



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

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

**Diseño y análisis *in silico* de derivados de 1,2,4-oxadiazol como
potenciales agentes terapéuticos del receptor GABA_B**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. Sindy Anahí Pérez Aniceto.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Mario Fernández Zertuche.

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández.

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2022




El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), bajo la dirección del Dr. Mario Fernández Zertuche y en el Laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos del Centro de Investigaciones en Dinámica Celular (CIDC), bajo la co-dirección del Dr. Rodrigo Said Razo Hernández del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico mediante la beca de posgrado otorgada No.745589.

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Diseño y análisis *in silico* de derivados de 1,2,4-oxadiazol como potenciales agentes terapéuticos del receptor GABA_B**, que presenta la alumna **Sindy Anahí Pérez Aniceto (10033418)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Irma Linzaga Elizalde CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Susana Thelma López Cortina Facultad de Ciencias Químicas-UANL	APROBADO	
Dr. Ivan Omar Romero Estudillo CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-01-26 10:10:28 | Firmante

iUMmfCvosybmYLVELpNKUqQ/VFz5x03umy1/q5aNICCsaMhWB+n7zUgpdpbz7+Oa0T81JSado1uVbMhrG48k98SGwnqaGzrCC14YmJr9ruvAPp+WTrASc5zdGQR1Y72quN e5Jm19sfxRS3huH/OZL6UBEqyQ4qQRpSCwBwcFr8vHben8bDwdxKlL1ovip+9o+eW1/eXwgbDWTOMHslhGNul7uzAryGrW8aowbAy0eN7zTobjYSIJKOX/IN3mTzUIC7BhPA ZCJAo8sBjwCfkkbPx1hGaywpydmOTLqHMKWuHUTUb8UAhQdkbNBwEshkz0IbEHvTqXQg==

IRMA LINZAGA ELIZALDE | Fecha:2022-01-26 10:17:11 | Firmante

mRJCMGBqsw0xgTk/TNQP1phxg6STAmzszRajDCuV/s3TCUYTDICnbQtszSEBfU5SKJqBctyYUFgVJcZq9hEJ.OI7aKTJHdmsslcuB57EwAhrbxnk2syVCimJLnYvok3351m45c 4ITJT18z3Jk81pd3RMDMNc0Mg4dcAQGPpUppzlxuAjoFxCQ58sqTT6k+nCIF11oDRfuHeKPI87s2GjZ214BsBygv854EjfnNWlz69VKpvYGkVhL4pFIOsRrxynT1Cu5v9sv+Ma+45 KRLH3TIWTEusGb6+PBppRTy09UJe+juUG5OBdS2r7RNuTNvweiP9Ao4Te6Gz7eK7+Rg==

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2022-01-26 10:20:01 | Firmante

b+c0gDimR0rymp88FioUM6wbsWoo7ycHARMW/xAOcWLTULkwn5aoEUFc3WhLW+/KTy+Vz7p1SiKui0wr1993ZIU1HnsDf6uoUHuggQ+GggKhty9tz2seYjnMZodsCKj11/9kbJ X/3fChKvrmSWxiOndi20y25w7dMTMFLQimmlagKilsI/RwC2PCHLuMxwhdrfaa46PA8hk3oYNC4ql/5+Wifa4/+NNPcSmj1lw4mtPcD0ew7gCX9qF/9G3W6cMjHC+hX54pBMXMT wKKTb2Nu4NnCMQRWesmbF+ECE/A9sxGsVY5cmdH0SGbXwnB2SVmsHC79nkCP4TwVXnw==

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2022-01-26 13:17:17 | Firmante

cqJ0jN1/VZUZ90Kgk7soIDCvJX7UbByr38mdju2ofglefaScmG8IWLXPChabomWJTghAq0nWxJzBUfjQ5ByHpeqw2o0ITpl050CetDcLiouTsAbKP+686H1sIKZXCAr7/LO6xKAN VswSOk3/2jxrRkFXpsTzZ+iY6mxEd5POZFEJLKIPN2Q3DegNnt1lou83TgnnT6K4e8WBWsxXeus88YcssbXkh9BhZ9m3rt+9QWPCUSRaWWUkKjnOt4kwBvJGjtp2Gcv3Hz6U z4aBKjPlz8H2IVveAvDXPgu+KW3C96wqfSTgzlPKmDLTg3h0+cb4GWxXpvh+ZmuA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



oNMQY40FP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DfHO1oSXZAWEvAZekRFipNO3vp7jvwU0>

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Sindy Anahí Pérez Aniceto, Mario Fernández Zertuche, Rodrigo Said Razo Hernández.
“Diseño *in silico* de análogos de Baclofen con estructura 1,2,4-Oxadiazol”. XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, Abril 2021.

Sindy Anahí Pérez Aniceto, Mario Fernández Zertuche, Rodrigo Said Razo Hernández.
“Diseño *in silico* de análogos de Baclofen con estructura 1,2,4-Oxadiazol”. LatinXChem, Septiembre 2021.

AGRADECIMIENTOS

A mi papá Felipe, mi mamá Esperanza y mis hermanas por el gran apoyo recibido para la conclusión de este proyecto.

Al Dr. Mario Fernández, por la oportunidad y la confianza recibida para formar parte de su grupo de investigación y el gran apoyo proporcionado para la conclusión de este proyecto. Así como al Dr. Rodrigo Razo, quien nos brindó su apoyo y conocimientos sobre para el desarrollo de la parte computacional.

A mi comité tutorial: Dra. Yolanda Ríos, Dr. Ivan Romero y Dr. Rodrigo Razo, por los consejos y recomendaciones recibidas durante estos años.

A mi Jurado revisor: Dra. Susana López, Dra. Yolanda Ríos, Dra. Irma Linzaga, Dr. Ivan Romero y Dr. Rodrigo Razo, por su tiempo dedicado para la revisión de este trabajo y contribuir a su mejora.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro de investigaciones Químicas (CIQ) y del Laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos del Centro de Investigaciones en Dinámica Celular (CIDC).

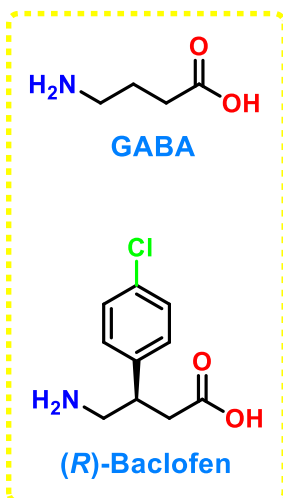
ABREVIATURAS

Å	Angstrom
ΔG_L	Energía libre de Gibbs
μM	Micro molar
β	Beta
BBB	Barreras hematoencefálicas lipofílicas
Ca^{2+}	ion calcio
CACA	Ácido <i>cis</i> -4-aminocrotónico
Cl^-	Ion Cloruro
cLogP	Logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el <i>n</i> -octanol calculado
Cys	Cisteína
D-AMPH	Señal discriminativa inducida por D-anfetamina
DBU	1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno
DIFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
EC ₅₀	Concentración efectiva media
ee	Exceso enantiómero
ERGE	Enfermedades por reflujo gastroesofágico
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-AT	GABA aminotransferasa
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GBH	Ácido γ -hidroxibutírico
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HBA	Aceptores de Hidrógenos
HBD	Donadores de Hidrógenos
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
Ile	Isoleucina
K^+	Ion potasio
$K_2CO_3^*$	Carbonato de potasio
K_d	constante de unión
$LiAlH_4^*$	Hidruro de litio y aluminio
L-PA	Ácido L-pipecólico
Met	Metionina
mg	miligramos
mL	mililitros
MMFF	Merck Molecular Force Field
N	Nitrógeno
$NaBH_4^*$	Boro Hidruro de sodio

NaClO₂*	Clorito de sodio
Na₂HPO₃*5H₂O*	Fosfito de sodio dibásico pentahidratado
NH₃*	Amoniaco
nM	nanomolar
PASS	Prediction of Activity Spectra for Substances
PDB	Protein Data Bank
pH	potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
PLP	piridoxal-5'-fosfato
PLIP	Protein-ligand interaction profiler
PM	Peso molecular
PMP	Piridoxamina 5'-fosfato
PSA	Área de superficie polar
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
SAR	Relación estructura-actividad
Ser	Serina
SNC	Sistema nervioso central
SSA	Semialdehído succínico
SSDH	Semialdehído succínico deshidrogenasa
<i>t</i>-BuOH	<i>Tert</i> -butanol
TMG	1,1,3,3-tetrametilguanidina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Uma	Unidad de masa atómica
Val	Valina

*Formulas Químicas

RESUMEN

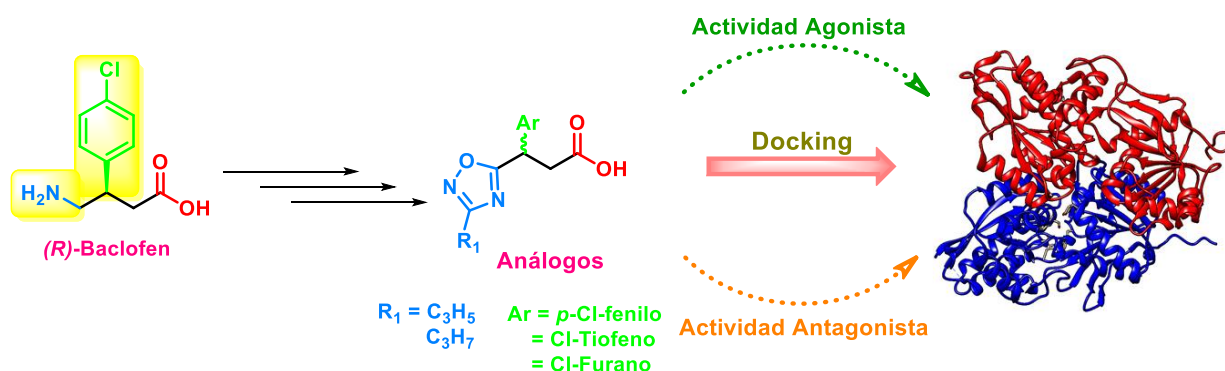


El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor de naturaleza inhibitoria del sistema nervioso central (SNC), siendo su función principal regular la excitación-inhibición de las neuronas, ejerciendo su función fisiológica mediante las interacciones con dos clases de receptores: ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) y metabotrópicos (GABA_B).

(R)-Baclofen, análogo de GABA (β -*p*-clorofenil sustituido), es el único ligando agonista dirigido a los receptores GABA_B aprobado por la FDA para el tratamiento de la espasticidad muscular en pacientes con esclerosis múltiple y lesiones en la médula espinal.

Debido a esto, en estudios farmacológicos, han relacionado a los receptores GABA_B con una amplia gama de trastornos del SNC como la ansiedad, cognición, dolor, depresión, epilepsia, reflujo gastroesofágico, trastorno del espectro autista, accidente cerebrovascular, adicción a las drogas, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, se ha demostrado en estudios preclínicos que los antagonistas de GABA_B presentan propiedades neuroprotectoras, anticonvulsivas y de mejora de la cognición, siendo la característica antidepressiva la mejor descrita. En este sentido, existe un esfuerzo creciente para diseñar nuevos agentes terapéuticos que interactúen selectivamente con los receptores GABA_B, permitiendo una mejor comprensión de la neurotransmisión GABAérgica, lo cual es de gran importancia para mejorar nuestro conocimiento sobre la excitabilidad neuronal y potenciar el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas y trastornos psiquiátricos.

De esta manera, (R)-Baclofen es considerado el compuesto prototipo para el diseño de compuestos con actividad farmacológica en el receptor GABA_B.



Esquema 1. Diseño *in silico* de análogos de (R)-Baclofen con sistemas 1,2,4-oxadiazoles.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Sistema Nervioso Central	1
1.2	Ácido γ -aminobutírico.....	2
1.3	Biosíntesis y degradación.....	3
1.4	Receptores de GABA.....	4
1.4.1	Receptores Ionotrópicos.....	5
1.4.2	Receptores Metabotrópicos.....	6
1.5	(R)-Baclofen.....	7
1.5.1	Síntesis de Baclofen.....	8
1.5.2	Síntesis enantioselectiva.....	9
1.5.3	Resolución Química.....	10
1.5.4	Resolución Enzimática.....	11
2	ANTECEDENTES	13
2.1	Agonistas del Receptor GABA _B reportados en la literatura.....	13
2.2	Antagonistas del receptor GABA _B reportados en la literatura.....	15
2.3	Antagonistas co-cristalizados del receptor GABA _B	18
2.4	Análogos de GABA y Baclofen sintetizados en el grupo de investigación.....	23
3	DISEÑO IN SILICO DE ANÁLOGOS DE BACLOFEN	26
3.1	Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).....	26
3.2	Acoplamiento molecular (Docking molecular)	27
3.3	Estudio <i>in silico</i> de la farmacocinética	30
3.3.1	Reglas de Lipinski	30
3.3.2	Reglas de Veber.....	30
3.3.2	Relación de la penetración de la estructura BBB.....	31
4	JUSTIFICACIÓN	33
5	OBJETIVOS	34
5.1	Objetivo General.....	34
5.2	Objetivos Específicos.....	34
6	Diseño de los análogos de (R)-Baclofen en base al ligando	35
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1	Análisis de los descriptores	36
7.2	Análisis de la diana terapéutica.....	39
7.2.1	Superficies Hidrofóbicas.....	44
7.2.2	Superficies de Enlace de Hidrógeno.....	45

7.2.3	Superficies Electrostáticas.....	46
7.2.4	Superficies Aromáticas.....	48
7.3	Validación del Docking molecular.....	49
7.4	Docking Molecular	51
7.4.1	Preparación de las moléculas 103a-i	51
7.5	Modos Normales	64
8	CONCLUSIONES.....	75
9	PERSPECTIVAS	76
10	REFERENCIAS	77
11	Anexos.....	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equilibrio en los niveles de concentración de GABA y glutamato.	1
Figura 2. Biosíntesis y degradación de GABA. ³	3
Figura 3. Representación esquemática de los receptores GABA _A , GABA _B y GABA _C . a) Receptores Ionotrópicos. b) Receptores Metabotrópicos. ⁸	4
Figura 4. Estructuras de los receptores GABA _A y GABA _C . ⁹	5
Figura 5. Representación esquemática del receptor GABA _B . ¹²	7
Figura 6. Estructura del antagonista 2-hidroxisaclofeno e Interacciones con el receptor GABA _B	19
Figura 7. Estructura 3D e interacciones del antagonista CGP 54626 con el receptor GABA _B	20
Figura 8. Estructura de CGP 35348 e Interacciones con el receptor GABA _B	21
Figura 9. Estructura 3D del antagonista SCH 50911 e Interacciones con el receptor GABA _B	21
Figura 10. Estructura 3D e interacciones de Faclofen unido al receptor GABA _B	22
Figura 11. Estructura 3D e interacciones de CGP 46381 unido al receptor GABA _B	23
Figura 12. Descripción general del DIFAC.	26
Figura 13. Proceso del acoplamiento molecular. A) Estructura tridimensional del ligando. B) Estructura tridimensional del receptor. C) El ligando se acopla en la cavidad de unión del receptor y se exploran las supuestas conformaciones. D) Se identifican la conformación de unión más probable y las interacciones intermoleculares correspondientes.	27
Figura 14. Esquemización del modelo receptor-ligando.	28
Figura 15. Metodología del diseño in silico.	36
Figura 16. A) Estructura crio-em del receptor GABA _B humano unido a Baclofen/BHFF en estado activo. B) Estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA _B humano unido al agonista Baclofen. C) Estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA _B humano unido al antagonista SCH50911.	40
Figura 17. Cavidades generadas de los cristales 4MS3, 4MS4 y 7C7Q.	41
Figura 18. Cavidades generadas de los cristales 4MR9, 4MRM y 4MR8 y sus respectivos esquemas 2D.	42
Figura 19. Superficies hidrofóbicas de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.	45
Figura 20. Superficies de tipo enlace de hidrogeno de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.	46
Figura 21. Superficies electrostáticas de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR9.	47
Figura 22. Superficies aromáticas de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.	49
Figura 23. Comparación estructural de los ligandos activos (color amarillo) y los de mínima energía (color cian).	50
Figura 24. Conformaciones de menor energía de los compuestos 103a-i , Baclofen e interacciones.	56

Figura 25. Representación de las conformaciones de menor energía (poses) de los compuestos 103a-i y de comparativa la estructura del antagonista SCH 50911 activo, además de las interacciones.	62
Figura 26. Modos normales: A) Modo normal y conformaciones del cristal 4MS4. B) Modo normal y conformaciones del cristal 7C7Q. C) Modo normal y conformaciones del cristal 4MR9.	65
Figura 27. Movimientos de los tres modos normales empleados del cristal 7C7Q.....	66
Figura 28. Movimientos de los tres modos normales empleados del cristal 4MR9.....	67
Figura 29. A) pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.	69
Figura 30. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.	70
Figura 31. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.	71
Figura 32. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.	72
Figura 33. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.	73
Figura 34. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.	74
Figura 35. Comparativa de Baclofen con los compuestos 103a-i y sus interacciones correspondientes.	85

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Análogos de GABA empleados para diversos trastornos del SCN.....	2
Esquema 2. Estrategias reportadas por Keberle y colaboradores para la obtención de Baclofen racémico.....	9
Esquema 3. Ruta de síntesis alternativa patentada por Ashutosh Jagtap y colaboradores..	9
Esquema 4. Síntesis One-pot asimétrica de (<i>R</i>)-Baclofen.....	10
Esquema 5. Síntesis (<i>R</i>)-Baclofen mediante resolución química.....	11
Esquema 6. Estructuras de (<i>R</i>)- <i>N</i> -fenilpantolactama y (<i>S</i>)-naproxeno.....	11
Esquema 7. Síntesis mediante resolución enzimática de (<i>R</i>)-Baclofen.....	12
Esquema 8. Agonistas del receptor GABA _B	13
Esquema 9. Análogos de (<i>R</i>)-Baclofen con modificaciones en la posición orto del anillo aromático.....	14
Esquema 10. Antagonistas de baja afinidad.....	15
Esquema 11. Antagonistas de alta afinidad.....	16
Esquema 12. Antagonista del receptor GABA _B marcado con ¹²⁵ I de alta afinidad.....	17
Esquema 13. Primera generación de análogos de GABA y Baclofen.....	23
Esquema 14. Segunda generación de análogos de GABA y Baclofen.....	24
Esquema 15. Análogos de GABA con sistemas de triazol.....	25
Esquema 16. Diseño in silico de análogos de (<i>R</i>)-Baclofen con sistemas 1,2,4-oxadiazoles.....	34
Esquema 17. Diseño de los análogos de Baclofen en base al ligando. Análogos de Baclofen 103a-i con anillos de 1,2,4-oxadiazol.....	35
Esquema 18. Representación gráfica del docking molecular.....	51
Esquema 19. Energías de interacción de los compuestos 103a-i , la desviación estándar es de: ± 0.05-0.1.....	52
Esquema 20. Valores de energía de interacciones y sus respectivos valores de eficiencia de ligando de los compuestos 103a-i	58
Esquema 21. Representación gráfica del docking molecular semiflexible.....	64
Esquema 22. Energías de Interacciones y eficiencia del ligando de los compuestos 77a-i empleando la estructura cristalina 4MS4.....	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades farmacocinéticas de los antagonistas del receptor GABA _B	17
Tabla 2. Descriptores moleculares de GABA y diferencias de los antagonistas del receptor GABA _B	31
Tabla 3. Valores teóricos de LogP y otros descriptores.	37
Tabla 4. Cálculos correspondientes a los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.	43
Tabla 5. Docking molecular de los compuestos de referencia con los cristales 4MS4, 7C7Q y 4MR9.	49
Tabla 6. Comparación de residuos entre Baclofen, GABA, SCH 509 y los compuestos 103a-i	56
Tabla 7. Interacciones de los compuestos 103a-i con el receptor GABA _B correspondiente al cristal 4MR9.....	63
Tabla 8. Docking molecular semiflexible, teniendo una desviación estándar de entre 0.05 a 0.1.....	68
Tabla 9. Predicción de la actividad de los compuestos 103a-i de PASS online.	74
Tabla 10. Comparativa de los residuos de aminoácidos del receptor en base a los grupos que poseen los compuestos de referencia y los compuestos 103a-i	85

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central (SNC) contiene concentraciones excepcionalmente altas de ciertos aminoácidos, en particular el glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA, 1). Los aminoácidos dicarboxílicos (por ejemplo: glutamato, aspartato) median las respuestas excitadoras mientras que los ácidos monocarboxílicos (GABA, glicina) median los estímulos inhibidores. En los últimos años, se ha descubierto que varias clases terapéuticas provocan sus efectos farmacológicos y terapéuticos al modular la neurotransmisión en el SNC de estos neurotransmisores de aminoácidos.¹

En general, se cree que la excitabilidad general del SNC está modulada por la actividad fisiológica equilibrada de dos neurotransmisores de aminoácidos, GABA (inhibidor) y glutamato (excitador).

El glutamato media en la mayoría de las transmisiones sinápticas excitatorias del cerebro. Se encuentra involucrado en los procesos fisiológicos tan diversos como la proliferación celular, la apoptosis, la supervivencia celular, el aprendizaje y la memoria, así como en procesos patológicos como epilepsia, hipoxia y lesiones cerebrales isquémicas. Además, se conoce su participación directa en las grandes degeneraciones neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington.

Por otra parte, GABA media en la mayoría de las transmisiones sinápticas inhibitorias del cerebro. Entre las posibles implicaciones funcionales, se cree que la alteración de 1 participa en procesos de tipo coordinador o integrador en relación con procesos motores y cognitivos, así como en importantes trastornos neurológicos y psiquiátricos, como lo es la enfermedad de Huntington, la epilepsia, la discinesia tardía, el alcoholismo, la esquizofrenia, trastornos del sueño y la enfermedad de Parkinson, etc.²

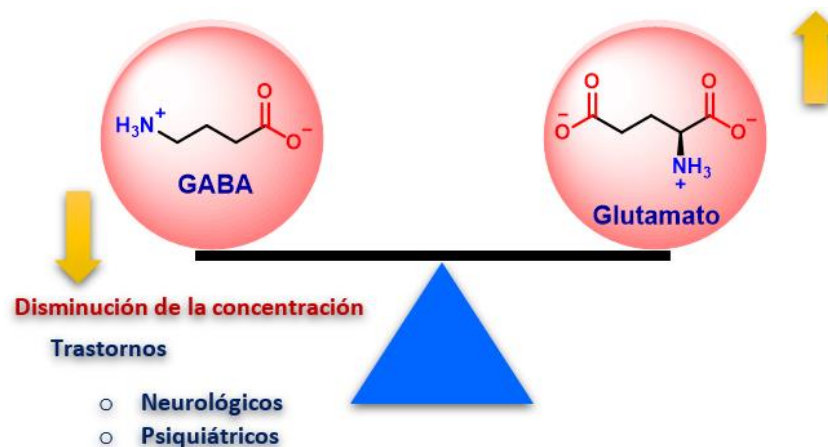
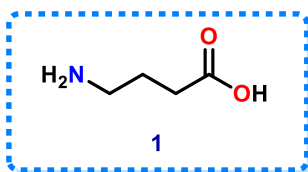


Figura 1. Equilibrio en los niveles de concentración de GABA y glutamato.

1.2 Ácido γ -aminobutírico

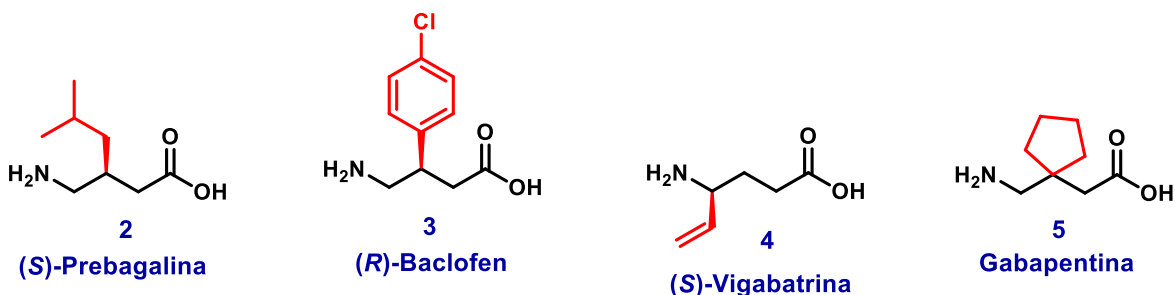


El ácido γ -aminobutírico, (GABA) **1** fue identificado en los 1950's por Kuffler, Kravitz, y Potter; siendo el principal neurotransmisor inhibitorio y el *L*-glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de los mamíferos, encargándose de la neurotransmisión mediante señales eléctricas entre las células nerviosas por procesos de excitación e inhibición, regulados por un nivel de equilibrio del sistema GABAérgico.^{3,4}

La neurotransmisión GABAérgica se basa en la interacción con los subtipos de receptores GABA_A , GABA_B y GABA_C . Los receptores ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) median las respuestas rápidas de **1** al activar la apertura de los canales de iones cloruro. Por otra parte los receptores metabotrópicos (GABA_B) son miembros de la familia 3 (o familia C) de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) responsables de las respuestas de **1** más lentas activando proteínas G e influyendo en los sistemas de segundos mensajeros.⁵

Es importante mantener los niveles de GABA **1**, dado que el equilibrio se debe a que alguna variación en su concentración en el cerebro da lugar a procesos excitatorios que se han asociado con algunos trastornos neurológicos y psiquiátricos como la epilepsia, Alzheimer, Parkinson y Huntington. Sin embargo, la administración directa de **1** no se considera una terapia eficaz debido a la alta hidrofilia (coeficiente de partición $\text{ClogP} = -3.2$) que presenta dando como resultado una mala permeabilidad a través de las barreras hematoencefálicas lipofílicas (BBB).

Uno de los principales métodos para elevar el nivel de **1** en el SNC es el uso de moléculas pequeñas, también denominadas fármacos y profármacos GABAérgicos, capaces de difundirse a través de la BBB e inhibir la actividad de la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT). Estos compuestos son principalmente β -aril- o β -alquil sustituidos, y han sido objeto de extensas investigaciones para producir análogos de **1**, descritos como derivados lipofílicos de **1**, tales como (*S*)-Pregabalina **2**, (*R*)-Baclofen **3**, (*S*)-Vigabatrina **4** y Gabapentina **5**, Esquema 1.



Esquema 1. Análogos de GABA empleados para diversos trastornos del SCN.

Por su naturaleza los análogos de GABA descritos en el Esquema 1 difieren en su mecanismo de acción y son empleados en distintos trastornos. Por ejemplo, la (*S*)-Pregabalina **2** se une a la proteína $\alpha 2\text{-}\delta$, un canal de calcio dependiente del voltaje, lo que reduce la liberación de neurotransmisores excitadores y moduladores de péptidos que pueden ser responsables de estos efectos anticonvulsivos, ansiolíticos y analgésicos. El (*R*)-Baclofen **3** es un agonista de GABA_B utilizado en el tratamiento de la espasticidad, actúa mejorando la movilidad de pacientes con esclerosis múltiple, lesiones de la médula espinal y rigidez muscular. Por otra parte, la (*S*)-Vigabatrina **4** es un fármaco antiepiléptico inhibidor de la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT) más eficaz, su mecanismo de acción es a través de la unión irreversible a la enzima mediante dos mecanismos principales que involucran adiciones de tipo Michael y enamina.

Finalmente, la gabapentina **5** es un fármaco neuroléptico utilizado clínicamente para la prevención de convulsiones, ansiedad, discinesia tardía y dolor neuropático.

Debido a su importancia clínica, la síntesis y evaluación biológica de análogos de estos compuestos se han descrito en la literatura importantes aportaciones que proponen una variedad de modificaciones estructurales.

1.3 Biosíntesis y degradación.

GABA **1** es sintetizado en el cerebro a partir de la descarboxilación del neurotransmisor excitatorio, el ácido *L*-glutámico por la acción específica de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), enzima que requiere la presencia del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP). Posteriormente el GABA es catabolizado a semialdehído succínico (SSA) por la enzima GABA-AT, enzima que requiere igualmente del cofactor PLP.

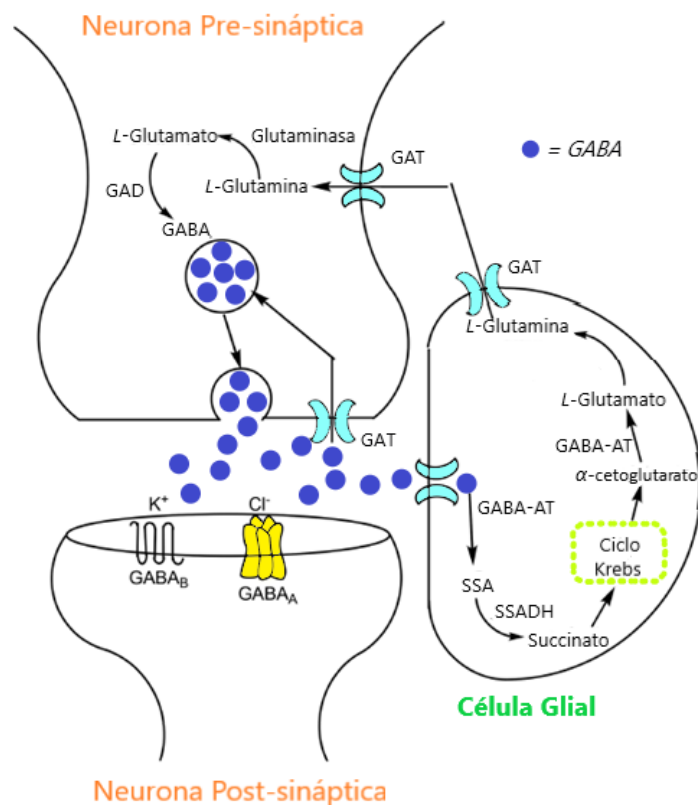


Figura 2. Biosíntesis y degradación de GABA.³

La degradación de GABA convierte simultáneamente al PLP en piridoxamina-5'-fosfato (PMP). El semialdehído succínico (SSA) se oxida posteriormente a ácido succínico mediante la acción de la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa (SSDH). Por último, el ácido succínico entra al ciclo de Krebs y se vuelve a transformar a α -cetoglutarato, el cual posteriormente, se convierte a ácido *L*-glutámico, mediante la regeneración del PMP a PLP.

1.4 Receptores de GABA.

GABA ejerce sus acciones fisiológicas a través de la interacción con tres subtipos de receptores, denominados GABA_A, GABA_B y GABA_C.⁶

Estos receptores se encuentran localizados en las neuronas pre- y postsinápticas. Los receptores ionotrópicos, GABA_A y GABA_C son miembros de la superfamilia de canales de Cl⁻ regulados por ligandos y median la actividad inhibitora rápida de **1**. Los receptores metabotrópicos, GABA_B pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas de unión a guanosina-5'-trifosfato (GTP) y regulan los canales de K⁺ y Ca²⁺ que median las acciones inhibitoras a largo plazo de **1**, Figura 3.⁷

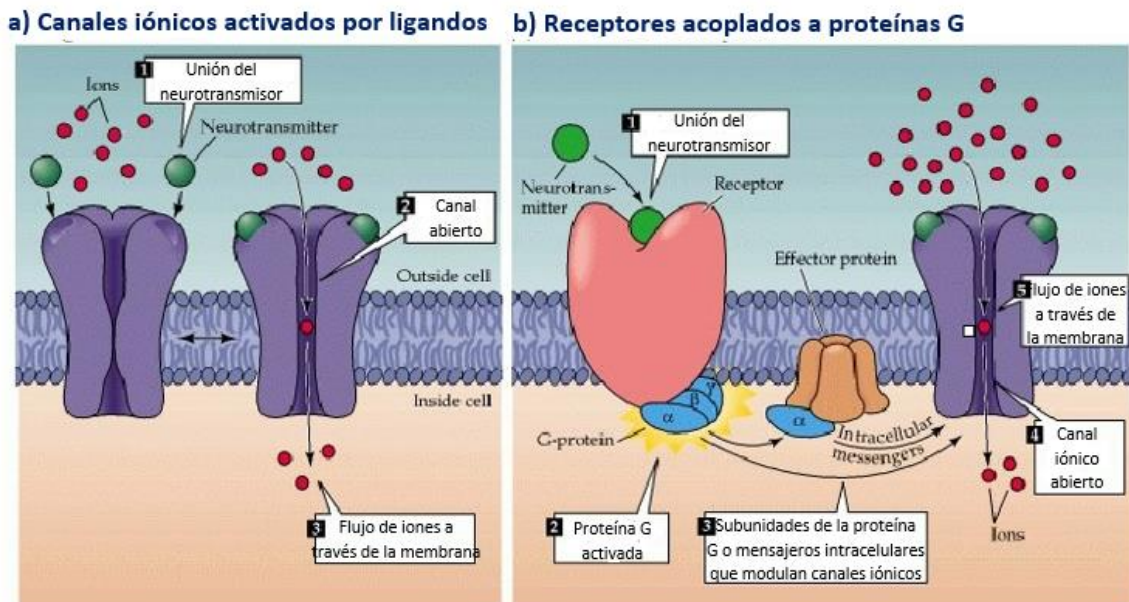


Figura 3. Representación esquemática de los receptores GABA_A, GABA_B y GABA_C. **a)** Receptores Ionotrópicos. **b)** Receptores Metabotrópicos.⁸

1.4.1 Receptores Ionotrópicos.

Tanto los receptores GABA_A como los GABA_C son miembros de una superfamilia de canales iónicos activados por transmisores que incluye la acetilcolina nicotínica, la glicina sensible a estricnina y los receptores 5-hidroxitriptamina 3 (5-HT₃). Se cree que estos canales de iones controlados por transmisores son estructuralmente muy similares, compuestos de cinco subunidades que se organizan juntas para formar un canal de iones, Figura 4.

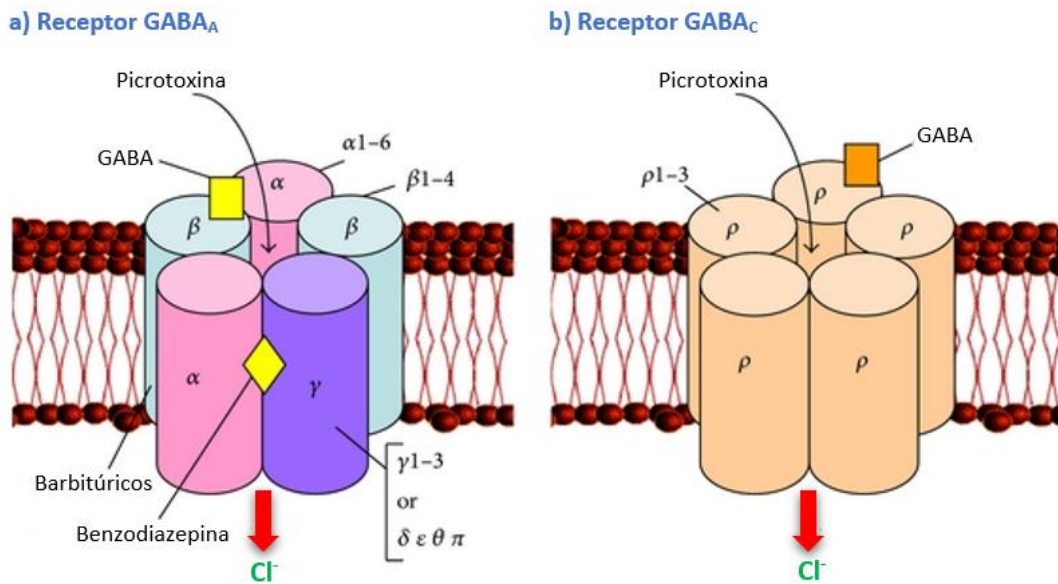
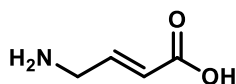


Figura 4. Estructuras de los receptores GABA_A y GABA_C.⁹

Los receptores GABA_A se activan mediante la unión alostérica de su ligando fisiológico GABA **1**, aumentando la permeabilidad de los aniones Cl⁻, dando lugar a una hiperpolarización de la célula receptora, generando que el potencial de membrana sea negativo, dando lugar a un potencial postsináptico inhibitorio.

Estos receptores, pueden ser modulados de forma alostérica por fármacos como las benzodiazepinas, barbitúricos, alcoholes y neuroesteroides.

En cuanto a los receptores GABA_C, en 1984 fueron designados, posteriormente, estudios realizados por Johnston y colaboradores indicaron que el ácido Z-4-aminobut-2-enoico (ácido *cis*-4-aminocrotónico **6** (CACA)) análogo de **1**, parcialmente plegado activa selectivamente a este receptor.¹⁰



6

Ácido *cis*-4-aminocrotónico (CACA)

Los receptores GABA_C no muestran afinidad por la bicuculina (antagonista GABA_A), ni al Baclofen (agonista GABA_B), ni tampoco muestran esta afinidad por benzodiazepinas, esteroides o barbitúricos.

1.4.2 Receptores Metabotrópicos.

En 1981 fueron descubiertos los receptores GABA_B denominados receptores metabotrópicos; siendo los encargados de producir señales inhibitorias lentas y prolongadas, y funcionando como moduladores para la liberación de neurotransmisores.

Los receptores GABA_B pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G y son funcionales como heterodímeros compuestos por dos subunidades, GABA_{B1} y GABA_{B2}. La subunidad GABA_{B1} contiene el sitio de unión a GABA, mientras que la subunidad GABA_{B2}, está ubicada dentro de la superficie celular, la cual es la que se encuentra unida a la proteína G. La activación de estos receptores bloquea la liberación presináptica de algunos neurotransmisores, especialmente la dopamina, a través de la inhibición de canales iónicos de Ca²⁺ dependientes de voltaje, y también estimula la activación de la proteína G abriendo canales iónicos de K⁺ para generar potenciales postsinápticos inhibitorios.⁹

Adicionalmente, en estudios farmacológicos se ha evidenciado que los receptores GABA_B podrían estar implicados en el desarrollo de algunos trastornos del SNC como lo son la espasticidad, depresión, ansiedad, dolor, esquizofrenia, epilepsia, adicción a las drogas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedades por reflujo gastroesofágico (ERGE).⁹ Destacando el interés farmacológico de los receptores GABA_B, se consideran como blancos terapéuticos importantes, ya que su manipulación farmacológica tiene el potencial de tratar una amplia variedad de enfermedades neurológicas.

En el 2013, se reportó la estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B de humano unido a Baclofen,¹¹ esta aportación es de gran importancia, ya que permite el diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC), teniendo como objetivo el diseño, optimización y selección de nuevos compuestos con posible actividad biológica.

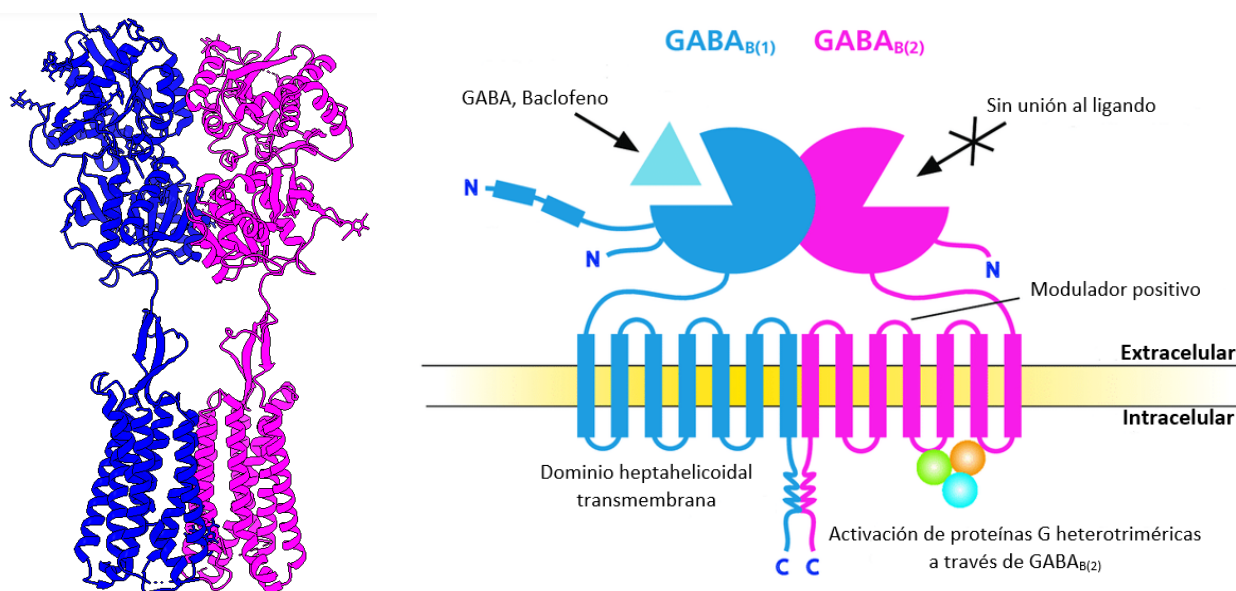
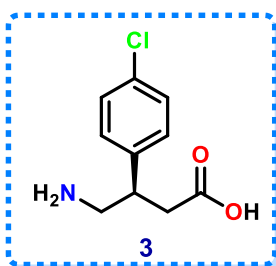


Figura 5. Representación esquemática del receptor GABA_B.¹²

1.5 (*R*)-Baclofen



medula espinal.

(*R*)-Baclofen **3** (ácido 4-amino-3-(4-clorofenil) butanoico) fue sintetizado por primera vez en 1962 por Heinrich Keberle, y actualmente es el único ligando agonista dirigido hacia los receptores GABA_B aprobado por la FDA y comercializado bajo el nombre de Lioresal, es un análogo de GABA, sustituido en posición β con un grupo *p*-clorofenilo, empleado para tratar la espasticidad muscular en pacientes con esclerosis múltiple y lesiones de la

En 1998 Ling y colaboradores¹³ mencionaron que (*R*)-Baclofen podría reducir el ansia de cocaína en las personas. La importancia de esta observación en el posible tratamiento del abuso de las drogas se ve reforzada por el hallazgo de que el Baclofen reduce el deseo de un huésped por sustancias adictivas como la heroína, el alcohol y la nicotina.

(*R*)-Baclofen **3** tiene un centro quiral y un peso molecular de 213.66 g/mol. La molécula contiene dos donantes de enlaces de hidrógeno, tres aceptores de enlaces de hidrógeno y cuatro enlaces rotativos; tiene pKa de 3.89 y 9.79. En condiciones fisiológicas, es anfótero. **3** se rige por las reglas de Lipinski y tiene una biodisponibilidad global entre el 70 y el 85%. Es ligeramente soluble en agua (0.712 mg/mL) y etanol.¹⁴

Su especificidad hacia los receptores GABA_B para ejercer su acción farmacológica fue de suma importancia para la elucidación de estos receptores.

Y más allá de considerar a Baclofen **3** como el fármaco ideal, presenta una baja

penetración en el SNC y considerado como el fármaco prototipo para diversos grupos de investigación se han dado a la tarea a la búsqueda de diversos métodos de síntesis de nuevos análogos de **3**, con el objetivo de mejorar su perfil farmacológico.

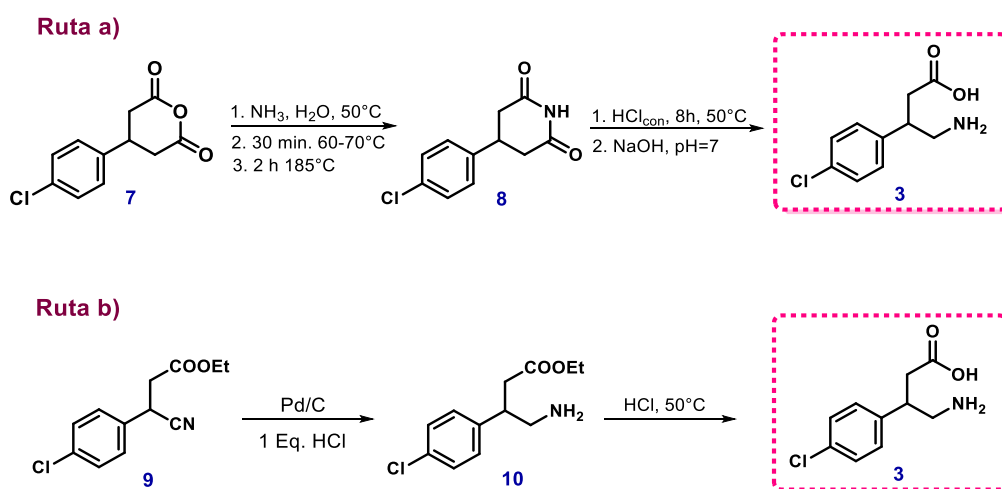
1.5.1 Síntesis de Baclofen

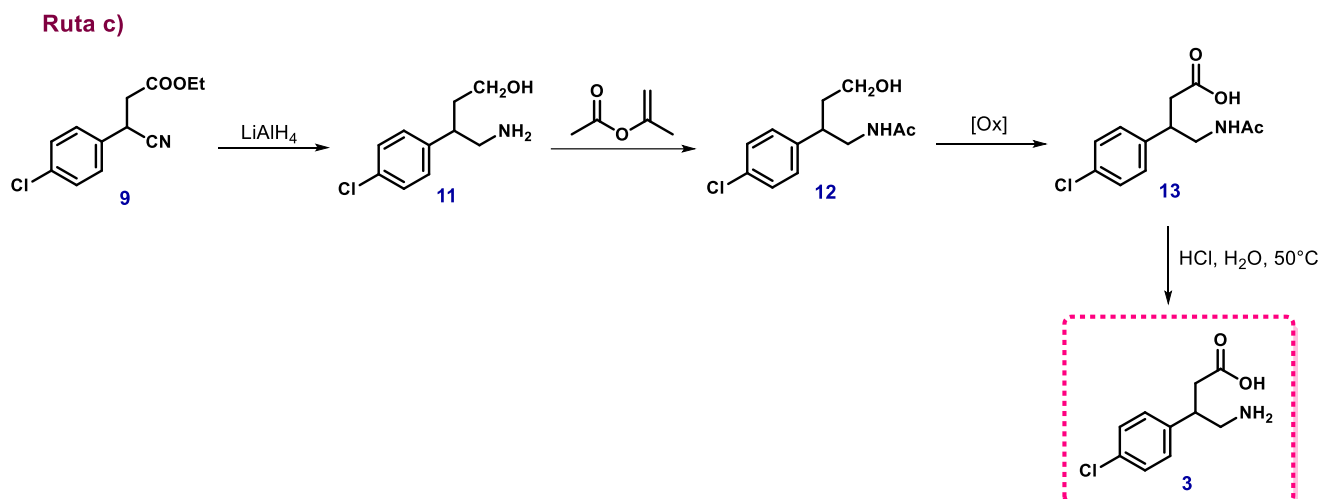
Heinrich Keberle sintetizó originalmente el Baclofen en 1962 en Ciba, Suiza¹⁵ donde presento varios enfoques sintéticos como el que se muestra en el Esquema 2.

La ruta a inicia con la disolución y adición del anhídrido **7** con NH₃ en presencia de calor para la formación de la imida **8**, posteriormente se realizó una hidrólisis básica y posteriormente una degradación de Hoffman para la obtención de **3** racémico.

Posteriormente en la ruta b, la síntesis inicia utilizando el *p*-clorodihidrocinamato **9** como punto de partida, como primer paso la reducción catalizada con paladio y posteriormente la adición de 1 Eq. de HCl para evitar la ciclación espontánea obteniendo la amina **10** siendo aislada y finalmente se llevó a cabo una hidrólisis en condiciones ácidas para la generación de **3**.

La ruta c, inicia con la reducción del *p*-clorodihidrocinamato **9** con hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) para proporcionar **11**, mediante una acetilación se realizó la protección selectiva de la amina **12**, posteriormente se a cabo la oxidación del grupo hidroxilo para obtención del ácido carboxílico **13** y finalmente la eliminación del grupo *N*-acetil en condiciones ácidas para obtener **3**.

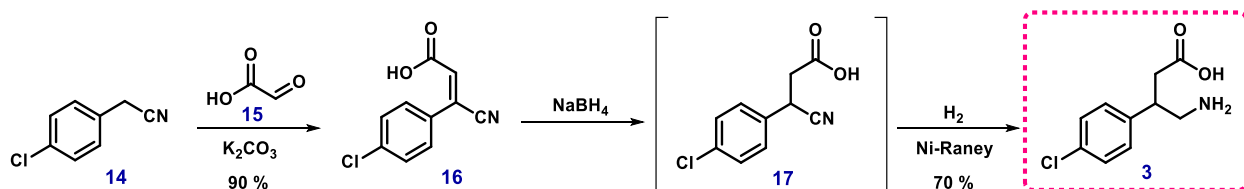




Esquema 2. Estrategias reportadas por Keberle y colaboradores para la obtención de Baclofen racémico.

Ashutosh Jagtap y colaboradores¹⁶ en 2018 desarrollaron una ruta de síntesis alternativa; donde destacan que puede ser más escalable a nivel comercial y la generación de menos residuos.

La síntesis de **3** se inició al hacer reaccionar el 2-(4-clorofenilo) acetonitrilo **14** con ácido glioxílico **15** en presencia de K_2CO_3 generando así el ácido 3-(4-clorofenil)-3-cianoacrilico **16** con un rendimiento del 90 %. A continuación, el tratamiento de **16** con NaBH_4 en THF, produjo el intermediario **17** que sin purificación adicional se trató en condiciones de hidrogenación catalítica usando Niquel-Raney y atmósfera de hidrógeno proporcionando el compuesto **3** con un 70% de rendimiento químico Esquema 3.



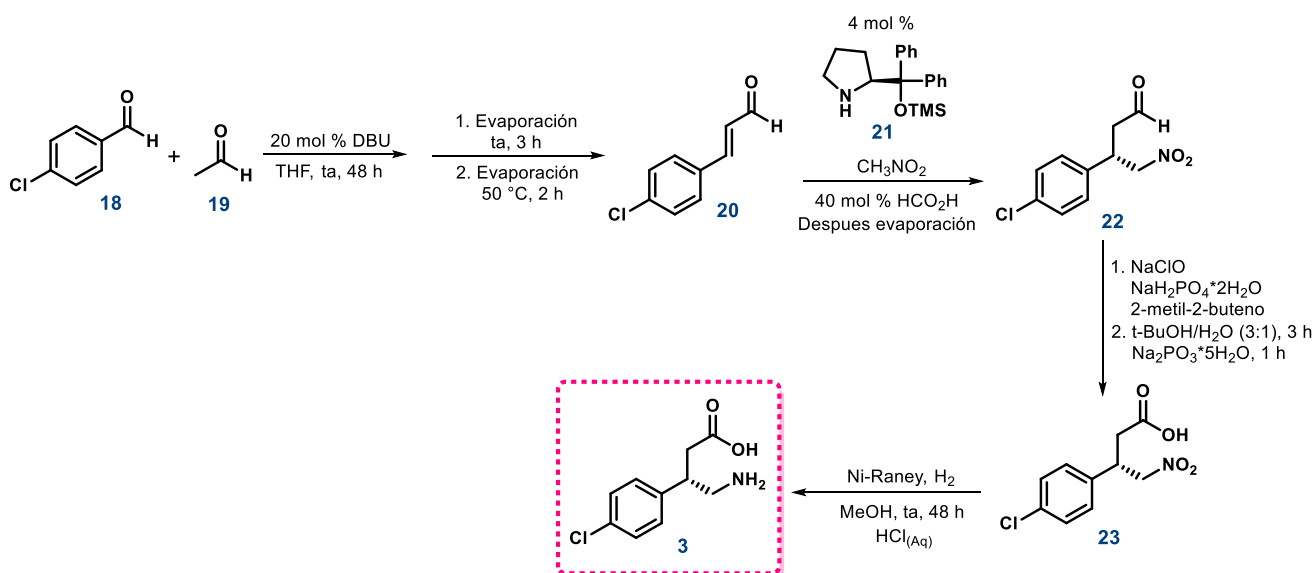
*Para asegurar <30 ppm de Ni en el producto final, se utilizó una solución de EDTA para eliminar los contaminantes de níquel.

Esquema 3. Ruta de síntesis alternativa patentada por Ashutosh Jagtap y colaboradores.

1.5.2 Síntesis enantioselectiva.

Hayashi y colaboradores¹⁷ desarrollaron una síntesis one-pot de enantiómero (*R*)-Baclofen.

La síntesis inicia mediante una condensación aldólica entre el *p*-cloro-benzaldehído **18** y el acetaldehído **19** en presencia de DBU seguida de dos evaporaciones a diferentes temperatura para formar el aldehído α,β -insaturado **20**. Posteriormente, se efectuó una adición 1,4 tipo Michael con nitrometano y el compuesto **21**. La siguiente transformación fue la oxidación de Kraus-Pinnick en *t*-BuOH para la formación del ácido carboxílico **23**. Posteriormente se llevó a cabo la adición de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para la reducción de NaClO_2 remanente y finalmente se procedió a la reducción del grupo nitro con Ni-Raney en una atmósfera de nitrógeno para obtener a **3** con un rendimiento total del 31 %, Esquema 4.



Esquema 4. Síntesis One-pot asimétrica de (*R*)-Baclofen.

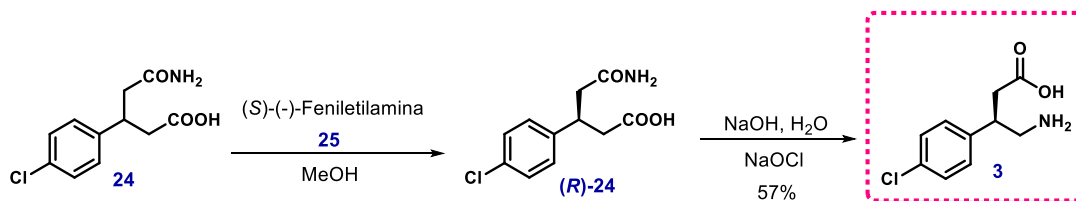
Otras propuestas de síntesis enantioselectiva de (*R*)-Baclofen es la descrita por Corey y Zhang,¹⁸ destacando el uso de sales de amonio cuaternarias quirales rígidas en específico el uso de la sal de cinconinio.

1.5.3 Resolución Química.

Antes de llevarse a cabo la síntesis de **3** mediante resolución enzimática, en 1997 Caira y colaboradores¹⁹ fueron los primeros en reportar su síntesis empleando reactivos químicos como agentes de resolución.

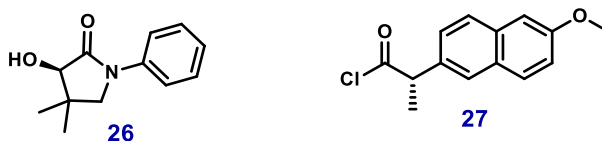
Caira y colaboradores informaron la producción a gran escala de **3**, iniciando con la resolución química del ácido 3-(4-clorofenil) glutámico racémico **24** con (*S*)-(-)-fenilatilamina **25** en MeOH, generando las sales diastereoméricas de (*S*)-(-)-fenilatilamina, las cuales fueron separadas mediante cristalización, posteriormente la sal ópticamente pura

se trató en NaOH acuoso y luego se neutralizó con HCl diluido para producir **(R)-24** posteriormente, mediante la reacción de Hoffman se obtuvo **3** con un rendimiento del 57 % y un ee del 98.9 %, Esquema 5.



Esquema 5. Síntesis *(R)*-Baclofen mediante resolución química.

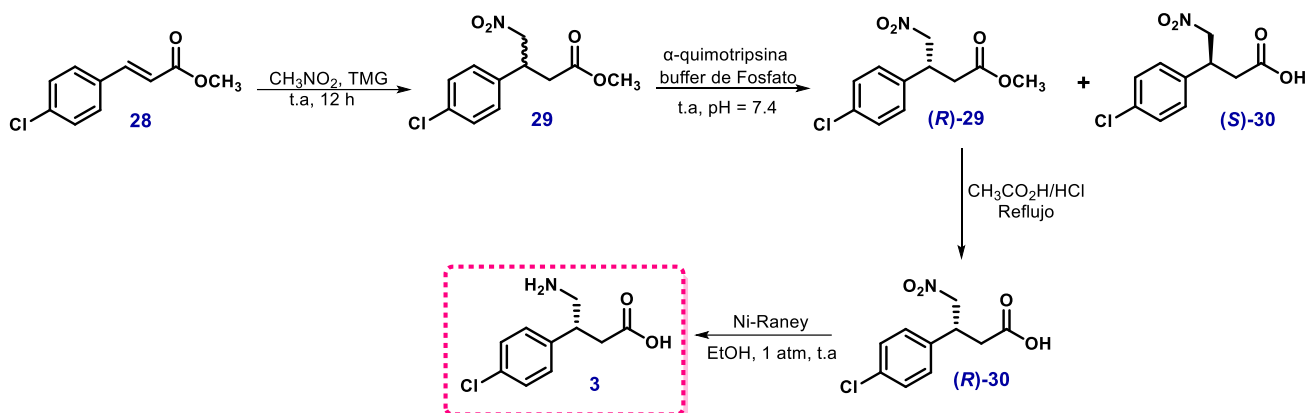
Actualmente, en la literatura existen varios reportes del uso de agentes de resolución para la síntesis de **3**, como es el caso de *(R)*-*N*-fenilpantolactama **26** reportado por Camps y colaboradores.²⁰ En otro ejemplo, Linzaga y colaboradores²¹ describieron la síntesis de **3** mediante el empleo de *(S)*-naproxeno **27** como agente de resolución, Esquema 6.



Esquema 6. Estructuras de *(R)*-*N*-fenilpantolactama y *(S)*-naproxeno.

1.5.4 Resolución Enzimática.

Felluga y colaboradores²² reportaron la síntesis de **3** a partir del *p*-clorocinamato **28**, al cual se llevó a cabo una adición 1,4 tipo Michael de nitrometano catalizada con 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG) para la generación del nitroéster racémico **29**. El siguiente paso fue el empleo de la enzima α -quimotripsina, en una disolución buffer a un pH 7.4, con el objetivo de hidrolizar únicamente el grupo nitroéster **29** de configuración *(S)* para generar el ácido carboxílico **30**. La reacción procedió con un 53 % de conversión, por otra parte, el nitroéster *(R)*-**29** se obtuvo con ee del 99.9 % y un rendimiento del 42 %. Posteriormente, el compuesto se sometió a hidrólisis ácida para generar el ácido carboxílico *(R)*-**30**, el cual se trató con Ni-Raney para reducir el grupo nitro a la amina y generar **3**, Esquema 7.



Esquema 7. Síntesis mediante resolución enzimática de (R)-Baclofen.

Otra propuesta de síntesis de **3** mediante la resolución enzimática es la reportada por Chenevert y Desjardins²³ proponiendo el uso de α -quimotripsina.

2 ANTECEDENTES

2.1 Agonistas del Receptor GABA_B reportados en la literatura.

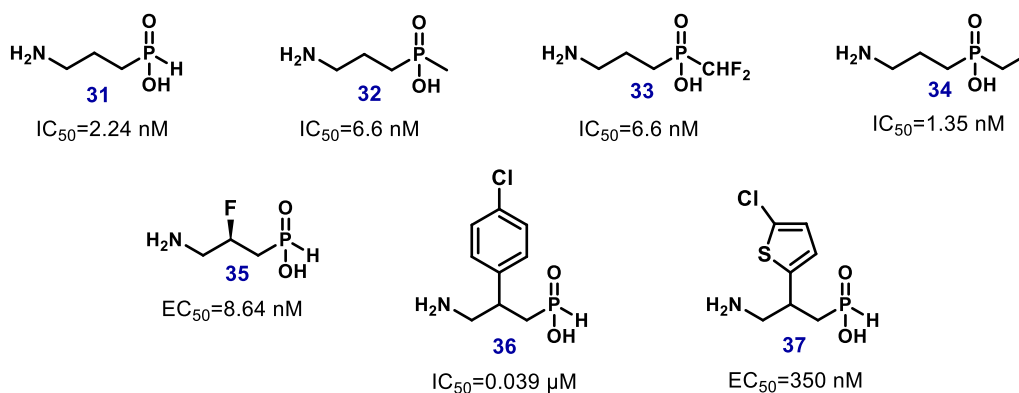
Como anteriormente se mencionó, en la actualidad **3** es único agonista del receptor GABA_B aprobado por la FDA, y el cual presenta una baja absorción en el cerebro y aunado a esto un bajo potencial terapéutico, razón por la cual, diversos grupos de investigación han intentado mejorar su actividad mediante la síntesis de análogos de **3**, con variaciones en su estructura.

En la literatura hay muestra de varios agonistas que están dirigidos al receptor GABA_B, los cuales muestran similitud o variaciones estructurales en referencia a Baclofen. A continuación, se muestran algunos ligandos, los cuales presentan un reemplazo bioisostérico en el grupo del ácido carboxílico por el ácido fosfónico.

En 1995 que Froestl y colaboradores²⁴ reportaron la síntesis y la evaluación biológica de los compuestos GCP 27495 **31**, CGP 35024 **32** y CGP 36216 **34**, estos análogos de ácido fosfónico, presentaron actividad de IC₅₀=2.24 nM para **31**, 6.6 nM para **32** y de 1.35 nM para **34** en comparación con (*R*)-Baclofen **3** cuyo concentración es de IC₅₀=25 nM. Además, los átomos de Flúor de CGP 47656 **33** son reemplazos isotéricos de los átomos de hidrógeno en **32**, produciendo un compuesto con alta afinidad por los receptores GABA_B con actividad agonista parcial.

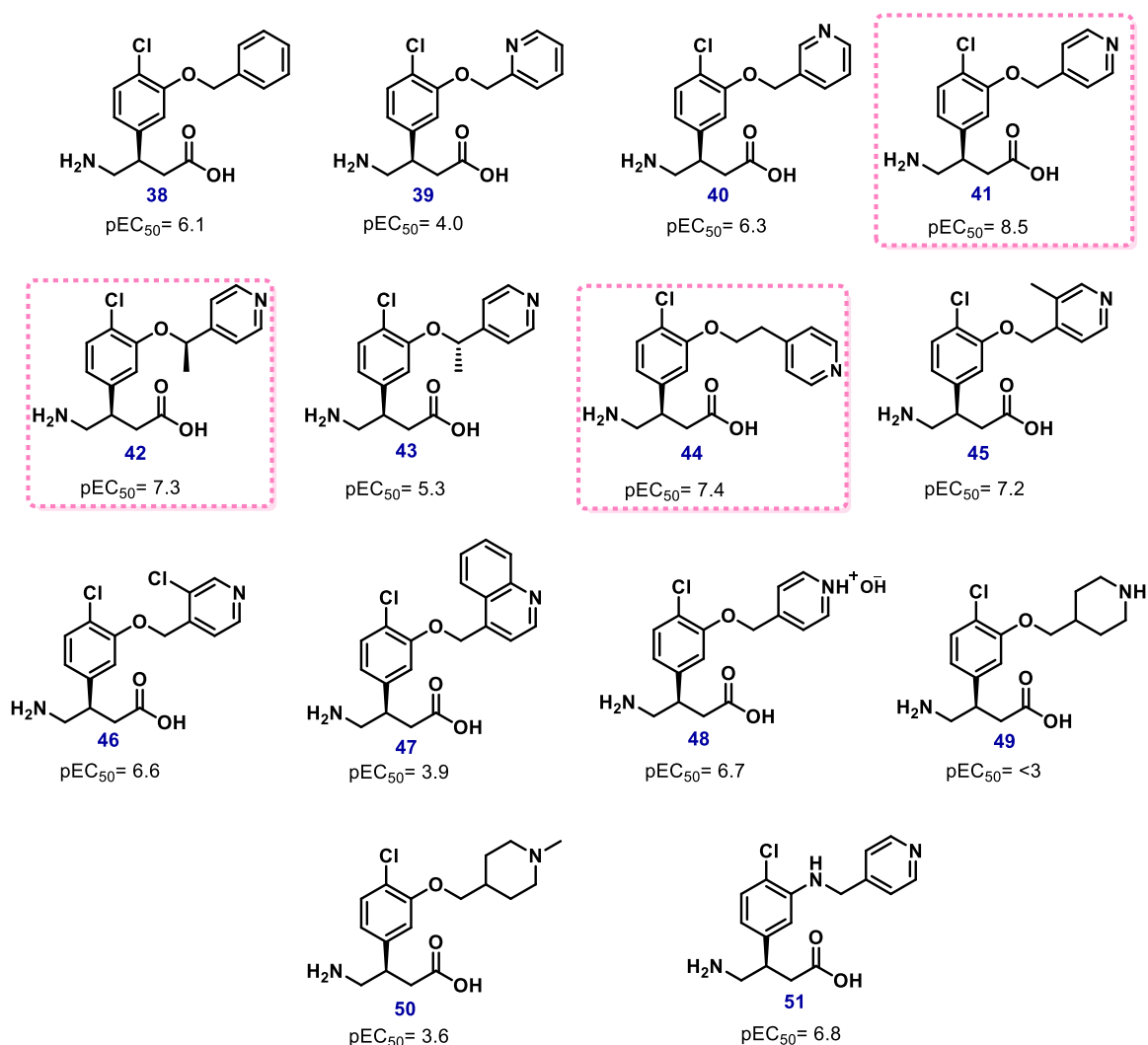
Posteriormente, Alstermark y colaboradores,²⁵ sintetizaron el compuesto **3**, el cual presento actividad de EC₅₀=8.64 nM como agonista del receptor GABA_B, la cual es superior a la de **3** que es de EC₅₀=750 nM.

En la misma línea, el reemplazo del grupo carboxílico de **3** por el grupo del ácido fosfínico dio el derivado del ácido fosfínico **36** que mostró un valor de IC₅₀= 0.039 μM, Esquema 8.²⁶



Esquema 8. Agonistas del receptor GABA_B.

Recientemente en el 2011, Xu y colaboradores²⁷ llevaron a cabo la síntesis y evaluación de una serie de análogos de **3**, presentando modificaciones en la posición *orto* con respecto al átomo de cloro del anillo aromático. Siendo los compuestos **41** ($pEC_{50}=8.5$), **42** ($pEC_{50}=7.3$) y **44** ($pEC_{50}=7.4$) los que mostraron mejor actividad en los ensayos preliminares en receptores GABA_B expresados en células embrionarias de riñón, Esquema 9.



Esquema 9. Análogos de (*R*)-Baclofen con modificaciones en la posición *orto* del anillo aromático.

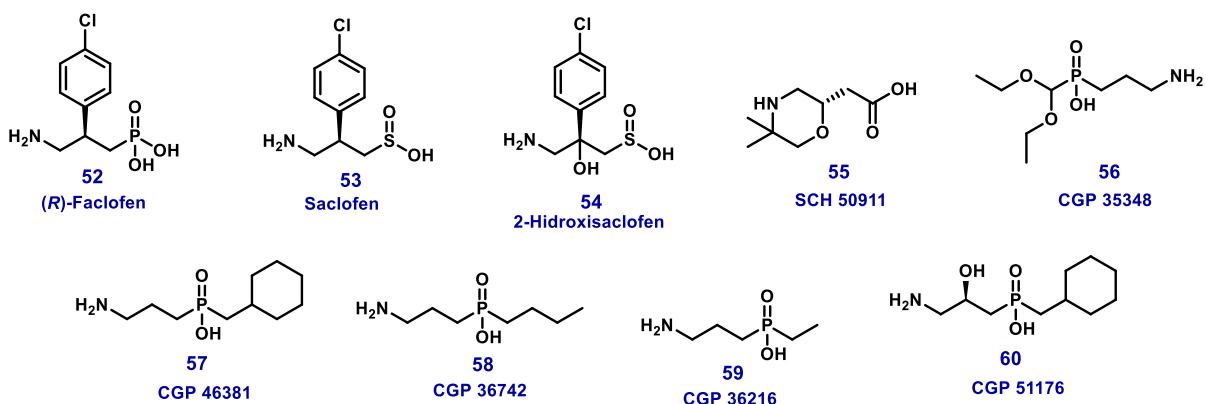
2.2 Antagonistas del receptor GABA_B reportados en la literatura.

Dada la importancia y el interés farmacológico de los antagonistas dirigidos hacia el receptor GABA_B, se emprendieron inmediatamente esfuerzos para el diseño y desarrollo de antagonistas selectivos del receptor GABA_B de alta afinidad ha sido importante para establecer la importancia y el aislamiento de los genes del receptor GABA_B. Kerr, Ong y colaboradores^{28,29} describieron el Faclofen **52**, Saclofen **53** y 2-hidroxisaclofeno **54**, siendo los primeros antagonistas selectivos, aunque estos agentes tienen bajas afinidades y son ineficaces después de la administración sistémica por los sitios de unión de GABA_B en las membranas cerebrales de ratas, como primeros antagonistas fueron herramientas importantes para definir la relevancia farmacológica y fisiológica de los receptores GABA_B.

El antagonista SCH 50911 **55** (IC₅₀= 3 μM), es un agente químicamente distinto que es eficaz después de la administración sistémica pero que tiene una afinidad relativamente baja por el receptor.^{30,31} Los descubrimientos posteriores de antagonistas se derivaron en gran parte de un grupo de Novartis en Basilea, Suiza por Froestl y Mickel,³² desarrollaron el primer antagonista del receptor GABA_B capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, CGP 35348 **56**,³³ y los primeros agentes activos por vía oral, CGP 36742 **58**³⁴ y CGP 51176 **60**.³⁵ Esquema 10.

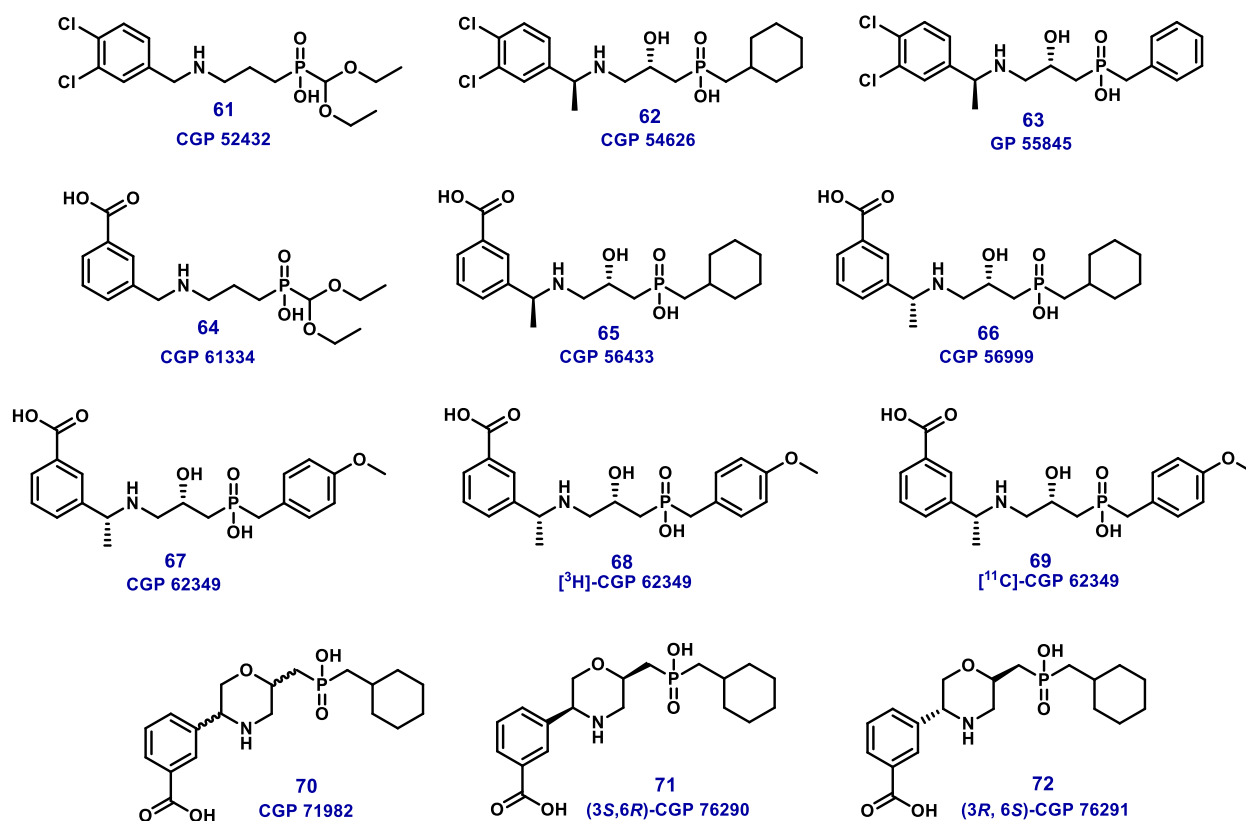
El antagonista CGP 36742 **58**, es uno de los ligandos del receptor GABA_B más estudiado y el cual ha aportado demasiado en las investigaciones realizadas sobre este receptor. En contexto, uno de los estudios realizados por Nyitrai y colaboradores,³⁶ determinó que CGP 36742 mejora la liberación de somatostatina en el hipocampo de ratas, tanto *in vivo*, como *in vitro*.

Por otra parte, Nowak y colaboradores³⁷ destacan la actividad antidepresiva presentada por los antagonistas CGP 36742 y CGP 51176 en roedores.



Esquema 10. Antagonistas de baja afinidad.

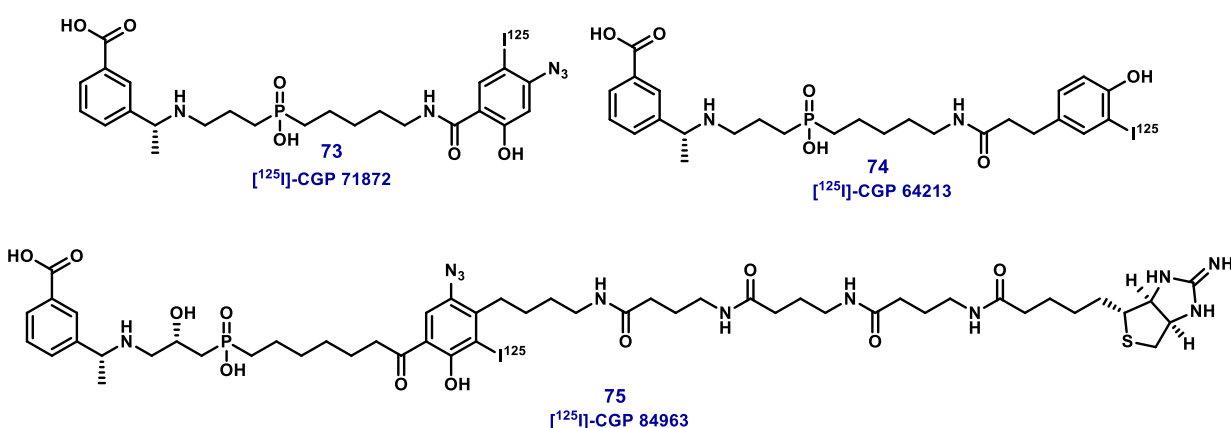
El avance más crucial en el descubrimiento de antagonistas se produjo con el desarrollo de compuestos con afinidades 10,000 veces más altas que los antagonistas anteriores. Este gran avance se debió a la unión de sustituyentes 3,4-diclorobencilo o 3-carboxibencilo a las moléculas existentes. Esto produjo una profusión de compuestos con afinidades en el rango nanomolar.³⁸ Se han llevado a cabo numerosas investigaciones con CGP 52432 **61** (IC₅₀= 55nM), CGP 54626 **62** (IC₅₀= 4nM), CGP 55845 **63** (IC₅₀= 6nM), CGP 61334 **64** (IC₅₀= 36nM) CGP 56433 **65** (IC₅₀= 80nM), CGP 56999 **66** (IC₅₀= 2nM), y CGP 62349 **67** (IC₅₀= 2nM). También están disponibles varios compuestos como radioligandos, tales como: [³H]-CGP 62349 **68** y [¹¹C]-CGP 62349 **69**,³⁹ siendo este último un radioligando que contenía el isótopo emisor de positrones o antielectrón ¹¹C como ligando potencial de tomografía por emisión de positrones.⁴⁰ La introducción del resto del ácido fosfínico en el compuesto **55** condujo a una nueva clase de antagonistas del receptor GABA_B muy potentes, como: racemato CGP 71982 **70**, (IC₅₀= 8nM), (3*S*, 6*R*)-CGP 76290 **71** (IC₅₀= 2nM) y (3*R*, 6*S*)-CGP76291 **72** (IC₅₀= 69nM),⁴¹ Esquema 11.



Esquema 11. Antagonistas de alta afinidad.

Finalmente, dos antagonistas yodados de alta afinidad, [¹²⁵I]-CGP 71872 **73** (IC₅₀= 2.4

nM)⁴² y [¹²⁵I]-CGP 64213 **74** (IC₅₀= 1.6 nM, es decir, inhibición de la unión de [¹²⁵I]-CGP 64213 a los receptores GABA_B en las membranas de la corteza cerebral de rata),⁴³ se desarrolló un ligando de fotoafinidad, ambos con altas radiactividades específicas de >2000 Ci/mmol, que se utilizaron para elucidar la estructura de GABA_{B1}.⁴⁴ El ligando [¹²⁵I]-CGP 84963 **75** (IC₅₀= 6nM, inhibición de la unión de [¹²⁵I]-CGP 64213 a los receptores GABA_B en las membranas de la corteza cerebral de ratas) combina en una molécula una parte que se une al receptor GABA_B, un ácido azidosalicílico como una fracción de fotoafinidad separada por un espaciador de tres moléculas de GABA de 2-iminobiotina, que se une a la avidina de una manera reversible dependiente del pH. Este compuesto se preparó para facilitar el aislamiento y la purificación del fragmento del receptor GABA_{B1} N-terminal extracelular para estudios de cristalización y rayos X del sitio de unión de GABA_{B1},⁴⁵ Esquema 12.



Esquema 12. Antagonista del receptor GABA_B marcado con I¹²⁵ de alta afinidad.

Posteriormente se determinaron las propiedades farmacocinéticas como: LogP, área superficial, Peso molecular, TPSA y momento dipolar de todos los antagonistas anteriormente mencionados con el fin de encontrar una relación estructura-actividad entre sus propiedades calculadas, Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades farmacocinéticas de los antagonistas del receptor GABA_B.

Compuesto	Log P	Área superficial	PM	TPSA	Momento dipolar
(R)-Faclofen	-3.49	200.97	249.63	88	28.04
Saclofen	0.90	313.51	233.71	67.77	27.97
2-hidroxisaclofeno	-1.34	324.48	249.71	88	25.24
SCH 50911	-3.25	292.40	173.212	65.97	25.48

Baja afinidad	CGP 35348	-1.26	384.50	225.225	86.23	22.28
	CGP 46381	-1.12	383.07	219.265	67.77	27.79
	CGP 36742	-1.81	323.31	179.200	67.77	27.71
	CGP 36216	-2.68	262.12	151.146	67.77	27.68
	CGP 51176	-1.66	391.09	235.264	88	25.90
Alta afinidad	CGP 52432	1.80	557.36	384.23	75.20	22.51
	CGP 54626	1.81	591.16	408.30	76.97	24.13
	CGP 55845	2.73	566.06	400.28	56.74	25.16
	CGP 61334	0.28	560.50	359.359	112.50	23.67
	CGP 56433	0.29	593.86	383.425	114.27	26.12
	CGP 56999	0.29	594.39	383.425	114.27	27.44
	CGP 62349	-0.08	596.21	407.403	123.50	26.39
	[³H]-CGP 62349	-0.08	596.21	413.427	123.50	26.39
	[¹¹C]-CGP 62349	-0.08	596.21	406.403	123.50	26.39
	CGP 71982	0.35	571.47	381.409	103.27	26.01
	CGP 76290	0.35	570.29	381.409	103.27	24.71
	CGP 76291	0.35	571.47	381.409	103.27	27.35
	CGP 71872	-4.84	778.98	639.404	178.46	26.99
	CGP 64213	-5.06	744.55	598.391	149.03	32.53
	CGP 84963	3.39	1662.58	1208.18	337.90	7.09

Estos se organizaron de acuerdo a su afinidad, clasificándose como alta y baja afinidad hacia los receptores GABA_B, en color amarillo se muestran los antagonistas de baja afinidad y en color azul los antagonistas de alta afinidad.

2.3 Antagonistas co-cristalizados del receptor GABA_B

Actualmente y en comparación a los agonistas dirigidos al receptor GABA_B, existen más estructuras cristalinas del dominio extracelular del receptor GABA_B con sus correspondientes antagonistas, siendo estos importantes para la investigación y diseño de

nuevos fármacos. Su principal aplicación de los antagonistas es la caracterización o elucidación del receptor GABA_B, permitiendo revelar con mayor profundidad su papel.⁴⁶

Aunque actualmente no existe un antagonista aprobado o comercial, se ha demostrado en estudios preclínicos que los antagonistas del receptor GABA_B presentan propiedades neuroprotectoras, anticonvulsivas y de mejora de la cognición, siendo la característica antidepresiva la mejor descrita.⁴⁷

En este sentido, existe un esfuerzo creciente para diseñar nuevos agentes terapéuticos que interactúen selectivamente con los receptores GABA_B, y que permitan una mejor comprensión de la neurotransmisión GABAérgica, lo cual es de gran importancia para mejorar nuestro conocimiento sobre la excitabilidad neuronal y potenciar el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas y trastornos psiquiátricos.

En contexto, se muestran las estructuras cristalinas de los antagonistas con interacción al receptor GABA_B. Estos cristales pueden ser encontrados en Protein Data Bank (PDB) y en las diversas bases de datos de estructuras cristalinas de las proteínas.

En la Figura 6, se muestra al antagonista 2-hidroxisaclofeno unido al receptor GABA_B (PDB: 4MQF). Estudios recientes mostraron que el antagonista 2-hidroxisaclofeno redujo los efectos de Baclofen en la señal discriminativa inducida por D-anfetamina (D-AMPH). Estas observaciones sugieren que el receptor GABA_B puede estar involucrado en la modulación de la señal discriminativa de D-AMPH.⁴⁸

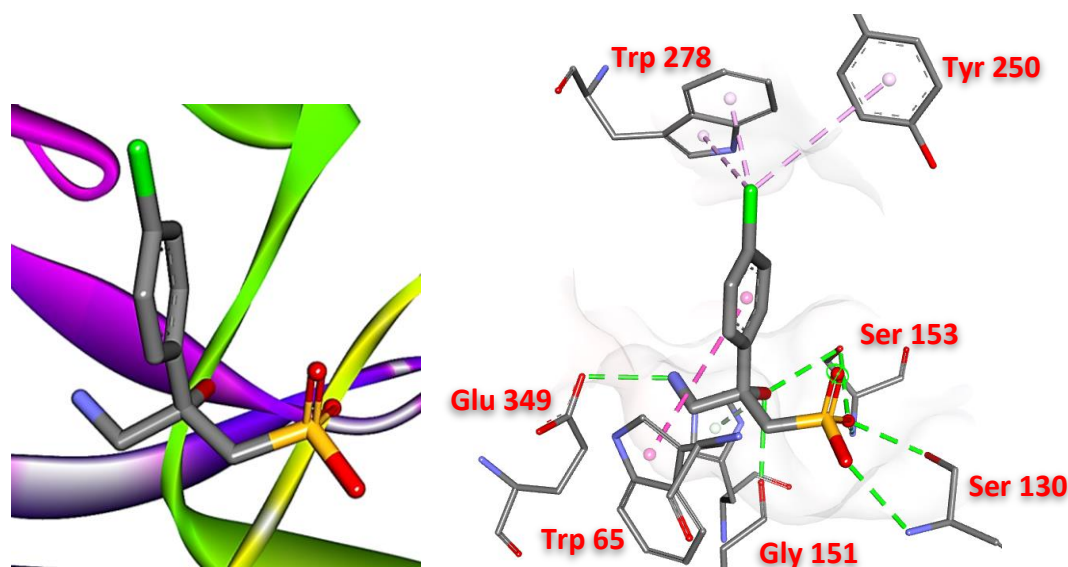


Figura 6. Estructura del antagonista 2-hidroxisaclofeno e Interacciones con el receptor GABA_B.

En cuanto al antagonista CGP 54626, Figura 7 teniendo un código PDB: 4MR7, se han

realizado estudios donde se investigó el papel de los receptores GABA_A como los del receptor GABA_B en la supresión de la ingesta de alimentos y la inducción del comportamiento similar al sueño por parte del ácido *L*-pipecólico (*L*-PA).⁴⁹

Otra aplicación de este antagonista la reporta Asay,⁵⁰ quien llevo a cabo la caracterización de la unión de [³H] CGP 54626 a los receptores GABA_B en la rana toro macho (*rana catesbeiana*). Donde se determinaron sitios de unión con una farmacología apropiada para los receptores GABA_B.

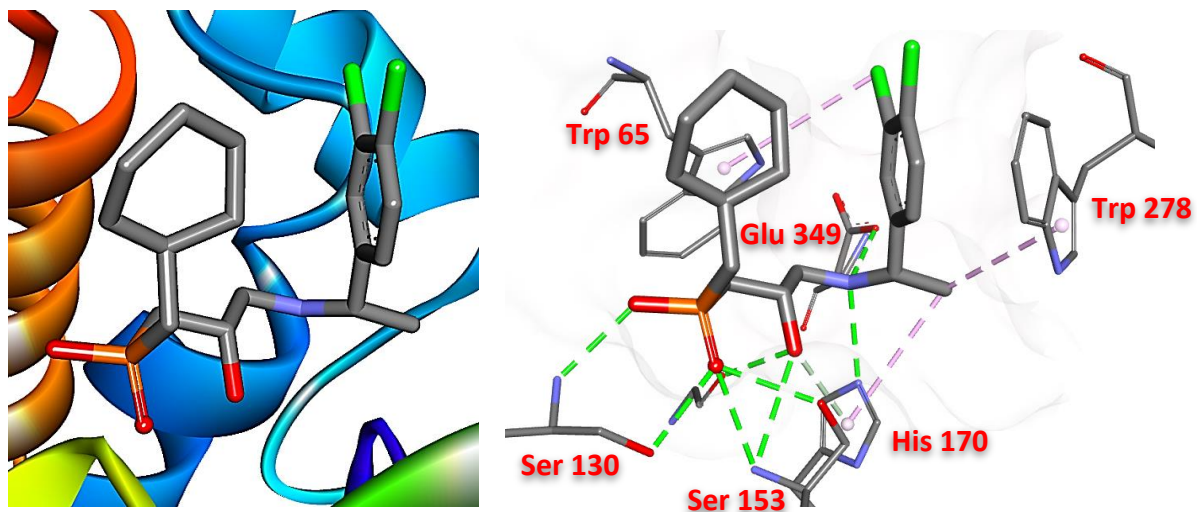


Figura 7. Estructura 3D e interacciones del antagonista CGP 54626 con el receptor GABA_B.

El antagonista CGP 35348 código PDB: 4MR8, Figura 8, existen varias aplicaciones o usos, una de ellas es lo reportado por Gillani y colaboradores,⁵¹ donde se determino el potencial de CGP 35348 sobre el receptor GABA_B en el aprendizaje, la memoria y la coordinación neuromuscular en ratones albinos. Otra importante aplicación es la realizada por Malcagio y colaboradores,⁵² donde resaltan la prevención del efecto antinocicepción (reversión o alteración de los aspectos sensoriales de la intensidad del dolor) y la relajación muscular inducidos por Baclofen.

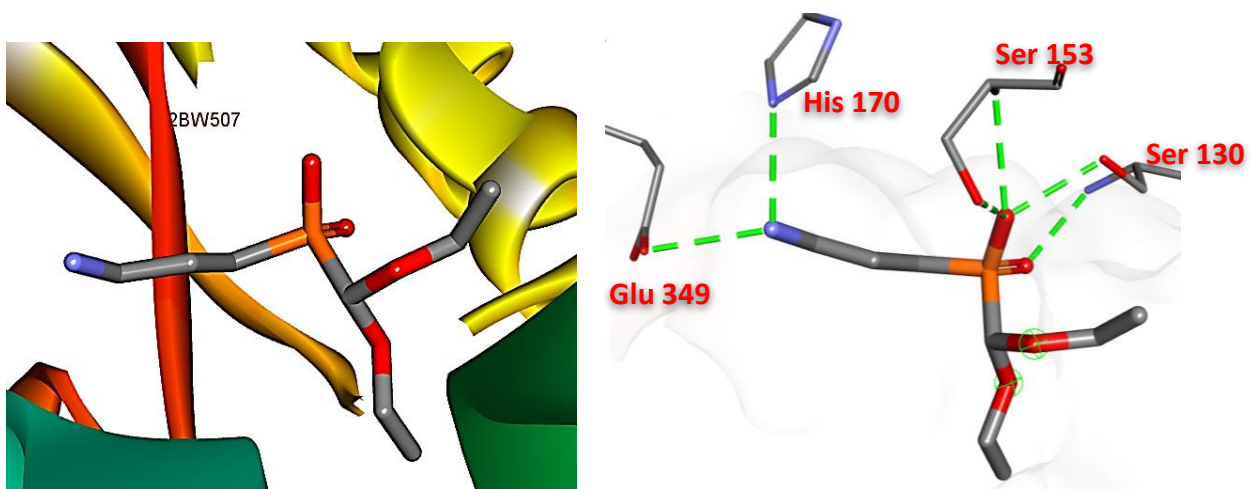


Figura 8. Estructura de CGP 35348 e Interacciones con el receptor GABA_B.

Durante la caracterización farmacológica del antagonista SCH 50911 código PDB: 4MR9, Figura 9 se determinó que es más potente en la inhibición de la unión de GABA sobre el receptor GABA_B en el cerebro de rata ($IC_{50}=1.1 \mu M$), así como otros ensayos clínicos.³¹ Adicionalmente, Carai y colaboradores,⁵³ estudiaron el efecto del antagonista en el receptor GABA_B, sobre la aparición de convulsiones en ratas dependientes de etanol que sufren el síndrome de abstinencia de etanol.

En 2007, Filip y colaboradores,⁵⁴ llevaron a cabo el estudio sobre el efecto del receptor GABA_B sobre la autoadministración inducida por cocaína y la discriminación de drogas.

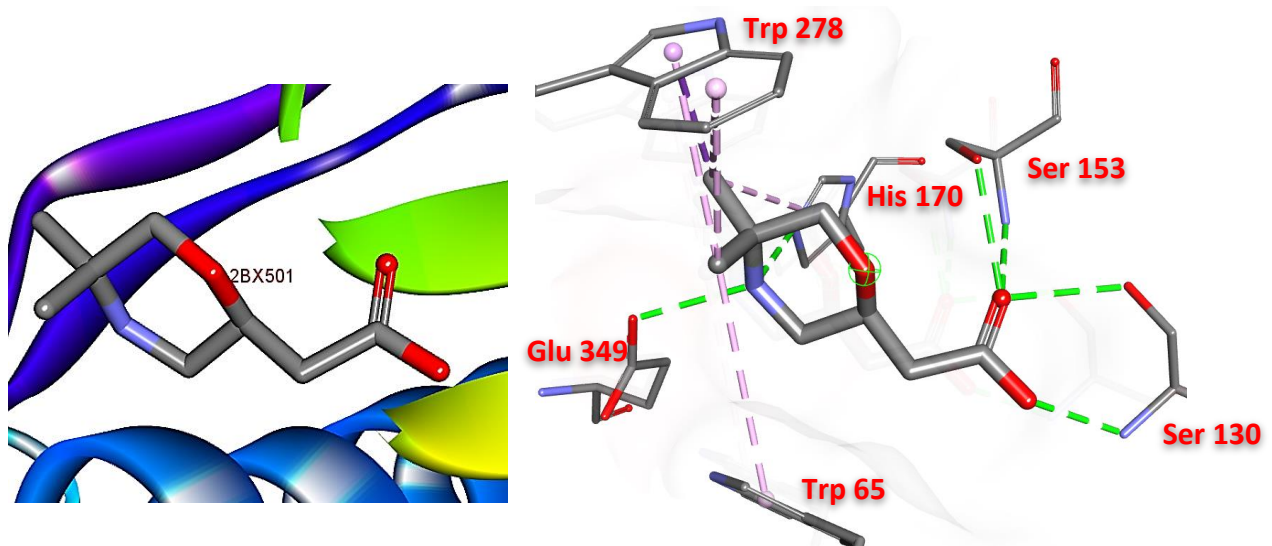


Figura 9. Estructura 3D del antagonista SCH 50911 e Interacciones con el receptor GABA_B.

(*R*)-Faclofen **50** es un análogo de (*R*)-Baclofen que tiene un reemplazo isostérico del grupo ácido carboxílico por el ácido fosfónico Figura 10, siendo un antagonista del receptor GABA_B código PDB: 4MRM. Allan⁵⁵ evaluó la capacidad de alterar los efectos conductuales del etanol mediante la pérdida del reflejo de enderezamiento, descoordinación motora, locomoción espontánea e hipotermia, dando buenos resultados en los efectos del etanol sobre la descoordinación motora, la actividad locomotora y la hipotermia.

Soltész y colaboradores⁵⁶ llevaron a cabo un estudio, donde Faclofen (0.5-1 mM) inhibió reversiblemente el potencial postsináptico inhibitorio (IPSP) tardía, resistente a bicuculina, dependiente de K⁺ registrada en células de proyección del núcleo geniculado lateral dorsal de gato y rata, y en neuronas piramidales CA1 del hipocampo de rata. Además, que en las mismas concentraciones Faclofen bloqueo reversiblemente la hiperpolarización insensible a la bicuculina dependiente de K⁺ evocada por el GABA y Baclofen.

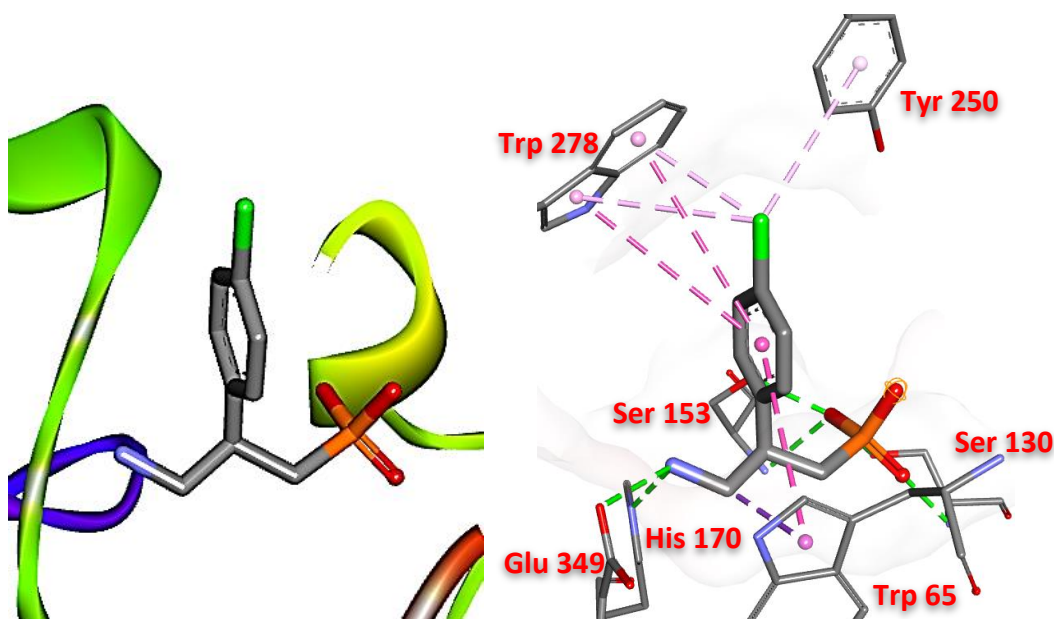


Figura 10. Estructura 3D e interacciones de Faclofen unido al receptor GABA_B.

Finalmente el antagonista CGP 46381 código PDB: 4MS1 (Figura 11) previno por completo el efecto sedante/hipnótico del ácido γ -hidroxibutírico (GHB).⁵⁷

En otro estudio realizado por Bexis y colaboradores,⁵⁸ se determinó que Baclofen tiene cierto potencial en el tratamiento de la abstinencia de opioides y que los receptores GABA_B pueden estar implicados en dicha abstinencia, estos resultados se obtuvieron dado que el antagonista revirtió los efectos ejercidos por Baclofen sobre los movimientos estereotipados de la cabeza, la ptosis y la pérdida de peso.

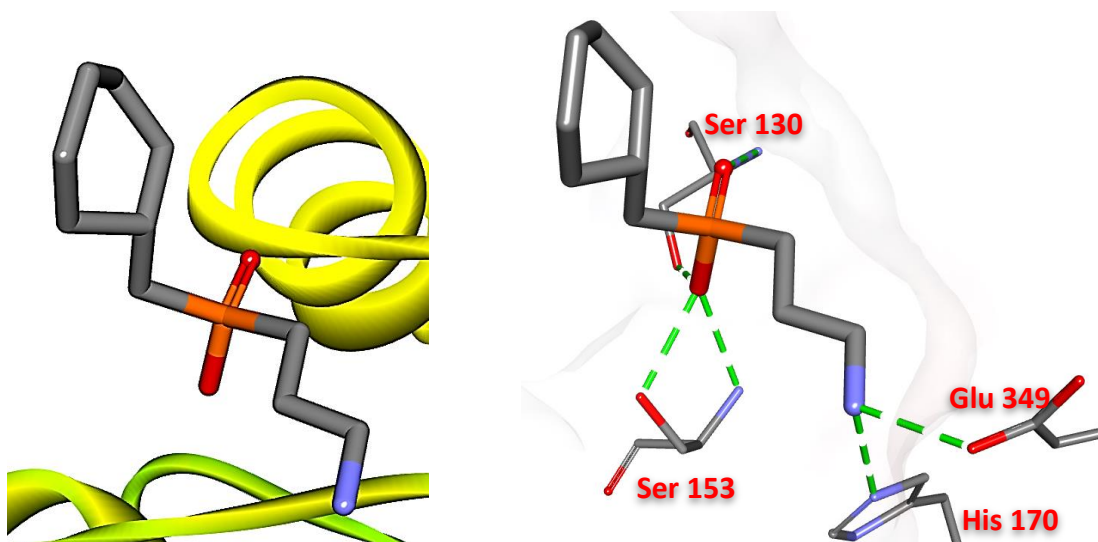
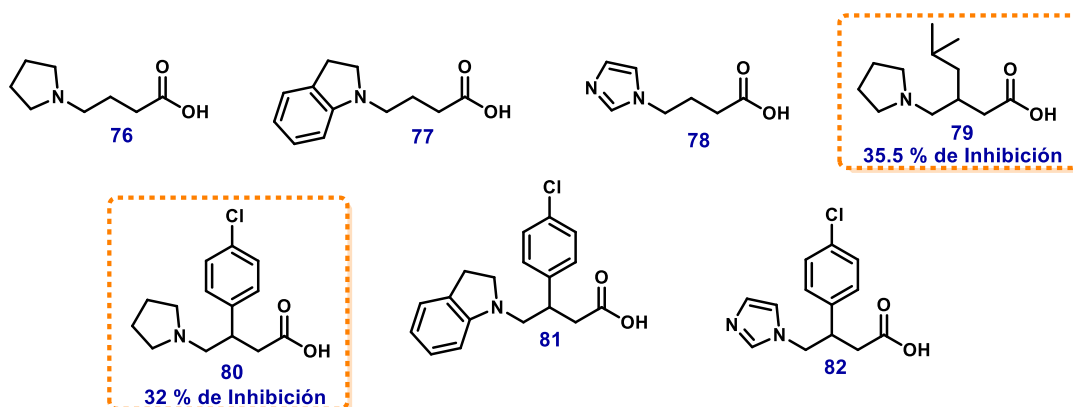


Figura 11. Estructura 3D e interacciones de CGP 46381 unido al receptor GABA_B.

2.4 Análogos de GABA y Baclofen sintetizados en el grupo de investigación.

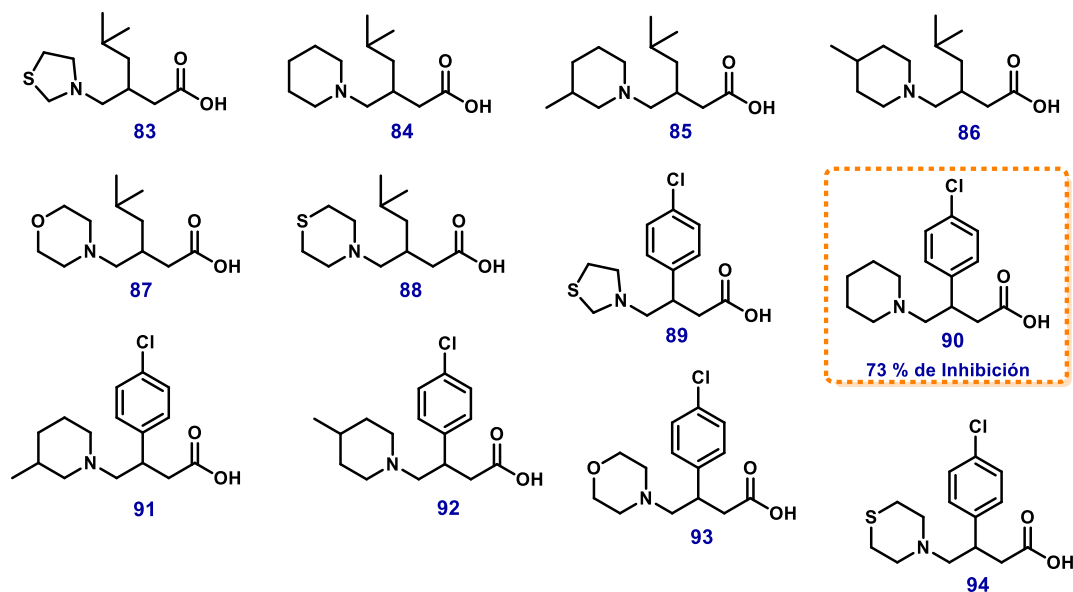
En nuestro grupo de investigación, existen antecedentes de la síntesis y diseño de análogos de GABA y Baclofen, donde destacan los diferentes sistemas de heterocíclicos, siendo estos de suma importancia para la síntesis medicinal.

Inicialmente, estos análogos se diseñaron como posibles inhibidores de la enzima GABA-AT, donde el átomo de nitrógeno en posición γ y está englobado en los diversos sistemas de heterocíclicos. En la primera generación de estos análogos se sintetizaron los compuestos **76-82**,⁵⁹ se reportó que los compuestos **79** y **80** presentaron actividad inhibitoria sobre la enzima GABA-AT del 35.5% y 32% respectivamente, Esquema 13.



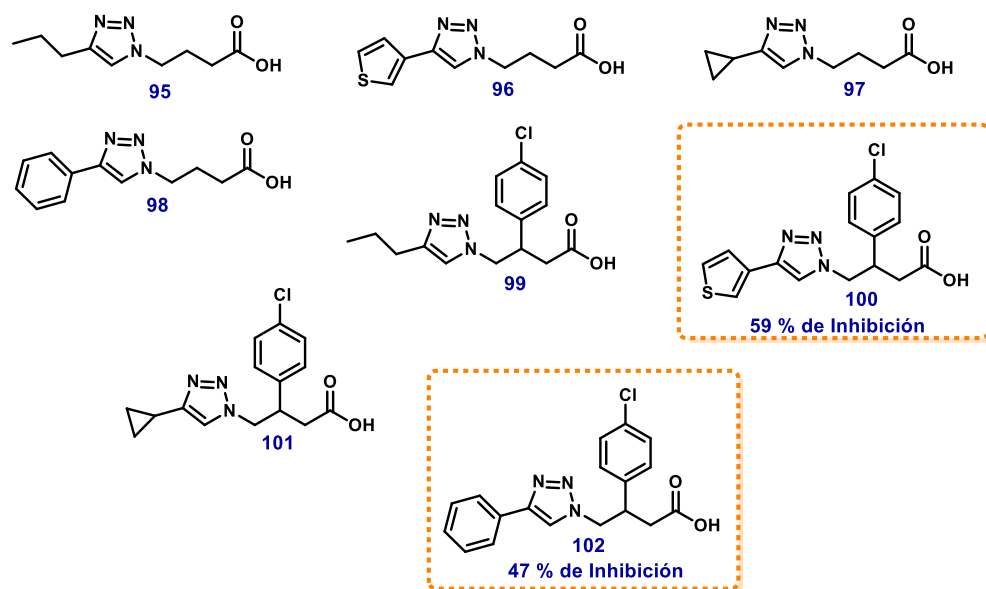
Esquema 13. Primera generación de análogos de GABA y Baclofen.

En cuanto a los análogos de GABA y Baclofen de segunda generación, en este caso se realizó el diseño y posteriormente la síntesis de los compuestos **83-94**,⁶⁰ los cuales presentaban similitudes estructurales con los análogos de la primera generación que presentaron un mejor perfil de inhibición a la enzima GABA-AT. Siendo el compuesto **90**, el que mostró una inhibición del 73 % sobre la enzima GABA-AT, Esquema 14.



Esquema 14. Segunda generación de análogos de GABA y Baclofen.

Para la tercera generación de análogos, se realizaron modificaciones al sistema del heterociclo empleado, donde ahora se sintetizaron anillos de triazol, obteniendo los compuestos **95-102**, siendo las moléculas **100** y **102** las que presentaron una mejor actividad en las pruebas de inhibición enzimática sobre GABA-AT, teniendo una inhibición del 43% y 59%,⁶¹ respectivamente Esquema 15.



Esquema 15. Análogos de GABA con sistemas de triazol.

3 DISEÑO *IN SILICO* DE ANÁLOGOS DE BACLOFEN

3.1 Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) es una técnica que emplea herramientas computacionales para el diseño y/u optimización de fármacos, para relacionar la actividad de un compuesto con su estructura química. Los objetivos principales del DIFAC son tres: descubrir moléculas activas, optimizar moléculas activas ya conocidas y seleccionar, de un grupo dado de estructuras, a los candidatos que tengan mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos, Figura 12. De esta manera, el uso de la computadora puede ayudar a descubrir y diseñar estructuras químicas que tengan las propiedades adecuadas para entrar en el proceso de desarrollo de un fármaco.

Las estrategias del DIFAC se dividen en dos partes principales:

- Diseño basado en la estructura del ligando.** Los métodos que agrupan en esta área se centran en el estudio de la estructura 3D del fármaco de referencia (SAR, modelado del farmacóforo y QSAR).
- Diseño basado en la estructura del receptor.** Los métodos que corresponden a esta estrategia consideran la estructura tridimensional del objetivo biológico (estructuras cristalográficas de rayos X o NMR) (Acoplamiento molecular (docking) y cribado virtual).

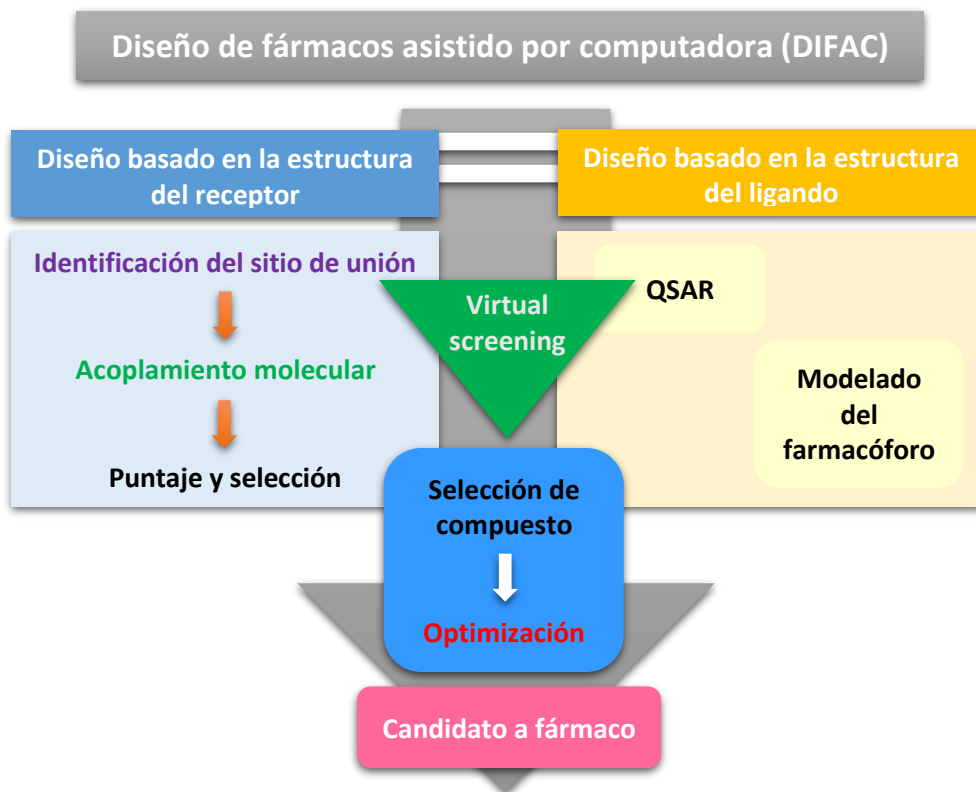


Figura 12. Descripción general del DIFAC.

Este proyecto está enfocado en el uso del acoplamiento molecular (docking molecular), por lo que a continuación se describe más a detalle esta herramienta computacional.

3.2 Acoplamiento molecular (Docking molecular)

El acoplamiento molecular (docking molecular) es una técnica de modelado molecular, la cual consiste en la predicción de las interacciones entre una proteína (enzima o receptor) y una molécula pequeña (ligando), mediante el empleo de un programa computacional, Figura 13. El acoplamiento se utiliza ampliamente para el estudio de interacciones y mecanismos biomoleculares, y se aplica al diseño de fármacos con base a su estructura.⁶²

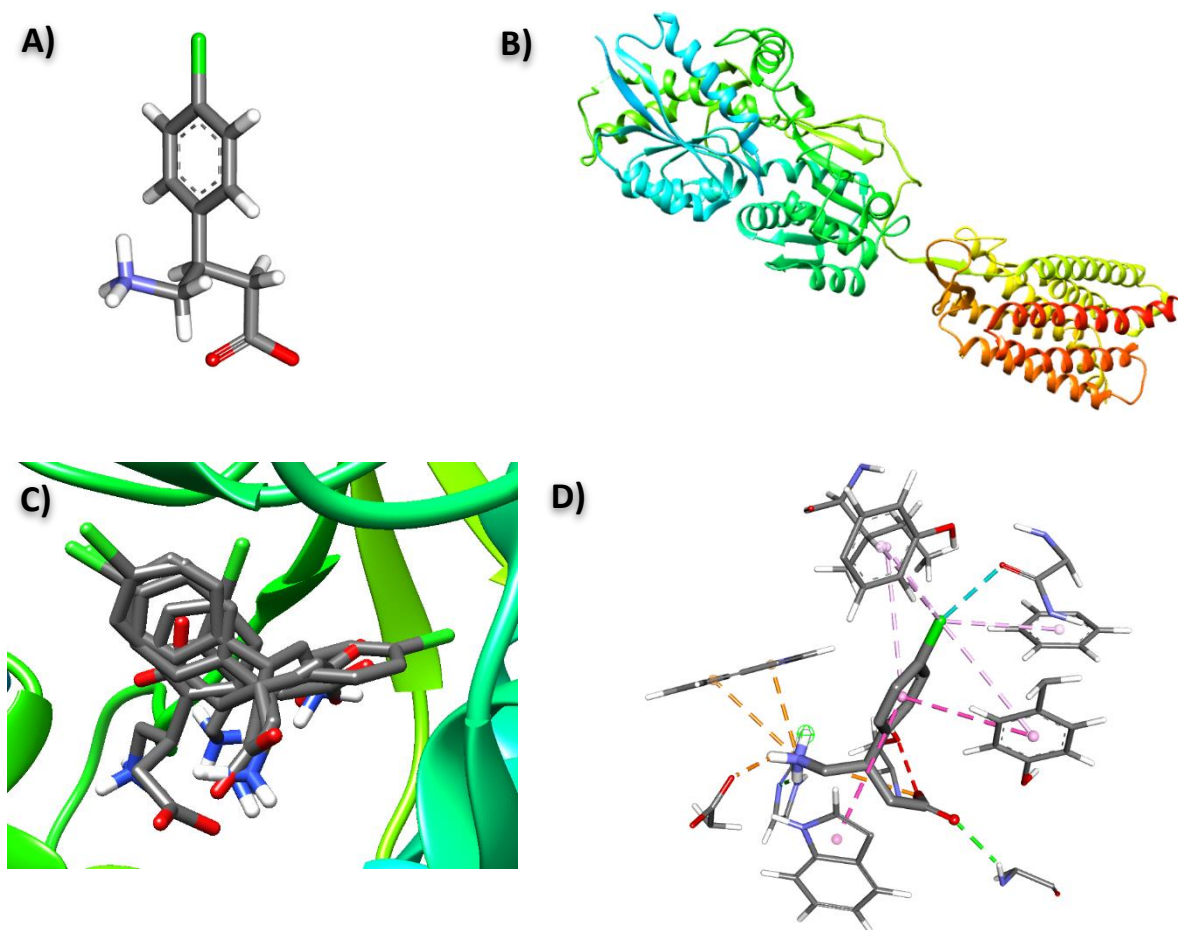


Figura 13. Proceso del acoplamiento molecular. **A)** Estructura tridimensional del ligando. **B)** Estructura tridimensional del receptor. **C)** El ligando se acopla en la cavidad de unión del receptor y se exploran las supuestas conformaciones. **D)** Se identifican la conformación de unión más probable y las interacciones intermoleculares correspondientes.

La identificación de las conformaciones de unión más probables requiere dos pasos:

- i. Exploración de un gran espacio conformacional que representa varios modos de unión potenciales.
- ii. Predicción precisa de la energía de interacción asociada con cada una de las conformaciones de unión predichas.

Además, los algoritmos de acoplamiento molecular ejecutan predicciones cuantitativas de la energía de unión, proporcionando clasificaciones de compuestos acoplados en función de la afinidad de unión de los complejos ligando-receptor. Este proceso se lleva a cabo de forma recursiva hasta converger a una solución de mínima energía.

Posteriormente, se desarrollaron programas basados en diferentes algoritmos para realizar estudios de acoplamiento molecular, lo que ha hecho del acoplamiento una herramienta cada vez más importante en la investigación farmacéutica.

Debido a esto, actualmente el acoplamiento proteína-ligando se clasifica de la siguiente manera:

- a) Acoplamiento rígido (el receptor y el ligando se mantienen rígidos).
- b) Acoplamiento con ligando Flexible (únicamente el receptor se mantiene rígido durante el experimento).
- c) Acoplamiento flexible (el receptor y el ligando se mantienen flexibles).

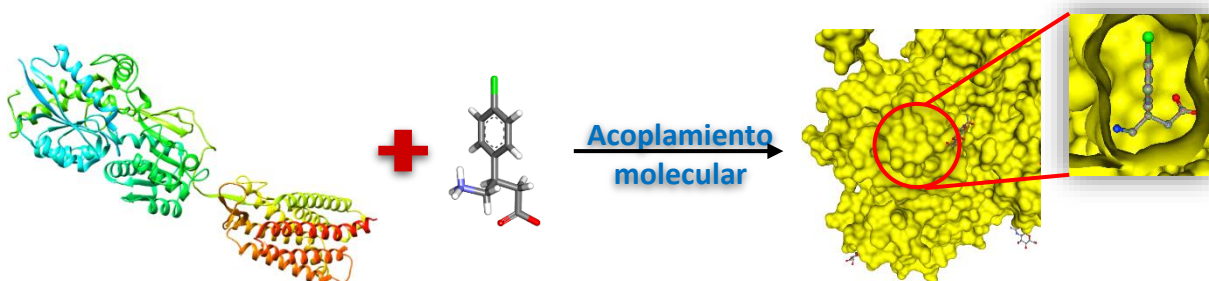


Figura 14. Esquemización del modelo receptor-ligando.

Los programas de acoplamiento molecular utilizan funciones de puntuación para estimar la energía de unión de los complejos ligando-receptor predichos. La variación de energía, debido a la formación de la estructura ligando-receptor, viene dada por la constante de unión (K_d) y la energía libre de Gibbs (ΔG_L) o la ecuación de Arrhenius.⁶³

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Ecuación de la Energía libre de Gibbs

$$\Delta G = -RT \log k$$

Ecuación de Arrhenius

Las funciones de puntaje del docking se pueden clasificar en dos grandes categorías:

1. Aproximación empírica. Se basa en un campo de fuerza.

Las funciones de puntuación basadas en el campo de fuerza estiman la energía de enlace sumando las contribuciones de los términos enlazados (estiramiento del enlace, flexión del ángulo y variación diédrica) y no enlazados (interacciones electrostáticas y de van der Waals) en una función maestra general. Este tipo de función de puntuación aplica un método ab initio para calcular la energía asociada con cada término de la función utilizando las ecuaciones de la mecánica clásica. Una limitación importante de los métodos basados en campos de fuerza es su inexactitud para estimar las contribuciones entrópicas. Esta deficiencia se debe a la falta de un modelo físico razonable para describir este fenómeno. Además, el disolvente no se considera explícitamente, lo que dificulta la estimación de las energías de desolvatación.⁶³

$$E_{total} = E_{vdw} + E_{es} + E_{hb} + E_{torsional} + E_{desolvatación} + E_{.....}$$

2. Aproximación basada en el conocimiento. Las energías son calibradas de acuerdo con cada par atómico.

Se usan análisis estadísticos de complejos 3D de PBD y en la búsqueda de encontrar una contribución energética ΔW de cada par de átomos interactuantes entre la proteína y el ligando.

En cuanto a los algoritmos de búsqueda que emplean los programas de acoplamiento molecular se clasifican en:

1. **Métodos de emparejamiento basados en características.** Emplea técnicas visuales para emparar características de complementariedad en las moléculas.
2. **Métodos de búsqueda paso a paso.** Explora el espacio guiado por la función de scoring.
 - Es guiado por la función de puntaje.
 - Usa dos componentes. Un módulo de posicionamiento y un módulo de puntaje.
 - El algoritmo de búsqueda puede ser exhaustivo (fuerza bruta). Van a encontrar la mejor solución.
 - El algoritmo de búsqueda con pruebas al azar se llama método estocástico. No se garantiza obtener la mejor pose, método heurístico.

3.3 Estudio *in silico* de la farmacocinética

El método más rápido para evaluar las propiedades farmacológicas de un compuesto es aplicar "reglas". Las reglas son un conjunto de pautas para las propiedades estructurales de los compuestos que tienen una mayor probabilidad de ser bien absorbidos después de la dosificación oral. Los valores de las propiedades asociadas con las reglas se cuentan rápidamente a partir del examen de la estructura o se calculan utilizando un software ampliamente disponible.⁶⁴ A continuación, se abordarán las reglas de Lipinski y Veber siendo estas las más frecuentes en el diseño de fármacos.

3.3.1 Reglas de Lipinski

Las reglas se hicieron más prominentes y definidas en el campo con el informe de Lipinski de la "regla de los 5", o lo que se conoce como las "reglas de Lipinski". Estas reglas son un conjunto de valores de propiedad que se derivaron de la clasificación de las propiedades fisicoquímicas clave de compuestos similares a fármacos. Las reglas se utilizaron en Pfizer durante algunos años antes de su publicación y desde entonces se han utilizado ampliamente. El impacto de estas reglas en el campo ha sido muy alto. Esta aceptación se puede atribuir a muchos factores:

Es más probable una mala absorción o permeación cuando:

- ✚ >5 donantes de H (la suma de todos los OH y NH)
- ✚ PM >500
- ✚ LogP >5 (MlogP >4.15)
- ✚ >10 aceptores de enlaces de H (la suma de todos los N y O)

Aunque la "violación" de una regla puede no resultar en una absorción deficiente, la probabilidad de una absorción deficiente aumenta con la cantidad de reglas que se rompen y el grado en que se exceden.

3.3.2 Reglas de Veber

Adicionalmente las reglas que propone Veber y colaboradores. Estudiaron las propiedades estructurales que aumentan la biodisponibilidad oral en ratas. Llegaron a la conclusión de que la flexibilidad molecular, el área de superficie polar (PSA) y el recuento de enlaces de hidrógeno son determinantes importantes de la biodisponibilidad oral. Los enlaces rotativos se pueden contar manualmente o mediante programas. El PSA se calcula mediante programas y está estrechamente relacionado con los enlaces de hidrógeno.⁶⁴

- ✚ ≤10 Enlaces rotables.
- ✚ ≤140 Å² PSA o ≤12 enlaces de hidrógenos totales.

El análisis de los descriptores moleculares de los antagonistas reportados en la literatura

contra las mismas propiedades de GABA, sirvió para determinar los rangos que hay entre cada uno de ellos y se muestran en la Tabla 2.



Tabla 2. Descriptores moleculares de GABA y diferencias de los antagonistas del receptor GABA_B.

	Compuesto	LogP	LogD	V	# átomos (total)	PM	Dipolo molecular	TPSA
	GABA*	-3.46	-3.46	101.84	16	103.121	26.19	67.77
Baja Afinidad	R-Faclofen	-0.03	-0.03	99.13	12	146.51	1.85	20.23
	Saclofen	4.36	4.36	211.67	10	130.59	1.78	0
	2-hidroxisaclofeno	2.12	2.12	222.64	11	146.59	-0.95	20.23
	SCH 50911	0.21	0.21	190.56	11	70.10	-0.71	-1.8
	CGP 35348	2.2	2.2	282.66	18	122.104	-3.91	18.46
	CGP 46381	2.34	2.34	281.23	20	116.144	1.6	0
	CGP 36742	1.65	1.65	221.47	13	76.08	1.52	0
	CGP 36216	0.78	0.78	160.28	7	48.025	1.49	0
CGP 51176	1.8	1.8	289.25	21	132.143	-0.29	20.23	
Alta Afinidad	CGP 52432	5.26	5.26	455.52	31	281.11	-3.68	7.43
	CGP 54626	5.27	5.27	489.32	37	305.18	-2.06	9.2
	CGP 55845	6.19	6.19	464.22	33	297.16	-1.03	-11.03
	CGP 61334	3.74	3.74	458.66	34	256.24	-2.52	44.73
	CGP 56433	3.75	3.75	492.02	40	280.304	-0.07	46.5
	CGP 56999	3.75	3.75	492.55	40	280.304	1.25	46.5
	CGP 62349	3.38	3.38	494.37	38	304.29	0.2	55.73
	[³ H]-CGP 62349	3.38	3.38	494.37	38	310.306	0.2	55.73
	[¹¹ C]-CGP 62349	3.38	3.38	494.37	38	303.282	0.2	55.73
	CGP 71982	3.81	3.81	469.63	38	278.29	-0.18	35.5
	CGP 76290	3.81	3.81	468.45	38	278.29	-1.48	35.5
	CGP 76291	3.81	3.81	469.63	38	278.29	1.16	35.5
	CGP 71872	-1.38	-1.38	677.14	50	536.283	0.8	110.7
	CGP 64213	-1.6	-1.6	642.71	48	495.27	6.34	81.26
	CGP 84963	6.85	6.85	1560.74	137	1105.06	-19.1	270.13

*Valores reales de los descriptores moleculares de GABA.

3.3.2 Relación de la penetración de la estructura BBB.

Las propiedades fisicoquímicas afectan en gran medida la permeación de la BBB transcelular pasiva del compuesto. Los estudios han demostrado las siguientes propiedades estructurales son clave para el descubrimiento de fármacos del SNC.

-  Enlaces de Hidrógenos (aceptores y donadores).
-  Lipofilicidad

- ✚ Área superficial polar (PSA).
- ✚ Peso molecular (PM).
- ✚ Acidez.

Estas propiedades son más restrictivas en la BBB que en la mayoría de las otras barreras de membrana del cuerpo. Como grupo, los fármacos comerciales del SNC en comparación con los fármacos que no son del SNC tienen menos donantes de enlaces de hidrógeno, un LogP más alto, un PSA más bajo y menos enlaces rotativos. Pardridge propuso por primera vez un conjunto de reglas fisicoquímicas de BBB. La estructura debe tener lo siguiente:⁶⁵

- ✚ Enlace de hidrogeno (total) <8-10
- ✚ PM <400-500
- ✚ No ácidos.

Spraklin sugiere donantes de enlaces H<2 y aceptores de enlaces H<6. Esto está de acuerdo con el consenso general de que los donantes de enlaces H son más limitantes que los aceptores de enlaces H.⁶⁵

Clark y Lobell⁶⁵ compilaron otro conjunto de reglas de BBB. La estructura debe tener lo siguiente:

- ✚ $N + O < 6$
- ✚ $PSA < 60-70 \text{ \AA}^2$.
- ✚ $PM < 450$
- ✚ $\text{Log } D = 1-3$
- ✚ $\text{ClogP}-(N+O) > 0$

Estas reglas son útiles para evaluar la permeabilidad de BBB antes de la síntesis, evaluar los compuestos que se incorporan a un proyecto (por ejemplo, socio de la alianza), diagnosticar una penetración cerebral in vivo deficiente y orientar qué modificaciones estructurales podrían mejorar mejor la permeabilidad de BBB de una serie de pistas de descubrimiento.

4 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación está enfocada en el diseño *in silico* de nuevos derivados de 1,2,4-oxadiazol mediante el uso de herramientas computacionales para el diseño de fármacos en función al ligando, las cuales hoy en día son de gran importancia para la generación de nuevos fármacos. Estas herramientas computacionales minimizan el tiempo y los recursos empleados en el diseño tradicional de fármacos. A su vez, gracias al avance de las ciencias de la computación y en las teorías de la mecánica cuántica, los resultados obtenidos por estas herramientas son más confiables.

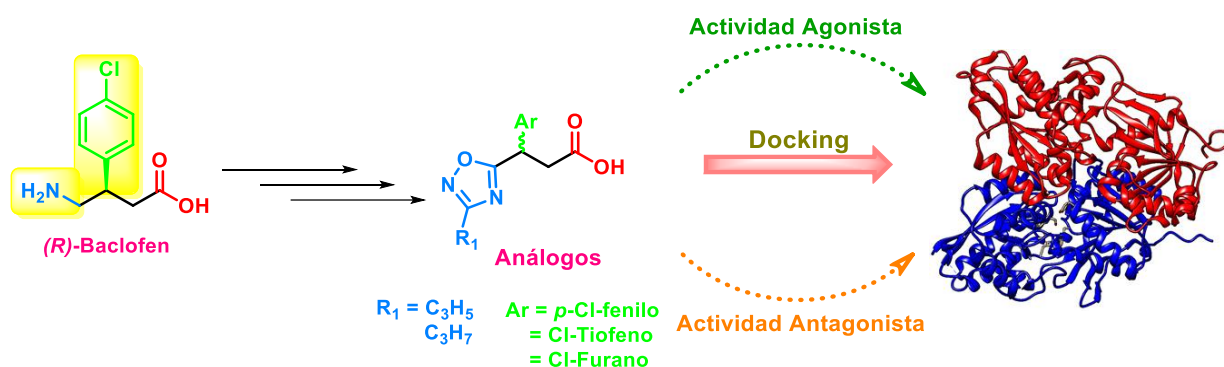
Los receptores GABA_B están asociados a una gran diversidad de trastornos neurológicos y psiquiátricos. Su activación está asociada al tratamiento de la espasticidad muscular y su inactivación con el tratamiento empleado en problemas a la adicción al alcohol, por mencionar algunas. Debido a lo anterior la búsqueda de compuestos con actividad biológica es de gran interés en la industria y académica.

Dentro de la búsqueda de compuestos activos sobre este receptor se encuentra el (*R*)-Baclofen que tiene un efecto agonista, y se ha utilizado como andamio estructural para el diseño y búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos sobre este receptor. En el grupo de investigación nos hemos especializado en el diseño y síntesis de compuestos biológicamente activos, en específico, englobando el grupo amino de GABA y Baclofen en anillos heterociclos. En este trabajo se propone el uso del anillo de oxadiazol como heterociclo debido a sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, para la generación de potenciales compuestos biológicamente activos del receptor GABA_B.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Diseño y análisis *in silico* de la probable actividad biológica sobre el receptor GABA_B de los derivados de 1,2,4-oxadiazol **103a-i**, Esquema 16.



Esquema 16. Diseño *in silico* de análogos de (R)-Baclofen con sistemas 1,2,4-oxadiazoles.

5.2 Objetivos Específicos.

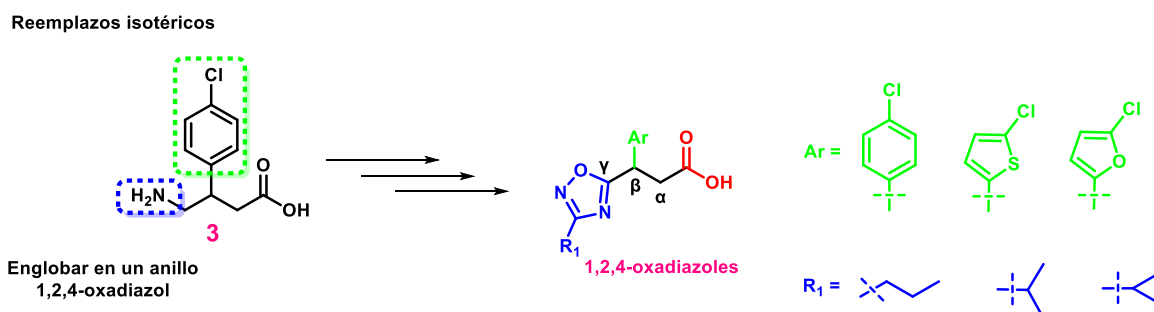
- I. **Análisis de descriptores moleculares:** Cálculo de descriptores moleculares asociados a las propiedades farmacocinéticas de los compuestos **103a-i**.
- II. **Análisis de la diana terapéutica:** Análisis estructural del receptor GABA_B y la determinación de sus descriptores moleculares y obtención de los modos normales.
- III. **Acoplamiento molecular:** acoplamiento molecular de los derivados de 1,2,4-oxadiazol con diferentes conformaciones del receptor GABA_B.
- IV. Análisis de resultados y propuesta de candidatos finales.

6 DISEÑO DE LOS ANÁLOGOS DE (R)-BACLOFEN EN BASE AL LIGANDO.

Para el diseño de los derivados de 1,2,4-oxadiazol **103a-i** como análogos de (R)-Baclofen se realizó en base al antecedente del modelo QSAR llevado a cabo en el grupo de investigación. El cual consistió emplear diversos análogos de Baclofen y agonistas reportados en la literatura con diversas estructuras, donde se identificaron características estructurales y electrónicas que están relacionadas con la actividad. Destacando englobar al átomo de nitrógeno en un heterociclo como lo es el anillo 1,2,4-oxadiazol con fin de que la interacción con el residuo *Trp 278* sea menos fuerte, ya que esta reduce la potencia de los compuestos como agonistas del receptor GABA_B.⁶⁶

En cuanto al resto de la estructura de los compuestos **103a-i**, se mantuvo al grupo del ácido carboxílico, por otra parte, la modificación del sustituyente aromático en la posición β y la adición de sustituyentes alifáticos en el anillo de oxadiazol, es con el fin de favorecer la lipofilia de las moléculas.

Con base en lo anterior, se diseñaron los análogos **103a-i**, teniendo como sustituyentes aromáticos en la posición β a *p*-Clorofenilo, 5-Clorotiofeno y 5-Clorofurano, los sustituyentes R₁ en el anillo de oxadiazol son: *n*-propilo, isopropilo y ciclopropilo, Esquema 17.

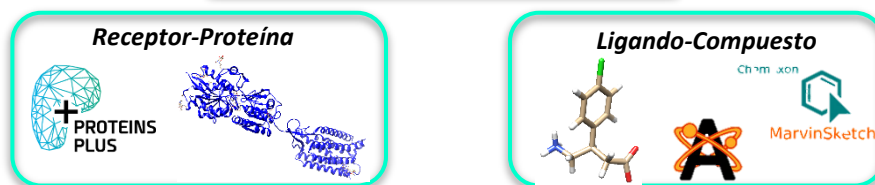


Esquema 17. Diseño de los análogos de Baclofen en base al ligando. Análogos de Baclofen **103a-i** con anillos de 1,2,4-oxadiazol.

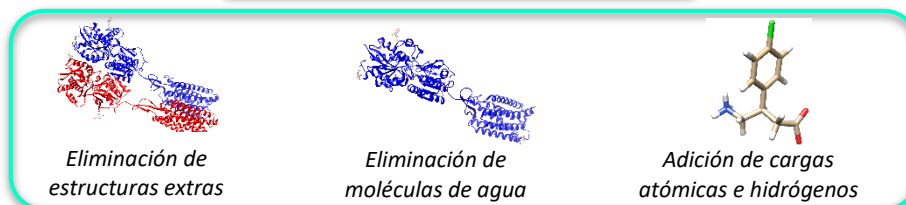
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto se llevo a cabo el diseño *in silico* de los análogos de baclofeno con estructura 1,2,4-oxadiazol **103a-i**, con el fin de determinar su posible actividad con el receptor GABA_B. A continuación se muestran los diversos pasos que se llevaron a cabo para el diseño *in silico* de los análogos de (R)-Baclofen con los sistemas 1,2,4-oxadiazoles, Figura 15.

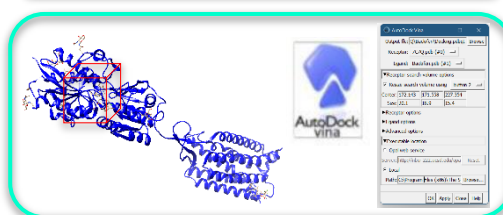
1. Obtención de estructuras



2. Preparación de estructuras



3. Identificación del sitio de unión



4. Resultados y visualización de las interacciones de los complejos

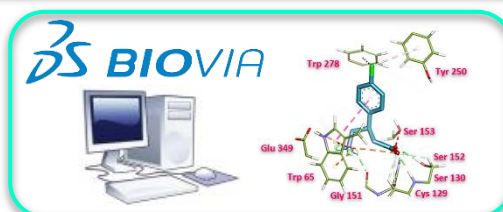


Figura 15. Metodología del diseño *in silico*.

7.1 Análisis de los descriptores

Posteriormente se determinaron los descriptores de los compuestos **103a-i**, siendo uno de ellos, la lipofilidad es una propiedad que tiene un efecto importante sobre las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/Tox), así como sobre la actividad farmacológica. La lipofilidad se ha estudiado y aplicado como una propiedad importante de un fármaco durante décadas. Puede medirse o calcularse rápidamente. La lipofilidad se ha correlacionado con muchas otras propiedades, como solubilidad, permeabilidad, metabolismo, toxicidad, unión a proteínas y distribución.⁶⁴

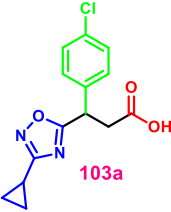
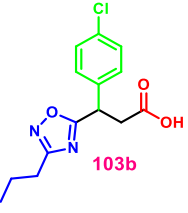
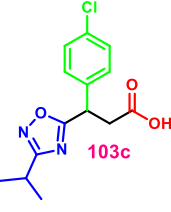
Para la obtención de los valores teóricos de lipofilidad, se emplearon diferentes programas y servidores con fin de realizar comparaciones debido a que todos emplean diferentes algoritmos de cálculo, finalmente se utilizaron el programa MarvinSketch y el servidor de libre acceso Molinspiration.

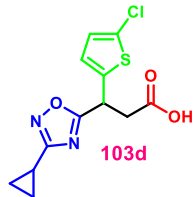
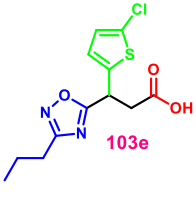
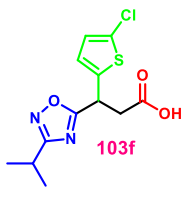
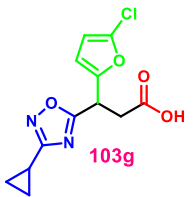
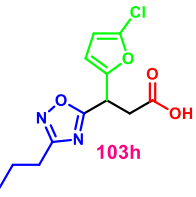
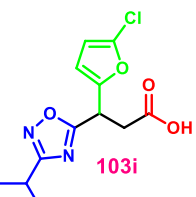
Además, se determinaron y analizaron otras propiedades moleculares de los compuestos diseñados, los cuales fueron basados en las reglas de Lipinski, las cuales consisten en que los compuestos tendrán una mayor probabilidad de ser permeable en las membranas y absorbido fácilmente por el cuerpo si cumplen con los siguientes criterios:

- ✚ Coeficiente de partición (LogP) < 5.
- ✚ Peso molecular < 500 uma.
- ✚ No más de 5 donadores de enlaces Hidrógenos.
- ✚ No más de 10 aceptores de enlaces de Hidrógenos.

En la Tabla 3 se pueden apreciar los valores teóricos de LogP y los valores correspondientes a los criterios basados en las reglas de Lipinski de los compuestos diseñados **103a-i**.

Tabla 3. Valores teóricos de LogP y otros descriptores.

Molécula	PM (g/mol)	LogP	Donadores de H	Aceptores de H
 103a	294.74	0.04	1	5
 103b	294.74	0.38	1	5
 103c	294.74	0.55	1	5

 103d	298.74	-0.21	1	5
 103e	298.74	0.13	1	5
 103f	298.74	0.29	1	5
 103g	282.68	-1.39	1	6
 103h	282.68	-1.06	1	6
 103i	282.68	-0.89	1	6

De acuerdo con los valores teóricos obtenidos de LogP de los compuestos **103a-i**, se puede apreciar que los compuestos **103a**, **103b**, **103c**, **103e** y **103f** presentarían una mejor lipoficidad con referencia al de Baclofen (LogP= -1.33). Y en cuanto a los criterios de Lipinski, todos los compuestos cumplen con las reglas previamente mencionadas, tanto en

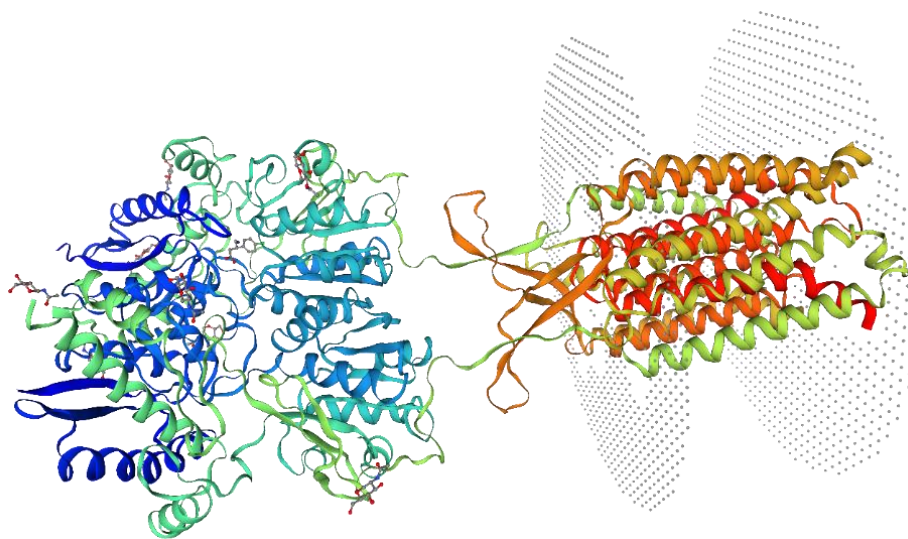
el número sugerido grupos de donadores y aceptores de hidrógeno, y en el peso molecular estos son menores a 500 uma.

7.2 Análisis de la diana terapéutica.

Una vez conocidas las dianas terapéuticas a analizar, se procedió a realizar el análisis de las diferentes estructuras cristalinas de nuestro blanco biológico (Receptor GABA_B) y los ligandos de interés (Baclofen y el antagonista SCH 50911).

Los códigos PDB de los cristales que se analizaron son los siguientes: 7C7Q (Estructura crio-em del receptor GABA_B humano unido a baclofeno/BHFF en estado activo, Figura 16A), 4MS4 (Estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B humano unido al agonista Baclofen, Figura 16B) y 4MR9 (Estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B humano unido al antagonista SCH50911, Figura 16C), a los cuales se les determinó la cavidad mediante el uso del servidor *Protein plus* y además de las diferentes propiedades fisicoquímicas.

A)



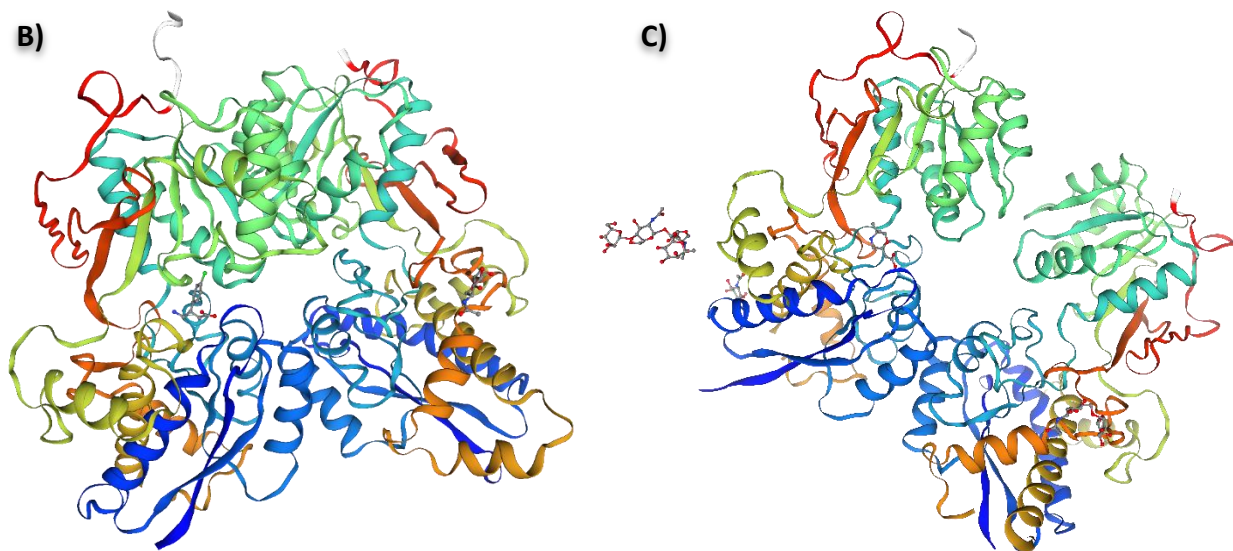
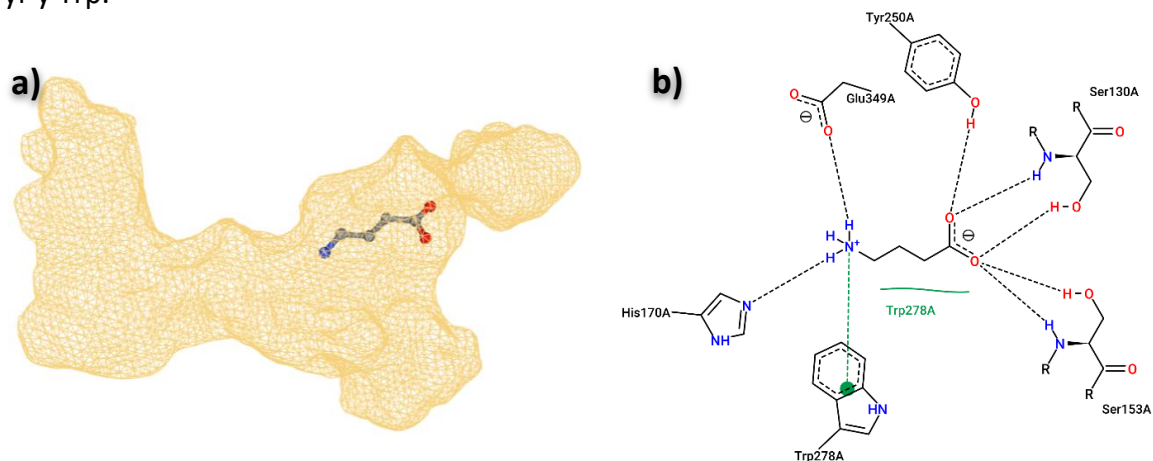


Figura 16. **A)** Estructura crio-em del receptor GABA_B humano unido a Baclofen/BHFF en estado activo. **B)** Estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B humano unido al agonista Baclofen. **C)** Estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B humano unido al antagonista SCH50911.

Posteriormente se llevó a cabo la generación de las cavidades en el servidor *protein plus* de los siguientes cristales: 4MS3, 4MS4, 4MR8, 4MR9, 4MRM y 7C7Q y los esquemas 2D de las interacciones con los residuos de aminoácidos del receptor GABA_B.

En primer lugar, se generaron las cavidades de los cristales 4MS3 (agonista endógeno, Figura 17a), 4MS4 y 7C7Q, estas fueron generadas en el sitio de unión de sus respectivos ligandos, además se pueden apreciar las diferentes formas y tamaños que tienen, esto es debido al tamaño del ligando.

En cuanto al análisis de las interacciones de los ligandos (GABA y Baclofen), en el grupo amino se aprecian las interacciones con los aminoácidos: His, Trp y Glu; para el grupo carbonilo: Tyr, Ser130 y Ser153; para la cadena de GABA y el *p*-clorofenilo en Baclofen: Trp, Tyr y Trp.



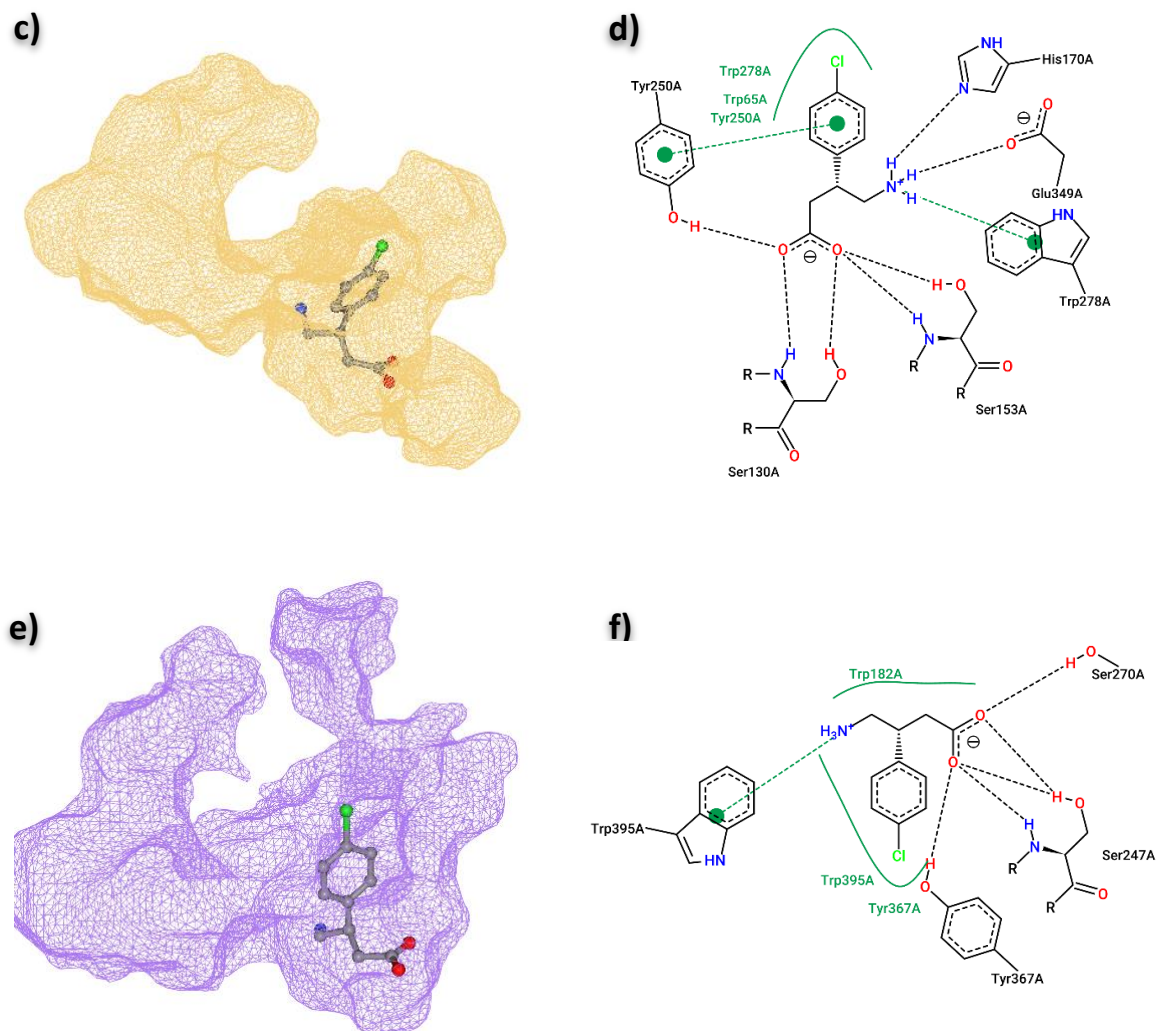


Figura 17. Cavidades generadas de los cristales 4MS3, 4MS4 y 7C7Q.

Después se generaron las cavidades de los cristales: 4MR8, 4MR9 y 4MRM correspondientes a los antagonistas: CGP 35348, SCH 50911 y Faclofen respectivamente, Figura 18. El análisis de estas cavidades sirvió de comparativa entre los antagonistas analizados, ya que estos varían en cuanto a tamaño, además de resaltar las interacciones de los aminoácidos característicos que puedan poseer los antagonistas en comparación con los agonistas del receptor GABA_B.

Adicionalmente, se obtuvo el esquema 2D de las interacciones con los residuos de aminoácidos que poseen estos antagonistas son: His, Glu, Ser130, Ser153 y Trp.

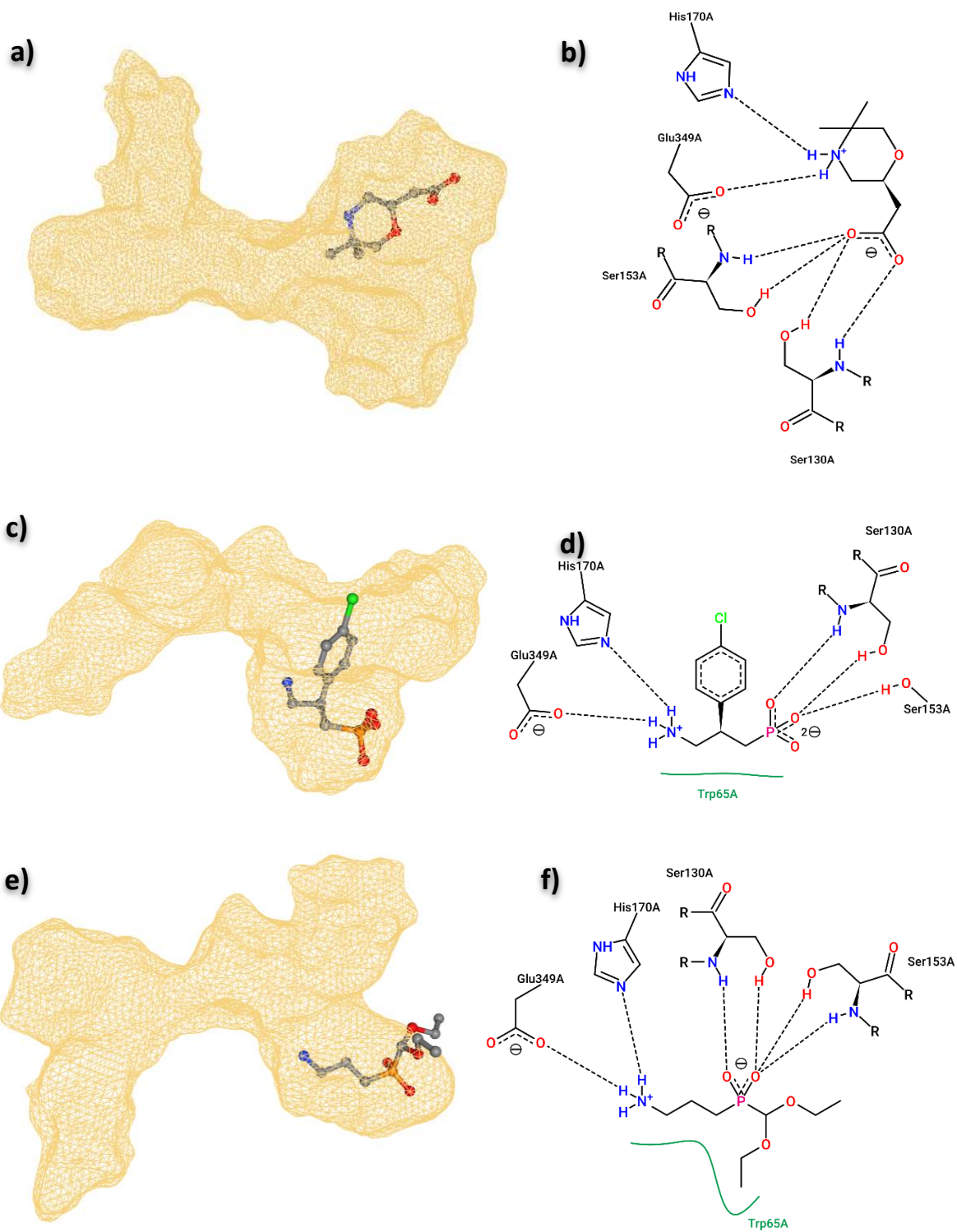


Figura 18. Cavidades generadas de los cristales 4MR9, 4MRM y 4MR8 y sus respectivos esquemas 2D.





La información obtenida de las seis cavidades se muestra en la Tabla 4, en donde se puede apreciar las variaciones que hay entre ellas, como es el caso de los cristales 4MS4 y

7C7Q, dado que ambos cristales poseen el mismo el ligando. Entre las variaciones que se pueden destacar son: volumen, profundidad, superficie e hidrofobicidad, en específico para los cristales 4MS4 y 7C7Q.

Tabla 4. Cálculos correspondientes a los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.

Código PDB	Método	Drug Score	Volumen Å ³	Profundidad Å	Superficie Å ²	Hidrofobicidad
4MS3	Difracción de rayos X	0.85	775.62	23.29	880.22	0.36
4MS4	Difracción de rayos X	0.8	997.03	22.93	1051.28	0.30
7C7Q	Microscopia de electrones	0.81	1111.71	24.45	994.27	0.20
4MR9	Difracción de rayos X	0.84	932.63	23.71	1111.13	0.50
4MRM	Difracción de rayos X	0.84	870.6	22.93	1018.42	0.42
4MR8	Difracción de rayos X	0.84	895.62	23.12	985.86	0.46

Como parte del análisis realizado en cada uno de los cristales, se procedió a la generación de las siguientes superficies mediante el uso del programa *Discovery studio visualizer*⁶⁷ para la determinación y análisis de las interacciones se empleó el servidor *protein-ligand interaction profiler* (PLIP):

-  Superficies Hidrofóbicas.
-  Superficies de enlace de Hidrógeno.
-  Superficies Electroestáticas.
-  Superficies Aromáticas.

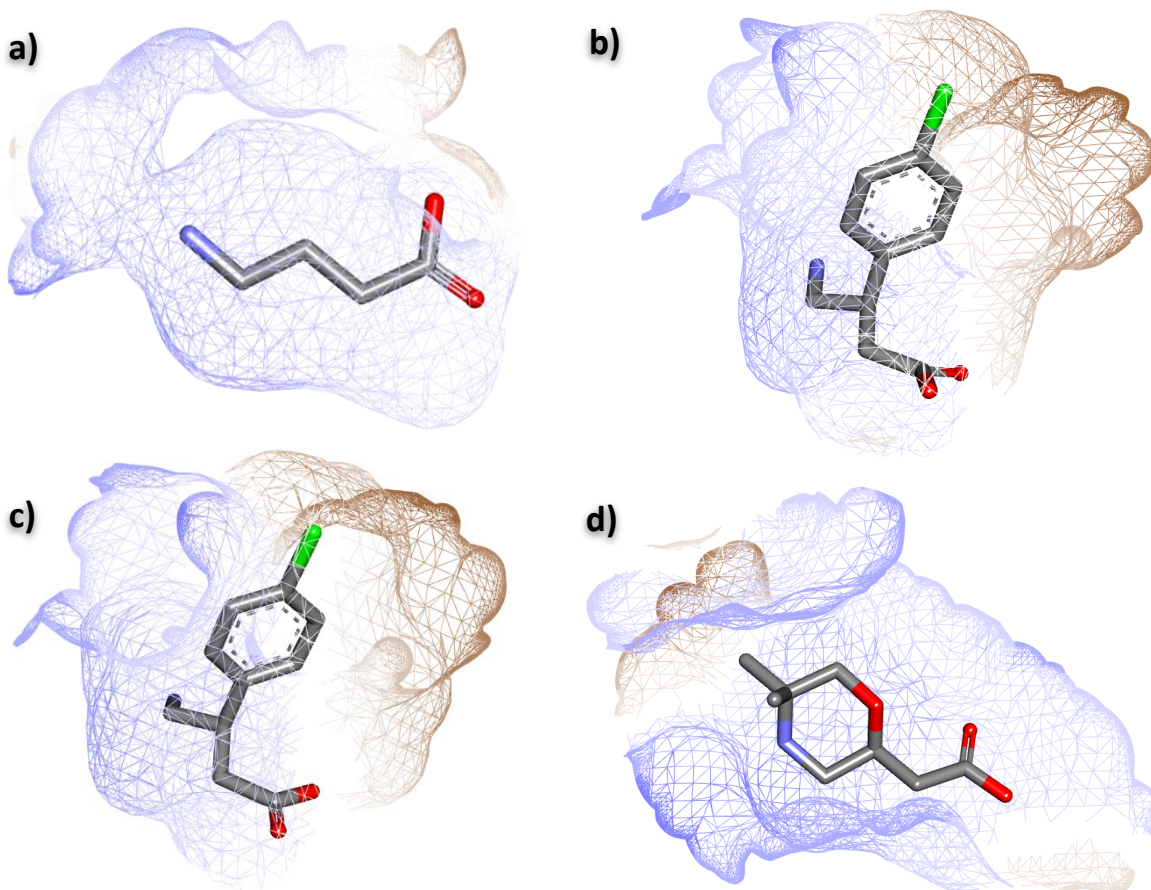
Este análisis fue de gran importancia para el conocimiento de las características de cada uno de los residuos de aminoácidos que interactúan con los ligandos: GABA, Baclofen, SCH 50911, Faclofen y CGP 35348 a continuación, se irán desglosando cada una de ellas.

7.2.1 Superficies Hidrofóbicas

El análisis de las interacciones hidrofóbicas se realizó en las seis cavidades anteriormente generadas, siendo de gran importancia dado que son la principal fuerza impulsora de las interacciones fármaco-receptor.⁶⁸ En las superficies de las cavidades correspondientes, la parte más hidrofóbica o menos polares es representada de color café y la menos hidrofóbica o más polares en color azul, Figura 19.

Para el análisis de los cristales 4MS3, 4MS4 y 7C7Q, se pueden apreciar las áreas hidrofóbicas de las superficies de las cavidades de cada cristal, además de los residuos de aminoácidos y sus respectivas distancias, con los cuales pueden formar interacciones hidrofóbicas son los siguientes: Trp 65 (3.77 Å) y Trp 278 (3.71 y 3.98 Å) para el cristal 4MS3 (Figura 19a); Trp 65 (3.74 Å), Trp 65 (3.72 Å), Tyr 250 (3.86 Å), Tyr 250 (3.50 Å), Ile 276 (3.99 Å) y Trp 278 (2.79 Å) para el cristal 4MS4 (Figura 19b). En cuanto al cristal 7C7Q (Figura 19c), las interacciones de este tipo que se destacan son con los siguientes aminoácidos: Trp 182 (3.50 Å) y Trp 395 (3.83 Å).

Y finalmente para el análisis de las superficies de las cavidades de los antagonista SCH 50911, Faclofen y CGP 3538 las interacciones hidrofóbicas destacables son: Trp 65 (3.74 Å) y Trp 278 (3.99 Å) para el cristal 4MR9 (Figura 19d); Trp 65 (3.97 Å) para el cristal 4MRM (Figura 19e) y para el cristal 4MR8: Val 201 (3.83 Å), Figura 19f.



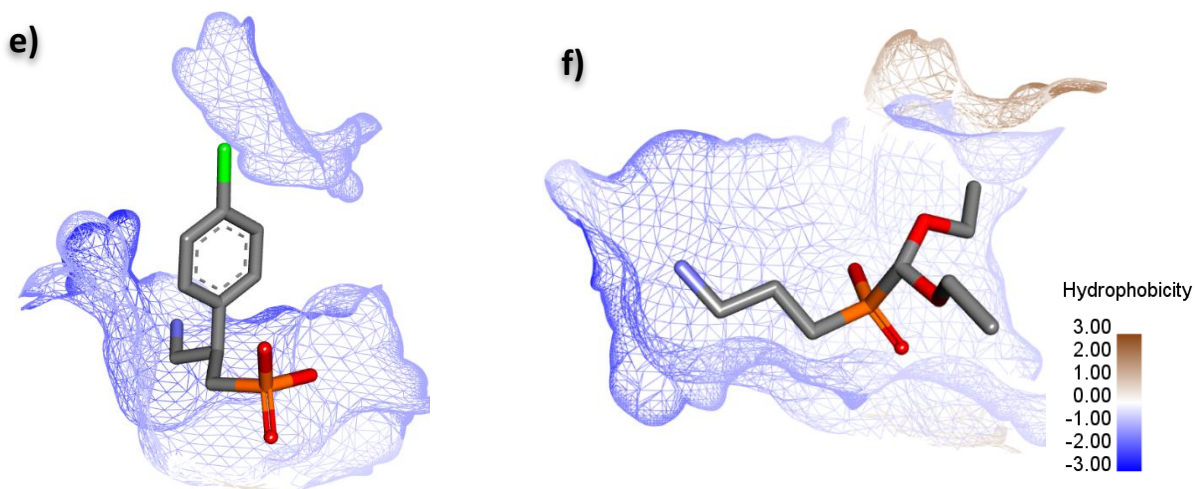


Figura 19. Superficies hidrofóbicas de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.

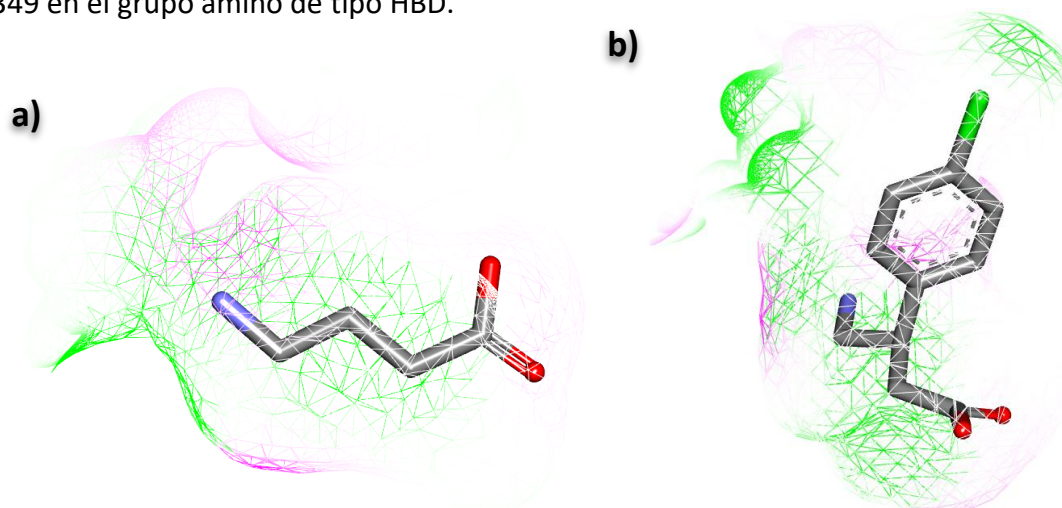
7.2.2 Superficies de Enlace de Hidrógeno.

Los enlaces de hidrógeno son las interacciones intermoleculares direccionales predominantes en los complejos biológicos y en la contribución predominante a la especificidad del reconocimiento molecular.⁶⁸

Para las interacciones de enlaces de hidrógenos, las cuales pueden ser de tipo aceptores de Hidrógenos (HBA) indicado de color verde o donadores de Hidrógenos (HBD) indicado de color rosa como se puede apreciar en la Figura 20.

En el análisis de los cristales 4MS3, 4MS4 y 7C7Q las interacciones que presentan de enlace de hidrogeno son las siguientes en el grupo amino: His 170, Glu 349, siendo de tipo HBD y para el grupo carboxilato: Ser 130, Ser 153, Tyr 250 de tipo HBD.

Y en los cristales 4MR9, 4MRM y 4MR8 las interacciones de enlace de hidrógeno son las siguientes: Ser 130, Ser 153, Ser 153 para el grupo carboxilato, siendo de tipo HBD y Glu 349 en el grupo amino de tipo HBD.



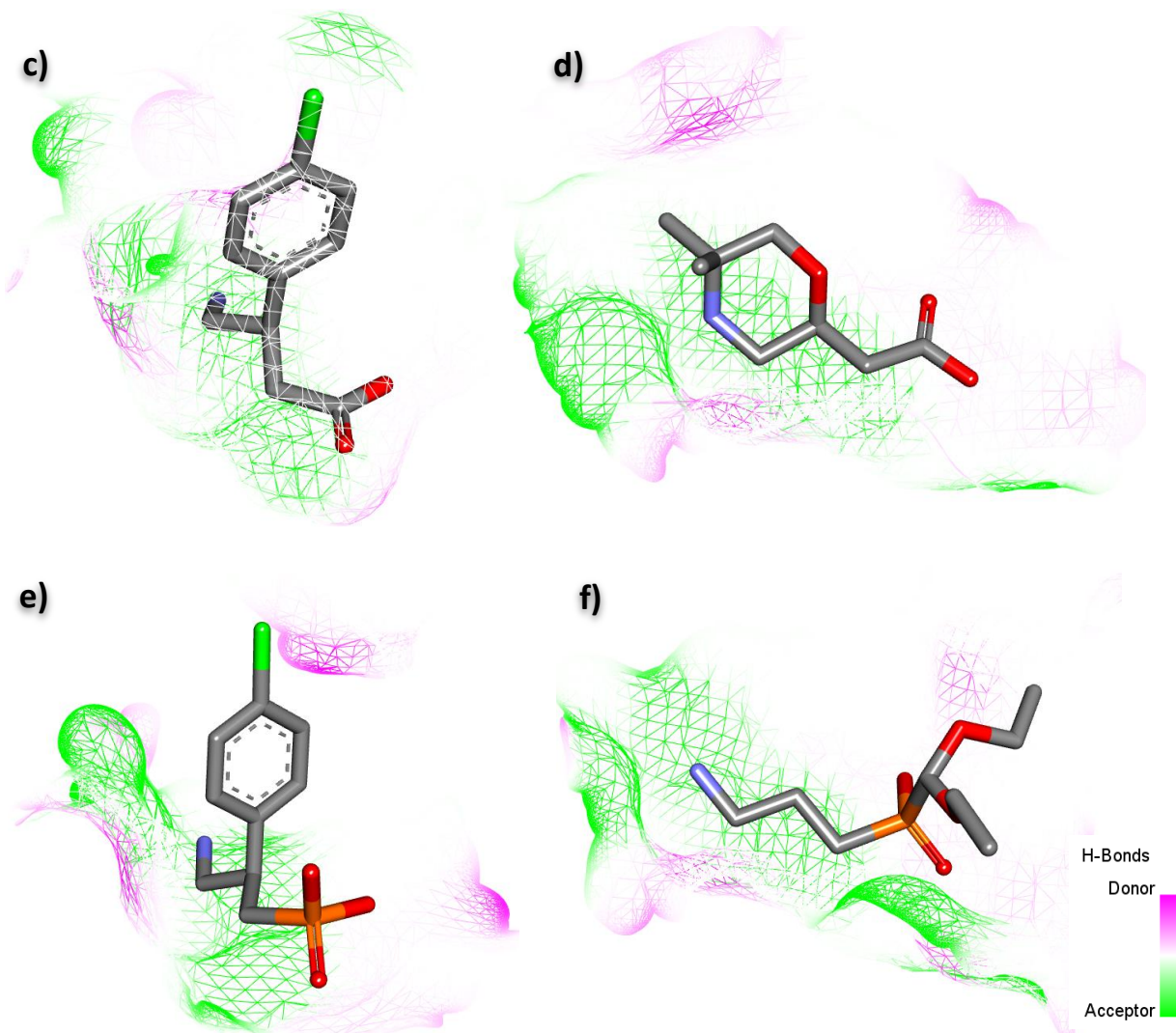


Figura 20. Superficies de tipo enlace de hidrogeno de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.

7.2.3 Superficies Electrostaticas

Las interacciones electrostaticas o puente salino son de las más frecuentes entre el receptor-ligando, las cuales consisten en la interacción entre dos iones una carga positiva y una negativa respectivamente, donde las áreas de color rojo nos indican las zonas ricas en electrones o cargas negativas formales y en cuanto a las áreas de color azul, estas nos indican las zonas deficientes en electrones o cargas positivas formales.

A continuación, se muestran las superficies electrostaticas de las seis cavidades correspondientes a las estructuras cristalinas analizadas. Aunque ninguno de los seis cristales muestren interacciones de este tipo, si es importante su análisis, Figura 21.

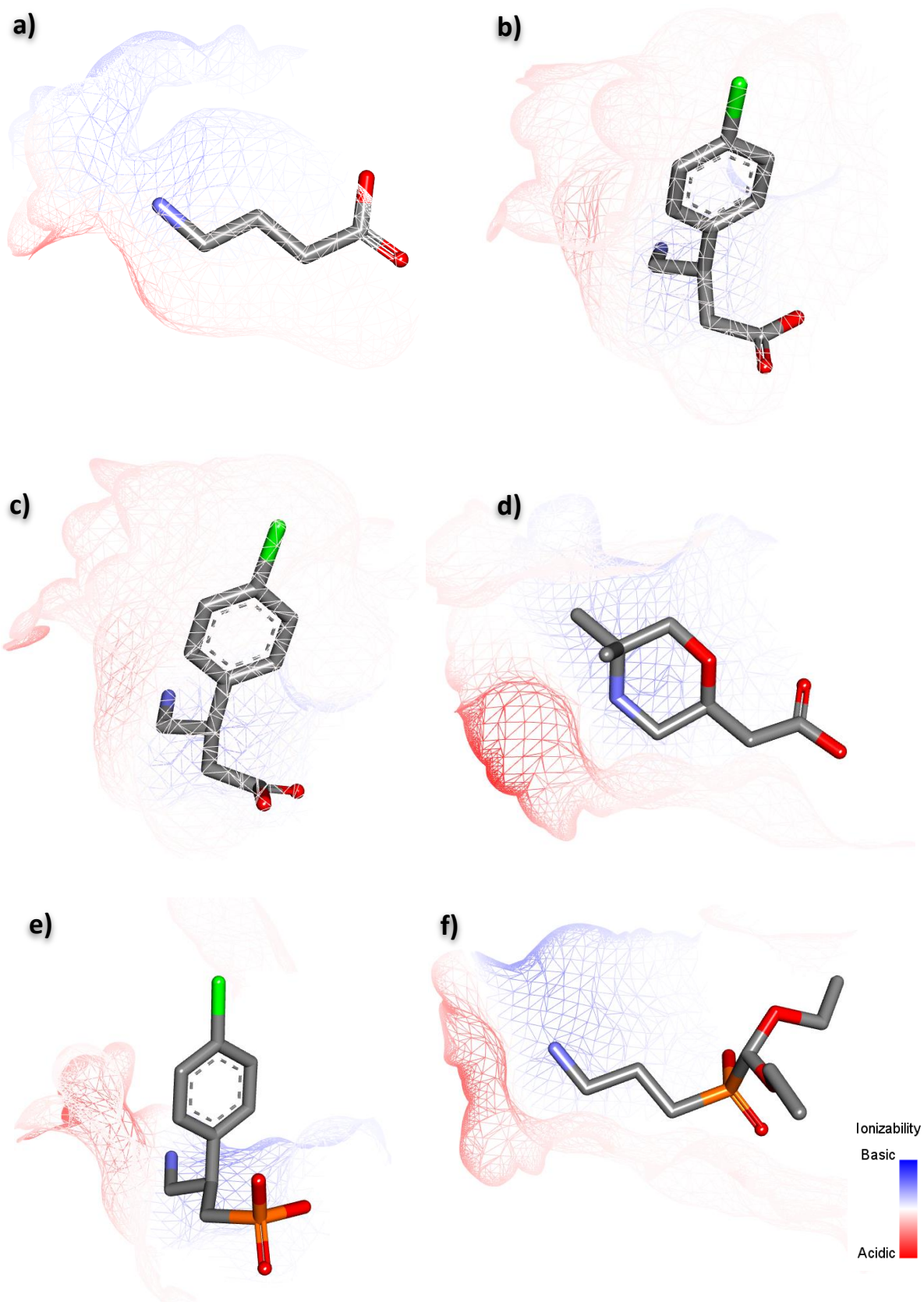
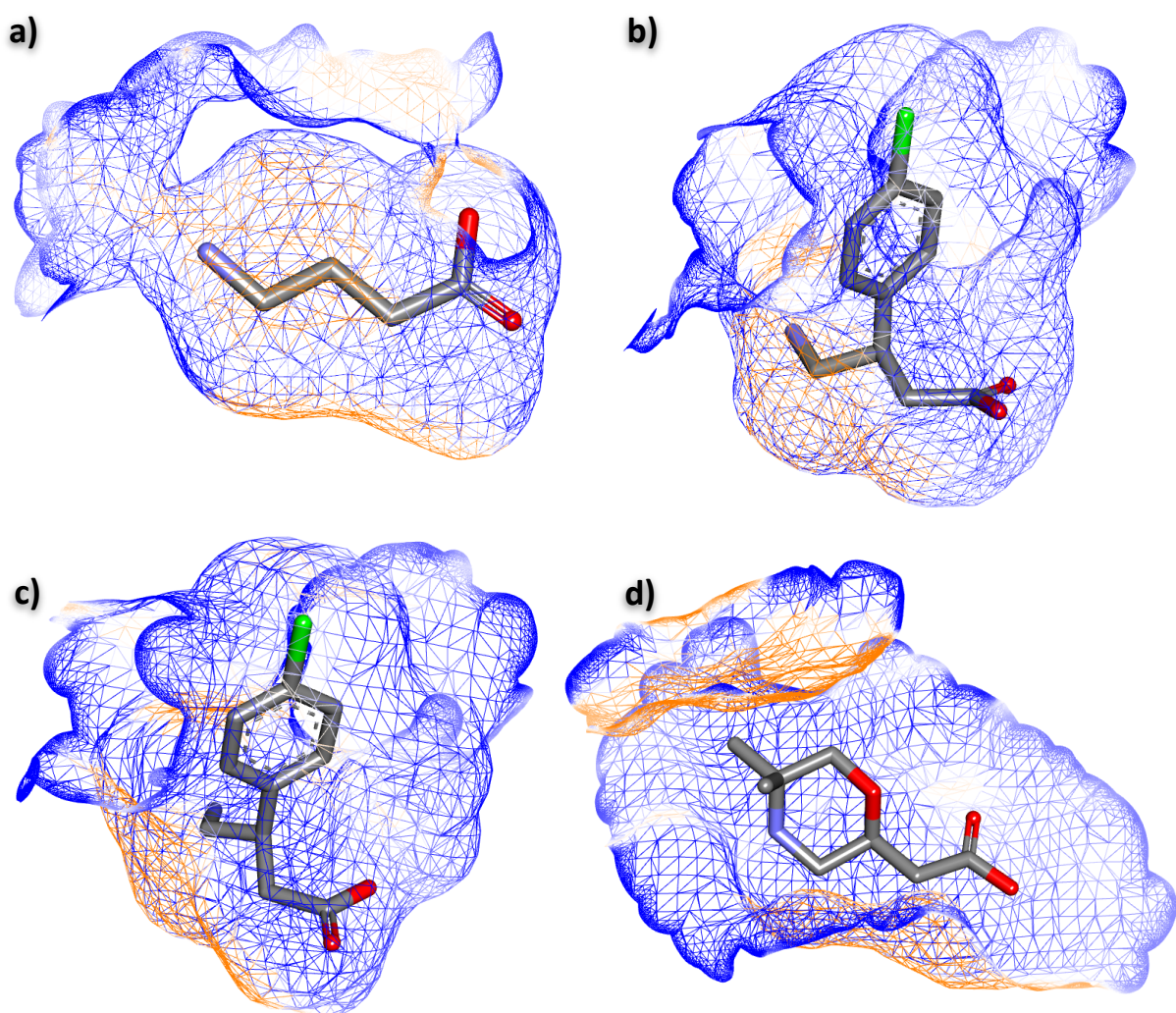


Figura 21. Superficies electrostáticas de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR9.

7.2.4 Superficies Aromáticas.

Las interacciones que involucran anillos aromáticos son importantes contribuyentes al reconocimiento de proteína-ligando y concomitantemente al diseño de fármacos.⁶⁸ Estas interacciones son de gran importancia en nuestro diseño *in silico*, ya que nuestros compuestos poseen dos anillos aromáticos, a continuación, se muestra el análisis del sitio de unión de los ligandos de referencias en los tres cristales empleados.

Los colores que representan a las áreas aromáticas de las superficies en el sitio de unión de los ligandos son el azul, indica una interacción de tipo π -stacking y el color naranja es una interacción de π - π , Figura 22.



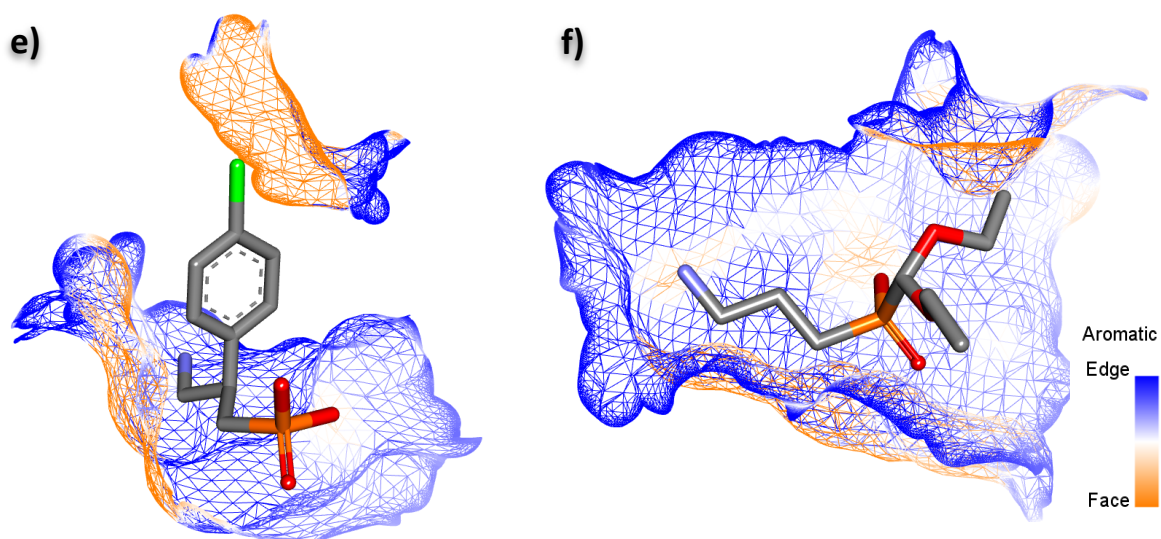


Figura 22. Superficies aromáticas de los cristales 4MS3, 4MS4, 7C7Q, 4MR9, 4MRM y 4MR8.

7.3 Validación del Docking molecular.

Para la validación de nuestro modelo de Docking molecular, este se llevó a cabo de dos tipos: energética y estructural, para el caso de la validación energética, se emplearon los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los ligandos anteriormente mencionados, además de agregar los antagonistas CGP 35348, CGP 46381 y Faclofen como antagonistas de referencia.

Una vez determinado los ligandos de referencia, se procedió a realizar el docking molecular de todos los ligandos con los respectivos cristales, empleando Autodock Vina como software y Chimera como visualizador.

Las energías de interacción de Baclofen, SCH 50911 y de los antagonistas de referencia con los cristales 4MS4, 7C7Q y 4MR9 se aprecian en la Tabla 5. Las energías interacción que se obtuvieron muestran que no hay una gran diferencia entre ellas dependiendo el cristal utilizado para el docking molecular, dando una gran confianza a emplear esos cristales, ya que pueden considerarse como diferentes conformaciones de la estructura cristalina del receptor $GABA_B$.

Tabla 5. Docking molecular de los compuestos de referencia con los cristales 4MS4, 7C7Q y 4MR9.

Compuesto	IC_{50}	Log IC_{50}	Log P	Log S	4MS4 (Kcal/mol)	7C7Q (Kcal/mol)	4MR9 (Kcal/mol)
Baclofen	52	1.716	-1.33	-1.70	-8.4	-7.7	-5.86
SCH 50911	1000	3.000	-3.25	-0.17	-5.9	-6.6	-6.16
CGP 35348	27000	4.431	-1.26	1.26	-5.5	-5.56	-5.1

CGP 46381	5000	3.699	-1.12	-0.68	-6.4	-6.2	-5.3
Faclofeno	229	2.360	-3.49	-0.23	-8.3	-7.7	-5.8

La validación estructural consistió en la replicación de la estructura del ligando co-cristalizado con sus respectivos cristales, se realizó empleando las estructuras cristalinas del receptor GABA_B de los cristales: 4MS4, 7C7Q y 4MR9, esto fue realizado mediante el docking molecular, donde las estructuras de color cian corresponden al ligando activo y las estructuras de color amarillo son las obtenidas del docking molecular empleando al ligando de mínima energía, Figura 23.

Se observó que, al realizar el docking molecular con el cristal 4MS4 el ligando activo no lograba reproducir la conformación del ligando co-cristalizado, como se puede observar, el grupo amino del resultado experimental este se encuentra hacia abajo. Para la comparación del cristal 7C7Q, se muestra a continuación, se aprecia el empalme de Baclofen activo y el obtenido en el docking molecular, donde se observa que no hay mucha diferencia entre la estructura activa y la de mínima energía, ya que se mantiene la misma conformación de los grupos amino y carboxilato con respecto a la conformación del ligando activo (Estructura de color amarillo).

Lo mismo sucedió para el antagonista SCH 50911, la estructura activa (cian) y la estructura de mínima energía (Estructura de color cian) mantienen una similitud estructural.

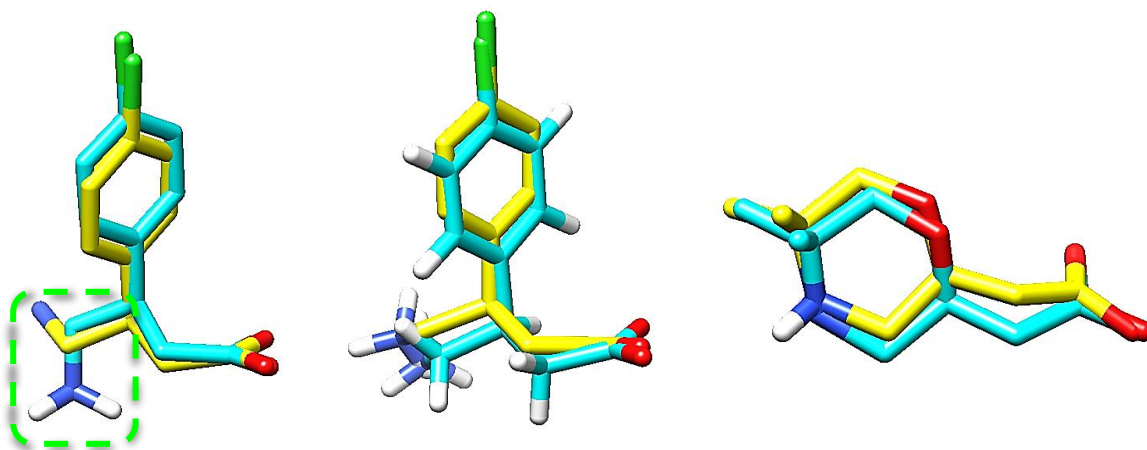
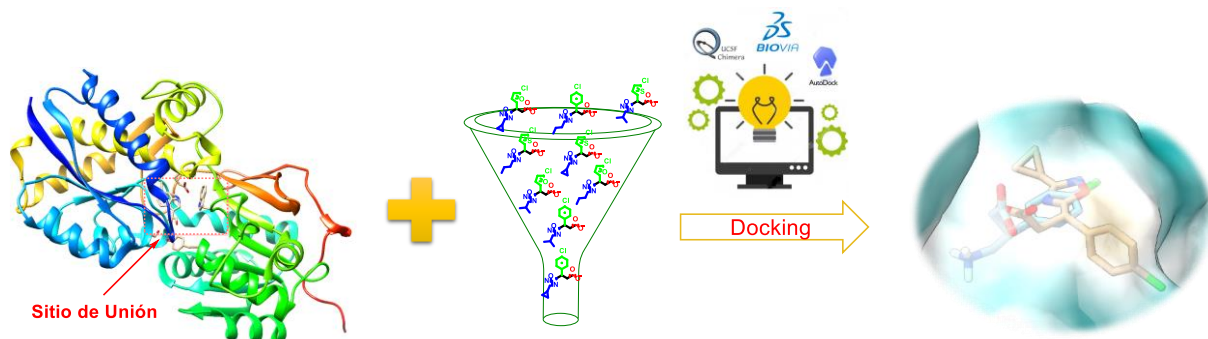


Figura 23. Comparación estructural de los ligandos activos (color amarillo) y los de mínima energía (color cian).

7.4 Docking Molecular

Los cálculos del docking molecular se realizaron en Autodock Vina como programa y Chimera como visualizador, Esquema 18.



Esquema 18. Representación gráfica del docking molecular.

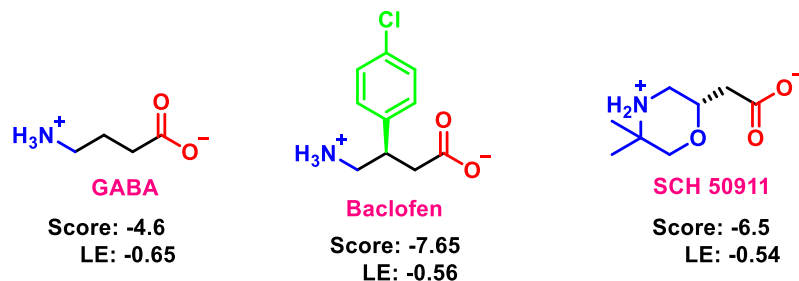
7.4.1 Preparación de las moléculas 103a-i.

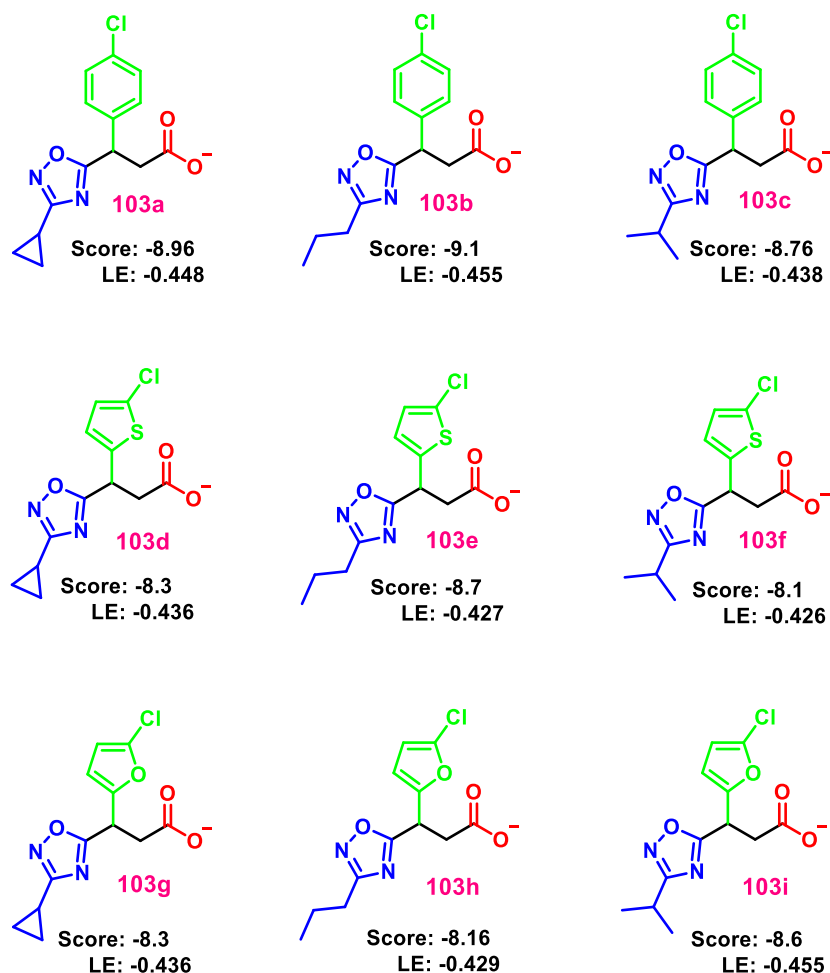
Las moléculas **103a-i** fueron construidas en Avogadro, para su optimización, estas fueron analizadas a un pH =7.4 y además se realizó un análisis conformacional dentro de la teoría del nivel de mecánica molecular empleando el campo de fuerza MMFF (Merck Molecular Force Field) obteniendo los conformeros de mínima energía de los compuestos **103a-i**, GABA, Baclofen y SCH 50911; finalmente se agregaron cargas parciales tanto para los compuestos **103a-i** y las estructuras cristalinas (PDB: 4MS4, 4MR9 y 7C7Q), el método de cargas empleado fue el de Gasteiger.

Para todos los cálculos del docking molecular se emplearon los ligandos co-cristalizados de GABA, Baclofen y SCH 50911, además de emplear los conformeros de mínima energía de los compuestos **103a-i**.

La información correspondiente al docking molecular de la estructura cristalina del receptor GABA_B unido a Baclofen (PDB: 4MS4) se muestra en los Anexos.

Posteriormente se prosiguió a realizar el docking molecular de los compuestos **103a-i** con la estructura cristalina del receptor GABA_B unido Baclofen (PDB: 7C7Q). En el Esquema 19 se aprecian los resultados del docking y eficiencia del ligando (LE).

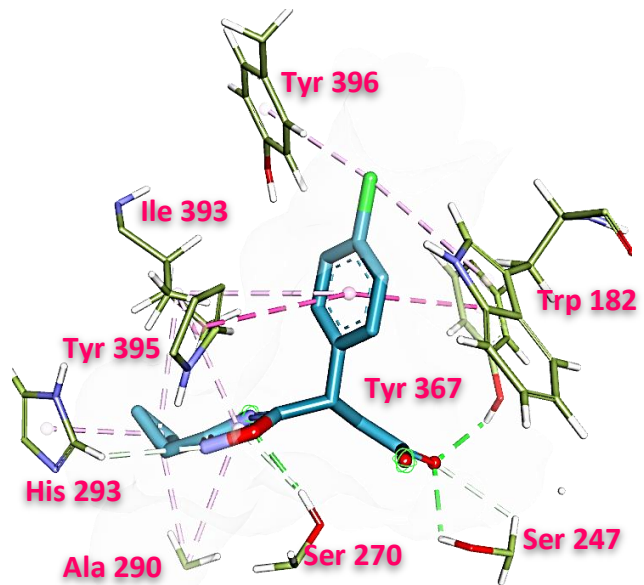
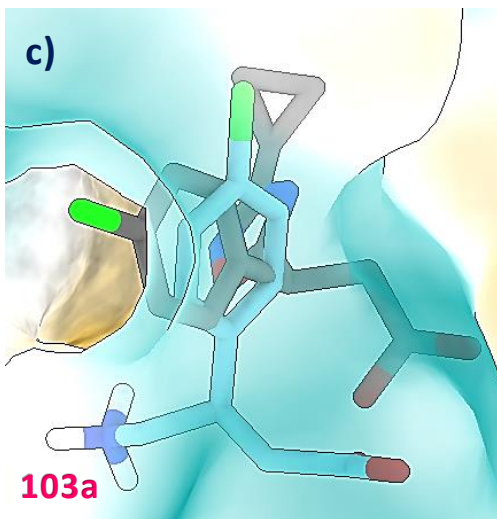
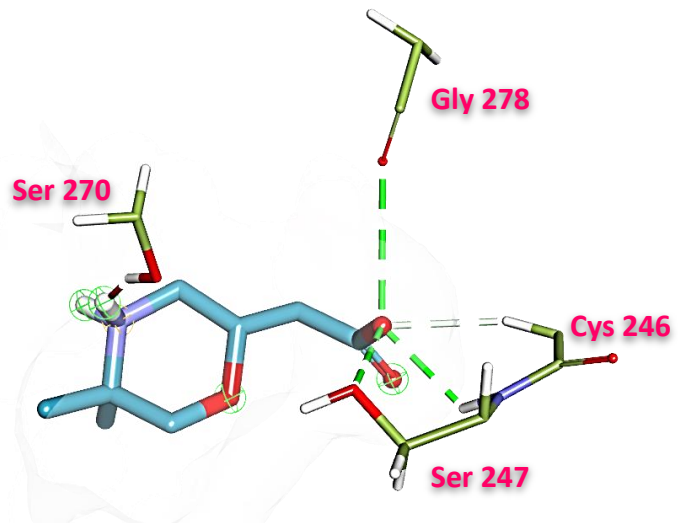
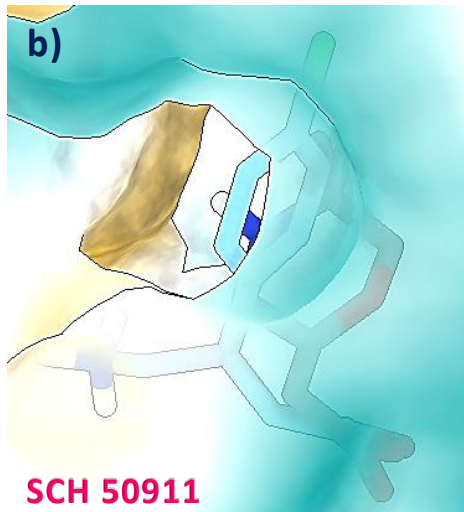
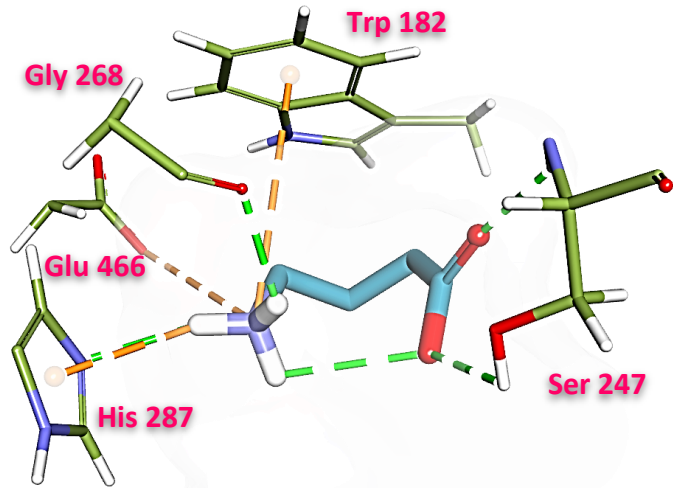
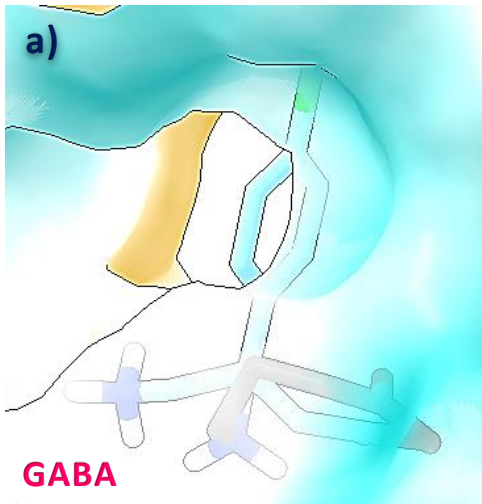


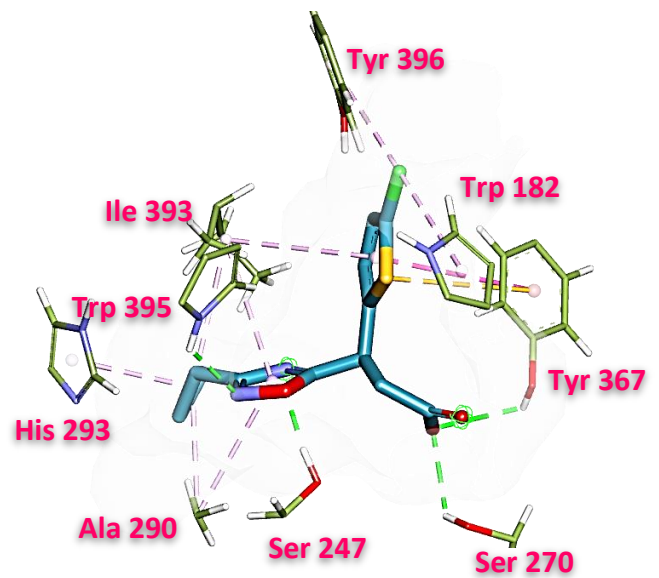
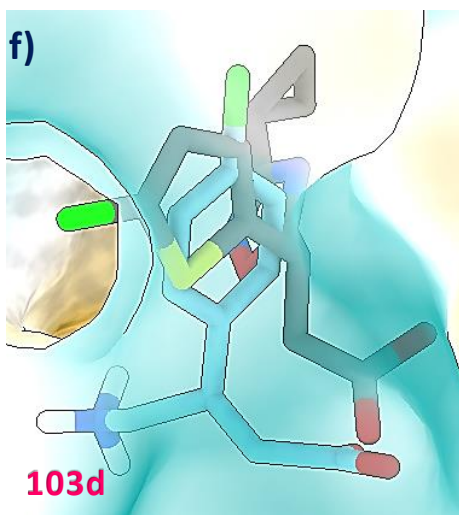
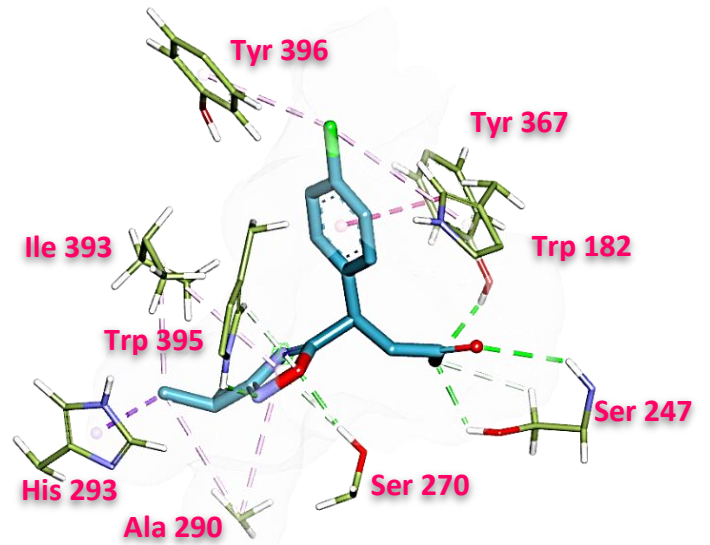
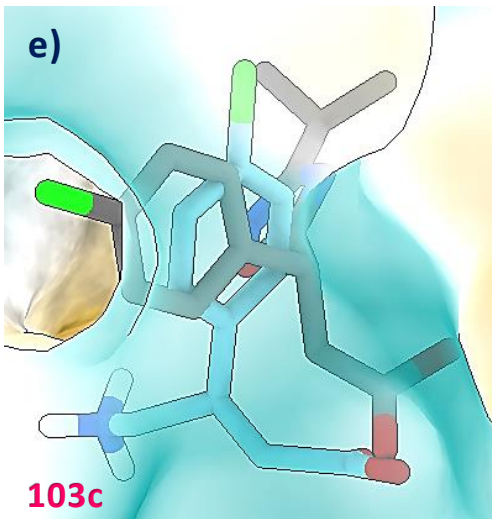
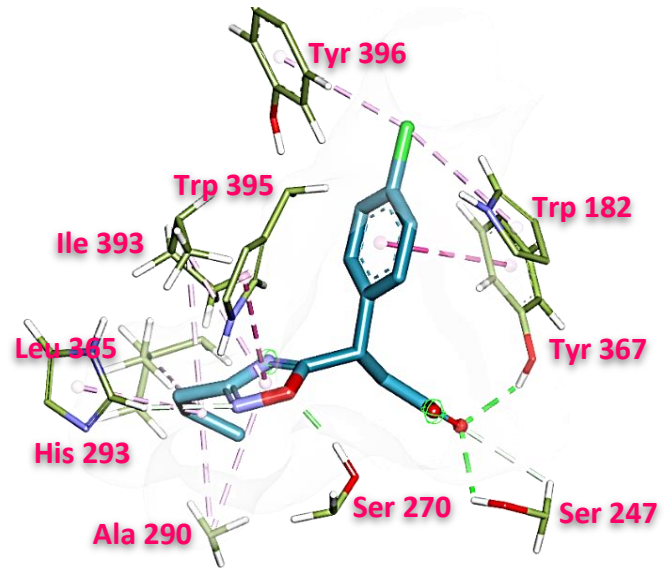
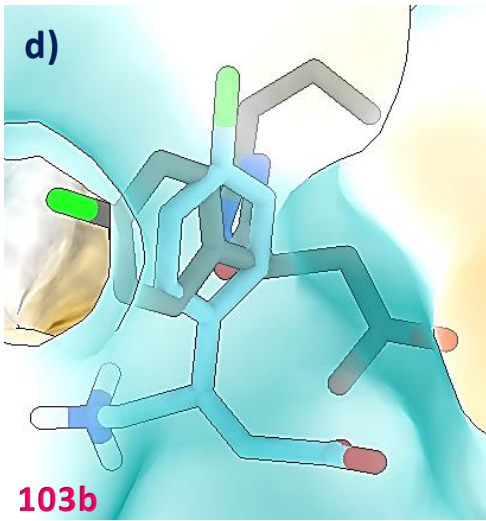


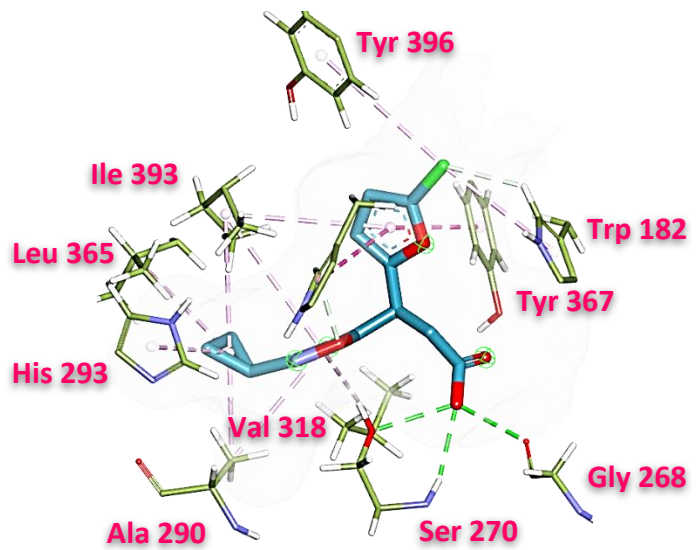
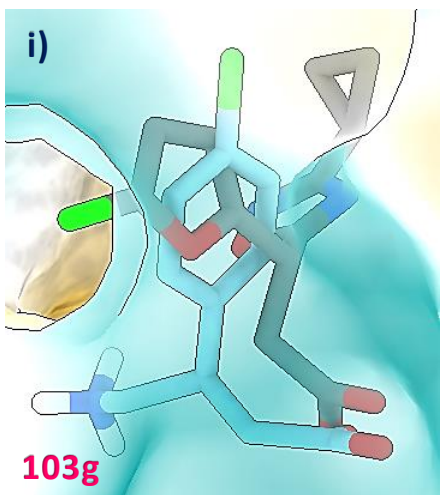
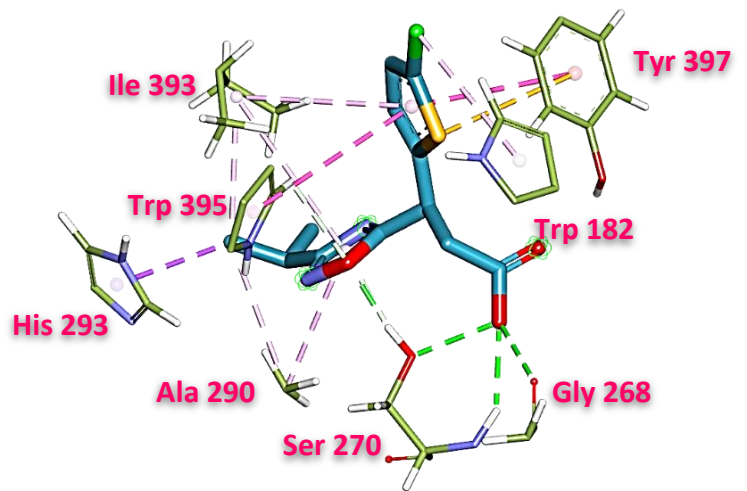
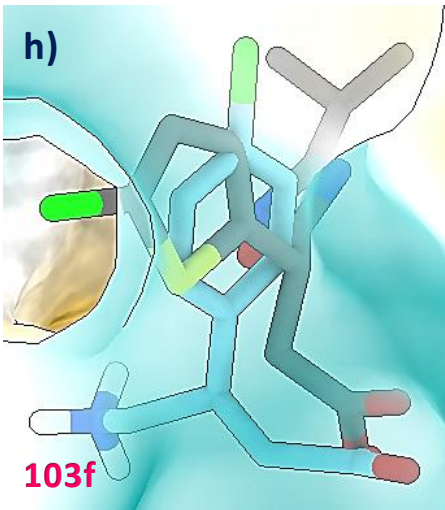
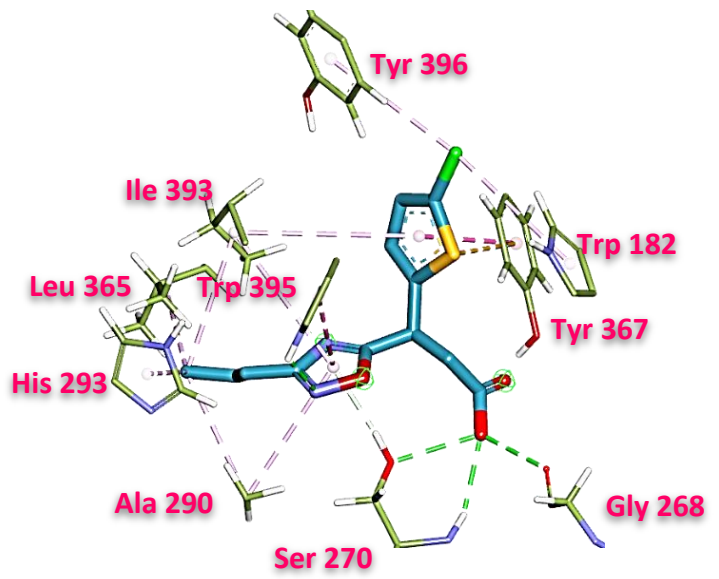
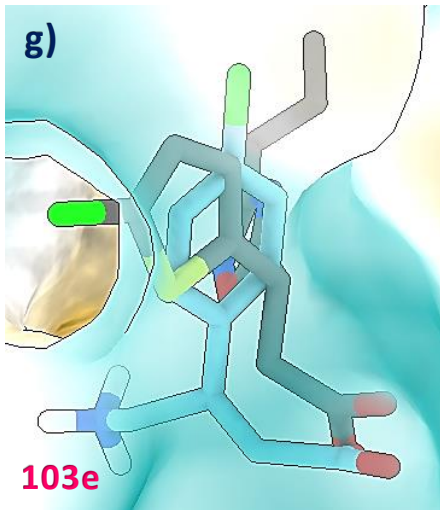
Esquema 19. Energías de interacción de los compuestos **103a-i**, la desviación estándar es de: \pm 0.05-0.1.

Los compuestos **103a**, **103b** y **103c** mostraron mejores energías de interacción en comparación a las mostradas por los compuestos de referencia: GABA, Baclofen y SCH 50911.

En la Figura 24 se muestran las conformaciones que adoptaron GABA, SCH 50911 y los compuestos **103a-i** (color gris) de acuerdo con la forma y tamaño de la cavidad correspondiente al cristal 7C7Q y como comparativa se muestra la conformación de Baclofen activo (color cian). Cabe resaltar que en todos los casos se muestra la conformación de menor energía de interacción, siendo las mejores poses en referencia a Baclofen, además de que ninguna pose de los compuestos **103a-i** mantiene una similitud total con la conformación de Baclofen activo, también se pueden apreciar las estructuras 3D de las interacciones de los compuestos **103a-i** con los residuos de aminoácidos del receptor GABA_B.







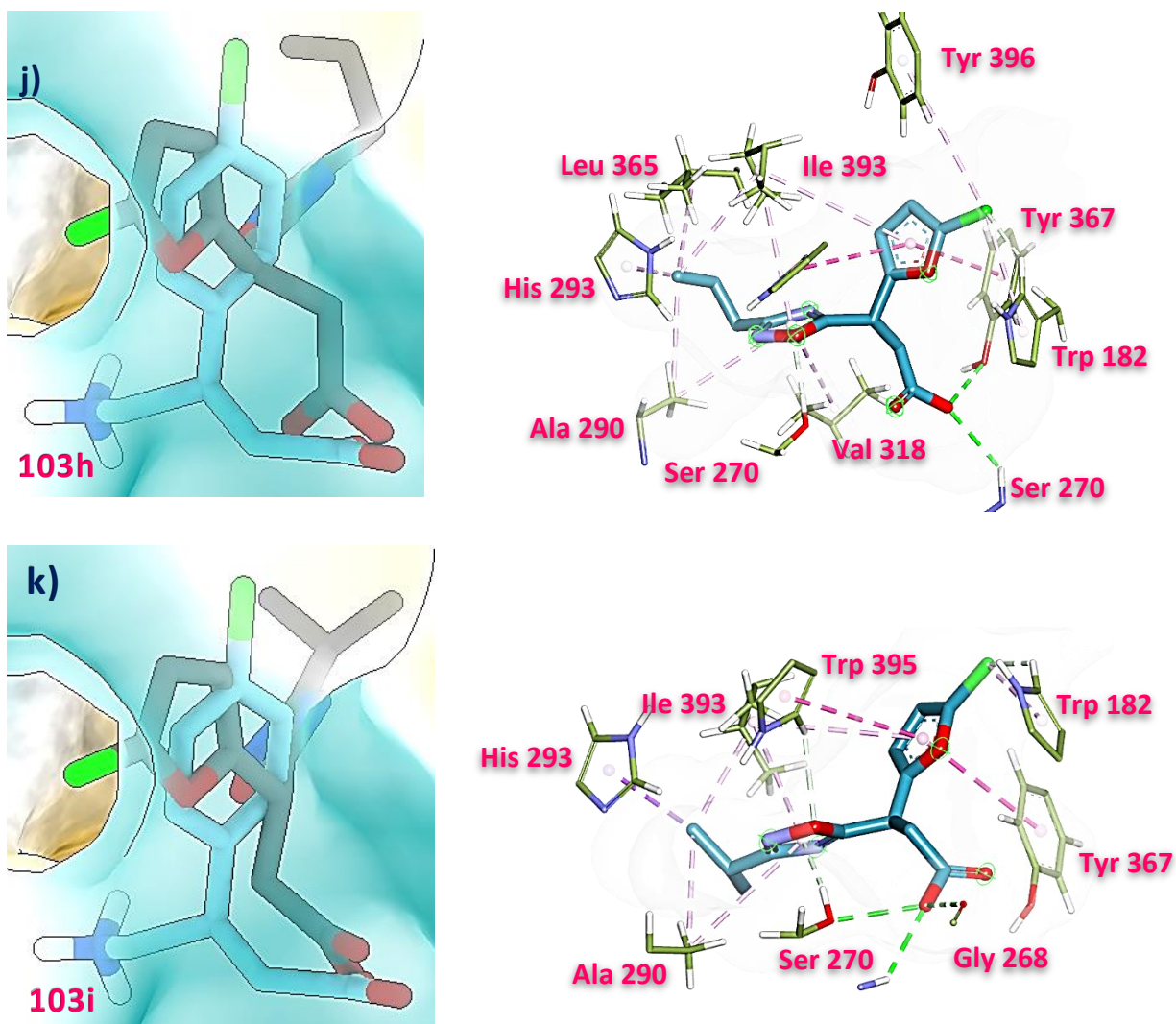


Figura 24. Conformaciones de menor energía de los compuestos **103a-i**, Baclofen e interacciones.

Posteriormente se realizó una comparación de los residuos de aminoácido que tiene Baclofen, SCH 50911 y los compuestos **103a-i**, con fin de analizar y determinar si las interacciones que se aprecian son favorables para la posible actividad de nuestros compuestos hacia los receptores GABA_B, Tabla 6. Además se determinó que la inclusión del grupo amino al anillo 1,2,4-oxadiazol favorece al aumentar el número de interacciones tanto de tipo lipofílicas, aromáticas e iónicas.

Tabla 6. Comparación de residuos entre Baclofen, GABA, SCH 509 y los compuestos **103a-i**.

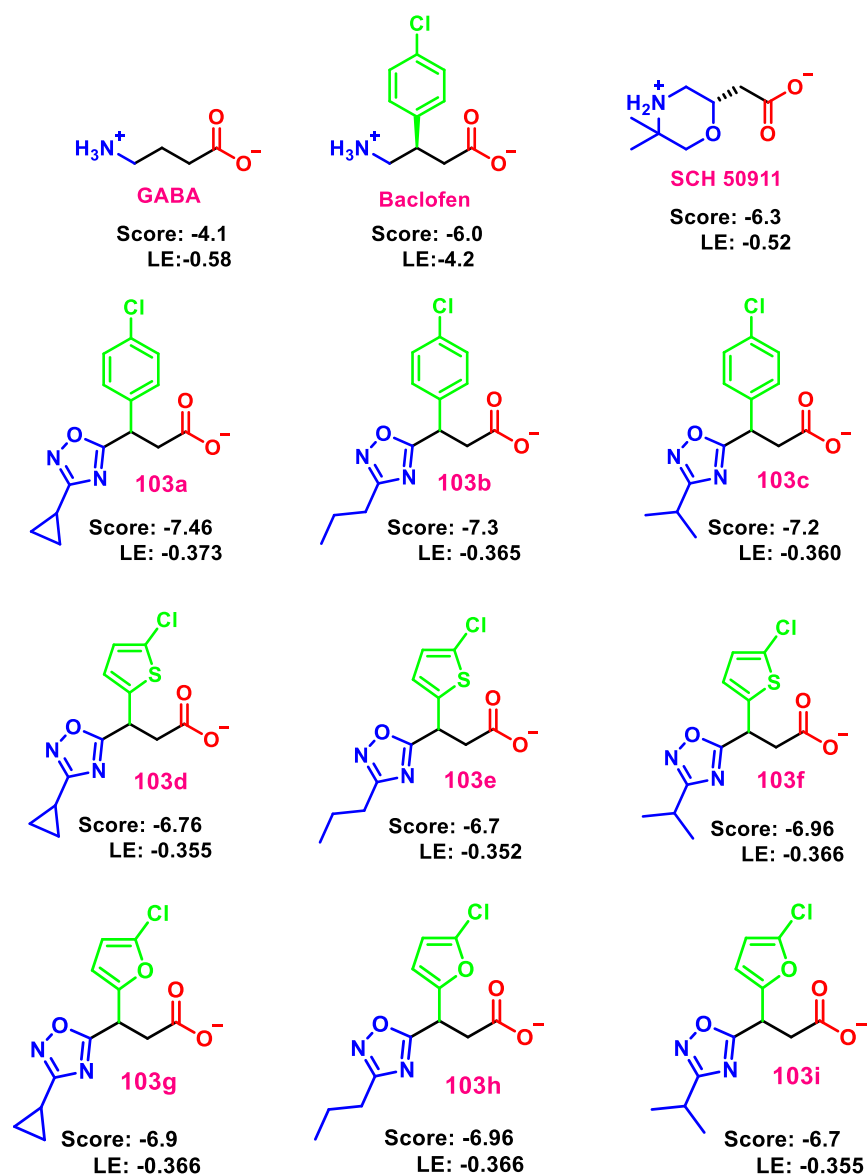
Interacciones con el Receptor GABA_B

Compuesto	Amino	Carboxilato	Aromático
	Trp395, His287,		Trp396, Ile393,

Baclofen	Trp395	Ser270, Ser247	Phe366, Trp182, Tyr367
GABA	Gly268, Glu466, Trp182, His287	Ser247	-----
SCH 50911	Ser270	Ser270, Ser247, Gly268	-----
103a	Ser270, His293, Ala290, Ile393,	Ser247, Tyr367	Tyr396, Trp182, Trp395, Phe319, Tyr367, Ile393
103b	Trp395, His293, Ser270, Ala290, Ile393, Leu365	Ser247, Tyr367	Trp182, Tyr396
103c	Trp395, Ala290, His293, Leu365, Ile393, Ser270	Ser270, Gly268	Try367, Ile393, Trp182, Tyr396
103d	Trp395, Ala290, His293, Leu365, Ile393, Ser270	Ser270, Gly268	Try367, Ile393, Trp182, Tyr396
103e	Trp395, Ala290, His293, Leu365, Ile393, Ser270	Ser270, Gly268	Try367, Ile393, Trp182, Tyr396
103f	Ser270, His293, Ile393, Ala290	Ser270, Gly268	Tyr367, Trp182, Tyr396, Trp395, Ile393
103g	Ala290, Ile393, His293, Trp395	Ser270, Gly268	Try367, Trp182
103h	Ala290, Ile393, His293, Trp395	Ser270, Gly268	Try367, Trp182
103i	Ala290, Ile393, His293, Trp395	Ser270, Gly268	Try367, Trp182

Los compuestos **103c-i** son los únicos que mantienen interacción con los mismos residuos aminoácidos con respecto al antagonista SCH 50911, en el grupo carboxilato son: Ser270 y Gly268. Para las interacción del grupo amino, los compuestos **103a-f** son los que matienen la unica interacción con el residuo de Ser270, además de tener interacciones con los residuos His293, Ala290, Ile293, Leu365 y Trp395.

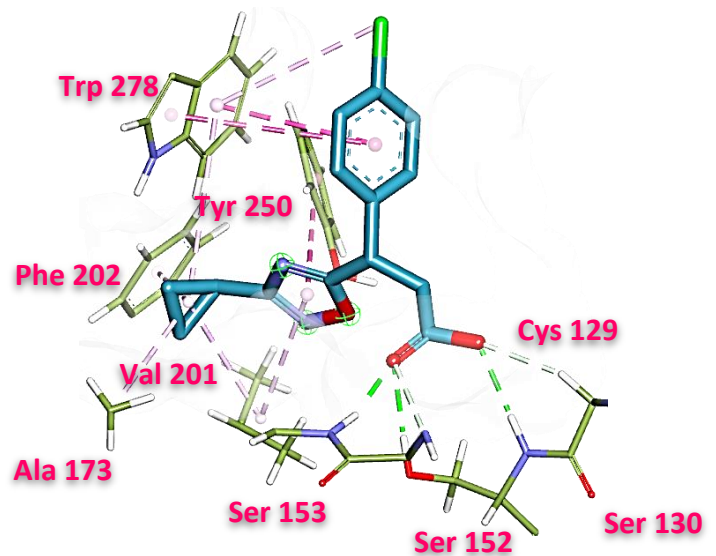
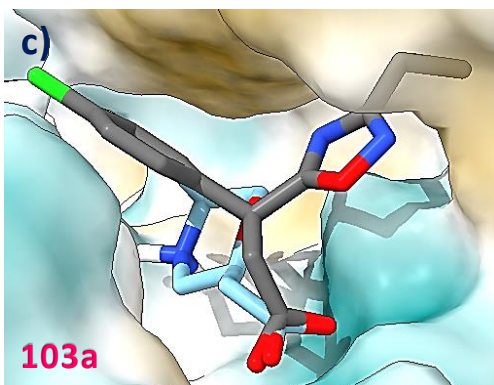
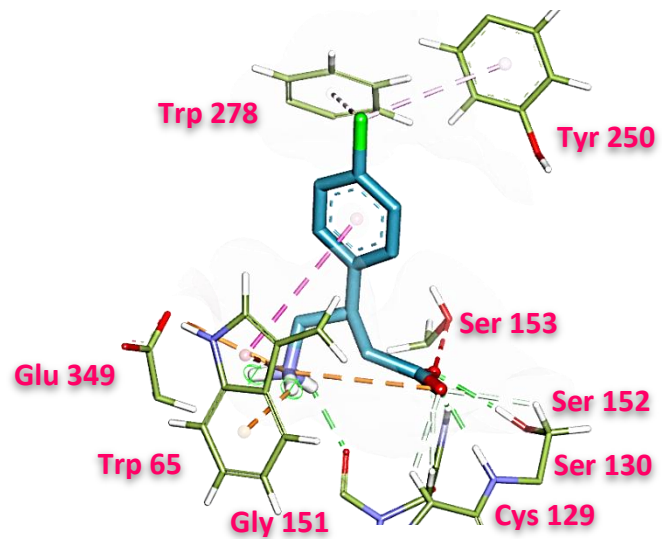
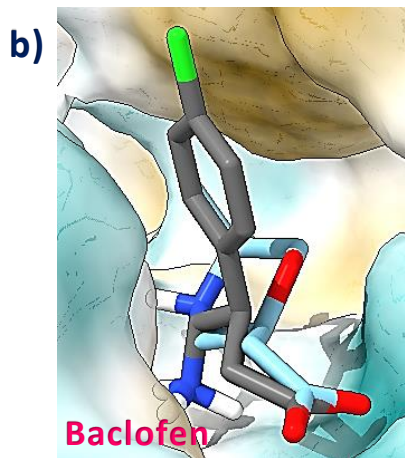
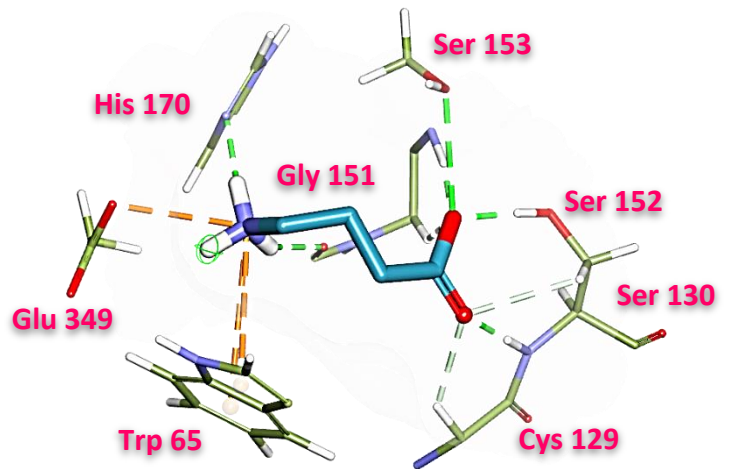
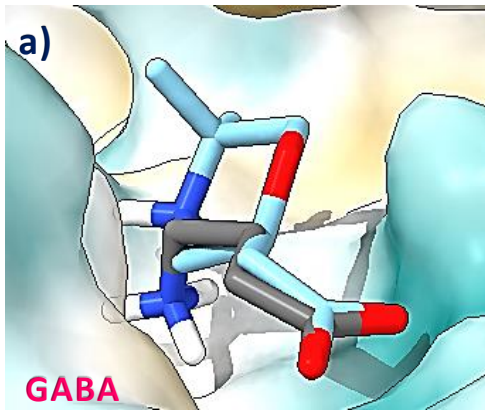
Los cálculos del docking molecular de los compuestos **103a-i** con la estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B humano unido al antagonista SCH50911 (PDB: 4MR9) se muestran a continuación y sus respectivos valores de eficiencia del ligando, destacando que los compuestos **103a**, **103b**, **103f**, **103g** y **103h** mostraron valores de energía de interacción más negativos con respecto a las demás moléculas.

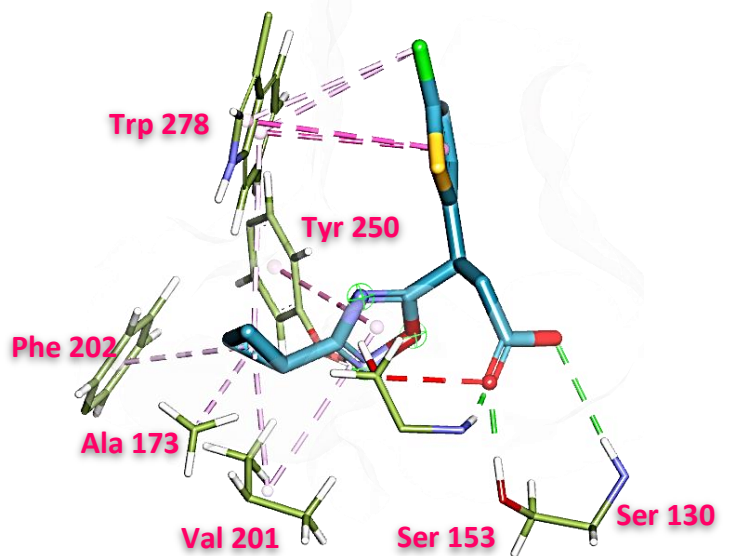
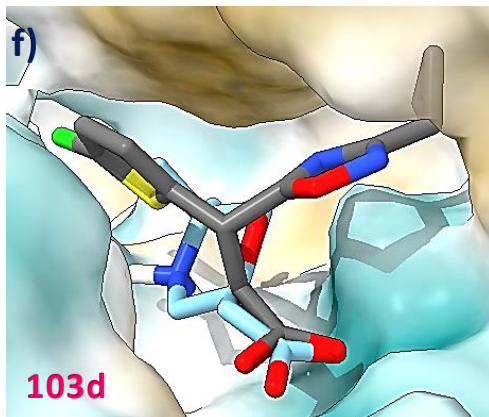
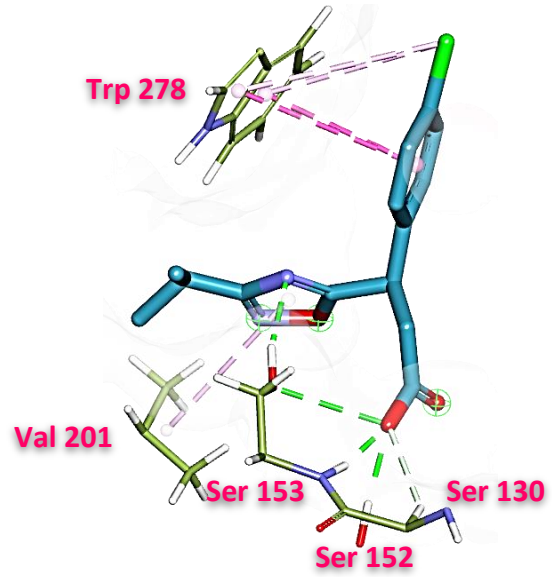
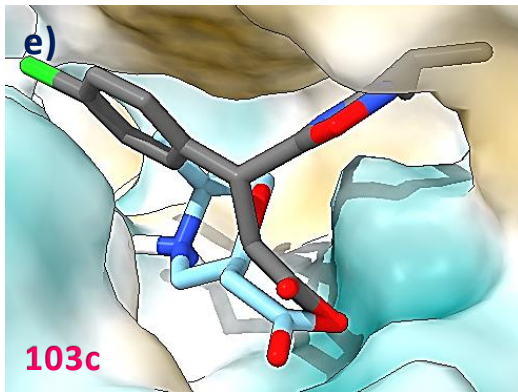
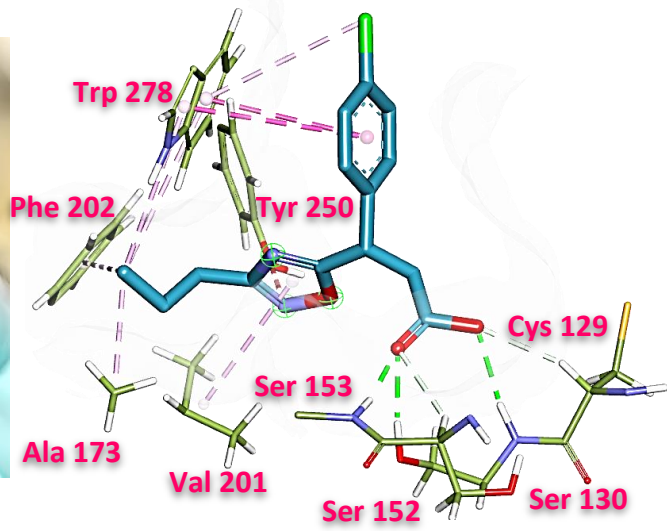
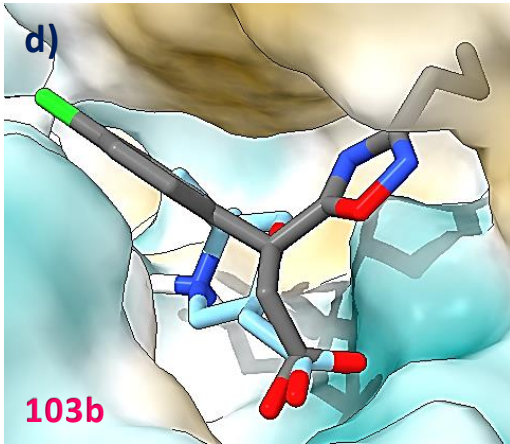


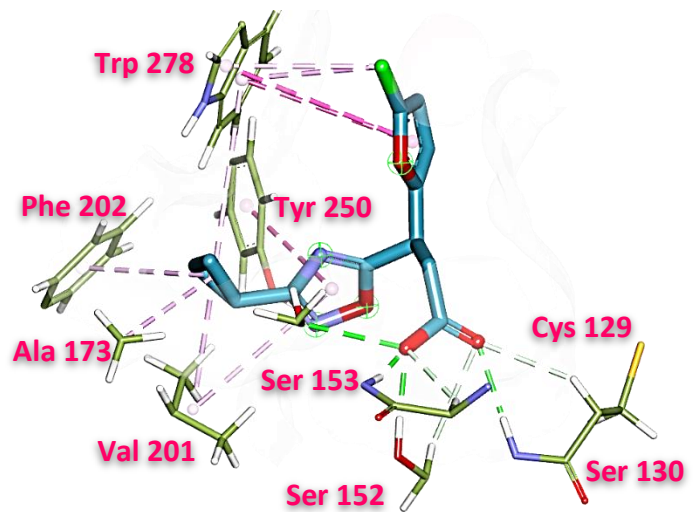
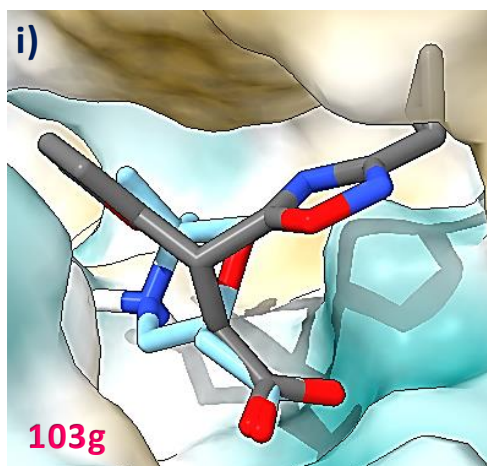
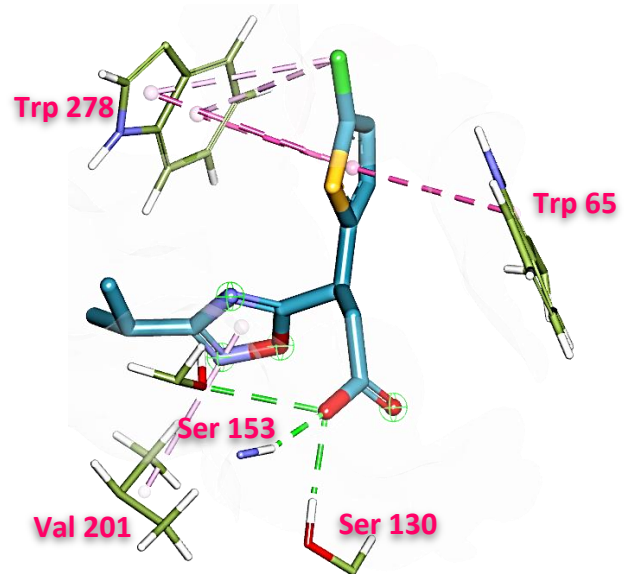
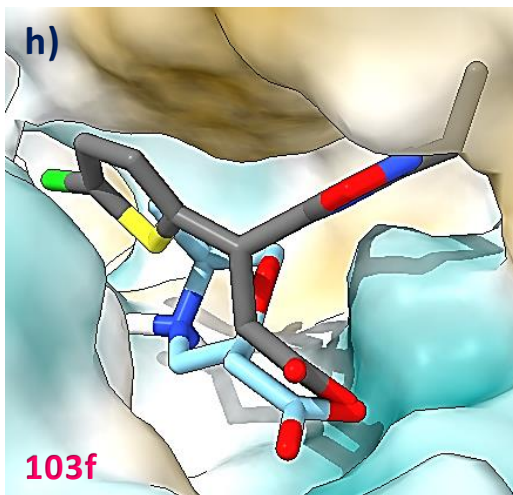
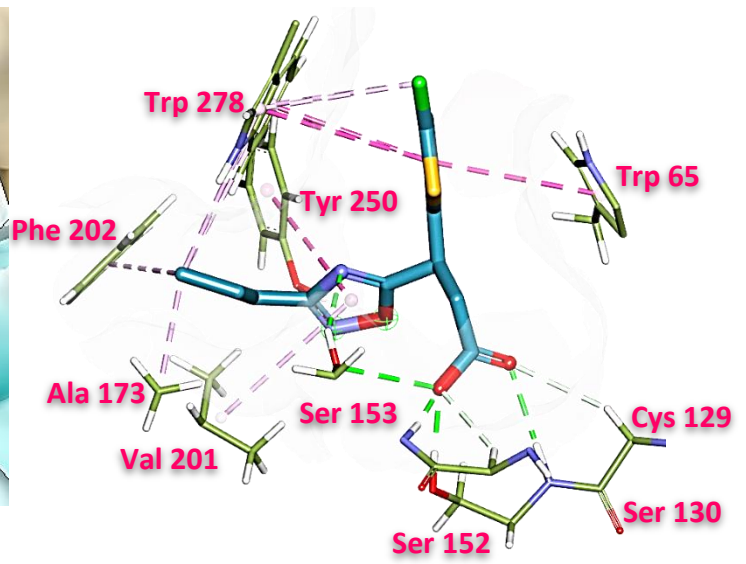
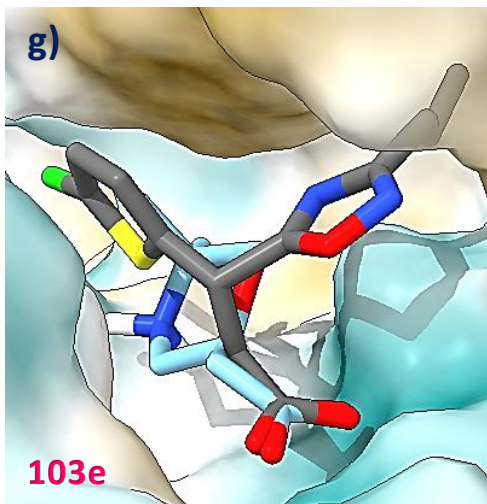
Esquema 20. Valores de energía de interacciones y sus respectivos valores de eficiencia de ligando de los compuestos **103a-i**.

Las conformaciones de menor energía de interacción de los **103a-i**, teniendo como comparativa la conformación activa del antagonista SCH 50911, además de mostrar las

estructuras en 3D de las interacciones que los compuestos tienen con los residuos de aminoácidos del receptor GABA_B.







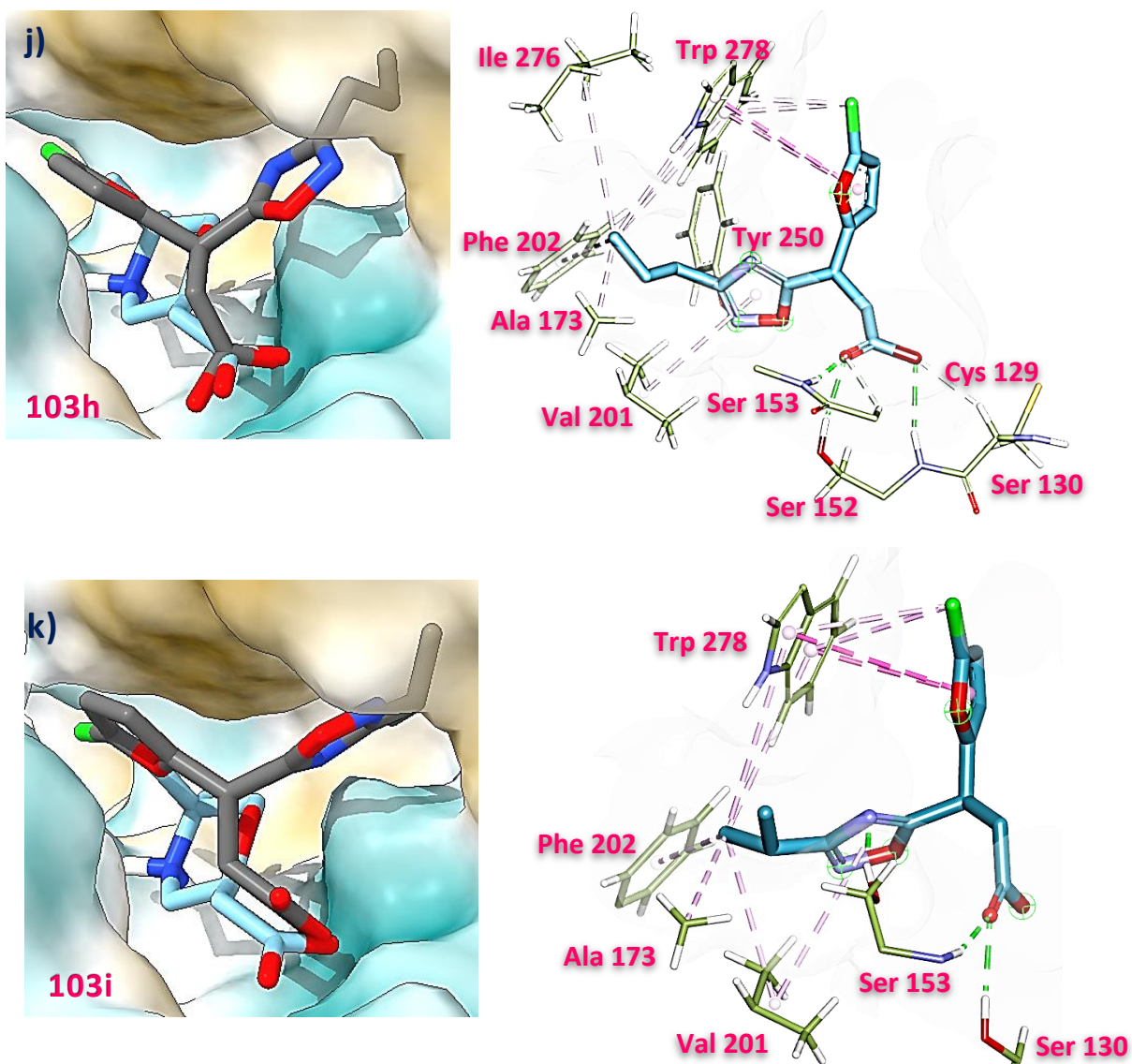


Figura 25. Representación de las conformaciones de menor energía (poses) de los compuestos **103a-i** y de comparativa la estructura del antagonista SCH 50911 activo, además de las interacciones.

En la comparativa de las conformaciones o poses de SCH 50911 con los compuestos **103a-i**, se aprecia que estos adoptan una conformación similar en el aspecto de que el sustituyente aromático (Cl-Fenilo, Cl-Tiofeno y Cl-Furano) está acomodado de la misma manera, en la comparación con las conformaciones obtenidas en las otras estructuras cristalinas.

Tabla 7. Interacciones de los compuestos **103a-i** con el receptor GABA_B correspondiente al cristal 4MR9.

Interacciones con el Receptor GABA_B

Compuesto	Amino	Carboxilato	Aromatico
Baclofen	Gly151, Glu349, Trp65	Ser153, Ser130, Ser152, Cys129	Tyr250, Trp278, Trp65
GABA	Ser130, Ser153, Cys129	His170, Gly151, Glu349, Trp65	-----
SCH 50911	His170, Glu349	Ser153, Ser130	-----
103a	His170, Cys129, Ser153	Ser153	Trp278
103b	Tyr250, Val201, Trp278, Ala173, Phe202	Ser153, Ser130	Trp278
103c	Ser153, Ala173, Phe202, Ile276, Trp278	Trp65	Trp278
103d	Trp278, Tyr250, Val201, Phe202	Ser153, Ser130	Trp278
103e	Trp278, Tyr250, Val201, Phe202	Ser153, Ser130	Trp278
103f	Val201	Ser153, Ser130	Trp278, Trp65
103g	Trp278, Tyr250, Val201, Phe202, Ala173	Ser153, Ser130	Trp278
103h	Trp278, Tyr250, Val201, Ile276, Phe202, Ala173	Ser153, Ser130, Ser152, Cys129	Trp278
103i	Trp278, Tyr250, Val201, Phe202	Ser153, Ser130, Cys129	Trp278

En la comparativa realizada en la Tabla 7, se aprecia que **103b** y **103d-i** tienen las mismas interacciones con Ser153 y Ser130 de tipo HBD, en el grupo carboxilato con respecto a SCH 50911. En el grupo amino solo se mantienen en común la interacción con His170 en el compuesto **103a**, el resto de los compuestos adoptaron una conformación diferente en

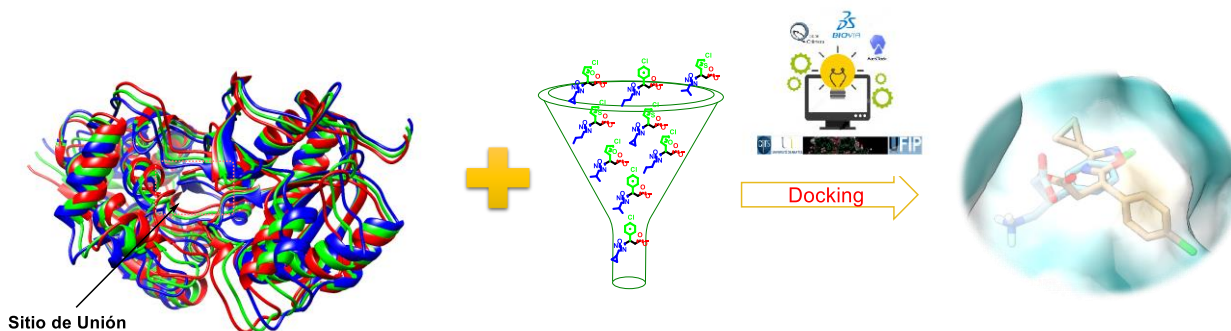
esa parte de la estructura; los residuos de aminoácidos que destacan en el anillo de 1,2,4-oxadiazol son: Trp278, Tyr250, Val201, Ala173 y Phe202, siendo de tipo aromáticas (π - π), hidrofóbicas y electrostáticas.

7.5 Modos Normales

Durante este proceso, el procedimiento de acoplamiento permite modificar fácilmente la conformación del sistema de acoplamiento (receptor y ligando). Dado que las variables de receptor y ligando aumentan junto con el número de átomos, y es necesario considerar varios factores adicionales.⁶⁹

Para los cálculos de docking molecular semiflexible, este consistió en la determinación de los modos normales de baja frecuencia de las estructuras cristalinas mediante el uso del servidor *e/Nemo*, siendo la interfaz web del Elastic Network Model (ENM), teniendo en cuenta que, a la aproximación RTB este servidor puede realizar cálculos para sistemas de todos los átomos, con el fin de analizar estos modos en diferentes niveles de detalle, es decir, comparar la colectividad de los modos.

Para la obtención de los modos normales de nuestras estructuras cristalinas, el procedimiento consistió en subir el archivo PDB de cada estructura cristalina correspondiente al servidor, y la generación de los modos normales, posteriormente solo son seleccionados los primeros 3 modos normales de cada estructura cristalina, de las cuales en Chimera se escogieron 3 conformaciones (inicial, intermedia y final) de cada cristal para efectuar el docking molecular en Autodock Vina, Esquema 21.



Esquema 21. Representación gráfica del docking molecular semiflexible.

A continuación, se muestran los modos normales de cada estructura cristalina (PDB: 4MS4, 7C7Q y 4MR9) y sus respectivas conformaciones, ya que fueron seleccionadas una conformación inicial, intermedia y final, con el fin de analizar a detalle los diferentes niveles, Figura 26.

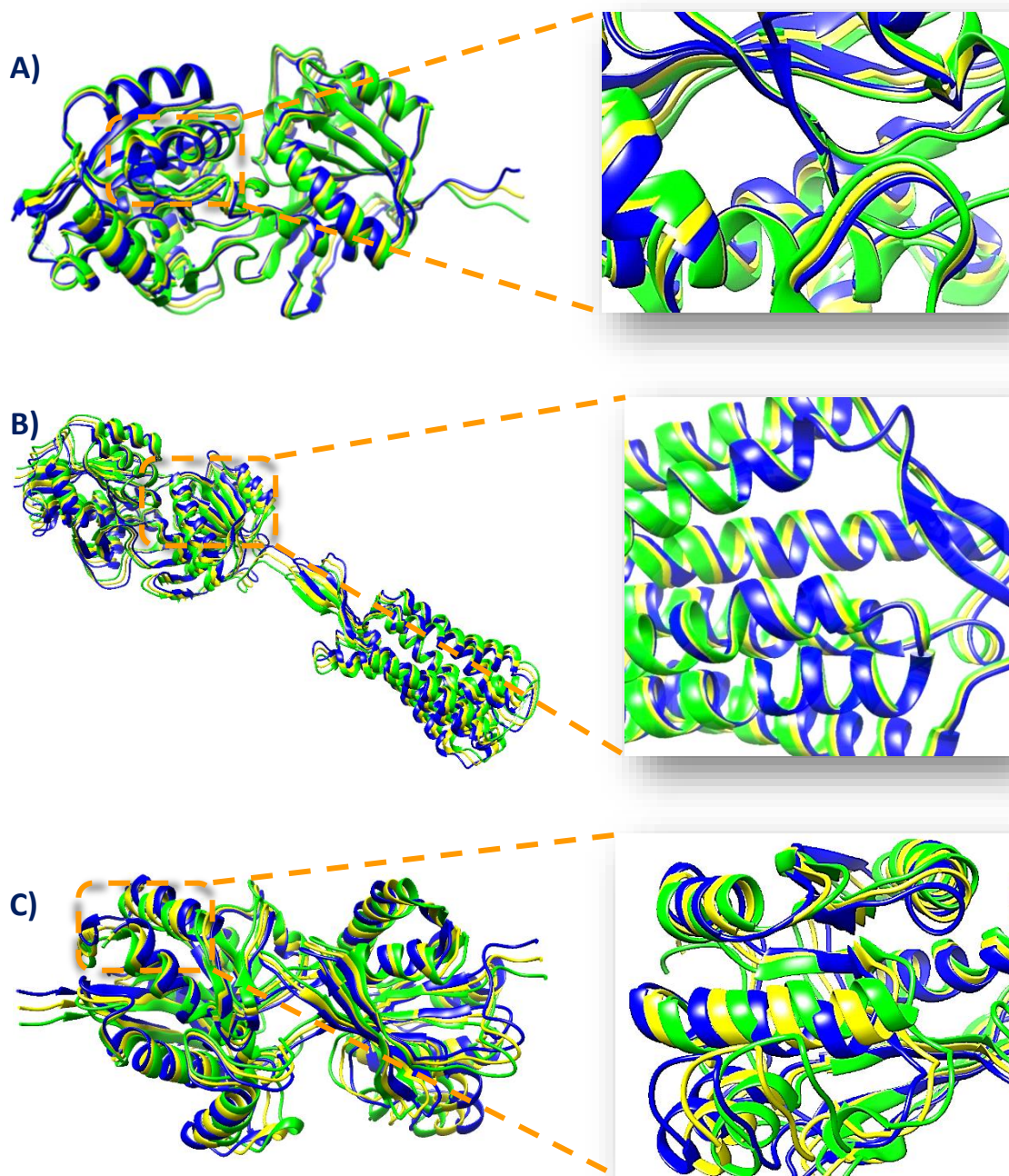


Figura 26. Modos normales: **A)** Modo normal y conformaciones del cristal 4MS4. **B)** Modo normal y conformaciones del cristal 7C7Q. **C)** Modo normal y conformaciones del cristal 4MR9.

En las siguientes animaciones 3D correspondientes a cada modo normal empleado, se muestran los movimientos que cada estructura cristalina tiene conforme a las vistas de tres diferentes puntos ortológicos con MolScript, o cada vector que representa un cierto movimiento de la proteína de modo que cualquier cambio conformacional se puede

expresar como una combinación lineal de los modos normales, aunque estos movimientos no son visibles en este documento.

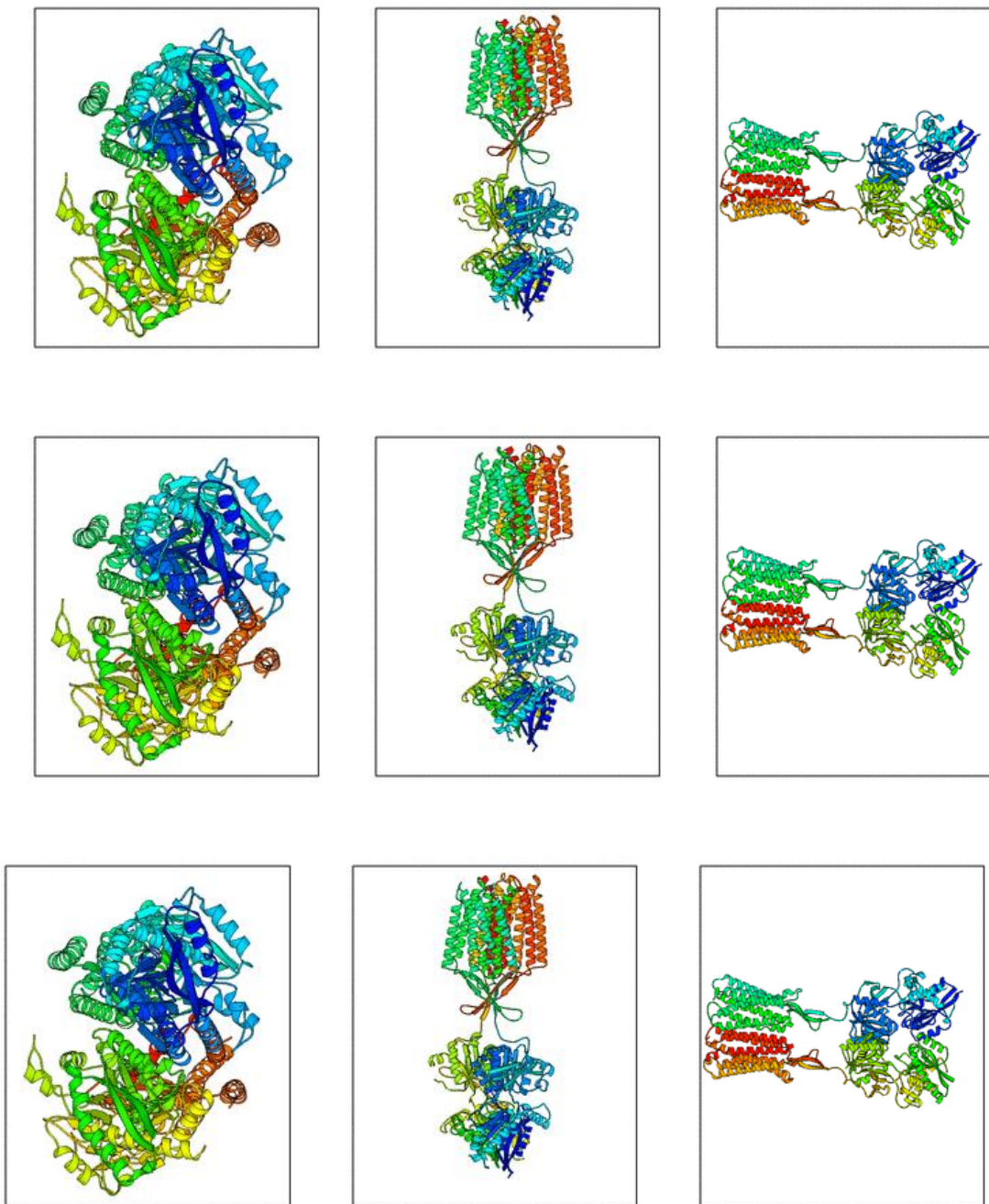


Figura 27. Movimientos de los tres modos normales empleados del cristal 7C7Q.

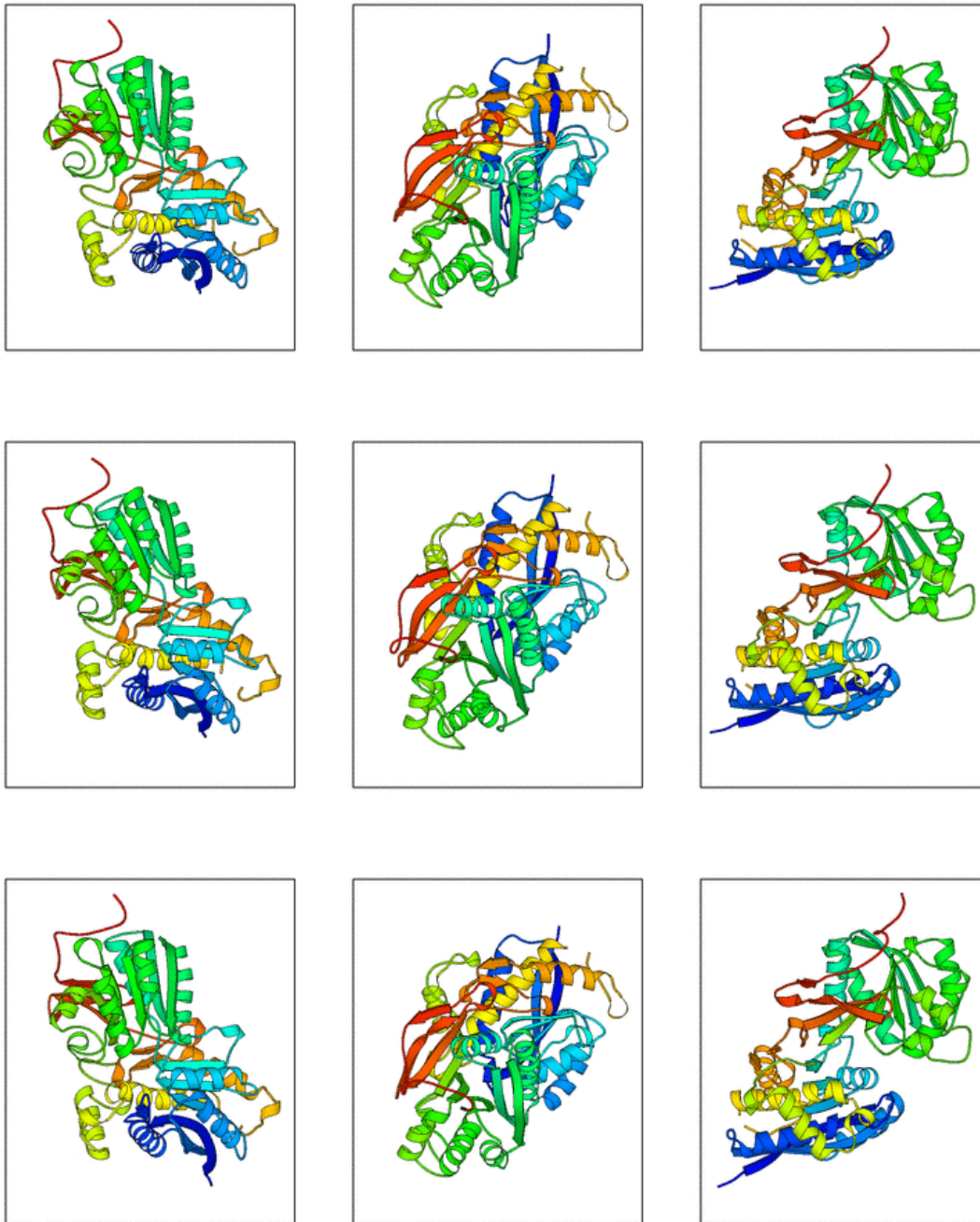


Figura 28. Movimientos de los tres modos normales empleados del cristal 4MR9.

Los cálculos obtenidos de las tres conformaciones de cada modo normal se muestran en la Tabla 8, observándose pequeñas diferencias en los resultados de acuerdo con el cambio conformacional o la conformación analizada de la estructura cristalina, esto nos indica que de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en docking molecular rígido y los obtenidos en el docking molecular semiflexible no hay tanta variación en el

movimiento de los residuos de aminoácidos. Para este análisis se emplearon solo las estructuras cristalinas del receptor GABA_B unido a Baclofen (PDB: 7C7Q) y al antagonista SCH 50911 (PDB: 4MR9).

Tabla 8. Docking molecular semiflexible, teniendo una desviación estándar de entre 0.05 a 0.1.

Compuesto	Estructura cristalina del receptor GABA _B					
	7C7Q (Kcal/mol)			4MR9 (Kcal/mol)		
Baclofen	-8.3	-8.4	-8.6	-5.9	-5.9	-6.0
SCH 50911	-6.3	-5.9	-5.9	-6.1	-6.3	-6.2
103a	-9.0	-8.9	-9.0	-7.3	-7.4	-7.3
103b	-9.0	-8.9	-9.1	-6.5	-7.3	-7.4
103c	-8.8	-8.8	-8.8	-6.8	-7.2	-7.1
103d	-8.2	-8.1	-8.3	-6.8	-6.7	-6.8
103e	-8.4	-8.4	8.2	-6.6	-6.7	6.7
103f	-7.7	-7.7	-7.6	-6.9	-7.0	-7.0
103g	-8.7	-8.6	-8.5	-6.8	-6.9	-6.8
103h	-8.3	-8.3	-8.4	-6.9	-7.0	-7.0
103i	-8.6	-8.5	-8.6	-6.7	-6.7	-6.6

A continuación, se muestran las interacciones y la conformación de los compuestos **103a-c**, siendo los que presentaron una menor energía de interacción en el docking molecular anteriormente realizado; donde se aprecian el movimiento del ligando y de los residuos del receptor GABA_B, esto se puede observar más a detalle en las distancias de cada interacción.

En el compuesto **103a** las modificaciones que se logran apreciar en la comparativa de la pose del docking rígido con las tres conformaciones del primer modo normal, siendo una de ella la interacción con Ile393 con el *p*-clorofenilo, además de la variación en el acomodo de Val318 y la interacción de Tyr367 con el oxígeno del carbonilo que no se aprecian en las últimas dos conformaciones.

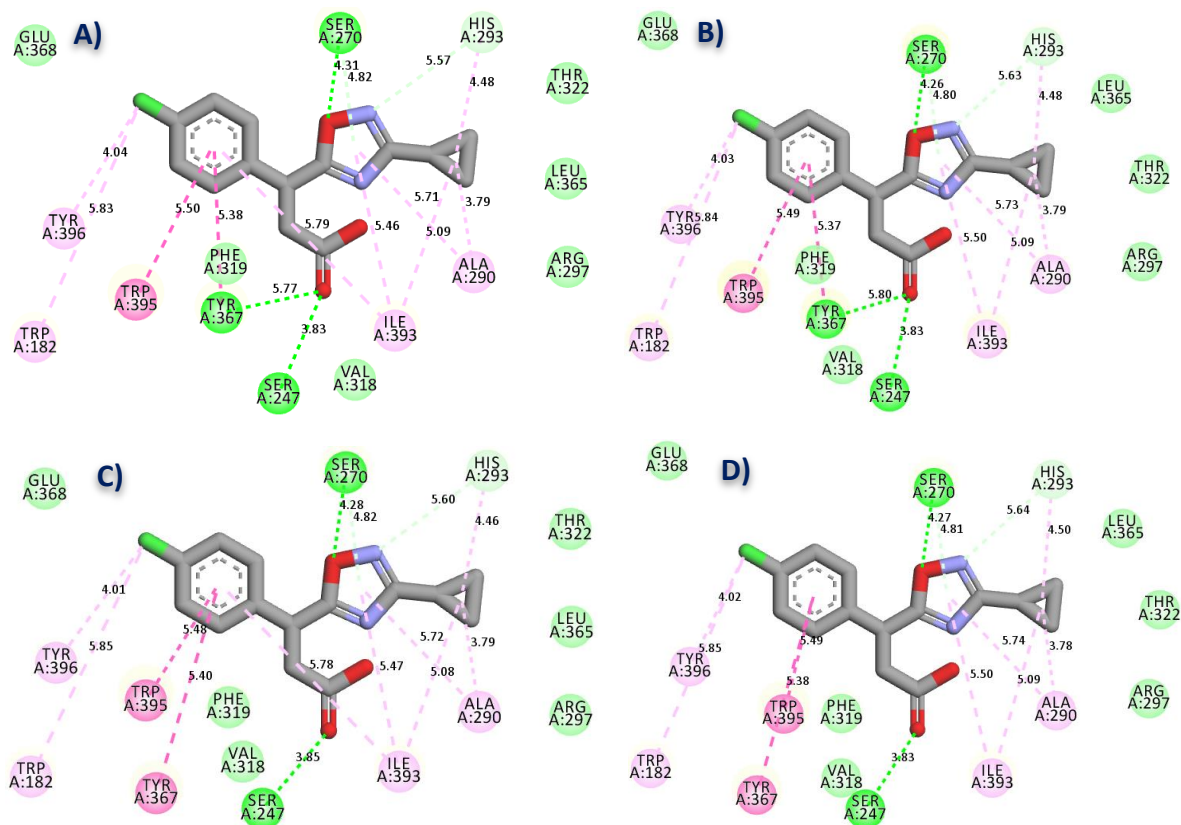
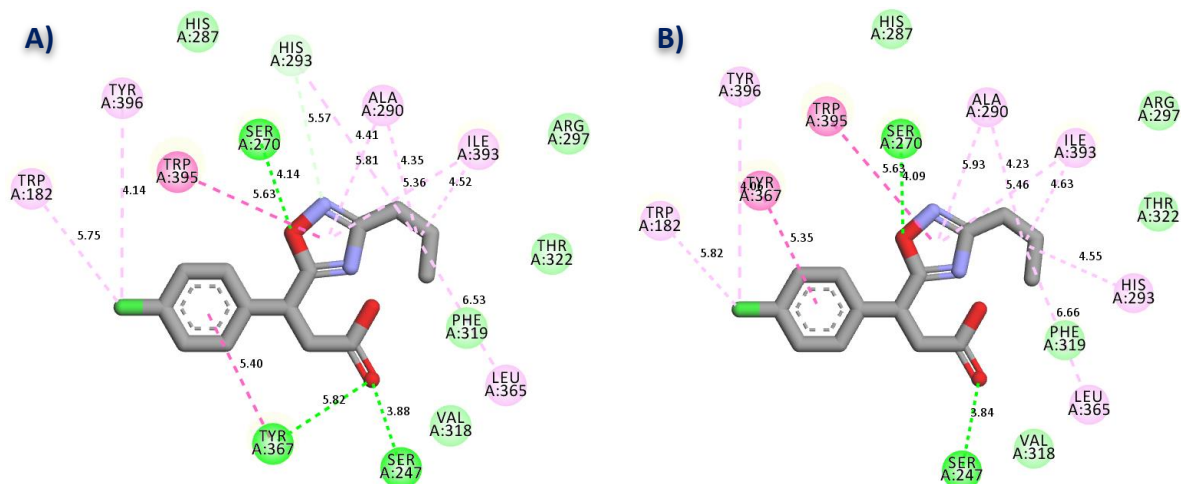


Figura 29. **A)** pose del docking rígido. **B)** Pose de la primera conformación del modo normal. **C)** Interacciones de la segunda pose del modo normal. **D)** Interacciones de la tercera conformación.

En el análisis del compuesto **103b**, en el anillo *p*-clorofenilo se aprecia el cambio de la interacción de Trp395 con el anillo del 1,2,4-oxadiazol, además de tener una interacción de más con Tyr367 y en el grupo carbonilo la pérdida de la interacción con Tyr367 como se observan en las poses de las conformaciones de los modos normales.



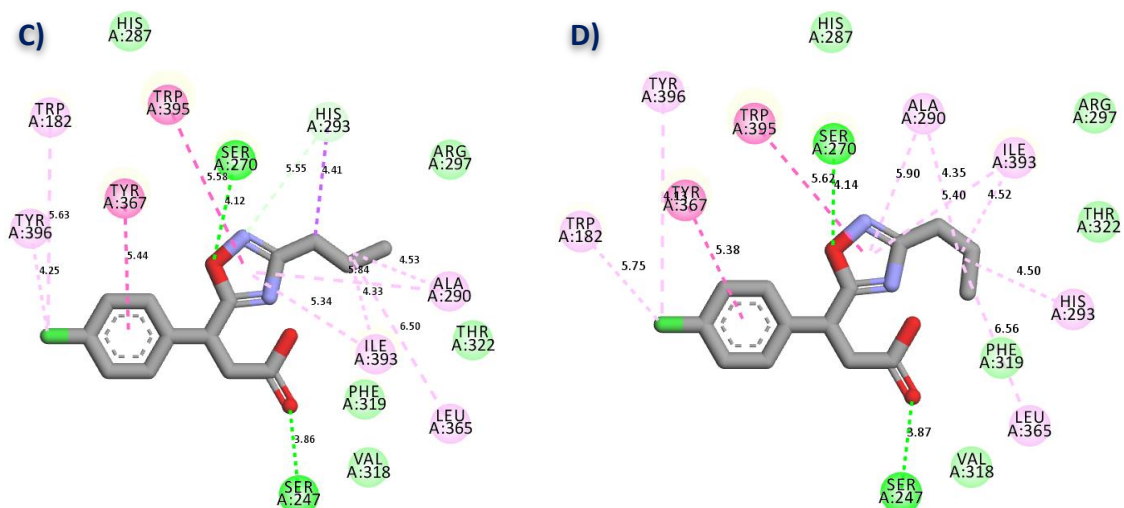
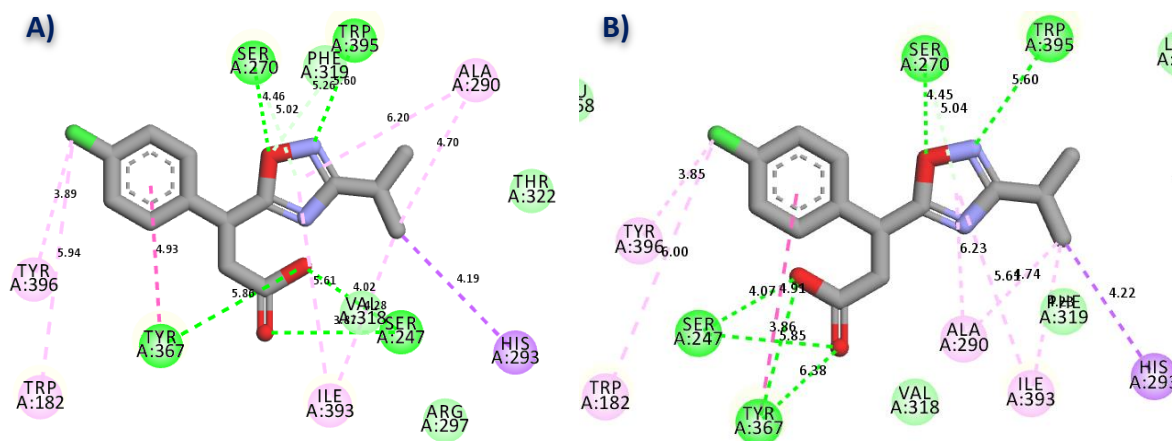


Figura 30. A) Pose del docking rígido. **B)** Pose de la primera conformación del modo normal. **C)** Interacciones de la segunda pose del modo normal. **D)** Interacciones de la tercera conformación.

Para el compuesto **103c**, en el anillo 1,2,4-oxadiazol se observa la pérdida de la interacción con Phe319 para las poses correspondientes a las tres conformaciones del modo normal del receptor GABA_B, la cual se encuentra a una distancia de 5.26 Å, (Figura 31A).



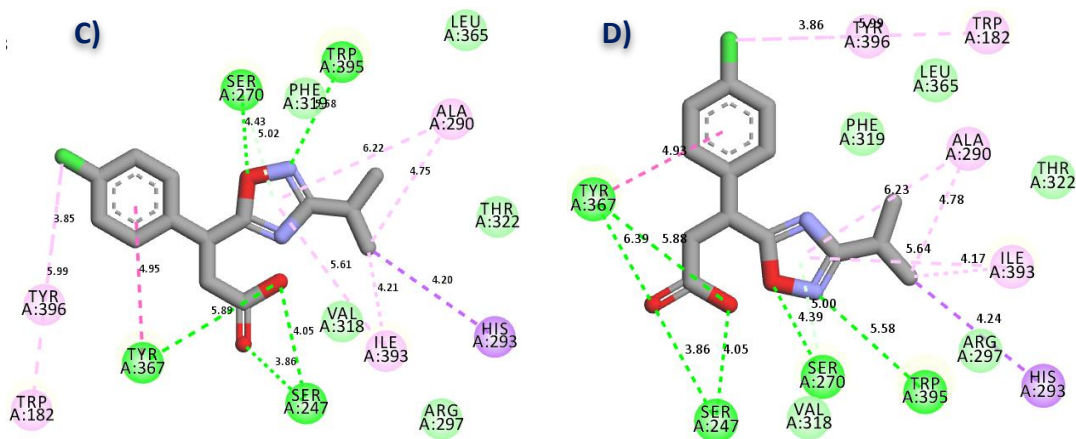
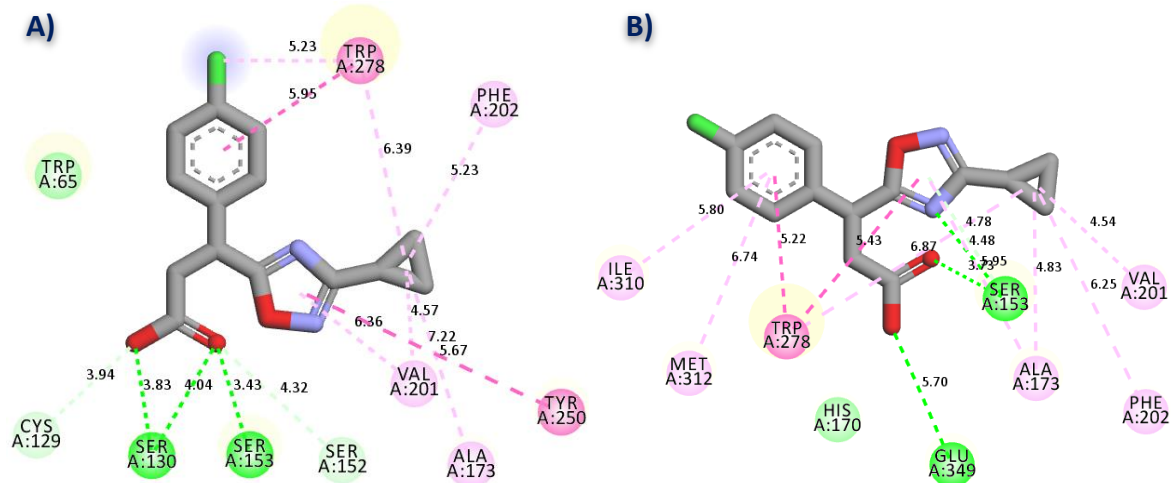


Figura 31. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.

Las interacciones de los compuestos **103a-c** con las tres conformaciones del primer modo normal correspondiente al cristal 4MR9 se muestran a continuación.

En el compuesto **103a**, en el anillo *p*-clorofenilo hay interacciones con los residuos Ile310, Met312 y en el caso de la tercera conformación hay interacciones con Cys103 y Cys129; en el grupo carbonilo no se observan las interacciones con Ser130 y Ser152, además de tener interacción con Glu349.



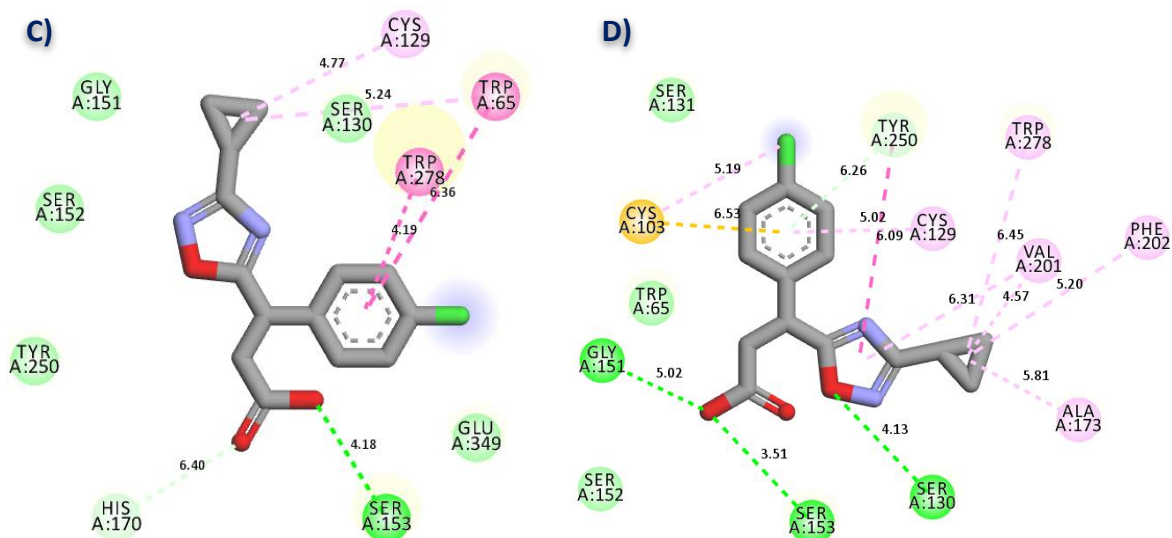
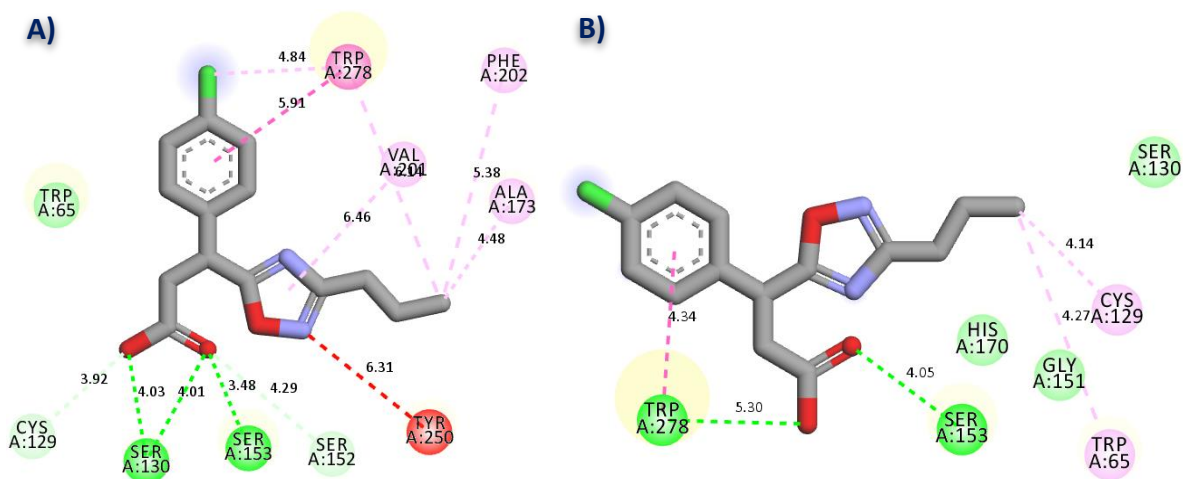


Figura 32. A) Pose del docking rígido. **B)** Pose de la primera conformación del modo normal. **C)** Interacciones de la segunda pose del modo normal. **D)** Interacciones de la tercera conformación.

En compuesto **103b** hay variaciones destacables de las interacciones con los residuos del receptor GABA_B en las conformaciones uno y tres, siendo las siguientes: para el grupo carbonilo las interacciones con Ser152 y Ser130 no son apreciables y en cambio se observan las interacciones con Trp278, Gly151 y Trp65; en el anillo *p*-clorofenilo de la conformación tres, las interacciones son con: Cys129, Cys103 y Tyr250, finalmente las interacciones en el anillo 1,2,4-oxadiazol de la conformación uno, presenta interacción con los residuos Cys129 y Trp65.



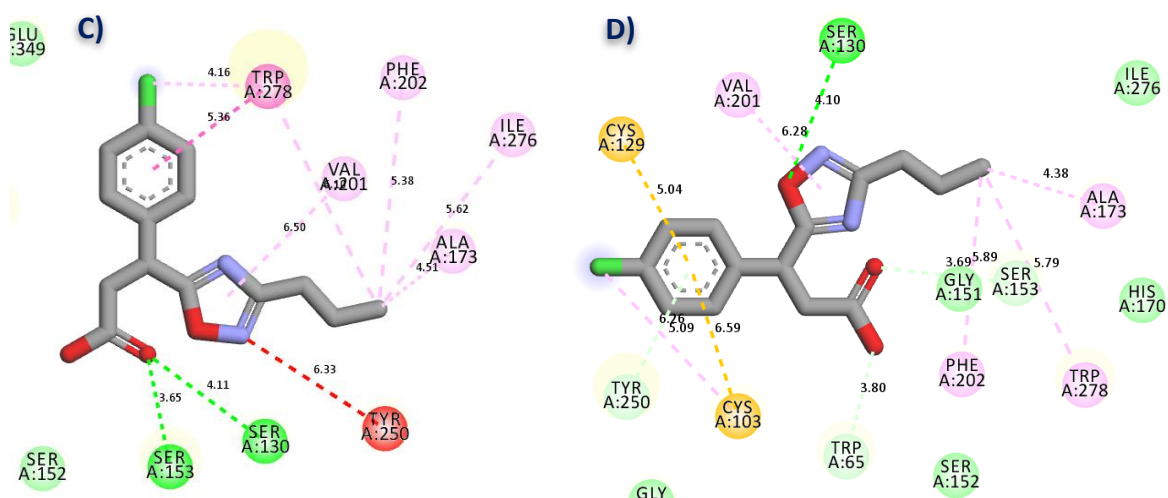
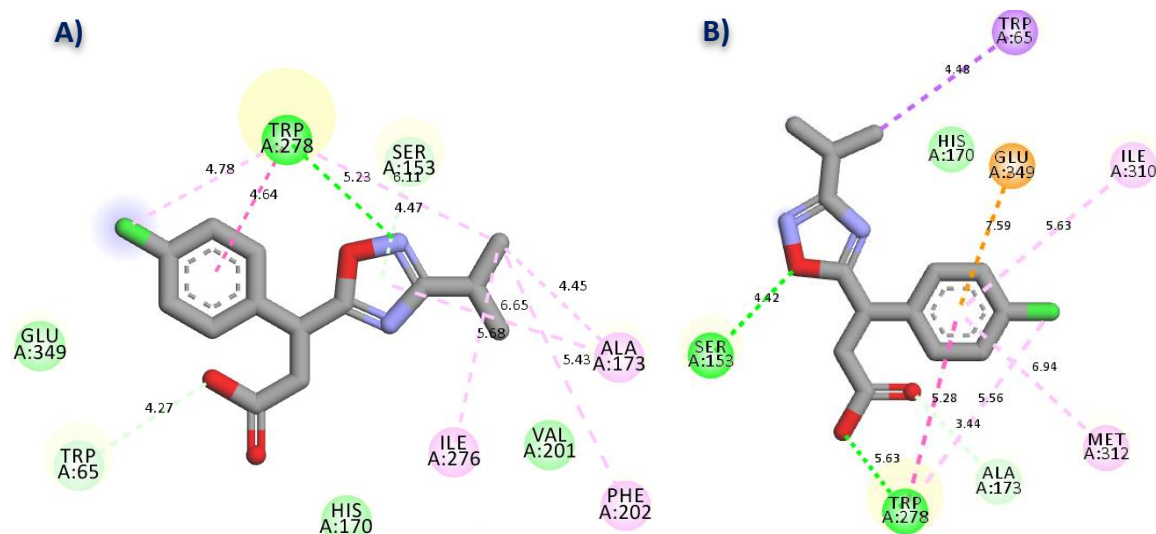


Figura 33. **A)** Pose del docking rígido. **B)** Pose de la primera conformación del modo normal. **C)** Interacciones de la segunda pose del modo normal. **D)** Interacciones de la tercera conformación.

Finalmente, para el análisis de las interacciones de las conformaciones correspondientes al primer modo normal del compuesto **103c**, las conformaciones uno y tres (Figuras 34B y 34C) muestra que las interacciones en *p*-clorofenilo son diferentes a las otras conformaciones, las cuales son: Glu349, Ile310, Met312, His170 y Trp65.

En el anillo 1,2,4-oxadiazol se aprecian variaciones en las interacciones con respecto a las mostradas en la pose del docking rígido, Val201, Cys129, Ser131, Tyr250 y Trp65.



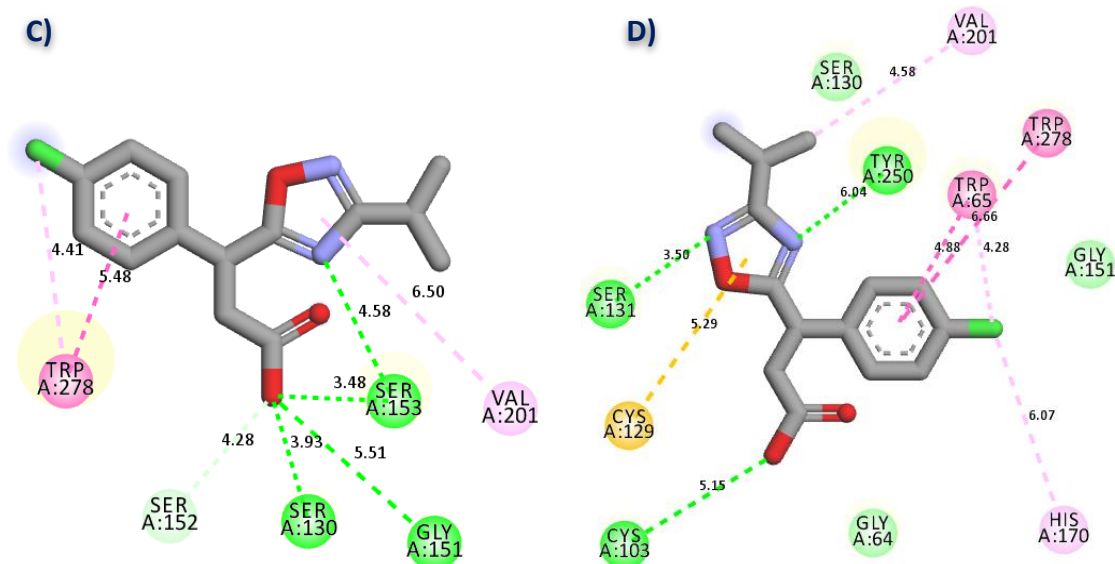


Figura 34. A) Pose del docking rígido. B) Pose de la primera conformación del modo normal. C) Interacciones de la segunda pose del modo normal. D) Interacciones de la tercera conformación.

Finalmente se realizó el análisis de predicción utilizando el servidor en línea Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS online), el cual permite predecir la actividad biológica de compuestos por comparación estructural con más de 250,000 moléculas activas, con una exactitud igual o superior al 95%. Los resultados arrojados por la base de datos consisten en una lista de probabilidad de actividades biológicas organizadas de mayor a menor, en función de la probabilidad de actividad (P_a). Los valores de $P_a > 0.7$ indican una buena probabilidad (equivalente a mayor del 70%), valores entre 0.5 a 0.7 indican una probabilidad media y por último, valores por debajo de 0.5 indican una probabilidad baja.⁷⁰

Y de acuerdo con los resultados obtenidos de este análisis se aprecia que nuestros compuestos presentarían actividad o unión hacia el receptor $GABA_B$, de esta manera se corroborarían los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, Tabla 9.

Tabla 9. Predicción de la actividad de los compuestos **103a-i** de PASS online.

Compuesto	Actividad		
	Agonista del receptor $GABA_B$	Antagonista del receptor $GABA_B$	Inhibidor de GABA-AT
GABA	0.556	0.205	0.779
(R)-Baclofen	0.631	0.473	
(R)-Faclofen			
SCH 50911	0.204	0.113	0.388
103a	0.34	0.057	0.354

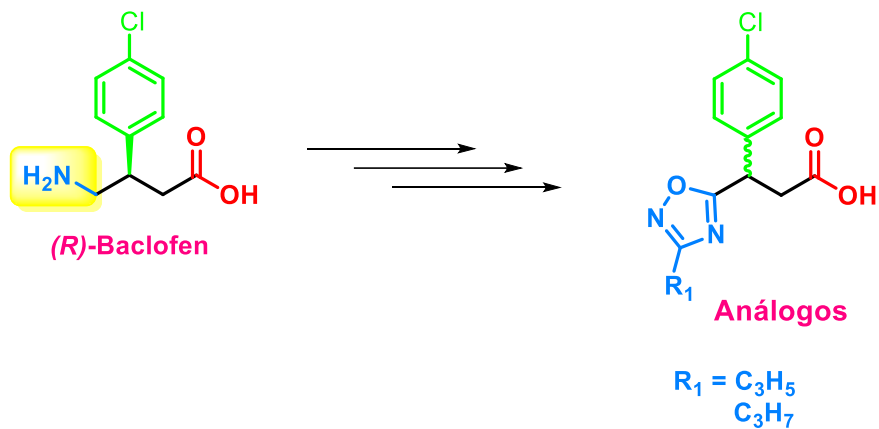
103b	0.218		0.316
103c	0.247	0.036	0.294
103d	0.181	0.045	0.297
103e		0.049	0.264
103f		0.054	0.245
103g	0.183		0.327
103h			0.291
103i			0.270

8 CONCLUSIONES

- Se determinaron las propiedades farmacocinéticas de los compuestos **103a-i** mediante el uso diferentes programas y servidores, con respecto a los valores teóricos de lipofilicidad (LogP), los compuestos **103a**, **103b**, **103c**, **103e** y **103f** fueron mejores con respecto a Baclofen y el antagonista SCH 50911.
- Se determinaron los residuos de aminoácidos del receptor GABA_B importantes, involucrados en la interacción con los compuestos biológicamente activos. Destacando los residuos para los agonistas: Ser153, Ser130, Tyr250, His170, Glu349, Trp278, Trp65 y para los antagonistas: Ser153, Ser152, Ser130, Gly151, Cys129.
- Se realizó el acoplamiento molecular empleando las tres estructuras cristalinas del receptor GABA_B (4MS4, 7C7Q y 4MR9), determinado que los compuestos **103a**, **10b** y **103c** fueron los que presentaron una mejor energía de interacción en las tres estructuras cristalinas del receptor GABA_B.
- Se obtuvieron los tres modos normales más representativos de los cristales 4MS4, 7C7Q y 4MR9, extrayendo nueve conformaciones representativas (tres de cada modo normal) de cada cristal.
- Con base en los resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares de las tres estructuras cristalinas y a su análisis; los compuestos **103a**, **10b** y **103c** son los mejores candidatos para sintetizar.

9 PERSPECTIVAS

1. El planteamiento de una ruta de síntesis para los compuestos **103a**, **103b** y **103c**.



2. Realizar los estudios *in vitro* para determinación y corroboración de su posible actividad farmacológica.
3. En base a los resultados obtenidos de nuestro diseño de *in silico*, llevar a cabo un modelo QSAR para la propuesta de nuevos análogos de (R)-Baclofen como posibles agonistas del receptor GABA_B.

10 REFERENCIAS

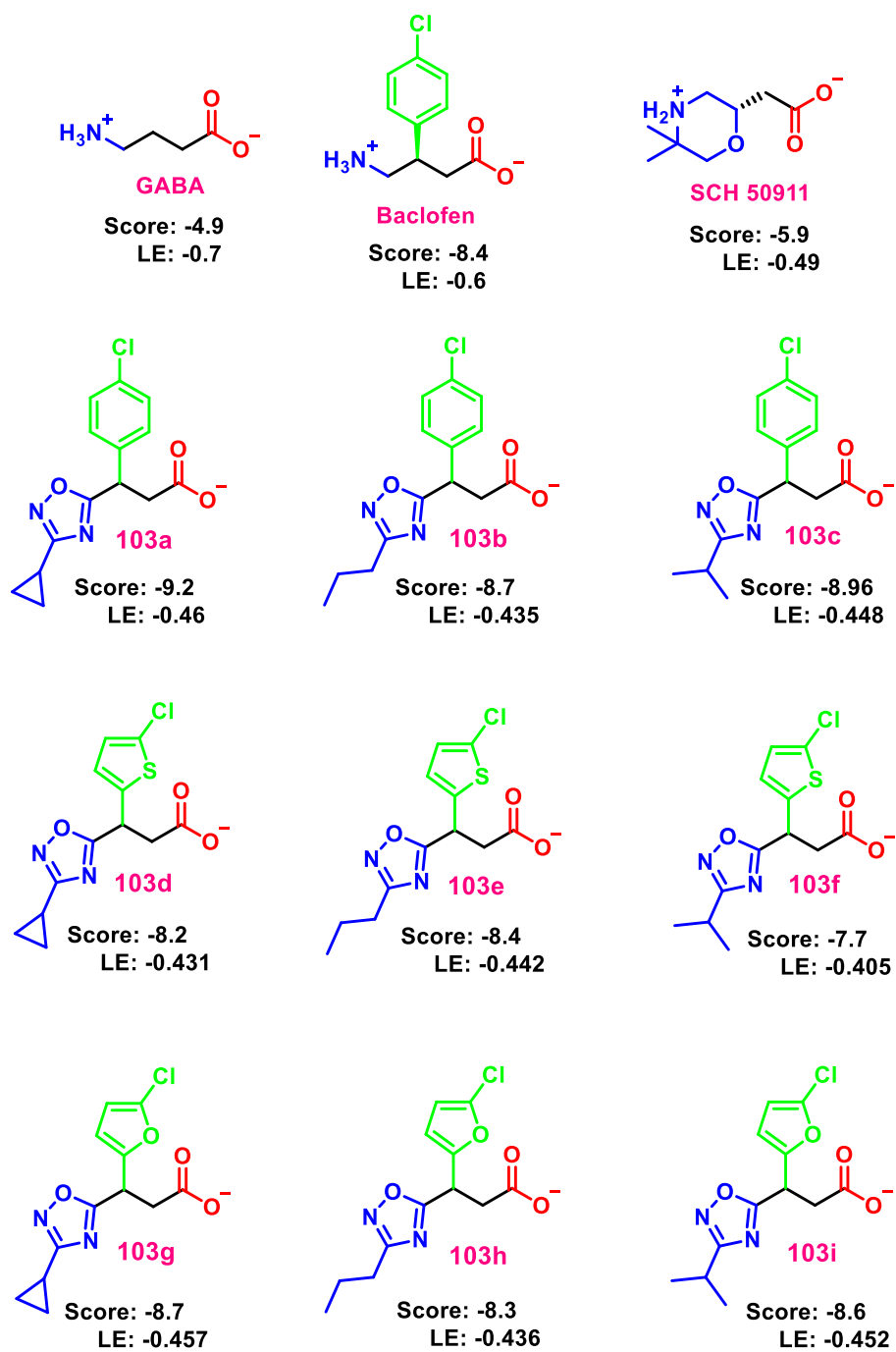
- (1) DeRuiter, J. Principles of Drug Action, **2004**, 2, 1-12.
- (2) Luján, R. *Cienc. al Día Int.* **2004**, 5, 1-19.
- (3) Silverman, R. B. *Chem. Rev.* **2018**, 4037-4070.
- (4) Sereikaite, V.; Fritzius, T.; Kasaragod, V. B.; Bader, N.; Maric, H. M.; Schindelin, H.; Bettler, B.; Strømgaard, K. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 8819-8830.
- (5) Pinard, A.; Seddik, R.; Bettler, B. *Advances in Pharmacology*, **2010**, 58, 231-255.
- (6) Costantino, G.; Macchiarulo, A.; Guadix, A. E.; Pellicciari, R. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1827-1832.
- (7) Watanabe, M.; Maemura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H. *Int. Rev. Cytol.* **2002**, 213, 1-47.
- (8) Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; et al., *Neuroscience*, **2001**.
- (9) Benarroch, E. E. *Neurology* **2012**, 78, 578-584.
- (10) Bormann, J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, 21, 16-19.
- (11) Geng, Y.; Bush, M.; Mosyak, L.; Wang, F.; Fan, Q. R. *Nature* **2013**, 504, 254-259.
- (12) Emson, P. C. *Prog. Brain Res.* **2007**, 160, 43-57.
- (13) Ling, Walter; Shoptaw, Steven; Majewska, D. *Neuropsychopharmacology* **1998**, 18, 403-404.
- (14) Kent, C. N.; Kent, C. N.; Park, C.; Lindsley, C. W.; Lindsley, C. W.; Lindsley, C. W.; Lindsley, C. W. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, 11, 1740-1755.
- (15) Keberle, H.; Faigle, J. W.; Wilhem, M. U.S. Patent 3,471,548 Oct 7, **1969**, 3-6.
- (16) Jagtap, A.; Maharashtra, M.; Gharpure, M.; Shinde, N. U.S. Patent 2018/0208544A1, Jul 26, **2018**, 1-9.
- (17) Hayashi, Y.; Sakamoto, D.; Okamura, D. *Org. Lett.* **2016**, 18, 4-7.
- (18) Corey, E. J.; Zhang, F. Y. *Org. Lett.* **2000**, 2, 4257-4258.
- (19) Caira, M. R.; Clauss, R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L.; Wildervanck, A. F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1997**, 4, 763-768.
- (20) Camps, P.; Muñoz, T. D.; Sánchez, L. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 2039-2044.
- (21) Montoya, B. I. J.; Valentín, G. B.; López, M. E.; Linzaga, E. I.; Ordoñez, M.; Román, B. *P. Molecules* **2015**, 20, 22028-22043.
- (22) Felluga, F.; Gombac, V.; Pitacco, G.; Valentin, E. *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, 16, 1341-1345.

- (23) Reddipalli, G.; Venkataiah, M.; Fadnavis, N. W. *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21*, 320-324.
- (24) Froestl, W.; Mickel, S. J.; Hall, R. G.; Sprecher, G. Von; Strub, D.; Baumann, P. A.; Brugger, F.; Gentsch, C.; Jaekel, J.; Olpe, H.; Rihs, G.; Vassout, A.; Waldmeier, P. C.; Bittiger, H. **1995**, *38*, 3297-3312.
- (25) Alstermark, C.; Amin, K.; Dinn, S. R.; Elebring, T.; Fjellstro, O.; Fitzpatrick, K.; Geiss, W. B.; Gottfries, J.; Guzzo, P. R.; Harding, J. P.; Holme, A.; Kothare, M.; Lehmann, A.; Mattsson, J. P.; Nilsson, K.; Sunde, G.; Swanson, M.; Unge, S.; Woo, A. M.; Wyle, M. *J. J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4315-4320.
- (26) Howson, W. J. M.; Broekman, M.; J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 515-518.
- (27) Xu, F.; Peng, G.; Phan, T.; Dilip, U.; Chen, J. L.; Chernov-Rogan, T.; Zhang, X.; Grindstaff, K.; Annamalai, T.; Koller, K.; Gallop, M. A.; Wustrow, D. J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6582-6585.
- (28) Kerr, D. I. B.; Ong, J.; Prager, R. H.; Gynther, B. D.; Curtis, D. R. *Brain Res.* **1987**, *405*, 150-154.
- (29) Kerr, D. I. B.; Ong, J.; Johnston, G. A. R.; Abbenante, J.; Prager, R. H. *Neurosci. Lett.* **1988**, *92*, 92-96.
- (30) Frydenvang, K.; Enna, S. J.; Krogsgaard, L. P. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1997**, *53*, 1088-1091.
- (31) Bolser, D.C.; Blythin, D. J.; Chapman, R. W.; Egan, R. W.; Hey, J. A.; Rizzo A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *274*, 1393-1398.
- (32) Froestl, W.; Mickel, S. J.; Hall, R. G.; Von Sprecher, G.; Strub, D.; Baumann, P. A.; J. *Med. Chem.* **1995**, *38*, 3297-3312.
- (33) Olpe, H. R.; Karlsson, G.; Pozza, M. F.; Brugger, F.; Steinmann, M.; Van Riezen, H.; Fagg, G.; Hall, R. G.; Froestl, W.; Bittiger, H. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *187*, 27-38.
- (34) Olpe, H. R.; Steinmann, M. W.; Ferrat, T.; Pozza, M. F.; Greiner, K.; Brugger, F.; Froestl, W.; Mickel, S. J.; Bittiger, H. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *233*, 179-186.
- (35) Froestl, W.; Mickel, S. J.; Von Sprecher, G.; Diel, P. J.; Hall, R. G.; Maier, L.; Strub, D.; Melillo, V.; Baumann, P. A.; Bernasconi, R.; Gentsch, C.; Hauser, K.; Jaekel, J.; Karlsson, G.; Klebs, K.; Maître, L.; Marescaux, C.; Pozza, M. F.; Schmutz, M.; Steinmann, M. W.; Van Riezen, H.; Vassout, A.; Mondadori, C.; Olpe, H. R.; Waldmeier, P. C.; Bittiger, H. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3313-3331.
- (36) Nyitrai, G.; Kékesi, K. A.; Emri, Z.; Szárics, É.; Juhász, G.; Kardos, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *478*, 111-119.
- (37) Nowak, G.; Partyka, A.; Pałucha, A.; Szewczyk, B.; Wierońska, J. M.; Dybała, M.; Metz, M.; Librowski, T.; Froestl, W.; Papp, M.; Pilc, A. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 581-590.

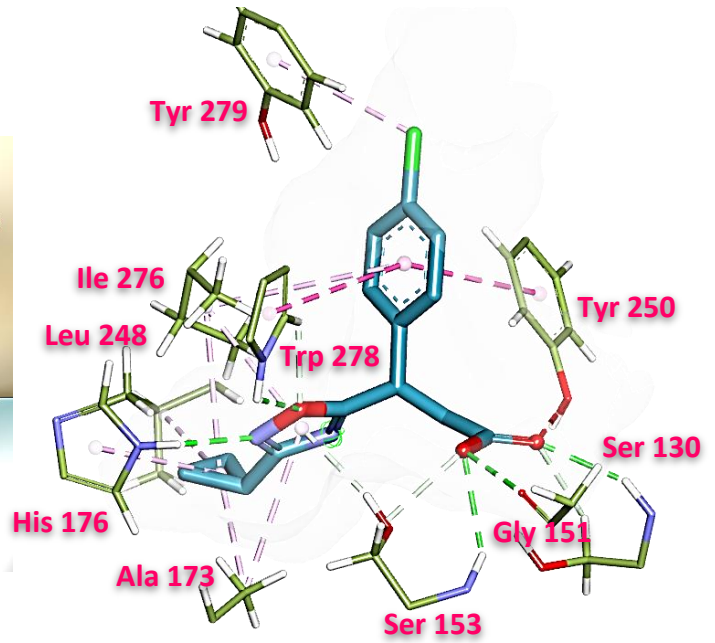
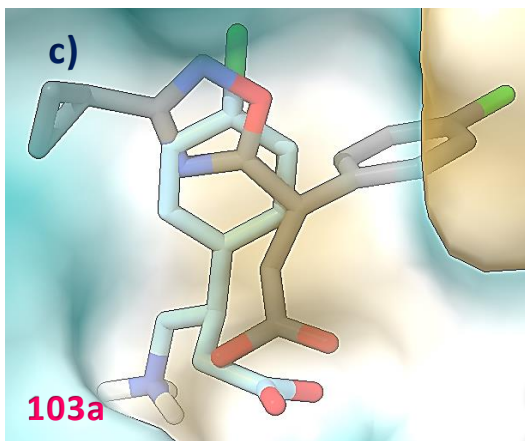
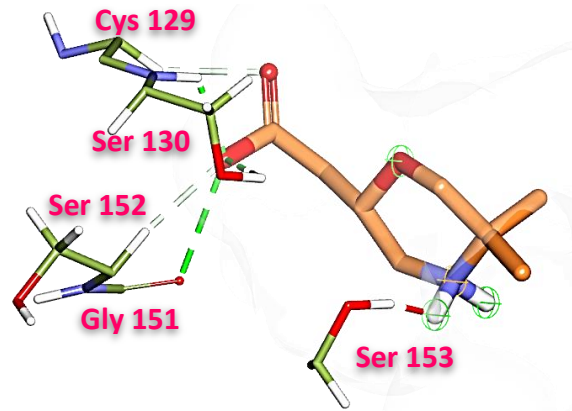
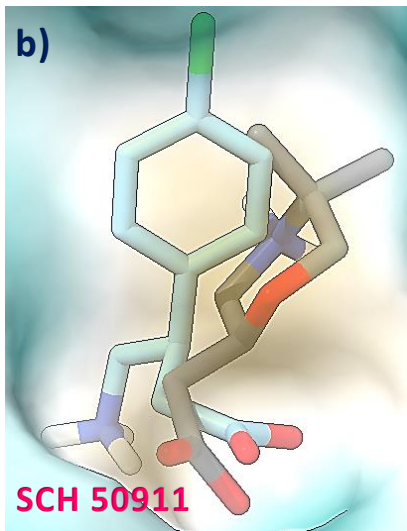
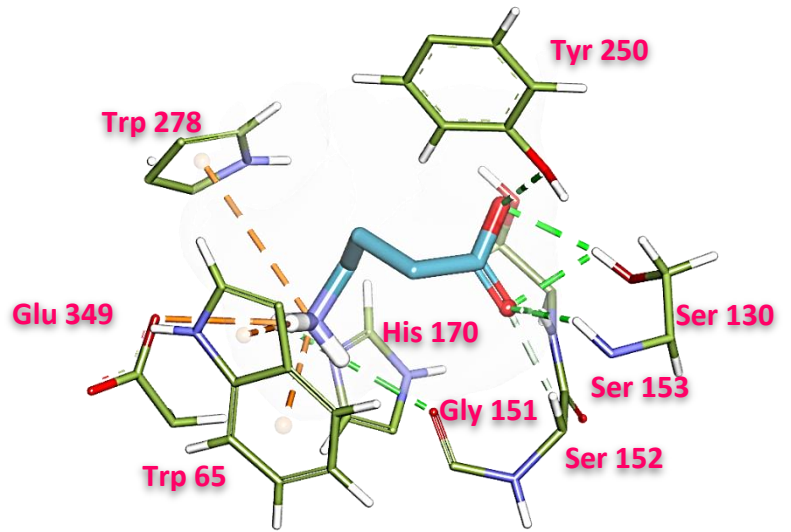
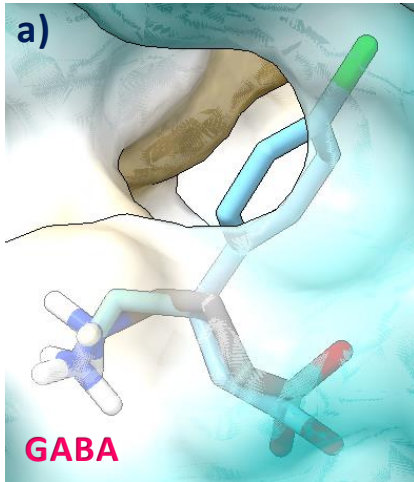
- (38) Froestl, W.; Mickel, S. J.; Mondadori, C.; Olpe, H. R.; Pozza, M. F.; Waldmeier, P. C.; Bittiger, H. *Pharmacochem. Libr.* **1996**, *24*, 253-270.
- (39) Sloviter, R. S.; Ali-Akbarian, L.; Elliott, R. C.; Bowery, B. J.; Bowery, N. G. *Neuropharmacology* **1999**, *38*, 1707-1721.
- (40) Todde, S.; Moresco, R. M.; Fröstl, W.; Stampf, P.; Matarrese, M.; Carpinelli, A.; Magni, F.; Galli Kienle, M.; Fazio, F. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27*, 565-569.
- (41) Ong, J.; Kerr, D. I. B.; Bittiger, H.; Waldmeier, P. C.; Baumann, P. A.; Cooke, N. G.; Mickel, S. J.; Froestl, W. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *362*, 27-34.
- (42) Belley, M.; Sullivan, R.; Reeves, A.; Evans, J.; O'Neill, G.; Ng, G. Y. K. *Bioorganic Med. Chem.* **1999**, *7*, 2697-2704.
- (43) Calon, F.; Morissette, M.; Goulet, M.; Grondin, R.; Blanchet, P. J.; Bédard, P. J.; Di Paolo, T. *Exp. Neurol.* **2000**, *163*, 191-199.
- (44) Froestl, W.; Bettler, B.; Bittiger, H.; Heid, J.; Kaupmann, K.; Mickel, S. J.; Strub, D. *Farmaco* **2003**, *58*, 173-183.
- (45) Froestl, W.; Bettler, B.; Bittiger, H.; Heid, J.; Kaupmann, K.; Mickel, S. J.; Strub, D. *Neuropharmacology* **1999**, *38*, 1641-1646.
- (46) Bowery, N. G.; Bettler, B.; Froestl, W.; Gallagher, J. P.; Marshall, F.; Raiteri, M.; Bonner, T. I.; Enna, S. J. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 247-264.
- (47) Enna, S. J.; Bowery, N. G. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, **2013**, 351-353.
- (48) Miranda, F.; Jiménez, J. C.; Cedillo, L. N.; Sandoval, S. A.; Millán, M. P.; Sánchez, C. H.; Velázquez, M. D. N. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, *93*, 25-30.
- (49) Takagi, T.; Bungo, T.; Tachibana, T.; Saito, E. S.; Saito, S.; Yamasaki, I.; Tomonaga, S.; Denbow, D. M.; Furuse, M. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *73*, 270-275.
- (50) Asay, M. J.; Boyd, S. K. *Brain Res.* **2006**, *1094*, 76-85.
- (51) Gillani, Q.; Iqbal, S.; Arfa, F.; Khakwani, S.; Akbar, A.; Ullah, A.; Ali, M.; Iqbal, F. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1-6.
- (52) Malcangio, M.; Ghelardini, C.; Giotti, A.; Malmberg, A. P.; Bartolini, A. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *103*, 1303-1308.
- (53) Carai, M. A. M.; Brunetti, G.; Lobina, C.; Serra, S.; Vacca, G.; Minardi, G.; Colombo, G.; Gessa, G. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *445*, 195-199.
- (54) Filip, M.; Frankowska, M.; Przegaliński, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *574*, 148-157.
- (55) Jaramillo, A.; Gill, B. M.; Delovitch, T. L. *Life Sciences* **1994**, *55*, 1163-1177.
- (56) Soltesz, I.; Haby, M.; Leresche, N.; Crunelli, V. *Brain Res.* **1988**, *448*, 351-354.
- (57) Carai, M. A. M.; Colombo, G.; Brunetti, G.; Melis, S.; Serra, S.; Vacca, G.; Mastinu, S.;

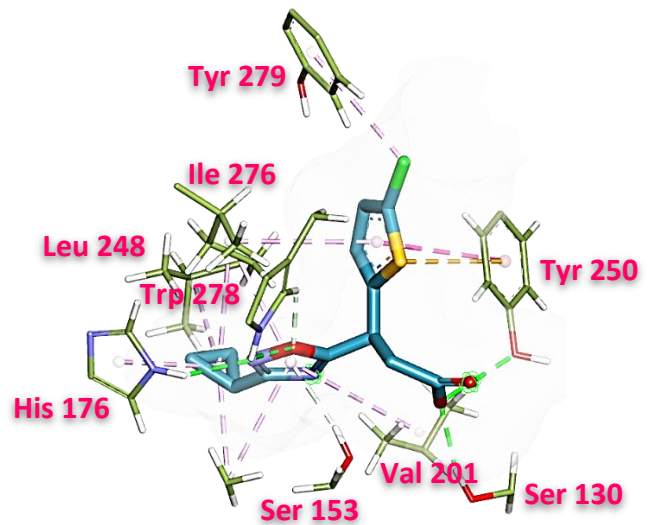
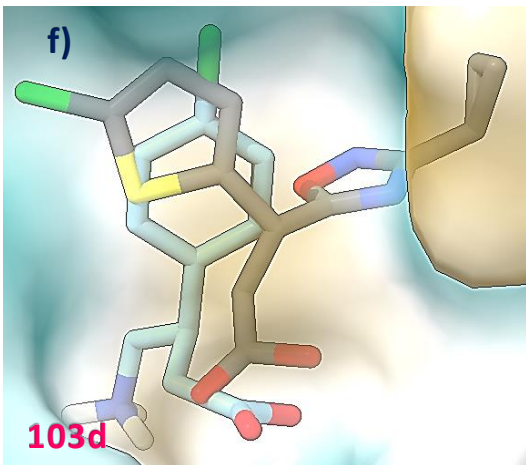
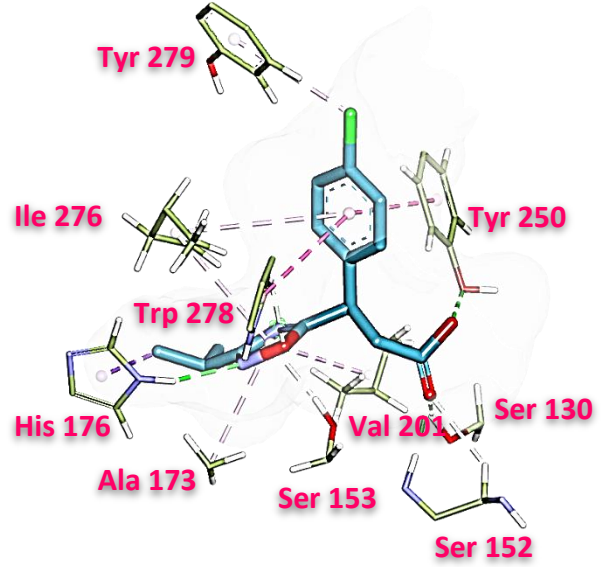
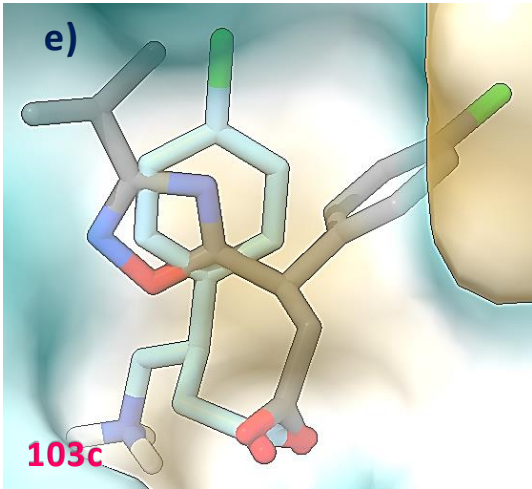
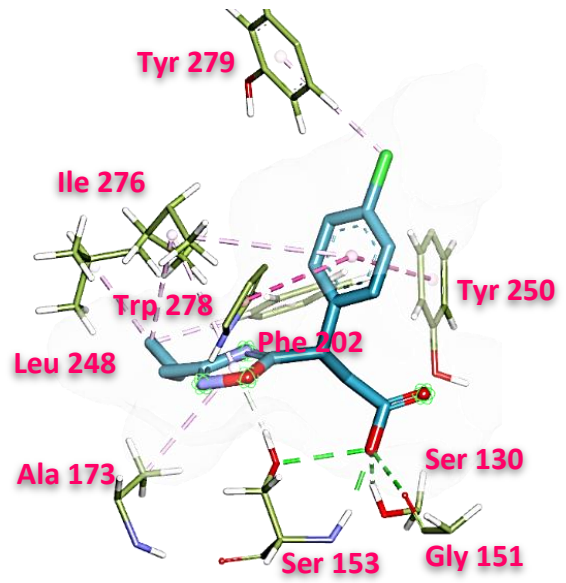
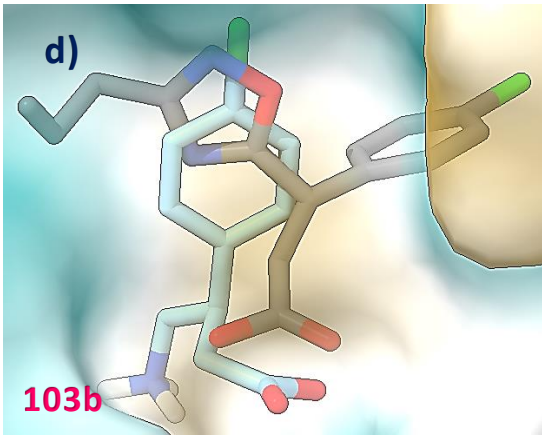
- Pistuddi, A. M.; Solinas, C.; Cignarella, G.; Minardi, G.; Gessa, G. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *428*, 315-321.
- (58) Bexis, S.; Ong, J.; White, J. *Life Sciences*, **2001**, *70*, 395-401.
- (59) De Ruyck, J.; Brysbaert, G.; Blossey, R.; Lensink, M. F. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **2016**, *9*, 1-11.
- (60) Tovar, G. E.; Guevara, S. J. A.; Said, R.; Santiago, Á.; Pastor, N. *Molecules* **2018**, *23*, 2984-.
- (61) Díaz, P. L.; Razo, H. R. S.; Pastor, N.; Santiago, Á.; Guevara, S. J. A.; Fernández, Z. M. *ChemistrySelect* **2020**, *5*, 1071-1079.
- (62) Kim, J.; Kwon, J.; Kim, M.; Do, J.; Lee, D.; Han, H. *Polym. J.* **2016**, *48*, 829-834.
- (63) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Molecules*, **2015**, *20*, 13384-13421.
- (64) Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Desing and Methods from ADME to Toxicity Optimization*, **2008**, 37-39.
- (65) Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*, **2008**, 122-130.
- (66) Martínez, C. Z.; Pastor, N.; Pineda, U. K.; Gómez, S. Z.; Fernández, Z. M.; Razo, H. R. S. **2019**, 94.
- (67) BIOVIA. Dassault Systemes, Discovery Studio Visualizer, Discovery Studio 2019 Client, San Diego: Dassault Systemes, **2019**.
- (68) De Freitas, R. F.; Schapira, M. *Med. Chem. Comm.*, **2017**, *8*, 1970-1981.
- (69) Tao, X.; Huang, Y.; Wang, C.; Chen, F.; Yang, L.; Ling, L.; Che, Z.; Chen, X. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 33-45.
- (70) Sadym, A.; Lagunin, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. *SAR QSAR Environ. Res.* **2003**, *14*, 339-347.

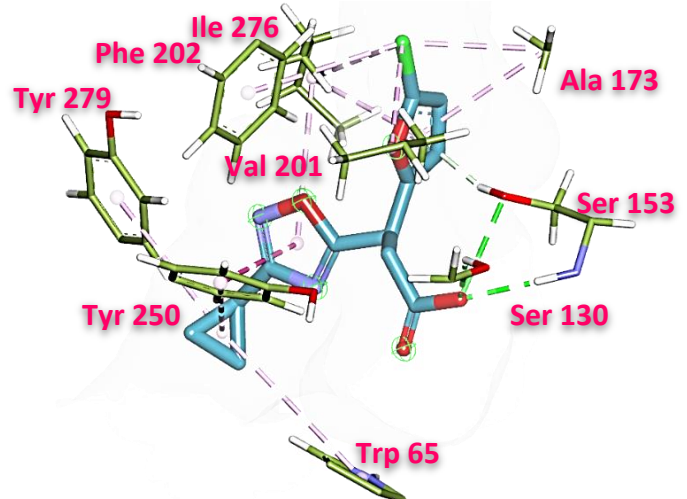
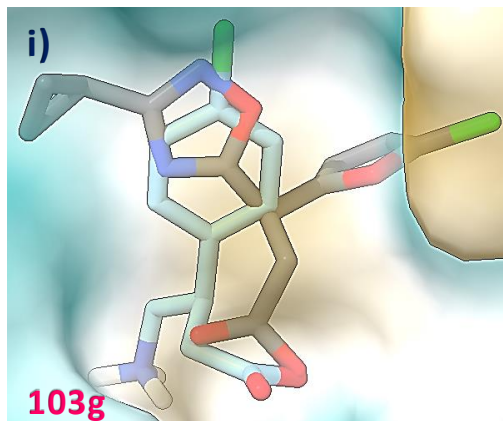
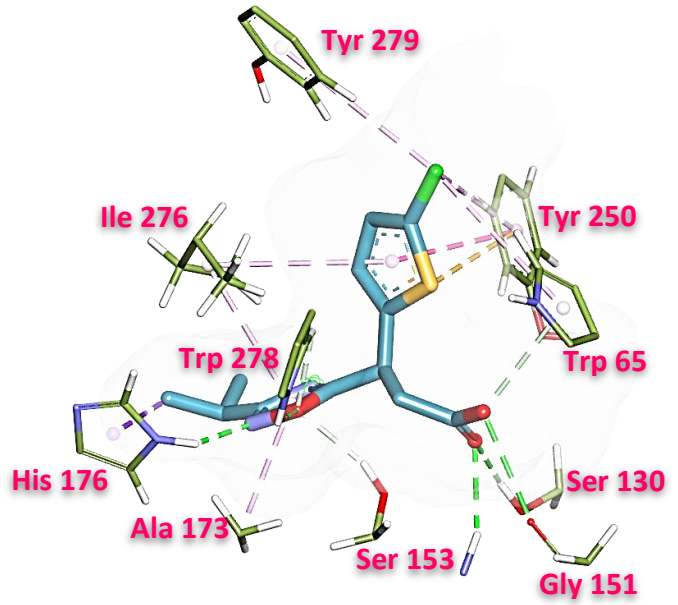
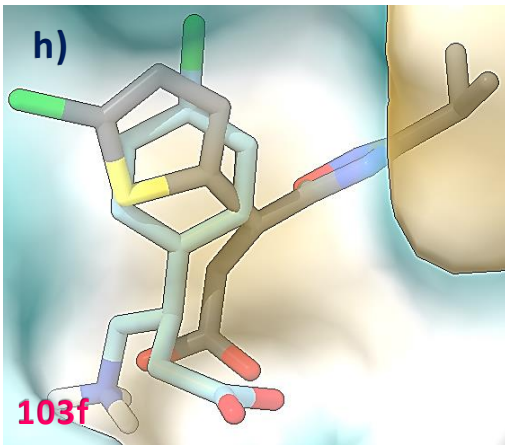
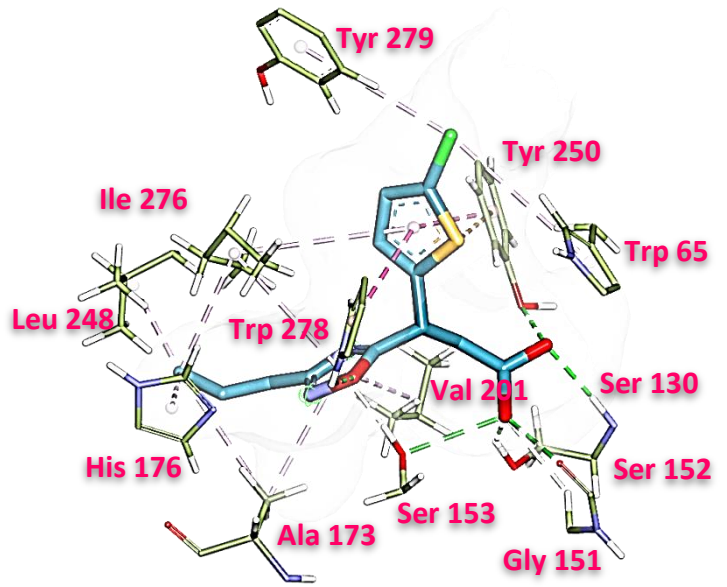
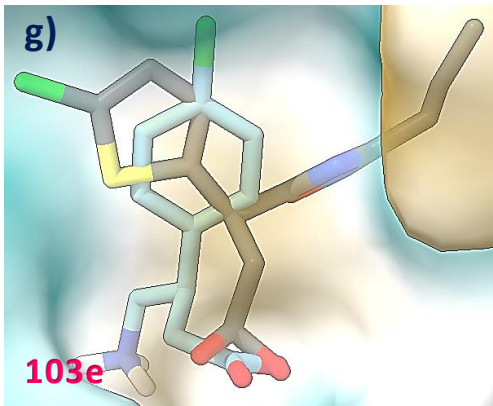
11 ANEXOS



Esquema 22. Energías de Interacciones y eficiencia del ligando de los compuestos **103a-i** empleando la estructura cristalina 4MS4.







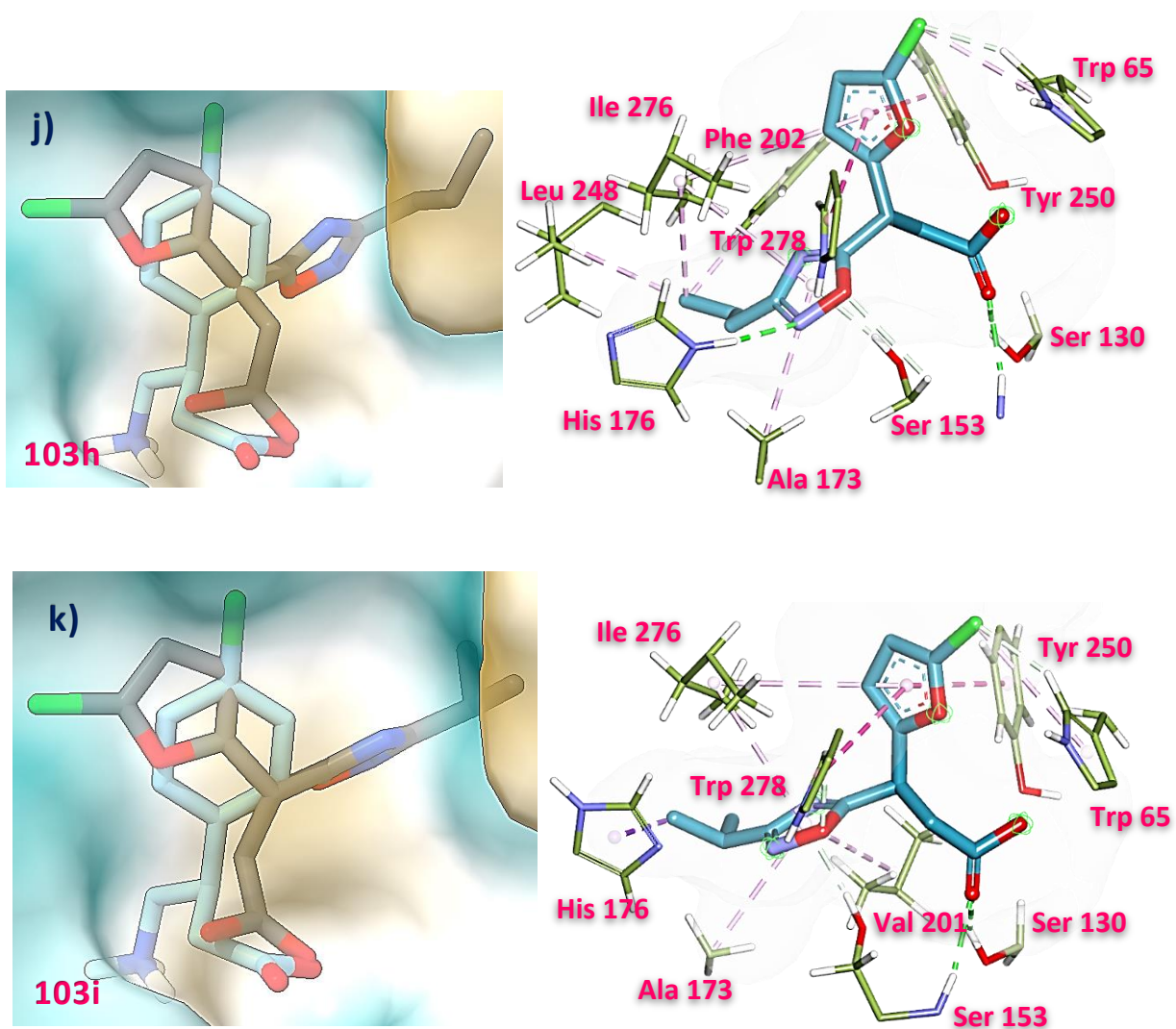


Figura 35. Comparativa de Baclofen con los compuestos **103a-i** y sus interacciones correspondientes.

Tabla 10. Comparativa de los residuos de aminoácidos del receptor en base a los grupos que poseen los compuestos de referencia y los compuestos **103a-i**.

Interacciones con el receptor GABA_b

Compuesto	Amino	Carboxilato	Aromático
Baclofen	His170, Glu349, Trp278	Ser153, Ser130, Tyr250	Trp278, Trp65
GABA	His170, Glu349, Trp278, Trp65, Gly151	Ser153, Ser152, Ser130, Tyr250	----

SCH 50911	Ser153	Ser130, Ser152, Gly151, Cys129	----
103a	His176, Trp278, Ile276, Leu248	Ser153, Ser130, Tyr250, Gly151	Tyr279, Ala172
103b	Val173, Ile276, Phe202, Leu248	Ser153, Ser130, Gly151	Trp278, Tyr250, Ile276
103c	His176, Trp278, Ile276, Ala173, Val201	Ser130, Tyr250,	Trp278, Tyr250, Ile276, Tyr279
103d	His176, Trp278, Ile276, Ser153, Leu248, Ala173, Val201	Ser130, Tyr250	Tyr250, Ile276, Tyr279
103e	His176, Trp278, Ile276, Leu248, Ala173, Val201	Ser130, Tyr250	Tyr250, Trp65, Tyr279, Ile276, Trp278
103f	His176, Trp278, Ala173, Ile276	Ser150, Ser130, Gly151, Trp65	Tyr250, Ile276, Tyr279, Trp65
103g	Trp250, Tyr279, Ile276, Trp65	Ser150, Ser130	Ala173, Val201, Phe202, Ile276
103h	His176, Ile276, Val201, Ala173	Ser153, Ser130	Trp278, Tyr250, Trp65, Ile276
103i	His176, Ile276, Val201, Ala173	Ser153, Ser130	Trp278, Tyr250, Ile276