



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Síntesis y modelado farmacofórico basado en la estructura de la  
transcriptasa reversa del VIH tipo 1 de amidas derivadas del  $\beta^2$ -triptófano”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**I.F. Tonatiuh Benítez González**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
FARMACOLOGÍA**

**Directora de la tesis: Dra. Martha Sonia Morales Ríos**

Ciudad de México

Mayo, 2017

*AGRADECIMIENTOS:*

Al CONACyT por la beca otorgada.

Al Departamento de Farmacología del CINVESTAV Zacatenco por las facilidades otorgadas en la elaboración de esta tesis.

A los colaboradores del equipo del laboratorio 30 del Departamento de Química:

- Q.F.B. Joel de Jesús Trujillo Serrato, por la capacitación y ayuda en técnicas de síntesis química
- Q.F.B. Nadia Azucena Pérez Rojas, por su ayuda en las pruebas de espectrometría de masas
- Q.F.B. Yolanda Mora Pérez, por la ayuda en las pruebas de resonancia magnética nuclear y análisis de docking molecular
- Q.F.B. Elvia Celina Álvarez Cisneros por la ayuda en las pruebas de resonancia magnética nuclear
- Q.F.B. Angelina Hernández Barragán por su ayuda en las pruebas de cristalografía por difracción de rayos X.

A mi familia y seres queridos que me acompañaron y apoyaron en esta etapa

A mis compañeros de generación de maestría y compañeros de laboratorio por las experiencias vividas en este periodo

Esta tesis se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) bajo la dirección de la Dra. Martha Sonia Morales Ríos en el marco del programa de Posgrado de Farmacología, con una beca de inversión en el conocimiento otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro becario 589944; No. de apoyo 422786).

**Parte de los resultados de esta tesis se presentaron en un congreso nacional**

Modelado farmacofórico basado en la estructura de la transcriptasa reversa del VIH tipo 1 y  
análisis docking de un bipyrimidinilindol

T. Benítez-González, H.L. Mendoza-Figueroa, Y. Mora-Pérez y M.S. Morales-Ríos  
51° Congreso Mexicano de Química, Pachuca, Hgo., México, del 28 de Septiembre al 1 de  
Octubre de 2016. *Memorias del congreso*, 120-122 (2016).

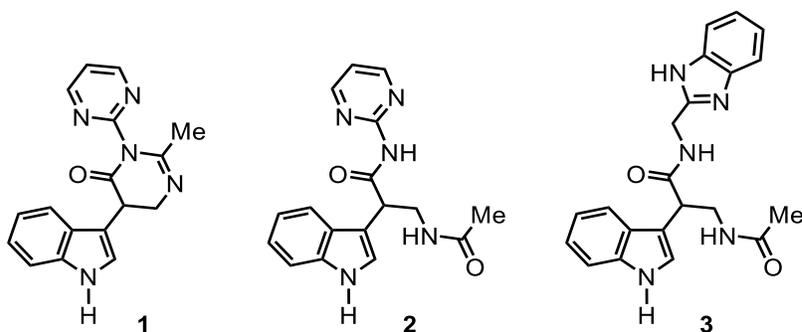
# ÍNDICE

	<i>Página</i>
<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b> Proceso replicativo del Virus de Inmunodeficiencia Humana(VIH-1)	<b>3</b>
<b>1.2</b> Estructura de la Transcriptasa Reversa (RT) del VIH-1	<b>6</b>
<b>1.3</b> Tipos de tratamiento contra el VIH-1	<b>7</b>
<b>1.3.1</b> Mecanismo de acción de los Inhibidores No Nucléosidos de la RT(NNRTIs).	<b>8</b>
<b>1.3.1.1</b> Mecanismo de resistencia a NNRTIs	<b>8</b>
<b>1.4</b> Diseño racional de fármacos	<b>9</b>
<b>1.4.1</b> Modelado molecular	<b>10</b>
<b>1.4.2</b> Análisis conformacional	<b>11</b>
<b>1.4.3</b> Estudios de docking molecular	<b>11</b>
<b>1.4.4</b> Diseño de NNRTIs	<b>12</b>
<b>1.4.5</b> Modelado farmacofórico de NNRTIs	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>15</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>15</b>
<b>4.1</b> Objetivos particulares	<b>15</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>17</b>
<b>5.1</b> Modelado molecular de las amidas <b>1-3</b>	<b>17</b>
<b>5.1.1</b> Análisis y optimización conformacional	<b>17</b>
<b>5.1.2</b> Análisis de docking molecular	<b>21</b>
<b>5.1.3</b> Alineamiento de los confórmeros <i>C1</i> y <i>C<sub>D</sub></i>	<b>26</b>
<b>5.1.4</b> Mapeo farmacofórico y alineación al modelo de mariposa	<b>27</b>
<b>5.1.4.1</b> Elementos farmacóforos	<b>27</b>
<b>5.1.4.2</b> Modelo de mariposa	<b>30</b>

	<i>Página</i>	
<b>5.2</b>	<b>Síntesis de la propanamida 3</b>	<b>31</b>
<b>5.2.1</b>	<i>β</i> -aminoácidos	<b>31</b>
<b>5.2.2</b>	Análisis retrosintético	<b>32</b>
<b>5.2.2.1</b>	Síntesis del equivalente sintético <i>N</i> -acil- <i>β</i> <sup>2</sup> -triptófano 4	<b>32</b>
<b>5.2.2.2</b>	Elucidación estructural del <i>N</i> -acil- <i>β</i> <sup>2</sup> -triptófano 4	<b>33</b>
<b>5.2.2.2.1</b>	Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	<b>34</b>
<b>5.2.2.2.2</b>	Enlace por puente de hidrógeno	<b>35</b>
<b>5.2.2.2.3</b>	Análisis por difracción de rayos-X	<b>36</b>
<b>5.2.3</b>	Formación del enlace amida	<b>38</b>
<b>5.2.3.1</b>	Síntesis de la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida 3	<b>38</b>
<b>5.2.3.2</b>	Elucidación estructural de la benzimidazolil-3- acetamidoindolil propanamida 3	<b>40</b>
<b>5.2.3.2.1</b>	Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>44</b>
<b>7.1</b>	Modelado computacional	<b>44</b>
<b>7.1.1</b>	Búsqueda conformacional	<b>44</b>
<b>7.1.2</b>	Optimización geométrica	<b>44</b>
<b>7.1.3</b>	Mapeo farmacofórico y alineación al modelo de mariposa	<b>44</b>
<b>7.1.4</b>	Análisis de docking molecular	<b>45</b>
<b>7.2</b>	Parte experimental química	<b>45</b>
<b>7.2.1</b>	Procedimientos generales	<b>45</b>
<b>7.2.3</b>	Síntesis de la propanamida 3	<b>46</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>54</b>
<b>9.1</b>	Tablas y espectros	<b>54</b>

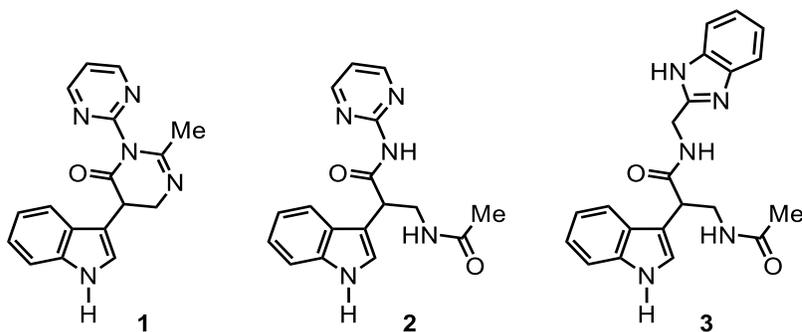
## SUMMARY

In order to obtain structural information and predict the potential biological activity of a novel set of  $\beta^2$ -tryptophan-derived amides **1-3** as HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) non-nucleoside inhibitors and finding a probable lead, an *in silico* conformational analysis was performed using a combined molecular structure analysis and flexible docking simulations through density functional theory calculations at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory in condensed phase together with the use of the AutoDock software. The alignment of the calculated energetically more stable conformer of **1-3** with the corresponding bound conformer in the docked structure were evaluated using UCSF Chimera software, in all cases it was observed that the free energy of association exceeded the energy required for the ligand to undergo a conformational change. According to docking results, a binding model of the amides **1-3** within the HIV-1 RT non-nucleoside binding pocket is proposed. Among these, compound **3** showed the maximum free binding energy of -10.17 kcal/mol. Pharmacophore models and 2D interaction plots were obtained for these minimized complexes using LigandScout software in order to identify which of these elements were the ones that generated the interactions with reverse transcriptase in the docking studies. The results indicated that the novel amides **1-3** adopt a butterfly like conformation with a hydrophilic central body flanked by hydrophobic wings, that are pharmacophoric structural requirements for the HIV-1 RT inhibitory activity. Finally, the sum of combined efforts led to the selection of candidate structure **3**, which was synthesized in order to the *in vitro* anti HIV-1 activity could be later analyzed in a biological assay.



## RESUMEN

A fin de obtener información estructural y predecir la actividad biológica potencial de un nuevo conjunto de amidas **1-3** derivadas del  $\beta^2$ -triptófano como inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (RT) del VIH-1 y encontrar un probable líder, se realizó un análisis conformacional *in silico* combinando simulaciones de estructuras moleculares y acoplamiento molecular flexible mediante el uso de la teoría de funcionales de la densidad, a nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p) en fase condensada, junto con el uso del programa AutoDock. La alineación de la estructura 3D derivada del conformero energéticamente más estable de **1-3** con la correspondiente aislada del docking molecular se evaluó utilizando el programa UCSF Chimera, encontrándose en todos los casos que la energía libre de asociación superó aquella necesaria para que el ligando ejecute un cambio conformacional. De acuerdo con los resultados de acoplamiento, se propone un modelo de unión de las amidas analizadas **1-3** dentro del bolsillo de unión a no nucleósidos de la RT del VIH-1. Entre estos, el compuesto **3** mostró la máxima energía libre de unión de -10.17 kcal/mol. Con el fin de identificar cuáles de los elementos farmacóforos son los responsables de generar las interacciones con la enzima RT en los estudios de acoplamiento se obtuvieron modelos farmacóforos para los complejos minimizados y gráficos de interacción 2D utilizando el programa LigandScout. Los resultados indicaron que las amidas **1-3** adoptan una conformación similar a una mariposa con un cuerpo central hidrófilo flanqueado por alas hidrofóbicas, requisitos estructurales farmacofóricos para la actividad inhibidora de la RT del VIH-1. Finalmente, la suma de esfuerzos combinados condujeron a la selección de la estructura candidata **3**, que se sintetizó con el fin de que la actividad anti-VIH *in vitro* pudiera analizarse posteriormente en un ensayo biológico.



## 1. INTRODUCCIÓN

A principio de la década de 1980, la repentina aparición de los primeros casos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) advirtió el surgimiento de una de las peores epidemias de toda la historia de la humanidad. La creciente tasa en el número de infectados (debido a la segregación del problema a grupos minoritarios y la falta de cultura de prevención) provocó la propagación de una de las peores enfermedades del siglo XX y XXI que afecta a millones de personas y que ha dejado a su paso, millones de víctimas [1], esto, aunado al continuo cambio en la estructura biológica del virus causante, ha arrojado cifras alarmantes de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [2]:

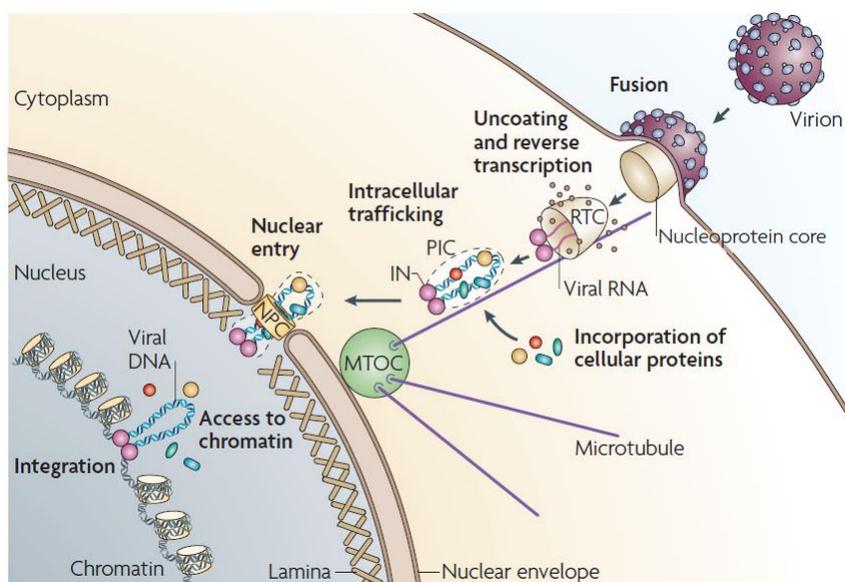
- Al 2012, el número de víctimas por SIDA rondaba los 34 millones.
- En 2012 se estimaba la existencia de unos 35.3 millones de personas infectadas por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Debido a la falta de una vacuna efectiva, la terapia farmacológica sigue siendo, hoy en día, la herramienta terapéutica más útil y de mayor uso contra la infección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Estas terapias, en su mayoría, consisten en un régimen combinatorio en el que se utilizan, al menos, dos clases de fármacos diferentes -que actúan a distintos niveles del ciclo de infección- con el objetivo de mantener la replicación del virus bajo control y observar, como consecuencia, un aumento en el conteo de células CD4. Este régimen es conocido como terapia anti-retroviral altamente activa (HAART, por sus siglas en inglés) [3].

### 1.1 Proceso replicativo del Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH-1)

El VIH, perteneciente a la familia de los retrovirus y del género de los lentivirus, contiene dos copias de idénticas de RNA de cadena simple (ssRNA) con una secuencia genómica de 9.7 kb. Este genoma codifica para proteínas estructurales y no estructurales del virus. La infección por VIH-1 lleva consigo un proceso en el que las glicoproteínas de la envoltura viral (gp120/gp41) interaccionan con los receptores CD4 de los linfocitos-T y con los co-receptores CCR5 y/o CXCR4 (receptores acoplados a proteínas G). Al darse dicha unión, se genera un cambio conformacional en la estructura de las glicoproteínas de la envoltura viral que favorece la fusión membranal del virus con el huésped. Una vez ocurrida la fusión, el núcleo viral (que

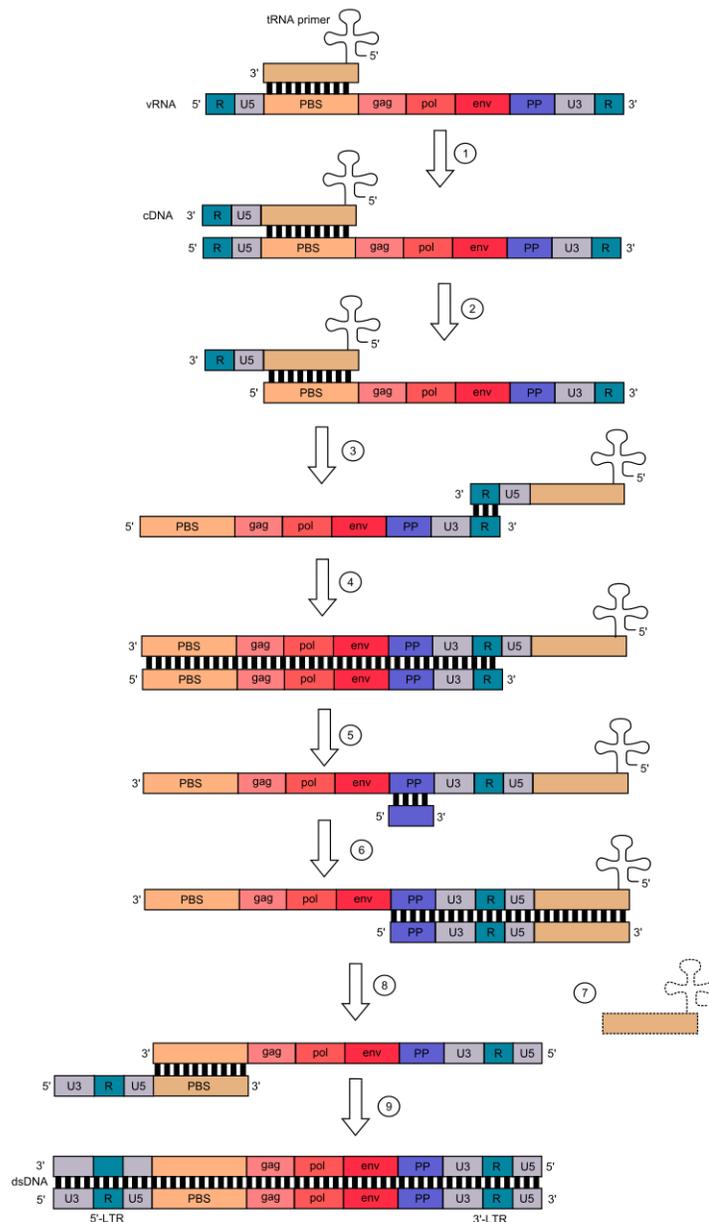
contiene enzimas esenciales en el proceso de infección) se sitúa en el citoplasma celular del huésped. A continuación, ocurre un proceso llamado “uncoating” en el cual la cápside viral libera el conjunto enzima-sustrato llamado “complejo de transcripción reversa” (RTC), que tiene como propósito principal, la generación de una cadena de DNA doble a partir de RNA de cadena simple (Fig. 1) [4].



**Figura 1.** Proceso replicativo del Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH-1) [4].

La transcriptasa reversa (RT) es una enzima específica de retrovirus, cuya función es originar una copia de DNA a partir de una única hebra de RNA. La RT tiene dos sitios catalíticos: sitio de DNA polimerasa (POL) y sitio de ribonucleasa (RNasa H). El sitio POL puede polimerizar una cadena simple de DNA a partir de una plantilla de RNA y/o de DNA y de un cebador. Este cebador es una secuencia de 18 nucleótidos que corresponde al tRNA<sup>Lys3</sup>, que es complementario a una secuencia de igual longitud (18 b) en el extremo 5' del genoma viral de RNA denominado sitio de unión al cebador (PBS). Cuando el tRNA de la célula huésped hibrida con el PBS, como cebador de RNA, entonces, el POL inicia la síntesis de la cadena (-) (en dirección 5'-3') de DNA usando una cadena (+) de RNA viral como plantilla. En un primer paso, el POL genera una cadena doble híbrida de RNA/DNA, que la RNasa H utiliza después como sustrato para llevar a cabo la separación de la cadena híbrida mediante la escisión en varios puntos de la cadena (+) de RNA viral, a excepción de una región rica en

purina denominada tracto de polipurina (PPT) que es resistente a la acción de la RNasa H y que permanece apareada a la región de DNA complementaria correspondiente. Estos fragmentos del PPT sirven como cebadores para la síntesis de la segunda cadena de DNA que es complementaria a la cadena (+) y que se sintetiza de 5' a 3', que -durante la síntesis de DNA- desplaza la secuencia PBS de RNA y la secuencia de la polimerasa desplaza la secuencia PPT de RNA formando una cadena doble de DNA (Fig. 2) [5].



**Figura 2.** Proceso de transcripción inversa de los retrovirus [5].

El proceso mencionado anteriormente se lleva a cabo en el citoplasma de la célula huésped para después formar el complejo llamado complejo de pre-integración (PIC) el cual incorpora la cadena doble de DNA al núcleo celular a través de la membrana nuclear (Fig. 1) [4].

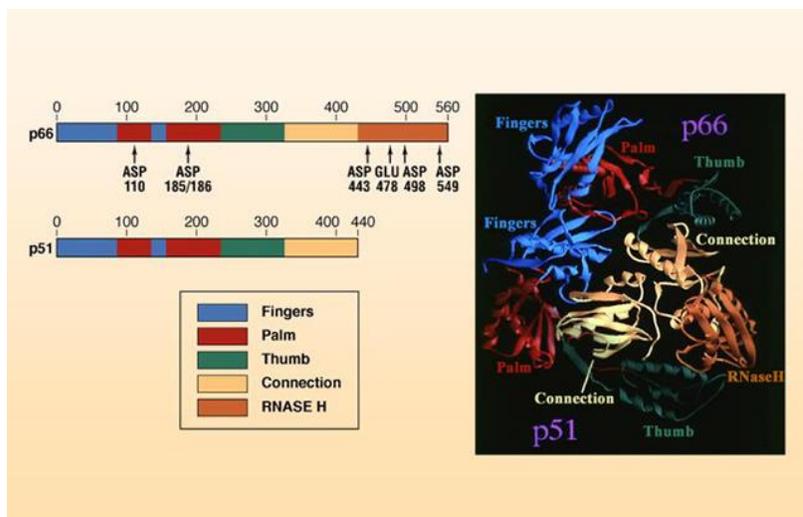
Al completar la síntesis, la doble cadena de DNA viral es reclutada hacia el núcleo celular donde el DNA viral es insertado en el genoma del huésped por medio de una integrasa (IN) (Fig. 1) que realiza cortes complementarios (cohesivos), en extremos contrarios de cada hebra de la cadena doble de DNA viral para parearse con el genoma de la célula huésped y, así, integrar el genoma viral transcrito al genoma del huésped. Esta copia de DNA insertada, llamada provirus, es la fuente del genoma y del mRNA viral, que son generados por la transcriptasa del huésped.

Por último, los fragmentos de mRNA viral sintetizados en el proceso anterior, migran al citoplasma, donde los ribosomas del huésped realizan el proceso de traducción y conforman proteínas largas que, por medio de acción de la proteasa viral (PT), serán fragmentadas en segmentos más cortos. Estas formarán posteriormente el núcleo viral. Este paso es crucial para la creación de virus infecciosos ya que después se ensamblarán los elementos del núcleo viral (dos cadenas de RNA viral y la maquinaria enzimática) con ayuda de estas proteínas cortas y que después formarán la cápside del virus, que dejará la célula donde adquirirá una envoltura para iniciar un nuevo proceso infeccioso.

## **1.2 Estructura de la Transcriptasa Reversa (RT) del VIH-1**

La transcriptasa reversa (RT) del VIH-1 es una proteína heterodimérica asimétrica de 117 kDa compuesta de dos subunidades relacionadas, p66 y p51. La subunidad más grande p66 (66 kDa) está conformada por 560 aminoácidos y está compuesta por dos dominios catalíticos espacialmente distintos conocidos como polimerasa y RNasa H. El dominio polimerasa está compuesto por cuatro subdominios: dedos (residuos 1-85 y 118-155), palma (residuos 86-117 y 156-237), pulgar (238-318) y conexión (319-426). La subunidad p51 está compuesta por 440 aminoácidos y se pliega en los mismos cuatro subdominios que p66, sin embargo las posiciones de los subdominios entre sí son diferentes en p66 y p51. La subunidad p51 tiene un papel más bien estructural y de soporte para los sitios activos en p66. Se dice que ambas subunidades están relacionadas, ya que comparten 440 aminoácidos en su secuencia que

corresponden a la subunidad p51 y los restantes corresponden sólo a la subunidad p66 (120 aminoácidos) [3,6,7], (Fig. 3).



**Figura 3.** Estructura de la transcriptasa reversa (RT) del VIH-1 [8].

### 1.3 Tipos de tratamiento contra el VIH-1

Las terapias contra el VIH-1 revolucionaron los tratamientos anti-SIDA desde mediados de la década de los noventa del siglo pasado hasta nuestros días gracias al desarrollo de inhibidores para tres enzimas esenciales del VIH-1: la transcriptas reversa (RT), la integrasa (IN) y la proteasa (PT), además de la introducción de regímenes combinatorios de fármacos que potencializan la eficacia y duración de la terapia. El estándar en el tratamiento de VIH-1 ha evolucionado de una monoterapia antiretroviral hasta una terapia combinatoria (“cocktail”) de varios tipos de fármacos (terapia HAART), con el fin de reducir la carga viral plasmática mediante la supresión de la replicación del DNA, lo que resulta en una reconstitución del sistema inmune [9].

La RT es un blanco clave en el desarrollo de terapias antiretrovirales debido a su papel central dentro del ciclo de vida del VIH. Existen dos clasificaciones principales de las terapias antiretrovirales: (a) los Nucleósidos Inhibidores de la RT (NRTIs) que inhiben la función del sitio catalítico de DNA polimerasa (POL) mediante la inclusión de estructuras no funcionales análogas a los nucleósidos que se aparean con la cadena plantilla impidiendo la polimerización

de las cadenas de doble hélice de DNA/RNA y/o de DNA, y (b) los Inhibidores No Nucleósidos de la RT (NNRTIs) [1,3]. Ambos forman parte del esquema de terapia combinatoria, previamente mencionada [9].

A pesar de que este régimen terapéutico obtuvo buenos resultados, se observó que una porción significativa de pacientes no obtuvo los beneficios esperados, esto debido a que el virus presentó resistencia a los fármacos disponibles en ese entonces, como consecuencia de la monoterapia o tratamientos con efectos por debajo de los óptimos. Debido a este problema, en años recientes se han desarrollado varias moléculas con mejores perfiles ante la resistencia, entre los cuales se encuentran varios NNRTIs que fueron descritos por primera vez en la década de los noventa del siglo pasado y que actualmente siguen representando una terapia importante en los pacientes, por lo que se siguen desarrollando nuevas moléculas con este mecanismo de acción [10].

### **1.3.1 Mecanismo de acción de los Inhibidores No Nucleósidos de la RT (NNRTIs)**

Los NNRTIs son inhibidores no competitivos ya que no interfieren de manera directa con la unión de los monómeros que constituyen el DNA o desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) [11]. El mecanismo de inhibición de los NNRTIs consiste principalmente en el acoplamiento y alineación de estas moléculas en un sitio alostérico de unión conocido como Bolsa de Unión a NNRTIs (NNIBP, por sus siglas en inglés). La NNIBP es una región hidrofóbica, adyacente al sitio activo de la polimerasa a una distancia aproximada de 10 Å, localizada en el subdominio “palma” de la subunidad p66 y parte de la subunidad p51. La unión de los NNRTIs a este sitio induce un cambio conformacional que provoca la reducción en la flexibilidad natural de la enzima, impidiendo el cierre de los subdominios “dedos” y “pulgar” [11] (Fig. 3). Existe evidencia estructural que sugiere que la unión de NNRTI a la NNIBP afecta la conformación de los carboxilatos catalíticos (residuos D110, D185 y D186) que unen los cofactores metálicos (iones divalentes  $Mg^{+2}$ ) impidiendo la síntesis de DNA.

#### **1.3.1.1 Mecanismo de resistencia a NNRTIs**

El surgimiento de la primera generación de fármacos inhibidores de VIH-1 tuvo una buena eficacia terapéutica durante un tiempo considerable para los pacientes infectados con el virus silvestre (WT-VIH-1). Estos medicamentos de primera generación (nevirapine, delaviridine) y

de segunda generación (efavirenz) presentaron una menor efectividad frente a un set de formas mutantes resistentes de la RT del VIH-1, clínicamente más relevantes (Y188C, Y181C, K103N y L100I). Estas mutaciones han dado lugar a niveles altos de resistencia ante los actuales NNRTIs. Otras mutaciones de resistencia que se han descrito son K101E, V106A, V179D, Y188L, G190A y P263L.

Existen tres tipos diferentes de resistencia hacia los medicamentos generados por las mutaciones:

- **Pérdida/cambio en las interacciones hidrofóbicas:** Este tipo de resistencia se presenta en el núcleo hidrofóbico de la NNBIP cuando los residuos que contienen anillos aromáticos, responsables de la interacción específica con los NNRTIs, sufren mutaciones que ocasionan la disminución o pérdida total de las interacciones hidrofóbicas. Las mutaciones que generan esta resistencia son Y181C, Y188L y F227L.
- **Impedimento estérico:** Los residuos L100 y G190, que se encuentran en la región central de la NNBIP, cuando sufren mutaciones tienden a causar altos niveles de resistencia. Las mutaciones antes descritas (L100I y G190A) provocan un cambio en la forma de la NNIBP que impide la interacción con los NNRTIs.
- **Mutaciones en la entrada de la bolsa:** Las mutaciones en K103N y K101E, localizadas en el borde de NNIBP, provocan que las cadenas de estos aminoácidos, al apuntar hacia afuera, impidan la entrada de los NNRTIs al interior de la bolsa [9].

#### 1.4 Diseño racional de fármacos

La mayor parte de la investigación moderna enfocada al descubrimiento y diseño de nuevos fármacos tiene como objetivo principal la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica sobre blancos moleculares específicos, tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, o la búsqueda de actividad biológica no descrita de moléculas ya conocidas, conjuntando un esfuerzo multidisciplinario en el que áreas como la química

medicinal, la cristalografía y la química computacional realizan aportaciones importantes para dicho objetivo; y a su vez, que esta actividad biológica, sea terapéutica.

Las metodologías computacionales, junto con la dilucidación de las estructuras tridimensionales (3D) de los blancos moleculares, se han convertido en componentes clave en el campo del descubrimiento y diseño racional de fármacos [12]. Actualmente, dos de las técnicas más aplicadas en el descubrimiento de fármacos son la química computacional y el modelado molecular las cuales tienen por objetivo la racionalización y estimación de las propiedades de las moléculas y sus interacciones con el blanco molecular, así como identificar y caracterizar la potencial interacción entre la proteína y el nuevo ligando creando modelos y simulaciones que permitan la predicción del posicionamiento del ligando elegido mediante el uso de algoritmos computacionales basados en la estructura de la proteína blanco y/o sitio de unión conocido de la misma [12]. Los ligandos pueden ser moléculas conocidas en las que se pretende optimizar la interacción con la proteína mediante modificaciones a su estructura, dar un nuevo uso terapéutico en otra proteína blanco o para diseñar nuevas moléculas basadas en las interacciones que se pueden encontrar en los sitios de unión de la proteína blanco (análisis virtual basado en estructuras) [5].

#### **1.4.1 Modelado molecular**

El modelado molecular es una herramienta computacional basada en algoritmos que calculan propiedades, datos estructurales y energéticos de las moléculas. Estos cálculos pueden basarse en las leyes de la física (mecánica molecular) o en métodos mecanocuánticos.

Para realizar el modelado, es necesario representar la molécula. El programa de modelado la transformará en una estructura en tres dimensiones y después corregirá la estructura mediante minimización energética. Este proceso consiste en corregir la estructura mediante el cálculo de la energía inicial de la molécula variando las longitudes y los ángulos de enlace hasta llegar a un momento en que las variaciones en la estructura no suponen cambios en la energía (energía estérica mínima). En ocasiones se llega a mínimos locales que no corresponden con la conformación absoluta de mínima energía (curva de energía). Estos programas permiten medir las longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros, es decir, energía estérica que es útil para comparar distintas conformaciones de la misma molécula [12].

### 1.4.2 Análisis conformacional

El análisis conformacional comprende el estudio de los arreglos atómicos espaciales intramoleculares que pueden ser interconvertibles por rotación alrededor de enlaces simples y su influencia sobre las propiedades de la molécula. Al realizar un análisis conformacional por lo general arroja más de un resultado (número de conformeros) que ayudan a identificar la conformación de mínima energía de la molécula, es decir la de mayor estabilidad. Mediante una minimización de la energía se puede llegar a una conformación estable. Si se establece un mínimo local, se necesita suministrar energía para superar la barrera energética que haga llegar a la conformación más estable. Para identificar la conformación más estable hay que generar varias conformaciones y comparar sus energías estéricas. Esto se puede conseguir por dos métodos: a) Dinámica molecular y b) Rotación secuencial de enlaces. Para calcular y predecir otras propiedades moleculares es necesario tener en cuenta los electrones de la molécula. Para ello, se recurre a métodos mecanocuánticos que realizan cálculos empleando un programa de cálculos semiempíricos, que no se discutirán en el presente trabajo [12].

### 1.4.3 Estudios de docking molecular

En el campo del modelado molecular, la metodología conocida como “docking” o acoplamiento molecular, permite predecir el posicionamiento de un ligando (conformación y orientación) dentro de un sitio de unión en un blanco mediante la formación de un complejo estable [12]. El docking tiene dos objetivos generales: generar un modelado estructural exacto en la interacción y una correcta predicción de la actividad. Es una metodología muy utilizada cuando se conoce la estructura de la proteína blanco, el sitio activo y/o sitio de unión, que pretende encontrar compuestos suficientemente específicos que modulen el blanco molecular seleccionado para obtener un efecto terapéutico.

Existen varios métodos computarizados que permiten simular las posibles formas de unión a la molécula blanco elegida. Un ejemplo son los análisis docking moleculares primarios de alto rendimiento, que son utilizados, primordialmente, como una herramienta para identificar una potencial unión entre una pequeña molécula y una proteína mediante una exploración exhaustiva de las posiciones relativas ligando-proteína y donde se evalúan las interacciones intermoleculares en cada posición explorada [12]. Los resultados de esta exploración arrojan

una colección de posibles conformaciones de acoplamiento ligando-proteína, que el programa ordena de acuerdo con el valor que la función de su evaluación le asignó a cada solución. Esta asignación es conocida como “scoring”.

Estos dos procesos consecutivos se han podido resolver de muy diversas formas gracias a los softwares disponibles para realizar estudios de docking molecular (p. ej. Ligand Scout, Autodock) y/o gracias al uso de bases de datos disponibles de uso público (p. ej. Swiss Dock, Swiss Target Prediction). El objetivo de una función de evaluación (scoring function) es la de clasificar y discriminar, mediante cálculos, las soluciones correctas de interacción (posiciones con una baja desviación estándar -“RMSD”- con respecto a la posición cristalográfica) y el resto de las soluciones calculadas, mediante el cálculo de una estimación de energía de unión del complejo ligando-receptor en cada posición. Estas fuerzas están determinadas por la suma de fuerzas intermoleculares que no participan en los enlaces (van der Waals, interacción por puente de hidrógeno y/o electrostáticas) y que mantienen unido al complejo.

En los estudios de docking molecular se parte de un complejo cristalizado enzima-ligando, cuyos datos geométricos se pueden obtener de la base de datos Brookhaven (“Protein Data Bank”, PDB) donde se describen y recaban todas las estructuras obtenidas experimentalmente. De esta manera, los programas realizan una aproximación de las interacciones entre moléculas nuevas sobre la forma tridimensional de la proteína [12].

#### **1.4.4 Diseño de NNRTIs**

Una de las principales cuestiones a considerar en el diseño computacional de nuevos NNRTIs es la incorporación de la flexibilidad inherente de la NNIBP. Esto es especialmente crucial en el proceso de unión ligando-proteína, cuando se induce un ajuste que conduce a un reacomodo estructural de la RT. Aunque los métodos actuales computacionales docking trabajan con ligandos flexibles, la dificultad radica en lidiar con la flexibilidad de la proteína blanco (RT). A la fecha, los avances en la química medicinal de NNRTIs se han valido del uso del diseño basado en ligando.

La flexibilidad de NNIBP ha dirigido el diseño de NNRTIs de tal manera que existe una gran diversidad estructural entre ellos, lo que provee una amplia oportunidad en el descubrimiento de nuevas moléculas. Aunque los NNRTIs tienen gran variedad estructural y química, el tipo

de unión a NNIBP ocurre de manera similar y en un proceso más o menos idéntico entre ellos, lo que provee información valiosa en el campo de diseño de fármacos. También, gracias a los esfuerzos continuos en el desarrollo de herramientas computacionales y el incremento en la información estructural de la RT, la coordinación de áreas multidisciplinarias, tales como química medicinal, biología estructural y química computacional; han provisto de poderosas estrategias para afrontar la flexibilidad de NNIBP e identificar nuevas moléculas contra la WT-RT (<wild type> WT) y sus variaciones mutadas, además de mejorar el perfil farmacocinético.

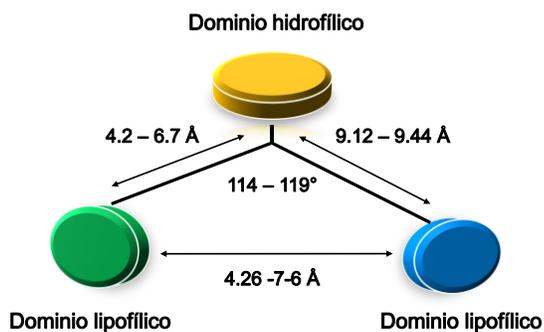
Para el diseño de nuevos NNRTIs se consideran los siguientes criterios: (a) alto nivel de actividad ante mutaciones claves en los que otros NNRTIs presentan resistencia; (b) alta biodisponibilidad y potencia; (c) baja toxicidad; y (d) fácil síntesis y formulación.

Otro aspecto a considerar en el diseño de NNRTIs, es el tamaño y volumen de la NNIBP, ya que ésta es afectada en gran medida por los posicionamientos de las estructuras secundarias  $\beta$ 10 (residuos del 232 al 234) y  $\beta$ 11 (residuos del 239 al 241) y el movimiento de horquilla-lazo (“hairpin-loop”) P236.

#### **1.4.5 Modelado farmacofórico de NNRTIs**

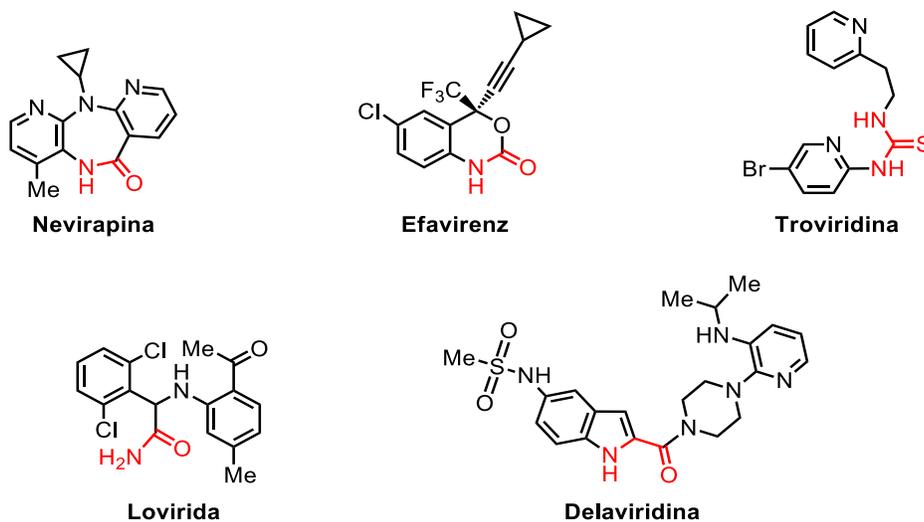
Gracias al uso de las herramientas de modelado molecular, cristalografía de rayos X con varios ligandos y al análisis de la diversidad estructural de los NNRTIs, se ha propuesto un modelo tridimensional común para los NNRTIs basado en las moléculas conocidas que han presentado actividad inhibitoria comprobada [9], que contemplan los elementos estructurales determinantes en la actividad anti-VIH: un dominio central hidrofílico (“cuerpo”) al que se le anexan dos dominios hidrofóbicos (“alas”). Aunque no existe un patrón estructural definido entre los NNRTIs, estos contienen fragmentos ubicuos en sus estructuras que incluyen: (a) sistemas aromáticos (normalmente sustituidos con un halógeno) que participa en interacciones  $\pi$ - $\pi$ , (b) grupos amina, amida o tioamida capaces de crear interacciones de puente de hidrógeno (como donadores o aceptores) y (c) una o más cadenas alifáticas que participan en interacciones hidrofóbicas. Todas estas estructuras ubicuas se han modelado en una disposición espacial común, que derivó en el modelo farmacofórico conocido como modelo de mariposa. El modelo farmacofórico tridimensional muestra la disposición de los tres dominios

característicos donde el dominio hidrofílico se mantiene en el centro (que puede ser un grupo amida o tioamida) y los dos motivos hidrofóbicos (Fig. 4).



**Figura 4.** Estructura de mariposa. Se muestran las regiones principales del “esqueleto privilegiado” de los NNRTIs VIH-1 [3].

Algunos ejemplos de estructuras de NNRTIs basadas en el modelo de mariposa son nevirapina, efavirenz, trovirdina, lovirida y delaviridina (Fig. 5).



**Figura 5.** Ejemplos de NNRTIs basados en la estructura de mariposa [3].

## 2. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de fracaso al tratamiento contra el VIH-1 es la aparición de resistencia debida a mutaciones en el genoma viral, que se traducen en una disminución de la sensibilidad del VIH-1 a uno o más fármacos. Por ello es necesario el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento contra el VIH-1.

## 3. HIPÓTESIS

Debido a que la transcriptasa reversa (RT) juega un papel relevante en el control de la replicación del VIH-1, la RT es uno de los blancos terapéuticos más atractivos para el desarrollo de fármacos anti-retrovirales, tales como los NNRTIs.

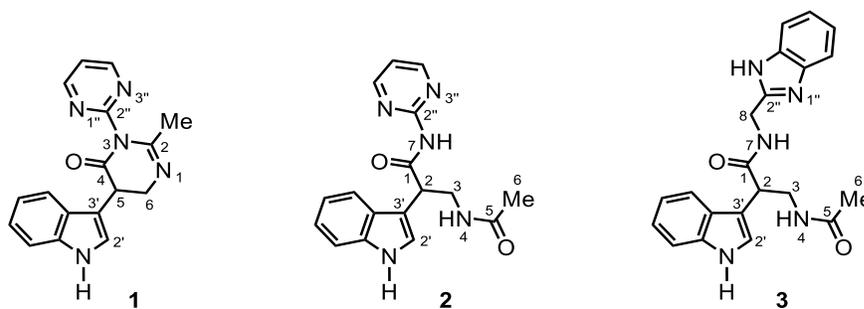
Una característica importante como criterio para el desarrollo de fármacos NNRTIs es la estructura conocida como “mariposa”, que ha demostrado ser un factor relevante para la interacción con la RT. Por ello, ligandos derivados del  $\beta^2$ -triptófano cuyo esqueleto de “mariposa” contenga una función amida como centro hidrofílico y unas “alas” hidrofóbicas compuestas por sistemas heterocíclicos aromáticos interaccionarán con la RT.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Predecir la posible actividad farmacológica de una serie de amidas derivadas del  $\beta^2$ -triptófano como inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (NNRTIs) del VIH-1 haciendo uso del modelado molecular. Determinar la energía de unión del complejo ligando-enzima por docking molecular y sintetizar el compuesto con mejor afinidad.

### 4.1 Objetivos particulares

- a) Realizar el análisis de modelado molecular de los ligandos **1-3** derivados del  $\beta^2$ -triptófano (Fig. 6) y caracterizar las interacciones con la enzima RT-VIH-1 (PDB código 1KLM) mediante docking molecular y análisis farmacofórico.



**Figura 6.** Estructura de las amidas **1-3** derivadas del  $\beta^2$ -triptófano.

- b) Sintetizar el compuesto con mayor afinidad y realizar la caracterización de las estructuras de los productos finales e intermediarios por métodos cristalográficos y espectrográficos que incluyen resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masa (EM).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Modelado molecular de las amidas 1-3

Las propiedades estructurales de los NNRTIs determinan en gran medida su eficiencia terapéutica potencial. Por ello, el conocimiento de su flexibilidad y de sus propiedades conformacionales puede ser importante para la interpretación de las interacciones ligando-receptor. El diseño de nuevos NNRTIs debe considerar estructuras con una libertad conformacional que permita adaptarse a las diferentes conformaciones de la bolsa de unión NNIBP y, al mismo tiempo, debe contener características químicas adecuadas capaces de interactuar con residuos altamente conservados tales como, Lys103, Tyr181 Tyr188 y Trp229.

#### 5.1.1 Análisis y optimización conformacional

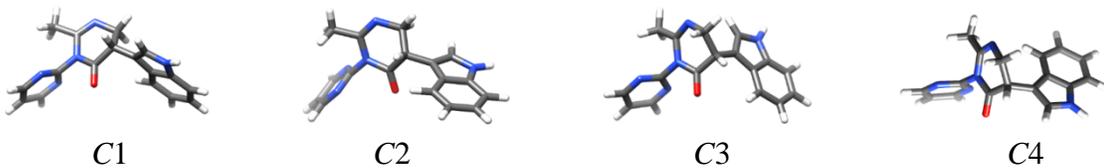
Se realizó el modelado molecular de una serie de amidas **1-3** derivadas del  $\beta^2$ -triptófano que incorporan ya sea el grupo hidrofóbico pirimidinil (**1** y **2**) o el grupo ambivalente hidrofílico/hidrofóbico benzimidazolil (**3**) a la estructura base del  $\beta^2$ -triptófano. El ácido carboxílico del  $\beta^2$ -triptófano puede encontrarse como un derivado de una amida cíclica (**1**) o acíclica (**2** y **3**) y en este caso el grupo está acetilado.

Con la finalidad de determinar la flexibilidad inherente de cada una de las moléculas **1-3**, teniendo en cuenta que el análisis en fase acuosa simula mejor el medio ambiente biológico, la búsqueda conformacional se realizó en presencia de un entorno acuoso utilizando el método MMFFaq de perturbación de energía libre implementado en simulaciones de Monte Carlo. Los cálculos se realizaron utilizando el programa Spartan 14 [13]. Las optimizaciones de la geometría se realizaron utilizando el programa Gaussian 09 a nivel DFT aplicando el sistema B3LYP funcional y 6-31G+(d,p) basado en el modelo continuo polarizable (CPM) de Tomasi y la constante dieléctrica del agua a 298.15 K ( $\epsilon = 78.4$ ) [14-17].

La representación de las estructuras 3D energéticamente más estables de **1-3** en presencia de disolvente acuoso implícito (simulando condiciones fisiológicas) y su caracterización (los valores absolutos para los conformeros de más baja energía de Gibbs, las energías de Gibbs entre los conformeros, expresadas en términos relativos y las respectivas fracciones molares dadas por las poblaciones de Boltzmann) se presentan en las Tablas 1, 2 y 4.

La búsqueda conformacional inicial de **1** generó un total de 4 conformeros dentro de las primeras 3.1 kcal/mol (100% de la población), que fueron optimizados usando el método DFT. En la Tabla 1 se muestran las geometrías de los cuatro conformeros optimizados C1-C4 de **1**, en donde se observa que todas ellas adoptan la conformación de mariposa característica de muchos NNRTIs (Tabla 1). Se encontró que la geometría de la molécula está determinada por la flexibilidad limitada del anillo central de pirimidona y el giro restringido de los anillos de pirimidina e indol alrededor de los enlaces simples N3-C2' y C5-C3'' que conectan a estos anillos con la pirimidona (para numeración ver Fig. 6, Sección 4.1).

**Tabla 1.** Geometría, valores absolutos de energías de Gibbs ( $G$ ), energías relativas de Gibbs ( $E_{rel}$ ) y distribución de Boltzmann (%) para los conformeros de mínima energía C1-C4 en solución acuosa de **1**<sup>a</sup>.



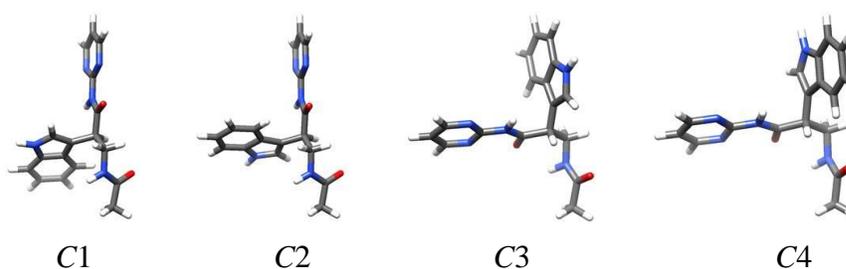
Conformero	$G$ (Hartrees)	$E_{rel}$ (kcal/mol)	Distribución de Boltzmann
C1	-1005.911626	0.000	47.76
C2	-1005.911210	0.261	30.74
C3	-1005.910842	0.492	20.82
C4	-1005.907614	2.518	0.68

<sup>a</sup>Método DFT B3LYP (CPM).

En el caso de la búsqueda conformacional de **2** por mecánica molecular (MMFFaq), ésta se realizó restringiendo la geometría de los dos grupos amida de **2** en un arreglo *trans*, considerando que la conformación *trans* en amidas es más estable en alrededor de 3 kcal/mol con respecto a la conformación *cis* y que la barrera energética de isomerización *cis/trans* es significativamente alta, con un valor de 15-20 kcal/mol [18-20]. En estas condiciones, el análisis generó 6 conformeros dentro de las primeras 2.1 kcal/mol (99.6% de la población),

que después de su optimización por el método DFT se redujo a 4 mínimos conformacionales C1-C4. En la Tabla 2 se indican las geometrías de los 4 conformeros optimizados C1-C4 de **2**, que se generan por el giro alrededor de los enlaces simples C2-C3, C2-C3' y C3-N4 (para numeración ver Fig. 6, Sección 4.1), como se constata de los valores determinados para los ángulos diedro H2-C2-C3-H3a, H2-C2-C3'-C2' y H3a-C3-N4-H4 (Tabla 3).

**Tabla 2.** Geometría, valores absolutos de energías de Gibbs ( $E$ ), energías relativas de Gibbs ( $E_{rel}$ ) y distribución de Boltzmann (%) para los conformeros de mínima energía C1-C4 en solución acuosa de **2**<sup>a</sup>.



Conformero	$E$ (Hartrees)	$E_{rel}$ (kcal/mol)	Distribución de Boltzmann
C1	-1082.39435	0.000	57.31
C2	-1082.39355	0.505	24.43
C3	-1082.39302	0.837	13.95
C4	-1082.39191	1.533	4.31

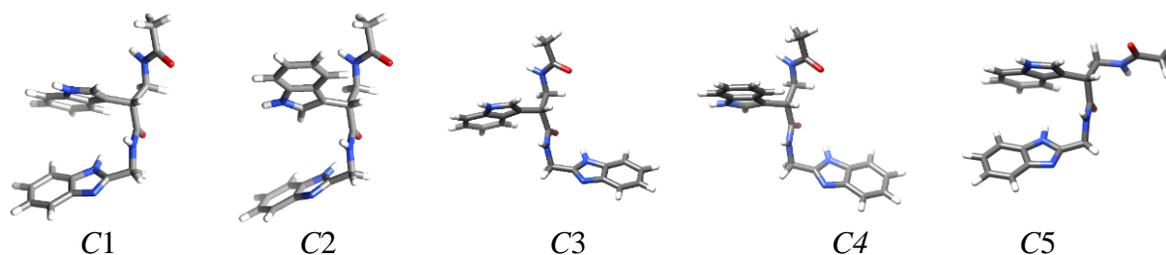
<sup>a</sup>Método DFT B3LYP (CPM).

**Tabla 3.** Ángulos diedros selectos ( $\angle$ , °) para los conformeros de mínima energía C1-C4 de **2**.

$\angle$	C1	C2	C3	C4
H2-C2-C3-H3a	60.97	57.32	174.92	179.36
H2-C2-C3-N4	-59.06	-57.54	66.48	35.53
H2-C2-C3'-C2'	-179.45	5.16	6.45	-169.22
H3a-C3-N4-H4	153.98	149.21	-54.10	-37.16

La búsqueda conformacional por mecánica molecular (MMFFaq) de la molécula **3**, manteniendo la restricción de los grupos amida en un arreglo *trans*, generó 5 conformeros C1-C5 (de un total de 41, después de eliminar las estructuras duplicadas) dentro de las primeras 2.1 kcal/mol que contribuyeron con el 99.1% de la población total (Tabla 4). La optimización por el método DFT condujo a un único mínimo conformacional C1 (Tabla 5).

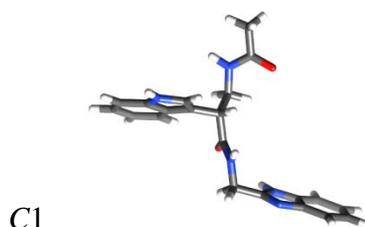
**Tabla 4.** Geometría, valores absolutos de energías de Gibbs ( $E$ ), energías relativas de Gibbs ( $E_{rel}$ ) y distribución de Boltzmann (%) para los conformeros de mínima energía C1-C7 en solución acuosa de **3**<sup>a</sup>.



Confórmero	$E$ (kcal/mol)	$E_{rel}$ (kcal/mol)	Distribución de Boltzmann
C1	-29.764	0	0.464
C2	-29.319	0.445	0.437
C3	-28.112	1.652	0.057
C4	-27.928	1.836	0.020
C5	-27.682	2.082	0.013

<sup>a</sup> Método MMFFaq.

**Tabla 5.** Geometría, valor absoluto de la energía de Gibbs ( $E$ ), energía relativa de Gibbs ( $E_{rel}$ ) y distribución de Boltzmann (%) para el conformero C1 en solución acuosa de **3**.<sup>a</sup>



Conformero	$E$ (Hartrees)	$E_{rel}$ (kcal/mol)	Distribución de Boltzmann
C1	-1237.28905726	0.00	100.00

<sup>a</sup>Método DFT B3LYP (CPM).

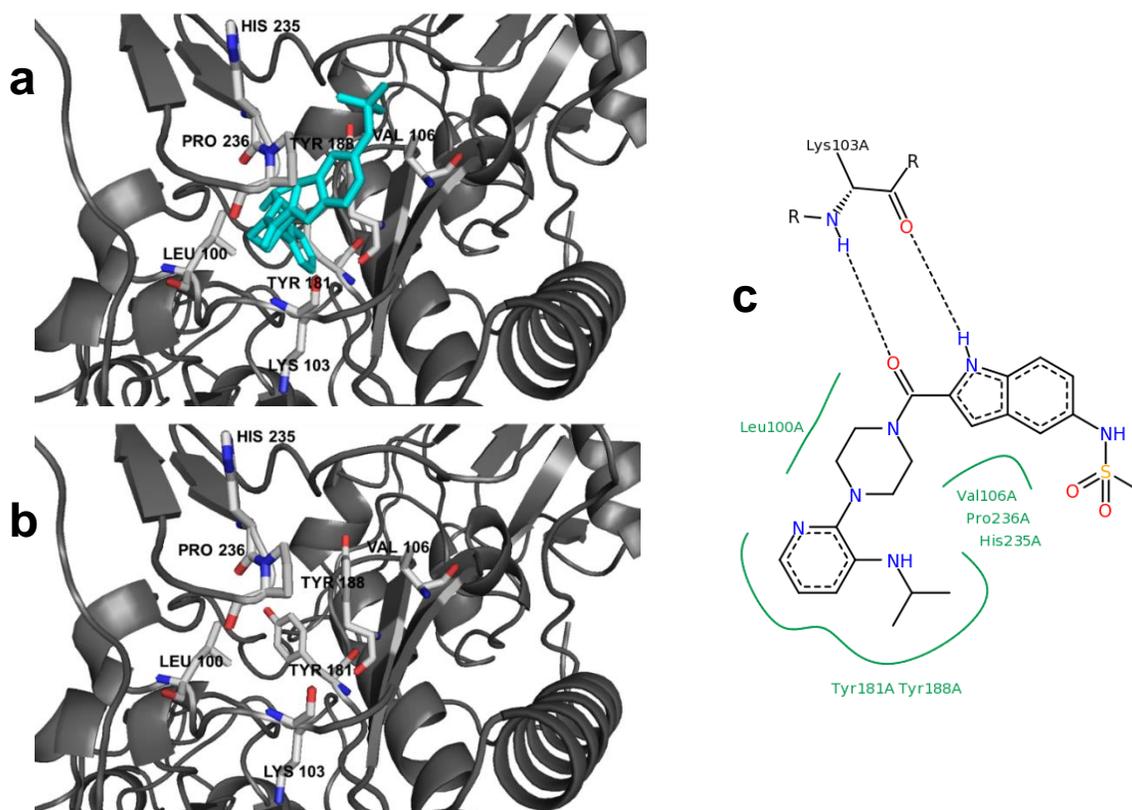
### 5.1.2 Análisis de docking molecular

Se realizó un estudio de docking molecular de los ligandos **1-3**, utilizando el método computacional automático Autodock 4 [21], con el fin de determinar la energía de afinidad, las interacciones enlazantes principales, así como las respectivas conformaciones espaciales del complejo enzima-ligando. La región de análisis se delimitó a la bolsa de unión a NNRTIs de la RT (NNIBP), la estructura de la NNIBP se obtuvo del <Protein Data Bank> (PDB código 1KLM), utilizando la proteína rígida y el ligando flexible.

Para probar la exactitud del método seleccionado, es decir para asegurar que la orientación de los ligandos **1-3** y la posición obtenida de los estudios docking son válidos y representan de manera razonable los modos de unión de **1-3**, los parámetros de docking del programa Autodock 4 fueron validados para la estructura cristalina de la RT del VIH cocrystalizada con delaviridina (Fig. 7), en donde la energía de interacción del complejo de -12.50 kcal/mol se calculó usando el programa Autodock 4. El procedimiento consistió en retirar el ligando (delaviridina) del archivo original de coordenadas de rayos X para ser acoplado nuevamente de manera flexible en la bolsa de unión de la RT. Los resultados del control docking demostraron que el programa Autodock 4 definió la orientación óptima del inhibidor acoplado (delaviridina) próxima a la orientación original encontrada en el cristal (Fig. 7). La desviación

RMS de sólo 0.59 Å entre las coordenadas del ligando cristalino y el docking indican una muy buena alineación de las posiciones experimentales y calculadas.

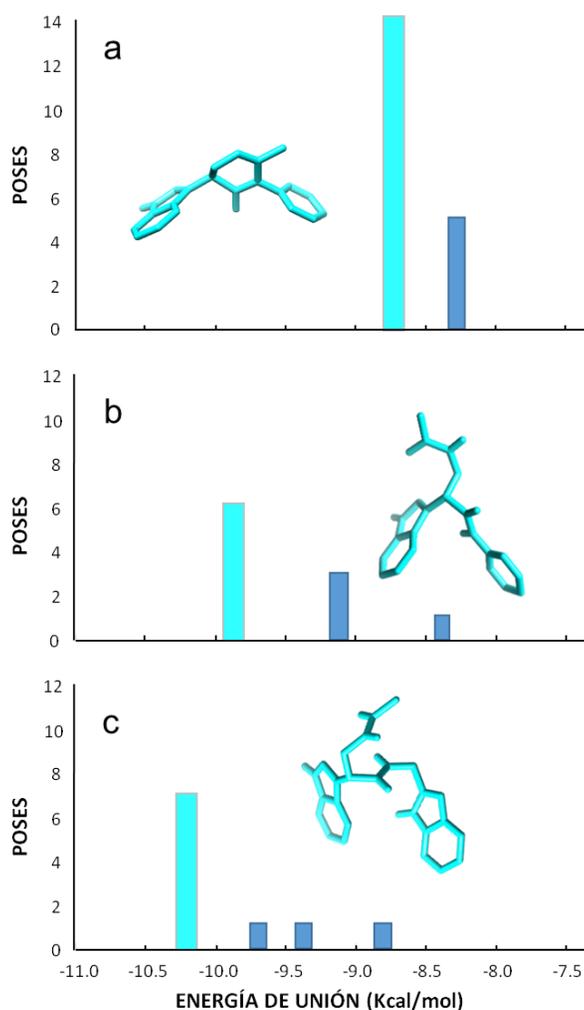
Como se observa en la Fig 7, los aminoácidos más importantes involucrados en las interacciones hidrofóbicas en el bolsillo de unión de la RT con NNRTI son Leu100, Val106, Val179, Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229 y Leu 234 mientras que Lys101, Lys103 y Glu138 (subunidad P51), pueden ser responsables de las interacciones de puente de hidrógeno [22].



**Figura 7.** (a) Estructura del sitio NNIBP de RT obtenida por cristalografía por rayos-X del complejo RT-delaviridina y contactos críticos (código PDB 1KLM). (b) Estructura 3D del sitio de unión NNIBP de RT sin el ligando. (c) Proyección 2D de los residuos de contacto crítico de delaviridin en NNIBP [23].

Las principales interacciones enlazantes para cada ligando **1-3** en el sitio NNIBP se representaron mediante la generación de clusters clasificados según su energía usando una tolerancia de 2.0 Å. El análisis jerárquico de cada uno de los clusters, realizado sobre 100

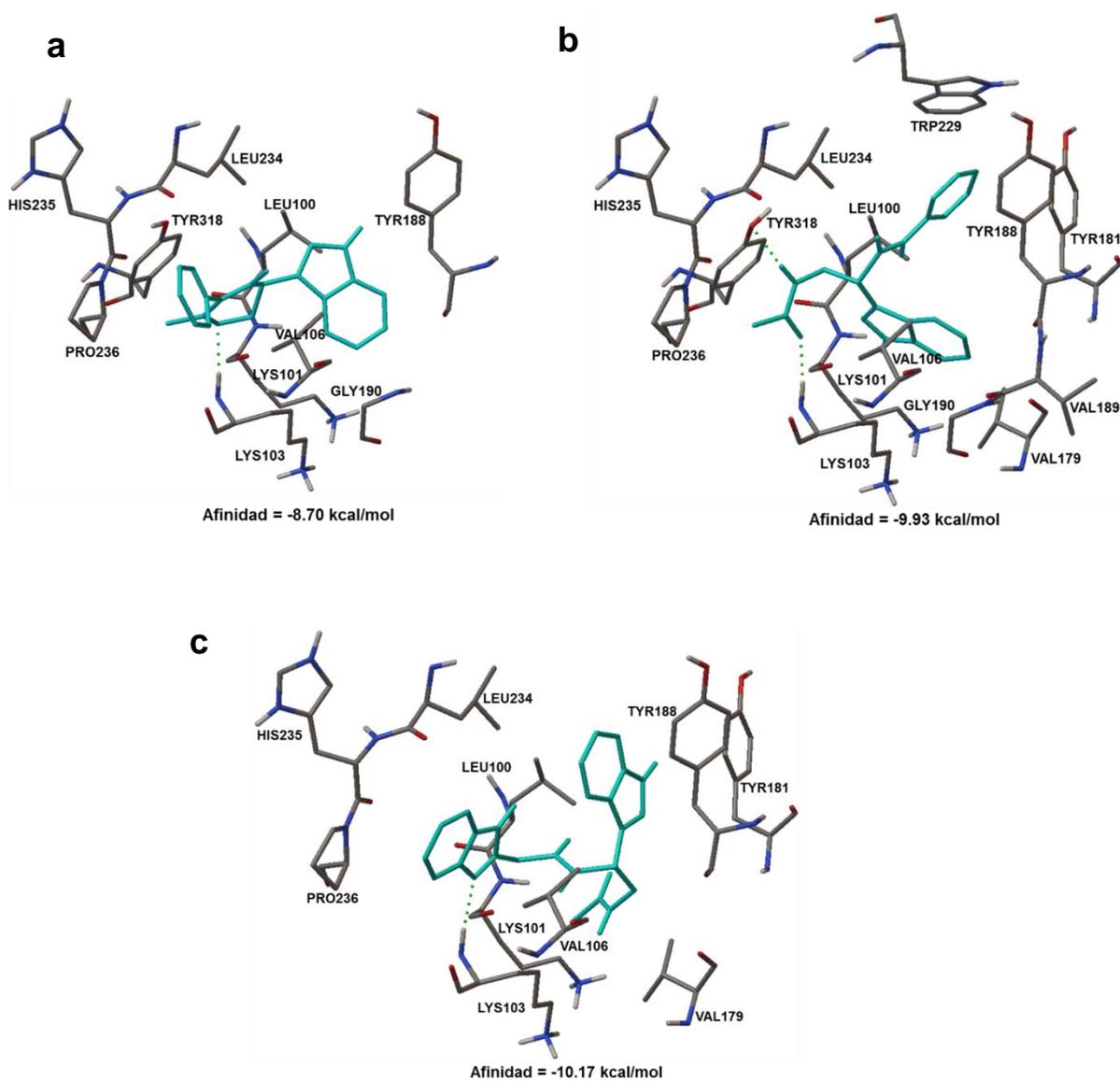
corridas docking independientes, mostró que las conformaciones obtenidas se pueden agrupar en 2 a 4 grupos geométricos prevalentes para cada molécula asociados a la frecuencia de ocurrencia ( $f_{oc}$ ) más alta y, por lo tanto, con menos costo en la pérdida de entropía conformacional en la formación del complejo acorde con las energías de interacción. Los experimentos se realizaron sin moléculas de agua en el sitio alostérico. El análisis de cada ligando generó 19 poses para el ligando **1** agrupadas en 2 clusters, 10 poses para el ligando **2** agrupadas en 3 clusters y 10 poses para el ligando **3** agrupadas en 4 clusters (Fig. 8). Para seleccionar la mejor pose para cada ligando se consideró la energía de unión del complejo (menor energía de unión entre todas las poses obtenidas), que en este caso coincide con la pose que ocupa la primera posición dentro del cluster mas poblado.



**Figura 8.** Clusters generados por exploración docking de los ligandos **1** (a), **2** (b) y **3** (c).

En todos los casos analizados los clusters ocuparon el bolsillo de unión alostérica de la RT pero con poses de unión diferentes. En la Figura 9a-c se muestran las poses de acoplamiento de los ligandos **1-3** con la energía libre de unión más baja en el complejo RT-ligando.

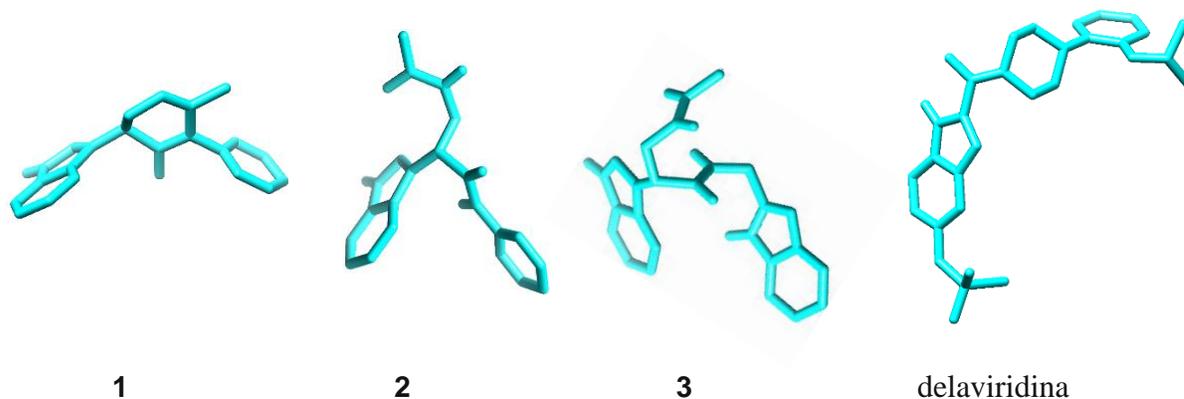
Como se observa en la Figura 9a, la conformación docking del ligando **1** muestra que los electrones- $\pi$  no compartidos del átomo de nitrógeno  $sp^2$ -N del anillo central de pirimidinona de **1** forman un puente de hidrógeno del tipo  $N\cdots H-N$  con el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del residuo Lys103, en tanto que el anillo de indol interactúa hidrófobamente con los residuos Leu100, Tyr188 y Tyr318. Estos contactos hidrófobos deben contribuir significativamente a la estabilización del complejo, cuya energía de unión calculada es de -8.70 kcal/mol. La conformación docking del ligando **2** evidencia un modo de unión localizado en el bolsillo alostérico de la RT (Fig. 9b), aunque difiere del encontrado para el ligando **1**. En el ligando **2**, el anillo de pirimidina está orientado hacia un canal formado entre los residuos hidrófobos Leu100, Tyr181, Tyr188 y Trp229. La sustitución del anillo de pirimidinona por grupos amida favorece la formación de dos puentes de hidrógeno, uno de tipo  $O\cdots H-O$  entre el grupo carbonilo de la cadena etilamido y el átomo de oxígeno del residuo Try318 y el otro puente de tipo  $N\cdots H-N$  entre el átomo de nitrógeno de la cadena etilamido y el átomo de hidrógeno del grupo amino del residuo Lys103. El anillo de indol de la molécula **2** interactúa hidrófobamente con los residuos Leu100, Tyr188 y Tyr318. La energía de unión calculada es de -9.93 kcal/mol. El análisis docking del ligando **3** (Fig. 9c) muestra que la sustitución del grupo pirimidinil, presente en **2**, por un grupo benzimidazolil reorienta al ligando en el bolsillo alostérico de la RT, de tal manera que es ahora el anillo de indol el que interactúa hidrófobamente con los residuos Val106, Val179, Tyr181 y Tyr188, en tanto que el átomo de nitrógeno  $sp^2$ -N del anillo de benzimidazol forma un puente de hidrógeno del tipo  $N\cdots H-N$  con el átomo de hidrógeno del grupo amino del residuo Lys103. La posible explicación de los diferentes modos de unión de los compuestos **2** y **3** puede ser la diferencia en la hidrofobicidad de los anillos de pirimidina y de indol comparados con el anillo menos hidrofóbico de benzimidazol y por ello responsable de la reorientación del anillo de indol de **3** en el canal formado por residuos hidrófobos. La energía de unión calculada para este complejo fue de -10.17 kcal/mol.



**Figura 9a-c.** Conformación docking en el bolsillo alostérico de la RT del ligando **1** (a), del ligando **2** (b) y del ligando **3** (c). Los enlaces por puente de hidrógeno se representan como líneas punteadas en verde.

### 5.1.3 Alineamiento de los conforméros $C_1$ y $C_D$

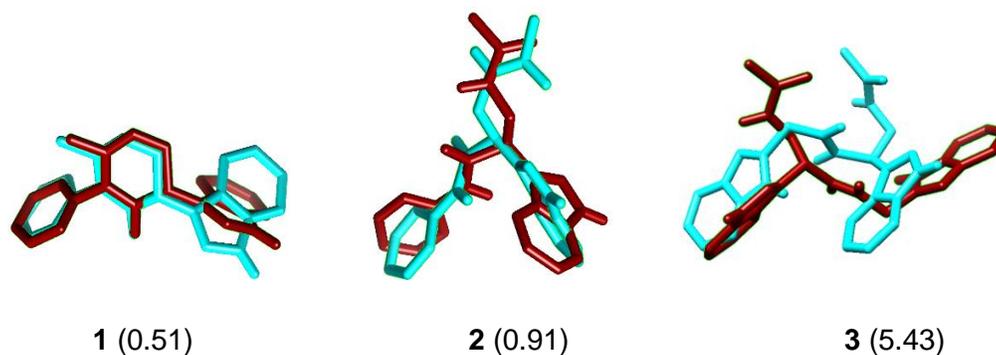
Una vez efectuados los análisis docking, se realizó el aislamiento virtual *in silico* de las estructuras 3D de los ligandos **1-3** del complejo RT-ligando (Autodock 4), denominadas en lo sucesivo  $C_D$  (Fig. 10).



**Figura 10.** Conformación  $C_D$  de los ligandos **1-3** y de la delaviridina sustraída del archivo de coordenadas de rayos-X del complejo RT-delaviridina.

Con la finalidad de determinar si la geometría del conforméro energéticamente más estable ( $C_1$ ) de los ligandos **1-3** obtenida por cálculos DFT coincide con aquella derivada del docking molecular ( $C_D$ , Fig. 10) se realizó el alineamiento correspondiente para cada par usando la función “*Ensemble Match*” del programa UCSF Chimera. Esta función evalúa todos los grupos de coordenadas a comparar entre dos moléculas con el mismo número de átomos, en donde el valor RMS indica la desviación resultante de la sobreposición entre los puntos de coincidencia generados y la diferencia entre los puntos en los que no hubo coincidencia con respecto a la referencia establecida (conforméros obtenidos en los análisis docking). Como se observa en la Figura 11, se obtuvo un buen alineamiento entre los conforméros  $C_1$  y  $C_D$  del ligando **1** (RMS 0.51) atribuido a una restricción conformacional conferida por el anillo de pirimidinona. El reemplazamiento del anillo de primidona por grupos amida en los ligandos **2** y **3** conduce a un alineamiento menos efectivo, con una desviación RMS de 0.91 para el ligando **2** y de hasta 5.43 para el ligando **3**.

Cabe señalar que no resulta realista asumir que los ligandos siempre se unen al receptor en sus conformaciones de mínima energía ya que la energía libre de asociación generalmente supera la energía necesaria para que el ligando sufra un cambio conformacional. Con base en el análisis antes descrito, se concluye que la superficie energética de los ligandos aislados **1-3** se perturba en mayor o menor grado por la interacción con el receptor.



**Figura 11.** Alineamiento de la estructura 3D aislada del docking molecular  $C_D$  (cian) con la correspondiente debida al conformero energéticamente más estable  $C_1$  (granate) calculada en fase acuosa de los ligandos **1-3** (RMSD en paréntesis).

#### 5.1.4 Mapeo farmacofórico y alineación al modelo de mariposa

El análisis cualitativo de las estructuras 3D de los ligandos **1-3** aislados del docking molecular muestra que la restricción conformacional debida a la presencia del anillo de primidinona en **1** o de los grupos amida en **2** y **3** favorece la conformación mariposa presente en muchos otros NNRTI conocidos [3,10]. A continuación, se discutirán los modelos de farmacóforos para las estructuras 3D de los ligandos **1-3**, así como gráficos de interacción 2D obtenidos del programa LigandScout 3.12 [24].

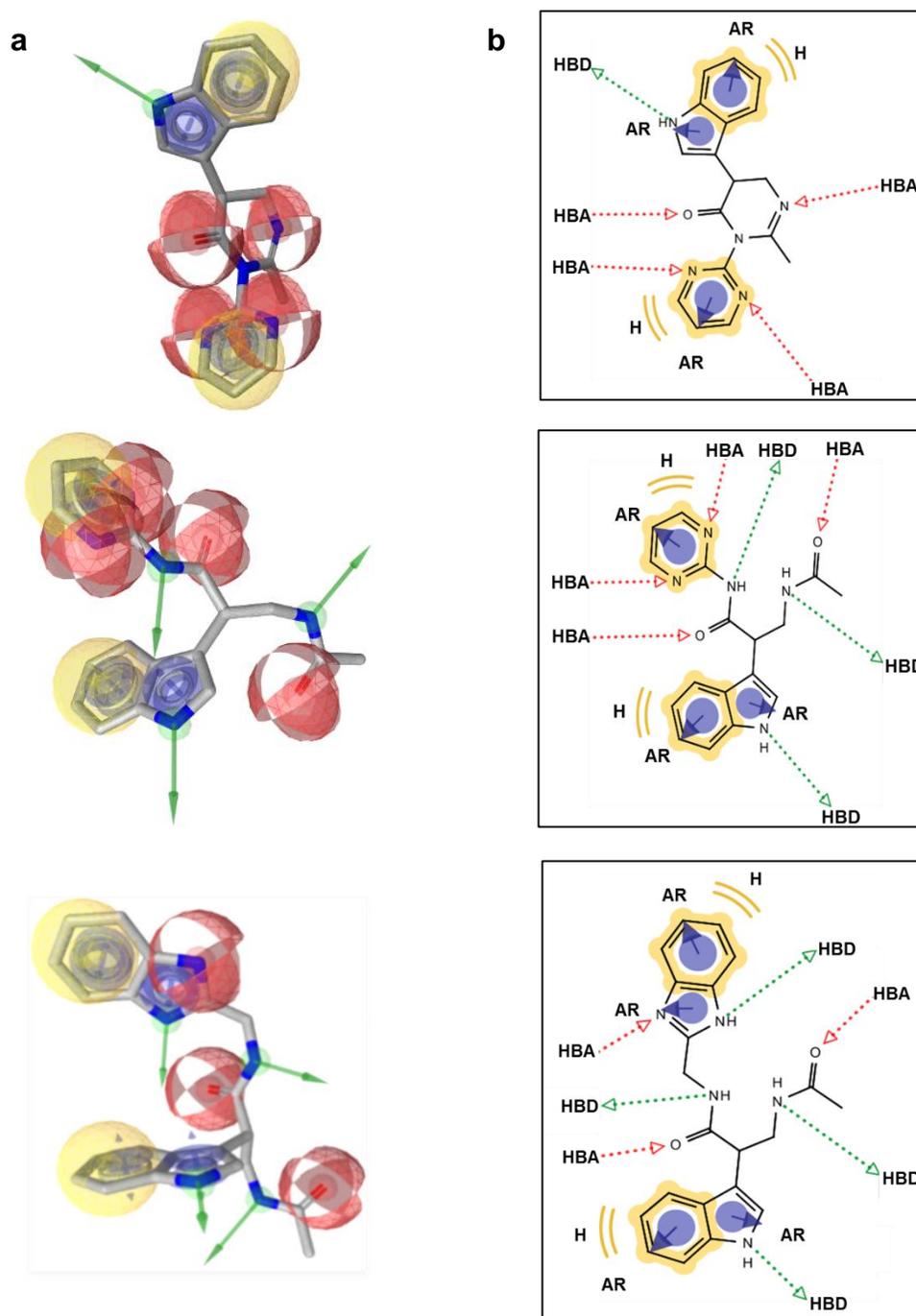
##### 5.1.4.1 Elementos farmacóforos

El modelo farmacofórico mapeado con el conformero aislado del docking molecular de **1** (Figura 10) contiene potencialmente 4 aceptores de puente de hidrógeno (HBA, esferas rojas)

debidos a los dos nitrógenos del anillo de pirimidina, el carbonilo y el nitrógeno  $sp^2$  de la pirimidona; un donador de puente de hidrógeno (HBD, vector verde) que procede del grupo NH del indol y dos áreas hidrófobas (H, zonas amarillas) localizadas en el entorno de los anillos aromáticos (AR, círculos azules) del indol y de la pirimidina.

Como se observa en la Figura 12, el modelo farmacofórico mapeado con el confórmero aislado del docking molecular de **2** contiene también 4 aceptores de puente de hidrógeno (HBA) que en este caso son debidos a los dos nitrógenos del anillo de pirimidina y a los dos carbonilos de los grupos amida; 3 donadores de puente de hidrógeno (HBD) que procede de los grupos NH del indol y de las amidas y dos áreas hidrófobas (H) localizadas en el entorno de los anillos aromáticos (AR) del indol y de la pirimidina.

En tanto que el modelo farmacofórico mapeado con el confórmero aislado del docking molecular de **3** contiene 3 aceptores de puente de hidrógeno (HBA) debidos al nitrógeno  $sp^2$  del benzimidazol y a los dos carbonilos de los grupos amida; 4 donadores de puente de hidrógeno (HBD) debidos a los grupos NH del indol de las dos amidas y del benzimidazol y dos áreas hidrófobas (H) localizadas en el entorno de los anillos aromáticos (AR) del indol y del benzimidazol.

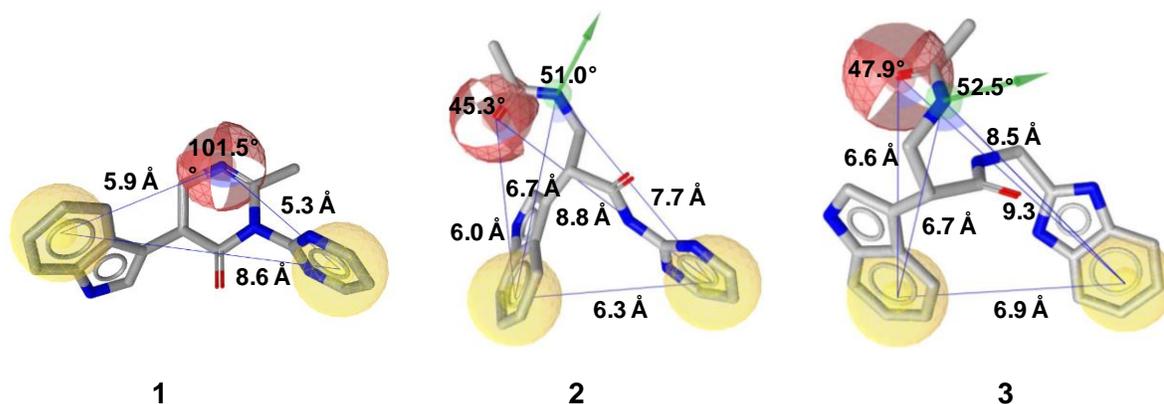


**Figura 12.** Mapas farmacóforos 3D de los conformeros aislados del docking molecular (panel **a**) y gráfica esquemática de las potenciales interacciones moleculares 2D de **1-3** usando LigandScout 3.12 (panel **b**). Elementos farmacóforos: aceptor de puente de hidrógeno (HBA, rojo) donador de puente de hidrógeno (HBD, verde) áreas hidrófobas (H, amarillo), anillos aromáticos (AR, azul).

### 5.1.4.2 Modelo de mariposa

Para determinar los parámetros fisicoquímicos que caracterizan la unión y afinidad de los ligandos **1-3** con la enzima RT del VIH-1, se analizó la disposición geométrica de los elementos farmacóforos de cada ligando (LigandScout 3.12). En la Figura 13 se muestra la disposición geométrica de los grupos farmacóforos, las distancias relativas y el ángulo formado entre el elemento HBA y/o HBD y los elementos H de los modelos generados para los ligandos **1-3**.

De acuerdo con el modelo de mariposa (Fig. 4, sección 1.4.4), existen dos distancias a considerar tomando como referencia el cuerpo central hidrofílico (HBA y/o HBD): una distancia corta (4.2-6.7 Å) y una distancia larga (9.1-9.4 Å). Otros parámetros a considerar son la distancia comprendida entre los dos elementos hidrofóbicos (4.3-7.6 Å) y el ángulo formado por las dos regiones hidrofobas en donde el vértice es el elemento hidrofílico (114°-119°) [10].



**Figura 13.** Distribución geométrica de los grupos farmacóforos en **1-3**. Los elementos farmacóforos clave incluyen HBA (rojo), HBD (verde) y H (amarillo). Relación de distancias en Å y ángulos en grados.

Para el caso del ligando **1**, el elemento HBA en el modelo farmacofórico se localizó en el átomo de nitrógeno  $sp^2$  del anillo central de pirimidinona. En tanto que el modelo farmacofórico de **2** presenta dos elementos hidrofílicos formadores de puente de hidrógeno HBD y HBA que corresponden al grupo NH y al carbonilo de la amina acetilada, respectivamente, por lo que las mediciones se realizaron a partir de cada uno de ellos. Al igual

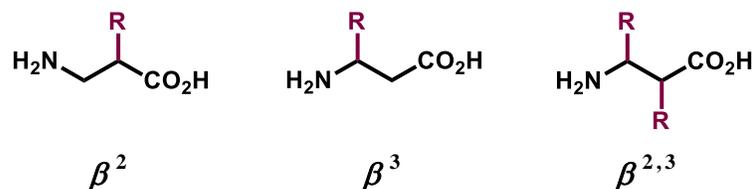
que en **2**, en el modelo farmacofórico de **3** las mediciones se realizaron a partir del cuerpo central hidrofílico, conformado ya sea por el grupo NH de la amida (elemento HBD) ó por el carbonilo de la amina acetilada (elemento HBA). El análisis de los parámetros geométricos de los modelos farmacóforos generados para los ligandos **1-3** indica que en general cumplen o son próximos a las especificaciones implicadas en el modelo mariposa, por lo que estos ligandos se unen virtualmente a la RT del VIH en una conformación similar a una mariposa.

## 5.2 Síntesis de la propanamida **3**

El análisis de los resultados de docking molecular de las amidas **1-3** en el bolsillo alostérico de la enzima RT demostró que el compuesto con mayor afinidad resultó ser la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida **3**. Por ello, la propanamida **3** se constituyó en el objetivo de síntesis. La propanamida **3** puede considerarse como una molécula híbrida constituida por dos sistemas heterocíclicos nitrogenados: un  $\beta$ -aminoácido, el  $\beta^2$ -triptófano, y un núcleo de benzimidazol. En tanto que los análogos del  $\beta$ -triptófano representan aminoácidos no naturales que son bloques de construcción importantes para la síntesis de peptidomiméticos, productos naturales y compuestos biológicamente activos [25], el benzimidazol exhibe una gama de actividades biológicas [26].

### 5.2.1 $\beta$ -aminoácidos

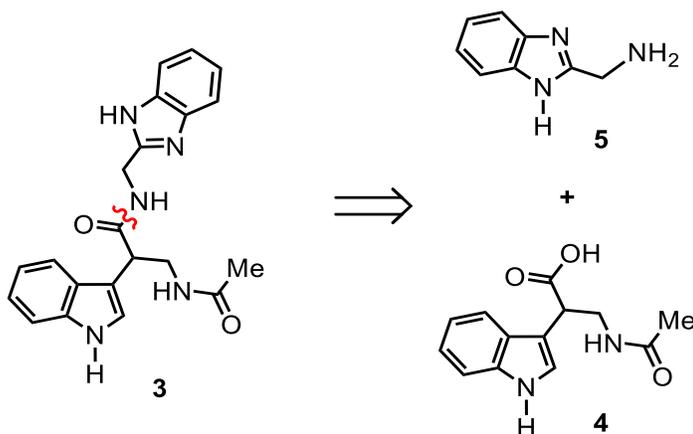
Los  $\beta$ -aminoácidos son similares a los  $\alpha$ -aminoácidos ya que también presentan un grupo amino y carboxi terminales. Sin embargo, en los  $\beta$  derivados estos grupos se encuentran separados por dos átomos de carbono, tal como se muestra en la Figura 14. Por lo tanto un  $\beta$ -aminoácido monosustituído puede existir como isómeros *R* o *S* tanto para el carbono  $\alpha$  (C2) como para el carbono  $\beta$  (C3), resultando en un total de cuatro posibles isómeros. Los  $\beta$ -aminoácidos presentan importantes propiedades farmacológicas y son por ello potentes herramientas para el desarrollo de nuevos medicamentos. Por ejemplo, los  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminoácidos se han utilizado en el estudio de la relación estructura-actividad del sitio activo de la proteasa VIH-1 para el tratamiento del SIDA [27].



**Figura 14.** Clasificación de los  $\beta$ -aminoácidos.

### 5.2.2 Análisis retrosintético

Un método para diseñar la síntesis de un compuesto diana consiste en desconectar un enlace estratégico del compuesto diana para dar dos subestructuras más pequeñas, este método se denomina retrosíntesis. En el caso de la propanamida **3** un enlace estratégico puede ser el enlace peptídico que conecta la subestructura *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano con el 2-(aminometil)benzimidazol. Por consiguiente el último paso en la síntesis de **3** puede ser una reacción de condensación, como se muestra en el Esquema 1. La síntesis de la propanamida **3** será posible si se prepara el equivalente sintético *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4**, ya que el 2-(aminometil)benzimidazol **5** es un producto comercial.

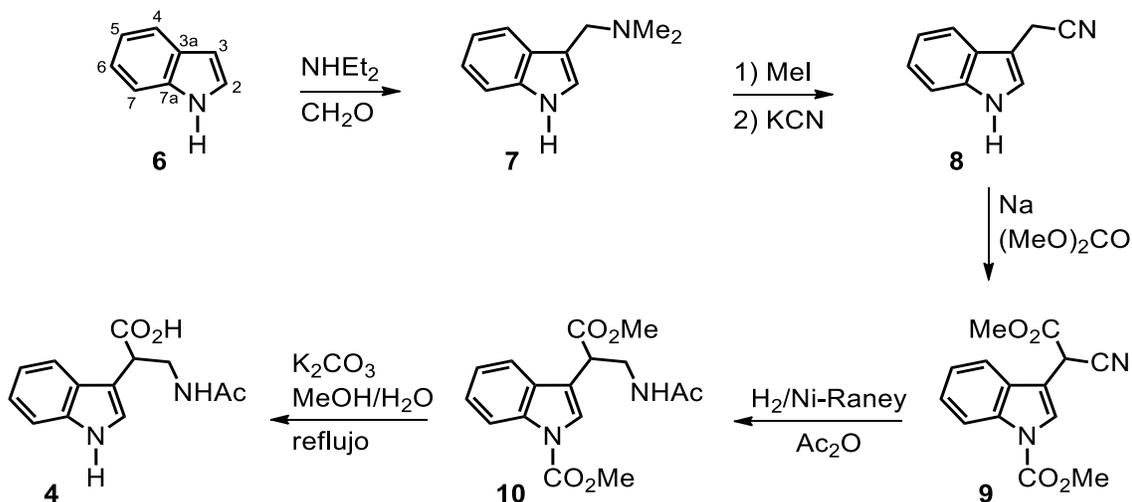


**Esquema 1.** Análisis retrosintético de la propanamida **3**.

#### 5.2.2.1 Síntesis del equivalente sintético *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4**

La síntesis del equivalente sintético *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4** se inició a partir del indol **6** usando metodologías previamente desarrolladas [28] u optimizadas [29] por este grupo de

investigación. La primera etapa consistió en la reacción de formilación-alkilación del indol **6** con dietilamina y formaldehído (reacción de Manich) para dar el 3-(dietilaminometil)indol **7**, que por tratamiento con MeI seguido de KCN dio el 3-acetonitrilindol **8**. El tratamiento de **8** con Na y carbonato de metilo condujo al  $\beta$ -ciano éster **9**. La hidrogenación catalítica de **9** en presencia de Ni/Raney redujo al grupo ciano a la correspondiente amina primaria, que por reacción con anhídrido acético, presente en el medio de reacción, dio el *N*-acil- $\beta^2$ -amidodiéster **10**. Los compuestos **6-10** son conocidos [29]. A continuación, el tratamiento de **10** con  $K_2CO_3$  a reflujo de MeOH/ $H_2O$  condujo al *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4**, resultante de la hidrólisis selectiva del grupo éster y concomitante *N*-descarboalcoxilación, con un rendimiento en la última etapa del 78.8% (Esquema 2).



**Esquema 2.** Síntesis del equivalente sintético *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4**

### 5.2.2.2 Elucidación estructural del *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4**

La estructura del *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4** se determinó mediante el análisis de métodos espectrográficos que incluyen RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (Tablas 2 y 3, Anexo), IR, espectrometría de masa y difracción de rayos-X (Tabla 1, Anexo).

#### 5.2.2.2.1 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La asignación inequívoca de las resonancias de hidrógeno y carbono del *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4** se realizó por el análisis concertado de los patrones de acoplamiento, desplazamientos químicos y datos de RMN 2D de gHSQC y gHMBC. Debido a la baja solubilidad del *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4** en disolventes poco polares, las mediciones se llevaron a cabo en DMSO- $d_6$  y CD<sub>3</sub>OD. En DMSO- $d_6$  la humedad del disolvente oscureció las señales de los hidrógenos alifáticos del metileno de la cadena, en tanto que en CD<sub>3</sub>OD las señales del hidrógeno ácido del NH de la amida y del indol intercambiaron con deuterio.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H en solución de CD<sub>3</sub>OD se observan señales entre  $\delta$  7.8 y 6.9 con un patrón de acoplamiento característico de un benceno *orto*-disustituido. Las resonancias de los hidrógenos H4' y H7' aparecen como señales dobles anchas en  $\delta$  7.66 y  $\delta$  7.34, respectivamente, con constantes de acoplamiento *orto* de 8.2 Hz. Las resonancias de H5' en  $\delta$  7.01 y H6' en  $\delta$  7.10 se observan como señales que asemejan a una triple de dobles con constantes de acoplamiento *orto* de 8.1 y 7.0 Hz y *meta* de 1.2 Hz. Adicionalmente, en  $\delta$  7.17 se presenta una señal simple que se atribuyó al hidrógeno H-2'. En la región alifática se observan tres resonancias, cada una como señal doble de dobles, que se asignaron a los hidrógenos del metino H2 en  $\delta$  4.16 ( $J = 8.4$  y 6.5 Hz) y del metileno H3 en  $\delta$  3.76 ( $J = 13.4$  y 8.6 Hz) y en  $\delta$  3.62 ( $J = 13.4$  y 6.5 Hz). La señal simple en  $\delta$  1.89 se asignó al metilo del grupo acetamida. El espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostró señales características de carbonilo en  $\delta$  176.8 y 173.6 debidas a los grupos carboxílico y acetamida, respectivamente. Los carbonos CH aromáticos se asignaron a las resonancias en  $\delta$  123.8 (C2') 119.7 (C4'), 120.0 (C5'), 122.6 (C6') y 112.4 (C7'). Los carbonos cuaternarios C3', C3a' y C7a' se asignaron a las señales en  $\delta$  111.7, 127.9 y 138.1, respectivamente. Finalmente, Los carbonos alifáticos C2, C3 y COMe corresponden a las señales en  $\delta$  44.0, 43.2 y 22.5, respectivamente.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H en solución de DMSO- $d_6$  se observó una señal simple ancha en  $\delta$  11.00 y una señal triple ancha en  $\delta$  8.04 que se asignaron a los hidrógenos NH del indol y de la acetamida, respectivamente. El resto de las señales no se vieron afectadas de manera significativa por el cambio de disolvente, excepto la señal de H2' en  $\delta$  7.20 que se observa como una señal doble ( $J = 2.4$  Hz) por acoplamiento a tres enlaces con el NH del indol. El

espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  en solución de DMSO- $d_6$  no mostró cambios significativos con respecto al obtenido en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

#### 5.2.2.2.2 Enlace por puente de hidrógeno

A pesar de que los enlaces covalentes presentan una fuerte interacción molecular (alrededor de 80-100 kcal/mol), las interacciones débiles (no covalentes) son de especial interés en la química medicinal. El enlace por puente de hidrógeno  $\text{X-H}\cdots\text{Y-Z}$  es un enlace electrostático de interacción débil en el que un átomo de H electropositivo es un intermediario entre dos especies electronegativas X y Y acercando espacialmente a ambas especies. Los enlaces por puente de hidrógeno (los cuales tienen una fuerza típica de 1 a 7 kcal/mol) son más fuertes que las interacciones de Van der Waals, pero más débiles que los enlaces covalentes o iónicos [30]. Aunque las interacciones por puente de hidrógeno presentan una fuerza débil de manera individual, su importancia radica en la fuerza que aportan de manera acumulada. Los enlaces por puente de hidrógeno son de extrema relevancia en ramas como la química supramolecular, biología estructural (proteínas, ácidos nucleicos), análisis conformacional, catálisis asimétrica, diseño de fármacos y en la química de reconocimiento molecular.

Desde los albores de este siglo la interacción entre las moléculas se ha convertido en el tema más fascinante en la química y la bioquímica. Para que un sistema con interacciones dinámicas sea eficaz, la energía de una interacción individual nunca debe ser demasiado grande; las interacciones fuertes son incompatibles con la naturaleza específica del reconocimiento molecular o auto-ensamblado. Por ello, las interacciones más débiles, más suaves y flexibles desempeñan la parte central en sistemas dinámicos. Es pertinente en este sentido señalar que una selectividad de 1000 a 1 puede ser el resultado de la diferencia en la energía de Gibbs de solamente 4 kcal mol $^{-1}$ .

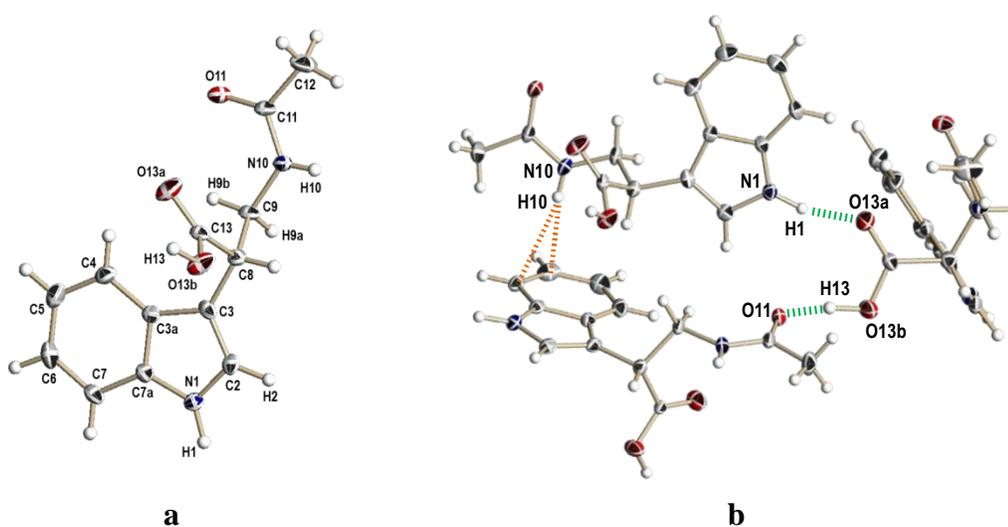
Los enlaces por puente de hidrógeno comparativamente fuertes, tales como  $\text{N-H}\cdots\text{O}$ ,  $\text{O-H}\cdots\text{O}$  y  $\text{O-H}\cdots\text{N}$ , son de vital importancia en el plegamiento y conformación de la estructura tridimensional de las biomoléculas. Los enlaces puente de hidrógeno "no-clásicos"  $\text{C-H}\cdots\text{O}$ ,  $\text{C-H}\cdots\text{N}$  y  $\text{N-H}\cdots\pi$  con frecuencia tienen gran influencia en la estabilidad conformacional de las moléculas. Dentro de estas interacciones débiles, la atracción entre un enlace NH y un

sistema  $\pi$  conocida como interacción  $\text{NH}\cdots\pi$  se ha observado ampliamente en proteínas, sin embargo, ha sido poco estudiada como interacción individual [31].

Aunque existen varios grupos funcionales capaces de formar interacciones por puente de hidrógeno, entre los más estudiados se encuentran los grupos amida y ácido carboxílico, cualquiera de ellos puede actuar como donador y aceptor de protones [32].

#### 5.2.2.2.3 Análisis por difracción de rayos-X

En la Figura 15a se muestra la estructura molecular del  $\beta$ -amidoácido **4** obtenida mediante difracción de rayos X de un cristal. La estructura del cristal confirmó la asignación estructural elucidada por RMN, específicamente la conservación de la integridad del grupo amida después de la hidrólisis selectiva de **10**. El  $\beta$ -amidoácido **4** contiene grupos aceptores y donadores que pueden formar interacciones intra- o intermoleculares por puente de hidrógeno. Resulta de particular interés mencionar que la celda cristalina unitaria o unidad asimétrica de **4** (es decir, la parte que se repite por operaciones de simetría) consiste de una estructura trimérica cíclica estabilizada por interacciones intermoleculares tipo puente de hidrógeno, la geometría de la cual se muestra en la Figura 15b y la Tabla 6. El análisis de la estructura trimérica confirma la presencia de distancias intermoleculares muy cortas que involucran interacciones por puente de hidrógeno de ya sea el grupo OH proveniente de ácido carboxílico o del grupo NH ácido del anillo de indol, caracterizados por una distancia  $\text{OH}\cdots\text{O}$  de 1.622(4) Å y una distancia  $\text{NH}\cdots\text{O}$  de 1.857(4) Å. La distancia  $\text{NH}\cdots\text{O}$  es más larga que aquella del puente de hidrógeno  $\text{OH}\cdots\text{O}$ , consistente con una menor acidez del grupo NH del indol comparado con el grupo OH del ácido carboxílico. En ambos casos, el ángulo donador-hidrógeno $\cdots$ aceptor ( $\text{O-H}\cdots\text{O}$  y  $\text{N-H}\cdots\text{O}$ ) es mayor de  $160^\circ$ , consistente con una fuerte interacción por puente de hidrógeno. Además de los puentes de hidrógeno “clásicos” antes descritos, en la estructura trimérica cíclica de **4**, el protón de la amida está vinculado con una interacción  $\text{N-H}\cdots\pi$ , que apunta directamente al anillo de indol (Figura 15b, Tabla 6).



**Figura 15.** (a) Vista elipsoidal térmica (30% de probabilidad) de la estructura cristalográfica determinada por difracción de rayos X de **4**. (b) Estructura trimérica del cristal de **4**, que muestra dos tipos de interacción por puente de hidrógeno: la “clásica” con puentes formados por átomos de oxígeno (trazos en verde) y la “no clásica” formada por el anillo de indol (trazos en naranja).

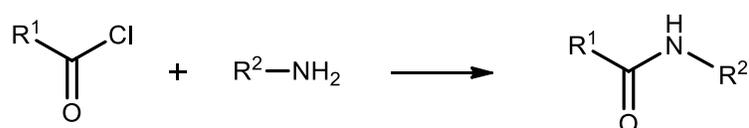
**Tabla 6.** Distancias ( $d$ , Å) y ángulos de enlace ( $\angle$ , °) de puentes hidrógeno intermoleculares obtenidos de la proyección de la celda unitaria del cristal del *N*-acil- $\beta^2$ -triptófano **4**

Enlace (X-H...Y)	$d(\text{X-H})$	$d(\text{H...Y})$	$\angle(\text{XHY})$
O(13b)-H(13)···O(11)	0.977(4)	1.622(4)	164(4)
N(1)-H(1)···O(13a)	0.978(4)	1.857(4)	167(3)
N(10)-H(10)···C(6)	0.854(3)	2.579(3)	161(2)
N(10)-H(10)···C(7)	0.854(3)	2.779(3)	168(2)

### 5.2.3 Formación del enlace amida

Los enlaces amida juegan un papel importante en la elaboración y composición de sistemas biológicos, representando por ejemplo los principales enlaces químicos que unen los bloques de construcción de aminoácidos para dar proteínas. Los enlaces amida no se limitan a los sistemas biológicos y están de hecho presentes en una gran variedad de moléculas, incluyendo los principales fármacos comercializados.

Los enlaces amida se sintetizan típicamente a partir de la unión de ácidos carboxílicos y aminas. Sin embargo, la condensación de estos dos grupos funcionales, con la necesaria eliminación de agua, no se produce espontáneamente a temperatura ambiente, requiere altas temperaturas (>200 °C) [33], condiciones típicamente perjudiciales para la integridad de los sustratos. Por esta razón, normalmente es necesario activar primero el ácido carboxílico, proceso que habitualmente se lleva a cabo mediante la conversión del grupo -OH del ácido carboxílico en un buen grupo saliente antes del tratamiento con la amina. Entre estos métodos, el uso de cloruros de acilo es uno de los más fáciles y económicos (Esquema 3). Sin embargo, el valor de los cloruros de acilo en la formación de amidas es limitado debido a la ocurrencia de reacciones secundarias tales como racemización, hidrólisis o desprotección. Por lo tanto, se han desarrollado una multitud de métodos y estrategias para la formación del enlace amida [34].

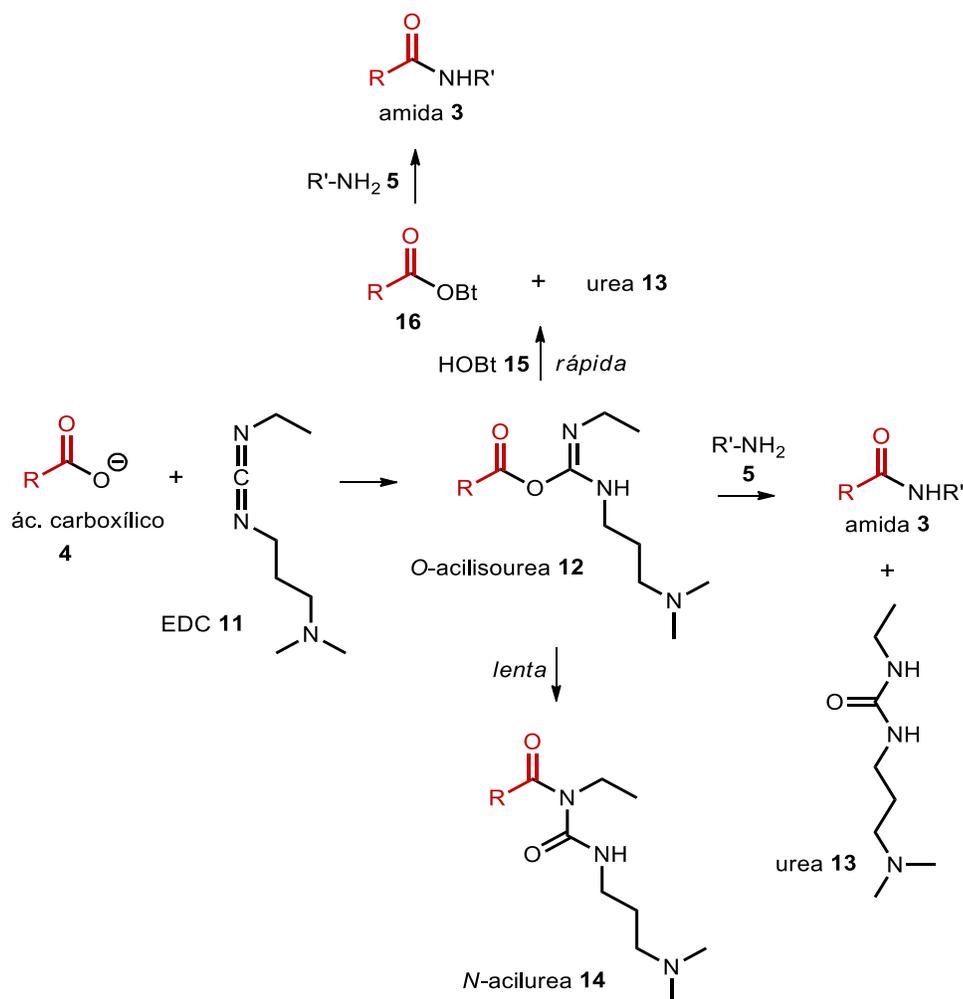


**Esquema 3.** Acoplamiento de aminas primarias con cloruros de ácido.

#### 5.2.3.1 Síntesis de la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida 3

La síntesis de la propanamida **3** se llevó a cabo usando una carbodiimida como agente acoplante [35]. En este caso se usó la 1-etil-3-(3'-dimetilamino)carbodiimida (EDC) **11** que reaccionó con el ácido carboxílico del derivado del  $\beta^2$ -triptófano **4** para formar el anhídrido mixto de la *O*-acilisourea **12**. Este intermedio puede entonces reaccionar directamente con la

amina **5** para producir la amida deseada **3** y el subproducto de urea, la dimetilaminoproil-3-etilurea **13**, que es extremadamente soluble en agua y puede ser eliminada en el tratamiento acuoso. En nuestro caso, para minimizar la formación de la *N*-acilurea **14** no reactiva y evitar reacciones secundarias, se adicionó el nucleófilo hidroxibenzotriazol (HOBt) **15** que generó a su vez un intermedio suficientemente activo **16** para acoplarse con el 2-(aminometil)benzimidazol **5**. De esta manera, la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida **3** se obtuvo en un rendimiento del 78% a partir del derivado del  $\beta^2$ -triptófano **4** (Esquema 4).



**Esquema 4.** Síntesis de la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida **3**.

### 5.2.3.2 Elucidación estructural de la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida **3**

La estructura de la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida **3** se determinó mediante el análisis de métodos espectrográficos que incluyen RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Tablas 2 y 3, Anexo), IR y espectrometría de masa.

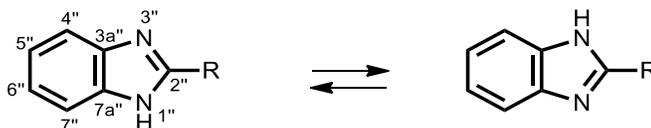
#### 5.2.3.2.1 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La asignación inequívoca de las resonancias de hidrógeno y carbono de la benzimidazolil-3-acetamidoindolil propanamida **3** se realizó por el análisis concertado de los patrones de acoplamiento, desplazamientos químicos y datos de RMN 2D de gHSQC y gHMBC. Debido a la baja solubilidad de la propanamida **3** en disolventes poco polares, tales como el  $\text{CDCl}_3$ , las mediciones se llevaron a cabo en  $\text{CD}_3\text{OD}$  y  $\text{DMSO}-d_6$ . En  $\text{DMSO}-d_6$  la humedad del disolvente oscureció las señales de los hidrógenos alifáticos del metileno de la cadena, en tanto que en  $\text{CD}_3\text{OD}$  las señales del hidrógeno ácido del NH de la amida, del indol y del benzimidazol intercambiaron con deuterio.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en solución de  $\text{CD}_3\text{OD}$  se observan señales entre  $\delta$  7.7 y 6.9, con un patrón de acoplamiento característico de dos bencenos *orto*-disustituidos simétrica- y asimétricamente, debidas a los anillos de benzimidazol e indol, respectivamente. En el caso del indol, las resonancias de los hidrógenos H4' y H7' aparecen como una señal doble ancha en  $\delta$  7.64 y  $\delta$  7.34 con constante de acoplamiento *orto* de 8.1 Hz. Las resonancias de H5' en  $\delta$  7.01 y H6' en  $\delta$  7.10 muestran en primera instancia un patrón de acoplamiento que asemeja a un triple de dobles. El análisis detallado de estas señales permitió determinar que se trata de un sistema doble de doble de dobles (ddd) con dos constantes de acoplamiento *orto* de 8.1 y 7.0 Hz y *meta* de 1.2 Hz. Adicionalmente, en  $\delta$  7.23 se presenta una señal simple que se atribuyó al hidrógeno H-2'.

En el caso del anillo de benzimidazol en solución de  $\text{CD}_3\text{OD}$ , la mezcla equi-poblada de dos tautómeros benzimidazolilo idénticos resultantes de una migración 1,3 de hidrógeno da lugar a un sistema AA'BB' en  $\delta$  7.50 y 7.20 asignadas a los pares de hidrógenos H5''/H6'' y H4''/H7'', respectivamente. Esto muestra claramente que los hidrógenos H4''/H7'' y los hidrógenos H5''/H6'' son equivalentes, a consecuencia de un intercambio 1,3 de hidrógeno rápido

(Esquema 5) [36, 37]. El intercambio es tan rápido que en el espectro de  $^{13}\text{C}$  las señales de los pares de carbonos  $\text{C}3\text{a}''/\text{C}7\text{a}''$ ,  $\text{C}4''/\text{C}7''$  y  $\text{C}5''/\text{C}6''$  se observan como señales equivalentes en  $\delta$  139.4, 123.6 y 115.8, respectivamente. Cabe señalar que las señales de los pares  $\text{C}3\text{a}''/\text{C}7\text{a}''$  y  $\text{C}5''/\text{C}6''$  son muy anchas (Figura 2, en Anexo).

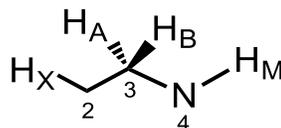


**Esquema 5.** Tautomería prototrópica 1,3 de bencimidazoles.

En la región alifática del espectro de  $^1\text{H}$  de la propanamida **3** en solución de  $\text{CD}_3\text{OD}$  se observan dos señales dobles de un sistema AB en  $\delta$  4.71 y 4.47 ( $J = 15.8$  Hz) que se asignaron al metileno vecino al bencimidazol y tres resonancias, cada una como señales doble de dobles que se asignaron a los hidrógenos del metino en  $\delta$  4.15 ( $J = 8.0$  y 6.4 Hz) y del metileno en  $\delta$  3.76 ( $J = 13.2$  y 8.1 Hz) y en  $\delta$  3.62 ( $J = 13.2$  y 6.4 Hz) de la cadena propanamida. La señal simple en  $\delta$  1.87 se asignó al metilo del grupo acetamida (Tabla 2 en Anexo). El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró señales características de carbonilo en  $\delta$  176.0 y 173.6 debidas a los grupos carboxílico y acetamida, respectivamente. Los carbonos CH aromáticos se asignaron a las resonancias en  $\delta$  124.1 ( $\text{C}2'$ ) 119.6 ( $\text{C}4'$ ), 120.1 ( $\text{C}5'$ ), 122.7 ( $\text{C}6'$ ) y 112.4 ( $\text{C}7'$ ). Los carbonos cuaternarios  $\text{C}3'$ ,  $\text{C}3\text{a}'$  y  $\text{C}7\text{a}'$  se asignaron a las señales en  $\delta$  112.2, 127.9 y 138.1, respectivamente. En tanto que los carbonos alifáticos  $\text{C}2$ ,  $\text{C}3$ ,  $\text{C}8$  y  $\text{COMe}$  corresponden a las señales en  $\delta$  45.0, 43.2 38.4 y 22.5, respectivamente (Tabla 3, en Anexo).

En contraste con lo observado en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la propanamida **3** obtenido en solución de  $\text{CD}_3\text{OD}$ , en solución de  $\text{DMSO-}d_6$  la propanamida **3** presentó una señal ancha en  $\delta$  12.14, una señal doble en  $\delta$  10.94 ( $J = 1.8$  Hz) y dos señales triples en  $\delta$  8.74 y 8.25 que se asignaron a los hidrógenos NH del bencimidazol, del indol y de las amidas NH-7 y NH-4, respectivamente. Otros cambios significativos, influenciados por el uso de  $\text{DMSO-}d_6$  como disolvente, ocurrieron en el patrón de acoplamiento de la señal de  $\text{H}2'$  que se observó como una señal doble en  $\delta$  7.23 ( $J = 2.3$  Hz) por acoplamiento a tres enlaces con el NH del indol, en tanto que las señales de los protones H-8 (parte AB) en  $\delta$  4.62 ( $J = 15.8, 6.2$  Hz) y en  $\delta$  4.37 ( $J$

= 15.8, 5.0 Hz) mostraron un sistema de 3 espines ABX por acoplamiento con el protón NH-7 (parte X). A su vez, los protones H-3 (parte AB) en  $\delta$  3.67 y 3.50 mostraron un patrón de acoplamiento de 4 espines ABMX (Figura 16) por acoplamiento con los protones H-2 (parte X) y NH-4 (parte M).



**Figura 16.** Sistema de 4 espines ABMX.

En DMSO-*d*<sub>6</sub> el equilibrio prototrópico 1,3 del anillo de bencimidazol no es tan rápido, probablemente debido a un puente de hidrógeno intermolecular con el disolvente, tal como lo demuestra la no equivalencia de las señales de los pares de hidrógenos H-4''/H-7'' y H-6''/H-7'' que se observan como señales anchas en  $\delta$  7.16, 7.14, 7.47 y 7.53, respectivamente (Tabla 2 en Anexo). El espectro de RMN de <sup>13</sup>C corrobora esta situación, mostrando señales distintas para los carbonos de cada par C-3a''/C-7a'', C-4''/C-7'' y C-5''/C-6'' (Tabla 3 en Anexo). El resto de señales no se vieron afectadas de manera significativa por el cambio de disolvente

## 6. CONCLUSIONES

Los métodos de modelado molecular actualmente disponibles tienen un papel muy importante en el proceso de desarrollo de fármacos, proporcionando una interpretación física virtual de la actividad molecular. Dentro de las aplicaciones específicas, que son motivo de análisis en esta tesis, se encuentra el diseño y selección de compuestos derivados de  $\beta$ -aminoácidos con un perfil de actividad anti-VIH, así como la identificación de las relaciones existentes entre estos compuestos y la enzima transcriptasa reversa, en términos de interacciones entre grupos farmacofóros. Los resultados obtenidos proporcionaron guías cualitativas para el diseño de nuevos fármacos anti-VIH. Finalmente, se sintetizó y caracterizó por métodos espectrográficos, un nuevo derivado de un  $\beta$ -aminoácido que cumple con las características farmacofóras de modelo de mariposa, con un cuerpo central hidrofílico flanqueado por alas hidrofóbicas.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Modelado computacional

En esta sección se describen las metodologías que se siguieron para crear modelos 2D y 3D de las amidas **1-3** mediante el uso de cálculos teóricos.

#### 7.1.1 Búsqueda conformacional

La búsqueda conformacional de las amidas **1-3** se realizó con Spartan '14 [17] empleando el algoritmo Monte Carlo con el método campo de fuerza de mecánica molecular MMFFaq. La selección de los conformeros se hizo por comparación de sus valores energéticos y su contribución a la distribución de Boltzmann.

#### 7.1.2 Optimización geométrica

La optimización de la geometría de los conformeros seleccionados de mínima energía de **1-3** se realizó con el programa Gaussian '09 [18] empleando el nivel de cálculo de Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) HF/6-31G+(d,p) bajo influencia de un medio acuoso que incorpora el método de polarización continua (CPCM) [19-21].

#### 7.1.3 Mapeo farmacofórico y alineación al modelo de mariposa

El análisis de la disposición geométrica tridimensional de los elementos farmacóforos de los compuestos **1-3** se evaluó mediante la generación de mapas farmacofóricos. La alineación de los elementos farmacofóricos se realizó con base en el modelo de “mariposa” utilizando el programa LigandScout 3.12 [22]. La hipótesis fue generada considerando los conformeros con mejor afinidad de cada compuesto, obtenidos de los estudios docking.

*Alineamiento de conformeros del docking con los conformeros de menor energía.* Para determinar la relación geométrica entre el conformero energéticamente más estable y el conformero aislado del docking molecular, se realizó un alineamiento rígido bajo los criterios predeterminados en las propiedades de alineamiento de LigandScout, tomando como plantilla de referencia el conformero aislado de los estudios de docking.

#### 7.1.4 Análisis de docking molecular

El criterio de búsqueda se refinó dentro de una zona de 60x60x60 Å centrado en la región de la bolsa de unión de la RT (PDB: 1KLM) con una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.5 Å. Se utilizó un protocolo estándar con una población inicial al azar de 100 posiciones individuales y un número máximo de evaluaciones de energía de  $2.5 \times 10^7$  por ciclo de análisis. Todos los parámetros se mantuvieron por default en su posición estándar. Se generaron 100 conformaciones de acoplamiento del receptor para cada ligando, realizando colecciones (<clusters>) en función de la energía total de acoplamiento ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ). Los clusters se mantuvieron con un desviación cuadrática media (RMSD) de 0.3 Å, empleando el programa AutoDockTools 1.5.6 [21].

### 7.2 Parte experimental química

En esta sección se describe el proceso por el cual se sintetizó la propanamida **3** a partir del precursor indol **6**.

#### 7.2.1 Procedimientos generales

Todas las materias primas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Chemical Co. y utilizadas sin purificación adicional. La cromatografía en capa fina se realizó usando placas precoladas con sílica gel 60 F254 e indicador fluorescente (Merck Chem. Co.), los productos fueron visualizados con luz ultravioleta a 254 nm. La cromatografía en columna flash se realizó usando sílica gel 60 (230-400 mallas Merck Chem. Co.). Los disolventes se purificaron acorde a los procedimientos estándar. Los puntos de fusión fueron medidos en un equipo Fisher-Johns y no están corregidos.

*Determinación de los espectros de IR.* Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Buck Scientific modelo 500 IR en pastilla de KBr.

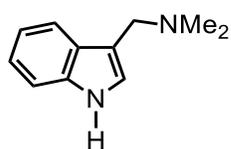
*Determinación de los espectros RMN.* Los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos en espectrómetros Varian Mercury operando a 300 y 74.5 MHz respectivamente, utilizando  $\text{SiMe}_4$  como referencia interna. La multiplicidad de señales se indica por medio de una o más de las siguientes abreviaciones: s (simple), d (doble), t (triple), m (múltiple), a (ancha).

*Determinación de la estructura cristalina por rayos-X del N-acil- $\beta^2$ -triptófano 4.* La estructura de rayos-X de **4** se determinó en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de Cu- $K_{\alpha}$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). Los datos se colectaron a 298 K en el modo registro  $\omega$ - $2\theta$ . Los refinamientos de la celda unitaria se realizaron utilizando los programas SHELXS97 incluidos en el paquete de programas cristalográficos WinGX v.1.64.05. El refinamiento estructural se determinó por matrices totales de mínimos cuadrados en  $F^2$ . Los átomos, excepto hidrógenos, fueron tratados anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno, incluidos en el factor de estructura, se refinaron isotrópicamente.

*Determinación de los espectros de masa.* Las mediciones por CG/EM se efectuaron en un cromatógrafo de gases Varian CP3800 acoplado a un detector de masa selectivo Varian Saturn 2000. Los análisis de EM se obtuvieron en el modo de impacto electrónico (IE) con un voltaje de ionización de 70 eV. Los espectros de masa de alta resolución (HRMS, de sus siglas en inglés) fueron obtenidos en un espectrómetro Waters Synapt G2 en el Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Colorado, Boulder, CO, EUA.

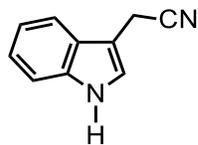
### 7.2.2 Síntesis de la propanamida **3**

#### 3-(Dietilaminometil)indol **7**



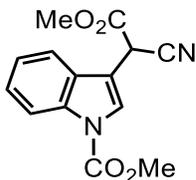
El compuesto **7** se obtuvo a partir del indol **6** como un sólido incoloro en un rendimiento del 87.0%, siguiendo la metodología descrita en la referencia [29]. Los datos espectroscópicos concuerdan con los ya publicados.

#### 3-Acetonitrilindol **8**



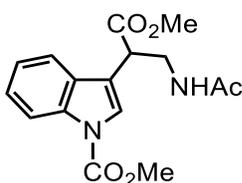
El compuesto **8** se obtuvo a partir de **7** como un aceite viscoso de color ámbar en un rendimiento del 77.8%, siguiendo la metodología descrita en la referencia [29]. Los datos espectroscópicos concuerdan con los ya publicados.

Acetato de 2-ciano-2-(1-metoxicarbonil-1*H*-indol-3-il)metilo **9**



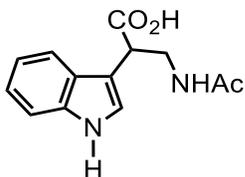
El compuesto **9** se obtuvo a partir de **8** como cristales incoloros en un rendimiento del 75.5%, siguiendo la metodología descrita en las referencias [28,29]. Los datos espectroscópicos concuerdan con los ya publicados.

Propionato de 3-acetamido-2-(1-metoxicarbonil-1*H*-indol-3-il)metilo **10**



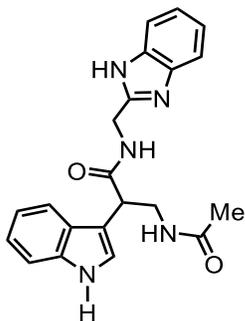
El compuesto **10** se obtuvo a partir de **9** como un sólido ligeramente amarillo en un rendimiento del 90.1%, siguiendo la metodología descrita en la referencia [28]. Los datos espectroscópicos concuerdan con los ya publicados.

Ácido 3-acetamido-2-(1*H*-indol-3-il)propanoico **4**



A un matraz de fondo redondo se le adicionó el propionato de 3-acetamido-2-(1-metoxicarbonil-1*H*-indol-3-il)metilo **10** (100 mg, 0.31 mmol) y se suspendió en una solución acuosa de MeOH al 75% (17 mL) con agitación mecánica continua a temperatura ambiente. Después, se adicionó a la suspensión K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en polvo (353 mg) y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h para dar una solución incolora. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó al vacío para dar un sólido blanquecino. El sólido se disolvió en agua (15 mL) y se acidificó con una solución de HCl 0.1N (en porciones de 1-2 mL y en intervalos de 2-3 minutos) hasta alcanzar un pH 2-3. La mezcla de reacción acidificada se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El residuo en forma de aceite amarillo se recrystalizó de AcOEt a temperatura ambiente para dar **10** en un rendimiento del 76% (58 mg, 0.23 mmol). Cristales ligeramente amarillos *pf* = 214-216 °C; *R<sub>f</sub>* = 0.30 (AcOEt/MeOH 9:1); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  = 3360, 3262, 1700, 1608 cm<sup>-1</sup>; EMIE (*m/z*): 246 (M<sup>+</sup>, 1), 202 (32), 143 (89), 130 (100); HRMS *m/z* calcd para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + Na: 269.0902; encontrado: 269.0901; rayos-X ver Tabla 1 en Anexo; RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C ver Tablas 2 y 3 en Anexo.

*N*-((1*H*-Benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)-3-acetamido-2-(1*H*-indol-3-il)propanamida **3**



La síntesis de la propanamida **3** se llevó a cabo como se muestra en el Esquema 4. A un matraz de dos bocas con refrigerante se le adicionó el ácido 3-acetamido-2-(1*H*-indol-3-il)propanoico **4** (100 mg, 0.40 mmol) en DMF (2 mL) se agitó por 20 min a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón para dar una solución ligeramente ámbar. Entonces se adicionó EDC **11** (101 mg, 0.52 mmol), seguido de HOBt **15** (55 mg, 0.40 mmol) bajo agitación y en intervalos de 20 min para dar una solución homogénea. A continuación se adicionó el 2-(aminometil)benzimidazol **5** (90 mg, 0.40 mmol) y  $N(\text{Et})_3$  (113  $\mu\text{L}$ , 0.81 mmol), la mezcla se mantuvo con agitación durante 4 h a temperatura ambiente formándose un precipitado blanco. La mezcla de reacción se llevó a sequedad con corriente de aire y el residuo se particionó entre AcOEt (10 mL) y agua (10 mL). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y concentraron al vacío. El residuo en forma de un aceite viscoso ligeramente marrón se purificó por CF utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt/MeOH 9:2 para dar **3** en un rendimiento del 78% (118 mg, 0.31 mmol). Sólido beige  $\text{pf} = 240\text{-}242\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0.62$  (AcOEt/MeOH 9:1); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}} = 3355, 1653\text{ cm}^{-1}$ ; EMIE ( $m/z$ ): 375 ( $\text{M}^+$ , 2), 119 (96), 93 (99), 63 (100); HRMS  $m/z$  calcd para  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2 + \text{H}^+$ : 376.1768; encontrado: 376.1779; RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  ver Tablas 2 y 3, en Anexo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barré-Sinoussi, F.; Ross, A.; Delfraissy, J. Past, present and future: 30 years of HIV research. Review article, *Nature Microbiology*, (2013) 11, 877-883.
- [2] *World Health Organization web site* (2013), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>
- [3] Sarafianos, S.; Marchand, B.; Himmel, D.; Parniak, M.; Hughes, S.; Arnold E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. Review article, *Journal of Molecular Biology*, (2010) 3, 693-713.
- [4] Craige, R.; Suzuki Y. The road to chromatin-nuclear entry of retroviruses. Review Article, *Nature Microbiology*, (2007) 5, 187-196.
- [5] Esposito, F.; Corona, A.; Tramontano, E. HIV-1 Reverse transcriptase still remains a new drug target: Structure, function, classical inhibitors, and new inhibitors with innovative mechanisms of actions. Review article, *Molecular Biology International* (2012) 2012, 1-23.
- [6] Shafer, R.W.; Dupnik, K.; Winters, M.A.; Eshleman, S.H. A guide to HIV-1 reverse transcriptase and protease sequencing for drug resistance studies, HIV-1 RT and protease sequencing for drug resistance studies. Review article, *HIV Sequence Database Compendium* (2001) 2001, 1-51.
- [7] Olivares, I.; Mulky, A.; Boross, P.; Tözsér, J.; Kappes, J.; López-Galíndez, C.; Menéndez-Arias, L. HIV-1 Protease dimer interface mutations that compensate for viral reverse transcriptase instability in infectious virions, *Journal of Molecular Biology* (2007) 2, 369-381.
- [8] Hughes, S. HIV dynamics and replication program. *National Cancer Institute web site* (2010). <http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/Hughes.html>
- [9] Arts, E.; Hazuda, D. HIV-1 Antiretroviral drug therapy, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (2012) 2, 1-24.

- [10] Zhan, P.; Chen, X.; Li, D.; Fang, Z.; De Clercq, E.; Liu, X. HIV-1 NNRTIs: Structural diversity, pharmacophore similarity, and implications for drug design. *Medicinal Research Reviews* (2013) 33, E1–E72.
- [11] de Béthune, M.P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989–2009). *Antiviral Research* (2010) 85, 75-90.
- [12] Kitchen, D.; Decornez, H.; Furr, J.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drugs discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* (2004) 3, 935-949.
- [13] Hehre, W. Spartan'14 for Windows, Macintosh, and Linux; Wavefunction, Inc.: A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations. *Wavefunction, Inc.* (1993). [http://www.wavefun.com/japan/products/books/AGuidetoMM\\_Cha1-2](http://www.wavefun.com/japan/products/books/AGuidetoMM_Cha1-2)  
<http://downloads.wavefun.com/Spartan14Manual>
- [14] Frisch, M.J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J.A., Jr.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.J.; Brothers, E.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J.M.; Klene, M.; Knox, J.E.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.G.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Farkas, Ö.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cioslowski, J.; Fox, D.J. Gaussian 09, Revision E.01. *Gaussian, Inc., Wallingford CT* (2009).

- [15] Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Journal of Chemical Physics* (1981) 55, 117-129.
- [16] Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *Journal of Chemical Physics* (1997) 107, 3210-3221.
- [17] Caricato, M.; Mennucci, B.; Tomasi, J.; Ingrosso, F.; Cammi, R.; Corni, S.; Scalmani, G. Formation and relaxation of excited states in solution: A new time dependent polarizable continuum model based on time dependent density functional theory. *Journal of Chemical Physics* (2006) 124, 520-532.
- [18] Scherer, G.; Kramer, M.L.; Schutkowski, M.; Reimer, U.; Fischer, G., Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society* (1998) 120, 5568-5574.
- [19] Schiene-Fischer, C.; Fischer, G. Direct measurement indicates a slow cis/trans isomerization at the secondary amide peptide bond of glycylglycine. *Journal of the American Chemical Society* (2001) 123, 6227-6231.
- [20] Li, P.; Chen, X.G.; Shulin, E.; Asher, S.A. UV resonance Raman ground and excited state studies of amide and peptide isomerization dynamics. *Journal of the American Chemical Society* (1997) 119, 1116-1120.
- [21] Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Autodock 4 and AutoDock Tools 4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* (2009) 16, 2785-2791.
- [22] Murugesu, S.; Chandler, S.; Penta, A. Structure-based virtual screening and docking studies for the identification of novel inhibitors against wild and drug resistance strains of HIV-1 RT. *Medical Chemistry Research* (2015) 24, 1869-1883.

- [23] RCSB: Protein Data Bank web site (1998). <http://www.rcsb.org/pdb/explore/-explore.do?structureId=1klm>
- [24] Wolber, G.; Langer, T. LigandScout: 3D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of Chemical Information and Modeling* (2005) 45, 160-169.
- [25] Miller, A.; Martin, S.F. Concise, enantioselective total synthesis of (-)-alstonerine. *Organic Letters* (2007) 9, 1113-1116.
- [26] Salahuddin, M.S.; Avijit, M. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry* (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017>
- [27] Takashiro, E.; Hayakawa I.; Nitta T.; Kasuya A.; Miyamoto S.; Ozawa Y.; Yagi, R.; Yamamoto, I.; Shibayama, T.; Nakagawa, A.; Yabe Y. Structure-activity relationship of HIV-1 protease inhibitors containing  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amino acids. Detailed study of P<sub>1</sub> site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999) 7, 2063-2072.
- [28] Joseph-Nathan, P.; Morales-Ríos, M.S. *United States Patent* No. 4,803,284; Feb. 7, 1989.
- [29] Morales-Ríos, M.S.; Joseph-Nathan, P. NMR studies of indoles and their *N*-carboalkoxy derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* (1987) 25, 911-918.
- [30] Joesten, M.D.; Schaad, L.J. Hydrogen Bonding. *Marcel Dekker, New York* (1974) VI, 622 S.
- [31] Leutwyler, S.; Klopper, W. Strong N-H $\cdots\pi$  hydrogen bonding in amide-benzene interactions. *The Journal of Physical Chemistry B* (2009) 113, 2937-2943.
- [32] (a) Deshiraju-Angew, G.R. A Bond by any other name. *Chemie International Edition* (2011) 50, 52-59; (b) Arunan, E.; Desiraju, G.R.; Klein, R.A.; Sadlej, J.; Scheiner, S.; Alkorta, I.; Clary, D.C.; Crabtree, R.H.; Dannenberg, J.J.; Hobza, P.; Kjaergaard, H.G.;

- Legon, A.C.; Mennucci, B.; Nesbitt, D.J. Defining the hydrogen bond: An account (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* (2011) 86, 1619-1636.
- [33] Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Review* (2009) 38, 606-631.
- [34] Pattabiraman, V.R.; Bode, J.W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature*, (2011) 480, 471-479.
- [35] Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* (2005) 61, 10827-10852.
- [36] Alkorta, I.; Elguero, G. A theoretical study on the tautomerism of C-carboxylic and methoxycarbonyl substituted azoles. *Structural Chemistry* (2005) 16, 507-514.
- [37] Sridharan, V.; Saravanan, S. Muthusubramanian, S.; Sivasubramanian, S. NMR investigation of hydrogen bonding and 1,3-tautomerism in 2-(2-hydroxy-5-substituted-aryl) benzimidazoles. *Magnetic Resonance in Chemistry* (2005) 43, 551-556.

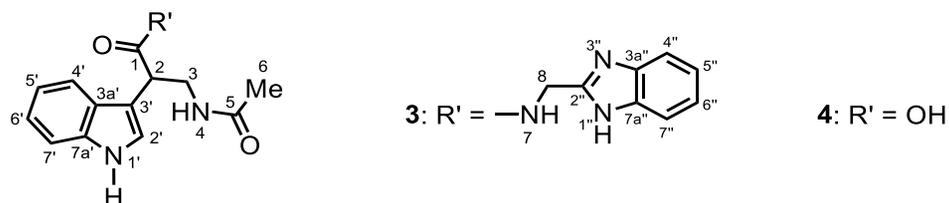
**9. ANEXO**

	<i>Página</i>
<b>9.1</b> Tablas y espectros	54
Tabla 1. Datos de rayos-X del $\beta$ -aminácido <b>4</b>	55
Tabla 2. Datos de RMN $^1\text{H}$ de la propanamida <b>3</b> y del $\beta$ -aminácido <b>4</b>	56
Tabla 3. Datos de RMN $^{13}\text{C}$ de la propanamida <b>3</b> y del $\beta$ -aminácido <b>4</b>	58
Figura 1. Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la propanamida <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	60
Figura 2. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la propanamida <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	61
Figura 3. Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la propanamida <b>3</b> ( $\text{DMSO-}d_6$ )	62
Figura 4. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la propanamida <b>3</b> ( $\text{DMSO-}d_6$ )	63
Figura 5. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del $\beta$ -aminácido <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	64
Figura 6. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del $\beta$ -aminácido <b>4</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	65
Figura 7. Espectro de RMN $^1\text{H}$ del $\beta$ -aminácido <b>4</b> ( $\text{DMSO-}d_6$ )	66
Figura 8. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del $\beta$ -aminácido <b>4</b> ( $\text{DMSO-}d_6$ )	67

**Tabla 1.** Datos del cristal y detalles relacionados con la colección y refinamiento de la estructura obtenida por difracción de rayos-X del  $\beta$ -aminácido **4**

<b>4</b>	
Fórmula	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<i>T</i> (K)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.30x0.28x0.28
Sistema cristalino	ortorrómbico
Grupo espacial	Pna2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	14.884(15)
<i>b</i> (Å)	8.521(8)
<i>c</i> (Å)	9.693(10)
$\alpha$ (°)	90
$\beta$ (°)	90
$\gamma$ (°)	90
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1229(2)
<i>D</i> <sub>calc</sub> (mg mm <sup>-3</sup> )	1.331
<i>Z</i>	4
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0.096
$\theta_{\text{range}}$ (°)	2.75-29.24
Refl. totales	19453
Refl. únicas	1722
<i>R</i> <sub>int</sub>	0.0255
Refl. observadas	1459
Param. refinados	185
<i>R</i> (%), <i>R</i> <sub>w</sub> (%)	4.4, 10.8
<i>e</i> <sub>max</sub> (eÅ <sup>-3</sup> )	-0.219

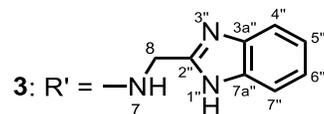
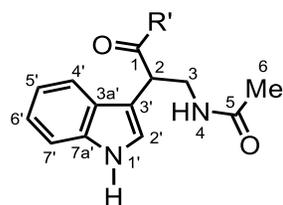
**Tabla 2.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  de la propanamida **3** y del  $\beta$ -aminácido **4** ( $\delta$  en ppm;  $J$  en Hz)



			$\text{H}_X\text{-2}$	$\text{H}_A\text{-3}$	$\text{H}_B\text{-3}$	$\text{NH}_M\text{-4}$	$\text{H-2}'$	$\text{H-4}'$	$\text{H-5}'$	$\text{H-6}'$	$\text{H-7}'$
<b>3</b>	$\text{CD}_3\text{OD}$	$\delta$	4.15 dd	3.82 dd	3.70 dd	-	7.23 s	7.64 da	7.09 ddd	6.97 ddd	7.34 da
		$J$	8.0, 6.4	13.2, 8.1	13.2, 6.4	-	-	8.1	8.1, 7.0, 1.2	8.1, 7.0, 1.2	8.1
<b>3</b>	$\text{DMSO-}d_6$	$\delta$	4.02 dd	3.67 m <sup>a</sup>	3.50 m <sup>a</sup>	8.25 ta <sup>b</sup>	7.23 d	7.69 da	6.97 td <sup>b</sup>	7.06 td <sup>b</sup>	7.33 da
		$J$	9.2, 5.3	-	-	5.3	2.3	7.9	7.5, 1.0	7.6, 1.2	7.9
<b>4</b>	$\text{CD}_3\text{OD}$	$\delta$	4.16 dd	3.76 dd	3.62 dd	-	7.17 s	7.66 da	7.01 ddd	7.10 ddd	7.34 da
		$J$	8.4, 6.5	13.4, 8.6	13.4, 6.5	-	-	8.2	8.1, 7.0, 1.2	8.1, 7.0, 1.2	8.2
<b>4</b>	$\text{DMSO-}d_6$	$\delta$	3.97 dd	3.57 m <sup>a</sup>	_a	8.04 ta <sup>b</sup>	7.20 d	7.62 da	6.99 td <sup>b</sup>	7.08 td <sup>b</sup>	7.35 da
		$J$	8.8, 6.5	-	-	5.3	2.3	7.6	7.0, 1.2	7.0, 1.2	8.2

Continúa.....

**Tabla 2.** (continuación)



**4:** R' = OH

			NH <sub>X</sub> -7	H <sub>A</sub> -8	H <sub>B</sub> -8	H-4''	H-7''	H-5''	H-6''
<b>3</b>	CD <sub>3</sub> OD	$\delta$	-	4.71 d	4.47 d	7.20 m		7.50 m	
		$J$	-	15.8	15.8				
<b>3</b>	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	$\delta$	8.74 ta <sup>b</sup>	4.62 dd	4.37 dd	7.16 a	7.14 a	7.47 a	7.53 a
		$J$	5.6	15.8, 6.2	15.8, 5.0	-	-	-	-

<sup>a</sup> Señal oscurecida o parcialmente oscurecida por la humedad del disolvente.

<sup>b</sup> Multiplicidad aparente.

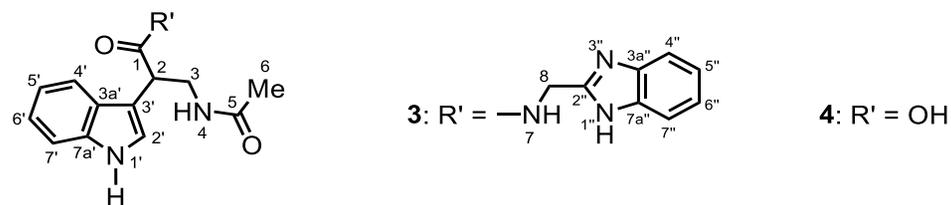
**3**  $\delta$  (CD<sub>3</sub>OD): 1.87 (3H, s, Me).

**3**  $\delta$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.14 (1H, a, NH-1''), 10.94 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, NH-1'), 1.81 (3H, s, Me).

**4**  $\delta$  (CD<sub>3</sub>OD): 1.89 (3H, s, Me).

**4**  $\delta$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.99 (1H, sa, NH-1'), 1.78 (3H, s, Me).

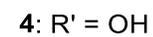
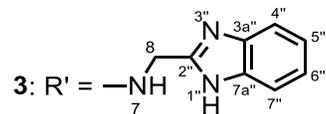
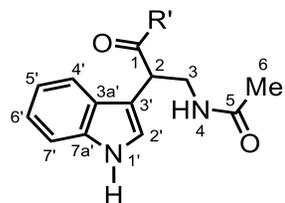
**Tabla 3.** Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de la propanamida **3** y del  $\beta$ -aminácido **4** ( $\delta$  en ppm)



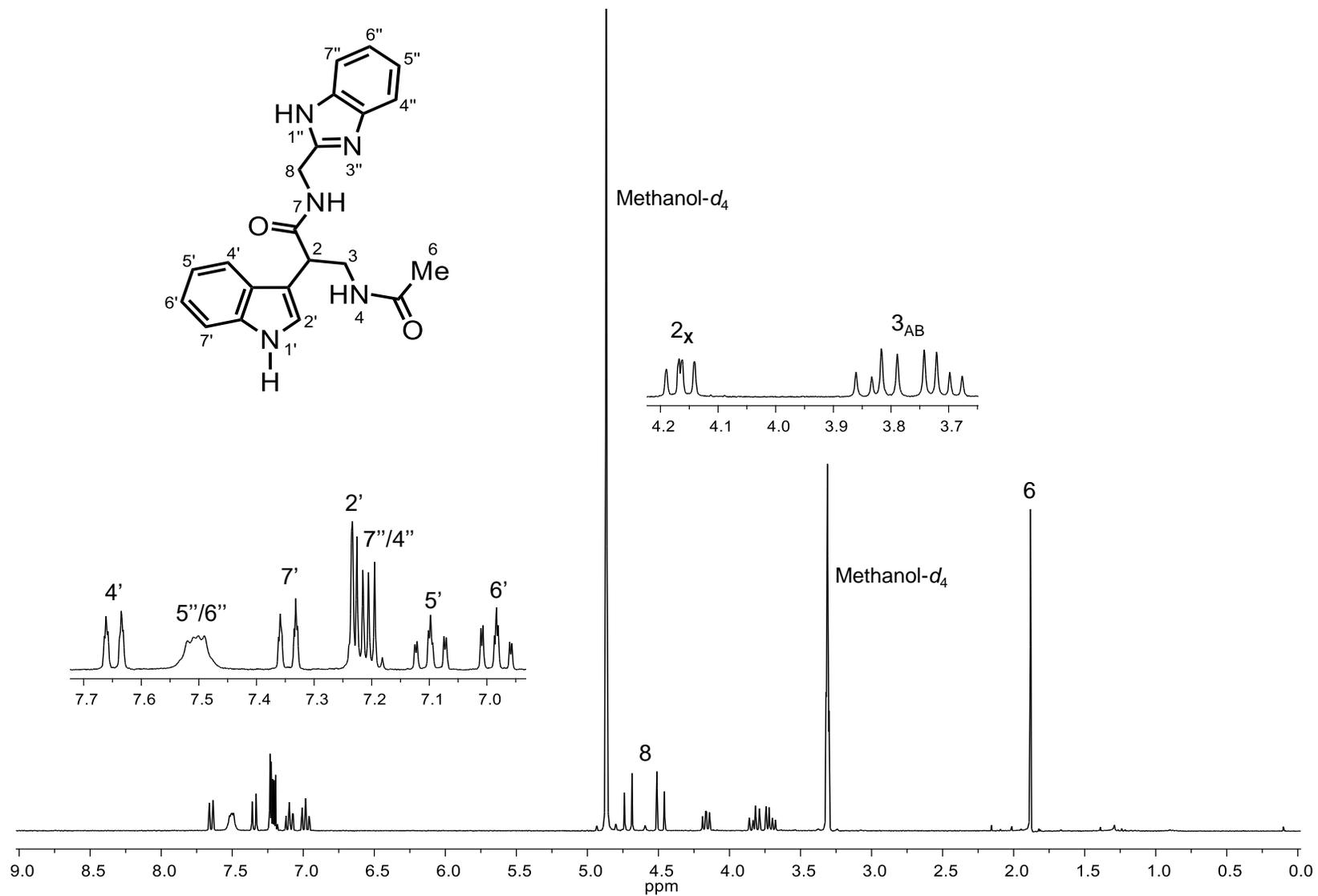
			C-1	C-2	C-3	C-5	C-6	C-2'	C-3'	C-3a'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'	C-7a'
<b>3</b>	$\text{CD}_3\text{OD}$	$\delta$	176.0	45.0	43.2	173.6	22.6	124.1	112.2	127.9	119.6	120.1	122.7	112.4	138.1
	$\text{DMSO-}d_6$	$\delta$	172.9	43.4	41.7	169.7	22.7	122.9	111.4	126.6	118.8	118.5	121.1	111.4	136.1
<b>4</b>	$\text{CD}_3\text{OD}$	$\delta$	176.8	44.0	43.2	173.6	22.5	123.8	111.7	127.9	119.7	120.0	122.6	112.4	138.1
	$\text{DMSO-}d_6$	$\delta$	174.3	42.7	41.3	169.6	22.6	122.9	110.6	126.4	118.6	118.7	121.2	111.6	136.2

Continúa .....

**Tabla 3.** (continuación)



			C-8	C-2''	C-3a''	C-7a''	C-4''	C-7''	C-5''	C-6''
<b>3</b>	CD <sub>3</sub> OD	$\delta$	38.5	153.3	139.4 a		123.6		115.8 a	
	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	$\delta$	37.3	152.4	143.0 a	134.2 a	122.0 a	121.2 a	111.3 a	118.3 a



**Figura 1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la propanamida **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

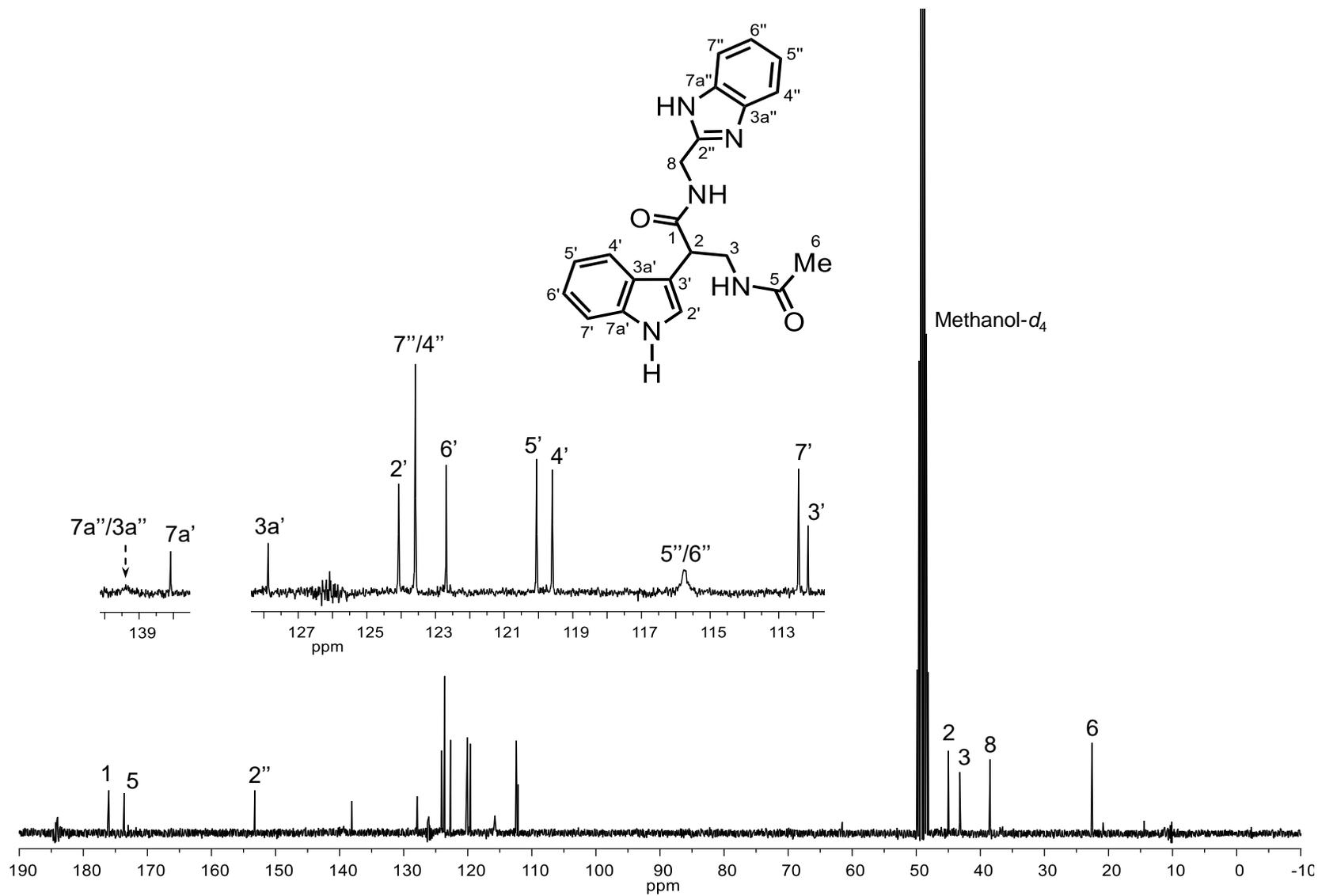
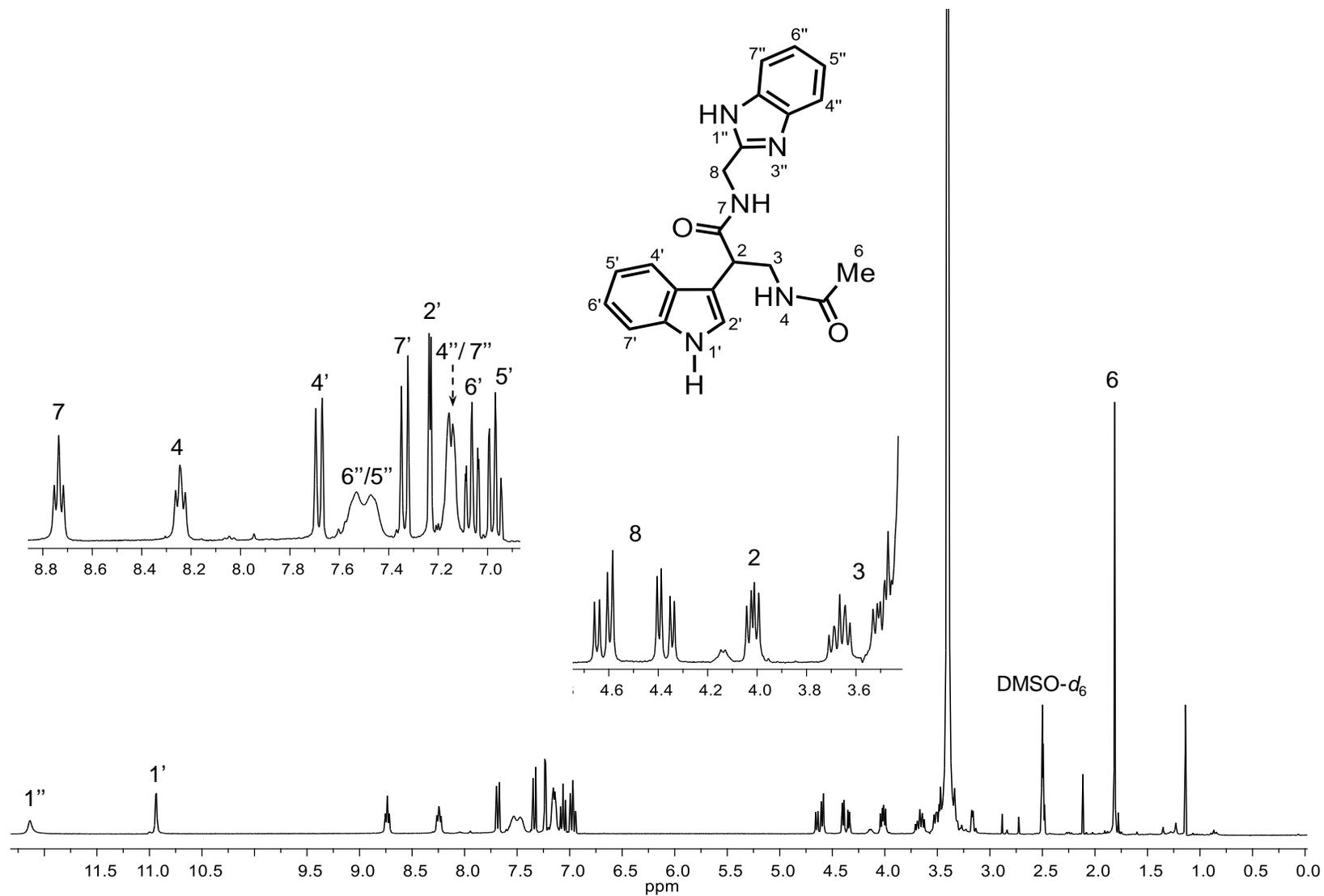


Figura 2. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la propanamida 3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Figura 3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la propanamida **3** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

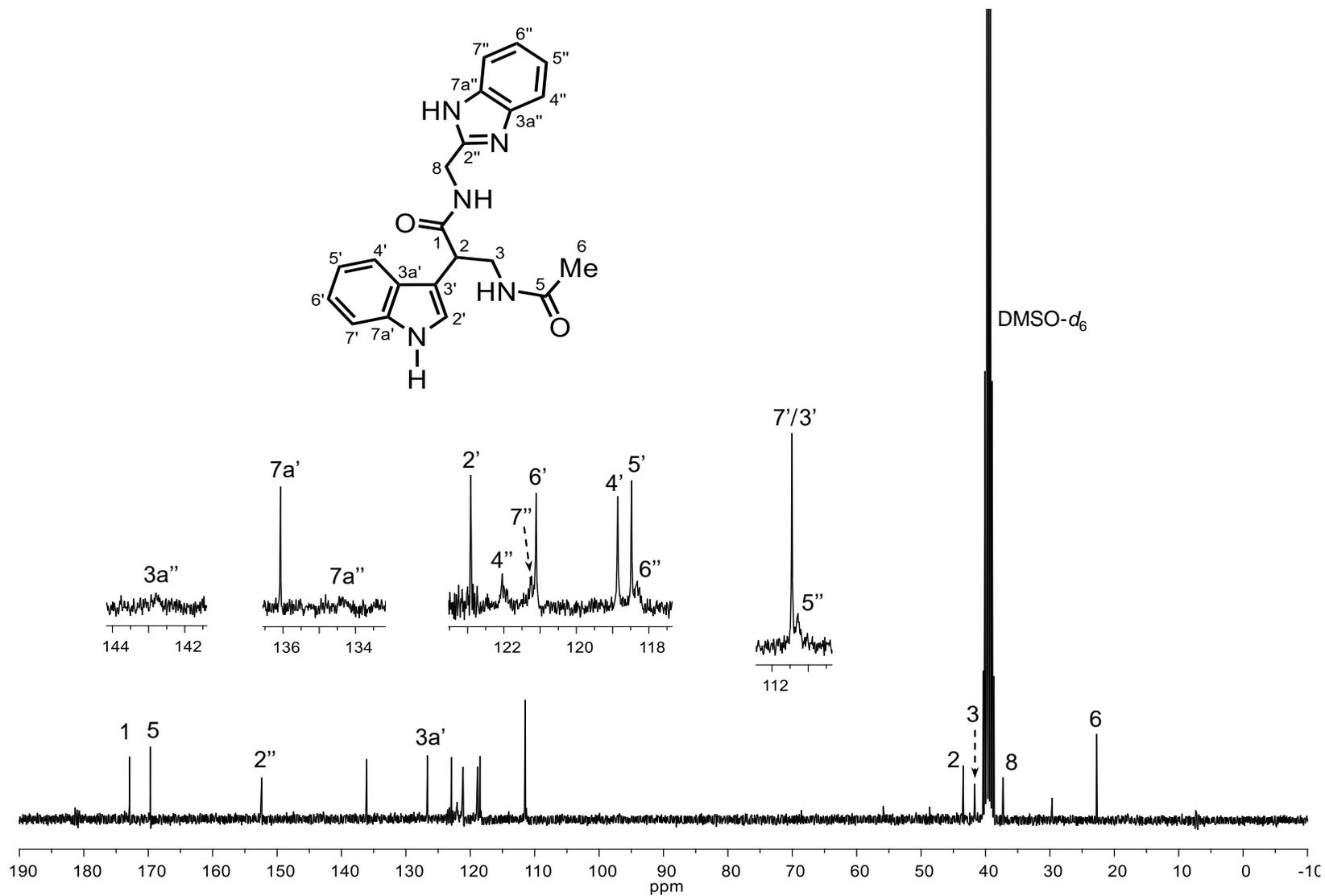
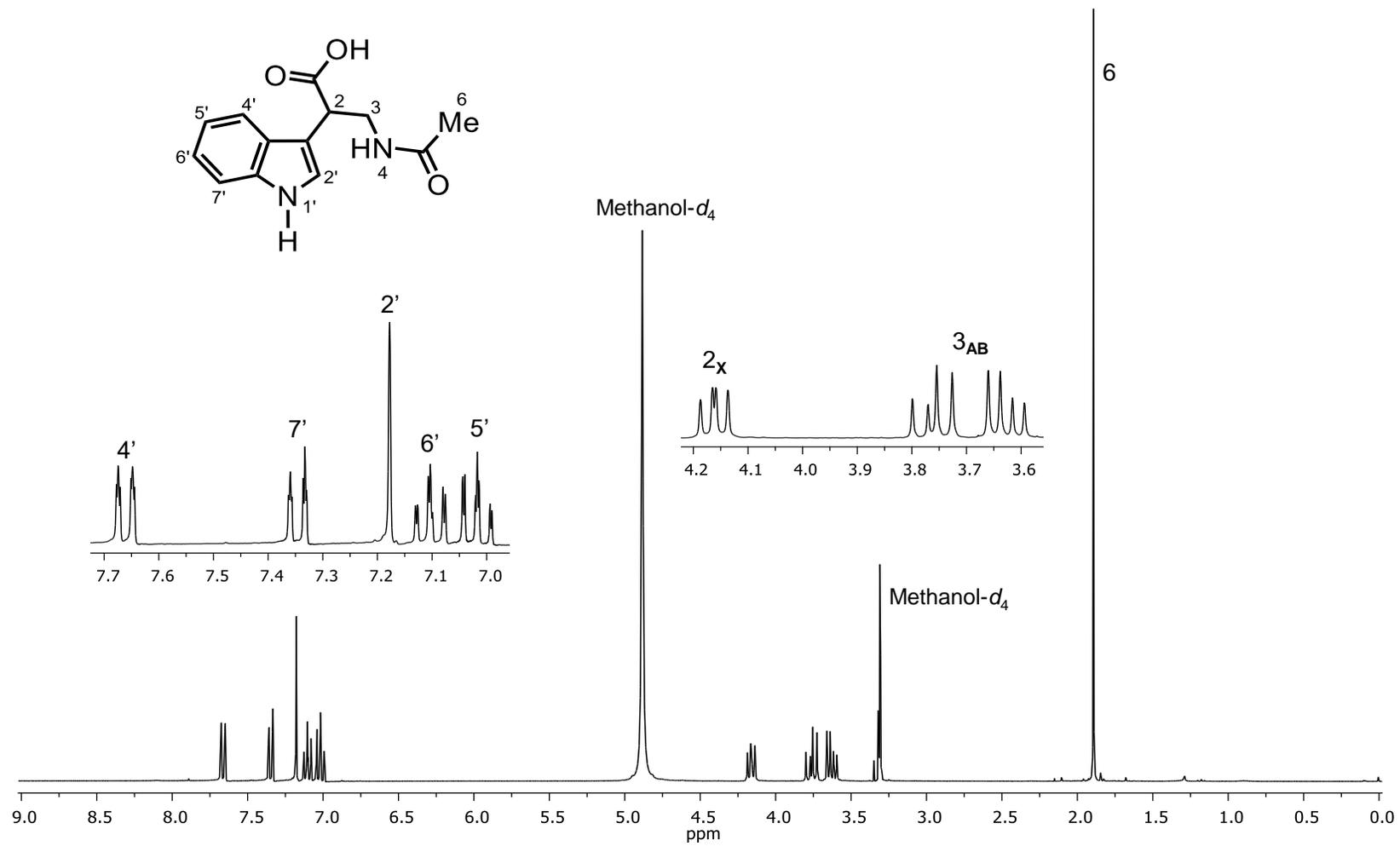
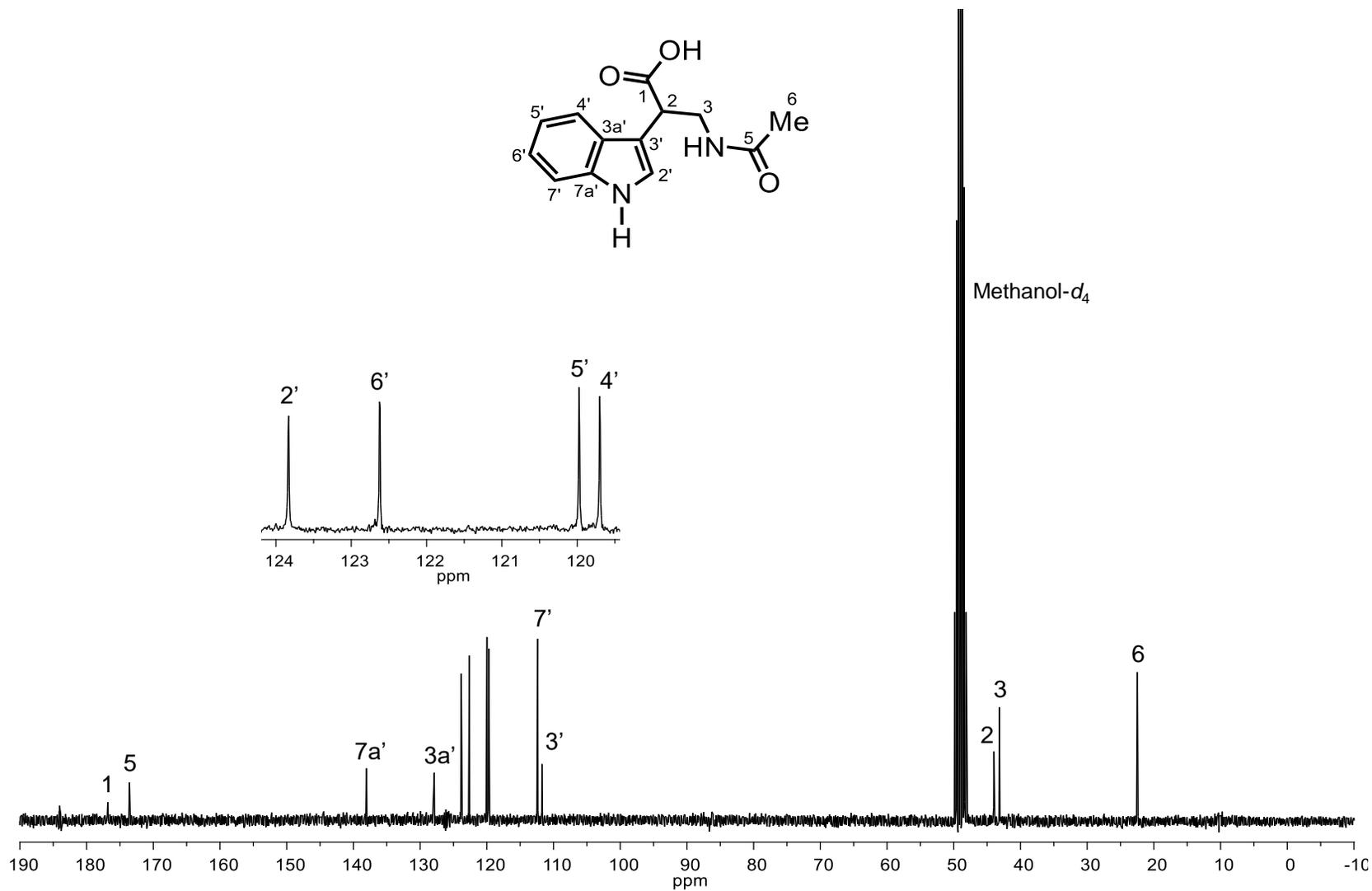


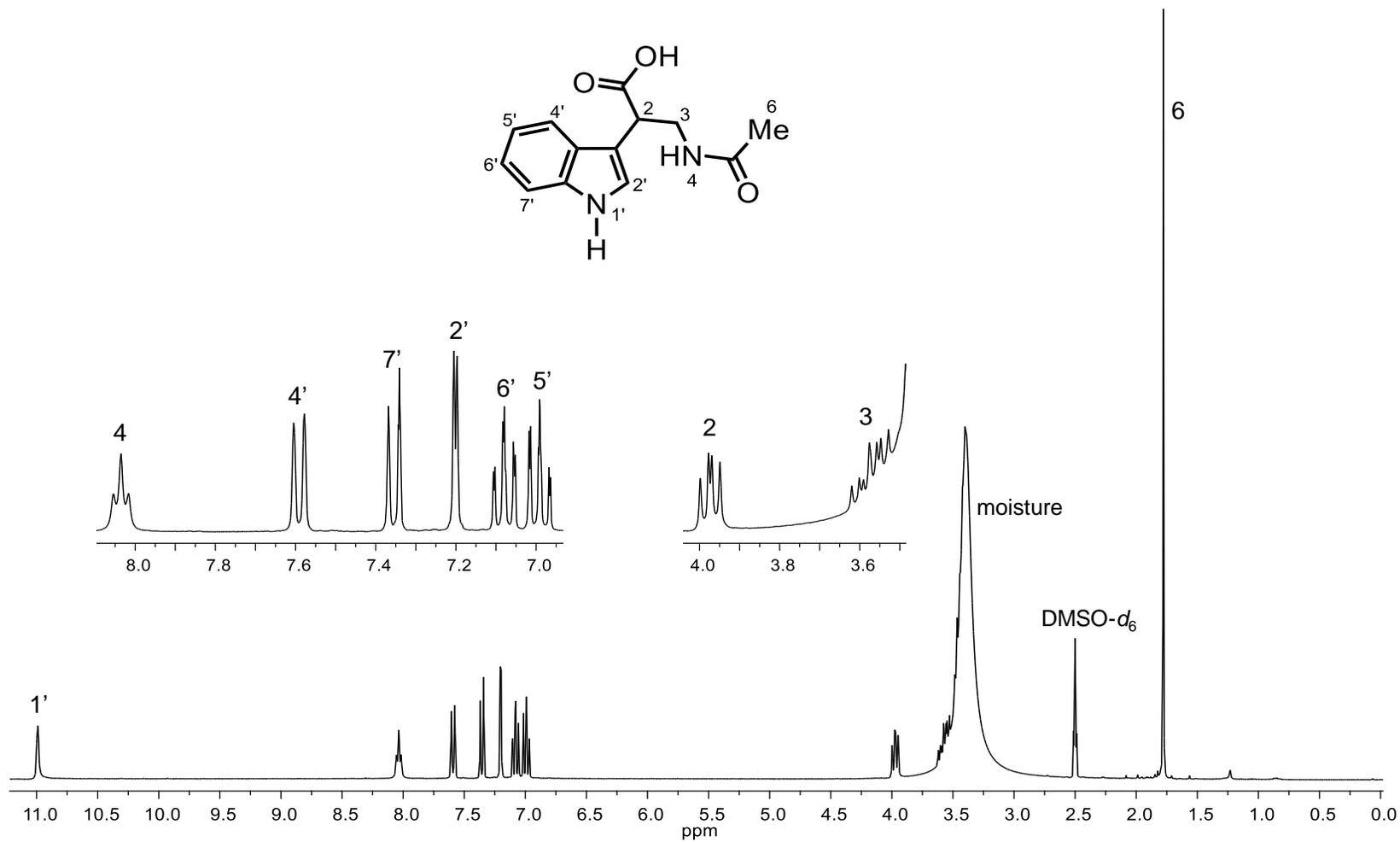
Figura 4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la propanamida 3 ( $\text{DMSO-}d_6$ )



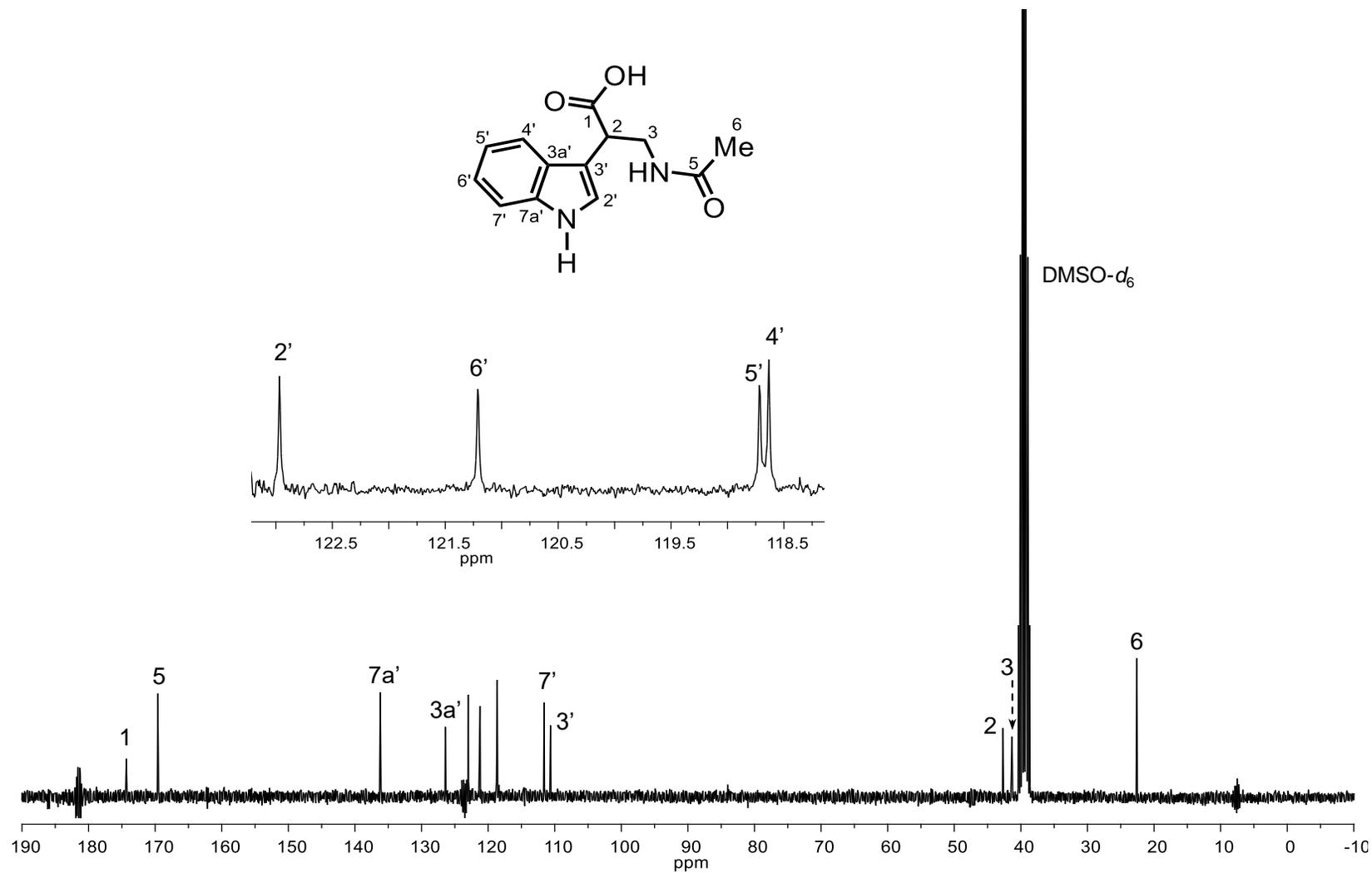
**Figura 5.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del  $\beta$ -aminoácido **4** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Figura 6.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del  $\beta$ -aminoácido 4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Figura 7.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del  $\beta$ -aminoácido **4** ( $\text{DMSO-}d_6$ )



**Figura 8.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del  $\beta$ -aminoácido **4** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

