



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

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

**Diseño *in silico* de análogos de baclofeno como potenciales
agonistas del receptor GABA_B**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. Alma Barragán Labastida.

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Mario Fernández Zertuche.

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández.

CUERNAVACA, MORELOS

Octubre, 2022



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM), bajo la dirección del Dr. Mario Fernández Zertuche y en el laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC), bajo la dirección del Dr. Rodrigo Said Razo Hernández del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto No. 761162.



**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 in silico de análogos de baclofeno como potenciales agonistas del receptor GABA_A*, que presenta la alumna Alma Barragán Labastida (10036238) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez Facultad de Farmacia-UAEM	APROBADO	
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Juan Alberto Guevara Salazar Escuela Superior de Medicina-IPN	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

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2022-06-24 20:36:38 | Firmante
 m1orcfs3AMyGyTZb0C4fGc6GK2qG6W+Ad8ChnD3j0Cd71IBjcv+pbwkpQYtsZuTwEhJAdoJ8oh7Y1bcNC4KlyGpOoUeTgbtHvPmUlyj3ys8+a2gytbcVsu5fndTGAJNEmo-T
 E9iCn5XIG6LXD611scuXFzLDcO9BbWqC8AfmCey11BR9NoyLE63h1Z+ytntg2+rWDKYXyJJgmbRG86Gy53mfG5qWodOlnf9L9TecKpFTpwKB8mHYJoa317T1MH6sV6Pa
 C3Jr81F395g+phvWWRzmoCCz67MzflL8UF2gE7vNqV4eaBZKwa1njA9nzued0Mw==

JUAN ALBERTO GUEVARA SALAZAR | Fecha:2022-06-24 20:38:34 | Firmante
 IdzTJuscO2bwFR23IZBfIOA2QBriMh69KvxF1DxolmI661BBnYDZnHdMbkMkM2Df2g8uqyRrX/EX4eknlVKtS2XEzPhZjOWM48UR7esBrCneArFbFrRHJN3r9kSLGz8Kry
 K12EKWwNrvYtgybxXpauXNmQFXHoLmuKMeX+ND6AG799LAYOWOnKhuBH93tSuWwWsl.11+Jululcz0sKud4G3TfPctc8zb00tpUivbTieQ1kU8+n8mgI4D0TcBjyR1TU
 BOuCTyZ7s9PmN2qa7muaidS2lwC8RHqRwsvprYdxE6v4OCnYtytZv1LWfU8jHk40y5a==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-06-24 21:50:41 | Firmante
 0t53w7pYD7nwxLxifly5OQ7VWfPad4Aq+HLBaHEBc0kij2+5XjysBu660D1+WDdFD+L27aQ3aonwBQ7Qdsr1YXjUR948B6EDw4Piv08yWQFsnW42ytd7fFsgyQFkCspEpe
 a4HJgt5Jgy93yz855yX4mZwtWECFYXb4/Qq1QvnoWkVDRXXU9qseFWIT3yAiwkeKpcQZsziQ1n7JPOLr+yHlomp11F2H+qj4GY/RMmLmL3PifeY1Dx43R107uHIOF6G9I9Gq
 ZoTe7kwmfyFBFAInMz8RW7b1F+erUKCHkBlzTaFzWdJEnI868B3bvvpjQ==

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2022-06-27 09:30:40 | Firmante
 OUIDWo9CgbAWaL3e4HUObv8KQwopzKaojVJAInPibz28iD4dsXC1yU0Gg06dMYKsUUXpgkJe5V6hFF9zckXmEN2cMDDWg5gNF8Q2M4T4QedjVkrfIVZJ31kArqk4D0UK9C
 CjseOPRcPxxMJKUDAVWmiQUSYx0Pk+oNcn6brCkXIAiWwHrG+nD66APGTqv+hZTh3I2H3GjE2ZT1J0vY9yEMLJIF7Lc0q021xt9tGpPnZmWY3ceRDP+JkVWVM8w11wrem
 vIPQISEdc8GzH0ayq14kn7HToezFUigTsxXeOth3yu3Qv3RvTbIGju0002shpJcOmLXyq==

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2022-06-27 17:24:57 | Firmante
 bofIqGorvhwXbFRsq6UUoz1bzdDz8BpcDgquW1Aof5fd10Eh88bHmKM00E4ID3hmEZ4Opt1V2JypVjHeDM+WwoVDH61NQRINvNvKlyrY1Ee3WQz0k5cAMMxkGyD1OR8
 8/1fMkqz8L9k3qJ652Zda11zvPvq587vG5p7ZzFMYdhsvOMxvDIF8Uf0apXrjCwg8mxeR6d+94cg3DCMKANVGeKXvUsSD1gdhwVFRIBQHW0ka86hRM317QrRm9s8GgTVXt95
 Y3rM4ANL0teNs8ko5pCvJmQN6FcnHh7R+SZvEFHzMGkomyNjgCEa4W48Jf1K4q1+IX5a==

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



MzpEhVVGH

<https://efirma.uaem.mx/ino/Repudio/7U7A48ftLeAAHvrMKHrRqj9RX4Qsma>

Presentaciones a congresos

Alma Barragán Labastida, Dr. Mario Fernández Zertuche, Dr. Rodrigo Said Razo Hernández. “Diseño *in silico* de análogos de baclofeno como posibles agonistas del receptor GABA_B”. XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, (México), Abril 2021.

Alma Barragán Labastida, Dr. Mario Fernández Zertuche, Dr. Rodrigo Said Razo Hernández. “Diseño *in silico* de análogos de baclofen con estructura de isoxazol”. 25 aniversario del Centro de Investigaciones Químicas, Mayo 2021.

Alma Barragán Labastida, Dr. Mario Fernández Zertuche, Dr. Rodrigo Said Razo Hernández. “Diseño *in silico* de análogos de baclofeno como posibles agonistas del receptor GABA_B”. LatinXChem septiembre 2021.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar una etapa más de mi vida profesional.

A mis padres, por todo el apoyo y motivación para salir adelante, en especial por su amor y paciencia.

Al Doctor Mario Fernández Zertuche por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por apoyarme y aconsejarme durante todo el proceso.

Al Doctor Rodrigo Said Razo Hernández por aceptar ser el Co-Director de este proyecto y por brindarme la oportunidad y confianza de trabajar en su grupo de investigación. Gracias por el tiempo, dedicación, observaciones y consejos a lo largo de este proyecto.

A mi comité tutorial: Al Dr. Iván Omar Romero estudillo, al Dr. Rodrigo Said Razo Hernández y al Dr. Mario Fernández Zertuche por su disposición, comentarios, observaciones y recomendaciones para la mejora del presente trabajo.

A mi jurado revisor: La Dra. Yolanda Rios, al Dr. Juan Alberto Guevara, al Dr. Juan Gabriel Navarrete, al Dr. Iván Omar Romero y al Dr. Rodrigo Said Razo, por darse el tiempo de revisar este trabajo y contribuir a su mejora con sus observaciones y recomendaciones.

A Arturo Peñaloza, por acompañarme, apoyarme y motivarme durante esta etapa de mi vida profesional.

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).

Diseño *in silico* de análogos de baclofeno como potenciales agonistas del receptor GABA_B

ÍNDICE

Figuras, Esquemas y Tablas.....	V-VII
Abreviaturas.....	VIII
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Neurotransmisión.....	2
1.2 Neurotransmisores.....	2
1.3 Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	3
1.4 Biosíntesis y degradación del GABA.....	3
1.5 Receptores específicos de GABA.....	4
1.6 Receptores GABA _A	4
1.7 Receptor GABA _C	5
1.8 Receptores GABA _B	5
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Representación y organización molecular del receptor GABA _B	6
2.2 Trastornos neurológicos asociados al receptor GABA _B	8
2.3 (<i>R</i>)-baclofeno en la terapia farmacológica.....	9
2.4 Ligandos del receptor GABA _B reportados en la literatura como análogos de 1 y 2	10
2.5 Antecedentes en el grupo de investigación en la síntesis y evaluación de nuevos análogos de GABA, baclofeno y pregabalina.....	15
3. DISEÑO <i>IN SILICO</i> DE ANÁLOGOS DE BACLOFENO.....	18
3.1 Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).....	18
3.2 Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>).....	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVO GENERAL.....	20
6.1 Objetivos específicos.....	21
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21

7.1	Análisis del blanco biológico	21
7.2	Análisis sobre las cavidades de los diferentes ligandos agonista y antagonistas.	23
7.3	Análisis sobre los residuos de interacción para agonistas del receptor GABA _B	27
7.4	Análisis sobre los residuos de interacción para antagonistas del receptor GABA _B	29
7.5	Superficies de Enlace de Hidrógeno.....	31
7.6	Superficies electrostáticas.	33
7.7	Superficies hidrofóbicas.....	34
7.8	Superficies aromáticas.....	35
7.9	Determinación de la distribución de las moléculas.	35
8.	ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING).....	42
8.1	Preparación de la proteína.....	43
8.2	Preparación de los ligandos.....	43
8.3	Parámetros del acoplamiento molecular.....	44
8.4	Validación estructural.....	44
8.5	Resultados obtenidos de la primera serie de análogos de baclofeno con estructura de isoxazol sobre el cristal 7C7Q.	47
8.6	Resultados obtenidos de la segunda serie de análogos de baclofeno con estructura de (<i>R</i> y <i>S</i>)- 89a-k sobre el cristal 7C7Q.	53
8.7	Resultados obtenidos de la tercera serie de análogos de baclofeno con estructura de (<i>R</i> y <i>S</i>)- 90a-k sobre el cristal 7C7Q.	60
9.	CONCLUSIONES.....	66
10.	PERSPECTIVAS	67
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	68
12.	ANEXOS.....	74
10.1	Conformaciones e interacciones de los antagonistas co-cristalizados sobre el cristal 7C7Q en 3D y 2D.....	74
	Primera serie de análogos de baclofeno (<i>R</i> y <i>S</i>)- 88a-g	77
	Segunda serie de análogos de baclofeno (<i>R</i> y <i>S</i>) 89a-k	78
	Tercera serie de análogos de baclofeno (<i>R</i> y <i>S</i>) 90a-k	79

Figuras, Esquemas y Tablas.

Figura 1. Neurotransmisión GABAérgica.	2
Figura 2. Representación esquemática de los receptores a) ionotrópicos y b) metabotrópicos. ⁵	4
Figura 3. Estructura de los receptores GABA _A y GABA _C	5
Figura 4. Representación molecular de la estructura del receptor GABA _B a) forma apo y b) unido a baclofeno (agonista).	6
Figura 5. Análogos estructurales de GABA.	8
Figura 6. Análogos de GABA que actúan sobre el receptor GABA _B con actividad biológica distinta.	10
Figura 7. Análogos de 1 y 2 β-sustituídos.	11
Figura 8. Estructura de algunos análogos de baclofeno.	12
Figura 9. Análogos reportados por Attia y et.al.	13
Figura 10. Análogos reportados por Attia y et.al. conformacionalmente restringidos.	13
Figura 11. Isómeros de GABA y baclofeno.	14
Figura 12. Agonistas del receptor GABA _B reportados por Colby y et.al.	14
Figura 13. Primera generación de análogos de GABA y baclofeno reportados en el grupo de investigación.	15
Figura 14. Segunda generación de análogos de GABA, 2 y 3 reportados.	16
Figura 15. Tercera generación de análogos de 1 y 2	16
Figura 16. Análogos de 2 como posibles agonistas del receptor GABA _B	17
Figura 17. Moléculas que se diseñaron en el grupo de investigación partiendo del andamio molecular de baclofeno, la modificación recomendada con (GE, cuadros amarillos).	18
Figura 18. Representación del acoplamiento molecular (docking).	20
Figura 19. Representación estructural de los ligandos co-cristalizados a) agonistas y b) antagonistas.	22
Figura 20. a) Receptor metabotrópico GABA _B de humano en su estado apo. b) Estructura crio-em del receptor GABA _B de humano unido al antagonista CGP54626. c) Estructura crio-em del receptor GABA _B de humano unido a baclofeno/BHFF en estado activo.	23
Figura 21. Forma y tamaño de las cavidades de los ligandos agonistas.	25
Figura 22. Forma y tamaño de las cavidades de los ligandos antagonistas.	26
Figura 23. a) Estructura secundaria de 7C7Q unido a baclofeno, b) Cavity (color gris) y aminoácidos presentes dentro de la cavity del cristal 7C7Q, en stick color azul se representan los aminoácidos hidrofóbicos no polares, en color morado los aminoácidos de hidrofobicidad media y en color rojo los aminoácidos hidrofílicos.	27
Figura 24. Representación en 3D de las interacciones de GABA sobre el cristal 4MS3.	27
Figura 25. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal 4MS ₄	28
Figura 26. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal 7C7Q.	28
Figura 27. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal PDB 6UO8.	28
Figura 28. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal 4MRM.	29
Figura 29. Representación en 3D de las interacciones que comparten los antagonistas CGP35348, CGP46381 y SCH50911 con sus respectivos cristales.	29
Figura 30. Representación en 3D de las interacciones de CGP54626 sobre el cristal 7CUM.	30
Figura 31. Representación en 3D de las interacciones de 2-hidroxibaclofeno sobre el cristal 4MQF.	30

Figura 32. Superficie de tipo enlace de hidrógeno de los cristales con ligandos agonistas (GABA, baclofeno y SKF97541).	32
Figura 33. Superficie de tipo enlace de hidrógeno de los cristales con ligandos antagonistas (4MQF, 4MR9 y 7CUM).	33
Figura 34. Superficies electrostáticas de los cristales a) 4MS3, b) 7C7Q, c) 6UO8, d) 4MQF, e) 4MR9 y f) 7CUM.	34
Figura 35. Superficies hidrofóbicas de los ligandos de los cristales 4MS3, 7C7Q, 6UO8, 4MQF, 4MR9 y 7CUM, respectivamente.	34
Figura 36. Superficies aromáticas de los ligandos de los cristales 4MS3, 7C7Q, 6UO8, 4MQF, 4MR9 y 7CUM, respectivamente.	35
Figura 37. a) Representación de la conformación del ligando activo (resultado del docking, color gris) con respecto al ligando de origen (color azul) b) Interacciones que comparte el confórmero del resultado del docking.	44
Figura 38. a) Representación de la conformación del ligando activo (resultado del docking, color gris) con respecto al ligando de origen (color azul) b) Interacciones que comparte el confórmero del resultado del docking.	45
Figura 39. a) alineación de los agonistas y b) alineación de los antagonistas con respecto a (<i>R</i>)-baclofeno (stick color amarillo).	47
Figura 40. Columna uno (superposición de las moléculas (<i>R</i> y <i>S</i>)- 88a-g con respecto a (<i>R</i>)-baclofeno sobre el cristal 7C7Q) el enantiómero <i>R</i> se encuentra representado en color crema y el enantiómero <i>S</i> en color gris, como confórmero de referencia permanece el (<i>R</i>)- baclofen.	52
Figura 41. a) Conformaciones de (<i>R</i>)- a-g con respecto a (<i>R</i>)-baclofeno (stick cian; -7.4 kcal/mol), b) conformaciones de las moléculas con mejor energía de interacción (<i>R</i>)- 88a (stick morado; -8.4 kcal/mol), (<i>R</i>)- 88e (stick verde; -8.6 kcal/mol) y (<i>R</i>)- 88f (stick color amarillo).	53
Figura 42. a) Columna uno; superposición de las moléculas (<i>R</i> y <i>S</i>)- 89a-k con respecto a (<i>R</i>)-baclofeno sobre el cristal 7C7Q. b) Columna dos; tipo de interacciones que presenta cada molécula.	59
Figura 43. Columna uno; superposición de las moléculas (<i>R</i> y <i>S</i>)- 90a-k con respecto a (<i>R</i>)-baclofeno sobre el cristal 7C7Q. b) Columna dos; tipo de interacciones que presenta cada molécula.	65
Esquema 1. Biosíntesis y degradación del GABA.	3
Esquema 2. Representación gráfica del acoplamiento molecular (Docking) y especificaciones sobre las coordenadas 3D utilizadas para llevar a cabo el docking (PDB:7C7Q, volumen de la caja: X=168, Y=173, Z= 224, tamaño: X=20, Y=20, Z=20).	43
Esquema 3. Resultados obtenidos de ClogP y energía de interacción (kcal/mol) para los agonistas y antagonistas.	46
Esquema 4. Resultados obtenidos de ClogP y energía de interacción (kcal/mol) para la primera serie de análogos de baclofeno (<i>R</i> y <i>S</i>)- 88a-g).	48
Esquema 5. Resultados obtenidos de energía de interacción (kcal/mol) de la segunda serie de análogos de baclofeno (<i>R</i> y <i>S</i>)- 89a-k).	55
Esquema 6. Resultados obtenidos de ClogP y energía de interacción (kcal/mol) de la tercera serie de análogos de baclofeno (<i>R</i> y <i>S</i>)- 90a-k).	61

Tabla 1. Información sobre la cavidad de los diferentes agonistas y antagonistas co-cristalizados reportados en la literatura.	24
Tabla 2. Propiedades moleculares de la primera serie de análogos de baclofeno 88a-g	37
Tabla 3. Propiedades moleculares de la segunda serie de análogos de baclofeno 89a-k	38
Tabla 4. Propiedades moleculares de la tercera serie de análogos de baclofeno 90a-k	40
Tabla 5. Interacciones de agonistas co-cristalizados y resultados del docking sobre la proteína 7C7Q.	75
Tabla 6. interacciones de antagonistas co-cristalizados y resultados del docking sobre cristal 7C7Q.	76
Tabla 7. Interacciones que presentaron la serie de compuestos (<i>R</i> y <i>S</i>) 88a-g sobre el cristal 7C7Q.	77
Tabla 8. Interacciones de los compuestos (<i>R</i> y <i>S</i>)- 89a-k sobre el cristal 7C7Q.....	78
Tabla 9. Interacciones de los compuestos (<i>R</i> y <i>S</i>)- 90a-k en el cristal 7C7Q.....	79

ABREVIATURAS

Arg	Arginina
Ala	Alanina
Å	Angstrom
ΔG_L	Energía libre de Gibbs
μM	Micro molar
β	Beta
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca^{2+}	ión calcio
Cl^-	ión cloruro
clogP	Logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el <i>n</i> -octanol calculado
Cys	Cisteína
DIFAC	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora
EC_{50}	Concentración efectiva media
FDA	Food and Drug Administration
g	gramos
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA-AT	GABA aminotransferasa
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
HBA	Aceptores de enlace de hidrógeno
HBD	Donadores de enlace de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
IC_{50}	Concentración inhibitoria media
Ile	Isoleucina
K^+	ion potasio
KCTD	Potassium Channel Tetramerization Domain
Leu	Leucina
mg	miligramos
mL	mililitros
MMFF	Merck Molecular Force Field
nM	nanomolar
<i>p</i>	posición <i>para</i>
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
Pro	Prolina
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
RE	Reticulo endoplasmático

Ser	Serina
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Semialdehído succínico
SSDH	Semialdehído succínico deshidrogenasa
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VFT	Venus FlyTrap
7TM	Dominio heptahelicoidal transmembrana

Resumen

El receptor GABA_B es un heterodímero constituido por dos subunidades (GABA_{B1} y GABA_{B2}) que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés). Baclofeno es actualmente el único agonista aprobado por la FDA que activa a este receptor, y es utilizado clínicamente para tratar espasticidad muscular y lesiones de la medula espinal. Desafortunadamente, baclofeno tiene una baja absorción en el cerebro, lo que provoca múltiples efectos no deseados.

En este trabajo, el perfil de interacción de los agonistas y antagonistas co-cristalizados con el receptor GABA_B fue determinado. Usando acoplamiento molecular, encontramos las diferencias y similitudes entre los ligandos (agonistas y antagonistas) en función del tipo, la forma, la energía (*score*), y los aminoácidos de interacción. Con esta información diseñamos compuestos potencialmente activos sobre el receptor GABA_B, manteniendo el grupo ácido carboxílico y el grupo amino de la estructura de baclofeno y reemplazando el grupo *p*-clorofenilo por un anillo heterocíclico de isoxazol para optimizar la interacción con el receptor mediante interacciones de enlaces de hidrógeno. Además, se utilizaron diferentes sustituyentes sobre este anillo para optimizar la interacción en función de su lipofilia y efecto estérico utilizando la naturaleza hidrofóbica del sitio de unión. Como segundo diseño, se realizó el reemplazo isostérico del ácido carboxílico por un anillo de tetrazol, con el objetivo de mejorar la lipofilia de los compuestos. Finalmente, se conservó el anillo de tetrazol y el tamaño de los candidatos se redujo, además de esto, se evaluaron diferentes grupos electroattractores. Nuestros resultados mostraron que al menos 16 de nuestros candidatos tienen una mayor lipofilia y energía de interacción con respecto a los agonistas reportados en la literatura.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Neurotransmisión

El funcionamiento normal del sistema nervioso central (SNC) procede a través del control y comunicación que reciben y envían células cerebrales, denominadas neuronas. A este mecanismo de comunicación se le conoce como sinapsis, lo cual significa que la información es transmitida de una neurona a otra por un mensajero químico llamado neurotransmisor. Estos interactúan con receptores específicos, cambiando su actividad. El neurotransmisor es almacenado en pequeñas vesículas en la neurona presináptica donde por la llegada de un potencial de acción, es liberado al espacio sináptico, uniéndose a la neurona postsináptica para llevar a cabo su acción fisiológica (excitarla o inhibirla) al interactuar con receptores específicos de la membrana (Figura 1).¹

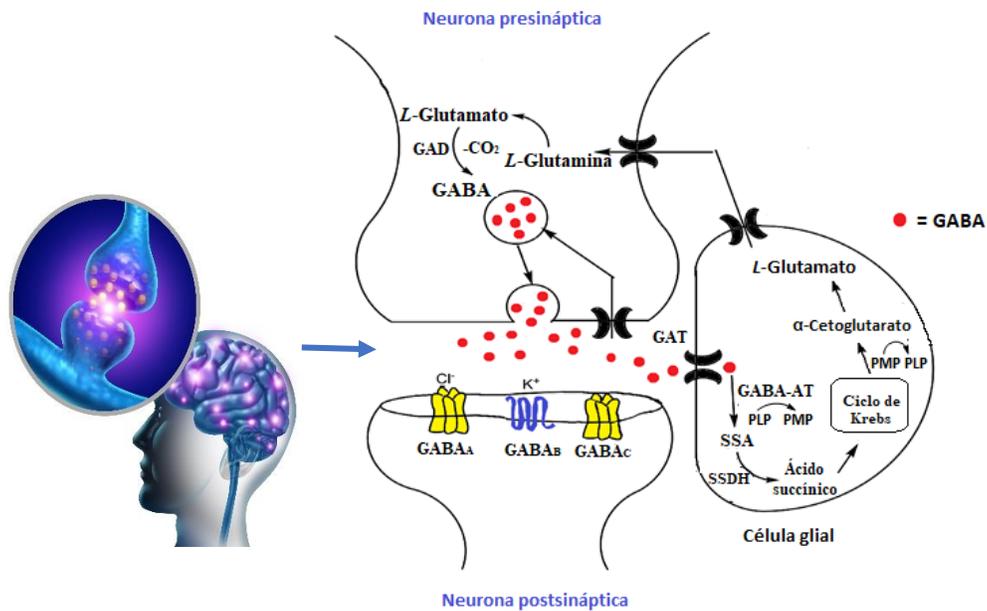
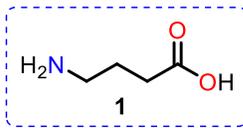


Figura 1. Neurotransmisión GABAérgica.

1.2 Neurotransmisores

Un neurotransmisor se define como un mensajero químico que transporta, aumenta y equilibra las señales entre las neuronas o las células nerviosas y otras células del cuerpo. A pesar de la gran variedad de sinapsis en el cerebro en general, solo se transmiten dos tipos de mensajes: excitadores e inhibidores; los primeros producen la despolarización (L-glutámico, neurotransmisor excitatorio más importante del SNC), mientras que los segundos producen la hiperpolarización (ácido γ -aminobutírico, neurotransmisor inhibitorio más importante).² El adecuado funcionamiento del SNC requiere un equilibrio adecuado entre la excitación y la inhibición de los impulsos sinápticos.³

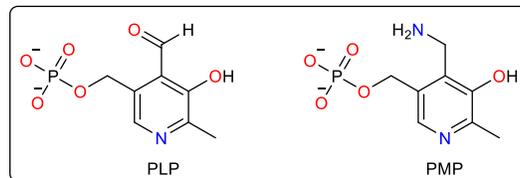
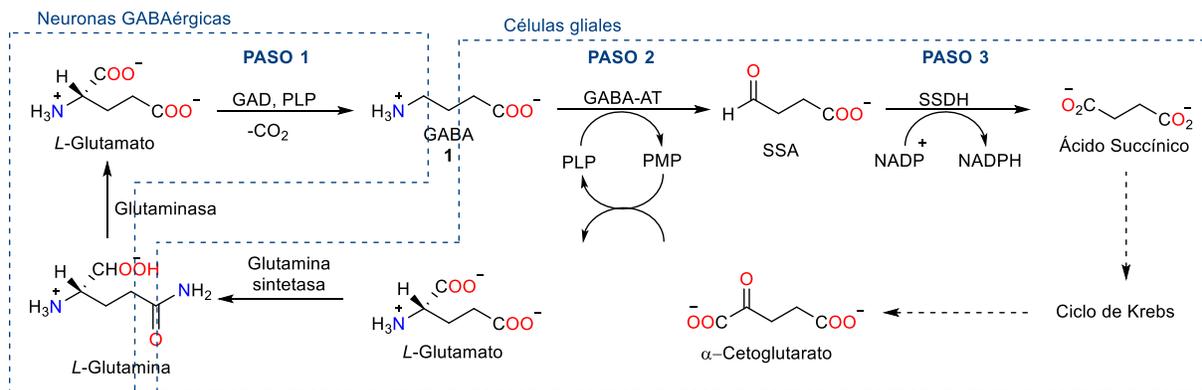
1.3 Ácido γ -aminobutírico (GABA)



El ácido γ -aminobutírico mejor conocido como GABA **1**, es el principal neurotransmisor de naturaleza inhibitoria presente en el SNC de mamíferos. Es un aminoácido neutro de bajo peso molecular (PM=103 g/mol), tiene una alta hidrofiliidad ($\log P=-3.17$) y una alta solubilidad acuosa (1.3 g/mL). Su función principal es regular la liberación de neurotransmisores y la actividad excitatoria en el SNC, mediante la activación de los receptores específicos de GABA: receptores ionotrópicos (denominados GABA_A y GABA_C) y metabotrópicos (denominados GABA_B).⁴ Se estima que aproximadamente el 40% de la actividad sináptica inhibitoria está en función de este aminoácido, razón por la cual juega un papel importante para las funciones sensitivas, cognitivas y motoras del cerebro.⁵

1.4 Biosíntesis y degradación del GABA.

GABA **1** es biosintetizado en el cerebro por la descarboxilación del neurotransmisor excitatorio más abundante, el ácido *L*-glutámico por la acción específica de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), enzima que requiere la presencia del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) (Paso 1, Esquema 1). Posteriormente, GABA es liberado al espacio sináptico y transportado a las células gliales donde es catabolizado a semialdehído succínico (SSA) por la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT), enzima que requiere igualmente de la coenzima PLP. La degradación de GABA convierte simultáneamente al PLP en piridoxamina-5'-fosfato (PMP) (paso 2).



Esquema 1. Biosíntesis y degradación del GABA.

El semialdehído succínico (SSA) se oxida posteriormente a ácido succínico mediante la acción de la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa (SSDH) (paso 3). 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 (Esquema 1).⁴

1.5 Receptores específicos de GABA.

Una vez liberado GABA al espacio sináptico, llevará a cabo su función fisiológica mediante la activación de los receptores: GABA_A, GABA_B o GABA_C, los cuales ejercen efectos inhibitorios en el SNC. Estos receptores se encuentran localizados en las neuronas pre- y postsinápticas. Los receptores ionotrópicos, GABA_A y GABA_C; regulan la respuesta rápida mediante la apertura de canales iónicos, estos permiten la entrada de iones Cl⁻ activados por ligando (hiperpolarización), mientras que los receptores metabotrópicos, GABA_B (acoplados a proteína G) regulan la transmisión sináptica lenta y prolongada a través de sistemas de segundos mensajeros que activan a canales de Ca²⁺ y K⁺ (despolarización) (Figura 2).²

a) Canales iónicos activados por ligando.

b) Receptores acoplados a proteína G.

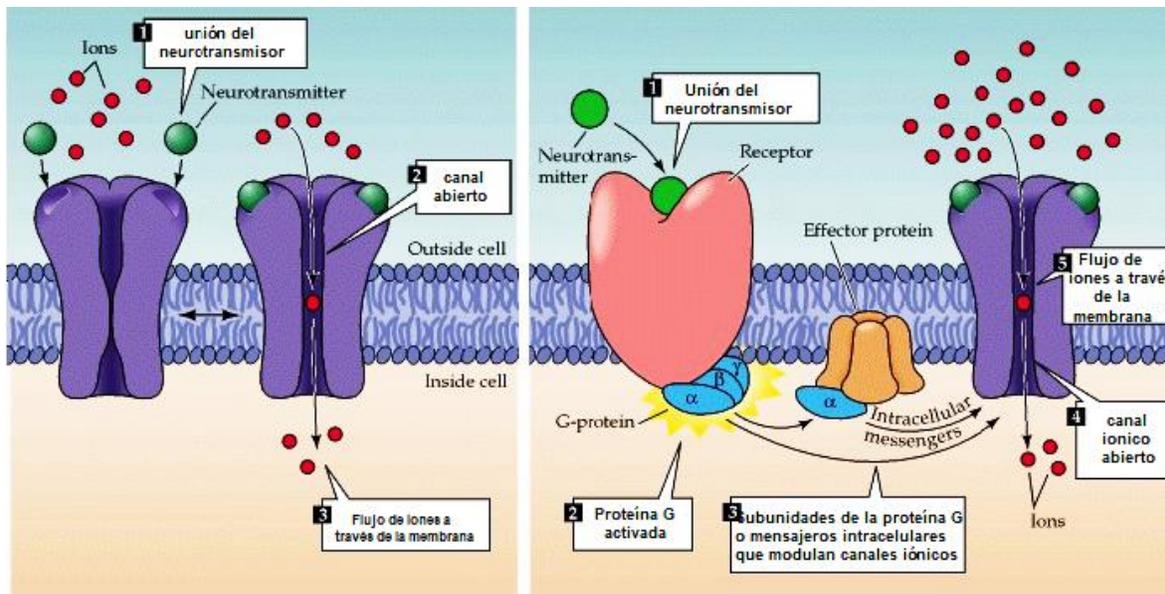


Figura 2. Representación esquemática de los receptores a) ionotrópicos y b) metabotrópicos.⁵

1.6 Receptores GABA_A

Los receptores GABA_A se localizan generalmente en la membrana postsináptica, estructuralmente son una glucoproteína heteropentamérica constituida por la combinación de subunidades polipeptídicas múltiples. Se han descrito siete clases de subunidades polipeptídicas (α , β , γ , δ , ϵ , θ y ρ) y múltiples isoformas para cada clase de receptor. Este receptor forma un canal iónico selectivo para el ión cloruro (activado por ligando). La activación del receptor tras la unión ortostérica de su ligando fisiológico (GABA), aumenta la permeabilidad de los aniones Cl⁻, dando lugar a una

hiperpolarización de la célula receptora, haciendo que el potencial de membrana sea más negativo, esto determina un potencial postsináptico inhibitorio. Estos receptores GABA_A, pueden ser modulados alostéricamente por fármacos como las benzodiazepinas, barbitúricos, alcoholes y neuroesteroides.⁶

1.7 Receptor GABA_C

El receptor GABA_C es también un canal de iones cloruro; sin embargo, no es sensible a los ligandos específicos de los receptores GABA_A y GABA_B. Por ejemplo, este receptor no muestra afinidad a la bicuculina (antagonista GABA_A) ni al baclofeno (agonista GABA_B). Tampoco presenta afinidad por las benzodiazepinas, barbitúricos, alcoholes y neuroesteroides, como ocurre con el receptor GABA_A. Los receptores GABA_C, son activados selectivamente por el ácido (+)-*cis*-2-aminometilciclopropan carboxílico [(+)-CAMP] y bloqueados por el ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il) metil fosfínico (TPMPA) y la picrotoxina.⁷ (Figura 3, representación de la estructura de los receptores GABA_A y GABA_C).

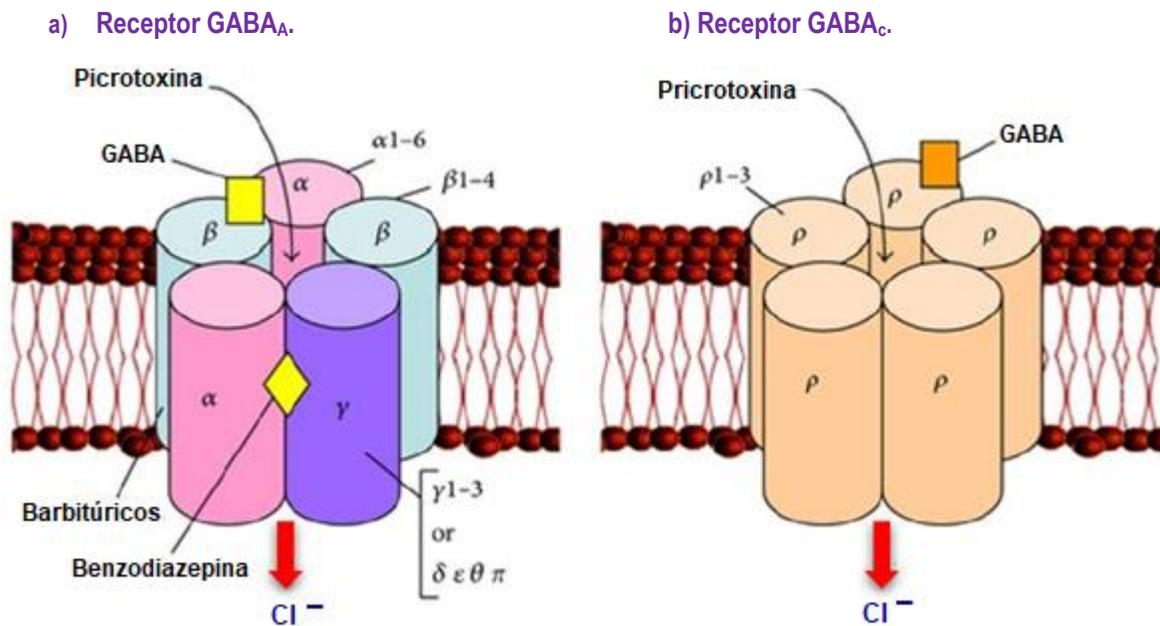


Figura 3. Estructura de los receptores GABA_A y GABA_C.

1.8 Receptores GABA_B.

Los receptores GABA_B, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. A la fecha se han identificado dos subunidades de este receptor: GABA_{B1} y GABA_{B2}. La subunidad GABA_{B1} contiene el sitio de unión a GABA, mientras que la subunidad GABA_{B2}, ubicada dentro de la superficie celular, es la que se encuentra unida a la proteína G.⁸ Cuando estos receptores son activados por GABA, activan canales iónicos de Ca²⁺ y K⁺ e inhiben la función de la adenilil ciclasa a través de la activación de la proteína G.⁸ Por otro lado, su modulación también se ha relacionado con la liberación

de algunos neurotransmisores tales como, glutamato, dopamina, adrenalina y serotonina. Actualmente, se conoce a baclofeno como el único ligando agonista del receptor GABA_B.

2. ANTECEDENTES

2.1 Representación y organización molecular del receptor GABA_B

Los receptores GABA_B son acoplados a proteína G, y se diferencian de otros receptores acoplados a proteína ya que son heterodímeros que están obligatoriamente constituidos por dos subunidades GABA_{B1} (tiene dos isoformas GABA_{B1a} y GABA_{B1b}, se diferencian por incluir adicionalmente dos dominios de sushi (dominio de interacción proteína-proteína) en GABA_{B1a}) y GABA_{B2b}. Ambas subunidades están compuestas estructuralmente de manera similar que forman un dominio extracelular (“fuera de la célula”) VFT, por sus siglas en inglés, Venus FlyTrap, seguido de un dominio heptahelicoidal transmembrana (7TM) y un dominio C-terminal localizado intracelularmente (“dentro de la célula”) que contiene una estructura en espiral (dominio de interacción proteína-proteína) (Figura 4).⁹

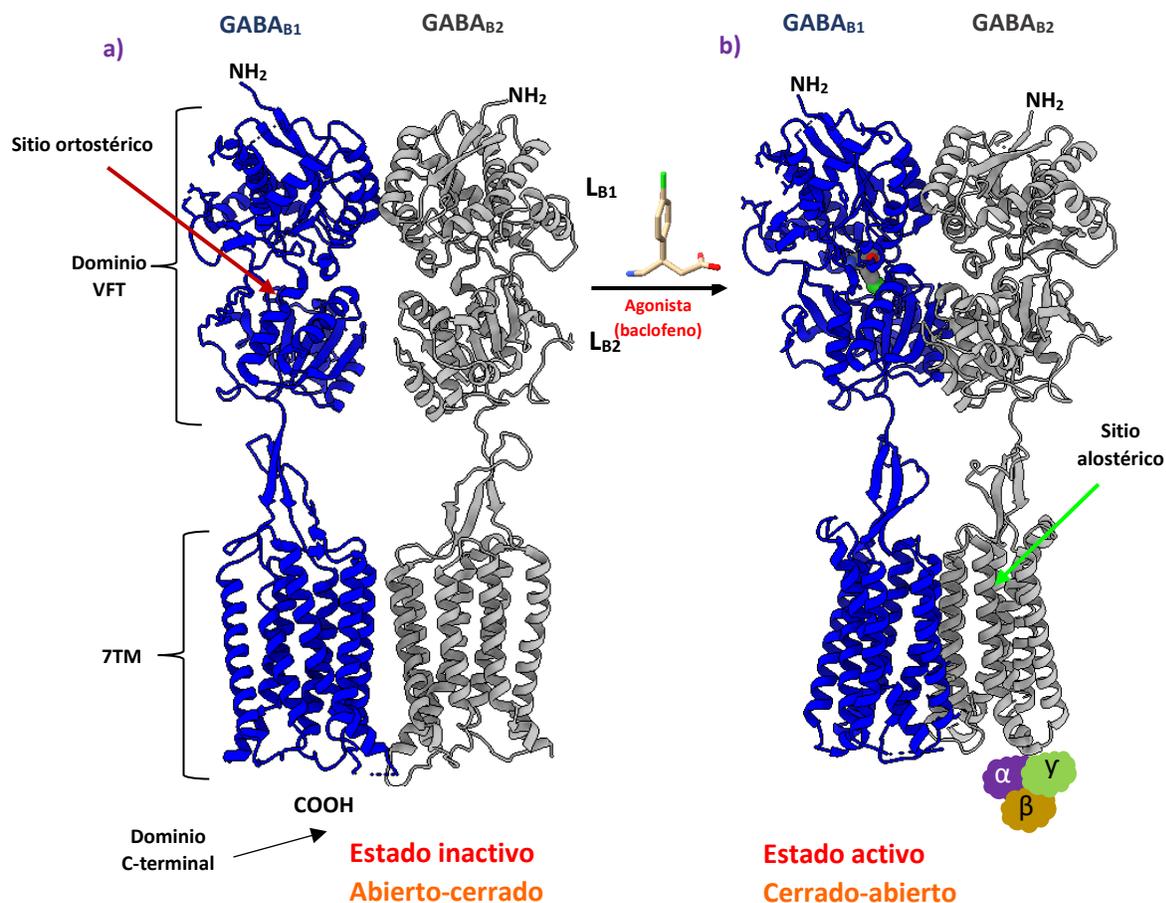


Figura 4. Representación molecular de la estructura del receptor GABA_B a) forma apo y b) unido a baclofeno (agonista).

La heterodimerización de GABA_{B1} y GABA_{B2} involucra los dominios de bobina enrollada en espiral y estéricamente inactiva la señal de retención del RE (retículo endoplasmático) señal de retención/recuperación en GABA_{B1}, permitiendo la salida de RE y el tránsito del complejo receptor a la superficie celular. A pesar de su organización estructural similar, ambas subunidades tienen funciones distintas. La VFT en GABA_{B1} constituye el sitio de unión para los ligandos ortostéricos (sitio de unión para agonistas y antagonistas), mientras la estructura GABA_{B2} es inactiva y no se une a ligandos, pero es capaz de unirse a moduladores alostéricos positivos, este sitio no activa al receptor pero aumenta la afinidad y la eficacia para la unión de agonistas a GABA_{B1} en un sitio ubicado dentro del dominio transmembrana y se estabiliza mediante la interacción de proteínas KCTD, por sus siglas en inglés, *potassium channel tetramerization domain*, asociadas con el dominio C-terminal de GABA_{B2}. Mientras que la subunidad GABA_{B1} es indispensable para la activación del receptor, GABA_{B2} es necesaria para la expresión de la membrana celular, el acoplamiento a proteína G y para la activación de la misma (Gi/o) y unión de alta afinidad de agonistas del GABA_{B1}.^{9, 10}

De manera general, en ausencia de un ligando (forma apo, Figura 4, inciso a) ambas subunidades tienen una buena homología estructural (desviación RMS 1.48 Å, PDB: 4MQE). Una de las principales diferencias entre ambas subunidades, es la orientación relativa para cada lóbulo de las VFT, el ángulo definido por los dos lóbulos permanece casi constante en todas las estructuras disponibles para el VFT de GABA_{B2}, mientras que va a diferir para el VFT de GABA_{B1} ya que depende de la presencia e identidad del ligando que este unido al cristal (Geng 2013). Este ángulo será más grande en la forma apo y cuando este unido a un antagonista, en cambio, será más pequeño en presencia de agonistas (Figura 4, inciso b). Por lo tanto, se tiene dos conformaciones para el VFT de GABA_{B1} (una abierta y cerrada, respectivamente).

En cuanto a la ejecución en respuesta del SNC, los sistemas efectores que están fuertemente unidos a los receptores GABA_B, son los canales de Ca²⁺ y los canales catiónicos. Otro efectores como los canales de K⁺, adenilil ciclasas están débilmente asociadas al receptor. Por otro lado, en cuanto a la regulación anormal del tránsito del receptor GABA_B, los mecanismos de deterioro/reducción están asociados a enfermedades neurológicas como; isquemia cerebral, drogadicción y dolor neuropático.

En este sentido, surge la motivación de estudiar y analizar los receptores GABA_B, así como a su ligando endógeno 1. Los receptores GABA_B fueron identificados por primera vez por Bowery y colaboradores (1980) en la periferia y luego se demostró que estaba presente a través del SNC de varias especies vertebrados, donde son expresados por casi todas la neuronas y células cerebrales no neuronales (Bettler y colaboradores 2004 y 2012).¹¹

En el año 2013, se reportó la estructura cristalina del dominio extracelular del receptor GABA_B de humano unido a agonistas y antagonistas,¹² esta aportación permite, el diseño de fármacos asistido

por computadora (DIFAC), el cual tiene como objetivo el diseño, optimización y selección de compuestos con posible actividad biológica. Con base en esto, es posible el diseño de análogos mediante el modelado molecular utilizando la estructura cristalina del receptor GABA_B.

2.2 Trastornos neurológicos asociados al receptor GABA_B

Los receptores GABA_B no solo se han identificado en el sistema nervioso central, sino también en el sistema periférico y órganos, donde contribuye a la modulación de la actividad neuronal. Debido a su amplia distribución e importante participación en la neurotransmisión, los receptores GABA_B han merecido gran atención, ya que se ha demostrado que son blancos terapéuticos potenciales para tratar una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas como,¹³ espasticidad muscular,¹² dolor neuropático,¹⁴ reflujo gastroesofágico,¹⁵ epilepsia,¹⁶ trastorno de ansiedad e incluso adicciones.¹⁷ Estos problemas podrían terminar con el aumento de las concentraciones de GABA en el cerebro. Desafortunadamente **1**, no puede ser utilizado en la terapia farmacológica debido a que es una molécula hidrofílica y; por lo tanto, no puede atravesar BHE (la barrera hematoencefálica). En las últimas décadas, se han desarrollado varios fármacos con el objetivo de encontrar análogos de GABA con mejores propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que estén dirigidos hacia el receptor GABA_B, que dio como resultado, fármacos clínicamente aprobados por la FDA: (*R*)-baclofeno **2**, (*S*)-pregabalina **3**, (*S*)-vigabatrina **4** y gabapentina **5** (Figura 5). Sin embargo, a pesar de su alta similitud estructural con **1**, estos fármacos no son análogos de **1** desde el punto de vista farmacológico, ya que actúan a través de diferentes mecanismos de acción que GABA.¹⁸

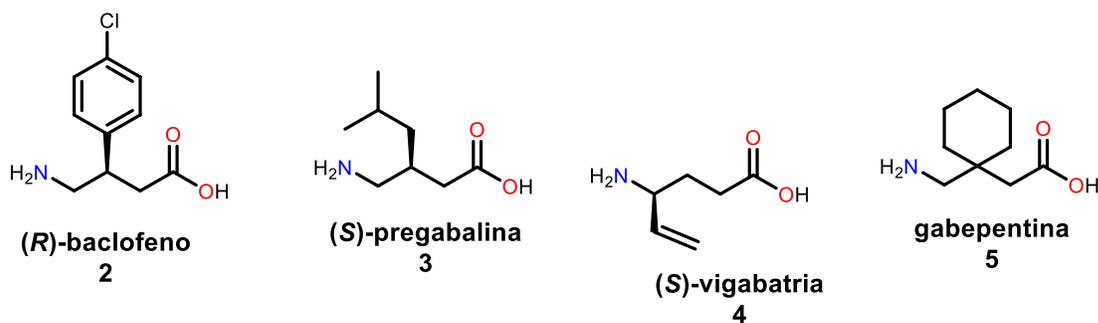
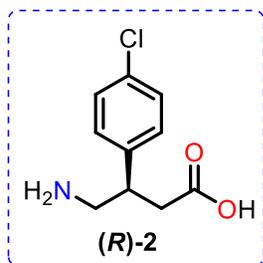


Figura 5. Análogos estructurales de GABA.

Por ejemplo, (*S*)-pregabalina **3** y gabapentina **5**, tienen un mecanismo de acción mediante la unión a la proteína $\alpha 2-\delta$, un canal de calcio dependiente de voltaje, lo que reduce la liberación de neurotransmisores excitadores y moduladores peptídicos. Estos medicamentos tienen eficacia como antiepilépticos y analgésicos.¹⁹ Por otro lado, (*S*)-vigabatrina **4**, es también un fármaco antiepiléptico y su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima GABA-AT, que como se mencionó antes es la enzima que cataboliza a GABA.²⁰ De manera particular, **4** es un inhibidor suicida que forma un aducto ternario covalente con el sitio activo y la coenzima piridoxal 5'fosfato (PLP) de GABA-AT, debido a la

presencia del grupo vinilo, da lugar a un intermediario electrofílico fuerte (aceptor de Michael).¹⁰ Finalmente, únicamente (*R*)-baclofeno **2** es un ligando agonista que activa al receptor de interés (Receptor GABA_B), y es utilizado clínicamente para tratar la espasticidad muscular y otras lesiones de la medula espinal.

2.3 (*R*)-baclofeno en la terapia farmacológica



Con el objetivo de aumentar el carácter lipófilo de **1**, en 1962 fue sintetizado baclofeno **2**,²¹ que contiene un grupo *p*-clorofenilo en la posición beta (β), el único ligando agonista del receptor GABA_B aprobado por la FDA en 1972 y es utilizado en la clínica para tratar espasticidad muscular asociada a la esclerosis múltiple, parálisis cerebral y lesiones en la medula espinal.²² Además, se ha demostrado que su acción farmacológica es enantioselectiva, ya que la mayor actividad biológica reside en el enantiómero (*R*),²³ razón por la cual se ha reportado en la literatura diferentes metodologías de síntesis asimétrica de (*R*)-baclofeno, incluyendo síntesis enantioselectiva,²⁴ resoluciones químicas,²⁵ y métodos quimioenzimáticos.²⁶

En los últimos años, se ha comprobado que (*R*)-**2** tiene eficacia en el tratamiento de reflujo gastroesofágico, alcoholismo, adicciones y ansiedad, atrayendo gran atención.²² Desafortunadamente, (*R*)-**2**, está lejos de ser un fármaco ideal, debido a que tiene una baja absorción en el cerebro y por ende una acción de corta duración,²⁷ por lo cual se requieren altas concentraciones de este para llevar a cabo su correcto funcionamiento, y; por lo tanto, causa múltiples efectos tóxicos tales como; somnolencia, debilidad, mareos, cansancio, dolor de cabeza, convulsiones, vomito, confusión y presión arterial baja, lo cual dificultan su uso clínico.

Considerando la amplia gama de enfermedades asociadas con el receptor GABA_B, y que (*R*)-**2** no puede ser utilizado como fármaco potencial debido a los efectos tóxicos anteriormente descritos. Grupos de investigación llevaron a cabo modificaciones estructurales mínimas sobre (*R*)-**2**, donde en la mayoría de los casos se ha mantenido el grupo farmacóforo de GABA (el grupo α -ácido y el grupo γ -amino); pero, a pesar de que algunos de ellos comparten similitud estructural a la de GABA, sus objetivos son diferentes ya que algunos tienen actividad biológica diferente como; agonistas parciales, o antagonistas (Figura 6).²² Por ello, surge el interés por diseñar y desarrollar nuevos ligandos que sean agonistas específicamente dirigidos hacia el receptor GABA_B.

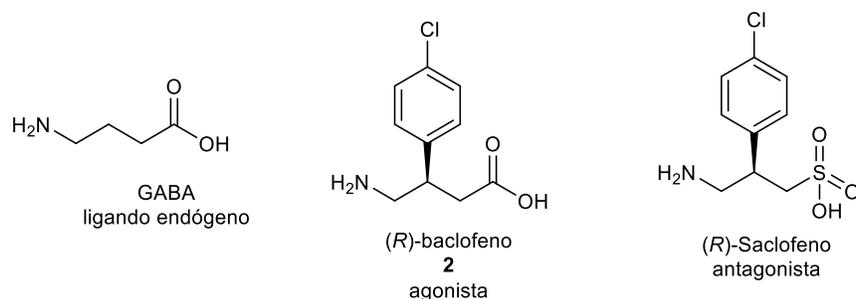


Figura 6. Análogos de GABA que actúan sobre el receptor GABA_B con actividad biológica distinta.

2.4 Ligandos del receptor GABA_B reportados en la literatura como análogos de **1** y **2**.

Dada la importancia de los receptores GABA_B en la neurobiología, incluyendo la depresión, accidente cerebrovascular, y trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Huntington, Parkinson y Alzheimer, y que **2** es el único compuesto aprobado por la FDA que activa al receptor GABA_B y, que además esté ha demostrado que podría ser empleado en el tratamiento de otras enfermedades neurológicas y psiquiátricas, anteriormente descritas. Grupos de investigación han reportado un gran número de compuestos análogos de **1** y **2**, de los cuales algunos de ellos han sido designados como agonistas del receptor GABA_B, en su mayoría conservan el grupo farmacóforo de GABA (el ácido carboxílico y el grupo amino), y un grupo aromático en posición β como en **2**, ya que es importante para la farmacocinética y para la farmacodinámica.²⁸

Gran parte de los trabajos descritos anteriormente, han hecho énfasis en la modificación del anillo aromático de baclofeno **2**, lo cual ha proporcionado información importante en el campo de relación estructura-actividad, por ejemplo, la sustitución del grupo aromático en posición β, por anillos de benzofurano **35a-c** reportados en 1987, por Berthelot *et. al.*²⁹ siendo los compuestos **35a** y **35c** los únicos en desplazar [³H] baclofeno con una IC₅₀= 18, 5.6 μM, respectivamente, comparados con (R,S)-baclofeno cuyo valor de IC₅₀ fue de 0.2 μM (Figura 7). Posteriormente, en 1991,³⁰ el mismo grupo de investigación, reportó análogos de β-furil y β-tienel (**36a,b** y **37a-g**), de los cuales, los análogos **37b** y **37f** desplazaron a (R)- [³H]baclofeno de los sitios de unión del receptor GABA_B, con un de IC₅₀= 1.34, 0.61 μM, respectivamente, en comparación con (R,S)-baclofeno, cuyo valor de IC₅₀= fue de 0.33 μM (Figura 7).

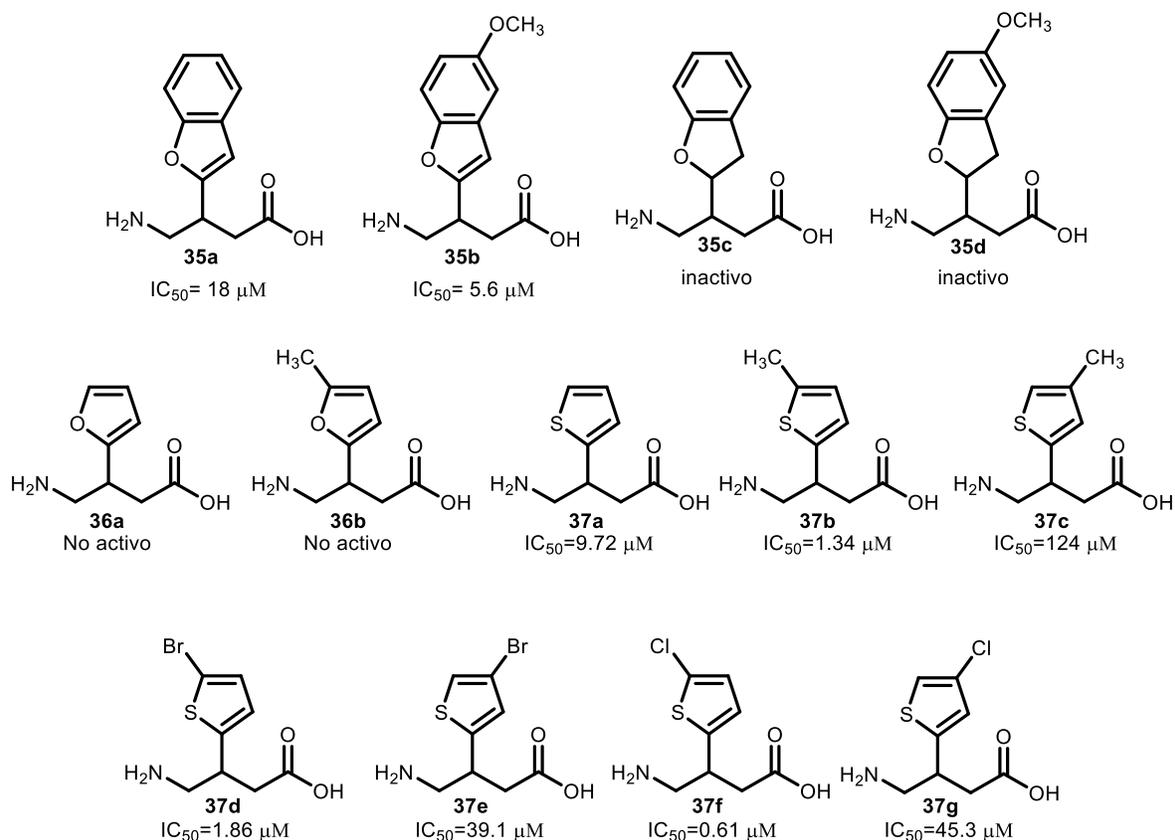


Figura 7. Análogos de 1 y 2 β -sustituidos.

A través de un estudio integrado de modelado molecular/QSAR, Constantino y *et. al.* concluyeron que el grupo *p*-clorofenilo y las sustituciones heteroaromáticas son fundamentales en la unión de baclofeno y análogos al receptor debido a su capacidad para establecer interacciones aromáticas π - π importantes dentro de la cavidad con residuos de Tyr366 y Tyr395.²⁸

Recientemente, en el 2011, Xu y *et. al.* reportaron la síntesis y evaluación de una serie de análogos de baclofeno **38a-l**, agregando sustituyentes en posición *orto* con respecto al átomo de cloro en el anillo aromático, los compuestos **38d**, **38e** y **38g** exhibieron actividad agonista, presentando una potencia mejorada (8.5, 7.3 y 7.4, respectivamente) en comparación con **2** ($pEC_{50}=7.1$) hacia el receptor GABA_B (Figura 8).³¹

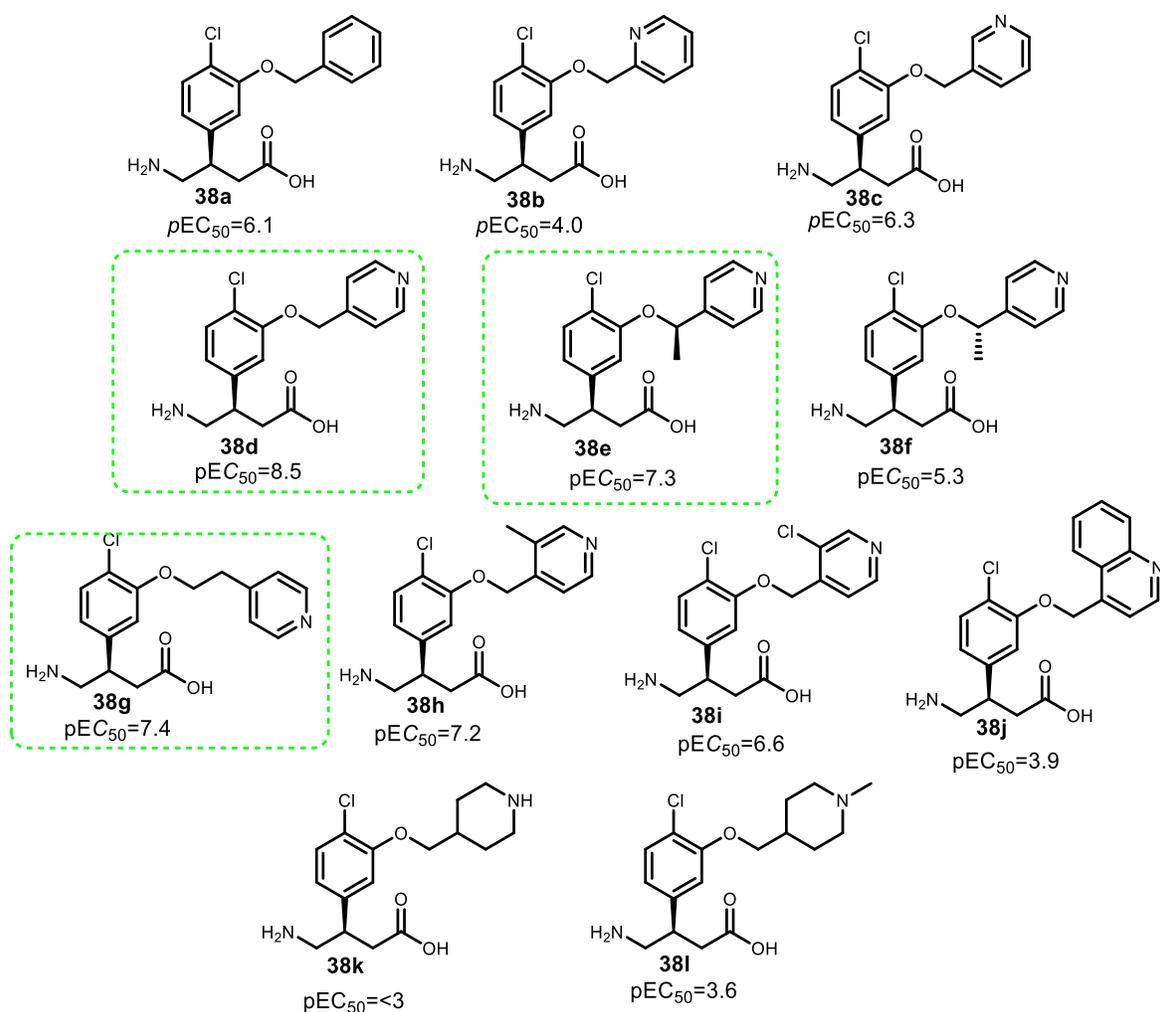


Figura 8. Estructura de algunos análogos de baclofeno.

Modificaciones en el anillo, así como extensión en la cadena alifática **39a-e**, **40**, **41** y **42** han dado como resultados compuestos activos (**39b**, **39d** y **40**); sin embargo, no mejores a (*R, S*)-baclofeno ($pEC_{50}=5.24$). Tal es el caso de algunos análogos reportados por Attia, *et. al* (Figura 9).³²

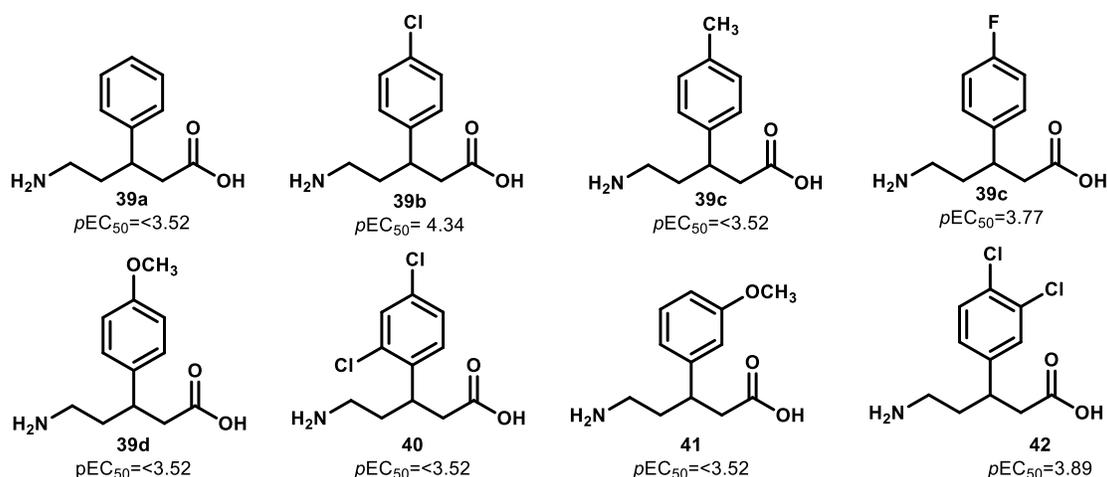


Figura 9. Análogos reportados por Attia y *et. al.*

Adicionalmente, este grupo de investigación reportó la síntesis de los compuestos **43**, **44a** y **44b**, de los cuales, el compuesto conformacionalmente restringido **43** fue inactivo como agonista del receptor GABA_B, mientras que los compuestos **44a** y **44b** fueron activos con pEC_{50} de 3.62 y 4.49, respectivamente (Figura 10).³³

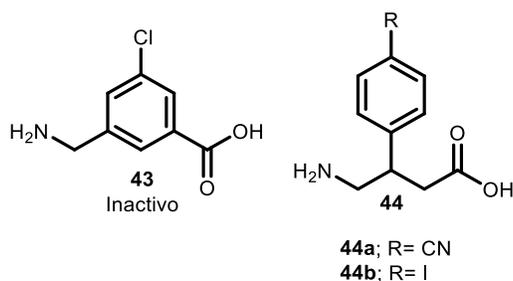


Figura 10. Análogos reportados por Attia y *et. al.* conformacionalmente restringidos.

En la literatura se encuentran reportados isómeros de GABA y baclofeno, en los cuales, el reemplazo isotérico del ácido carboxílico por ácidos sulfónico, fosfónico y fosfínicos dio como resultados principalmente antagonistas del receptor GABA_B, los cuales bloqueaban el efecto de GABA y baclofeno en el receptor GABA_B *in vitro*. Los primeros antagonistas del receptor fueron reportados por Kerr *et al.* en 1987 ((*R*)-faclofeno y 1988 (2-hidroxisaclofeno), respectivamente).³⁴ Por otro lado, Alstermark y colaboradores, sintetizaron el compuesto **46** (análogo fluorado de **45**).³⁵ Siguiendo este mismo enfoque, se reportaron análogos de GABA donde se incorporaron sustituyentes alquilo al átomo de fosforo. Los compuestos de ácido metil **47** y etil fosfínico **48** resultaron ser muy potentes *in vitro* pero no *in vivo*. Ligandos con sustituyentes en el grupo amino y el grupo fosfínico, por ejemplo, **CGP35345** y **CGP46381** poseen actividad antagonista micromolar.³⁶ Por otra parte, ligandos con sustituyentes más grandes, dieron como resultados a los antagonistas **CGP54626** y **CGP55845**.

Algunos antagonistas han sido empleados como radioligandos, los cuales fueron útiles para identificar la estructura del receptor (Figura 11).³⁷

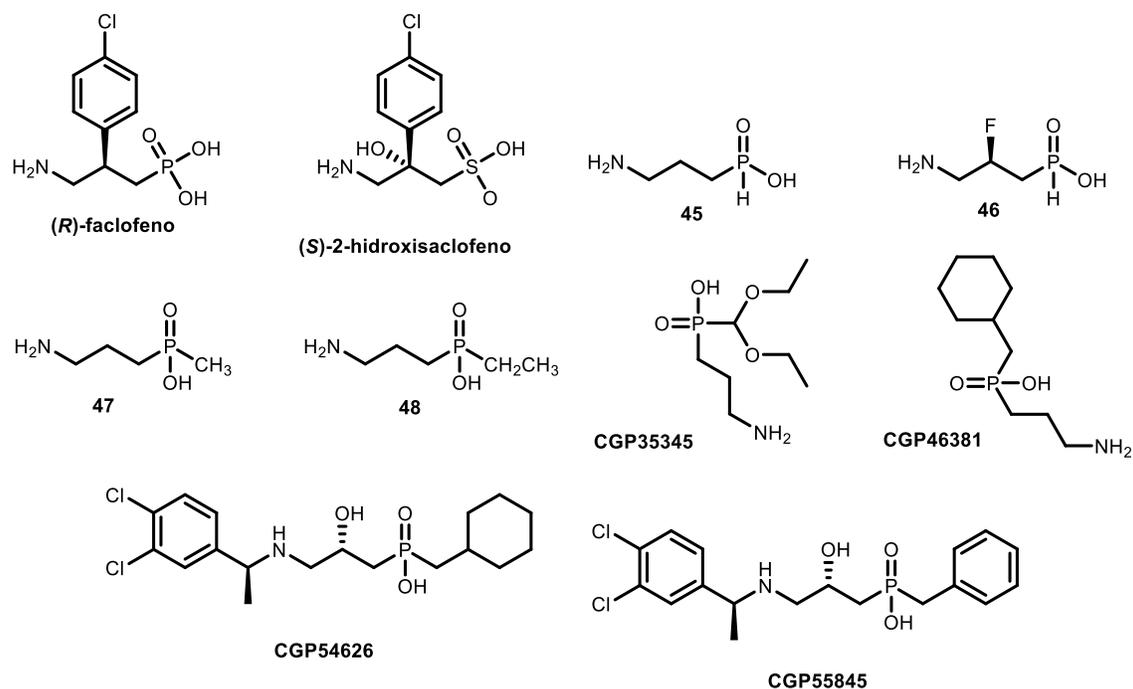


Figura 11. Isómeros de GABA y baclofeno.

Recientemente, Colby y colaboradores reportaron un nuevo tipo de agonistas del receptor GABA_B, denominados difluorometilcetonas **49-54** las cuales ya no guardan analogía estructural con GABA, sin embargo, presentan una potencia y selectividad para el receptor, la cual podría ser justificada teniendo en cuenta que presentan en su estructura átomos y grupos funcionales que pueden funcionar como aceptores y donadores de enlace de hidrógeno. Además, poseen grupos aromáticos los cuales podrían formar interacciones π - π las cuales son importantes para la actividad con el receptor.²⁸ Los compuestos **53** y **54** fueron los más activos con valores de EC₅₀ de 24.9 y 19.4 μ M, respectivamente, comparados con baclofeno (1,7 μ M) (Figura 12).³⁸

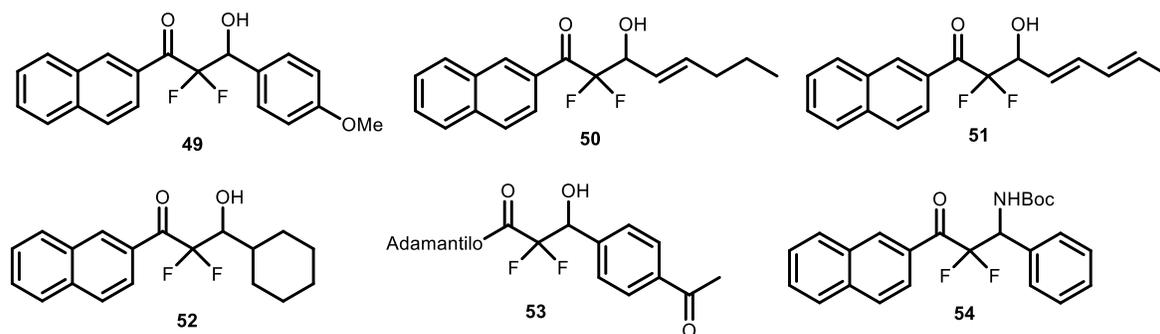


Figura 12. Agonistas del receptor GABA_B reportados por Colby y et.al.

2.5 Antecedentes en el grupo de investigación en la síntesis y evaluación de nuevos análogos de GABA, baclofeno y pregabalina.

Aproximadamente el 85 % de productos químicos biológicamente activos,³⁹ contienen un heterociclo en su estructura, siendo los más comunes aquellos que contienen átomos de azufre, oxígenos y nitrógenos.⁴⁰ Este hecho refleja el papel central que tiene englobar heterociclos en el diseño medicinal moderno, ya que la adición de estos puede ayudar a la modulación de algunas propiedades las moléculas como la solubilidad, liposolubilidad, polaridad y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con dianas biológicas.^{41, 42}

Con base en esto, en años recientes, nuestro grupo de investigación ha explorado la síntesis de análogos de GABA, baclofeno y pregabalina, donde el átomo de nitrógeno en posición γ forma parte de diferentes sistemas heterocíclicos, estos análogos fueron diseñados y evaluados como posibles inhibidores de la GABA-AT (enzima responsable de la degradación de GABA) con el objetivo de aumentar las concentraciones de GABA en el cerebro.

La primera generación que reportó nuestro grupo de investigación, estuvo formada por los compuestos **55-61**, donde los compuestos **58** y **60** mostraron actividad inhibitoria sobre la GABA-AT del 35.51 y 32.03%, respectivamente (Figura 13).⁴³

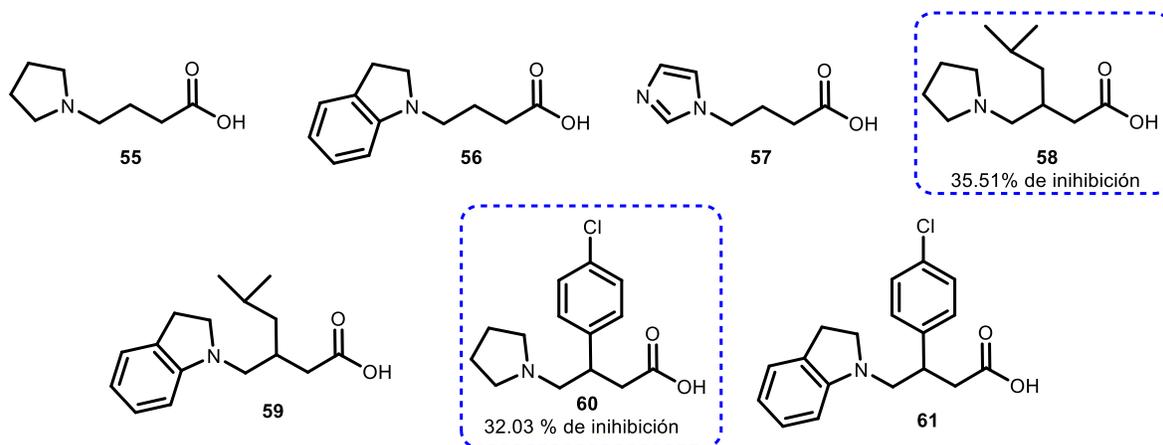


Figura 13. Primera generación de análogos de GABA y baclofeno reportados en el grupo de investigación.

En la segunda generación, se diseñaron y sintetizaron las moléculas **62-75**, las cuales incluían algunas características estructurales de los análogos de la primera generación que arrojaron mejor perfil como inhibidores de la GABA-AT (Figura 14), únicamente el compuesto **73** mostró una inhibición del 73%.⁴⁴

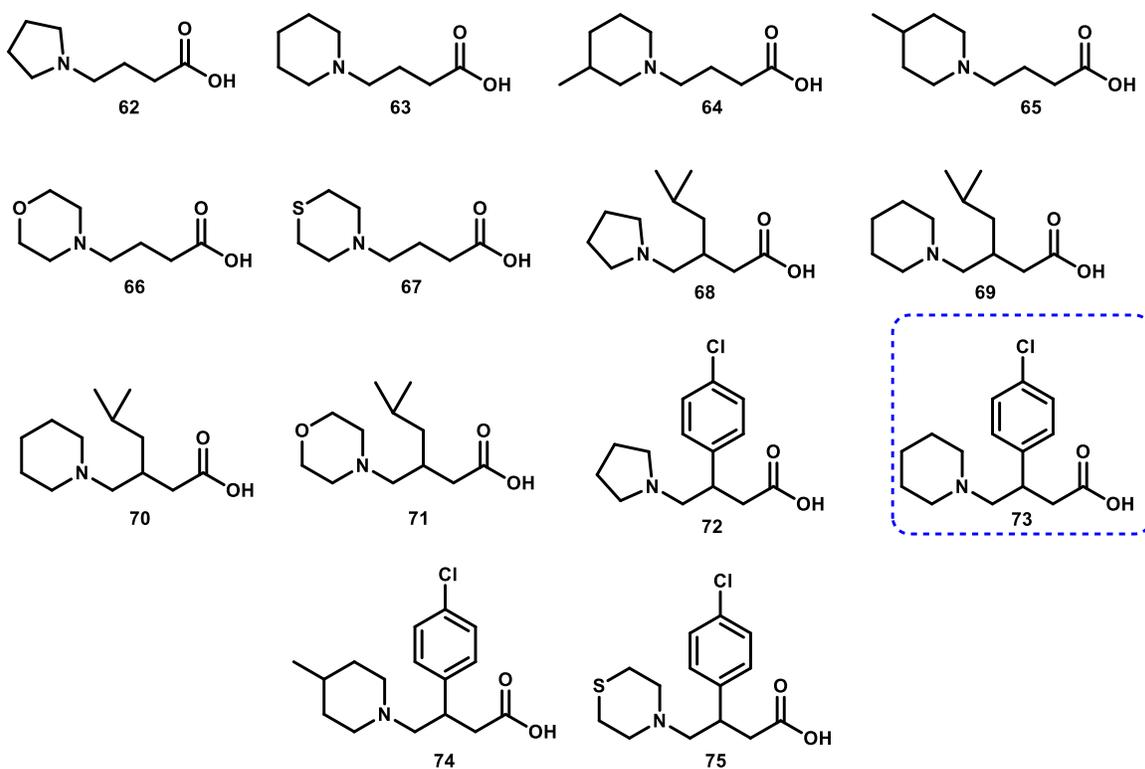


Figura 14. Segunda generación de análogos de GABA, 2 y 3 reportados.

Para la tercera generación, se exploró la incorporación de anillos de triazol en el sistema heterocíclico, donde se obtuvieron los compuestos **76-83**, siendo las moléculas **82** y **83** las que presentaron inhibición enzimática sobre la GABA-AT, con una inhibición de 43 y 59%, respectivamente (Figura 15).⁴⁵

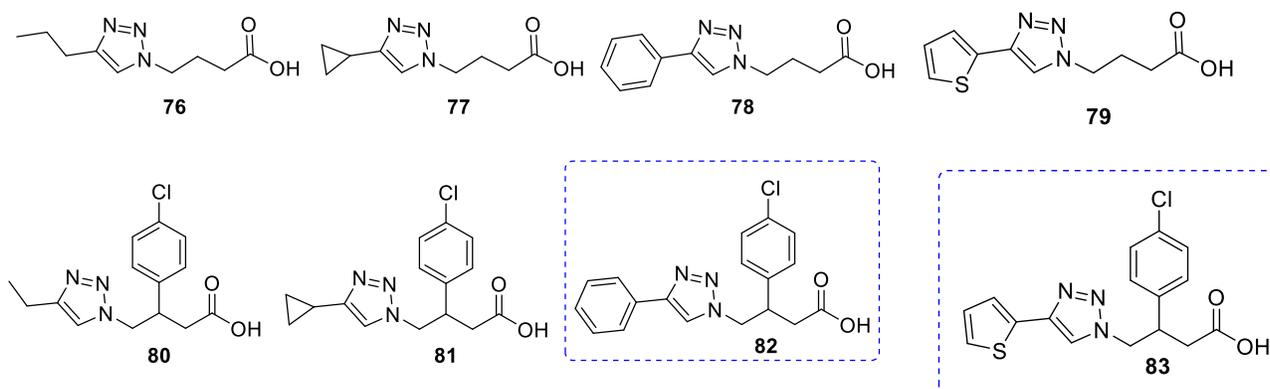


Figura 15. Tercera generación de análogos de 1 y 2.

Más recientemente, se diseñaron y sintetizaron nuevas moléculas análogas de baclofeno sustituidas en posición γ y con anillos heterocíclicos de isoxazol y sustituidas en posición β con diversos anillos aromáticos **84-87a-d** (Figura 16) estas moléculas tienen el objetivo de ser evaluadas como potenciales agonistas del receptor GABA_B.⁴⁶

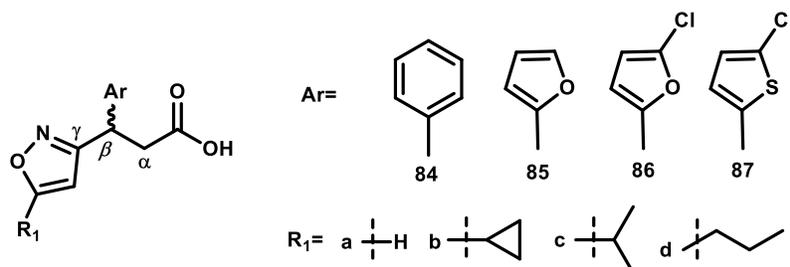


Figura 16. Análogos de **2** como posibles agonistas del receptor GABA_B.

Asimismo, como parte de este trabajo y de un análisis computacional, nuestro grupo de investigación realizó el diseño *in silico* basado en la estructura del receptor GABA_B donde se utilizaron moléculas reportadas en la literatura, estas moléculas en su mayoría conservan el grupo farmacóforo de baclofeno, además se incorporaron agonistas estructuralmente diversos pero que se sabe activan al receptor. En este sentido, primero se realizó un estudio de relación estructura actividad (SAR), el cual se realizó en tres etapas: 1) los análogos fueron clasificados en dos grupos (activos e inactivos), 2) se analizó la modificación estructural sobre las estructuras anteriormente mencionadas (grupos funcionales sobre el andamio de baclofeno), y 3) se analizaron las características electrónicas y estéricas de los sustituyentes de las moléculas.

Posteriormente, para una mayor aproximación se realizó una construcción de un modelo QSAR, donde se emplearon parámetros de energía de acoplamiento con el receptor como descriptor molecular 3D. De este análisis, se describió un modelo lineal, donde se basó en todos los parámetros estadísticos, que describen la concentración media efectiva (pEC_{50}) de los compuestos agonistas sobre el receptor GABA_B, según sus descriptores moleculares que es:

$$Y = 0.244E_{TRP278} + 0.005E_{LUMO} - 137.01PW5 + 10.24PJ12 + 0.06T(N...O) + 13.24 \quad (\text{Eq.1})$$

$s = 0.524$	$F = 23.90$	$\delta K = 0.043 (0.00)$	$R^N = -0.162 (-0.19)$
$R^P = 0.207 (0.10)$	$\Delta Q = 0.007 (-0.005)$	$R_0^2 = 0.85$	$Q_{LOO}^2 = 80.12$

El modelo matemático que resultó de este trabajo previo sugirió entonces que, la actividad de agonistas del receptor GABA_B esta influenciada por tres factores: la forma y el tamaño molecular (PW5 y PJI2), las características constitucionales (E_{LUMO} y T(N...O)) y la energía de interacción del receptor GABA_B con Trp278. De este estudio se propusieron seis nuevas moléculas con alto potencial para ser candidatas como agonistas de receptor GABA_B (Figura 17).⁴⁷

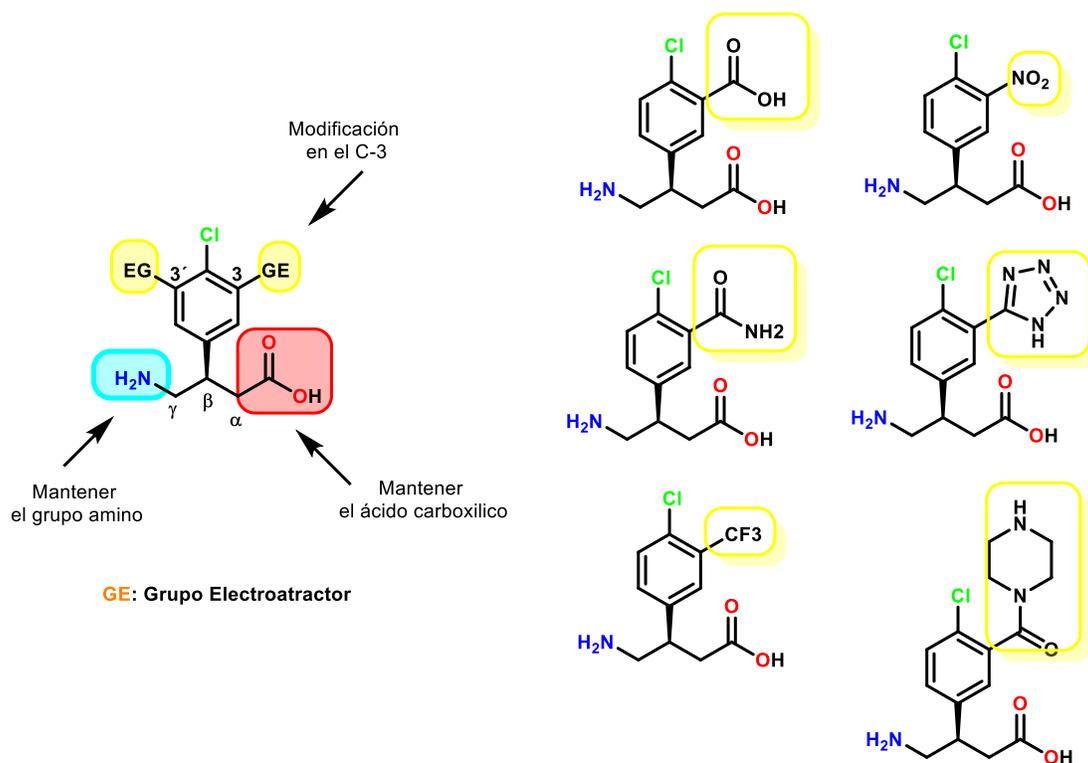


Figura 17. Moléculas que se diseñaron en el grupo de investigación partiendo del andamio molecular de baclofeno, la modificación recomendada con (GE, cuadros amarillos).

3. DISEÑO *IN SILICO* DE ANÁLOGOS DE BACLOFENO

3.1 Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso altamente demandante en términos de tiempo y dinero. En línea de desarrollo, desde la identificación de un nuevo compuesto hasta su aprobación, dura un promedio de 17 años y cuesta un promedio de 800 millones de dólares.

Por tal motivo, en un esfuerzo por reducir la búsqueda de fármacos efectivos, el empleo de herramientas computacionales ha dado lugar a lo que actualmente se conoce como el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DIFAC), herramienta que se ha convertido en un elemento clave en la investigación académica e industria. Este método, combina la actividad de los fármacos y el

conocimiento de las interacciones moleculares, junto con técnicas de visualización, cálculos de energía, consideraciones geométricas y datos filtrados de una enorme base de datos.

La vida tal y como la conocemos está estrechamente relacionada con las formas y la estructura química que presentan moléculas como las proteínas. Las proteínas de origen natural tienen varias funciones; componen la estructura celular, transforman la energía química en trabajo celular, son parte del reconocimiento de otras estructuras moleculares, entre otras. Funciones notables no solo por el mantenimiento de la vida, sino también porque están codificadas en secuencias de aminoácidos con la mayor economía de energía libre posible. Puesto que las proteínas son los componentes moleculares más abundantes en los seres vivos, no es de extrañarse que éstas sean las dianas biológicas más frecuentes de los fármacos.⁴⁸

3.2 Acoplamiento molecular (*Docking*).

El acoplamiento molecular por computadora es una técnica de modelado molecular, que predice la estructura del complejo ligando-receptor. Si el tipo de interacciones entre el ligando y el receptor es entendido, puede ser empleado para diseñar compuestos con una actividad mejorada sobre dicho receptor.

El acoplamiento molecular nace con el modelo de Fisher (1890), donde propuso que las enzimas reconocen a sus sustratos de la misma manera que una llave entra en una cerradura. Por lo tanto, para cada enzima existe un sustrato altamente específico. Sin embargo, el modelo de llave-cerradura ocurre entre interacciones altamente rígidas. Hoy en día se conoce que este proceso no es altamente rígido, sino que ocurre un cambio conformacional en la proteína ocasionado por el sustrato (modelo o teoría de ajuste inducido).⁴⁹

El ajuste inducido es el modelo de Daniel Koshland (1958), donde propuso que la interacción de un ligando en el sitio de unión del receptor se asemeja más al ajuste de una mano (ligando) al introducirse a un guante (receptor). Este modelo propuso que se requiere la orientación precisa del ligando en el sitio de unión; el ligando puede causar cambios posicionales de los residuos del sitio de unión; los cambios inducidos por la unión son específicos de cada ligando.⁵⁰

Finalmente, la teoría del ensamblaje conformacional por Buyong Ma *et al* (2003), donde describe la complejidad conformacional de las proteínas asociadas a su alta dinámica estructural, lo cual genera múltiples conformaciones en el receptor y es necesario el estudio de éstas para entender el proceso de acoplamiento molecular.⁵¹

El primer paso del acoplamiento molecular es identificar el sitio de unión del ligando en la proteína, esto se hace para limitar el espacio de búsqueda sobre la superficie del receptor y así minimizar el costo computacional de la búsqueda. El siguiente paso es la validación estructural y energética del sistema, la primera obtenida por la selección del algoritmo de búsqueda adecuado y la segunda con la función de puntaje.

4. JUSTIFICACIÓN.

El receptor GABA_B (GPCRs), se distribuye ampliamente en el SNC, en el sistema periférico y órganos, donde contribuye a la modulación de la actividad neuronal. Debido a su amplia distribución e importante participación en el proceso de la neurotransmisión, los receptores GABA_B han merecido gran atención, ya que han demostrado que son blancos terapéuticos potenciales para tratar una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas como, espasticidad muscular, dolor neuropático, epilepsia, reflujo gastroesofágico e incluso adicciones. Actualmente, el único ligando agonista aprobado por la FDA que se sabe activa a este receptor es baclofeno, y es utilizado en la clínica para tratar espasticidad muscular y lesiones en la medula espinal. Desafortunadamente, baclofeno tiene una baja absorción en el cerebro, por lo cual se requieren altas concentraciones de este para llevar a cabo su correcto funcionamiento, y; por lo tanto, causa múltiples efectos tóxicos, dificultando su uso clínico.

Motivo por el cual, nos surge el interés por diseñar y potencializar nuevos ligandos que sean agonistas y con una alta absorción en el cerebro. Para ello, en este trabajo se utilizó el acoplamiento molecular por computadora (*Docking*), donde se consideró la estructura del receptor y el fármaco de referencia 2.

5. HIPÓTESIS.

Por medio del acoplamiento molecular por computadora podemos diseñar análogos de baclofeno con mejores características fisicoquímicas y energías de interacción con el receptor GABA_B con respecto a los agonistas reportados en la literatura.

6. OBJETIVO GENERAL.

Diseño *in silico* de compuestos heterocíclicos con analogía estructural a baclofeno como potenciales agonistas del receptor GABA_B utilizando el acoplamiento molecular "*docking*" (Figura 18).

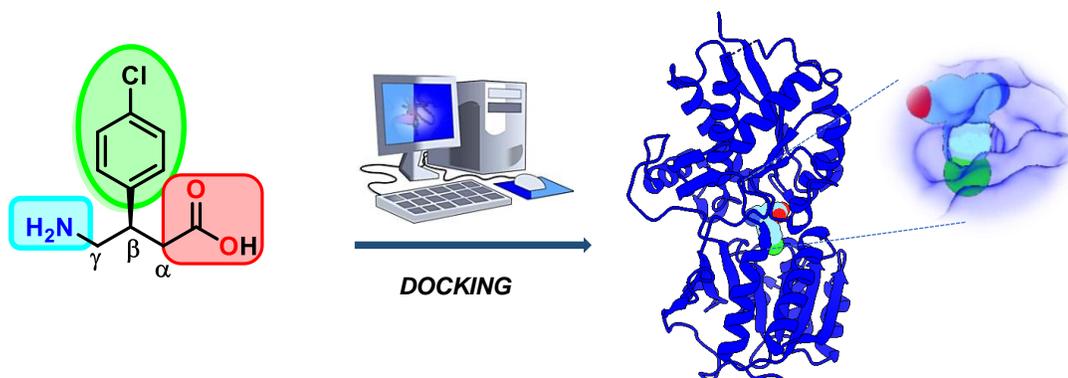


Figura 18. Representación del acoplamiento molecular (*docking*).

6.1 Objetivos específicos

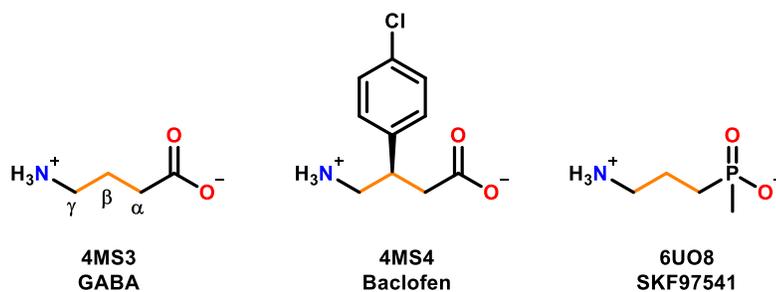
- 1.- Estudio estructural del receptor GABA_B.
- 2.- Estudio SAR de agonistas y antagonistas reportados del receptor GABA_B.
- 3.- Validación estructural y energética del *docking*.
- 4.- Acoplamiento molecular por computadora de agonistas y antagonistas co-cristalizados con el receptor GABA_B.
- 5.- Diseño de análogos heterocíclicos con base en el receptor GABA_B.
- 6.- Cálculo de propiedades fisicoquímicas de las moléculas propuestas.
- 7.- Comparar los resultados obtenidos de las moléculas **88a-g**, **89a-k** y **90a-k** con los resultados del *docking* del paso 4.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis del blanco biológico

En primera instancia, se llevó a cabo un análisis de las diferentes estructuras cristalinas que se tienen disponibles de nuestro blanco biológico (receptor GABA_B). A la fecha se han reportado 9 estructuras cristalinas del dímero de VFT del receptor GABA_B en complejo con varios ligandos, los cuales se encuentran disponibles en el software de acceso libre Protein Data Bank (PDB, por sus siglas en inglés). Se encuentran reportadas 3 estructuras co-cristalizadas con diferentes ligandos agonistas (GABA, baclofeno y SKF97541, PDB: 4MS3, 4MS4 y 6UO8, respectivamente), y 6 estructuras con diferentes antagonistas (PDB: 4MR9, 4MRM, 4MR8, 4MS1, 7CUM y 4MQF). Además, se tiene disponible 2 estructuras del cristal en su forma apo, reportadas en diferentes años, una en el 2013 y otra en el 2020 (PDB: 4MQE y 6VJM). Hasta ahora, todos los ligandos co-cristalizados son análogos estructurales de GABA (con un α -ácido y un γ -amino) (Figura 19).

a) Agonistas



b) Antagonistas

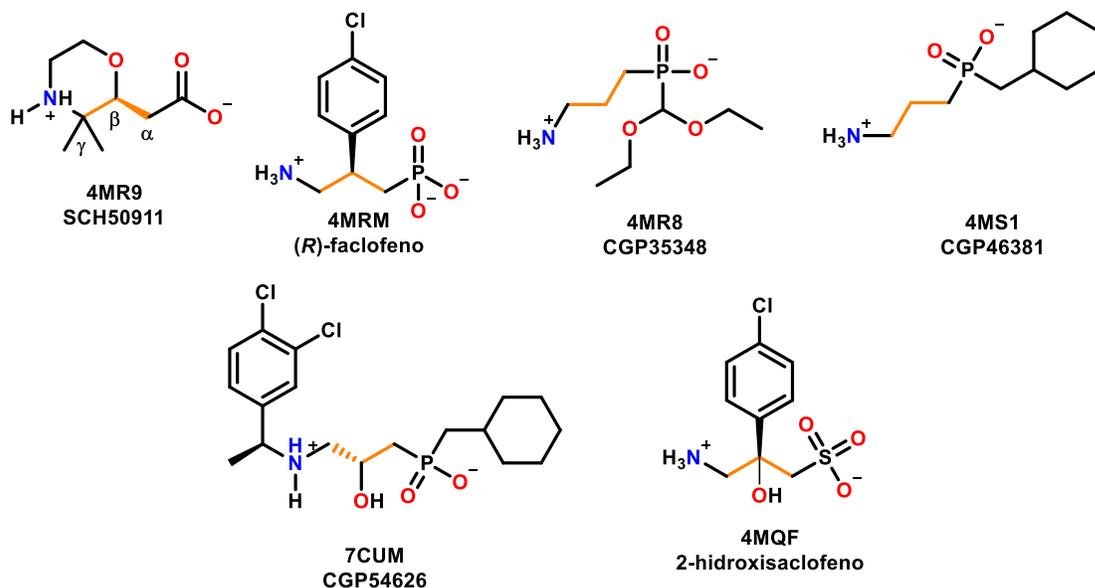


Figura 19. Representación estructural de los ligandos co-cristalizados a) agonistas y b) antagonistas.

Teniendo en cuenta las estructuras cristalinas del receptor GABA_B unido a diferentes ligandos (agonistas como antagonistas), a continuación, se muestra las estructuras moleculares de los cristales 6VJM (forma apo), 7CUM (antagonista) y 7C7Q (agonista) todas ellas reportadas en el año 2020 (Figura 20).

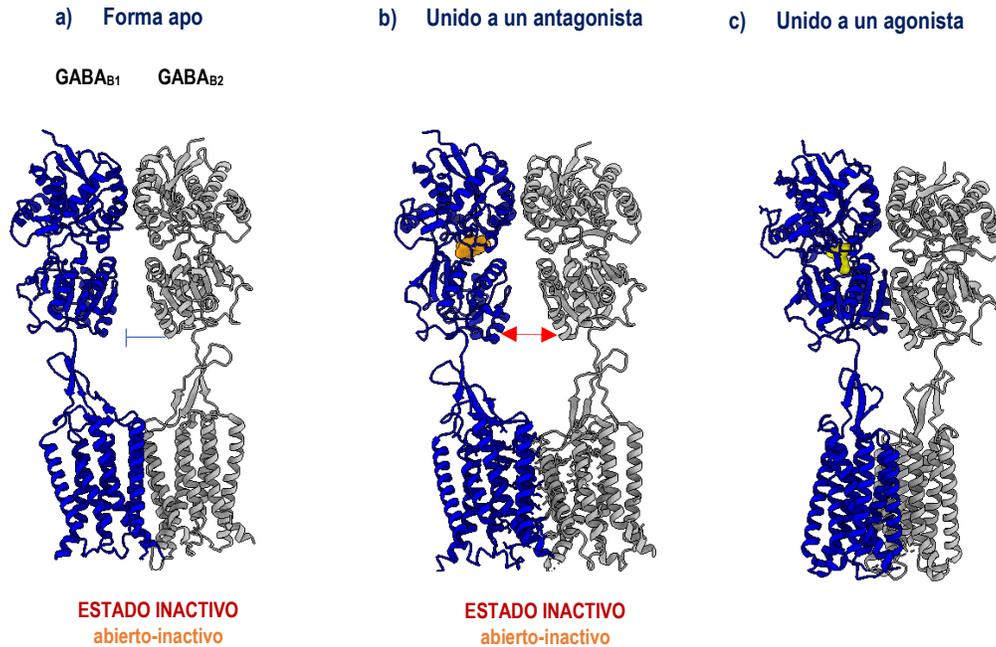


Figura 20. a) Receptor metabotrópico GABA_B de humano en su estado apo. b) Estructura crio-em del receptor GABA_B de humano unido al antagonista CGP54626. c) Estructura crio-em del receptor GABA_B de humano unido a baclofeno/BHFF en estado activo.

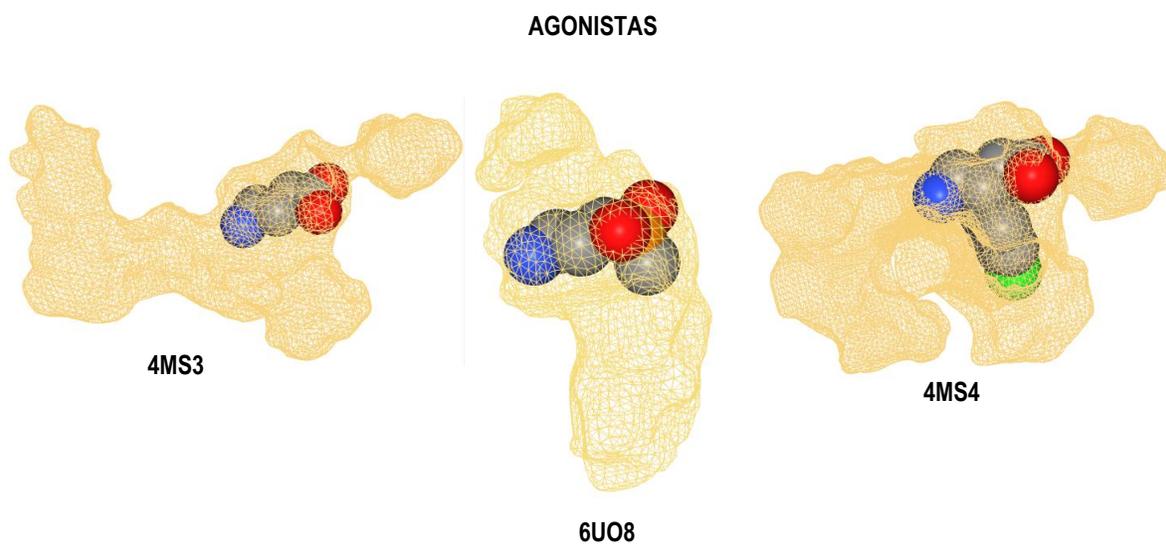
Como se observa, se puede claramente diferenciar de las estructuras de criomicroscopía electrónica X, la función de un agonista, que es, la inducción del cambio conformacional de tal forma que, podemos apreciar como la subunidad GABA_{B1} y GABA_{B2} interactúan y forman una conformación cerrada/activa (Figura 20c), por otro lado para la conformación de la proteína en su forma apo (en ausencia de ligando) se observa abierta-inactiva (Figura 20a), este mismo efecto se observa para la conformación de la proteína cuando se está unida a un antagonista (Figura 20b).

7.2 Análisis sobre las cavidades de los diferentes ligandos agonista y antagonistas.

Posteriormente, utilizando el servidor de acceso libre *ProteinsPlus*, se analizó información importante para cada cristal. Principalmente este servidor se centra en las interacciones ligando-proteína. Además, proporciona información importante como, la detección de las cavidades permitiéndonos visualizar el tamaño y la forma de estas, que a su vez nos permitió obtener información para predecir el posible sitio de unión y estimar su *drug score*. A continuación, se muestra la información sobre la cavidad que se obtuvo en el sitio de unión para cada ligando agonista y (Tabla 1, Figura 21) y antagonistas (Tabla1, Figura 22) co-cristalizado.

Tabla 1. Información sobre la cavidad de los diferentes agonistas y antagonistas co-cristalizados reportados en la literatura.

PDB	Drug Score	Volumen [Å ³]	Superficie [Å ²]	Profundidad [Å]	Resolución Å	Radio de Hidrofobicidad
AGONISTAS						
4MS3	0.85	775.62	880.22	23.29	2.5	0.36
4MS4	0.8	1038.02	1126.1	23.28	1.9	0.29
6UO8	0.83	475.25	533.07	22.32	3.63	0.31
7C7Q	0.81	1111.71	994.27	24.45	3	0.20
ANTAGONISTAS						
4MR9	0.83	992.18	1073.92	22.44	2.35	0.50
4MRM	0.84	900.45	993.72	24.26	2.86	0.45
4MR8	0.84	857.88	967.34	23.88	2.15	0.44
4MS1	0.81	985.6	1190.06	23.40	2.25	0.45
7CUM	0.78	590.26	628.24	17.12	3.52	0.40
4MQF	0.84	891.35	1058.35	23.81	2.22	0.47



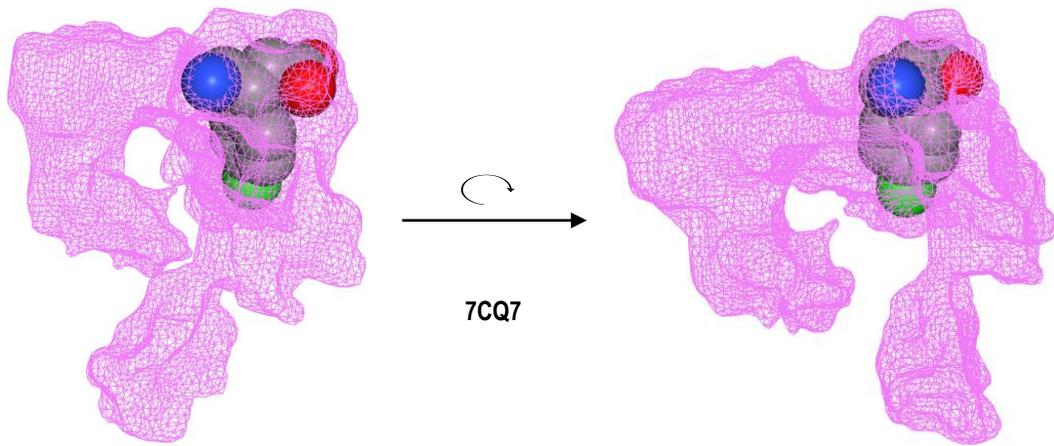
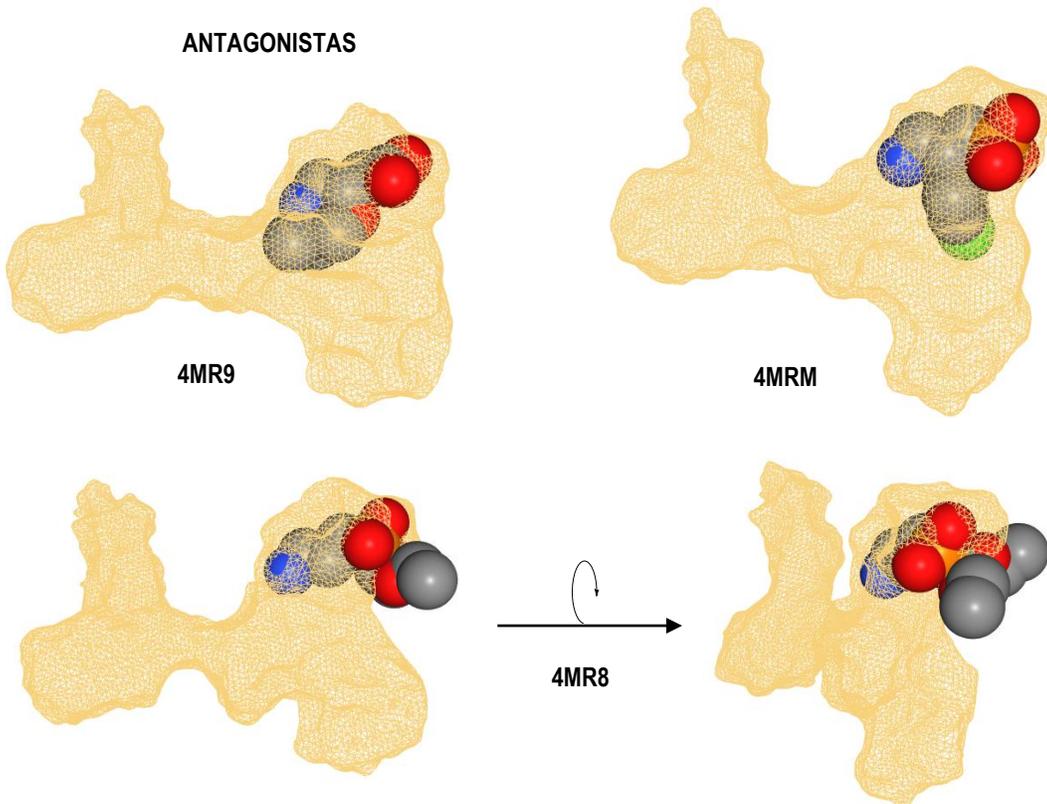


Figura 21. Forma y tamaño de las cavidades de los ligandos agonistas.

Como se ilustra en la Tabla 1, en el año 2020⁵² se reportó otro cristal del receptor GABA_B unido a baclofeno (PDB:7C7Q), como se observa, a pesar de que ambos cristales tienen el mismo ligando, existen variaciones en la cavidad en cuanto el volumen, superficie, profundidad e hidrofobicidad que son específicos para cada cristal.



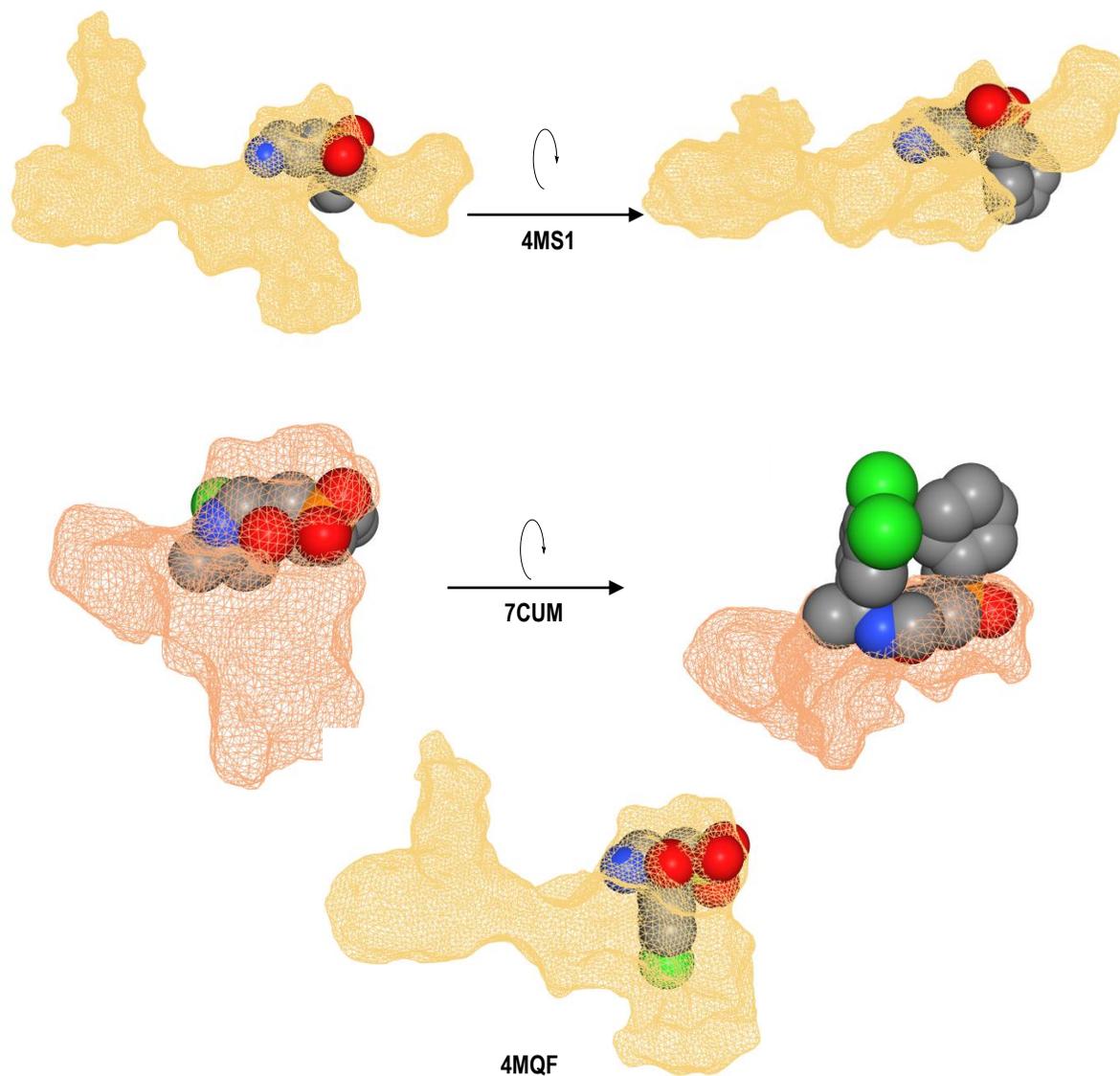


Figura 22. Forma y tamaño de las cavidades de los ligandos antagonistas.

Con base a la información obtenida anteriormente sobre el análisis de las cavidades de las diferentes estructuras de nuestro blanco biológico (Receptor GABA_B), especialmente los que están unidos a ligandos agonistas que son de nuestro interés, decidimos analizar el carácter hidrofóbico de los aminoácidos que están presentes dentro de la cavidad de la proteína 7C7Q ya que es la que mejores propiedades estructurales y fisicoquímicas tiene con respecto a las otras, se observa en color azul los aminoácidos hidrofóbicos no polares, en color morado los aminoácidos de hidrofobicidad media y en color rojo los aminoácidos hidrofílicos (Figura 23).

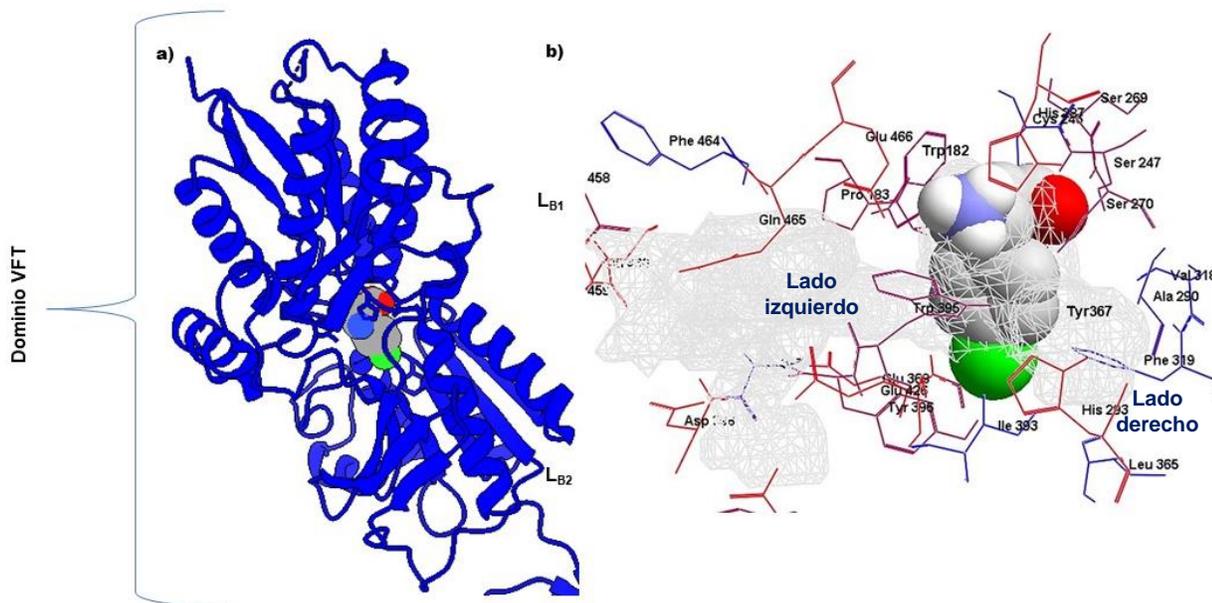
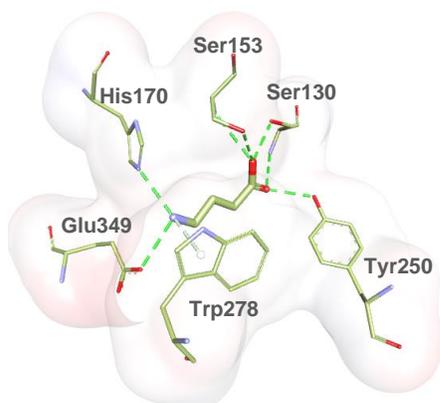


Figura 23. a) Estructura secundaria de 7C7Q unido a baclofeno, b) Cavidad (color gris) y aminoácidos presentes dentro de la cavidad del cristal 7C7Q, en stick color azul se representan los aminoácidos hidrofóbicos no polares, en color morado los aminoácidos de hidrofobicidad media y en color rojo los aminoácidos hidrofílicos.

Como se observa, la cavidad está fuertemente influenciada de lado derecho por aminoácidos hidrofóbicos no polares (Val318, Ala290 y Phe319), del lado izquierdo está influenciada por aminoácidos de hidrofobicidad media (Tyr396, Trp395 y Trp182).

Con base a esta información, podemos construir un diseño de ligando con base a la estructura de la cavidad del receptor. Posteriormente, fueron evaluados los aminoácidos de interacción de los tres ligandos agonistas y los seis antagonistas co-cristalizados cada uno con su respectivo cristal, esto se realizó con ayuda del servidor de acceso libre *ProteinsPlus* y el software *Discovey studio 2021*.

7.3 Análisis sobre los residuos de interacción para agonistas del receptor GABA_B.



Las interacciones en el sitio de unión a GABA en la subunidad de VFT de GABA_{B1} PDB:4MS3 (Figura 24), son por el lado del grupo carboxilato, redes de interacciones de enlace de hidrógeno donde están involucrados aminoácidos de Ser130, Ser153 y Tyr250. Por el lado del grupo γ -amino interactúa con aminoácidos de His170, Glu349 y Trp278 a través de interacciones de enlace de hidrógeno, iónica y π -catión.

Figura 24. Representación en 3D de las interacciones de GABA sobre el cristal 4MS3.

Por otro lado, baclofeno, un agonista específico de receptor GABA_B, se une de manera similar a GABA, pero presenta un giro conformacional de Tyr250 para acomodar el anillo *p*-clorofenilo. Interacciones en el sitio de unión a baclofeno en la subunidad de GABA_{B1} PDB:4MS4 (2013),¹² por el lado del grupo carboxilato interacciona por medio de enlaces de hidrógeno con aminoácidos de Ser130, Ser153 y Tyr250, por el lado del grupo γ -amino, interactúa con aminoácidos de His170, Glu349 y Trp278 a través de enlace de hidrógeno, iónicas y π -catión. Finalmente el grupo *p*-clorofenilo en posición β interacciona con aminoácidos aromáticos de Tyr250, Trp278 y Trp65 a través de interacciones π - π (Figura 25).

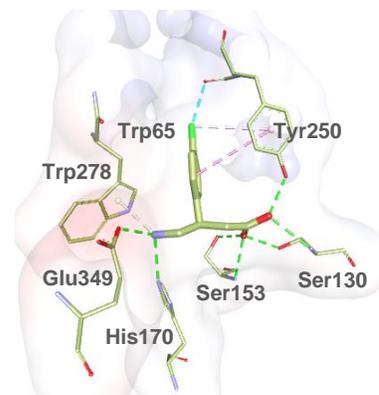
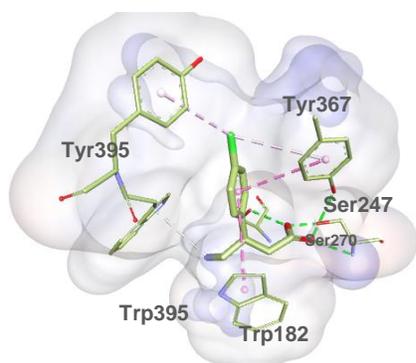
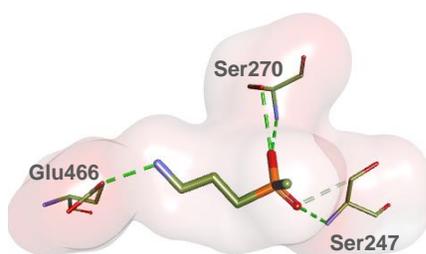


Figura 25. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal 4MS4.



Otro cristal de baclofeno unido al receptor GABA_{B1} que fue reportado, es el 7C7Q (2020),⁵² donde se observa para este cristal que, el grupo carboxilato mantiene las mismas interacciones de enlace de hidrógeno con los residuos de Ser247, Ser270 y Tyr367, de igual forma se mantienen las mismas interacciones del grupo *p*-clorofenilo con los mismos aminoácidos aromáticos analizados en el cristal 4MS4, pero se observa que por el lado del grupo γ -amino, únicamente permanece la interacción π -catión con el aminoácido de Trp395 (Figura 26).

Figura 26. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal 7C7Q.

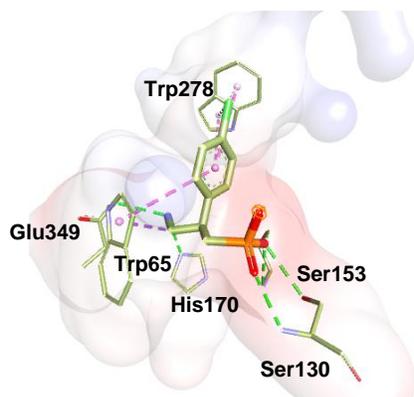


Glu466 (Figura 27).

Figura 27. Representación en 3D de las interacciones de baclofeno sobre el cristal PDB 6UO8.

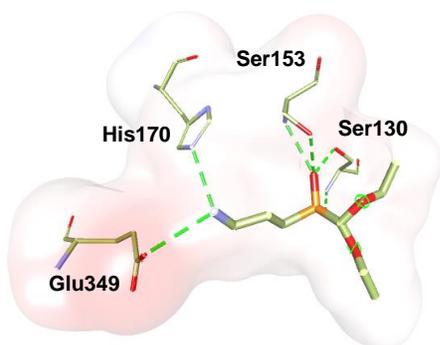
En el año 2019,⁵³ se reportó otro ligando agonista del receptor GABA_B co-cristalizado, del cual se obtuvo la siguiente información (Figura 27), el ácido fosfínico interacciona con aminoácidos de Ser247 y Ser270 a través de interacciones de enlace de hidrógeno y el grupo γ -amino interacciona del mismo modo por una interacción electrostática con el aminoácido de

7.4 Análisis sobre los residuos de interacción para antagonistas del receptor GABA_B.



La sustitución del grupo ácido carboxílico de baclofeno por un grupo de ácido fosfónico dio lugar a faclofeno (PDB:4MRM), un antagonista selectivo del receptor GABA_B, por el lado del grupo fosfónico interacciona por medio de enlaces de hidrógeno con aminoácidos de Ser130 y Ser153, por el lado del grupo γ -amino, interactúa con aminoácidos de His170, Glu349 y Trp65 a través de enlace de hidrógeno y π -catión, respectivamente (Figura 28). Finalmente, el grupo *p*-clorofenilo en posición β interacciona con aminoácidos aromáticos de Trp278 y Trp65 a través de interacciones π - π .

Figura 28. Representación en 3D de las interacciones de faclofeno sobre el cristal 4MRM.



Continuando con el análisis, los antagonista CGP35348 (PDB:4MR8), CGP46381 (PDB:4MS1) y SCH50911 (PDB:4MR9), comparten el mismo tipo de interacciones (enlace de hidrógeno, Figura 29) con los mismos aminoácidos (His170, Ser153, Ser130 y Glu349). Adicionalmente los grupos alílicos para 4MR8 y 4MS1 interactúan con el aminoácido aromático Trp65 (Figura 29).

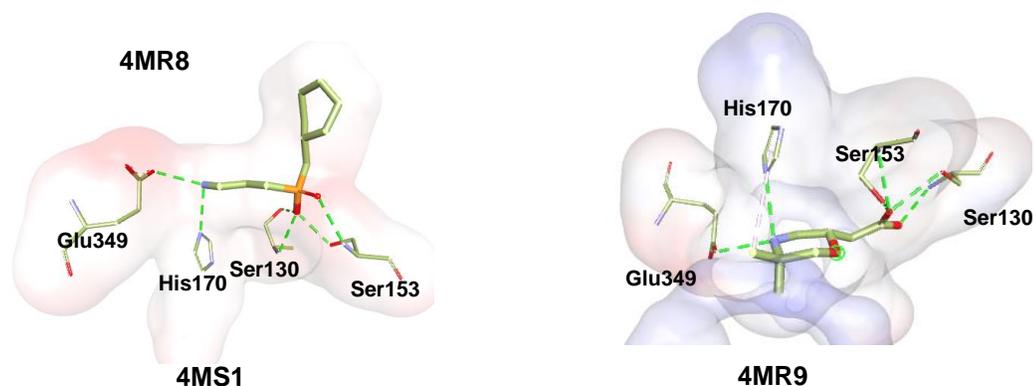
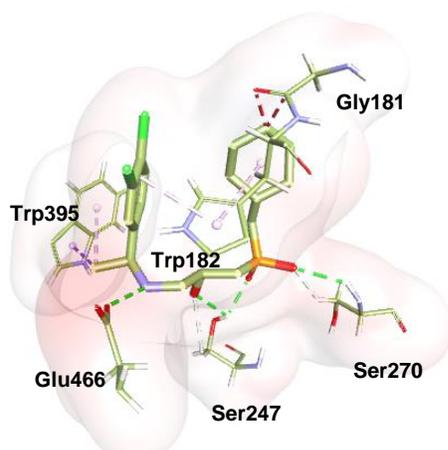


Figura 29. Representación en 3D de las interacciones que comparten los antagonistas CGP35348, CGP46381 y SCH50911 con sus respectivos cristales.



de Ser247 (Figura 30).

Figura 30. Representación en 3D de las interacciones de CGP54626 sobre el cristal 7CUM.

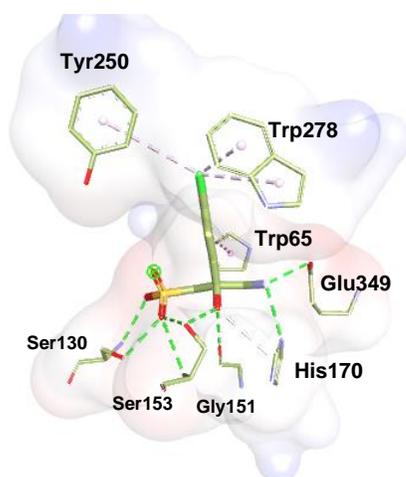


Figura 31. Representación en 3D de las interacciones de 2-hidroxisaclofeno sobre el cristal 4MQF.

De este análisis se observó que todos los ligandos se unen a la subunidad de VFT de GABA_{B1} los cuales involucran aminoácidos similares (en su mayoría enlaces de hidrógeno). En resumen, los grupo α -ácido, forman enlaces de hidrógeno con residuos de Ser130 y Ser153, mientras que el grupo γ -amino esta unido por enlace de hidrógeno con aminoácidos de His170 y Glu349. Por el lado del grupo aromático de baclofeno comparte los mismos aminoácidos aromáticos de interacción con el antagonista 2-hidroxisaclofeno. Por otro lado el aminoácido de Trp65 forma interacciones de Van der Waals al menos con 4 de los antagonistas.

Cabe mencionar que el sustituyente β -hidroxilo de CGP54626 (7CUM) y 2-hidroxisaclofeno (4MQF) forman interacciones adicionales de enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo que tienen

Por otro lado, para el antagonista CGP54626 (7CUM), el grupo α -ácido interactúa por medio de enlace de hidrógeno con aminoácidos de Ser247 y Ser270, por el lado del grupo ciclohexilo interactúa con Gly181 y Trp182. El grupo γ -amino interactúa por interacción electrostática con el aminoácido de Glu466. El grupo aromático interactúa con residuos aromáticos de Trp395 y Trp182 a través de interacciones π - π . Finalmente, el grupo β -hidroxilo interactúa por medio de enlace de hidrógeno con el residuo

Finalmente, el antagonista 2-hidroxisaclofeno (PDB:4MQF), interactúa por el lado del grupo α -ácido con aminoácidos de Ser130 y Ser153, mientras con el grupo γ -amino interactúa con aminoácidos de His170 y Glu349. Por otro lado, el grupo *p*-clorofenilo interactúa con aminoácidos aromáticos de Tyr250, Trp278 y Trp65. Finalmente, el grupo β -hidroxilo interactúa adicionalmente con aminoácidos de Ser153, Gly151 y His170 (Figura 31).

presente en su estructura con el receptor los cuales podrían ser específicos para estos dos antagonistas (Ser247 y Ser153 respectivamente).

Otro dato importante que se analizó a partir de los ligandos co-cristalizados fue que, se cree que el antagonista grande y voluminoso (CGP54626, 7CUM) impide una formación cerrada y estable al formar interacciones con GABA_{B1b}, probablemente por su tamaño en comparación con los agonistas. Finalmente, este ligando tiene interacciones extra con Trp182 y Gly181 a través del sustituyente ciclohexilo.

Finalmente, como podemos observar, relacionar patrones de interacción con el receptor, respecto a la actividad y la afinidad del ligando es difícil, ya que los patrones de interacción para la unión en la cavidad de GABA_{B1} son similares para anclar agonista como antagonistas, sin importar la actividad del ligando.

Como parte de nuestro estudio de análisis se prosiguió a la generación de las superficies de contacto de enlace de hidrógeno, electrostáticas, hidrofóbicas y aromáticas, utilizando el software *Discovery studio visualizar*. Como parte de un tercer estudio de análisis para predecir los aminoácidos de interacción, así como para determinar la distancia y ángulo que tienen, se utilizó el servidor *protein-ligand interaction profiler* (PLIP, por sus siglas en inglés).

Se llevó a cabo únicamente para los tres ligandos agonistas (PDB: 4MS3, 7C7Q y 6UO8), y para tres ligandos antagonistas (PDB: 4MQF, 4MR9 y 7CUM). Este análisis fue de importancia, para conocer la contribución individual de cada residuo de aminoácido involucrado que interactúa con los ligandos de efecto agonista y antagonista.

7.5 Superficies de Enlace de Hidrógeno.

Los enlaces de hidrógeno son las interacciones más frecuentes en los complejos biológicos. Son interacciones fuertes (0.25-40 kcal/mol) ya que dependen de un ángulo y una distancia específica. El ángulo que deben de tener el donador y el aceptor para que sea más energético debe oscilar entre 130-180° (por la geometría del orbital) y deben de tener una distancia desde 1.5, 2.5 hasta 3 Å. Los residuos de interacción de enlace de hidrógeno pueden ser de tipo aceptores de hidrógenos (HBA) que se indican de color verde o donadores de enlace de hidrógeno (HBD) indicado de color morado (Figuras 32 y 33).

El grupo amino del ligando del cristal 4MS3 forma interacciones de enlace de hidrógeno con aminoácidos de His170 ($d=1.85 \text{ \AA}$, $\theta=164.8^\circ$) y Glu349 ($d=2.14 \text{ \AA}$, $\theta=152.85^\circ$) de tipo HBA, mientras que el grupo ácido carboxílico presenta interacciones de este tipo con aminoácidos de Tyr250 ($d=2.60 \text{ \AA}$, $\theta=154.95^\circ$), Ser130 ($d=2.03 \text{ \AA}$, $\theta=164.77^\circ$), Ser153 ($d=2.14 \text{ \AA}$, $\theta=170.50^\circ$) y con Tyr250 ($d=$

1.72 Å, $\theta = 154.95^\circ$), los cuales contribuyen como HBD. Adicionalmente, Ser153 funciona como HBA con el ácido carboxílico cuando este funciona como HBD ($d=2.14$ Å, $\theta = 135.75^\circ$).

El ligando del cristal 7C7Q presenta una interacción con el grupo amino, el cual participa como un HBD con el aminoácido de Glu466 el cual contribuye como un HBA ($d= 2.69$ Å, $\theta = 134.77^\circ$) y el grupo ácido carboxílico participa como un HBA con aminoácidos de Ser247 ($d = 2.16$ Å, $\theta = 144.07^\circ$), Ser270 ($d= 2.81$ Å, $\theta = 155.28^\circ$) y Tyr367 ($d= 3.17$ Å, $\theta = 155.38^\circ$) los cuales contribuyen con interacciones de tipo HBD.

Finalmente, para los agonistas, el ligando SKF97541 del cristal 6UO8 forma interacciones de enlace de hidrógeno de tipo HBD con el grupo amino, interaccionando con el residuo de Glu466, el cual contribuye como un HBA ($d= 1.69$ Å, $\theta = 173.06^\circ$). Por el lado de grupo ácido fosfínico interacciona con aminoácidos de Ser247 ($d= 2.13$ Å, $\theta = 150.69^\circ$) y Ser270 ($d= 2.54$ Å, $\theta = 123.42^\circ$), los cuales contribuyen con interacciones de tipo HBD, y otra interacción adicional con Ser270 fungiendo como HBA ($d= 2.32$ Å, $\theta = 116.33^\circ$) (Figura 32).



Figura 32. Superficie de tipo enlace de hidrógeno de los cristales con ligandos agonistas (GABA, baclofeno y SKF97541).

Para los antagonistas, iniciando con el ligando del cristal 4MQF, el grupo amino (HBD), interacciona con el aminoácido de Glu349 ($d= 1.86$ Å, $\theta = 142.80^\circ$) de tipo HBA. Por el lado del grupo sulfónico (HBA) interacciona con aminoácidos de Ser130 ($d= 1.90$ Å, $\theta = 170.40^\circ$), Ser153 ($d= 2.28$ Å, $\theta = 170.62^\circ$) de tipo HBD, y con Ser153 ($d= 2.22$ Å, $\theta = 155.58^\circ$) de tipo HBA. Finalmente, por el lado del grupo hidroxilo (HBD) interacciona con Ser153 ($d= 2.12$ Å, $\theta = 135.79^\circ$) como HBA.

Para el ligando del cristal 4MR9, el grupo amino (HBD), interacciona con el aminoácido Glu349 ($d= 1.84$ Å, $\theta = 152.83^\circ$). Por el lado del grupo ácido carboxílico (HBA) interacciona con residuos de Ser130 ($d=1.85$ Å, $\theta = 174.30^\circ$) y Ser153 ($d=2.06$ Å, $\theta = 165.95^\circ$). Finalmente, el oxígeno dentro del ciclo (HBA) interacciona con el aminoácido de Ser153 ($d= 2.95$ Å, $\theta = 112.31^\circ$) de tipo HBD.

Finalmente, el nitrógeno (HBD) del ligando del cristal 7CUM interactúa con el residuo de Glu466 ($d=1.83 \text{ \AA}$, $\theta = 171.75^\circ$) de tipo HBA. Por el lado del grupo fosfínico (HBA) interactúa con aminoácidos de Ser247 ($d= 2.25 \text{ \AA}$, $\theta = 136.73^\circ$), Ser270 ($d= 3.12 \text{ \AA}$, $\theta = 145.33^\circ$) de tipo HBD. Además, Ser270 actúa también como HBA con el ácido fosfínico ($d= 2.29$, $\theta = 103.65^\circ$) y con el grupo hidroxilo ($d= 2.08 \text{ \AA}$, $\theta= 112.73^\circ$) los cuales participan como HBD (Figura 33).

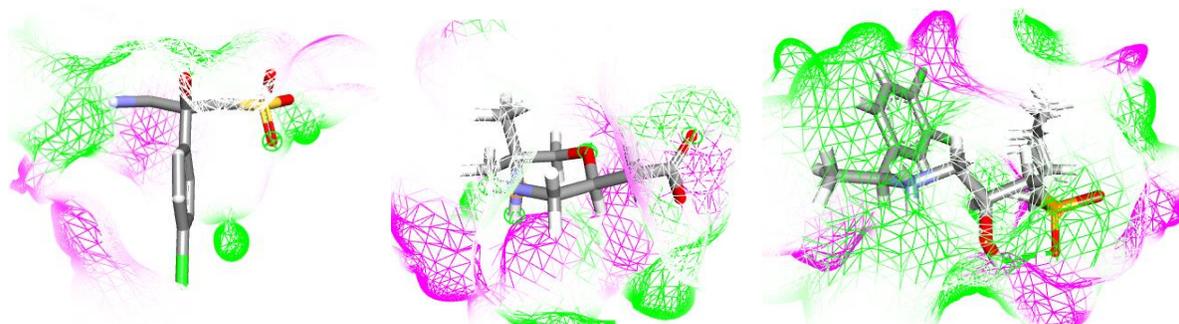


Figura 33. Superficie de tipo enlace de hidrógeno de los cristales con ligandos antagonistas (4MQF, 4MR9 y 7CUM).

7.6 Superficies electrostáticas.

Las interacciones electrostáticas o iónicas son las que gobiernan las interacciones entre ligando-receptor. Este tipo de interacciones son no direccionadas; y, por lo tanto, no se ven afectadas por la distancia, esto debido a que es una interacción que se da entre dos iones con cargas opuestas. En la Figura 34 el área de color rojo nos indica la zona rica en electrones o bien de cargas negativas formales, por lo tanto, el área de color azul nos indica las zonas deficientes de electrones o cargas positivas (Figura 34).

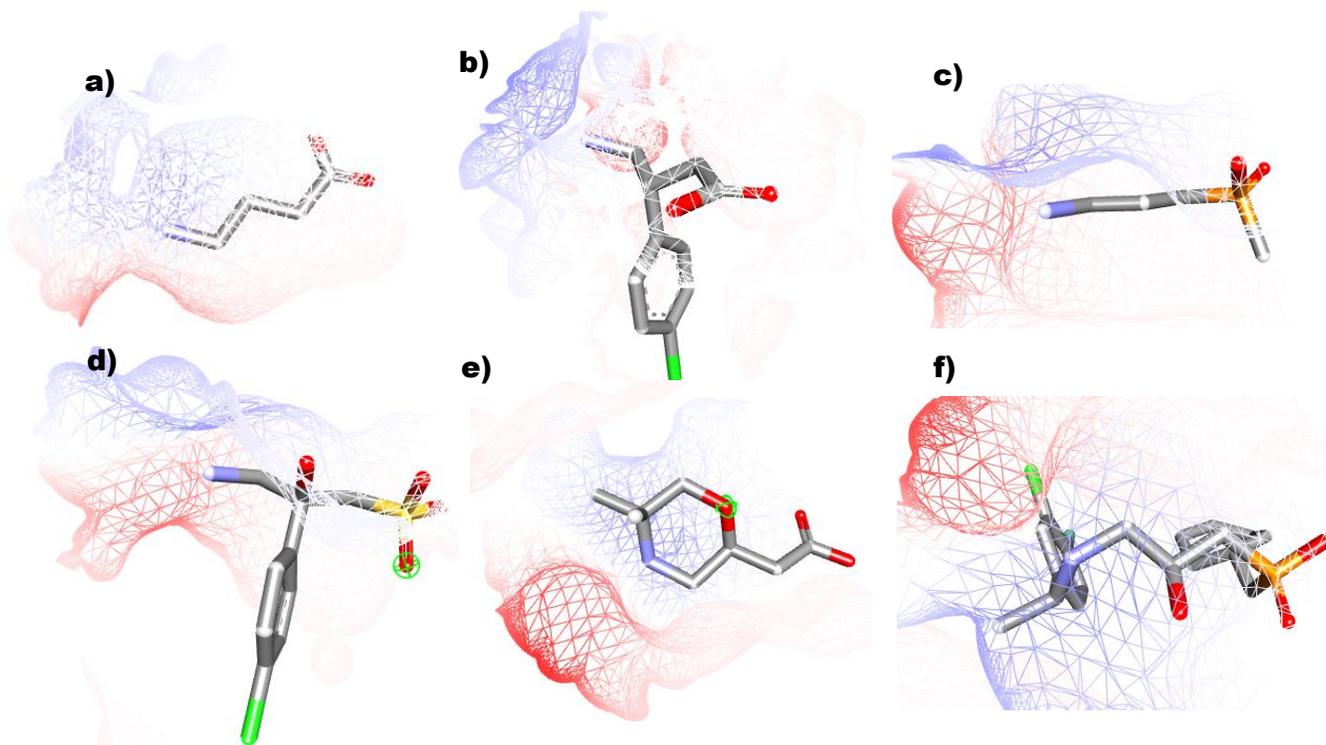


Figura 34. Superficies electrostáticas de los cristales a) 4MS3, b) 7C7Q, c) 6UO8, d) 4MQF, e) 4MR9 y f) 7CUM.

7.7 Superficies hidrofóbicas.

Las interacciones hidrofóbicas (dipolo-dipolo inducido) están asociadas a la entropía del sistema. Son interacciones débiles (1.5-2 kcal/mol), y por lo tanto es fácil solvatar al sistema, porque su energía es pequeña. El análisis de las interacciones hidrofóbicas se llevó a cabo en la superficie de las cavidades de los cristales correspondientes: 4MS3, 7C7Q, 6OU8, 4MQF, 4MR9 y 7CUM. En la superficie de las cavidades, la parte más hidrofóbica o menos polar es representada de color café y la menos hidrofóbica o más polar, es representada en color azul (Figura 35).

El ligando endógeno GABA (4MS3) forma interacciones hidrofóbicas dentro de la cavidad con aminoácidos de Trp65 a una distancia de 3.77 Å y con Trp278 a una distancia de 3.98 y 3.71 Å. Para baclofeno (7C7Q) forma interacciones hidrofóbicas con aminoácidos de Trp182 (3.5 Å) y Trp395 (3.83 Å). El ligando SKF97541 (6OU8), únicamente presenta interacciones de enlace de hidrógeno.

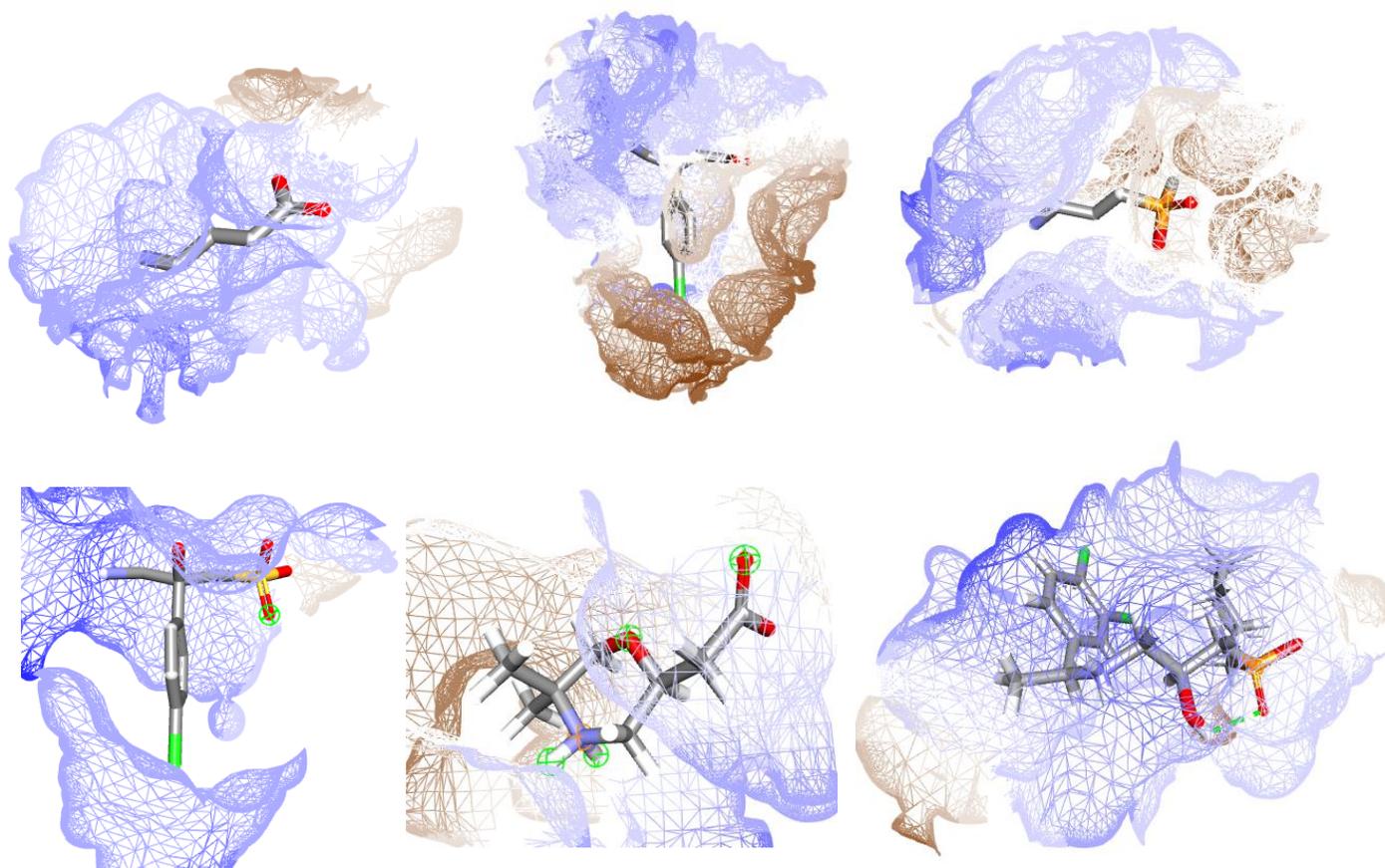


Figura 35. Superficies hidrofóbicas de los ligandos de los cristales 4MS3, 7C7Q, 6OU8, 4MQF, 4MR9 y 7CUM, respectivamente.

El ligando del cristal 4MQF únicamente presenta una interacción hidrofóbica con el *p*-clorofenilo y el aminoácido de Trp65 (3.91 Å). El ligando del cristal 4MR9 presenta una interacción hidrofóbica con el α -metileno y el aminoácido de Trp65 (3.74 Å) y otra con el grupo metilo con el aminoácido de Trp278

(3.99 Å). Finalmente, para el ligando del cristal 7CUM, el grupo ciclohexilo presenta una interacción con el aminoácido de Trp182 (3.11 Å), por el lado del grupo 3,4-diclorofenilo interacciona con el aminoácido de Trp395 (3.81 Å) y finalmente el grupo metilo interacciona con el aminoácido de Trp395 (3.24 Å).

7.8 Superficies aromáticas

Las interacciones que involucran anillos aromáticos son importantes contribuyentes en el reconocimiento de proteína-ligando y en el diseño de fármacos. Son de gran importancia en el diseño *in silico*, ya que nuestro ligando de referencia (baclofeno) contiene un anillo aromático.

A continuación, se hace referencia de este tipo de interacción en el cristal 7C7Q. Los colores que representan el área aromática en el sitio de unión se indica con color azul (indica una interacción tipo π -stacking) y en color naranja es una interacción π - π (Figura 36).

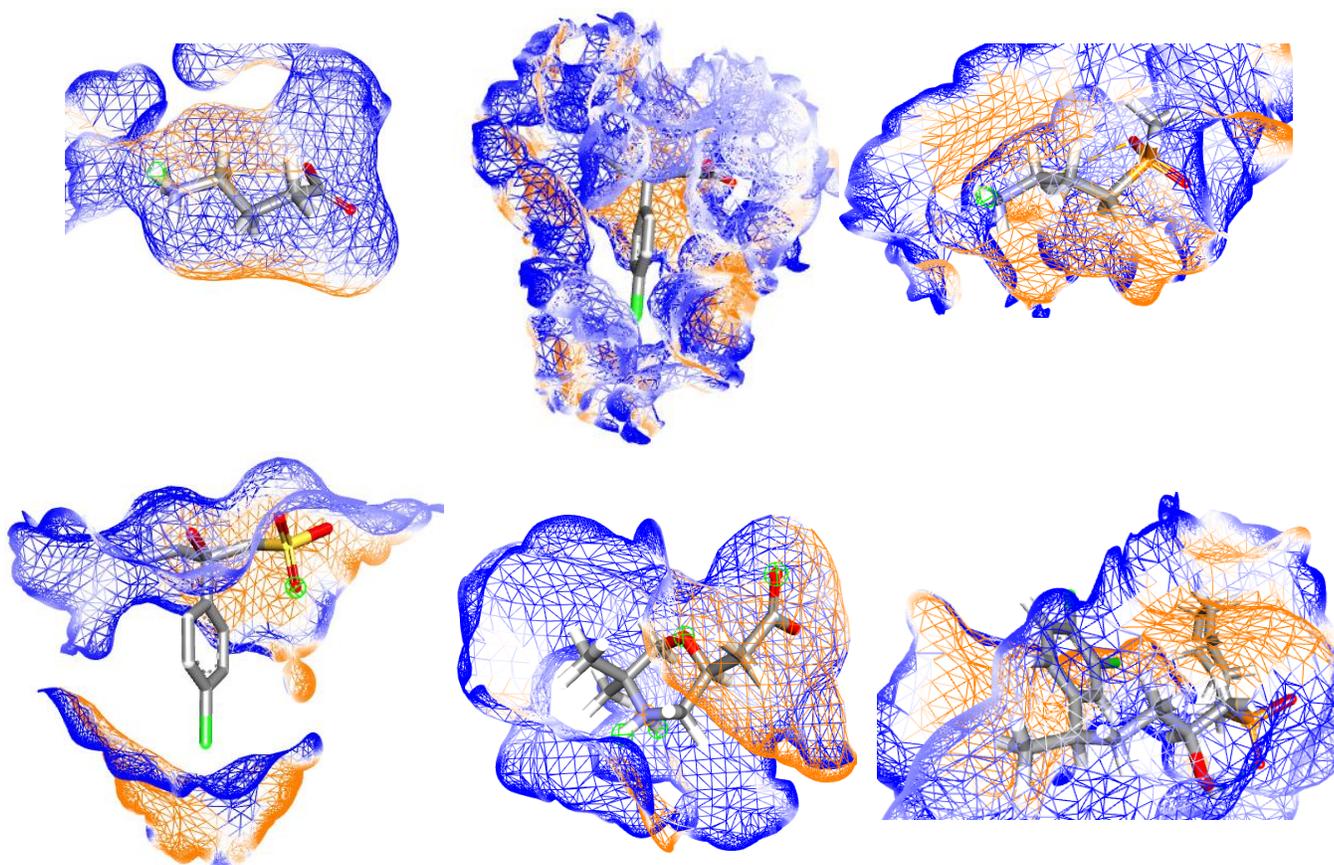


Figura 36. Superficies aromáticas de los ligandos de los cristales 4MS3, 7C7Q, 6UO8, 4MQF, 4MR9 y 7CUM, respectivamente.

7.9 Determinación de la distribución de las moléculas.

La distribución de una sustancia química en el cuerpo es un aspecto importante de la farmacocinética; sin embargo, no es fácil medir dicha distribución mediante técnicas *in vitro* o *in vivo*.

La predicción *in silico* de dicha distribución se puede efectuar mediante dos parámetros clave: ionización y lipofilia de la molécula.⁵⁴

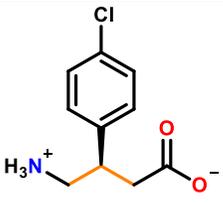
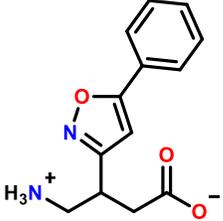
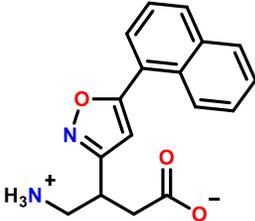
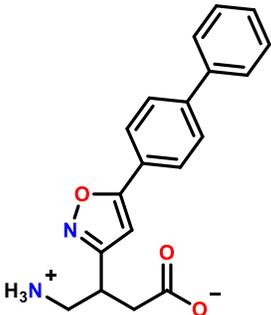
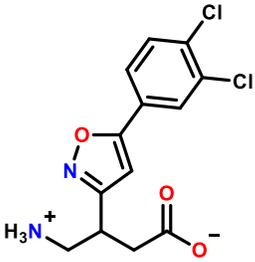
La lipofilia, representada por logP (logaritmo del coeficiente de partición entre el *n*-octanol y agua) ayuda a explicar la permeabilidad y distribución de un compuesto neutro; sin embargo, a un pH dado, algunos átomos pueden donar (disociar) o recibir (asociar) protones. Esta asociación/disociación cambia la carga de la molécula y por ende afecta al coeficiente de partición (logP) que no considera cambios en el pH del medio. El coeficiente de distribución (logD) si considera el pH del medio y es una constante que se utiliza para estimar las diferencias en concentración de las especies ionizadas y las no ionizadas a cierto pH.⁵⁵ Para calcular los valores de logD de cierta sustancia, es necesario conocer su pK_a (constante de ionización) y su logP. En general, a pH de 7.4 los valores de logD considerados como óptimos son entre **-0.5 y 2** para absorción en los enterocitos tras la administración oral. Los compuestos con valores de logD menores a -0.5 o mayores de 2, tienden a tener baja absorción debido a la limitada permeabilidad de las membranas o una escasa solubilidad en agua, respectivamente. La concentración de especies neutras y ionizadas no solo depende de su pK_a , sino también de los grupos donadores y aceptores de enlace de hidrógeno presentes en la molécula.

En el presente trabajo, se analizaron algunas propiedades moleculares de los compuestos diseñados basados en las reglas de Lipinski⁵⁴, las cuales sugieren que hay una mayor probabilidad de que un compuesto sea permeable a las membranas y fácilmente absorbido por el cuerpo si las moléculas diseñadas cumplen con los siguientes criterios:

- ✓ Peso molecular menor a 500 uma.
- ✓ La Lipofilia, expresada en valores de clogP (logaritmo del coeficiente de partición entre el *n*-octanol y agua calculada), debe ser menor a 5.
- ✓ No más de 5 grupos donadores de enlace de hidrógeno.
- ✓ No más de 10 grupos aceptores de enlace de hidrógeno.

Para nuestro proyecto, las propiedades moleculares de cada análogo diseñado se evaluaron en el servidor de libre acceso Molinspiration. En las Tablas 1 a 3 se puede observar que la lipofilia de las moléculas se encuentra dentro del valor recomendable por Lipinski, (clogP menor a 5) este valor fue obtenido del programa ChemDraw, además ningún análogo excede el número sugerido de grupos donadores y aceptores de protón. Adicionalmente, los pesos moleculares son menores a 500 uma. Por otro lado, los valores de logD se calcularon en el servidor MarvinSketch observándose que los compuestos **88a**, **88e**, **88f**, **89b**, **89c**, **89d**, **90b**, **90c** y **99d** presentan valores de logD fuera del intervalo recomendable y por ende podrían presentar una baja permeabilidad a pH fisiológico.

Tabla 2. Propiedades moleculares de la primera serie de análogos de baclofeno **88a-g**.

Molécula	clogP	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	logD
	-1.51	3	3	213.66	-0.78
 <p>88a</p>	-2.384	3	5	246.27	-1.25
 <p>88b</p>	-1.21	3	5	296.33	-0.26
 <p>88c</p>	-0.496	3	5	322.36	0.40
 <p>88d</p>	-1.043	3	5	315.16	-0.04

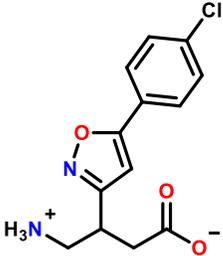
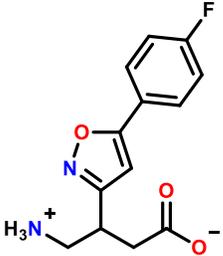
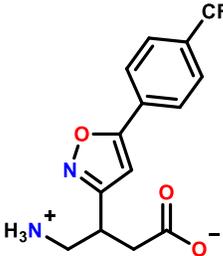
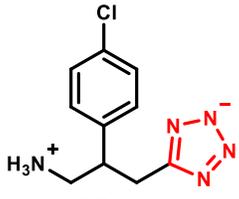
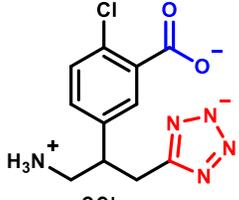
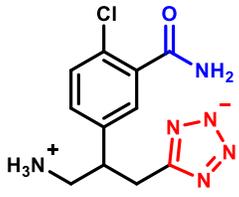
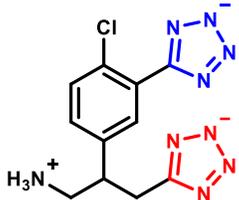
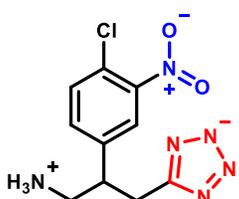
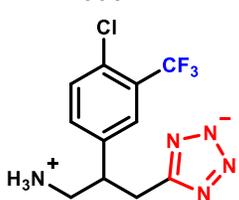
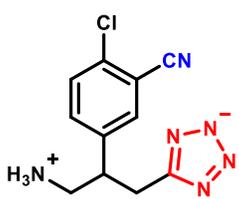
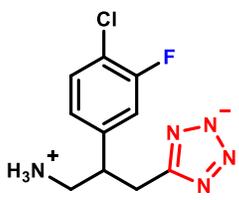
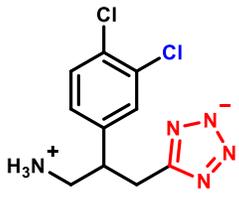
 88e	-1.64	3	5	280.71	-0.65
 88f	-2.21	3	5	264.26	-1.11
 88g	-1.446	3	5	314.26	-0.37

Tabla 3. Propiedades moleculares de la segunda serie de análogos de baclofeno **89a-k**

Molécula	clogP	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	logD
 89a	0.99	3	5	237.69	0.09
 89b	-3.26	3	7	280.69	-2.42

 <p>89c</p>	-1.15	5	7	280.72	-1.13
 <p>89d</p>	0.5	3	9	304.73	-1.03
 <p>89e</p>	0.58	3	8	282.69	0.05
 <p>89f</p>	1.67	3	5	305.69	0.97
 <p>89g</p>	0.29	3	6	262.70	-0.05
 <p>89h</p>	1.136	3	5	255.68	0.24
 <p>89i</p>	1.586	3	5	272.14	0.66

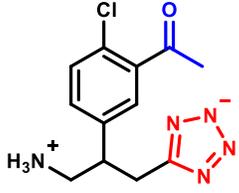
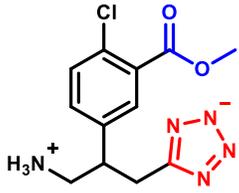
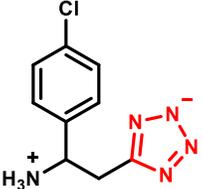
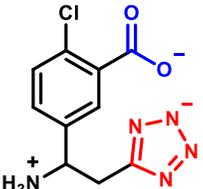
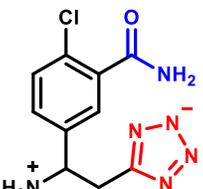
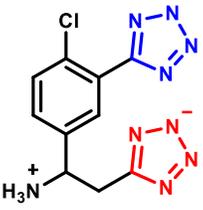
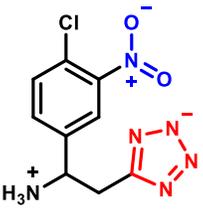
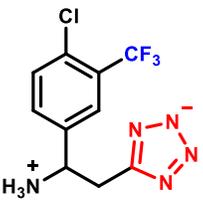
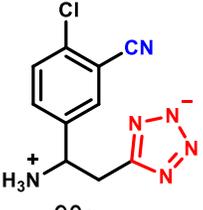
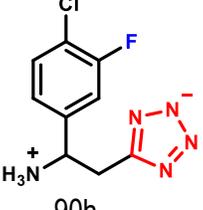
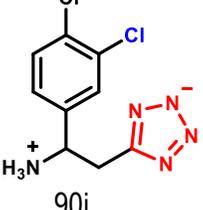
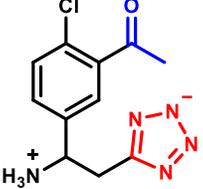
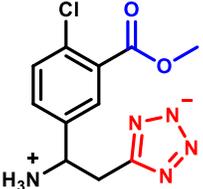
 89j	0.24	3	6	279.73	-0.43
 89k	0.52	3	7	295.73	0.15

Tabla 4. Propiedades moleculares de la tercera serie de análogos de baclofeno **90a-k**.

Molécula	clogP	Donadores de H	Aceptores de H	PM (g/mol)	LogD
 90a	0.78	3	5	223.67	0.08
 90b	-3.47	3	7	266.67	-2.53
 90c	-1.36	5	7	266.69	-1.12

 90d	0.29	3	9	290.70	-1.11
 90e	0.37	3	8	268.66	0.06
 90f	1.46	3	5	291.66	0.97
 90g	0.089	3	6	248.68	-0.06
 90h	0.92	3	5	241.66	0.24
 90i	1.37	3	5	258.11	0.65

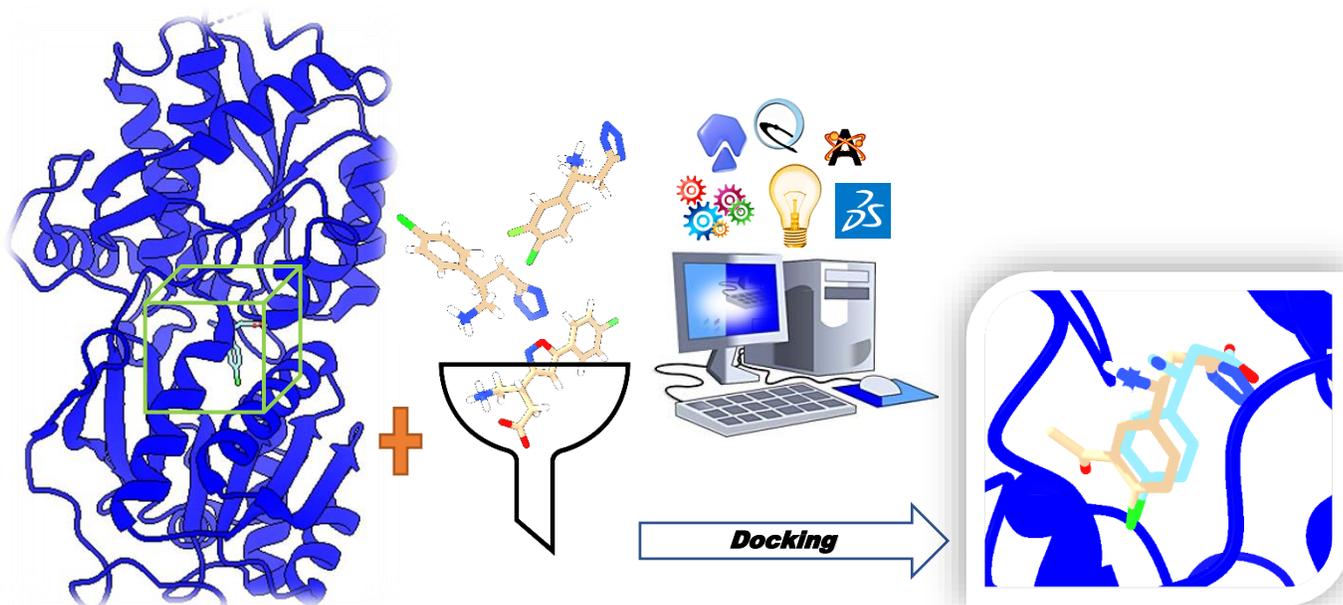
 90j	0.04	3	6	265.70	-0.44
 90k	0.31	3	7	281.70	0.15

8. Acoplamiento molecular (*Docking*)

Con base en información obtenida anteriormente sobre el análisis de las cavidades, se decidió únicamente llevar a cabo la validación estructural del resultado del acoplamiento molecular sobre los cristales donde se tiene unido a baclofeno (4MS4 y 7C7Q) tomando en consideración el tamaño, forma, volumen, superficie, profundidad e hidrofobicidad de cada cavidad (Figura 21).

La información correspondiente al acoplamiento molecular de la estructura cristalina del receptor GABA_B unido a baclofeno empleando el cristal con código PDB:4MS4 se encuentra en los Anexos.

Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron por triplicado en el software Autodock Vina y el visualizador UCSF Chimera (Esquema 2).



Esquema 2. Representación gráfica del acoplamiento molecular (*Docking*) y especificaciones sobre las coordenadas 3D utilizadas para llevar a cabo el *docking* (PDB:7C7Q, volumen de la caja: X=168, Y=173, Z= 224, tamaño: X=20, Y=20, Z=20).

8.1 Preparación de la proteína.

Para llevar a cabo el estudio *in silico* se utilizaron los datos cristalográficos de rayos X del heterodímero del receptor GABA_B de humano unido a baclofeno (PDB:4MS4 y 7C7Q de 1.9 y 3 Å de resolución, respectivamente). En el visualizador UCSF Chimera, se decidió eliminar el monómero o bien la subunidad GABA_{B2} (sitio de unión de ligandos alostéricos) ya que únicamente nos interesa el sitio de unión del ligando ortostérico (dominio L_{B1} y L_{B2} de la subunidad GABA_{B1}, sitio de unión de ligandos agonistas y antagonistas), además se removieron los ligandos de menor interés dentro de la proteína (moléculas de agua y restos de ligandos diferentes a baclofeno). Finalmente, se llevó a cabo la protonación de las proteínas y se agregó el método de cargas parciales AMBERff14SB.

8.2 Preparación de los ligandos.

Para llevar a cabo el acoplamiento se construyeron y optimizaron las moléculas (ligandos) en su forma zwitteriónica y en su configuración *R* y *S* utilizando el programa Avogadro, además se realizó un análisis conformacional dentro de la teoría de nivel de mecánica molecular empleando el campo de fuerza MMFF94 (Merck Molecular Force Field, por sus siglas en inglés), donde se obtuvieron los conformeros de mínima energía, finalmente, se agregaron los hidrógenos y las cargas parciales en el software Autodock Vina. El método de cargas que se empleó fue el Gasteiger.

Para los cálculos de acoplamiento donde se utilizaron todos los ligandos co-cristalizados (agonistas y antagonistas) únicamente se llevó a cabo la protonación de estos y se agregaron las cargas parciales utilizando el método anteriormente mencionado.

8.3 Parámetros del acoplamiento molecular.

Una vez lista la proteína y los ligandos, se llevaron a cabo los cálculos del acoplamiento molecular en el software Autodock Vina. El tipo de *docking* que se llevó a cabo fue el acoplamiento de ligando flexible (la proteína se mantiene rígida, y el ligando se trata como flexible) La función de puntaje (*scoring*) utilizada fue la empírica. Todos los ligandos se acoplaron en el sitio de unión de baclofeno ubicada en la subunidad GABA_{B1} entre los dominios L_{B1} y L_{B2}. Las especificaciones de las coordenadas 3D utilizadas para llevar a cabo el acoplamiento son las siguiente: PDB:4MS4; volumen de la caja: X= -22, Y= 20, Z= -30, tamaño: X= 20, Y= 20, Z=20 y PDB:7C7Q; volumen de la caja: X=168, Y=173, Z= 224, tamaño: X=20, Y=20, Z=20.

Finamente, para el análisis para predecir las interacciones moleculares que puedan darse entre la proteína y los ligandos del resultado del *docking* se utilizó el programa Discovery Studio.

8.4 Validación estructural

La validación del *docking* se llevó a cabo analizando la reproducción del mejor modo de unión de baclofeno en su respectivo cristal (PDB:4MS4 y 7C7Q), donde se seleccionó, aquel donde se reprodujera con mayor certeza la pose/conformación del ligando.

Lo primero que se hizo fue analizar el resultado del acoplamiento molecular (*docking*) con la proteína 4MS4 con su ligando co-cristalizado (baclofeno, Figura 37).

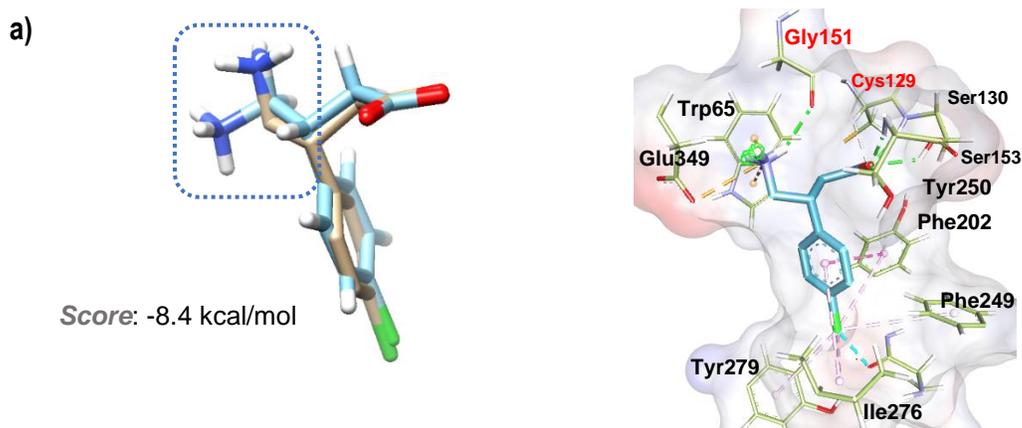


Figura 37. a) Representación de la conformación del ligando activo (resultado del *docking*, color gris) con respecto al ligando de origen (color azul) b) Interacciones que comparte el conformero del resultado del *docking*.

Se observó que, al realizar el *docking* con el ligando co-cristalizado de 4MS4, éste no logró reproducir la conformación del ligando de origen, como se puede observar el grupo amino del resultado experimental se encuentra hacia abajo. Además, nos dimos cuenta de que hay interacciones que no comparten en el programa Discovery Studio con ProteinsPlus, como fue la interacción de grupo amino

con histidina y la interacción del grupo ácido carboxílico con tirosina. Sin embargo, se observan interacciones adicionales en Discovery Studio como, por ejemplo; con el grupo amino se observa una interacción con Gly151 y con el grupo ácido carboxílico se observa una interacción con Cys129, además de un incremento de interacciones aromáticas con residuos de Phe202, Phe249 y Ile276.

Posteriormente se llevó a cabo el acoplamiento molecular utilizando el ligando co-cristalizado pero ahora utilizando el cristal 7C7Q, y se obtuvo la siguiente información (Figura 38).

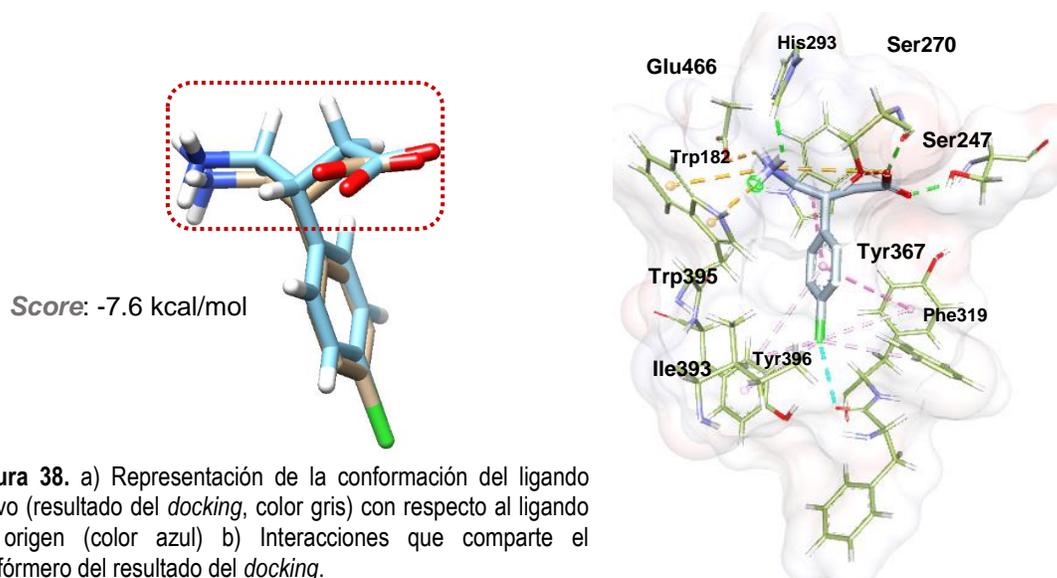
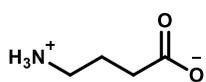


Figura 38. a) Representación de la conformación del ligando activo (resultado del *docking*, color gris) con respecto al ligando de origen (color azul) b) Interacciones que comparte el conformero del resultado del *docking*.

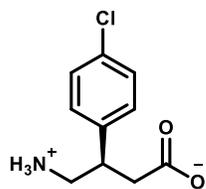
En este ensayo, se observó que del resultado de *docking*, donde se empleó el ligando activo (baclofeno, Figura 38) del cristal 7C7Q, éste logró reproducir casi en su totalidad la conformación del ligando de origen, donde se observa que no hay mucha diferencia entre la conformación de la estructura activa con respecto a la conformación adquirida del resultado del *docking*, ya que ambas conformaciones guardan cierta linealidad, manteniendo los grupos clave (amino y ácido carboxílico) del mismo modo. Razón por lo cual, se decidió realizar experimentos adicionales sobre este cristal (7C7Q) donde se reproduce con mayor certeza la conformación del ligando experimental con respecto al ligando co-cristalizado.

Posterior a esto, comenzamos el acoplamiento molecular. Primero decidimos realizar el acoplamiento molecular de los agonistas y antagonistas co-cristalizados y tres agonistas reportados en la literatura que se sabe activan al receptor GABA_B en el Esquema 3 se pueden observar el cálculo de ClogP de cada molécula agonista y antagonista y, los valores de energía (*score*) que se obtuvieron del resultado del *docking* para las moléculas al utilizar la proteína 7C7Q.

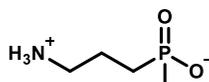
a) Agonistas



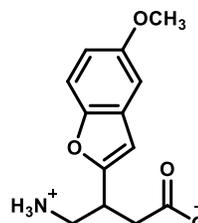
GABA
ClogP= -3.66
score = -4.5



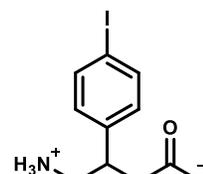
(R)-baclofeno
ClogP=-1.51
score= -7.6



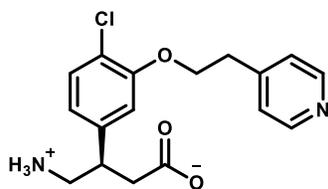
SKF97541
ClogP= -1.33
score= -4.5



35b
ClogP= -1.75
score= -7.8

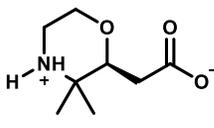


44b
ClogP= -1.10
score= -7.0

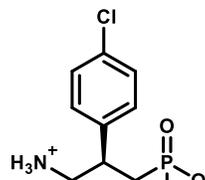


38g
ClogP= -1.08
score= -7.9

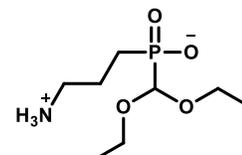
b) Antagonistas



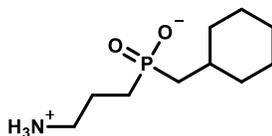
SCH50911
ClogP= -3.03
score= -6.4



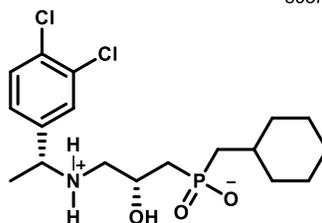
(R)-Faclofeno
ClogP= 0.4276
score= -7.7



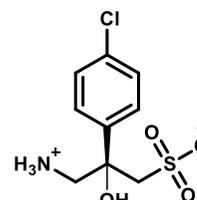
CGP35348
ClogP= -0.58
score= -5.5



CGP46381
ClogP= 1.31
score= -6.1



CGP4626
ClogP= 4.32
score= -5.9



2-hidroxisaclofeno
ClogP= -3.76
score= -8.0

Esquema 3. Resultados obtenidos de ClogP y energía de interacción (kcal/mol) para los agonistas y antagonistas.

Del resultado del acoplamiento molecular, se decidió colocar todas las moléculas agonistas en la cavidad del receptor y luego de esto se decidió realizar el mismo procedimiento, pero ahora utilizando los antagonistas co-cristalizados y se obtuvo la siguiente información (Figura 39).

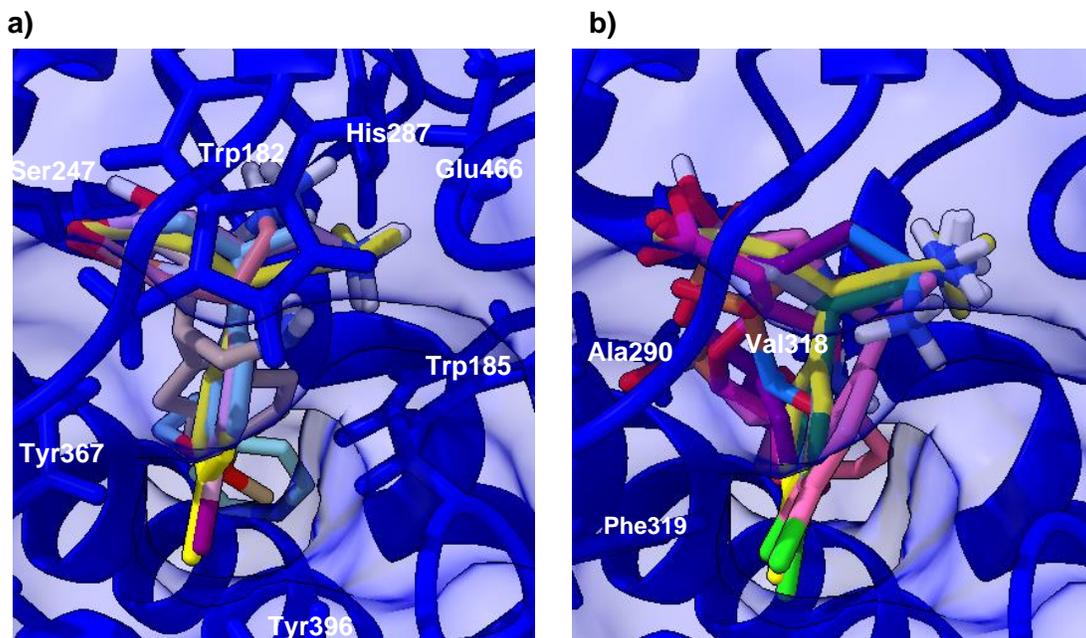


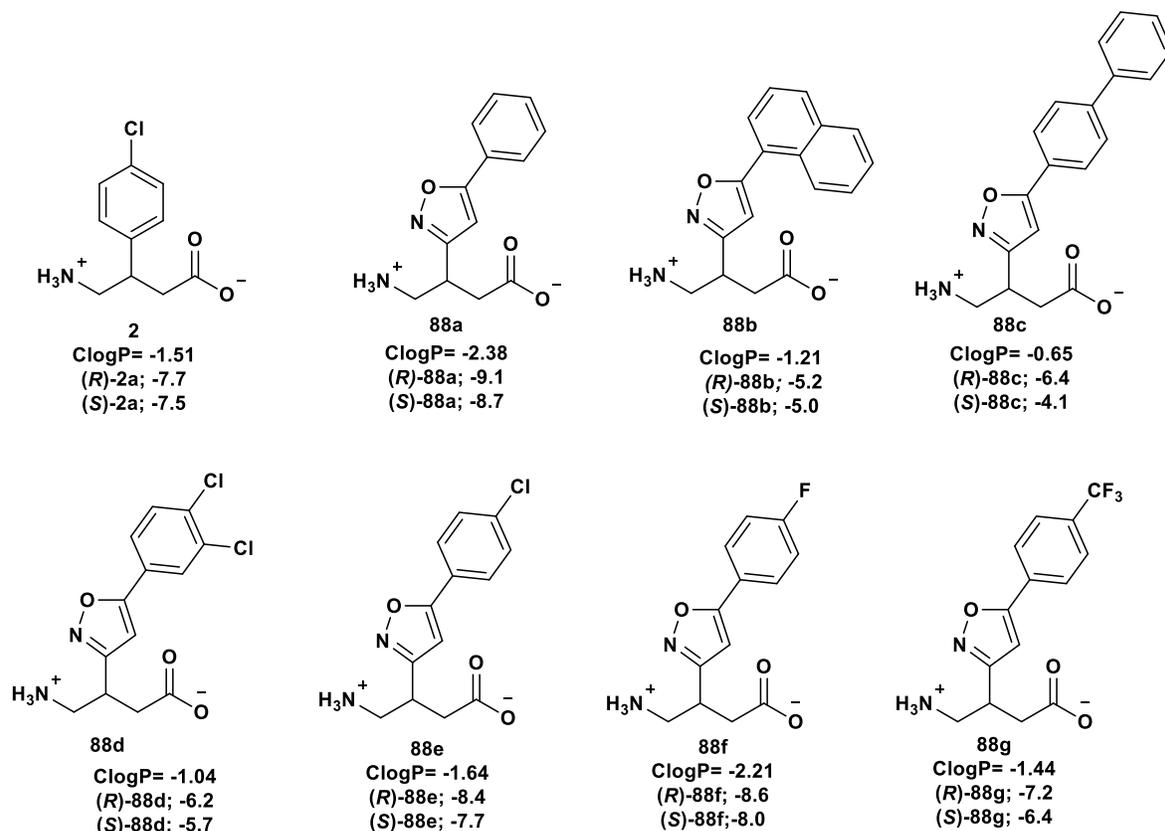
Figura 39. a) alineación de los agonistas y b) alineación de los antagonistas con respecto a (*R*)-baclofeno (stick color amarillo).

Como se observa, los agonistas Figura 39a, mantienen cierto alineamiento con respecto a (*R*)-baclofeno, y están fuertemente influenciados en la cavidad por aminoácidos aromáticos, aminoácidos polares (Trp182, Trp395, Tyr367, Tyr396, Ser247 y Ser270) y aminoácidos cargados (His287 y Glu466). Por otro lado, los antagonistas Figura 39b, están inclinados hacia la región más hidrofóbica de la cavidad, donde interactúan adicionalmente con aminoácidos de Ala290, Val318, Phe319 y Cys246. Una vez analizada la orientación y las interacciones de cada ligando con el receptor de los agonistas y antagonistas dentro de la cavidad (Anexos, Tabla 5 y 6), se realizó el acoplamiento molecular para la primera serie de moléculas (*R* y *S*)-**88a-g**.

8.5 Resultados obtenidos de la primera serie de análogos de baclofeno con estructura de isoxazol sobre el cristal 7C7Q.

Para la primera serie, se mantuvieron ciertas características que conservan la mayoría de las moléculas reportadas en la literatura y que además algunos de ellos muestran actividad sobre el receptor (conservan el ácido carboxílico y el grupo amino como en **1** e incluyen un sustituyente aromático en posición β para mejorar la lipofilia como en **2**). Por lo tanto, se propuso la sustitución isostérica del *p*-clorofenilo por un anillo de isoxazol *R* sustituido. Se propuso el anillo de isoxazol ya que al tener dos heteroátomos electronegativos podría favorecer las interacciones intermoleculares con el receptor, además se propusieron sustituyentes hidrofóbicos en *R*, para interactuar con los aminoácidos hidrofóbicos de la cavidad y así también podrían favorecer la lipofilia de las moléculas, lo cual es importante para que los compuestos sean permeables a la membrana. En el Esquema 4 se

pueden observar el cálculo de ClogP de cada molécula y los valores (*score*) que se obtuvieron del resultado del *docking* para las moléculas **88a-g** de configuración *R* y *S* al utilizar la proteína 7C7Q.



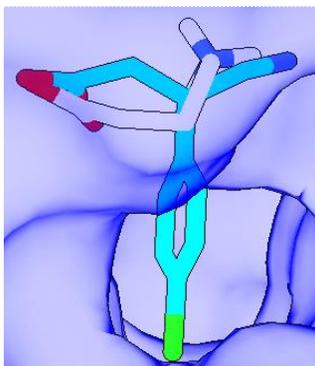
Esquema 4. Resultados obtenidos de ClogP y energía de interacción (kcal/mol) para la primera serie de análogos de baclofeno (*R* y *S*-**88a-g**).

Las moléculas **88a**, **88e** y **88f** mostraron mejor farmacodinámica (*score*) con respecto a los ligandos agonistas de referencia (GABA, skf97541 y (*R*)-baclofeno y (*S*)-baclofeno). Sin embargo, en cuanto a su lipofilia únicamente las moléculas **88b**, **88c**, **88d** y **88g** mejoraron con respecto a baclofeno (ClogP=-1.51) pero no cuanto su farmacodinámica. Cabe mencionar que el enantiómero (*S*)-baclofeno tiene una disminución en su energía de interacción con respecto al enantiómero *R* (-7.5, -7.7, respectivamente), y adicionalmente el enantiómero (*S*)-baclofeno interacciona con el aminoácido de Cys246 (interacción que predomina con ligandos antagonistas del resultado del *docking*) (ver Anexos, Tabla 6). La disminución en la energía se observa también para todos los enantiómeros (*S*)-**88a-g**, siendo los de mejor energía los enantiómeros de configuración *R*. En la Figura 40 se observan las conformaciones en 3D (primera columna) y en 2D las interacciones (segunda columna) que tienen las moléculas de referencia GABA (blanco), skf97541 (blanco), baclofeno, y la primera serie de moléculas (*R* y *S*)-**88a-g** sobre el cristal de la proteína 7C7Q, el enantiómero *R* se encuentra representado en

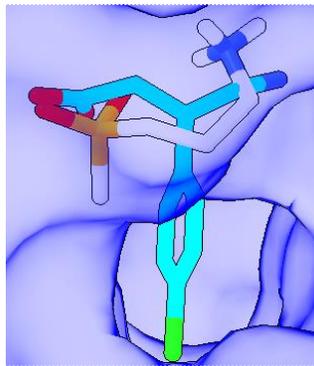
color crema y el enantiómero S en color gris, como confórmero de referencia permanece el (R)-baclofeno activo del cristal (color cian).

Ligandos agonistas de referencia

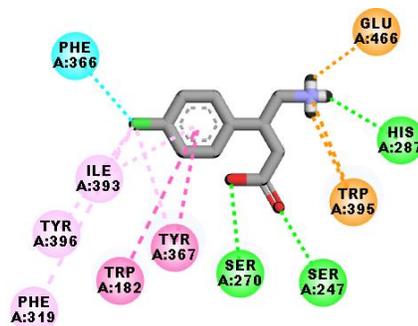
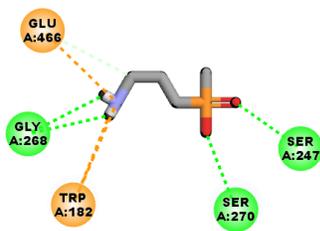
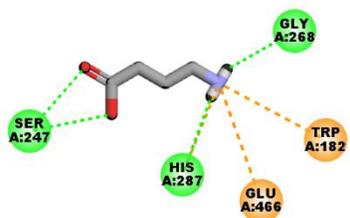
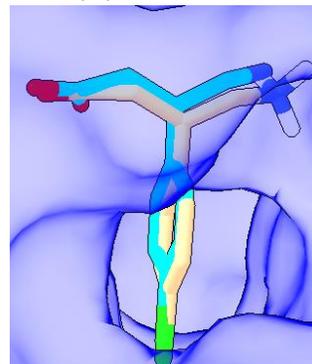
GABA



skf97541

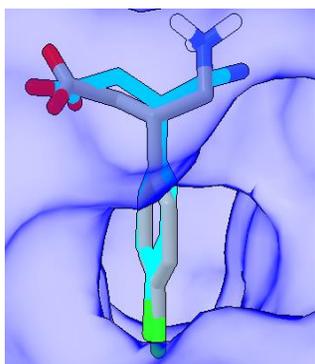


(R)-baclofeno

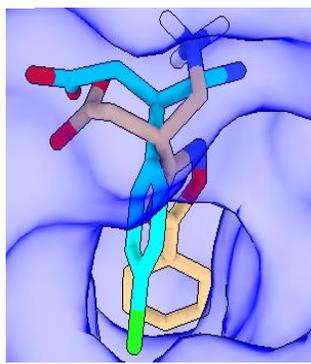


Primera serie:

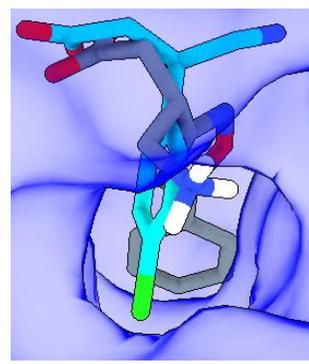
(S)-baclofeno

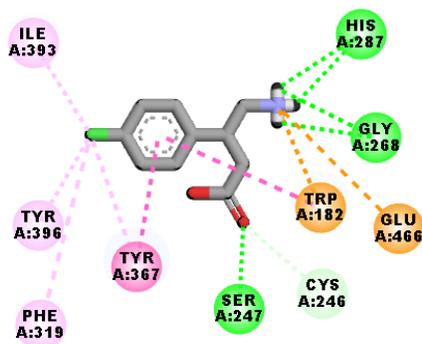


(R)-88a

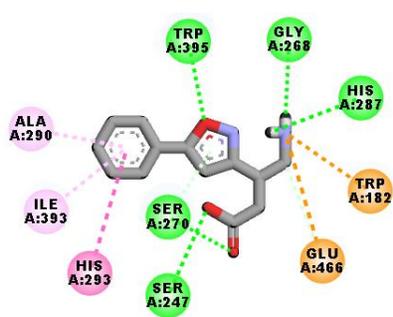
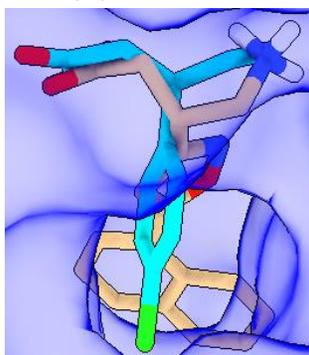


(S)-88a

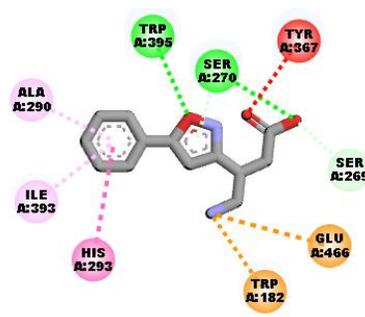
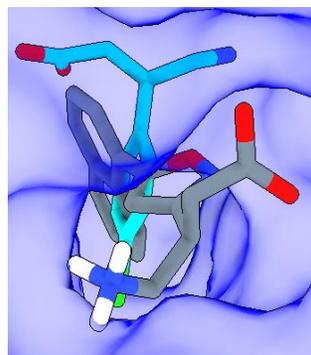




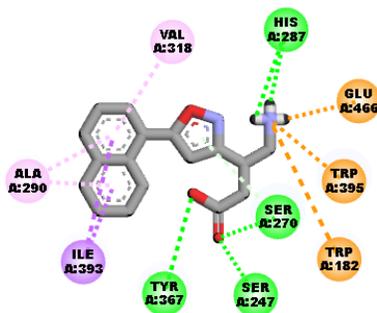
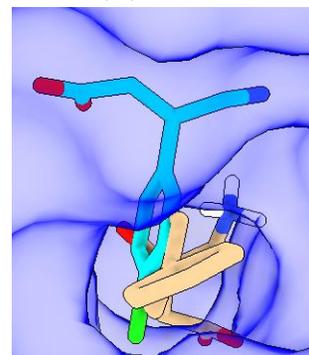
(R)-88b



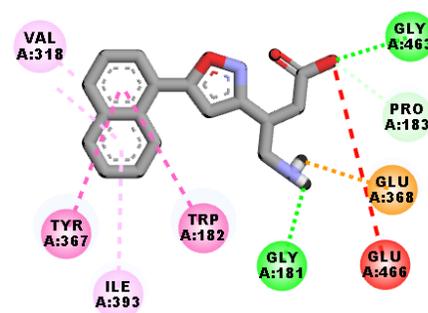
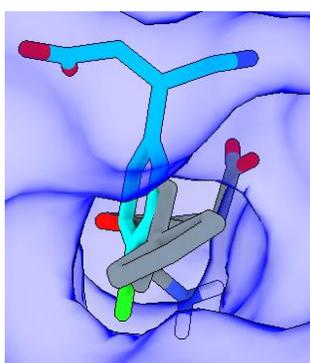
(S)-88b



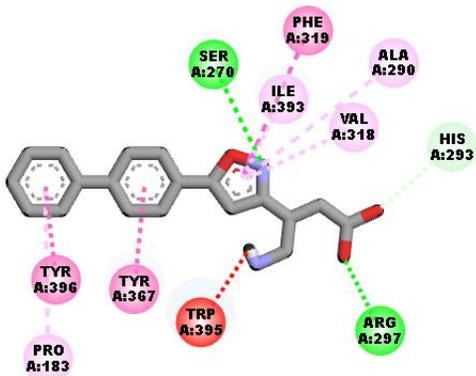
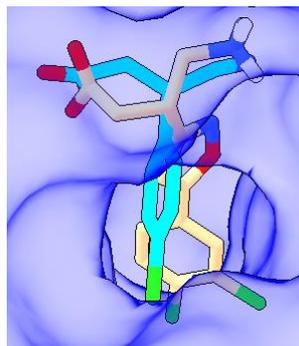
(R)-88c



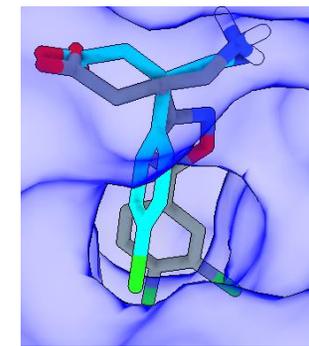
(S)-88c

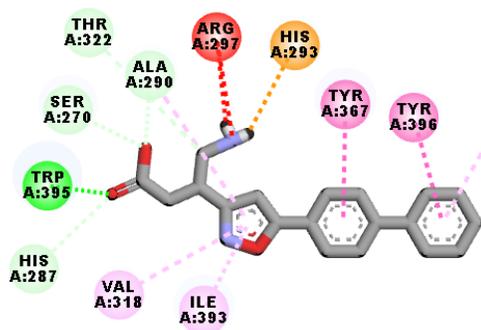


(R)-88d

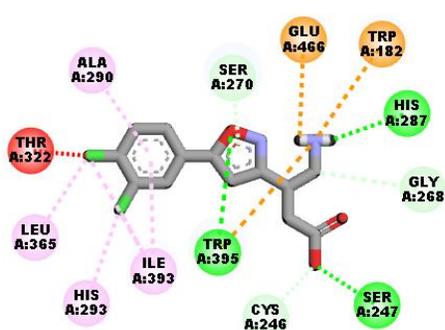
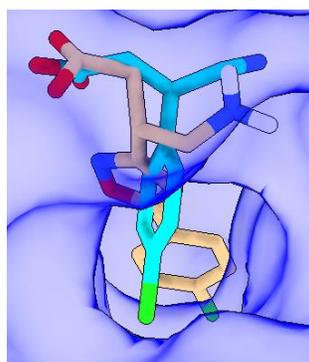


(S)-88d

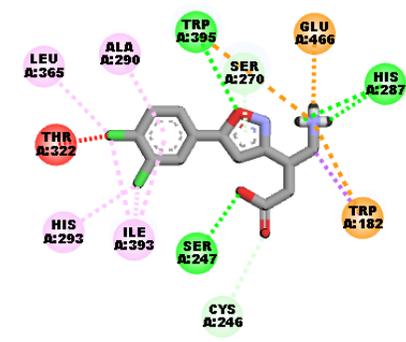
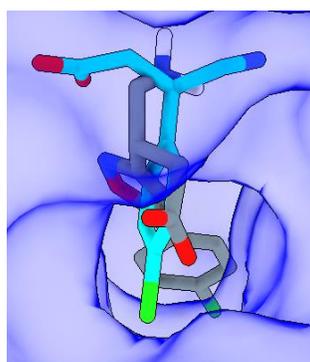




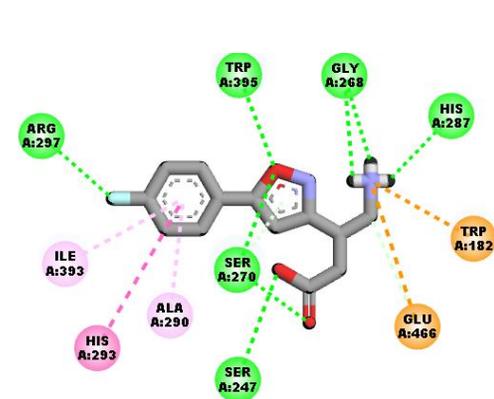
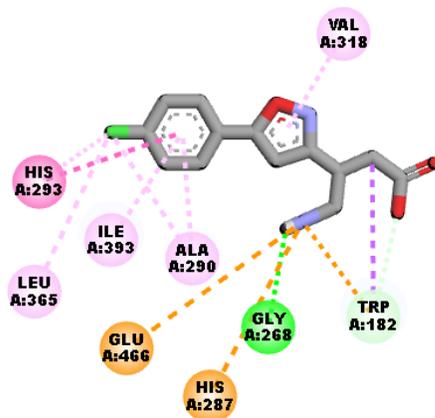
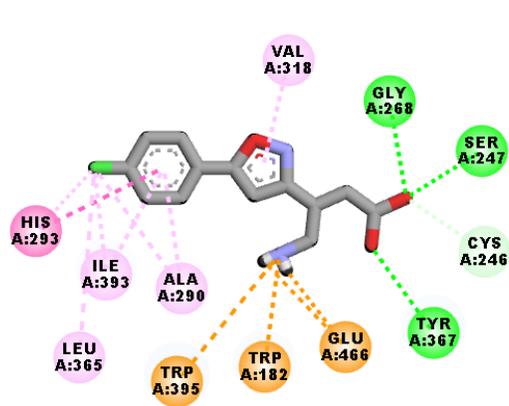
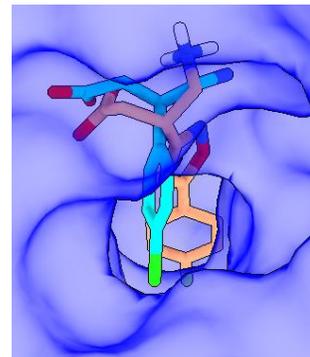
(*R*)-88e



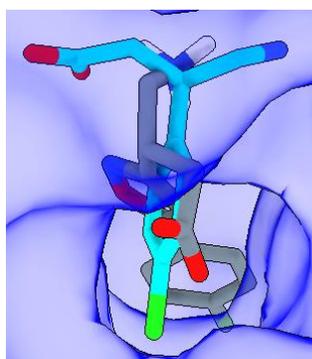
(*S*)-88e



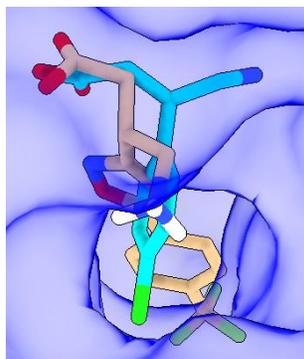
(*R*)-88e



(S)-88f



(R)-88g



(S)-88g

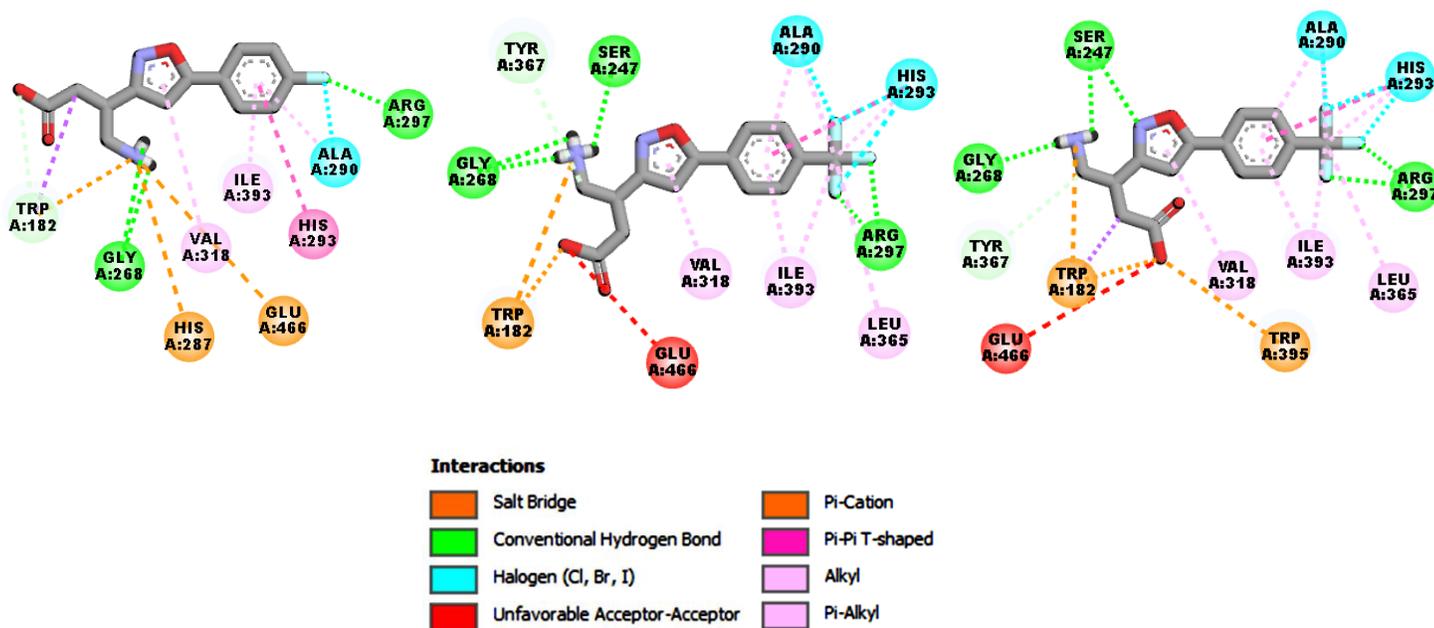
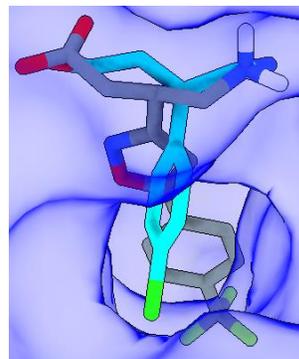


Figura 40. Columna uno (superposición de las moléculas (*R* y *S*)-88a-g con respecto a (*R*)-baclofeno sobre el cristal 7C7Q) el enantiómero *R* se encuentra representado en color crema y el enantiómero *S* en color gris, como conformero de referencia permanece el (*R*)- baclofen.

En la Figura 40 se muestran las conformaciones que adoptaron GABA, skf97541, (*R* y *S*)-baclofeno y los ligandos de la primera serie (*R* y *S*)-88a-g. Cabe mencionar, que en todos los casos se muestra únicamente la conformación de menor energía, siendo estas la mejor conformación con respecto a *R*-baclofeno (enantiómero con la actividad biológica deseada). Como podemos observar, ninguna conformación de las moléculas (*R* y *S*)-88a-g tiene similitud total con la conformación de baclofeno activo, además en cada enantiómero (*R* y *S*) se observó un incremento con los aminoácidos de interacción en su mayoría con residuos de Val318, His293, Ala290, Cys246, Pro183 y Arg297 los cuales en su mayoría interaccionan con los sustituyentes aromáticos en *R* y los heteroátomos del anillo de isoxazol.

Posteriormente, se decidió que todos los resultados del acoplamiento molecular de configuración *R* de esta primera serie de compuestos **88a-g** se alinearan el sitio de unión del receptor (Figura 41a).

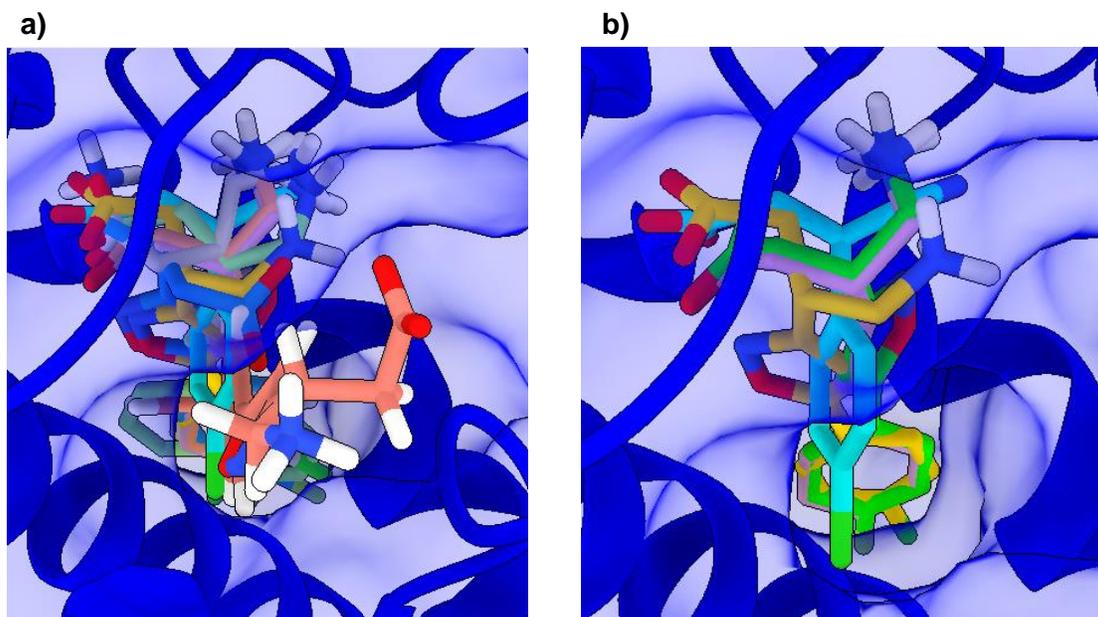


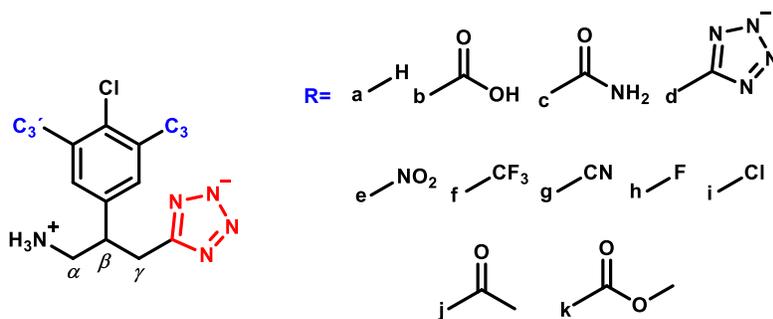
Figura 41. a) Conformaciones de (*R*)-**a-g** con respecto a (*R*)-baclofeno (stick cian; -7.4 kcal/mol), b) conformaciones de las moléculas con mejor energía de interacción (*R*)-**88a** (stick morado; -8.4 kcal/mol), (*R*)-**88e** (stick verde; -8.6 kcal/mol) y (*R*)-**88f** (stick color amarillo).

Como se puede observar en la Figura 41a, las moléculas de la primera serie (*R*)-**88a-g** no tienen alineamiento estructural total con respecto a *R*-baclofeno (stick color cian), ni siquiera con aquellas con las que presento mejores energías de interacción (*R*)-**88a**, (*R*)-**88e** y (*R*)-**88f** (Figura 41b). Además, se observó que las moléculas están inclinadas hacia la región más hidrofóbica de la cavidad, como la de los antagonistas (Figura 39b), por lo cual podría presentar un efecto antagonista en lugar de un efecto agonista; esto se corroboró con el análisis de las interacciones (Anexo, Tabla 6). Las moléculas de la primera serie interactúan con al menos uno de los aminoácidos con los que interactúan específicamente con los antagonistas co-cristalizados (Val318, Cys246, Ala290, His293) (Tabla 7).

8.6 Resultados obtenidos de la segunda serie de análogos de baclofeno con estructura de (*R* y *S*)-**89a-k** sobre el cristal 7C7Q.

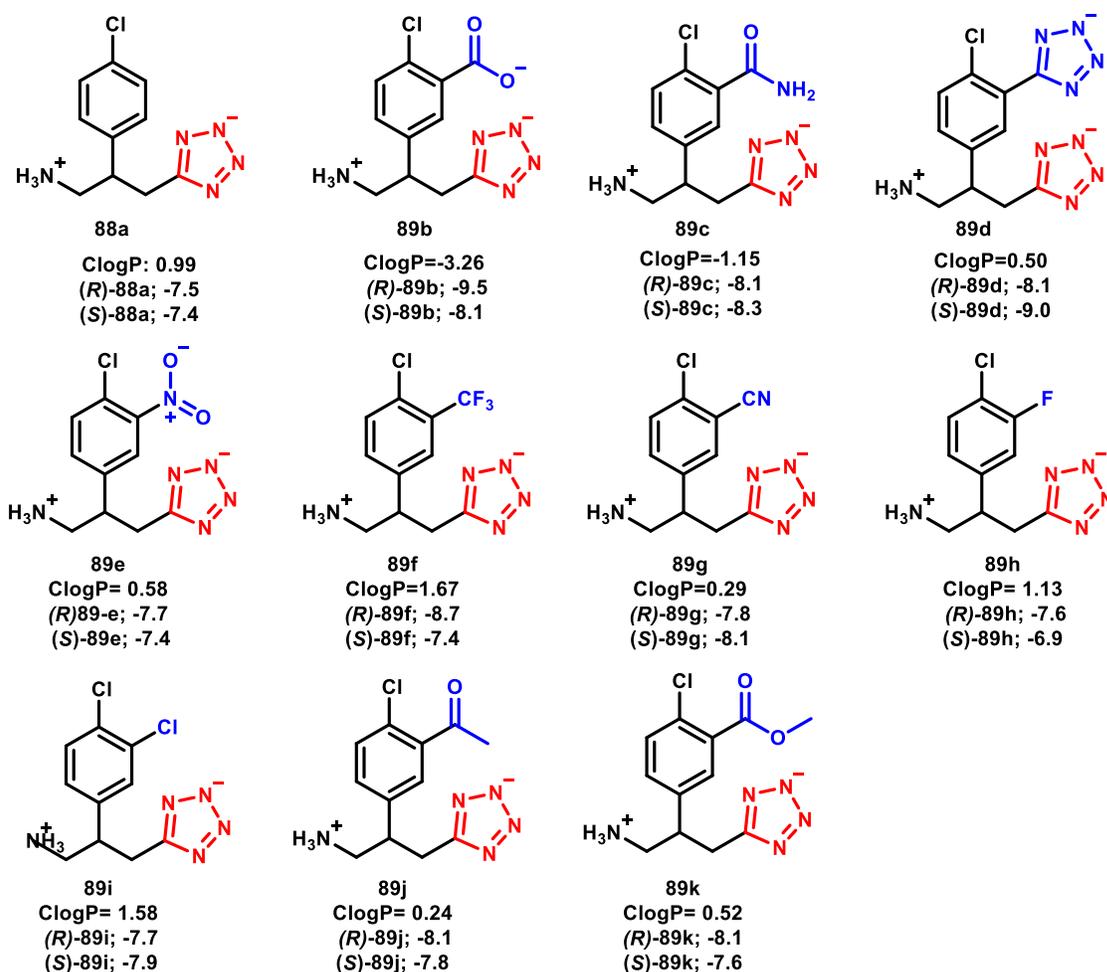
Con base a los resultados obtenidos en la primera serie de moléculas, y considerando que existen análogos de **1** y **2** donde el ácido carboxílico ha sido reemplazado por isómeros de ácido sulfónico, fosfónico y fosfínico (Figura 11), se propuso una segunda serie de moléculas. Donde se planteó el reemplazo isostérico del ácido carboxílico por el de tetrazol, con el objetivo de evaluar si

aumenta la lipófila y la farmacodinámica de las moléculas, además se decidió mantener el grupo *p*-clorofenilo en posición β como en **2**, e incorporar sustituyentes en la posición tres del anillo aromático esto de acuerdo con un estudio previo dentro del grupo de investigación donde se observó que es la región donde se extiende la cavidad del blanco biológico (Figura 23).



Asimismo, se decidió incorporar grupos electroattractores en la posición tres del carbono del grupo *p*-cloro fenilo ya que podría favorecer la deslocalización del orbital LUMO sobre el anillo aromático, lo cual podría disminuir la energía de interacción con Trp278 (interacción π -catión que reduce la potencia con el receptor), esto con base a la predicción del modelo QSAR que se analizó previamente.⁵⁶

En el Esquema 5 se pueden observar los valores de ClogP y (*score*) que se obtuvieron del resultado del *docking* para las moléculas **89a-g** de configuración *R* y *S* al utilizar la proteína 7C7Q.



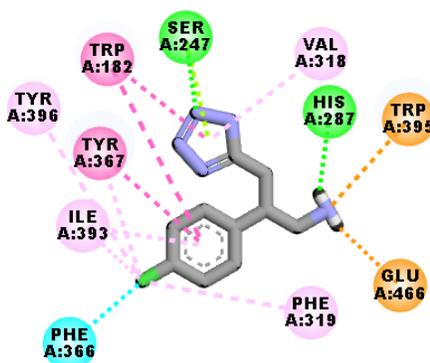
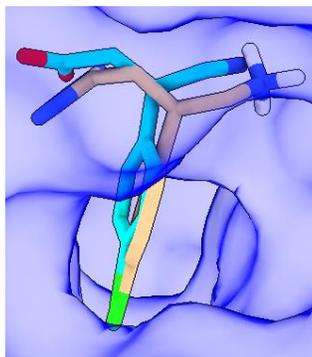
Esquema 5. Resultados obtenidos de energía de interacción (kcal/mol) de la segunda serie de análogos de baclofeno (*R* y *S*-**89a-k**).

De este análisis, se puede observar que el anillo de tetrazol si ayudo a mejorar la lipofilicidad de las moléculas **88a-k** con respecto a baclofeno (ClogP=-1.518), a excepción de la molécula **89b** (ClogP= -3.26). En cuanto la energía de interacción, en su totalidad todas ellas fueron mejores con respecto a la de (*R*)-baclofeno (-7.6 kcal/mol), y se observó nuevamente una menor energía de interacción para los enantiómeros de configuración *S*.

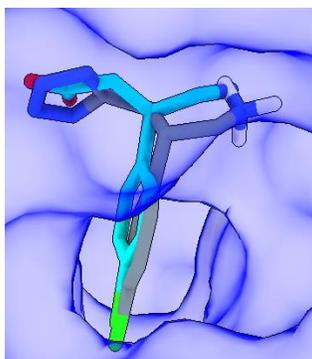
Posteriormente, se evaluó por separado cada molécula. En la columna uno se observan las conformaciones en 3D y en la segunda columna se observa en 2D las interacciones que tiene cada molécula en el sitio de unión, en color crema se representa el enantiómero de configuración *R* y el enantiómero *S* en color gris, como conformero de referencia permanece el (*R*)- baclofeno activo del cristal (color cian) (Figura 42).

Segunda serie

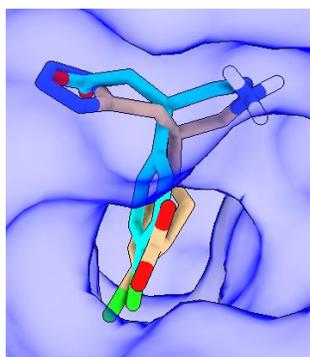
(R)-89a



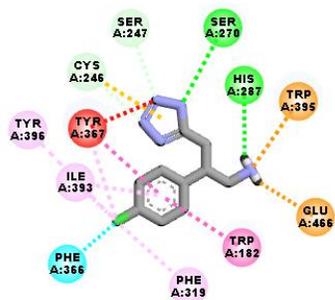
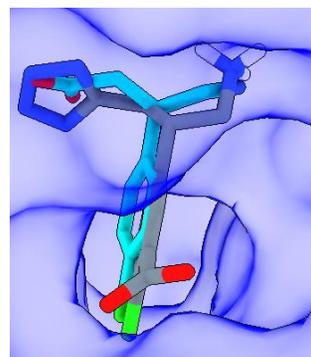
(S)-89a



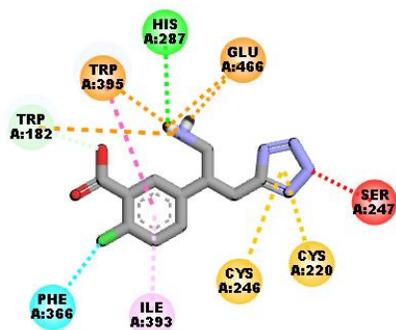
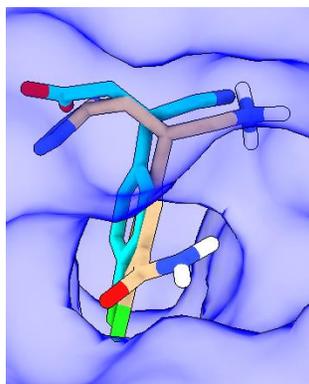
(R)-89b



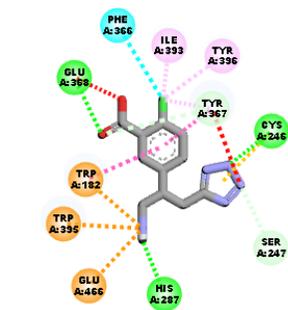
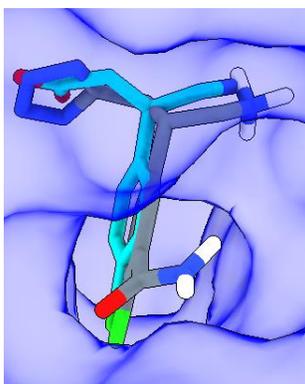
(S)-89b



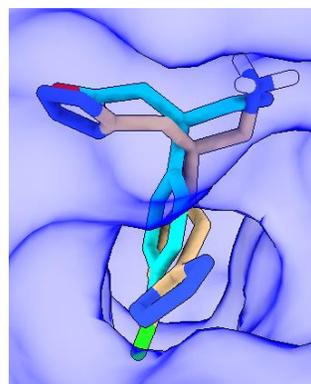
(R)-89c

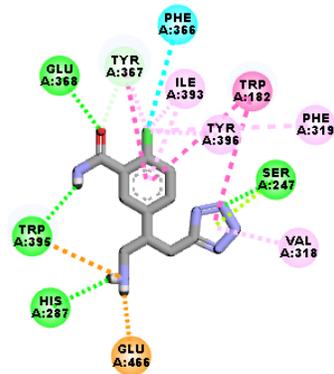


(S)-89c

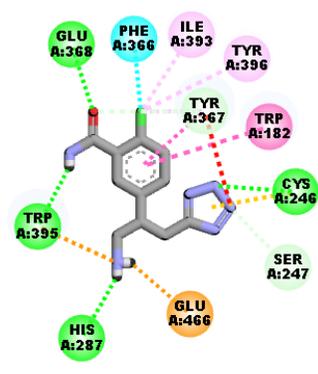
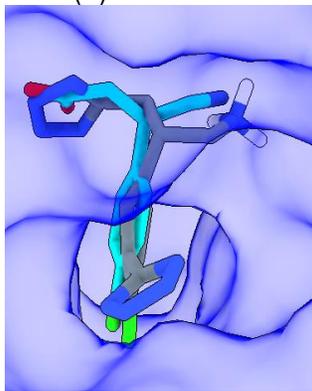


(R)-89d

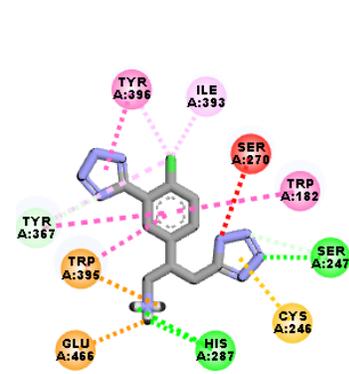
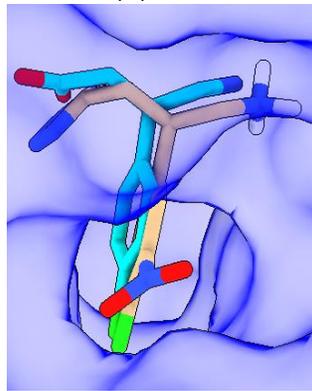




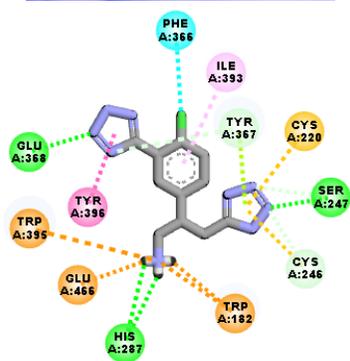
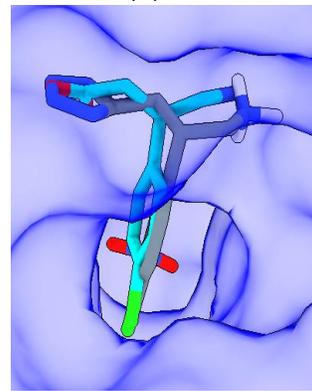
(S)-89d



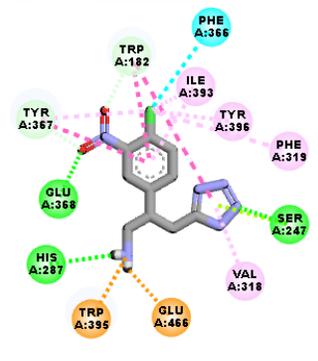
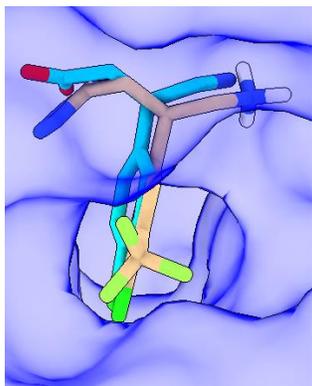
(R)-89e



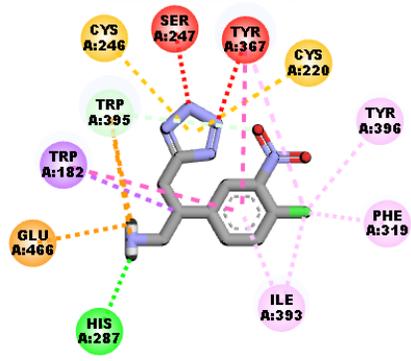
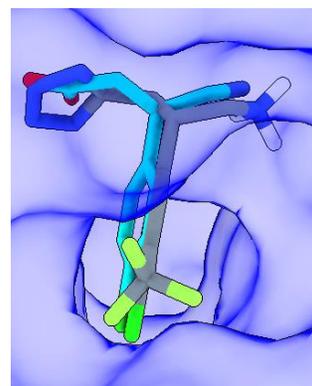
(S)-89e



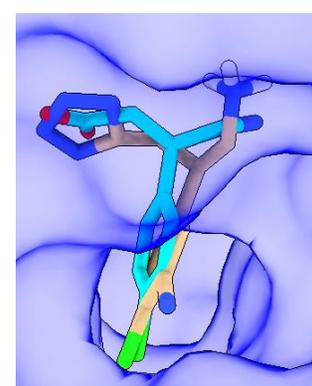
(R)-89f

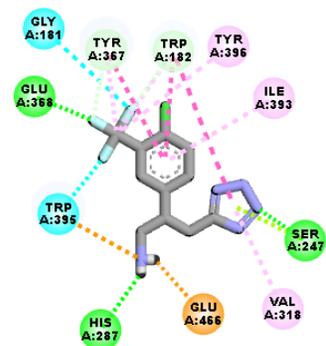


(S)-89f

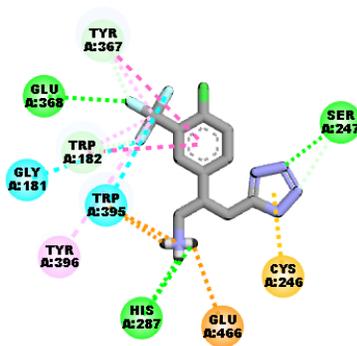


(R)-89g

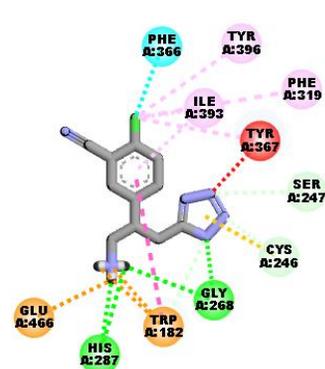




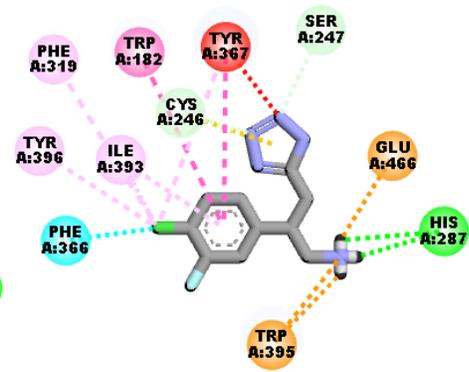
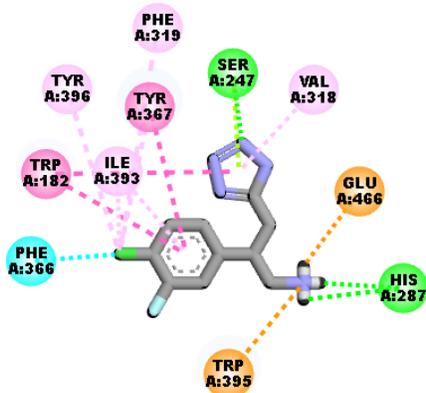
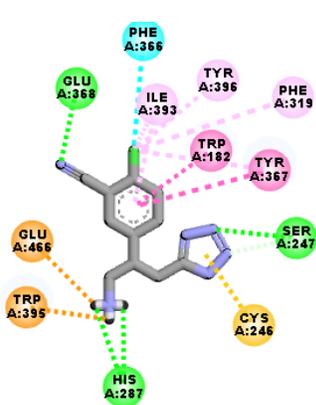
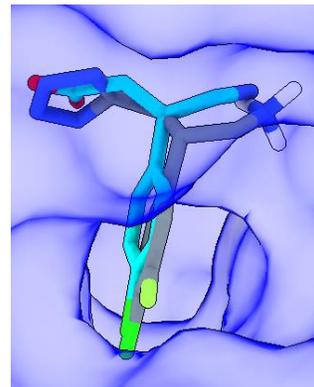
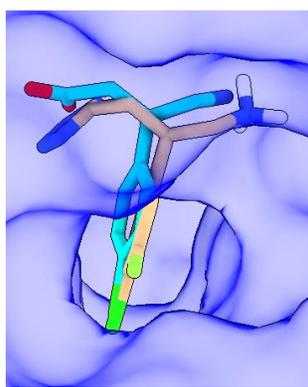
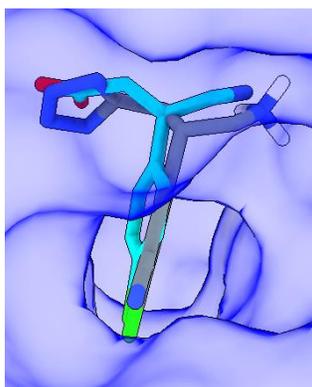
(S)-89g



(R)-89h



(S)-89h



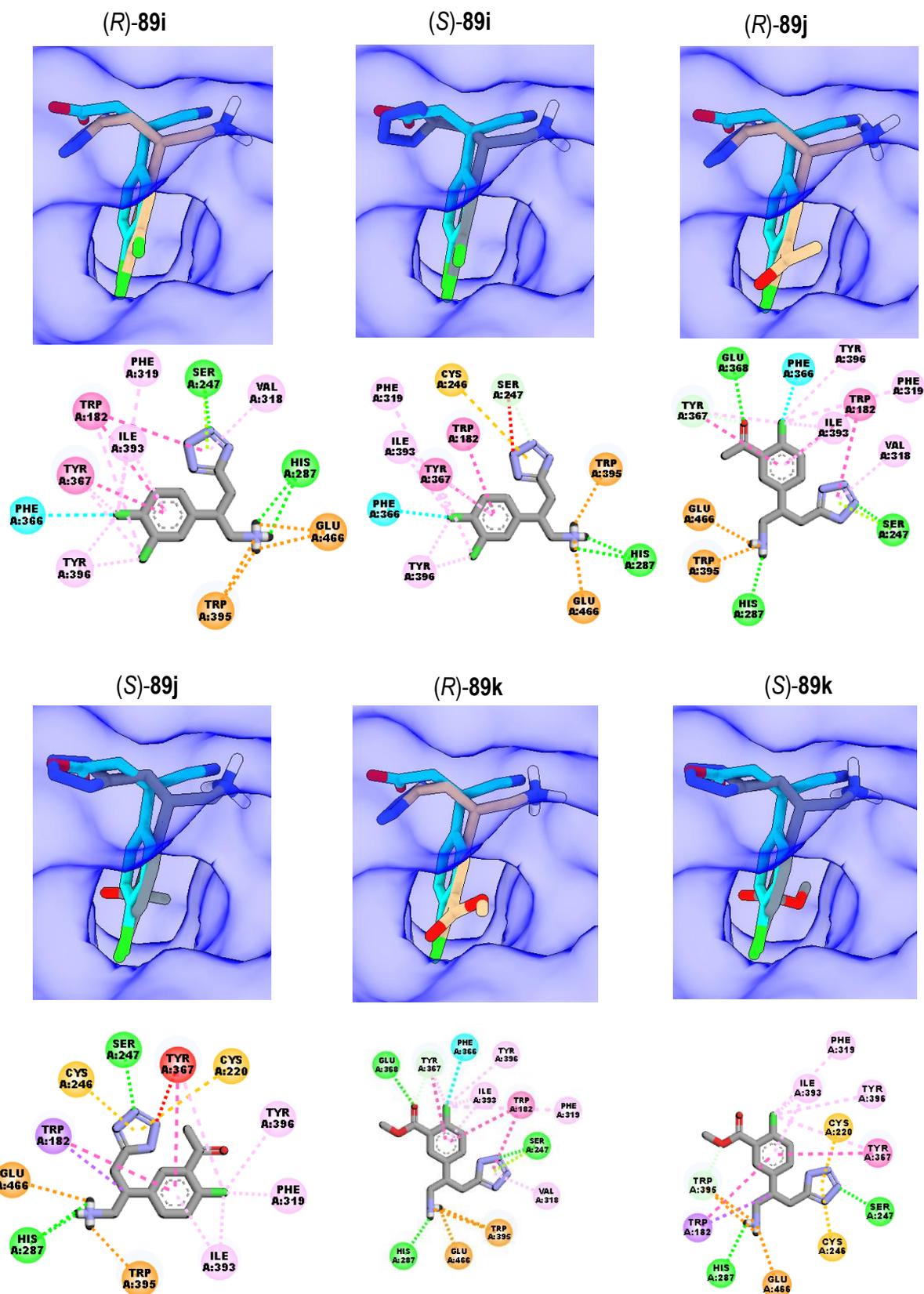
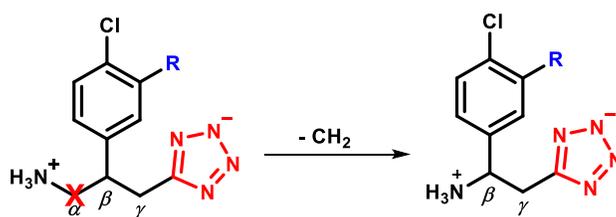


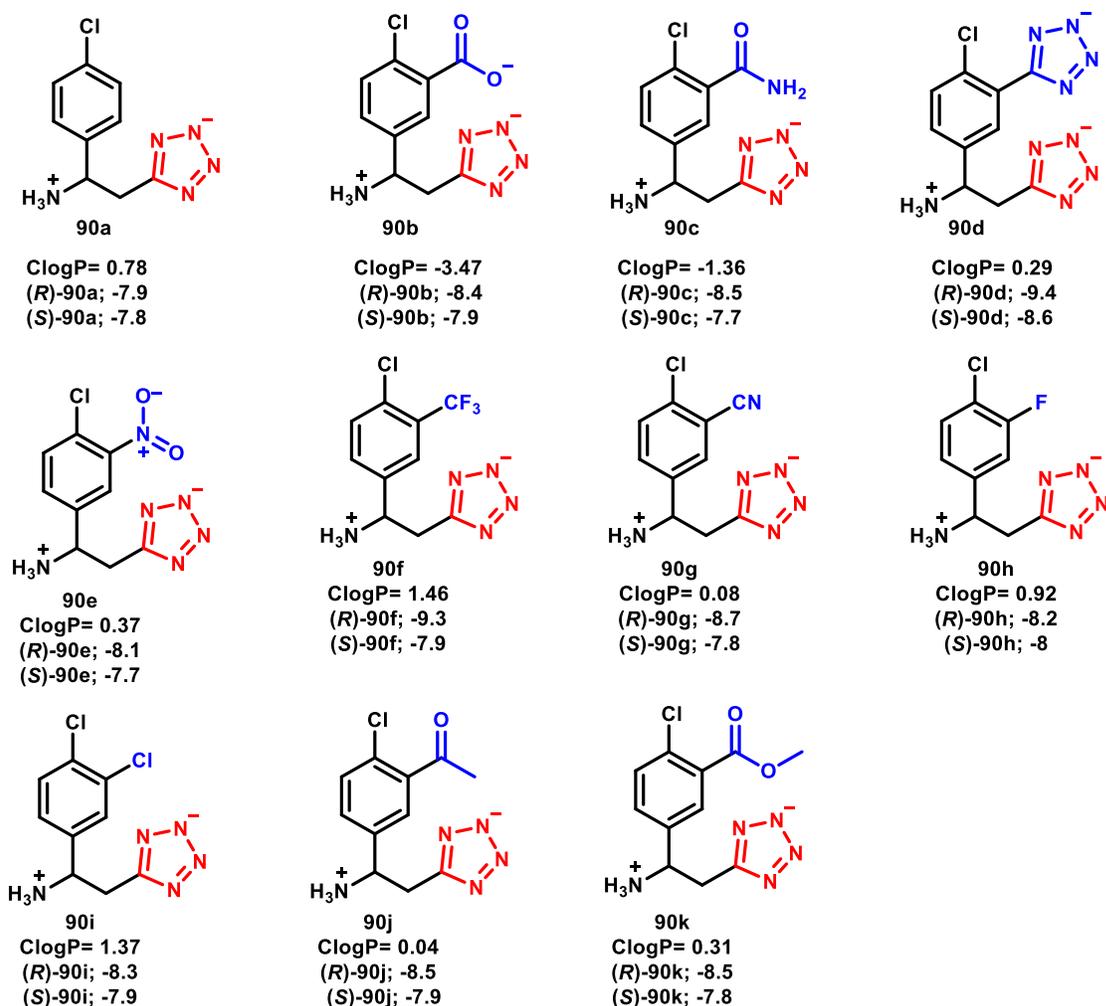
Figura 42. a) Columna uno; superposición de las moléculas (R y S)-89a-k con respecto a (R)-baclofeno sobre el cristal 7C7Q. b) Columna dos; tipo de interacciones que presenta cada molécula.

De este análisis, se observó que los anillos de tetrazol no se alinean con respecto al ácido carboxílico de *R-2*, esto podría deberse al tamaño del anillo de tetrazol, que hace que la molécula se observe más desfasada, ya que hubo un incremento en el volumen molecular. Además, se encontró que los anillos de tetrazol interactúan con los aminoácidos de Cys246, Val318 compartidos por los antagonistas (Anexos, Tabla 8).

8.7 Resultados obtenidos de la tercera serie de análogos de baclofeno con estructura de (*R* y *S*)-**90a-k** sobre el cristal 7C7Q.

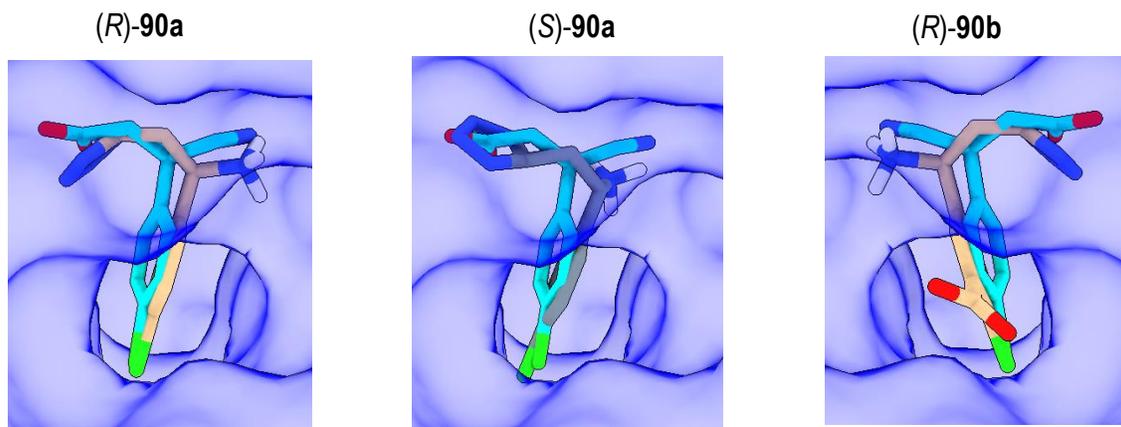
De acuerdo con los resultados obtenidos de la segunda serie de moléculas, se propuso eliminar el grupo metileno de la cadena alifática (en posición γ), en el Esquema 6 se observan los valores (*score*) que se obtuvieron del resultado del *docking* para las moléculas **90a-g** de configuración *R* y *S* al utilizar la proteína 7C7Q.

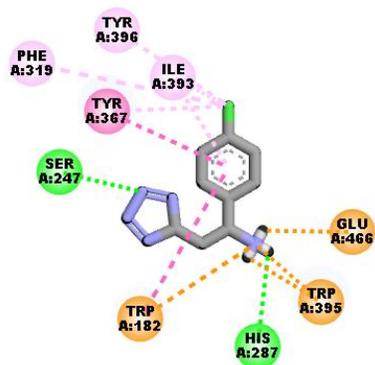




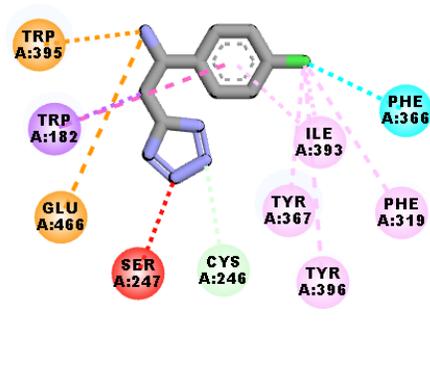
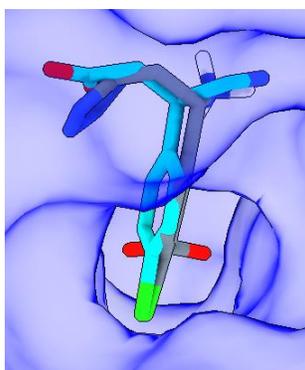
Esquema 6. Resultados obtenidos de ClogP y energía de interacción (kcal/mol) de la tercera serie de análogos de baclofeno (*R* y *S*-90a-k).

En la Figura 39, columna uno se observa el enantiómero *R* (color crema) y el enantiómero *S* (color gris), como confórmero de referencia permanece el baclofeno activo del cristal (color cian), en la columna dos se observa las interacciones de cada molécula en el sitio de unión.

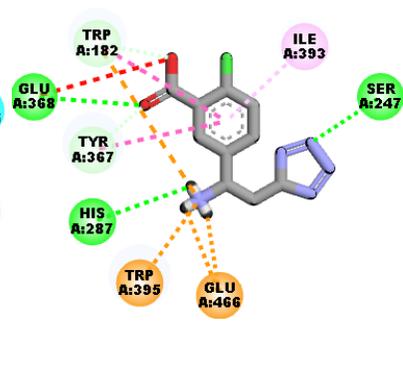
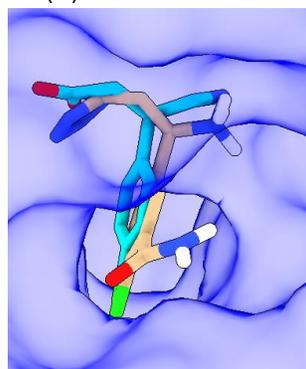




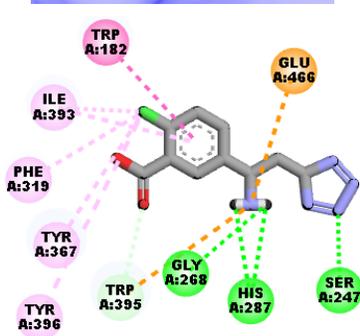
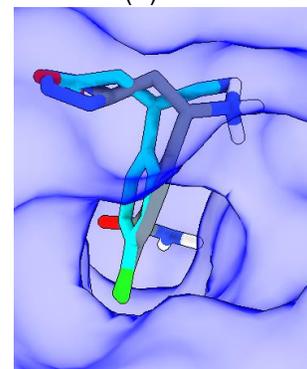
(S)-90b



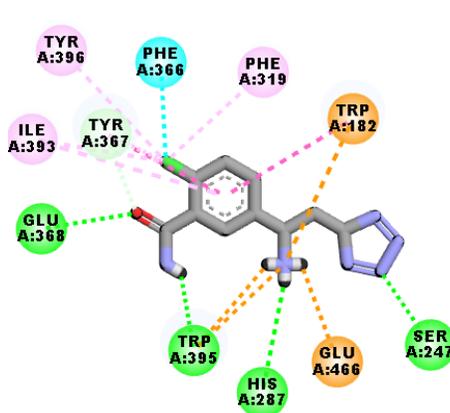
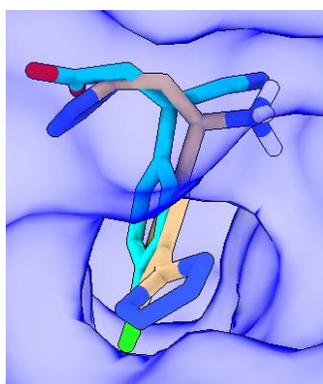
(R)-90c



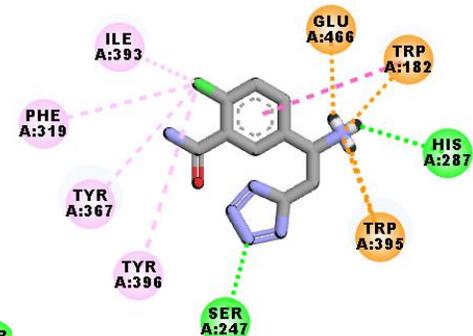
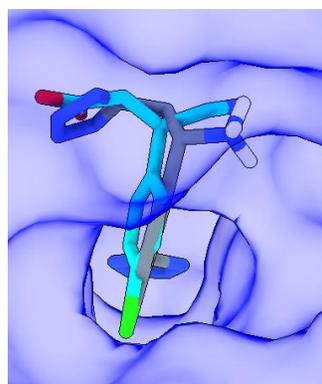
(S)-90c



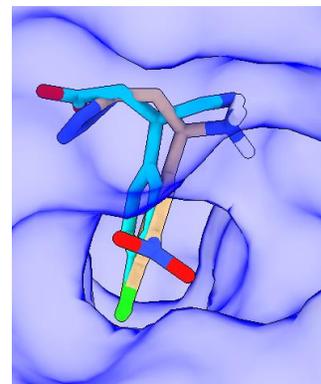
(R)-90d

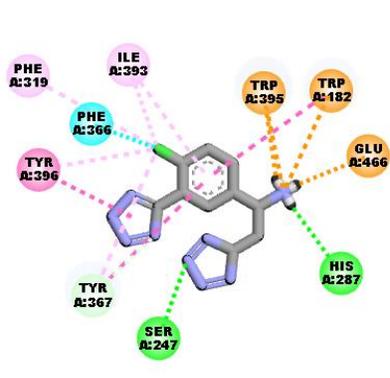


(S)-90d

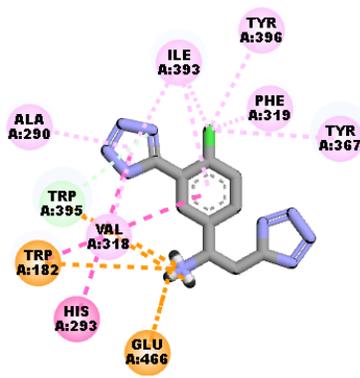
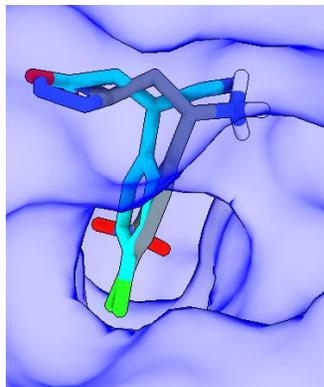


(R)-90e

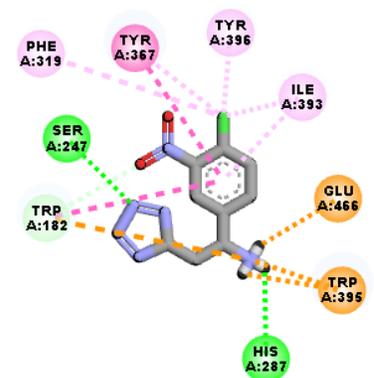
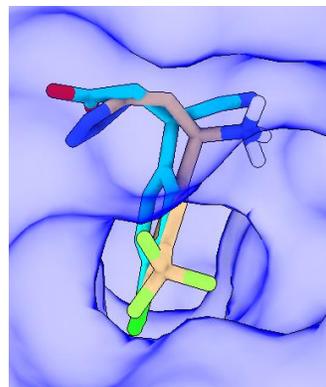




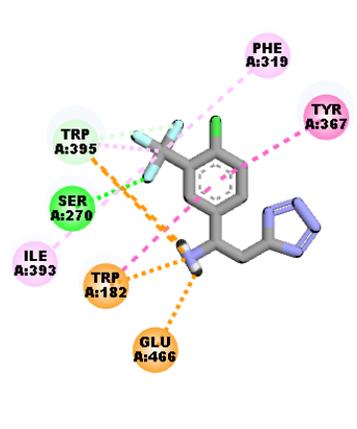
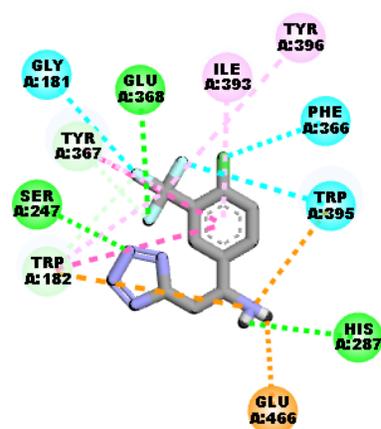
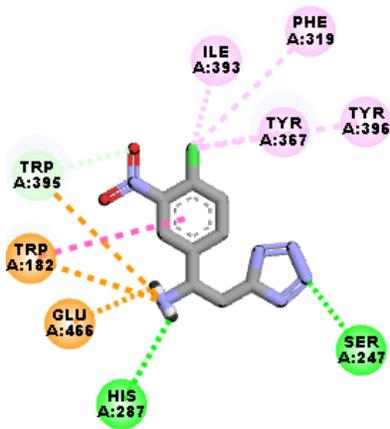
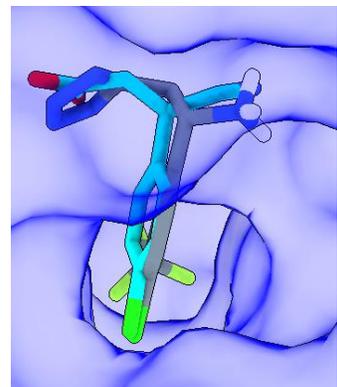
(S)-90e



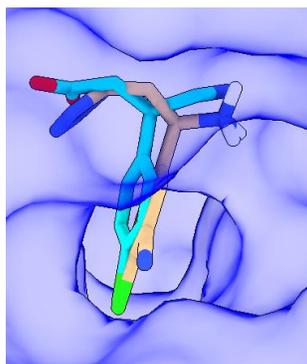
(R)-90f



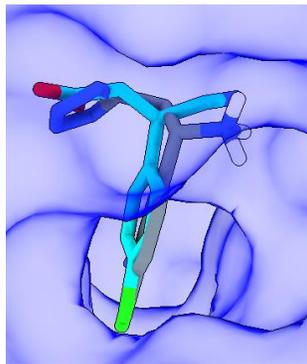
(S)-90f



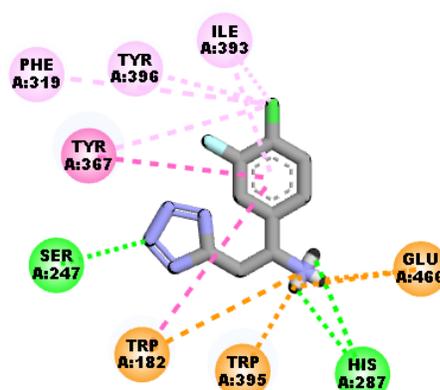
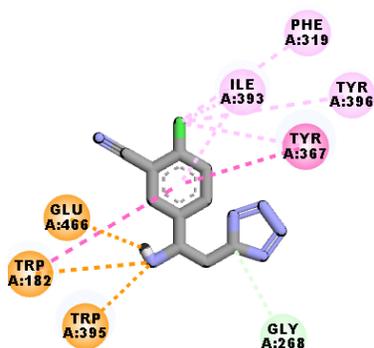
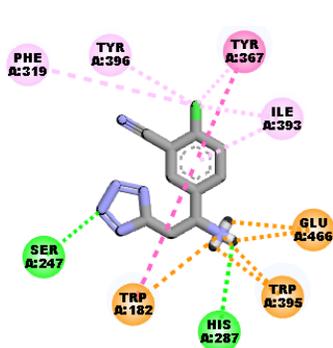
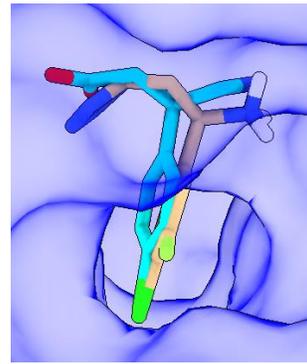
(R)-90g



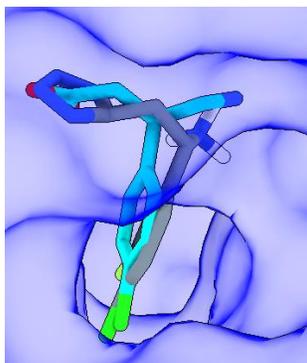
(S)-90g



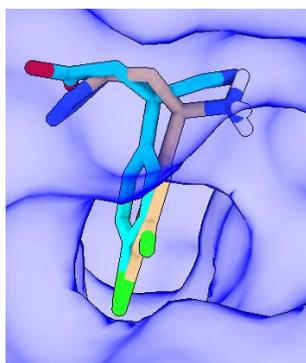
(R)-90h



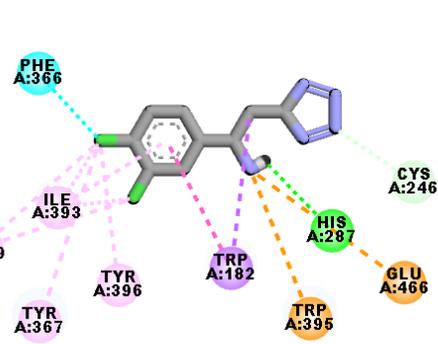
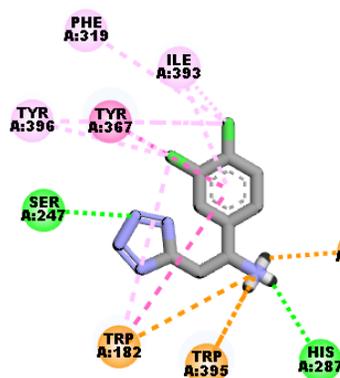
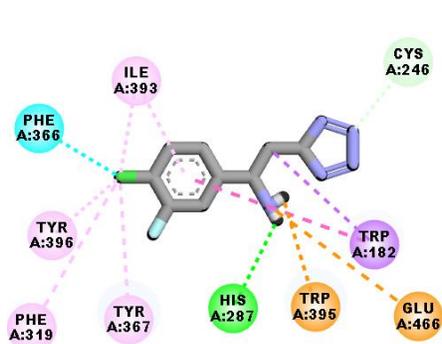
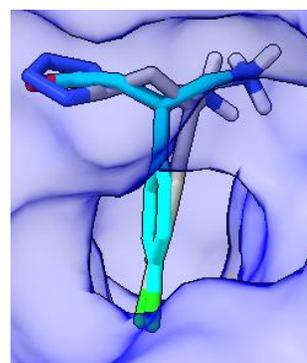
(S)-90h



(R)-90i



(S)-90i



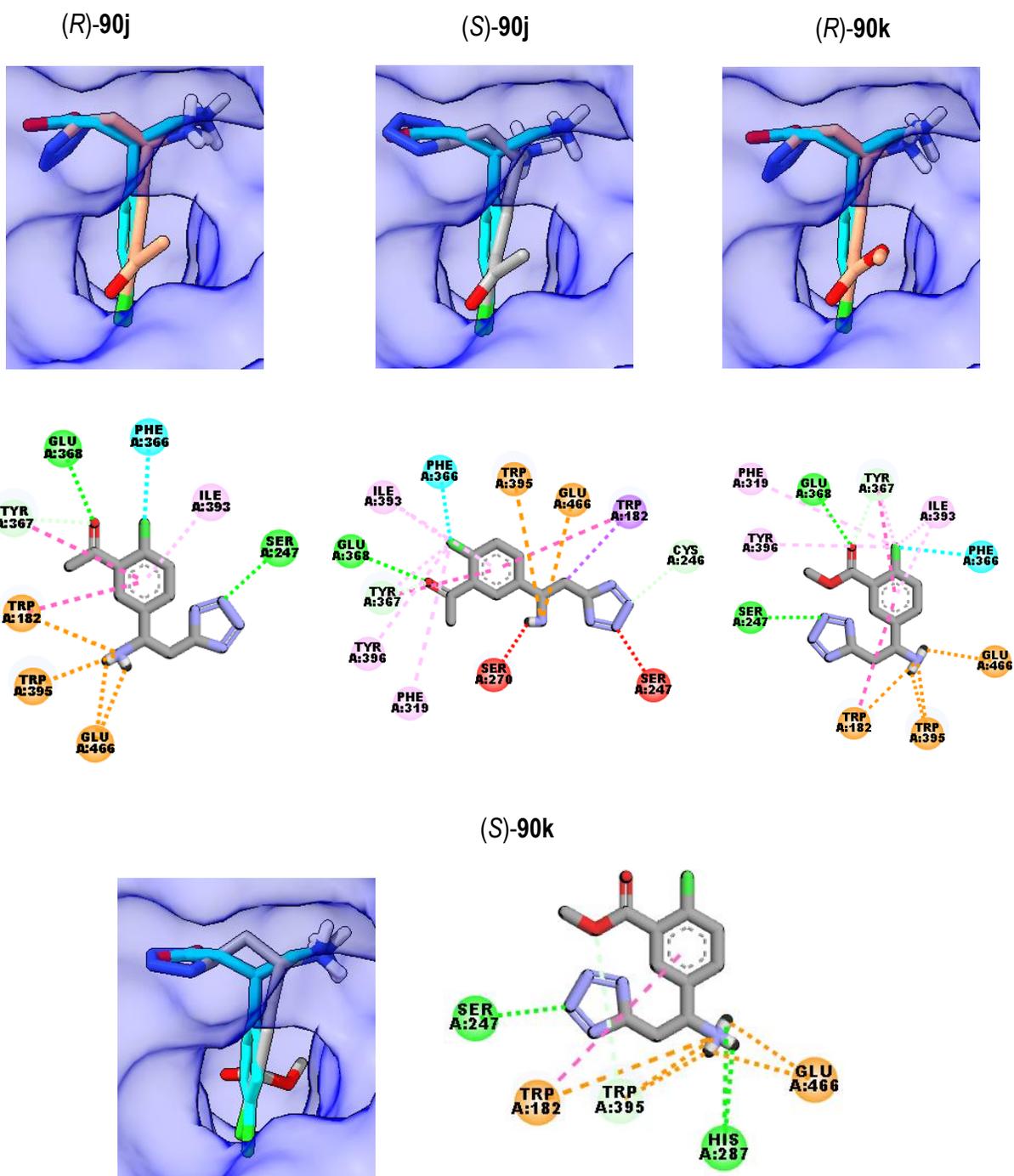


Figura 43. Columna uno; superposición de las moléculas (*R* y *S*)-90a-k con respecto a (*R*)-baclofeno sobre el cristal 7C7Q. b) Columna dos; tipo de interacciones que presenta cada molécula.

Como se puede observar en la Figura 43, la eliminación de la cadena de metileno favoreció el alineamiento estructural de todas las moléculas de la tercera serie, además en todos los casos se mejoró la energía de interacción en comparación con la energía de interacción de la segunda serie,

excepto para (*R*)-**90b**. En cuanto a la lipofilia, se esperaba que los valores de ClogP disminuyeran debido a la eliminación de la cadena de metileno.

Finalmente, se evaluaron las interacciones de estas moléculas con los aminoácidos dentro de la cavidad del receptor y se encontró que las moléculas (*R*)-**90a**, (*R* y *S*)-**90b**, (*R* y *S*)-**90c**, (*R*)-**90d**, (*R* y *S*)-**90e**, (*R* y *S*)-**90f**, (*R* y *S*)-**90g**, (*R*)-**90h**, (*R*)-**90i** y (*R* y *S*)-**90k** comparten las mismas interacciones que conservan todos los ligandos agonistas co-cristalizados y los agonistas reportados en la literatura, que se utilizaron en este trabajo: Ser247, Ser270, Glu466, His287, Trp395, Trp182, Tyr367, Tyr396, Ile393, Phe319, Phe366, Gly181. A su vez, algunos de sus sustituyentes electroattractores interactúan con Glu368 (Anexos, Tabla 9). De este análisis podemos observar que nuevamente algunos de los enantiómeros de configuración *S* de esta serie de moléculas presentan interacciones que comparten con los antagonistas. Por otro lado, observamos que todos los enantiómeros de configuración *R* de esta serie no presentan ninguna interacción antagonista.

9. Conclusiones.

- Al analizar las diferentes estructuras del receptor GABA_B, elegimos la proteína 7C7Q para llevar a cabo los experimentos de *docking*, debido a que aprobó su validación estructural y energética.
- Mediante el análisis de los aminoácidos de interacción de agonistas y antagonistas co-cristalizados sobre la proteína 7C7Q, es posible discriminar todas aquellas moléculas que compartan interacciones con los antagonistas (Cys246, Val318, Ala290 y His293).
- Utilizando la estructura y los aminoácidos presentes dentro de la cavidad del receptor y manteniendo analogía estructural del fármaco de referencia ((*R*)-baclofeno), se propusieron tres diseños de moléculas.

1. Del primer diseño, se sugiere no aumentar el tamaño del andamio molecular del (*R*)-baclofeno con sustituyentes de carácter hidrofóbico sobre el anillo. Los sustituyentes que se propusieron en *R* y la modificación del *p*-clorofenilo por el anillo de isoxazol provoca una orientación hacia los aminoácidos hidrofóbicos no polares de la cavidad; de acuerdo con nuestro análisis estos aminoácidos son desfavorables para la actividad agonista, ya que éstos (Cys246, Ala290, His293 y Val318) interactúan específicamente con los antagonistas co-cristalizados.

2. Por otro lado, al reemplazar al ácido carboxílico por el tetrazol, reducir la cadena lateral y agregar sustituyentes electroattractores en el carbono tres del grupo *p*-clorofenilo, se logró potencializar y aumentar la lipofilicidad de las moléculas con respecto al (*R*)-baclofeno.

Finalmente, se analizaron un total de 58 moléculas (*R* y *S*)-**88a-g**, (*R* y *S*)-**89a-k** y (*R*)-**90a-k**, al menos 16 de ellas de configuración *R* y *S* comparten interacciones con los agonistas reportados en la literatura. Además, mejoran en cuanto a su lipofilia y su perfil farmacodinámico con respecto a baclofeno (ClogP=-1.51, score=-7.6 kcal/mol).

10. Perspectivas

- Proponer la síntesis de la serie del andamio molecular **90**.
- Terminar de analizar la serie (*R*)-**90a-k** con diferentes conformaciones de la proteína.
- En un futuro, verificar nuestros resultados realizando ensayos *in vitro*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Moskowitz, N.; Puszkin, S. "A Unified Theory of Presynaptic Chemical Neurotransmission." *J. Theor. Biol.* **1985**, *112*, 513–534. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(85\)80019-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(85)80019-9).
- (2) R. Luján. "Bases Moleculares de La Señalización Neuronal." *Cienc. al Día Int.* **2004**, *5*, 1–19.
- (3) Albarracín, S. L.; Baldeón, M. E.; Sangronis, E.; Petruschina, A. C.; Reyes, F. G. R. L. "Glutamato: Un Aminoácido Clave Para Las Funciones Sensoriales y Metabólicas." *Arch. Latinoam. Nutr.* **2016**, *66*, 101–112.
- (4) Hawker, D. D.; Silverman, R. B. "Synthesis and Evaluation of Novel Heteroaromatic Substrates of GABA Aminotransferase." *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, *20*, 5763–5773.
- (5) Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; et al. *No Title*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10855/>.
- (6) Nicandro Mendoza Patiño. "Aspectos Generales de La Neurotransmisión En El SNC". In *Farmacología Médica*; 2008; pp 271–273.
- (7) Malcangio, M.; Bowery, N. G. "Possible Therapeutic Application of GABA_B Receptor Agonists and Antagonists." *Clin. Neuropharmacol.* **1995**, *18*, 285–305. <https://doi.org/10.1097/00002826-199508000-00001>.
- (8) Fowler, C. E.; Aryal, P.; Suen, K. F.; Slesinger, P. A. "Evidence for Association of GABA_B Receptors with Kir3 Channels and Regulators of G Protein Signalling (RGS4) Proteins." *J. Physiol.* **2007**, *580*, 51–65. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.123216>.
- (9) Linn Samira Mari Evenseth. "The GABA_B Receptor-Structure, Ligand Binding and Drug Development." *MDPI* **2020**, 1–5. <https://doi.org/10.4324/9780429320712-13>.
- (10) Brown, K. M.; Roy, K. K.; Hockerman, G. H.; Doerksen, R. J.; Colby, D. A. "Activation of the γ -Aminobutyric Acid Type B (GABA_B) Receptor by Agonists and Positive Allosteric Modulators." *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6336–6347. <https://doi.org/10.1021/jm5018913>.
- (11) Bowery, N. G. "GABA_B Receptors: Molecular Biology and Pharmacology." *Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.* **2016**, 477–484. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02340-3>.
- (12) Geng, Y.; Bush, M.; Mosyak, L.; Wang, F.; Fan, Q. R. "Structural Mechanism of Ligand Activation in Human GABA_B Receptor." *Nature* **2013**, 254–259. <https://doi.org/10.1038/nature12725>.

- (13) Colombo, G. "GABA Receptor. In *GABA_B receptor*, G." Colombo, Ed.; 2021; p v. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46044-4>.
- (14) Goudet, C.; Magnaghi, V.; Landry, M.; Nagy, F.; Gereau IV, R. W.; Pin, J. P. "Metabotropic Receptors for Glutamate and GABA in Pain." *Brain Res. Rev.* **2009**, *60*, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.007>.
- (15) Lehmann, A. "GABA_B Receptors as Drug Targets to Treat Gastroesophageal Reflux Disease." *Pharmacol. Ther.* **2009**, *122*, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.008>.
- (16) Karlsson, G.; Kolb, C.; Hausdorf, A.; Portet, C.; Schmutz, M.; Olpe, H. R. "GABA_B Receptors in Various in Vitro and in Vivo Models of Epilepsy: A Study with the GABA_B Receptor Blocker CGP 35348." *Neuroscience* **1992**, *47*, 63–68. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90120-Q](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90120-Q).
- (17) Bowen, D. M.; Najlerahim, A.; Procter, A. W.; Francis, P. T.; Murphy, E. "Circumscribed Changes of the Cerebral Cortex in Neuropsychiatric Disorders of Later Life." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 9504–9508. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9504>.
- (18) Froestl, W. "An Historical Perspective on GABAergic Drugs." *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 163–175. <https://doi.org/10.4155/fmc.10.285>.
- (19) Sills, G. J. "The Mechanisms of Action of Gabapentin and Pregabalin." *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.11.003>.
- (20) Storici, P.; De Biase, D.; Bossa, F.; Bruno, S.; Mozzarelli, A.; Peneff, C.; Silverman, R. B.; Schirmer, T. "Structures of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Aminotransferase, a Pyridoxal 5'-Phosphate, and [2Fe-2S] Cluster-Containing Enzyme, Complexed with γ -Ethylnyl-GABA and with the Antiepilepsy Drug Vigabatrin." *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 363–373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305884200>.
- (21) Keberle, H.; Faigle, J. W.; Wilhem, M. "Gamma-Amino-Beta-(Para-Halophenyl)-Butyric Acids and Their Esters." United States Patent USD3471548. 29 Jun 1964.
- (22) Froestl, W. "Chemistry and Pharmacology of GABA_B Receptor Ligands." *Adv. Pharmacol.* **2010**, *58*, 19–62. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)58002-5](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)58002-5).
- (23) Paredes, R.; Agmo, A. "Stereospecific Actions of Baclofen on Sociosexual Behavior, Locomotor Activity and Motor Execution." *Psychopharmacology (Berl)*. **1989**, *97*, 358–364. <https://doi.org/10.1007/BF00439451>.
- (24) Shao, C.; Yu, H. J.; Wu, N. Y.; Tian, P.; Wang, R.; Feng, C. G.; Lin, G. Q. "Asymmetric Synthesis of β -Substituted γ -Lactams via Rhodium/Diene-Catalyzed 1,4-Additions: Application

- to the Synthesis of (*R*)-Baclofen and (*R*)-Rolipram." *Org. Lett.* **2011**, *13*, 788–791.
<https://doi.org/10.1021/ol103054a>.
- (25) Singh, M.; Malik, P.; Bhushan, R. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*, 842–846.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw014>.
- (26) Felluga, F.; Gombac, V.; Pitacco, G.; Valentin, E. "A Short and Convenient Chemoenzymatic Synthesis of Both Enantiomers of 3-PhenylGABA and 3-(4-Chlorophenyl)GABA(Baclofen)." *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, *16*, 1341–1345. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.02.019>.
- (27) Deguchi, Y.; Inabe, K.; Tomiyasu, K.; Nozawa, K.; Yamada, S.; Kimura, R. Deguchi et "Al_Brain and BBB Transport of Baclofen in Rats." **1995**, *12* (Pharmaceutical Research), 1838–1844.
- (28) Costantino, G.; Macchiarulo, A.; Guadix, A. E.; Pellicciari, R. "QSAR and Molecular Modeling Studies of Baclofen Analogues as GABA_B Agonists." *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1827–1832.
- (29) Berthelot, P.; Vaccher, C.; Musadad, A.; Flouquet, N.; Debaert, M.; Luyckx, M. "Synthesis and Pharmacological Evaluation of γ -Aminobutyric Acid Analogues. New Ligand ForgababSites." *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 743–746. <https://doi.org/10.1021/jm00387a031>.
- (30) Pascal Berthelot, Claude Vaccher, Nathalie Flouquet, t Michel Debaert, M. L. and C. B. "3-Thienyl- and 3-Furylaminobutyric Acids. Synthesis and Binding GABAB Receptor Studies." **1991**, *34*, 2557–2560. <https://doi.org/10.1021/jm00112a033>.
- (31) 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. "Discovery of a Novel Potent GABAB Receptor Agonist." *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (21), 6582–6585.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.08.006>.
- (32) Mohamed I. Attia, C. H. and H. B.-O. "GABA_B-Agonistic Activity of Certain Baclofen Homologues." *Molecules* **2013**, *18*, 10266–10284.
<https://doi.org/10.3390/molecules180910266>.
- (33) Attia, M. I.; Herdeis, C.; Bräuner-Osborne, H. "Synthesis and Pharmacological Characterization of Certain Baclofen Analogues." *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **2013**, *8*, 139–149.
- (34) Kerr, D. I. B.; Ong, J.; Prager, R. H.; Gynther, B. D.; Curtis, D. R. "Phaclofen: A Peripheral and Central Baclofen Antagonist." *Brain Res.* **1987**, *405*, 150–154. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90999-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90999-1).

- (35) Lehmann, A.; Antonsson, M.; Aurell-Holmberg, A.; Blackshaw, L. A.; Brändén, L.; Elebring, T.; Jensen, J.; Kärrberg, L.; Mattsson, J. P.; Nilsson, K.; Oja, S. S.; Saransaari, P.; Von Unge, S. "Different in Vitro and in Vivo Profiles of Substituted 3- Aminopropylphosphinate and 3- Aminopropyl(Methyl)Phosphinate GABA_B Receptor Agonists as Inhibitors of Transient Lower Oesophageal Sphincter Relaxation." *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165* (6), 1757–1772. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01682.x>.
- (36) Froestl, W.; Mickel, S. J.; Hall, R. G.; von Sprecher, G.; Strub, D.; Baumann, P. A.; Brugger, F.; Gentsch, C.; Jaekel, J.; Olpe, H. R.; Rihs, G.; Vassout, A.; Waldmeier, P. C.; Bittiger, H. "Phosphinic Acid Analogues of GABA. 1. New Potent and Selective GABA_B Agonists." *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3297–3312. <https://doi.org/10.1021/jm00017a015>.
- (37) Brown, K. M.; Roy, K. K.; Hockerman, G. H.; Doerksen, R. J.; Colby, D. A. "Activation of the γ -Aminobutyric Acid Type B (GABA_B) Receptor by Agonists and Positive Allosteric Modulators." *J. Med. Chem.* **2015**. <https://doi.org/10.1021/jm5018913>.
- (38) Han, C.; Salyer, A. E.; Kim, E. H.; Jiang, X.; Jarrard, R. E.; Powers, M. S.; Kirchoff, A. M.; Salvador, T. K.; Chester, J. A.; Hockerman, G. H.; Colby, D. A. "Evaluation of Difluoromethyl Ketones as Agonists of the γ -Aminobutyric Acid Type B (GABA_B) Receptor." *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (6), 2456–2465. <https://doi.org/10.1021/jm301805e>.
- (39) Jampilek, J. "Heterocycles in Medicinal Chemistry." *Molecules* **2019**, *24*, 1–4. <https://doi.org/10.3390/molecules24213839>.
- (40) Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. "Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals." *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274. <https://doi.org/10.1021/jm501100b>.
- (41) Laurence, C.; Brameld, K. A.; Graton, J.; Le Questel, J. Y.; Renault, E. "The PKBHX Database: Toward a Better Understanding of Hydrogen-Bond Basicity for Medicinal Chemists." *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4073–4086. <https://doi.org/10.1021/jm801331y>.
- (42) Meanwell, N. A. "Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design." *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529–2591. <https://doi.org/10.1021/jm1013693>.
- (43) Tovar-Gudi o, E.; Guevara-Salazar, J. A.; Bahena-Herrera, J. R.; Trujillo-Ferrara, J. G.; Martínez-Campos, Z.; Razo-Hernandez, R. S.; Santiago, Á.; Pastor, N.; Fernandez-Zertuche, M. "Novel-Substituted Heterocyclic GABA Analogues. Enzymatic Activity against the GABA-

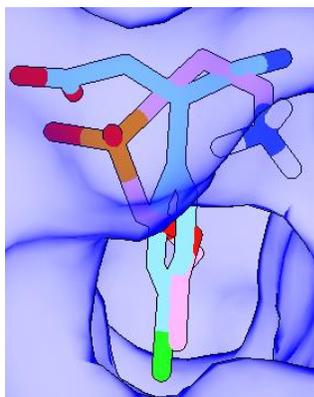
- AT Enzyme from *Pseudomonas Fluorescens* and in Silico Molecular Modeling." *Molecules* **2018**, *23*, 1–26. <https://doi.org/10.3390/molecules23051128>.
- (44) Rodríguez-Lozada, J.; Tovar-Gudiño, E.; Guevara-Salazar, J. A.; Razo-Hernández, R. S.; Santiago, Á.; Pastor, N.; Fernández-Zertuche, M. "QSAR and Molecular Docking Studies of the Inhibitory Activity of Novel Heterocyclic GABA Analogues over GABA-AT." *Molecules* **2018**, *23*, 1–31. <https://doi.org/10.3390/molecules23112984>.
- (45) Díaz-Peralta, L.; Razo-Hernández, R. S.; Pastor, N.; Santiago, Á.; Guevara-Salazar, J. A.; Fernández-Zertuche, M. "1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazole GABA Analogues: Synthesis, In Vitro Evaluation, Quantum QSAR and Molecular Docking against *Pseudomonas Fluorescens* GABA-AT." *ChemistrySelect* **2020**, *5*, 1071–1079. <https://doi.org/10.1002/slct.201901485>.
- (46) Zuleyma Martínez Campos. "Diseño in Silico y Síntesis de Análogos de Baclofen Como Posibles Agonistas Del Receptor GABAB", **2021**.
- (47) Martínez-Campos, Z.; Pastor, N.; Pineda-Urbina, K.; Gómez-Sandoval, Z.; Fernández-Zertuche, M.; Razo-Hernández, R. S. "In Silico Structure-Based Design of GABA_B Receptor Agonists Using a Combination of Docking and QSAR." **2019**; Vol. 94. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13580>.
- (48) K Anand Solomon. *Molecular Modelling and Drug Desing*; Ambica, C., Ed.; 2017.
- (49) Fischer, E. Emil Fisher: Einfluss Der Configuration Aun Die Wirkung Der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985–2993. <https://doi.org/10.1002/cber.18940270364>.
- (50) Koshland, D. E. "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44*, 98–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.2.98>.
- (51) Li, W.; Ma, B.; Shapiro, B. A. "Binding Interactions between the Core Central Domain of 16S RRNA and the Ribosomal Protein S15 Determined by Molecular Dynamics Simulations." *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 629–638. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg149>.
- (52) Mao, C.; Shen, C.; Li, C.; Shen, D. D.; Xu, C.; Zhang, S.; Zhou, R.; Shen, Q.; Chen, L. N.; Jiang, Z.; Liu, J.; Zhang, Y. "Cryo-EM structures of inactive and active GABA_B receptor. Cell Research." <https://proteins.plus/>. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0350-5>.
- (53) HM, B.; K, H.; H, N. "Announcing the Worldwide Protein Data Bank." *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 980.
- (54) Strobe, C. L.; Mansouri, K.; Clewell, H. J.; Rabinowitz, J. R.; Stevens, C.; Wambaugh, J. F. "High-Throughput in-Silico Prediction of Ionization Equilibria for Pharmacokinetic Modeling."

- Sci. Total Environ.* **2018**, *615*, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.033>.
- (55) Mansouri, K.; Cariello, N. F.; Korotcov, A.; Tkachenko, V.; Grulke, C. M.; Sprankle, C. S.; Allen, D.; Casey, W. M.; Kleinstreuer, N. C.; Williams, A. J. "Open-Source QSAR Models for PKa Prediction Using Multiple Machine Learning Approaches." *J. Cheminform.* **2019**, *11*, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0384-1>.
- (56) Martínez-Campos, Z.; Pastor, N.; Pineda-Urbina, K.; Gómez-Sandoval, Z.; Fernández-Zertuche, M.; Razo-Hernández, R. S. "In Silico Structure-Based Design of GABA_B Receptor Agonists Using a Combination of Docking and QSAR." *Chem. Biol. Drug Des.* **2019**, *94*, 1782–1798. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13580>.

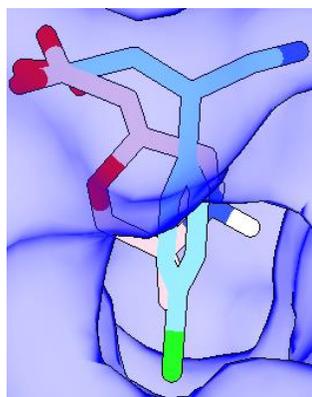
12. ANEXOS

12.1 Conformaciones e interacciones de los antagonistas co-cristalizados sobre el cristal 7C7Q en 3D y 2D.

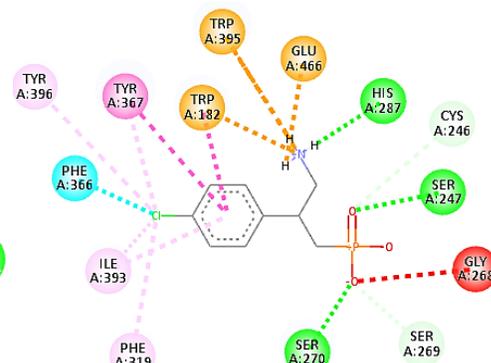
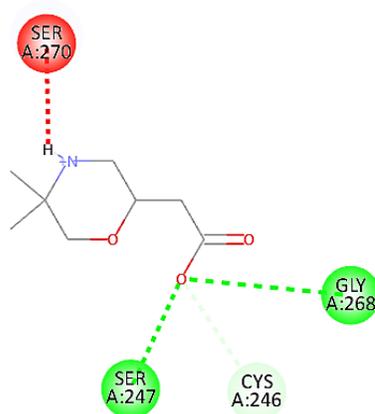
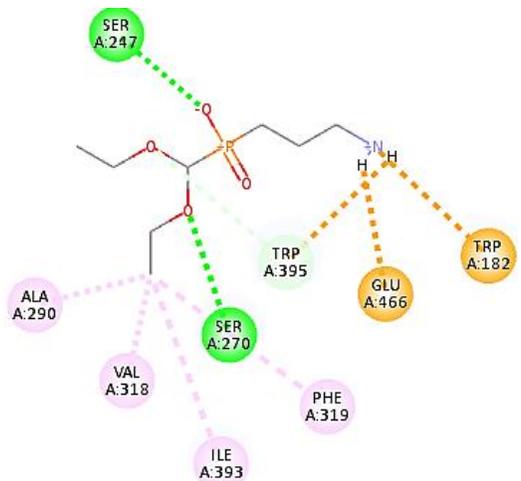
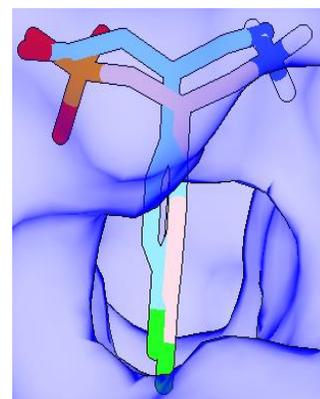
4MR8



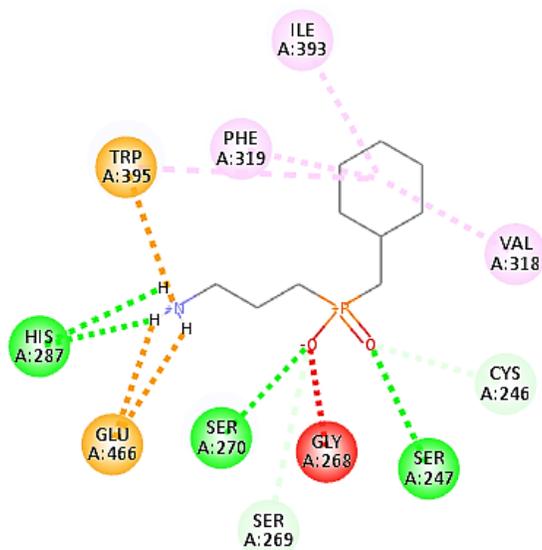
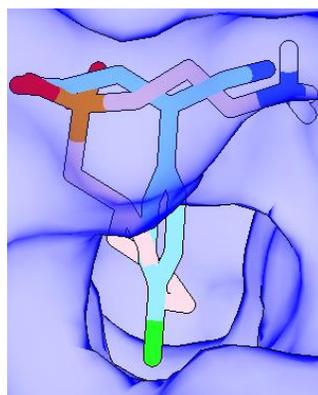
4MR9



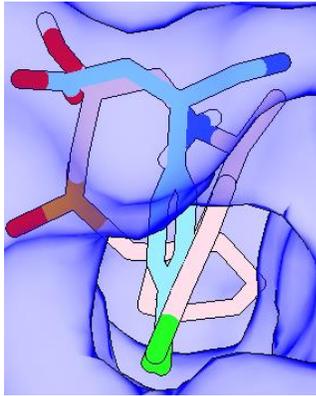
4MRM



4MS1



7CUM



4MQF

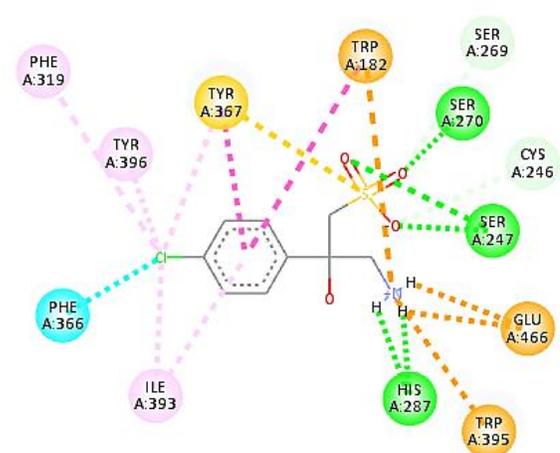
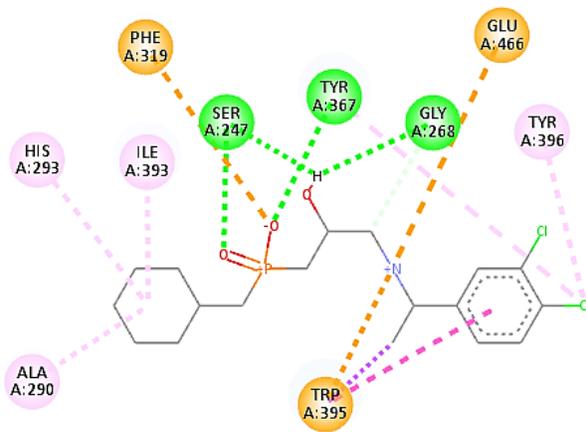
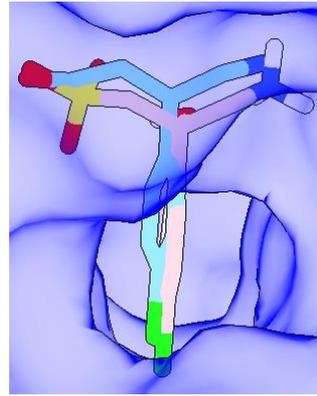


Tabla 5. Interacciones de agonistas co-cristalizados y resultados del *docking* sobre la proteína 7C7Q.

PDB	Residuos de interacción				score	
4MS3	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp182, His287, Gly268)		-CO ₂ ⁻ (Ser247)		-4.5	
4MS4	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395, His287)		-CO ₂ ⁻ (Ser247, Ser270)	Aro (Tyr367, Ile393, Trp182)	-Cl (Phe366, Phe319, Tyr367, Tyr396, Ile393)	-8.4
7C7Q	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395, His287)		-CO ₂ ⁻ (Ser247, Ser270)	Aro (Tyr367, Ile393, Trp182)	-Cl (Phe366, Phe319, Tyr367, Tyr396, Ile393)	-7.6

6UO8	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp182, Gly268)	-CH ₂ (Glu466)	-PO ₂ ⁻ (Ser247, Ser270)			-4.5

Tabla 6. interacciones de antagonistas co-cristalizados y resultados del *docking* sobre cristal 7C7Q.

***NOTA:** Los aminoácidos en color rojo son aminoácidos específicos para los antagonistas.

PDB	Interacciones						score
4MR8	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395, Trp182)		-PO ₂ ⁻ (Ser247)	(CH ₃ CH ₂ O) ₂ CH- O—(Ser270, Trp395), CH ₃ CH ₂ - (Phe319, Val318 , Ala290 , Ile393)			-5.5 (±) 0.1
4MR9	-NH ₂ ⁺ (Ser270)		-CO ₂ ⁻ (Ser247, Gly268, Cys246)				-6.4 (±) 0.1
4MRM	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395, Trp182 His287)	-CH ₂ (Trp395)	-PO ₃ ²⁻ (Ser247, Ser270, Ser269, Gly269, Cys246)		Aro (Tyr367, Ile393, Trp182)	-Cl (Phe366, Phe319, Tyr367, Ile393, Tyr396)	-7.7 (±) 0.1
4MS1	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395, His287)		-PO ₂ ⁻ (Ser247, Ser270, Gly268, Cys246 , Ser269)			Cadena alifática (Phe319, Ile393, Trp395, Val318)	-6.1 (±) 0.1
7CUM	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395)	-CH ₂ (Gly268)	-PO ₂ ⁻ (Ser247, Tyr367, Phe319)	OH (Gly268, Ser247)	Aro (Trp395)	Cl (Tyr367, Tyr396) Cadena alifática (Ile393, His293 , Ala290), - CH ₃ (Trp395)	-5.9 (±) 0.1
4MQF	-NH ₃ ⁺ (Glu466, Trp395, Trp182, His287)		-SO ₃ ²⁻ (Ser247, Ser270, Cys246 , Ser269, Tyr367)		Aro (Tyr367, Ile393, Trp182)	Cl- (Phe366, Phe319, Ile393, Tyr396, Tyr367)	-8 (±) 0.1

Primera serie de análogos de baclofeno (*R* y *S*)-88a-g.

Tabla 7. Interacciones que presentaron la serie de compuestos (*R* y *S*) 88a-g sobre el cristal 7C7Q.

Compuesto	INTERACCIONES				
	-NH ₃ ⁺	-CO ₂ ⁻	Isoxazol	Aromático	Halógeno
(<i>R</i>)-88a	Glu466 His287 Trp182 Gly268	Ser247 Ser270	Trp395 Ser270	Ala290 Ile393 His293	
(<i>S</i>)-88a	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247 Ser270 Cys246	Trp395 Ser270	Ala290 Ile393 His293	
(<i>R</i>)-88b	Glu466 His287 Trp182 Trp395	Ser270 Ser247 Tyr367	Ser270	Val318 Ala290 Ile393	
(<i>S</i>)-88b	Glu368 Gly181	Gly463 Pro183		Trp182 Tyr367 Ile393 Val318	
(<i>R</i>)-88c		Arg297 His293	Ser270 Ile393 Phe319 Ala290 Val318	Tyr367 Tyr396 Pro183	
(<i>S</i>)-88c	His293	Ser270 His287 Ala290 Trp395	Ile393 Val318 Ala290 Thr322	Tyr367 Tyr396 Pro183	
(<i>R</i>)-88e	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247 Cys246	Val318	Ala290 Ile393 His293	-Cl Ile393 His293 Leu 365 Ala290
(<i>S</i>)-88e	Gly268 Ser247 Trp182	Trp395 Trp182	Val318	Ala290 Ile393 His293	Ile393 His293 Leu365 Ala290
(<i>R</i>)-88f	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247 Ser270 Ser269	Trp395 Ser270	Ala290 Ile393 His293	-F Arg297
(<i>S</i>)-88f	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247 Ser270 Cys246	Trp395 Ser270	Ala290 Ile393 His293	-F Arg297
(<i>R</i>)-88d	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247	Val318	Ala290 Ile393 His293	His293 Leu365 Phe319 Thr322 Ile393 His293 Ala290
(<i>S</i>)-88d	Glu466 His287 Trp182 Trp395 Gly268	Ser247 Cys246	Trp395 Ser270	Ala290 Val318	Ile393 His293 Leu365
(<i>R</i>)-88g	Glu466 Trp182	Ser247	Val318	Ala290 Ile393	-CF3 His293

	Trp395			His293	Leu365 Ala290 Arg297
(S)-88g	Glu466 His287 Trp182 Trp395	Ser247 Tyr367	Val318 Ser270	Ala290 Ile393 His293	His293 Leu365 Ala290 Arg297

Segunda serie de análogos de baclofeno 89a-k.

Tabla 8. Interacciones de los compuestos (R y S)-89a-k sobre el cristal 7C7Q.

INTERACCIONES					
Compuesto	-NH ₃	Tetrazol	Aromático	Meta_sust	Halógeno
(R)-89a	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393		Ile393 Tyr367 Tyr396 Phe319 Phe366
(S)-89a	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Cys246	Trp182 Tyr367 Ile393		Ile393 Tyr367 Tyr396 Phe319 Phe366
(R)-89b	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367	-CO ₂ Tyr367 Gly368	Ile393 Ph366
(S)-89b	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367	Gly368	Tyr367 Tyr396 Ile393 Ph366
(R)-89c	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393	-AMIDA Glu368 Trp395	Tyr367 Tyr396 Phe319 Phe366
(S)-89c	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367	Glu368 Trp395	Tyr367 Tyr396 Phe366 Ile393
(R)-89d	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247 Tyr367 Cys246 Cys220	Ile393	Glu368	Phe366
(S)-89d	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367 Ile393		Tyr367 Tyr396 Ile393
(R)-89e	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393	-NO ₂ Trp182 Tyr367 Glu368	Tyr367 Tyr396 Ile393
(S)-89e	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367 Ile393	Glu368	Phe366 Phe319
(R)-89f	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393	-CF ₃ Glu368 Tyr367 Tyr396	
(S)-89f	Glu466 His287	Ser247 Cys246	Trp182 Tyr367	Gly181 Tyr367	Trp182

	Trp395			Glu368 Tyr395	
(R)-89g	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393		Tyr367 Tyr396 Ile393 Phe319
(S)-89g	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Cys246	Trp182 Ile393	-CN Glu368	Tyr396 Ile393 Phe319 Phe366
(R)-89h	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393	-F	Tyr396 Phe319 Phe366
(S)-89h	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367 Ile393		Tyr396 Phe319 Phe366 Ile393
(R)-89i	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393		Tyr396 Tyr367 Trp182 Phe319 Phe366
(S)-89i	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Ile393		Tyr396 Ile393 Phe319 Phe366
(R)-89j	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393	-COCH ₃ Glu368	Ile393 Tyr367 Phe366
(S)-89j	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367	Glu368	Ile393 Tyr396 Tyr367 Phe366
(R)-89k	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Trp182 Val318	Trp182 Tyr367 Ile393	-CO ₂ CH ₃ Glu368	Tyr396 Phe366 Phe319
(S)-89k	Glu466 His287 Trp395	Ser247 Tyr367 Cys246	Trp182 Tyr367	Glu368	Tyr396 Phe366 Phe319

Tercera serie de análogos de baclofeno (R y S) 90a-k.

Tabla 9. Interacciones de los compuestos (R y S)-90a-k en el cristal 7C7Q.

Compuesto	INTERACCIONES				
	-NH ₃	Tetrazol	Aromático	Meta-sust	Halógeno
(R)-90a	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393		Ile393 Tyr367 Tyr396 Phe319
(S)-90a	Glu466 Trp395	Ser247 Cys246	Trp182 Ile393		Phe366 Ile393 Tyr367 Tyr396 Phe319
(R)-90b	Glu466 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Ile393 Tyr367	-CO ₂ Glu368 Tyr367	

				Trp182	
(S)-90b	Glu466 Trp395 His287 Gly268	Ser247	Trp182 Ile393	Trp395 Tyr367	Phe319 Tyr367 Tyr396 Ile393
(R)-90c	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-AMIDA Glu368 Trp395 Tyr367	Ile393 Phe319 Phe366
(S)-90c	His287 Glu466 Trp182 Trp395	Ser247	Trp182		Ile393 Phe319 Tyr367 Tyr396
(R)-90d	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Ile393 Tyr367 Trp182	Tetrazol Tyr396 Tyr367	Phe366 Phe319 Tyr396 Ile393
(S)-90d	Glu466 Trp182 Trp395		Val318	Ala290 Trp395 Val318 His293	Ile393 Tyr396 Phe319 Tyr367
(R)-90e	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247 Ser270	Trp182 Tyr367 Ile393	-NO2 Trp182	Tyr367 Tyr396 Ile393 Phe319
(S)-90e	Glu466 His278 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182	Trp395	Ile393 Phe319 Tyr367 Tyr396
(R)-90f	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-CF₃ Glu368 Tyr367 Tyr396 Trp395 Gly181	Phe366 Ile393
(S)-90f	Trp395 Trp182 Glu466		Trp182 Tyr367	Trp395 Phe319 Ser270 Ile393	
(R)-90g	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-CN	Tyr367 Tyr396 Ile393 Phe319
(S)-90g	Trp395 Trp182 Glu466	Gly268	Trp182 Tyr367 Ile393		Ile393 Phe319 Tyr367 Tyr396
(R)-90h	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-F	Tyr396 Phe319 Ile393
(S)-90h	His283 Trp395 Glu466	Cys246	Trp182 Ile393		Ile393 Tyr396 Phe319 Tyr367
(R)-90i	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-Cl Tyr396 Trp182 Tyr367	Tyr396 Tyr367 Ile393 Phe319
(S)-90i	Glu466 His287	Cys246	Trp182 Ile393	Ile393 Phe319	Phe366 Phe319

	Trp395 Trp182				Ile393 Tyr396
(R)-90j	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-COCH₃ Glu368 Tyr367	Phe366
(S)-90j	Glu466 Trp395	Cys246	Ile393 Trp182 Tyr367	Glu368	Phe366 Ile393 Tyr367 Tyr396 Phe319
(R)-90k	Glu466 Trp182 Trp395	Ser247	Trp182 Tyr367 Ile393	-CO₂CH₃ Glu368	Tyr396 Phe366 Phe319 Ile393
(S)-90k	Glu466 His287 Trp395 Trp182	Ser247	Trp182	Trp395	