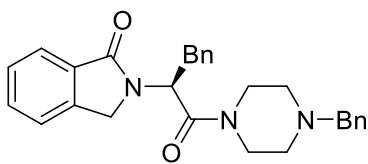
**2d**



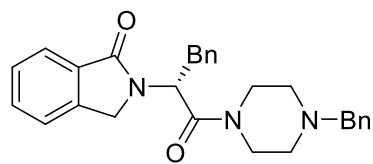
**3a**



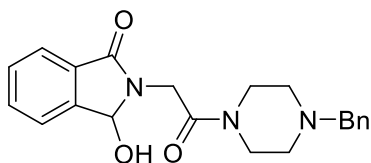
**3b**



**3c**



**3d**



**4a**

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcOEt	Acetato de etilo
AChE	Acetilcolinesterasa
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
Å	Angstrom
Bn	Bencilo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DCC	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
$\delta$	Desplazamiento químico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
e.e.	Exceso enantiomérico
$R_f$	Factor de retención
°C	Grado Celsius
g	Gramo
Hex	Hexano
h	Hora
<i>ESI</i>	Ionización por <i>Electrospray</i> (por sus siglas en inglés)
IPA	Isopropanol
Lit.	Literatura
<i>UV</i>	Luz ultravioleta
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mmol	Milimol
min	Minuto
M	Molar
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión

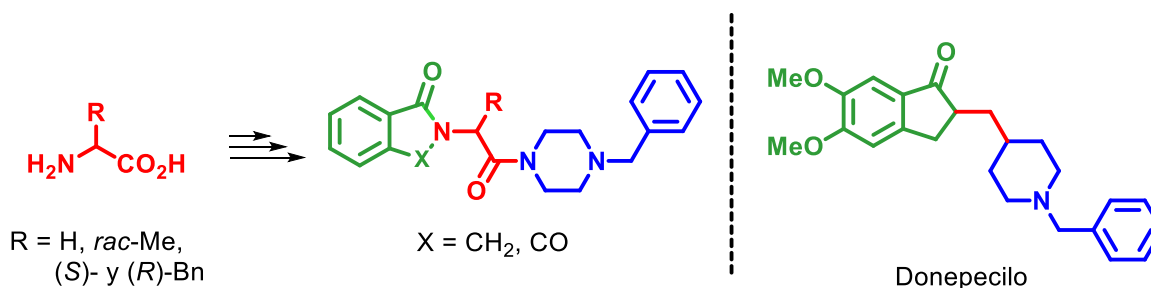
r.e.	Relación enantiomérica
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>br</i>	Señal ancha
<i>d</i>	Señal doble
<i>d br</i>	Señal doble ancha
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
<i>q</i>	Señal cuádruple
<i>m</i>	Señal múltiple
<i>s</i>	Señal simple
<i>t</i>	Señal triple
T	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
t	Tiempo
tr	Tiempo de retención
TEA	Trietilamina
AU	Unidades de absorbancia (por sus siglas en inglés)

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo el diseño, síntesis y evaluación *in vitro* de análogos del donepecilo derivados de aminoácidos obteniéndose nuevos compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE), los cuales podrían ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). El diseño de estos nuevos compuestos consistió en la construcción de un modelo farmacofórico basado en las interacciones que presenta el donepecilo cristalizado con la AChE para utilizarlo como referencia y proponer nuevos análogos del donepecilo. Mediante acoplamiento molecular se analizó la posible interacción de los compuestos propuestos en el sitio activo de la AChE. Posteriormente se midió la similitud estructural tridimensional que presentan los análogos propuestos en relación al donepecilo para la cual se compararon las respectivas estructuras moleculares tridimensionales.

Los nueve compuestos sintetizados se obtuvieron con rendimientos de moderados a buenos, entre 48% y 88% con una buena pureza enantiomérica. Estos nuevos compuestos se caracterizaron mediante espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , así como espectrometría de masas de alta resolución.

Por último se realizó un ensayo preliminar para evaluar la capacidad inhibitoria sobre la AChE de los compuestos sintetizados. Para lo cual se utilizó un kit comercial de inhibición basado en una metodología enzimática colorimétrica, en donde se encontró que los compuestos presentan un porcentaje de inhibición en un rango de 1.69 a 18.53% a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedad de Alzheimer

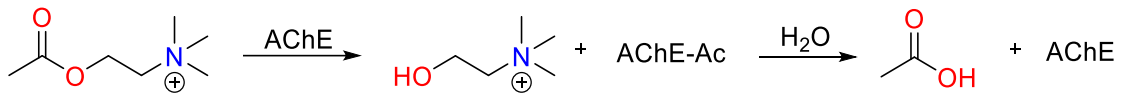
La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de memoria y discapacidad cognitiva en la población mayor.<sup>1,2</sup> Es considerada la principal causa de demencia a nivel global, de la cual actualmente se estiman más de 50 millones de casos, y se pronostica que se triplicará para el año 2050.<sup>3</sup>

En México se estiman alrededor de un millón de casos de la EA y afecta con mayor frecuencia a las personas mayores de 65 años. Se ha observado que la progresión de la EA es compleja y está relacionada con múltiples factores como la degradación de los nervios colinérgicos en el cerebro, estrés oxidativo, acumulación o deposición del péptido  $\beta$ -amiloide, disminución de los niveles de acetilcolina, entre otros.<sup>4,5</sup>

La hipótesis colinérgica sugiere que la disminución de las funciones cognitivas y mentales se asocia con la deficiencia de acetilcolina (ACh), neurotransmisor que juega un papel clave en los procesos de aprendizaje y memoria, por lo que uno de los principales objetivos terapéuticos en la patogénesis de la EA es la inhibición de las enzimas que degraden la ACh e intervienen en la pérdida de la neurotransmisión, logrando una intensificación de la transmisión colinérgica.<sup>6,7</sup>

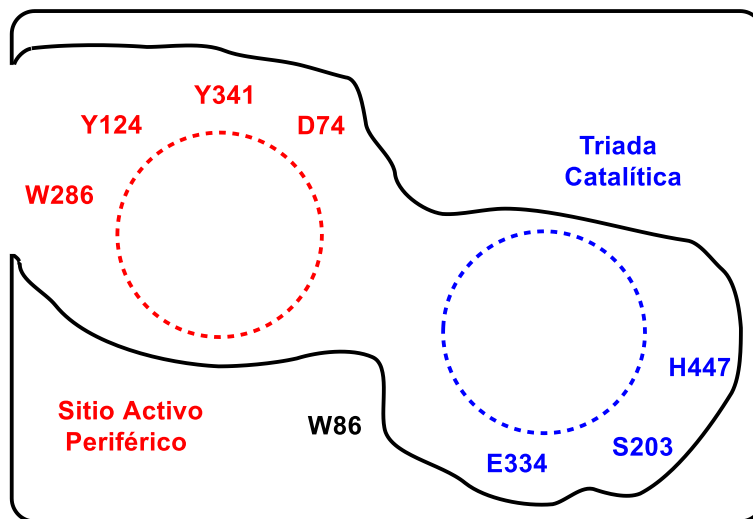
### 2.2 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima situada en las hendiduras sinápticas y su función es la degradación del neurotransmisor acetilcolina después de mediar la actividad sináptica en el sistema nervioso; de esta manera esta enzima limita la sinapsis colinérgica.<sup>8</sup> La reacción catalizada por esta enzima es la hidrólisis de acetilcolina a colina y acetato mediante un proceso en dos etapas; en la etapa 1 se genera un intermediario de la enzima acetilada y se libera colina, mientras que en la segunda etapa se hidroliza dicho intermediario para regenerar a la AChE, tal como se observa en la Esquema 1.



**Esquema 1.** Hidrólisis de ACh catalizada por AChE.

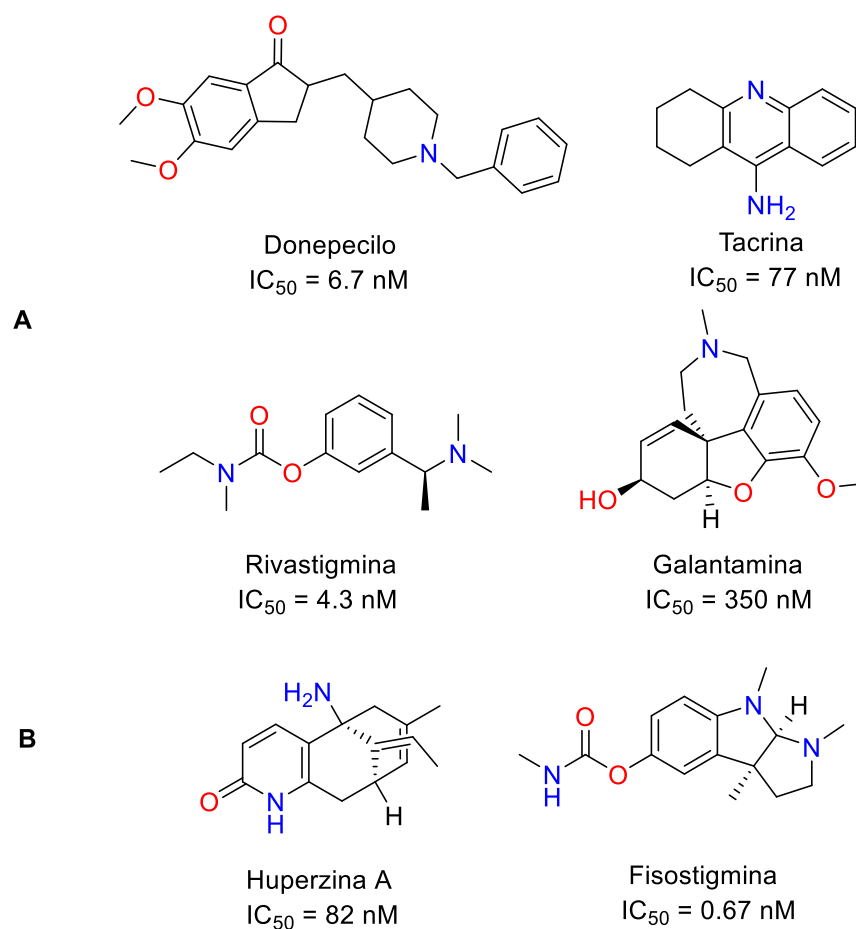
El sitio activo de la AChE está representado en la Figura 1 y está compuesto por un sitio de unión periférico, el cual funciona como un sitio de reconocimiento para el sustrato acetilcolina y está constituido por los aminoácidos tirosina (Y72) y (Y124), ácido aspártico (D74) y triptófano (W286). A la vez compuesto también por un sitio catalítico formado por los aminoácidos: serina (S203), histidina (H447) y ácido glutámico (E334) conocidos como triada catalítica. Sin embargo, el principal aminoácido involucrado en la unión del sustrato a la enzima es triptófano (W86) localizado en la proximidad de la triada catalítica.<sup>9,10</sup>



**Figura 1.** Representación esquemática del sitio activo de la AChE.

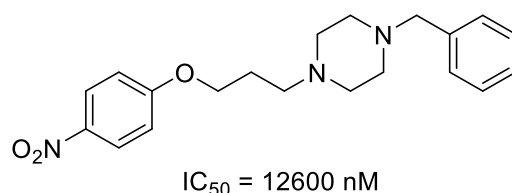
### 2.3 Inhibidores de AChE

Hoy en día no se cuenta con alguna opción terapéutica que modifique la EA; solo se dispone de tratamientos paliativos. Los inhibidores de AChE son los tratamientos de primera línea y representan la mayor estrategia terapéutica para el tratamiento de los síntomas de la EA. A la fecha, existen cuatro inhibidores de la AChE aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos): donepecilo, rivastigmina, galantamina y tacrina (Figura 2A). En particular para la tacrina, su uso es poco recomendado por la cantidad de efectos adversos en comparación con los demás inhibidores, siendo el donepecilo es el más utilizado.<sup>11,12</sup> Al igual que la galantamina, otros productos naturales presentan propiedades inhibitorias de la AChE como lo son huperzina A y fisostigmina (Figura 2B).

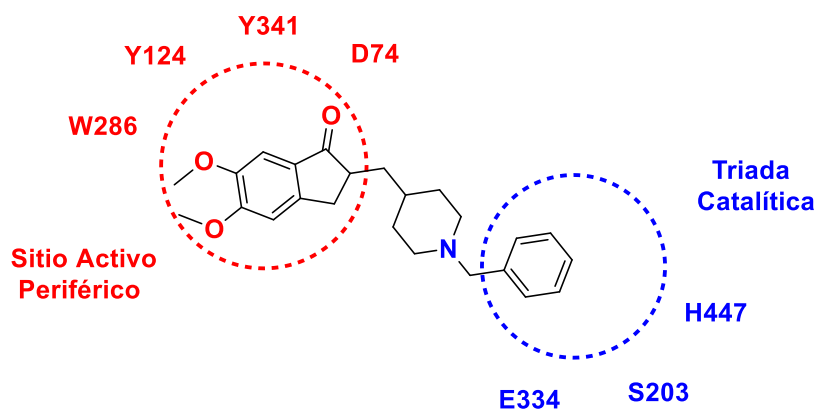


**Figura 2.** A) Estructura de los fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA. B) Productos naturales inhibidores de AChE.

El donepecilo es un inhibidor de la AChE y fue obtenido después de una secuencia de modificaciones sintéticas a partir de un compuesto con propiedades inhibitorias de la AChE (Figura 3) descubierto a partir de un filtrado computacional de una colección de diversos compuestos.<sup>13</sup> En su estructura contiene un núcleo de *N*-bencilpiperidina y un núcleo de indanona los cuales son responsables de su actividad. En diferentes estudios<sup>14-15</sup> se ha demostrado que el núcleo de indanona es responsable de la unión al sitio activo periférico y el fragmento bencilo interactúa con los residuos de la triada catalítica como se representa en la Figura 4.



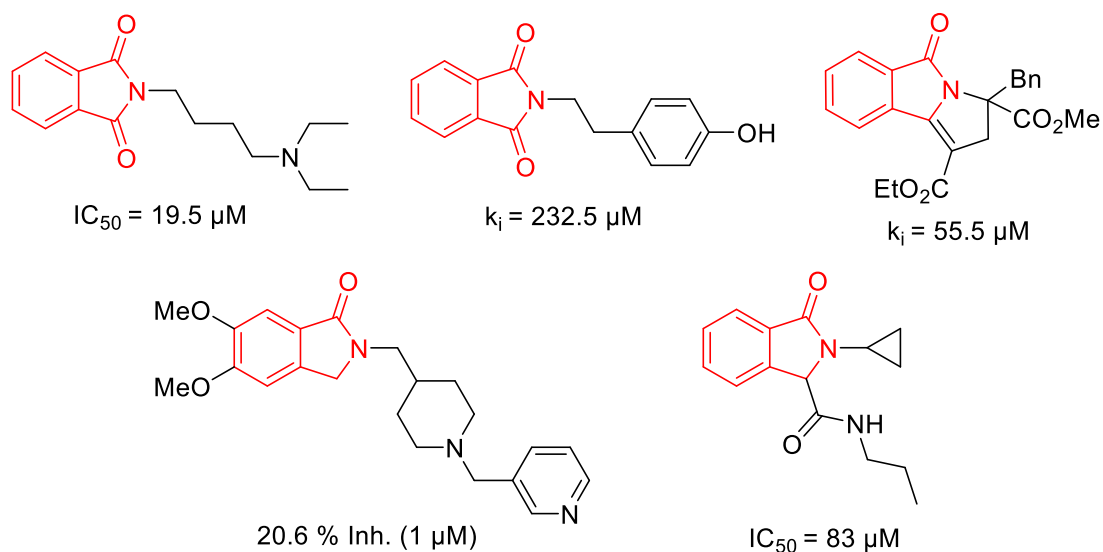
**Figura 3.** Compuesto con propiedades inhibitorias de la AChE descubierto a partir de un filtrado computacional.



**Figura 4.** Esquematización de la interacción del donepecilo con el sitio activo de la AChE.

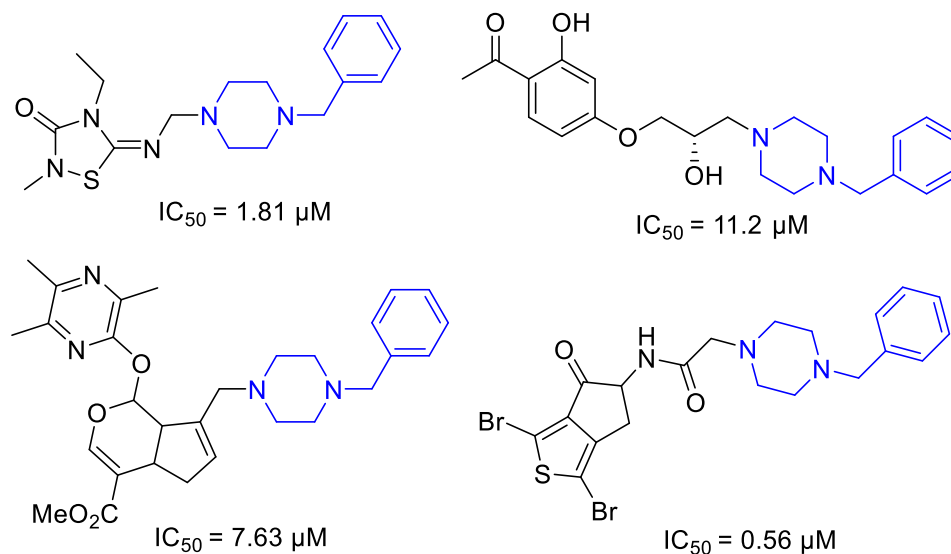
Además de los compuestos anteriormente mencionados, a la fecha se han sintetizado números compuestos capaces de inhibir a dicha enzima entre los cuales destacan los derivados de ftalimidias o 1,3-isoindolindionas y 1-isoindolonas siendo núcleos cuya interacción con el sitio activo periférico de la AChE se ha estudiado mediante acoplamiento molecular;<sup>16</sup> ejemplos de estos compuestos se muestran en la Figura 5.





**Figura 5.** Compuestos sintéticos derivados de 1,3-isoindolindionas y 1-isoindolonas con actividad inhibitoria de la AChE.<sup>17-20</sup>

Entre los compuestos sintéticos con actividad inhibitoria de la AChE también destacan los derivados de *N*-bencilpiperazina, núcleo que ha demostrado una mejora en la adquisición y consolidación de la memoria.<sup>21</sup> Algunos ejemplos de estos compuestos sintéticos se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Compuestos sintéticos derivados de *N*-bencilpiperazina con actividad inhibitoria de la AChE.<sup>22-25</sup>

## 2.4 Modelo de farmacóforo

Se define como un arreglo tridimensional de las características estéricas y electrónicas mínimas necesarias para asegurar interacciones óptimas con un blanco en específico, lo cual desencadenará una respuesta biológica.

La manera en que los ligandos se unen a blancos macromoleculares está basada en un conjunto de interacciones químicas como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas. Los modelos de farmacóforo representan una descripción intuitiva y poderosa de dichas interacciones. Estos modelos permiten la comprensión del modo de interacción de los ligandos dirigidos a un blanco específico.<sup>26</sup>

Los modelos de farmacóforo capturan la naturaleza y el arreglo tridimensional de las características químicas en el ligando que son relevantes para la interacción con el blanco macromolecular. Esta descripción principalmente incluye: átomos donadores/aceptores de hidrógeno, elementos hidrofóbicos y elementos iónicos.

La principal ventaja de estos modelos es que permiten identificar estructuras diversas que se ajusten a los requerimientos relevantes para la interacción con el blanco macromolecular. Por lo anterior es necesario realizar la validación de dichos modelos. En general, el análisis consiste en determinar la capacidad del modelo para distinguir entre compuestos activos de compuestos inactivos.<sup>27,28</sup>

## 2.5 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una de las metodologías más utilizadas para hacer aproximaciones del reconocimiento e interacción molecular, ya que tiene como finalidad buscar la conformación y posición óptima de un ligando dentro de un blanco macromolecular.

El proceso se puede realizar de forma general como: rígido o flexible. El acoplamiento rígido se basa en el modelo clásico de llave-cerradura de Emil Fischer. En donde se asume que un ligando y una proteína están rígidos durante su interacción. Otro tipo de acoplamiento se deriva del modelo de ajuste inducido, considerando que la unión del ligando y la proteína se debe a una influencia directa y movimiento entre sí. Actualmente, se usa con frecuencia una aproximación de acoplamiento flexible para el ligando mientras que la proteína permanece rígida.<sup>29</sup>

La búsqueda de la mejor interacción ligando-proteína se realiza mediante un algoritmo que genera diferentes conformaciones del ligando y las acopla con la proteína. La validación de este proceso consiste en determinar la capacidad del programa y su algoritmo para reproducir el modo de unión de una molécula de referencia que puede ser el sustrato natural o un inhibidor característico y compararlo con el modo de unión experimental.<sup>30</sup>

### **2.6 Similitud molecular**

Una forma directa y rápida de comparar estructuras químicas en forma sistemática es mediante el tipo de átomos y su conectividad entre sí para establecer la similitud de ambas estructuras. La importancia de similitud entre dos estructuras químicas radica en el principio de similitud molecular propuesto por Johnson y Maggiora, el cual establece que las moléculas estructuralmente similares tienden a tener propiedades similares. Por lo tanto, dada una molécula de actividad biológica conocida, es probable que compuestos estructuralmente similares a ella muestren la misma actividad.<sup>31</sup>

Para medir cuantitativamente la similitud entre dos moléculas en forma consistente, son necesarios dos elementos: una representación consistente y sistemática de las estructuras y una medida de similitud. La similitud molecular es comúnmente utilizada para filtrar bases de datos e identificar compuestos de interés. De igual manera es una herramienta útil para el reposicionamiento de fármacos al buscar un uso alternativo para fármacos aprobados.<sup>28</sup>

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Como se mencionó en los antecedentes, los fármacos inhibidores de la AChE aprobados para el tratamiento de esta enfermedad están asociados con varios efectos adversos, entre los principales se encuentran hepatotoxicidad, vómito, diarrea, insomnio y fatiga;<sup>13,15</sup> además estos fármacos son utilizados solo para el tratamiento de los síntomas, de leves a moderados, en las etapas tempranas de la EA. Por lo mencionado anteriormente, es de gran importancia la obtención de nuevos inhibidores de AChE que en un futuro puedan ser utilizados en el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos para la EA.

### **4. HIPÓTESIS**

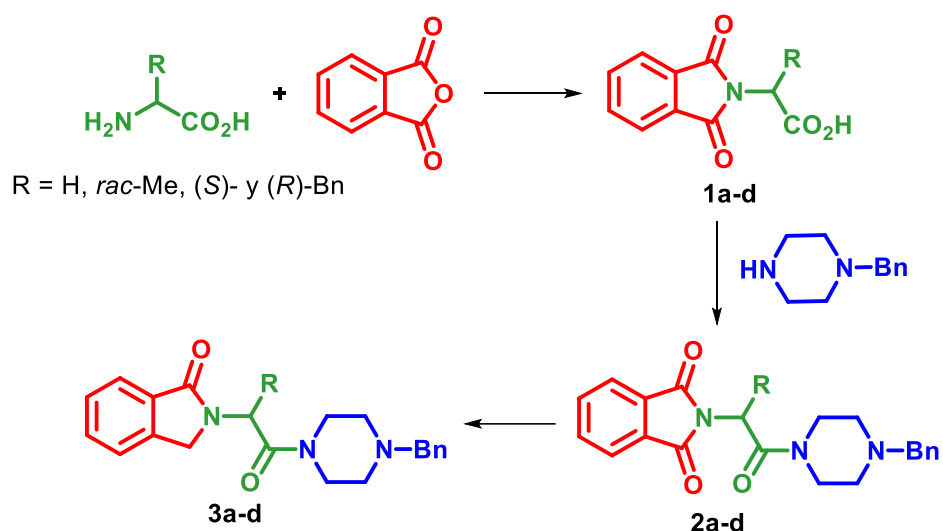
Al utilizar la estructura molecular del donepecilo como referencia y el modo de interacción que presenta con la AChE se podrá realizar un modelo de farmacóforo que permitirá diseñar y sintetizar nuevas moléculas que puedan presentar actividad inhibitoria sobre la AChE y una potencial aplicación en el tratamiento de la EA.

## 5. OBJETIVOS

El objetivo general que persigue este trabajo es obtener nuevos compuestos con propiedades inhibitorias de la AChE, mediante el diseño, síntesis y caracterización de nuevos análogos del donepecilo.

Los objetivos particulares consisten en:

1. Realizar un modelo farmacofórico basado en la interacción del donepecilo con la AChE.
2. Diseñar nuevos análogos del donepecilo al identificar posibles reemplazos en la estructura molecular.
3. Realizar acoplamiento molecular para evaluar la posible interacción con la AChE de los compuestos diseñados.
4. Medir la similitud molecular entre los análogos diseñados y el donepecilo.
5. Sintetizar los productos **1a-d**, **2a-d** y **3a-d** (Esquema 2).
6. Caracterizar los productos **1a-d**, **2a-d** y **3a-d**.



**Esquema 2.** Ruta sintética propuesta para la obtención de nuevos análogos del donepecilo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Modelo de farmacóforo

Se utilizó el programa LigandScout 4.4<sup>32</sup> para la obtención del modelo farmacofórico y se empleó la estructura cristalográfica de la AChE humana cristalizada formando un complejo con el donepecilo (PDB ID: 4EY7).<sup>33</sup> La estructura tridimensional de los compuestos utilizados fue construida mediante el programa Avogadro<sup>34</sup> y la optimización de su geometría se realizó empleando el campo de fuerza MMFF94 disponible en el programa. El modelo de farmacóforo se construyó considerando esferas de exclusión. La validación del modelo se realizó evaluando diferentes compuestos cuya capacidad inhibitoria de la AChE ha sido previamente reportada y se han clasificado como inactivos o activos. Se considera necesaria una concordancia de al menos tres regiones farmacofóricas para que un compuesto se ajuste al modelo, por lo que aquellos compuestos con una concordancia a menos de tres regiones no se ajustan al modelo de farmacóforo, evaluando así la capacidad del modelo de distinguir inhibidores de AChE de compuestos inactivos.

### 6.2 Acoplamiento molecular

Se utilizó el programa Autodock Vina<sup>35</sup> para realizar el acoplamiento molecular de los compuestos **2a-d** y **3a-d** sobre la estructura tridimensional de la AChE (PDB ID: 4EY7) la cual fue preparada en el programa Autodock Tools.<sup>36</sup> Para cada ensayo se mantuvo una exhaustividad de 8 y la caja de búsqueda se centró en la cavidad correspondiente al Sitio Activo Periférico y a la Triada Catalítica de la AChE. El protocolo de acoplamiento molecular fue validado mediante dos técnicas. La primera de ellas fue *re-docking*, la cual consistió en utilizar la estructura cristalizada del donepecilo y realizar el acoplamiento molecular en la misma proteína donde fue cristalizado, en este caso se utilizó la estructura de la AChE con clave del PDB 4EY7. La segunda técnica fue *cross-docking*. Para lo cual se utilizó la estructura del donepecilo cristalizado en la proteína con clave PDB 4EY7 y se realizó el acoplamiento molecular sobre otra estructura de la AChE, en este caso con clave PDB 6O4W.

### 6.3 Similitud molecular

Se utilizó el programa LiSiCA para realizar los cálculos de similitud estructural tridimensional para lo cual se tomó como referencia la estructura cristalizada del donepecilo en complejo con la AChE (PDB ID: 4EY7). Para la estructura tridimensional de los compuestos propuestos se emplearon las conformaciones de mínima energía obtenidas del acoplamiento molecular. Ambas estructuras son convertidas a un grafo molecular, en donde cada átomo es convertido en un vértice del grafo y cada enlace está representado por un borde o línea. Se emplea el algoritmo máximo de Clique para encontrar la subgrafo en común con el mayor número de vértices de los grafos comparados, este subgrafo en común representa la mayor subestructura en común de ambas moléculas comparadas.<sup>37</sup> La similitud entre las dos moléculas comparadas es expresada mediante el coeficiente de Tanimoto.

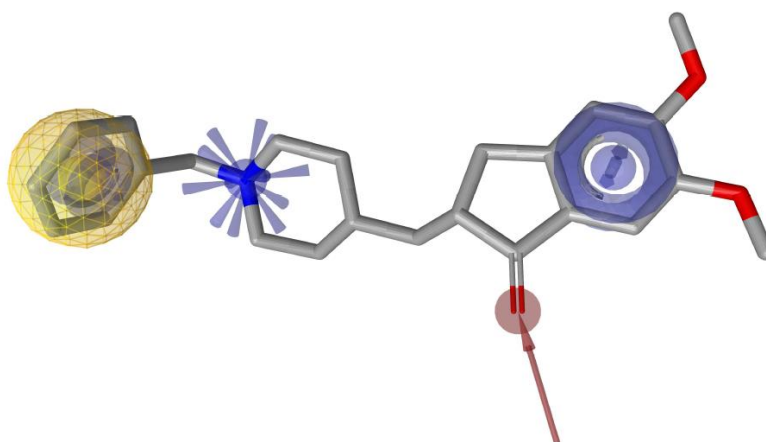
### 6.4 Procedimiento experimental

La descripción detallada del procedimiento para la síntesis química, así como la caracterización de los compuestos **1a-d**, **2a-d** y **3a-b** se encuentra en el anexo 2. La evaluación de la actividad inhibitoria de la AChE de los compuestos **2a-d** y **3a-b** se realizó mediante el método de Ellman.<sup>38</sup> Para esto se utilizó un kit de detección de inhibidores de AChE (número de catálogo MAK324), AChE (C3389) y donepecilo (D6821), los cuales fueron comprados de Merck®. Las disoluciones de la enzima se prepararon disolviendo el polvo liofilizado en agua y las disoluciones de los compuestos fueron preparadas a una concentración de 100 µM en DMSO al 20%. Se utilizó una placa de 96 pozos y la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro MultiSkan GO Thermofisher. El procedimiento experimental para el ensayo enzimático fue realizado acorde a las especificaciones técnicas del kit (MAK324).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Modelo de farmacóforo y diseño de análogos

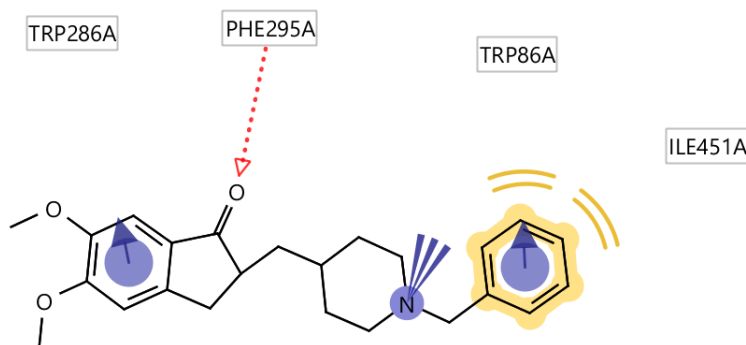
A partir de la estructura tridimensional de la AChE humana cristalizada en complejo con el donepecilo se obtuvo el modelo farmacofórico tridimensional basado en las interacciones de dicho ligando con la enzima, en este modelo se resaltan cinco regiones importantes para la interacción enzima-ligando: dos regiones aromáticas (anillos azules), una región aceptora de enlaces de hidrógeno (esfera y flecha rojas), una región ionizable positivamente (estrella azul) y una región hidrofóbica (esfera amarilla), como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Modelo de farmacóforo 3D basado en la interacción donepecilo-AChE.

En este modelo farmacofórico, el anillo aromático de la 4,5-dimetoxi-1-indanona es considerado como una región para el reconocimiento molecular debido a las interacciones  $\pi$ - $\pi$  que puede generar con la cadena lateral del residuo Trp286 al igual que el anillo aromático de la bencilpiperidina las interacciones  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas que puede generar con el residuo Trp86 e Ile451. A su vez el átomo de nitrógeno de la piperidina genera interacciones  $\pi$ -catión con el residuo Trp86 en función del pH. Mientras que el grupo carbonilo de la 4,5-dimetoxi-1-indanona actúa como un aceptor de enlaces de hidrógeno con el residuo Phe295 (Figura 8).





**Figura 8.** Modelo de farmacóforo 2D basado en la interacción donepecilo-AChE y residuos principales que intervienen en el reconocimiento molecular.

Las regiones farmacofóricas de este modelo concuerdan en con las reportadas en la literatura,<sup>15</sup> a excepción de una región hidrofóbica correspondiente al anillo de piperidina que no está presente en este modelo de farmacóforo generado.

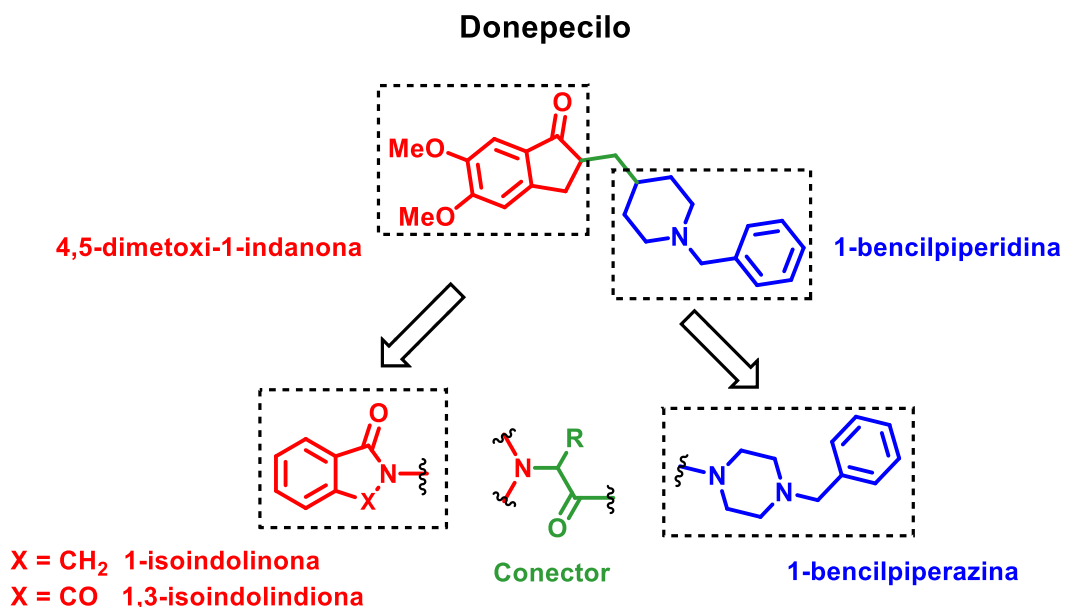
La validación del modelo de farmacóforo se realizó evaluando su capacidad de distinguir inhibidores de AChE de compuestos inactivos. Se utilizaron diferentes compuestos cuya capacidad inhibitoria de la AChE ha sido previamente reportada y se han clasificado como inactivos o activos.<sup>20-25</sup> En la Tabla 1 se puede observar que los compuestos que no coinciden con tres o más regiones farmacofóricas del modelo corresponden a compuestos catalogados como inactivos o no inhibidores de AChE y no se ajustan al modelo, mientras que los compuestos catalogados como inhibidores de AChE coinciden con tres o más regiones y si se ajustan al modelo.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos del ajuste de compuestos activos e inactivos y su concordancia con el modelo farmacofórico.

SMILES del compuesto	Actividad inhibitoria sobre AChE	Número de regiones coincidentes	RMSD
<chem>O=C1N(CCC2=CNC3=C2C=CC=C3)CC4=CC(OC)=C(OC)C=C41</chem>	Inactivo	< 3	-
<chem>O=C1N(CC2CCNC2)CC3=CC(OC)=C(OC)C=C31</chem>	Inactivo	< 3	-
<chem>O=C(C)C1=CC=C(OC[C@H](CN2CCCC2)O)C=C1O</chem>	Inactivo	< 3	-

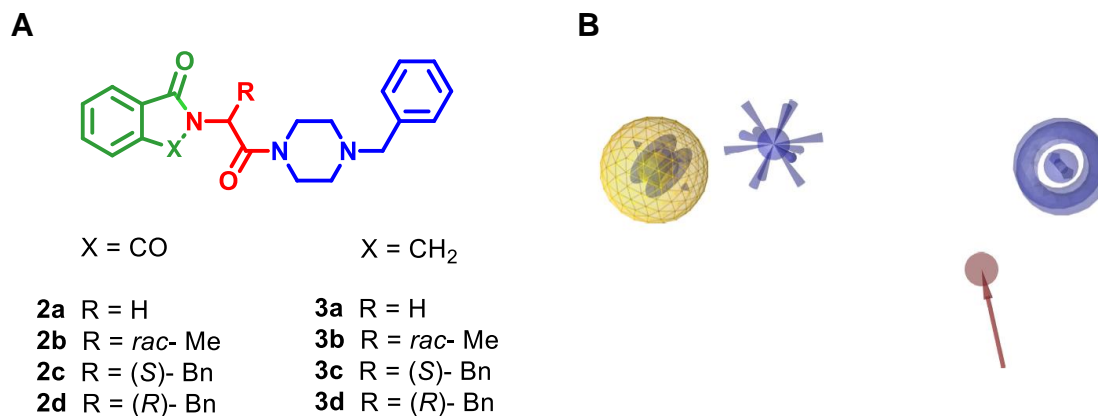
<chem>CC1=C(C(OCC)=O)[C@@H](C(N2CCN(C(C(C)=C)=O)CC2)=O)[C@H](C3=CC=CC=C3)O1</chem>	Inactivo	< 3	-
<chem>O=C(C)C1=C(C)OC(C)C1C(N2CCN(C(/C=C/C3=CC=CC=C3)=O)CC2)=O</chem>	Inactivo	< 3	-
<chem>BrC1=C2C(C(NC(CN3CCN(CCC4=CC=CC=C4)CC3)=O)CC2=O)=C(Br)S1</chem>	Inactivo	< 3	-
<chem>BrC1=C2C(C(NC(CN3CCN(CCC4CCCC4)CC3)=O)CC2=O)=C(Br)S1</chem>	Inactivo	< 3	-
<chem>O=C1c2cccnc2C(=O)N1CCC1CCN(Cc2ccccc2)CC1</chem>	Activo	4	0.734
<chem>O=C1CCc2cc3c(CCC4CCN(Cc5ccccc5)CC4)noc3cc2N1</chem>	Activo	3	0.878
<chem>Cc1cccc(CN2CCC(CCC(=O)c3ccc4c(c3)CCN4)CC2)c1</chem>	Activo	3	0.643
<chem>Cc1nc2ccc(C(=O)CCC3CCN(Cc4ccccc4)CC3)cc2s1</chem>	Activo	3	0.655
<chem>O=c1[nH]c2ccccc2c(=O)n1CCC1CCN(Cc2ccccc2)CC1</chem>	Activo	3	0.830

Gracias a este modelo farmacofórico se lograron identificar las regiones de importancia para el reconocimiento enzima-ligando y se propuso la siguiente estrategia de diseño para reemplazar el fragmento de 4,5-dimetoxi-1-indanona y de 1-bencilpiperazina, por fragmentos estrechamente similares y que han demostrado tener actividad inhibitoria de la AChE como se mencionó anteriormente. Esta estrategia consiste en reemplazar dichos fragmentos y conectarlos mediante un aminoácido, del cual el átomo de nitrógeno forma parte del fragmento sustituyente de la 1-isoindolona o 1,3-isoindoldiona y de esta manera obtener nuevos análogos del donepecilo (Figura 9).



**Figura 9.** Estrategia de diseño de nuevos análogos del donepecilo.

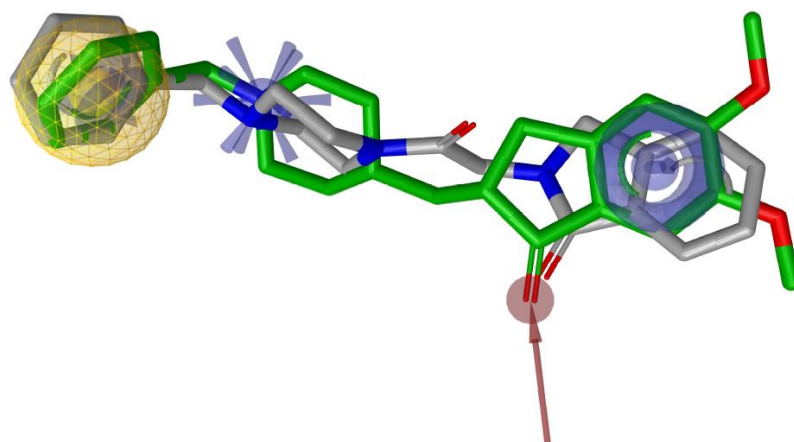
Los aminoácidos seleccionados para ser utilizados como conectores fueron glicina, (*rac*)-alanina, (*S*)- y (*R*)-fenilalanina, por lo que los análogos propuestos son los compuestos **2a-d** y **3a-d** (Figura 10A), de los cuales el compuesto **3a** fue seleccionado como referencia para realizar un alineamiento sobre el modelo farmacofórico generado previamente (Figura 10B).



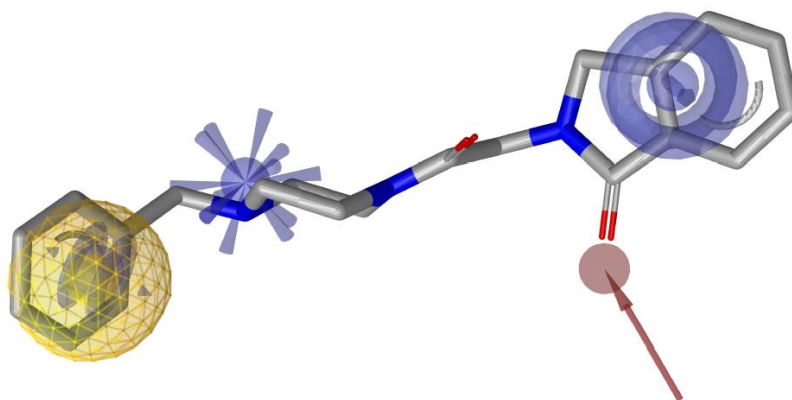
**Figura 10.** A) Análogos propuestos. B) Modelo de farmacóforo para la interacción con la AChE.

Al utilizar el compuesto **3a** como referencia se obtuvo un buen ajuste sobre el modelo farmacofórico comparándolo con el donepecilo (en verde, Figura 11A); en este ajuste se obtuvo un RMSD de 0.641 en donde coinciden cuatro de las cinco regiones farmacofóricas del modelo, siendo el aceptor de enlaces de hidrógeno la región faltante (Figura 11B).

A



B



**Figura 11.** A) Sobreposición del compuesto **3a** (gris) y donepecilo (verde) sobre el modelo farmacofórico. B) Ajuste del compuesto **3a** en el modelo farmacofórico.

En la Tabla 2 se muestra el alineamiento de los compuestos diseñados y la concordancia con las regiones farmacofóricas del modelo. Se puede observar que el fragmento de 1-isoindolona o 1,3-isoindoldiona presente en los compuestos **2a-d** y **3c**, no se ajustó a la región aromática correspondiente al anillo de indanona. De

manera similar estos núcleos no se ajustaron a la región aceptora de enlaces de hidrógeno a excepción de los compuestos **2a**, **2b** y **2c**. Por otra parte los compuestos **2a-d** y **3a-d** cumplen con los requerimientos estructurales necesarios para interactuar con la región hidrofóbica, la región ionizable y la región aromática correspondiente al grupo bencilo presentes en el modelo de farmacóforo, por lo que el fragmento de bencilpiperazina podría interactuar de buena manera con el sitio activo de la AChE.

**Tabla 2.** Alineamiento de compuestos diseñados y su concordancia con las regiones farmacofóricas del modelo.

Compuesto	Región aromática (indanona)	Región aromática (bencilo)	Aceptora de enlaces de H	Región ionizable	Región hidrofóbica	RMSD
<b>2a</b>	No	Si	Si	Si	Si	0.630
<b>2b</b>	No	Si	Si	Si	Si	0.630
<b>2c</b>	No	Si	No	Si	Si	0.078
<b>2d</b>	No	Si	Si	Si	Si	0.878
<b>3a</b>	Si	Si	No	Si	Si	0.641
<b>3b</b>	Si	Si	No	Si	Si	0.650
<b>3c</b>	No	Si	No	Si	Si	0.078
<b>3d</b>	Si	Si	No	Si	Si	0.821

## 7.2 Acoplamiento molecular

Para analizar el perfil de interacción de los análogos propuestos **2a-d** y **3a-d** con el sitio activo de la AChE se procedió a realizar acoplamiento molecular de los compuestos propuestos sobre la estructura tridimensional de la AChE humana cristalizada.

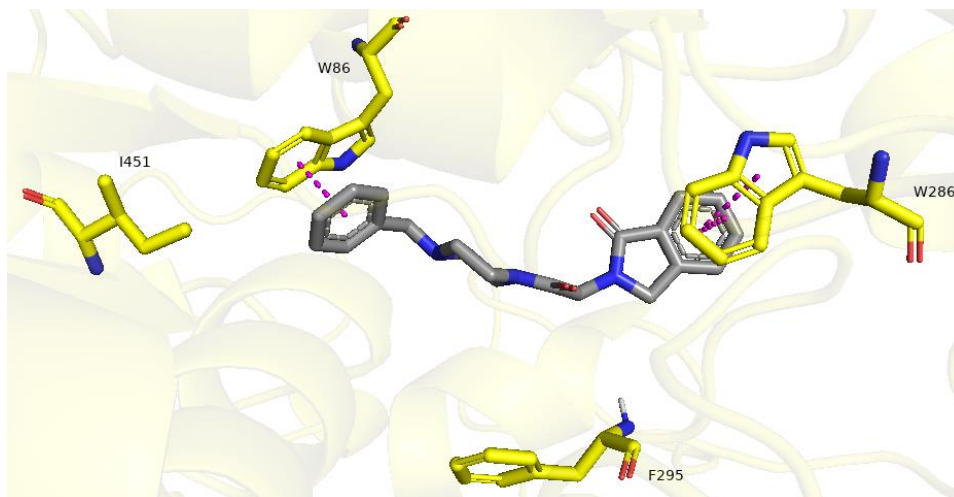
En la Tabla 3 se puede observar los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los análogos propuestos en la conformación de mínima energía obtenida mediante Autodock Vina. Además de presentar energías de unión comparables a las del donepecilo, presentan cierta concordancia de interacciones con los residuos de importancia analizados por el modelo de farmacóforo. La

totalidad de las interacciones que presentan los compuestos propuestos con la triada catalítica y con el sitio activo periférico de la AChE se puede observar mediante los esquemas en dos dimensiones del Anexo 1.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos del acoplamiento molecular y concordancia con interacciones de importancia según el modelo farmacofórico.

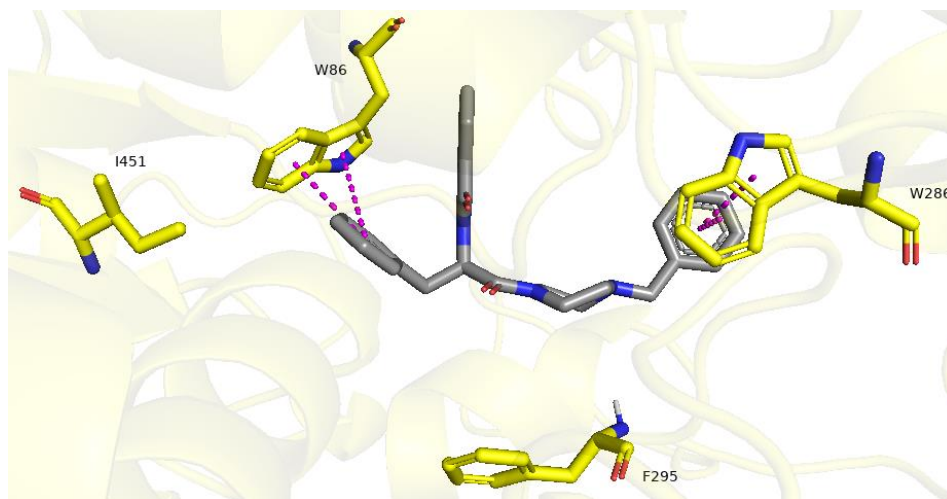
Compuesto	X	R	$\Delta G$ (kcal/mol)	Concordancia con interacciones de importancia
<b>2a</b>	CO	H	-11.3	Trp86, Trp286, Ile451
<b>2b</b>	CO	(S)-Me	-11.5	Trp86, Trp286
<b>2b</b>	CO	(R)-Me	-11.0	Trp86, Trp286, Ile451
<b>2c</b>	CO	(S)-Bn	-11.7	Trp86, Trp286
<b>2d</b>	CO	(R)-Bn	-11.2	Trp86, Trp286
<b>3a</b>	CH <sub>2</sub>	H	-11.3	Trp86, Trp286, Ile451
<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	(S)-Me	-11.1	Trp86, Trp286,
<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	(R)-Me	-10.3	Trp86, Trp286
<b>3c</b>	CH <sub>2</sub>	(S)-Bn	-10.5	Trp86, Trp286
<b>3d</b>	CH <sub>2</sub>	(R)-Bn	-10.5	Trp86, Trp286
Donepecilo	-	-	-12.2	Trp86, Trp286, Phe295, Ile451
Galantamina	-	-	-9.3	Trp86

Nuevamente el compuesto **3a** fue utilizado como modelo para analizar las interacciones que presentan esta serie de análogos. En la Figura 12 se puede observar el modo de unión de mínima energía que presenta dicho compuesto en el sitio activo de la AChE, el cual es muy similar al modo de unión del donepecilo cristalizado. En esta representación se pueden apreciar las interacciones  $\pi$ - $\pi$  (líneas moradas) que se generan entre el anillo aromático de la isoindolon-1-ona con la cadena lateral del residuo Trp286 al igual que el anillo aromático de la 1-bencilpiperazina con el residuo Trp86.



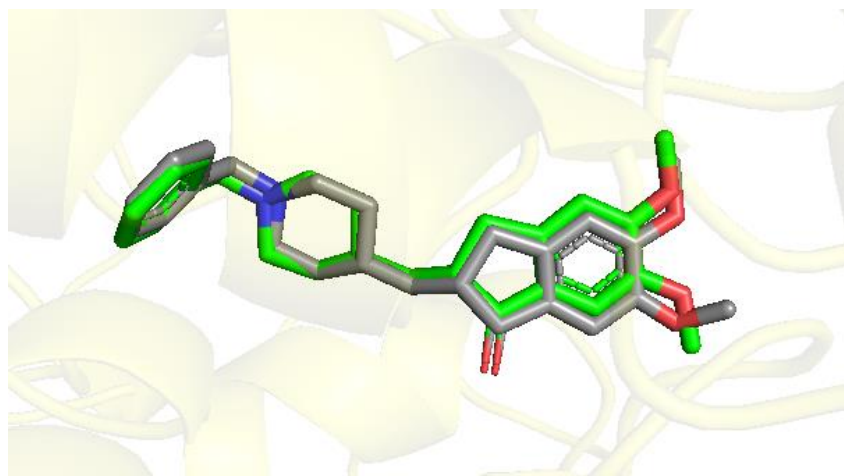
**Figura 12.** Interacción del compuesto **3a** con los residuos del sitio activo de la AChE.

Cabe mencionar que los compuestos derivados fenilalanina presentaron un modo de unión diferente al donepecilo y a los demás análogos propuestos. En la Figura 13 se muestra que el compuesto **3d** presenta interacciones  $\pi$ - $\pi$  (líneas moradas) con la cadena lateral del residuo Trp286 mediante la interacción con el anillo aromático de la 1-bencilpiperazina en lugar del anillo aromático de la isoindol-1-ona. A su vez también presenta interacciones  $\pi$ - $\pi$  con el residuo Trp86 mediante el anillo aromático de la cadena lateral de la fenilalanina en lugar de la 1-bencilpiperazina.



**Figura 13.** Interacción del compuesto **3d** con los residuos del sitio activo de la AChE.

La primera etapa de validación del acoplamiento molecular consistió en la técnica de *re-docking*, la cual consistió en utilizar la estructura cristalizada del donepecilo y realizar el acoplamiento molecular en la misma proteína donde fue cristalizado, en este caso se utilizó la estructura de la AChE con clave del PDB 4EY7. Para lo anterior se compararon las coordenadas atómicas del donepecilo cristalizado en complejo con la AChE (estructura en verde, Figura 14) contra las coordenadas atómicas del donepecilo obtenidas del acoplamiento molecular (estructura en gris, Figura 14), en donde se obtuvo un RMSD de 0.3277 y debido a que este es un valor cercano a cero, se puede concluir que existe una buena reproducibilidad del modo de unión experimental por parte del programa.

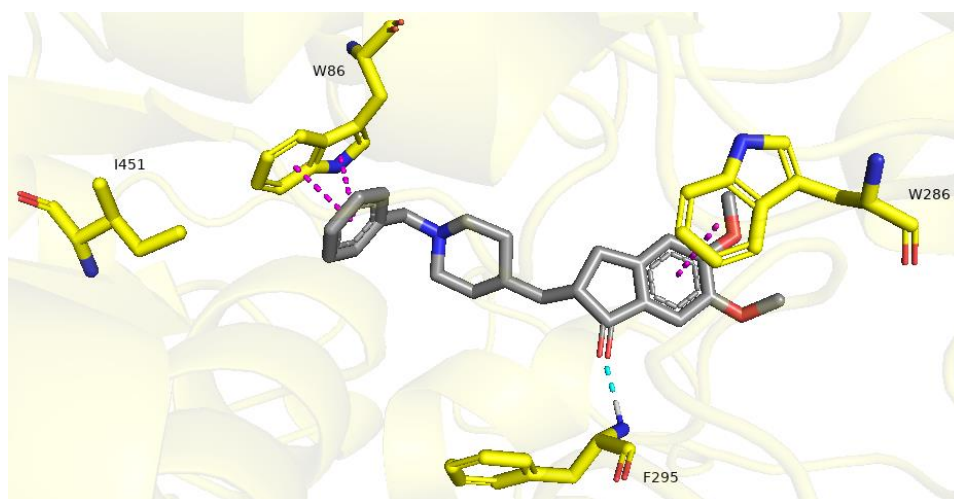


**Figura 14.** Sobreposición de la estructura del donepecilo cristalizado (verde) y el obtenido del acoplamiento molecular (gris) en el sitio activo de la AChE.

La segunda técnica empleada para validar el proceso de acoplamiento molecular realizado, fue *cross-docking*. Para lo cual se utilizó la estructura del donepecilo cristalizado en la proteína con clave PDB 4EY7 y se realizó el acoplamiento molecular sobre otra estructura diferente de la AChE, en este caso con clave PDB 6O4W. Como se puede observar en la Figura 15, este proceso de acoplamiento molecular generó las mismas interacciones reportadas anteriormente para la unión donepecilo-AChE, en donde el anillo aromático de la 4,5-dimetoxi-1-indanona presenta interacciones  $\pi$ - $\pi$  (líneas moradas) generadas con la cadena lateral del residuo Trp286 al igual que el anillo aromático de la bencilpiperidina con el residuo



Trp86, mientras que el grupo carbonilo de la 4,5-dimetoxi-1-indanona actúa como un aceptor de puentes de hidrógeno con el residuo Phe295. Por lo anterior, nuevamente se puede concluir que existe una buena reproducibilidad del modo de unión ligando-enzima por parte del programa y los resultados obtenidos para el acoplamiento molecular de los compuestos **2a-d** y **3a-d** son confiables. En la Tabla 4 se observan los resultados obtenidos del acoplamiento cruzado de dichos compuestos.



**Figura 15.** Interacción del donepezilo cristalizado (PDB 4EY7) con los residuos del sitio activo de la AChE (PDB 6O4W).

**Tabla 4.** Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos diseñados en la estructura de la AChE (PDB 6O4W).

Compuesto	X	R	$\Delta G$ (kcal/mol)	Concordancia con interacciones de importancia
<b>2a</b>	CO	H	-10.9	Trp86, Trp286, Ile451
<b>2b</b>	CO	(S)-Me	-11.3	Trp86, Trp286
<b>2b</b>	CO	(R)-Me	-11.2	Trp86, Trp286, Ile451
<b>2c</b>	CO	(S)-Bn	-11.7	Trp86, Trp286
<b>2d</b>	CO	(R)-Bn	-11.0	Trp86, Trp286
<b>3a</b>	CH <sub>2</sub>	H	-11.3	Trp86, Trp286, Ile451
<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	(S)-Me	-11.1	Trp86, Trp286,
<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	(R)-Me	-10.1	Trp86, Trp286
<b>3c</b>	CH <sub>2</sub>	(S)-Bn	-10.4	Trp86, Trp286

<b>3d</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>R</i> )-Bn	-10.5	Trp86, Trp286
Donepecilo	-	-	-11.9	Trp86, Trp286, Phe295, Ile451
Galantamina	-	-	-9.0	Trp86

### 7.3 Similitud molecular

Para analizar el grado de similitud estructural que presentan los análogos propuestos en relación al donepecilo, se utilizó LiSiCA un programa de cribado virtual basado en el ligando que es utilizado para encontrar la similitud en dos y tres dimensiones entre pares de moléculas y que ha sido aplicado efectivamente para encontrar nuevos inhibidores de colinesterasas.<sup>37</sup> Este programa compara dos moléculas basándose en su estructura, en este caso tridimensional consistente en la estructura del donepecilo cristalizado y las conformaciones obtenidas del acoplamiento molecular de los análogos propuestos. Ambas estructuras son convertidas a un grafo molecular, en donde cada átomo es convertido en un vértice del grafo y cada enlace está representado por un borde o línea. Se emplea el algoritmo máximo de Clique para encontrar la subgrafo en común con el mayor número de vértices de los grafos comparados, este subgrafo en común representa la mayor subestructura en común, referida como arreglo espacial, de ambas moléculas comparadas. La similitud entre las dos moléculas comparadas es expresada mediante el coeficiente de Tanimoto ( $T_{AB}$ ):

$$T_{AB} = \frac{N_S}{(N_B + N_A - N_S)}$$

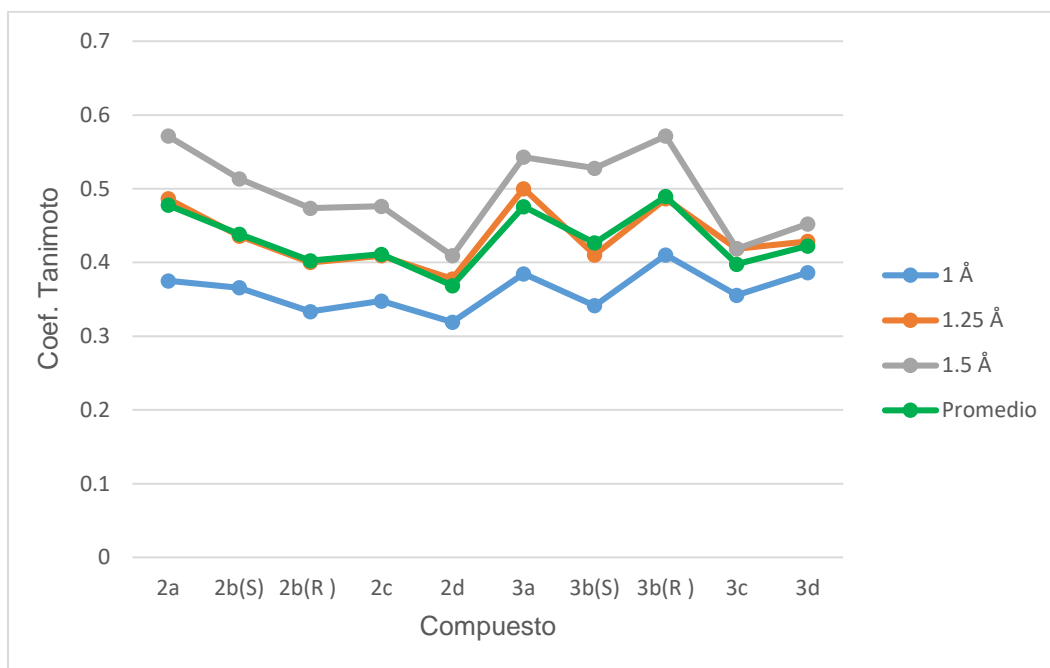
Donde  $N_S$  es el número de átomos en la subestructura en común,  $N_A$  el número de átomos que constituye la molécula de referencia y  $N_B$  es el número de átomos que constituyen a la molécula a evaluar. Un valor de  $T_{AB} = 0$  nos indica que no existe similitud entre ambas representaciones utilizadas de las moléculas, mientras que un valor de  $T_{AB} = 1$  significa que las representaciones evaluadas para ambas moléculas son idénticas.

En la Tabla 5, se observan los resultados obtenidos para la similitud molecular tridimensional en función de la relación espacial entre los componentes de los grafos moleculares del donepecilo como molécula de referencia y los componentes de los grafos moleculares para los compuestos **2a-d** y **3a-d**, para lo cual se consideraron tres medidas para la diferencia entre la distancia espacial: 1 Å, 1.25 Å y 1.5 Å.

Con estos resultados de similitud estructural se puede concluir que los compuestos derivados del aminoácido glicina **2a** y **3a** son los que presentan una mayor similitud con el donepecilo en comparación con los derivados de otros aminoácidos con excepción del enantiómero (*R*) del compuesto **3b**, que también presentó un valor alto de similitud. Como se puede apreciar en la Grafica 1, la mayoría de los compuestos derivados del núcleo 1-isoindolinona ( $X = \text{CH}_2$ ) en general presentan valores ligeramente más altos de similitud con el fármaco de referencia que los compuestos derivados del núcleo 1,3-isoindolindiona ( $X = \text{CO}$ ).

**Tabla 5.** Similitud tridimensional entre los análogos propuestos y el donepecilo expresada mediante el coeficiente de Tanimoto ( $T_{AB}$ ).

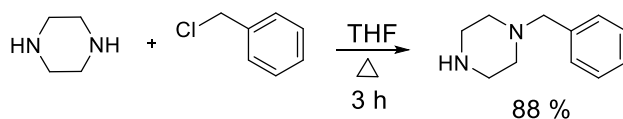
Compuesto	X	R	$T_{AB}$ (1.0 Å)	$T_{AB}$ (1.25 Å)	$T_{AB}$ (1.5 Å)	$T_{AB}$ Promedio
<b>2a</b>	CO	H	0.37500	0.48648	0.57142	0.47763
<b>2b</b>	CO	( <i>S</i> )-Me	0.36585	0.43589	0.51351	0.43842
<b>2b</b>	CO	( <i>R</i> )-Me	0.33333	0.40000	0.47368	0.40233
<b>2c</b>	CO	( <i>S</i> )-Bn	0.34782	0.40909	0.47619	0.41103
<b>2d</b>	CO	( <i>R</i> )-Bn	0.31914	0.37777	0.40909	0.36867
<b>3a</b>	CH <sub>2</sub>	H	0.38461	0.50000	0.54285	0.47582
<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>S</i> )-Me	0.34143	0.41025	0.52777	0.42649
<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>R</i> )-Me	0.41025	0.48648	0.57142	0.48939
<b>3c</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>S</i> )-Bn	0.35555	0.41860	0.41860	0.39578
<b>3d</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>R</i> )-Bn	0.38636	0.42860	0.45238	0.42245
Donepecilo	-	-	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000



**Grafica 1.** Similitud tridimensional entre los análogos propuestos y el donepecilo.

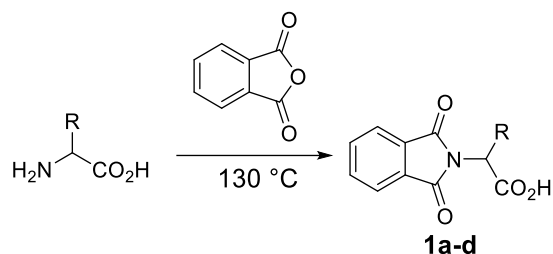
### 7.3 Síntesis de compuestos

La obtención de los análogos del donepecilo comenzó con la síntesis de la *N*-bencilpiperazina, la cual se obtuvo mediante una reacción de sustitución nucleofílica entre el cloruro de bencilo y piperazina en THF a temperatura de reflujo obteniéndose el producto deseado en 88 % de rendimiento (Esquema 3).



**Esquema 3.** Síntesis de *N*-bencilpiperazina.

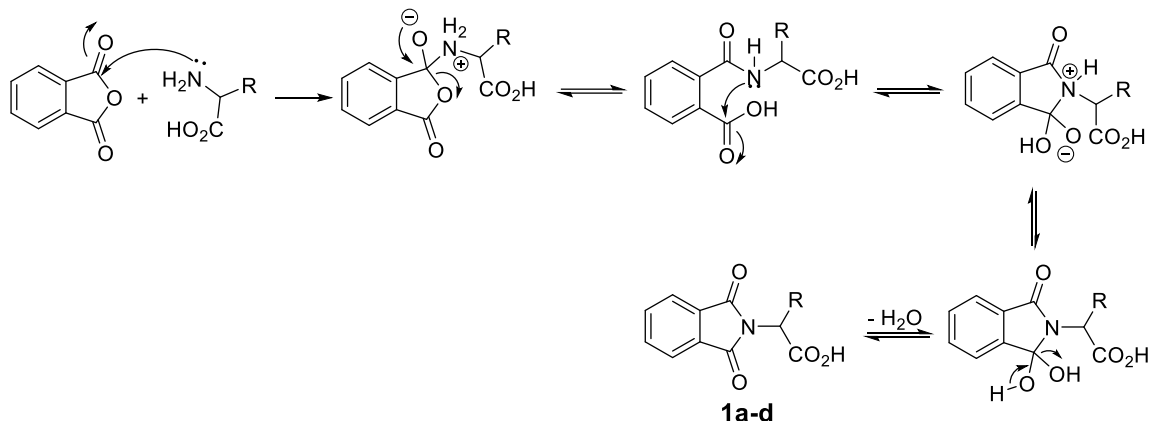
La síntesis de los productos **1a-d** se realizó mediante la reacción entre anhídrido ftálico y el aminoácido correspondiente a 130 °C en una reacción libre de disolvente en la cual se obtuvieron los productos deseados con buenos resultados (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resultados obtenidos en la síntesis de los productos **1a-d**.

Ensayo	Producto	R	t (min)	Rendimiento (%)	e.e. (%) <sup>a</sup>
1	<b>1a</b>	H	15	74	-
2	<b>1b</b>	<i>rac</i> -Me	30	85	0
3	<b>1c</b>	( <i>S</i> )-Bn	20	86	100
4	<b>1d</b>	( <i>R</i> )-Bn	20	88	97

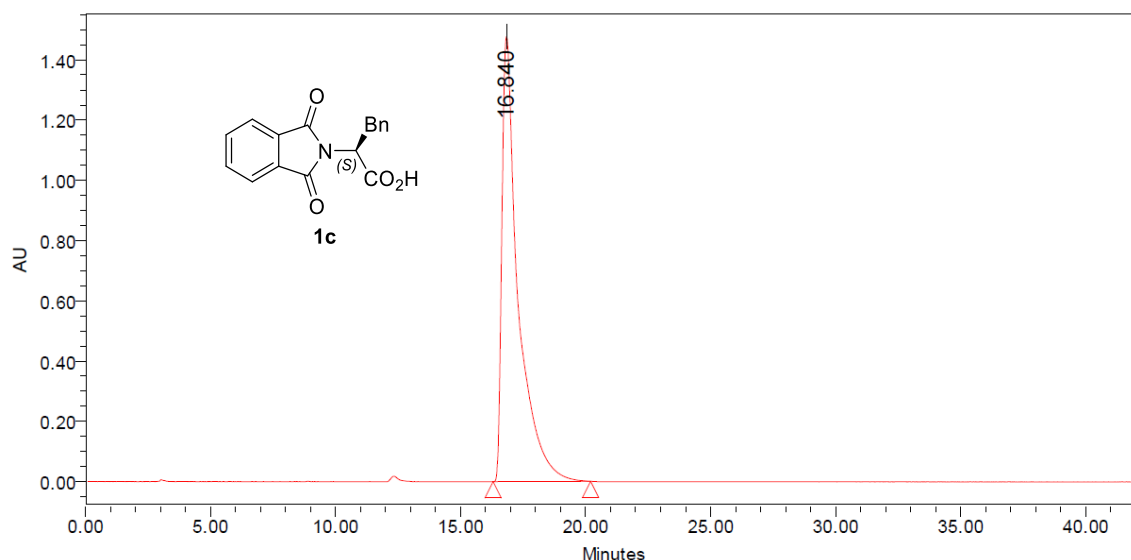
<sup>a</sup> Determinado mediante HPLC columna Chiralpak AD-H.

Esta reacción es ampliamente utilizada en la *N*-protección de aminoácidos con anhídrido ftálico para generar ftalimidas *N*-sustituidas generalmente con buenos rendimientos y sin racemización de los productos,<sup>39,40</sup> para el caso de esta reacción la mezcla de ambos reactivos sólidos se calienta a una temperatura mayor a la temperatura de fusión del anhídrido ftálico propiciado que una vez fundido éste, actúe como disolvente y el aminoácido se disuelva en él y una vez en solución el grupo amino del aminoácido realiza un ataque nucleofílico sobre uno de los grupos carbonilos del anhídrido, el segundo paso de esta reacción, más lento que el primero, consiste en un segundo ataque nucleofílico por parte del nitrógeno del ahora grupo amida al grupo carboxilo formado,<sup>41</sup> generando así una ciclación intramolecular; finalmente con la pérdida de una molécula de agua, se obtiene la ftalimida *N*-sustituida (Esquema 4).

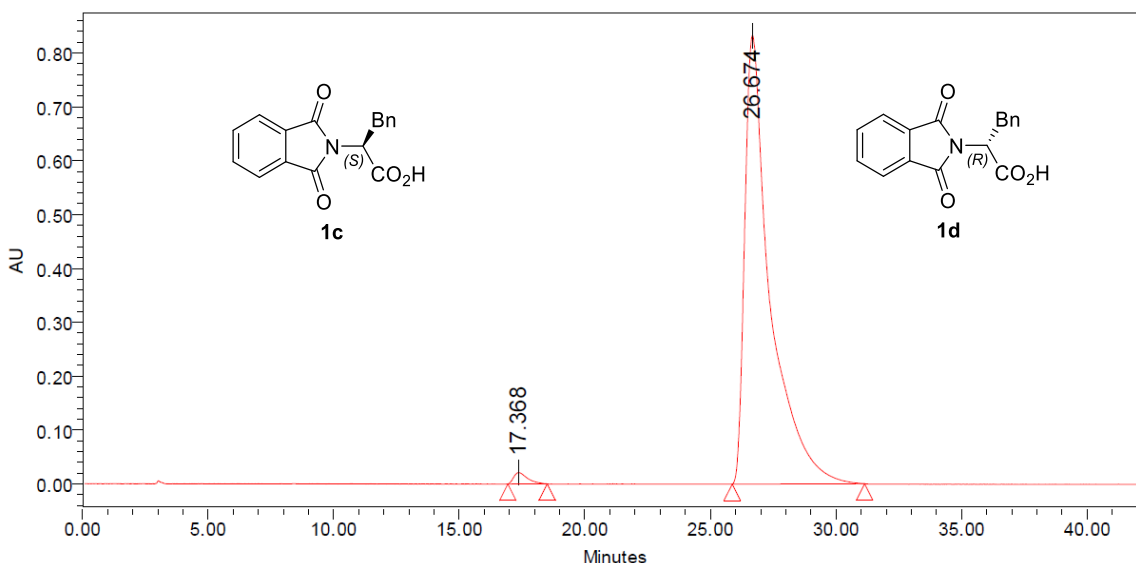


**Esquema 4.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los compuestos **1a-d**.

En la Figura 16 se puede observar el cromatograma del compuesto **1c** donde se puede apreciar un 100% de e.e., mientras que en la Figura 17 el cromatograma del compuesto **1d** muestra una relación enantiomérica de 1.5:98.5 (*S*:*R*) correspondiendo a un 97% de e.e. a favor del enantiómero (*R*); por lo que se confirma que la reacción de condensación entre anhídrido ftálico y (*S*)- o (*R*)-fenilalanina ocurre con nula o escasa racemización del producto como se mencionó anteriormente.



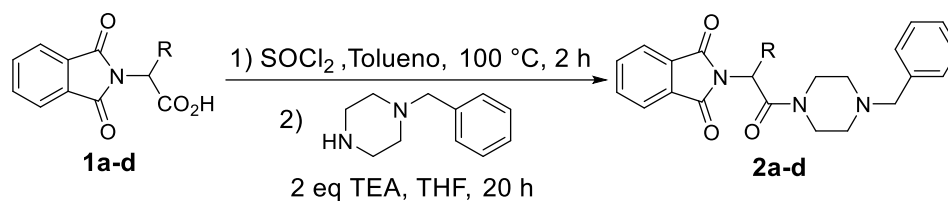
**Figura 16.** Cromatograma de HPLC para el compuesto **1c**.



**Figura 17.** Cromatograma de HPLC para el compuesto **1d** (r.e. 1.5:98.5).

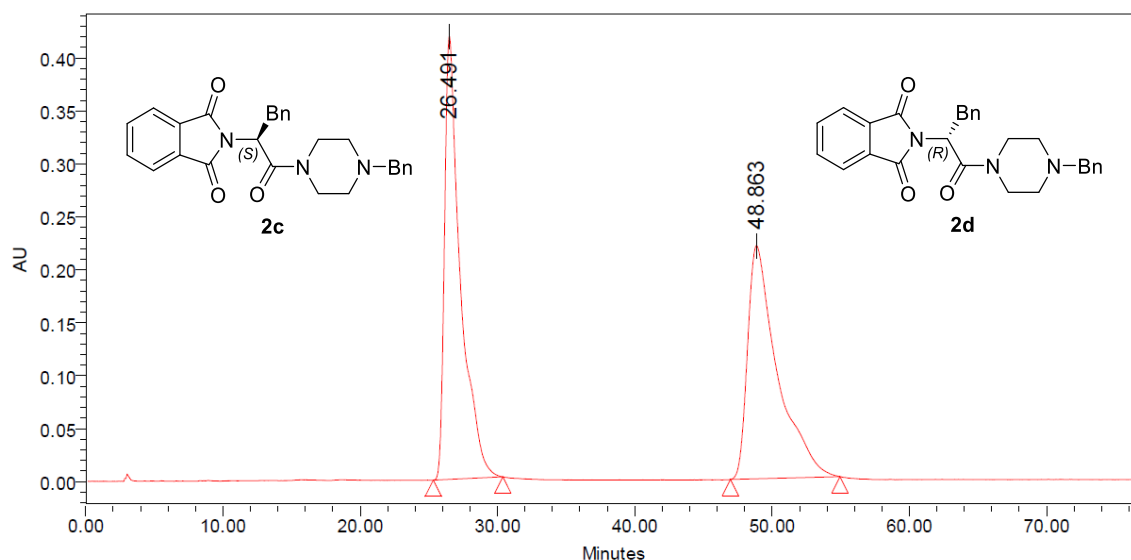
Posteriormente se procedió a la obtención de los compuestos **2a-d**, para lo cual el primer procedimiento que se realizó fue la reacción entre un cloruro de ácido generado *in situ* a partir de los compuestos **1a-d** y *N*-bencilpiperazina. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de dicha reacción en donde se obtuvieron los productos deseados con bajos rendimientos y pérdida de la pureza enantiomérica de los compuestos como se puede apreciar en la Figura 18.

**Tabla 7.** Resultados obtenidos en la síntesis de los productos **2a-d** mediante un cloruro de ácido generado *in situ*.



Ensayo	Producto	R	% Rendimiento	e.e. (%) <sup>a</sup>
1	<b>2a</b>	H	18	-
2	<b>2b</b>	<i>rac</i> -Me	15	0
3	<b>2c</b>	( <i>S</i> )-Bn	12	0
4	<b>2d</b>	( <i>R</i> )-Bn	15	0

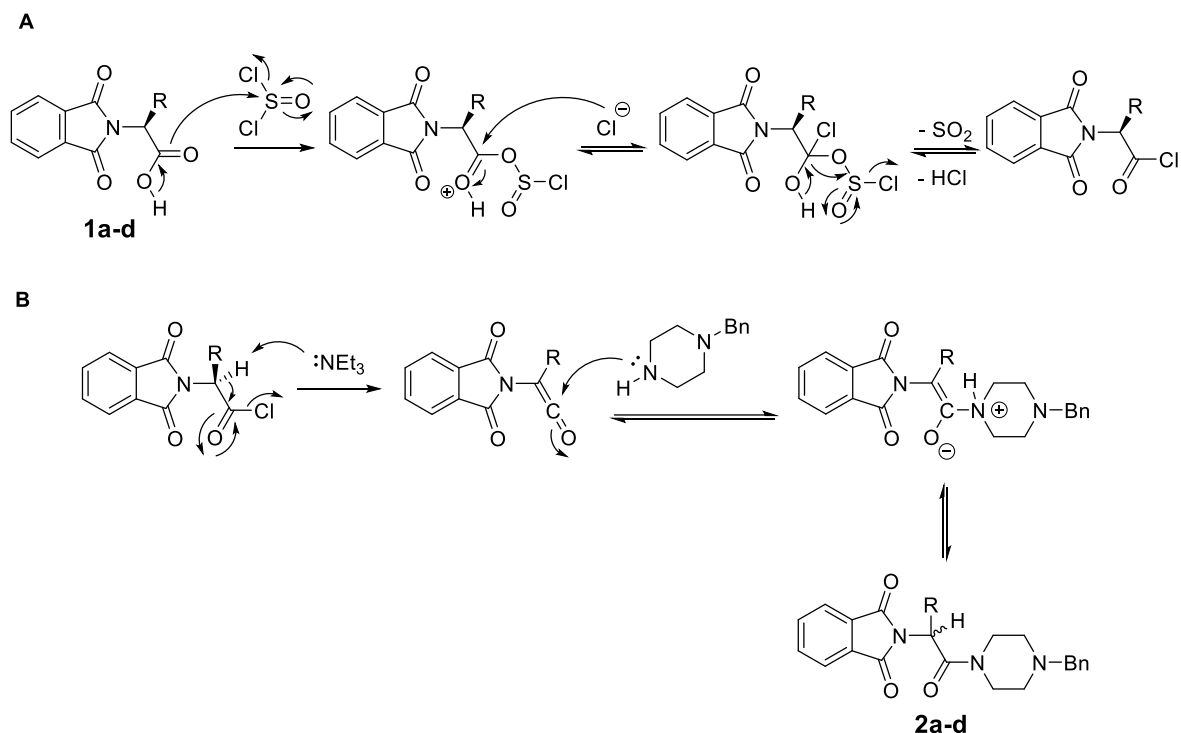
<sup>a</sup> Determinado mediante HPLC columna Chiralpak AD-H.



**Figura 18.** Cromatograma de HPLC para el compuesto **2c** (r.e. 50:50).

Este método para la formación de amidas partiendo de ácidos carboxílicos implica un ataque nucleofílico por parte del grupo carboxilo hacia el  $\text{SOCl}_2$ , formando así un anhídrido mixto, en donde el residuo de  $\text{SOCl}_2$  actúa como grupo saliente para una sustitución nucleofílica de un ion cloruro para generar un cloruro de ácido,<sup>42</sup> el cual posee una mayor reactividad en comparación con un ácido carboxílico (Esquema 5A). Dichos cloruros de ácido pueden formar una cetena *in situ* mediante el tratamiento con trietilamina a temperatura ambiente.<sup>43,44</sup> La cual en presencia de *N*-bencilpiperazina sufre un ataque nucleofílico, por parte del átomo de nitrógeno nucleofílico de la piperazina, para obtener los productos deseados **2a-d** (Esquema 5B). La formación *in situ* de la cetena mediante el uso de una base capaz de abstraer el hidrógeno ácido en posición  $\alpha$  al carbonilo, en este caso trietilamina, explica la pérdida de la pureza enantiomérica de los compuestos **2c** y **2d** observada en la tabla 7.

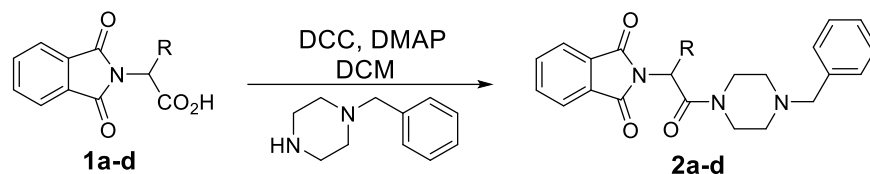




**Esquema 5.** Mecanismo de reacción propuesto para A) la obtención de cloruros de ácido a partir de los compuestos **1a-d**, B) la obtención de los compuestos **2a-d** empleando  $\text{Et}_3\text{N}$  y *N*-bencilpiperazina.

Otro método empleado para la obtención de los productos **2a-d** fue a partir de los ácidos carboxílicos **1a-d** y *N*-bencilpiperacina bajo condiciones suaves de reacción es mediante el uso de un reactivo de acoplamiento como lo es DCC el cual es ampliamente utilizado en la síntesis de péptidos a temperatura ambiente.<sup>45</sup> En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de dicha reacción en donde se obtuvieron los productos deseados con rendimientos moderados, además se puede apreciar el efecto del uso de DMAP como catalizador tanto en el rendimiento de la reacción como en la pureza enantiomérica de los productos.

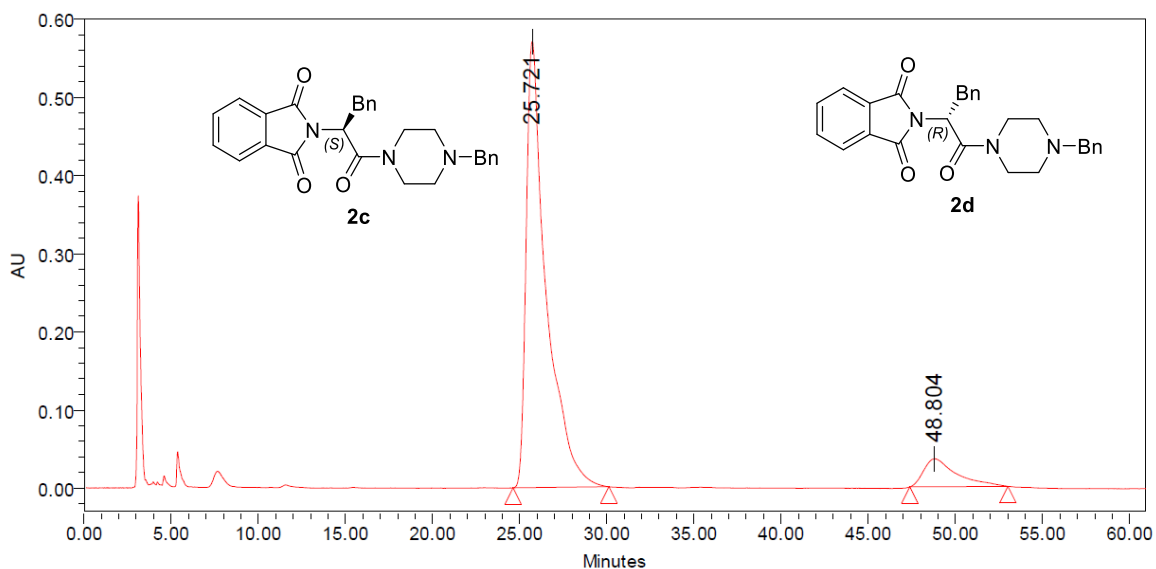
**Tabla 8.** Resultados obtenidos en la síntesis de los productos **2a-d** mediante el uso de DCC.



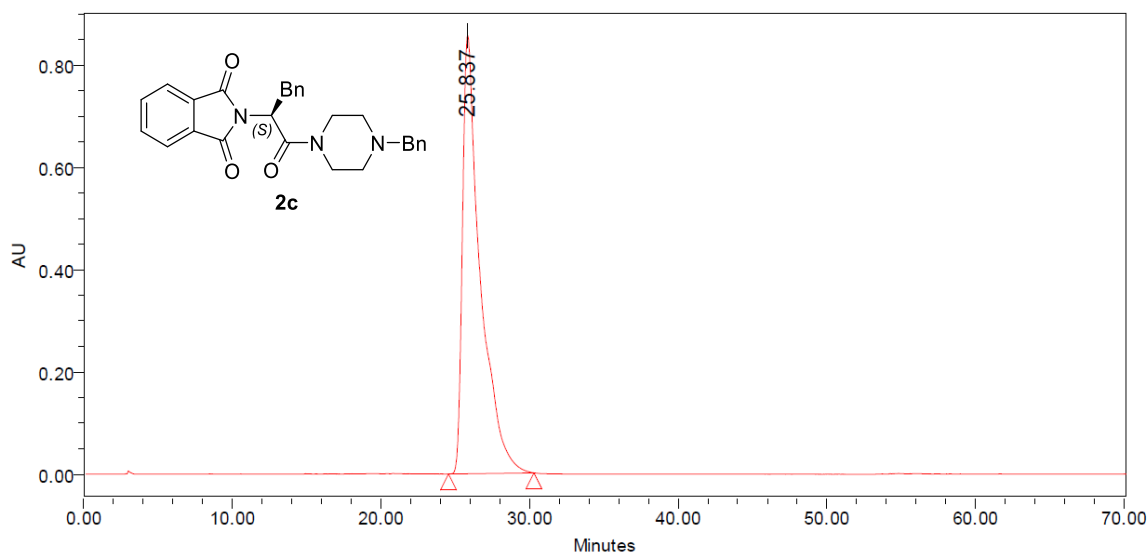
Ensayo	Producto	R	DMAP (%)	t (h)	Rendimiento (%)	e.e. (%) <sup>a</sup>
1	<b>2a</b>	H	20	48	50	-
2	<b>2a</b>	H	0	48	41	-
3	<b>2b</b>	<i>rac</i> -Me	20	48	53	0
4	<b>2b</b>	<i>rac</i> -Me	0	48	45	0
5	<b>2c</b>	( <i>S</i> )-Bn	20	48	65	50
6	<b>2c</b>	( <i>S</i> )-Bn	20	20	62	82
7	<b>2c</b>	( <i>S</i> )-Bn	0	20	52	100
8	<b>2d</b>	( <i>R</i> )-Bn	0	20	55	97(100) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Determinado mediante HPLC columna Chiralpak AD-H. <sup>b</sup> Después de recristalización.

El uso de DMAP en la reacción tiene diferentes efectos notables, uno de ellos en el rendimiento de la reacción que se obtiene de la reacción el cual aumenta ligeramente cuando se utiliza en un 20%. Pero el efecto de mayor importancia es su influencia en el exceso enantiomérico de los productos, ya que como se puede notar, su presencia como catalizador genera un 82% de e.e. para el compuesto **2c** (Figura 19). Mientras que cuando no se utiliza se mantiene la pureza enantiomérica que presentan los compuestos **1c** y **1d**, por lo que se obtiene un 100% de e.e. para el compuesto **2c** (Figura 20) y 97% de e.e. para el compuesto **2d** (Tabla 5, ensayos 6-8). De igual manera con el uso de DMAP como catalizador se puede apreciar que a mayor tiempo de reacción no se genera un aumento significativo del rendimiento pero si genera una reducción de la pureza enantiomérica generando un 50% de e.e. para el compuesto **2c** (Tabla 5, ensayos 5 y 6). De estos resultados se puede reforzar el argumento mencionado anteriormente de que el uso de una base, en este caso DMAP, puede afectar la estereoquímica de los productos al abstraer el hidrógeno ácido en posición  $\alpha$  al carbonilo presente en los compuestos.

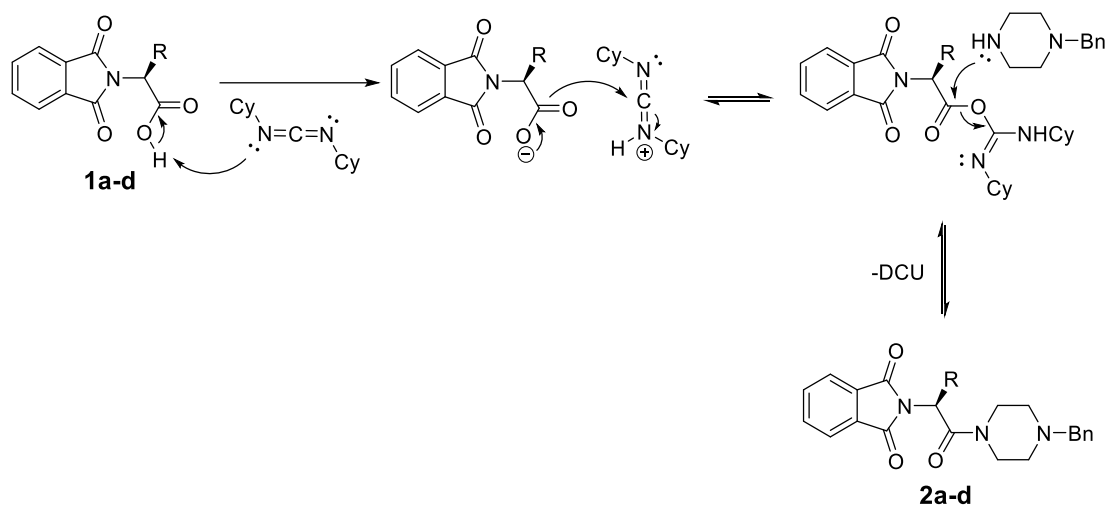


**Figura 19.** Cromatograma de HPLC del crudo de reacción para el compuesto **2c** en presencia de DMAP (r.e. 91:9).



**Figura 20.** Cromatograma de HPLC para el compuesto **2c** en ausencia de DMAP.

Este método para la formación de amidas partiendo de ácidos carboxílicos implica la formación de una *O*-acilurea como intermediario reactivo que presenta una mayor reactividad en comparación con el ácido carboxílico. El cual es capaz de sufrir un ataque nucleofílico por parte del átomo de nitrógeno de la *N*-bencilpiperazina y liberar diciclohexilurea (DHU) como subproducto y de esta manera obtener los productos deseados **2a-d** sin afectaciones en la pureza enantiomérica presentada (Esquema 6).

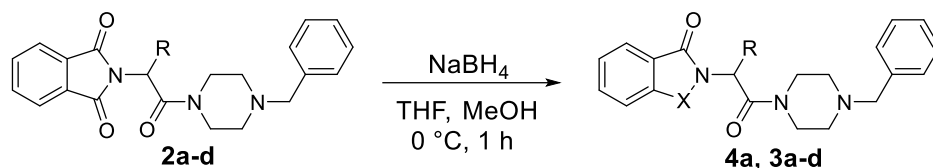


**Esquema 6.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los compuestos **2a-d** empleando DCC y *N*-benzilpiperazina.

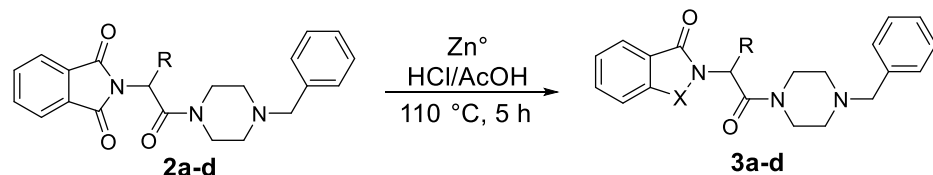
Con los productos **2a-d** en mano se procedió al último paso de la ruta sintética para la obtención de los análogos del donepecilo diseñados en este trabajo. Para lo cual se realizó una reacción de reducción de dichos compuestos empleando  $\text{NaBH}_4$  (método A) para obtener los productos **3a-d**, metodología que se ha utilizado para reducir totalmente hasta el grupo metileno a uno de los grupos carbonilos presente en derivados de 1,3-isoindolindiona.<sup>46</sup> Sin embargo, en la reacción para el compuesto **2a** se obtuvo el producto de la reducción parcial hasta el alcohol **4a**. Mientras que para la reacción de los compuestos **2b-d** el crudo de reacción se obtuvo como una mezcla de varios productos los cuales no se pudieron separar bajo las condiciones de cromatografía en columna realizadas (Tabla 8). Por lo anterior se ensayó una segunda metodología para la obtención de los productos **3a-d**, en la que los compuestos **2a-d** se sometieron a una variación de la reducción de Clemmensen, en este caso siendo una reacción de reducción empleando Zn metálico en medio ácido (método B), siendo de igual manera una metodología que se ha utilizado para reducir totalmente hasta el grupo metileno a uno de los grupos carbonilos presente en derivados de 1,3-isoindolindiona,<sup>47</sup> sin embargo en el caso de los compuestos **2a-d** no procedió la reacción (Tabla 6).

**Tabla 8.** Metodologías empleadas para la obtención de los productos **3a-d**.

Método A



Método B



Ensayo	Producto	X	R	Método A Rendimiento (%)	Método B Rendimiento (%)
1	<b>3a</b>	CH <sub>2</sub>	H	-	N.R.
2	<b>3b</b>	CH <sub>2</sub>	<i>rac</i> -Me	A	N.R.
3	<b>3c</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>S</i> )-Bn	A	N.R.
4	<b>3d</b>	CH <sub>2</sub>	( <i>R</i> )-Bn	A	N.R.
5	<b>4a</b>	CHOH	H	48	-

A = Mezcla compleja difícil de separar por cromatografía en columna.

N.R. = no reacción.

#### 7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de la AChE

En la Tabla 9 se observan los resultados de la evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de la AChE por parte de los compuestos **2a-d** y **4a**, obtenidos en este trabajo, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para lo cual se utilizó al donepecilo como control. Se puede observar que los compuestos evaluados presentaron un bajo porcentaje de inhibición de la AChE a la concentración evaluada, siendo el compuesto **4a** el que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (18.53%). Estos resultados muestran que los compuestos **2b-d** y **4a** tienen una menor potencia en contraste con el donepecilo que generó 93.36% de inhibición de la AChE.

**Tabla 9.** Actividad inhibitoria de la AChE de los compuestos **2a-d** y **4a** a 100  $\mu$ M.

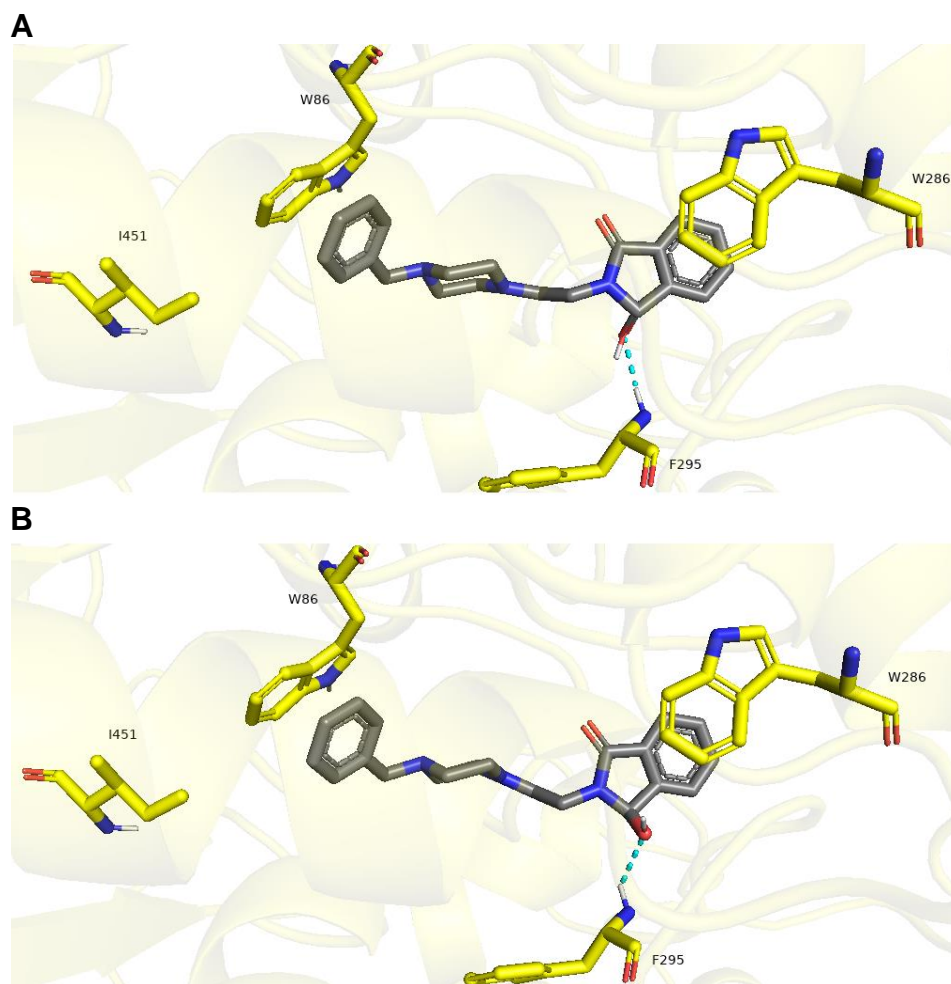
Compuesto	X	R	% inhibición (100 $\mu$ M)
<b>2a</b>	CO	H	N.D.
<b>2b</b>	CO	<i>rac</i> -Me	8.62
<b>2c</b>	CO	( <i>S</i> )-Bn	8.58
<b>2d</b>	CO	( <i>R</i> )-Bn	1.69
<b>4a</b>	CHOH	H	18.53
Donepecilo	-	-	93.36

N.D. = no determinado

Los compuestos **2b-d** presentaron valores de  $\Delta G$  muy similares en el acoplamiento molecular y mayores al donepecilo (Tabla 3). Esta misma tendencia puede observarse de forma general en la Tabla 9, en donde dichos compuestos presentaron valores de porcentaje de inhibición similares entre ellos y menores al donepecilo. De manera similar los compuestos **2b** y **2c** presentaron valores de similitud más altos (Tabla 5) y un mayor porcentaje de inhibición en comparación al compuesto **2d**.

Como se mencionó previamente el grupo carbonilo del núcleo de indanona presente en el donepecilo actúa como un aceptor de enlaces de hidrógeno con el aminoácido Phe295 del sitio activo de la AChE. La baja potencia que presentan los compuestos **2b-d**, en comparación al donepecilo, puede ser debida a la ausencia de dicha interacción. La ausencia de dicha interacción se puede analizar mediante los resultados del acoplamiento molecular presentados en la Tabla 3.

Lo anterior puede reforzarse mediante el análisis por acoplamiento molecular de la interacción con la AChE por parte del compuesto **4a**, en donde podemos observar que sus dos enantiómeros además de presentar un modo de interacción similar al de los demás compuestos, el grupo alcohol si interacciona mediante un puente de hidrógeno con el residuo Phe295 (línea punteada azul, Figura 21), siendo este compuesto el que presentó el mayor porcentaje de inhibición a la concentración ensayada.



**Figura 21.** Interacción del compuesto **4a** con los residuos del sitio activo de la AChE. A) Enantiómero (*S*)  $\Delta G$  (kcal/mol) = -11.3. B) Enantiómero (*R*)  $\Delta G$  (kcal/mol) = -11.1.

## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la construcción de un modelo de farmacóforo basado en la interacción del donepecilo con la AChE, el cual permitió diseñar los compuestos **2a-d** y **3a-d** como nuevos análogos del donepecilo.

El posible modo de interacción de estos compuestos con la AChE se analizó mediante acoplamiento molecular el cual fue similar al que presenta el donepecilo. Además se calculó la similitud molecular que presentan estos nuevos compuestos con dicho fármaco, la cual se encuentra en un rango de 0.39 a 0.47. De forma general los **2b** y **2c** presentaron valores de similitud más altos y un mayor porcentaje de inhibición en comparación al compuesto **2d**.

Se logró la síntesis de los compuestos **1a-d** con rendimientos mayores al 74% a partir de los aminoácidos glicina, *rac*-alanina, (*S*)- y (*R*)-fenilalanina empleando un enfoque de química verde utilizando calentamiento en una reacción libre de disolvente y hacer uso de una mezcla de H<sub>2</sub>O/EtOH para purificar los productos. Los compuestos **2a-d** se obtuvieron con rendimientos moderados entre 41% y 65%, los cuales mantuvieron una buena pureza enantiomérica en los casos correspondientes al emplear DCC y *N*-bencilpiperazina. Mientras que el compuesto **4a** se obtuvo de la reducción con NaBH<sub>4</sub> del compuesto **2a** con un 48% de rendimiento.

Los compuestos obtenidos en este trabajo fueron sometidos a una evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de la AChE mediante un ensayo *in vitro*, en donde se encontró que los compuestos **2b-d** y **4a** presentan un porcentaje de inhibición de la AChE en un rango de 1.69 a 18.53% a una concentración de 100 µM. De manera general el protocolo de modelado de farmacóforo, acoplamiento molecular, similitud molecular, síntesis y caracterización; permitió la obtención de nuevos compuestos con propiedades inhibitorias de la AChE.



## 9. PERSPECTIVAS

1. Obtener y caracterizar mediante RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  así como por espectrometría de masas de alta resolución los compuestos **3a-d**.
2. Obtener los enantiómeros por separado de los compuestos **2b** y **4a**.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de la AChE del compuesto **2a**, así como los enantiómeros por separado de los compuestos **2b** y **4a**.
4. Realizar ensayos de cinética enzimática para evaluar el tipo de inhibición que presentan los compuestos **2a-d** y **4a**.
5. Realizar ensayos dosis-respuesta para obtener la  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos **2a-d** y **4a**.
6. Realizar ensayos de toxicidad para evaluar los posibles efectos adversos de los compuestos **2a-d** y **4a**.

**10. REFERENCIAS**

1. Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol. Med. Rep.* **2019**; 20(2): 1479–1487.
2. Long J.M., Holtzman D.M., Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell.* **2019**; 179(2): 312–339.
3. Nichols E. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health.* **2022**; 7: e105–e125.
4. Serrano-Pozo A., Frosch M.P., Masliah E., Hyman B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2011**; 1(1): a0 06189–a0 06189.
5. Ansari M.A., Scheff S.W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2010**; 69(2): 155–167.
6. Bartus R.T., Dean L.T., Beer B., Lippa A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* **1982**; 217 (4558): 408.
7. Hampel H., Mesulam M.M., Cuello A.C., Khachaturian A.S., Vergallo A., Farlow M.R., *et al.* Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **2019**; 6(1): 2–15.
8. Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D., Bondzic A.M., Vasic V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**; 11(3): 315–335.
9. Makarian M., Gonzalez M., Salvador S., Lorzadeh S., Hudson P., Pecic S. Synthesis, kinetic evaluation and molecular docking studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors. *J. Mol. Struct.* **2022**; 1247: 131425.
10. Castro-Silva E., Bello M., Hernández-Rodríguez M., Correa-Basurto J., Murillo-Álvarez J., Rosales-Hernández M., Muñoz-Ochoa M. *In vitro* and *in silico* evaluation of fucosterol from *Sargassum horridum* as potential human acetylcholinesterase inhibitor. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**; 37(12): 3269–3268.

11. Hilal-Dandan R., Brunton L. Goodman y Gilman. Manual de farmacología y terapéutica. 2ª ed. China: McGraw-Hill; **2015**; p. 391–393.
12. Marucci G., Moruzzi M., Amenta F. Chapter 31 - Donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. In Diagnosis and Management in Dementia. Martin C.R., Preedy V.R. Eds. Academic Press; **2020**; p. 495–510.
13. Sugimoto H. Structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: Donepezil hydrochloride for the treatment of Alzheimer's Disease. *Pure Appl. Chem.* **1999**; 71(11): 2031–2031.
14. Azzouz R., Peauger L., Gembus V., Tintas M.L., Sopkova-de-Oliveira-Santos J., *et al.* Novel donepezil-like *N*-benzylpyridinium salt derivatives as AChE inhibitors and their corresponding dihydropyridine "bio-oxidizable" prodrugs: synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**; 145: 165–190.
15. Akhoun B.A., Choudhary S., Tiwari H., Kumar A., Barik M.R., Rathor L., *et al.* Discovery of a new donepezil-like acetylcholinesterase inhibitor for targeting Alzheimer's disease: computational studies with biological validation. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**; 60(10): 4717–4729.
16. Zhang H., Song Q., Yu G., Cao Z., Qiang X., Liu X., Deng Y. Phthalimide-(*N*-alkylbenzylamine) cysteamide hybrids as multifunctional agents against Alzheimer's disease: Design, synthesis, and biological evaluation. *Chem. Biol. Drug Des.* **2021**; 98: 493–500.
17. Ruiz-Maciel O., Padilla-Martínez I.I., Sánchez-Labastida L.A., *et al.* Inhibitory activity on cholinesterases produced by aryl-phthalimide derivatives: green synthesis, *in silico* and *in vitro* evaluation. *Med. Chem. Res.* **2020**; 29: 1030–1040.
18. Ignasik M., Bajda M., Guzior N., Prinz M., Holzgrabe U. and Malawska B. Design, Synthesis and Evaluation of Novel 2-(Aminoalkyl)-isoindoline-1,3-dione Derivatives as Dual-Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2012**; 345: 509–516.
19. Andrade-Jorge E., Rivera-Sánchez F., Rodríguez J.E., Lagos-Cruz J.A., Reyes-Vallejo N., Gallardo-Ortíz I.A., *et al.* Isoindolone derivatives as novel potential anti-Alzheimer's candidates: synthesis, *in silico* and AChE inhibitory

- activity evaluation. *Med. Chem. Res.* **2022**; <https://doi.org/10.1007/s00044-022-02884-0>.
20. Sunil P., Singh U.V., Sharma R., Zhou J., Thapa P., *et al.* Influence of ligand geometry on cholinesterase enzyme - A comparison of 1-isoinidolinone based structural analog with Donepezil. *J. Mol. Struct.* **2022**; 1247: 131385.
21. Castillo-Hernandez J.C., Velazquez-Moyado J.A., Reyes-Ramirez A., Ramirez-Lopez E.G., Gonzalez-Andrade M., Navarrete A. Effect of *N*-Benzylpiperazine, Its Metabolite *N*-Benzylethylenediamine, and Its Disubstituted Analogue *N,N*-Dibenzylpiperazine on the Acquisition, Formation, and Consolidation of Memory in Mice. *Pharmacology.* **2017**; 99 (5-6): 268–274.
22. Omran Z., Cailly T., Lescot E., Sopkova-de-Oliveira-Santos J., Agondanou J.H., Lisowski V., *et al.* Synthesis and biological evaluation as AChE inhibitors of new indanones and thiaindanones related to donepezil. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**; 40(12): 1222–1245.
23. Huang W., Wang Y., Li J., *et al.* Design, synthesis, and evaluation of genipin derivatives for the treatment of Alzheimer's Disease. *Chem Biol Drug Des.* **2019**; 93: 110–122.
24. Zhu G., Li X., Yang J. *et al.* Development of novel 2-acetylphenol-O-alkylhydroxyethylamine derivatives as multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. *Med. Chem. Res.* **2021**; 30: 2016–2029.
25. Martínez A., Fernández E., Santiago-Conde A.C., Rodríguez-Franco I., Baños J.E., Badia A. *N*-Benzylpiperidine derivatives of 1,2,4-thiadiazolidinone as new acetylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**; 35(10): 913–922.
26. Schaller D., Šribar D., Noonan T., Deng T., Ngoc-Nguyen T., Pach S., *et al.* Next generation 3D pharmacophore modeling. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2020**; 10: 1468.
27. Brown C. y Davis H. Receiver Operating Characteristics Curves and Related Decision Measures: A Tutorial. *Chemometr. Intell. Lab.* **2006**; 80: 24-38.

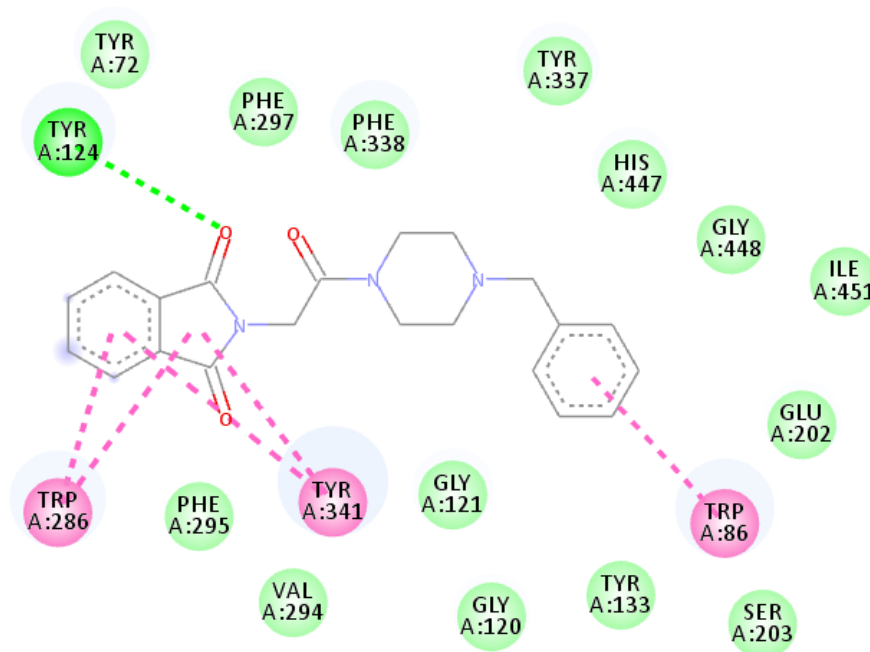
28. Prieto-Martínez F., y Medina-Franco J.L. Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* **2018**; 21(2): 124-134.
29. Saldívar-González F., Prieto-Martínez F., Medina-Franco J.L. Descubrimiento y Desarrollo de Fármacos: Un enfoque Computacional. *Educación Química.* **2017**; 28: 51-58.
30. Bello M., Martínez-Archundia M., y Correa-Basurto J. Automated docking for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**; 8: 821-834.
31. Leach A., y Gill V. An introduction to chemoinformatics. Holanda: Kluwer Academic Publisher; **2003**, p 104.
32. Wolber G. y Langer T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**; 45: 160–169.
33. Cheung J., Rudolph M. J., Burshteyn F., Cassidy M.S., Gary E.N., Love J., *et al.* Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**; 55(22): 10282–10286.
34. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E. and Hutchison G.R. “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform”. *J. Cheminformatics.* **2012**; 4:17.
35. Trott O., y Olson A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**; 31(2): 455–461.
36. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D. S. and Olson A.J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**; 16: 2785–91.
37. Lesnik S., Stular T., Brus B., Knez D., Gobec S., Janezic D., Konc J., LiSiCA: A Software for Ligand-Based Virtual Screening and Its Application for the Discovery of Butyrylcholinesterase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**; 55: 1521–1528.

38. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr. y Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**; 7: 88–95.
39. Zeng Q., Liu Z., Li B. and Wang F. Mild and effective *N*-phthaloylation of amino acids. *Amino Acids.* **2004**; 27: 183–186.
40. Bose A., Greer F. and Price C. A procedure for phthaloylation under mild conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**; 23: 1335–1338.
41. Smith M.B. March's Advanced Organic Chemistry. 7<sup>a</sup> ed. EUA: John Wiley and Son's; **2013**; p. 557, 902–906, 944–948, 1202, 1215, 1282–1284.
42. Bruckner R. Advanced Organic Chemistry: Reaction mechanism. EUA: Harcourt/Academic press; **2002**, p. 238–239, 430–432.
43. Calmès M., Escalé F., y Martínez J. Synthesis of *N*-Boc-(*R*)- $\alpha$ -phenyl- $\gamma$ -aminobutyric acid using an *in situ* diastereoselective protonation strategy. *Tetrahedron Asymmetry.* **2002**; 13(3): 293-296.
44. Calmes M., Daunis J., y Mai N. Asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids via diastereoselective addition of (*R*)-pantolactone to their ketenes. *Tetrahedron Asymmetry.* **1997**; 8(10):1641-1648.
45. Smith M.B. March's Advanced Organic Chemistry. 7<sup>a</sup> ed. EUA: John Wiley and Son's; **2013**; p. 1217.
46. Golec, Julian. Caspase inhibitors and uses thereof. Inglaterra; WO 01/42216 A2. 2001.
47. Reyes A., Huerta L., Alfaro M. y Navarrete A. Synthesis and nootropic activity of some 2,3-dihydro-1*H*-isoindolin-1-one derivatives structurally related with piracetam. *Chem. Biodivers.* **2010**; 7(11): 2718-2726.
48. Baltzly R., Buck J.S., Lorz E. and Schön W. The Preparation of *N*-Mono-substituted and Unsymmetrically Disubstituted Piperazines. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**; 66(2): 263–266.

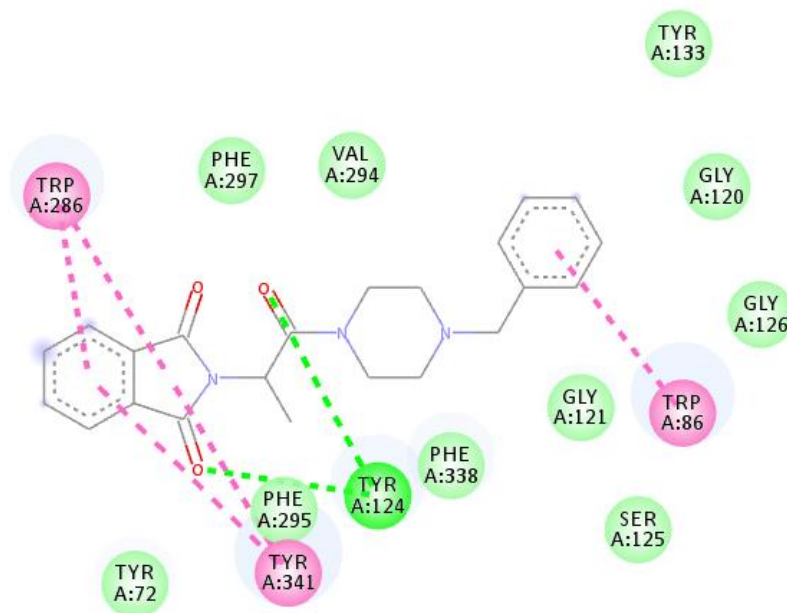
## 11. ANEXOS

## Anexo 1. Interacciones de los compuestos 2a-d y 3a-d con la AChE.

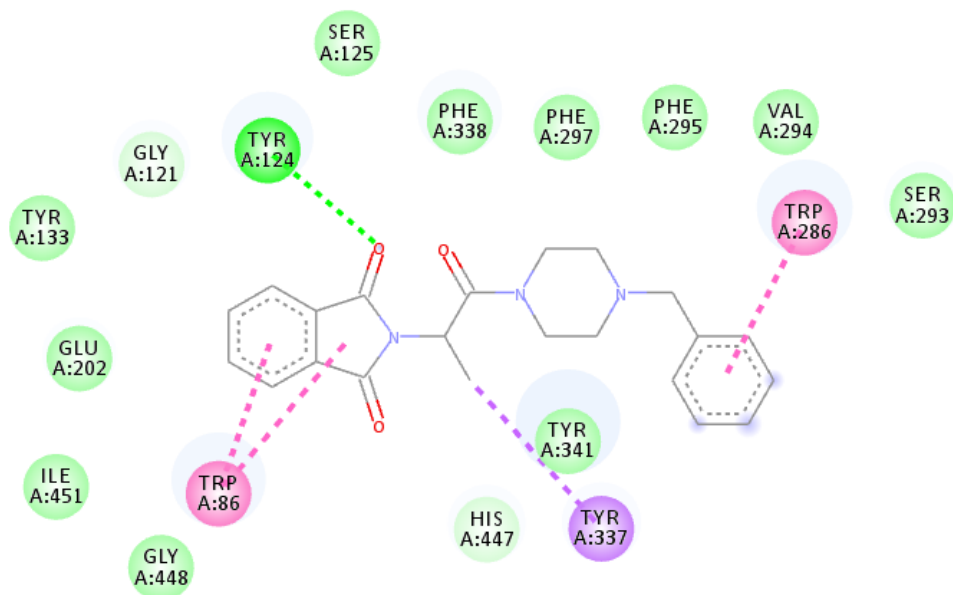
A continuación se muestran las interacciones obtenidas por acoplamiento molecular para la interacción de los compuestos **2a-d** y **3a-d** en su conformación de mínima energía con el sitio activo de la AChE mediante esquemas bidimensionales. En donde se observan los residuos con los que interacciona mediante interacciones hidrofóbicas (esferas verdes), interacciones  $\pi$ - $\pi$  (líneas punteadas rosas), interacciones  $\pi$ -catión (líneas punteadas naranjas) y puentes de hidrógeno (líneas punteadas verdes).



Interacciones del compuesto **2a** con el sitio activo de la AChE.

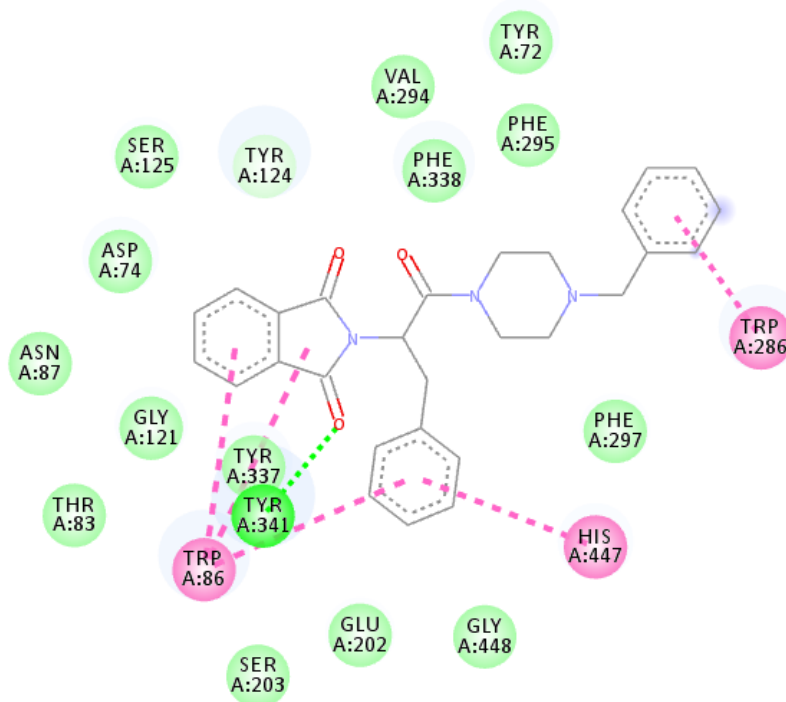


Interacciones del compuesto **2b** (enantiómero *S*) con el sitio activo de la AChE.

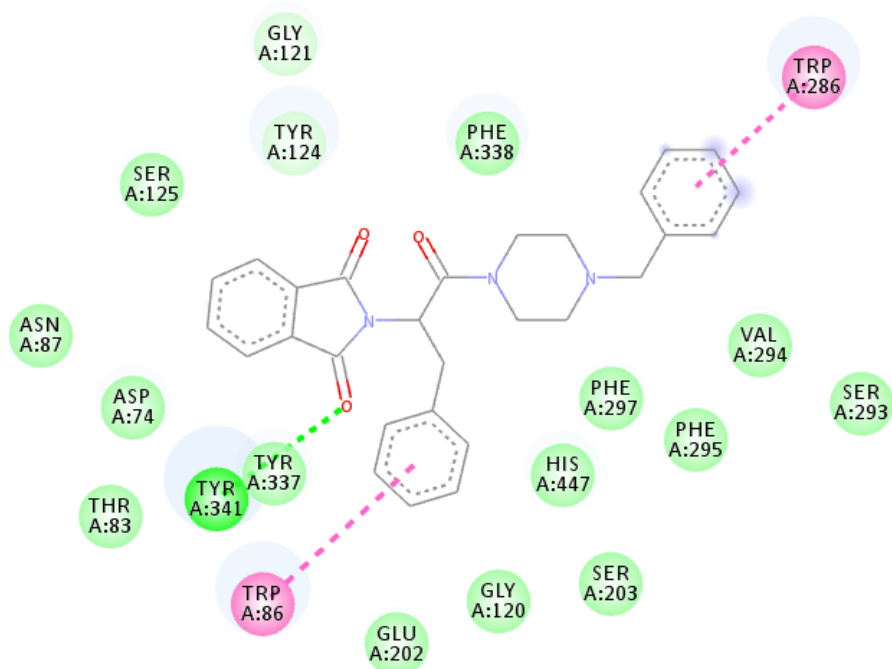


Interacciones del compuesto **2b** (enantiómero *R*) con el sitio activo de la AChE.

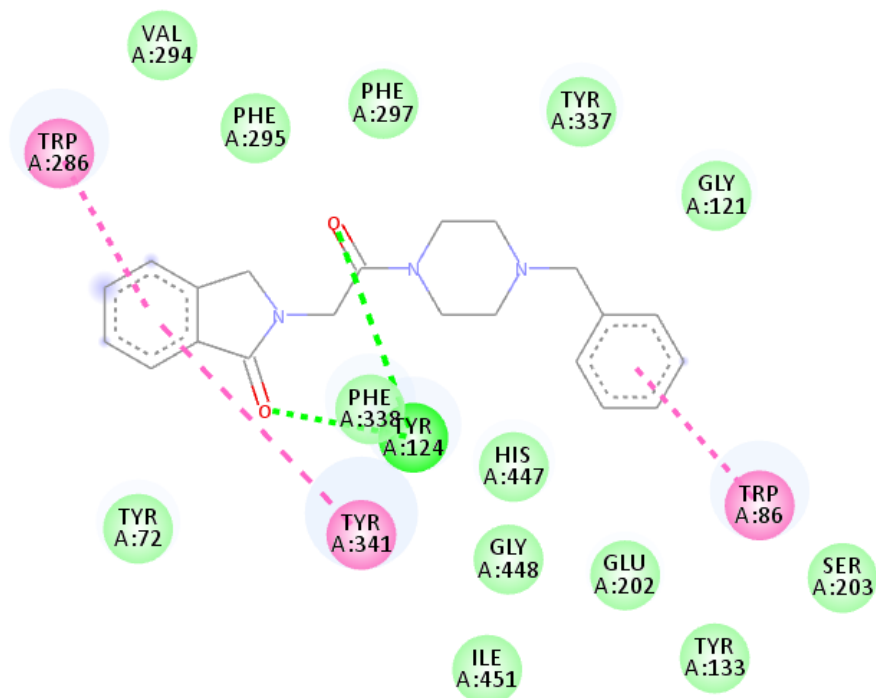




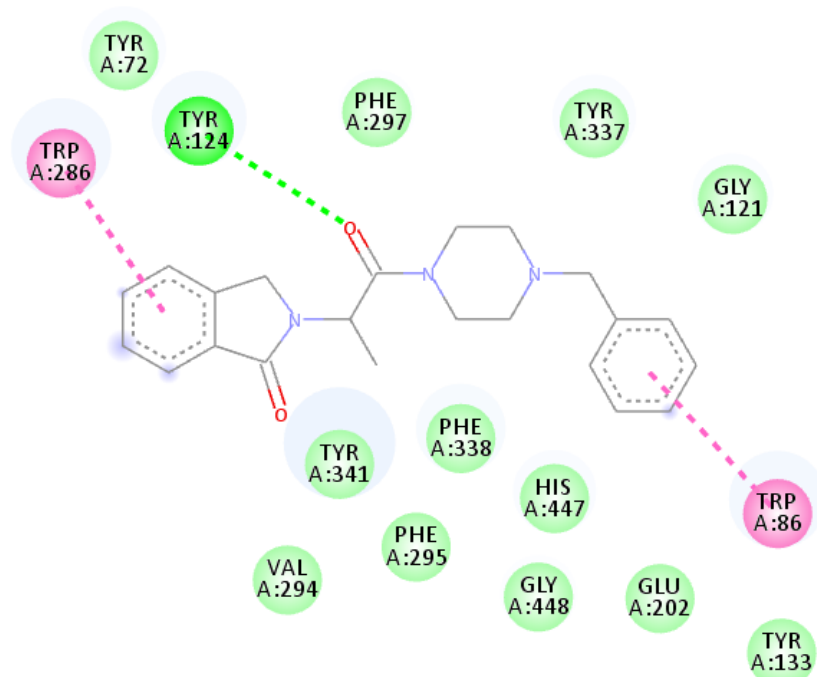
Interacciones del compuesto **2c** con el sitio activo de la AChE.



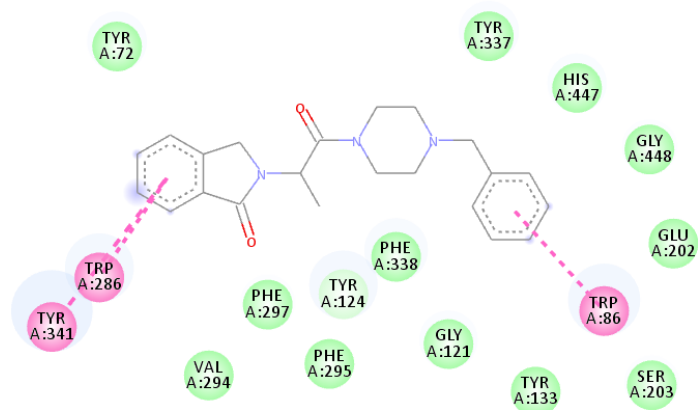
Interacciones del compuesto **2d** con el sitio activo de la AChE.



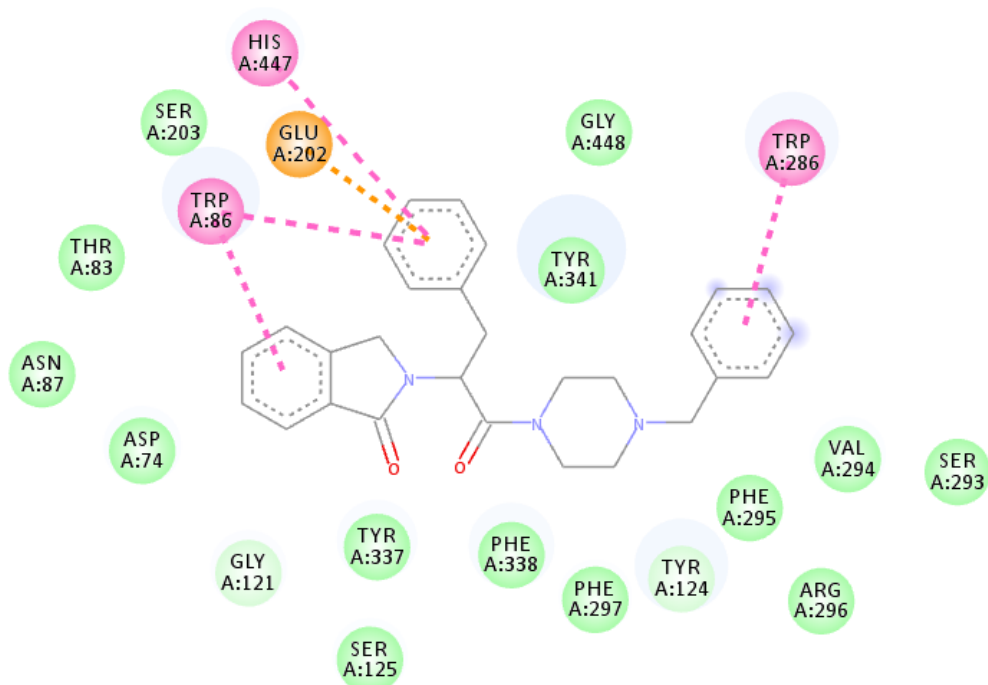
Interacciones del compuesto **3a** con el sitio activo de la AChE.



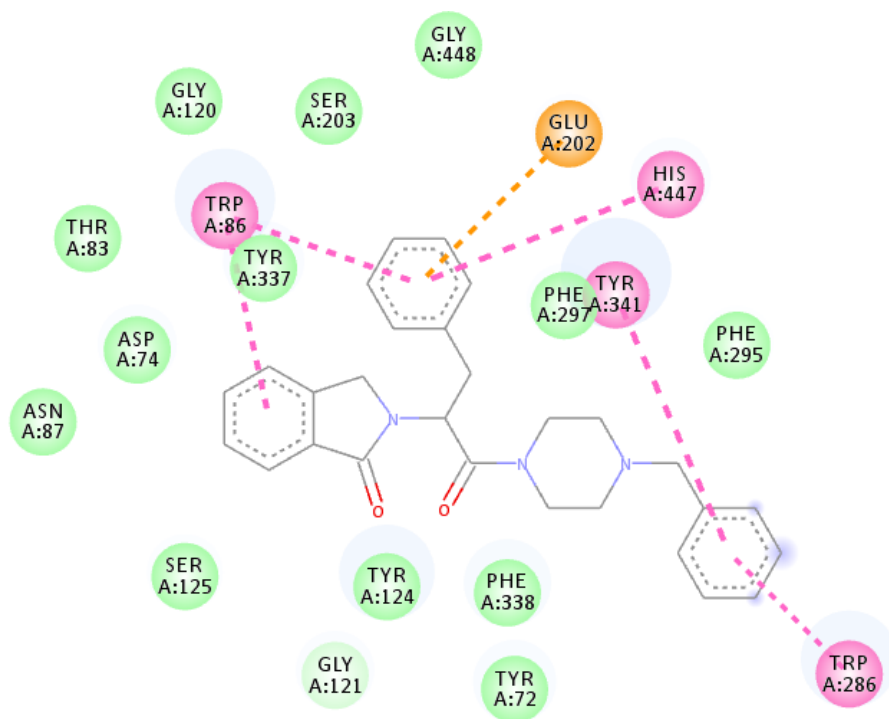
Interacciones del compuesto **3b** (enantiómero S) con el sitio activo de la AChE.



Interacciones del compuesto **3b** (enantiómero *R*) con el sitio activo de la AChE.



Interacciones del compuesto **3c** con el sitio activo de la AChE.



Interacciones del compuesto **3d** con el sitio activo de la AChE.

## Anexo 2. Metodología sintética

### Generalidades

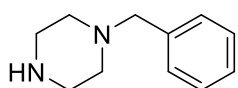
Los disolventes empleados para purificación y trabajos de reacción fueron destilados antes de usarse. Los reactivos empleados para las reacciones fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, los cuales no fueron sometidos a alguna purificación adicional antes de su uso.

El curso de las reacciones efectuadas en este trabajo fue seguido por CCF, utilizando placas comerciales de gel de sílice (60 F254) soportado en láminas de aluminio con indicador de fluorescencia de la marca Merck<sup>®</sup> y como revelador luz UV a 254 nm. Los compuestos se purificaron por cromatografía en columna empleando sílica gel comercial. La temperatura de fusión se determinó en un aparato Melt-Temp Electrothermal y no están corregidos.

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y de RMN <sup>13</sup>C se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III 400 MHz utilizando como disolventes deuterados como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en ppm, para indicar la multiplicidad de las señales en RMN <sup>1</sup>H, se utilizan las abreviaturas: (s) simple, (d) doble, (dd) doble de dobles, (br) señal ancha, (t) triple y (m) múltiple. Las constantes de acoplamiento (*J*) se reportaron en Hz. Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos en un espectrómetro Jeol JMS-AX505HA mediante la técnica ESI+.

Los cromatogramas fueron obtenidos en un equipo de HPLC Waters 2695 con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996 a 30 °C, empleando una columna Chiralpak AD-H, con un flujo de 1 mL/min utilizando hexano e isopropanol como fase móvil, previamente filtrados y desgasificados.

### Síntesis de 1-bencilpiperazina

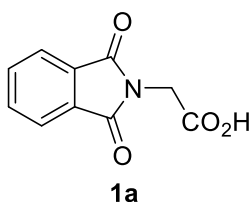


En un matraz de 1 L provisto de agitación magnética se colocaron 19.3 g (224 mmol) de piperazina y se agregaron 150 mL de THF, posteriormente se calentó a temperatura de reflujo y una vez disuelta en su totalidad la piperazina, se agregaron gota a gota 5.2 mL (37 mmol) de cloruro de bencilo. La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo durante tres horas. Posteriormente el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida con ayuda de un rotavapor, el sólido obtenido se suspendió en 100 mL de hexano, se filtró a vacío y se lavó con 100 mL de hexano. El filtrado se destiló a presión reducida hasta eliminar el disolvente y el residuo obtenido se purificó por destilación a presión reducida, colectando la fracción principal correspondiente a la BZP a 128-131 °C a 2 mmHg (Lit. 127-130 °C).<sup>48</sup> Se obtuvieron 5.71 g (88 %) de un líquido incoloro.

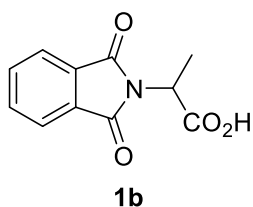
### Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 1a-d

En un matraz de fondo redondo de 250 mL provisto de agitación magnética se colocaron 5.0 g del aminoácido correspondiente y 1 equivalente de anhídrido ftálico. El matraz con la mezcla de reacción se colocó en un baño de aceite a 130 °C hasta que ambos sólidos formaron una disolución y posteriormente se formó un sólido. Una vez sucedido esto, el matraz se retiró del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente, el sólido formado se recristalizó con EtOH/H<sub>2</sub>O (2:1).

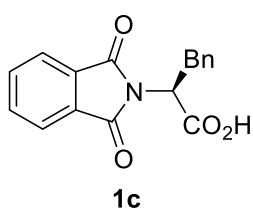
### Ácido 2-(1,3-dioxisoindol-2-il)acético, [1a]



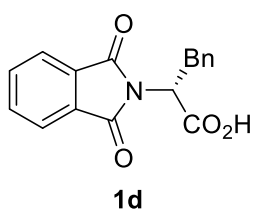
Sólido blanco; 10 g (74 %); p.f. = 191-193 °C;  $R_f$  = 0.61 (hex/acetona, 6:4); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) = 4.42 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.82-7.87 (m, 2H, ArH), 7.89-7.94 (m, 2H, ArH); RMN <sup>13</sup>C (100.6 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) = 38.1 (CH<sub>2</sub>), 122.9 (2xArH), 131.9 (2xC<sub>ipso</sub>), 134.21 (2xArH), 167.62 (2xNC=O), 169.42 (CO<sub>2</sub>H); EMAR (ESI<sup>+</sup>) calculado para C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub> + H<sup>+</sup>: 206.04593, encontrado: 206.04533.

**Ácido (rac)-2-(1,3-dioxoisoindol-2-il)propanoico, [1b]**

Sólido blanco; 10.79 g (88 %); p.f. = 158-160 °C;  $R_f$  = 0.61 (hex/acetona, 6:4); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.68 (d,  $J$  = 7.37 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.98 (q,  $J$  = 7.37 Hz, 1H, CH), 7.81-7.91 (m, 4H, ArH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100.6 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 13.9 ( $\text{CH}_3$ ), 122.8 (2xArCH), 131.8 (2x $\text{C}_{ipso}$ ), 134.1 (2xArCH), 167.5 (2xNC=O), 171.7 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ); EMAR (ESI $^+$ ) calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_4 + \text{H}^+$ : 220.06174, encontrado: 206.06098.

**Ácido (S)-2-(1,3-dioxoisoindol-2-il)-3-fenilpropanoico, [1c]**

Sólido blanco; 7.69 g (87 %); p.f. = 181-183 °C;  $R_f$  = 0.65 (hex/acetona, 6:4); 100% e.e. HPLC (hex/IPA 9:1): tr = 16.84 min; RMN  $^1\text{H}$  (301 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.41-3.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.15 (dd,  $J$  = 11.3, 5.6 Hz, 1H, CH), 7.04-7.16 (m, 5H, ArH), 7.71-7.78 (m, 4H, ArH); RMN  $^{13}\text{C}$  (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 34.2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 53.2 (CH), 122.9 (2xArCH), 126.5 (ArCH bencilo), 128.2 (2xArCH bencilo), 128.6 (2xArCH bencilo), 131.4 (2x $\text{C}_{ipso}$ ), 134.3 (2xArCH), 137.3 ( $\text{C}_{ipso}$  bencilo), 167.6 (2xNC=O), 170.8 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ); EMAR (ESI $^+$ ) calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4 + \text{H}^+$ : 296.09226, encontrado: 296.09228.

**Ácido (R)-2-(1,3-dioxoisoindol-2-il)-3-fenilpropanoico, [1d]**

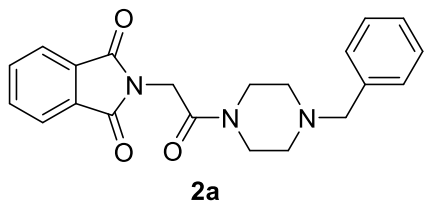
Sólido blanco; 7.78 g (88 %); p.f. = 180-182 °C;  $R_f$  = 0.65 (hex/acetona, 6:4); 97% e.e. HPLC (hex/IPA 9:1): tr = 17.36 y 26.67 min.

**Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 2a-d**

En un matraz de 100 mL provisto de agitación magnética se colocaron 300 mg (1.46 mmol) del compuesto **1a-b**, 1.1 equivalentes de DCC y la cantidad correspondiente de DMAP de acuerdo a la Tabla 5, posteriormente se agregaron 5 mL de DCM seguidos de 1.1 equivalentes de 1-bencilpiperazina. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo de reacción

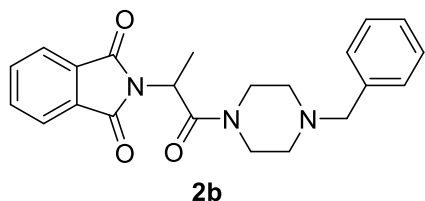
establecido en la Tabla 5, se filtró al vacío el sólido suspendido y el producto se purificó por cromatografía en columna empleando Hexano/Acetona (6:4).

### 2-(2-(4-bencilpiperazin-1-il)-2-oxoetil)isoindolin-1,3-diona, [2a]



Sólido blanco; 265.7 mg (50%); p.f. = 152-154 °C; (IPA/hex 2:1);  $R_f$  = 0.46 (hex/acetona, 6:4); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.47 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 2.55 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 3.54-3.57 (m, 4H; 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ; 2H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 3.64 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 4.50 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 7.27-7.38 (m, 5H, ArH), 7.71-7.76 (m 2H, ArH), 7.86-7.91 (m, 2H, ArH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 39.0 ( $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ ), 42.3 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 44.7 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 52.5 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 52.7 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 62.8 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 123.5 (2xArCH), 127.3 (ArCH, bencilo), 128.3 (2xArCH, bencilo), 129.1 (2xArCH, bencilo), 132.2 (2x $\text{C}_{ipso}$ ), 134.0 (2xArCH), 137.5 ( $\text{C}_{ipso}$ , bencilo), 163.8 ( $\text{NC}=\text{O}$ ), 168.0 (2x $\text{NC}=\text{O}$ ); EMAR (ESI $^+$ ) calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{H}^+$ : 364.16676, encontrado: 364.16612.

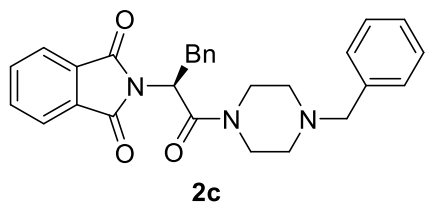
### (RS)-2-(1-(4-bencilpiperazin-1-il)-1-oxopropan-2-il)isoindolin-1,3-diona, [2b]



Sólido blanco; 273.79 mg (53 %); p.f. = 161-163 °C;  $R_f$  = 0.53 (hex/acetona, 6:4); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.71 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.38 (br, 4H, 2  $\text{CH}_2$ , piperazina), 3.35-3.45 (m, 2H, piperazina), 3.49 (d,  $J$  = 2.49 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.59 (br, 1H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 3.72 (br, 1H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 5.13 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 1H, CH), 7.24-7.33 (m, 5H, ArH), 7.72-7.77 (m, 2H, ArH), 7.84-7.89 (m, 2H, ArH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 15.6 ( $\text{CH}_3$ ), 42.5 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 45.4 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 46.8 (CH), 52.7 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 52.9 ( $\text{CH}_2\text{N}$  piperazina), 62.7 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 123.4 (2xArCH), 127.2 (ArCH, bencilo), 128.3 (2xArCH, bencilo), 129.0 (2xArCH, bencilo), 131.7 (2x $\text{C}_{ipso}$ ), 134.1 (2xArCH), 137.5 ( $\text{C}_{ipso}$ , bencilo), 167.5 ( $\text{NC}=\text{O}$ ), 167.7 (2x $\text{NC}=\text{O}$ ); EMAR (ESI $^+$ ) calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{H}^+$ : 378.18095, encontrado: 378.18177.

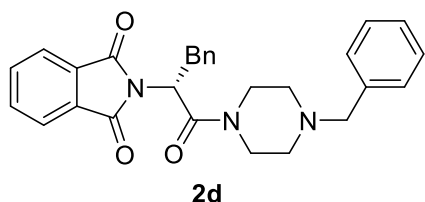


**(S)-2-(1-(4-bencilpiperazin-1-il)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)isoindolin-1,3-diona,**  
**[2c]**



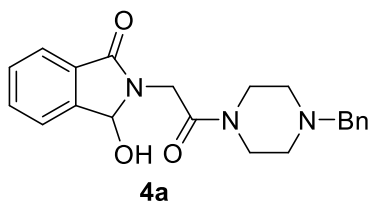
Sólido blanco; 239.60 mg (52 %); p.f. = 117-119 °C (DCM/hex, 1:6);  $R_f$  = 0.56 (hex/acetona, 6:4); 100 % e.e. HPLC (hex/IPA 8:2): tr = 25.83 min; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.31 (br, 2H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 2.43 (br, 2H,  $\text{CH}_2$  piperazina), 3.38-3.50 (m, 5H), 3.58-3.70 (m, 3H), 5.30 (dd,  $J$  = 5.8, 10.0 Hz, 1H, CH), 7.15-7.21 (m, 5H, ArH), 7.26-7.33 (m, 5H, ArH), 7.69-7.63 (m, 2H, ArH), 7.77-7.82 (m, 2H, ArH); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 35.0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 42.5 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 45.5 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 52.5 (CH), 52.7 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 52.8 ( $\text{CH}_2$  piperazina), 62.7 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 123.4 (2xArCH), 126.8 (ArCH, bencilo), 127.2 (ArCH, bencilo), 128.3 (2xArCH, bencilo), 128.5 (2xArCH, bencilo), 129.0 (2xArCH, bencilo), 129.1 (2xArCH, bencilo), 131.4 (2x $\text{C}_{ipso}$ ), 134.1 (2xArCH), 137.0 ( $\text{C}_{ipso}$ , bencilo), 137.5 ( $\text{C}_{ipso}$ , bencilo), 166.7 ( $\text{NC=O}$ ), 167.7 (2x $\text{NC=O}$ ); EMAR (ESI $^+$ ) calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{H}^+$ : 454.21203, encontrado: 454.21307.

**(R)-2-(1-(4-bencilpiperazin-1-il)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)isoindolin-1,3-diona,**  
**[2d]**



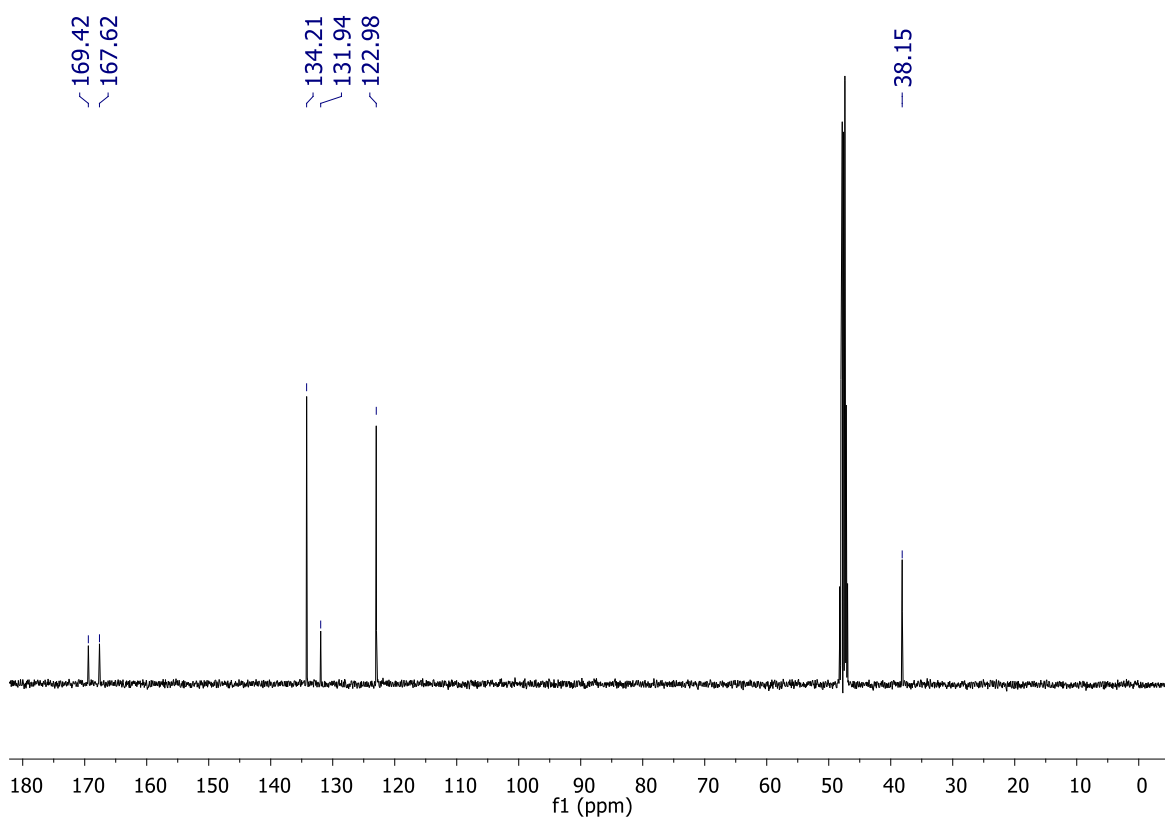
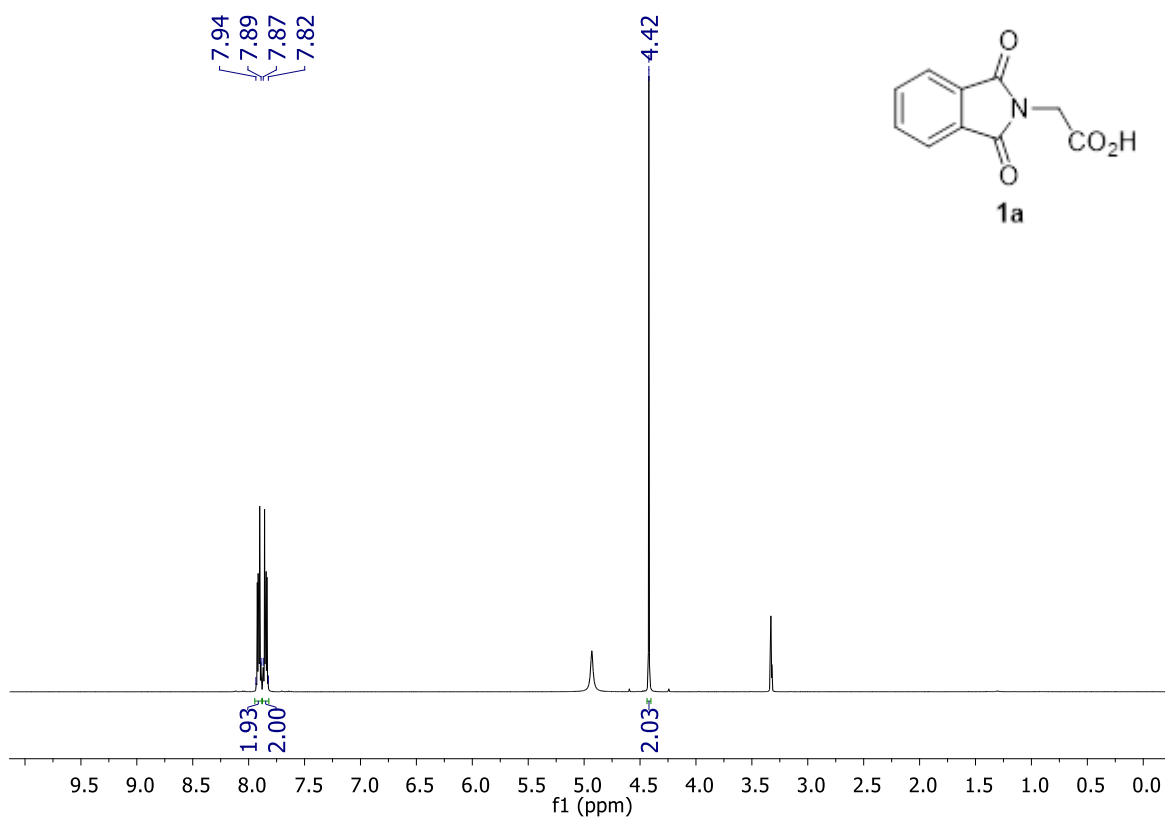
Sólido blanco; 253.42 mg (55 %); p.f. = 118-119 °C (DCM/hex, 1:6);  $R_f$  = 0.56 (hex/acetona, 6:4); 100 % e.e. HPLC (hex/IPA 8:2): tr = 49.77 min.

**Síntesis de 2-(2-(4-bencilpiperazin-1-il)-2-oxoetil)-3-hidroxiisoindolin-1-ona, [4a]**

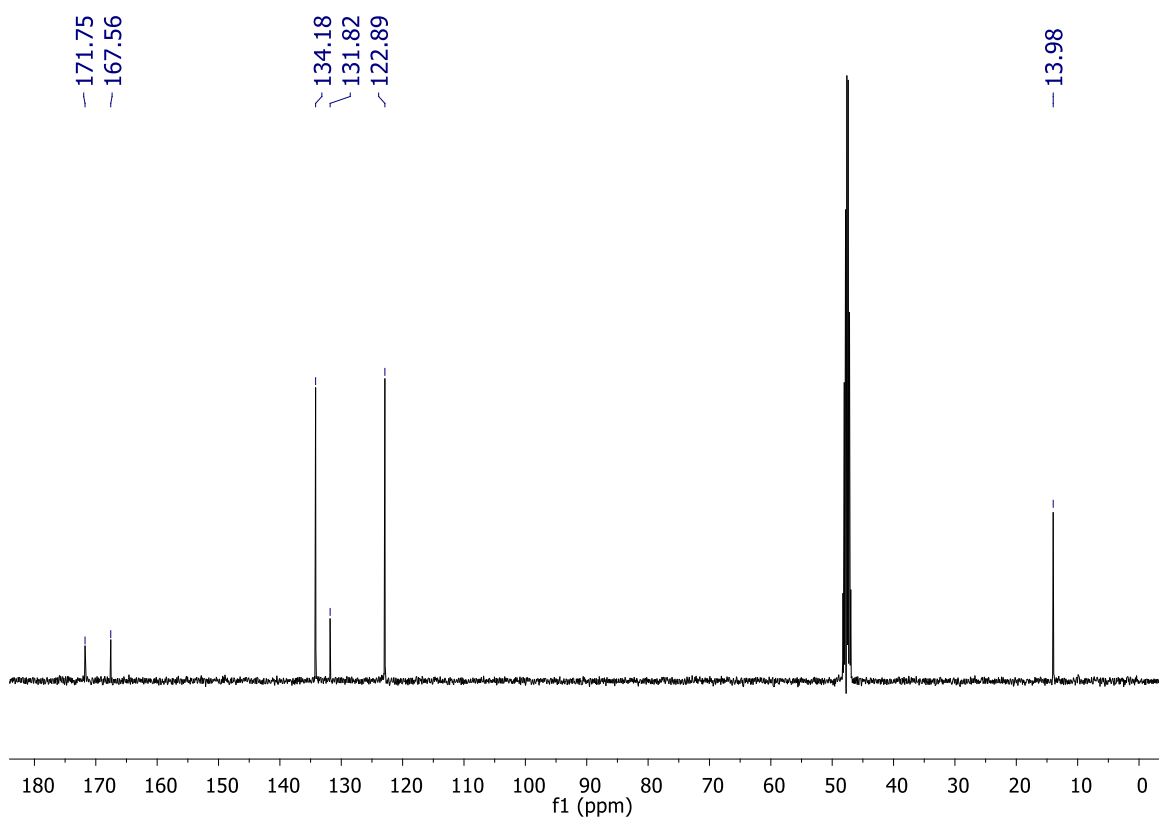
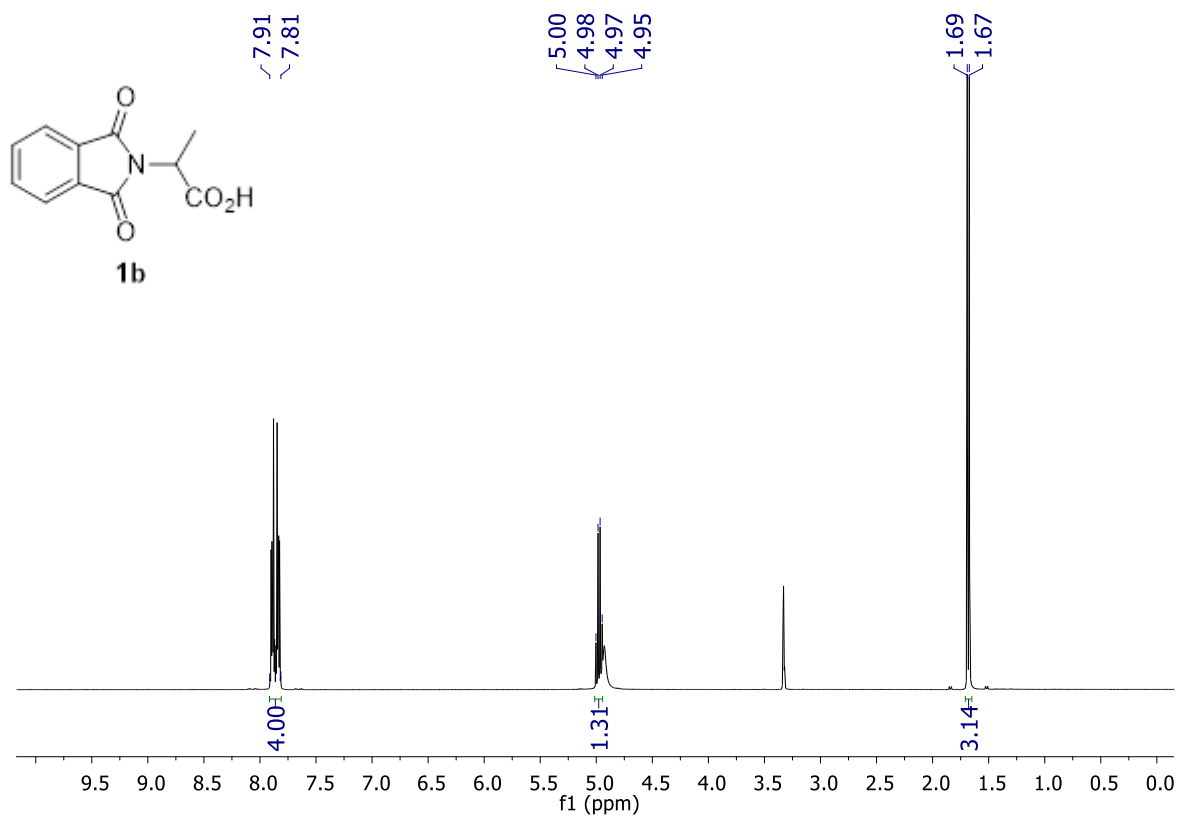


En un matraz de 100 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 200 mg del compuesto **2a** en 5 mL de THF y 1 mL de MeOH, el matraz se colocó en un baño de hielo y posteriormente se agregaron 3 equivalentes de NaBH<sub>4</sub>. Después de una hora, el producto correspondiente se aisló por cromatografía en columna utilizando hex/acetona (6:4). Se obtuvieron 105.6 mg (48 %) de un sólido blanco; p.f. = 125-127 °C; *R<sub>f</sub>* = 0.37 (Hexano/Acetona, 1:1); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2.45-2.51 (d br, 4H, bencilpiperazina), 3.54-3.60 (d br, 6H, bencilpiperazina), 4.12 (d, J = 16.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.53 (d, J = 16.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.75 (br, 1H, OH), 5.89 (s, 1H, CHOH), 7.26-7.39 (m, 5H, ArH), 7.45-7.50 (m, 1H, ArH), 7.54-7.62 (m, 2H, ArH), 7.75-7.77 (m, 1H, ArH); RMN <sup>13</sup>C (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 41.8 (CH<sub>2</sub>C=O), 42.2 (CH<sub>2</sub> piperazina), 45.1 (CH<sub>2</sub> piperazina), 52.4 (CH<sub>2</sub> piperazina), 52.7 (CH<sub>2</sub> piperazina), 62.7 (CH<sub>2</sub>Ph), 83.1 (CHOH), 123.50 (2xArCH), 123.56 (ArCH, bencilo), 128.5 (2xArCH, bencilo), 129.3 (ArCH, bencilo), 129.64 (ArCH, bencilo), 130.95 (2xC<sub>ipso</sub>), 132.6 (2xArCH), 144.9 (C<sub>ipso</sub>, bencilo), 167.2 (NC=O), 168.0 (NC=O).

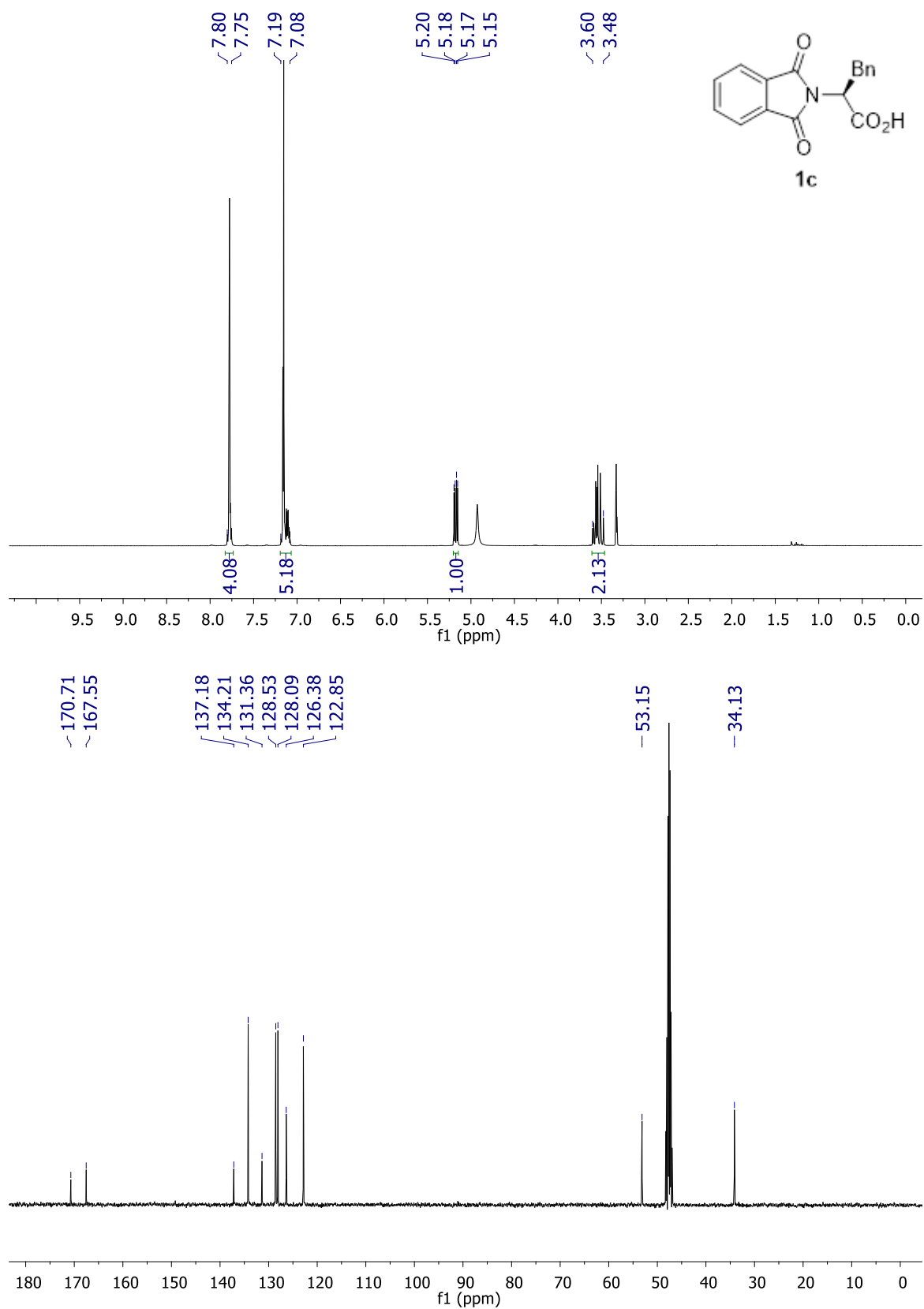
**Anexo 3. Espectros de RMN y EMAR de los compuestos 1a-c, 2a-c y 4a.**

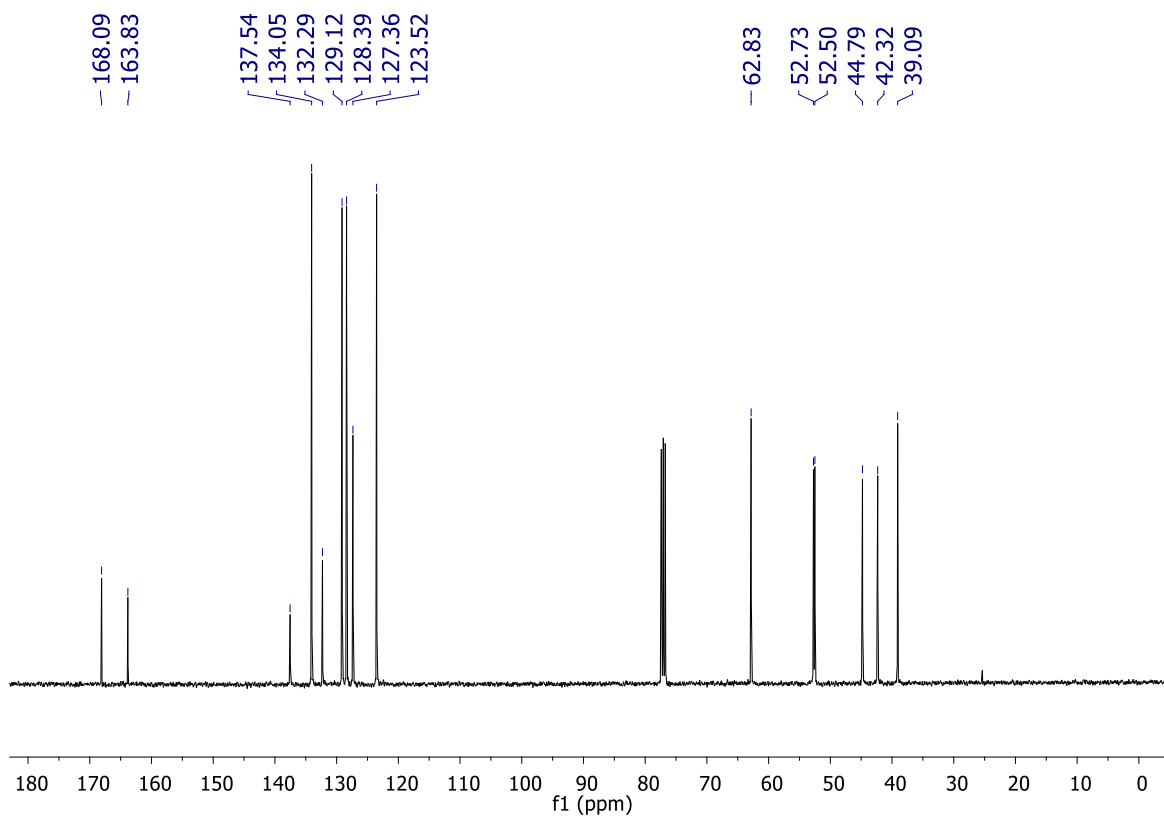
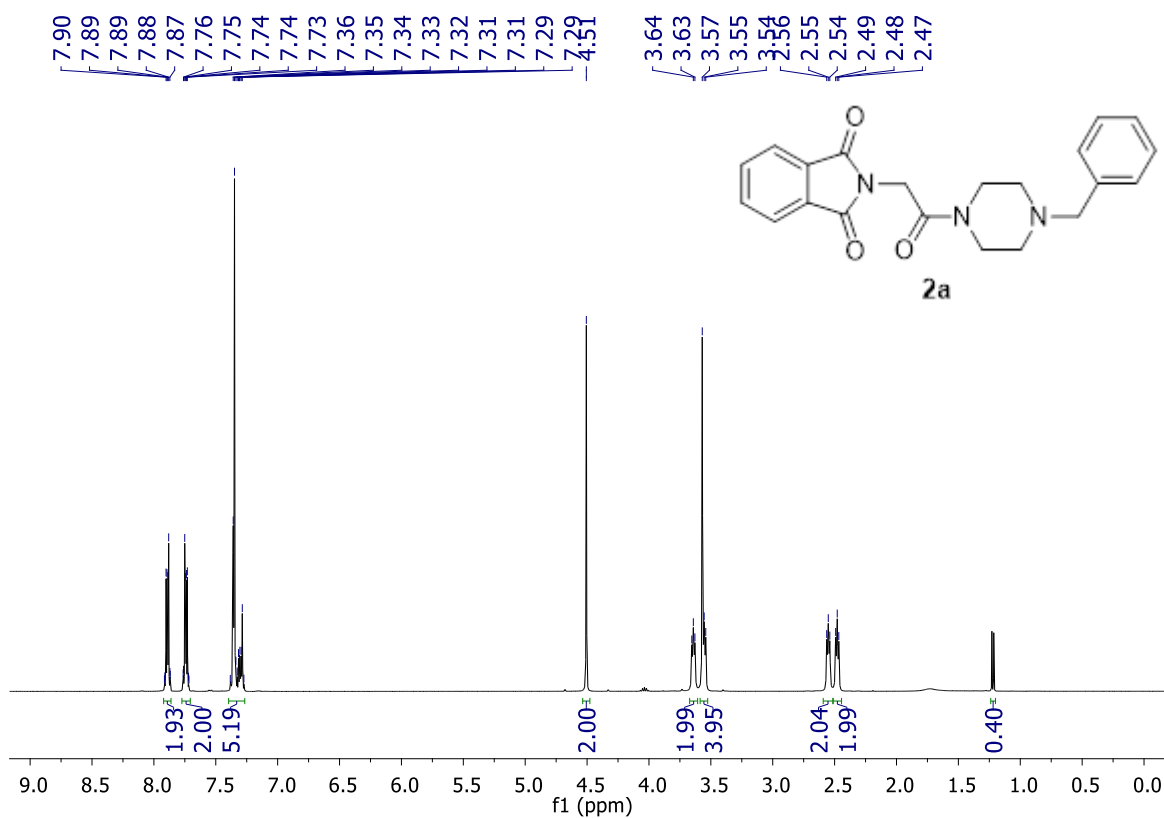


Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **1a** (400 y 100.6 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

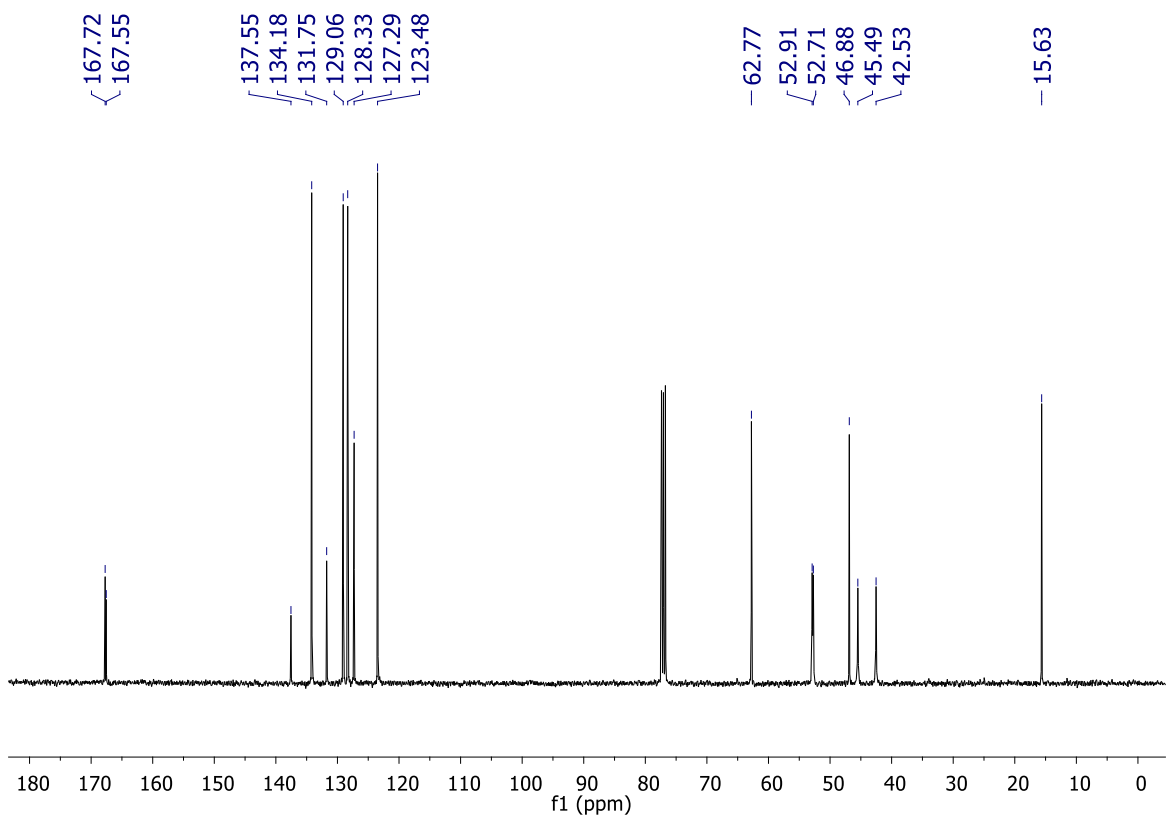
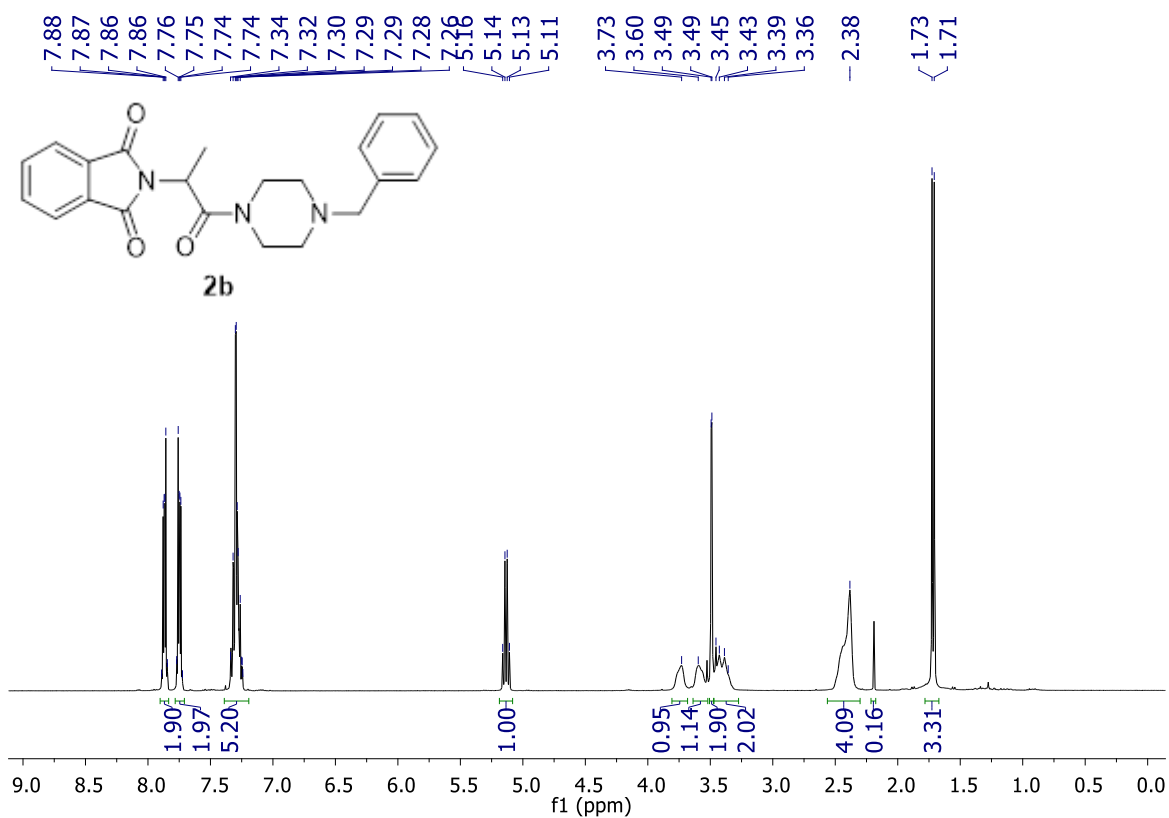


Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **1b** (400 y 100.6 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para el compuesto **1c** (300 y 76 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

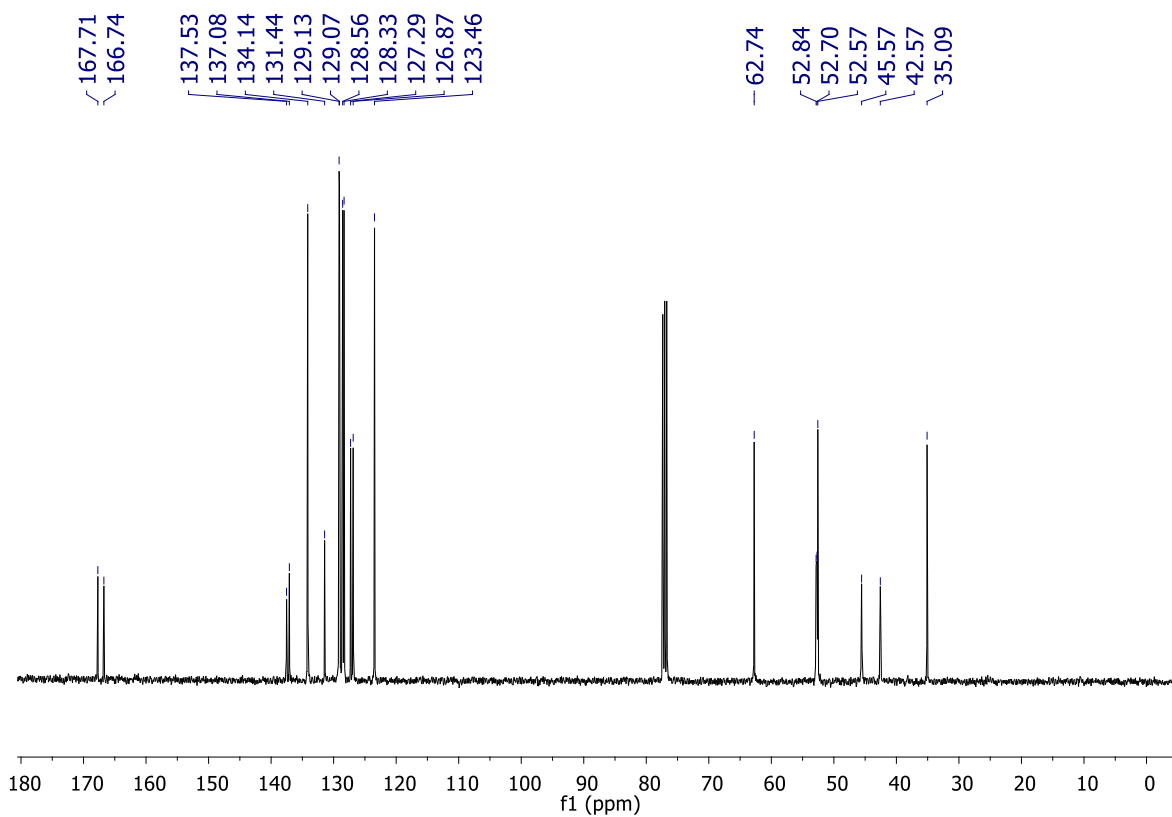
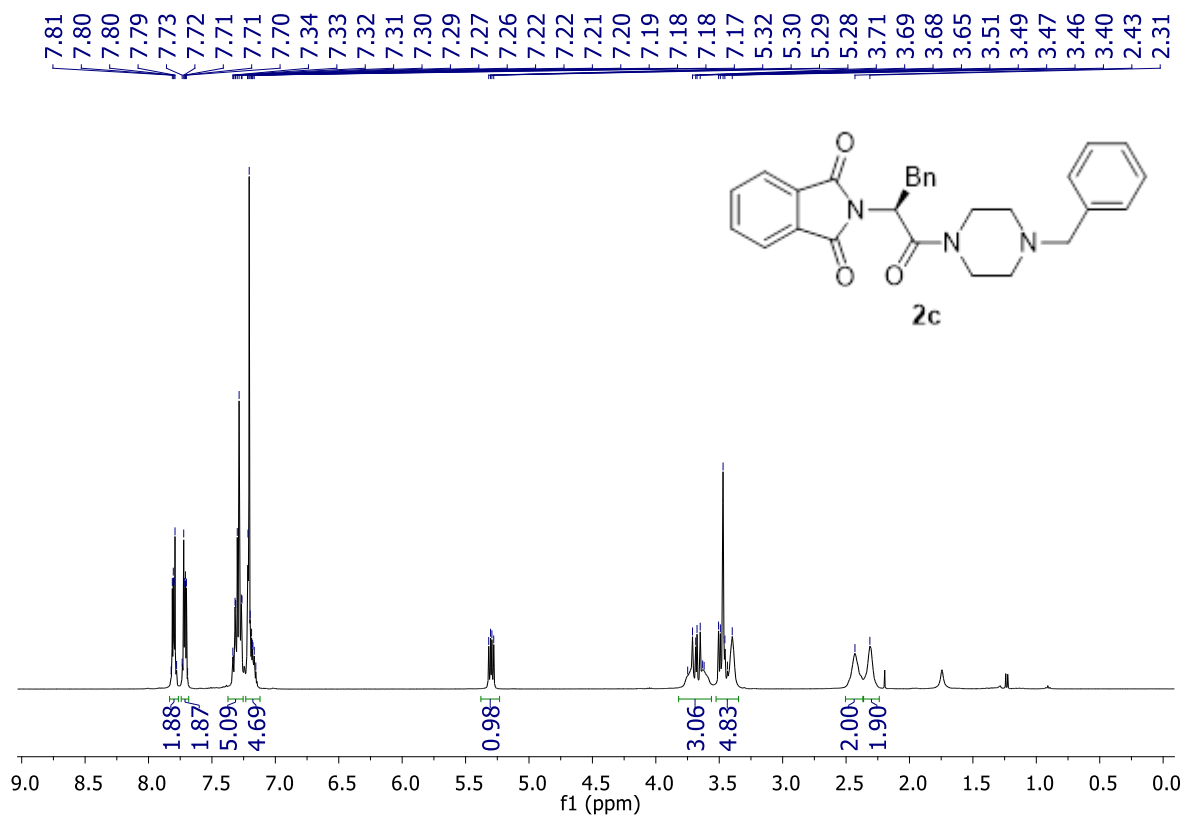


Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **2a** (400 y 100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

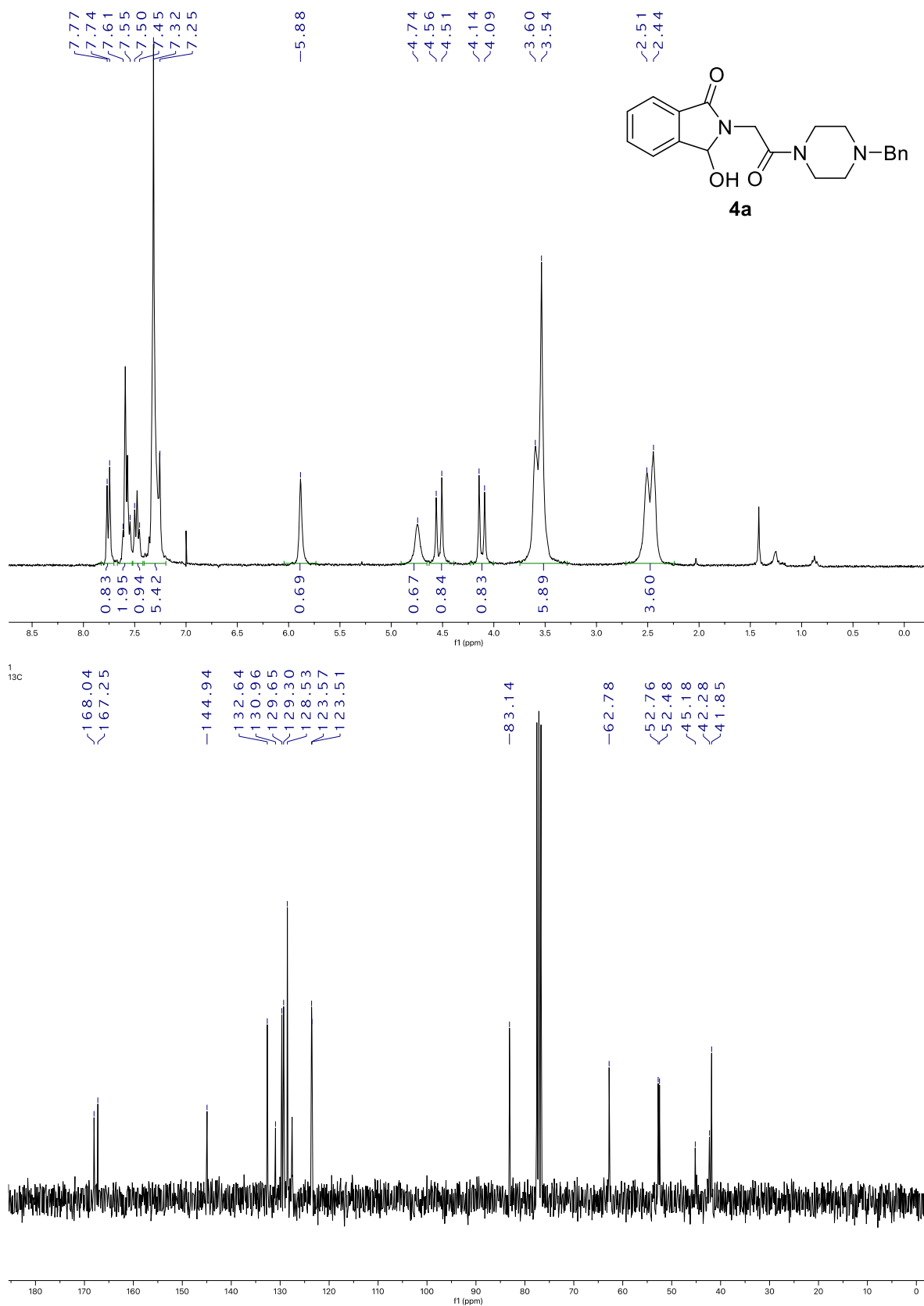


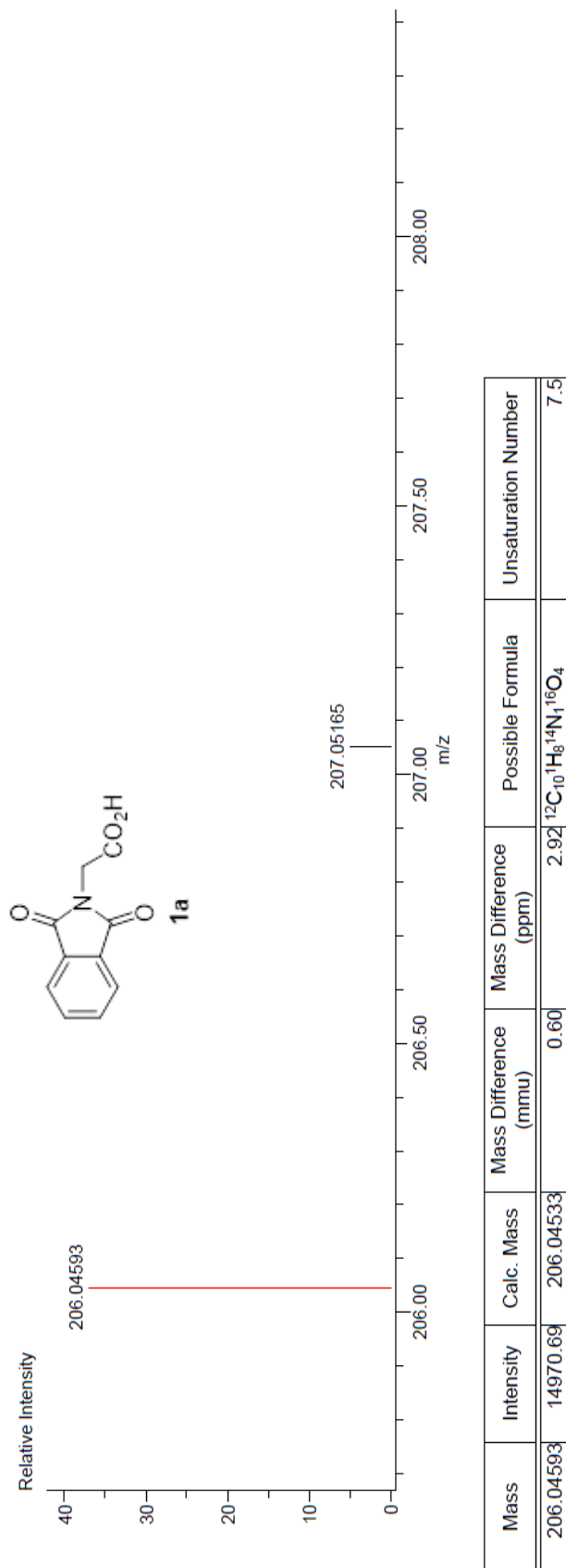
Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **2b** (400 y 100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

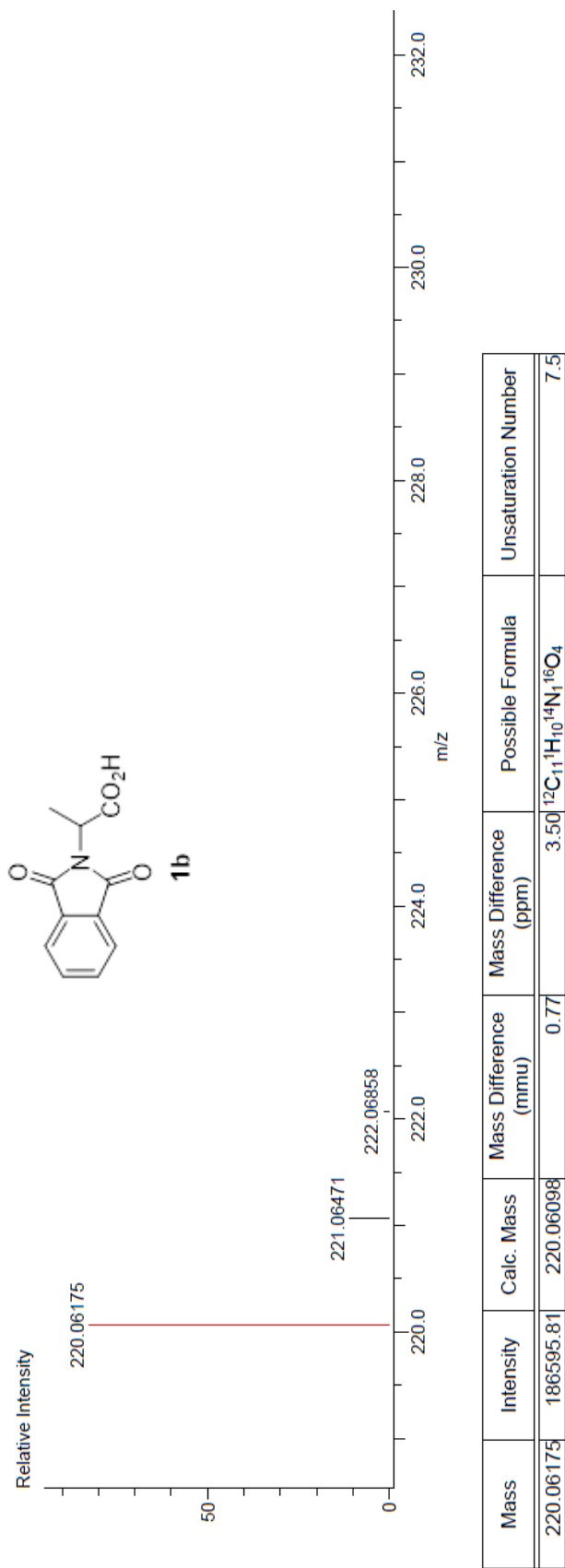


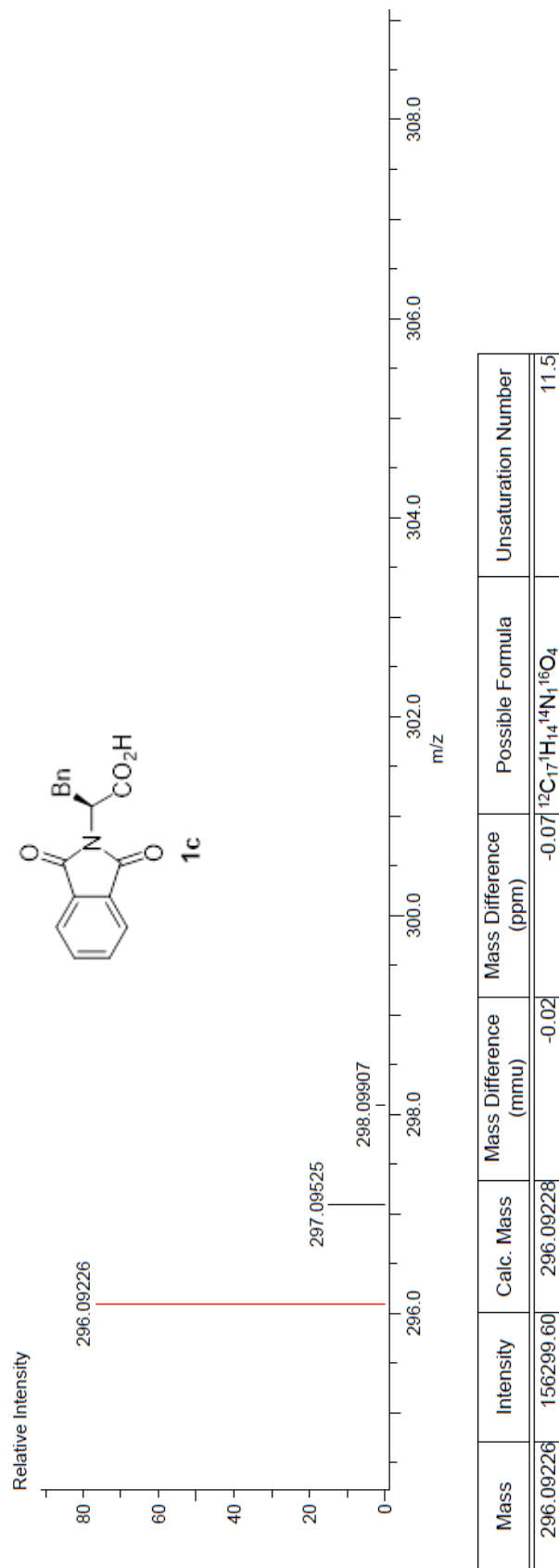


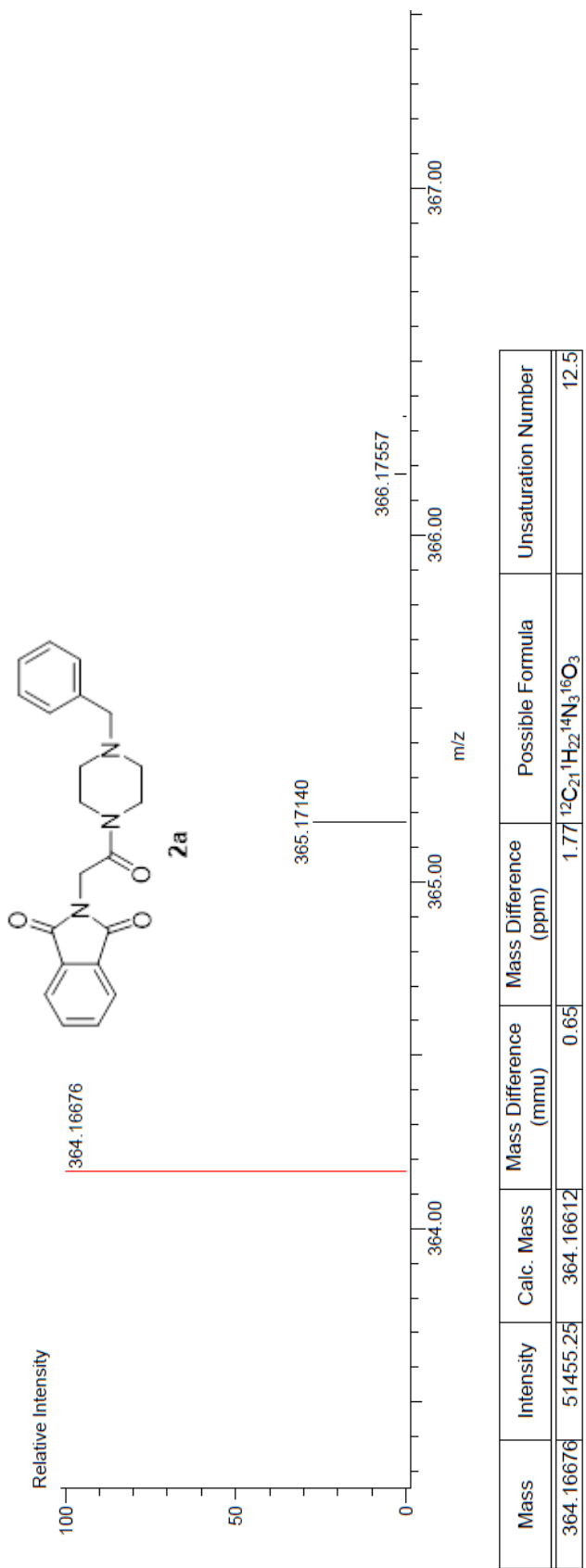
Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **2c** (400 y 100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

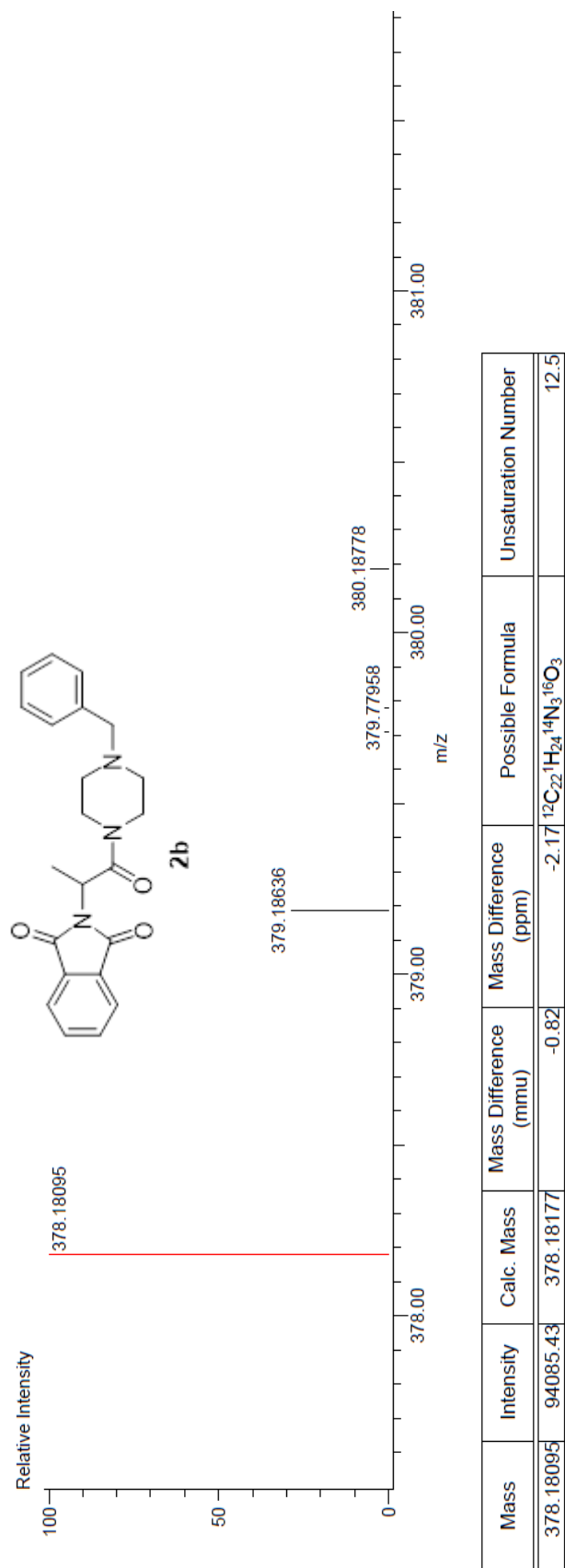
Espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para el compuesto **4a** (300 y 76 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

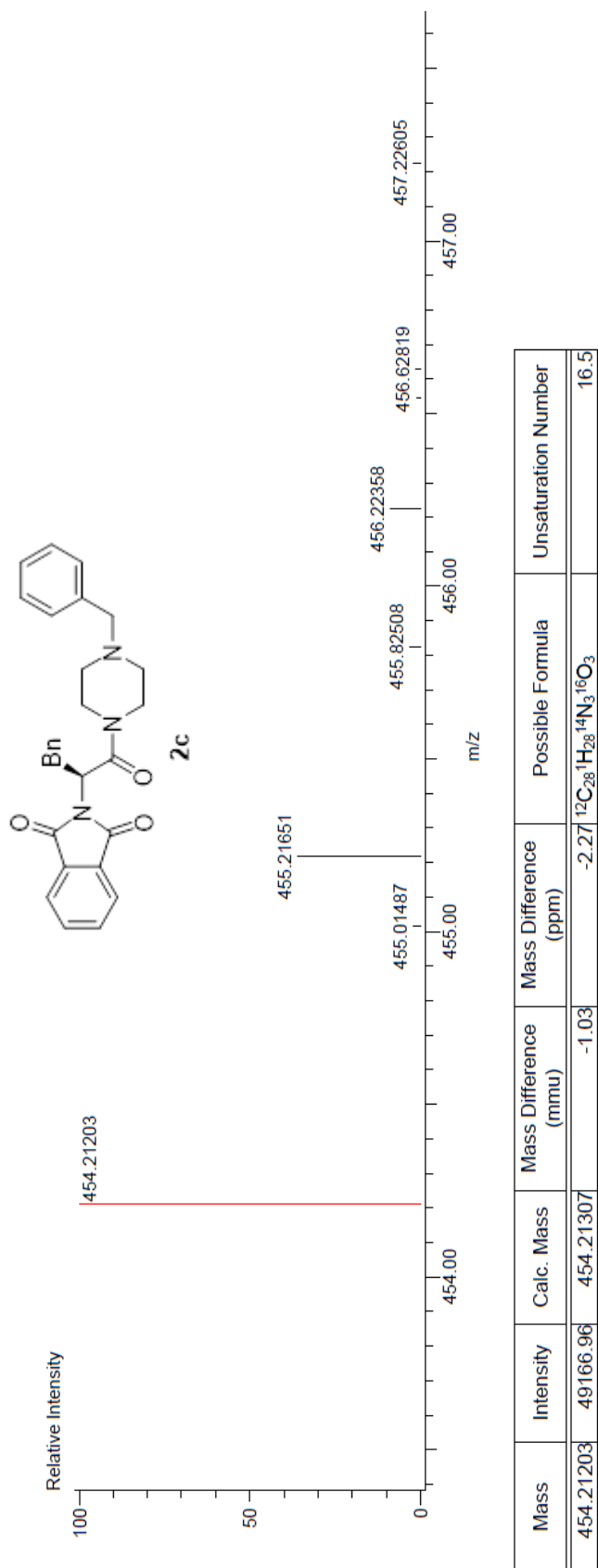
Espectro de EMAR para el compuesto **1a**.

Espectro de EMAR para el compuesto **1b**.

Espectro de EMAR para el compuesto **1c**.

Espectro de EMAR para el compuesto **2a**.

Espectro de EMAR para el compuesto **2b**.

Espectro de EMAR para el compuesto **2c**.