

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA PROTEÍNA SV2A Y SÍNTESIS  
DE NUEVAS PIRROLIDONAS ANÁLOGAS A LEVETIRACETAM”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Q. F. B. JOSE MANUEL ALVAREZ BALTAZAR

**DIRIGIDA POR:**

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

QUERÉTARO, MÉXICO  
CENTRO UNIVERSITARIO  
DICIEMBRE DE 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Estudio computacional de la proteína SV2A y síntesis de  
nuevas pirrolidonas análogas a levetiracetam.

**por**

JOSE MANUEL ALVAREZ BALTAZAR

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-249386-0223-1222



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“Estudio computacional de la proteína SV2A y síntesis de nuevas  
pirrolidonas análogas a levetiracetam”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Q. F. B. JOSE MANUEL ALVAREZ BALTAZAR

**DIRIGIDA POR:**

DR. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

COMITÉ TUTORAL

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

Presidente

Dra. JULIETA GRISELDA MENDOZA TORREBLANCA

Secretario

Dr. JAIME PEREZ VILLANUEVA

Vocal

Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

Suplente

Dr. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

Suplente

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro  
Diciembre de 2022

## AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca de maestría (769607) y por el proyecto de Ciencia Básica A1-S-17090 (SEP-CONACYT-CB2017-2018) que hizo posible la adquisición del equipo utilizado en las simulaciones y análisis computacionales, así como los insumos utilizados en las reacciones de síntesis.
- A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en el Posgrado en Ciencias Químico Biológicas.
- Al Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos por todo el apoyo brindado durante mi desarrollo académico y personal en estos dos años de maestría.
- A mis profesores de las distintas materias de la maestría, gracias por compartirme sus conocimientos durante mis estudios de posgrado.
- A mis sinodales el Dr. Jaime, la Dra. Julieta, la Dra. Jessica y el Dr. Alejandro por apoyarme durante mis exámenes tutoriales para lograr el desarrollo de este proyecto.
- Al Dr. Ernesto Sánchez de la UAM-Xochimilco por el apoyo brindado en la obtención de los espectros de RMN.
- A mi director de tesis, el Dr. Antonio Romo Mancillas, por sus enseñanzas, apoyo y comprensión durante todos estos años de trabajo. Y al mismo tiempo, al Dr. Giovanni Aguilera Durán, quien también fue una parte importante durante el desarrollo de este proyecto de tesis, sin ayuda de ambos, este proyecto no hubiera sido posible. Gracias totales a mis eternos mentores.
- A mis amigos y compañeros del grupo de trabajo, Alex, Fer, Steph y Betty quienes siempre estuvieron conmigo amenizando las horas de trabajo y motivándome para salir adelante, nunca faltaron las risas y los momentos de diversión después de las largas horas de trabajo, gracias chicos.
- A mis amigos de QFB y licenciatura en general (Arturo, Grecia, Lalo, Karla, Cris, Gus, Esly, Anahy, Benja, Odette, Apo, Zyanya y un largo etc.), que, a pesar de ya no verlos tan seguido, me han apoyado mucho desde fuera; gracias por brindarme su apoyo y motivación para seguir adelante.
- A quienes han sido mis alumnos durante este tiempo, tanto en clases de Química Orgánica, como en servicio social y proyectos de licenciatura, muchas gracias por su confianza y acompañarme durante mi desarrollo docente-académico.
- A mi prometida, la Química en Materiales Abril Saray Tapia, por todo el amor y apoyo brindado todo este tiempo, sin tu ayuda nunca lo hubiera podido lograr, gracias por motivarme y comprenderme en mis peores caídas y, sobre todo, por ayudarme a levantarme, gracias por estos casi 5 años a tu lado.
- A mis padres, sobre todo a ellos, quienes siempre han creído en mí, me han apoyado en mis decisiones y siempre han estado cuando más lo necesito. Gracias por todo.
- A Dios y a la vida, por poner a las personas correctas en mi camino.

## DEDICATORIA

*ESTA TESIS VA DEDICADA A LAS PERSONAS QUE ME HAN ACOMPAÑADO  
TODA LA VIDA...MI FAMILIA...*

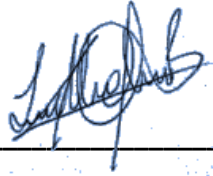
*MAMÁ, PAPÁ, CLAU, DANY, USTEDES SIEMPRE HAN SIDO MIS PILARES,  
POR USTEDES SOY QUIEN SOY, GRACIAS POR TANTO Y PERDÓN POR TAN  
POCO...*

*MUJER, GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO, ESTOS 5 AÑOS HAN  
SIDO MARAVILLOSOS, ESTE LOGRO TAMBIÉN VA PARA TI...*

*...ESTO ES POR Y PARA USTEDES.*

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:** Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Atentamente:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. M. Alvarez B.', is positioned above a solid horizontal line.

**Q. F. B. JOSE MANUEL ALVAREZ BALTAZAR**

## RESUMEN

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta del 0.5 % al 1.5 % de la población a nivel global, sin hacer distinción de edad, sexo, raza o estatus económico. Como tratamiento existen tres generaciones de fármacos que presentan efectos anticonvulsivos; sin embargo, no siempre se logran estos, causando diversas reacciones secundarias y efectos adversos graves en los pacientes. Uno de estos fármacos es el levetiracetam, este fármaco anticonvulsivo destaca de los demás al contar con un mecanismo de acción único y novedoso al presentar interacciones con la proteína SV2A, que lo hacen una excelente opción de tratamiento empleado en pacientes con epilepsia. Aun así, existe un cierto porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento del levetiracetam, por lo que resulta importante ampliar la gama de este tipo de fármacos que puedan presentar efectos anticonvulsivos. Debido a esto, en el presente trabajo, se realizó el estudio computacional de SV2A y la síntesis orgánica de nuevos análogos del levetiracetam que presentaron un mayor docking score, calculado por acoplamiento molecular, al receptor SV2A y un posible mejor perfil ADME que los compuestos previamente diseñados por el grupo de investigación, con la finalidad de obtener un mayor número de moléculas estructuralmente relacionadas con levetiracetam y con una posible acción anticonvulsiva. Primeramente, por técnicas computacionales, se obtuvo la estructura tridimensional de SV2A mediante modelado por homología y dinámica molecular, posteriormente se realizaron estudios de acoplamiento molecular de 18 nuevos análogos de levetiracetam, finalmente se realizó la síntesis de dichas moléculas y, mediante técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear, el proyecto concluyó con la obtención de JMAB-2-C1 y los intermediarios para JMAB-2-A1, A2, E1 Y E2, con rendimientos del 9.5 %, 27.7 % y 43.39 % respectivamente.

### **Palabras clave:**

Epilepsia, levetiracetam, SV2A, síntesis orgánica, análogos, modelado molecular.

## ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder that affects 0.5% to 1.5% of the global population, regardless of age, sex, race, or economic status. To treatment there are three generations of drugs that have anticonvulsant effects; however, these are not always effective, causing various secondary reactions and serious adverse effects in patients. One of these drugs is levetiracetam. This anticonvulsant drug stands out from the others as it has a unique and novel mechanism of action as it interacts with the SV2A protein, doing it an excellent treatment option used in patients with epilepsy. Unfortunately, there is a certain percentage of patients who do not respond to levetiracetam treatment, so it is important to expand the range of this type of drug that may have anticonvulsant effects. Due to this, in the present work, the computational study of SV2A and the organic synthesis of the new levetiracetam analogs were carried out, which presented a high docking score, calculated by molecular docking, to the SV2A receptor and a possible better ADME profile than the compounds previously designed by the research group, with the purpose of obtain a greater number of molecules structurally related to levetiracetam and with a possible anticonvulsant action. Firstly, by computational techniques, the three-dimensional structure of SV2A was obtained through homology modeling and molecular dynamics, later induced fit coupling studies of 12 new levetiracetam analogs were carried out, finally the synthesis of these molecules was carried out and, by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, the project concluded with the obtaining of JMAB-2-C1 and the intermediates for JMAB-2-A1, A2, E1 Y E2, with yields of 9.5%, 27.7% and 43.39% respectively..

**Keywords:** Epilepsy, levetiracetam, SV2A, organic synthesis, analogs, molecular modelling.



# ÍNDICE

	Página
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Generalidades de la epilepsia	12
2.2. Fármacos antiepilépticos	13
2.3. Levetiracetam y otros racetams	15
2.4. Proteínas de vesículas sinápticas 2	17
2.5. Proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A)	18
2.6. Diseño de Fármacos Asistido por Computadora	20
2.7. Antecedentes del grupo de trabajo	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos específicos	25
6. METODOLOGIA	26
6.1. Estudio computacional de SV2A	26
6.2. Síntesis orgánica y caracterización química	27
6.3. Rutas sintéticas propuestas para las moléculas análogas del levetiracetam.	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
8. CONCLUSIONES	49
9. PERSPECTIVAS	50
10. REFERENCIAS	51
11. ANEXOS	56

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de FAE por generaciones.	13
<b>Tabla 2.</b> Efectos antiepilépticos sobre la causa y propagación de la crisis.	14
<b>Tabla 3.</b> Docking score de moléculas sintetizadas previamente y las nuevas moléculas propuestas.	22
<b>Tabla 4.</b> Compuestos JMAB-2.	27
<b>Tabla 5.</b> Análisis de calidad de los modelos por homología.	32
<b>Tabla 6.</b> Análisis de calidad de los C1 de los modelos de SV2A.	35
<b>Tabla 7.</b> Resultados de los estudios docking.	37
<b>Tabla 8.</b> Resultados de síntesis.	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos.	15
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular de racetams anticonvulsivos.	15
<b>Figura 3.</b> Ruta quimioenzimática para obtención de levetiracetam.	16
<b>Figura 4.</b> Síntesis por obtención sustentable de levetiracetam.	16
<b>Figura 5.</b> Proteínas SV2.	17
<b>Figura 6.</b> Estructura primaria de la proteína SV2A.	18
<b>Figura 7.</b> Modelo estructural de la proteína SV2A.	19
<b>Figura 8.</b> Moléculas sintetizadas análogas del levetiracetam y su efecto anticonvulsivo en el modelo de Litio-pilocarpina.	21
<b>Figura 9.</b> Diagrama de propiedades ADME-Tox.	23

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
<b>Esquema 1.</b> Serie de reacciones para a síntesis de los compuestos JMAB-2-A1 y JMAB-2-A2 para el anillo de bencimidazol.	28
<b>Esquema 2.</b> Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-B1 y JMAB-2-B2 para el anillo de benzotiazol.	29
<b>Esquema 3.</b> Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-C1 y JMAB-2-C2 para el anillo de quinolina.	29
<b>Esquema 4.</b> Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-D1 y JMAB-2-D2 para el anillo de indól.	29
<b>Esquema 5.</b> Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-E1 y JMAB-2-E2 para el anillo de indazol.	30
<b>Esquema 6.</b> Serie de reacciones para la formación del anillo de pirrolidona cuando en posición 4 del anillo no se encuentra un sustituyente distinto a los hidrógenos.	30
<b>Esquema 7.</b> Serie de reacciones para la formación del anillo de pirrolidona cuando en posición 4 del anillo se encuentra un grupo propilo como sustituyente.	30
<b>Esquema 8.</b> Serie de reacciones para la obtención de 1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona (JMAB-2-A1).	42
<b>Esquema 9.</b> Serie de reacciones para la obtención de 7-aminobenimidazol (intermediario de JMAB-2-A1 y JMAB-2-A2).	44
<b>Esquema 10.</b> Serie de reacciones para la obtención de la molécula 4-nitroindazol (intermediario de JMAB-2-E1 y JMAB-2-E2).	45
<b>Esquema 11.</b> Serie de reacciones para la obtención de 3-formilpentanoato de etilo (Reacción de prueba)	46
<b>Esquema 12.</b> Serie de reacciones para la obtención de la molécula 4-nitrobenzotiazol (Intermediario de JMAB-2-B1 y JMAB-2-B2).	47

## 1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una de las afecciones cerebrales más comunes a nivel mundial, llegando a afectar a más de 70 millones de personas sin hacer distinción de edad, sexo y género. Esta enfermedad se caracteriza por disparos neuronales descontrolados, de forma local o generalizada, en el cerebro. Este trastorno puede presentarse en cualquier edad; sin embargo, se ha reportado mayor porcentaje de incidencia en la población infantil (niños de 0 a 1 años) y en adultos de la tercera edad (>60 años). Aunque en la actualidad exista una gran variedad de medicamentos para la epilepsia, aproximadamente un tercio de los pacientes que presentan este desorden no responden a su tratamiento, por lo tanto, se dice que padecen de epilepsia “intratable” o “refractaria”, que exige el diseño de nuevos agentes antiepilépticos con mecanismos de acción innovadores. Existen tres generaciones de fármacos anticonvulsivos (FAE) utilizados para el tratamiento de la epilepsia; sin embargo, se ha encontrado que los fármacos de primera generación generan numerosas reacciones secundarias destacando daño hepático, alteraciones gastrointestinales, teratogenicidad, ataxia, entre otras. Entre los medicamentos de segunda generación se encuentra el levetiracetam, un derivado de la pirrolidona, cuyo mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de canales de calcio y potasio presinápticos y especialmente a la unión de este fármaco con la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A), proteína de 742 aminoácidos que tiene una estructura de 12 dominios transmembranales. El levetiracetam es un fármaco de gran importancia para el tratamiento de la epilepsia debido a sus grandes ventajas que tiene sobre otros fármacos indicados para el mismo tratamiento; sin embargo, existe un cierto porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento, por lo que resulta importante ampliar la gama de este tipo de fármacos que puedan presentar efectos anticonvulsivos. Debido a esto, en el presente trabajo se realizaron estudios computacionales de la proteína SV2A y la síntesis química de análogos del levetiracetam, encontrando ciertas características estructurales que podrían permitir la interacción de estas moléculas con el receptor, produciendo un posible efecto anticonvulsivo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de la epilepsia

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Liga Internacional Contra la Epilepsia (*International League Against, Epilepsy*, ILAE), se define a la epilepsia como un trastorno cerebral no transmisible, crónico que afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. Se caracteriza principalmente por convulsiones recurrentes, que son episodios breves de movimiento involuntario que pueden involucrar una parte del cuerpo (parcial) o todo el cuerpo (generalizado) que en ocasiones se acompañan de pérdida de conciencia y control de la función intestinal (OMS, 2019). Las convulsiones se deben a descargas eléctricas excesivas de grupos de células cerebrales que pueden producirse en diferentes partes del cerebro. Las convulsiones pueden ir desde episodios muy breves de ausencia o de contracciones musculares hasta convulsiones prolongadas y graves. Su frecuencia también puede variar desde al menos una al año hasta varias al día. Las características de las convulsiones varían y dependen de en qué parte del cerebro comienza la alteración y cómo se propaga. Ocurren síntomas temporales, como pérdida del conocimiento o la conciencia, y alteraciones del movimiento, de los sentidos (incluyendo visión, audición y gusto), estado de ánimo u otras funciones cognitivas (OMS, 2019; Fisher *et al.*, 2014).

Casi el 80 % de las personas con epilepsia viven en países de ingresos bajos y medios. En muchas partes del mundo, la epilepsia aún está estigmatizada y es posible que las personas no reciban tratamiento (OMS, 2019). Este trastorno debe ser una prioridad de salud mundial, especialmente porque existen tratamientos rentables que pueden reducir sustancialmente la morbilidad, la discapacidad y la mortalidad. En 1997, la OMS, junto con la ILAE y la Oficina Internacional para la Epilepsia, lanzó la Campaña Mundial contra la Epilepsia, que resultó en la Asamblea Mundial de la Salud de 2015 instando a todos los estados a abordar las necesidades específicas de las personas con epilepsia (Thijs *et al.*, 2019).

La etiología de la epilepsia puede clasificarse de distintas maneras, entre ellos puede ser de origen idiopático, cuando se desconoce su causa y se identifican factores genéticos implicados, pero no existe otra enfermedad más que la propia epilepsia. En el origen sintomático, se presenta una causa clara subyacente, como por ejemplo un trastorno del Sistema Nervioso Central (SNC) que aumenta el riesgo de epilepsia (traumatismo craneoencefálico, un accidente cerebrovascular (ACV), meningitis o una patología metabólica). Por último, puede ser de origen criptogenético o probablemente sintomático, cuando se sospecha la existencia de un trastorno del SNC o causa sintomática pero no puede ser determinada por los medios actuales (Fuentes de Gilbert, 2007).

Existen distintos tipos de crisis epilépticas y se pueden clasificar en crisis de inicio focal, de inicio generalizado o de inicio desconocido. Las crisis generalizadas involucran una actividad anormal en ambos hemisferios cerebrales de manera simultánea, las personas con epilepsias generalizadas pueden presentar diversos tipos de crisis, entre ellas, crisis de ausencia, mioclónicas, atónicas, tónicas y tónico-clónicas. Mientras que las

crisis de inicio focal afectan a un solo hemisferio, observándose diversos tipos de crisis, como crisis focales con pérdida de la conciencia, crisis focales con afectación de la conciencia, crisis focales motoras, crisis focales no motoras y crisis bilaterales tónico-clónicas, algunos ejemplos son la epilepsia de lóbulo temporal (ELT), la epilepsia de lóbulo frontal, parietal u occipital. Para las crisis de inicio desconocido se entiende que el paciente tiene epilepsia, pero el médico no puede determinar si el tipo de epilepsia es focal o generalizada porque no se dispone de suficiente información (Scheffer, 2017).

La ELT es un ejemplo de epilepsia focal que se origina en una o varias de las localizaciones anatómicas del orbe temporal y que puede extenderse a través de una red de interconexiones neuronales al tejido cerebral adyacente. La ELT se caracteriza principalmente por convulsiones parciales que se originan en el hipocampo, la corteza entorrinal o la amígdala muchos años después de una lesión cerebral inicial que puede ser provocada por un estado epiléptico (EE), encefalitis o convulsiones febriles. Aproximadamente el 60 % de todos los pacientes con epilepsia padecen epilepsia focal, haciendo de esta el tipo de epilepsia más común; en un tercio de estos casos, se localizan mayoritariamente en el lóbulo temporal, no existe un control suficiente tras el tratamiento con varios fármacos antiepilépticos (Lévesque *et al.*, 2013; Pascual, 2007).

## 2.2 Fármacos antiepilépticos

Existen más de 25 fármacos antiepilépticos (FAE) aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos por sus siglas en inglés) que pueden clasificarse según la cronología de su desarrollo en tres distintas generaciones (Tabla 1) (López-González, 2016; Sankaraneni *et al.*, 2015).

**Tabla 1. Clasificación de FAE por generaciones** (Reimers & Brodtkorb, 2012; Sankaraneni *et al.*, 2015).

Primera generación	Segunda generación	Tercera generación
Fenobarbital	Vigabatrina	Eslicarbazepina
Fenitoína	Oxcarbazepina	Lacosamida
Primidona	Lamotrigina	Retigabina
Carbamazepina	Gabapentina	Vigabatrina
Ácido Valproico	Felbamato	Fosfenitoína
Etosuximida	Topiramato	Clobazam
	Tiagabina	Perampanel
	Levetiracetam	Brivaracetam
	Pregabalina	Cannabidiol
	Zonisamida	Everolimus
	Estiripentol	
	Rufinamida	

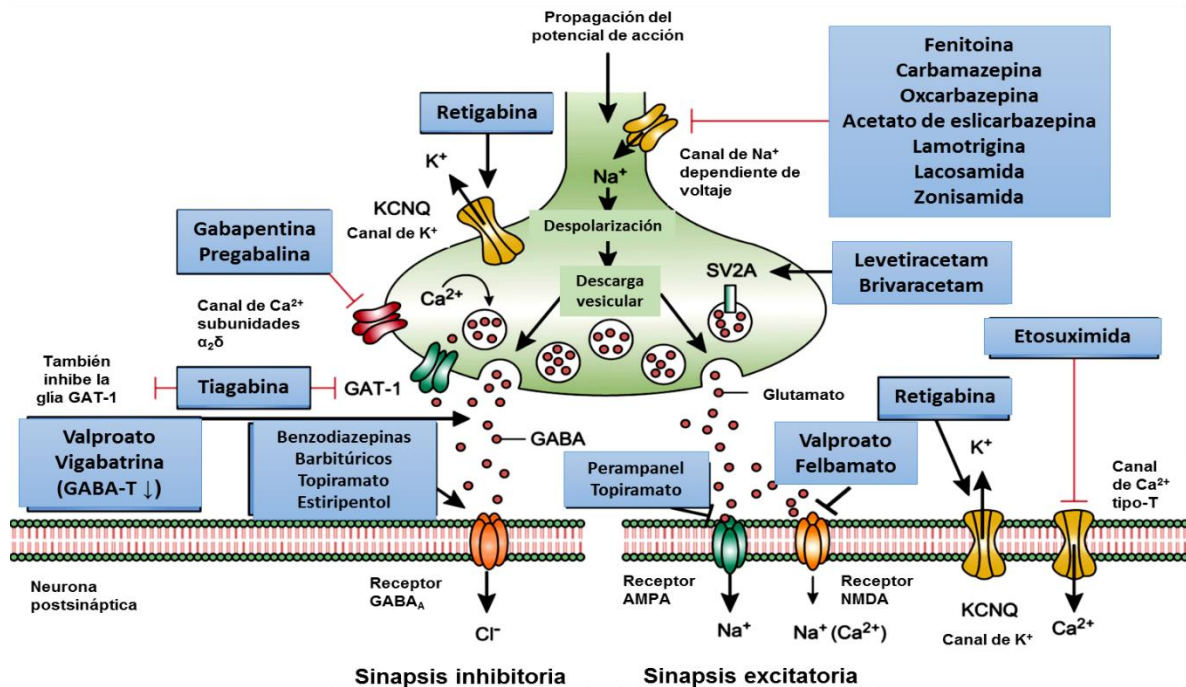
En la actualidad se sabe que un fármaco antiepiléptico ideal debe ser aquel que experimenta un metabolismo hepático mínimo o nulo, soluble en agua, debe tener menos potencial de presentar interacciones con otros medicamentos, así como una menor capacidad de unión a proteínas plasmáticas. Existen fármacos que cumplen con ciertas

características antes mencionadas, pero aún están lejos de ser un FAE ideal ya que además de ello, sus mecanismos de acción no están bien definidos (Vidaurre *et al.*, 2017).

La mayor parte de los medicamentos anticonvulsivos tienen poco efecto sobre el foco epiléptico. Su efecto consiste en evitar la propagación de la descarga a estructuras vecinas normales. En la Tabla 2 pueden observarse los efectos antiepilépticos más importantes sobre la causa y la propagación de las crisis (López-González, 2016), mientras que en la Figura 1 se puede apreciar un esquema general de los mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos (Löscher *et al.*, 2016).

**Tabla 2. Efectos antiepilépticos sobre la causa y propagación de la crisis (López-González, 2016).**

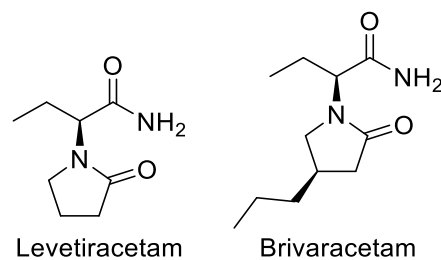
Mecanismo	Observaciones	Ejemplos
Inhibición de los canales de sodio	Los medicamentos que actúan de esta manera se unen a la forma inactiva de los canales de sodio, cerrando el canal dependiente de voltaje.	Fenitoína Carbamazepina Valproato Sódico
Inhibición de los canales de calcio	Existen varios tipos de canales de calcio con diferentes características eléctricas. El calcio interviene en la liberación de neurotransmisores y da paso a la despolarización continua de la membrana y los cambios en la descarga paroxística. Los fármacos actúan reduciendo la entrada de calcio y la liberación de neurotransmisores.	Valproato Etosuximida
Regulación del efecto de GABA	El efecto inhibitorio de GABA se puede regular por distintos mecanismos: aumentando la síntesis, promoviendo la liberación, facilitando la acción sobre el receptor, impidiendo la recaptura e inhibiendo su degradación.	Benzodiazepinas
Inhibición de la excitación glutamatérgica	La excitación mediada por el ácido glutámico puede inhibirse limitando su liberación, bloqueando el efecto sobre el receptor NMDA; este receptor tiene la acción de amplificar la respuesta al repolarizar neuronas que estaban despolarizadas.	Lamotrigina



**Figura 1. Principales mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos** (Imagen adaptada de Löscher *et al.*, 2016; Chávez-Elías, 2018).

### 2.3 Levetiracetam y otros racetams

El levetiracetam (LEV) es el enantiómero (S) del compuesto racémico etiracetam, usado de manera terapéutica para controlar la epilepsia, particularmente para el tratamiento de convulsiones en adultos y niños. Es un fármaco antiepiléptico de segunda generación (Alrabiah, 2019).



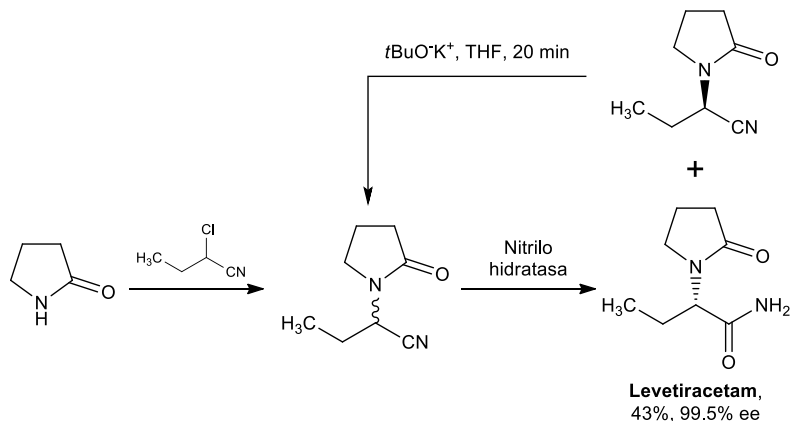
**Figura 2. Estructura molecular de racetams anticonvulsivos.** Está conformada por una lactama de cinco miembros y en posición 1 (unido directamente al nitrógeno) se encuentra la *n*-butanamida.

El levetiracetam tiene una estructura novedosa (Figura 2) y mecanismos de acción únicos. A diferencia de otros FAE, los mecanismos de acción del levetiracetam parecen implicar la unión neuronal a la proteína 2A de la vesícula sináptica, inhibiendo la liberación de calcio de las reservas intraneuronales, oponiéndose a la actividad de los moduladores negativos de las corrientes reguladas por GABA y glicina e inhibiendo la actividad sincronizada excesiva entre neuronas. Además, el levetiracetam inhibe los canales de calcio de tipo N. El levetiracetam se asocia con una absorción rápida y completa, una alta biodisponibilidad oral, un metabolismo mínimo que consiste en la hidrólisis del grupo acetamida y principalmente la eliminación renal. Carece de potencial inductor de



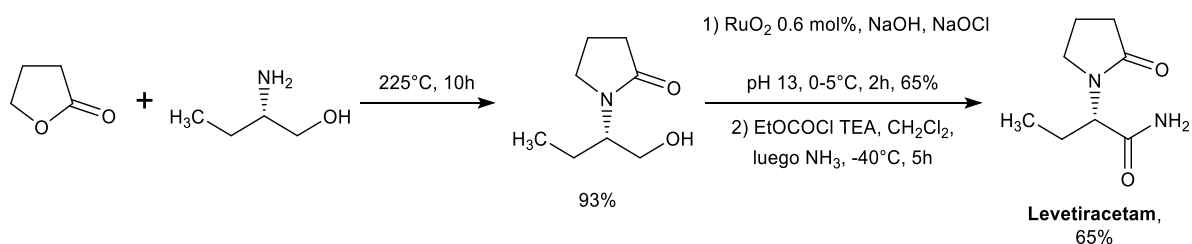
isoenzimas del citocromo P450 y no se asocia con interacciones farmacocinéticas clínicamente significativas con otros fármacos, incluidos otros FAE (Lyseng-Williamson, 2011). Aun así, estudios han demostrado que Levetiracetam ha sido efectivo solamente en un 35 % de los pacientes, quienes disminuyeron >50 % las convulsiones con dicho tratamiento (Privitera, 2001).

La síntesis original de esta molécula implica el uso de agentes protectores y generación de muchos residuos salinos, además de la resolución de la amina utilizada como materia prima (Surtees *et al.*, 2011). Para la síntesis industrial de este API (*active pharmaceutical ingredient*, ingrediente farmacéutico activo), se han propuesto dos rutas, una quimioenzimática (Figura 3) y otra con química orgánica sustentable (Figura 4).



**Figura 3. Ruta quimioenzimática para obtención de levetiracetam** (Tucker *et al.*, 2009).

En la ruta quimioenzimática, se parte de la pirrolidona y el 2-clorobutanonitrilo, los cuales reaccionan para dar el 2-(2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanonitrilo. Éste se resuelve dinámicamente con una nitrilo hidratasa (obtenidas por mutación dirigida, provenientes de microorganismos de los géneros *Rhodococcus* y *Agrobacter*). Después de purificado, se da un rendimiento aceptable para el levetiracetam y un alto grado de pureza enantiomérica, mientras que el isómero *R* se recicla por racemización en medio básico aumentando el rendimiento final del procedimiento (Tucker *et al.*, 2009).



**Figura 4. Síntesis por obtención sustentable de levetiracetam** (Mylavarapu *et al.*, 2010; Neelakandan *et al.*, 2013).

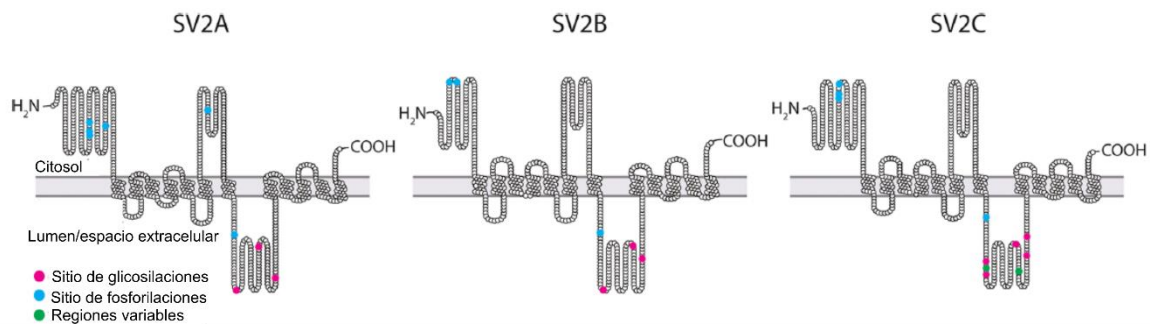
En el caso de la obtención por síntesis sustentable del levetiracetam, se realiza una condensación de la butirolactona con (S)-2-aminobutanol sin disolvente que aumenta la sustentabilidad del proceso. La pirrolidona resultante actúa como grupo protector ante la oxidación catalítica del alcohol para obtener el ácido y posteriormente su amidación para obtener este API (Mylavarapu *et al.*, 2010; Neelakandan *et al.*, 2013).

## 2.4 Proteínas de vesículas sinápticas tipo 2

La glicoproteína 2 de la vesícula sináptica (SV2) es un prototipo de proteína identificada específicamente en las vesículas sinápticas de las neuronas, que consta de tres isoformas diferentes, SV2A, SV2B y SV2C (Ohno & Tokudome, 2017). Diversos autores mencionan que SV2 es una proteína esencial.

SV2 es una glicoproteína de 80 kD asociada a la membrana. El epítipo de SV2 está presente en peces, anfibios y mamíferos y se localiza específicamente en células neurales y endocrinas. La proteína SV2 contiene 12 dominios transmembranales y 3 sitios de N-glicosilación en el asa intravesicular. La mitad amino-terminal de la proteína muestra una identidad de secuencia de aminoácidos significativa con una familia de proteínas bacterianas que transportan azúcares, citrato y fármacos. Su localización en vesículas, topología de membrana predicha y la identidad de secuencia en transportadores conocidos sugieren que SV2 es un transportador de vesículas sinápticas; sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito el sustrato endógeno que transporta (Bajjalieh, 1992). Asimismo, se requiere de la proteína SV2 para la secreción normal evocada de  $\text{Ca}^{2+}$  de las neuronas (Talbot *et al.*, 2018).

En la Figura 5 se puede observar un esquema de la estructura de cada una de las isoformas de la proteína.



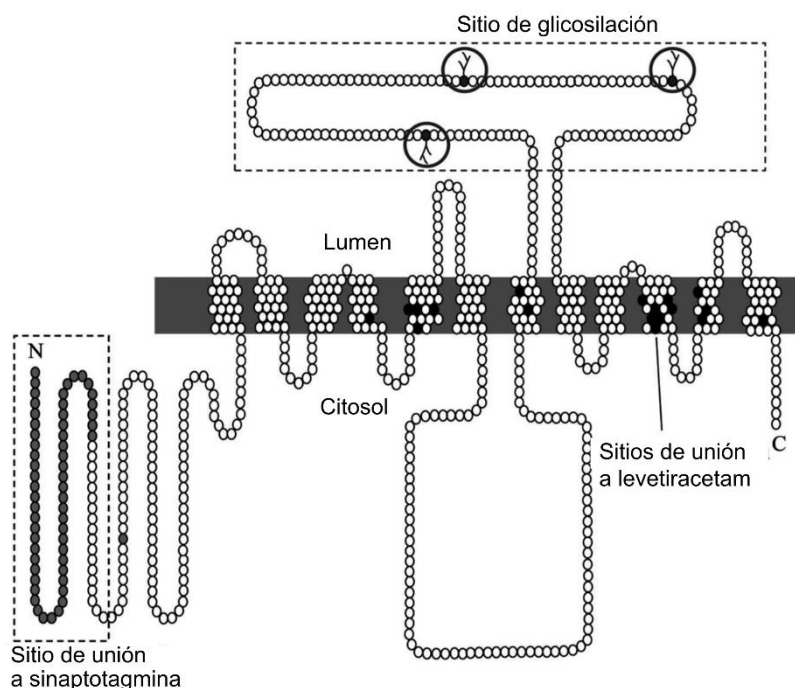
**Figura 5. Proteínas SV2.** Las proteínas SV2 tienen un gran porcentaje de homología, como se visualiza aquí. Los parálogos comparten aproximadamente un 60 % de identidad de secuencia y un 80 % de homología estructural. Las regiones N-terminales son las más variables entre las tres proteínas; esta región está sustancialmente truncada en SV2B. El cuarto bucle interluminal es masivo, lo suficientemente largo como para abarcar todo el ancho de una vesícula sináptica y el sitio de N-glicosilación. Tanto SV2A como SV2B tienen tres sitios de glicosilación. SV2C tiene cinco sitios. Las proteínas también están fosforiladas. El sitio Thr84 está fosforilado por proteínas de la familia 1 de caseína cinasa, que controlan el reclutamiento de sinaptotagmina (Imagen adaptada de Stout *et al.*, 2019).

En modelos animales, los ratones que carecen de la isoforma de expresión más amplia, SV2A, desarrollan convulsiones graves y mueren en las 3 semanas posteriores al nacimiento. Por otra parte, SV2A es el sitio de unión del levetiracetam, un fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*Food and Drug*

*Administration*, FDA) que se utiliza actualmente en el tratamiento de la epilepsia y que también se muestra prometedor para el tratamiento de trastornos de ansiedad, dolor, discinesias y trastorno de estrés postraumático. En la actualidad, SV2A es el único objetivo farmacológico anticonvulsivo en las vesículas sinápticas (Yao *et al.*, 2010).

## 2.5 Proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A)

Si bien las proteínas SV2 se encuentran en todas las vesículas neurosecretoras, los parálogos individuales varían en sus perfiles de expresión. SV2A es el más ubicuo, con expresión en todas las estructuras del cerebro en diversos grados. La expresión de SV2B es más restringida, con una expresión más fuerte en los núcleos trigémino y motor y muy poca expresión en el globo pálido, la circunvolución dentada del hipocampo, el cerebelo y la sustancia negra *pars reticulata*. La expresión de SV2C es la más limitada, se localiza en regiones cerebrales evolutivamente antiguas, con una fuerte expresión en todo el cuerpo estriado, mesencéfalo y pálido ventral y muy poca expresión en la neocorteza (Stout *et al.*, 2019). En la Figura 5 puede observarse un esquema de la estructura primaria de la proteína SV2A.

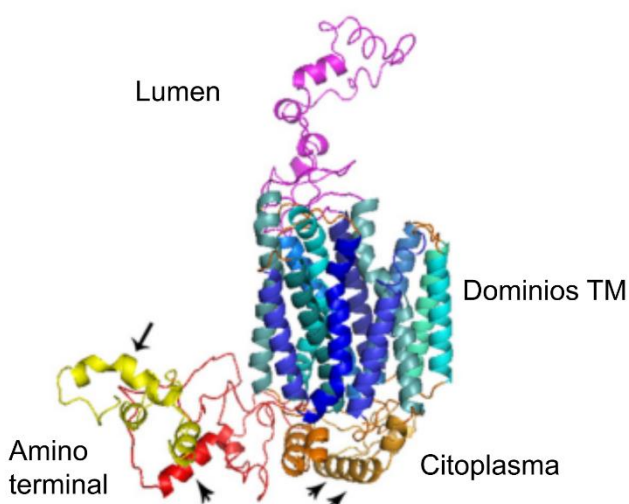


**Figura 6. Estructura primaria de la proteína SV2A.** SV2A está formada por 12 dominios transmembranales; un sitio de unión a sinaptotagmina-1 (SYT-1) y un asa grande entre los dominios 6 y 7, además de una región intraluminal que contiene 3 sitios de glicosilación (marcados con un círculo de color gris). En la región transmembranal se presentan los sitios de unión a LEV y sus análogos (círculos negros) (Figura adaptada de Ohno & Tokudome, 2017).

El gen que codifica a SV2A se encuentra en los cromosomas 1 (1q21.2), 2 (2q34) y 3 (3qF2.1) en humanos, ratas y ratones, respectivamente, y codifica 742 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 83 kDa. La proteína SV2A contiene 12 dominios transmembranales, mientras que el bucle intraluminal grande contiene múltiples sitios de

glicosilación (N498, N548, N573) y sirve como un sitio de unión para las neurotoxinas botulínicas (es decir, BoNT / A y BoNT / E) que inhiben la liberación de neurotransmisores desde los terminales de los axones. SV2A también sirve como un sitio de unión específico para levetiracetam y sus análogos (p. ej., brivaracetam), que se utilizan ampliamente para el tratamiento de convulsiones generalizadas y parciales y están implicados en sus acciones antiepilépticas (Ohno & Tokudome., 2017).

La proteína SV2A consta de 742 aminoácidos distribuidos en 12 dominios transmembranales de cadenas  $\alpha$ -hélices, un dominio intraluminal indefinido y dos dominios citoplasmáticos: un extremo amino terminal relativamente grande con un sitio de unión a la sinaptotagmina 1 (SYT-1) más un motivo de unión a ATP y un bucle grande entre los dominios TM 6-7 con otro motivo de unión a ATP. En la Figura 7 puede observarse el modelo estructural de la proteína SV2A (Correa-Basurto *et al.*, 2015).



**Figura 7. Modelo estructural de la proteína SV2A.** En color magenta se representa el asa que se encuentra en el dominio intraluminal. En diferentes tonalidades de azul se observan los 12 dominios transmembranales ( $\alpha$ -hélices). En color amarillo se observa la región *N*-terminal con el sitio de unión a SYT-1 y en color rojo un motivo de unión a ATP. En color marrón se observa un asa con otros motivos de unión a ATP que están entre los dominios 6-7. La región *N*-terminal, el sitio de unión a SYT-1 y las uniones ATP se encuentran en la parte del citoplasma (Imagen adaptada de Correa-Basurto *et al.*, 2015).

Esta proteína constituye el sitio de unión tanto del levetiracetam como del brivaracetam, de los cuales es el mecanismo de acción único entre los anticonvulsivos. Utilizando técnicas computacionales, se encontraron las principales interacciones que existen entre los ligandos y el sitio de unión, siendo de tipo hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno, identificando además los principales residuos que presentan estas interacciones: T456, S665, W666, D670 y L689 (Shi, 2011; Correa-Basurto *et al.*, 2015). Debido a esta selectividad de unión a SV2A, mayor en brivaracetam que en levetiracetam, estos FAE tienen buen perfil como anticonvulsivos de reemplazo y menor cantidad de efectos adversos (Steinhoff, *et al.*, 2019). Sin embargo, estos fármacos aún presentan efectos adversos, algunos principalmente relacionados con el comportamiento de los pacientes y los de largo plazo; por otra parte, cerca de un tercio de los pacientes con

epilepsia son refractarios a la farmacoterapia y los FAE no tienen efectos en la fisiopatología del trastorno (Reddy, Younus, 2018; Raut & Bhatt, 2020). Por estas razones, es importante la búsqueda de nuevos agentes anticonvulsivos.

## 2.6 Diseño de Fármacos Asistido por Computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) ha tomado gran relevancia en los últimos años en la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, el cual consiste en aplicar una serie de procedimientos desde una computadora para encontrar y relacionar la actividad de un compuesto con su diana biológica. El DiFAC es una rama científica multidisciplinaria conformada principalmente por modelado molecular, bioinformática, química computacional y química teórica. Tiene como objetivo descubrir moléculas activas y optimizar las ya conocidas, así como seleccionar, de un grupo numeroso de estructuras acorde a las propiedades adecuadas, a los candidatos que tengan mayor oportunidad de convertirse en un nuevo fármaco (Hopfinger, 1985; Medina-Franco, 2006; Medina-Franco, *et al.* 2015).

Para la realización del acoplamiento molecular (*docking*) es necesario contar con la estructura tridimensional de la proteína completa o de la región de estudio, dichas estructuras pueden encontrarse, de forma cristalizada, en distintas bases de datos como en Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, cuando no se encuentra dicha estructura tridimensional, es necesario construirla mediante el modelado por homología (Sneha, 2016).

El modelado por homología de proteínas se encarga de encontrar similitudes estructurales, a partir de la secuencia de aminoácidos, con las de una o varias proteínas ya conocidas. De esta manera, el servidor puede construir el modelo, dando como resultado la estructura tridimensional de la proteína de interés con base en los datos del programa. La precisión con la que se generan los modelos depende de la similitud de las secuencias de aminoácidos, una cadena que presente al menos el 50 % de homología en sus secuencias, puede tomarse como un modelo de gran precisión. En caso de que el modelo no cumpla con el 50 % pero se encuentre dentro de un rango de 30 – 50 % de homología, se espera que el 80 % de los carbonos del modelado se mantengan dentro de un rango de 3.5 Å de su posición real. Para los casos en que el modelado no cumpla con los dos criterios anteriores, pueden aparecer un gran número de errores en los estudios posteriores, por lo que se recomienda seleccionar a las mejores plantillas con el mejor resultado de homología (Aguilera-Durán, 2021).

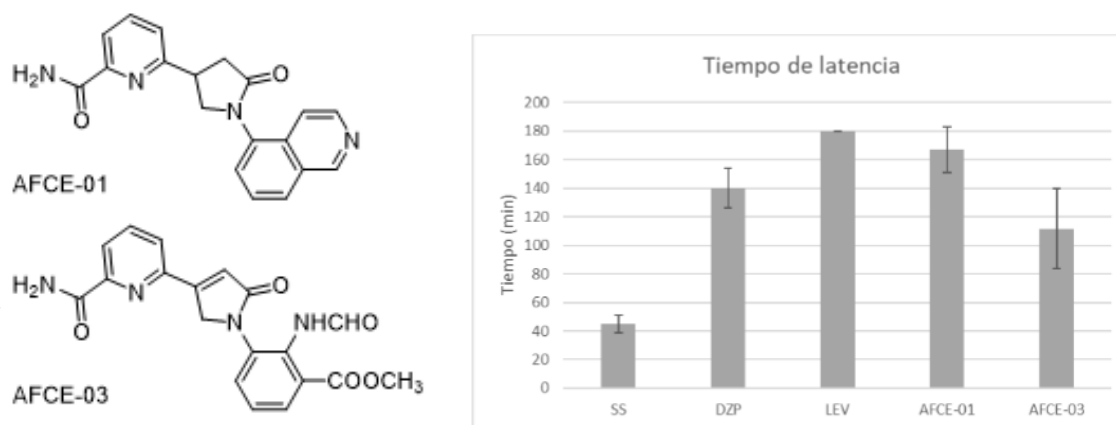
La mejor manera de conocer el comportamiento de las proteínas, sus cambios conformacionales, sus estados de relajación y hasta sus interacciones que se presentan en presencia de un ligando, sin duda alguna son las simulaciones de Dinámica Molecular (DM) (Dämgen, 2018). La DM permite el estudio de las proteínas bajo estándares termodinámicos constantes (presión, volumen y temperatura), así mismo, permite simular el comportamiento de la estructura tridimensional en un sistema similar al nativo (de membrana o citosólica) (Mitsutake, 2013), además de permitir calcular, con una gran aproximación, la energía de unión de un ligando con una proteína (Londhe *et al.*, 2019).

Los estudios de *docking* nos permiten estudiar y conocer las interacciones que existen entre un ligando (generalmente es una molécula pequeña) con una diana biológica (receptor, enzima, canal, transportador, entre otros). Los programas que realizan *docking* básicamente se encargan de realizar una búsqueda exhaustiva para encontrar el mejor acoplamiento del ligando en la diana (*score*) basado en el cálculo de energía de unión, con ello, se pueden diseñar nuevas moléculas que presenten un mejor score sobre una diana de interés (Aguilera-Durán, 2021).

## 2.7 Antecedentes del grupo de trabajo

En el grupo de trabajo de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro (DACSIF-UAQ), se realizaron estudios basados en el ligando, con la finalidad de identificar otro farmacóforo de los racetams y proponer nuevas estructuras. Se analizaron 89 ligandos análogos a LEV reportados en la literatura y se construyó un nuevo modelo farmacofórico. Este modelo permitió el diseño de más de 300 estructuras nuevas, las cuales presentaron el anillo de la pirrolidona que proporciona un aceptor de puente de hidrógeno, una subestructura aromática en la posición 4 del anillo con quiralidad definida y en posición 1 una subestructura heterocíclica con capacidad de adquirir carga positiva y con donadores de puentes de hidrógeno (Chávez-Elías, 2018).

En dicho trabajo realizado en el 2017 por Amelia Chávez Elías para la obtención del grado de Maestría en Ciencias Químico Biológicas, se lograron sintetizar dos moléculas nuevas análogas del levetiracetam (AFCE-01 y AFCE-03), donde AFCE-01 presentó actividad biológica anticonvulsiva muy parecida al levetiracetam, dejando la expectativa de la síntesis de un mayor número de moléculas análogas de dicho fármaco que pudieran presentar una actividad anticonvulsiva aún mejor. En la Figura 8 se pueden observar los resultados que se lograron en dicha investigación.

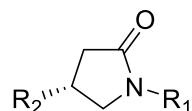


**Figura 8. Moléculas sintetizadas análogas del levetiracetam y su efecto anticonvulsivo en el modelo de Litio-pilocarpina.** En ambas moléculas (AFCE-01 Y AFCE-03) se observa el anillo de pirrolidona con sus respectivos sustituyentes en posición 1 y 4. Para medir su actividad biológica se midió el tiempo de latencia para el desarrollo de crisis convulsivas en un modelo de crisis inducida mediante litio-pilocarpina, observándose que ambos compuestos presentan actividad biológica (Chávez-Elías, 2018).

A pesar de la actividad anticonvulsiva de ambos compuestos, su síntesis requiere de múltiples pasos con dificultad sintética considerable, además de tener una complejidad estructural que tiene consecuencias en sus propiedades fisicoquímicas. Debido a esto, se realizaron estudios de *docking* consenso, realizado en diferentes estructuras del modelo de SV2A, lo que derivó en el diseño de una nueva generación de moléculas, considerando la predicción de propiedades fisicoquímicas ideales, de las cuales se eligieron ocho nuevas moléculas, dichos estudios de *docking* presentaron afinidad teórica con SV2A comparable a la de LEV y un mejor perfil ADME teórico que las previamente sintetizadas. La razón de las modificaciones elegidas fue que la presencia de los grupos aromáticos en 4 podrían ser la causa de las propiedades fisicoquímicas pobres, regresándose a los grupos presentes de hidrógeno y *n*-propilo; mientras que en la posición 1 se han reportado que la sustitución por anillos heterocíclicos aromáticos incrementa la afinidad hacia la proteína SV2A (Mercier, *et al.*, 2014).

En la Tabla 3 podemos observar que las tres moléculas previamente sintetizadas presentan un mejor *docking* score, ya que presentan mejores valores negativos, que las ocho nuevas moléculas. Sin embargo, la predicción ADME indica que las nuevas moléculas seleccionadas pueden tener la capacidad de atravesar barrera hematoencefálica (Figura 9) como lo indica el diagrama de huevo cocido, confiriéndoles un mejor perfil ADME teórico.

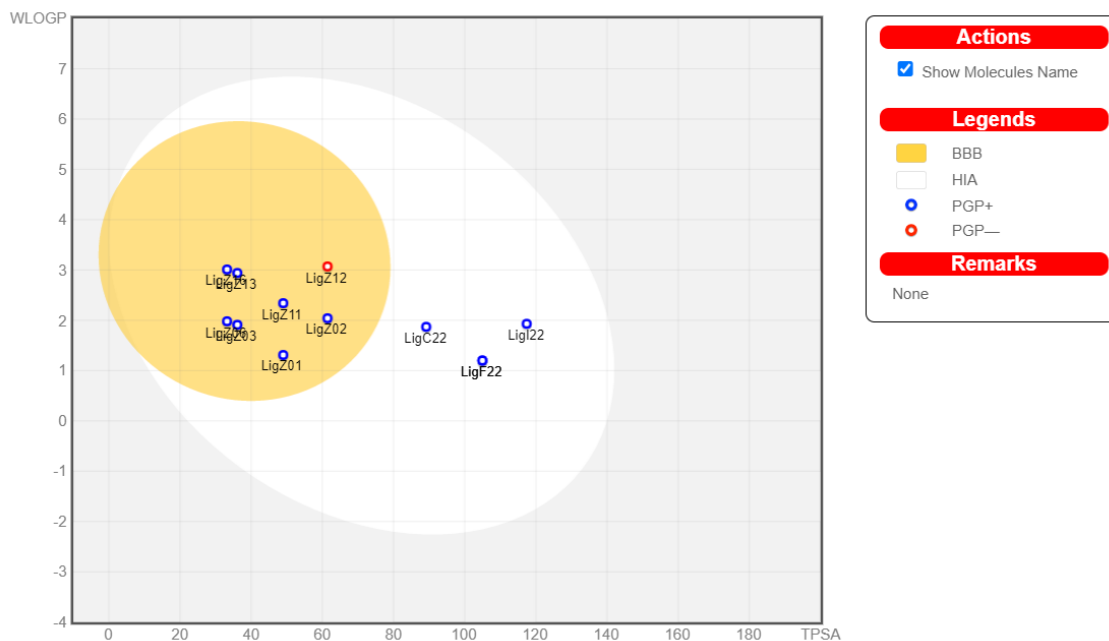
**Tabla 3. *Docking* score de moléculas sintetizadas previamente y las nuevas moléculas propuestas.**



Clave <i>docking</i>	Clave síntesis	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<i>Docking</i> score (kcal/mol)	
				promedio	SD
<b>C22</b>	AFCE-2-01	Isoquinolin-5-il	4-(aminocarbonil)piridin-2-il	-6.798	3.575
<b>F22</b>	AFCE-2-02	1 <i>H</i> -bencimidazol-4(7)-il	4-(aminocarbonil)piridin-2-il	-7.594	2.478
<b>I22</b>	AFCE-2-03	Benzotiazol-5-il	4-(aminocarbonil)piridin-2-il	-7.070	2.892
<b>Z01</b>	JMAB-2-A1	1 <i>H</i> -bencimidazol-4(7)-il	H	-4.814	0.746
<b>Z02</b>	JMAB-2-B1	Benzotiazol-5-il	H	-5.106	0.460
<b>Z03</b>	JMAB-2-D1	Indol-4-il	H	-5.694	0.831
<b>Z06</b>	JMAB-2-C1	Isoquinolin-5-il	H	-4.188	0.766
<b>Z11</b>	JMAB-2-A2	1 <i>H</i> -bencimidazol-4(7)-il	<i>n</i> -Pr	-5.458	0.911
<b>Z12</b>	JMAB-2-B2	Benzotiazol-5-il	<i>n</i> -Pr	-5.842	0.790
<b>Z13</b>	JMAB-2-D2	Indol-4-il	<i>n</i> -Pr	-6.412	0.953
<b>Z16</b>	JMAB-2-C2	Isoquinolin-5-il	<i>n</i> -Pr	-4.916	1.290

De las ocho moléculas seleccionadas, cuatro de ellas tienen en posición 4 un hidrógeno, mientras que las otras cuatro moléculas tienen un grupo *n*-propilo en la misma posición; en la posición 1 donde se encuentra el grupo amino se estableció un grupo diferente para cada una de las moléculas: un núcleo de benzotiazol, uno de bencimidazol, uno de isoquinolina y uno de indol (Tabla 4; ver metodología). Estas modificaciones, teóricamente permiten aumentar su actividad anticonvulsiva manteniendo los beneficios del

levetiracetam como fármaco anticonvulsivo, dado que presentan una mejor interacción con SV2A (Daina *et al.*, 2016).



**Figura 9. Diagrama de propiedades ADME-Tox.** El diagrama muestra que las ocho moléculas propuestas tienen mejores propiedades fisicoquímicas que permiten atravesar la barrera hematoencefálica a diferencia de las 3 moléculas previamente sintetizadas. La zona blanca (clara del huevo), indica el exterior de la barrera mientras que la zona amarilla (yema de huevo) indica el interior de la barrera hematoencefálica (Daina *et al.*, 2016).

A pesar de que en los estudios computacionales se obtuvieron resultados favorables para la síntesis de estas ocho moléculas, el grupo de trabajo se percató que dichos resultados podrían carecer de certeza, esto debido a que las dinámicas moleculares contaban con un campo de fuerza poco apropiado, muy general y poco específico para proteínas como lo es OPLS-AA, además de ser simulaciones relativamente cortas (50 ns), ya que al realizar simulaciones con una duración mayor (100-200 ns) el modelo perdía coherencia en las regiones luminales y citosólicas, estados conformacionales clave para SV2A en presencia del ligando LEV (Lee, 2015; Contreras-García *et al.*, 2022).

Por lo tanto, en el presente trabajo, se realizaron nuevos estudios computacionales con nuevos modelos de SV2A, con simulaciones más largas y prestando especial atención en las conformaciones estructurales cuando SV2A se encuentra abierto hacia el citosol o hacia la zona intravesicular, así como nuevos estudios de *docking* con las nuevas moléculas. Por último, se realizó la síntesis y caracterización de las respectivas moléculas.



### 3. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico que afecta del 0.5 % al 1.5 % de la población a nivel global, sin hacer distinción de edad, sexo, raza o estatus económico.

En la actualidad, existen tres generaciones de fármacos anticonvulsivos los cuales llegan a administrarse como monoterapia o en combinaciones para obtener el efecto esperado; sin embargo, no siempre se logran estos efectos, causando, además, diversas reacciones secundarias y efectos adversos graves en los pacientes. Razón suficiente para no considerar a estos medicamentos como fármacos anticonvulsivos ideales. Por otra parte, levetiracetam es un fármaco anticonvulsivo de segunda generación de alta biodisponibilidad, amplio espectro, baja interacción con otros fármacos, eliminación vía renal y con un mecanismo de acción único y novedoso, estas características hacen del levetiracetam un excelente fármaco empleado en pacientes con epilepsia.

Aun así, existe un porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento del levetiracetam, por lo que resulta importante ampliar la gama de este tipo de fármacos que puedan presentar efectos anticonvulsivos. A través de estudios computacionales de la proteína SV2A y de la síntesis química de análogos del levetiracetam, se han encontrado ciertas características estructurales que permiten la interacción de estas moléculas con el receptor, produciendo un efecto anticonvulsivo. Sin embargo, estos compuestos sintetizados anteriormente no han sido completamente satisfactorios, por lo que generación de más compuestos afines con el receptor SV2A permitirá un mayor enriquecimiento para la búsqueda de nuevos fármacos ideales anticonvulsivos para el tratamiento de la epilepsia.

Debido a esto, un nuevo estudio computacional y la síntesis orgánica de nuevos análogos del levetiracetam con alta afinidad al receptor SV2A y un posible mejor perfil ADME, proveerá un mayor número de moléculas estructuralmente relacionados con levetiracetam con una posible acción anticonvulsiva, esto servirá para ampliar las opciones de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia, incluyendo a los pacientes que actualmente muestran resistencia a los medicamentos ya existentes.

## 4. HIPÓTESIS

El acoplamiento molecular entre las moléculas análogas a levetiracetam, con la estructura tridimensional de SV2A obtenida mediante modelado por homología y simulaciones de dinámica molecular, permitirá observar las interacciones intermoleculares y un mayor *docking score* que levetiracetam, reforzando la pertinencia de sintetizarlas y sugiriendo que puedan tener una posible mayor actividad antiepiléptica que este fármaco.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar las interacciones intermoleculares y el *docking score* de nuevos análogos de levetiracetam con una nueva estructura tridimensional de SV2A y llevar a cabo la síntesis de estos.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Modelar la estructura tridimensional de SV2A mediante modelado por homología y simulaciones de dinámica molecular.
- 2) Evaluar los análogos de levetiracetam mediante acoplamiento molecular con SV2A.
- 3) Sintetizar los compuestos análogos a levetiracetam.
- 4) Caracterizar la estructura de las moléculas sintetizadas por medio de las técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 Estudio computacional de SV2A

#### 6.1.1 Estructura de SV2A y modelado por homología

La secuencia de aminoácidos (a.a.) de la proteína SV2A fue obtenida de la base de datos de UniProt (Consortium, 2017). El modelado por homología se realizó mediante los servidores de licencia abierta I-TASSER y Robetta (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014; Zhang, 2008).

#### 6.1.2 Modelo por homología de SV2A

Para la obtención de los modelos por homología, la secuencia completa de SV2A de 742 a.a. (código UniProt Q7L0J3), la región del amino terminal 1-169 a.a. y la región intravesicular 469-598 a.a., fueron cargadas en el servidor web de I-TASSER y de Robetta. Para el caso de las regiones transmembranales, estas fueron obtenidas directamente del modelo de AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2021). Todas las regiones modeladas por separado fueron unidas de manera manual para la construcción del modelo final en el programa Schrödinger Maestro (Maestro-Desmond Interoperability Tools, 2020) y posteriormente se le realizó un análisis de calidad en el servidor web MolProbity (Chen *et al.*, 2009).

#### 6.1.3 Simulaciones de Dinámica Molecular

Una vez obtenidos los modelos, se llevó a cabo una simulación de DM, con el objetivo de encontrar una conformación energéticamente favorecida de SV2A para los estudios posteriores. La construcción del sistema se realizó en el módulo Martini Maker del servidor web CHARMM-GUI, para obtener la topología de tipo *Coarse Grained* (CG). Las simulaciones de tipo CG fueron realizadas en Gromacs 2021.6 (Berendsen *et al.*, 1995; Van Der Spoel *et al.*, 2005) utilizando el campo de fuerza Elnedynp22 y Martini22p en un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 1 atm de presión y 310.15 K de temperatura, se adicionó una membrana de POPC, se utilizó un modelo de agua polarizable (PW) y se agregaron los iones correspondientes para neutralizar el sistema (NaCl, 0.15 M). Los sistemas se sometieron a los pasos de equilibrio y minimización recomendados por el servidor, similares a los necesarios en las simulaciones *all-atom* (AA), previo al paso de producción empleando un acoplamiento de temperatura y cambios de escala de velocidad en un término estocástico (Parrinello y Rahman, 1981). Para encontrar las estructuras representativas en la simulación se utilizó el algoritmo "gromos". Posteriormente, las topologías de tipo CG fueron convertidas a topologías AA en el módulo "All-Atom Converter" de "Martini Maker" en CHARMM-GUI (Jo *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2015; Brooks *et al.*, 2009) y se realizó un análisis de calidad en el servidor MolProbity para seleccionar la estructura a utilizar en los estudios posteriores (Chen *et al.*, 2009).

#### 6.1.4 Acoplamiento molecular

Ya seleccionada la mejor estructura de SV2A, se calculó un *GridBox* de 80 x 80 x 80 npts (número de puntos de *grid*) con un *spacing* de 0.375 Å en Autogrid 4.2.6 (Morris

*et al*, 2009) utilizando como coordenadas los sitios de unión de Levetiracetam de los segmentos transmembranales (Ile273, Phe277, Trp300, Val453, Thr456, Tyr461, Tyr462, Ser665, Asp670, Leu689, Asn690 y Cys693, Contreras-García *et al.*, 2022). Posteriormente se realizó un acoplamiento molecular con AutoDock-GPU 1.5.3, usando un total de 100 corridas y 100,000,000 de evaluaciones, con un algoritmo genético Lamarckiano y el método Solis-Wets de búsqueda local (Santos-Martins *et al*, 2021) de los ligandos seleccionados, racetams conocidos (LEB, BRV y Padsevonil), las moléculas del proyecto de tesis de Chávez-Elías (AFCE-01, 02 y 03) y las 10 estructuras diseñadas para este trabajo. Para las moléculas que presentan en su estructura el núcleo de bencimidazol se realizó el acoplamiento de sus distintos tautómeros, siendo JMAB-2-A1-T1, JMAB-2-A1-T2, JMAB-2-A2-T1, JMAB-2-A2-T2, JMAB-2-B1, JMAB-2-B2, JMAB-2-C1, JMAB-2-C2, JMAB-2-D1, JMAB-2-D2, JMAB-2-E1 y JMAB-2-E2 dando un total de 18 ligandos. Las estructuras de las moléculas evaluadas fueron modeladas y optimizadas en el programa Schrödinger Maestro (*Maestro-Desmond Interoperability Tools*, 2020). Para el segundo acoplamiento se calculó un GridBox de 60 x 60 x 60 npts en AutoGrid 4.2.6 y el acoplamiento mantuvo las mismas condiciones en número de corridas y evaluaciones.

## 6.2 Síntesis orgánica y caracterización química

La síntesis orgánica de las moléculas enlistadas en la Tabla 4 se llevaron a cabo en el laboratorio de Química Medicinal del edificio 10 de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la supervisión del Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas.

Las rutas de síntesis fueron planteadas al principio del proyecto con el fin de obtener todas las moléculas, sin embargo, estas rutas fueron remplazadas y descritas en el apartado de “Resultados y discusión”, debido a las dificultades sintéticas que presentaron cada una de ellas.

Los reactivos empleados para la síntesis de las moléculas fueron de grado reactivo para síntesis, con una pureza encima del 95 % de la marca Sigma-Aldrich. Los disolventes utilizados para las reacciones y los métodos de purificación fueron obtenidos de la marca Sigma-Aldrich y J. T. Baker.

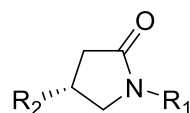
El avance de las reacciones fue monitoreado mediante la técnica de cromatografía en capa fina, utilizando placas cromatográficas de gel de sílice con indicador de fluorescencia de la marca Sigma-Aldrich, las cuales se revelaron en una cámara UV-Vis a 254 nm.

La purificación de las moléculas se realizó mediante las técnicas de cristalización y recristalización, así como por cromatografía en columna, usando gel de sílice de la marca Sigma-Aldrich con un tamaño de poro de 60 Å.

La caracterización química de las moléculas sintetizadas se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM, Xochimilco) en colaboración con el Dr. Ernesto Sánchez.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensionales ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) se obtuvieron empleando un espectrómetro de la marca Agilent DD2 a 600 y 151 MHz respectivamente. Se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. El procesamiento de los espectros se realizó mediante el software MestReNova. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportaron en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento en Hertz (Hz) y las multiplicidades se expresaron como: singulete (s), doblete (d), doble de doble (dd), triplete (t) y multiplete (m).

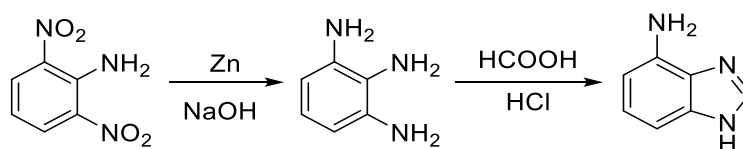
**Tabla 4. Compuestos JMAB-2**



Clave del compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Clave del compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
JMAB-2-A1		H	JMAB-2-C1		H
JMAB-2-A2			JMAB-2-C2		
JMAB-2-B1		H	JMAB-2-D1		H
JMAB-2-B2			JMAB-2-D2		
JMAB-2-E1		H	JMAB-2-E2		

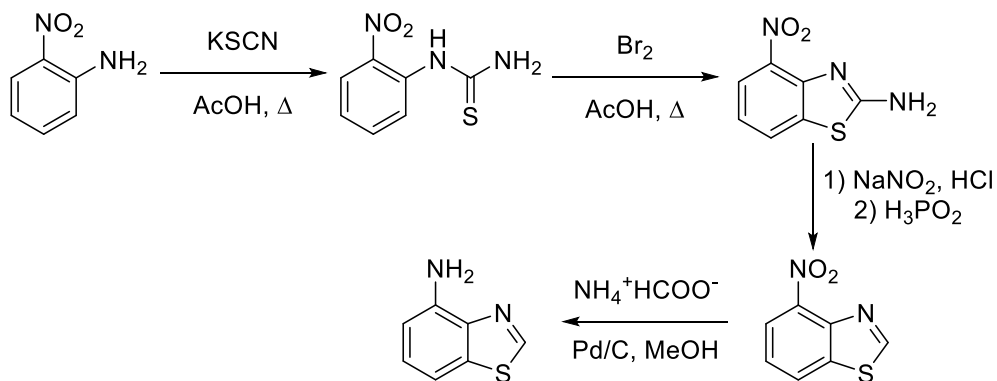
### 6.3 Rutas sintéticas propuestas para las moléculas análogas del levetiracetam

Para la síntesis de los heterociclos que forman parte de las moléculas como sustituyentes en posición 1 del anillo de pirrolidona se propusieron las siguientes series de reacción.



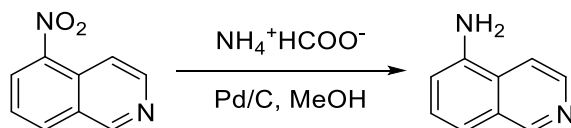
**Esquema 1.** Serie de reacciones para a síntesis de los compuestos JMAB-2-A1 y JMAB-2-A2 para el anillo de bencimidazol.

En el esquema 1 el paso inicial para esta reacción es la reducción de los grupos nitro a grupos amino catalizada por el Zn en medio alcalino, para posteriormente obtener la formación del heterociclo con ácido fórmico (Gadakh *et al.*, 2014).



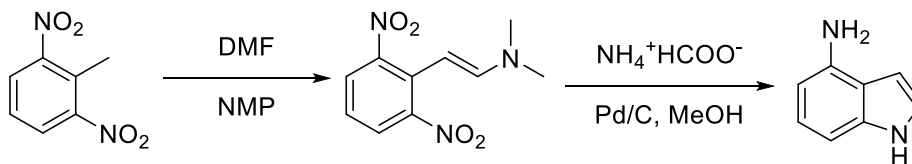
**Esquema 2.** Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-B1 y JMAB-2-B2 para el anillo de benzotiazol.

El primer paso de la secuencia de reacciones presentadas en el esquema 2 es la formación de la tiourea al reaccionar la 2-nitroanilina con el tiocianato de potasio, después se da la formación de un enlace S-Br que es atacado por el carbono del anillo aromático y da paso al heterociclo (Lv *et al.*, 2015). Posteriormente se forma una sal de diazonio entre el grupo amino  $\text{NH}_2$  y el nitrito de sodio que, con ayuda del ácido hipofosforoso, lleva al benzotiazol no sustituido sobre la posición 2 (Burglova *et al.*, 2016). Finalmente hay una reducción del grupo nitro del anillo aromático en grupo amino con el formiato de amonio en presencia de paladio/carbono y metanol (Ram & Ehrenkauffer, 1984).



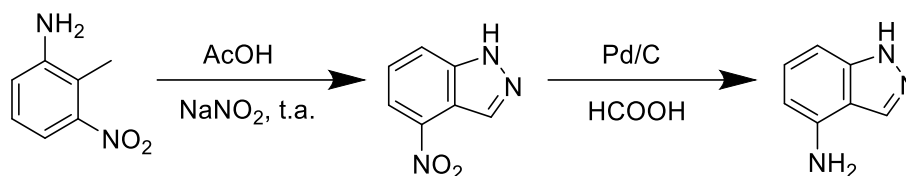
**Esquema 3.** Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-C1 y JMAB-2-C2 para el anillo de quinolina.

De la misma manera en el esquema 3, para la formación de la quinolina, ocurre la reducción del grupo nitro del anillo aromático a grupo amino mediante la adición de formiato de amonio catalizada por paladio/carbono en metanol (Ram & Ehrenkauffer, 1984).



**Esquema 4.** Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-D1 y JMAB-2-D2 para el anillo de indol.

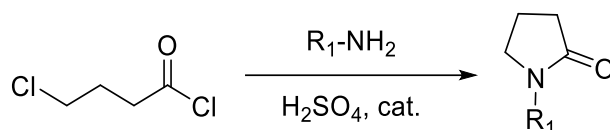
Como puede observarse en el esquema 4, en esta primera reacción ocurre una condensación aldólica entre el 2,6-dinitrotolueno y la *N,N*-dimetilformamida en presencia de *N*-metil-2-pirrolidona, posteriormente ocurre la reducción de los grupos nitro con formiato de amonio y se da paso a la formación del heterociclo, según la síntesis de indoles de Leimgruber-Batcho (Maehr *et al.*, 1981).



**Esquema 5.** Serie de reacciones para la síntesis de los compuestos JMAB-2-E1 y JMAB-2-E2 para el anillo de indazol.

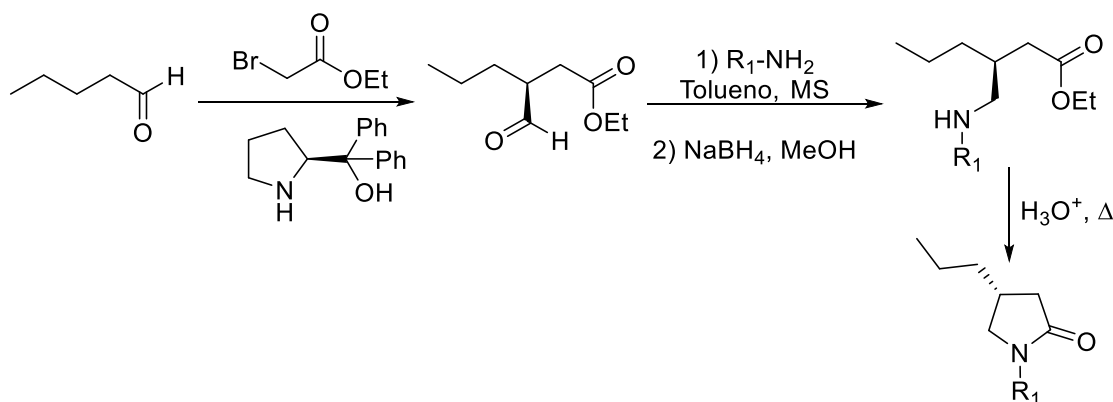
El esquema 5 muestra la formación del 4-aminoindazol a partir de la 3-nitro-2-metil-anilina, donde al reaccionar con el nitrito de sodio se forma una sal de diazonio, para posteriormente dar paso a la ciclación del indazol, al quedar la molécula con un grupo nitro se procede a la reducción con Pd/C en HCOOH y tener así nuestra molécula deseada (Souers *et al.*, 2005).

Para la síntesis del anillo de pirrolidona se proponen dos rutas distintas dependiendo del sustituyente que se tendrá en la posición 4.



**Esquema 6.** Serie de reacciones para la formación del anillo de pirrolidona cuando en posición 4 del anillo no se encuentra un sustituyente distinto a los hidrógenos.

En la reacción del esquema 6 el grupo amino de los heterociclos formados anteriormente actuará como nucleófilo sobre el carbono carbonílico del cloruro de 4-clorobutirilo, el cloro sale por ser buen grupo saliente, esto da paso a la formación de una amida (Kenda *et al.*, 2003). Por último, el átomo de nitrógeno de la amida vuelve a actuar como nucleófilo, pero esta vez sobre el carbono del otro cloro, sacándolo de la misma manera y obteniendo la pirrolidona sin sustituyentes distintos al hidrógeno en el carbono 4 (Charrier *et al.*, 2009).



**Esquema 7.** Serie de reacciones para la formación del anillo de pirrolidona cuando en posición 4 del anillo se encuentra un grupo propilo como sustituyente.

El primer paso de esta reacción del esquema 7, basado en la síntesis de la pregabalina, ocurre entre el derivado de prolina y el aldehído formando una enamina, después ocurre un ataque nucleofílico entre ese doble enlace y el enlace C-Br de la

molécula de acetato de etilo expulsando al bromo como buen grupo saliente, al tener unida la prolina ésta funciona como inductor quiral, dejando esa nueva formación de enlace hacia adelante, el catalizador de prolina sale debido a la presencia de agua en el medio generando de nuevo el aldehído. Posteriormente ocurre un ataque nucleofílico entre la amina de los heterociclos formados anteriormente y el compuesto en cuestión, dando paso a una imina que sufre de una reducción con el borohidruro de sodio. Finalmente, un nuevo ataque del grupo amino se da con el carbono carbonílico formando el ciclo de pirrolidona en presencia de agua ácida expulsando etanol como grupo saliente. La pirrolidona resultante tiene como sustituyente la cadena de tres carbonos en posición cuatro (Andruszkiewicz, 1989; Mercier *et al.*, 2014; Vázquez *et al.*, 2002).



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Estudio computacional de SV2A

#### 7.1.1 Modelos por homología

Del servidor I-TASSER se obtuvieron 5 modelos completos de SV2A; sin embargo, la estructura tridimensional no presentaba coherencia en los segmentos intravesicular y citosólico al compararlo con el PDB de SV2C (Código UniProt Q496J9 y código PDB 6ES1) que presenta un barril-beta en el segmento intravesicular, sitio de unión de la toxina botulínica. Por lo que, para la construcción completa de SV2A, se realizaron 5 modelos de la región del amino terminal y 5 modelos de la región intravesicular, la región transmembranal fue obtenida directamente del modelo AlphaFold, se seleccionaron los 2 mejores modelos de cada uno para la construcción manual de dos modelos completos de I-TASSER considerando los criterios de *C-score* (valores de -5 a 2 indican un modelo confiable) y *TM-score* (valores mayores a 0.5 indican una correcta topología del modelo) (Aguilera-Durán y Romo-Mancillas, 2020) obtenidos del mismo servidor de I-TASSER. Todos los modelos fueron sometidos a un análisis de calidad en el servidor web MolProbity para obtener los diagramas de Ramachandran (Ramachandran Plot, RP), el análisis nos indica que a mayor porcentaje de residuos favorecidos existe una mejor calidad estereoquímica de los modelos (Jha *et al*, 2018). En la tabla 5 se resumen los datos de *C-score*, *TM-score* y favorecidos de Ramachandran de los modelos seleccionados para la construcción de los modelos completos.

**Tabla 5. Análisis de calidad de los modelos por homología**

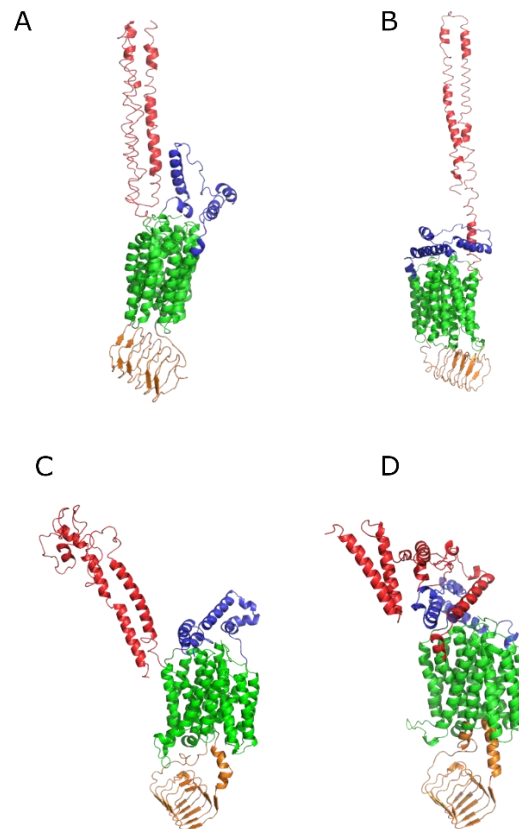
Modelos de SV2A				
ID	Clave de cada modelo	<i>C-score</i>	<i>TM-score</i>	Favorecidos de Ramachandran
<b>M1_IT</b>	M4_NH3t	-3.13	0.39 ± 0.13	75.68 %
	M3_IntV	-0.99	0.66 ± 0.13	
<b>M2_IT</b>	M3_NH3t	-2.11	0.39 ± 0.13	79.73 %
	M1_IntV	-0.42	0.66 ± 0.13	
<b>M1_R</b>	MC1_R	-	-	89.05 %
<b>M2_R</b>	MC2_R	-	-	96.49 %

M1\_IT: Modelo 1 construido con los modelos segmentales de I-TASSER, M2\_IT: Modelo 2 construido con los modelos segmentales de I-TASSER, M1\_R y MC1\_R: Modelo completo 1 obtenido de Robetta. M2\_R y MC2\_R: Modelo completo 2 obtenido de Robetta. M3\_NH3t: modelo 3 del segmento amino terminal, M4\_NH3t: Modelo 4 del segmento amino terminal, M1\_IntV: Modelo 1 del segmento intravesicular, M3\_IntV: Modelo 3 del segmento intravesicular.

El modelo completo de SV2A 1 de I-Tasser (M1\_IT) se construyó con el modelo 4 de la región amino terminal y el modelo 3 de la región intravesicular, el cuál presentó un 75.68 % de favorecidos de Ramachandran, mientras que para el modelo completo de SV2A 2 (M2\_IT) se construyó con el modelo 3 de la región amino terminal y el modelo 1 de la región intravesicular, el modelo presentó un 79.73 % de favorecidos de Ramachandran; ambos modelos se construyeron utilizando el programa Schrödinger Maestro.

Para el caso del programa Robetta, se obtuvieron 5 modelos de la proteína SV2A completos sin la necesidad de una construcción manual, ya que presentaban una conformación tridimensional satisfactoria; de la misma manera, se sometieron a un análisis de calidad en el servidor web MolProbity y se seleccionaron aquellos modelos con mejor porcentaje de favorecidos de Ramachandran, resultando en el modelo completo de SV2A 1 de Robetta (M1\_R) un 89.05 % y para el modelo completo de SV2A 2 de Robetta (M2\_R) un 96.49 %, los resultados se encuentran resumidos en la tabla 5.

La Figura 10 muestra la estructura tridimensional de los 4 modelos de SV2A.



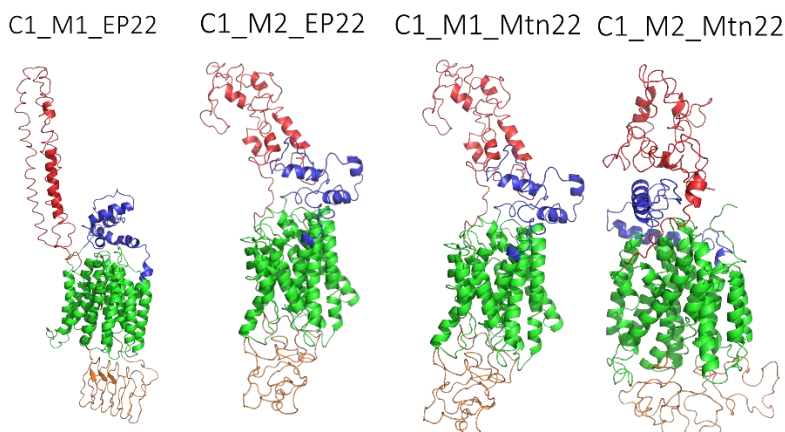
**Figura 10. Modelados por homología.** Se muestran los 4 modelados por homología de SV2A, siendo A: M1\_IT, B: M2\_IT, C: M1\_R, D: M2\_R. Las cadenas en color rojo muestran el segmento del amino terminal, en color azul se presenta un loop citoplásmico, en color verde se observa la región transmembranal y en color naranja se observa el barril-beta intravesicular.

### **7.1.2 Simulaciones de Dinámica Molecular**

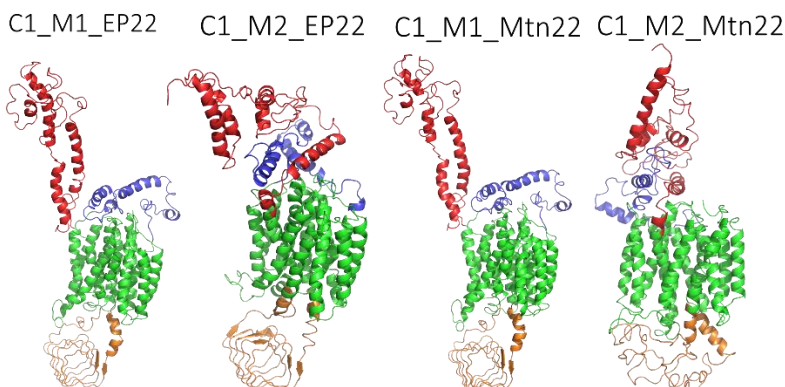
Una vez obtenidos los modelos por homología de SV2A, se realizó la construcción de los sistemas de tipo CG en el servidor web Charmm-Gui y se sometieron a una DM de 1000 ns con dos diferentes campos de fuerza (Elnedynp22 y Martini22p) para encontrar la estructura más estable. Se obtuvieron las estructuras más representativas (C1) para cada modelo y se hizo una conversión topológica de tipo AA para hacer un nuevo análisis de calidad y seleccionar al mejor modelo para realizar los estudios de acoplamiento molecular.

En la Figura 11 se resumen los C1 obtenidos para cada modelo en su respectivo campo de fuerza.

## I-TASSER



## ROBETTA



**Figura 11. Estructuras más representativas (C1) de cada modelo.** La parte superior de la figura muestra los C1 de M1\_IT y M2\_IT en los campos de fuerza de Elnedyp22 (EP22) y Martini22 (Mtn22), la parte inferior de la figura muestra los C1 de M1\_R y M2\_R de los mismos campos de fuerza ya mencionados.

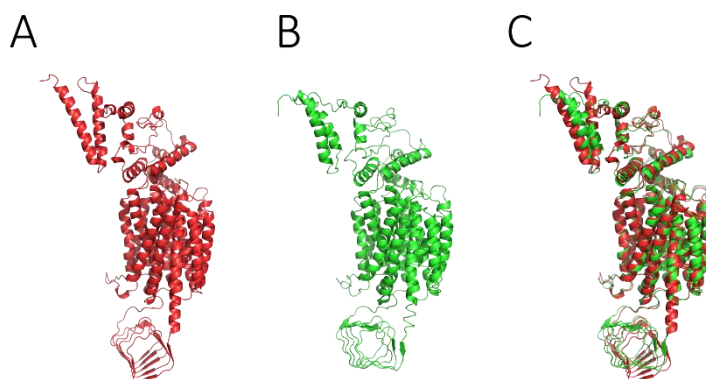
A simple vista se observa que los C1 para los modelos de I-Tasser perdieron estabilidad, ya que el barril-beta intravesicular pierde su estructura representativa, mientras que para los modelos de Robetta, solo C1\_M2\_Mtn22 perdió dicha estructura, por lo que se puede afirmar que los mejores modelos fueron los que se obtuvieron por el programa de Robetta, ya que la mayoría de sus C1 mantuvieron su estructura estable en la DM.

Posteriormente se realizó el análisis de calidad para cada C1 de los modelos, en la Tabla 6 se observan los resultados generados en el servidor MolProbit.

**Tabla 6. Análisis de calidad de los C1 de los modelos de SV2A.**

ID	Favorecidos de Ramachandran
C1_M1_EP22_IT	77.03 %
C1_M2_EP22_IT	74.32 %
C1_M1_Mtn22_IT	74.32 %
C1_M2_Mtn22_IT	75.00 %
C1_M1_EP22_R	82.30 %
<b>C1_M2_EP22_R</b>	<b>86.62 %</b>
C1_M1_Mtn22_R	82.70 %
C1_M2_Mtn22_R	79.59 %

En la Tabla 6 podemos observar que la mejor estructura representativa es el modelo 2 generado en Robetta bajo el campo de fuerza Elnedynp22 (C1\_M2\_EP22\_R), ya que presenta el mayor porcentaje de favorecidos de Ramachandran. Se realizó un alineamiento entre el modelo 2 de SV2A hecho en Robetta y el C1 de dicho modelo en el programa Schrödinger Maestro para calcular su RMSD, con el fin de observar si existe una diferencia significativa entre ambas estructuras, obteniendo un resultado de 2.366 Å, tomando como referencia que un valor de RMSD > 2.0 Å indica diferencia significativa (Becerra *et al*, 2021) y que los favorecidos de Ramachandran obtuvieron un 86.62 %, se puede concluir que nuestra conformación obtenida al final de nuestra DM puede ser útil para los estudios posteriores de acoplamiento. En la Figura 12 puede observarse el alineamiento del modelo inicial con la estructura obtenida al final de la simulación.

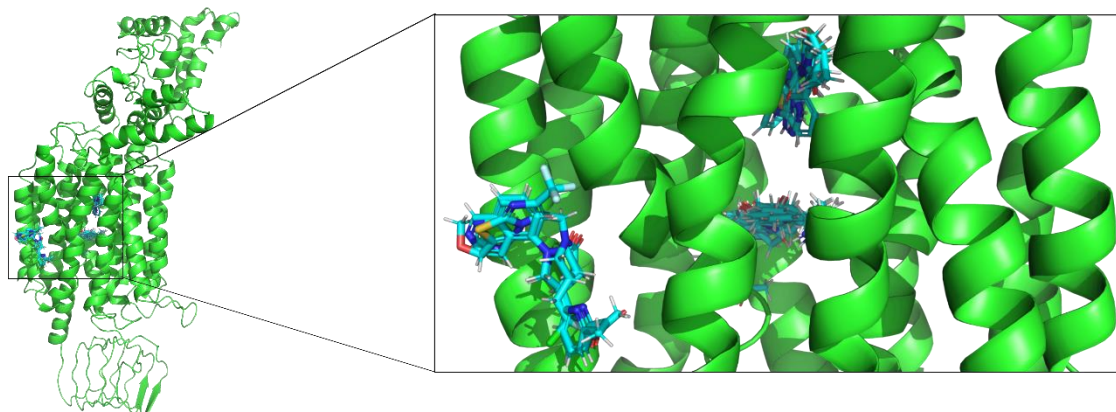


**Figura 12. Estructuras de SV2A.** A) M2\_R, B) C1\_M2\_EP22\_R, C) Alineamiento entre M2\_R y C1\_M2\_EP22\_R. RMSD: 2.366 Å.

### **7.1.3 Acoplamiento molecular (Docking)**

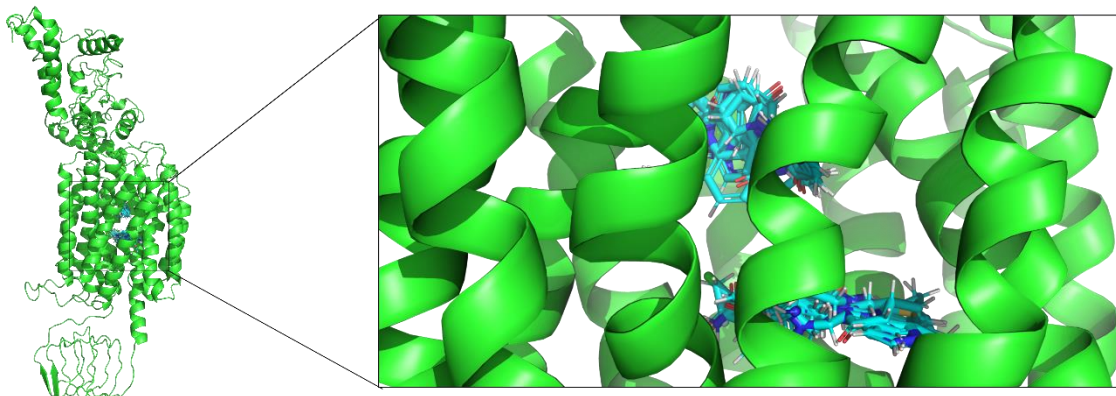
El primer estudio de *docking* arrojó resultados deficientes, ya que algunos ligandos, entre ellos Padsevonil, AFCE-01 y AFCE-03 no entraban al segmento transmembranal, encontrando dos sitios de unión tanto fuera como dentro del segmento, por lo que se realizó

un segundo estudio de acoplamiento; en la Figura 13 pueden observarse los resultados del primer *docking*.



**Figura 13. Primer estudio docking de SV2A.** Se muestra en color verde el segmento transmembranal de SV2A y en color azul los ligandos. Puede observarse a Padsevoniil, AFCE-01 y AFCE-03 unidos fuera de SV2A.

Un segundo estudio de acoplamiento se realizó con el mismo número de corridas y evaluaciones; sin embargo, la *GridBox* fue generada con 60x60x60 npts, por lo que el tamaño de la caja disminuyó con el objetivo de que los ligandos entraran al segmento transmembranal y, por consiguiente, a su sitio de unión correspondiente. La Figura 14 muestra todos los ligandos dentro del segmento transmembranal, en dos distintos lugares (arriba y abajo).

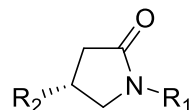


**Figura 14. Segundo estudio docking de SV2A.** En la figura se observan los acoplamientos de los ligandos dentro del segmento transmembranal en dos partes diferentes dentro del mismo sitio de unión (arriba y abajo).

En este segundo estudio de *docking* se pueden observar dos distintos lugares en los que se acoplan los ligandos, tanto arriba como abajo (siendo arriba la parte donde se orienta el amino terminal extravésicula y abajo la parte donde se orienta el barril-beta intravésicula), en la parte de arriba se encuentran aquellos ligandos diseñados con el sustituyente de hidrógeno en la posición 4 del anillo de pirrolidona, mientras que en la parte de abajo se encuentran todos los ligandos que cuentan con la cadena de *n*-propilo en la misma posición, esto puede deberse a que dicha cadena proporciona interacciones

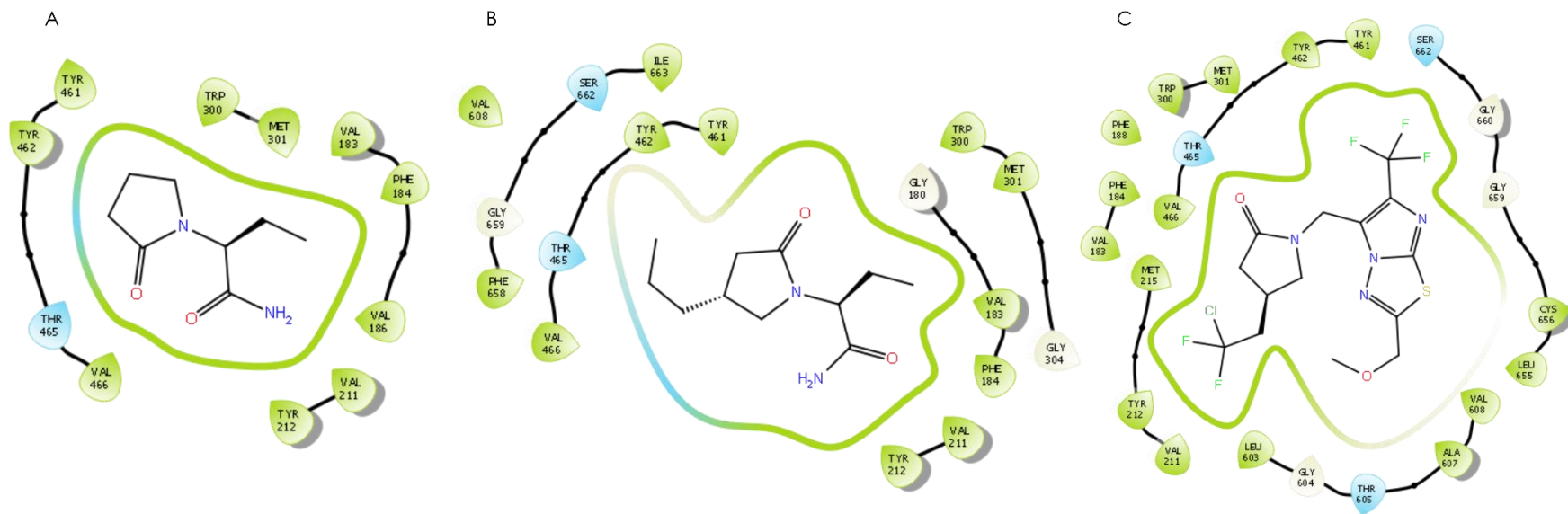
hidrofóbicas, así como también puede que se trate de un factor estérico por lo que su acoplamiento se da mejor en dicha posición, aquí además se encuentran los ligandos de LEV, BRV Y PAD. En la Tabla 7 se mencionan la posición y los resultados de *Docking score* para cada ligando evaluado.

**Tabla 7. Resultados de los estudios docking.**

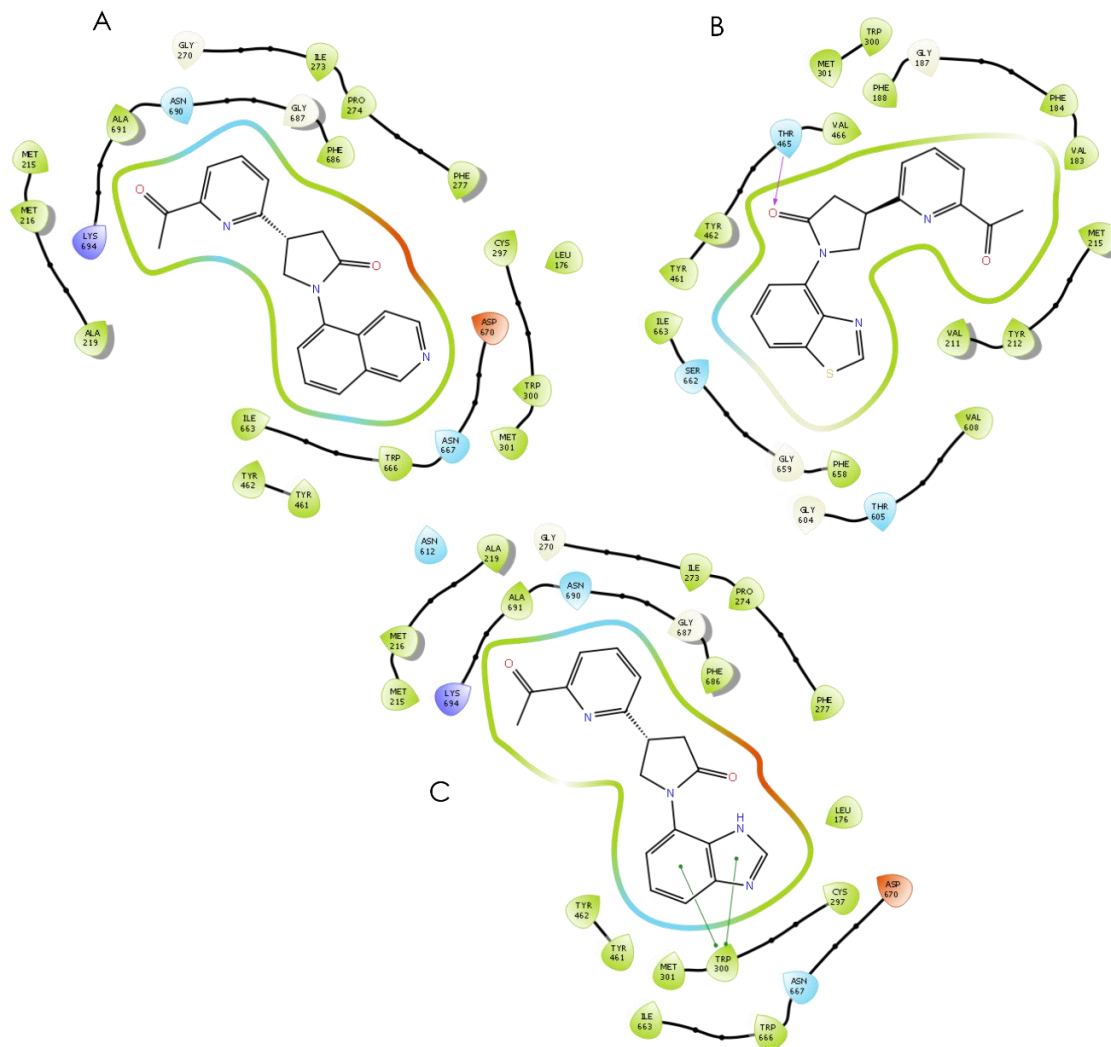


Clave docking	Clave síntesis	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Posición de acoplamiento	<i>Docking score</i> (kcal/mol)
SA1	AFCE-2-01	Isoquinolin-5-il	4-(aminocarbonil) piridin-2-il	Arriba	-6.86
SA2	AFCE-2-02	1 <i>H</i> -bencimidazol-4(7)-il	4-(aminocarbonil) piridin-2-il	Abajo	-6.83
SA3	AFCE-2-03	Benzotiazol-5-il	4-(aminocarbonil) piridin-2-il	Arriba	-8.41
SLEV	-	2-butanamida	H	Abajo	-5.09
SBRV	-	2-butanamida	<i>n</i> -Pr	Abajo	-6.22
SPAD	-	2-(metoximetil)-6-(trifluorometil)imidazo[2,1-b][1,3,4]tiadiazol-5-il)metil	( <i>R</i> )-4-(2-cloro-2,2-difluoroetil)	Abajo	-6.67
SM1	JMAB-2-A1	1 <i>H</i> -bencimidazol-7-il	H	Arriba	-6.39
SM2	JMAB-2-A1	1 <i>H</i> -bencimidazol-4-il	H	Arriba	-6.29
SM3	JMAB-2-B1	benzotiazol-5-il	H	Arriba	-6.92
SM4	JMAB-2-D1	indol-4-il	H	Arriba	-6.36
SM5	JMAB-2-C1	Isoquinolin-5-il	H	Arriba	-7.22
SM6	JMAB-2-E1	1 <i>H</i> -indazol-4-il	H	Arriba	-6.53
SM7	JMAB-2-A2	1 <i>H</i> -bencimidazol-7-il	<i>n</i> -Pr	Abajo	-7.21
SM8	JMAB-2-A2	1 <i>H</i> -bencimidazol-4-il	<i>n</i> -Pr	Abajo	-7.11
SM9	JMAB-2-B2	benzotiazol-5-il	<i>n</i> -Pr	Abajo	-6.85
SM10	JMAB-2-D2	indol-4-il	<i>n</i> -Pr	Abajo	-7.41
SM11	JMAB-2-C2	isoquinolin-5-il	<i>n</i> -Pr	Abajo	-6.79
SM12	JMAB-2-E2	1 <i>H</i> -indazol-4-il	<i>n</i> -Pr	Abajo	-7.58

Todos los ligandos previamente diseñados mostraron un mejor *docking score* que levetiracetam y brivaracetam, indicando que tienen un mejor acoplamiento con la proteína SV2A, los ligandos que presentaron un mejor *docking score* fueron AFCE-2-03, JMAB-2-E2, JMAB-2-D2, JMAB-2-C1 y JMAB-2-A2 con resultados de -8.41, -7.58, -7.41, -7.22 y -7.21 kcal/mol respectivamente. Las siguientes figuras muestran los diagramas de interacción de los racetams, las moléculas AFCE y las estructuras JMAB que tuvieron mejor resultado de *docking score*, todos los diagramas de interacción restantes se enlistan en el apartado de anexos (Anexo 1 y Anexo 2).

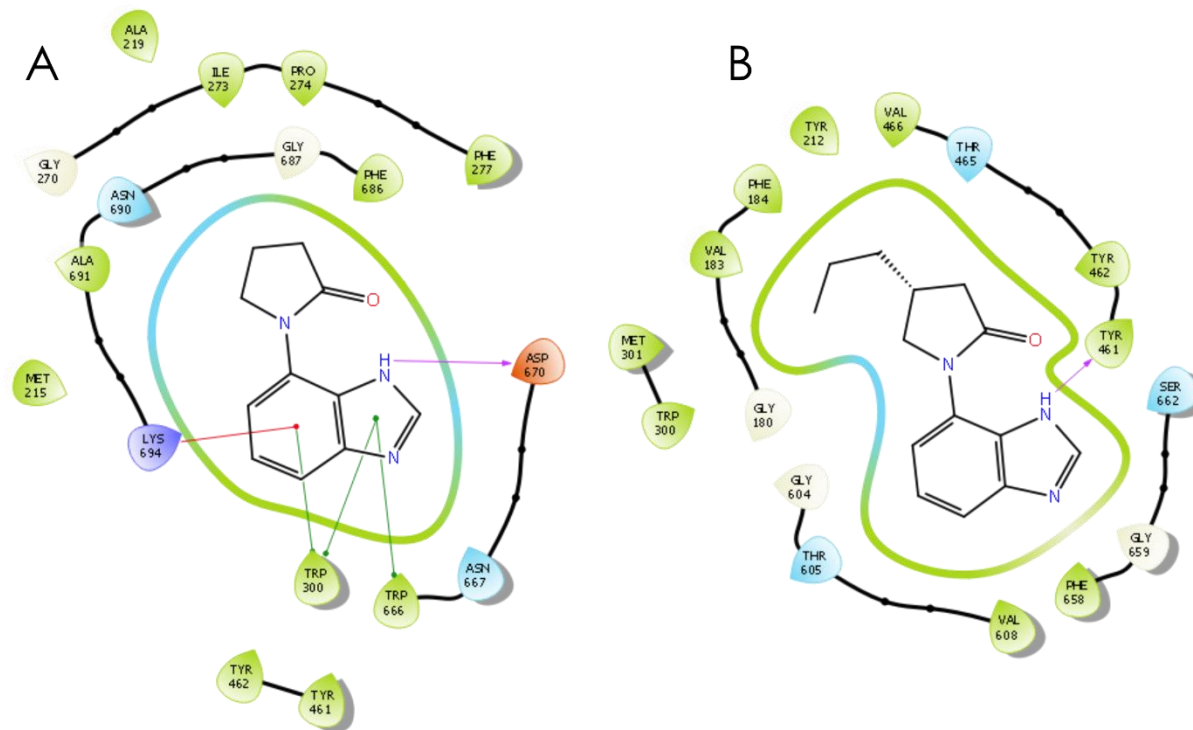


**Figura 15. Diagramas de interacción de los racetams con SV2A.** A) Levetiracetam, B) Brivaracetam y C) Padsevonil. Mediante el estudio de acoplamiento se observa que no hay ninguna interacción formal por parte de las moléculas con SV2A, en todos los casos puede observarse un acoplamiento por ambientes hidrofóbicos (en color verde) y de tipo polares (en color azul).

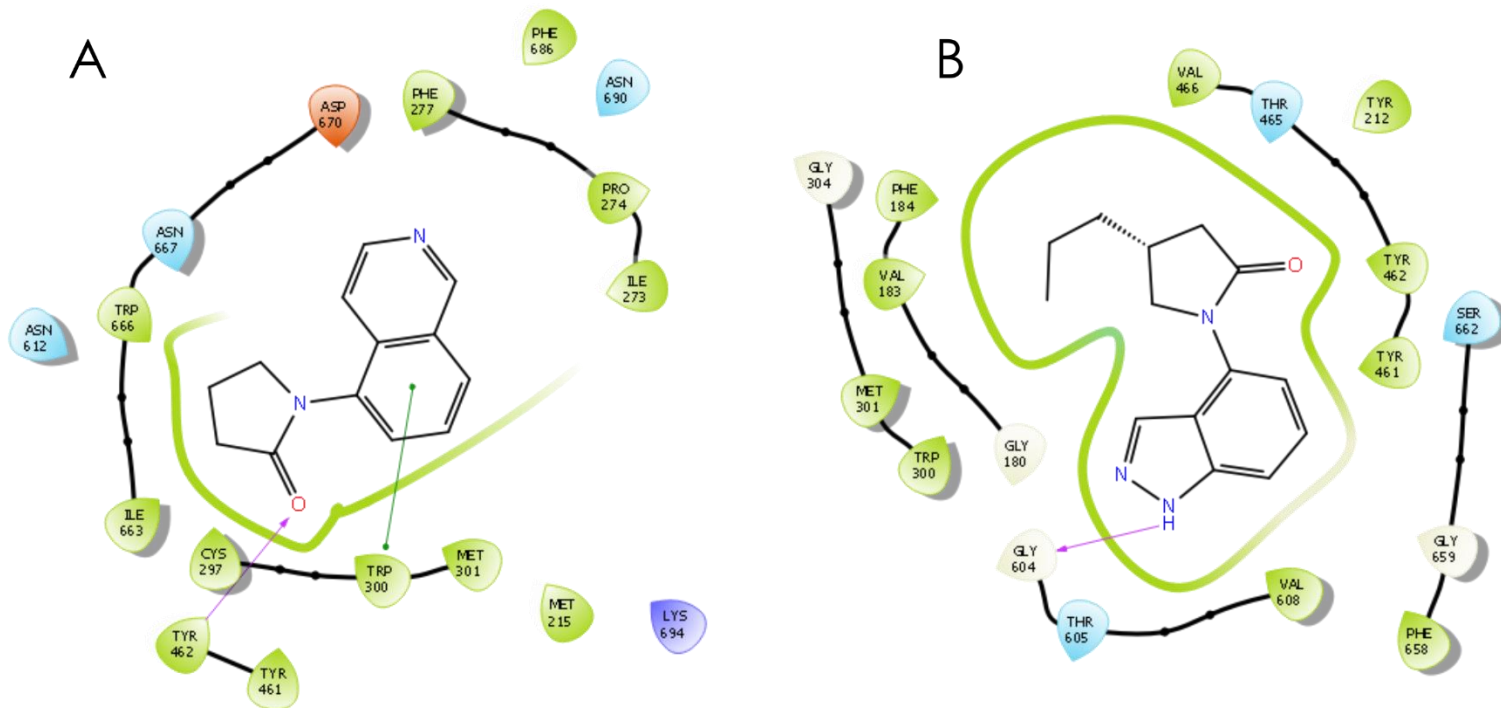


**Figura 16. Diagrama de interacción de las moléculas AFCE con SV2A.** A) AFCE-2-01, B) AFCE-2-02, C) AFCE-2-03. Los resultados de *consensus docking* indican que B tuvo interacción de tipo puente de hidrógeno, cumpliendo el papel de aceptor sobre el átomo de oxígeno del carbonilo de la pirrolidona con Thr465, mientras que C mantuvo interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo de bencimidazol con Trp300.





**Figura 17. Diagrama de interacción de JMAB-2-A1 y JMAB-2-A2 con SV2A.** A) JMAB-2-A1 y B) JMAB-2-A2. El estudio de acoplamiento muestra resultados de interacciones de A con SV2A de tipo donador de puentes de hidrogeno en el amino protonado del anillo de bencimidazol con Asp670, tres interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo de bencimidazol con Trp300 y Trp666 e interacciones de tipo  $\pi$ -catión entre el anillo de bencimidazol con Lys694; mientras que para B se muestran interacciones por puentes de hidrógeno entre el amino protonado de bencimidazol con Tyr461.



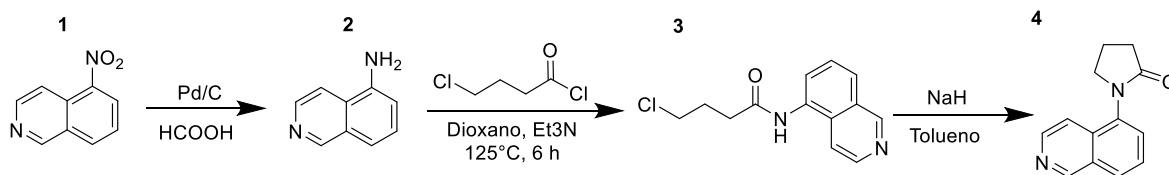
**Figura 18. Diagrama de interacción de JMAB-2-C1 y JMAB-2-E2 con SV2A.** A) JMAB-2-C1 y B) JMAB-2-E2. El estudio de acoplamiento muestra resultados de interacciones de A con SV2A de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el heterociclo de isoquinolina y Trp300 y una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo de la pirrolidona con Tyr462; mientras que en B se muestra una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el amino protonado del anillo de indazol y Gly604.

Al observar que los ligandos tuvieron un mejor *docking score* que las estructuras de levetiracetam y brivaracetam y que, además, presentaron interacciones con residuos importantes del sitio de unión de dichos racetams (Trp300, Thr445, Tyr461, Tyr462, Gly604, Trp666, Lys694 y Asp670), se concluyó satisfactoriamente el estudio computacional de SV2A y los ligandos y se dio paso a la síntesis de dichas moléculas.

## 7.2 Síntesis orgánica y caracterización química

En este apartado se mencionan los resultados de síntesis obtenidos para cada compuesto en el desarrollo de este proyecto de investigación, además de la caracterización química de las moléculas obtenidas mediante los espectros de RMN por el equipo Agilent DD2. La mayoría de las rutas sintéticas propuestas en la metodología fueron cambiadas debido a que no se contó a tiempo con los reactivos necesarios para ello y/o a que los productos no resultaban ser puros al monitorearlas por cromatografía en capa fina (CCF). Las condiciones y métodos específicos para cada reacción se mencionan en el apartado de Anexos. Los espectros de resonancia se encuentran, de la misma manera, en el apartado de Anexos. Para el caso del heterociclo del indol, cuya estructura forma parte de las moléculas JMAB-2-D1 y JMAB-2-D2, no pudo realizarse su síntesis debido a las razones anteriormente mencionadas.

### 7.2.1 Obtención de 1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona (JMAB-2-C1)



**Esquema 8.** Serie de reacciones para la obtención de 1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona (JMAB-2-C1).

La ruta de síntesis para la obtención de 1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona (**4**) constó de tres pasos, la primera parte consistió en la reducción del grupo nitro de la 5-nitroisoquinolina (**1**) utilizando Pd/C como catalizador y ácido fórmico como donador de hidrógeno, el segundo paso se basó en la formación la amida, donde el grupo amino de **2** realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del cloruro de 4-clorobutirilo, deslocalizando y regresando la carga del oxígeno para posteriormente sustituir al cloro como buen grupo saliente, siendo catalizada la reacción por la Et<sub>3</sub>N como base y utilizando dioxano como disolvente para promover la reacción de tipo S<sub>N</sub>2; por último, el tercer paso resolvió la formación del anillo de pirrolidona utilizando NaH como base fuerte para la extracción del protón del nitrógeno de la amida y, de esta manera, promover el ataque nucleofílico sobre el carbono halogenado y desplazar al cloro como grupo saliente. (Anexo 3).

La obtención del intermediario **2** presentó varias complicaciones, al intentar reducir el grupo nitro con Zn como catalizador, tal y como se había planteado en la ruta sintética original, los análisis por CCF presentaron materia prima al término de la reacción, por lo que fue remplazado por el Pd/C, aumentando considerablemente el rendimiento y la

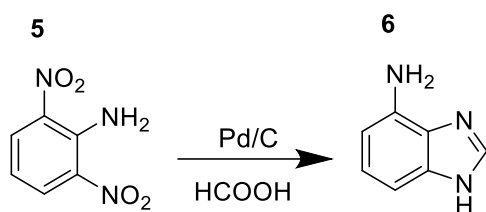
velocidad de reacción. A pesar de que el Pd/C presentaba complejidad para separarse por filtración por gravedad, se logró aislar el producto puro, tal y como se observa en el espectro de resonancia, donde se encuentran las señales representativas del grupo amino y los carbonos aromáticos. El producto **2** (5-aminoisoquinolina, PM: 144.17 g/mol) resultó en un sólido color amarillo brillante con un rendimiento crudo del 83.5 % (9.589 mmol).

Señales representativas para la identificación de RMN:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.40 (s, 1H), 8.77 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 8.58 (dd,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H), 8.50 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 8.32 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.75 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 2.06 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{cdcl}_3$ )  $\delta$  152.97 (s), 146.57 (s), 144.51 (s), 134.91 (s), 129.06 (s), 128.48 (s), 128.22 (s), 125.82 (s), 115.80 (s). (Anexos 4 y 5).

La síntesis de **4** a partir de **2** presentó varios pasos de complejidad. Debido a numerosas concentraciones en el rotavaporador y a las extracciones de agua/AcOEt para separar la molécula de las sales de trietilamina formadas, el rendimiento bajó considerablemente, por lo que es de suma importancia encontrar mejores procedimientos para purificar la molécula y aumentar así su rendimiento. El espectro de resonancia muestra las señales representativas de los átomos de carbono número 13, 14 y 15 indicando al anillo de pirrolidona formado. Aun así, se encuentran señales que no pertenecen a la molécula, tratándose de los disolventes acetato de etilo y tolueno, por lo que es posible que la molécula no se encontraba pura en su totalidad, se debe tomar en consideración aumentar el tiempo de secado del producto para evitar esas señales en síntesis posteriores, sin embargo, la ruta sintética funcionó para la producción de dicha molécula. Al final se obtuvo un sólido color café pálido, siendo este el producto **4** (1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona, PM: 212.24 g/mol), con un rendimiento del 9.5 % correspondientes a un peso de 195 mg (0.9187 mmol).

Señales representativas para la identificación de RMN:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 2.50 (t,  $J = 10.6, 5.8$  Hz, 1H), 2.30 – 2.23 (m, 1H). (Anexos 6 y 7).

### 7.2.2 Obtención de 7-aminobencimidazol



**Esquema 9.** Serie de reacciones para la obtención de 7-aminobencimidazol (intermediario de JMAB-2-A1 y JMAB-2-A2).

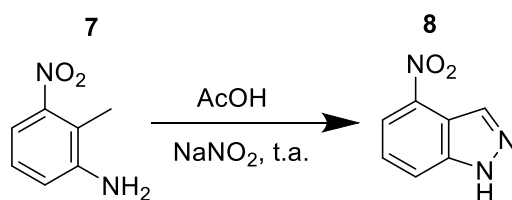
La ruta planteada en metodología para la reducción de los grupos nitro utilizando Zn como catalizador y posteriormente HCOOH para la formación del bencimidazol no resultaron satisfactorios como se esperaba, debido a que los análisis de CCF mostraban una gran cantidad de productos secundarios, forzando de esta manera intentar una nueva ruta de síntesis, por lo que finalmente fue sustituida por el catalizador de Pd/C mostrando en CCF el término de la reacción al no presentarse materia prima.

La formación de **6** fue prácticamente sencilla al hacer reaccionar **5** con ácido fórmico en presencia del catalizador Pd/C, ya que al mismo tiempo que se reducen los grupos nitro, ocurre la reacción de condensación para la formación del anillo. Sin embargo, una vez completada la reacción, de la misma manera fue muy difícil purificarlo, ya que el compuesto al ser un líquido muy viscoso y además de ser soluble en agua, no se lograba recrystalizar. El producto **6** (7-aminobenzimidazol, PM: 133.15 g/mol) obtuvo un peso de 0.987 g (7.4126 mmol) equivalente a un rendimiento crudo del 27.7 %. (Anexo 8).

En los espectros de resonancia puede observarse que la molécula se encuentra formada, pero presenta contaminación, posiblemente de productos secundarios o de disolventes, por lo que es de suma importancia encontrar mejores métodos de purificación, así como una mejora en la monitorización de la reacción para evitar la formación de dichos productos secundarios, estos pueden tratarse de productos formilados en el grupo amino del bencimidazol, por lo que se debe considerar cuidar de una mejor manera las condiciones de reacción. La señal más importante que nos indica que la molécula está formada, es la del protón unido al carbono entre los nitrógenos del anillo de imidazol, que se encuentra tanto en 8.19 ppm en <sup>1</sup>H y en 144.24 ppm en <sup>13</sup>C respectivamente.

Señales representativas para la identificación en RMN: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.33 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.19 (s, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.14 (dd, *J* = 6.2, 2.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 1H), 2.19 (s, 1H). (Anexos 9 y 10).

### 7.2.3 Obtención de 4-nitroindazol

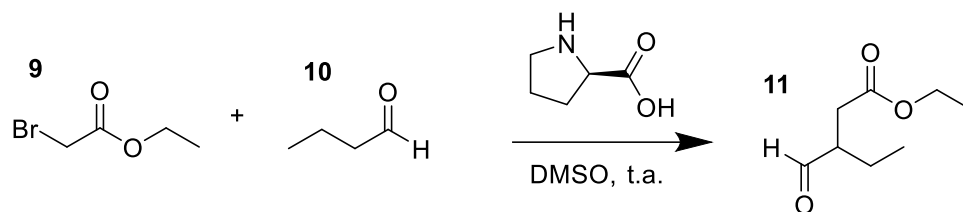


**Esquema 10.** Serie de reacciones para la obtención de la molécula 4-nitroindazol (intermediario de JMAB-2-E1 y JMAB-2-E2).

La formación de **8** nos permite tener el intermediario para las moléculas JMAB-2-E1 y JMAB-2-E2, sin embargo, estas no pudieron concretarse. Su reacción constó de un solo paso, donde el grupo amino de **7** forma una sal de diazonio al reaccionar con el NaNO<sub>2</sub>, y posteriormente, mediante una condensación, dio paso a la formación del anillo de indazol. Un paso importante para esta síntesis es la adición lenta del nitrito de sodio, ya que, al añadirlo, la consistencia de la reacción en el matraz cambió completamente a un líquido muy viscoso, por lo que su agitación se complicó, esto puede deberse a la formación de la sal de diazonio, ya que con el tiempo la solución regresaba a su estado líquido. La adición de exceso de disolvente para esta reacción fue necesaria para promover el avance de la reacción. En los espectros de resonancia podemos encontrar la formación correcta de **8**, siendo la señal en 8.63 ppm en <sup>1</sup>H la más representativa, ya que corresponde al protón unido al carbono número 7 del anillo de indazol, ya que, de no haberse formado el producto, esa señal correspondería a una señal de metilo en los desplazamientos de carbonos alifáticos. El producto final obtuvo un rendimiento crudo del 43.39 % con un peso de 2.089 g (12.889 mmol) de **8** (4-nitroindazol, PM:162.12 g/mol). (Anexo 11)

Señales representativas para la identificación en RMN: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.66 – 8.60 (m, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 141.74 (s), 140.14 (s), 133.04 (s), 124.80 (s), 117.78 (s), 117.66 (s), 115.80 (s). (Anexos 12 y 13)

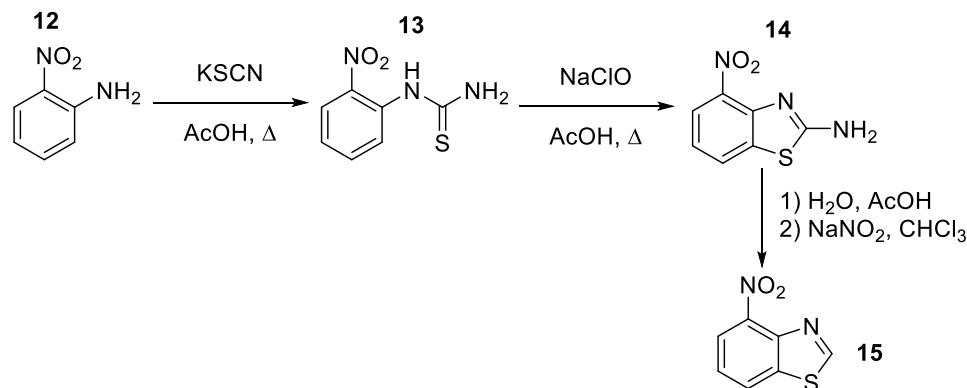
### 7.2.4 Obtención de 3-formilpentanoato de etilo



**Esquema 11.** Serie de reacciones para la obtención de 3-formilpentanoato de etilo (Reacción de prueba)

El esquema 11 describe una serie de reacciones para la obtención de 3-formilpentanoato de etilo (11). El primer paso de la reacción se da entre la L-Prolina y 10 (butiraldehído) formando una enamina, después se da un ataque nucleofílico por parte de ese doble enlace y el enlace C-Br de 9 expulsando al bromo como buen grupo saliente, al tener unida la prolina ésta funciona como inductor quiral, dejando esa nueva formación de enlace hacia adelante, el catalizador de prolina sale debido a la presencia de agua en el medio generando a 11. Esta reacción de prueba fue realizada con el propósito de observar su comportamiento, ya que, de manera estructural, es muy parecida a la reacción propuesta en metodología para la obtención del anillo de pirrolidona con la cadena *n*-propilo en posición 4; sin embargo, al no contar con el valeraldehído necesario para la formación de dicho anillo para las moléculas JMAB-2-A2, B2, C2, D2 y E2, se optó por experimentar con 10, resultando un producto similar. Esto fue lo último que se le realizó a la reacción ya que el tiempo no fue suficiente para realizarle estudios de RMN, sin embargo, se espera que la reacción se comporte de manera similar cuando se hagan los estudios con el reactivo necesario. (Anexo 14).

### 7.2.5 Obtención de 4-nitrobenzotiazol



**Esquema 12.** Serie de reacciones para la obtención de la molécula 4-nitrobenzotiazol (Intermediario de JMAB-2-B1 y JMAB-2-B2).

Durante las reacciones para la formación del compuesto **15**, se tuvo bastante incertidumbre, ya que los resultados en CCF mostraban a los reactivos como a los productos con un factor de retención ( $R_f$ ) similar; sin embargo, al notar cambios físicos durante la reacción (cambios de color) se decidió proseguir con las reacciones. Por otra parte, a pesar de creer que las reacciones si estaban avanzando, los resultados de los espectros de RMN muestran las señales del reactivo inicial, siendo las más representativas las señales en  $^1\text{H}$  de 6.21 ppm y  $^{13}\text{C}$  de 144.67 ppm que indican la presencia del grupo amino de **12**, por lo que se concluye que esta reacción no sufrió de ningún cambio o avance desde su primer paso. Estos resultados negativos funcionarán para plantear una mejor ruta de síntesis para el 4-nitrobenzotiazol que es un intermediario para las moléculas JMAB-2-B1 y JMAB-2-B2. (Anexo 15).

Señales representativas de RMN:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11 (dt,  $J = 6.0, 3.0$  Hz, 1H), 7.36 (td,  $J = 8.4, 5.6, 1.5$  Hz, 1H), 6.82 (dd, 1H), 6.70 (td, 1H), 6.23 – 5.99 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{cdcl}_3$ )  $\delta$  144.67 (s), 135.68 (s), 132.24 – 131.97 (m), 126.16 (s), 118.74 (s), 116.93 (s). (Anexos 16 y 17).

En la Tabla 8 se resumen los resultados de los compuestos sintetizados.

**Tabla 8. Resultados de síntesis**

Número	Formula química	Características	Rendimiento (%)
2	$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2$	Sólido fino color amarillo brillante	83.5
4	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$	Sólido amorfo color café pálido	9.5
6	$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3$	Semisólido color verde oscuro	27.7
8	$\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$	Sólido en forma de hojuelas color marrón	43.39
11	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$	N/A	N/A
15	$\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	Cristales amorfos de color rojizo	N/A



El proceso de síntesis, a pesar de haber obtenido una molécula completa (JMAB-2-C1), tiene varios puntos de mejora, especialmente para los casos de purificación, ya que la mayoría de los compuestos presentaron contaminación de disolvente y productos secundarios en los espectros de RMN, así como realizar una nueva búsqueda de rutas alternas de síntesis para lograr un mayor rendimiento para los intermediarios.

Uno de los principales problemas que se encontraron durante la síntesis, fue la reducción del grupo nitro al grupo amino de los heterociclos, ya que, a pesar de que el catalizador de Pd/C funciona, los rendimientos podrían mejorarse mediante una reducción por hidrogenación catalítica para lograr la reducción completa del reactivo y así aumentar el rendimiento de las reacciones.

## 8. CONCLUSIONES

La obtención de la estructura tridimensional SV2A, generado por modelado por homología desde el servidor web Robetta, permitió observar las interacciones intermoleculares y un mayor *docking score* de las moléculas análogas a levetiracetam. Estos resultados reforzaron la importancia de continuar con la síntesis de dichas moléculas; los espectros de RMN confirmaron las estructuras de JMAB-2-C1 y los intermediarios para JMAB-2-A1, A2, E1 Y E2.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Restructurar las rutas de síntesis para cada uno de los compuestos obtenidos, así como plantear nuevos métodos de identificación y purificación.
2. Lograr la síntesis de las moléculas completas a partir de los intermediarios sintetizados en este proyecto de investigación.
3. Realizar la evaluación biológica en distintos modelos biológicos para verificar y medir la actividad anticonvulsiva de las moléculas diseñadas y sintetizadas en el proyecto.
4. Realizar la caracterización de las moléculas sintetizadas mediante más técnicas como Espectroscopía de IR y Espectrometría de Masas con el fin de presentar mayor certeza en la elucidación de las estructuras.

## 10. REFERENCIAS

1. Aguilera-Durán, G. (2021). Estudio computacional de blancos moleculares relevantes en vitíligo: Activación de los receptores CXCR3 y CXCR6, y modulación alostérica de la tirosinasa. (Tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Químico Biológicas). Facultad de Química; Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.
2. Aguilera-Durán, G. & Romo-Mancillas, A. (2020). Computational Study of C-X-C Chemokine Receptor (CXCR)3 Binding with Its Natural Agonists Chemokine (C-X-C Motif) Ligand (CXCL)9, 10 and 11 and with Synthetic Antagonists: Insights of Receptor Activation towards Drug Design for Vitiligo. *Molecules*, 25(19), 4413. <https://doi.org/10.3390/molecules25194413>
3. Alrabiah, H. (2019). Levetiracetam. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 167-204. doi:10.1016/bs.podrm.2019.02.003
4. Andruszkiewicz, R., & Silverman, R. B. (1989). A Convenient Synthesis of 3-Alkyl-4-aminobutanoic Acids. *Synthesis*, 1989(12), 953–955. <https://doi.org/10.1055/s-1989-27443>
5. Bajjalieh, S., Peterson, K., Shinghal, R., & Scheller, R. (1992). SV2, a brain synaptic vesicle protein homologous to bacterial transporters. *Science*, 257(5074), 1271-1273. doi:10.1126/science.1519064
6. Becerra, E.; Aguilera-Durán, G.; Berumen, L.; Romo-Mancillas, A.; García-Alcocer, G. Study of Endogen Substrates, Drug Substrates and Inhibitors Binding Conformations on MRP4 and Its Variants by Molecular Docking and Molecular Dynamics. *Molecules* 2021, 26, 1051, doi:10.3390/molecules26041051
7. Berendsen, H., van der Spoel, D. & van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91(1-3), 43-56. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-e](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-e).
8. Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., . . . Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545-1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
9. Burglova, K., Okorochenkov, S., & Hlavac, J. (2016). Efficient Route to Deuterated Aromatics by the Deamination of Anilines. *Organic Letters*, 18(14), 3342–3345. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01438>
10. Charrier, N., Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Hawkins, J., Howes, C., Hubbard, J., Hussain, I., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., . . . Wayne, G. (2009). Second generation of BACE-1 inhibitors. Part 1: The need for improved pharmacokinetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(13), 3664–3668. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.165>
11. Chávez-Elías, A. (2018). Síntesis y actividad antiepiléptica de pirrolidonas 1,4-disustituidas (Tesis para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Químico Biológicas). Facultad de Química; Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.
12. Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2009). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section*

13. Consortium, T.U. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017,45, D158–D169, doi:10.1093/nar/gkw1099.
14. Contreras-García, I.J.; Cárdenas-Rodríguez, N.; Romo-Mancillas, A.; Bandala, C.; Zamudio, S.R.; Gómez-Manzo, S.; Hernández-Ochoa, B.; Mendoza-Torreblanca, J.G.; Pichardo-Macías, L.A. (2022). Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals*. 15, 475. <https://doi.org/10.3390/ph15040475>
15. Correa-Basurto, J., Cuevas-Hernández, R. I., Phillips-Farfán, B. V., Martínez-Archundia, M., Romo-Mancillas, A., Ramírez-Salinas, G. L., . . . Mendoza-Torreblanca, J. G. (2015). Identification of the antiepileptic racetam binding site in the synaptic vesicle protein 2A by molecular dynamics and docking simulations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fncel.2015.00125
16. Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 11(11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
17. Dämgen, M.A.; Biggin, P.C. (2018). Computational methods to examine conformational changes and ligand-binding properties: Examples in neurobiology. *Neurosci.* doi:10.1016/j.neulet.2018.03.004.
18. Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., . . . Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482. doi:10.1111/epi.12550
19. Fuentes de Gilbert, B. (2007). Epilepsia. In *Tratado de geriatría para residentes*. Madrid: Sociedad Española de Geriatría y Gerontología.
20. Gadakh, B., Vondenhoff, G., Lescrinier, E., Rozenski, J., Froeyen, M., & van Aerschot, A. (2014). Base substituted 5'-O-(N-isoleucyl)sulfamoyl nucleoside analogues as potential antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(10), 2875–2886. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.040>
21. Hopfinger, A. J. (1985). Computer-assisted drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28(9), 1133-1139. <https://doi.org/10.1021/jm00147a001>
22. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859-1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
23. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. *et al* (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
24. Kenda, B. M., Matagne, A. C., Talaga, P. E., Pasau, P. M., Differding, E., Lallemand, B. I., Frycia, A. M., Moureau, F. G., Klitgaard, H. V., Gillard, M. R., Fuks, B., & Michel, P. (2003). Discovery of 4-Substituted Pyrrolidone Butanamides as New Agents with Significant Antiepileptic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(3), 530–549. <https://doi.org/10.1021/jm030913e>
25. Lee, J.; Daniels V, Sands ZA, Lebon F, Shi J, Biggin PC. (2015). Exploring the Interaction of SV2A with Racetams Using Homology Modelling, Molecular Dynamics and Site-Directed Mutagenesis. *PLoS ONE* 10(2): e0116589. doi:10.1371/journal.pone.0116589

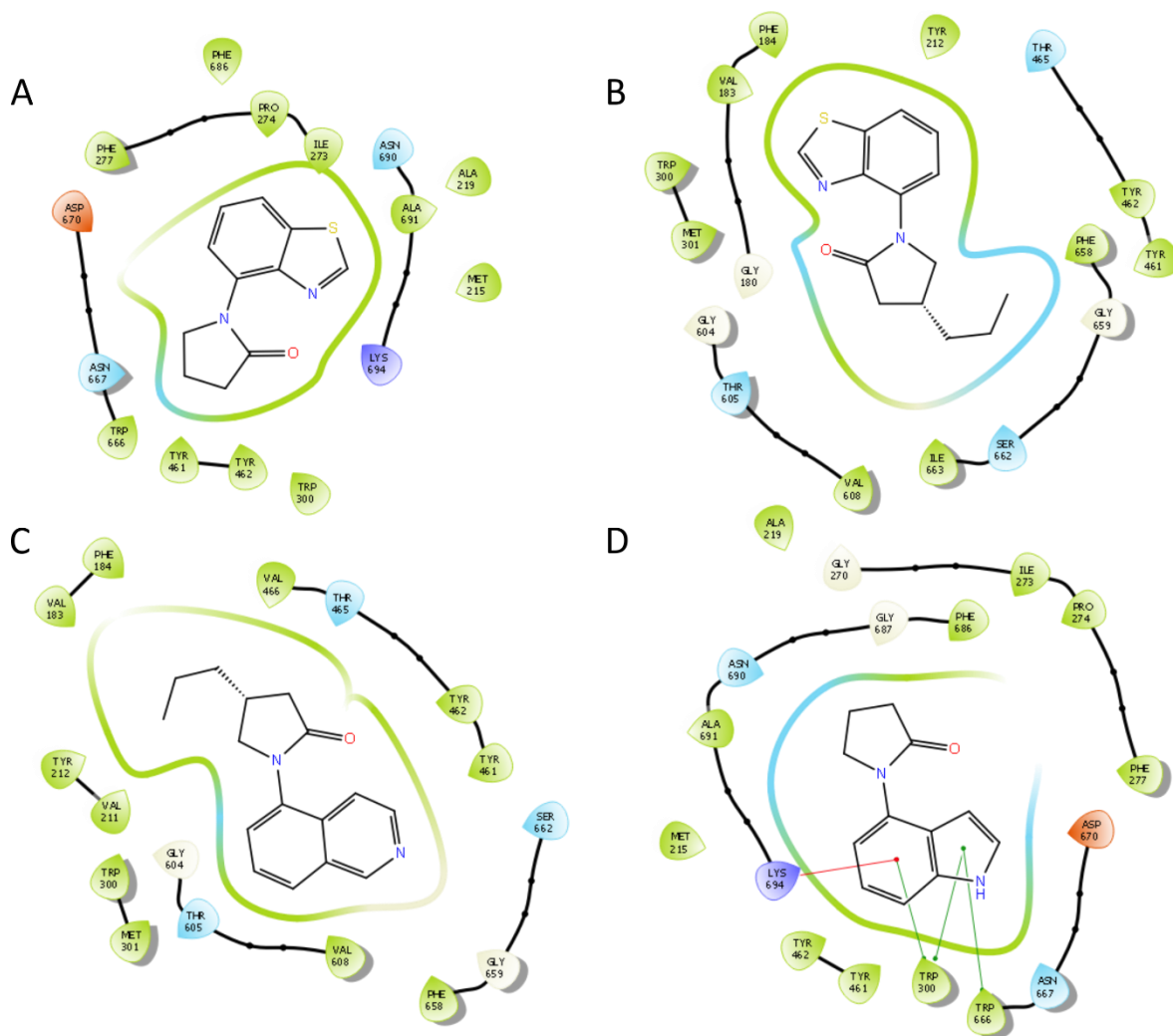
26. Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B. & Im, W. (2015). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405-413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
27. Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2887-2899. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.10.011
28. Londhe, A.M.; Gadhe, C.G.; Lim, S.M.; Pae, A.N. (2019). Investigation of Molecular Details of Keap1Nrf2 Inhibitors Using Molecular Dynamics and Umbrella Sampling Techniques. *Molecules*. 24, 4085, doi:10.3390/molecules24224085.
29. López-González, R. (2016). EPILEPSIA, TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO Y SU MONITOREO. *Cúpula*, 30(2), 44-53.
30. Löscher, W.; Gillard, M.; Sands, Z. A.; Kaminski, R. M.; Klitgaard, H. *CNS Drugs* (2016) Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond. 30:1055–1077. doi: 10.1007/s40263-016-0384-x.
31. Lv, F., Li, Z. F., Hu, W., & Wu, X. (2015). Small molecules enhance functional O-mannosylation of Alpha-dystroglycan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(24), 7661–7670. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.011>
32. Lyseng-Williamson KA. (2011). Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs*. Mar 5;71(4):489-514. doi: 10.2165/11204490-00. PMID: 21395360.
33. Maehr, H., & Smallheer, J. M. (1981). ChemInform Abstract: A NEW APPROACH TO 4-SUBSTITUTED INDOLES. *Chemischer Informationsdienst*, 12(36). <https://doi.org/10.1002/chin.198136221>
34. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, Maestro 2020, (n.d.). <https://www.schrodinger.com/desmond>.
35. Medina-Franco, J. L., Fernández-de Gortari, E. & Naveja, J. J. (2015). Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 26(3), 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.05.002>
36. Medina-Franco, J. L., Lopez-Vallejo, F. & Castillo, R. (2006). Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 17. 452-457.
37. Mercier, J.; Archen, L.; Bollu, V.; Carré, S.; Evrard, Y.; Jnoff, E.; Kenda, B.; Lallemand, B.; Michel, P.; Montel, F.; Moureau, F.; Price, N.; Quesnel, Y.; Sauvage, X.; Valade, A. & Provins, L. (2014), Discovery of Heterocyclic Nonacetamide Synaptic Vesicle Protein 2A (SV2A) Ligands with Single-Digit Nanomolar Potency: Opening Avenues towards the First SV2A Positron Emission Tomography (PET) Ligands. *ChemMedChem*, 9: 693-698. doi:10.1002/cmdc.201300482
38. Mitsutake, A.; Nagai, T.; Takano, H. (2013). Relaxation mode analysis for simulations of biomolecules. 1637, 164102, doi:10.1007/s12551-018-0406-7.
39. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

40. Mylavarapu, R.; Anand, R. V.; Kondaiah, G. C. M.; Reddy, L. A.; Reddy, G. S.; Roy, A.; Bhattacharya, A.; Mukkanti, K.; Bandichhor, R. (2010). An Alternate Synthesis of Levetiracetam. *Green Chem. Lett. Rev.* 3, 225–230.
41. Neelakandan, K.; Chavan, A. B.; Prabhakaran, B.; Manikandan, H. (2013). An Efficient Process of Racemization of Alpha-Ethyl-2-Oxo-1-Pyrrolidineacetic Acid: A Levetiracetam Intermediate. *Der Pharm. Sin.* 4, 168–172.
42. Ohno, Y., & Tokudome, K. (2017). Therapeutic Role of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) in Modulating Epileptogenesis. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 16(4). doi:10.2174/1871527316666170404115027
43. Organización Mundial de la Salud (OMS). Consultado, noviembre de 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
44. Parrinello, M. & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182-7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
45. Pascual, M. R. (2007). Temporal Lobe Epilepsy: Clinical Semiology and Neurophysiological Studies. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 28(6), 416-423. doi:10.1053/j.sult.2007.09.004
46. Privitera, M. (2001). Efficacy of Levetiracetam: A Review of Three Pivotal Clinical Trials. *Epilepsia*, 42: 31-35. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2001.00007.x>
47. Ram, S., & Ehrenkauf, R. E. (1984). A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent. *Tetrahedron Letters*, 25(32), 3415–3418. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)91034-2](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)91034-2)
48. Raut, D.; Bhatt., L (2020) Evolving targets for anti-epileptic drug discovery. *European Journal of Pharmacology*. 77, art. no. 173582. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173582
49. Reddy, D.; Younus, I. (2018) A resurging boom in new drugs for epilepsy and brain disorders. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 11(1), 27-45. doi: 10.1080/17512433.2018.1386553
50. Reimers, A., & Brodtkorb, E. (2012). Second-generation antiepileptic drugs and pregnancy: A guide for clinicians. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 12(6), 707-717. doi:10.1586/ern.12.32
51. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 2010, 5, 725–738, doi:10.1038/nprot.2010.5
52. Santos-Martins, D., Solis-Vasquez, L., Tillack, A. F., Sanner, M. F., Koch, A. & Forli, S. (2021). Accelerating AutoDock4 with GPUs and Gradient-Based Local Search. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(2), 1060-1073. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c01006>
53. Schauwecker, P. E. (2012). Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease*, 45(1), 297–304.
54. Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., . . . Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521. doi:10.1111/epi.13709

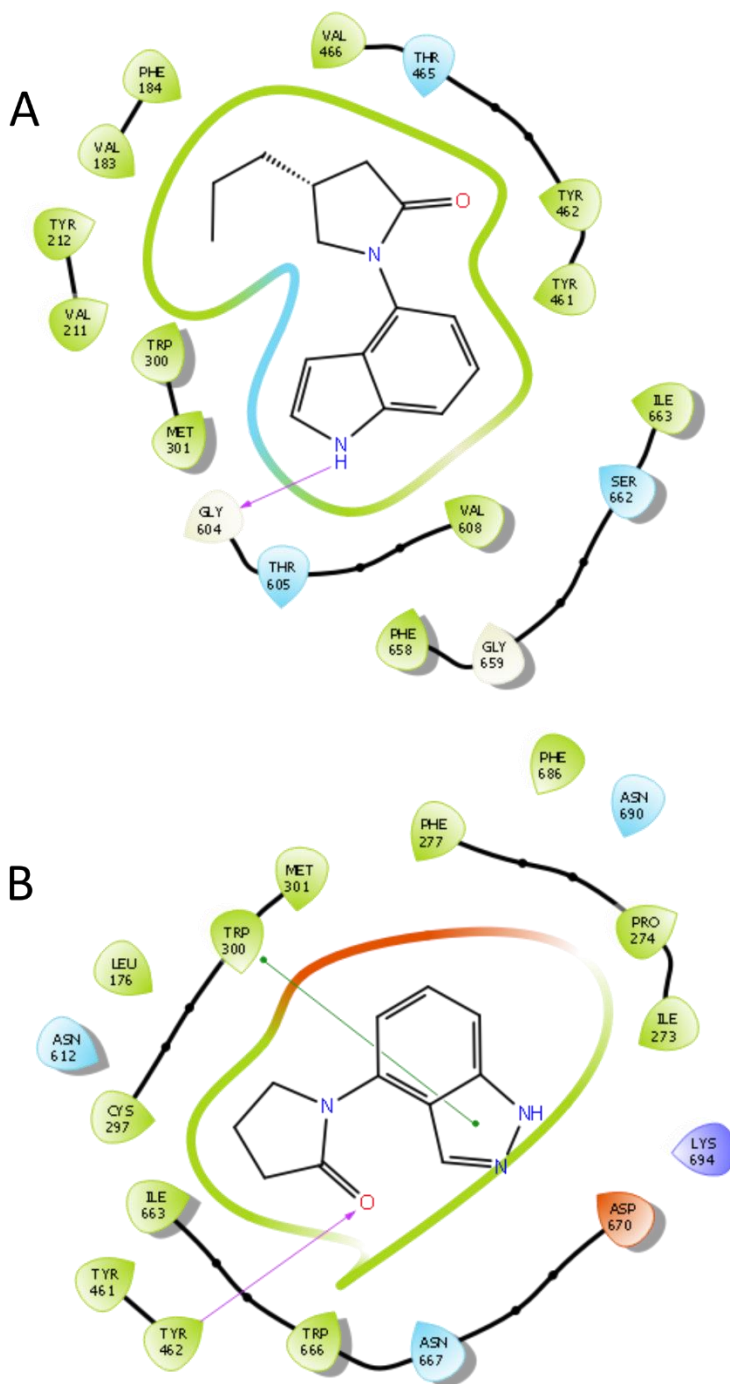
55. Shi J., Anderson D., Lynch B., Castaigne J., Foerch P., Lebon F. (2011). Combining modelling and mutagenesis studies of synaptic vesicle protein 2A to identify a series of residues involved in racetam binding. *Biochem Soc Trans* 1. 39 (5): 1341–1347. doi: <https://doi.org/10.1042/BST0391341>
56. Sneha, P.; George Priya Doss, C. (2016) Molecular Dynamics. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Elsevier Inc., Vol. 102, pp. 181–224 ISBN 9780128047958.
57. Steinhoff, B. J.; Staack, A. M. (2019). Levetiracetam and brivaracetam: a review of evidence from clinical trials and clinical experience. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 12, 1-23. doi:10.1177/1756286419873518
58. Stout, K. A., Dunn, A. R., Hoffman, C., & Miller, G. W. (2019). The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2: Structure, Function, and Disease Relevance. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(9), 3927-3938. doi:10.1021/acscchemneuro.9b00351
59. Surtees, J.; Bouvy, D.; Thomas, A. (2011). Process for the Preparation of 2-Oxo-1-Pyrrolidine Derivatives. *EP Pat. 1806339A1*, 1, 1–32.
60. Talbot, C. J., & Kubilus, J. K. (2018). Developmental analysis of SV2 in the embryonic chicken corneal epithelium. *Experimental Eye Research*, 172, 137-143. doi:10.1016/j.exer.2018.04.002
61. Thijs, R. D., Surges, R., O'brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), 689-701. doi:10.1016/s0140-6736(18)32596-0
62. Tucker, J. L.; Xu, L.; Tu, W.; Scott, R. W.; Zhao, L.; Ran, N. (2009). Chemoenzymatic Processes for Preparation of Levetiracetam. *WO Pat. WO/2009/009117 A3* 4.
63. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701-1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
64. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., . . . Velankar, S. (2021). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
65. Vázquez, J., Prieto, A., Fernández, R., Enders, D., & Lassaletta, J. M. (2002). Asymmetric Michael addition of formaldehyde N,N-dialkylhydrazones to alkylidene malonates. *Chemical Communications*, 5, 498. <https://doi.org/10.1039/b200209b>
66. Vidaurre, J., Gedela, S., & Yarosz, S. (2017). Antiepileptic Drugs and Liver Disease. *Pediatric Neurology*, 77, 23-36. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2017.09.013
67. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, 12, 7–8, doi:10.1038/nmeth.3213
68. Yao, J., Nowack, A., Kensel-Hammes, P., Gardner, R. G., & Bajjalieh, S. M. (2010). Cotrafficking of SV2 and Synaptotagmin at the Synapse. *Journal of Neuroscience*, 30(16), 5569-5578. doi:10.1523/jneurosci.4781-09.2010
69. Zhang, J.; Yang, J.; Jang, R.; Zhang, Y. (2015) GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G ProteinCoupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure*, 23, 1538–1549, doi:10.1016/j.str.2015.06.007



## 11. ANEXOS

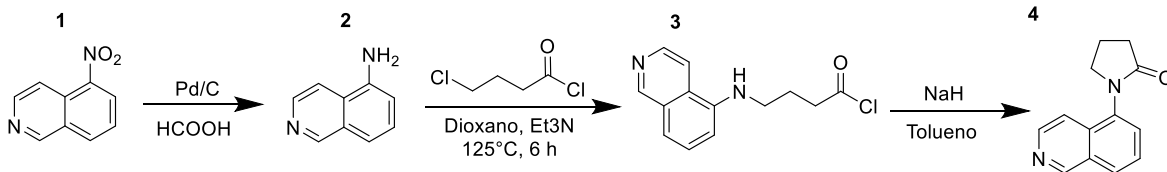


**Anexo 1.** Diagramas de interacción de JMAB-2-B1, JMAB-2-B2, JMAB-2-C2 y JMAB-2-D1 con SV2A. En la imagen pueden observarse las 4 diferentes estructuras de A) JMAB-2-B1, B) JMAB-2-B2, C) JMAB-2-C2 y JMAB-2-D1. Los estudios de acoplamiento muestran interacciones en D de tipo  $\pi$ -catión entre el anillo del indol y el residuo Lys694, así como tres interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre la misma estructura del indol y los residuos Trp300 y Trp666. Las demás estructuras muestran un acoplamiento por ambientes hidrofóbicos (en color verde) y de tipo polares (en color azul).



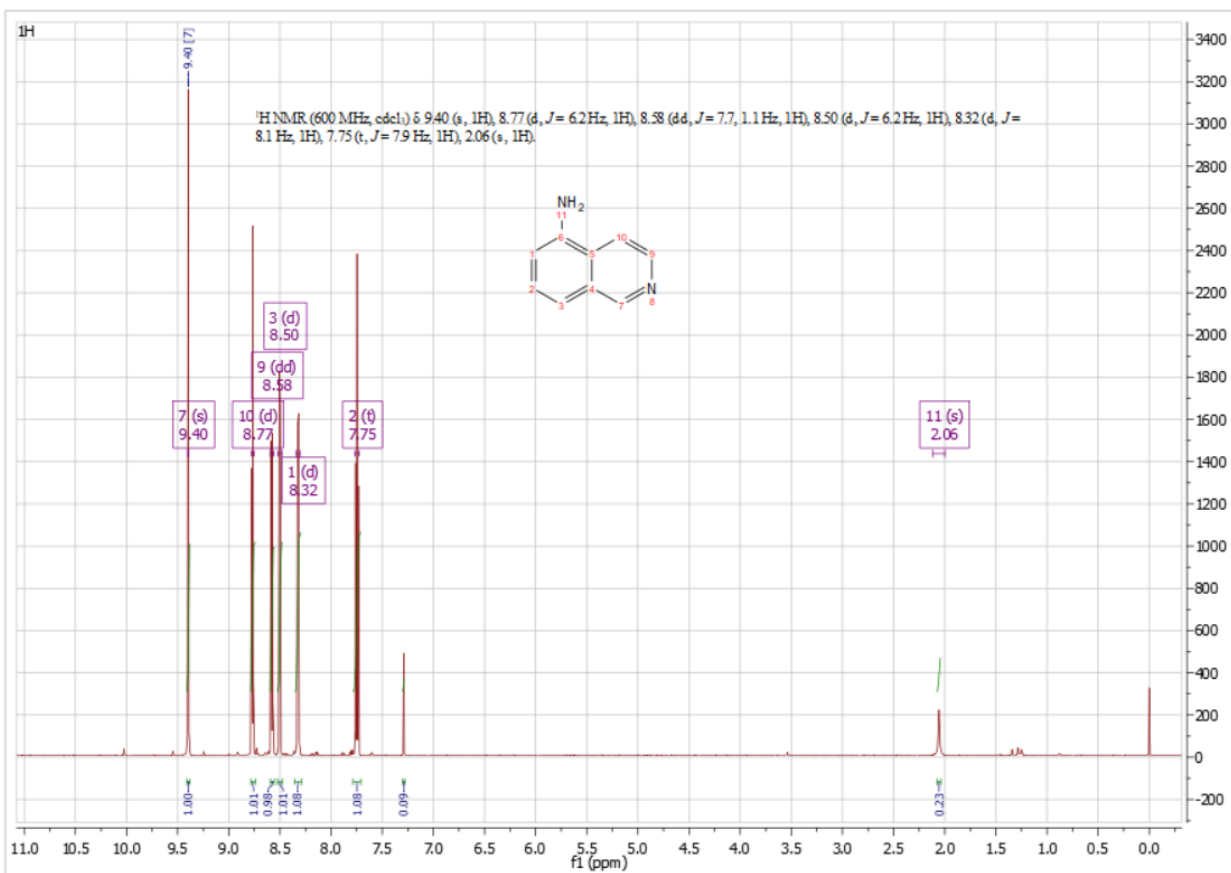
**Anexo 2.** Diagramas de interacción de JMAB-2-D2 y JMAB-2-E1 con SV2A. En la imagen pueden observarse las estructuras de A) JMAB-2-D2 y B) JMAB-2-E1. Los estudios de docking muestran en A interacciones de tipo donador de puentes de hidrógeno entre el amino protonado del heterociclo indol y el residuo Gly604, mientras que para B se observan interacciones de tipo aceptor de puentes de hidrógenos entre el oxígeno del carbonilo del anillo de pirrolidona y el residuo Tyr 462, así como interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre el heterociclo de indazol y el residuo Trp300.

### Anexo 3. Ruta sintética para la obtención de 1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona (JMAB-2-C1).

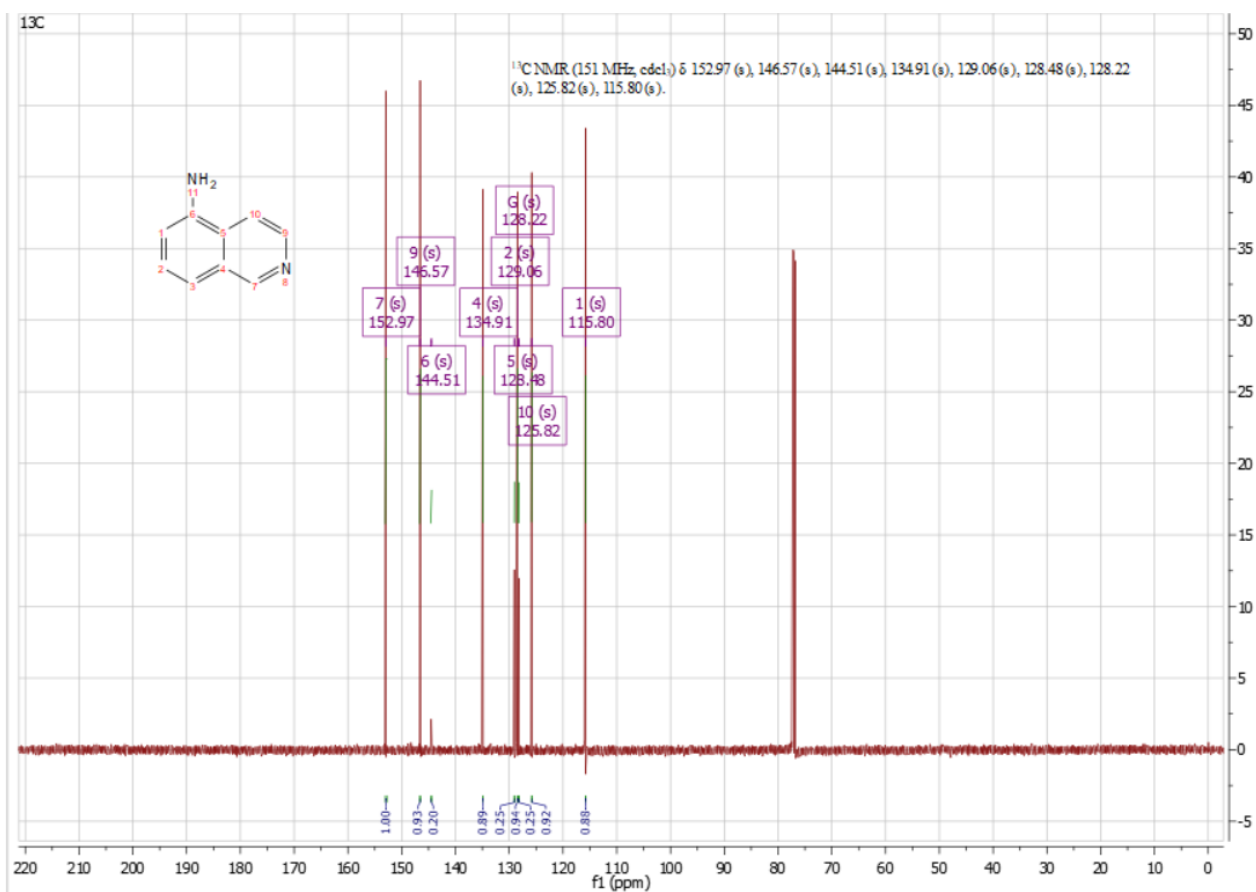


En un matraz bola de fondo plano de 125 mL se colocaron 2 g (11.484mmol) de **1** y se disolvieron en 20 mL de ácido fórmico, posteriormente el matraz de reacción se llevó a un baño de agua fría (2 °C) y se sometió a una atmosfera inerte con gas argón. Después se pesaron 0.2 g (1.1148 mmol) del catalizador de paladio sobre carbono (Pd/C) al 10 % y se añadió lentamente al matraz. Una vez añadido todo el catalizador, se pasó nuevamente gas argón para asegurar una atmosfera inerte y se dejó en agitación y reflujo durante 24 horas a una temperatura de 80-90 °C. Una vez terminada la reacción, monitoreada por CCF el catalizador de Pd/C se retiró mediante filtración con 3 lavados de 10 mL de dioxano cada uno para asegurar que no quedara compuesto orgánico atrapado en el filtro. La solución ácida de dioxano se concentró en un rotavaporador obteniendo el producto **2** (5-aminoisoquinolina, PM: 144.17 g/mol), un sólido color amarillo brillante con un rendimiento crudo del 83.5 % (9.589 mmol).

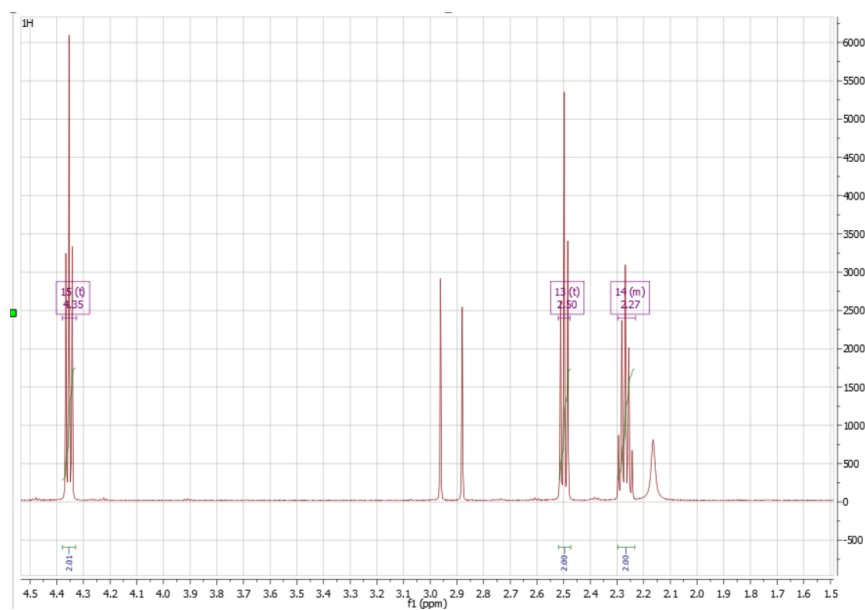
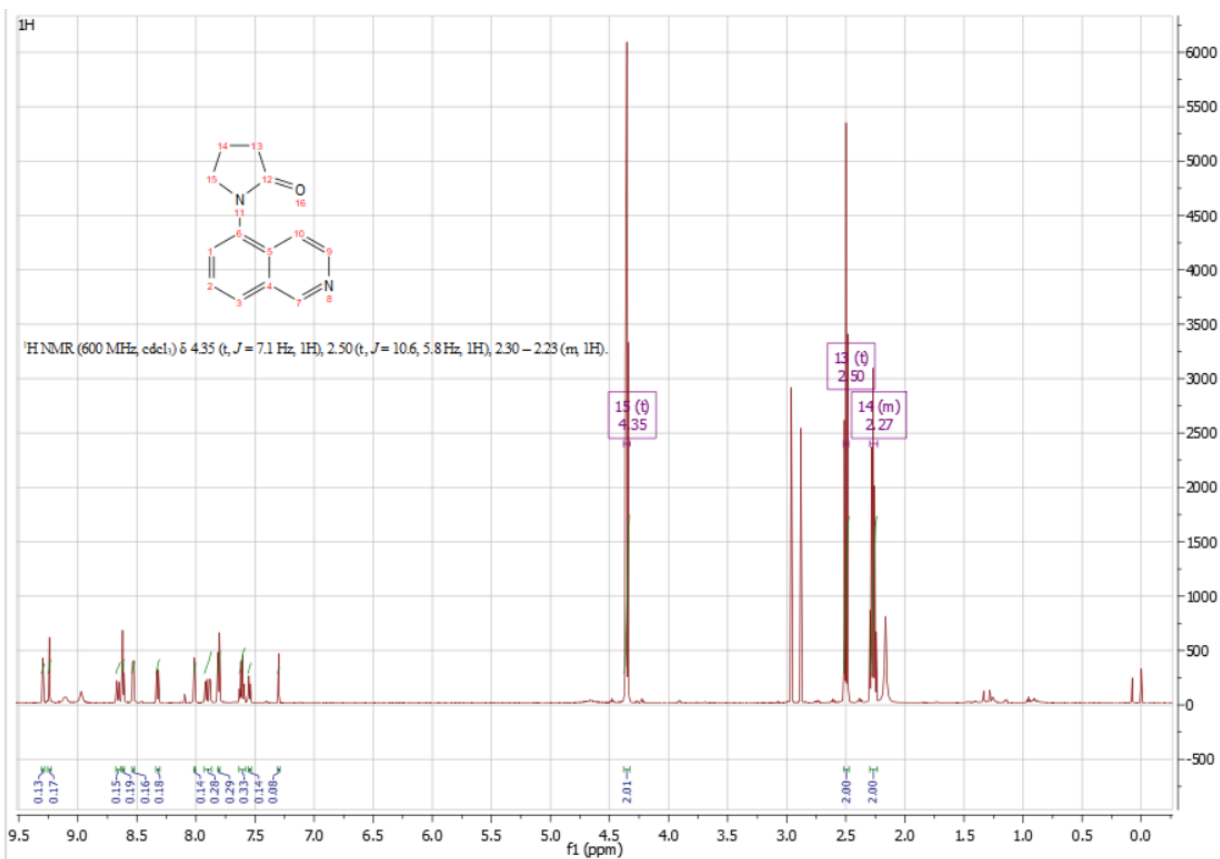
Posteriormente en un matraz se adicionó el producto **2** y se añadieron 25 mL de dioxano, se agitó hasta su completa disolución y se añadieron 2.04 mL (14.38 mmol) de trietilamina, la reacción se dejó en agitación durante 20 min a 45 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron poco a poco 2.76 mL (10.549 mmol) del cloruro de 4-clorobutirilo, se llevó a una atmosfera inerte de gas argón y la reacción se dejó a reflujo durante 6 horas a 125 °C. Al final de la reacción se formó un sólido insoluble, pudiéndose tratar de la sal cloruro de trietilamonio, se optó por filtrar el sólido y el líquido correspondiente al producto **3** se llevó al rotavapor para concentrar el dioxano, se formó un sólido color grisáceo que posteriormente se resuspendió en tolueno y se añadieron 0.383 g (9.589 mmol) de hidruro de sodio para dejarlo reaccionar durante dos horas a 60 °C en agitación y reflujo. Al término de la reacción el tolueno se concentró en el rotavapor y se hizo una extracción con agua/AcOEt por triplicado, la fase orgánica se concentró en el rotavapor y se obtuvo un sólido color café pálido siendo este el producto **4** (1-(isoquinolin-5-il)pirrolidin-2-ona, PM: 212.24 g/mol), con un rendimiento crudo del 9.5 % correspondientes a un peso de 195 mg (0.9187 mmol).



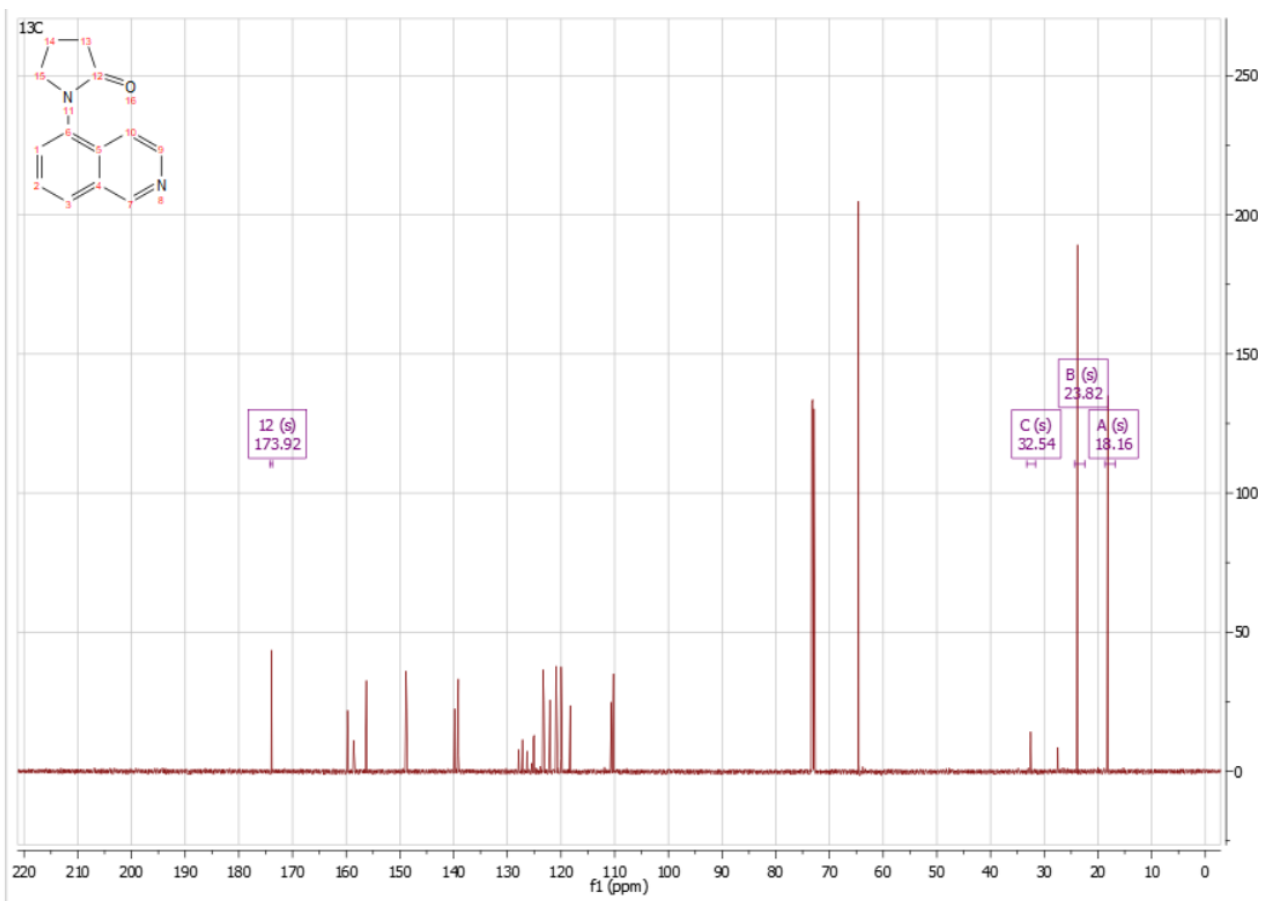
**Anexo 4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **2**. Se muestran las señales representativas de **2**, siendo el singlete que se encuentra desplazado en 2.06 ppm la señal del grupo amino aromático, indicando la reducción del grupo nitro.



Anexo 5. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de 2. Se muestran las señales de los carbonos aromáticos.

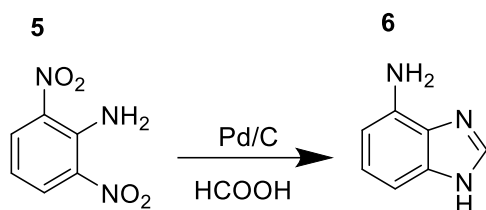


**Anexo 6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **JMAB-2-C1**. Se muestran las señales representativas de los tripletes en 2.50 y 4.35 ppm y el multiplete en 2.27, indicando a los átomos de hidrogeno de los carbonos 13, 15 y 14 respectivamente, mostrando a la pirrolidona de la molécula formada.



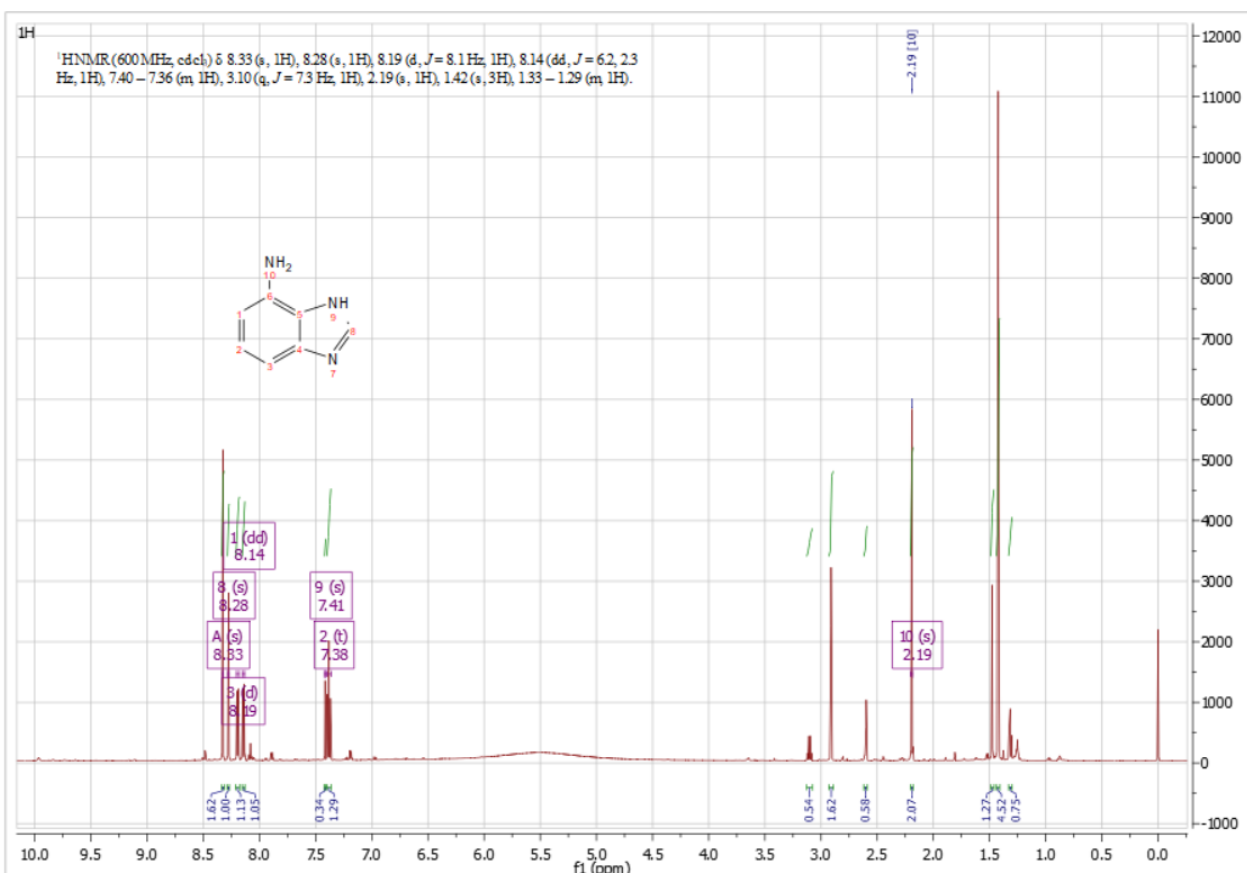
**Anexo 7.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de JMAB-2-C1. Se muestran las señales representativas de los carbonos de la pirrolidona, sin embargo, se observa un exceso de señales proveniente de los disolventes presentes en la muestra.

### Anexo 8. Ruta sintética para la obtención de 7-aminobenzimidazol.

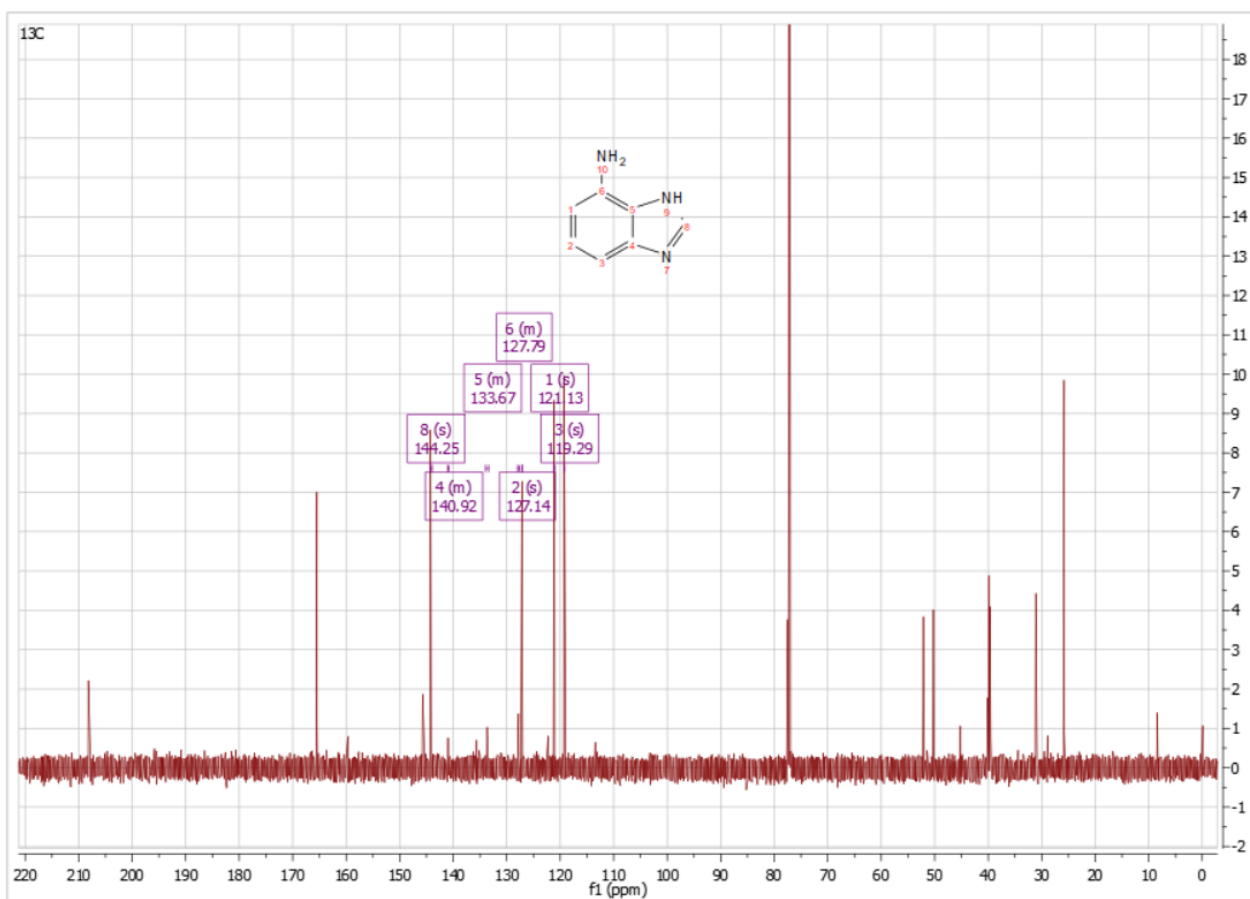


En un matraz bola de fondo plano de 125 mL se añadieron 5 g (26.75 mmol) de 2,6-dinitroanilina (**5**) y, con mucho cuidado, 500 mg de catalizador de Pd/C al 10 %, posteriormente se hizo pasar gas argón al matraz para mantener una atmosfera inerte y enseguida se añadieron lentamente 50 mL de ácido fórmico, se dejó reaccionando en agitación y reflujo a una temperatura de 80 – 90 °C durante 24 horas. Al término de la reacción monitoreada por CCF, el catalizador de Pd/C se filtró por gravedad y se realizaron lavados con MeOH obteniendo un líquido verdoso. El MeOH ácido se concentró en el rotavapor y se obtuvo un semisólido de color oscuro, siendo este el producto **6** (7-aminobenzimidazol, PM: 133.15 g/mol), con un peso de 0.987 g (7.4126 mmol) equivalente a un rendimiento crudo del 27.7 %.



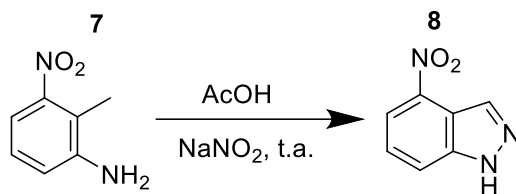


**Anexo 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **6**. Se muestran las señales representativas de los hidrógenos de los carbonos aromáticos ente 7.2 y 8.4 ppm. El singulete que se encuentra en 8.28 ppm corresponde a la señal del protón que se encuentra en el átomo de carbono número 8 de la estructura, así como la señal de 2.19 ppm que representa el grupo amino del bencimidazol que integra para dos protones.

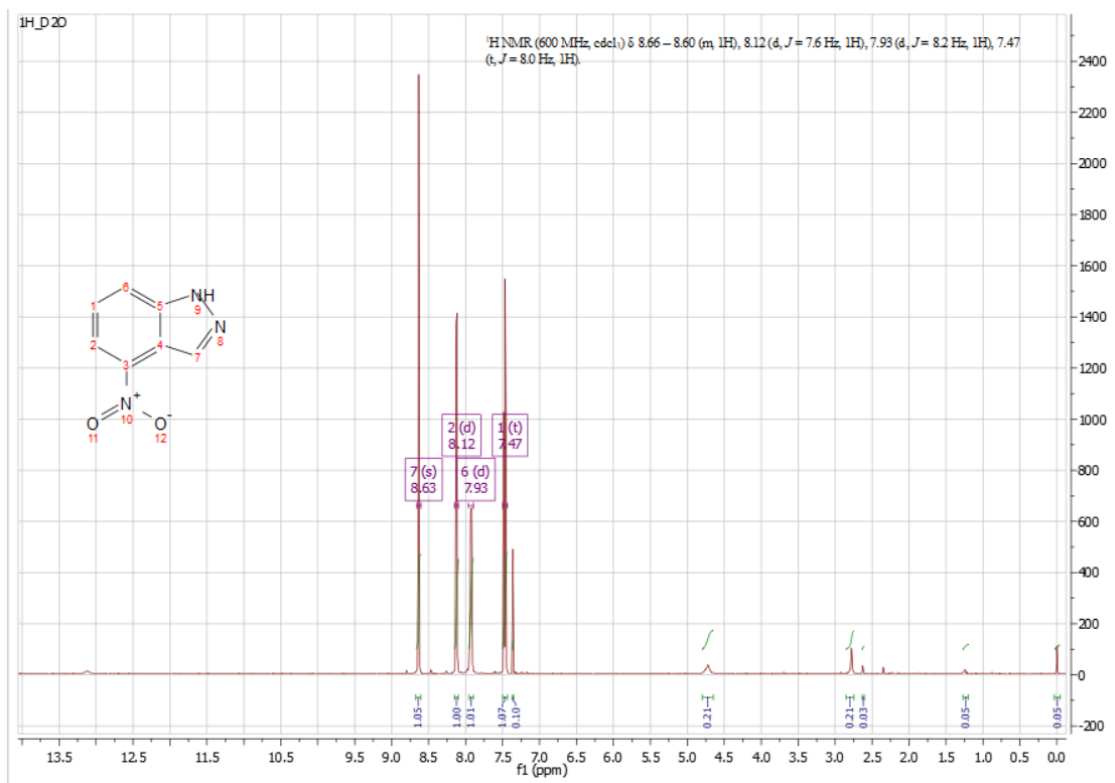


**Anexo 10.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de **6**. Se muestra la señal en 144.25 ppm correspondiente al carbono número 8 de la estructura, así como los carbonos aromáticos que se señalan en el espectro. Las señales restantes muestran que el compuesto está contaminado.

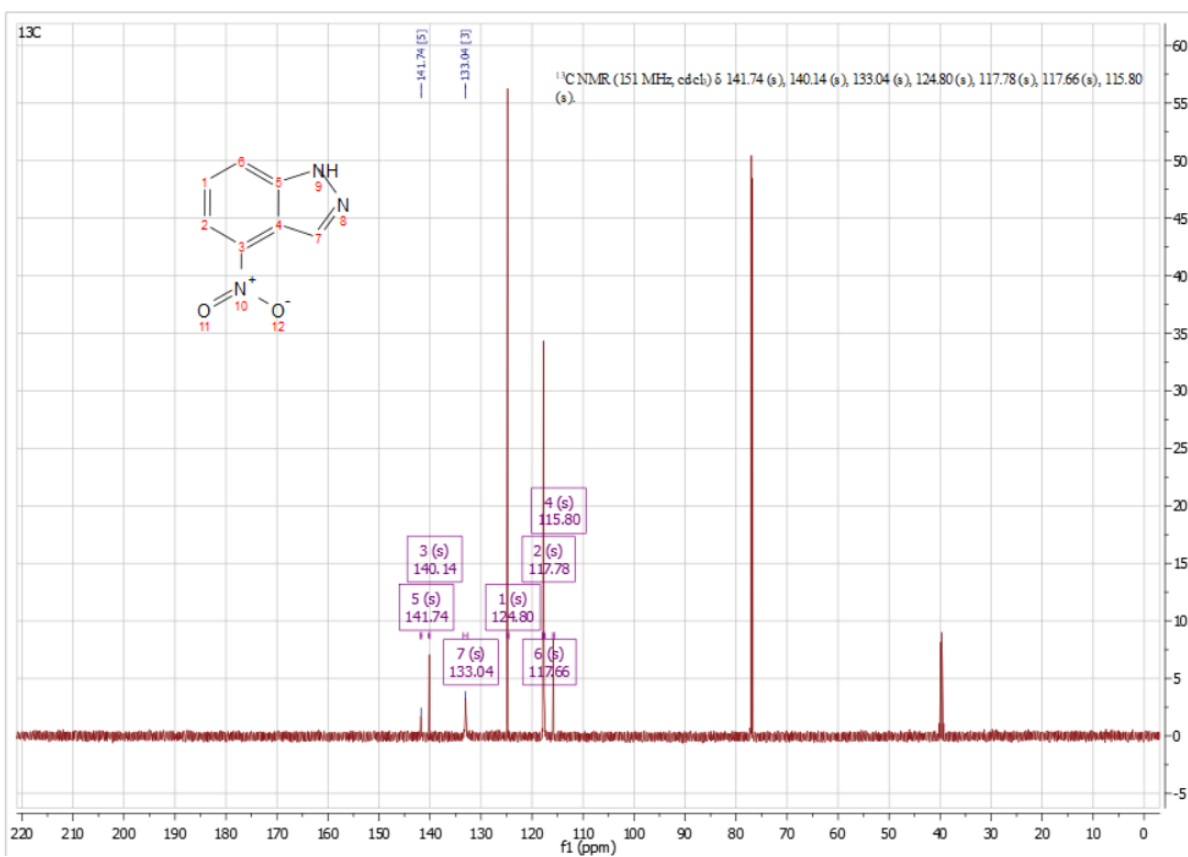
### Anexo 11. Ruta sintética para la obtención de 7-nitroindazol



En un matraz bola de fondo plano se añadieron 4.52 g (29.707 mmol) de **7** (3-nitro-2-metilanilina) y posteriormente se añadieron poco a poco 45 mL de ácido acético hasta disolver completamente a **7**, en seguida y en agitación constante, se añadieron lentamente 4.09 g (59.27 mmol) de nitrito de sodio y se dejó reaccionar durante 72 horas a temperatura ambiente. En el proceso comenzaba a formarse un sólido color naranja. Al término de la reacción monitoreada por CCF, el AcOH se concentró en el rotavapor y el sólido resultante su resuspendió en AcOEt caliente, se filtró al vacío encontrándose el producto **8** en la fase líquida, siendo el sólido aparentemente acetato de sodio, por lo que se concentró el AcOEt. Se procedió a purificar el sólido resultante disolviéndolo en tolueno caliente y filtrando de la misma manera en caliente. Conforme el líquido comenzaba a enfriarse aparecieron sólidos de color marrón. El tolueno se concentró y el producto obtuvo un rendimiento crudo del 43.39 % con un peso de 2.089 g (12.889 mmol) de **8** (4-nitroindazol, PM:162.12 g/mol).

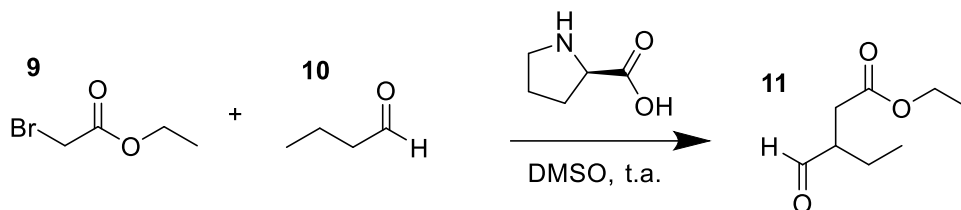


**Anexo 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **8**. Se muestran las señales representativas de los hidrógenos de los carbonos aromáticos ente 7.2 y 8.7 ppm. El singulete de la señal en 8.63 ppm representa al hidrógeno del carbono número 7 de la estructura representada.



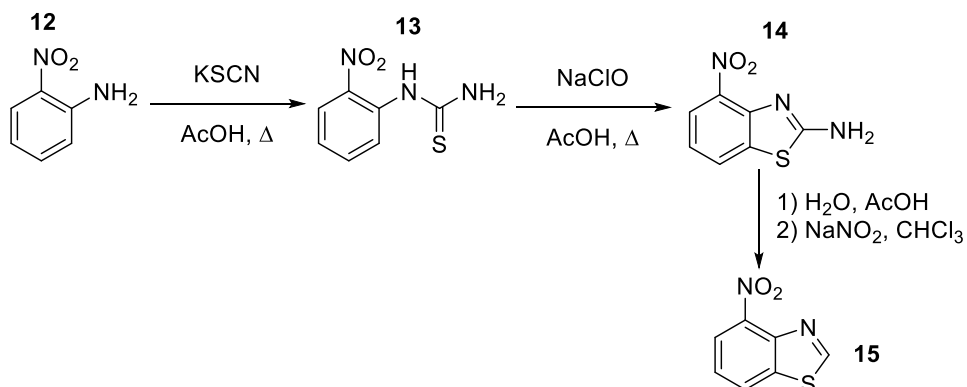
Anexo 13. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de **8**. Se observan las 7 señales de los carbonos aromáticos.

#### Anexo 14. Ruta sintética para la obtención de 3-formilpentanoato de etilo



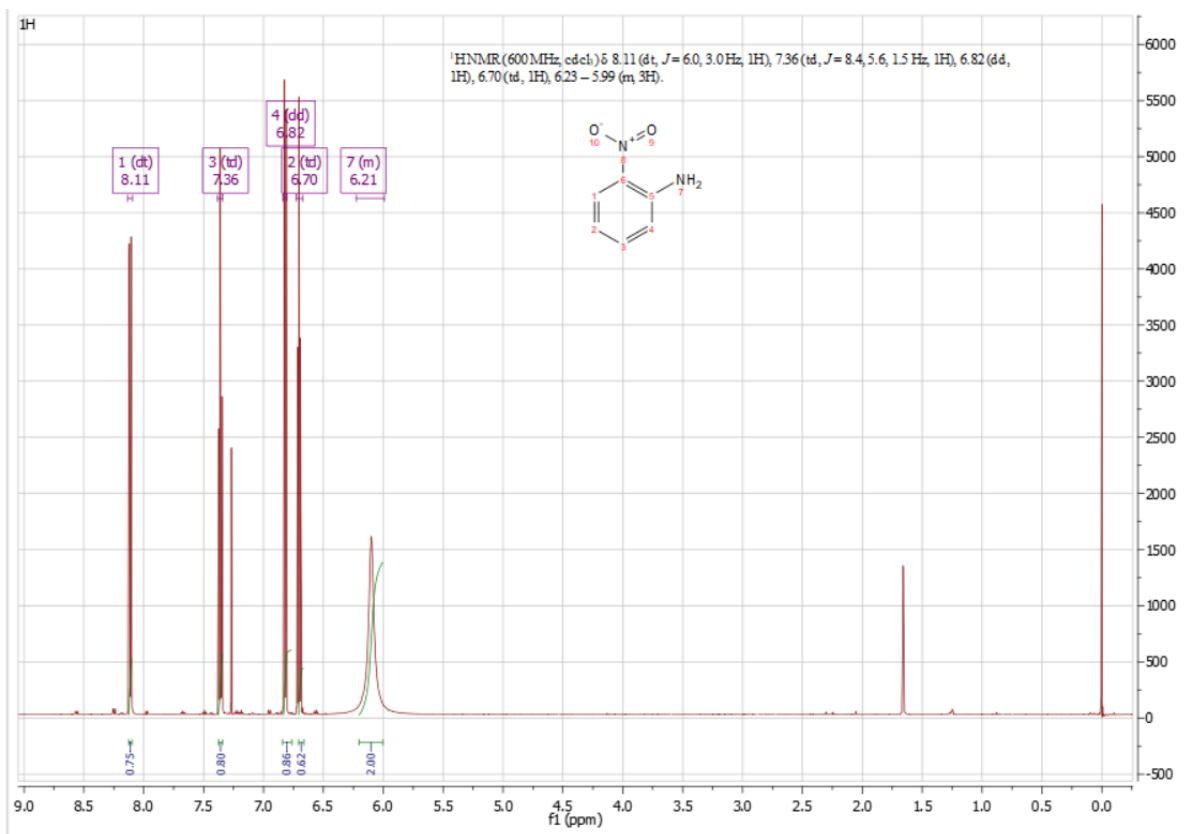
En un matraz bola de fondo plano de 125 mL se añadieron 100 mg (0.8686 mmol) de L-prolina y 8 mL de DMSO, se agitó hasta que estuviera disuelta la L-prolina. Posteriormente se añadieron 0.73 mL (8.686 mmol) de butiraldehído (**10**) al matraz y se dejó en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente en un sistema cerrado. Transcurrido ese tiempo se añadieron 1.441 mL (13.029 mmol) de 2-bromoacetato de etilo. La reacción se dejó en agitación constante durante 48 horas a temperatura ambiente en un sistema cerrado. Al final de la reacción se hizo una extracción utilizando AcOEt/agua, la fase orgánica incolora mostraba producto puro por CCF tratándose del producto **11**.

#### Anexo 15. Ruta sintética para la obtención de 4-nitrobenzotiazol.



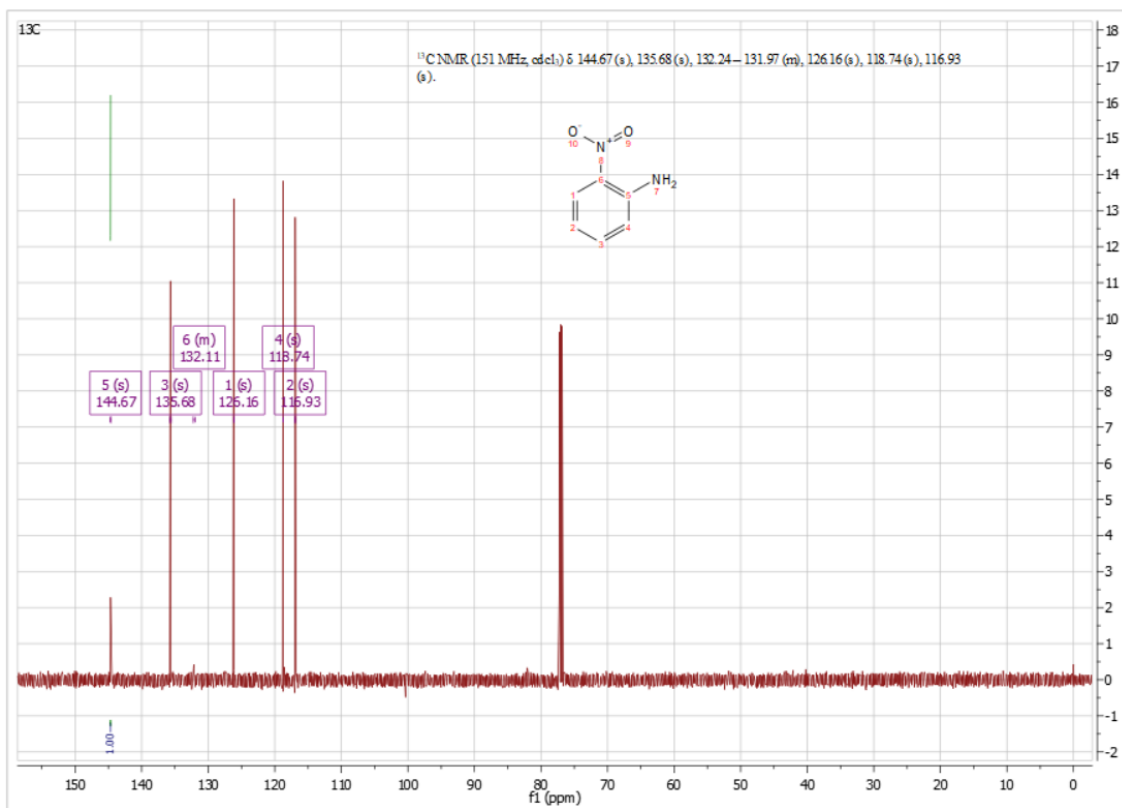
En un matraz bola de fondo plano se disolvieron 500 mg (3.619 mmol) de **12** (2-nitroanilina) en 5 mL de ácido acético glacial a 130 °C en agitación constante, posteriormente se agregaron 380 mg (3.91 mmol) de KSCN, la reacción se dejó a reflujo y agitación constante durante 3 horas a una temperatura de 130 °C. Una vez terminada la reacción y haber obtenido **13**, se añadieron al matraz de reacción 2.23 mL de NaClO al 5 % (1.75 mmol) y se dejó en agitación durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se agregaron lentamente 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se dejó la reacción en agitación y reflujo durante 2 horas más. Al término de la reacción el ácido acético se concentró en el rotavapor, el producto obtenido **14** se lavó con 50 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10 % en un baño de hielo, el compuesto comenzó a precipitarse entre los primeros 10-20 minutos. El sólido se filtró por gravedad y se lavó con la solución de bicarbonato fría. Por último, el producto se disolvió en 5 mL de agua y 1 mL de ácido acético, se añadieron 69 mg (1 mmol) de nitrito de sodio y 2 mL de cloroformo, se dejó en agitación durante 45 minutos. Al término de la desaminación se lavó todo con 15 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10 % hasta llevar a pH = 7. Se realizó una extracción con AcOEt por triplicado, para posteriormente concentrar

el mismo disolvente. Se obtuvo un semisólido color rojo oscuro, el cual se disolvió en ciclohexano caliente, una vez disuelto se dejó atemperar por 30 minutos y se pasó por un baño de hielo para obtener cristales, estos se filtraron y se lavaron con ciclohexano frío.



**Anexo 16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **15**. Se muestran las señales representativas de los hidrógenos de los carbonos aromáticos ente 6.5 y 8.5 ppm. El singlete de la señal en 6.21 ppm representa a los protones del grupo amino de la estructura, por lo que se concluye que la reacción no tuvo avance.





**Anexo 17.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C de **15**. Las señales indican la presencia de los carbonos del reactivo y no del producto deseado.