

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**ESTUDIO IN SILICO BASADO EN FRAGMENTOS DEL
ANDAMIO DE ESPIROOXINDOL Y SU ANÁLISIS COMO
INHIBIDOR DE LA BETA-SECRETASA (BACE1)**

TESIS

Que presenta:

Q. F. I. Omar Jesús Zúñiga Olvera

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en la Especialidad de Farmacología

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 30 del 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 (smorales@cinvestav.mx), en el marco del Programa de Posgrado de Farmacología, con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro: CVU 967036.

Parte de los resultados de esta tesis se presentaron en un congreso internacional y un congreso nacional:

“In silico fragment-based studies of spirooxindoles as inhibitors of β -secretase (BACE1)”

XXVI EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, September 7-11, 2020 and EFMC-YMCS, Virtual Poster Session, September 9, 2020.

Omar J. Zúñiga-Olvera, Luis G. Hernández-Vázquez, Gelacio Martínez-Gudiño, Joel Trujillo-Serrato, Martha S. Morales-Ríos.

Book of Abstracts, Abstract number P010.

“Uso del modelado molecular para desarrollar un nuevo andamiaje oxindólico como posible inhibidor de la β -secretasa (BACE1)”

VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada, UANL, Webinar octubre 1 y 2, 2020.

Omar J. Zúñiga-Olvera, Gelacio Martínez-Gudiño, Martha S. Morales-Ríos

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo hubiese sido imposible sin el apoyo brindado de muchas personas. Por ello, es para mí grato utilizar este espacio para expresarles mis más sinceros agradecimientos.

Debo agradecer de manera especial a la Dra. Martha Sonia Morales Ríos por permitirme ser su alumno y emprender este reto bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como persona.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio 30 del Departamento de Química. A Nadia Azucena Pérez Rojas por su disposición y apoyo incondicional; a Joel de Jesús Trujillo Serrato por su paciencia y sabiduría brindada durante la síntesis química; a Elvia Celina Álvarez Cisneros por su colaboración en mi trabajo; a mis compañeros Claudia Cahuantzi Tamalatzí, Brenda Fernanda Chávez Shan y Gelacio Martínez Gudiño por sus consejos y ayuda en las dificultades que se me presentaron y sobre todo por los momentos de alegría que compartimos.

Quiero expresar también un agradecimiento al Dr. Jesús Armando Luján Montelongo por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis, su participación enriqueció el trabajo realizado; al Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza por su interés en mi trabajo y apoyo durante la realización del mismo.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo es para mis padres, Alberto y Angélica, por su esfuerzo y tenacidad durante toda mi vida, por forjarme como la persona que soy en la actualidad, ustedes son y serán mi principal fuente de apoyo; a mi hermana Dulce por su confianza y alegría que siempre me acompañan. A ustedes dedico este trabajo, son mi principal motivación.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Química Medicinal	1
1.1.1 Diseño racional de fármacos	2
1.1.2 Importancia de la estereoquímica en química medicinal	4
1.2 Enfermedad de Alzheimer	6
1.2.1 Fármacos modificadores de los síntomas y fármacos modificadores de la enfermedad.....	7
1.2.2 Hipótesis β -amiloide	7
1.2.3 β -Secretasa (BACE1)	9
1.2.4 Avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer.....	11
1.3 Descubrimiento de Fármacos Basado en Fragmentos (FBDD)	12
1.3.1 Vinculación de fragmentos con potencial inhibidor contra BACE1	13
1.4 Métodos de Síntesis de Oxindoles y Sistemas Espirocíclicos.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo General	17
2.1.1 Objetivos particulares	17

3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 Métodos Computacionales	19
5.1.1 Modelado molecular de los espirooxindoles <i>anti/syn</i> 1-3	19
5.1.2 Docking molecular de los espirooxindoles <i>anti/syn</i> 1-3 en el sitio activo de BACE1	22
5.1.2.1 Análisis estructural de las interacciones BACE1/ 1-3	28
5.1.2.2 Lanabecestat [®] , un inhibidor de BACE1	41
5.1.2.3 Energía de unión de BACE1/ 1-3 vs. BACE1/Lanabecestat [®]	42
5.1.3 Predicción de propiedades ADME <i>in silico</i> de los espirooxindoles <i>anti/syn</i> 1-3	46
5.1.3.1 Predicción de la permeabilidad hematoencefálica.....	49
5.1.3.2 Predicción del comportamiento metabólico.....	51
5.2 Síntesis Química	53
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	56
7. METODOLOGÍA GENERAL	56
7.1 Métodos Computacionales	56
7.1.1 Análisis conformacional	57
7.1.1.1 Optimización geométrica.....	57
7.1.2 Docking molecular.....	57

7.1.2.1	Metodología para la ejecución del programa	
	AutoDockTools.....	57
7.2	Determinación de Propiedades Farmacocinéticas.....	58
7.3	Síntesis Química	58
8.	BIBLIOGRAFÍA	61

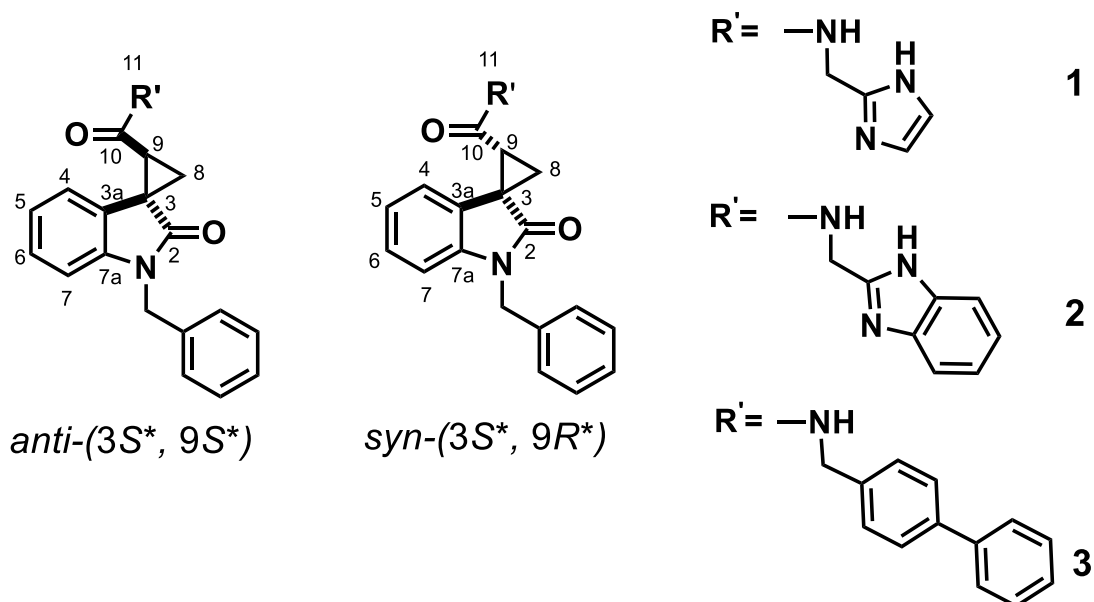
ABREVIATURAS

Å	Angstrom
Aβ	Beta amiloide
Aβ42	Péptido beta amiloide de 42 residuos de aminoácidos
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADME	Adsorción, distribución, metabolismo y excreción
APP	Proteína precursora amiloide
APOE	Apolipoproteína E
BACE1	β -Secretasa
BBB	Barrera hematoencefálica
(C₆H₅)CH₂Br	Bromuro de bencilo
C99	Fragmento carbonilo terminal de APP
Da	Dalton
DFT	Teoría del funcionales de la densidad
ΔG	Energía libre de Gibbs/ Energía de unión
DMT	Tratamiento farmacológico modificador de la enfermedad
EA	Enfermedad de Alzheimer
E_{rel}	Energía relativa
FBDD	Descubrimiento de fármacos basado en fragmentos
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico

HCOH	Formaldehído
KCN	Cianuro de potasio
Log P	Coeficiente de partición octanol-agua
MeI	Yoduro de metilo
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de sodio
NH(Et)₂	Dietilamina
PDB	Base de datos de proteínas
PSEN 1/2	Presinilina 1 y 2
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
sAPPβ	Péptido soluble APP β
SPE	Single point energy
t. a.	Temperatura ambiente
TPSA	Área topológica de superficie polar
THF	Tetrahidrofurano

RESUMEN

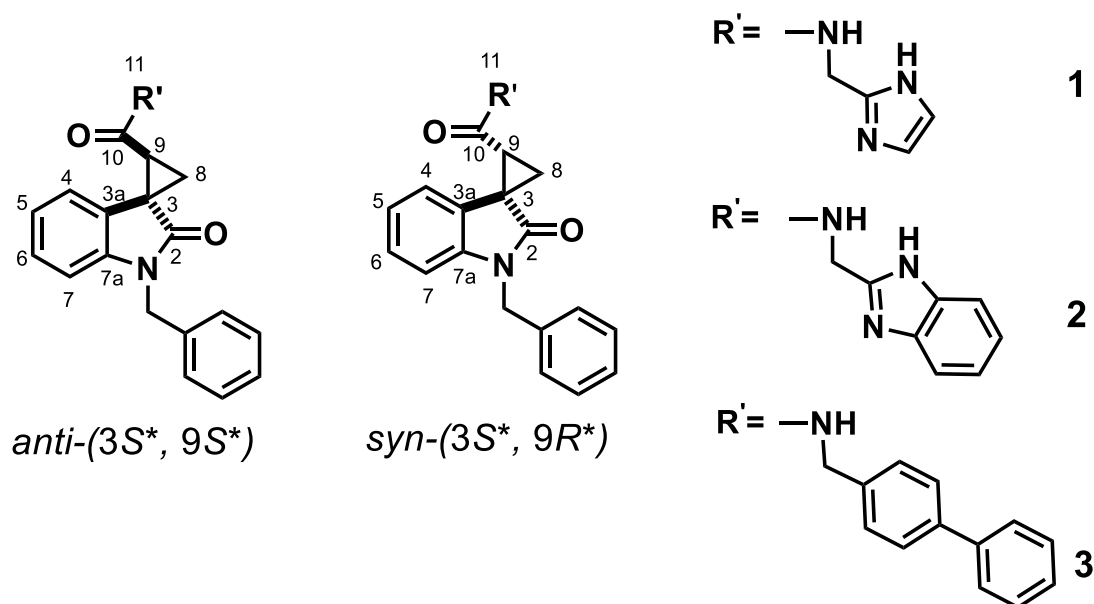
La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más común de trastorno neurodegenerativo, principalmente en edades avanzadas. Es responsable de alrededor del 60-70% de los casos de demencia en todo el mundo y afecta a más de 30 millones de personas. Un rasgo distintivo de esta enfermedad es la presencia de "placas" amiloides extracelulares, compuestas principalmente por fragmentos proteolíticos de la proteína precursora amiloide (APP). En los últimos 20 años, una intensa investigación se ha centrado en la creación de inhibidores de la β -secretasa (BACE1), una aspartil proteasa transmembranal que escinde la APP en el sitio β , como una estrategia importante para la intervención farmacológica en la EA. El objetivo de este estudio es construir ligandos como inhibidores contra BACE1 a partir de pequeños fragmentos y predecir con precisión sus modos de unión. La investigación involucró varios métodos de cribado computacional que se aplicaron a una serie de compuestos espirooxindólicos **1**, **2** y **3** unidos a fragmentos de aminas selectas (Esquema i).



Esquema i. Estructura de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of neurodegenerative disorder, in elderly people mainly. AD is responsible for around 60-70% of dementia cases worldwide and affects more than 30 million people. A distinctive feature of this disease is the presence of extracellular amyloid "plaques", composed by proteolytic fragments of the amyloid precursor protein (APP) mainly. In the last 20 years, intensive research has focused on the development of inhibitors of β -secretase (BACE1), a transmembrane aspartyl protease that cleaves APP at the β site, as an important strategy for pharmacological intervention in AD. The aim of this study is to construct ligands as inhibitors against BACE1 from small fragments and to accurately predict their binding modes. The research involved several computational screening methods that were applied to a series of spirooxindolic compounds **1**, **2** and **3** bound to fragments of selected amines (Scheme i).



Scheme i. Structure of *anti/syn* spirooxindoles **1-3**.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Química Medicinal

La química medicinal es una ciencia interdisciplinaria que cubre un campo particularmente amplio, teniendo como centro a la química orgánica. Por su parte la química orgánica se relaciona con las ciencias de la vida, tales como la bioquímica, la farmacología, la biología molecular, la genética, la inmunología y toxicología; por otro lado, también se conecta con disciplinas basadas en áreas fundamentales de la química como lo es la fisicoquímica, cristalografía, espectroscopía y técnicas de simulación basadas en computadora, análisis de datos y visualización de datos [1].

Aunque el término específico "química medicinal" fue establecido recientemente, la gente en la antigüedad sabía que ciertas plantas (que ahora sabemos que contienen productos naturales con propiedades medicinales) tenían efectos terapéuticos sin ninguna explicación aparente. Por ejemplo, el uso de opio por los sumerios se remonta a alrededor de 2100 a. C [1]. Es después de la Segunda Guerra Mundial cuando se desarrolló el concepto de química medicinal debido a que la comprensión de la farmacología a nivel molecular hizo posible racionalizar la actividad biológica de un compuesto [1].

De manera formal, la química medicinal se refiere al descubrimiento, identificación, desarrollo e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular. Aunque da mayor énfasis en el desarrollo de medicamentos, el interés de la química medicinal no es restricta y se extiende también a compuestos bioactivos en general [2].

La química medicinal de hoy en día se enfoca también en mejorar los productos farmacéuticos ya existentes. Esto se logra optimizando la estructura de moléculas bioactivas y, por lo tanto, sus propiedades para mejorar sus interacciones con sus blancos terapéuticos, así como su metabolismo y toxicidad para crear medicamentos que sean selectivos y tengan efectos secundarios limitados [2].

Los desafíos en la química medicinal siguen siendo grandes. Sin embargo, al ritmo que los avances tecnológicos actuales aumentan y nuestro conocimiento de la

química y la biología se expande, se anticipa que se tendrá la posibilidad de crear nuevos y mejores medicamentos [2].

1.1.1 Diseño racional de fármacos

La mayoría de los medicamentos que están en uso clínico son el resultado de un proceso de investigación muy complejo. Por lo mismo, es necesaria la unión de esfuerzos de diferentes disciplinas científicas para descubrir y desarrollar medicamentos con efectos clínicos benéficos y efectos secundarios mínimos [3].

El proceso comienza con la investigación sobre las causas de una enfermedad, que en algunos casos puede llevar a la identificación de uno o varios blancos terapéuticos asociados con esa enfermedad. Los pasos siguientes involucran la identificación de compuestos activos con el blanco terapéutico y la optimización de su actividad biológica. Estos ensayos se hacen *in vitro* con los blancos terapéuticos, comúnmente una proteína o enzima que fue aislada a partir de células. Los compuestos activos se someten a varias evaluaciones experimentales que implican ensayos en líneas celulares, en animales y pruebas clínicas en humanos. Los compuestos que pasan satisfactoriamente por todas las etapas son aprobados para uso clínico por un agente regulatorio (Figura 1) [3].

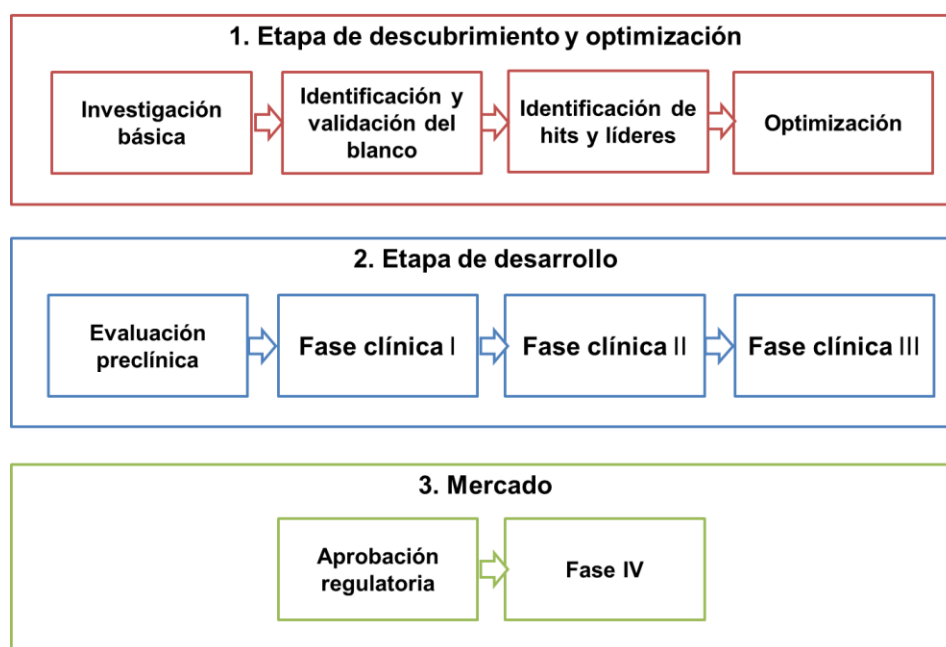


Figura 1. Etapas principales en el desarrollo de un medicamento.

En el desarrollo de nuevos fármacos, las moléculas que muestran actividad biológica sobre un blanco terapéutico o que muestran actividad biológica en un ensayo de tamizaje son llamadas *hits*. A continuación, se desarrollan nuevos compuestos a partir de estos precursores (*hits*) que buscan tener propiedades farmacéuticas atractivas, como lo son: baja toxicidad, solubilidad acuosa adecuada para administrarse por vía oral, buena absorción gastrointestinal, un metabolismo de primer paso reducido, así como una buena biodisponibilidad. Tales compuestos son llamados líderes o cabezas de serie [4]. Considerando que el número de moléculas orgánicas que son sintéticamente factibles se encuentran entre 10^{20} y 10^{60} , es evidente que su análisis sería muy complejo sin el uso de técnicas computacionales [5]. En años recientes los métodos computacionales (también llamados *in silico*) están ganando cada vez más importancia en el descubrimiento de nuevos fármacos ya que su aplicación permite realizar estimaciones confiables que disminuyen el tiempo y los costos de desarrollo. Simultáneamente, las metodologías *in silico* se han convertido en una parte crucial del proceso interdisciplinario en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, permitiendo profundizar en los fenómenos de reconocimiento molecular [6].

La disponibilidad de estructuras experimentales tridimensionales (3D) de complejos ligando-enzima es de gran importancia en la identificación, síntesis y desarrollo de nuevos compuestos químicos que sean adecuados para el uso terapéutico. Esta información experimental 3D se obtiene generalmente de la cristalografía de rayos X y espectroscopía de RMN. Las estructuras 3D de los modos de unión ligando-enzima permiten apreciar de forma visual los espacios donde se unen las moléculas activas, ya sea al sitio activo u ortostérico, o bien a otra parte de la superficie de la proteína o sitio alostérico. Además, proporcionan información detallada acerca de las interacciones específicas que guían el reconocimiento molecular y finalmente, permiten evaluar el efecto que las modificaciones estructurales del ligando pudiesen ejercer sobre la afinidad de unión a la diana seleccionada, situación que es de especial relevancia en la fase de optimización de un compuesto líder [7].

El descubrimiento de fármacos se ha beneficiado también con la disponibilidad de colecciones de moléculas (quimiotecas) y fragmentos moleculares que hacen

posible la exploración, mediante algoritmos de acoplamiento docking, que implica la predicción de la conformación y orientación del ligando dentro de un sitio de unión dirigido en un blanco terapéutico. De este modo, el cribado virtual (*in silico*) se puede utilizar para identificar y priorizar listas de moléculas candidatas para su posterior estudio experimental, y también para generar ideas que conduzcan al diseño de nuevas entidades químicas con potencial farmacológico [8].

1.1.2 Importancia de la estereoquímica en química medicinal

La quiralidad se define formalmente como la propiedad geométrica de un objeto rígido (como una molécula o fármaco) de no ser superponible con su imagen especular. Las dos imágenes especulares de una molécula quiral son denominados enantiómeros. Un racemato o mezcla racémica es una mezcla de cantidades iguales de ambos enantiómeros de un fármaco quiral [9].

La importancia de la estereoquímica en el desarrollo de medicamentos es relevante en la práctica médica. Aproximadamente el 50% de los medicamentos comercializados son quirales, y de estos aproximadamente el 50% son mezclas de enantiómeros en lugar de enantiómeros individuales [9]. Es crítico distinguir el enantiómero único de la forma racémica porque pueden diferir en su dosis, eficacia, biodisponibilidad, metabolismo, efectos secundarios o uso indicado [9].

El uso de medicamentos de enantiómero único puede conducir a perfiles farmacológicos más simples y selectivos, mejores índices terapéuticos y farmacocinética más simple; esto es debido a las diferentes tasas metabólicas de los diferentes enantiómeros, y a una diferenciación en las interacciones farmacológicas. Por ejemplo, un enantiómero puede ser responsable de los efectos terapéuticos de un medicamento mientras que el otro enantiómero puede estar inactivo o contribuir a los efectos indeseables. En tal caso, el uso del enantiómero individual proporcionaría un medicamento superior y puede preferirse sobre su forma racémica. En ensayos clínicos, formulaciones del enantiómero (S)-albuterol, un agonista de los receptores adrenérgicos β_2 usado para el tratamiento del asma, y (S)-omeprazol, un inhibidor de la bomba de protones para el tratamiento de reflujo gastroesofágico, han demostrado que son superiores a sus formulaciones

racémicas (Figura 2) [9]. Existen otros casos, donde ambos enantiómeros de un fármaco quiral pueden contribuir a los efectos terapéuticos, y el uso de un enantiómero único puede ser menos efectivo o incluso menos seguro que la forma racémica. Por ejemplo, el enantiómero (-) del sotalol tiene actividad betabloqueante y antiarrítmica, mientras que el enantiómero (+) solo presenta propiedades antiarrítmicas, pero carece del antagonismo β -adrenérgico [10] (Figura 2) [10].

El desarrollo de un medicamento con principio activo basado en un enantiómero único, que ha sido utilizado y aprobado previamente como una mezcla de enantiómeros, no implica necesariamente que la forma enantiopura se pueda convertir en el medicamento estándar. La decisión de usar un solo enantiómero contra una mezcla de enantiómeros de un medicamento en particular debe hacerse sobre la base de los datos de ensayos clínicos y experiencia clínica.

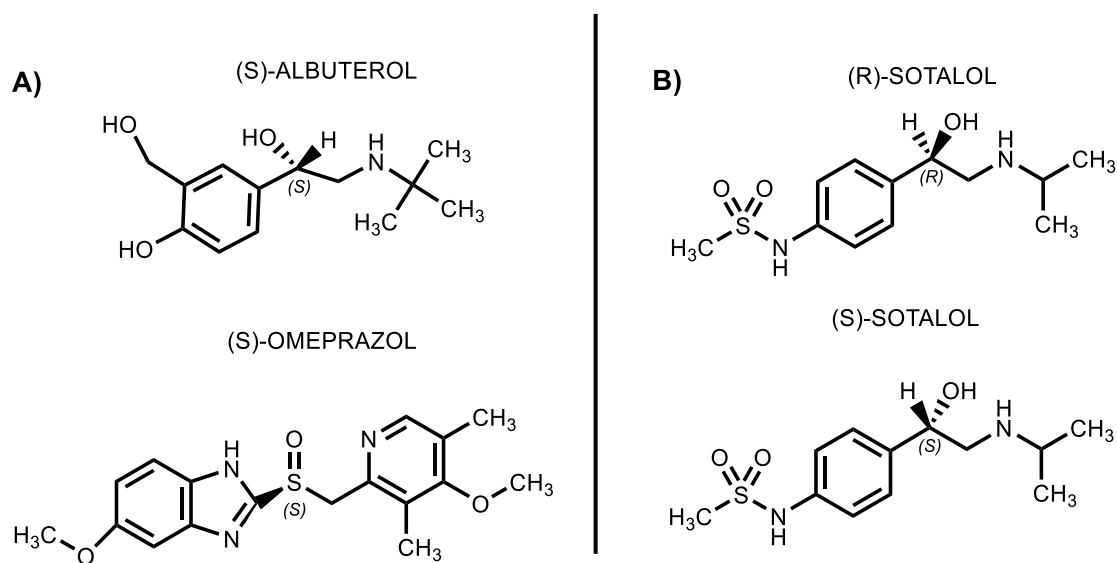


Figura 2. Importancia de la estereoquímica en el desarrollo de medicamentos.

- A) Ejemplo de formulaciones de enantiómero único que han demostrado ser superiores a sus formulaciones racémicas.
- B) Formulaciones racémicas en las que ambos enantiómeros han demostrado contribuir al efecto terapéutico deseado.

1.2 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más común de trastorno neurodegenerativo, asociado con alteraciones cognitivas, funcionales y de comportamiento, principalmente en edades avanzadas. Es responsable de alrededor del 60-70% de los casos de demencia en todo el mundo, afectando a más de 30 millones de personas. Este número se espera que alcance alrededor de los 100 millones (uno de cada 85 personas) para 2050 [11]. Desafortunadamente, las opciones terapéuticas disponibles para la EA actualmente están limitadas a tratamientos sintomáticos, donde la eficiencia es modesta, limitada a reducir los síntomas en la fase inicial de demencia, e implica importantes efectos secundarios. Estos hechos alientan a mejorar nuestro conocimiento actual e investigación experimental sobre el diagnóstico y prevención de EA [11].

De una manera más general, la EA es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial compleja, donde el componente genético representa aproximadamente el 70% con respecto a los determinantes epigenéticos y ambientales [12]. El gen de la apolipoproteína E (gen APOE) parece ser el principal factor de susceptibilidad genética, mientras que los genes APP (proteína precursora amiloide), PSEN1 (presenilina 1) y PSEN2 (presenilina 2) y γ -secretasa, producen la enfermedad familiar y que se heredan de manera autosómica dominante de la EA [12].

La EA se caracteriza morfológicamente por una atrofia cerebral, una disminución de las conexiones sinápticas, disminución de la densidad neuronal y la presencia de dos hallazgos fisiopatológicos: la formación de placas amiloides y marañas neurofibrilares [13]. El aumento de placas amiloides induce a la neurodegeneración en los sistemas de memoria antes de que el deterioro cognitivo pueda manifestarse. Además, la EA está asociada con una pérdida significativa de los marcadores colinérgicos presinápticos en la corteza del cerebro en sujetos de edad avanzada lo que afecta particularmente en las áreas relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Todo esto ha llevado a distintas hipótesis sobre la EA [13].

1.2.1 Fármacos modificadores de los síntomas y fármacos modificadores de la enfermedad

Los primeros fármacos desarrollados para el tratamiento de la EA fueron sintomáticos. El tratamiento sintomático tiene como objetivo tratar los síntomas que se asocian a la enfermedad y mejorar la calidad de vida. La mejoría sintomática en la EA puede consistir en una cognición mejorada, más autonomía y/o mejora en la disfunción neuropsiquiátrica y conductual, probablemente con una duración limitada. Un ejemplo de fármacos modificadores de los síntomas son los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI), que aumentan los niveles de acetilcolina, que están reducidos en la EA [14].

La terapia farmacológica modificadora de la enfermedad (DMT) está destinada a modificar los pasos patológicos que conducen a la EA, actuando así sobre la evolución de la enfermedad. Por esta razón, se le ha denominado terapias modificadoras de la enfermedad (Disease-Modifying Therapies, DMTs). Para bloquear la progresión de la enfermedad tienen que interferir con los pasos patogénicos responsables de los síntomas clínicos, incluyendo el depósito de placas extracelulares de péptidos beta amiloides ($A\beta$) y de ovillos neurofibrilares intracelulares, inflamación, daño oxidativo, desregulación del hierro y metabolismo del colesterol [14].

1.2.2 Hipótesis β -amiloide

La hipótesis β amiloide se basa en la formación de placas amiloides, formadas por agregados de péptidos de 38 a 43 aminoácidos. Este es el evento inicial del proceso patológico que comienza 15 o 20 años antes de que los síntomas clínicos se vuelvan aparentes. Los péptidos beta amiloides ($A\beta$) son moléculas en la patogénesis de EA que se originan por la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) por las enzimas γ - y β -secretasas [15]. La escisión de APP por la β -secretasa forma un fragmento de proteína llamado fragmento APP C-terminal (C99). La fragmentación de C99 por la γ -secretasa conduce a la producción de péptidos $A\beta$ (Figura 3) [15].

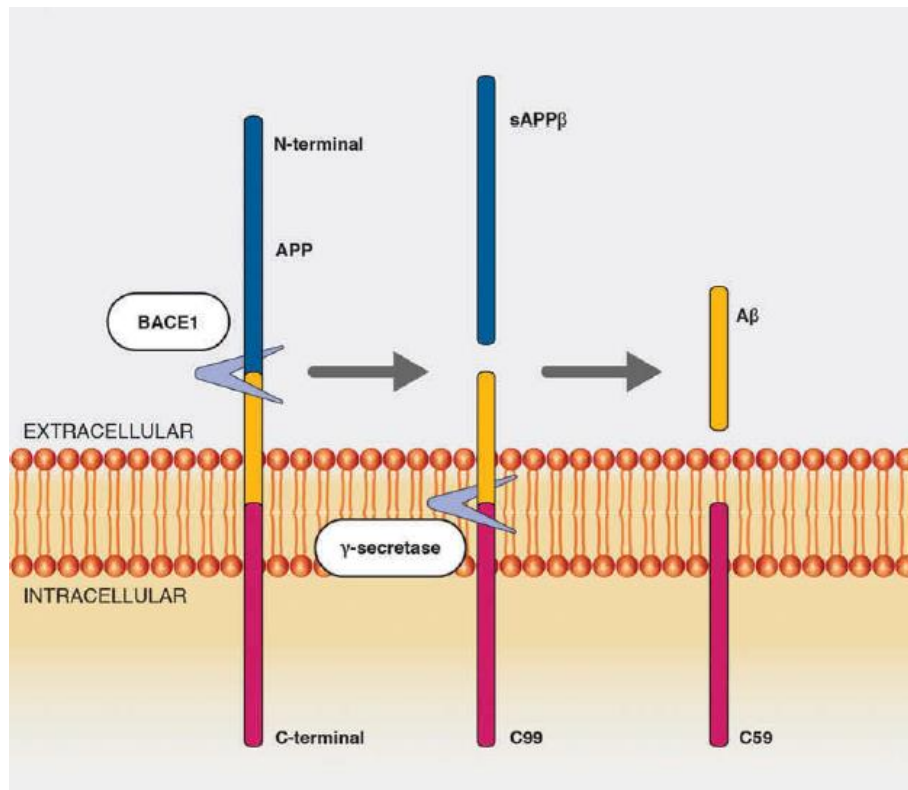


Figura 3. Proceso de escisión de la APP [15].

La APP se divide secuencialmente por dos proteasas aspárticas para generar A β . Durante el primer paso, BACE1 corta la APP lo que produce dos fragmentos de APP: C99 y sAPP β . Durante el segundo paso, la enzima γ -secretasa escinde C99 para generar A β (amarillo) que luego se libera en el espacio extracelular.

Se cree que los cambios graduales en los niveles de los péptidos β -amiloide en el cerebro inician la cascada amiloide [16]. Los niveles de A β se pueden elevar aumentando su producción y / o disminuyendo su aclaramiento. En particular, la relación A β 42 / A β 40 puede aumentarse mediante mutaciones en los genes de la proteína precursora de β -amiloide (APP), PSEN1 y PSEN2. Este aumento relativo de A β 42 aumenta la formación de oligómeros, lo que causa cambios sutiles y luego cambios permanentes cada vez más graves de la función sináptica [16].

Paralelamente, A β 42 forma depósitos microscópicamente visibles en el parénquima cerebral, primero como placas difusas relativamente no benignas (no fibrilares). A medida que las placas difusas comienzan a adquirir forma fibrilar, empiezan a observarse respuestas inflamatorias locales (microgliosis y astrocitosis). También se produce pérdida sináptica de la columna y distrofia neurítica. Con el tiempo, estos

eventos generan estrés oxidativo, una homeostasis iónica alterada y una serie de cambios bioquímicos adicionales [17]. Las marañas neurofibrilares son inducidas por actividades alteradas de quinasas y fosfatasas que contribuyen a defectos adicionales, incluidas algunas en el transporte axonal. La cascada culmina en disfunción sináptica/neuronal generalizada y muerte celular, lo que conduce a la demencia progresiva (Figura 4) [17].

Debido a que la formación de agregados de péptidos A β es un sello distintivo fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer, la β - y γ -secretasas son posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de tratamientos de la enfermedad de Alzheimer.

1.2.3 β -Secretasa (BACE1)

Las secretasas son un término genérico que se refiere a cualquier enzima que es capaz de escindir la APP. Dado que la producción de péptidos A β se encuentra al comienzo de la cascada amiloide, considerada ampliamente como el centro de gravedad de la patología, se espera que los compuestos capaces de modular a las secretasas controlen directamente tanto la velocidad de producción como la naturaleza de los péptidos A β , produciendo efectos benéficos [18].

La modulación de las secretasas teóricamente perjudicaría los eventos consecuentes, la oligomerización de A β y la fibrillogénesis, así como las posteriores deficiencias cognitivas asociadas con la enfermedad. Es importante destacar que la modulación de la actividad de la BACE1 se ha identificado como un objetivo muy prometedor para futuras intervenciones farmacológicas [18].

La BACE1 muestra un pro-dominio corto, una cola citoplasmática mucho más corta y un sitio catalítico grande [19]. La BACE1 es una aspartil proteasa transmembranal de 501 aminoácidos de longitud cuyo gen se encuentra en el cromosoma 11 (Figura 5). Se expresa abundantemente en neuronas donde es la iniciadora limitante de la generación de péptidos amiloides al liberar el extremo N-terminal de A β , el sitio catalítico presenta dos residuos de ácido aspártico (Asp 32 y Asp 228) responsables del corte de APP [19].

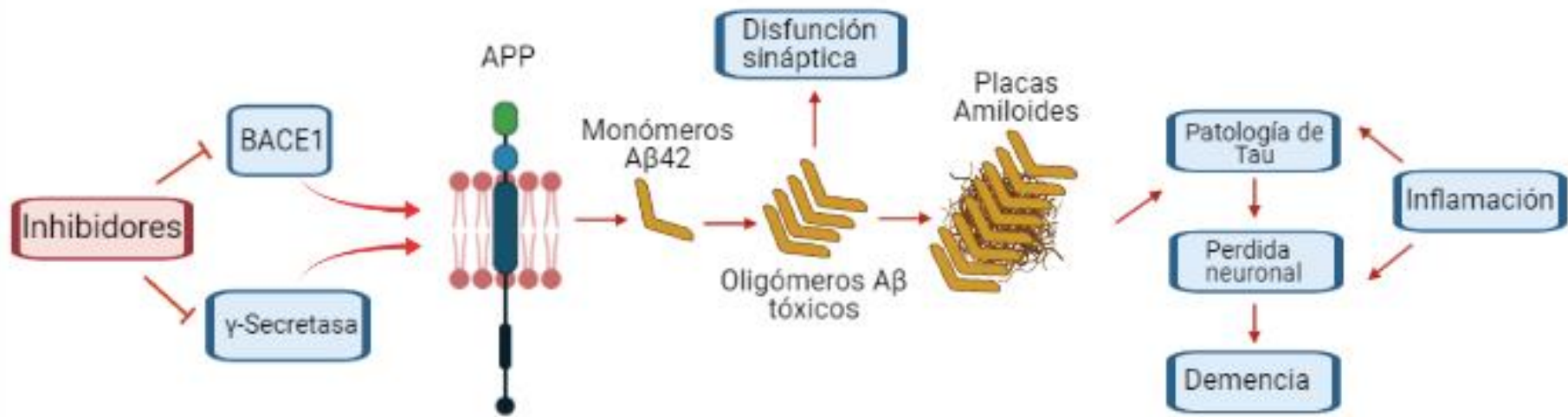


Figura 4. La cascada amiloide y los principales enfoques terapéuticos [17].

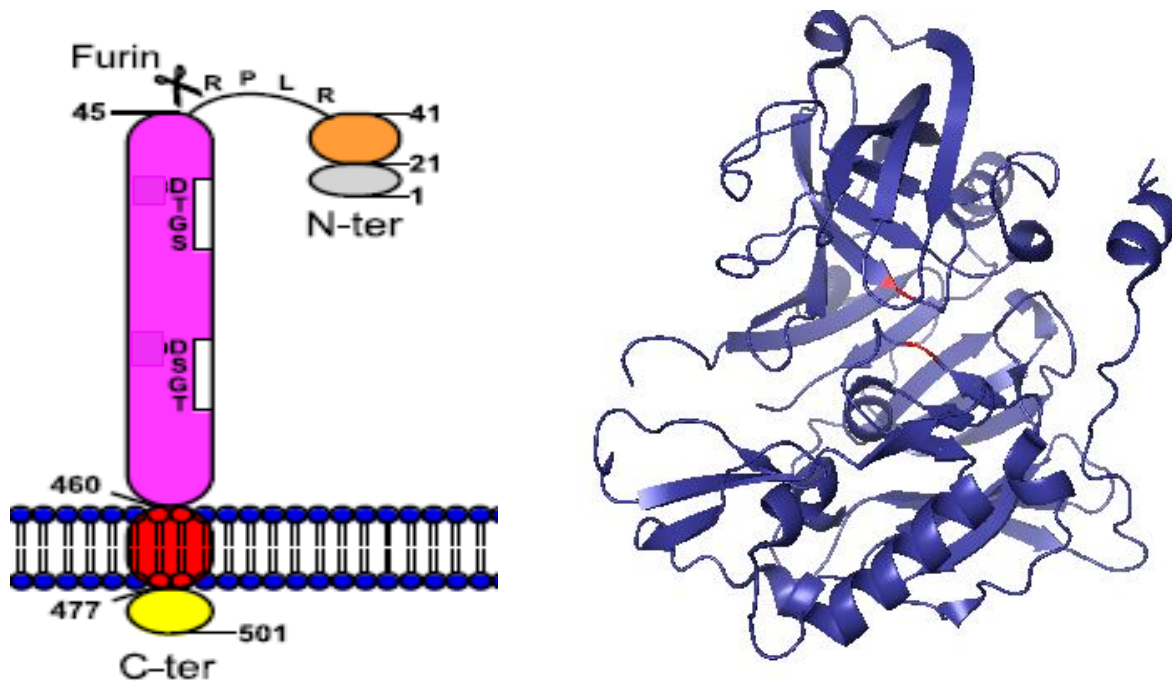


Figura 5. Estructura secundaria y tridimensional de la β -secretasa o BACE1 [19].

Del extremo N-terminal al C-terminal los dominios funcionales son: Gris, un péptido de señalización corto. Naranja, pro-dominio que mantiene la enzima inactiva. Purpura, dominio de proteasa que contiene el sitio catalítico siendo dos residuos de aspartato (D). Rojo, dominio transmembranar. Amarillo, cola citoplasmática.

Se ha demostrado que ratones knock-out de BACE1 no producen péptidos A β en el cerebro lo que apoya el hecho de que esta proteasa es responsable para la mayoría, si no toda, de la actividad de BACE1 en el sistema nervioso central. Por ello, esta enzima se destaca como un blanco terapéutico prometedor en el desarrollo de posibles inhibidores para el tratamiento de la EA al presentar una menor cantidad de sustratos en comparación con la γ -secretasa y asociarse a una mejoría en la función cognitiva [19].

1.2.4 Avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer

El interés farmacológico en la EA durante el presente siglo está creciendo cada vez más. El aumento en el número de trabajos de investigación sobre este tópico publicados desde el año 2000 hasta 2018 muestra una clara tendencia creciente, desde 315 publicados en 2000 hasta 2.298 en 2018 (Figura 6) [20].

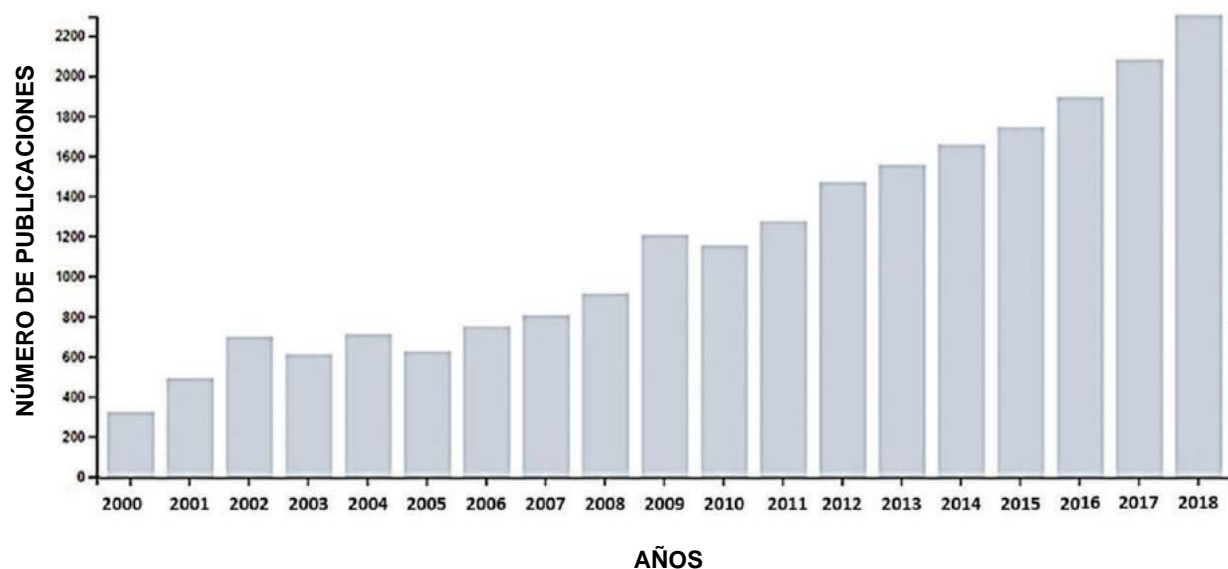


Figura 6. Evolución en el número de publicaciones sobre la EA [20].

En los últimos 20 años, una intensa investigación se ha centrado en la creación de inhibidores para BACE1. El desarrollo de inhibidores de esta enzima es todo un reto porque, además de la APP, la BACE1 tiene muchos más sustratos, entre los que se encuentran la neuregulina-1, implicada en la mielinización de los nervios periféricos. Este hecho hace que la inhibición inespecífica de la enzima pueda dar lugar a efectos adversos [21].

Varios grupos han sintetizado con éxito potentes moléculas orgánicas pequeñas con diferente selectividad por BACE1, además de caracterizar su farmacología en modelos murinos transgénicos de EA. Varios de estos compuestos han mostrado buena absorción a nivel cerebral y se ha observado que reducen los niveles de placas A β cerebrales dependiente de la dosis administrada en animales [22].

A pesar del fuerte compromiso del objetivo, los inhibidores de BACE1 no han podido demostrar ralentización significativa del deterioro cognitivo en ensayos clínicos en pacientes con EA leve a moderada o en sujetos cognitivamente sanos con riesgo de desarrollar EA. Por lo tanto, en el cerebro, se puede suponer que la sobreproducción de placas A β podría representar una respuesta adaptativa a eventos patológicos desconocidos [22]. Sin embargo, no se debe descartar su uso ya que continúa siendo la hipótesis más intuitiva hasta el momento. Por lo que el desarrollo de nuevos inhibidores con mayor selectividad hacia BACE1 cuya función sea la modulación en la producción de placas A β y no su inhibición total es el reto a seguir.

1.3 Descubrimiento de Fármacos Basado en Fragmentos (FBDD)

En un intento por diseñar compuestos bioactivos innovadores, un químico farmacéutico se enfrenta a un espacio de búsqueda prácticamente infinito. Un método de cribado virtual de gran ayuda para el diseño racional de fármacos es el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos (FBDD) [23].

El método FBDD identifica ligandos de bajo peso molecular (~150 Da) que se unen a macromoléculas biológicamente importantes. El modo de unión experimental tridimensional de estos fragmentos se determina usando cristalografía de rayos X o espectroscopía de RMN, y se usa para facilitar su optimización en moléculas potentes con propiedades similares a fármacos. En comparación con el cribado de alto rendimiento, el enfoque de fragmentos requiere menos compuestos para su ejecución y a pesar de que los fragmentos *hits* iniciales tienen baja potencia debido a su pequeño tamaño, forman interacciones de alta calidad y pueden optimizarse fácilmente en potentes moléculas líderes (Figura 7) [23].

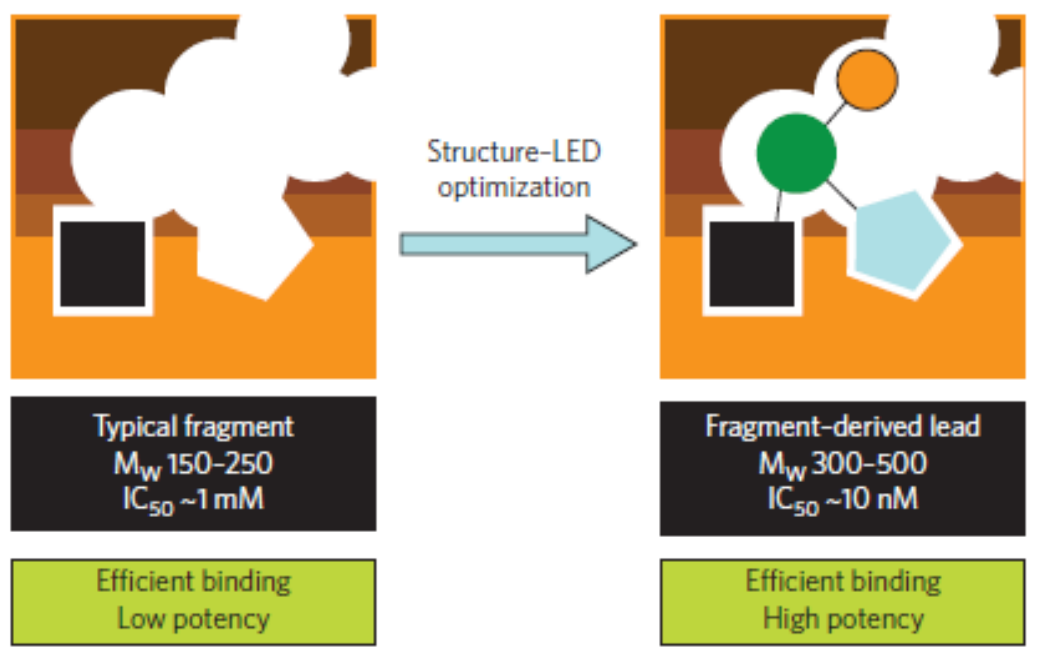


Figura 7. Representación del flujo de trabajo en el descubrimiento de fármacos basado en fragmentos [23].

La vinculación de fragmentos derivados de medicamentos y compuestos existentes con actividades y propiedades conocidas puede servir de referencia para el ensamblaje virtual de una molécula de mayor tamaño que ocupe el centro activo del blanco seleccionado. Sin embargo, además de considerar la posibilidad de exhibir la actividad biológica deseada, una molécula (o especie) también debe de presentar viabilidad sintética. Un objetivo importante para el diseño FBDD de un fármaco es la factibilidad de síntesis de la molécula construida virtualmente, y su posterior optimización química [24].

1.3.1 Vinculación de fragmentos con potencial inhibitorio contra BACE1

Haciendo uso del método FBDD, se propone diseñar compuestos bioactivos innovadores como inhibidores de la BACE1. En un inicio se identificaron aquellos fragmentos que pudiesen presentar actividad frente a dicho blanco con la perspectiva de incorporarlos a un esqueleto de oxindol, conocido por figurar frecuentemente como sustituyente en compuestos farmacológicamente activos [25].

La selección del fragmento de oxindol, útil para el diseño de nuevas estructuras químicas como potenciales inhibidores para BACE1 se realizó por revisión de la base de datos SwissTargetPrediction. Los 2-oxindoles son estructuras privilegiadas que contienen múltiples sitios para su diversificación a través de modificaciones químicas que pueden conducir a una gran cantidad de posibles perfiles farmacológicos. El término estructura privilegiada fue acuñado por primera vez por Evans y col. en 1988 y la definió como "un solo marco molecular capaz de proporcionar ligandos para diversos receptores." El núcleo de oxindol se usa como componente químico, andamio, fragmento y farmacóforo en el diseño o descubrimiento de fármacos [25].

Por otro lado, es sabido que el sistema de anillo de ciclopropano tiene un impacto positivo en las acciones biológicas de los medicamentos aprobados por la FDA para una amplia gama de enfermedades humanas [26]. El fragmento ciclopropano puede modificar significativamente las propiedades farmacocinéticas, incluida la unión al receptor y el metabolismo del fármaco, además su restricción conformacional puede reducir la susceptibilidad a la inactivación metabólica al bloquear los sitios lábiles y mejorar su potencia al estabilizar una conformación de unión favorable. Todos ellos son factores vinculantes que aumentan la probabilidad de una molécula para ser terapéuticamente útil. Adicionalmente, la considerable rigidez del anillo de ciclopropano, ubicado en el centro de la estructura de un fármaco, puede ayudar a introducir a los grupos farmacóforos que penden del anillo en los bolsillos de unión complementarios de la proteína objetivo [26].

Debido a la ubicación de BACE1 en el cerebro, los inhibidores de esta enzima necesitan cruzar tanto la barrera hematoencefálica (BBB) como las membranas neuronales para acceder al objetivo. Al respecto, sistemas heterocíclicos como los de imidazol y benzimidazol, aunados a hidrocarburos aromáticos como el difenilo han demostrado recientemente gran potencia y selectividad por la enzima BACE1. Estos sistemas se caracterizan por ser potentes, altamente permeables, oralmente activos y penetran la BBB [27].

1.4 Métodos de Síntesis de Oxindoles y Sistemas Espirocíclicos

El fragmento de oxindol exhibe una amplia gama de actividades biológicas. Es un compuesto heterocíclico orgánico constituido por un anillo de benceno unido a un anillo de pirrol que tiene un grupo carbonilo en la segunda posición. Al ser ubicuo en la naturaleza, se ha encontrado en tejidos y fluidos de mamíferos, así como en productos naturales producidos por una variedad de plantas, bacterias e invertebrados [28].

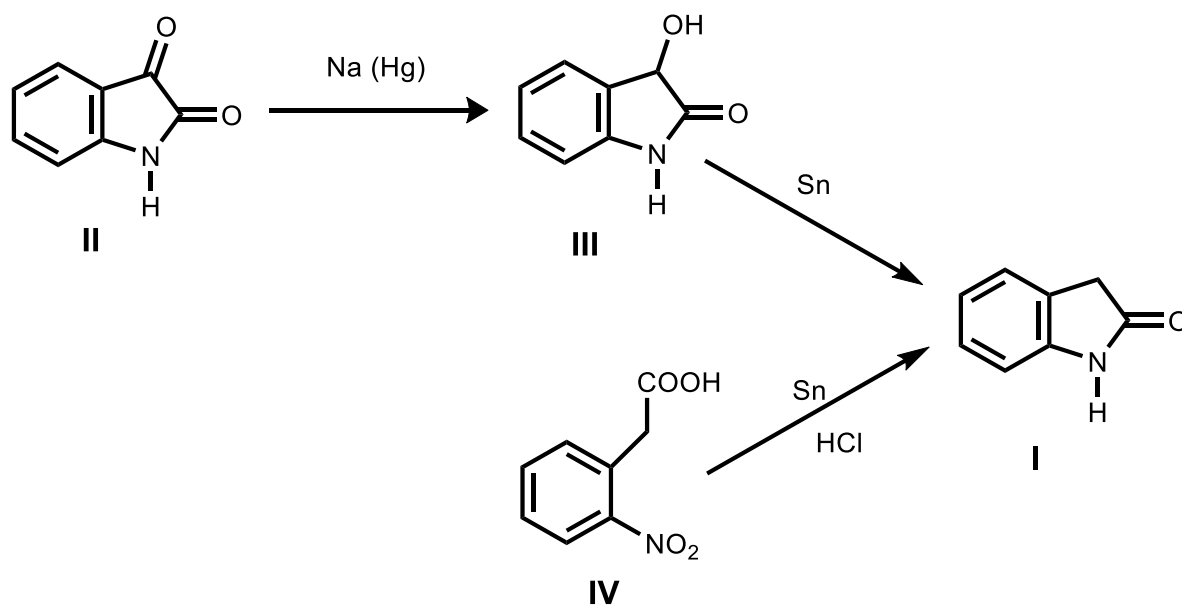
Tradicionalmente, el oxindol es utilizado en el tratamiento de infecciones, cáncer, úlceras gástricas, artritis y otros procesos inflamatorios [28]. Además, derivados 3-sustituidos y espirooxindoles están implicados en un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen actividad antitumoral, antioxidante, anti-Alzheimer, actividad antibacteriana, neuroprotectora, analgésica, etc [28].

A la luz de un amplio espectro de actividades biológicas y amplias posibilidades sintéticas, un gran número de grupos de investigación han participado en el diseño y síntesis de nuevos derivados de oxindol. La síntesis del núcleo de oxindol **I** fue realizada exitosamente por primera vez por Bayer y Knop en 1866 mediante la reducción de isatina **II** con una amalgama de sodio en medio alcalino dando el dioxindol **III**, que se trata adicionalmente con estaño y ácidos minerales para dar el oxindol **I** (Esquema 1) [29].

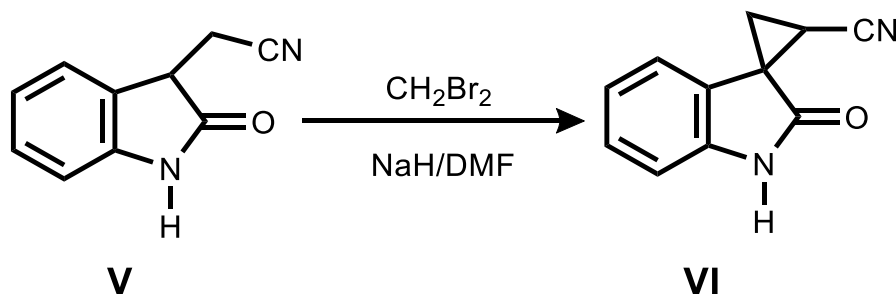
Entre todos los métodos disponibles para la síntesis de oxindol **I** el establecido por Baeyer se encuentra entre las reacciones más adecuadas en términos de rentabilidad al reducir el tiempo y obtener buen rendimiento. El método utiliza como material de partida el ácido 2-nitrofenilacético (**IV**) que al ser reducido por acción del estaño y ácido clorhídrico genera la molécula de oxindol **I** [29].

Los espirociclo-oxindoles funcionalizados se encuentran en una variedad de productos naturales y moléculas bioactivas. Por consiguiente, se han desarrollado muchas metodologías sintéticas para construir estos espirociclos, y en su mayoría se basan en reacciones de cicloadición o condensación [30].

Un método para la síntesis de espirociclopropil oxindoles es la espirociclación a partir del 3-cianometiloxindol **V** por un acoplamiento con dibromuros de alquilo $(CH_2)Br_2$ que conduce a los pares diastereoméricos posibles **VI**, utilizando una base fuerte como NaH en DMF a temperatura ambiente durante 1 h, sin interferencia de reacciones secundarias (Esquema 2) [30].



Esquema 1. Síntesis de oxindoles.



Esquema 2. Síntesis del espirociclopropil oxindol VI.

2. OBEJTIVO

2.1 Objetivo General

Descubrir nuevos ligandos como inhibidores de BACE1 empleando como herramienta el diseño de fármacos basado en fragmentos (FBDD) y predecir los modos de unión BACE1-ligando, usando el modelado molecular.

2.1.1 Objetivos particulares

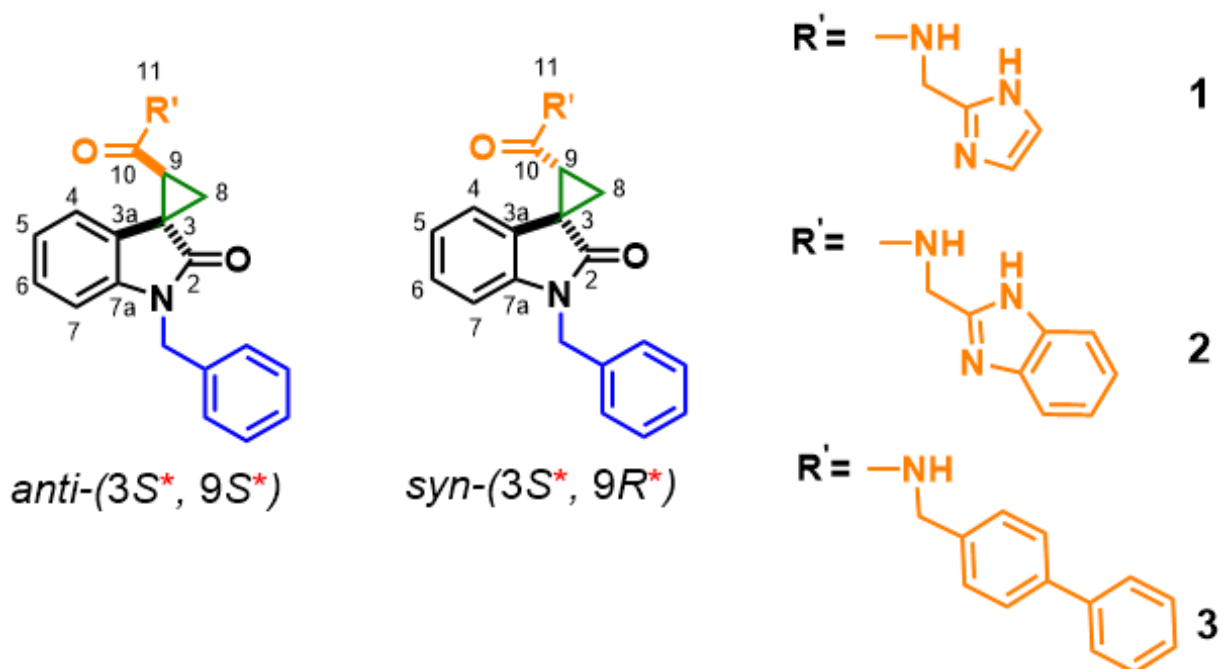
- Construir, mediante cribado virtual FBDD un grupo de entidades noveles o “*hits*” potencialmente capaces de interferir con la enzima BACE1 y cuyas estructuras químicas puedan ser candidatas de presentar una alta probabilidad de ser sintéticamente accesibles.
- Seleccionar, mediante docking molecular aquellos ligandos capaces de posicionarse de forma óptima en el sitio de unión, así como establecer una puntuación o ‘score’ para determinar su potencial afinidad por la enzima BACE1.
- Diseñar una estrategia de síntesis que permita construir un andamiaje formado por un anillo de oxindol enlazado a sistemas heterocíclicos a través de un ciclopropano.
- Llevar a cabo un estudio de simulación de las propiedades farmacocinéticas (ADME) de los ligandos propuestos a través de los servidores del Instituto Suizo de Bioinformática.

3. JUSTIFICACIÓN

En la enfermedad de Alzheimer (EA) la terapia de modificación de la enfermedad es un objetivo principal de investigación. Por lo que, en los últimos años, varios enfoques destinados a inhibir la progresión de la enfermedad de Alzheimer han avanzado a ensayos clínicos. Las estrategias dirigidas a la producción y eliminación del péptido beta-amiloide, se encuentran entre las más avanzadas. Aunque el diseño y desarrollo de inhibidores de la BACE1 ha demostrado ser extremadamente desafiante, existe una evidencia sustancial de que los inhibidores de esta enzima pueden actuar como agentes terapéuticos en la EA y su investigación y desarrollo debe buscarse para prevenir, retrasar el inicio o retrasar la progresión de la EA.

4. HIPÓTESIS

El diseño de un andamiaje formado por un anillo central de oxindol enlazado a grupos farmacofóros heterocíclicos conducirán a nuevos compuestos espirooxindólicos **1-3** potencialmente capaces de inhibir a la enzima β -secretasa (BACE1), (Esquema 3).



Esquema 3. Estructuras de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3**.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Métodos Computacionales

A continuación, se presentan los resultados del estudio *in silico* de los espirooxindoles **1-3** (Esquema 3), empleando diversos programas informáticos. En este estudio se determinan y analizan los resultados para el confórmero de mínima energía de cada uno de los espirooxindoles **1-3**. Adicionalmente se estima la energía de unión (ΔG) de *anti/syn* **1-3** con la enzima BACE1, así como la predicción de los modos de unión de *anti/syn* **1-3** con los aminoácidos que conforman el sitio ortoestérico de BACE1. Finalmente, se simulan las propiedades farmacocinéticas de los compuestos **1-3**, para predecir su biodisponibilidad a nivel del sistema nervioso central.

5.1.1 Modelado molecular de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3**

Con el propósito de conocer la conformación más estable o de mínima energía de los pares diastereoméricos *anti/syn* **1-3** se realizó un análisis conformacional; esto se llevó a cabo mediante modelado tridimensional con cálculos de mecánica molecular utilizando el algoritmo de Monte Carlo en fase acuosa (MMFFaq, programa Spartan 14') [31]. A continuación, se realizó una recategorización de la población conformacional mediante el cálculo "Single Point Energy" (SPE), que cual consiste en cálculos de predicción de la energía y propiedades relacionadas a la geometría específica de una molécula [31]. Para el espirooxindol **1** *anti*(3*R*9*R*) unido al fragmento de imidazol se obtuvieron 8 confórmeros y para su diastereómero *syn*(3*R*9*S*) se obtuvieron 9 confórmeros. En el caso del espirooxindol **2** *anti*(3*R*9*R*) unido al fragmento de benzimidazol se obtuvieron 5 confórmeros y para su diastereómero *syn*(3*R*9*S*) se obtuvieron 9 confórmeros. Por último, para el espirooxindol **3** *anti*(3*R*9*R*) unido al fragmento de difenilo se obtuvieron 11 confórmeros y para su diastereómero *syn*(3*R*9*S*) se obtuvieron 8 confórmeros.

Para minimizar posibles conformaciones aberrantes y garantizar una conformación global de mínima energía se realizó un cálculo de optimización energética de los confórmeros más estables obtenidos por SPE, utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT, programa Gaussian 09), empleando los niveles de cálculo

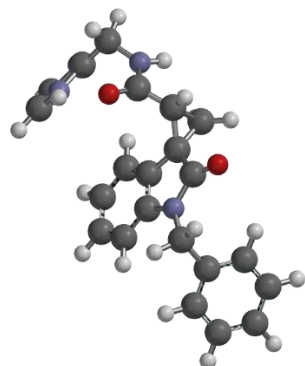
B3LYP/6-31G+ (d, p). Se incorporó el método de polarización continua (CPCM) en fase acuosa simulando un entorno fisiológico o biológico [32]. Los resultados obtenidos de los conformeros más estables, así como su distribución se muestran en la Tabla 1. La geometría de mínima energía en fase acuosa de los conformeros más estables de cada para diastereomérico *anti/syn* 1-3 se muestran en la Figura 8.

Tabla 1. Resultados del análisis conformacional de los diastereómeros *anti/syn* 1-3.

Espirooxindol	Configuración	E (Kcal/mol) ^a	Dist. Boltzmann ^b
<i>anti-1</i>	3R9R	-765536.07	0.25 %
<i>syn-1</i>	3R9S	-765538.12	0.35 %
<i>anti-2</i>	3R9R	-861958.62	0.48 %
<i>syn-2</i>	3R9S	-861960.76	0.50 %
<i>anti-3</i>	3R9R	-914313.68	0.48 %
<i>syn-3</i>	3R9S	-914313.74	0.52 %

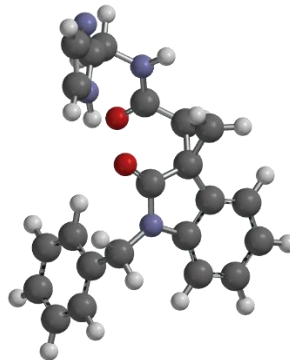
^a Energía del conformero más estable. ^bDistribución del conformero más estable.

Más allá de la alta rigidez del sistema espiránico conformado por los fragmentos de oxindol y ciclopropano, el análisis conformacional sugiere cierta flexibilidad a través de los enlaces sigma de los grupos metileno en el nitrógeno indólico (N1) y en el NH de la amida. De los seis casos analizados la estructura *syn-3*, sustituida con un grupo difenilo, mostró una mayor estabilidad conformacional.



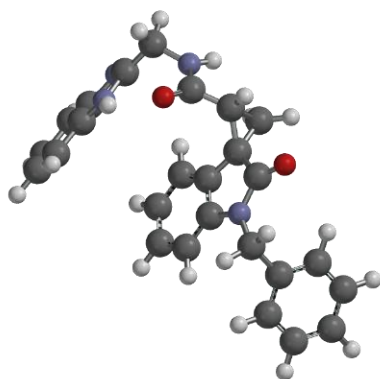
anti(3R9R)-1

$E_{\text{rel}} = 2.05 \text{ Kcal/mol}$



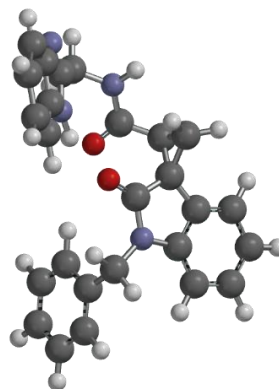
syn(3R9S)-1

$E_{\text{rel}} = 0.00 \text{ Kcal/mol}$



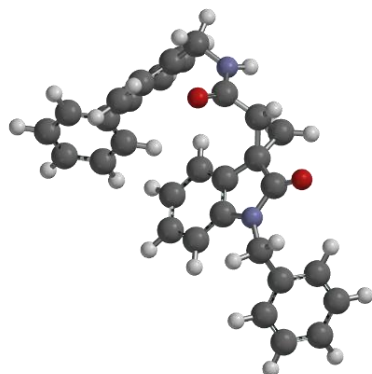
anti(3R9R)-2

$E_{\text{rel}} = 2.14 \text{ Kcal/mol}$



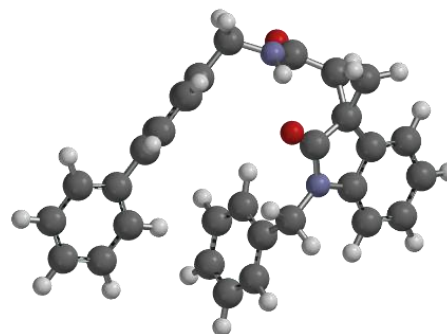
syn(3R9S)-2

$E_{\text{rel}} = 0.00 \text{ Kcal/mol}$



anti(3R9R)-3

$E_{\text{rel}} = 0.06 \text{ Kcal/mol}$



syn(3R9S)-3

$E_{\text{rel}} = 0.00 \text{ Kcal/mol}$

Figura 8. Confórmero más estable de cada par diastereomérico *anti/syn* 1-3.

5.1.2 Docking molecular de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3 en el sitio activo de BACE1

Con la finalidad de estimar la energía de unión (ΔG) de los complejos enzima-ligando, resultantes de la interacción de los pares enantioméricos *anti* 1-3 y *syn* 1-3 con BACE1, se realizó el docking molecular empleando el programa Autodock v4.2 MGL Tools v1.5.6 (ver Sección 7.1.2.1).

Previo al estudio docking y para garantizar que la orientación y la posición obtenida a partir de los cálculos de acoplamiento de los pares enantioméricos *anti* 1-3 y *syn* 1-3 pudieran representar un modo de unión razonable con la enzima BACE1, se realizó un proceso de validación del método docking usando la estructura de BACE1 co-cristalizada con el inhibidor 095 (PDB: 3UDK) desarrollado por Efremov y colaboradores [33] (Fig. 9).

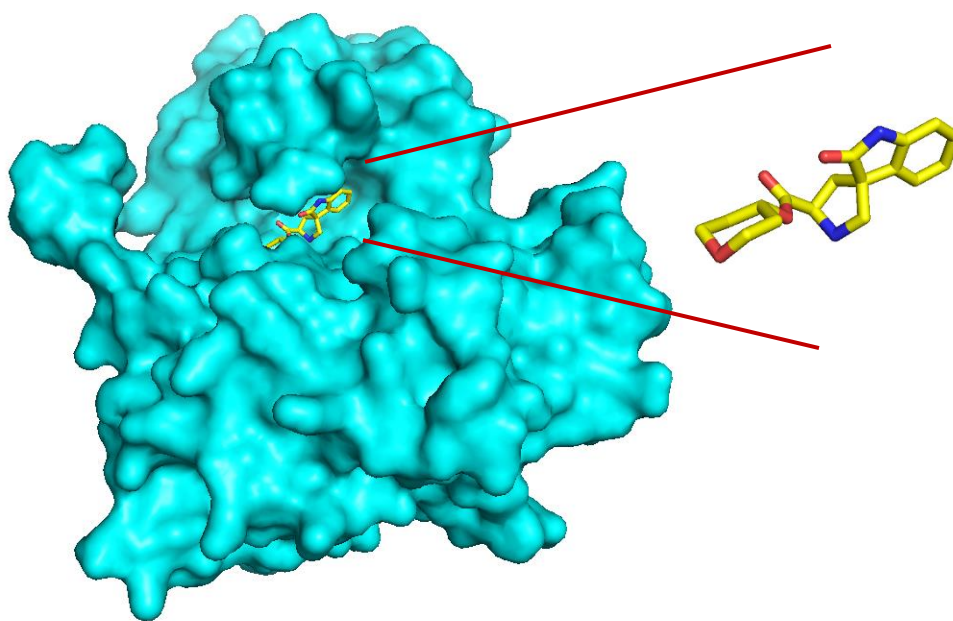


Figura 9. Acoplamiento espacial entre el centro activo de BACE1 y la molécula del inhibidor 095 (PDB: 3UDK).

El procedimiento de validación consistió en remover el inhibidor 095 del sitio activo de BACE1 y realizar un re-docking. El análisis de los resultados del estudio *in silico* confirmó que el inhibidor 095 se unió a la hendidura del sitio activo de la enzima en una conformación comparable a la observada experimentalmente por difracción de rayos-X (Figura 10). La desviación media cuadrática o RMSD entre la conformación de rayos-X predicha y observada para el inhibidor 095, obtenida usando el programa PyMOL 2.3, obtuvo un valor de 0.658 Å (RMSD <2.0 Å).

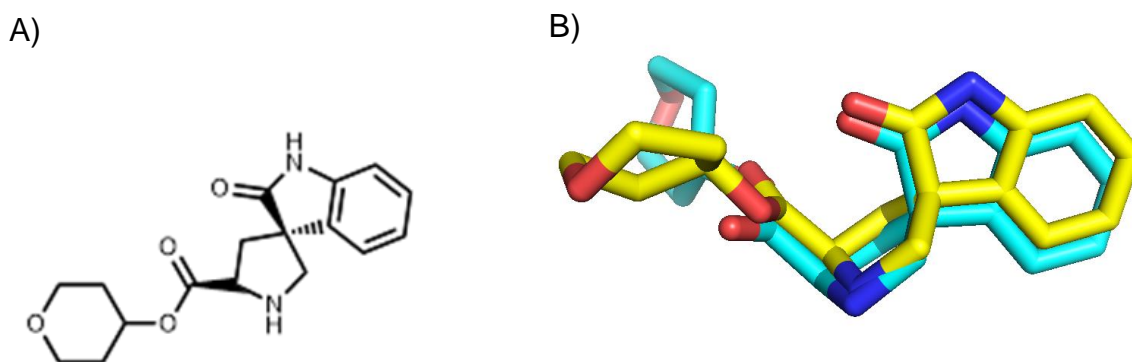


Figura 10. Validación del método docking.

A) Estructura 2D del inhibidor espiránico 095. B) Sobreposición de la pose experimental del inhibidor espiránico 095 (PDB: 3UDK) (amarillo) vs. la pose teórica obtenida por docking molecular (azul) (RMSD = 0.658 Å).

Para el análisis docking de los compuestos espirooxindólicos *anti/syn* **1-3** se delimitó al sitio catalítico de la enzima BACE1 (PDB: 3UDK). Las estructuras 3D utilizadas en el estudio docking de **1-3** corresponden a aquellas de los conformeros de mínima energía de cada par enantiomérico (*3R9R*) y (*3S9S*) y a las de sus correspondientes diasterómeros (*3R9S*) y (*3S9R*) de cada estructura optimizados con Gaussian09.

Los criterios utilizados para organizar los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de cada ligando se basaron en la elección de la pose del complejo enzima-ligando cuya energía de unión fuera la menor y por tanto la más estable y además la pose que ocupa la primera posición dentro del clúster más poblado (p en %). En la Tabla 2 se indican los resultados de la categorización de las poses con base en la energía de unión (ΔG) y la población (p).

Tabla 2. Resultados del acoplamiento molecular para la mejor pose de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3. Número de clúster (n), energía de unión (ΔG , kcal/mol) y población (p, %).

Espirooxindol	Configuración	Clúster (n)	Menor energía		Más poblado	
			ΔG	p	ΔG	p
<i>anti-1</i>	3R9R	9	-7.90	2%	-7.23	36%
<i>anti-1</i>	3S9S	9	-7.78	2%	-7.47	52%
<i>syn-1</i>	3R9S	7	-7.91	50%	-7.91	50%
<i>syn-1</i>	3S9R	11	-7.91	4%	-6.22	44%
<i>anti-2</i>	3R9R	14	-9.65	18%	-9.65	18%
<i>anti-2</i>	3S9S	9	-8.13	10%	-7.71	42%
<i>syn-2</i>	3R9S	5	-7.90	48%	-7.90	48%
<i>syn-2</i>	3S9R	13	-8.98	4%	-7.55	30%
<i>anti-3</i>	3R9R	13	-9.00	6%	-8.29	30%
<i>anti-3</i>	3S9S	4	-9.50	90%	-9.50	90%
<i>syn-3</i>	3R9S	10	-9.05	22%	-7.83	30%
<i>syn-3</i>	3S9R	8	-9.50	2%	-8.31	30%

- Casos donde el clúster de menos energía y el más poblado coinciden.

En las Figuras 11, 12 y 13 se muestra la distribución de los clústeres resultantes de 100 poses diferentes de espirooxindoles *anti/syn* 1-3.

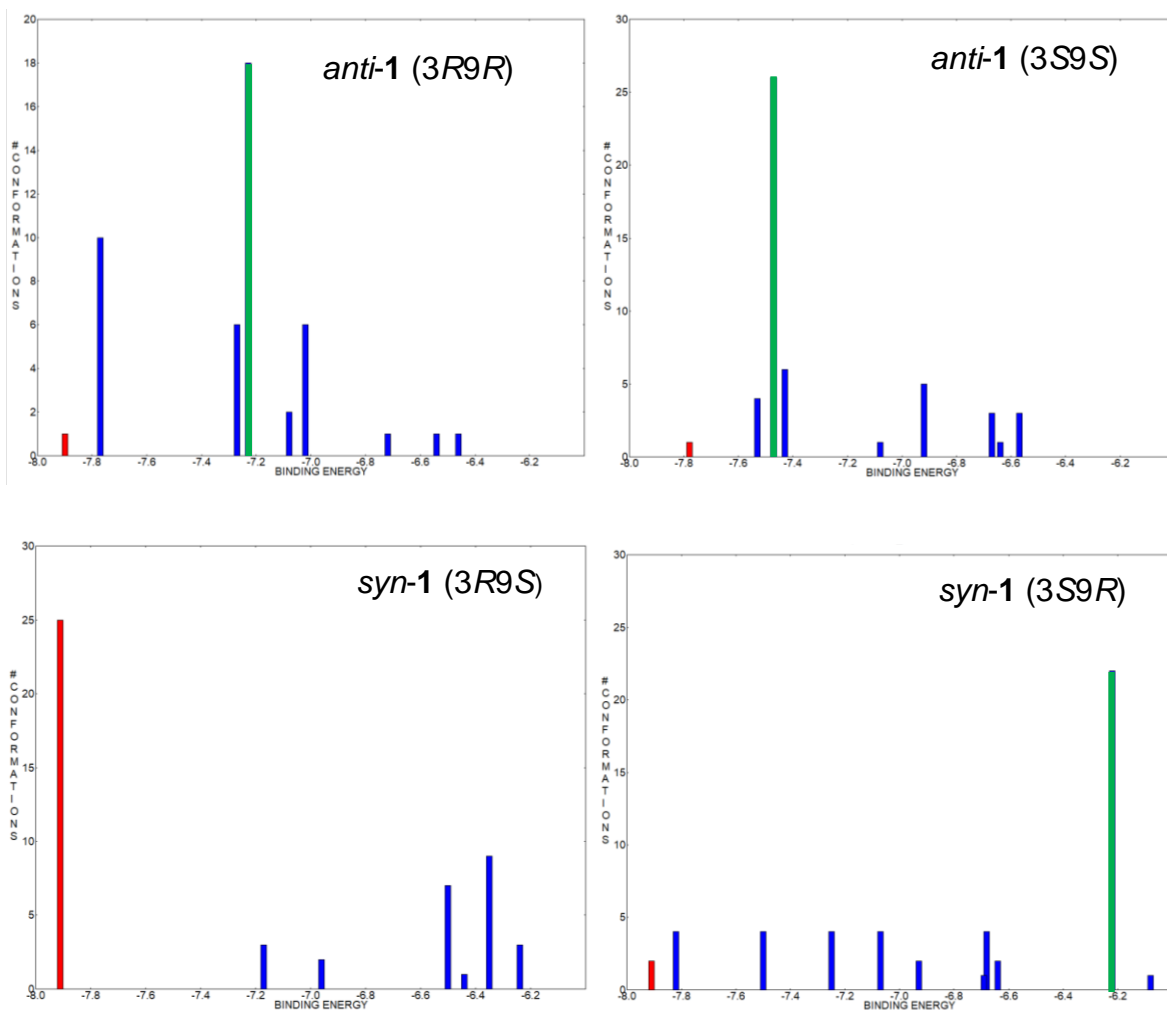


Figura 11. Distribución de poses (clústers) de los espirooxindoles *anti/syn-1* con un RMSD de 2.0. Clúster de la pose más estable en rojo. Clúster de la pose con mayor población en verde.

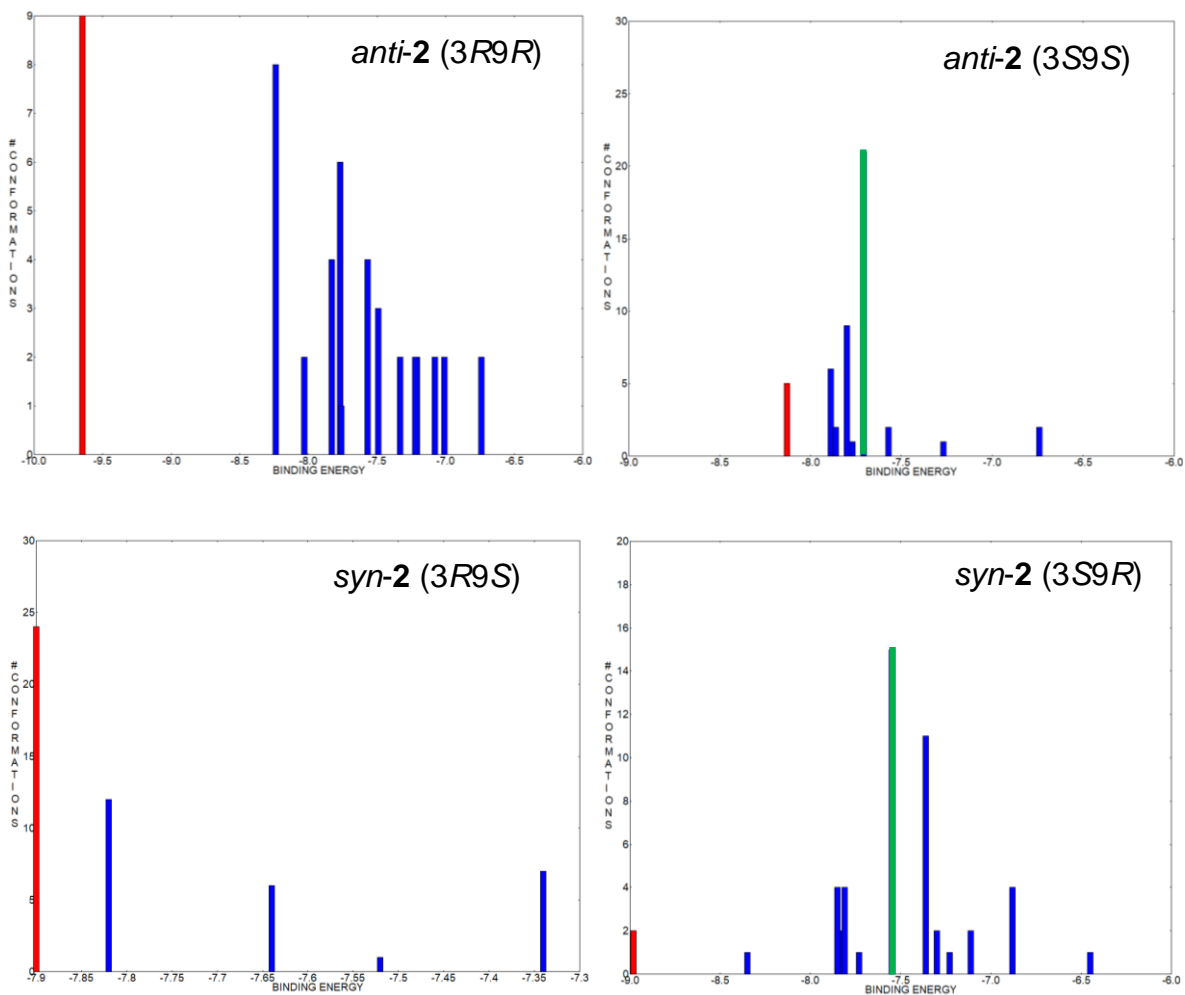


Figura 12. Distribución de poses (clústers) de los espirooxindoles *anti/syn-2* con un RMSD de 2.0. Clúster de la pose más estable en rojo. Clúster de la pose con mayor población en verde.

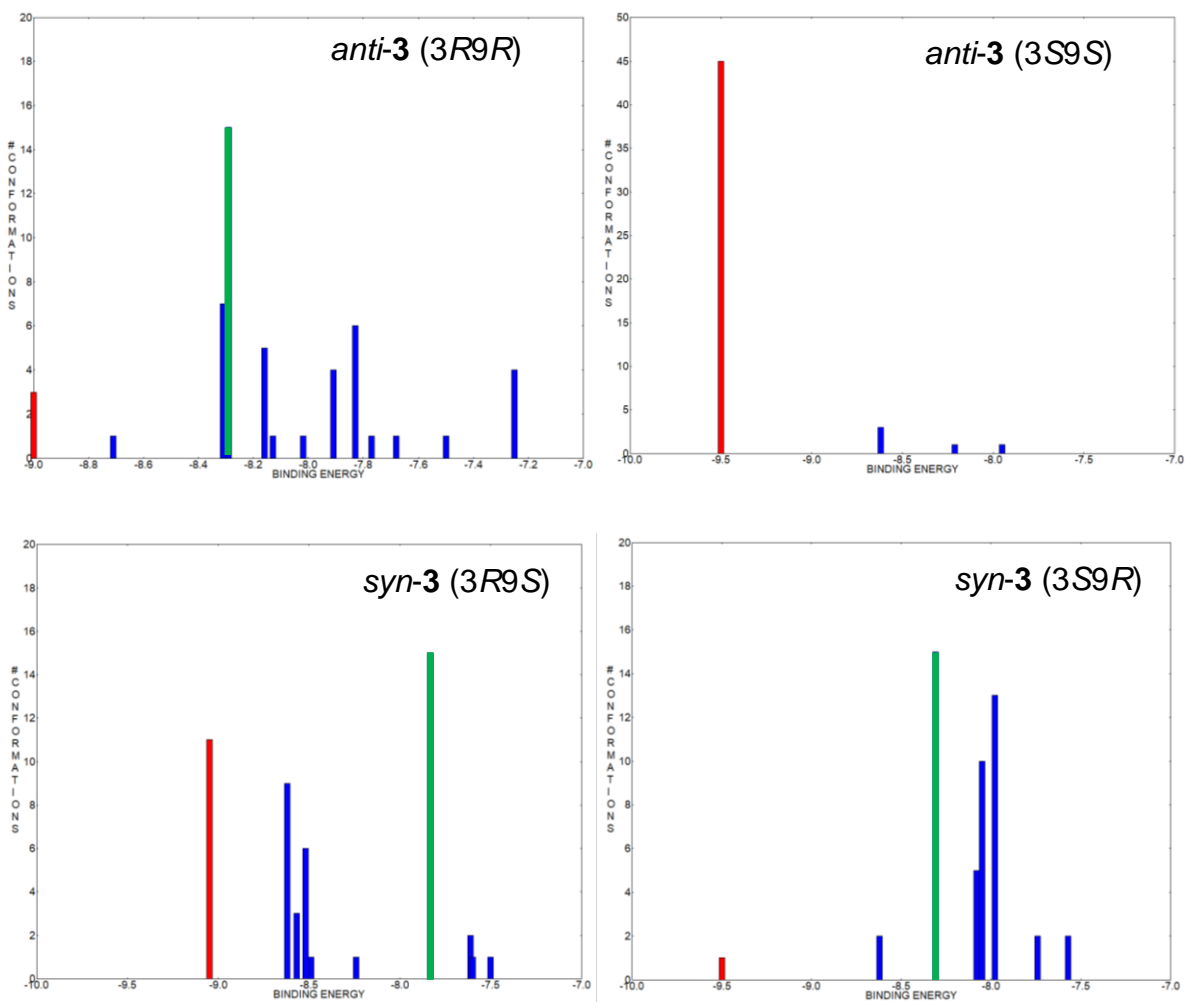


Figura 13. Distribución de poses (clústers) de los espirooxindoles *anti/syn-3* con un RMSD de 2.0. Clúster de la pose más estable en rojo. Clúster de la pose con mayor población en verde.

Tomando como criterio la energía de unión de los complejos, la mejor pose corresponde al complejo constituido por el espirooxindol *anti-2* (3R9R), presentando una energía de unión (ΔG) de -9.65 kcal/mol, con una población (p) de 18%. Por otra parte, la pose que ocupa la primera posición dentro del clúster más poblado (p = 90%) corresponde al espirooxindol *anti-3* (3S9S) con una energía de unión ΔG de -9.50 kcal/mol (Figuras 11, 12 y 13). Considerando que el número de clústeres en los complejos es influenciado por la libertad conformacional de los ligandos, mientras menor sea la libertad conformacional del ligando, mejor estabilidad conformacional habrá al unirse al sitio catalítico de la enzima con la consecuente formación de un menor número de poses o clústers. El análisis de los datos de la Tabla 2 indica que el espirooxindol *anti-3* (3S9S) es el candidato que destaca de entre las moléculas propuestas ya que cumple de mejor manera los criterios establecidos. Su constitución estructural, tamaño y una libertad conformacional limitada, le permite situarse dentro del sitio catalítico de la enzima BACE1, conocido por ser un espacio amplio, con una energía de unión y una distribución apropiada.

5.1.2.1 Análisis estructural de las interacciones BACE1/1-3

Las interacciones entre diversos ligandos y proteínas son en muchas ocasiones de carácter no covalente y por lo tanto reversibles, predominantemente con las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos del bolsillo de unión. Entre las interacciones clave entre ligandos y macromoléculas destacan los enlaces de hidrógeno [34], apilamiento aromático π - π y efectos hidrófobos [35]. Estas interacciones no covalentes juegan un papel primordial en el reconocimiento molecular y son la base del mecanismo de acción de los medicamentos [36].

Gracias al empleo de técnicas experimentales útiles para identificar las interacciones proteína-ligando como la cristalografía de rayos-X, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la criomicroscopía electrónica, se ha logrado identificar la estructura, así como los residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo de la enzima BACE1 [37].

La estructura de la enzima BACE1 tiene un plegamiento de proteasa aspártico pero su sitio activo es más abierto en comparación con otras proteasas. El sitio de unión

de APP (también llamado "hendidura") se encuentra entre los lóbulos N- y C - terminales con la díada catalítica de Asp 32 / Asp 228 en el centro de la hendidura [38] (Figura 14). El sitio activo de BACE1 es grande y consta de varios subsitios que a menudo se denominan bolsillos (Tabla 3). Los subsitios S1 y S3 están muy próximos y contienen residuos hidrófobos. Los bolsillos S2 y S4 también están ubicados uno cerca del otro, están expuestos a disolventes y constan de residuos hidrófilos. De igual manera los subsitios S3 'y S4' están conformados por residuos hidrófilos. Junto a S4' se encuentra el Subsitio S2' que contiene principalmente residuos hidrofóbicos y anfipáticos. El subsitio S1' está en el centro del sitio activo y contiene la díada catalítica de Asp 32 / Asp 228 y dos residuos hidrofóbicos de Ile 226 y Val 332 [38].

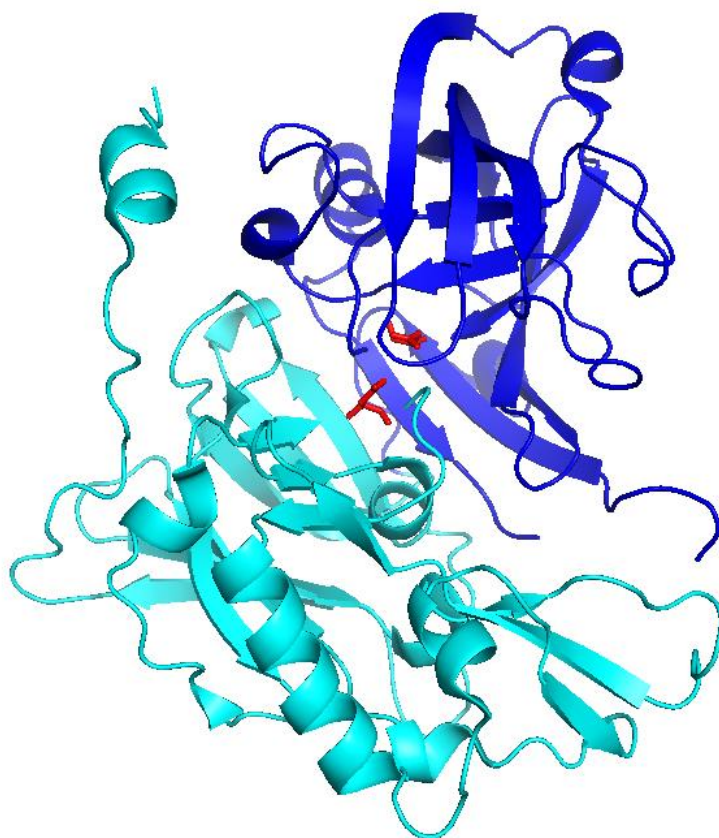


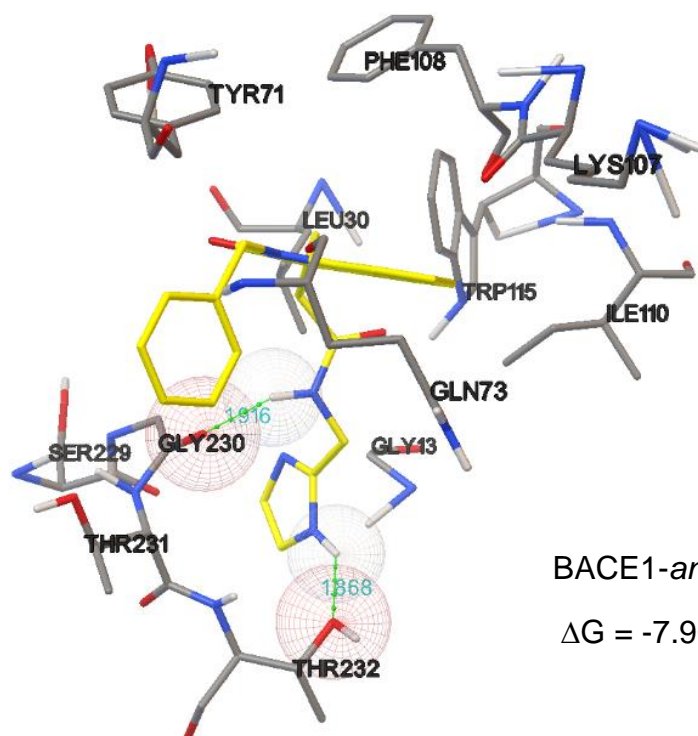
Figura 14. Estructura tridimensional de BACE1 humano. El lóbulo N-terminal de color azul y el lóbulo C-terminal es de color cian. El sitio activo con la díada catalítica de Asp 32 / Asp 228 se encuentra en el centro de ambos lóbulos en color rojo [38].

Tabla 3. Bolsillos y residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima BACE1 [38].

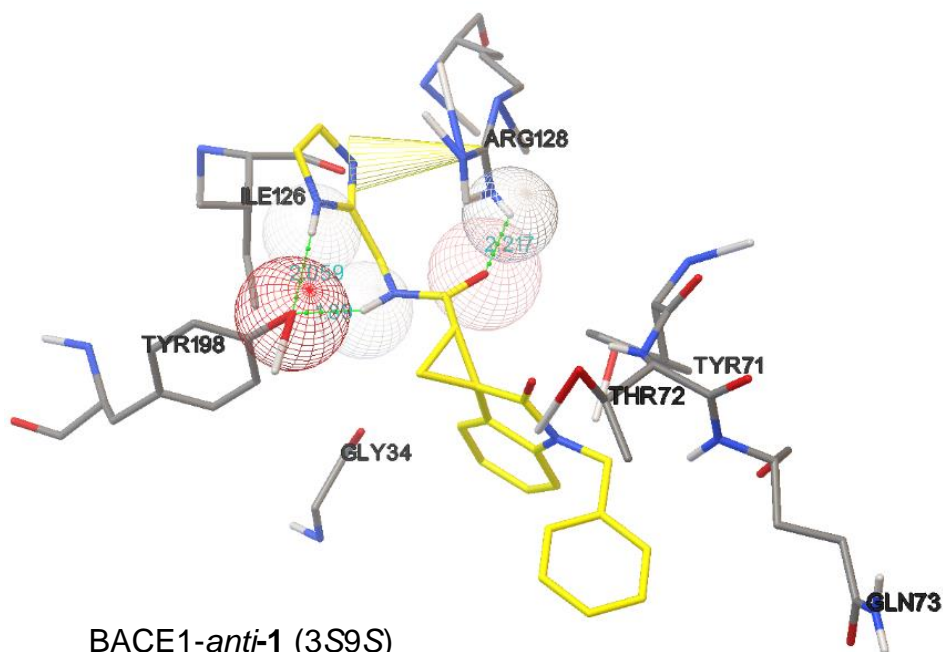
Bolsillo	Residuos de aminoácidos
S1, S3	Leu30, Phe108, Ile110, Ile118, Trp115.
S2, S4	Lys9, Ser10, Thr72, Gln73, Thr231, Thr232, Arg235, Arg307, Lys321.
S3', S4'	Pro70, Thr72, Glu125, Arg128, Agr195, and Trp197.
S2'	Ser35, Val69, Tyr71, Ile126, Tyr198.
S1'	Asp32, Asp228, Ile226, Val332.

Tomando en cuenta la información anterior, se realizó la identificación de las principales interacciones y las consecuencias que en ellas induce la estereoquímica de los ligandos propuestos. En cada caso se seleccionó la pose con mejor energía de unión (la más estable). Los complejos que obtuvieron los mejores puntajes se muestran en las Figuras 15-20, mientras que las interacciones se resumen en la Tabla 4, aquellas que coincidan con algún residuo de los bolsillos del sitio activo de BACE1 se muestran en rojo.

El análisis docking de los espirooxindoles *anti/syn-1* (Figuras 15 y 16), unidos al fragmento de imidazol, muestran una energía de unión dentro del sitio catalítico de BACE1 muy similar entre ellos, siendo los complejos BACE1-*syn-1* (3R9S) y (3S9R) los que presentan la mejor energía con -7.91 Kcal/mol. Las interacciones con los residuos de aminoácidos que se presentan, en su mayoría son residuos ubicados dentro de los bolsillos característicos del sitio activo, siendo las interacciones no polares las que más destacan, debido a la naturaleza hidrofóbica de las moléculas. La formación de puentes de hidrógeno es sabido que estabilizan de mejor manera la unión del complejo enzima-ligando, tres de los complejos BACE1-*anti/syn-1* presentaron puentes de hidrógeno a excepción del complejo BACE1-*syn-1* (3S9R).



BACE1-*anti-1* (3R9R)
 $\Delta G = -7.90$ Kcal/mol



BACE1-*anti-1* (3S9S)
 $\Delta G = -7.78$ Kcal/mol

Figura 15. Acoplamiento molecular de los espirooxindoles *anti-1* 3R9R y 3S9S y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.

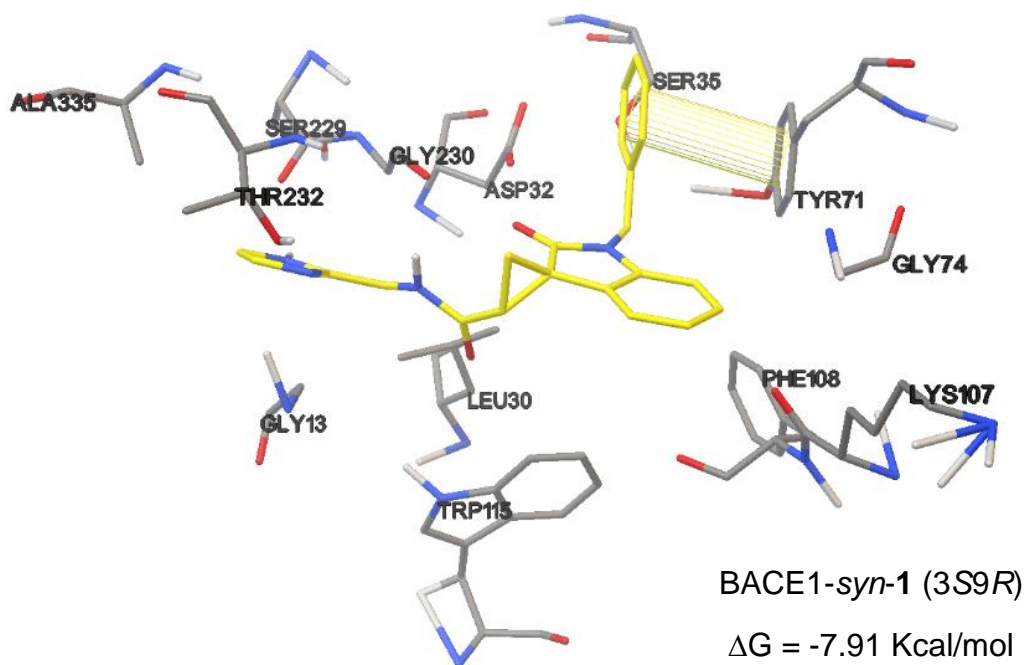
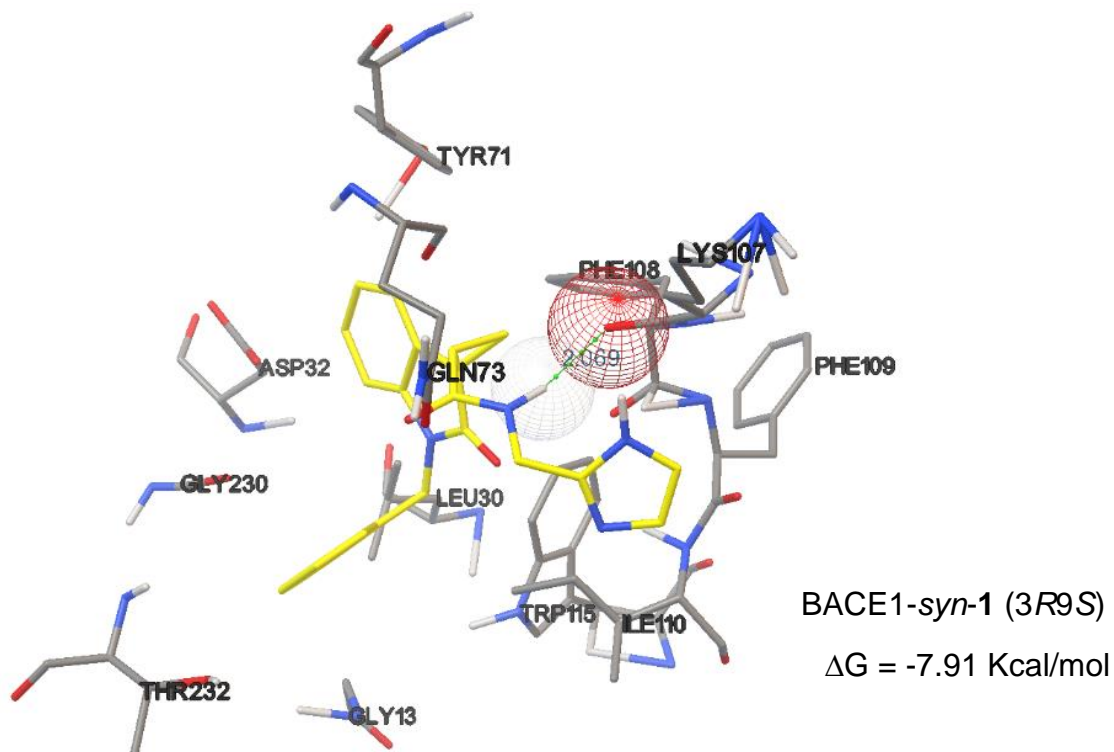
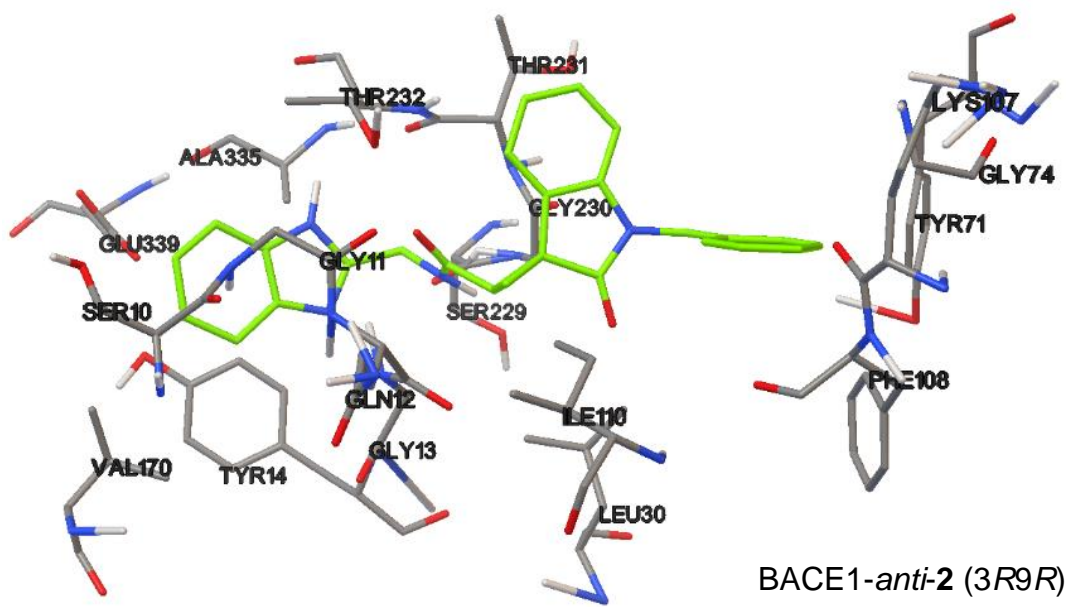
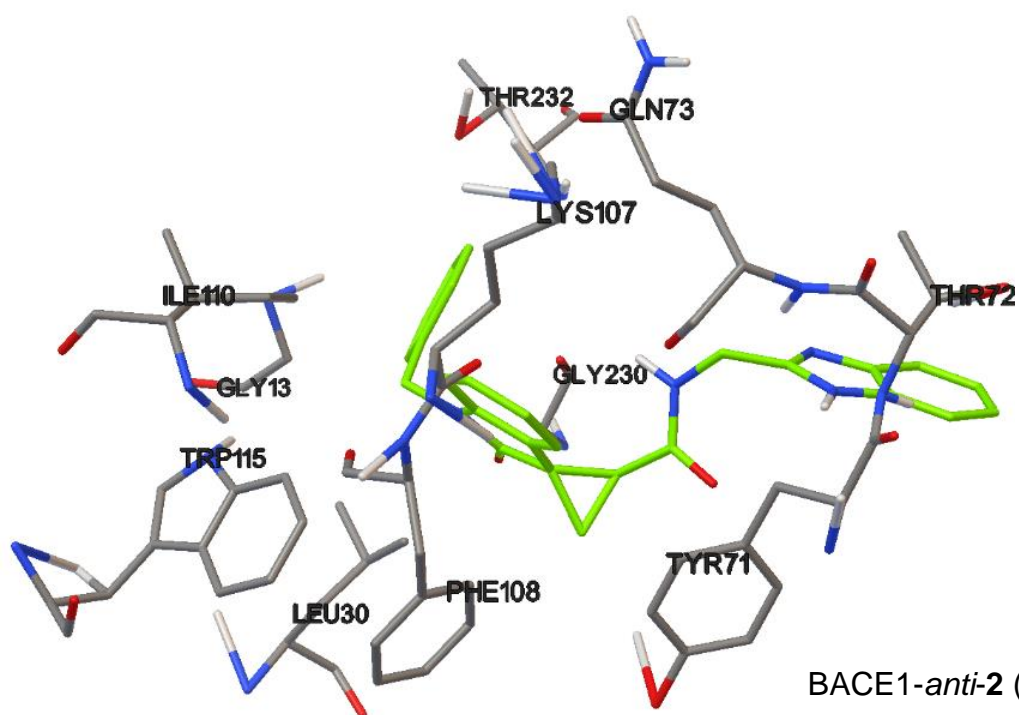


Figura 16. Acoplamiento molecular de los espirooxindoles *syn*-1 3R9S y 3S9R y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.



BACE1-*anti*-2 (3R9R)

$\Delta G = -9.65$ Kcal/mol



BACE1-*anti*-2 (3S9S)

$\Delta G = -8.13$ Kcal/mol

Figura 17. Acoplamiento molecular de los espirooxindoles anti-2 3R9R y 3S9S y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.

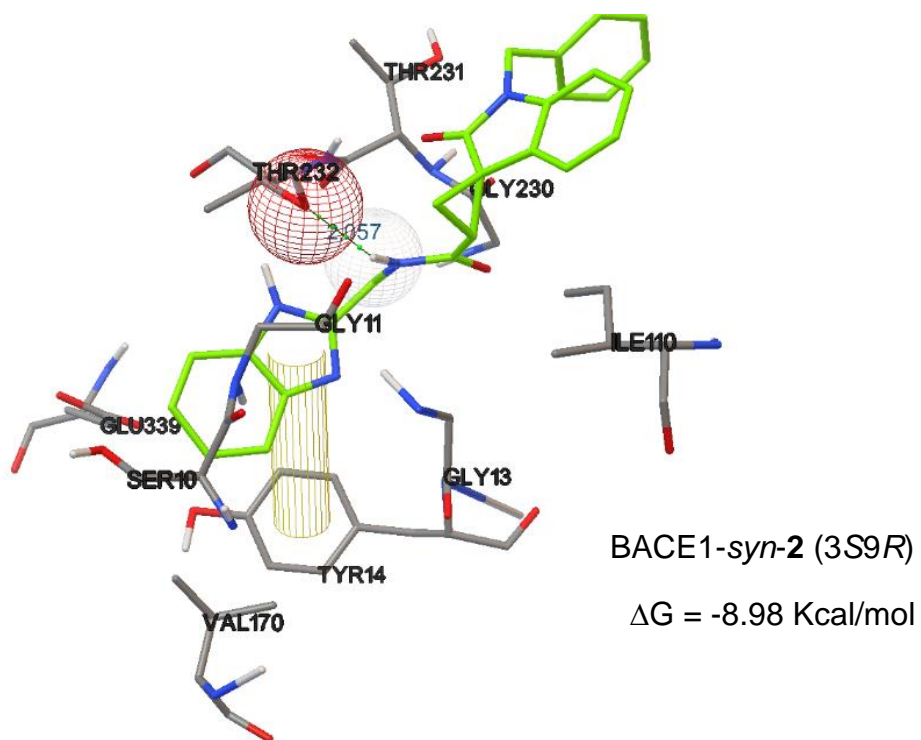
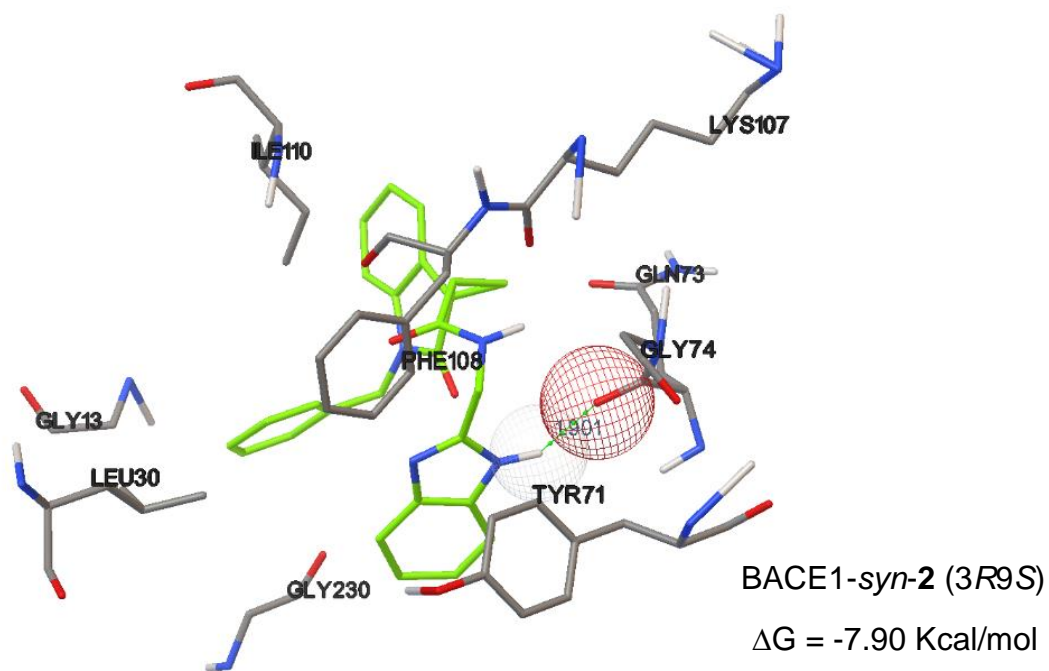


Figura 18. Acoplamiento molecular de los espirooxindoles *syn*-2 3R9S y 3S9R y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.

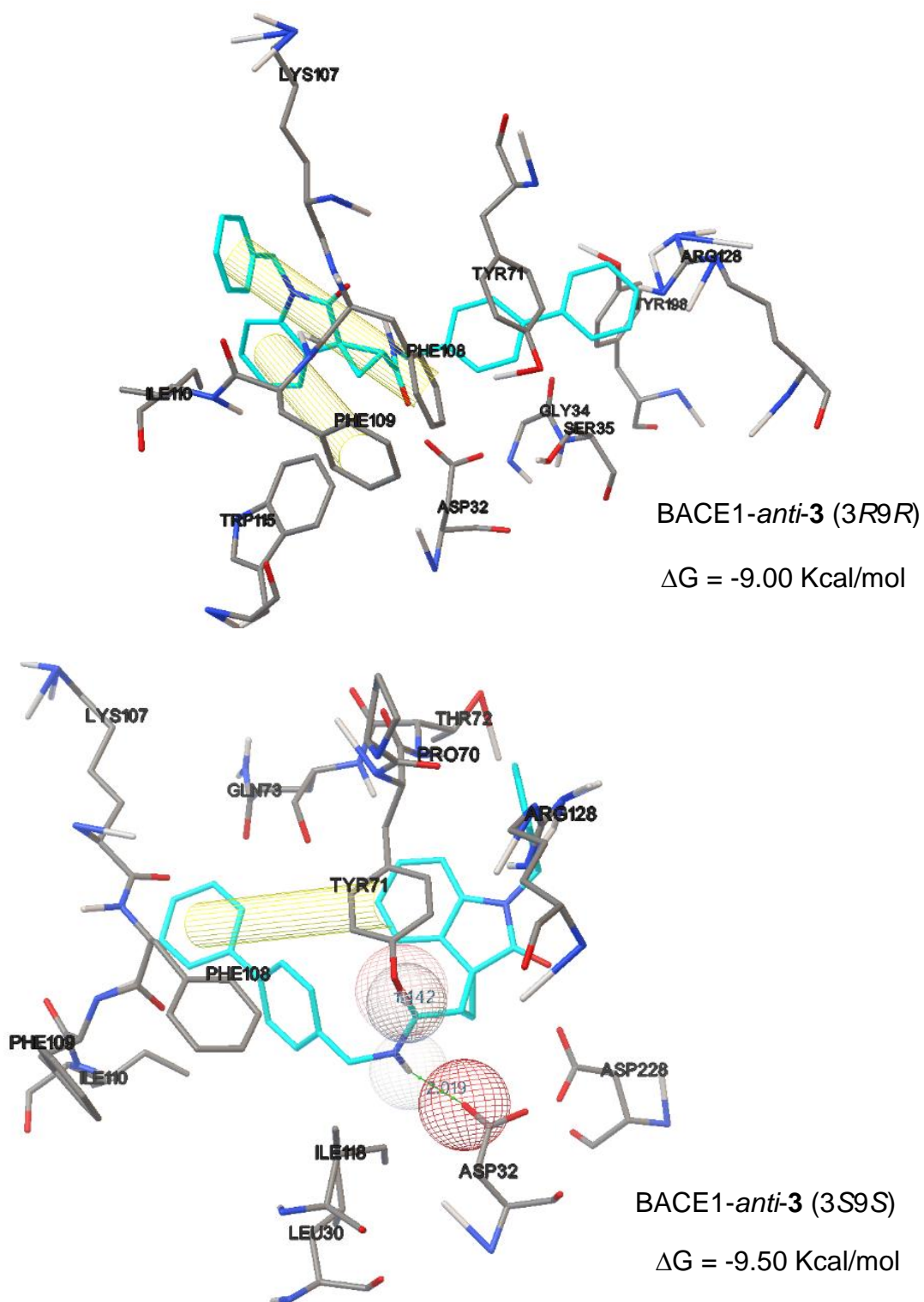


Figura 19. Acoplamiento molecular de los espirooxindoles *anti-3* 3R9R y 3S9S y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.

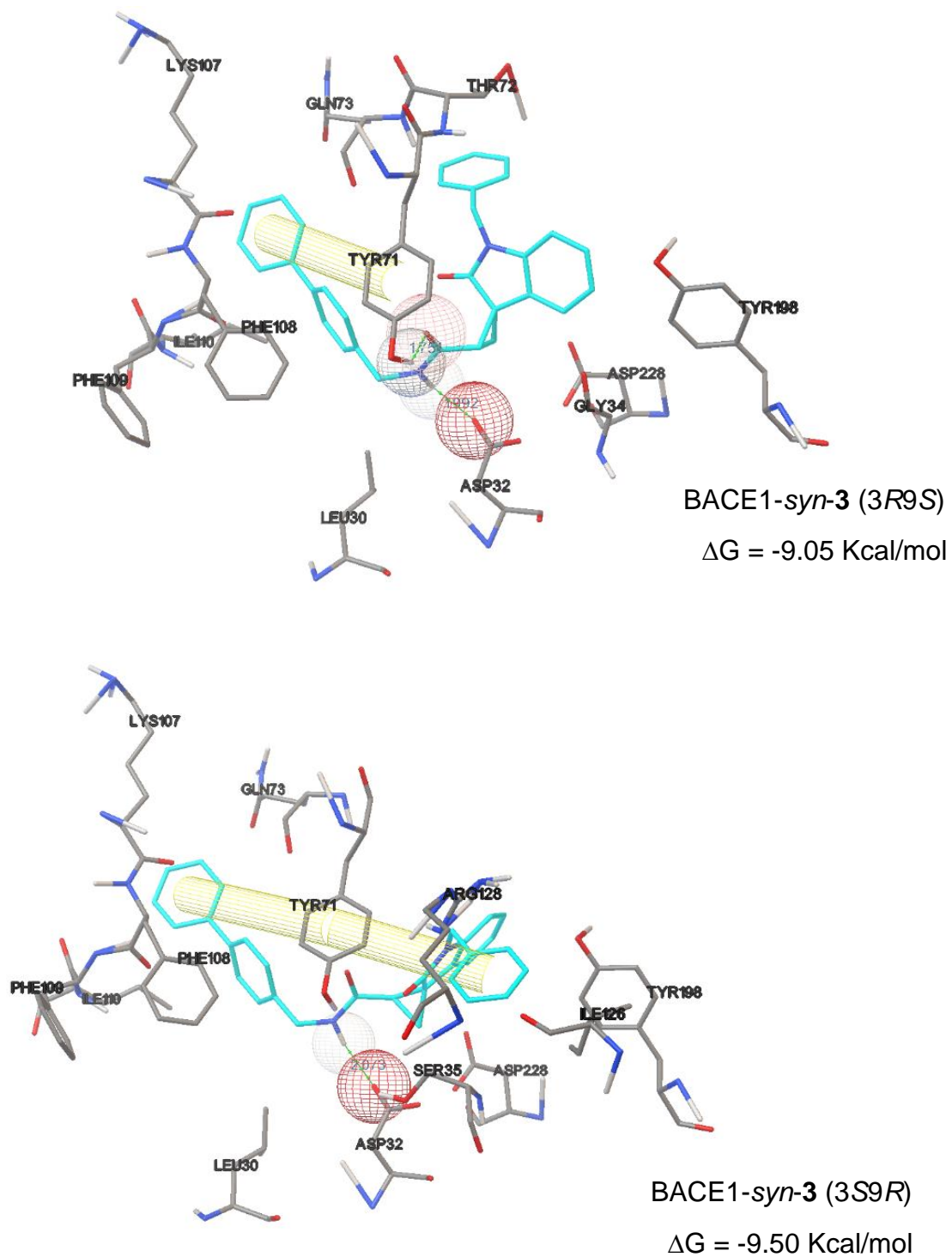


Figura 20. Acoplamiento molecular de los espirooxindoles *syn-3* 3R9S y 3S9R y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.

Tabla 4. Interacciones BACE1-ligando y energía de afinidad (ΔG) de los complejos.

Ligando	ΔG^a	Interacciones con residuos de aminoácidos			
		Polar	No polar	Puente de H ⁺	π - π
<i>anti-1</i> (3R9R)	-7.90	Q73, K107, T231, S229	G13, L30, Y71, F108, I110, W115	G230, T232	-
<i>anti-1</i> (3S9S)	-7.78	Q73, T232	G34, I126, Y71	R128, Y198	-
<i>syn-1</i> (3R9S)	-7.91	D32, Q73, T232	G13, L30, Y71, F108, F109, I110, W115, G230	K107	-
<i>syn-1</i> (3S9R)	-7.91	D32, S35, K107, S229, T232	G13, L30, G74, F108, W115, G230, A335	-	Y71
<i>anti-2</i> (3R9R)	-9.65	S10, Q12, K107, S229 T231, T232, E339	G11, G13, Y14 L30, G74, Y71, F108, I110, V170, G230, A335	-	-
<i>anti-2</i> (3S9S)	-8.13	T72, Q73, K107, T232	G13, L30, Y71, F108, I110, W115, G230	-	-
<i>syn-2</i> (3R9S)	-7.90	Q73, K107,	G13, L30, Y71, F108, I110, G230,	G74	-
<i>syn-2</i> (3S9R)	-8.98	S10, T231, E339	G11, G13, I110, V170, G230	T232	Y14

Tabla 4. Continuación.

Ligando	ΔG^a	Interacciones con residuos de aminoácidos			
		Polar	No polar	Puente de H ⁺	π - π
<i>anti</i> -3 (3R9R)	-9.00	D32, S35, K107, R128	G34, Y71, I110, W115, Y198	-	F108, F109
<i>anti</i> -3 (3S9S)	-9.50	P70, T72, Q73, K107, R128, D228	L30, F108, F109, I110, I118	D32, Y71	Y71
<i>syn</i> -3 (3R9S)	-9.05	T72, Q73, K107, D228	L30, G34, F108, F109, I110, Y198	D32, Y71	Y71
<i>syn</i> -3 (3S9R)	-9.50	S35, Q73, K107, R128, D228	L30, F108, F109, I110, I126, Y198	D32	Y71

^a kcal/mol. * Interacciones clave con residuos de aminoácidos de los bolsillos del sitio catalítico de BACE1.

Además de los puentes de hidrógeno, las interacciones π - π , que son causadas por el traslape intermolecular de los orbitales p en los sistemas conjugados π , también ayudan a estabilizar la unión de los complejos formados. En este caso, el complejo BACE1-*syn*-1 (3S9R) presenta una interacción con Tyr 71, dicha interacción está asociada a la presencia de anillos aromáticos entre ambas estructuras (Figura 16).

Es importante destacar las interacciones de tipo polar que se originan entre los residuos de ácido aspártico, Asp 32 y Asp 228, debido a que son la diada catalítica que escinden a la APP para dar lugar a los péptidos amiloides, entre los complejos formados de BACE1 *anti/syn*-1, solo el par de enantiómeros *syn*-1 3R9S y 3S9R originan una interacción de tipo polar con Asp 32, lo que conlleva gran importancia al tratar de crear un inhibidor para BACE1 (Figura 16).

Tomando en cuenta todos los factores para los complejos BACE1-*anti/syn-1* (Figuras 15 y 16), el mejor de todos ellos corresponde al complejo BACE1-*syn-1* (3R9S), al contar con la mejor energía de unión (-7.91 Kcal/mol), un mayor número de interacciones no polares y polares con residuos de aminoácidos de los bolsillos del sitio activo, así como un puente de hidrógeno con Lys 107 y una interacción de tipo no polar con Asp 32.

El estudio de las interacciones entre BACE1 y los espirooxindoles *anti/syn-2* (Figuras 17 y 18), unidos al fragmento de benzimidazol, muestran que el complejo con la mejor energía de unión es el BACE1-*anti-2* (3R9R) con -9.65 Kcal/mol, siendo este de entre todos los complejos analizados el que mejor energía de unión presentó. Además, el complejo BACE1-*anti-2* (3R9R) es el que más interacciones de tipo polar (7 interacciones) y no polar (11 interacciones) presenta, de las cuales la mayoría de estas son con residuos de aminoácidos característicos de los bolsillos del sitio activo de la enzima. Es importante mencionar que no presenta interacciones de tipo puente de hidrógeno o interacciones π - π , como si lo presentan los complejos BACE1-*syn-2* (3R9S) y (3S9R), y que ninguno de los complejos con el fragmento de benzimidazol interacciona con los residuos Asp 32 y Asp 228, cuya interacción mejoraría su potencial como posible inhibidor (Figura 17).

Por último, el análisis docking de las interacciones de los complejos BACE1-*anti/syn-3* (Figuras 19 y 20), unidos al fragmento de difenilo, demostraron tener una mejor energía de unión en comparación con los complejos formados con los fragmentos de imidazol y benzimidazol. Los complejos diastereoméricos BACE1-*anti-3*(3S9S) y BACE1-*syn-3*(3S9R) presentaron una energía de unión de -9.50 Kcal/mol. Ambos complejos lograron establecer interacciones con los residuos de la diada catalítica, Asp 32 y Asp 228, formando un puente de hidrogeno entre el nitrógeno del enlace amida con el Asp 32 y una interacción de tipo no polar con el Asp 228. Por otra parte, la formación de otro puente de hidrogeno entre el grupo carbonilo del enlace amida de los complejos BACE1-*anti-3*(3S9S) y BACE1-*syn-3* (3R9S) con Tyr 71, así como la formación de una interacción π - π con el aminoácido Tyr 71 ayudan a mejorar la estabilidad de los complejos. Al igual que con los complejos BACE1-*anti/syn-1,2*, los complejos BACE1-*anti/syn-3* formaron

interacciones de tipo polar y no polar con residuos característicos de los bolsillos del sitio activo de BACE1 (Figuras 19 y 20).

El análisis de los complejos formados, realizado con base en los valores más bajos de ΔG y la formación de interacciones tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas, predijo que el mejor complejo fue BACE1-*anti-3* (3S9S) con un valor de ΔG de - 9.50 Kcal/mol, y que además corresponde al clúster más poblado (Figuras 13, 19). El complejo BACE1-*anti-3* (3S9S) está estabilizado por la presencia de dos puentes de hidrógeno con Asp 32 y Tyr 71. Además, la presencia de los anillos aromáticos del grupo difenilo generan importantes interacciones hidrofóbicas con los residuos circundantes del sitio catalítico.

Haciendo una comparación con otros complejos de resultados similares (como el complejo BACE1-*anti-3* (3S9R), que presenta un valor de ΔG de -9.50 Kcal/mol) el complejo BACE1-*anti-3* (3S9S) es superior debido a que la distribución de poses dentro del sitio catalítico es mucho más representativo por ser el clúster más poblado con un valor del 90%, mientras que la distribución de poses en el complejo BACE1-*anti-3* (3S9R) logra alcanzar solo el 2%. Por lo tanto, la probabilidad de que esta pose se una dentro del sitio catalítico de BACE1 es demasiado baja (Tabla 2), (Figura 20).

Por otra parte, el complejo BACE1-*anti-2* (3R9R), presenta un valor de ΔG de -9.65 Kcal/mol y además corresponde al clúster más poblado. Sin embargo, este clúster solo representa el 18% de la población total (Figura 17) (Tabla 2). A pesar de generar el mayor número de interacciones hidrofóbicas de todos los complejos analizados, no presenta interacciones de tipo puente de hidrógeno y π - π que aumentarían la estabilidad del complejo, sin mencionar que no hay una interacción con los residuos de la díada catalítica Asp 32 y Asp 228, como si la hay en el complejo BACE1-*anti-3* (3S9S). Cabe aclarar que estos complejos no se descartan como potenciales inhibidores de BACE1, ya que es necesario llevar a cabo estudios de tipo biológico y farmacocinéticos para establecer su eficacia, pero el análisis *in silico* nos brinda información útil sobre los modos de unión con la enzima de interés.

5.1.2.2 Lanabecestat[®], un inhibidor de BACE1

Múltiples inhibidores de BACE1 se encuentran o han estado en diferentes fases de ensayos clínicos para el tratamiento de la EA. Entre ellos se encuentra el AZD3293 desarrollado por los laboratorios AstraZeneca, mejor conocido como Lanabecestat[®], que llegó a estudios clínicos fase III [39]. La estructura espiránica del Lanabecestat[®] se muestra en la Figura 21.

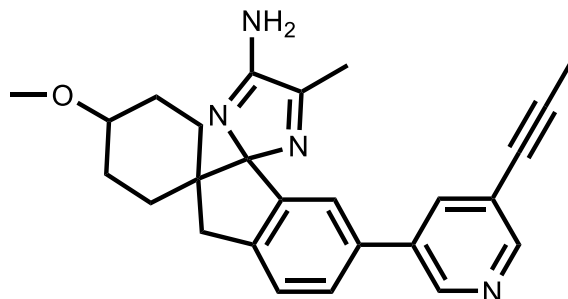


Figura 21. Estructura 2D del Lanabecestat[®] (AZD3293).

Estudios preclínicos en ratones transgénicos demostraron que el Lanabecestat[®], administrado principalmente por vía oral, previene la acumulación del péptido β -amiloidé al inhibir la enzima BACE1, por lo que podría retrasar los síntomas de la EA. Los estudios clínicos demostraron que, tanto en la fase I como en la fase II, Lanabecestat[®] posee una notable buena penetración de la barrera hematoencefálica y por ello un buen potencial contra la EA [40].

Los estudios de fase I se completaron en sujetos sanos y en pacientes con EA [41]. En un estudio de dosis única ascendente los resultados mostraron que Lanabecestat[®] se tolera bien sin efectos adversos graves observados hasta una dosis de 750 mg. Además, un estudio de dosis múltiples ascendentes demostró que Lanabecestat[®] reduce las concentraciones de A β 40 y A β 42 en el líquido cefalorraquídeo hasta en un 50 a 75% en dosis de 15 o 50 mg. Los ensayos de fase II y III se probaron en 1551 pacientes con deterioro cognitivo leve y EA leve, en un esquema de dosis de 20 a 50 mg, durante 104 semanas de duración [41].

En 2018, AstraZeneca anunció que los ensayos clínicos de fase III para Lanabecestat[®] no cumplían su criterio de valoración principal por lo que estos se

interrumpieron. Los efectos secundarios más comunes descritos fueron psiquiátricos, pérdida de peso y decoloración del cabello. Lo último probablemente debido a la inhibición de BACE2 en las células pigmentarias y hace eco de la despigmentación de la piel y el pelo observada en ratones, ratas, conejos y perros tratados con inhibidores no selectivos de BACE1/2 [42]. El Lanabecestat® se encuentra entre los inhibidores más potentes de BACE1 hasta ahora desarrollados [42].

5.1.2.3 Energía de unión de BACE1/1-3 vs. BACE1/Lanabecestat®

Con la finalidad de discernir la posible existencia de aquellas interacciones moleculares enzima-ligando, reconocidas como clave para inhibidores de BACE1, en los complejos BACE1/1-3 (Sección 5.1.3) y justificar así la síntesis química y posterior evaluación biológica de los espirooxindoles **1-3**, el complejo BACE1-Lanabecestat® se usó como modelo de referencia.

El examen de la energía de unión y de las interacciones moleculares entre el Lanabecestat® y BACE1 se llevó a cabo por análisis de la pose de acoplamiento más estable resultante del diagrama de interacción ligando-receptor del estudio docking, realizado siguiendo la metodología descrita para los espirooxindoles **1-3**.

Para analizar los resultados se seleccionó la conformación más estable (valor de menor energía de unión del complejo). El análisis de los resultados obtenidos muestra que el complejo formado entre la enzima BACE1 (PDB: 3UDK) y el inhibidor Lanabecestat® presenta una energía de unión de -8.60 Kcal/mol (Figura 22). Las interacciones del ligando con los residuos de aminoácidos son principalmente de tipo no polar y polar, se observan dos puentes de hidrógeno con Gln 73 y Ser 229. El Lanabecestat® forma cinco interacciones con los residuos ubicados dentro de los bolsillos característicos del sitio activo y no presenta algún tipo de interacción con los residuos Asp 32 y Asp 228 responsables de escindir la APP (Tabla 5).

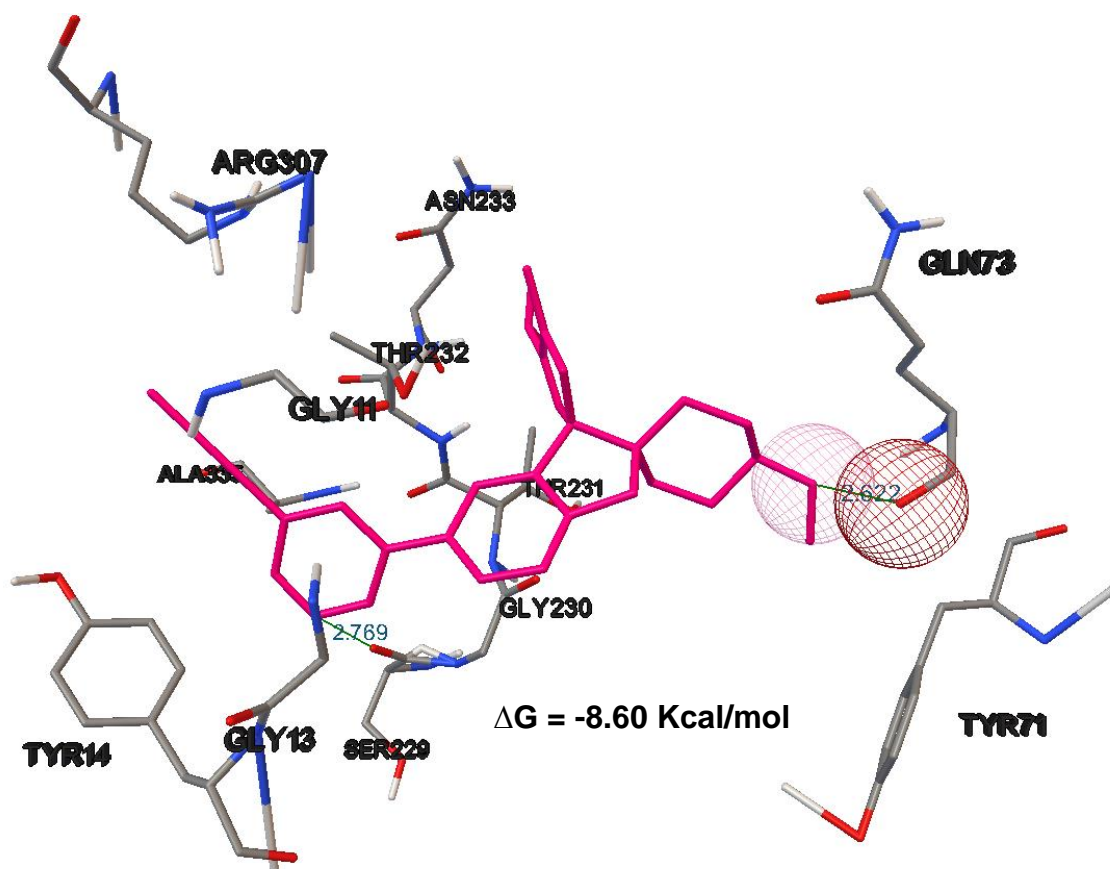


Figura 22. Acoplamiento molecular del inhibidor Lanabecestat® y su interacción con los residuos de aminoácidos dentro del sitio catalítico de BACE1.

Tabla 5. Interacciones BACE1-ligando y energía de afinidad (ΔG) del inhibidor Lanabecestat®.

Ligando	ΔG^a	Interacciones con residuos de aminoácidos			
		Polar	No polar	Puente de H ⁺	π - π
Lanabecestat®	-8.60	T231, T232, N233, R307	G11, G13, Y14, Y71, G230, A335	Q73, S229	-

^a kcal/mol. * Interacciones clave con residuos de aminoácidos de los bolsillos del sitio catalítico de BACE1.

Al comparar los resultados obtenidos a partir del complejo BACE1/ Lanabecestat® con aquellos de los complejos BACE1/**1-3** se observa que la energía de enlace es menor en los complejos BACE1/**3** que aquella obtenida con el inhibidor Lanabecestat® (Tabla 6). En particular, el complejo BACE1/*anti-3* (3S9S) muestra una energía de unión de -9.50 Kcal/mol y un porcentaje de distribución del 90%, lo que significa que el espirooxindol *anti-3* (3S9S) forma un complejo más estable con la enzima BACE1 respecto al inhibidor Lanabecestat®, que exhibe una energía de unión de -8.60 Kcal/mol y un porcentaje de distribución del 76% (Tabla 6).

Los resultados demuestran que las estructuras *anti/syn 2* y **3** pueden considerarse como posibles inhibidores de la enzima BACE1, siendo *anti-3* (3S9S) la mejor de entre ellas.

Tabla 6. Comparación de la distribución y energías de unión resultantes de los complejos enzima-ligando para la conformación más estable y para la más abundante, en paréntesis.

Complejo BACE1-ligando	Distribución del clúster (%)	Energía de unión (ΔG , Kcal/mol)
Lanabecestat ®	76 (76)	-8.60 (-8.60)
<i>anti-1</i> (3R9R)	2 (36)	-7.90 (-7.23)
<i>anti-1</i> (3S9S)	2 (52)	-7.78 (-7.47)
<i>syn-1</i> (3R9S)	50 (50)	-7.91 (-7.91)
<i>syn-1</i> (3S9R)	4 (44)	-7.91 (-6.22)
<i>anti-2</i> (3R9R)	18 (18)	-9.65 (-9.65)
<i>anti-2</i> (3S9S)	10 (42)	-8.13 (-7.71)
<i>syn-2</i> (3R9S)	48 (48)	-7.90 (-7.90)
<i>syn-2</i> (3S9R)	4 (30)	-8.98 (-7.55)
<i>anti-3</i> (3R9R)	6 (30)	-9.00 (-8.29)
<i>anti-3</i> (3S9S)	90 (90)	-9.50 (-9.50)
<i>syn-3</i> (3R9S)	22 (30)	-9.05 (-7.83)
<i>syn-3</i> (3S9R)	2 (30)	-9.50 (-8.31)

5.1.3 Predicción de propiedades ADME *in silico* de los espirooxindoles *antilsyn* 1-3

La gran cantidad de moléculas y la pequeña cantidad de muestras en la etapa inicial de los proyectos de química medicinal, junto con la necesidad de limitar la experimentación con animales, ha fomentado el uso de modelos computacionales que puedan predecir parámetros farmacocinéticos [43].

El desarrollo de fármacos implica la evaluación de parámetros farmacocinéticos tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), en etapas cada vez más tempranas en el proceso de descubrimiento, donde el número de compuestos considerados son numerosos pero la disponibilidad de sintetizarlos es escasa. En ese contexto, los modelos informáticos constituyen alternativas válidas a tomar en cuenta [44].

En la actualidad una gran variedad de métodos *in silico* comparten el objetivo de predecir los parámetros ADME a partir de la estructura molecular. El sitio web SwissADME es uno de estos sitios que permite el cálculo de parámetros clave fisicoquímicos y farmacocinéticos para una o varias moléculas. Dicho sitio desarrollado por el Instituto Suizo de Bioinformática contempla estudios tales como el trabajo pionero de Lipinski, quien definió parámetros fisicoquímicos para establecer si un compuesto tiene una alta probabilidad de ser un fármaco administrado oralmente, conocido como la regla de cinco de Lipinski. Así como trabajos elaborados por investigadores tales como Ghose, Veber, Egen y Muegge quienes de igual manera establecieron una serie de reglas para determinar la biodisponibilidad de una molécula [45].

El sitio SwissADME agrupó todos estos parámetros farmacocinéticos en una serie de listados, y parámetros fisicoquímicos en un gráfico tipo radar que contempla seis propiedades fisicoquímicas: lipofilicidad, tamaño, polaridad, solubilidad, flexibilidad e insaturaciones. Un rango fisicoquímico en cada eje fue definido por descriptores y representados como un área rosa en la que el gráfico de radar de una la molécula tiene que caer preferentemente, para ser considerado como un buen fármaco [45] (Figura 23).

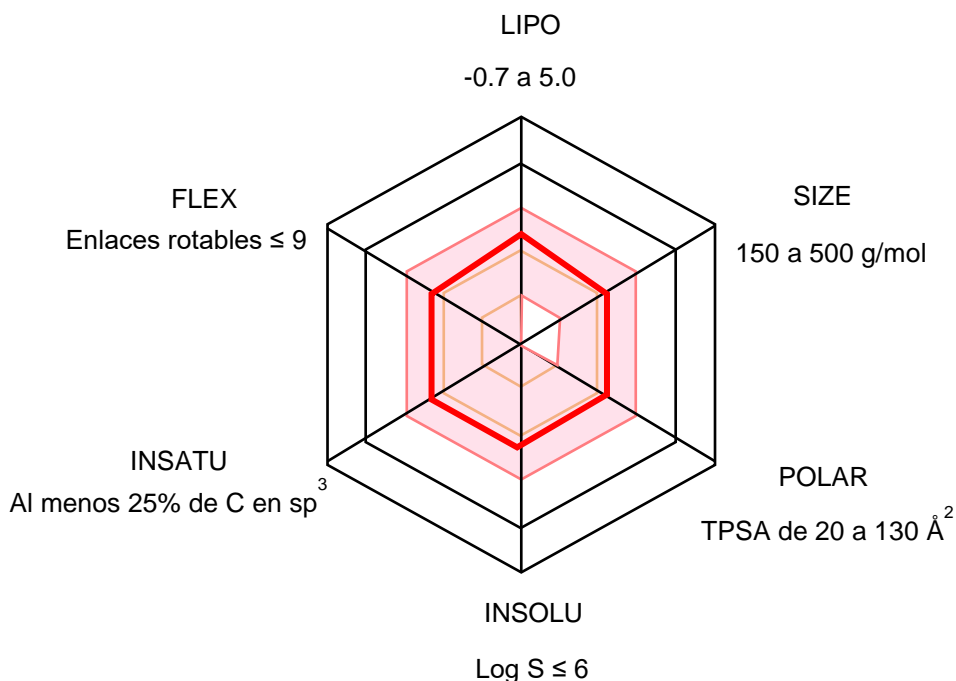


Figura 23. Gráfico tipo radar de biodisponibilidad que permite establecer la similitud de una molécula con un fármaco.

Empleando esta metodología se realizó el análisis de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3** con el fin de predecir si, previo a su síntesis, estos compuestos son potenciales candidatos a fármacos. Este análisis incluyó al inhibidor de BACE1 Lanabecestat[®]. La predicción de los parámetros ADME se realizó de manera paralela al estudio de docking molecular.

El análisis de las propiedades fisicoquímicas del inhibidor Lanabecestat[®], lo categoriza como un buen fármaco, debido a que las propiedades moleculares de su estructura no incumplen los parámetros establecidos por el sitio SwissADME (Tabla 7). Por otra parte, el análisis de los parámetros fisicoquímicos de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3**, arrojó un cumplimiento de 5 de entre los 6 parámetros establecidos por el sitio SwissADME, ya que exceden ligeramente en el número de insaturaciones (Tabla 7). Sin embargo, en general, se acepta que un principio activo para ser administrado por vía oral no debe violar más de una de las reglas establecidas.

Tabla 7. Gráfico de radar de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3 y el inhibidor Lanabecestat®.

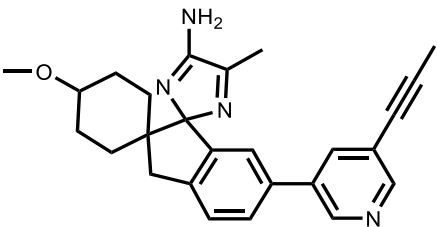
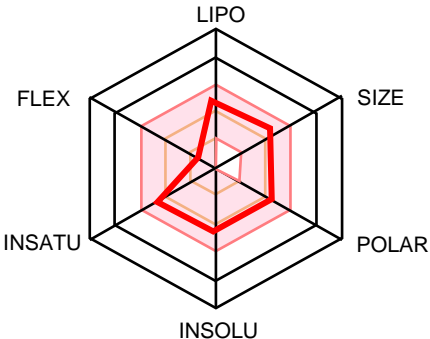
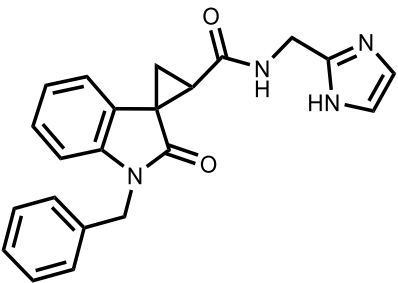
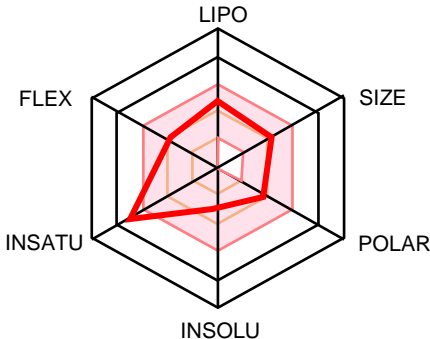
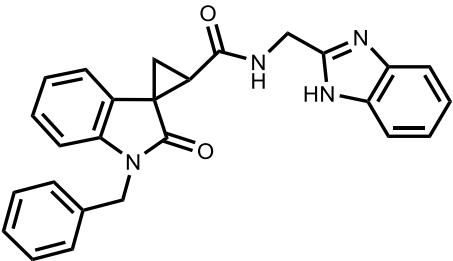
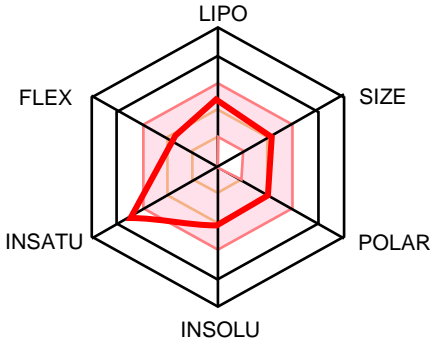
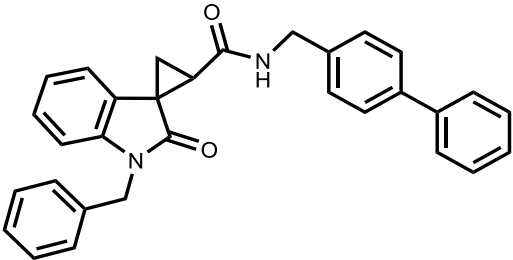
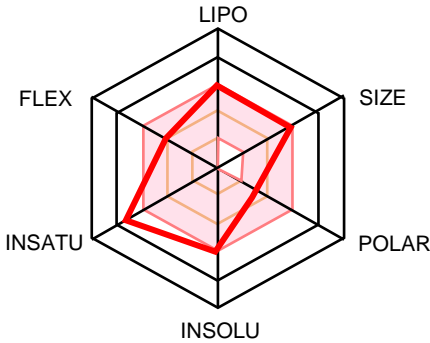
MOLÉCULA	GRÁFICO DE RADAR
 <p data-bbox="412 716 623 747">Lanabecestat®</p>	
 <p data-bbox="347 1171 683 1203">espirooxindol <i>anti/syn</i>-1</p>	
 <p data-bbox="347 1606 688 1638">espirooxindol <i>anti/syn</i>-2</p>	

Tabla 7. Continuación.

MOLÉCULA	GRÁFICO DE RADAR
 <p data-bbox="349 640 686 674">espirooxindol <i>anti/syn</i>-3</p>	

Los parámetros de lipofilidad y polaridad son factores que influyen de manera importante en la farmacocinética de fármacos. El análisis de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3 predice que estos se encuentran dentro de los límites establecidos (Tabla 7), lo que indica que dichas moléculas pueden presentar una buena absorción dentro del organismo.

5.1.3.1 Predicción de la permeabilidad hematoencefálica

Para que un fármaco sea eficaz, debe alcanzar su objetivo en el cuerpo en concentración suficiente y permanecer allí en forma bioactiva el tiempo suficiente para que ocurran los eventos biológicos esperados.

La absorción gastrointestinal y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica son dos comportamientos farmacocinéticos cruciales para estimar durante el proceso de descubrimiento de fármacos. Egan y colaboradores desarrollaron un modelo conocido como el “Huevo de Egan”, el cual es una representación descriptiva para discriminar entre moléculas bien absorbidas y mal absorbidas en función de su lipofilidad y polaridad, descrito por el coeficiente de partición n-octanol / agua ($\log P$) y el área topológica de superficie polar (TPSA) (Figura 24) [46]. Como la lipofilidad y la polaridad son a menudo propiedades inversamente correlacionadas,

las modificaciones químicas en una molécula que afectan simultáneamente a log P y TPSA son respaldadas eficientemente por el modelo. Estos beneficios prácticos hacen que el huevo de Egan sea ampliamente utilizado en contextos industriales y académicos [46].

El Instituto Suizo de Bioinformática, basándose en el modelo del Huevo de Egan, desarrolló un gráfico de huevo utilizando una base de datos con información acerca de la absorción gastrointestinal y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de más de 660 moléculas. El gráfico de huevo ofrece un método rápido, intuitivo y fácilmente reproducible que permite predecir la absorción gastrointestinal pasiva en la parte blanca o “clara” del gráfico y la permeabilidad hacia el cerebro en la parte amarilla o “yema” de pequeñas moléculas útiles para el descubrimiento y desarrollo de fármacos [47].

Dado que la enzima BACE1 se expresa abundantemente en las neuronas, los parámetros de lipofilicidad y polaridad juegan un papel fundamental en la evaluación de las propiedades farmacocinéticas de los espirooxindoles **1-3**. Con el fin de predecir si los espirooxindoles *anti/syn* **1-3** son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, se decidió realizar el gráfico del huevo propuesto por el Instituto Suizo de Bioinformática utilizando la lipofilicidad y polaridad de las moléculas propuestas. En este estudio se incluyó al inhibidor Lanabecestat®.

El gráfico del huevo predice que los espirooxindoles **2** y **3**, así como el Lanabecestat® son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, no así el espirooxindol **1** (Figura 24). Este resultado se atribuye a la mayor polaridad del fragmento heterocíclico de imidazol en **1** con respecto a los fragmentos de benzimidazol en **2** e hidrocarbonado en **3**.

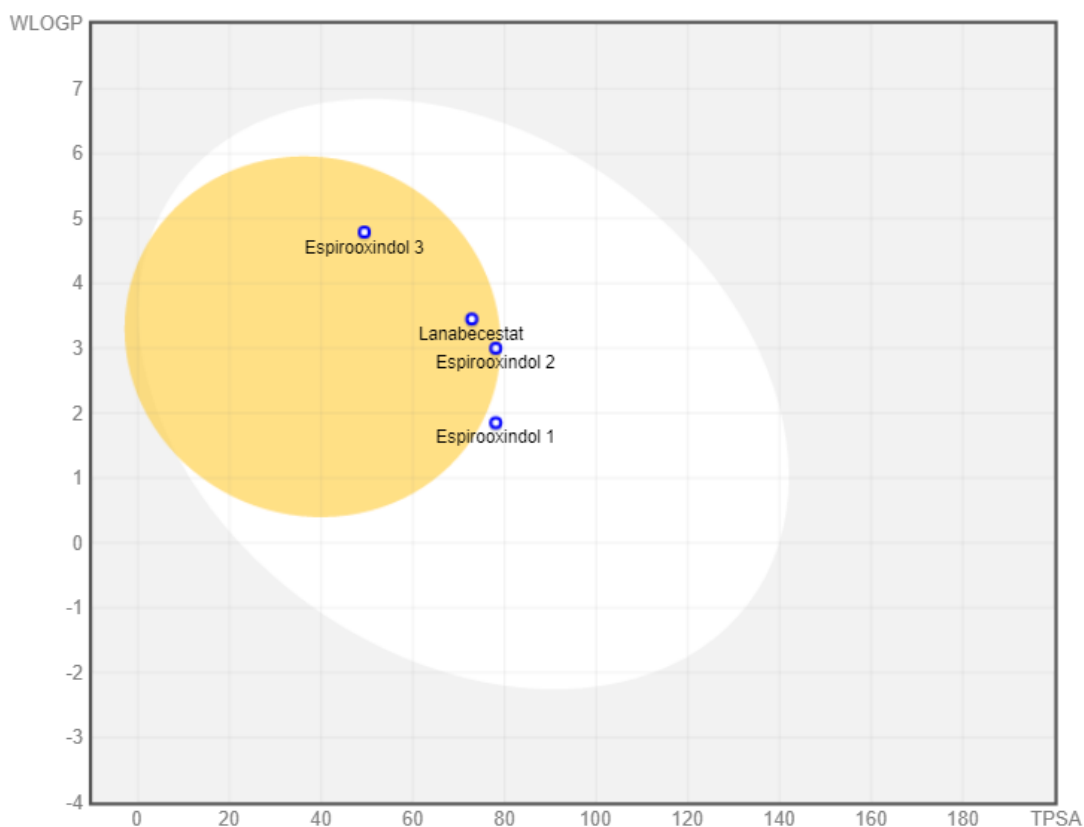


Figura 24. Gráfico de Huevo de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3, y el inhibidor Lanabecestat[®].

5.1.3.2 Predicción del comportamiento metabólico

En la tarea de investigación y desarrollo de nuevos fármacos, resulta de primera importancia el conocimiento de las rutas metabólicas de los fármacos. El metabolismo de los fármacos determina su comportamiento farmacocinético y la interacción que mantienen con otros compuestos. Por ello, el metabolismo de fármacos dentro del organismo es un factor importante dentro de los parámetros farmacocinéticos al diseñar una molécula. El sitio Swiss ADME proporciona información sobre este aspecto tomando en cuenta enzimas pertenecientes a la superfamilia del citocromo P450, involucradas en el metabolismo de los xenobióticos en el organismo, y la glicoproteína-P que expulsa gran cantidad de sustancias al exterior de las células con una amplia especificidad de sustrato [47]. Los espirooxindoles *anti/syn* 1-3 al igual que el inhibidor Lanabecestat[®] son sustrato de la glicoproteína-P, lo que disminuye su tiempo de vida dentro del organismo. Por

otro lado, los espirooxindoles mostraron ser inhibidores de enzimas como el CYP2C9, CYP2D6 y el CYP3A4 pertenecientes a la familia del citocromo P450, que al inhibir su función reduce el metabolismo de sus sustratos (Tabla 8). Esta información es útil para desarrollar la posología y formulación de un medicamento.

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3, y el inhibidor Lanabecestat®.

	Lanabecestat®	1	2	3
Absorción GI^a	Alta	Alta	Alta	Alta
Permeabilidad BHE^b	Si	No	Si	Si
Substrato P-gp^c	Si	Si	Si	Si
Inhibidor CYP2C9	No	Si	Si	Si
Inhibidor CYP2D6	Si	Si	Si	Si
Inhibidor CYP3A4	Si	Si	Si	Si

^a. Gastrointestinal. ^b. Barrera hematoencefálica. ^c. Glicoproteína P.

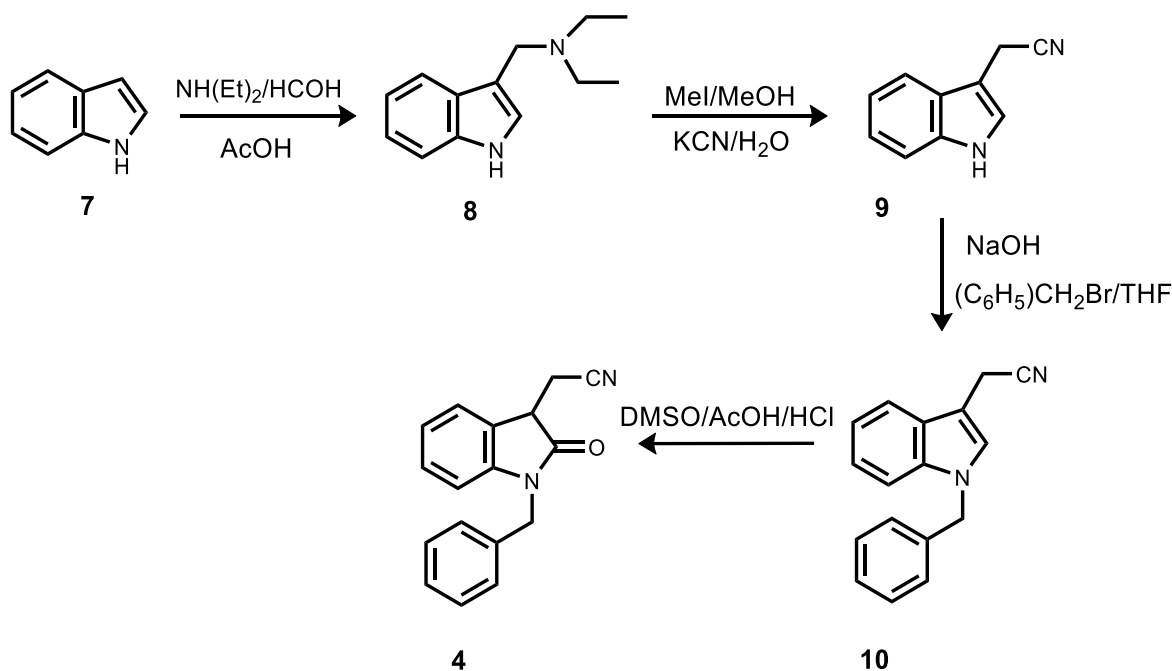
El estudio *in silico* en el sitio SwissADME, es un análisis empírico que brinda información predictiva acerca de las propiedades farmacocinéticas de una molécula, útiles en el diseño y desarrollo de un fármaco. Sin embargo, no sustituye lo estudios farmacocinéticos experimentales posteriores a la síntesis de un nuevo fármaco, pero ayuda a contemplar un panorama más amplio de posibilidades y puede dar una aproximación para reducir el tiempo y costos de experimentación durante el desarrollo de un proyecto.

5.2 Síntesis Química

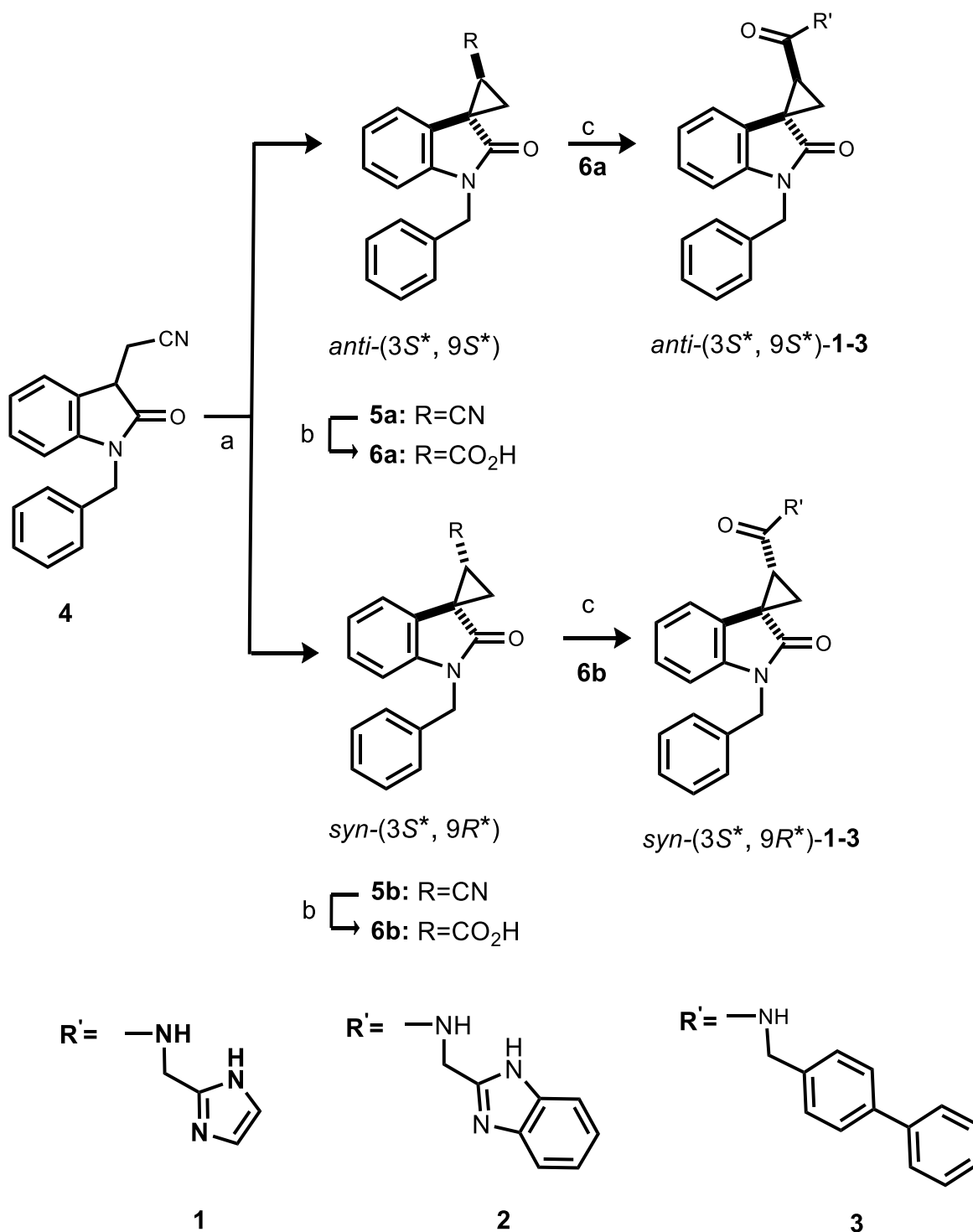
Después de demostrar a través del estudio *in silico* que los ligandos propuestos se unen teóricamente en el sitio catalítico de BACE1, se procedió a realizar la síntesis química de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3**.

En esta sección se presentan los resultados del desarrollo de una ruta de síntesis para la construcción del andamio de espirooxindol, así como una propuesta para la obtención de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3**; esto a través de la formación de un enlace amida resultante del bloque de construcción 3-cianobenciloxindol **4** con tres aminas comerciales: 2-(aminometil)imidazol, 2-(aminometil)benzimidazol y la (1,1'-bifenilo) -4-metilamina.

En una primera etapa, la síntesis del andamio de espirooxindol se inició a partir de la molécula de indol **7**, que por reacción de formilación-alkilación con $\text{NH}(\text{Et})_2$ y HCOH (reacción de Mannich) dio el 3-(dietilaminometil)indol **8** con un rendimiento de 60.8%. Se sintetizaron 40.0 g de **8** en lotes de 5 g como materia prima para las reacciones posteriores.



Esquema 4. Ruta de síntesis para la obtención del 3-cianobenciloxindol **4**.



Esquema 5. Propuesta de ruta de síntesis para la obtención de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3.

El tratamiento de 3-(dietilaminometil)indol **8** con MeI seguido de KCN dio lugar al 3-acetonitrilindol **9**, con un rendimiento de 81.6% (se sintetizaron 24.5 g). A continuación, el tratamiento del 3-acetonitrilindol **9** con bromuro de bencilo en agitación en un medio básico condujo al 3-acetonitrilindol-*N*-bencilado **10**, obteniendo un rendimiento del 76.1% (10.9 g). Para finalizar la obtención del 3-cianobenciloxindol **4** se efectuó una oxidación empleando 3-acetonitrilindol-*N*-bencilado **10** en un medio de DMSO/AcOH/HCl la cual será empleada para la siguiente etapa de síntesis (Esquema 4).

La propuesta de síntesis para la obtención de los espirooxindoles diastereoméricos **1**, **2** y **3** se planteó mediante la formación de un enlace amida a partir de un intermediario común, el 3-cianobenciloxindol **4**, que por un proceso de doble alquilación mediado por una base dará una mezcla diastereomérica de los espirooxindoles cianociclopropanos **5a** y **5b**, los que serán separados y purificados por métodos cromatográficos. La hidrólisis del grupo ciano al ácido carboxílico de **5a** y **5b** para dar **6a** y **6b** se llevará a cabo por tratamiento con K₂CO₃ en MeOH/H₂O. Finalmente, la formación del enlace amida se realizará por condensación de **6a** y **6b** con alguna de las tres aminas comerciales selectas, en presencia de un agente acoplante, la 1-etil-3-(3'-dimetilamino)carbodiimida (EDC) y del hidroxibenzotriazol (HOBt), cuya función es minimizar posibles reacciones secundarias, para dar lugar a los correspondientes espirooxindoles *anti/syn* **1-3** (Esquema 5).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La investigación realizada demostró que el empleo combinado de las técnicas FBDD y docking molecular son herramientas útiles en el diseño de nuevos andamiajes químicos como inhibidores de BACE1, abriendo múltiples opciones para el desarrollo de nuevos fármacos con indicaciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El diseño y evaluación *in silico* de nuevas estructuras basadas en un andamio de espirooxindol reveló que presentan afinidad frente a la enzima BACE1 comparable o incluso superior a la del inhibidor Lanabecestat[®], con una buena absorción gastrointestinal y capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que podrían ser inhibidores selectivos de dicha enzima.

Una vez concluida la síntesis química de los espirooxindoles **1-3**, se continuaría con estudios *in vitro* que confirmen que la unión espirooxindol-BACE1 presenta actividad biológica. Para tal efecto se usaría el método de fluorescencia FRET, que mide la actividad de la BACE1 por cuantificación de un sustrato peptídico (APP) en presencia de los potenciales ligandos.

Por tanto, el espirooxindol *anti-3* (3S9S) podría suponer un avance terapéutico en el tratamiento de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

7. METODOLOGÍA GENERAL

7.1 Métodos Computacionales

En esta sección se describen las herramientas computacionales que se emplearon para el análisis conformacional de los espirooxindoles *anti/syn* **1-3**, así como el estudio de docking molecular para identificar y caracterizar las interacciones entre la enzima BACE1 y los posibles ligandos.

7.1.1 Análisis conformacional

El análisis conformacional de las espirooxindoles *anti/syn* **1-3** se llevó a cabo en el programa Spartan 14', mediante el uso de cálculos de mecánica molecular utilizando el algoritmo de Monte Carlo en fase acuosa (MMFFaq), seguido del método Single Point Energy, empleando el nivel de cálculo B3LYP/6-31G* en fase acuosa. La selección de los conformeros más estables se realizó por comparación geométrica, valores energéticos y su contribución a la distribución de Boltzmann.

7.1.1.1 Optimización geométrica

La optimización de la geometría de los conformeros seleccionados de mínima energía se realizó con el programa Gaussian '09 empleando el nivel de cálculo B3LYP/6-31G+ (d, p) y teoría de funcionales de la densidad (DFT) en fase acuosa.

7.1.2 Docking molecular

El docking molecular es una técnica de mecánica molecular ampliamente utilizada para predecir energías y modos de enlace entre ligandos y proteínas, información de gran utilidad en el estudio de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. Para el estudio de acoplamiento proteína-ligando se utilizó el programa Autodock v4.2 MGL Tools v1.5.6. [48].

7.1.2.1 Metodología para la ejecución del programa AutoDockTools

Antes de iniciar con el acoplamiento la enzima BACE1 se importó al espacio de trabajo AutoDock. Se agregaron los átomos de hidrógeno polares y se calcularon las cargas de Kollman y Gasteiger para la proteína. La proteína se guardó en formato PDBQT que se utilizó como destino. El ligando se importó a la estación de trabajo, el árbol de torsión se definió eligiendo la raíz y el número de enlaces rotativos fue identificado y guardado en formato PDBQT. El ligando y la proteína se importaron en formato PDBQT al espacio de trabajo.

La asignación de los parámetros de la malla o cuadrícula es el paso más importante en el acoplamiento molecular, ya que acerca el ligando al sitio de unión con la

enzima. El criterio de búsqueda se refinó dentro de una zona de 60x60x60 Å, centrado en la región de los bolsillos del sitio activo de BACE1 (PDB: 3UDK), con una desviación media cuadrática (RMSD) de tolerancia en los resultados de 2.0 Å. La salida se guardó en formato de archivo de parámetros de cuadrícula (GPF). Se ejecutó AutoGrid proporcionando el archivo GPF como entrada y se convirtieron al archivo de registro de la cuadrícula (GLG). Luego la malla o cuadrícula fue ejecutada. Después de la ejecución exitosa de AutoGrid, el algoritmo genético se estableció por defecto y es el siguiente; 1) número de ejecuciones: 50; 2) poblaciones: 150; 3) evaluaciones energéticas: 25000000 y 4) el número de generaciones: 27000. Se utilizó el algoritmo genético de Lamarck y la salida se guardó en formato de archivo de parámetro de acoplamiento (DPF).

Se ejecutó AutoDock proporcionando archivos DPF como entrada, convertidos al archivo de registro de acoplamiento (DLG) y se inició el acoplamiento o docking. Se llevó a cabo un protocolo estándar con una población inicial al azar de 100 posiciones individuales y un número máximo de evaluaciones de energía de 25 x 107 por ciclo de análisis. Todos los parámetros se mantuvieron en su posición estándar. Se generaron 100 conformaciones de acoplamiento de la enzima para cada ligando, categorizadas en grupos (<clústers>) en función de la energía de afinidad (ΔG).

7.2 Determinación de Propiedades Farmacocinéticas

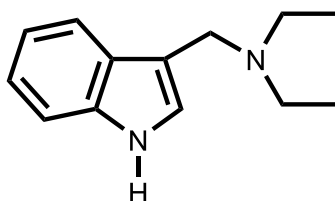
La predicción de las propiedades farmacocinéticas que conforman la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos se realizó utilizando el sitio SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) del Instituto Suizo de Bioinformática. Este análisis predictivo incluyó al inhibidor para BACE1 Lanabecestat[®], el cual logró llegar a estudios clínicos de fase III y los espirooxindoles *anti/syn* 1-3 que son candidatos como inhibidores de BACE1 para el tratamiento de la EA.

7.3 Síntesis Química

En este apartado se describe el proceso por el cual se sintetizó el andamio 2,3-dihidro-2-oxo-1-(fenilmetil)-1*H*-indol-3-acetonitrilo (**4**) (Esquema 4), precursor de los espirooxindoles *anti/syn* 1-3 (Esquema 5).

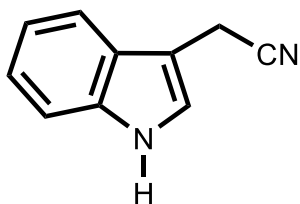
Las materias primas utilizadas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Chemical Co., sin purificación adicional. La cromatografía en capa fina se realizó usando placas precoladas con sílica gel 60 e indicador fluorescente (Merck Chem Co.), reveladas por luz ultravioleta a 254 nm o con $\text{Ce}(\text{SO}_4)$. La cromatografía en columna flash se realizó usando sílica gel 60 (Merck Chem Co.). Los puntos de fusión se determinaron en el equipo Fisher-Johns.

***N,N*-Diethyl-1*H*-indol-3-metilamina (8)**



A una solución acuosa de CH_2O al 37% (1.54 mL) enfriada en baño de hielo y con agitación magnética se agregó sucesivamente usando un embudo de adición, AcOH glacial (4 mL), $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)$ (2.12 mL) y finalmente indol **7** (2.0 g) manteniendo cuidadosamente la T a $5\text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla de reacción se continuó agitando a t. a. durante 17 h. Al terminar la reacción, el crudo se vertió sobre una solución de NaOH al 20% (aprox. 14 mL) enfriada a $5\text{ }^\circ\text{C}$, obteniéndose un precipitado que se filtró y se disolvió en AcOEt . La mezcla de reacción se lavó sucesivamente usando un embudo de separación con agua destilada y solución saturada de NaCl hasta neutralidad de las aguas de lavado. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo sólido se recristalizó en el mínimo volumen de AcOEt caliente ($55\text{ }^\circ\text{C}$) para dar **8** (2100 mg, 10.38 mmol, rendimiento 60.8%) como cristales incoloros (p. f. $106\text{ }^\circ\text{C}$, Lit. [49] $105\text{-}106\text{ }^\circ\text{C}$).

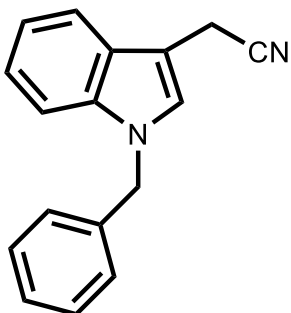
1*H*-Indol-3-acetonitrilo (9)



A una solución de **8** (1000 mg, 4.94 mmol) en MeOH (5.74 mL) enfriada a $5\text{ }^\circ\text{C}$, se le adicionó CH_3I (0.80 mL): La mezcla se agitó durante 2 h a t. a. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución de KCN (746 mg) en agua (1.38 mL). La mezcla de reacción se hirvió bajo reflujo durante 2 h. Posteriormente, la mezcla se llevó a t. a., se evaporó a sequedad y el residuo se particionó entre AcOEt y agua. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua y solución saturada de NaCl , se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y evaporó obteniéndose

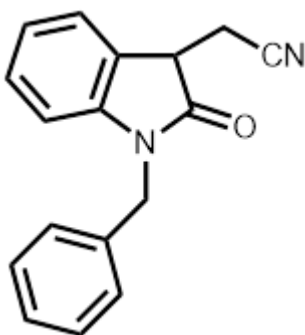
un líquido café viscoso que se purificó por destilación en un aparato Kugel-Rohr para dar **9** (630 mg, 4.03 mmol, rendimiento 81.6%) como un líquido viscoso amarillento traslúcido.

1-(Fenilmetil)-1*H*-indol-3-acetonitrilo (**10**)



A una solución de **9** (500 mg, 3.20 mmol) en THF (5 mL) enfriada en baño de hielo-agua, se le adicionó sucesivamente una solución de NaOH al 50% (5 mL) y sulfato ácido de tetrabutilamonio (50 mg). La mezcla se agitó durante 20 min a 5 °C y se le adicionó bromuro de bencilo (500 µL). La mezcla resultante se mantuvo a t. a. bajo agitación vigorosa por 17 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad con corriente de aire y el residuo se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó de manera sucesiva con agua y solución saturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y evaporó, obteniéndose un aceite viscoso café que se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel y eluída con una mezcla hexano-AcOEt (9:1) para dar **10** (600 mg, 2.43 mmol, rendimiento 76.1 %) como cristales ligeramente amarillos (p. f. 96 °C, Lit. [50] 96 °C).

2,3-Dihidro-2-oxo-1-(fenilmetil)-1*H*-indol-3-acetonitrilo (**4**)



A una mezcla de DMSO/AcOH/HCl conc. (10 mL en una proporción 4:2:1) bajo agitación magnética y a t. a. se añadió lentamente **10** (1.0 g, 3.82 mmol). Posteriormente la mezcla de reacción se mantuvo bajo reflujo a 90 °C durante 3 h. Al finalizar, se adicionó agua (10 mL) y se realizaron extracciones empleando diclorometano (3 x 15 mL). La fase orgánica se lavó de manera sucesiva con agua y solución saturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y evaporó a presión reducida. Finalmente, el residuo sólido se purificó por cromatografía en columna empacada con sílica gel y eluída con una mezcla hexano-AcOEt (7:3) para dar **4** (600 mg, 2.29 mmol, rendimiento 60.0%) como un sólido incoloro.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Imming, P. (2015). Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems. In the Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition. Elsevier Ltd.
2. Holbrook, S. Y. L., & Garneau-Tsodikova, S. (2017). What is medicinal chemistry? Demystifying a rapidly evolving discipline! Medicinal Chemistry Communications, 8(9), 1739–1741.
3. Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. Educacion Quimica, 28(1), 51–58.
4. Mandal, S., Moudgil, M., & Mandal, S. K. (2009). Rational drug design. European Journal of Pharmacology, 625(1–3), 90–100.
5. Reymond, J. L., Van Deursen, R., Blum, L. C., & Ruddigkeit, L. (2010). Chemical space as a source for new drugs. Medicinal Chemistry Communication, 1(1), 30–38.
6. Khedkar, S. A., Malde, A. K., & Coutinho, E. C. (2006). *In Silico* Screening of Ligand Databases: Methods and Applications. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 68(6), 689–696.
7. Carrasco-velar, R. (2008). Introducción al diseño racional de fármacos. Editorial Universitaria.
8. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. Nature Reviews Drug Discovery, 3(11), 935–949.
9. Mc.Conathy, J., & Owens, M. J. (2003). Stereochemistry in Drug Action. The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry, 05(02), 70–73.
10. Kato, R., Ikeda, N., Yabek, S. M., Kannan, R., & Singh, B. N. (1986). Electrophysiologic effects of the levo- and dextrorotatory isomers of sotalol in isolated cardiac muscle and their in vivo pharmacokinetics. Journal of the American College of Cardiology, 7(1), 116–125.

11. Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–18.
12. Morley, J. E., Farr, S. A., & Nguyen, A. D. (2018). Alzheimer Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, 34(4), 591–601.
13. P, S. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet*, 388, 505–517.
14. Galimberti, D., & Scarpini, E. (2011). Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 4(4), 203–216.
15. Imbimbo, B. P., & Watling, M. (2019). Investigational BACE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(11), 967–975.
16. Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 101–112.
17. Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(5), 387–398.
18. Venugopal, C., Demos, C. M., Rao, K. S. J., & Pappolla, M. A. (2008). Beta-Secretase: Structure, Function, and Evolution. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(3), 278–294.
19. Schaduangrat, N., Prachayasittikul, V., Choomwattana, S., Wongchitrat, P., Phopin, K., Suwanjang, W., & Nantasenamat, C. (2019). Multidisciplinary approaches for targeting the secretase protein family as a therapeutic route for Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, 39, 1730–1778.
20. González, J. F., Alcántara, A. R., Doadrio, A. L., & Sánchez-Montero, J. M. (2019). Developments with multi-target drugs for Alzheimer's disease: an overview of the current discovery approaches. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(9), 879–891.
21. Folch, J., Ettcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., & Camins, A. (2018). Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide. *Neurología, Sociedad Española de Neurología*, 33(1), 35–46.

22. Cummings, J., Ritter, A., & Zhong, K. (2018). Clinical Trials for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer's Disease: A Primer, Lessons Learned, and a Blueprint for the Future. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1), S3–S22.
23. Murray, C. W., & Rees, D. C. (2009). The rise of fragment-based drug discovery. *Nature Chemistry*, 1(3), 187–192.
24. Alex, A., & Flocco, M. (2007). Fragment-Based Drug Discovery: ¿What has it Achieved so Far? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(16), 1544–1567.
25. Kaur, M., Singh, M., Chadha, N., & Silakari, O. (2016). Oxindole: A chemical prism carrying plethora of therapeutic benefits. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 858–894.
26. Talele, T. T. (2016). The “cyclopropyl Fragment” is a Versatile Player that Frequently Appears in Preclinical/Clinical Drug Molecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(19), 8712–8756.
27. Coimbra, J. R. M., Marques, D. F. F., Baptista, S. J., Pereira, C. M. F., Moreira, P. I., & Dinis, T. (2018). Highlights in BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Frontiers in Chemistry*, 6, 1–10.
28. Kaur, M., Singh, M., Chadha, N., & Silakari, O. (2016). Oxindole: A chemical prism carrying plethora of therapeutic benefits. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 858–894.
29. W.C. Sumpter. (1945). The chemistry of oxindole. *Chemical Reviews*. (37) 443-479.
30. Morales-Ríos, M. S., González-Juárez, D. E., Rivera-Becerril, E., Suárez-Castillo, O. R., & Joseph-Nathan, P. (2007). One-pot synthesis of conformationally restricted spirooxindoles. *Tetrahedron*, 63(32), 7702–7707.
31. Wavefunction, I. (2014). Spartan'14 Manual. pp. 1–570
32. Tomberg, A. (2011). Gaussian 09W Tutorial. pp. 1–36.
33. Efremov, I. V., Vajdos, F. F., Borzilleri, K. A., Capetta, S., Chen, H., Dorff, P. H., Dutra, J. K., Goldstein, S. W., Mansour, M., & Withka, J. M. (2012). Discovery and optimization of a novel spiropyrrolidine inhibitor of β -secretase

- (BACE1) through fragment-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(21), 9069–9088.
34. Panigrahi, S. K., & Desiraju, G. R. (2007). Strong and weak hydrogen bonds in the protein-ligand interface. *Proteins*, 67, 128–14.
35. G. Efremov, R., O. Chugunov, A., V. Pyrkov, T., P. Priestle, J., M. Pentkovsky, V., S. Arseniev, A., & Jacoby, E. (2007). Molecular Lipophilicity in Protein Modeling and Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 393–415.
36. Gallina, A. M., Bork, P., & Bordo, D. (2014). Structural analysis of protein-ligand interactions: The binding of endogenous compounds and of synthetic drugs. *Journal of Molecular Recognition*, 27(2), 65–72.
37. Shimizu, H., Tosaki, A., Kaneko, K., Hisano, T., Sakurai, T., & Nukina, N. (2008). Crystal Structure of an Active Form of BACE1, an Enzyme Responsible for Amyloid β Protein Production. *Molecular and Cellular Biology*, 28(11), 3663–3671.
38. Mouchlis, V. D., Melagraki, G., Zacharia, L. C., & Afantitis, A. (2020). Computer-aided drug design of β -secretase, γ -secretase and anti-tau inhibitors for the discovery of novel Alzheimer's therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3).
39. Hassan, M., Shahzadi, S., Seo, S. Y., Alashwal, H., Zaki, N., & Moustafa, A. A. (2018). Molecular docking and dynamic simulation of AZD3293 and solanezumab effects against BACE1 to treat Alzheimer's disease. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 12(June), 1–11.
40. Cebers, G., Alexander, R. C., Haeberlein, S. B., Han, D., Goldwater, R., Ereshefsky, L., Olson, T., Ye, N., Rosen, L., Russell, M., Maltby, J., Eketjäll, S., & Kugler, A. R. (2017). AZD3293: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in healthy subjects and patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 55, 1039–1053.
41. Alexander, R., Budd, S., Russell, M., Kugler, A., Cebers, G., Ye, N., Olson, T., Burdette, D., Maltby, M., Paraskos, J., Elsby, K., Han, D., Goldwater, R., & Ereshefsky, L. (2014). AZD3293 a novel bace1 inhibitor: safety, tolerability

- and effects on plasma and CSF Ab peptides following single-and multiple-dose administration. *Neurobiology of Aging*. 35: S2.
42. Cebers, G., Lejeune, T., Attalla, B., Soderberg, M., Alexander, R. C., Budd Haeberlein, S., Kugler, A. R., Ingersoll, E. W., Platz, S., & Scott, S. W. (2016). Reversible and Species-Specific Depigmentation Effects of AZD3293, a BACE Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease, Are Related to BACE2 Inhibition and Confined to Epidermis and Hair. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. 3(4):202-218.
 43. Tian, S., Wang, J., Li, Y., Li, D., Xu, L., & Hou, T. (2015). The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86, 2–10.
 44. Ursu, O., Rayan, A., Goldblum, A., & Oprea, T. I. (2011). Understanding drug-likeness. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(5), 760–781.
 45. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 1–13.
 46. Egan, W. J., Merz, K. M., & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(21), 3867–3877.
 47. Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg to Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 1117–1121.
 48. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDock Tools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785–2791.
 49. Kühn, H., & Stein, O. (1937). About condensation of indoles with aldehydes and secondary amines, I. Mitteil: A new Gramin synthesis. *Reports of the German Chemical Society (A and B Series)*, 70 (3), 567–569.

50. Suvorov, N. N., Smushkevich, Y., Velezheva V. S., Rozhkov, V. S., & Sikamov, S. V. (1976). Synthesis of N-substituted indoles by extractive alkylation. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 12, pages 167–169.