

UCH-FC
DOC-Q
F 264
C.1



**SÍNTESIS DE TETRAHIDROCARBOLINAS COMO
INHIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASA CON
POSIBLE POTENCIACIÓN DEL RECEPTOR
NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA**

**TESIS
ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE**

DOCTOR EN QUÍMICA

Facultad De Ciencias

MANUEL IGNACIO FAÚNDEZ PARRAGUEZ

Noviembre, 2016

**Director de Tesis Dr. PATRICIO ITURRIAGA VÁSQUEZ
Co-director de Tesis Dra. ISABEL BERMÚDEZ DIAZ
Profesor Patrocinante Dr. NICOLÁS YUTRONIC SÁEZ**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Manuel Ignacio Faúndez Parraguez

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 15 de noviembre de 2016

Director de Tesis:

Dr. Patricio Iturriaga Vásquez

.....

Co-Director de Tesis:

Dra. Isabel Bermúdez Díaz

.....

Profesor Patrocinante:

Dr. Nicolás Yutrónic Sáez

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Cecilia Rojas (Presidente)

Dr. Carlos D. Pessoa Mahana

Dr. Ramiro Araya Maturana

Dr. Luis M. Vilches Herrera

"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa"

Mahatma Gandhi



Manuel Ignacio Faúndez Parraguez nació el 3 de abril de 1988 en la ciudad de Rancagua, Chile.

Su enseñanza básica la realizó en la escuela F-371 en la localidad de Nilahue Cornejo, comuna de Pumanque en la VI región de Chile. Sus estudios de enseñanza media los realizó en el Instituto Regional Federico Errázuriz en la ciudad de Santa Cruz, VI región.

En el año 2007 ingresó a estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Obtuvo su grado de licenciado en el año 2012 con el trabajo de investigación titulado “Síntesis de moléculas híbridas con actividad dual en monoaminooxidasas A y B” en el laboratorio de Biodinámica de la misma facultad bajo la dirección del Dr. Patricio Iturriaga. Ese mismo año ingresó al Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile ampliando sus conocimientos en el área de la Química Medicinal, desarrollando el trabajo de síntesis orgánica elaborando nuevos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.

Sus motivaciones científicas están centradas en el diseño y síntesis de compuestos orgánicos bioactivos y la simulación molecular específicamente en el área de la química computacional y el estudio de sistemas biológicos.

Agradecimientos

He culminado una etapa importante en mi vida. Han sido años donde he aprendido a apreciar de sobremanera lo que tengo y lo que hago; he aprendido que los límites de las capacidades desaparecen cuando uno pone pasión en lo que hace. Esto ha llevado a descubrirme, a valorar quien soy por lo que soy; a creer en lo que soy y lo que puedo hacer. Pero esta etapa no es un caminar solitario: son muchas las personas que me han acompañado en los procesos académicos y personales. Para ellos mi eterna gratitud pues gracias a ustedes soy lo que soy.

En primer lugar, a Dios y mi familia por estar siempre animándome y queriéndome incondicionalmente: a mis padres María y Manuel. A mis hermanos, Pyrita, Mati y Leo. A todos mis familiares que me apoyaron y me acompañaron en esta etapa.

Agradecer a Daniel por ser parte de mi vida, por su incondicional compañía y apoyo en los momentos alegres y duros de la vida. A Tamara por compartir su vida y su amistad sin disimular en ningún instante la locura que te caracteriza y que quiero y odio como tú sabes.

A los amigos que conocí en la universidad, la Mayo, Katy, Juanita, Isa, la Dani, la Mari, Nico, Karen, Yoyo, Álvaro, Sindy, Bárbara, el Lucho, la Cata, Juan Pablo, Salvador y el Toño. Por esas sobremesas eternas a la hora de almuerzo en el laboratorio. Momentos muy gratos que se disfrutaron mucho.

A mis amigos de la vida, a aquellos que conozco desde chico y a aquellos que conocí con el tiempo que se han transformado en parte fundamental de mi vida y que quiero mucho, Allyson, Andrés, el Gio, el Nico, la Carlilla, la Fran, Rodrigo, el Seba, Brayan, Iván, Hugo y Hans.

Quiero agradecer, de manera muy especial, al Profesor Nicolás Yutrónic por toda su ayuda, sus consejos y por aceptarme en su laboratorio durante la mayor parte de la realización de esta tesis. Por la diligencia y preocupación en los quehaceres diarios.

Al Dr. Patricio Iturriaga y la Dra. Isabel Bermúdez por toda su colaboración y ayuda; por permitirme ser parte del TeamNicotínico base de mi formación como químico.

A la comisión de evaluación de esta tesis: a la Dra. María Cecilia Rojas, al Dr. David Pessoa, al Dr. Ramiro Araya y al Dr. Marcelo Vilches. Por sus valiosos aportes. Su paciencia y buena disposición cuando corría detrás de ellos para rendir los exámenes en las fechas que necesitaba. Les agradezco porque fueron parte importante en mi formación.

Agradezco de manera muy especial también a los profesores Patrick Dallemagne, Christophe Rochais y Cédric Lecoutey del Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie en la ciudad de Caen en Francia, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo en mi pasantía doctoral y por su gran aporte en la construcción de la tesis que presento. Y en relación a esta pasantía, recuerdo y agradezco a grandes amigos que conocí en esa ciudad: Alba, David, Cecilia, Sandra, Steven y José. Por su cariño y por hacerme parte de su familia cuando la de uno estaba lejos.

Quiero agradecer también al Dr. Mario Faúndez de la Pontificia Universidad Católica de Chile y por su gran aporte en la evaluación biológica de mis compuestos por su disposición y su gran ayuda.

Agradezco a CONICYT por otorgarme la Beca de Doctorado Nacional, junto con el financiamiento de los Gastos de Operación y de Pasantía Doctoral. A la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y los Profesores que fueron parte de mi formación: al Dr. Bruce Cassels por su disposición y su valiosa ayuda, al igual que al Dr. Guillermo González y al Dr. Paul Jara.

En resumen, comparto con mucha gratitud este trabajo agradeciendo a todos quienes han estado conmigo.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.	1
1.1.	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	4
1.1.1.	Generalidades	4
1.1.2.	Causas de la Enfermedad de Alzheimer	6
1.1.4.	Alteraciones Estructurales	8
1.1.5.	Alteraciones neuroquímicas	10
1.2.	NEUROTRANSMISORES	11
1.3.	ACETILCOLINA (ACh)	12
1.4.	ACETILCOLINESTERASA (AChE)	14
1.4.1.	Donepezil como inhibidor de acetilcolinesterasa	16
1.4.2.	Estructuras de los inhibidores de acetilcolinesterasa	16
1.5.	RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA	19
1.5.1.	Ligandos receptor nicotínico de acetilcolina	22
1.5.2.	Moduladores Alostéricos del Receptor Nicotínico de Acetilcolina	23
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
2.1.	FORMULACIÓN DE PROYECTO	27
2.2.	HIPÓTESIS	27
2.3.	OBJETIVOS	28
3.	METODOLOGÍA	29
3.1.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1.1.	General	30
3.1.2.	Medición de la Actividad Catalítica de Acetilcolinesterasa	31
3.1.3.	Determinación del Mecanismo de Inhibición de Acetilcolinesterasa	33
3.1.4.	Estudio de modulación alostérica del Receptor Nicotínico de Acetilcolina	35
3.1.5.	Modelación Molecular de la enzima Acetilcolinesterasa	36

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1.	Química de los compuestos sintetizados.....	39
4.2.	Ensayos de cinética enzimática: inhibición de acetilcolinesterasa.	73
4.2.1.	Curvas dosis-respuesta de las moléculas sintetizadas sobre acetilcolinesterasa humana.....	75
4.3.	Estudio de la modulación alostérica del receptor nicotínico de acetilcolina.	88
4.4.	Modelación molecular de los inhibidores sintetizados sobre acetilcolinesterasa.	90
5.1.	RESUMEN OPERATIVO	102
5.2.	CONCLUSIONES	107
6.1.	ANEXO I: SINTESIS DE COMPUESTOS.	108
6.1.1.	Síntesis de ácido 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acético (a4).....	108
6.1.1.1.	2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol (a2)	108
6.1.1.2.	2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetato de metilo (a3)	109
6.1.1.3.	Ácido 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acético (a4).....	110
6.1.2.	6-metoxi-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol (a6)	111
6.1.3.	Síntesis de 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a10)	111
6.1.3.A.1.	PROCEDIMIENTO A: N'-benciliden-4-(metilamino)piperidina. (a8).....	112
6.1.3.A.2.	N'-benciliden-1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a9) ¹⁰⁶	112
6.1.3.A.3.	1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a10) ¹⁰⁶	113
6.1.3.B.1	PROCEDIMIENTO B: 1-bencilpiperidin-4-carboxamida (a12) ¹⁰⁷	114
6.1.3.B.2.	1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a10) ¹⁰⁸	114
6.1.5.	N-((1- <i>tert</i> -butoxicarbonilpiperidin-4-il)metil)-2-cloroacetamida (a16)	116
6.1.6.	N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-cloroacetamida (a17)	117
6.1.7.	Síntesis de 1-bencil-4-(metilhidroxi)piperidina (a20).....	117
6.1.7.1.	1-bencilpiperidin-4-carboxilato de etilo (a19) ¹⁰⁶	117
6.1.7.2.	1-bencil-4-(metilhidroxi)piperidina (a20) ¹⁰⁶	118

6.1.8.	2-cloroacetato de (N-(1-bencilpiperidin-4-il)metilo).....	119
6.1.9.	2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)-N- (1-Boc-piperidin-4-il-metil)acetamida (a22)	120
6.1.10.	2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)-N- (1-Boc-piperidin-4-il-metil) acetamida (MF1066) (a23)	120
6.1.11.	2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)-N- (piperidin-4-il-metil) acetamida (a24)	121
6.1.12.	2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)-N- (piperidin-4-il-metil) acetamida (a25)	122
6.1.13.	2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol (a27)	123
6.1.14.	8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol (a29)	123
6.1.15.	N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetamida (MF1047) (a30)	124
6.1.16.	N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>] indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetamida (MF1042) (a31)	125
6.1.17.	N-((1-propilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1064) (a32).....	126
6.1.18.	2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1050) (a33)	127
6.1.19.	2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetato de (1- bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1046) (a34)	128
6.1.20.	N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1073) (a35).....	129
6.1.21.	N-((1-(3-bromobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> - pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1081) (a36).....	130
6.1.22.	N-((1-(3-fluorobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> - pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1082) (a37).....	131
6.1.23.	N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4- dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1083) (a38).....	132

6.1.24.	Síntesis de ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) propanoico (a40)	133
6.1.24.1.	3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) propionato de metilo (a39).....	133
6.1.26.1.	Ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) propanoico (a40)	134
6.1.25.	Síntesis de 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil) isoindolin-1,3-diona (MF1056) (a43)	135
6.1.25.1.	2-((piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (a42).....	135
6.1.25.2.	2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (MF1056) (a43).....	136
6.1.26.	N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1053) (a44).....	137
6.1.27.	N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1062) (a45).....	138
6.1.28.	2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (MF1061) (a46)	139
6.1.29.	Síntesis de 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) benzonitrilo (NS9283) (a51)	140
6.1.29.1.	N'-hidroxinicotinimidamida (a48).....	140
6.1.29.2.	Cloruro de 3-cianobenzoilo (a50).....	141
6.1.29.3.	3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)benzonitrilo (NS9283) (a51).....	141
7.	REFERENCIAS.....	143
	ANEXO II	151
	Moléculas involucradas en esta tesis.....	151
	Moléculas evaluadas como inhibidores de acetilcolinesterasa.	153
	ANEXO III.....	154
	RMN- ¹ H N'-Hidroxinicotinimidamida (a48)	154
	RMN- ¹ H 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) benzonitrilo (NS9283) (a51).....	155
	RMN- ¹³ C 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) benzonitrilo (NS9283) (a51)	155

RMN- ¹ H 2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol (a2)	156
RMN- ¹ H 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetato de metilo (a3)	156
RMN- ¹ H Ácido 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acético (a4)	157
RMN- ¹ H 6-metoxi-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol (a6)	157
RMN- ¹ H 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a10)	158
RMN- ¹ H 1-bencilpiperidin-4-carboxamida (a12).....	158
RMN- ¹ H 2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol (a27).....	159
RMN- ¹ H 8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol (a29)	159
RMN- ¹ H 1-bencilpiperidin-4-carboxilato de etilo (a19)	160
RMN- ¹ H 1-bencil-4-(metilhidroxi)piperidina (a20).....	160
RMN- ¹ H 1 <i>H</i> -indol-3-carboxaldehído	161
RMN- ¹ H 3-(2-nitrovinil)-1 <i>H</i> -indol.....	161
RMN- ¹ H (1 <i>H</i> -indol-3-il)metanoamina	162
RMN- ¹ H 1,3-dioxoisindolin-2-carboxilato de etilo.....	162
RMN- ¹ H 5-metoxitriptamina.....	163
RMN- ¹ H 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetato de etilo	163
RMN- ¹ H 8-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol.....	164
RMN- ¹ H (8-cloro-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)) carboxilato de etilo.....	164
RMN- ¹ H 8-bromo-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol.	165
RMN- ¹ H (8-bromo-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)) carboxilato de etilo.....	165
RMN- ¹ H (8-fluor-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)) carboxilato de etilo.....	166
RMN- ¹ H (4-(2-(4-nitrofenil)hidrazono)piperidin)-1-carboxilato de etilo.....	166
RMN- ¹ H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetamida (MF1047) (a30)	167
RMN- ¹³ C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido [3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetamida (MF1047) (a30)	167
RMN- ¹ H N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>] indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetamida (MF1042) (a31)	168

RMN- ¹³ C N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il) acetamida (MF1042) (a31)	168
RMN- ¹ H N-((1-propilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1064) (a32).....	169
RMN- ¹ H 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)-N-(1-Boc-piperidin-4-il-metil) acetamida (MF1066) (a23).....	169
RMN- ¹ H 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1050) (a33).....	170
RMN- ¹³ C 2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1050) (a33).....	170
RMN- ¹ H 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1046) (a34).....	171
RMN- ¹³ C 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1046) (a34)	171
RMN- ¹ H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1073) (a35).....	172
RMN- ¹³ C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1073) (a35).....	172
RMN- ¹ H N-((1-(3-bromobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1081) (a36).....	173
RMN- ¹³ C N-((1-(3-bromobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1081) (a36).....	173
RMN- ¹ H N-((1-(3-fluorobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1082) (a37).....	174
RMN- ¹³ C N-((1-(3-fluorobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1082) (a37).....	174
RMN- ¹ H N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1083) (a38).....	175
RMN- ¹³ C N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4-b]indol-2(9 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1083) (a38).....	175

RMN- ¹ H ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) propanoico (a40)	176
RMN- ¹³ C ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indol-2(9 <i>H</i>)-il) propanoico (a40)	176
RMN- ¹ H 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (MF1056) (a43)	177
RMN- ¹³ C 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (MF1056) (a43)	177
RMN- ¹ H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>] indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1053) (a44)	178
RMN- ¹³ C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>] indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1053) (a44)	178
RMN- ¹ H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> - pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1062) (a45)	179
RMN- ¹³ C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> - pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetamida (MF1062) (a45)	179
RMN- ¹ H 2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (MF1061) (a46)	180
RMN- ¹³ C 2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol-2(5 <i>H</i>)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (MF1061) (a46)	180
Espectro IR MF1042	181
Espectro IR MF1050	181
Espectro IR MF1062	182
Espectro IR MF1053	182
Espectro IR MF1046	183
Espectro IR a40	183
Espectro IR MF1064	184
Espectro IR MF1056	184
Espectro IR MF1047	185
Espectro IR MF1066	185

Espectro IR a22.....	185
Espectro IR MF1073.....	186
Espectro IR MF1081.....	186
Espectro IR MF1082.....	186
Espectro IR MF1083.....	187
Espectro de masa a25.....	187
Espectro de masa a3.....	188
Espectro de masa a4.....	188
Espectro de masa a24.....	189
Espectro de masa a6.....	190
Espectro de masa MF1064.....	190
Espectro de masa MF1047.....	191

LISTAS DE TABLAS

TABLA.....	Páginas
Tabla 1. Formación de 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de metilo (a3). Condiciones sintéticas y sus rendimientos.....	44
Tabla 2. Formación de MF1047. Condiciones sintéticas y sus rendimientos	48
Tabla 3. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047.....	49
Tabla 4. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047 y MF1042.....	50
Tabla 5. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042 y MF1050.....	51
Tabla 6 Condiciones de Reacción para la obtención del compuesto MF1047. Condiciones sintéticas y sus rendimientos.....	52
Tabla 7. Condiciones experimentales para la obtención de MF1050 usando el intermediario aislado de la reacción anterior.....	53
Tabla 8. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050 y MF1046.....	56
Tabla 9. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046 y MF1061.....	57
Tabla 10. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061 y MF1053.....	62
Tabla 11. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053 y MF1062.....	65
Tabla 12. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053, MF1062 y MF1064.....	67
Tabla 13. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053, MF1062, MF1064 y MF1066.....	69
Tabla 14. Modificaciones de plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053, MF1062, MF1064, MF1066, MF1073, MF1081, MF1082 y MF1083.....	71
Tabla 15. Valores de K_i y de IC_{50} de los compuestos sintetizados en acetilcolinesterasa humana.....	74

LISTA DE FIGURAS.

FIGURAS.....	Páginas
Figura 1: Neurona y acumulación de placas amiloideas y ovillos neurofibrilares.....	9
Figura 2: Algunos neurotransmisores presentes en el Sistema Nervioso Central.....	11
Figura 3: Esquema de la formación de acetilcolina y su liberación a través de las vesículas sinápticas.....	12
Figura 4: Degradación de acetilcolina a través de la enzima acetilcolinesterasa.....	14
Figura 5: Inhibidores de acetilcolinesterasa para el manejo de la E. de Alzheimer.....	15
Figura 6: E2020 se une a lo largo del sitio activo.....	16
Figura 7: Derivados de donepezil y sus IC ₅₀ respectivos.....	17
Figura 8: Inhibidores de AChE reportados por Otto y colaboradores.....	18
Figura 9: Organización del nAChR.....	20
Figura 10: Estructura del Receptor Nicotínico de Acetilcolina.....	21
Figura 11: Agonistas del Receptor Nicotínico de Acetilcolina.....	22
Figura 12: Moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).....	23
Figura 13: Plantilla molecular para el diseño de nuevos inhibidores de AChE.....	27
Figura 14: Segmentos moleculares utilizados en la construcción de las moléculas diseñadas.....	39
Figura 15: Plantilla molecular para el diseño de nuevas moléculas que actúen como inhibidores de acetilcolinesterasa.....	40
Figura 16: Molécula MF1047. Conformada por un segmento tetrahydro-β-carbolina, un grupo amida y un segmento N-bencilpiperidina.....	41
Figura 17: Reacción de ciclación de Pictet-Spengler.....	41
Figura 18: Compuesto iii de PM = 436,59 g/mol.....	53
Figura 19: Señal de los protones asociados a los carbonos del derivado de la <i>tetrahydro-β</i> - carbolina (izquierda) y de la <i>tetrahydro-γ</i> -carbolina (derecha) de las moléculas MF1046 y MF1061, respectivamente.....	61

Figura 20: MF1053 y MF1047, derivados de tetrahydro- γ -carbolina y tetrahydro- β -Carbolina.....	63
Figura 21: Moléculas estudiadas, adicionales al trabajo de tesis propuesto.....	72
Figura 22: Curva dosis respuesta del compuesto MF1047.....	75
Figura 23: Curva dosis respuesta del compuesto MF1046.....	75
Figura 24: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1073.....	76
Figura 25: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1082.....	76
Figura 26: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1050.....	77
Figura 27: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1053.....	77
Figura 28: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1062.....	78
Figura 29: Curva dosis-respuesta de los compuestos con un IC50 menor a 1,7 μ M.....	78
Figura 30: Curva de saturación de hAChE por el sustrato acetiltiocolina en concentraciones milimolares.....	81
Figura 31: Curva de saturación de hAChE.....	81
Figura 32: Diagrama de Lineweaver-Burk construido para calcular de los parámetros cinéticos de acetilcolinesterasa.....	82
Figura 33: Corriente representativa del nAChR en presencia de ACh.....	84
Figura 34: Corrientes representativas del receptor nicotínico de acetilcolina (α_4) ₂ (β_2) ₃ en presencia de la solución buffer (B) en presencia de acetilcolina 0,1mM (ACh) y en presencia de los compuestos evaluados (a 10 μ M y 100 μ M)	85
Figura 35: Representación en dos dimensiones del compuesto MF1047 en el sitio catalítico de AChE.....	87
Figura 36: Modelamiento molecular de MF1047 (izquierda) y MF1042 (derecha) en el sitio activo de hAChE.....	88
Figura 37: Modelación molecular del compuesto MF1050 en el sitio activo de hAChE.....	89
Figura 38: Modelación molecular del compuesto MF1046 en el sitio activo de hAChE.....	90
Figura 39: Modelación molecular del compuesto MF1061 en el sitio activo de hAChE.....	91

Figura 40: Modelación molecular del compuesto MF1053 en el sitio activo de hAChE.....	92
Figura 41: Modelación molecular del compuesto MF1062 en el sitio activo de hAChE.....	93
Figura 42: Esqueleto de la nueva plantilla molecular	93
Figura 43: Modelación molecular de MF1064 y MF1066 en el sitio activo de hAChE.....	95
Figura 44: Modelación molecular del compuesto MF1073 en el sitio activo de hAChE.....	96
Figura 45: Modelación molecular del compuesto MF1081 en el sitio activo de hAChE.....	97
Figura 46: Modelación molecular del compuesto MF1082 en el sitio activo de hAChE.....	97
Figura 47: Modelación molecular del compuesto MF1083 en el sitio activo de hAChE.....	98

LISTA DE ESQUEMAS

Esquemas.....	páginas
Esquema 1: Reacción que permite cuantificar la concentración de acetiltiocolina hidrolizada por AChE.....	32
Esquema 2: Ruptura del segmento derivado de N-piperidina.....	41
Esquema 3: Formación de <i>N-bencil</i> piperidina a partir de dos procedimientos diferentes.....	42
Esquema 4: Retrosíntesis del compuesto MF1047.....	43
Esquema 5: Formación del ácido 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acético (a4) a partir del compuesto a2 en dos pasos sintéticos.....	44
Esquema 6: Formación de 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetato de metilo (a3) a partir de a2.....	44
Esquema 7: Procedimiento adaptado de la reacción de Bo Ram Kim para la obtención de MF1047.....	46
Esquema 8: Protocolo de reacción para la formación de a4.....	47
Esquema 9: Propuesta original de la reacción para la obtención del compuesto MF1050.....	52
Esquema 10: Mecanismo de reacción de a4 y a20 utilizando DCC y 4-DMAP en AcCN que explicaría la formación de MF1050.....	52
Esquema 11: Nueva ruta propuesta para la síntesis del compuesto MF1050.....	54
Esquema 12: Reacciones para la obtención del intermediario sintético para la formación del compuesto MF1050.....	54
Esquema 13: Formación de 8-metoxi-tetrahydro- γ -carbolina usando polietilenglicol 400 como soporte de la reacción	58
Esquema 14: Formación de derivados de tetrahydro- γ -carbolina. El nitrógeno se encuentra protegido en forma de carbamato.....	59
Esquema 15: desprotección del grupo amino secundario en forma de carbamato para la formación de los derivados de tetrahydro- γ -carbolina.....	59

Esquema 16: Esquema preliminar para la formación del compuesto MF1047 a partir del compuesto a2 y para la formación de MF1053, a partir de a27.....	63
Esquema 17: Esquema propuesto para la formación del compuesto MF1053 y sus derivados.....	64
Esquema 18: Desprotección de N-Boc para obtener N-piperidina derivados usando ácido trifluoroacético (TFA).....	69
Esquema 19: Formación de MF1073, MF1081, MF1082 y MF1083 a partir de MF1066 como intermediario del compuesto a25.....	70
Esquema 20: Mecanismo de unión del sustrato para una reacción enzimática.....	79
Esquema 21: Reacción enzimática en presencia de un inhibidor competitivo.....	79

ABREVIATURAS

AcCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
Cs ₂ CO ₃	Carbonato de cesio
DCM	Cloruro de metileno
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
D ₂ O	Agua deuterada
EtOH	Etanol
Et ₃ N	Trietilamina
EDCl.HCl	Clorhidrato N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
HCl	Ácido clorhídrico
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
K _i	Constante de inhibición
K ₂ CO ₃	Carbonato de Potasio
LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
LiOH	Hidróxido de litio
MeOH	Metanol

MgSO ₄	Sulfato de magnesio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NH ₄ OH	Amoniaco
Rf	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
p.f.	Punto de fusión
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía en placa fina

RESUMEN

Este trabajo de tesis consistió en la síntesis de dos familias de compuestos: derivados de *tetrahydro-β*-carbolina y derivados de *tetrahydro-γ*-carbolina, sin sustituciones y sustituidas en posición 6 y 8 con un grupo metoxilo, respectivamente. Se construyeron 13 nuevos compuestos mediante la combinación de derivados de *tetrahydro*carbolinas con segmentos moleculares derivados de *N*-piperidina unidos con un grupo amida o con un grupo éster. Los compuestos sintetizados fueron evaluados como inhibidores de acetilcolinesterasa humana (*hAChE*) y como moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (*nAChR*, su sigla en inglés). Para explicar los resultados experimentales obtenidos se realizaron estudios de acoplamiento molecular *in silico* para los compuestos evaluados.

De los compuestos evaluados en *hAChE*, 7 de éstos actuaron como inhibidores de la actividad catalítica. De los derivados de *tetrahydro*carbolina los que presentaron mayor potencia fueron las moléculas que contenían un segmento *tetrahydro-β*-carbolina sustituido por un grupo metoxilo en posición 6 y un segmento *N-bencil*piperidina, ambos segmentos unidos por un grupo amida. Los compuestos representativos de esta serie fueron **MF1047** ($IC_{50} = 0,50 \mu M$; $K_i = 0,32 \mu M$), **MF1073** ($IC_{50} = 0,43 \mu M$; $K_i = 0,29 \mu M$) y **MF1082** ($IC_{50} = 0,51 \mu M$; $K_i = 0,35 \mu M$).

Se evaluaron estos tres compuestos como moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina y ninguno de éstos provocó un efecto por sí solo sobre el receptor; no inhibieron ni potenciaron el efecto de acetilcolina sobre el canal iónico.

ABSTRACT

This thesis work consisted of the synthesis of two series of compounds: tetrahydro- β -carboline and tetrahydro- γ -carboline derivatives with an unsubstituted and a methoxy group substituted at the position six and eight, respectively. Thirteen new molecules were built by mixing up the segments of *tetrahydrocarbolines* and N-piperidines derivatives linked with an amide or an ester group. The synthesized compounds were tested as human acetylcholinesterase inhibitors (*hAChE*) and as allosteric modulators for the nicotinic acetylcholine receptor. Molecular modeling studies *in silico* were used to explain the experimental results.

Among the compounds tested, seven of them acted as inhibitors of the catalytic activity. Among the *tetrahydrocarbolines* derivatives, the molecules containing a *N*-benzylpiperidine segment and a 6-methoxy-substituted tetrahydro- β -carboline segment, linked by an amide group, turned out to be molecules that exhibit a high response. Representative compounds of these series are: **MF1047** ($IC_{50} = 0,50 \mu M$; $K_i = 0,32 \mu M$), **MF1073** ($IC_{50} = 0,43 \mu M$; $K_i = 0,29 \mu M$) y **MF1082** ($IC_{50} = 0,51 \mu M$; $K_i = 0,35 \mu M$).

These three compounds were tested as allosteric modulators for the nicotinic acetylcholine receptor. None of them causes an effect by itself on the receptor, this means they did not inhibit or enhance the effect of acetylcholine on the ion channel.

1. INTRODUCCIÓN.

Modular la actividad de la enzima acetilcolinesterasa ha sido una de las maniobras terapéuticas fundamentales en el control de las funciones cognitivas que se ven afectadas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (*EA*).

Una de las consecuencias relacionadas a la disminución de los niveles del neurotransmisor *acetilcolina* en el espacio sináptico neuronal es la activación de manera poco eficaz de los receptores nicotínicos (canales iónicos modulados por acetilcolina), alterando la sinapsis neuronal, característica propia en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. La disponibilidad apropiada del neurotransmisor colinérgico es el blanco principal en el diseño de drogas orientadas a tratar esta enfermedad.

Se han postulado múltiples mecanismos fisiopatológicos para explicar el deterioro cognitivo: la toxicidad del péptido β -amiloide ($A\beta$), la disfunción colinérgica, alteraciones de la proteína Tau, el daño oxidativo, la disfunción simpática y la inflamación secundaria a las placas. La estrategia colinérgica, referida al aumento de los niveles de acetilcolina por la inhibición de acetilcolinesterasa, sigue siendo el enfoque terapéutico más eficiente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Por otra parte, los moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina han representado una estrategia de tratamiento alternativo para tratar la enfermedad de Alzheimer debido a que, típicamente, mejoran la respuesta de los agonistas al receptor (acetilcolina es el agonista endógeno del receptor nicotínico) sin activar directamente los receptores. Por ello el desarrollo de moduladores alostéricos ha sido un paso importante en el desarrollo de tratamientos terapéuticos para los trastornos neurológicos que implican alteraciones en los receptores nicotínicos.

Entre los antecedentes recabados para proponer este trabajo se consideró un aspecto importante de la enfermedad de Alzheimer: La degradación de moléculas de acetilcolina conlleva a la disminución de su concentración en la hendidura sináptica provocando que los receptores nicotínicos no sean activados adecuadamente dificultando, por este medio, la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior de la célula nerviosa, causando deficiencia de las funciones cognitivas cerebrales. Por ello es interesante el control de la enzima encargada de la degradación de acetilcolina y a su vez la potenciación del neurotransmisor mediante el uso de ligandos alostéricos sobre el receptor nicotínico.

1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1.1. Generalidades

La enfermedad que *Alois Alzheimer*, neuropsiquiatra alemán, describió por primera vez en 1906 es, al día de hoy, la causa más frecuente de demencia en adultos mayores. Fue descrita como una afección de un paciente de 51 años que presentaba alteraciones de memoria y apraxia junto a un cuadro de demencia. Tras su fallecimiento, Alzheimer examinó su cerebro, observando la existencia de placas seniles, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal. Las placas neuríticas seniles aparecieron en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos de las leptomeninges. Estos hallazgos permitieron, por primera vez, separar esta demencia de las alteraciones producidas por el mero envejecimiento.¹ En base a ello, la *EA* se define como un trastorno neurodegenerativo irreversible del sistema nervioso central (*SNC*) caracterizada clínicamente como una demencia progresiva. Demencia es un término general para describir la pérdida de memoria y de otras habilidades intelectuales y es tan severa que interfiere con la vida cotidiana del individuo. En Chile los adultos mayores son más del 10% de la población y muchos de ellos pueden presentar demencias; se ha estimado que existirían más de 170.000 personas con algún grado de trastorno y muchos de ellos viven sin recibir tratamiento por desconocimiento e incluso, en algunos casos, ni siquiera serán diagnosticados.² Los síntomas aparecen de a poco y empeoran con el tiempo hasta convertirse en lo suficientemente graves como para interferir con las labores diarias. El número real de la población afectada se desconoce, pero se sospecha que es considerablemente superior al que se calcula debido, principalmente, al impacto de la

enfermedad sobre la pareja, los miembros de la familia, entre otros. Constituye la tercera enfermedad en costo social y económico, superada únicamente por la cardiopatía isquémica y el cáncer y es la causa número cuatro de muertes en países industrializados.³

Cuando *Alois Alzheimer* describió por primera vez la enfermedad, una persona en los Estados Unidos vivía un promedio de 50 años. Pocas personas llegaron a la edad de mayor riesgo. Como resultado, la enfermedad se consideró rara y atrajo poco interés científico. Esa actitud cambió a medida que la esperanza de vida aumentó y los científicos empezaron a darse cuenta de cuán a menudo la enfermedad de Alzheimer afectó a las personas a los 70 y 80 años.

El hecho que aún se desconozca de manera precisa qué es lo que causa la enfermedad de Alzheimer ha llevado el foco a un interés mundial integrando ramas muy diferentes de la ciencia como la medicina, biología, bioquímica, genética, sicología, nutrición, sociología, etc.^{4,5} Se han desarrollado numerosos estudios relacionados con la detección temprana de la enfermedad ^{6,7,8,9} como, por ejemplo, en el año 2014 fue dada a conocer una técnica desarrollada por científicos de la Universidad de Georgetown la cual puede predecir si la enfermedad de Alzheimer se manifestará en los tres años siguientes con una simple muestra de sangre. El ensayo que lograría aplicar tratamientos tempranos, todavía debe pasar otras pruebas clínicas para su aprobación completa.¹⁰

Uno de los aspectos fundamentales acerca de esta enfermedad es la acción terapéutica desarrollada hasta el momento; terapias basadas en el uso de fármacos aprobados por la *FDA* y que, actualmente, no detienen la evolución de la enfermedad ni mucho menos la curan pero que por discretos que sean los cambios manifestados en los

pacientes, conservan y prolongan, en alguna medida, la calidad de vida del enfermo, además del alivio representado en la carga experimentada de las personas que se ocupan de quien padece la enfermedad.¹¹

Actualmente la enfermedad de Alzheimer encabeza la investigación biomédica. Algunos de los avances más notables han demostrado cómo la enfermedad de Alzheimer afecta al cerebro. Comprender mejor su impacto puede dar lugar a mejores tratamientos.

1.1.2. Causas de la Enfermedad de Alzheimer

Los científicos creen que, para la mayoría de las personas, la *EA* es causada por una combinación de factores genéticos, medioambientales y por el estilo de vida que afecta al cerebro conforme pasan los años. A pesar que las causas no están aun completamente comprendidas, su efecto en el cerebro es claro; la *EA* daña y mata células del cerebro. Un cerebro afectado por *EA* tiene una menor cantidad de células nerviosas y una menor cantidad de conexiones entre las células sobrevivientes que un cerebro sano.¹² El paciente con la *EA* presenta una combinación de síntomas que incluyen alteraciones cognitivas, conductuales y neurológicas.

En relación a las alteraciones cognitivas, éstas se caracterizan principalmente por un deterioro precoz y progresivo de la memoria manifestado por la incapacidad de adquirir nueva información y por recordar datos ya adquiridos. Los científicos han identificado una condición entre la pérdida normal de memoria relacionada con la edad y la demencia

llamada deterioro cognitivo leve (*DCL*).¹³ Las personas con *DCL* tienen problemas de memoria, pero son capaces de realizar actividades rutinarias. El *DCL*, a menudo, conduce a la *EA*, pero no todos los pacientes con *DCL* desarrollan la enfermedad. Otros pacientes con *DCL* podrían evolucionar hacia demencias fronto-temporales, hacia enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, hacia demencias vasculares; otros podrían corresponder a esclerosis hipocampal.¹⁴ Cuando se ha tenido la oportunidad de hacer una autopsia, habitualmente se ha encontrado la *EA*. En el inicio destacan la pérdida de memoria y juicio; luego se agregan trastornos del lenguaje, pérdida de habilidades motoras, desorientación; al final el paciente termina postrado en cama, sin lenguaje y totalmente dependiente.^{15,16}

Las alteraciones de conducta están asociadas a agresividad, delirios, depresión, alucinaciones, pérdida del control de esfínteres y cambios en el ritmo del sueño despertándose frecuentemente.¹⁷

Las anomalías neurológicas se manifiestan mediante la aparición de un aumento de tono muscular, dificultando los movimientos de las extremidades. En algunos casos pueden aparecer crisis epilépticas. Todos estos síntomas están asociados a una serie de alteraciones estructurales, genéticas y neuroquímicas que afectan a la mayoría de los centros cognitivos, tales como el lóbulo temporal, el hipocampo y parte del sistema límbico, así como las áreas de asociación presentes en la corteza frontal y parietal.¹⁸

1.1.4. Alteraciones Estructurales

Las personas con deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer presentan pérdidas del volumen cortical, particularmente en el hipocampo, la amígdala y el córtex entorrinal.¹⁹ No se conoce si estos cambios volumétricos están presentes y cuál es su grado en individuos con las funciones cognitivas normales, antes de su diagnóstico clínico. Se realizaron escáneres cerebrales y pruebas cognitivas a 136 sujetos de más de 65 años cognitivamente normales. Después de cinco años, 23 sujetos mostraron síntomas de deterioro cognitivo leve. A estos sujetos se les encontró una reducción del volumen de materia gris en los lóbulos temporales anteromediales y en el giro angular izquierdo, incluso antes del inicio del estudio, cuando eran cognitivamente normales. Finalmente, de estos 23, a nueve se les diagnosticó la enfermedad de Alzheimer. Este estudio permitió el descubrimiento de cambios estructurales en el cerebro en personas clínicamente normales antes del diagnóstico del deterioro cognitivo leve.²⁰ En relación a ello, el retraso en el reconocimiento de los síntomas iniciales, unido al hecho de la confusión diagnóstica con síntomas de envejecimiento, hace que el diagnóstico precoz de la *EA* adquiera gran importancia.²¹

En un declive progresivo de las funciones cognitivas, la enfermedad se caracteriza por lesiones neuropatológicas que se manifiestan como depósitos proteínicos que se localizan preferentemente en el hipocampo y en las áreas parietotemporales de la corteza cerebral.²² Estas lesiones consisten en placas neuríticas compuestas por depósitos extracelulares de placas seniles y por ovillos intraneuronales formados por consistentes neurofibrillas de la proteína Tau citoesquelética.^{23,24,25} Estos dos procesos degenerativos

se potencializan y provocan una degeneración de las células nerviosas implicadas en la memoria y las funciones cognitivas superiores.

Además de los rebujos neurofibrilares y placas seniles, también se encuentran formaciones esféricas del péptido β -amiloide. Este péptido es altamente tóxico debido a que se adhiere a las membranas neuronales, lo que constituye el inicio de la formación de placas seniles²⁶ (Figura 1). Su formación radica en la división de la

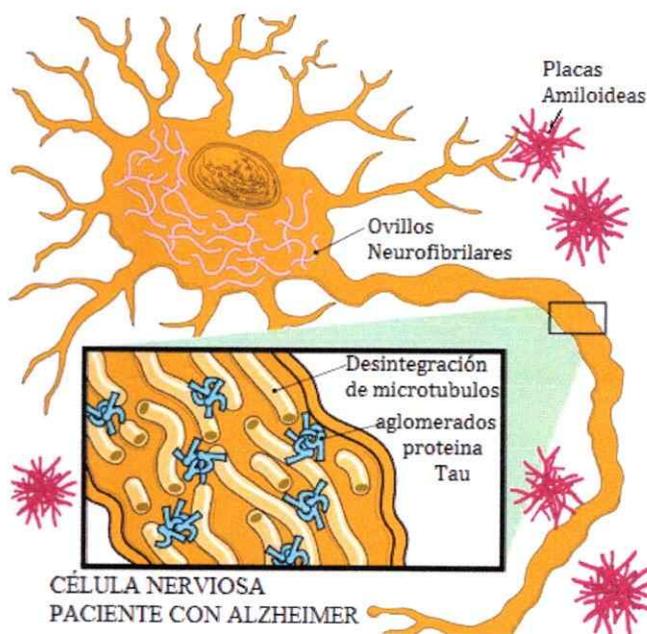


Figura 1: Neurona y acumulación de placas amiloideas y ovillos neurofibrilares.

Proteína Precursora Amiloide (PPA).²⁷ La toxicidad del β -amiloide se basa en la generación de radicales libres, inflamación y decremento de irrigación sanguínea a las neuronas.²⁸ En la muerte neuronal por la formación de placas seniles y marañas neurofibrilares disminuye dramáticamente las cantidades normales de los neurotransmisores, especialmente de acetilcolina, ocasionando un déficit de la molécula lo que impide la interacción con sus receptores colinérgicos; por lo tanto, rompe con la vía normal de señalización de la memoria en la corteza cerebral y el hipocampo.

Por otro lado, las células cerebrales dependen de un sistema de transporte y soporte interno para llevar los nutrientes y otros materiales esenciales a través de sus largas extensiones. Este sistema requiere del correcto funcionamiento de una proteína llamada

Tau.²⁹ Esta proteína pertenece a la familia asociada a microtúbulos, en condiciones normales, facilita el ensamblaje de la tubulina estabilizando la organización de los microtúbulos, lo que mantiene las prolongaciones citoplasmáticas típicas de las células nerviosas.³⁰ Cuando la *proteína Tau* está hiperfosforilada se produce un cambio conformacional en la molécula que impide su unión a los microtúbulos, desestabilizándolos y favoreciendo la agregación de dicha proteína. Como consecuencia de ello se produce el depósito intracelular de *ovillos neurofibrilares* con segmentos de la *proteína Tau* hiperfosforilada, evento característico de la *EA* y otras enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, el desensamblaje de los microtúbulos provocado por la hiperfosforilación de *Tau* provoca cambios en el armazón celular, así como en la localización y organización de estructuras subcelulares tales como las mitocondrias y los lisosomas, lo que conlleva una interrupción de la sinapsis y una inducción de la muerte neuronal por apoptosis³¹ (Figura 1).

1.1.5. Alteraciones neuroquímicas

Existe una variedad de neurotransmisores que se ven afectados en pacientes con la *EA*. La mayoría de estos neurotransmisores están relacionados con el control de las habilidades cognitivas, el mantenimiento del tono muscular entre otros. En relación a esto, se correlaciona, en parte, el déficit cognitivo con las alteraciones en los sistemas de neurotransmisión.

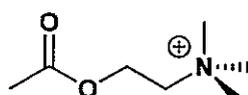
Ya en 1985 se conocía que existía una deficiencia de los neurotransmisores, especialmente acetilcolina, como también un aumento en los niveles de la enzima

acetilcolinesterasa en estudios post-mortem de cerebros de individuos con la EA.³² Además, en estudios tempranos de esta enfermedad, se observó una disminución en los niveles de dopamina y serotonina (neurotransmisores del SNC) en el líquido cefalorraquídeo y la corteza cerebral en pacientes con la EA. Por otro lado, los niveles de ácido gamma-amino butírico (GABA) y sus receptores se encontraron disminuidos en un 50% en la corteza temporal en pacientes con Alzheimer.

1.2. NEUROTRANSMISORES

Los neurotransmisores son moléculas liberadas por las neuronas presinápticas en la hendidura sináptica que inducen un cambio en el potencial de membrana postsináptica, lo que finalmente se traduce en cambios de la excitabilidad neuronal.³³ La acción

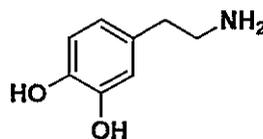
específica de un neurotransmisor depende de los subtipos de receptores específicos donde actúa y su distribución anatómica en el cerebro.³⁴ El efecto de los neurotransmisores es interrumpido por diferentes mecanismos de los



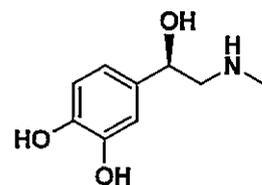
Acetilcolina



Serotonina



Dopamina



Epinefrina

Figura 2: Algunos neurotransmisores presentes en el Sistema Nervioso Central.

cuales se incluye la recaptación por la neurona presináptica y/o por catabolismo enzimático.³⁵ Algunos de los neurotransmisores más comunes en el Sistema Nervioso

Central son *glutamato* (Glu) *ácido gamma-amino butírico* (GABA), *acetilcolina* (ACh), *dopamina* (DA), *epinefrina* (E), *serotonina* (5-HT) y *glicina* (Gly), entre otros.

Los neurotransmisores pueden actuar como señales inhibitorias o excitatorias sobre la célula postsináptica.³⁶ Por ejemplo, acetilcolina ejerce acción excitatoria sobre los receptores nicotínicos (nAChR)¹², mientras que dopamina tiene un efecto dual, dependiendo del receptor dopaminérgico activado.¹³

1.3. ACETILCOLINA (ACh)

La acetilcolina es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y actúa como neurotransmisor en las uniones neuromusculares, en la sinapsis de los ganglios del sistema motor visceral y en una variedad de sitios dentro SNC.^{33,34} Si bien se sabe mucho acerca de la función de la transmisión colinérgica en la unión neuromuscular y en las sinapsis ganglionares,^{35,37,36} las acciones de ACh en el SNC no son tan bien comprendidas.

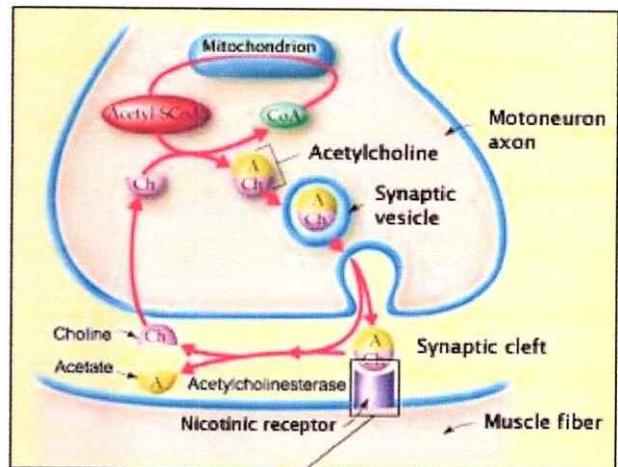


Figura 3: Esquema de la formación de acetilcolina y su liberación a través de las vesículas sinápticas. Acetilcolina es un neurotransmisor que activa los receptores nicotínicos permitiendo el flujo de iones a través del canal.

La ACh se sintetiza en el citoplasma neuronal a partir de la unión de *colina* y de *acetil coenzima A* (*acetil CoA*, que se sintetiza a partir de glucosa) en una reacción catalizada por la *acetilcolintransferasa* (*CAT*), para luego ser almacenadas en vesículas sinápticas que se acumulan en la región presináptica del terminal del axón. En dichas vesículas se transporta a las terminales nerviosas donde se utiliza para la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis neurona-neurona y neurona-célula muscular a través de los receptores colinérgicos.³⁸ Las neuronas colinérgicas inervan, a menudo, las terminales presinápticas de neuronas que secretan otros neurotransmisores, por consiguiente, la ACh puede modular la actividad de varios sistemas en el cerebro.^{39,40}

En el SNC las neuronas colinérgicas conforman un gran sistema ascendente cuyo origen se halla en el tronco cerebral e inerva amplias áreas de la corteza cerebral, además de mantener la consciencia, parecen intervenir en la transmisión de información visual, tanto en el colículo superior como en la corteza occipital. La acetilcolina también interviene en la percepción del dolor y la memoria.^{41,42}

1.4. ACETILCOLINESTERASA (AChE)

En contraste con la mayoría de los neurotransmisores la acción postsináptica de la ACh no termina en la recaptación sino en una hidrólisis enzimática llevada a cabo por la enzima acetilcolinesterasa.⁴³ Esta enzima se concentra en la hendidura postsináptica, lo que garantiza una rápida disminución en la concentración de ACh después de su lanzamiento desde la terminal presináptica. La AChE tiene una actividad catalítica muy alta

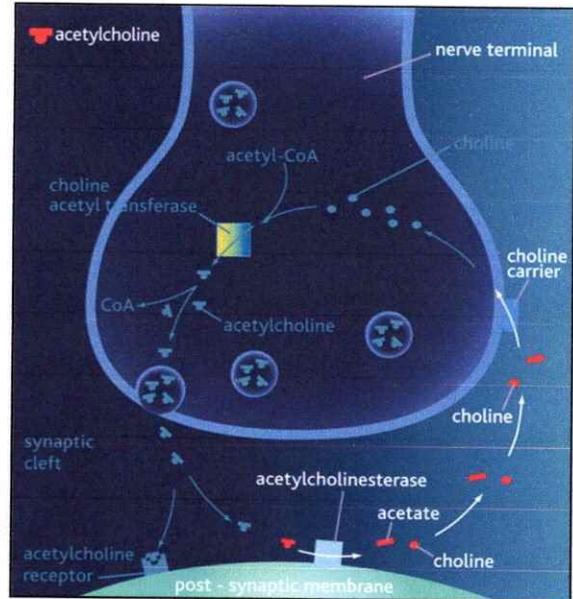


Figura 4: Degradación de la acetilcolina a través de la enzima acetilcolinesterasa en acetato y colina. Esta última es transportada mediante un carrier a la neurona presináptica la cual junto a acetil-CoA produce nuevamente acetilcolina.

(aproximadamente 5000 moléculas de ACh por molécula de AChE por segundo) e hidroliza la acetilcolina en acetato y colina.⁴³ Los terminales nerviosos colinérgicos recuperan la colina producida por la hidrólisis de la ACh mediante el uso de una vesícula transportadora.⁴²

De acuerdo con la “hipótesis colinérgica”, la alteración de la función colinérgica es de importancia crítica en la enfermedad de Alzheimer, especialmente en las áreas del cerebro relacionadas con el aprendizaje, la memoria, el comportamiento y las respuestas emocionales que incluyen la neocorteza y el hipocampo.⁴⁴ La atrofia cerebral es la manifestación clínica más evidente en la enfermedad de Alzheimer en donde los niveles de la ACh, neurotransmisor responsable de la conducción de los impulsos eléctricos de

una célula nerviosa a otra célula nerviosa, se reducen debido a la rápida hidrólisis por la acción de acetilcolinesterasa.⁴⁵

La enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo en pacientes ancianos se caracteriza por la disfunción colinérgica, la formación de placas seniles y de ovillos neurofibrilares⁴⁶ es por ello que, actualmente, la estrategia colinérgica, en la cual los niveles de la acetilcolina son incrementados por inhibición de acetilcolinesterasa, sigue siendo el enfoque terapéutico más eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se examinaron algunos inhibidores de AChE para determinar su valor terapéutico en el tratamiento y una serie de estudios demostraron que mejoran la cognición en algunos pacientes con Alzheimer.^{47,48,49}

Tacrina, donepezil, fisostigmina y galantamina son inhibidores de acetilcolinesterasa y se emplean para el manejo de la enfermedad de Alzheimer (Figura 5). Sin embargo, estos fármacos tienen una eficacia limitada en el control de los síntomas del Alzheimer. Por tanto, la búsqueda relacionada al diseño de nuevos

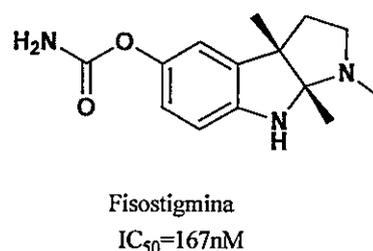
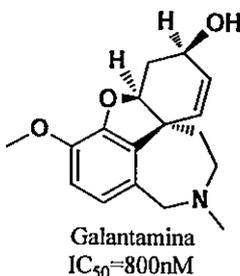
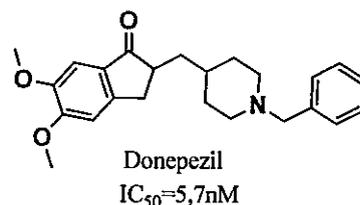


Figura 5: Inhibidores de acetilcolinesterasa para el manejo de la enfermedad de Alzheimer y sus respectivos valores de IC_{50} . Galantamina y Fisostigmina son, además, moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina.

inhibidores de acetilcolinesterasa mediante la modificación de los segmentos de los

grupo indanona por un grupo benzisoxazol ($IC_{50} = 2,8 \text{ nM}$) resultando un compuesto con muy alta actividad inhibitoria en AChE *in vitro* (1A), pero baja actividad *in vivo* debido a

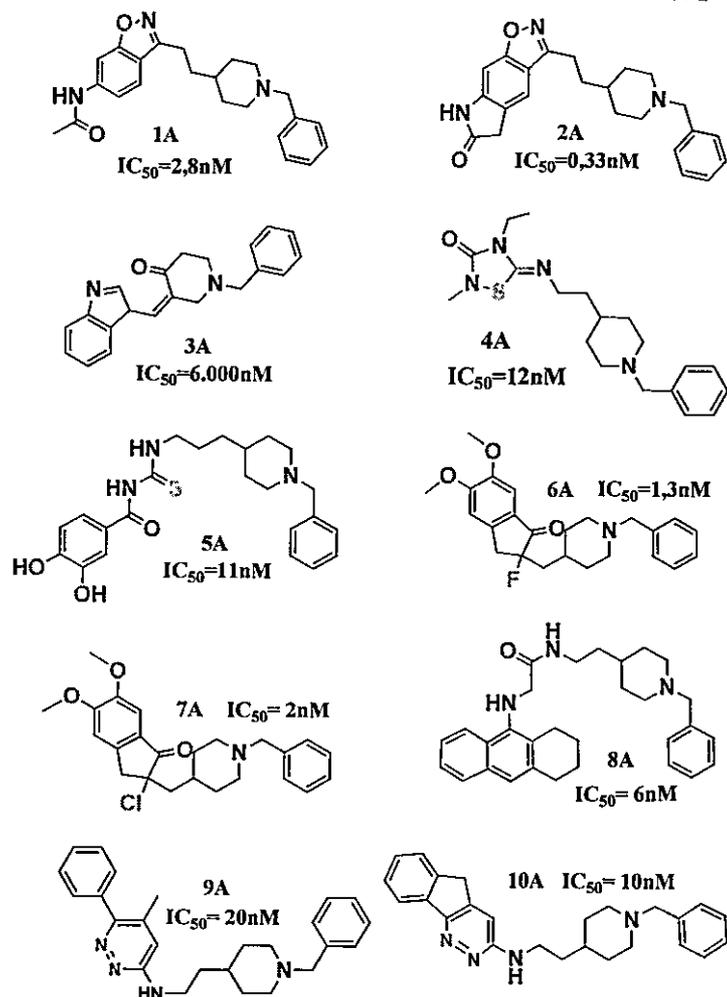


Figura 7: Derivados de donepezil y sus respectivos IC_{50} . Todas las moléculas poseen un grupo N-bencilpiperidina en un extremo de su arquitectura molecular.

nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa reemplazando el grupo indanona del donepezil por el grupo indol. El compuesto obtenido en comparación de donepezil mostró una actividad inhibitoria menor sobre AChE (3A) ($IC_{50} = 6.000 \text{ nM}$) probablemente debido a su arquitectura rígida impidiendo su entrada en el sitio catalítico de AChE.⁵³ Martínez y colaboradores sintetizaron derivados de N-bencilpiperidina ($IC_{50} = 12 \text{ nM}$) reemplazando el grupo indanona del donepezil por un grupo 1,2,4-tiadiazolidinona (4A), el cual fue igual

su rápida hidrólisis y la producción de metabolitos menos potentes.⁵¹ Nuevos resultados han sido publicados en donde se restringe la conformación del grupo N-acetilo de 1A mediante la ciclación del grupo funcional obteniéndose nuevos derivados metabólicamente más estables (2A) y con IC_{50} menores en AChE en comparación a 1A ($IC_{50} = 0,33 \text{ nM}$).⁵² Andreani y

colaboradores obtuvieron

de potente a la tacrina y 3,5 veces menos potente que donepezil.⁵⁴ Vidaluc y colaboradores en el año 1994 sintetizaron algunos derivados de N-bencilpiperidina con segmentos de aroiltiureas (**5A**) ($IC_{50} = 11$ nM). Además, se sintetizaron dos derivados de donepezil: con un átomo de flúor y otro con un átomo de cloro en posición dos en el segmento de la indanona con (**6A**) $IC_{50} = 1,3$ nM y (**7A**) $IC_{50} = 2,0$ nM respectivamente.⁵⁵ Por combinación de un segmento de tacrina con un segmento de N-bencilpiperidina de donepezil se dio lugar a una nueva clase de heterodiméricos de donepezil (**8A**) ($IC_{50} = 6$ nM) como inhibidores de AChE de unión doble.⁵⁶ Se sintetizaron una serie de aminopiridazinas en combinación con N-bencilpiperidina (**9A** y **10A**) con valores de IC_{50} de 20 nM y 10 nM, respectivamente. Estos compuestos fueron dos a cinco veces más potentes que donepezil.^{57,58,59}

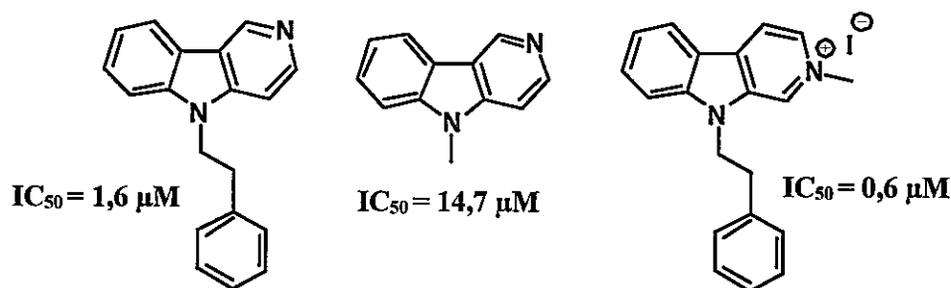


Figura 8: Inhibidores de AChE reportados por Otto y colaboradores⁶⁰.

Los estudios relacionados con donepezil y sus derivados, considerando su actividad inhibitoria sobre AChE, revelaron la importancia del grupo N-bencilpiperidina en la construcción y diseño de nuevos inhibidores además del uso complementario de anillos aromáticos en el otro extremo de la molécula. Se consideran los aportes entregados por Otto y colaboradores donde reportan derivados de beta y gamma carbolina (figura 8) como inhibidores de acetilcolinesterasa.⁶⁰

Considerando la contribución de los anillos de beta y gamma carbolina y su aporte en el diseño de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa es que fueron propuestos como segmento de estudio al igual que *N-bencilpiperidina* para la construcción de nuevos compuestos que presentan actividad inhibitoria en *AChE*.

1.5. RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA

Las neuronas colinérgicas liberan acetilcolina la cual puede unirse a dos receptores diferentes: los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) y los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) ionotrópicos y metabotrópicos, respectivamente.⁶¹ En el marco de este trabajo, el enfoque estuvo dirigido sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina.

Los nAChRs son canales iónicos activados por ligandos con una estructura pentamérica formada por una combinación de 2 diferentes subunidades (α y β) formando una estereoquímica conocida (2:1:1:1, figura 9).^{62,63} Hasta el momento se conocen nueve subunidades α (α_2 - α_{10}) y tres subunidades β (β_2 - β_4). Cada canal puede estar formado por una combinación de la misma subunidad formando estructuras homoméricas (α_7 , α_8 , α_9 , α_{10}) o de diferentes subunidades, heteroméricas, ($\alpha_9\alpha_{10}$, $\alpha_2\beta_4$, $\alpha_4\beta_2$, $\alpha_3\beta_4$, $\alpha_4\beta_4$).⁶⁴ Cada subtipo de los receptores nicotínicos conocidos están diferencialmente expresados en diferentes partes del cerebro y del cuerpo.⁴⁰

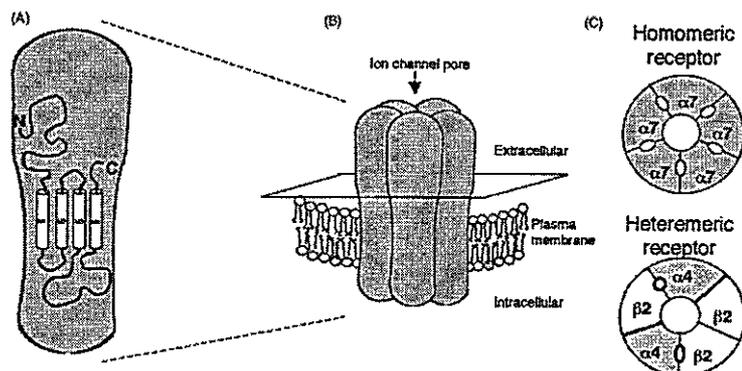


Figura 9: Organización del nAChR (A-C). (A) Representación esquemática de la topología transmembránica de las subunidades de nAChR. El modelo muestra la porción extracelular amino terminal, seguido de tres dominios de transmembrana hidrófobos (M1-M3), un bucle intracelular alargado, y luego un cuarto dominio hidrófobo de transmembrana (M4). (B) Disposición pentamérica de las subunidades de nAChR en un receptor montado sobre la transmembrana. (C) Disposición de las subunidades en un receptor homomérico ($\alpha 7$) y heteromérico ($\alpha 4\beta 2$), y la localización del sitio de unión de ACh.

A pesar de la gran variabilidad de los nAChRs, el mecanismo de activación de cada uno de éstos es bastante común.^{65,66} Los subtipos más abundantes de manera nativa en el SNC, se cree, son el receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$ y el homomérico $\alpha 7$. El subtipo $\alpha 4\beta 2$ contiene dos dominios de unión de ligandos agonistas clásicos localizados en la interface de cada subunidad α/β (figura 11).⁶⁷

Se sabe que la activación de los receptores por agonistas nicotínicos favorece la apertura del canal iónico permitiendo así, el paso prioritario de cationes monovalentes (entrada de Na^+ y salida de K^+) y minoritariamente la entrada de Ca^{2+} , particularmente en los que contienen subunidades del tipo $\alpha 7$;^{68,69} lógicamente, la permeabilidad al Ca^{2+} tendrá importantes consecuencias funcionales. La estimulación de un receptor nicotínico puede incrementar los niveles intracelulares de calcio, por una parte, gracias a la entrada del catión a través del receptor nicotínico, o bien indirectamente, a través del reclutamiento de canales de calcio dependientes de voltaje (la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} a través de

receptores nicotínicos produce la despolarización de la membrana neuronal necesaria para la apertura de estos canales).⁷⁰

Los receptores $\alpha_4\beta_2$ y α_7 están altamente expresados en las regiones del cerebro que desarrollan las neuropatologías de la enfermedad de Alzheimer, involucrando así estos receptores en la patogénesis de esta demencia.⁷¹ Los estudios recientes han correlacionado la disfunción del receptor nicotínico de acetilcolina con la neurodegeneración y los déficits cognitivos en la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson.⁷² Los objetivos potenciales en la patología de la enfermedad de Alzheimer son los nAChRs, pues, están ampliamente expresados a través del SNC, se sabe que participan en los procesos relacionados a la cognición y los pacientes con la *EA* exhiben una disminución en el número de estos receptores con funcionalidad.^{73,74}

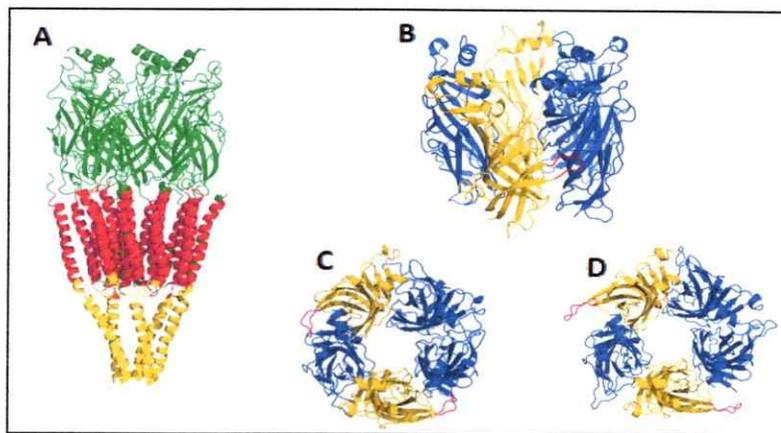


Figura 10: Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina. A) modelo completo del receptor mostrando el segmento intracelular (amarillo) compuesto por cinco hélices alfa, un segmento de transmembrana (rojo) y un segmento extracelular (color verde). Los ligandos agonistas y antagonistas competitivos se unen en este último segmento. B) Sección extracelular del receptor nicotínico con dos subunidades alfa (amarillo) y tres subunidades beta (azul). El sitio de unión de los ligandos agonistas y antagonistas se ubica entre las subunidades alfa-beta detrás del loop C de la interface (loop color rojo). C) Vista superior de la sección extracelular del receptor nicotínico. La figura muestra el loop C cerrado (loop color rojo) consecuencia de la interacción del ligando con el sitio de unión. Esta conformación permite la apertura del canal y el paso de iones a través de él. D) Vista superior de la sección extracelular del receptor nicotínico. La figura muestra el loop C abierto (loop color rojo) consecuencia de la interacción del ligando con el sitio de unión. Esta conformación cierra el canal e impide el paso de iones a través del receptor

1.5.1. Ligandos receptor nicotínico de acetilcolina

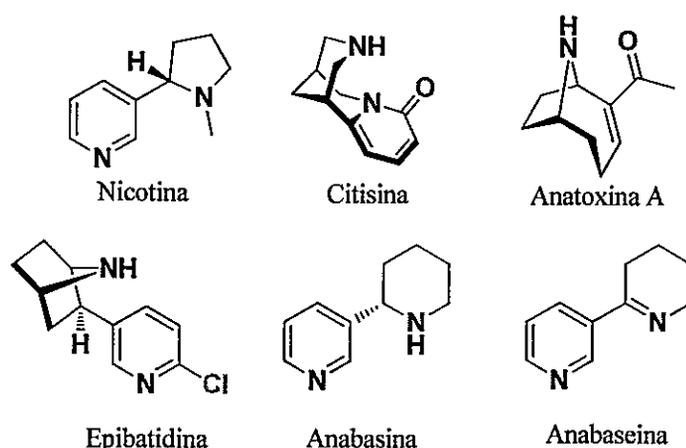


Figura 11: Agonistas del Receptor Nicotínico de Acetilcolina.

Los receptores nicotínicos presentan un sitio de unión de ligandos y dependiendo del tamaño de estos y las interacciones resultantes permiten la apertura o cierre del canal iónico. Los ligandos que

se unen al receptor y que provocan la apertura del canal se dice tienen un comportamiento agonista, mientras que aquellos que se unen al receptor e impiden la apertura se dice que su comportamiento es del tipo antagonista.

El neurotransmisor acetilcolina tiene un comportamiento agonista sobre el receptor nicotínico, por ello se habla que un ligando agonista al receptor imita la acción de acetilcolina. Cuando ACh u otro agonista se une al sitio ortostérico del canal provoca cambios conformaciones sobre este último favoreciendo la apertura del canal iónico y posibilitando el flujo de iones a través del receptor. Diversos ligandos naturales actúan como agonistas en el nAChR (figura 10): nicotina, citisina, anatoxina A, epibatidina, anabasina y anabaseina.

En tanto, los ligandos que actúan de manera antagonista al receptor nicotínico provocan la apertura del *loop C* de la subunidad α (normalmente por el gran volumen del ligando) lo cual ocasiona cambios conformacionales sobre el receptor impidiendo la

apertura del canal para el flujo de iones. La inhibición del receptor por un antagonista competitivo-reversible es contrarrestada con un incremento de la concentración del agonista.⁷⁵ Los antagonistas competitivos se descubrieron a partir de productos naturales. Algunos de los antagonistas empleados en la inhibición del receptor neuronal de acetilcolina son: *d-tubocurarina* (d-TC), *dihidro-β-eritroidina* (DHβE), *α-conotoxinas*, *α-Bungarotoxina* (α-Bgt), *metillicaconitina* (MLA), entre otros.

1.5.2. Moduladores Alostéricos del Receptor Nicotínico de Acetilcolina.

Los moduladores alostéricos son moléculas que no tienen efecto por sí mismas sobre un receptor, pero cuando están en presencia de un agonista pueden mejorar (modulador positivo) o disminuir (modulador negativo) la respuesta provocada por el agonista. Los moduladores alostéricos ejercen su efecto mediante la unión en un sitio que es diferente al del agonista.⁷⁶

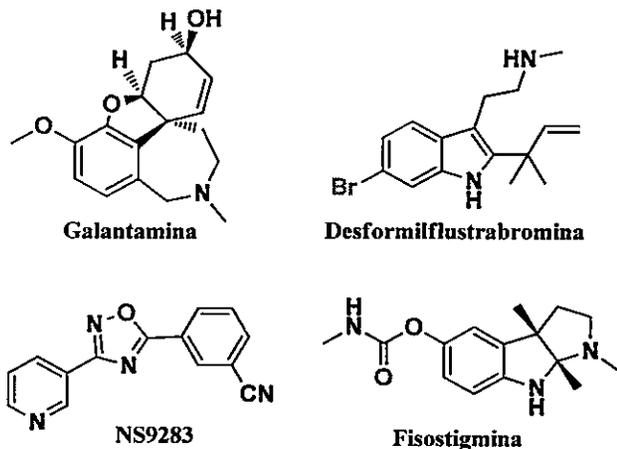


Figura 12: Moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR): galantamina, desformilflustrabromina y fisostigmina son compuestos proporcionados por la naturaleza a través de los bulbos y flores de la especie *Galanthus caucasicus*, del briozoo marino *Flustra foliacea*, y de la leguminosa *Calabar vean*, respectivamente. NS-9283 fue sintetizado en el laboratorio NeuroSearch. Galantamina y fisostigmina actúan además como inhibidores de acetilcolinesterasa.⁸⁰

Ciertos alcaloides, hace dos décadas atrás, fueron presentados como especies que activaban y potenciaban la respuesta del receptor nicotínico a través de la interacción con

un sitio alostérico. El efecto fue descubierto primero para la fisostigmina, un potente inhibidor de acetilcolinesterasa.⁷⁷ Posteriormente la galantamina y la codeína fueron reportadas como moduladores alostéricos positivos de los receptores nicotínicos de los tipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$.^{78,79,80} El efecto no fue contrarrestado por el uso de antagonistas nicotínicos competitivos. Todos los moduladores alostéricos actúan como antagonistas no competitivos en altas concentraciones.^{81,82} Se han estudiado ampliamente la Galantamina y su sal cuaternaria, N-metilgalantamina⁸³, no sólo son responsables de la potenciación del receptor de acetilcolina, sino que tienen actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa, por esto se reconoce como el principal candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.⁸⁴ Además de estos compuestos se conoce un diverso grupo de ligandos que actúan como moduladores alostéricos en los nAChRs, entre éstos el catión Zn^{2+} , hormonas esteroidales, desformilflustrabromina y NS9283. Sin embargo, con la excepción de Zn^{2+} , y KAB-18, moduladores alostéricos negativos de nAChR,^{85,86} existe un limitado conocimiento del sitio de unión y de los mecanismos de transducción asociados a ligandos que se unen alostéricamente a los receptores nicotínicos.

Un análisis estructural entre donepezil y sus derivados como inhibidores de acetilcolinesterasa y las moléculas conocidas en la actualidad como potenciadores alostéricos del nAChR permitirán proponer un diseño necesario para construir moléculas que puedan actuar de manera dual sobre estos sistemas. La interacción del segmento *N-bencil*piperidina en el sitio aniónico catalítico es una pieza fundamental en la inhibición de AChE y en el otro extremo un anillo aromático (indanona) interactuando con el sitio periférico. El anillo indólico de la *desformilflustrabromina* es parte del esqueleto principal

y como se desconoce el sitio específico donde se une al receptor nicotínico, se cree que su contribución pueda ejercer un papel importante en la potenciación alostérica del receptor. Una estructura química que combine el segmento *N-bencil*piperidina, importante en la construcción de un inhibidor de la AChE, con el anillo indólico de la desformilflustrabromina (atribuyendo su aporte a la modulación alostérica en nAChR), podría aportar al desarrollo de nuevas moléculas que actúen de manera dual sobre estos sistemas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. FORMULACIÓN DE PROYECTO

De los antecedentes recabados para proponer este trabajo se consideró un aspecto importante en el control de la enfermedad de Alzheimer: la degradación de moléculas de acetilcolina conlleva a la disminución de su concentración en la hendidura sináptica provocando que los receptores nicotínicos no sean activados adecuadamente dificultando, por este medio, la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior de la célula nerviosa, causando deficiencia de las funciones cognitivas cerebrales. Por ello sería interesante el control de la enzima encargada de la degradación de acetilcolina y a su vez la potenciación del neurotransmisor mediante el uso de ligandos que puedan actuar alostéricamente sobre el receptor nicotínico.

Considerando la búsqueda bibliográfica y los segmentos moleculares de los inhibidores estudiados se propone el siguiente esqueleto molecular del cual se establece que:

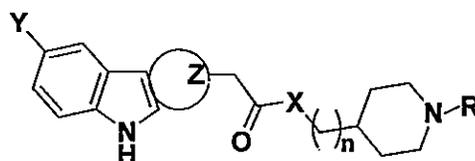


Figura 13. Plantilla molecular para el diseño de nuevos inhibidores de AChE.

2.2. HIPÓTESIS

Derivados de *tetrahydro-carbolinas* y *N-bencilpiperidinas* unidos en un mismo esqueleto molecular formarán nuevos compuestos los actuarán como inhibidores competitivos de acetilcolinesterasa con posible potenciación alostérica de nAChR.

Con el estudio presentado se propone realizar modificaciones concretas sobre esta plantilla cambiando los grupos funcionales e incorporando sustituyentes que permitan obtener moléculas con actividad inhibitoria sobre AChE.

2.3. OBJETIVOS

Sintetizar una serie de moléculas las cuales serán evaluadas en acetilcolinesterasa como inhibidores de la actividad enzimática y como potenciales moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina. Para lograrlo se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar una serie de compuestos derivados de *tetrahidro-β-carbolina*, *tetrahidro-γ-carbolina* y derivados *N-piperidina* en el mismo esqueleto molecular a través de la modificación de grupos funcionales y la incorporación de sustituyentes.
2. Caracterizar los compuestos sintetizados a través de métodos espectroscópicos y criterios de pureza.
3. Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados sobre la enzima acetilcolinesterasa
4. Estudiar el efecto que provocan las moléculas con mayor perfil de inhibición en acetilcolinesterasa en el receptor nicotínico de acetilcolina.

3. METODOLOGÍA.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.1. General.

Todos los reactivos y solventes químicos utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron adquiridos de fuentes comerciales (*Merck Millipore, Sigma-Aldrich, AK Scientific Inc., Alfa Aesar y Distribuidora Científica*).

Las reacciones fueron monitoreadas mediante *cromatografía en capa fina* (TLC, en sus siglas en inglés, *Thin Layer Chromatography*) usando cromatofolios de sílica gel del tipo GF-254 sobre soporte de aluminio. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo iluminándolos con una lámpara UV con emisión a 254 nm y reveladores químicos como *Reactivo de Dragendorff*, solución de permanganato de potasio y vapores de yodo, según sea el caso.

La purificación de los productos, en la mayoría de las reacciones, se realizó mediante cromatografía en columna de vidrio utilizando como fase estacionaria sílica gel N° 60 Merck de 230-400 mallas y utilizando como fase eluyente mezcla de solventes en proporciones indicadas en cada protocolo de reacción. En algunos casos fue utilizada la cromatografía preparativa en placas de vidrio de 20 x 20 cm con una capa de 5 a 10 mm de espesor de sílica gel para cromatografía preparativa.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo *Stuart SMP3* dotado de una termocupla para la medición de tres muestras de forma paralela.

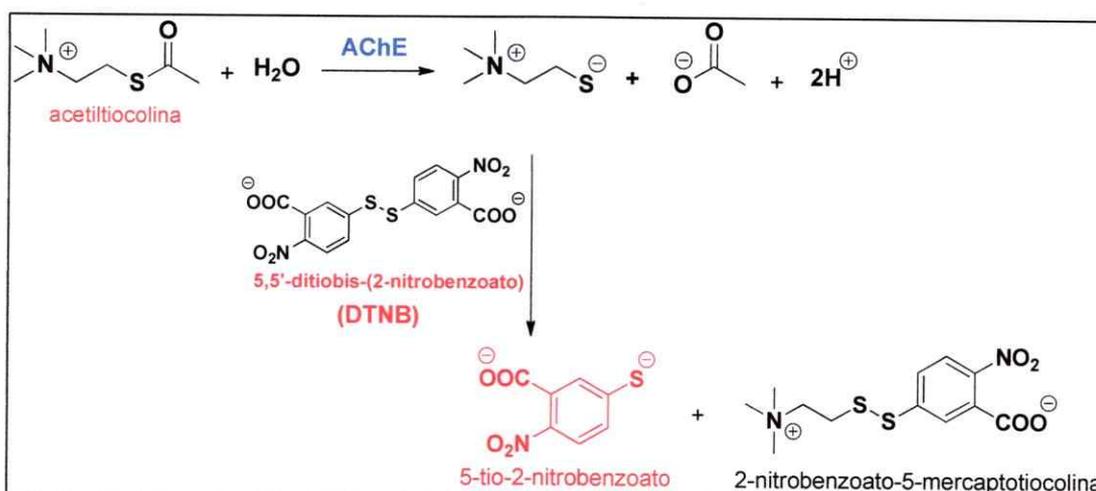
Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron de un equipo BRUKER AVANCE III multidimensional operando a 400 MHz y 200 MHz (^1H) y 100 MHz (^{13}C) con desplazamientos químicos expresados en partes por millón (en cloroformo-*d*, D_2O , $\text{DMSO-}d_6$), campo bajo desde TMS como un patrón interno y el acoplamiento en Hertz.

La espectrometría de masa fue se realizó en Micromass ZMD 2000 por ionización por electropulverización positiva (ESI en su sigla en inglés). EL espectro de masa de alta resolución fue obtenido usando el espectrómetro Jeol GCMate y desarrollado a 70 eV por impacto electrónico.

3.1.2. Medición de la Actividad Catalítica de Acetilcolinesterasa.

Los compuestos sintetizados fueron evaluados como inhibidores de acetilcolinesterasa a través del ensayo enzimático basado en el método espectroscópico de Ellman⁸⁷. La enzima acetilcolinesterasa humana (*hAChE*) se obtuvo de manera comercial desde Sigma-Aldrich al igual que la acetiltiocolina (ATI) y el ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). Para llevar a cabo el procedimiento reportado se preparó la solución control usando 150 μL de una solución tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, 20 μL de una solución de DTNB 5mM y 10 μL de enzima *hAChE*. Por otro lado, se prepararon las soluciones de prueba usando 150 μL de una solución tampón fosfato 0,1M a pH 7,4, 20 μL de una solución de DTNB 5 mM, 10 μL de enzima *hAChE* y luego 2 μL de una solución 1 mM en DMSO del compuesto (inhibidor) estudiado. Luego de 15

minutos de incubación se agregaron 20 μL de una solución de yoduro de acetiltiocolina 5 mM sobre las soluciones de prueba y del control. Se midió inmediatamente la absorbancia de la solución enzimática a una longitud de onda de 412 nm mediante un Lector de Elisa TECAN Infinite M200 y monitoreada nuevamente cada 2 minutos en un tiempo total de 10 minutos para obtener la velocidad inicial de la reacción.



Esquema 1: Reacción que permite cuantificar la concentración de acetiltiocolina hidrolizada por AChE mediante la formación de tiocolina como producto la cual reacciona rápidamente y de manera estequiométrica con DTNB para obtener 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina y 5-tio-2-nitrobenzoato. Éste último es cuantificado en un espectrofotómetro por medición de la absorbancia de luz visible a 412nm. De manera indirecta, conociendo la cantidad de acetiltiocolina que es hidrolizada por AChE, es posible conocer la cantidad de enzima inhibida y con ello la cantidad de sustrato estudiado que inhibe AChE.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición AChE} = 100 \times \left(\frac{v_i - v_0}{v_i} \right)$$

donde v_i es la velocidad inicial de la reacción enzimática en ausencia del inhibidor y v_0 la velocidad inicial de la reacción enzimática en presencia del inhibidor.

Para los compuestos que mostraron actividad inhibitoria significativa ($\geq 50\%$) se calculó el valor de su IC_{50} midiendo la velocidad inicial de la reacción enzimática usando

diferentes concentraciones del inhibidor en estudio (100 μM , 10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM y 0,001 μM) y graficando el porcentaje de inhibición de AChE en función del logaritmo de la concentración del inhibidor evaluado. Se obtuvo una curva del tipo dosis-respuesta y se determinó el IC_{50} como la concentración del inhibidor que redujo al 50% la actividad enzimática de AChE. Los datos obtenidos fueron procesados en el software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

3.1.3. Determinación del Mecanismo de Inhibición de Acetilcolinesterasa.

La determinación del mecanismo de inhibición de acetilcolinesterasa permitió conocer si los inhibidores evaluados compiten con el sustrato por el sitio catalítico (inhibidores competitivos), si se unen tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato de manera no excluyente (inhibidores no-competitivos) o si sólo se unen al complejo enzima-sustrato, pero no a la enzima libre (inhibidores incompetitivos). Para determinar el mecanismo de inhibición de un compuesto en particular se prepararon un total de 22 soluciones usando 150 μL de una solución tampón fosfato 0,1mM a pH 7,4, 20 μL de una solución de DTNB a 5 mM y 10 μL de enzima *hAChE*. A 11 de ellas se agregaron 2 μL de una solución del inhibidor en estudio a una concentración igual a 0,5 μM y las once restantes fueron usadas de control. Luego de agregar el inhibidor se incubó por 15 minutos y posteriormente se agregaron 20 μL de acetiltiocolina (ATI) a diferentes concentraciones (25 μM , 125 μM , 250 μM , 500 μM , 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM, 10 mM, 25 mM y 30 mM) a las soluciones en presencia y en ausencia del inhibidor en

estudio. Una vez agregado el sustrato se midió la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 412 nm a tiempo igual cero y monitoreada nuevamente cada 2 minutos en un tiempo total de 10 minutos para obtener la velocidad inicial de la reacción enzimática en ausencia y en presencia del inhibidor estudiado. Se graficaron los datos de velocidad de reacción en función de la concentración del sustrato y se obtuvo una curva de saturación con un valor máximo de velocidad al que tiende la curva experimental (V_{Max}). Del gráfico se pudo obtener el valor de la constante de Michaelis (K_M) que corresponde a la concentración del sustrato al cual la velocidad de reacción es la mitad que la V_{Max} . También se analizaron los datos obtenidos mediante la construcción del *diagrama de Lineweaver-Burk* en donde se grafica el inverso de la velocidad de la reacción ($1/V$) en función del inverso de la concentración del sustrato ($1/[S]$) obteniéndose una recta, identificando V_{Max} y K_M ; el punto de corte con el *eje de las ordenadas* es equivalente al inverso de la V_{Max} y el corte en el *eje de las abscisas* a $-1/K_M$.

3.1.4. Estudio de modulación alostérica del Receptor Nicotínico de Acetilcolina

La expresión de los receptores nicotínicos de acetilcolina en la membrana de los ovocitos de *Xenopus laevis* se realizó en el Laboratorio de Neurociencia Molecular, en el Departamento de Ciencias Biológicas y Médicas de la Universidad Oxford Brookes con la colaboración de la Dra. Isabel Bermúdez Díaz, de acuerdo al protocolo reportado por su grupo de investigación⁸⁸. Los ovocitos se colocaron en una cámara de registro de volumen 0,1 mL y se perfundieron con una *Solución de Ringer Modificada* (esto es una solución preparada con 150 mM de NaCl, 2,8 mM de KCl, 10 mM de HEPES y 1,8 mM de CaCl₂ ajustada con NaOH para obtener un pH = 7,2) a una velocidad de 15 mL/minutos. Las respuestas de corriente se registraron usando dos electrodos con fijación de voltaje, manteniendo un potencial de -60 mV utilizando el amplificador de pinzas de ovocitos OC-725C (Warner Instruments, USA) y el software Labscribe (Iworx, NH, USA). Los electrodos contenían una solución de KCl 3M con una resistencia inferior a 1 MΩ. Las soluciones de acetilcolina y de los inhibidores de AChE evaluados se prepararon usando la *Solución de Ringer modificada* y los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Se inyectaron 0,1 mM de acetilcolina y se normalizaron los picos de corriente producidos mediante la inyección de 1,0 mM de acetilcolina (EC₁₀₀). Luego de normalizada la corriente, Se inyectaron 0,1 mM de acetilcolina (EC₁₀) junto a 10 μM del inhibidor de AChE en estudio. Conjuntamente a la inyección, se midió la corriente producida por la adición de inhibidor de AChE en presencia de acetilcolina. El experimento fue repetido usando 100 μM del inhibidor de AChE en estudio junto a 0,1 mM de acetilcolina (EC₁₀). Se comparó, finalmente, la intensidad de corriente en ausencia

de la acetilcolina, la intensidad de corriente en presencia de acetilcolina (0,1 mM) y la intensidad de corriente en presencia del inhibidor de AChE en estudio a diferentes concentraciones (10 μ M y 100 μ M).

3.1.5. Modelación Molecular de la enzima Acetilcolinesterasa.

Para la construcción del modelo computacional de acetilcolinesterasa humana se utilizó su estructura cristalina (*código PDB: 4EY7*) desde Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Luego de acondicionar el modelo, éste fue solvatado en una caja cúbica de moléculas de agua TIP3P⁸⁹. Se neutralizaron las cargas del sistema agregando iones Na⁺. El total de átomos, en conjunto, fue de 66.378. Finalmente, la simulación molecular se realizó mediante el paquete computacional NAMD 2.9⁹⁰. Luego de tres etapas de minimización de energía, se realizó la dinámica molecular del sistema equilibrado abarcando 5ns con condiciones periódicas de borde en el conjunto NPT: ensamblado isothermal (300 K) e isobárico (1 atm). El modelo resultante fue validado con Anolea Web Server⁹¹ y su calidad estereoquímica monitoreada por PROCHECK⁹².

Los ligandos en estudio se crearon con el software Spartan10 (WaveFunction, Inc.) y se optimizaron geométricamente usando el *Método de Hartree-Fock* con las funciones básicas de polarización 6-31G*. El acoplamiento molecular se realizó en Autodock4.0 sobre el modelo obtenido por la dinámica molecular usando el Algoritmo Genético Lamarckiano⁹³ y aplicando los protocolos por defecto, agregando los siguientes

parámetros: número de corridas: 50, tamaño de la *Caja de Grillas*: 12 x 22 x 12 centrada en las coordenadas -5,337 (x); -11,471 (y); -4.371 (z) con un espaciado de 0,75 puntos. Los complejos proteína-ligando obtenidos con más baja energía fueron seleccionados para el análisis de las interacciones resultantes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Química de los compuestos sintetizados.

En el trabajo de tesis fue propuesta la síntesis de nuevos derivados de *tetrahydrocarbolinas* a partir de tetrahidro-carbolinas previamente sintetizadas y con la combinación de derivados de *N*-piperidina. Las moléculas diseñadas fueron construidas utilizando *tetrahydro-β-carbolina*, *tetrahydro-γ-carbolina* y *N*-bencilpiperidina de acuerdo a la búsqueda bibliográfica realizada previamente.⁵⁰⁻⁵⁹

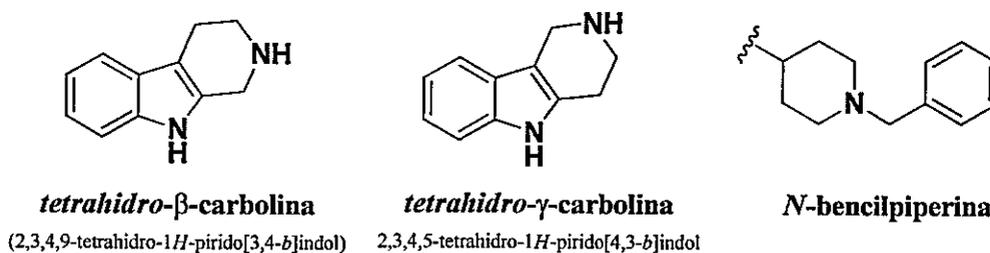


Figura 14: Segmentos moleculares utilizados en la construcción de las moléculas diseñadas

Para el diseño de nuevas moléculas con los segmentos anteriormente descritos fue propuesta la elaboración de una plantilla molecular, similar a la estructura del donepezil, que es un inhibidor de acetilcolinesterasa. La plantilla molecular fue elaborada considerando la modificación de los segmentos moleculares a fin de obtener por cada modificación una nueva molécula. Las modificaciones aceptadas son aquellas que contribuyen a obtener moléculas con un porcentaje de inhibición mayor al 50% sobre acetilcolinesterasa y que permiten cambiar sus grupos funcionales en función que cada modificación permita obtener moléculas con mayor porcentaje de inhibición de la enzima y con menores valores de IC_{50} .

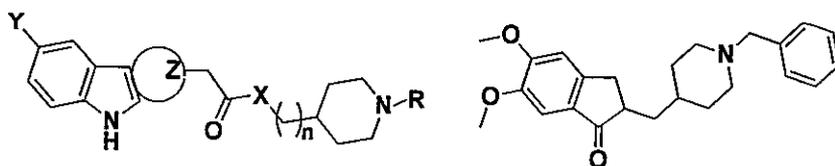


Figura 15: Plantilla molecular para el diseño de nuevas moléculas que actúen como inhibidores de acetilcolinesterasa. Diseñadas a partir de la similitud estructural con donepezil con la incorporación del segmento derivado de *N*-piperidina y de tetrahidrocarbolinas.

Para unir el segmento de la *tetrahidrocarbolina* y *N*-piperidina se incorporó un carbono metilénico con un grupo carbonilo como espaciador con el fin de mantener separación entre las porciones moleculares y que así puedan interactuar indistintamente con el sitio aniónico periférico y el subsitio aniónico en el interior de la enzima tal como la distribución que adopta el donepezil.⁵⁰ Además, como la cavidad donde se une el sustrato de acetilcolinesterasa posee residuos de aminoácidos de carácter básico y grupos aromáticos se presenta la posibilidad de formar puentes de hidrógeno; como una primera aproximación, se ha considerado la incorporación de un grupo amida, el cual puede actuar como donador y aceptor de puentes de hidrógeno. El diseño del primer compuesto sintetizado, **MF1047**, consideró el empleo de la *tetrahidrocarbolina* sin la incorporación de sustituyentes en el anillo, empleando como conector un grupo amida y en el otro extremo usando el grupo bencilo unido al nitrógeno de la *N*-piperidina. Así, el compuesto **MF1047** está formado por el anillo de la *tetrahidro-β*-carbolina, un grupo metileno entre la *tetrahidrocarbolina*, el grupo amida y por otro grupo metileno entre la amida y *N*-bencilpiperidina.

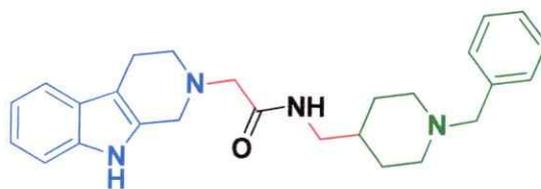


Figura 16: Molécula MF1047. Conformada por un segmento tetrahidro- β -carbolina, un grupo amida y un segmento *N*-bencilpiperidina. Se observan, además, los carbonos metilénicos que unen cada segmento y permiten que cada uno de éstos pueda rotar de manera independiente.

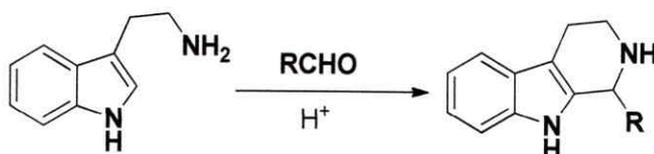
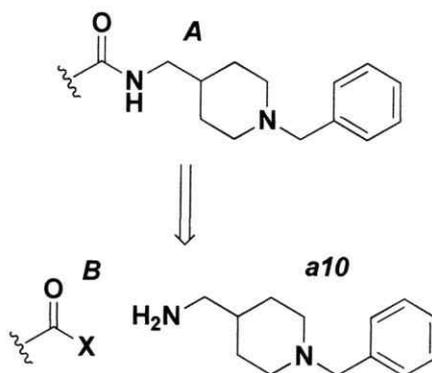


Figura 17: Reacción de ciclación de Pictet-Spengler

La síntesis de tetrahidro- β -carbolidinas se describe ampliamente en la literatura. Una manera de sintetizarla es con la reacción de *Pictet-Spengler* en la cual una *ariletilamina*, como la triptamina, se somete a un cierre del anillo después de la condensación con un aldehído o cetona.⁹⁴ Por lo general, estas reacciones ocurren sobre los 80°C empleando un catalizador ácido. Esta metodología fue usada para la obtención de la tetrahidro- β -carbolina usando como compuestos de partida *triptamina* y *paraformaldehído*. Sin

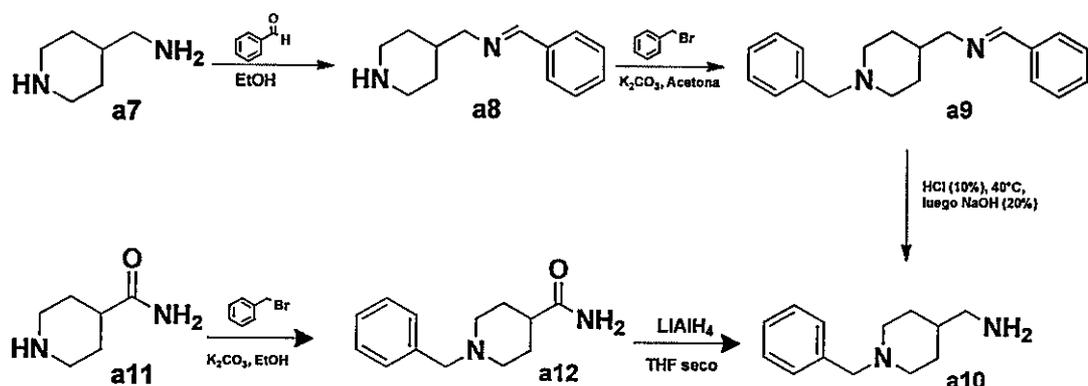
embargo y luego de numerosos intentos, el producto se formó con bajos rendimientos (menores al 20%) y en otros casos, simplemente no se formó en cantidades cuantificables. Finalmente, y como una variante de la reacción de *Pictet-Spengler*, se utilizó el método publicado en *Organic Syntheses* a partir de



Esquema 2: Ruptura del segmento derivado de *N*-piperidina

triptamina y ácido glioxílico en agua a pH = 4 y luego pudo aislarse el producto final (2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol, **reacción 6.1.1.1**).⁹⁵

Por otro lado, la formación del segmento *N*-bencilpiperidina (**a10**) estuvo determinada por la construcción del conector central (**A**). Por análisis retrosintético se propuso la síntesis del compuesto **A** a partir de un haluro de acilo (**B**) y 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (**a10**) (Esquema 2). Esta última molécula se sintetizó mediante la **reacción 6.1.3**. Para la obtención de **a10** fueron desarrolladas dos metodologías sintéticas (esquema 3), la primera a partir de 4-(metilamino)piperidina (**a7**, **reacción 6.1.3.A; Procedimiento A**) y la segunda a partir de piperidin-4-carboxamida (**a11**, **reacción 6.1.3.B; Procedimiento B**). El procedimiento A, comenzando desde **a7**, se llevó a cabo mediante la formación del grupo imino (**a8**) protegiendo la amina primaria, permitiendo

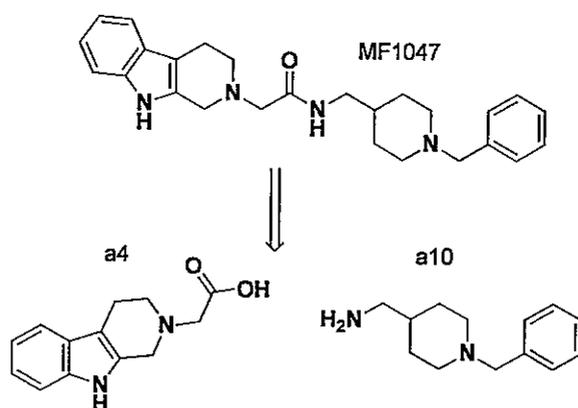


Esquema 3: Formación de *N*-bencilpiperidina a partir de dos procedimientos diferentes: de **a7** (Procedimiento A) y de **a11** (Procedimiento B).

el ataque nucleofílico del nitrógeno secundario sobre el carbono metilénico del bromuro de bencilo para formar el compuesto **a9** y finalizando con la desprotección del grupo amino primario mediante hidrólisis ácida, obteniéndose el compuesto **a10**. Por otro lado, el procedimiento B a partir de **a11**, se llevó a cabo mediante la alquilación del nitrógeno secundario con bromuro de bencilo obteniéndose el compuesto **a12**. Posteriormente,

usando LiAlH_4 , el grupo amida se redujo a la amina primaria formándose el compuesto **a10** como producto final.

Si bien ambas reacciones tuvieron rendimientos parecidos, el procedimiento **B** se llevó a cabo sólo en dos pasos sintéticos a diferencia del procedimiento **A** que se efectuó en tres pasos. Adicionalmente, en el procedimiento **A** se forman varios compuestos con *Rf* similares, por lo tanto, la purificación del producto final se desarrolló de manera más eficiente a través del procedimiento **B**.

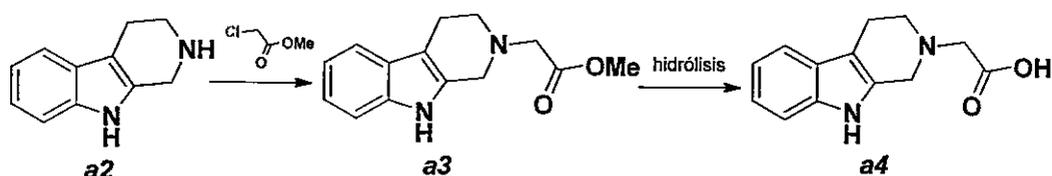


Esquema 4: retrosíntesis del compuesto MF1047.

Luego de sintetizar el compuesto **a10** propuesto en el *esquema 2*, se determinó el grupo funcional necesario para el *compuesto B*. *Wolfgang König* y *Rolf Geiger*, en el año 1970 reportaron el uso de dos reactivos químicos para desarrollar un método eficiente de síntesis de péptidos a partir de ácidos carboxílicos y aminas mediante la formación de amidas⁹⁶ por la activación del grupo carbonilo con *diciclohexilcarbodiimida* (DCC) y *1-hidroxibenzotriazol* (HOBT). Actualmente, se han obtenido nuevos derivados de DCC, pues éste forma subproductos que son difíciles de eliminar. El compuesto DIC (acrónimo para *N,N'*-diisopropilcarbodiimida) y EDC (también llamado EDAC o EDCI, acrónimos para *1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida*) se usan actualmente en la catálisis de

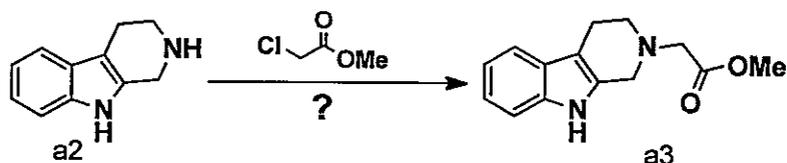
reacción para la formación de amidas entre ácidos carboxílicos y aminas. Respecto a la reacción en estudio, la retrosíntesis efectuada al compuesto MF1047 (esquema 4) nos muestra que sería posible obtener dicho producto por la reacción entre las especies **a10** y **a4** mediada por el uso de HOBT y EDC.

La formación del compuesto **a4** se llevó a cabo a partir del compuesto **a2** mediante la alquilación del nitrógeno básico de la *tetrahydro-β-carbolina* con 2-cloroacetato de metilo, para posteriormente realizar la hidrólisis del grupo éster y obtener el producto esperado (Esquema 5).



Esquema 5: Formación del ácido 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acético (**a4**) a partir del compuesto **a2** en dos pasos sintéticos.

La obtención del compuesto **a3** se estudió en las siguientes condiciones:



Esquema 6: Formación de 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de metilo (**a3**) a partir del compuesto **a2**

Tabla 1: Formación de 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de metilo (**a3**). Condiciones sintéticas y sus rendimientos

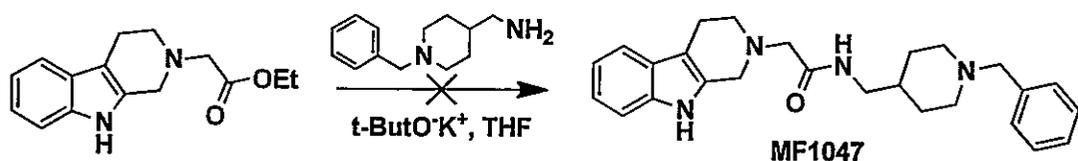
N°	Base utilizada	Solvente	T° (°C)	Tiempo reacción (horas)	% Rendimiento
1	K ₂ CO ₃	AcCN	Ambiente	24h	32
2	K ₂ CO ₃	DMF	Ambiente	24h	47
3	CS ₂ CO ₃	DMF	Ambiente	24h	70
4	CS ₂ CO ₃	DMF	80	18h	87

La formación de **a3** se estudió modificando las condiciones de síntesis (Tabla 1). Se realizaron las reacciones 1 y 2 a temperatura ambiente utilizando K_2CO_3 como base y monitoreadas durante 24 horas. Los solventes orgánicos AcCN y DMF disuelven completamente tanto el nucleófilo como el electrófilo, sin embargo, ninguno de los dos solventes fue capaz de disolver la base utilizada. Esto explicaría el bajo rendimiento de la reacción a temperatura ambiente. Monitoreadas las reacciones, el rendimiento máximo obtenido usando AcCN como solvente fue de un 32% mientras que, usando DMF por el mismo tiempo de reacción, el rendimiento máximo obtenido fue de un 47%. Al emplear Cs_2CO_3 en reemplazo de K_2CO_3 y manteniendo las condiciones sintéticas, el rendimiento de la reacción aumentó a un 70%. Con la finalidad de perfeccionar el método y usando las condiciones de la reacción N° 3, aumentando la temperatura del sistema a $80^\circ C$ se encontró que luego de 18 horas de reacción el rendimiento aumentó a un 87%.

La reacción no estuvo exenta de dificultades, puntualmente en la hidrólisis del compuesto **a3** para la formación del derivado ácido carboxílico (*esquema 5*). Estas se realizan comúnmente en agua usando una solución acuosa de HCl o una solución acuosa de NaOH, hidrólisis ácida o básica, respectivamente. Se realizaron ambos procedimientos con el compuesto **a3**, sin embargo, el producto esperado no pudo ser aislado, incluso la reacción fue repetida usando el derivado etílico del éster, pero el producto tampoco pudo ser monitoreado. En todos los casos se formó una solución acuosa oscura, de un color café intenso, a pesar que el seguimiento se realizó mediante TLC, el producto no se desplazó a través de las placas de sílica, sino que se mantuvo en el lugar donde fue aplicado, posiblemente por la formación del zwitterión respectivo. No fue posible extraer el

compuesto **a4** de la solución; el producto es soluble en agua y el volumen de la mezcla no fue posible liofilizar o evaporar usando un rotavapor a presión reducida. Fue necesario entonces, realizar una búsqueda más exhaustiva para la obtención del derivado.

Bo Ram Kim y colaboradores en el año 2012 publicaron un trabajo en el que describen la obtención de derivados amídicos mediante la reacción de ésteres con aminas.⁹⁷ Se propuso la obtención del compuesto **MF1047** de acuerdo al *esquema 7*, adaptando el protocolo a la síntesis estudiada y utilizando el derivado etílico del éster.



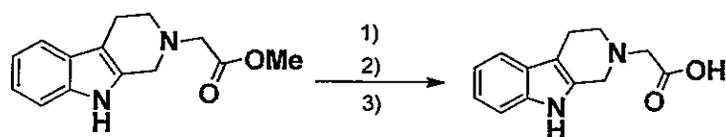
Esquema 7: Procedimiento adaptado de la reacción de Bo Ram Kim⁹⁷ para la obtención de MF1047

El compuesto t-BuOK (740 mg, 6,6 mmol) fue disuelto en 40 mL de THF de grado técnico, que contenía al menos 0.2% H₂O) con agitación constante a temperatura ambiente. El compuesto 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de etilo (852 mg, 3,3 mmol) y 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (674 mg, 3,3 mmol) fueron agregados inmediatamente y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que la amina fuera completamente consumida.

Todas las reacciones y variantes reportadas por los autores se desarrollaron por un periodo máximo de 1 hora. La principal novedad del método reportado por *Bo Ram Kim* era el corto tiempo de reacción con rendimientos superiores al 90%. Sin embargo, la síntesis desarrollada se monitoreó por 24 horas y no se observó la formación de producto (mediante por TLC). La situación no cambió luego de 48 horas de reacción. Se optó, por

lo tanto, de revisar de una manera más exhaustiva las referencias obtenidas desde la literatura o buscando nuevas metodologías de síntesis.

La transformación del éster metílico al ácido carboxílico se estudió ampliamente en el trabajo de tesis de *Tichenor*⁹⁸ y por *Hitchcock* en su patente.⁹⁹ Adoptando el procedimiento descrito y aplicándolo sobre la reacción de estudio se propuso el siguiente esquema, detallando las condiciones sintéticas:



Esquema 8: Protocolo de reacción para la formación del compuesto **a4**. Los números 1, 2 y 3 están referidos a las condiciones de la reacción que se reportan más abajo.

Los autores reportaron las siguientes condiciones para la obtención del producto:

- 1) El uso como solvente de una mezcla de THF, MeOH y agua destilada en las proporciones 3:1:1. El uso de 4 equivalentes de LiOH hidrato y 3 horas de reacción de la mezcla a temperatura ambiente.
- 2) Luego de finalizada la reacción el solvente debe ser evaporado parcialmente.
- 3) El crudo obtenido debe ser acidificado con HCl 2N hasta obtener un pH = 2. El sólido formado se filtra, se lava con éter etílico y se seca a temperatura ambiente.

Este protocolo fue replicado para la reacción del *esquema 8* pudiendo aislar e identificar el producto con un rendimiento de 22%. En la necesidad de obtener una mayor cantidad de producto, el método de obtención del derivado de ácido carboxílico fue

perfeccionado, modificando algunas condiciones sintéticas como resultado de varios intentos para obtener el producto deseado:

En el paso 1 se utilizó un total de 5 equivalentes de LiOH hidrato. Esto permitió que el rendimiento de la reacción aumentara a un 45%. En el paso 2 el solvente fue evaporado completamente antes de neutralizar el crudo formado. Esta modificación permitió aumentar el rendimiento del 45% al 60%. Considerando esta modificación en el estudio, en el paso 3 el crudo fue acidificado hasta pH = 3 obteniéndose un rendimiento del 97%. Cuando se cambió el pH a 4 el rendimiento del producto fue del 52%. De acuerdo a estas modificaciones se protocolizó el método de síntesis del compuesto **a4** en la **reacción 6.1.1.3**.

Retomando la síntesis del compuesto **MF1047**, se estudió el protocolo de síntesis usando HOBT y EDCI como catalizadores de la reacción entre los compuestos **a4** y **a10**, derivados del ácido carboxílico y de la amina, respectivamente.

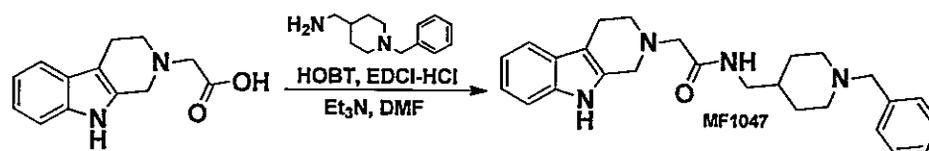


Tabla 2: Formación de MF1047. Condiciones sintéticas y sus rendimientos (Eq: equivalentes).

N°	Eq. Ác. Carboxílico	Eq. Amina	Eq. Et ₃ N	Eq. HOBT	Eq. EDCI	Temperatura (°C)	% Rendimiento
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	ambiente	0
2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	80	Cualitativo
3	1,0	1,0	4,0	1,0	1,0	80	64

La tabla 2 muestra las condiciones estudiadas en la obtención del compuesto **MF1047**. Se cambiaron los equivalentes de la base (**Et₃N**) y se aumentó la temperatura de la reacción, manteniendo el número de equivalentes del derivado del ácido carboxílico, la

amina, HOBT y EDCI. El compuesto **MF1047** se formó utilizando 4 equivalentes de trietilamina y calentando la reacción a 80 °C con un rendimiento del 64% luego de purificar el producto a través de una columna cromatográfica con sílica gel. El espectro RMN-¹³C mostró señales correspondientes a los doce tipos de átomos de carbono con hibridación sp² donde se observa la señal en 170 ppm, característica del carbono del grupo carbonilo de la amida, de acuerdo a la estructura propuesta. Por espectrometría de masas, la señal principal presentó una relación de *m/z* de 417,65, la cual concuerda con el peso molecular del compuesto. Luego de caracterizar el producto se midió el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por la acción de este compuesto de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo III de Metodología, obteniendo un 78% de inhibición de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa.

En función de la estructura química del compuesto MF1047 y de la plantilla molecular, se diseñaron nuevas moléculas como inhibidores de la actividad catalítica de acetilcolinesterasa determinando si el porcentaje de inhibición aumenta o disminuye al realizar las modificaciones en la plantilla.

Se aplicaron las siguientes modificaciones representadas en la tabla 3, en función de la plantilla propuesta, para la formación del compuesto **MF1047**:

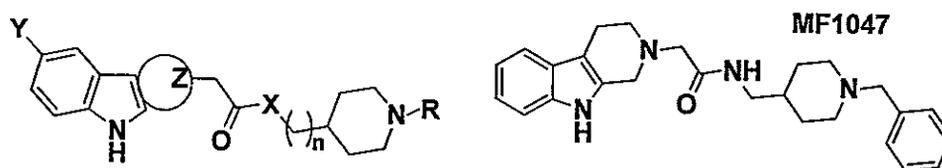


Tabla 3: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047

N°	Nombre	Y	Tetrahidro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	bencilo

Restringiendo la torsión del segmento *N*-bencilpiperidina al eliminar el carbono metilénico *n*, se propuso la síntesis de la molécula **MF1042** para evaluar si esta modificación genera un compuesto con mayor porcentaje de inhibición sobre acetilcolinesterasa, en comparación con el compuesto **MF1047**. La construcción de la molécula **MF1042** se resume en la tabla 4:

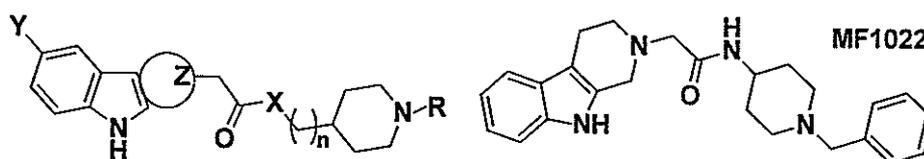


Tabla 4: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047 y MF1042.

N°	Nombre	Y	Tetrahydro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	bencilo

La síntesis de la molécula **MF1042** se llevó a cabo mediante una reacción análoga a la formación de **MF1047**: utilizando el derivado carboxílico de la *tetrahydro-β*-carbolina (**a4**) y el reactivo *4-amino-1-bencilpiperidina*, adquirido comercialmente desde *Sigma-Aldrich*. El procedimiento de síntesis de este compuesto se describe en la **reacción 6.1.16**. La caracterización del compuesto fue llevada a cabo mediante la medición de su punto de fusión, análisis del espectrómetro de masa y los espectros IR, RMN de ¹H y ¹³C. En este último se observó la ausencia de la señal del carbono *n* a campo alto y que se observó en el espectro de RMN-¹³C de **MF1047** a 45,86 ppm. En el espectro de RMN-¹H de **MF1042** se destacó la ausencia de la señal de los protones del carbono metilénico suprimido y que en el espectro de RMN-¹H del compuesto **MF1047** se observó como un triplete a 3,19

ppm. Por espectroscopia de masa la señal principal presentó una relación de m/z de 403,67 lo que concuerda con el peso molecular del compuesto esperado. Luego de sintetizado el compuesto **MF1042**, se evaluó su capacidad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa, disminuyendo ésta a 24% en comparación al 78% de inhibición que presenta **MF1047**. En función de este resultado se infiere la importancia del carbono metilénico entre el grupo amida y el anillo de piperidina el cual permite la libre rotación del enlace C-C, eliminando la tensión torsional del grupo *N-bencilpiperidina*. En función a este resultado, se mantuvo el carbono metilénico en las modificaciones posteriores de la plantilla.

Se sintetizó el compuesto **MF1050**, estructuralmente similar a **MF1047**, sin embargo, **MF1050** posee un grupo éster que actúa como conector entre los segmentos de la *tetrahydro-β-carbolina* y la *N*-piperidina a diferencia de **MF1047** que posee un grupo amida.

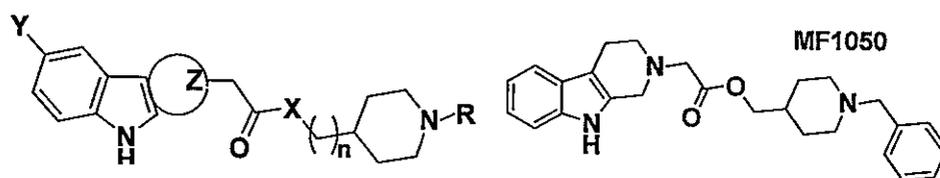
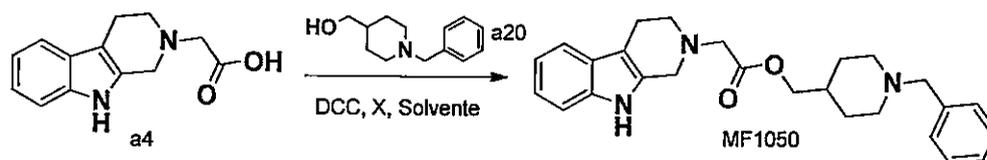


Tabla 5: Modificaciones de plantilla para la formación de **MF1047**, **MF1042** y **MF1050**.

N°	Nombre	Y	Tetrahydro-Z-carbolina	X	N	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo

El plan original de síntesis para la obtención de 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (**MF1050**) consideró la reacción del derivado ácido carboxílico de la *tetrahydro-β-carbolina* (**a4**) y el respectivo alcohol primario (**a20**), como se muestra en el *esquema 9*. Se contempló el uso de DCC

como catalizador de reacción, un agente orgánico eficaz en la síntesis de péptidos.¹⁰⁰ La reacción fue estudiada en condiciones sintéticas variables hasta obtener un protocolo eficaz de síntesis como muestra la tabla 6:

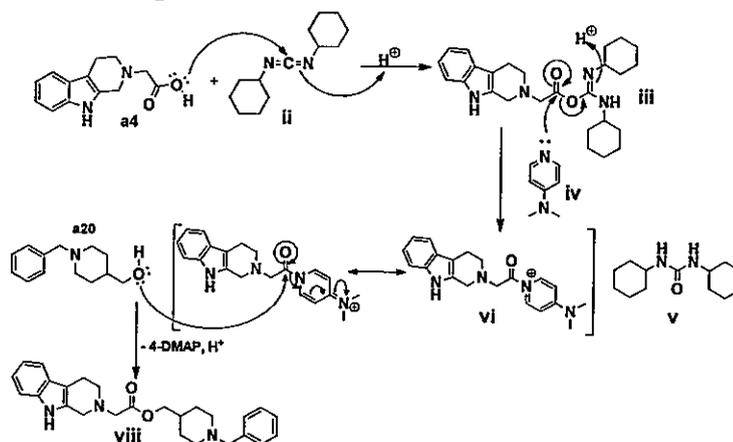


Esquema 9: Propuesta original de la reacción para la obtención del compuesto MF1050

Tabla 6: Condiciones de Reacción para la obtención del compuesto MF1047. Condiciones sintéticas y sus rendimientos. X corresponde al catalizador empleado (Eq. = equivalentes)

Nº	Eq. Ác. Carboxílico	Eq. Alcohol	Eq. DCC	Eq. X	Solvente	Temperatura (°C)	% Rendimiento
1	1,0	4,0	1,1	4-DMAP 0,1	AcCN	Reflujo	0
2	1,0	4,0	1,1	4-DMAP 0,1	DMF	Reflujo	0
3	1,0	4,0	1,1	HOBT 0,1	DMF	Reflujo	0

Las condiciones aplicadas en la síntesis de MF1050 del esquema 11 no permitieron la formación del producto. Se aisló un sólido blanco el cual, luego de analizar, no correspondió al producto esperado. El espectro de masa mostró la señal de relación de m/z de 436,5. Para obtener información acerca de las reacciones y productos involucrados en la síntesis se desarrolló el siguiente mecanismo de reacción.



Esquema 10: Mecanismo de la reacción del compuesto a4 con el compuesto a20 utilizando los reactivos DCC y 4-DMAP como catalizadores, en AcCN. Mecanismo que explicaría la formación de MF1050.

Analizando los pesos moleculares de los intermediarios de la reacción se aisló la molécula **iii** (ver *esquema 10*). La reacción en estudio, considerando las condiciones descritas en la tabla 6, permitió obtener el compuesto **iii**.

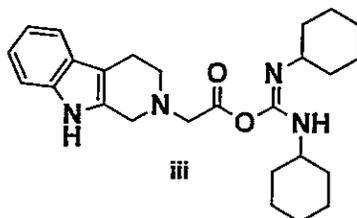


Figura 18: Compuesto **iii** de PM = 436,59 g/mol. Compuesto que correspondería el sólido formado.

Luego de aislar el intermediario formado se desarrolló la reacción entre el compuesto **iii** y el compuesto **a20** con las condiciones descritas en la *tabla 7*:

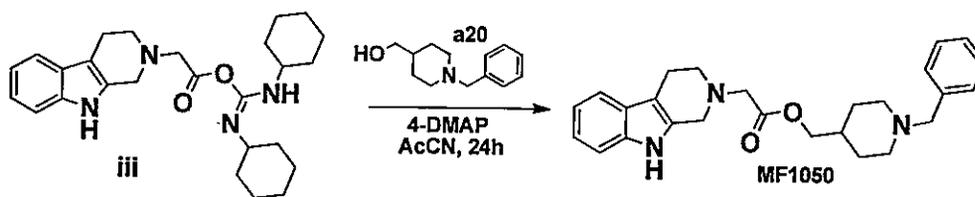
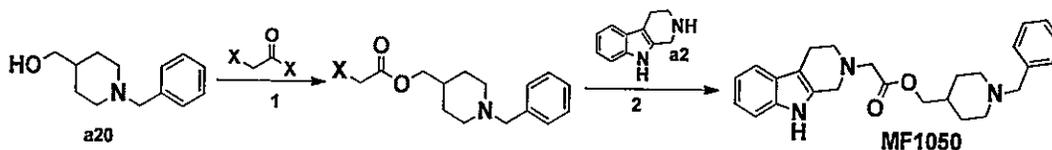


Tabla 7: Condiciones experimentales para la obtención de **MF1050** usando el intermediario aislado de la reacción anterior (Eq. = Equivalentes)

N°	Eq. Intermediario iii	Eq. Alcohol	Eq. 4-DMAP	Temperatura (°C)	% Rendimiento
1	1,0	4,0	0,1	ambiente	0
2	1,0	4,0	0,1	reflujo	0

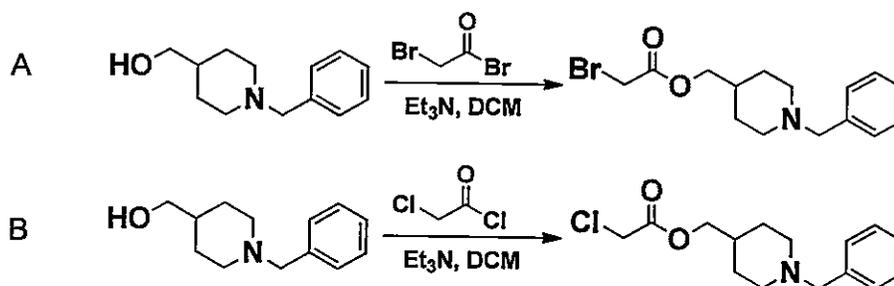
Usando las condiciones reportadas por los autores no se obtuvo el producto esperado. Mediante TLC y posteriormente usando un HPLC/UV-MS se identificaron solamente los reactivos de partida y no la presencia de nuevos productos. Tal problemática

fue abordada de manera inmediata: se modificó la ruta sintética para la obtención de **MF1050**. Se propuso la siguiente ruta de síntesis.



Esquema 11: Nueva ruta propuesta para la síntesis del compuesto MF1050

István Kádas y colaboradores propusieron realizar el paso 1 de la síntesis usando CHCl_3 o DCM como solventes y piridina o Et_3N como bases.¹⁰¹ Se propuso llevar a cabo la síntesis utilizando DCM como solvente por su bajo punto de ebullición y usar *trietilamina* como base pues puede ser removida mediante extracciones con agua destilada. Se estudiaron las siguientes transformaciones empleando los sustratos *bromuro de bromoacetilo*, y *cloruro de cloroacetilo*:



Esquema 12: Reacciones para la obtención del intermediario sintético para la formación del compuesto MF1050. En la reacción A se usó bromuro de bromoacetilo y en la reacción B se usó cloruro de cloroacetilo como reactante.

Los productos que se obtienen de las reacciones A y B del *esquema 12* son diferentes entre sí, sin embargo, ambas especies reaccionan de manera similar para formar el compuesto **MF1050**. Se probaron ambas reacciones en las mismas condiciones sintéticas obteniéndose los productos esperados. Sin embargo, cuando se almacenaron los

productos para su uso posterior cambiaron su coloración. Se analizaron a través de un HPLC/UV-MS y se observó la formación de nuevos compuestos, formados probablemente por la descomposición del producto inicial o por reacciones intermoleculares. Debido a esto, luego de sintetizarlos se emplearon inmediatamente. Otra situación a destacar ocurrió en el paso 2 del esquema 11: el derivado bromado, luego de reaccionar con la *tetrahidro*- β -carbolina, formó un mayor número de productos secundarios a diferencia del derivado clorado, dificultando la posterior purificación del compuesto **MF1050**. Finalmente, y como protocolo definitivo de síntesis, se optó por utilizar el *cloruro de cloroacetilo* como reactante en la obtención del intermediario **a21** (**reacción 6.1.8.**) para la formación del compuesto **MF1050**, como se detalla en la **reacción 6.1.18**. El producto formado se caracterizó por la medición de su punto de fusión, sus espectros RMN- ^1H , ^{13}C e IR, en este último se observan los picos característicos del grupo éster a 1735cm^{-1} propio del grupo carbonilo (C=O) y dos picos entre 1166 y 1182cm^{-1} propios del enlace C-O del éster.

Luego de obtenido el compuesto **MF1050** se evaluó su capacidad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa obteniendo el 55% de inhibición en comparación con el 78% de inhibición de la actividad catalítica provocada por el compuesto **MF1047**. En función a este resultado y manteniendo el grupo éster como conector de los segmentos moleculares en estudio, se incorporaron modificaciones sobre el anillo de la *tetrahidro*- β -carbolina: se incorporó el grupo metoxilo en posición 6 conformando la molécula **MF1046** como muestra la *tabla 8*:

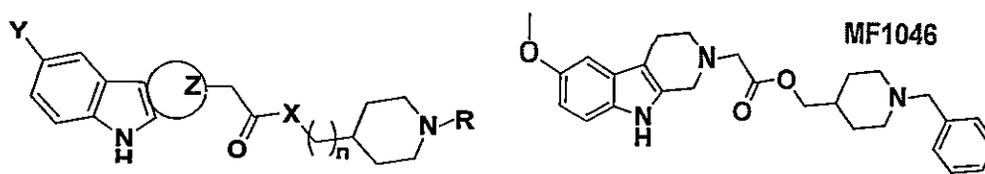


Tabla 8: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050 y MF1046.

N°	Nombre	Y	Tetrahidro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo

Para la síntesis del compuesto **MF1046**, se utilizó el mismo procedimiento sintético empleado en la obtención del compuesto **MF1050** usando los reactantes respectivos (**a6** y **a21**) tal como se especifica la **reacción 6.1.19**. La síntesis del compuesto **a6** (6-metoxi-tetrahidro-β-carbolina) se realizó, a su vez, empleando el mismo procedimiento de síntesis usado para el compuesto **a2** (tetrahidro-β-carbolina sin sustituyentes en el anillo *indol*).

La caracterización del compuesto **MF1046** se efectuó midiendo su punto de fusión, obteniendo su espectro de masa y su espectro RMN-¹H y ¹³C. En estos dos últimos se observaron señales adicionales en comparación con los espectros de **MF1050**: el singlete a campo alto que integra a tres protones a 3,85 ppm y la señal en el espectro de carbono a 55,92 ppm.

El compuesto **MF1046**, una vez sintetizado, se evaluó su porcentaje de inhibición sobre acetilcolinesterasa obteniendo el 61% de inhibición de la actividad catalítica. Comparando este valor con el porcentaje de inhibición medido para el compuesto

MF1050 (su análogo sin el grupo metoxilo en posición 6 del grupo *tetrahidro-β*-carbolina) se observó que el grupo metoxilo aporta al incremento del porcentaje de inhibición sobre acetilcolinesterasa. Para corroborar esta contribución se reemplazó el segmento de la *tetrahidro-β*-carbolina por su análogo *tetrahidro-γ*-carbolina, conservando el grupo metoxilo unido al anillo indol. De acuerdo a esto, se propuso la síntesis del compuesto **MF1061** con las modificaciones aplicadas a la plantilla inicial como lo indica la *tabla 9*:

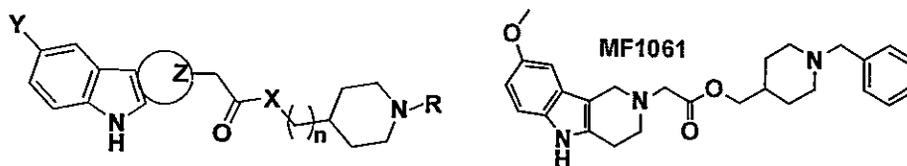
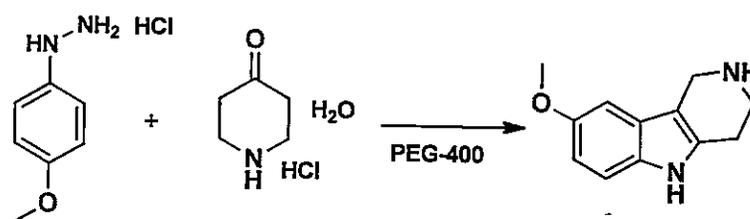


Tabla 9: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046 y MF1061.

N°	Nombre	Y	<i>Tetrahidro-Z-carbolina</i>	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo
5	MF1061	CH ₃ O	Gamma	O	CH ₂	Bencilo

El compuesto **MF1061** está conformado por un segmento de *tetrahidro-γ*-carbolina sustituido en la posición 8 por un grupo metoxilo. La denominación *gamma* fue determinada por la posición del nitrógeno básico de la *tetrahidrocarbolina*. En los acápites **reacción 6.1.13.** y **reacción 6.1.14**¹⁰² se detallan los procedimientos experimentales para su obtención. Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron muy distintos a los reportados por los autores. Es por ello que para la obtención de estos productos con un mayor rendimiento se llevó a cabo el estudio de otros métodos de síntesis.

En el año 2014 se reportó una nueva metodología de síntesis de la *tetrahydro-γ*-carbolina usando polietilenglicol 400 (PEG-400) como soporte de reacción.¹⁰³ En este reporte los autores hacen una crítica al uso de alcoholes como solventes para este tipo de reacciones atribuyendo los bajos rendimientos de la reacción a la formación de *hidrazonas* (*intermediarios de la reacción*), desplazando el equilibrio a la formación del intermediario y no del producto esperado (*tetrahydro-γ*-carbolina). El procedimiento reportado fue el siguiente:



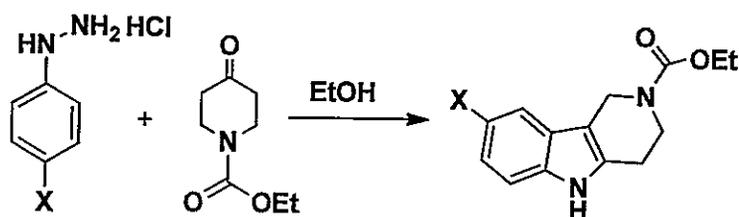
Esquema 13: Formación de 8-metoxi-tetrahydro- γ -carbolina usando polietilenglicol 400 como soporte de la reacción.

Sobre una solución de polietilenglicol 400 (PEG-400) (5 mL), se agregó fenilhidrazina (1,0 mmol) y clorhidrato de 4-piperidona monohidrato (1,0 mmol). Luego la mezcla de reacción fue calentada entre 110°C y 120°C hasta que la reacción se completara (monitoreada por TLC). Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con agua-hielo y se agitó a 0°C por 15 minutos. El sólido formado se filtró y secó.

Luego de reproducir el experimento de manera cuidadosa y repetir varias veces el procedimiento, no se obtuvo el producto deseado. Al monitorear la TLC no se observó consumo de los reactantes ni formación de nuevos compuestos. La reacción fue

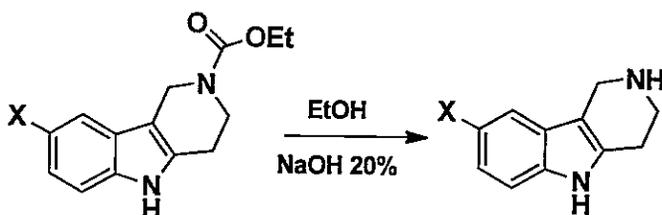
monitoreada por 24 horas más, pero no se detectó la formación de nuevos compuestos en la mezcla de la reacción.

Se desarrolló el método del *esquema 14* como una variante de la reacción reportada¹⁰² buscando un protocolo para la obtención de los productos con mejores rendimientos.



Esquema 14: Formación de derivados de tetrahydro- γ -carbolina. El nitrógeno se encuentra protegido en forma de carbamato.

Los compuestos sintetizados fueron fácilmente aislados obteniendo un alto rendimiento (entre un 80 y un 95%) usando el protocolo de síntesis descrito en acápite **reacción 6.1.13**. Luego, se eliminó la protección del grupo amino secundario obteniendo los derivados de la *tetrahydro- γ -carbolina* usando el protocolo descrito a continuación:



Esquema 15: desprotección del grupo amino secundario en forma de carbamato para la formación de los derivados de tetrahydro- γ -carbolina.

El carbamato derivado (13 mmol) se disolvió en EtOH (30 mL) y se agregaron 30 mL de una solución acuosa de NaOH al 20%. La mezcla fue calentada a reflujo por 24 horas con agitación constante. Luego de completada la reacción el solvente fue evaporado en un rotavapor a presión reducida. El crudo obtenido fue disuelto en 20 mL de una solución acuosa de NaOH al 20% y se extrajo con DCM (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró la sal y el filtrado se evaporó a sequedad hasta obtener un sólido como producto final (70-74% rendimiento).

El protocolo para la obtención del *8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol* (*8-metoxi-tetrahidro-γ-carbolina, a29*) se detalla en **reacción 6.1.14**. Finalmente, el compuesto **MF1061** se sintetizó usando los compuestos **a29** y **a21** como reactantes. El protocolo para la obtención del compuesto **MF1061** se detalla en **reacción 6.1.28**.

El compuesto **MF1061** es, estructuralmente, parecido al compuesto **MF1046**. (derivado de la *tetrahidro-γ-carbolina* y de la *tetrahidro-β-carbolina*, respectivamente, ver *tabla 9*). Luego de caracterizar el compuesto **MF1061** se pudo observar que su espectro RMN-¹H es muy similar al del compuesto **MF1046**. No obstante, se observa un desplazamiento químico de los protones de los carbonos saturados de las *tetrahidrocarbolinas*, por el cambio en la posición del átomo de nitrógeno:

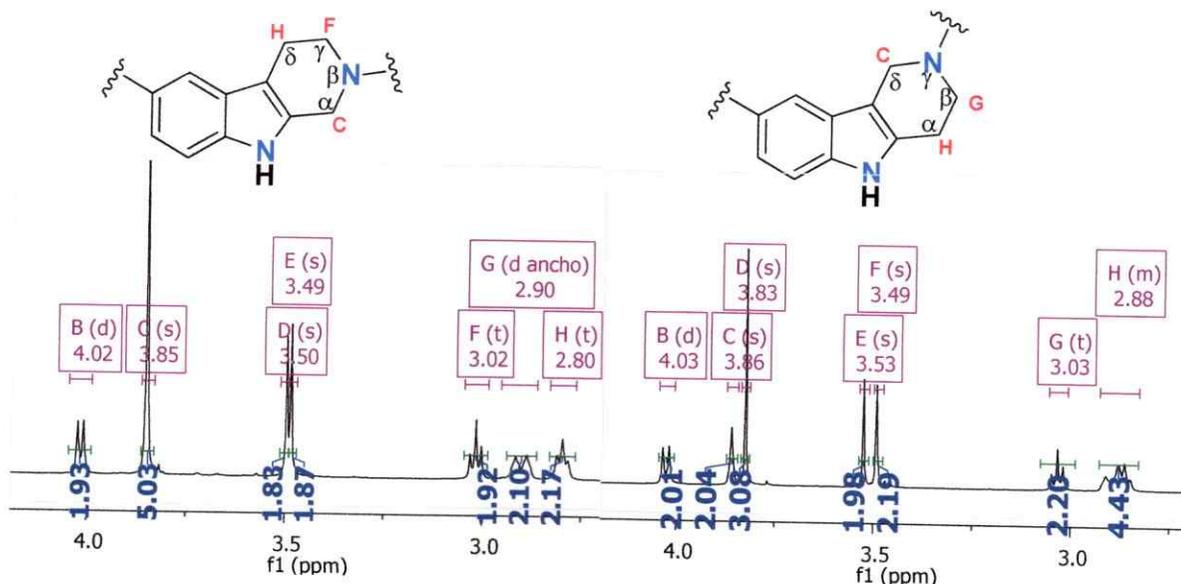


Figura 19: Señales de los protones asociados a los carbonos del derivado de la tetrahidro- β -carbolina (izquierda) y de la tetrahidro- γ -carbolina (derecha) de las moléculas MF1046 y MF1061, respectivamente.

El cambio de posición del átomo de nitrógeno de *beta* a *gamma* provoca que la señal del protón del carbono α de la tetrahidro- β -carbolina del compuesto **MF1046** (a 3,85 ppm, *singlete* que integra 2 protones) se desplace a campo alto junto a los protones del anillo de piperidina en el compuesto **MF1061** (a 2,88 ppm, *multiplete* que integra 4 protones). En esta última, la señal de los protones del carbono alfa de la gamma carbolina se solapan con la señal de los protones del anillo de piperidina, ante ello se observa una única señal a 2,88 ppm que puede ser interpretada como multiplete. Por otro lado, cuando el átomo de nitrógeno se encuentra en posición *beta* respecto a la tetrahidrocarbolina la señal de los protones del carbono δ en la tetrahidro- γ -carbolina del compuesto **MF1061** (a 3,86 ppm, *singlete* que integra 2 protones) se desplaza a campo alto en la tetrahidro- β -carbolina en el compuesto **MF1046** (a 2,80 ppm, *triplete* que integra 2 protones). El

espectro muestra un *triplete* en función de la disposición de los núcleos próximos con una constante de acoplamiento de 5,7 Hz entre los protones vecinos.

Luego de obtener el compuesto **MF1061**, este fue evaluado como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y se obtuvo el 48% de inhibición de la actividad catalítica. El porcentaje de inhibición de su análogo derivado de la *tetrahidro-β-carbolina* (**MF1046**) fue de 61%. En función de este resultado se propuso cambiar el grupo conector *éster* por el grupo *amida* conservando el segmento *tetrahidro-γ-carbolina*, diseñando el compuesto **MF1053** como se describe en la *tabla 10*:

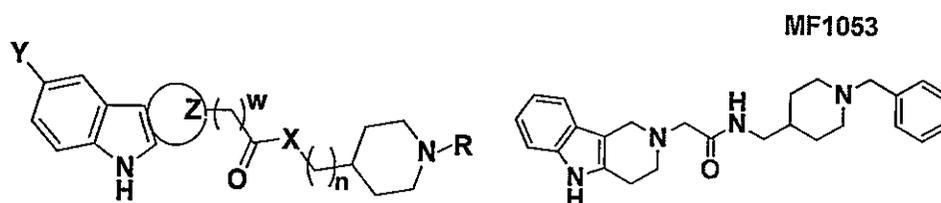


Tabla 10: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061 y MF1053.

N°	Nombre	Y	Tetrahidro-Z-Carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo
5	MF1061	CH ₃ O	Gamma	O	CH ₂	Bencilo
6	MF1053	H	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo

El compuesto **MF1053** se construyó de manera similar que el compuesto **MF1047**. Este último, se diseñó con un segmento de *tetrahidro-β-carbolina* (**a2**) a diferencia de **MF1053** que fue diseñado con un segmento *tetrahidro-γ-carbolina* (**a27**). La síntesis de este último segmento se detalla en **reacción 6.1.13**.

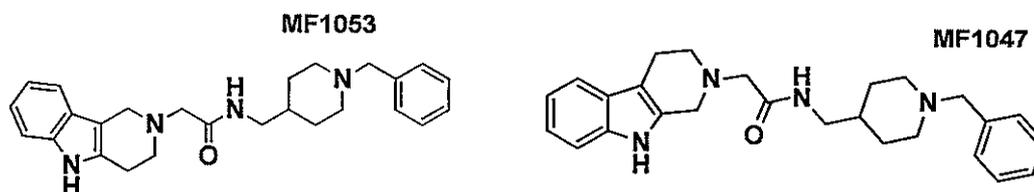
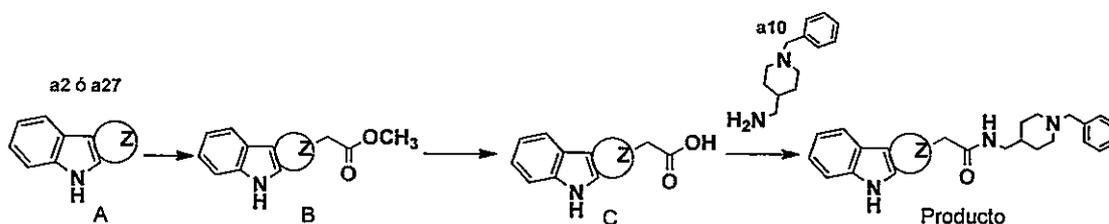


Figura 20: MF1053 y MF1047, derivados de tetrahidro- γ -carbolina y tetrahidro- β -carbolina, respectivamente.

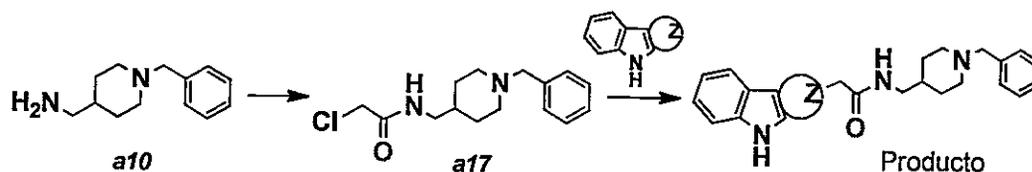
El esquema sintético sugerido para la obtención del compuesto **MF1053** fue, inicialmente parecido al empleado en la formación del compuesto **MF1047** (esquema 16):



Esquema 16: Esquema preliminar para la formación del compuesto **MF1047** a partir del compuesto **a2** y para la formación de **MF1053**, a partir de **a27**

Sin embargo, luego de sintetizar la tetrahidro- γ -carbolina (**a27**) no fue posible obtener su derivado éster metílico (**B**) empleando el procedimiento usado sobre su análoga tetrahidro- β -carbolina (reacción 6.1.1.2). La reacción fue monitoreada cada 1 hora mediante TLC y por HPLC/UV-MS y luego de transcurridas 48 horas de reacción el producto formado pudo ser obtenido con muy bajos rendimientos (entre un 20% y 25%, en todas preparaciones). A diferencia del producto sólido formado a partir de la tetrahidro- β -carbolina, el derivado del éster metílico de la tetrahidro- γ -carbolina, es líquido. Continuando con el siguiente paso sintético se utilizó el procedimiento de reacción 6.1.1.3. para obtener el derivado ácido carboxílico de la tetrahidro- γ -carbolina, sin embargo, el producto no pudo ser identificado ni aislado eficientemente. Como el procedimiento empleado consideraba que al modificar el pH de la solución se obtenía un

precipitado, esto no ocurrió. Debido a ello, se optó por modificar la ruta propuesta para la obtención del compuesto **MF1053**, utilizando el protocolo de la **reacción 6.1.8.** y cambiando el reactivo **a20** por el reactivo **a10**, proponiendo el siguiente esquema:



Esquema 17: Esquema propuesto para la formación del compuesto **MF1053** y sus derivados.

La síntesis de **MF1053** se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de **reacción 6.1.6.**, para la formación del compuesto **a17** y **reacción 6.1.26.** para la molécula final, empleando **a27**.

Luego de obtener y caracterizar el producto se evaluó como inhibidor de acetilcolinesterasa, determinándose que inhibía la actividad catalítica de la enzima en un 62%, aumentando el porcentaje de inhibición respecto a los derivados de éster evaluados, pero siendo aún menor el porcentaje de inhibición respecto al compuesto **MF1047**.

Con los resultados obtenidos se propuso la síntesis del compuesto **MF1062**: el compuesto **MF1053** con un grupo *metoxilo* en la posición 8 del segmento de la *tetrahidro-γ-carbolina* (ver *tabla 11*):

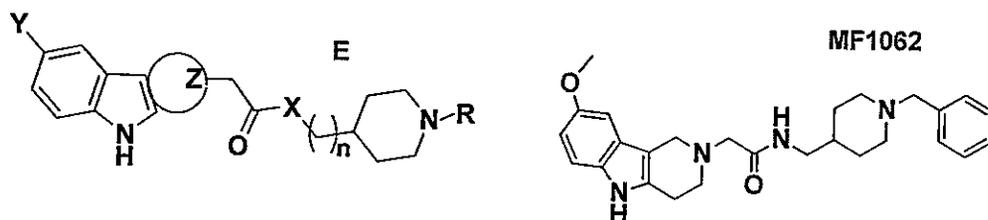


Tabla 11: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053 y MF1062.

N°	Nombre	Y	Tetrahydro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo
5	MF1061	CH ₃ O	Gamma	O	CH ₂	Bencilo
6	MF1053	H	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
7	MF1062	CH ₃ O	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo

Para la obtención del compuesto **MF1062** se empleó el procedimiento descrito en **reacción 6.1.27**. Estructuralmente, el compuesto es similar al compuesto **MF1053** y a **MF1061**. El compuesto **MF1062** posee un grupo metoxilo en posición 8 de la *tetrahydro-γ*-carbolina y tiene un grupo *amida* como conector entre los segmentos. El compuesto **MF1053** también posee un conector del tipo *amida*, pero no tiene sustituyentes en la posición 8 del segmento de la *tetrahydro-γ*-carbolina. El compuesto **MF1061**, a diferencia de **MF1062**, posee un grupo éster como conector entre los segmentos moleculares.

La interpretación de las señales de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto **MF1062** fue relativamente sencilla, considerando que éstos fueron resueltos anteriormente. Por ejemplo, en el espectro RMN-¹H fue posible observar las señales de los protones característicos del carbono del grupo metoxilo a 3,83 ppm (singlete que integra tres protones). El espectro de masa con la señal máxima de la relación de *m/z* a 447,63 concuerda con el peso molecular del compuesto sintetizado. En el espectro IR se

identificaron frecuencias características para **MF1062**; la correspondiente al enlace C=O del grupo amida a 1.660cm^{-1} y la correspondiente al enlace N-H a 3.302cm^{-1} . Adicionalmente, se observaron frecuencias a 1.215cm^{-1} y a 1.046cm^{-1} , características del enlace C-O del anillo aromático de la *tetrahidro- γ -carbolina*. La frecuencia correspondiente al grupo *metoxilo* se encuentra a 2.811cm^{-1} .

Luego de sintetizado el compuesto **MF1062**, se evaluó la capacidad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa logrando un 64% de inhibición, porcentaje superior a los demás compuestos sintetizados anteriormente, pero menor a la del compuesto **MF1047**. Los derivados de *tetrahidro- γ -carbolina* inhiben en un menor porcentaje la actividad enzimática de acetilcolinesterasa que los respectivos derivados de *tetrahidro- β -carbolina* usando la plantilla molecular propuesta. En función a estos resultados y utilizando el segmento de la *tetrahidro- β -carbolina* se estudió la influencia del grupo bencilo en el anillo de *N*-piperidina. Se sintetizó el compuesto **MF1064** modificando el sustituyente unido al átomo del nitrógeno del grupo *N*-piperidina (ver *tabla 12*):

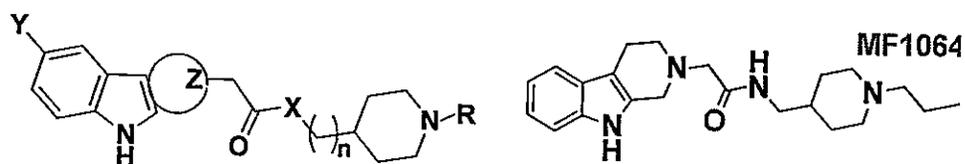


Tabla 12: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053, MF1062 y MF1064.

N°	Nombre	Y	Tetrahidro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo
5	MF1061	CH ₃ O	Gamma	O	CH ₂	Bencilo
6	MF1053	H	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
7	MF1062	CH ₃ O	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
8	MF1064	H	Beta	NH	CH ₂	Propilo

El compuesto **MF1064** se sintetizó de acuerdo al protocolo de **reacción 6.1.17**. A partir de (1-propilpiperidin-4-il)metanoamina (reactivo obtenido de manera comercial) se sintetizó el intermediario **a14** de acuerdo a **reacción 6.1.4**. Luego el compuesto **a14**, sin purificación previa, reaccionó con la *tetrahidro*- β -carbolina (**a2**) para formar el producto deseado. A diferencia de los compuestos **MF1047** y **MF1042**, este derivado de *acetamida* no fue sintetizado usando el derivado *ácido carboxílico* de la *tetrahidro*- β -carbolina (**a4**) como se reporta en **reacción 6.1.15**. Usando este procedimiento no fue posible aislar la molécula estudiada por el gran número de productos secundarios que se formaron en la reacción. Se optó por lo tanto utilizar la metodología de **reacción 6.1.6**, pues el desarrollo de la ruta sintética requiere un menor número de etapas de reacción, menor número de pasos de purificación y menores tiempos de reacción. Fue posible obtener el compuesto **MF1064**, pero con muy bajo rendimiento. Fue posible medir su punto de fusión, la relación de *m/z* por espectrometría de masa y efectuar el análisis del espectro de RMN-

¹H. La relación de *m/z* medida sobre la señal principal del espectro de masa entregó un resultado de 369 que coincide con el peso molecular del compuesto en estudio, mientras que en el espectro de RMN-¹H se observan las señales correspondientes a los protones del anillo aromático de la *tetrahidro-β-carbolina* y aquellas correspondientes a los protones de la cadena alquílica, a campo alto y además la señal del *tripleto* que integra los 3 protones del *metilo* terminal.

Luego de obtener el compuesto **MF1064** se evaluó su acción como inhibidor de acetilcolinesterasa obteniendo un porcentaje de inhibición igual al 6%, inferior al que presenta el compuesto análogo **MF1047** (78%). Por lo tanto, reemplazando el grupo bencilo por una cadena alquílica (grupo propilo) se forma un compuesto que no genera una inhibición importante de la actividad catalítica de acetilcolinesterasa.

Considerando este resultado, se propuso sintetizar el compuesto **MF1066** el cual posee un grupo *tert-butoxicarbonilo* (**Boc**) unido al nitrógeno del anillo de la *N*-piperidina y que es equivalente al volumen del grupo bencilo del compuesto **MF1047**, pero sin la misma densidad electrónica. Adicionalmente, con la incorporación del grupo protector **Boc**, se impide que, a pH fisiológico, el *nitrógeno* del anillo de *N*-piperidina se protone por conformar el grupo *carbamato*. Este detalle es esencial pues, como la plantilla se diseñó en base a la estructura del *donepezil*, este átomo de nitrógeno interacciona con el residuo de aminoácido *fenilalanina 330* formando una interacción del tipo catión- π , interacción que juega un papel importante en la estabilización de la estructura tridimensional de los ligandos en el sitio de unión. Se pretende evaluar esta característica con el compuesto **MF1066**.

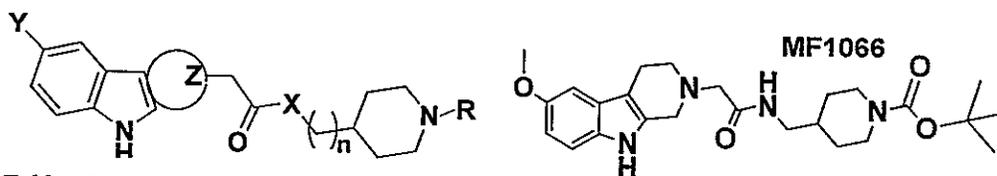
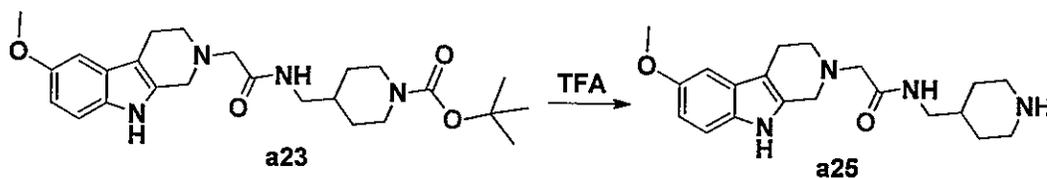


Tabla 13: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053, MF1062, MF1064 y MF1066.

N°	Nombre	Y	Tetrahidro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo
5	MF1061	CH ₃ O	Gamma	O	CH ₂	Bencilo
6	MF1053	H	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
7	MF1062	CH ₃ O	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
8	MF1064	H	Beta	NH	CH ₂	Propilo
9	MF1066	CH ₃ O	Beta	NH	CH ₂	Boc

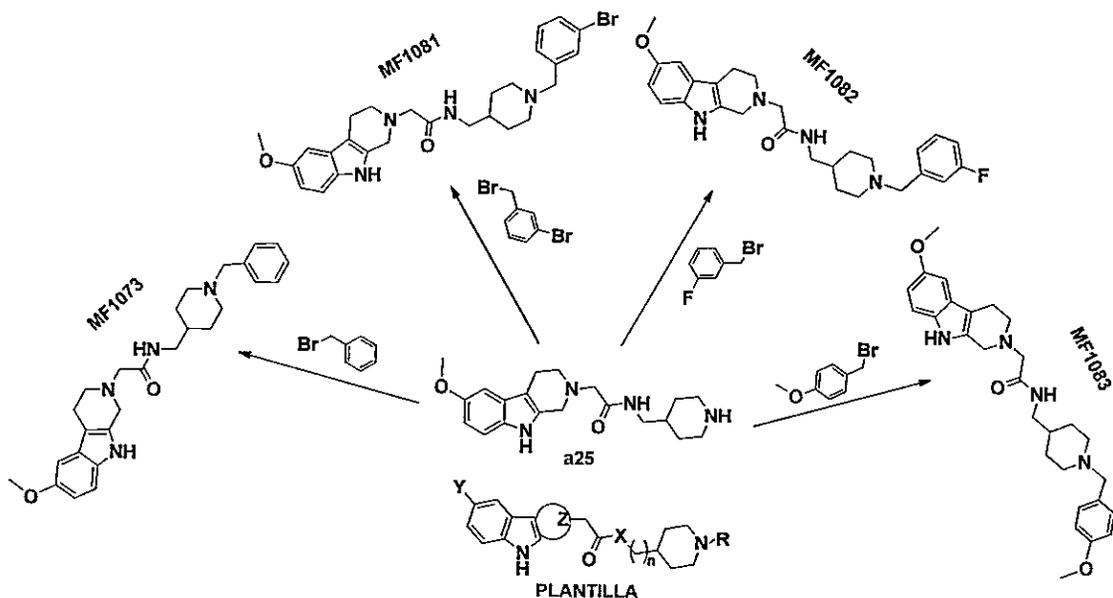
Para la síntesis de **MF1066** se adquirió de manera comercial el reactivo (*N*-(*tert*-butoxicarbonil)piperidin-4-il)metanol y se usó en **reacción 6.1.5** para obtener el compuesto **a6** el cual fue usado en **reacción 6.1.10** para obtener el compuesto **MF1066**. La preparación de esta molécula permitió generar de manera sencilla, nuevos derivados *N*-alquilados por la desprotección del átomo de *nitrógeno* del anillo de la *N*-piperidina.



Esquema 18: Desprotección de *N*-Boc para obtener *N*-piperidina derivados usando ácido trifluoroacético (TFA)

La obtención del compuesto **a25** permitió sintetizar nuevos derivados sintéticos a partir de la alquilación del átomo de *nitrógeno* del anillo de la *N*-piperidina. Mediante este protocolo, y usando reactivos disponibles en el laboratorio, se sintetizaron 4 nuevos derivados de la plantilla molecular, que se muestran en la *tabla 14*, como derivados de *N*-*bencil*piperidinas.

El compuesto **MF1073** se sintetizó a partir de bromuro de bencilo, los compuestos **MF1081** y **MF1082** se sintetizaron usando dos reactivos disponibles en el laboratorio que presentaban sustituciones en la posición *meta* del anillo de *benceno* y el compuesto **MF1083** con un reactivo disponible en el laboratorio, sustituido en la posición *para* del anillo de *benceno*.



Esquema 19: Formación de MF1073, MF1081, MF1082 y MF1083 a partir de MF1066.

Tabla 14: Modificaciones de la plantilla para la formación de MF1047, MF1042, MF1050, MF1046, MF1061, MF1053, MF1062, MF1064, MF1066, MF1073, MF1081, MF1082 y MF1083.

N°	Nombre	Y	Tetrahidro-Z-carbolina	X	n	R
1	MF1047	H	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
2	MF1042	H	Beta	NH	-	Bencilo
3	MF1050	H	Beta	O	CH ₂	Bencilo
4	MF1046	CH ₃ O	Beta	O	CH ₂	Bencilo
5	MF1061	CH ₃ O	Gamma	O	CH ₂	Bencilo
6	MF1053	H	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
7	MF1062	CH ₃ O	Gamma	NH	CH ₂	Bencilo
8	MF1064	H	Beta	NH	CH ₂	Propilo
9	MF1066	CH ₃ O	Beta	NH	CH ₂	Boc
10	MF1073	CH ₃ O	Beta	NH	CH ₂	Bencilo
11	MF1081	CH ₃ O	Beta	NH	CH ₂	3-bromo-Bencilo
12	MF1082	CH ₃ O	Beta	NH	CH ₂	3-fluoro-Bencilo
13	MF1083	CH ₃ O	Beta	NH	CH ₂	4-metoxi-Bencilo

El compuesto **a25** se sintetizó de acuerdo al protocolo descrito en **reacción 6.1.12.** a partir del compuesto **MF1066** en DCM con *ácido trifluoroacético*. La relación de volumen entre *TFA* y *DCM* empleada fue 1:1, esto se hace previniendo que si proporción es diferente la reacción no ocurre. Luego de obtener el compuesto **a25**, las reacciones de alquilación se efectuaron sin purificación previa del producto formado.

Se sintetizó el compuesto **MF1073** a partir de **a25** usando como reactante *bromuro de bencilo* como se detalla en **reacción 6.1.20.** el producto se caracterizó mediante la medición de su punto de fusión, RMN-¹H y ¹³C y espectroscopia IR. Por otro lado, los compuestos **MF1081**, **MF1082** y **MF1083** fueron sintetizados a partir del compuesto **a25** como se detalla en **reacción 6.1.21**, **reacción 6.1.22.** y en **reacción 6.1.23.**, respectivamente. Luego de caracterizados los productos, fueron evaluados como inhibidores de acetilcolinesterasa. Los resultados obtenidos permitieron comparar los porcentajes de inhibición en función a las modificaciones realizadas en la plantilla.

Durante la realización de este trabajo se sintetizaron dos moléculas adicionales (figura 21) a las propuestas en esta tesis, una de ellas es parte de la línea de investigación del grupo de laboratorio donde se desarrolló el trabajo experimental. En el estudio asociado a los moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina se pudo reproducir la síntesis del compuesto *NS9283*, modulador alostérico positivo del receptor nicotínico¹⁰⁴. Como no existe información en la literatura que muestre su perfil de inhibición sobre acetilcolinesterasa, se desarrolló la síntesis del compuesto para evaluar sus características como inhibidor de la enzima. El procedimiento sintético se detalla en **reacción 6.1.29**.

Por otro lado, la segunda molécula (*MF1056*) se obtuvo como parte del desarrollo de síntesis de las moléculas propuestas y la búsqueda bibliográfica que se realizó permanentemente. Los derivados del compuesto *isoindolin-1,3-diona* se reportaron como inhibidores de acetilcolinesterasa¹⁰⁵. Como estos derivados poseían una estructura similar al donepezil (la plantilla de síntesis propuesta en este trabajo fue elaborada, en gran parte, en función de la estructura de este compuesto), así se diseñó la síntesis de un compuesto en función del inhibidor de acetilcolinesterasa y derivados de isoindolin-1,2-diona, empleando los reactivos disponibles en el laboratorio.

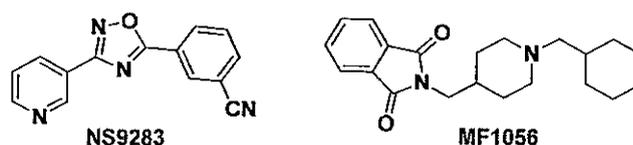


Figura 21: Moléculas estudiadas, adicionales al trabajo de tesis propuesto.

El compuesto **MF1056** se sintetizó de acuerdo al protocolo **reacción 6.1.25.** y al igual que el compuesto **NS9283**, se evaluó como inhibidor de acetilcolinesterasa y se comparó con los demás compuestos sintetizados.

4.2. Ensayos de cinética enzimática: inhibición de acetilcolinesterasa.

En la tabla 15 se muestran los porcentajes de inhibición de acetilcolinesterasa humana obtenidos para los derivados de la *tetrahydro-β*-carbolina (**MF1047**, **MF1042**, **MF1050**, **MF1046**, **MF1064**, **MF1066**, **MF1073**, **MF1081**, **MF1082** y **MF1083**) y de la *tetrahydro-γ*-carbolina (**MF1053**, **MF1061** y **MF1062**), sintetizados en este trabajo de tesis. Se muestran, además los porcentajes de inhibición de dos moléculas adicionales (**MF1056** y **NS9283**) no consideradas en la propuesta sintética inicial. Los datos obtenidos permitieron establecer una valiosa relación entre el efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados y su estructura, de acuerdo a la plantilla molecular propuesta.

Los compuestos que exhibieron un porcentaje de inhibición mayor al 50% se sometieron a estudios de concentración variable para calcular el IC_{50} . Para calcular este valor se midió el porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones para cada molécula en estudio ($10^{-4}M$ - $10^{-9}M$) y se graficó el porcentaje de inhibición en función de la concentración del inhibidor, y se ajustó la gráfica a una curva dosis-respuesta.

Los compuestos **MF1073** y **MF1050**, derivados de la *tetrahydro-β*-carbolina, con un grupo amida y un grupo éster como conectores, respectivamente (*ver tabla 16*) fueron sometidos a ensayos cinéticos con el fin de obtener las constantes de inhibición (K_i) correspondientes. Para los demás inhibidores reportados se obtuvieron las constantes de

inhibición a partir de los valores de IC_{50} de las curvas dosis-respuesta, considerando que la inhibición es de carácter competitiva empleando para el cálculo la ecuación de *Cheng-Prusoff*. Esta ecuación relaciona los valores de IC_{50} con las constantes de inhibición dependiente de la concentración del sustrato.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_M}$$

Ecuación de Cheng-Prusoff

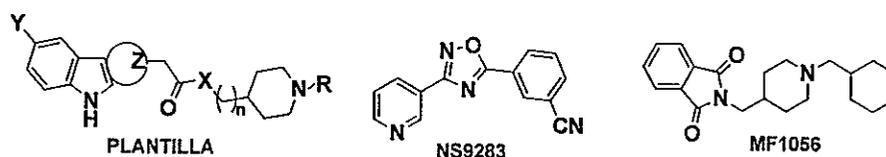


Tabla 15: Valores de K_i y de IC_{50} de los compuestos sintetizados en acetilcolinesterasa humana en unidades de concentración micromolar. Los experimentos para calcular el valor de IC_{50} se realizaron por duplicado. ND: valores no determinados, pues solamente se calcularon para los compuestos con un porcentaje de inhibición superior al 50%. El porcentaje de inhibición se determinó utilizando una concentración del inhibidor 1,0 μ M en la solución de estudio.

Molécula	Y	X	Tetrahidro -Z- carbolina	n	R	Inhibición hAChE (%)	IC_{50} (μ M)	K_i hAChE (μ M)
MF1047	H	NH	beta	1	bencilo	78	$0,50 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,08$
MF1042	H	NH	beta	0	bencilo	24	ND	ND
MF1050	H	O	beta	1	bencilo	55	$1,61 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,05$
MF1046	CH ₃ O	O	beta	1	bencilo	61	$1,20 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,09$
MF1061	CH ₃ O	O	gamma	1	bencilo	48	ND	ND
MF1053	H	NH	gamma	1	bencilo	62	$1,13 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,04$
MF1062	CH ₃ O	NH	gamma	1	bencilo	64	$0,98 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,07$
MF1064	H	NH	beta	1	propilo	6	ND	ND
MF1066	CH ₃ O	NH	beta	1	Boc	1	ND	ND
MF1073	CH ₃ O	NH	beta	1	bencilo	70	$0,43 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$
MF1081	CH ₃ O	NH	beta	1	3-Br-bencilo	17	ND	ND
MF1082	CH ₃ O	NH	beta	1	3-F-bencilo	70	$0,51 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,04$
MF1083	CH ₃ O	NH	beta	1	4-CH ₃ O-bencilo	1	ND	ND
MF1056	-	-	-	-	-	10	ND	ND
NS9283	-	-	-	-	-	3	ND	ND

En las siguientes figuras se muestran las curvas dosis-respuesta para los 7 derivados de las *tetrahydrocarbolina*s con valores de IC_{50} menores a $1,7 \mu M$.

4.2.1. Curvas dosis-respuesta de las moléculas sintetizadas sobre acetilcolinesterasa humana

Derivados de *tetrahydro-β-carbolina*

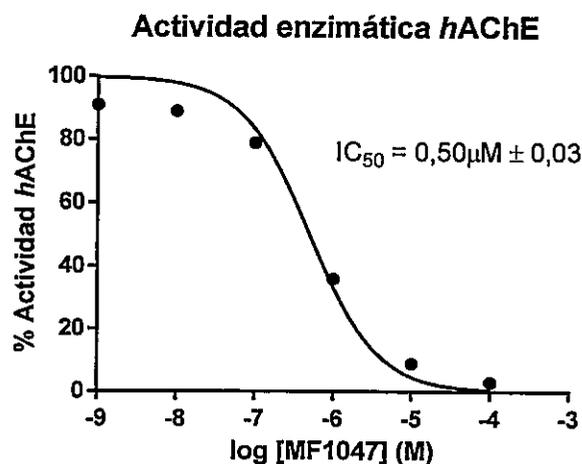


Figura 22: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1047

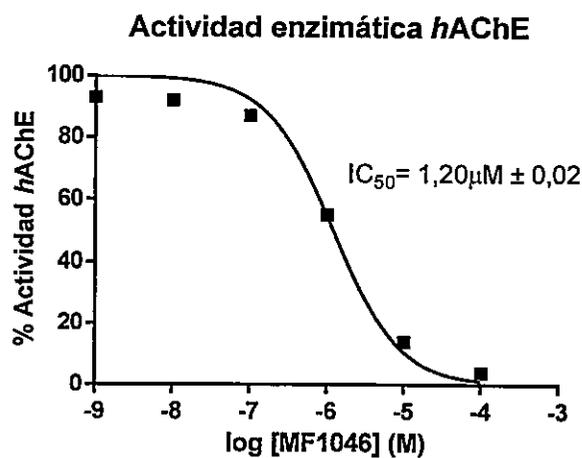


Figura 23: Curva dosis-respuesta de MF1046

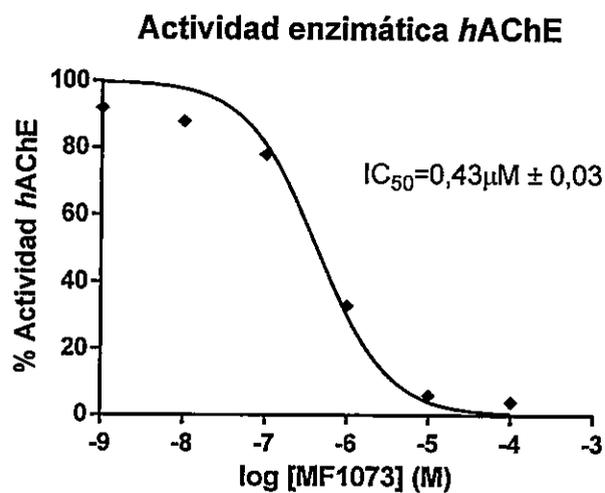


Figura 24: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1073.

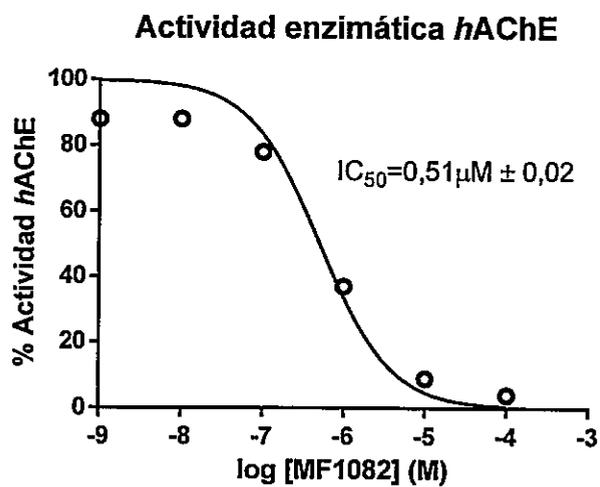


Figura 25: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1082.

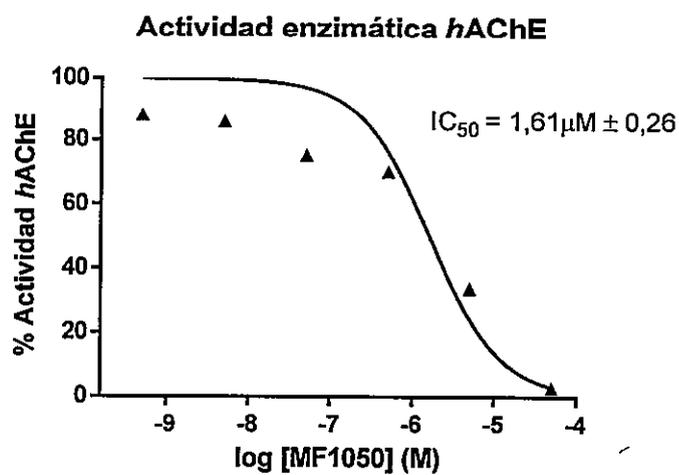


Figura 26: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1050

Derivados de tetrahydro- γ -carbolina

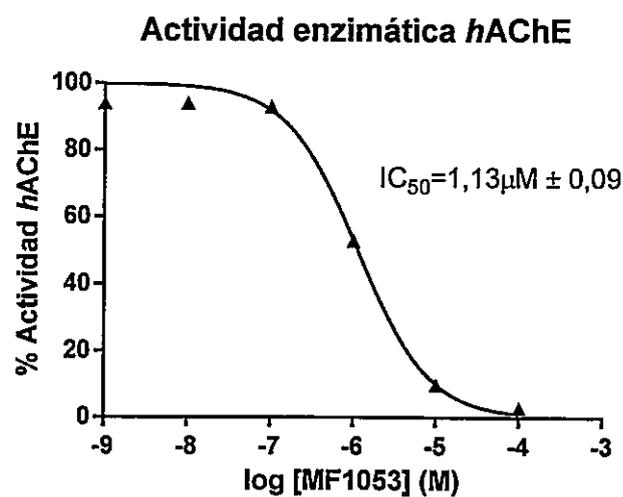


Figura 27: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1053

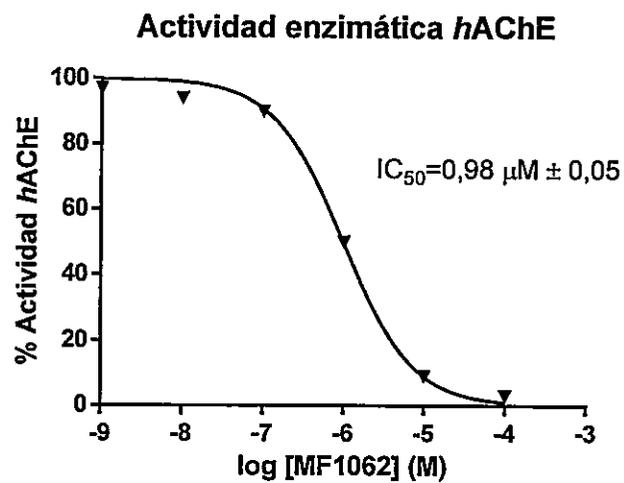


Figura 28: Curva dosis-respuesta del compuesto MF1062

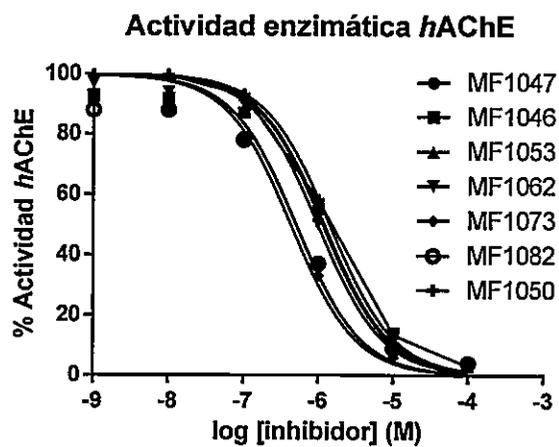


Figura 29: Curva dosis-respuesta de los compuestos con un IC_{50} menor a $1,7\mu M$.

4.2.2. Determinación del mecanismo de inhibición de acetilcolinesterasa.

En una reacción enzimática, el mecanismo de unión del sustrato a la enzima se expresa en el *esquema 20*:



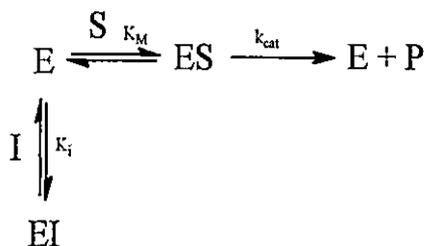
Esquema 20: Mecanismo de unión del sustrato para una reacción enzimática. k_1 , k_2 y k_{cat} son las constantes cinéticas para cada una de las etapas de la reacción.

Del mecanismo de la reacción se dedujo la ecuación de *Michaelis-Menten*.

$$v = \frac{V_{Max} [S]}{[S] + K_M}$$

La ecuación de Michaelis-Menten es la que describe la velocidad de la reacción enzimática cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima en condiciones de estado estacionario.

La determinación del mecanismo de inhibición de acetilcolinesterasa permitió evaluar si los inhibidores sintetizados compiten con el sustrato por la unión a la enzima libre de acuerdo al *esquema 21*.



Esquema 21: Reacción enzimática en presencia de un inhibidor competitivo

La enzima (enzima total = $[E]_0$) puede estar en el medio de reacción como enzima libre ($[E]$), como un complejo *enzima-sustrato* $[ES]$ o como un complejo *enzima-inhibidor* $[EI]$: ($[E]_0 = [E] + [ES] + [EI]$). K_i es la constante de disociación del complejo $[EI]$ y se

define como $K_i = [E][I]/[EI]$. La siguiente expresión resume la ecuación de velocidad de la reacción enzimática en presencia de un inhibidor competitivo.

$$v = \frac{V_{\text{Max}} [S]}{[S] + K_M (1 + [I]/K_i)}$$

Ecuación de la velocidad de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor competitivo

Comparando la *ecuación de Michaelis-Menten* y la ecuación de la velocidad de una reacción enzimática en presencia de un inhibidor competitivo, se observa que la velocidad máxima de la reacción no se ve afectada por la presencia de un inhibidor competitivo, pero sí la *constante de Michaelis* (K_M), la cual es mayor que en la reacción sin el inhibidor, en un factor $(1 + [I]/K_i)$.

Se construyó la curva de saturación de acetilcolinesterasa con el sustrato acetiltiolina, en la cual se observa cómo evoluciona la relación entre la velocidad de la reacción enzimática y la concentración del sustrato (*Figura 30*).

Se usaron dos de los compuestos sintetizados para los estudios del mecanismo de inhibición de acetilcolinesterasa. Se evaluaron los compuestos *MF1073* y *MF1050*, derivados de *acetamida* y *éster*, respectivamente. Éstos presentan un esqueleto similar a los demás inhibidores sintetizados (*tabla 15*). Se construyó la curva de saturación de acetilcolinesterasa con el sustrato acetiltiocolina en presencia de los inhibidores *MF1073* y *MF1050* como se muestra en la *figura 31*.

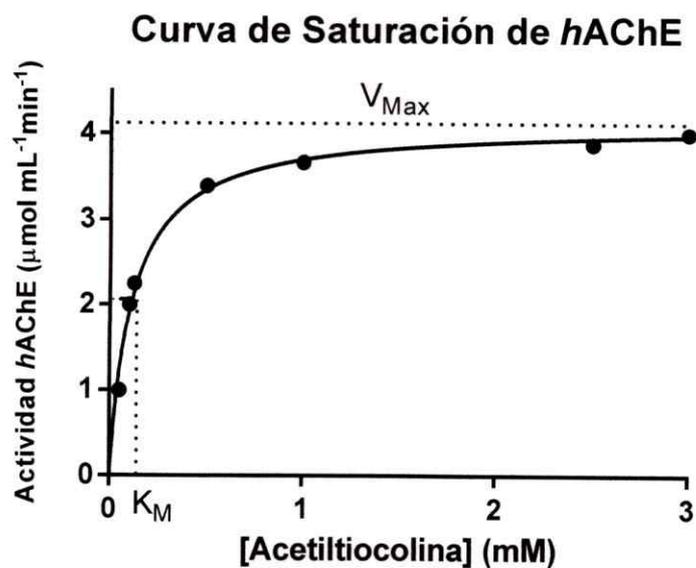


Figura 30: Curva de saturación de hAChE por el sustrato acetilcolina en concentraciones milimolares. Se observa la velocidad máxima (V_{Max}) de la reacción enzimática y la constante de Michaelis (K_M) asociada al sustrato.

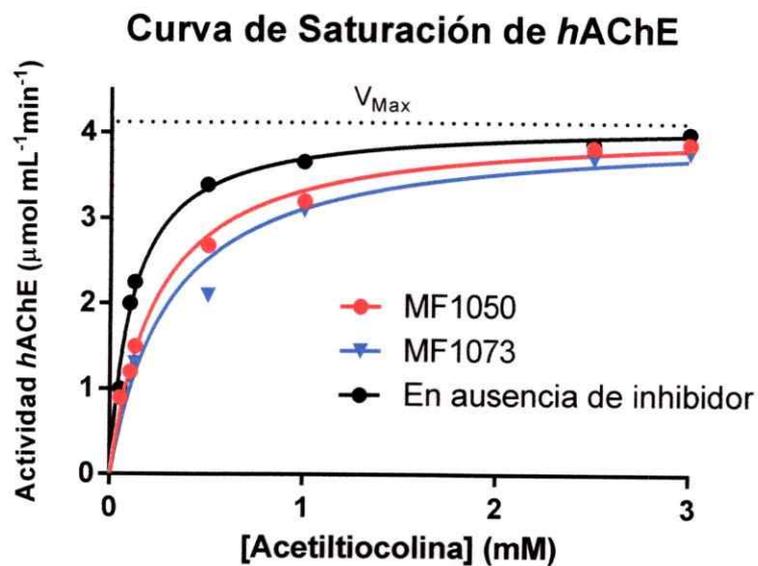


Figura 31: Curva de saturación de hAChE. La curva de color negro corresponde a la saturación con acetilcolina en ausencia de inhibidores, la curva de color rojo muestra la saturación de hAChE con acetilcolina en presencia del inhibidor MF1050, 0,5 μM y la curva de color azul muestra la saturación con acetilcolina en presencia del inhibidor MF1073, 0,5 μM .

Los experimentos cinéticos realizados permitieron la construcción del diagrama de Lineweaver-Burk, donde se grafica el recíproco de la concentración del sustrato versus el recíproco de la velocidad de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación de Lineweaver-Burk

El diagrama de Lineweaver-Burk se construyó utilizando los datos de actividad enzimática de saturación de *hAChE* por el sustrato a diferentes concentraciones en ausencia de los inhibidores *MF1073* y *MF1050* y en presencia de éstos a una concentración de 0,5 μM . Con este diagrama fue posible calcular el valor de la velocidad máxima, como también la constante de Michaelis (K_M) asociada a sustrato.

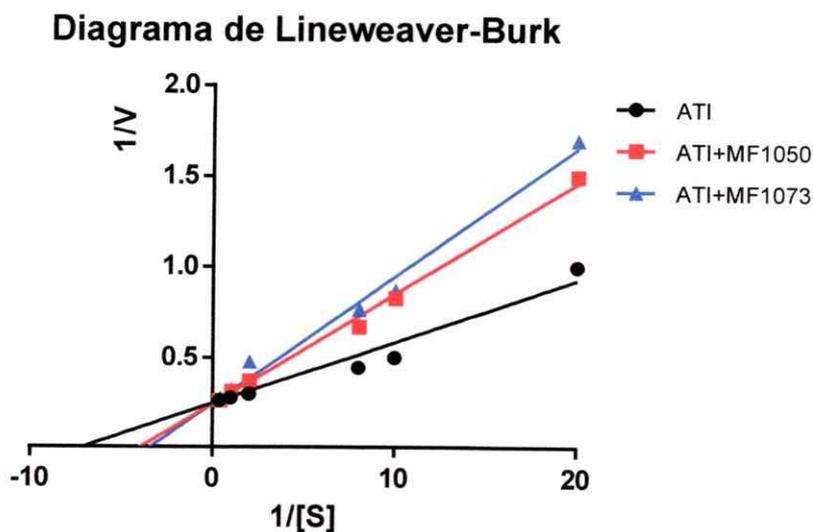
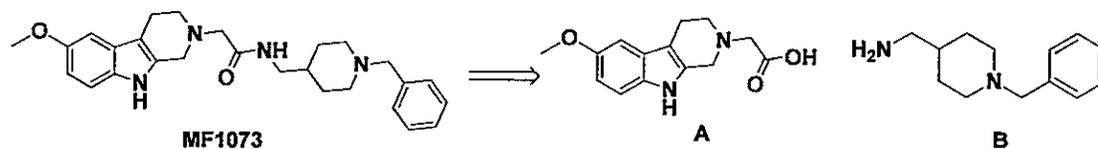


Figura 32: Diagrama de Lineweaver-Burk construido para calcular de los parámetros cinéticos de acetilcolinesterasa empleando acetiltiocolina como sustrato ($V_{Max}=4,12 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ para las tres rectas, $K_M=0,11 \text{ mM}$, $K_{M(\text{aparente})}(\text{MF1050}) = 0,23 \text{ mM}$ y $K_{M(\text{aparente})}(\text{MF1073}) = 0,30 \text{ mM}$).

En la *figura 32* se observa un aumento del valor de la constante de Michaelis para el sustrato acetiltiocolina en presencia de los inhibidores *MF1073* y *MF1050*, mientras que la velocidad máxima no varía en presencia de estos inhibidores; cuando se aumenta la cantidad del sustrato se alcanza la misma V_{Max} que en ausencia de los inhibidores. De acuerdo a estos datos se calculó la *constante de inhibición* (K_i) para los compuestos *MF1073* y *MF1050*, obteniendo un valor de $0,29 \mu M$ y $0,85 \mu M$, respectivamente.

Luego de estudiar la inhibición de los compuestos sintetizados y demostrar que actúan como inhibidores competitivos por la enzima libre, se midió la actividad catalítica de la acetilcolinesterasa en presencia de los compuestos A y B del esquema 22. Estos compuestos representan los posibles productos de hidrólisis de *MF1073* ante un rompimiento de la molécula por la acción enzimática. Con esto se podría inferir si la acción inhibitoria es causada por el compuesto *MF1073* o por los productos formados ante una posible hidrólisis del inhibidor, o una combinación entre ambos. La *hAChE* es una enzima del tipo hidrolasa que actúa con un mecanismo que involucra la triada catalítica compuesta por una *serina* (**Ser203**), un *glutamato* (**Glu334**) y una *histidina* (**His447**); pudiendo eventualmente hidrolizar los grupos conectores de los inhibidores estudiados: el grupo éster del inhibidor *MF1050* y el grupo amida en el inhibidor *MF1073*, generando subproductos de reacción que disminuirían la eficiencia de los compuestos sintetizados.



Esquema 22: Retrosíntesis del compuesto MF1073 y la representación de sus productos de hidrólisis.

Los compuestos *A* y *B* del esquema 22 fueron evaluados como inhibidores de *AChE*, sin embargo, ninguno de éstos mostró un valor de inhibición superior al 5%. por lo que se infiere que estos compuestos no son los responsables de la inhibición catalítica, sino que el compuesto *MF1073*.

Se concluye finalmente que los compuestos sintetizados actúan como inhibidores de acetilcolinesterasa humana y lo hacen de manera competitiva con el sustrato acetiltiocolina.

4.3. Estudio de la modulación alostérica del receptor nicotínico de acetilcolina.

Los compuestos que presentaron una menor constante de inhibición sobre acetilcolinesterasa humana (*MF1047*, *MF1073* y *MF1082*) fueron evaluados como moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina. El experimento consistió en medir la diferencia de potencial de la membrana del ovocito donde fueron expresados los receptores nicotínicos (trabajo realizado previamente por el grupo de investigación de la Dra. Isabel Bermúdez).

Usando una solución de acetilcolina 0,1 mM (la cual representa el EC_{10} de acetilcolina sobre el receptor), se estableció el control de las mediciones electrofisiológicas midiendo el potencial eléctrico (potencial de membrana del ovocito), comprobando la integridad de los receptores

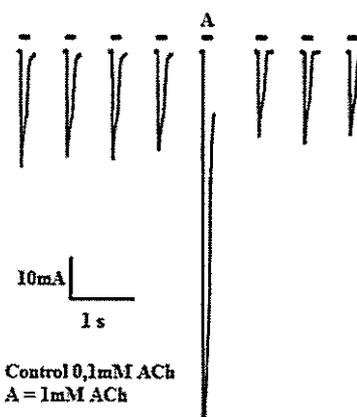


Figura 33: Corriente representativa del nAChR en presencia de ACh a 0,1 mM. La corriente A representa la amplitud de corriente al aumentar la concentración de ACh a su valor de EC_{100}

expresados. Luego de observar que no existe variación en la amplitud de corriente después de cada medida en presencia de acetilcolina 0,1 mM, se midió la corriente en presencia de acetilcolina a 1,0 mM (EC_{100} de acetilcolina sobre el receptor). Con lo anterior, se observa un incremento en la amplitud de la corriente y al aplicar nuevamente acetilcolina a 0,1 mM la diferencia del potencial de membrana vuelve a disminuir. (*figura 33*).

Luego de establecer el control de medición electrofisiológico con acetilcolina, se prepararon dos soluciones de cada uno de los inhibidores estudiados (*MF1047*, *MF1073* y *MF1082*) en concentraciones 10 μ M y 100 μ M. Luego se midió el potencial de membrana en presencia de acetilcolina y las moléculas en estudio, obteniéndose los gráficos de amplitud de corriente que se muestran en la *figura 34*:

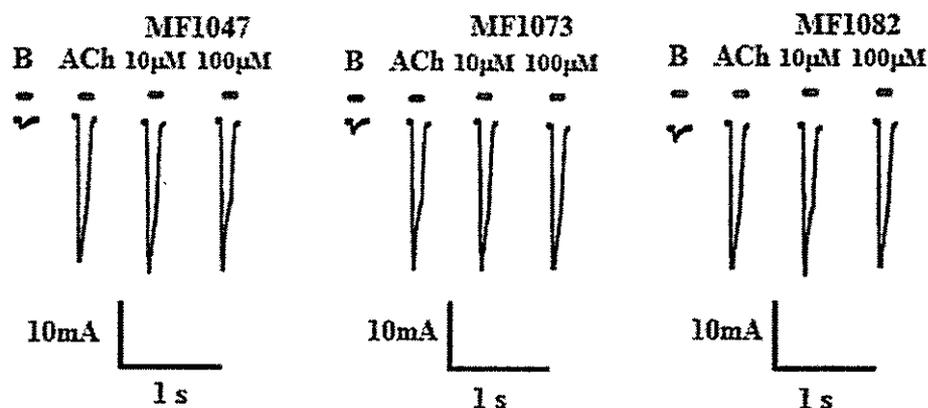


Figura 34: Corrientes representativas del receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha_4\beta_2$)₃ en presencia de la solución buffer (B) en presencia de acetilcolina 0,1 mM (ACh) y en presencia de los compuestos evaluados (a 10 μ M y 100 μ M).

Los gráficos obtenidos del software *Labscribe* (Iworx, NH, USA) registraron las variaciones de corriente a partir de la medición de voltaje de la solución en ausencia y en

presencia de acetilcolina. Luego de agregar acetilcolina 0,1 mM se agregó *MF1047*, 10 μ M y se registró la corriente. Como no se observó variación del potencial de membrana se agregó *MF1047*, 100 μ M, sin embargo, la amplitud de corriente no mostró cambios significativos respecto a aquella de la acetilcolina 0,1 mM en ausencia de *MF1047*. Lo mismo ocurrió para los compuestos *MF1073* y *MF1082*; los inhibidores de acetilcolinesterasa sintetizados no presentaron efecto sobre los receptores nicotínicos en presencia de acetilcolina.

4.4. Modelación molecular de los inhibidores sintetizados sobre acetilcolinesterasa.

Para intentar racionalizar y apoyar los resultados experimentales obtenidos sobre la *AChE* se realizaron los estudios de modelamiento molecular (*docking*), con el fin de encontrar posibles interacciones u orientaciones espaciales de los ligandos en el sitio catalítico de acetilcolinesterasa y que podrían tener un papel fundamental en la unión de los ligandos. Por otro lado, se realizaron estudios de dinámica molecular sobre la estructura cristalina de la enzima acetilcolinesterasa humana para adaptar el *bolsillo de unión* de los ligandos a la estructura molecular de los inhibidores desarrollados y estudiar las posibles orientaciones espaciales y las interacciones con los residuos de aminoácidos en un modelo flexibilizado. (figura 35).

Se utilizó la estructura cristalina **4EY7** con una resolución de 2,35Å y se utilizó el procedimiento detallado en la **sección 4.4**. Luego de validar la estructura y la calidad estereoquímica del modelo, se realizaron los estudios de acoplamiento molecular (*docking*) en el sitio catalítico de la enzima con cada uno de los compuestos sintetizados. El método intentó vincular las energías de unión aportadas por el software y los resultados experimentales obtenidos en este trabajo.

Las conformaciones de las moléculas obtenidas por el software en el sitio catalítico

coincidieron con la distribución espacial del compuesto *donepezil* (inhibidor de acetilcolinesterasa) donde el segmento *N-bencilpiperidina* se orientó hacia el subsitio aniónico del sitio de unión de acetilcolinesterasa. Asumiendo ésta como la conformación real de los inhibidores sintetizados, junto al segmento de la *tetrahydrocarbolina* encauzado al sitio aniónico periférico, se analizaron las interacciones resultantes con el sitio catalítico del modelo enzimático.

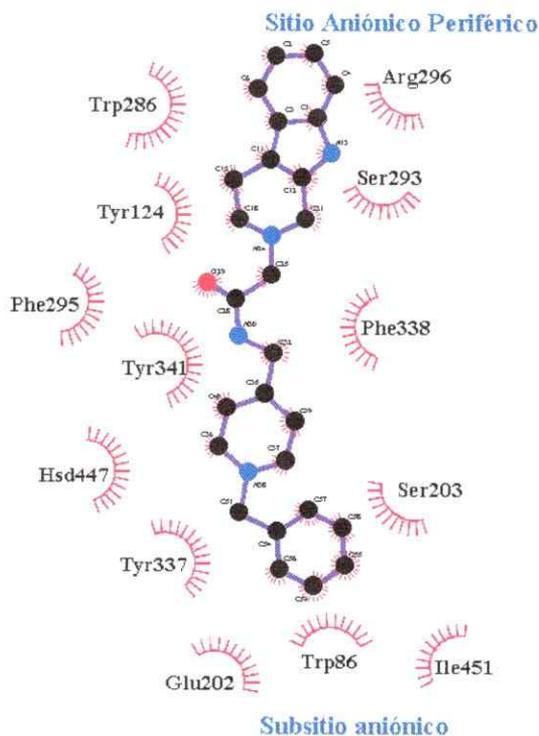


Figura 35: Representación en dos dimensiones del compuesto MF1047 en el sitio catalítico de AChE, donde el segmento *N-bencilpiperidina* se orienta hacia el subsitio aniónico y el segmento de la *tetrahydrocarbolina* hacia el sitio aniónico periférico.

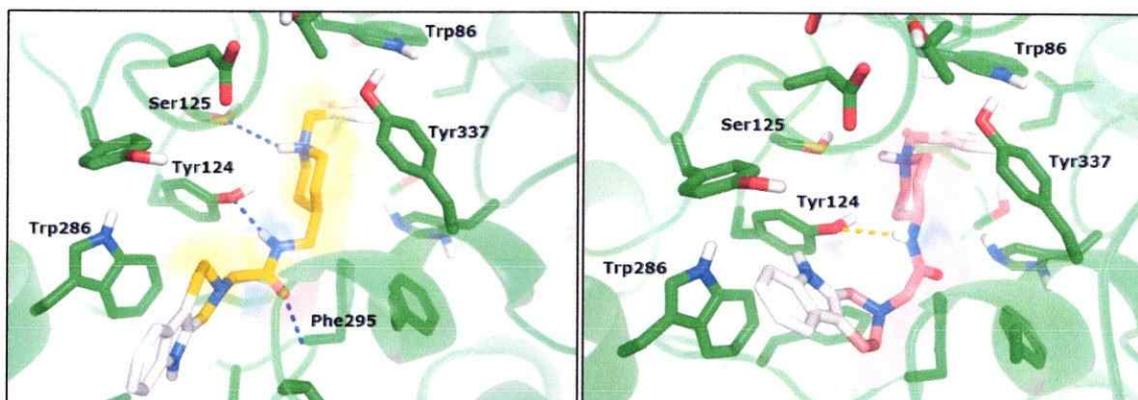


Figura 36: Modelamiento molecular de MF1047 (izquierda) y MF1042 (derecha) en el sitio activo de hAChE. Las imágenes muestran las interacciones de puentes de hidrógeno con líneas punteadas.

En la figura 36 se muestra una representación de la orientación de los compuestos **MF1047** y **MF1042** en el sitio activo de acetilcolinesterasa. Ambas moléculas presentan interacción del tipo π -stacking entre el anillo aromático del segmento de la *N*-bencilpiperidina y el triptófano 86 en el subsitio aniónico. El compuesto **MF1047** forma tres puentes de hidrógeno en el sitio catalítico con los residuos de la tirosina 124 y la serina 125 y con el armazón polipeptídico de la fenilalanina 295. Se muestra también la interacción del tipo π -stacking entre el segmento de la tetrahidro- β -carbolina y el residuo del triptófano 286.

Por otra parte, el compuesto **MF1042** carece mayormente de estas interacciones. La ausencia del carbono metilénico entre el grupo amida y el anillo *N*-piperidina provoca rigidez de sus segmentos restringiendo la rotación de su enlace induciendo a la vez que el anillo de la tetrahidro- β -carbolina no interactúe con el sitio aniónico periférico del sitio de unión resultando un menor número de interacciones entre el ligando y la macromolécula.

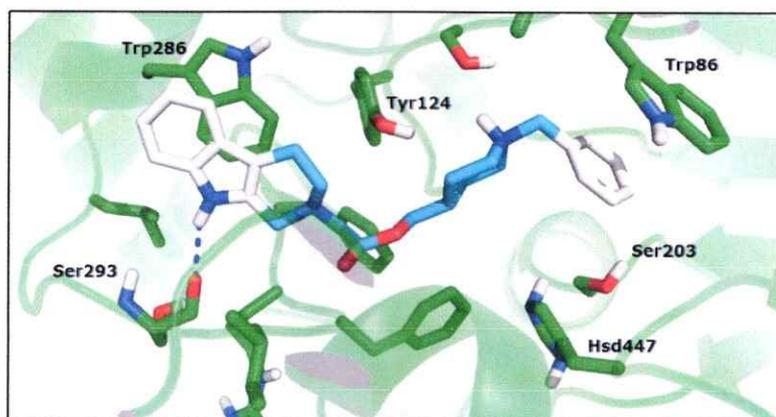


Figura 37: Modelación molecular del compuesto MF1050 en el sitio activo de hAChE. Las líneas punteadas muestran las interacciones de puente de hidrógeno.

El compuesto **MF1050** ($K_i = 0,85 \mu M$) es similar estructuralmente al compuesto **MF1047** ($K_i = 0,32 \mu M$). **MF1050** posee un grupo éster como conector. El ligando forma interacciones del tipo π -stacking entre el segmento de la tetrahydro- β -carbolina y el residuo aromático del triptófano 286 y entre el anillo aromático de la *N*-bencilpiperidina y el residuo del triptófano 86. El átomo de nitrógeno del grupo indol forma un puente de hidrógeno con la cadena polipeptídica de la enzima. Sin embargo, el grupo éster del compuesto **MF1050** no genera interacciones con el sitio activo de la AChE (figura 37) a diferencia del compuesto **MF1047** y su conector amida el cual interacciona con los residuos de la *tirosina* 124 y cadena polipeptídica de la *fenilalanina* 295 como se muestra en la figura 40.

El compuesto **MF1046**, al igual que el compuesto **MF1050**, posee un grupo éster como conector. Posee también un segmento *N*-bencilpiperidina y el otro tetrahydro- β -carbolina sustituido en posición seis por un grupo metoxilo.

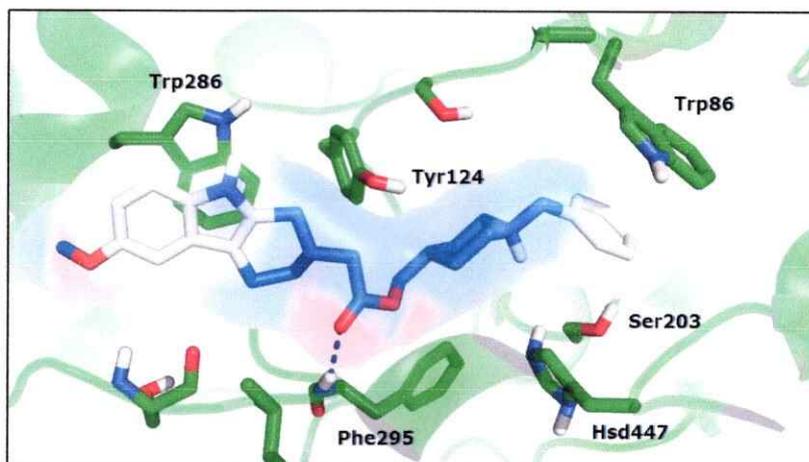


Figura 38: Modelación molecular del compuesto MF1046 en el sitio activo de hAChE. La línea punteada muestra interacción del tipo puente de hidrógeno.

A partir de los experimentos cinéticos desarrollados se concluyó que el compuesto **MF1046** ($K_i = 0,67 \mu M$) es más potente que el compuesto **MF1050** ($K_i = 0,85 \mu M$). Se infiere la importancia del grupo *metoxilo* como sustituyente en el anillo de la *tetrahidro-β-carbolina* (figura 38). Según el estudio de modelación molecular, el sustituyente induce un cambio conformacional en el segmento de la *tetrahidro-β-carbolina* del sitio activo de la *AChE* permitiendo la interacción del átomo de *oxígeno* del *grupo carbonilo* del *éster* con la cadena polipeptídica de la *fenilalanina 295*. La interacción del tipo π -stacking está presente como en el compuesto **MF1050**, pero se sospecha que el aporte del grupo *metoxilo* en la *tetrahidro-β-carbolina* a la *densidad electrónica* del anillo aromático fortalece la unión del compuesto **MF1046** con el sitio catalítico de la *AChE*.

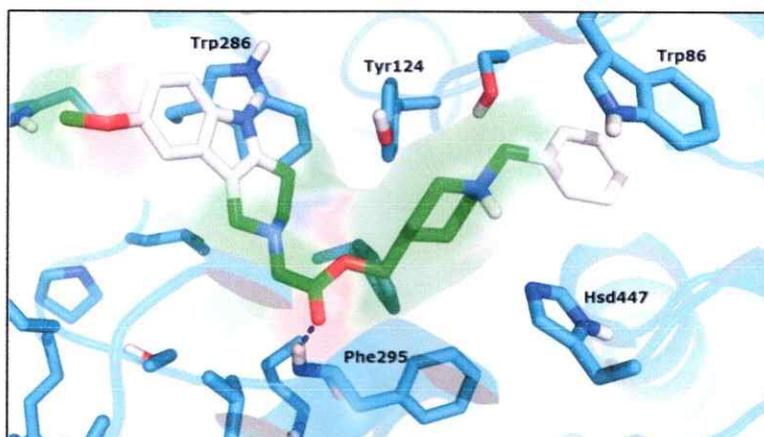


Figura 39: Modelación molecular del compuesto MF1061 en el sitio activo de hAChE. La línea punteada muestra la interacción del tipo puente de hidrógeno.

El compuesto **MF1061** es similar a **MF1046**, pero está construido con un segmento de *tetrahidro- γ -carbolina*. Según el modelo computacional el cambio de posición del *nitrógeno* de la *tetrahidrocarbolina* de *beta* a *gamma* genera un cambio conformacional del ligando al interior del sitio catalítico de *AChE*. El modelo conserva la interacción entre el *oxígeno* del *carbonilo* del grupo *éster* con la *cadena polipeptídica* de la enzima en el aminoácido *fenilalanina 295* y la interacción del tipo π -stacking entre el grupo *bencilo* del segmento *N-bencilpiperidina* con el residuo de aminoácido del triptófano 86 (figura 39). Sin embargo, este estudio no reportó interacción entre el segmento de la *tetrahidro- γ -carbolina* y el *triptófano 286* a diferencia del compuesto **MF1046** donde esta interacción sí está presente. Con los resultados obtenidos hasta el momento, parece ser importante la interacción del segmento de la *tetrahidrocarbolina* con el sitio aniónico periférico para lograr una mayor afinidad de los ligandos por el sitio de unión. La interacción con el residuo de aminoácido del *triptófano 286* pareciera ser clave en la inhibición enzimática.

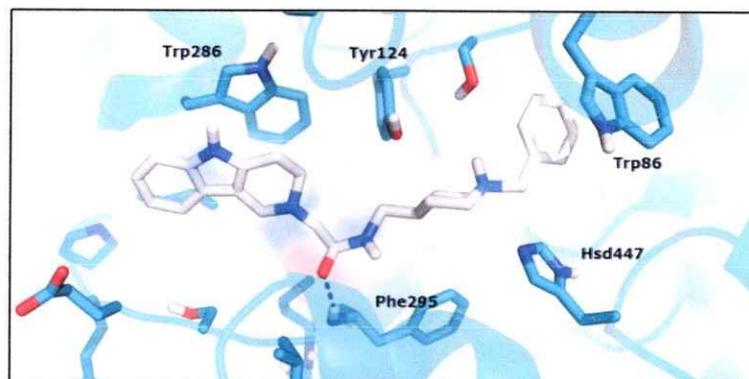


Figura 40: Modelación molecular del compuesto MF1053 en el sitio activo de hAChE. La línea punteada muestra interacción del tipo puente de hidrógeno.

Por otro lado, el compuesto **MF1053** cambia su conformación en el sitio catalítico permitiendo que el segmento de la *tetrahidro-γ*-carbolina interaccione con el residuo del triptófano 286 y el grupo bencilo del segmento N-bencilpiperidina con el residuo del triptófano 86 por interacción del tipo π -stacking. Este compuesto con el segmento *tetrahidro-γ*-carbolina logra inhibir en un 62% la actividad enzimática de AChE, obteniendo una $K_i = 0,63 \mu M$. Su análogo con el segmento *tetrahidro-β*-carbolina (**MF1047**) presenta un 78% de inhibición de la actividad enzimática con una $K_i = 0,32 \mu M$.

Disminuyó el valor de la constante de inhibición para el compuesto **MF1062** ($IC_{50} = 0,98 \mu M$, $K_i = 0,55 \mu M$) en comparación al compuesto **MF1053** ($IC_{50} = 1,13 \mu M$, $K_i = 0,63 \mu M$) por la incorporación de un grupo *metoxilo* en el carbono 8 de la *tetrahidro-γ*-carbolina (figura 41). Esto confirma la deducción que el grupo *metoxilo* actuaría como un elemento clave en la obtención de inhibidores más potentes en función de la plantilla propuesta.

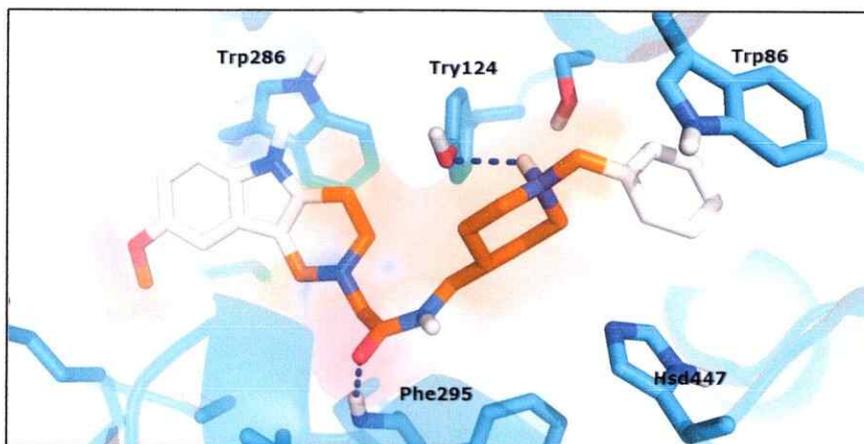


Figura 41: Modelación molecular del compuesto MF1062 en el sitio activo de hAChE. La línea punteada muestra interacción del tipo puente de hidrógeno.

Con las pruebas de inhibición sobre acetilcolinesterasa realizadas hasta ahora, el porcentaje de inhibición medido, el IC_{50} y las constantes de inhibición calculadas y la información aportada por el modelamiento molecular de los compuestos estudiados se propone una estructura proveniente de la plantilla molecular de acuerdo a las modificaciones realizadas y resumiendo en ella los mejores resultados obtenidos:

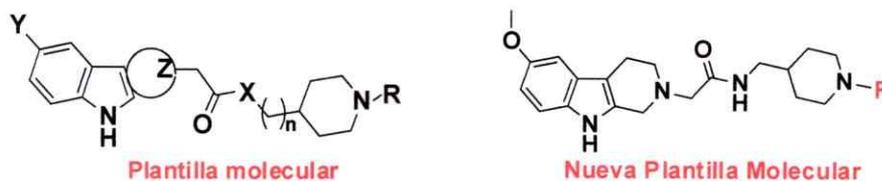


Figura 42: Esqueleto de la nueva plantilla molecular deducida con los aportes de los resultados de las pruebas biológicas realizadas hasta el momento a partir de la plantilla molecular inicial.

La nueva plantilla molecular es el resultado de los aportes de los ensayos de inhibición sobre acetilcolinesterasa y los estudios de modelación molecular. En función a los estudios de inhibición empleando el esqueleto molecular con un *grupo bencilo* como sustituyente **R** (figura 42), se propuso reemplazar este sustituyente y presumir la importancia del *anillo de benceno* en las estructuras anteriormente evaluadas.

Para ello se evaluó el compuesto **MF1064** (posee un *grupo propilo* como sustituyente **R**) como inhibidor de *AChE* obteniendo un 6% de inhibición de la actividad catalítica. Muy baja respecto al compuesto **MF1047**.

Lo mismo ocurre con el compuesto **MF1066** el cual posee un *grupo tert-butilcarboxilato (Boc)* unido a la amina secundaria de la *N*-piperidina por lo que impide que el átomo nitrógeno se protone, a pH fisiológico, por ser parte del *grupo carbamato*. Al evaluar la actividad inhibitoria de este compuesto se concluyó que no presenta inhibición de la actividad catalítica de *AChE*. El estudio de modelación molecular muestra que el segmento de la *tetrahydro-β*-carbolina interacciona con el sitio periférico enzimático, específicamente con el residuo de aminoácido del *triptófano 286*, pero no presenta interacción con el residuo de aminoácido del *triptófano 86* en el *subsitio aniónico* (figura 43). Las modificaciones realizadas para obtener los compuestos **MF1064** y **MF1066** sugieren que una cadena alifática o un grupo voluminoso con baja densidad electrónica con el nitrógeno del segmento *N*-piperidina no protonado como sustituyentes **R** en la plantilla propuesta, no generan compuestos que inhiban la acción enzimática de acetilcolinesterasa.

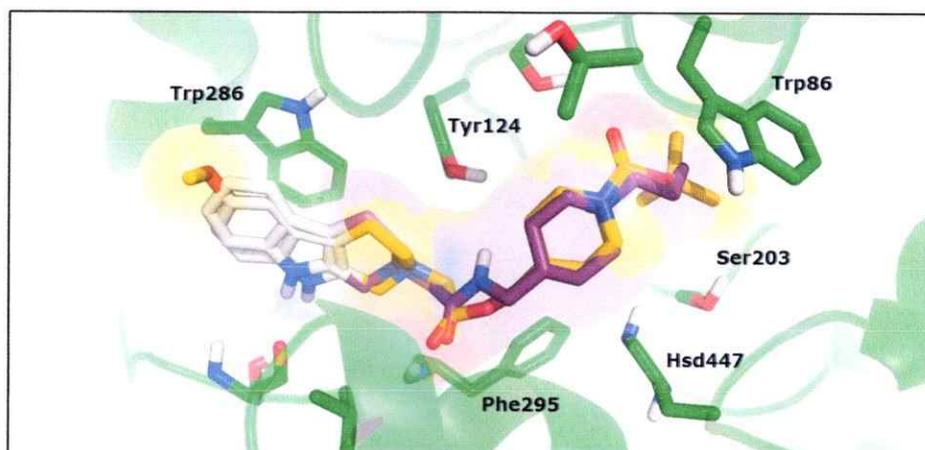


Figura 43: Modelación molecular de MF1064 y MF1066 en el sitio activo de hAChE. La ausencia de la interacción de los ligandos con el Trp86 sugiere que estas moléculas no actuarán como inhibidores de AChE.

El compuesto **MF1073** se evaluó como inhibidor de acetilcolinesterasa mostrando un 70% de inhibición de la actividad catalítica de AChE ($IC_{50} = 0,43 \mu M$; $K_i = 0,29 \mu M$). El resultado es concordante con las conjeturas desarrolladas desde la plantilla molecular propuesta: la molécula posee un segmento del tipo *tetrahydro-β-carbolina*, sustituido con un grupo metoxilo en posición 6, un segmento *N-bencilpiperidina* y un grupo amida como conector entre ambos segmentos. El segmento de la *tetrahydro-β-carbolina* sustituido en posición 6 por un grupo metoxilo en los derivados sintéticos aumentó siempre el porcentaje de inhibición de los análogos sin sustituyentes en el anillo *indol*.

El estudio de modelamiento molecular revela que el grupo amida presenta interacciones del tipo *punte de hidrógeno* con la *fenilalanina 295* y la *tirosina 124*. Se observa también las interacciones del tipo π -stacking entre el segmento de la *tetrahydro-β-carbolina* con el residuo de aminoácido del *triptófano 286* y entre el grupo *bencilo* del segmento *N-bencilpiperidina* con el residuo del *triptófano 86*, interacciones ya reportadas en los estudios de las moléculas evaluadas anteriormente. Adicionalmente se observó la

interacción del tipo *punte de hidrógeno* entre el *hidrógeno* del grupo *indol* y el oxígeno de la *serina 293* (Figura 44).

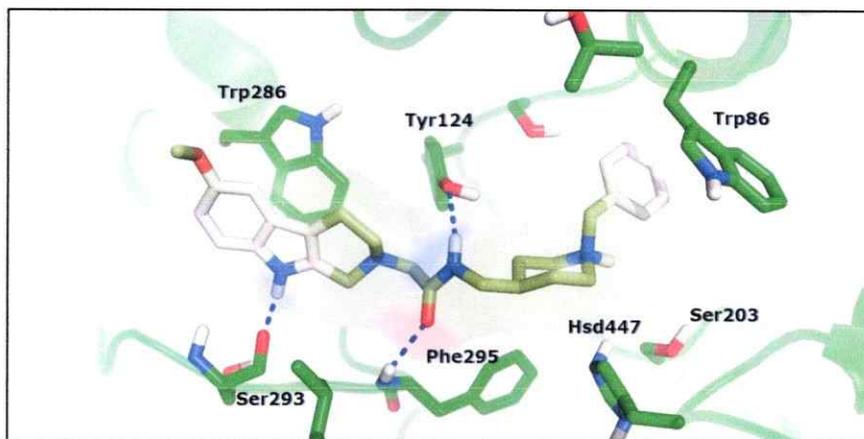


Figura 44: Modelación molecular del compuesto MF1073 en el sitio activo de hAChE. Las líneas punteadas muestran las interacciones del tipo *punte de hidrógeno*.

El compuesto **MF1073** presentó el menor IC_{50} y la menor K_i de las moléculas evaluadas en este trabajo. Se estudió el efecto de tres derivados bencílicos en función del compuesto **MF1073**, con la síntesis de los compuestos **MF1081**, **MF1082** y **MF1083**. Sin información previa y diseñando los compuestos solamente con los reactivos disponibles en el laboratorio se obtuvieron dos derivados *halogenados* en posición *meta* del anillo de *benceno* (**MF1081** y **MF1082**) y un derivado *metoxilado* en posición *para* del anillo de *benceno* (**MF1083**).

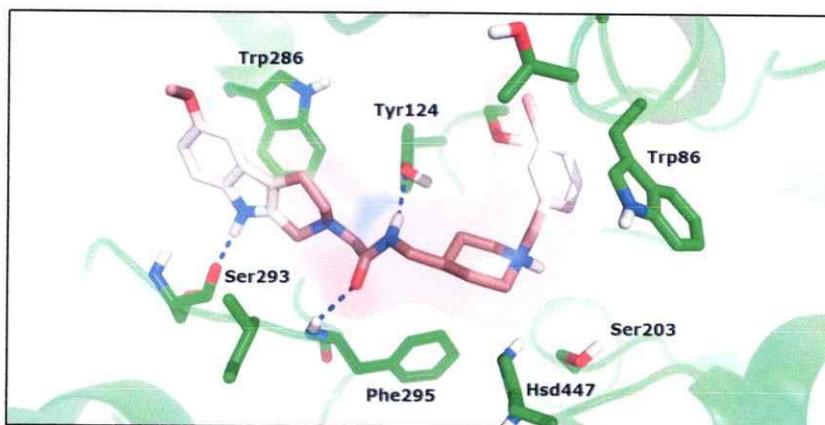


Figura 45: Modelación molecular del compuesto MF1081 en el sitio activo de hAChE. Las líneas punteadas muestran interacciones del tipo puente de hidrógeno.

El compuesto **MF1081** (figura 45), derivado bromado en *meta* del anillo de benceno del compuesto **MF1073**, presentó un porcentaje de inhibición de un 17% mientras que el compuesto **MF1082** (figura 46), derivado fluorado del compuesto **MF1073**, mostró un porcentaje de inhibición de 70% con un $IC_{50} = 0,51 \mu M$ y una $K_i = 0,35 \mu M$. El compuesto **MF1083** con grupo *metoxilo* en posición *para* del anillo de benceno no generó inhibición sobre AChE (figura 47).

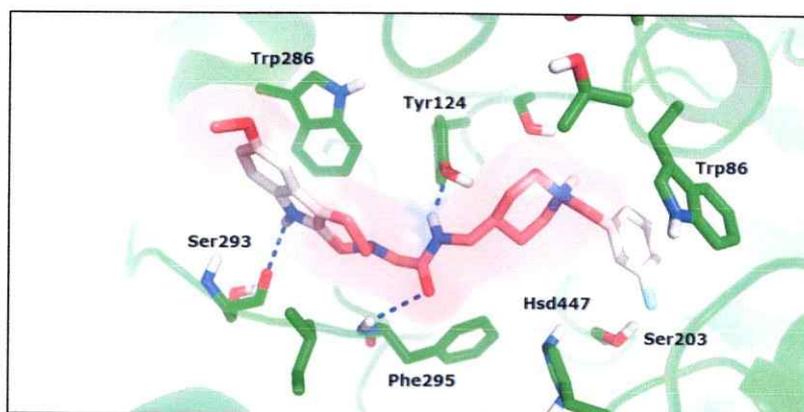


Figura 46: Modelación molecular del compuesto MF1082 en el sitio activo de hAChE. Las líneas punteadas muestran interacciones del tipo puente de hidrógeno

La incorporación de sustituyentes en el anillo de benceno no incrementó la inhibición de la actividad catalítica de AChE. La modelación molecular muestra que el

sitio activo de la *AChE* es bastante angosto. Al incorporar sustituyentes voluminosos en el *anillo de benceno* de la *N-bencilpiperidina* los ligandos se desplazan levemente fuera del bolsillo catalítico. Estos desplazamientos por la presencia de los sustituyentes incorporados pueden generar nuevas interacciones con los residuos de aminoácidos o suprimir las que se forman en ausencia de las incorporaciones. En el caso puntual, según los estudios de modelamiento molecular, la incorporación de un sustituyente voluminoso en el anillo de benceno desplaza este grupo desde el sitio de unión característico alejándolo del residuo del *triptófano 86* impidiendo la formación del π -*stacking*, interacción clave en la inhibición de *AChE*: con el tamaño del sustituyente se acentúa la distancia entre el anillo aromático y el residuo de aminoácido. Se piensa que la anexión de sustituyentes cada vez más voluminosos en el anillo de benceno del segmento *N-bencilpiperidina* provocarían una disminución de la inhibición enzimática.

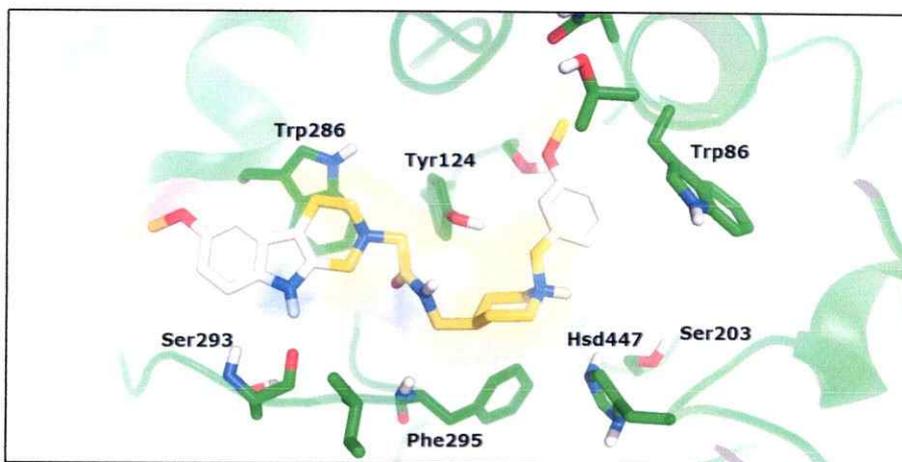
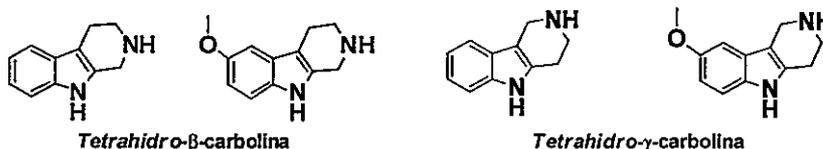


Figura 47: Modelación molecular del compuesto MF1083 en el sitio activo de hAChE

5.1. RESUMEN OPERATIVO

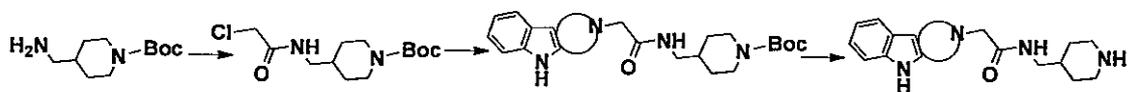
Se diseñaron 13 nuevos compuestos mediante la combinación de derivados de *tetrahydrocarbolina*s con segmentos moleculares derivados de *N*-piperidina unidos con un grupo amida y con un grupo éster. Estos compuestos fueron evaluados como inhibidores de acetilcolinesterasa humana (*hAChE*) y como moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina. De los compuestos evaluados en *hAChE*, 7 de éstos actuaron como inhibidores de la actividad catalítica, sin embargo, ninguno modula alostéricamente la apertura del canal iónico. A continuación, se describen las principales conclusiones de este trabajo.

Fue posible sintetizar dos derivados de *tetrahydro-β*-carbolina y dos derivados de *tetrahydro-γ*-carbolina: para cada grupo fue posible sintetizar su derivado *metoxilado* y su análogo sin sustituyentes.



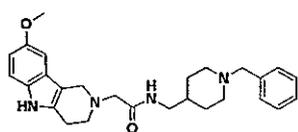
También se sintetizó el compuesto *1-bencil-4-(metilamino)piperidina* empleando dos rutas sintéticas: a partir del reactivo *4-(metilamino)piperidina* en tres etapas de reacción con un rendimiento total de reacción del 60% y a partir de *piperidin-4-carboxamida* en dos etapas sintéticas con 65% de rendimiento total de reacción. Adicionalmente se desarrolló una metodología sintética que permitió obtener nuevos derivados *N*-alquilados (*MF1073*, *MF1081*, *MF1082* y *MF1083*), principalmente derivados bencilados

sustituidos en el anillo de benceno a partir de 4-(aminometil)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo mediante sustituciones sobre el átomo de nitrógeno del anillo de piperidina.

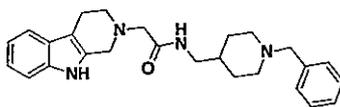


Estas y todas las moléculas sintetizadas fueron caracterizadas mediante RMN-¹H y la medición de su punto de ebullición. De manera complementaria fueron obtenidos y analizados los espectros RMN-¹³C, IR y de masa de los compuestos que fueron evaluados biológicamente.

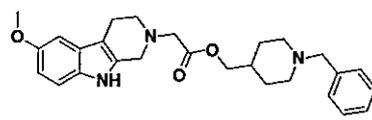
Un total de 15 nuevos compuestos a partir de la plantilla molecular propuesta pudieron ser obtenidos: diez derivados de la *tetrahydro-β*-carbolina (MF1042, MF1046, MF1047, MF1050, MF1064, MF1066, MF1073, MF1081, MF1082 y MF1083), tres derivados de la tetrahydro-*γ*-carbolina (MF1053, MF1061 y MF1062), un derivado de *isoindolin-1,3-diona* (MF1056) y un derivado de *1,2,4-oxadiazol* (NS9283) como posibles inhibidores de la actividad catalítica de acetilcolinesterasa humana. De estos 15 compuestos, siete de éstos actuaron como inhibidores de la enzima:



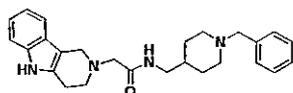
MF1062: $IC_{50} = 0,98 \mu M \pm 0,05$
 $K_i = 0,55 \mu M \pm 0,07$



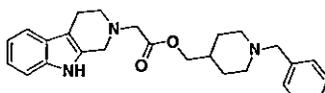
MF1047: $IC_{50} = 0,50 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,32 \mu M \pm 0,08$



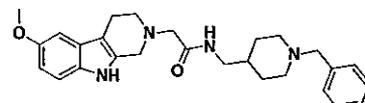
MF1046: $IC_{50} = 1,20 \mu M \pm 0,02$
 $K_i = 0,67 \mu M \pm 0,09$



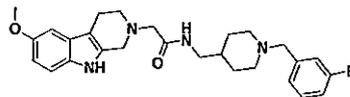
MF1053: $IC_{50} = 1,13 \mu M \pm 0,09$
 $K_i = 0,63 \mu M \pm 0,04$



MF1050: $IC_{50} = 1,61 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,85 \mu M \pm 0,05$

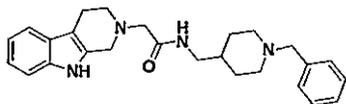


MF1073: $IC_{50} = 0,43 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,29 \mu M \pm 0,03$

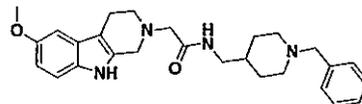


MF1082: $IC_{50} = 0,51 \mu M \pm 0,02$
 $K_i = 0,35 \mu M \pm 0,04$

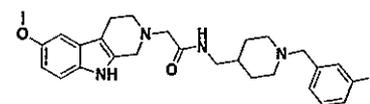
Presentaron mayor actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa aquellos compuestos contruidos con un segmento *tetrahydro*- β -carbolina y un segmento *N-bencilpiperidina* unidos por grupo acetamida como conector.



MF1047: $IC_{50} = 0,50 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,32 \mu M \pm 0,08$

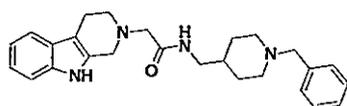


MF1073: $IC_{50} = 0,43 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,29 \mu M \pm 0,03$

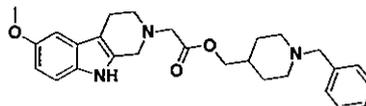


MF1082: $IC_{50} = 0,51 \mu M \pm 0,02$
 $K_i = 0,35 \mu M \pm 0,04$

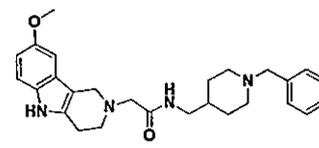
Considerando las modificaciones propuestas sobre la plantilla molecular, los inhibidores de acetilcolinesterasa que exhibieron mayor porcentaje de inhibición fueron aquellos que poseían un segmento *tetrahydro*- β -carbolina sustituido en posición seis por un grupo *metoxilo* en comparación a aquellos segmentos sin sustituir. Los compuestos que presentan un *grupo acetamida* como conector entre el segmento de la *N*-piperidina y la *tetrahydro*- β -carbolina mostraron los mayores porcentajes de inhibición entre las moléculas evaluadas en comparación a aquellas con un grupo éster como conector.



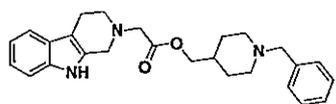
MF1050: $IC_{50} = 1,61 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,85 \mu M \pm 0,05$



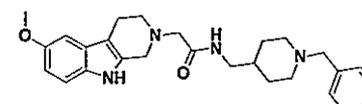
MF1073: $IC_{50} = 0,43 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,29 \mu M \pm 0,03$



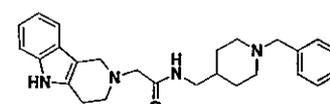
MF1062: $IC_{50} = 0,98 \mu M \pm 0,05$
 $K_i = 0,55 \mu M \pm 0,07$



MF1047: $IC_{50} = 0,50 \mu M \pm 0,03$
 $K_i = 0,32 \mu M \pm 0,08$



MF1046: $IC_{50} = 1,20 \mu M \pm 0,02$
 $K_i = 0,67 \mu M \pm 0,09$



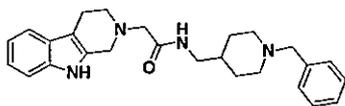
MF1061: $IC_{50} =$ No determinado
 $K_i =$ No determinado

Por otro lado, el porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa disminuye considerablemente si se elimina el carbono metilénico entre el grupo *N*-piperidina y el grupo conector amida (MF1042). Por lo tanto, las moléculas diseñadas debieron contener este grupo para lograr la inhibición de actividad catalítica.

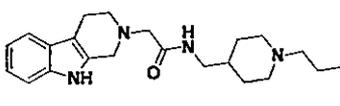
Se sintetizaron dos familias de derivados de *tetrahydrocarbolina* como inhibidores de acetilcolinesterasa. A pesar que se encontraron dos compuestos derivados de la *tetrahydro-γ-carbolina* como inhibidores de la enzima a concentraciones *micromolares* (MF1062 y MF1053), los compuestos derivados de la *tetrahydro-β-carbolina* resultaron ser más potentes que los derivados de la *tetrahydro-γ-carbolina*.

Luego evaluar los compuestos MF1064 y MF1066 como inhibidores de acetilcolinesterasa se concluye que una cadena alifática o un grupo voluminoso con baja densidad electrónica unido al átomo de nitrógeno de la *N*-piperidina genera compuestos con un porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa más bajo que compuestos con un grupo bencilo unido al anillo de la *N*-piperidina.

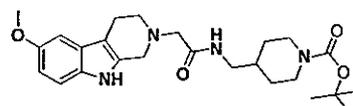
MF1047: % inhibición = 78%



MF1064: % inhibición = 6%

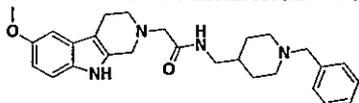


MF1066: % inhibición = 1%

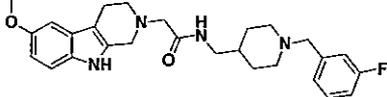


En la misma línea, un grupo *bencilo* unido al anillo de la *N*-piperidina genera compuestos con mayor inhibición de la actividad catalítica, sin embargo, si el anillo de benceno presenta sustituciones en posición *meta* o *para*, los nuevos compuestos serán menos potentes como inhibidores de acetilcolinesterasa en comparación al compuesto con el *anillo de benceno* sin sustituciones. Mientras más voluminosa sea la sustitución, menor es la inhibición de la actividad enzimática.

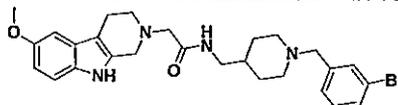
MF1073: % de inhibición = 70%



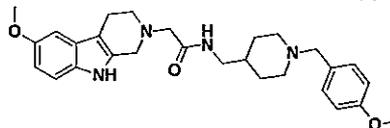
MF1082: % de inhibición = 70%



MF1081: % de inhibición = 17%



MF1083: % de inhibición = 1%



Considerando los estudios de la cinética enzimática realizada con los compuestos sintetizados, se concluye que *MF1046*, *MF1047*, *MF1050*, *MF1053*, *MF1062*, *MF1073* y *MF1082* actúan como inhibidores de acetilcolinesterasa. De estos siete inhibidores, los más potentes son los compuestos *MF1073*, *MF1047* y *MF1082* con constantes de inhibición (K_i) sobre acetilcolinesterasa iguales a 0,29 μM , 0,62 μM y 0,35 μM , respectivamente. Todos estos compuestos compiten con el sustrato por el sitio de activo enzimático (inhibidores competitivos) y, durante su interacción con el sitio catalítico, éstos no se descomponen por la acción hidrolítica de la enzima.

Fueron sintetizados dos compuestos adicionales a la plantilla molecular propuesta: el compuesto *NS9283*, modulador alostérico positivo del receptor nicotínico de acetilcolina y el compuesto *MF1056*, sintetizado de manera complementaria por la información de la literatura estudiada. Sin embargo, ninguno de éstos inhibió la actividad catalítica de acetilcolinesterasa.

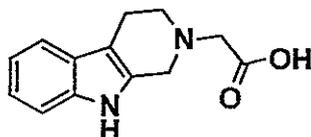
Para estudiar la modulación alostérica del receptor nicotínico de acetilcolina, se evaluaron los compuestos con los menores valores de constante de inhibición: *MF1047*, *MF1073* y *MF1082*. Sin embargo, ninguno de ellos produce un efecto sobre el receptor; no inhiben su acción ni potencia la respuesta de acetilcolina. Esto permitió concluir que los compuestos sintetizados solamente inhiben la enzima acetilcolinesterasa humana sin ejercer una acción moduladora sobre el receptor nicotínico.

5.2. CONCLUSIONES

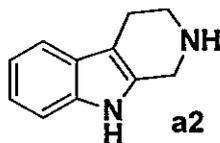
Los derivados de tetrahidro- β -carbolinas unidos a un segmento *N*-bencilpiperidina por un grupo acetamida actúan como inhibidores competitivos de la enzima acetilcolinesterasa. En función a la plantilla molecular propuesta, la presencia de un carbono metilénico entre el conector acetamida y el segmento *N*-bencilpiperidina es importante para obtener moléculas que inhiban la actividad enzimática de acetilcolinesterasa. La presencia del grupo bencilo unido al anillo *N*-piperidina es trascendental en el diseño de moléculas con un perfil mayor de inhibición de la actividad enzimática en comparación a moléculas con grupos alifáticos unidos al anillo de *N*-piperidina. Los derivados de *tetrahydro*carbolinas actúan como inhibidores de acetilcolinesterasa, sin embargo, los derivados de *tetrahydro*- β -carbolinas resultaron ser más potentes que sus análogos derivados de *tetrahydro*- γ -carbolinas. Lo mismo ocurre al reemplazar el grupo conector acetamida por un grupo acetato: los compuestos que poseen un grupo amida como conector en la plantilla molecular son más potentes que sus análogos con un grupo éster. Si bien la plantilla propuesta permitió diseñar compuestos que actuaran como inhibidores competitivos de la enzima acetilcolinesterasa, éstos no modulan alostéricamente ni ejercen alguna funcionalidad sobre el receptor nicotínico de acetilcolina.

6.1. ANEXO I: SINTESIS DE COMPUESTOS.

6.1.1. Síntesis de ácido 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il) acético (a4)



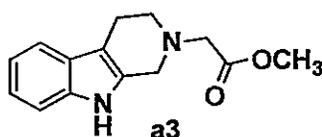
6.1.1.1. 2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol (a2)⁹⁵



Se preparó una suspensión de clorhidrato de triptamina (440 mg, 2,2 mmol) en agua destilada (8 mL). La suspensión se calentó en un baño de agua a 45°C hasta que el sólido se disolvió completamente. Luego se enfrió la solución a temperatura ambiente. En un vaso de precipitado se disolvió ácido glioxílico (227 mg, 2,4 mmol) en agua destilada (2 mL) y se agregó esta mezcla sobre la solución de clorhidrato de triptamina agitando constantemente. Sobre la disolución final se agregó, gota a gota, una solución acuosa de NaOH al 20% hasta lograr un pH de solución igual a 4. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. Luego el sólido obtenido se filtró y se transfirió a un vaso de precipitado de 50 mL. Sobre el sólido aislado se agregaron 2 mL de agua destilada y 0,6 mL de HCl concentrado. La suspensión resultante fue calentada a 85°C por 30 minutos y luego se agregó HCl concentrado (0,65 mL). La mezcla resultante se mantuvo

a 85°C durante 15 minutos más y posteriormente se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se filtró el precipitado formado y se lavó con agua destilada (10 mL). El sólido obtenido se redisolvió en agua destilada (20 mL) y la suspensión resultante fue calentada a 55°C con agitación constante, ajustando el pH de la solución a 12 agregando gota a gota una solución acuosa de NaOH al 20%. Luego la mezcla obtenida se enfrió a temperatura ambiente y el sólido formado se filtró y se lavó con agua destilada (10 mL) obteniéndose un sólido blanco como producto [246 mg, sólido gris, 65% rendimiento], p.f. 203-204°C. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,58 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 2,97 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,84 (s, 2H, CCH₂N), 6,86 – 7,04 (m, 2H, ArH), 7,25 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,34 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 10,63 (s, 1H, NH indol).

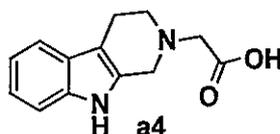
6.1.1.2. 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)acetato de metilo (**a3**)



El compuesto **a2** (1,00 g, 5,8 mmol) se disolvió en 20 mL de DMF. Posteriormente, se agregó Cs₂CO₃ (2,08 g, 6,38 mmol) sobre la solución. Se preparó una solución de 2-cloroacetato de metilo (0,69 g, 6,38 mmol) en 5 mL de DMF y se agregó ésta sobre la solución del compuesto **a2**, gota a gota, por un periodo de 30 minutos. Luego de completada la adición la mezcla resultante fue calentada a 70°C por 18 horas. La mezcla obtenida se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre un baño de agua-hielo. El

sólido formado se aisló por filtración y, posteriormente, se redisolvió en una mezcla de solventes DCM/MeOH (50:50). La solución obtenida se concentró en un rotavapor obteniéndose un sólido blanco como producto [1,25 g, 87% rendimiento] p.f. 143-144°C. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,68 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 2,90 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H, CH₂CH₂N), 3,52 (s, 2H, NCH₂CO₂), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,76 (s, 2H, CCH₂N), 6,87 – 7,06 (m, 2H, ArH), 7,26 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,35 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 10,70 (s, 1H, NH indol).

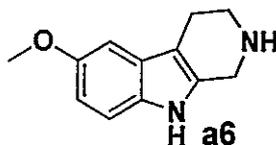
6.1.1.3. Ácido 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il) acético (**a4**)



El compuesto **a3** (539 mg, 1,95 mmol) se disolvió, mediante agitación constante, en una solución compuesta por 10 mL de THF, 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. Sobre la solución de **a3** se agregó LiOH hidrato (422 mg, 9,75 mmol) con agitación constante y a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción fue calentada a reflujo por 3 horas. Posteriormente la solución resultante se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó parcialmente el solvente. La suspensión obtenida se acidificó utilizando una solución de HCl 3N hasta obtener una mezcla de reacción a pH = 3. Sobre la suspensión obtenida se agregaron 5 mL de éter etílico agitando la mezcla resultante vigorosamente. El sólido formado se filtró y se lavó con 10 mL de agua destilada obteniéndose como

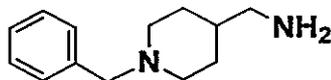
producto un sólido de color blanco [437 mg, 97% rendimiento] p.f. 285-286°C RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,73 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,00 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,43 (s, 2H, NCH₂CO₂), 3,88 (s, 2H, CCH₂N), 6,91 – 7,06 (m, 2H, ArH), 7,29 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 7,38 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, ArH), 10,76 (s, 1H, NH indol).

6.1.2. 6-metoxi-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol (**a6**)⁹⁵

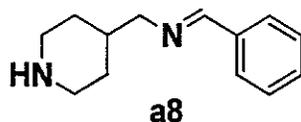


El compuesto **a6** se sintetizó a partir del compuesto **a5** (1,0 g, 4,4 mmol) usando ácido glioxílico (0,45 g, 4,8 mmol) y utilizando el protocolo de síntesis 6.1.1.1. [540 mg, sólido gris, 61% rendimiento] p.f. 223-224°C. RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,55 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 2,96 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,73 (s, 3H, CH₃O), 3,82 (s, 2H, CCH₂N), 6,63 (dd, *J*₁ = 8,6 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H, ArH), 6,84 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, ArH), 7,14 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, ArH), 10,44 (s, 1H, NH indol).

6.1.3. Síntesis de 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (**a10**)

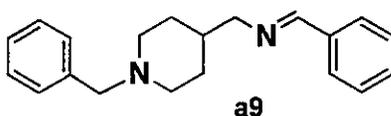


6.1.3.A.1. PROCEDIMIENTO A: N'-benciliden-4-(metilamino)piperidina. (**a8**)¹⁰⁶



El compuesto 4-(metilamino)piperidina (**a7**) (5,0 g, 41,7 mmol) se disolvió en EtOH (100 mL) y sobre la disolución se agregó benzaldehído (15,2 g, 41,7 mmol) gota a gota a temperatura ambiente con agitación constante. La mezcla fue calentada a reflujo por 24 horas y la solución resultante se enfrió a temperatura ambiente. El solvente de la reacción se evaporó en un rotavapor a presión reducida obteniéndose un líquido incoloro (compuesto **a8**) el cual se utilizó en el siguiente paso sintético sin purificación previa.

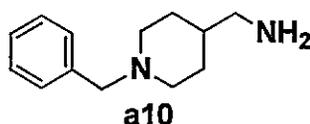
6.1.3.A.2. N'-benciliden-1-bencil-4-(metilamino)piperidina (**a9**)¹⁰⁶



El compuesto **a8** (2,0 g 10 mmol) se disolvió en 50 mL de acetona. Se agregó K₂CO₃ (2,8 g, 20 mmol) sobre la solución de **a8** con agitación constante y posteriormente, se agregó bromuro de bencilo (2,0 g, 12 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente la mezcla resultante se filtró y el

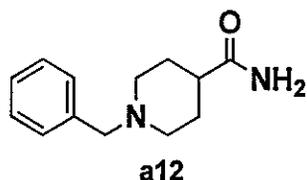
filtrado obtenido se concentró en un rotavapor a presión reducida obteniéndose un producto líquido (**a9**) el cual se usó sin purificación previa en el siguiente paso de síntesis.

6.1.3.A.3. 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (**a10**)¹⁰⁶



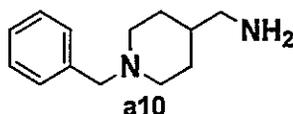
El compuesto **a9** (2,90 g, 10 mmol) se disolvió en 10 mL de una solución acuosa de HCl 10%. La mezcla fue calentada a 40°C por 4 horas y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se agregó CHCl₃ (50 mL) sobre la solución. La fase acuosa presente se separó con un embudo de decantación y sobre ésta se agregó gota a gota una solución de NaOH al 20% hasta alcanzar un pH de solución igual a 9. La mezcla resultante se vertió en un embudo de decantación y se agregaron 50 mL de CHCl₃. La fase orgánica se colectó en un matraz Erlenmeyer y la fase acuosa se lavó nuevamente con CHCl₃ (2 x 30 mL). Las fases orgánicas fueron colectadas y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó en un rotavapor a presión reducida. El crudo obtenido se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel (DCM:MeOH:NH₄OH / 9:1:0,1) obteniéndose el producto (1,22 g, base libre: aceite amarillo, 60% rendimiento), RMN-¹H (clorhidrato) (200 MHz, D₂O) δ 1,41 – 1,72 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,99 – 2,10 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 2,11 – 2,19 (m, 1H, CH), 2,92 – 3,25 (m, 4H, NCH₂CH₂CH), 3,63 (d, *J* = 12,6 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH), 4,36 (s, 2H, ArCH₂), 7,50 - 7,61 (m, 5H, ArH).

6.1.3.B.1 PROCEDIMIENTO B: 1-bencilpiperidin-4-carboxamida (a12)¹⁰⁷



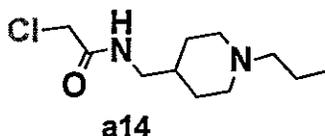
El compuesto piperidin-4-carboxamida (*a11*, 3,0 g, 23,7 mmol) se disolvió en EtOH (50 mL) y posteriormente se agregó K₂CO₃ (6,5 g, 47,5 mmol). Se adicionó gota a gota bromuro de bencilo sobre la mezcla resultante (4,4 g, 26,1 mmol) y luego de finalizada la adición se calentó a reflujo la solución por 6 horas. Posteriormente la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó completamente el solvente en un rotavapor a presión reducida. El crudo obtenido se disolvió en DCM (20 mL) y se lavó con agua destilada (3 x 20 mL). La fase orgánica se colectó y se secó con Na₂SO₄ anhidro; el sólido se filtró y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida obteniéndose un sólido de color blanco como producto (4,4 g, 86% rendimiento) p.f. 161-162°C. RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,43 – 1,71 (m, 4H, NCH₂CH₂CH), 1,80 – 1,98 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,98 – 2,17 (m, 1H, CH), 2,76 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 3,42 (s, 2H, ArCH₂), 6,70 (s, 1H, CONH₂), 7,08 – 7,49 (m, 5H, ArH).

6.1.3.B.2. 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a10)¹⁰⁸



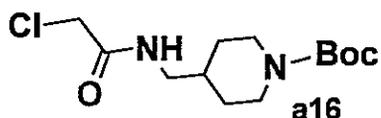
El compuesto **a12** (3,49 g, 16 mmol) se disolvió en THF seco (10 mL) y la solución resultante se vertió gota a gota sobre una suspensión de LiAlH₄ (1,06 g, 28 mmol) en THF seco (10 mL) a 0°C. La mezcla fue calentada a reflujo por 6 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se agregó lentamente 1,0 mL de agua destilada sobre la suspensión resultante y se agitó la mezcla por 15 minutos a 0°C. Luego se agregaron 100 µL de una solución de NaOH al 20% manteniendo la temperatura del sistema. Finalmente se agregaron 3,0 mL de agua destilada y la mezcla se calentó a temperatura ambiente; el sólido se filtró y se lavó con 20 mL de AcOEt y 20 mL agua destilada. El filtrado fue puesto en un embudo de decantación, se separó la fase orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el solvente en un rotavapor a presión reducida. El líquido resultante se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel (DCM:MeOH:NH₄OH / 9:1:0,1) obteniéndose como producto final un líquido amarillo (**a10**) (1,47 g, 45% rendimiento), RMN-¹H (clorhidrato(200 MHz, D₂O) δ 1,41 – 1,72 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,99 – 2,10 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 2,11 – 2,19 (m, 1H, CH), 2,92 – 3,25 (m, 4H, NCH₂CH₂CH), 3,63 (d, *J* = 12,6 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH), 4,36 (s, 2H, ArCH₂), 7,50 - 7,61 (m, 5H, ArH).

6.1.4. N-((1-propilpiperidin-4-il)metil)-2-cloro-acetamida (**a14**)



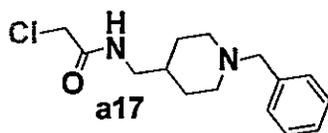
El compuesto *N-propil-4-(metilamino)piperidina* (**a13**, 892 mg, 5,7 mmol) se disolvió en DCM (4 mL) y sobre esta solución se agregó Et₃N (865 mg, 8,5 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a -20°C con agitación constante utilizando un baño de acetona-hielo. Se agregó lentamente una solución de cloruro de cloroacetilo (711 mg, 6,3 mmol) en DCM (3 mL) sobre la mezcla enfriada utilizando un embudo de adición. Luego de 2 horas de reacción se agregaron 5 mL de agua destilada y la disolución fue puesta rápidamente en un embudo de decantación. La fase orgánica se separó y se lavó con agua destilada fría (10 mL) y luego con una solución saturada de cloruro de sodio (10 mL). La fase orgánica aislada se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró el sólido y el filtrado se concentró en un rotavapor a temperatura ambiente a presión reducida. Se obtuvo un líquido como producto (**a14**) el cual se usó para el siguiente paso de síntesis sin purificación previa.

6.1.5. N-((1-*tert*-butoxicarbonilpiperidin-4-il)metil)-2-cloroacetamida (**a16**)



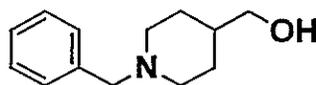
El compuesto **a16** se sintetizó a partir del reactivo *4-(metilamino)piperidin-1-carboxilato de tert-butilo* (**a15**) (1,56 g, 7,3 mmol) disuelto en DCM (10 mL) usando cloruro de cloroacetilo (0,91 g, 8,0 mmol) disuelto en DCM (5 mL) y Et₃N (1,10 g, 10,9 mmol) de acuerdo al procedimiento **6.1.4** obteniéndose un aceite amarillo como producto (**a16**) el cual se usó posteriormente sin purificación previa.

6.1.6. N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-cloroacetamida (**a17**)

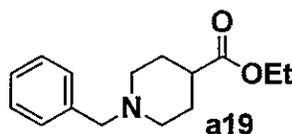


El compuesto **a17** se sintetizó a partir del compuesto **a10** (184 mg, 0,9 mmol) disuelto en DCM (4 mL) junto al cloruro de cloroacetilo (112 mg, 0,98 mmol) disuelto en DCM (3 mL) y Et₃N (109 mg, 1,1 mmol), empleando el procedimiento 6.1.4. obteniéndose como producto un líquido marrón el cual se utilizó posteriormente sin purificación previa.

6.1.7. Síntesis de 1-bencil-4-(metilhidroxi)piperidina (**a20**)



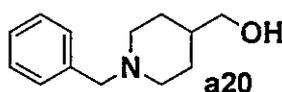
6.1.7.1. 1-bencilpiperidin-4-carboxilato de etilo (**a19**)¹⁰⁶



El compuesto isonipecotato de etilo (**a18**) (1,57 g, 10 mmol) se disolvió en 30 mL de AcCN y posteriormente se agregó K₂CO₃ (2,76 g, 20 mmol) con agitación constante a temperatura ambiente. Se añadió, gota a gota, cloruro de bencilo (1,33 g, 10 mmol) sobre la mezcla y se calentó la solución a 80°C por 12 horas. Completada la reacción se enfrió

la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente y se evaporó el solvente de la reacción con un rotavapor a presión reducida. El concentrado obtenido se disolvió con agua destilada (40 mL) y se lavó con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se colectó y se secó con Na₂SO₄ anhidro filtrando la sal y evaporando el solvente del filtrado con un rotavapor a presión reducida obteniéndose un líquido anaranjado como producto (**a19**) (1,77 g, 71% rendimiento). RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,17 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1,63 – 1,75 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,80 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,95 (td, *J*₁ = 11,4 Hz, *J*₂ = 2,0 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH), 2,13 – 2,25 (m, 1H, CHCO₂), 2,78 (td, *J*₁ = 11,4 Hz, *J*₂ = 2,0 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH), 3,41 (s, 2H, ArCH₂), 4,05 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 7,12 – 7,28 (m, 5H, ArH).

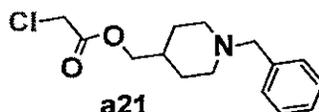
6.1.7.2. 1-bencil-4-(metilhidroxi)piperidina (**a20**)¹⁰⁶



El compuesto *1-bencilpiperidin-4-carboxilato* de etilo (**a19**) (1,74 g, 7 mmol) se disolvió en THF seco (15 mL) y la solución obtenida se adicionó sobre una suspensión de LiAlH₄ (570 mg, 15 mmol) en THF seco (10 mL) a 0°C. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente con agitación constante por 3 horas. Luego de completada la reacción la solución se enfrió a 0°C y se agregó cuidadosamente hielo molido sobre la mezcla hasta no observar burbujeo. El sólido resultante se filtró y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida hasta evaporar todo el THF. La fase acuosa resultante

se lavó con AcOEt (3 x 10 mL) en un embudo de decantación y las fases orgánicas se colectaron y se lavaron con una solución acuosa saturada de NaCl (3 x 10 mL) y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica conjunta se concentró en un rotavapor a presión reducida y el crudo obtenido se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel utilizando MeOH al 5% en DCM como fase eluyente obteniéndose un aceite amarillo como producto (1,24 g, 78% rendimiento). RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,14 – 1,26 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,34 – 1,47 (m, 1H, CH), 1,56 – 1,67 (m, 2H, NCH₂CH₂CH), 1,88 (td, *J*₁ = 11,7 Hz, *J*₂ = 1,8 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH), 2,08 (s, 1H, OH), 2,83 (td, *J*₁ = 11,7 Hz, *J*₂ = 1,8 Hz, 2H, NCH₂CH₂CH), 3,38 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H, CHCH₂OH), 3,42 (s, 2H, ArCH₂), 7,12 – 7,27 (m, 5H, ArH).

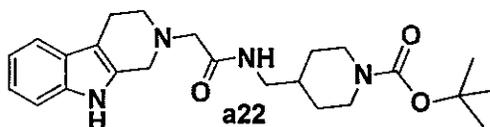
6.1.8. 2-cloroacetato de (N-(1-bencilpiperidin-4-il)metilo (a21)



El compuesto **a20** (252 mg, 1,2 mmol) se disolvió en DCM (3 mL) y sobre esta solución se agregó Et₃N (249 mg, 2,5 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a -20°C con agitación constante utilizando un baño de acetona-hielo a -20°C. Una solución de cloruro de cloroacetilo (180 mg, 1,6 mmol) en DCM (3 mL) se agregó gota a gota sobre la mezcla enfriada. Luego de mantener la temperatura de reacción por 3 horas, se agregaron 5 mL de agua destilada sobre la disolución e inmediatamente la mezcla se vertió en un embudo de decantación separando la fase orgánica. Ésta se lavó con agua destilada (10 mL) y luego

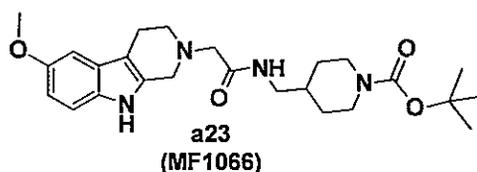
con una solución acuosa saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica obtenida se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró el sólido y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida a temperatura ambiente. Se obtuvo como producto un aceite de color marrón el que se usó posteriormente sin purificación previa.

6.1.9. 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)-N-(1-Boc-piperidin-4-il-metil)acetamida (a22)



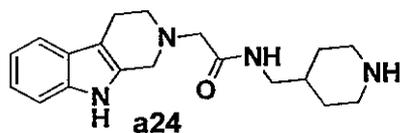
El compuesto **a2** (344 mg, 2,0 mmol) se disolvió en DMF (4 mL) y luego se agregaron Cs₂CO₃ (1,3 g, 4,0 mmol) con agitación constante a temperatura ambiente y el compuesto **a16** (581 mg, 2,0 mmol). La mezcla resultante fue calentada a 80°C por 4 horas con agitación constante y la solución obtenida se vertió en un vaso de precipitado sobre una mezcla de agua-hielo. Se formó un precipitado de color anaranjado; se filtró, se secó y se utilizó posteriormente sin purificación previa. (725 mg, 85% rendimiento bruto).

6.1.10. 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)-N-(1-Boc-piperidin-4-il-metil) acetamida (MF1066) (a23)



El compuesto **a23** se sintetizó utilizando el procedimiento **6.1.9** con los compuestos **a6** (1,41 g, 7 mmol) y **a16** (2,03 g, 7 mmol) disueltos en DMF (6 mL), usando como base Cs₂CO₃ (4,56 g, 4,56 mmol). El producto formado se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel usando como fase eluyente una mezcla de DCM y MeOH / (9:1). El sólido obtenido se recristalizó en MeOH obteniéndose como producto final un sólido de color blanco (2,65 g, 83% rendimiento) p.f. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,06 – 1,14 (m, 2H, CH₂NCO₂), 1,43 (s, 9H, CCH₃), 1,64 (m, 1H, CH), 1,65 – 1,75 (m, 2H, CH₂NCO₂), 2,77 (dd, *J*₁ = 8,2 Hz, *J*₂ = 2,9 Hz, 2H, CONHCH₂CH), 2,88 – 3,01 (m, 4H, CCH₂CH₂N), 3,41 (s, 2H, NCH₂CONH), 3,47 (dd, *J*₁ = 8,2 Hz, *J*₂ = 2,9 Hz, 2H, CH₂CH₂NCO₂), 3,74 (s, 2H, CCH₂N), 3,85 (s, 3H, CH₃O), 4,57 – 4,65 (m, 2H, CH₂CH₂NCO₂), 6,88 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H, ArH), 6,93 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, ArH), 7,16 – 7,21 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, ArH), 7,77 (s, 1H, CONH).

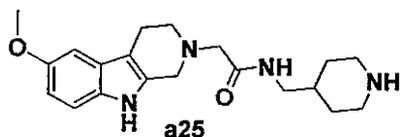
6.1.11. 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)-N-(piperidin-4-il-metil) acetamida (a24)



El compuesto **a22** (250 mg, 0,58 mmol) se disolvió en DCM (3 mL) a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, se agregó ácido trifluoroacético (3 mL) sobre la solución y la mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego de completada la reacción, el DCM se evaporó en un

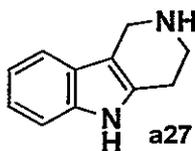
rotavapor a temperatura ambiente a presión reducida. El crudo obtenido se disolvió en DCM (10 mL) y la mezcla resultante se enfrió en un baño de agua-hielo. Se agregó sobre la disolución una solución acuosa de NaOH al 20% con agitación constante hasta obtener una mezcla con un pH igual 12. La solución obtenida se diluyó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (20 mL) y la fase orgánica se extrajo con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se colectó, se combinó y se secó con Na₂SO₄ anhidro y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida. El líquido obtenido se usó inmediatamente en la siguiente etapa de reacción, sin purificación previa.

6.1.12. 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)-N-(piperidin-4-il-metil) acetamida (*a25*)



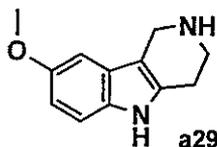
El compuesto *a25* se sintetizó a partir de una solución del compuesto *a23* (177 mg, 0,37 mmol) en 2 mL de DCM, agregando 2 mL de ácido trifluoroacético sobre la solución de acuerdo al procedimiento 6.1.11. El crudo del producto obtenido se usó inmediatamente en la siguiente etapa de reacción, sin purificación previa.

6.1.13. 2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol (**a27**)¹⁰²



Una mezcla de clorhidrato de fenilhidrazina (**a26**, 723 mg, 5,0 mmol) y de clorhidrato de piperidina monohidrato (783 mg, 5,1 mmol) en EtOH (100 mL) fue calentada a reflujo por 2 horas con agitación constante. Posteriormente la solución se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se evaporó parcialmente en un rotavapor la formación de un sólido de color blanco. Se colectó el sólido por filtración y se secó en una estufa (**a27**, 585 mg, 68% rendimiento) p.f. 274-275°C. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,66 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH₂CH₂N), 3,01 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CH₂CH₂N), 3,85 (s, 2H, CCH₂N), 6,94 – 7,01 (m, 2H, ArH), 7,32 – 7,23 (m, 2H, ArH), 10,71 (s, 1H, NH indol).

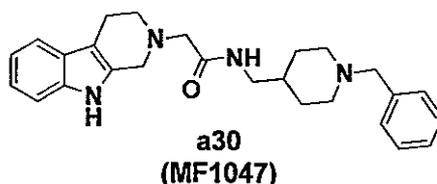
6.1.14. 8-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol (**a29**)¹⁰²



El compuesto **a29** se sintetizó mediante el procedimiento **6.1.13** usando como reactantes el clorhidrato de 4-metoxifenilhidrazina (**a28**, 2,0 g, 11,4 mmol) y el clorhidrato de piperidina monohidrato (1,7 g, 11,4 mmol) en EtOH (100 mL). (1,38 g, sólido gris, 60% rendimiento) 261-263°C. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,01 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H,

$\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}}$, 3,44 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{N}}$), 3,75 (s, 3H, CH_3O), 4,25 (s, 2H, $\text{C}\underline{\text{CH}_2\text{N}}$), 6,72 (dd, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H, ArH), 6,99 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, ArH), 7,21 – 7,25 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, ArH), 11,01 (s, 1H, NH indol).

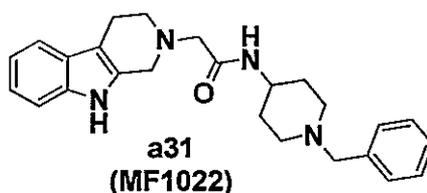
6.1.15. N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetamida (MF1047) (a30)



Sobre una solución de **a4** (123,2 mg, 0,535 mmol) en DMF (3 mL) se agregó el compuesto **a10** (109,3 mg, 0,535 mmol) y Et_3N (216 mg, 2,12 mmol). La mezcla se enfrió a -5°C y se agregó HOBt (72 mg, 0,535 mmol) y EDCI.HCl (102 mg, 0,53 mmol). La mezcla fue calentada a temperatura ambiente y se agitó por 24 horas. Posteriormente se evaporó completamente el solvente de la reacción en un rotavapor a presión reducida. El crudo obtenido se diluyó con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y la mezcla se extrajo con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se colectó y luego se secó con MgSO_4 anhidro. La sal se filtró y el filtrado obtenido se concentró en un rotavapor a presión reducida. El crudo se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel usando como fase móvil DCM/MeOH (8,5:1,5) obteniéndose como producto un sólido (**MF1047 (a30)**, 142 mg, sólido amarillo, 64% rendimiento), RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,25 – 1,33 (m, 2H, $\text{CH}\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}}$), 1,48 – 1,55 (m, 1H, CH), 1,62 – 1,67 (m, 2H, $\text{CH}\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}}$), 1,95

(t, $J = 11,1$ Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,85 (m, 4H, CCH₂CH₂N), 2,92 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 3,19 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CONHCH₂CH), 3,26 (s, 2H, NCH₂CONH), 3,50 (s, 2H, ArCH₂), 3,78 (s, 2H, CH₂), 7,06 – 7,59 (m, 9H, ArH), 7,88 (s, 1H, CONH). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 170,48, 138,26, 136,03, 131,17, 129,25, 128,20, 127,02, 121,69, 119,56, 117,99, 110,89, 107,99, 63,36, 60,91, 53,30, 51,70, 50,82, 44,43, 36,14, 29,93, 21,63 ppm.

6.1.16. N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetamida (MF1042) (a31)



El compuesto **MF1042** se obtuvo mediante el procedimiento de la reacción **6.1.15** utilizando como reactivos de partida el compuesto **a4** (90 mg, 0,39 mmol) disuelto en DMF (3 mL), N-bencil-4-aminopiperidina (74 mg, 0,39 mmol), HOBT (52,7 mg, 0,39 mmol), EDCl.HCl (74,8 mg, 0,39 mmol) y Et₃N (158 mg, 1,56 mmol) obteniéndose como producto un sólido. (**MF1042 (a31)**, 112 mg, sólido rojo, 71% rendimiento) p.f. 87-89°C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,44 – 1,55 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,69 – 1,73 (m, 1H, CH), 1,90 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,16 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,74 – 2,85 (m, 4H, CCH₂CH₂N), 2,90 (dd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 2,9$ Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 3,24 (s, 2H, NCH₂CO), 3,48 (s, 2H, ArCH₂), 3,77 (s, 2H, CH₂), 7,09 – 7,52 (m, 9H, ArH), 7,81 (s, 1H, NH CONH). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 169,66, 138,20, 136,01, 131,09, 129,13,

128,25, 127,10, 121,71, 119,60, 118,01, 110,85, 108,13, 63,00, 60,78, 52,10, 51,49, 50,69, 45,86, 32,13, 21,55 ppm.

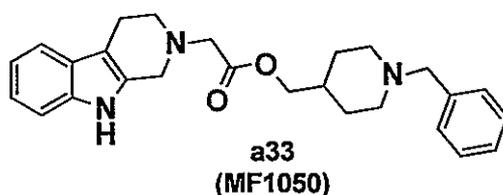
6.1.17. N-((1-propilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1064) (a32)



El compuesto **a2** (335 mg, 1,9 mmol) se disolvió en DMF (2 mL) y se agregó Cs_2CO_3 (1,264 g, 3,88 mmol) a temperatura ambiente con agitación constante. Luego el compuesto **a14** (453 mg, 1,9 mmol) se agregó y la mezcla fue calentada a 80°C con agitación constante por 2 horas. La solución resultante se concentró en un rotavapor a presión reducida y el crudo obtenido se disolvió en DCM (10 mL); se lavó la fase orgánica con agua destilada (3 x 20 mL) y luego se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró la sal y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida. El crudo se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel usando como fase móvil DCM, MeOH y NH_4OH (8,5:1,5:0,1) obteniéndose como producto un sólido (**MF1064 (a32)**, 85 mg, sólido amarillo, 12% rendimiento), p.f. 91-92°C. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,94 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1,19 – 1,27 (m, 1H, CH), 1,55 – 1,66 (m, 2H, CH_2CH_3), 1,67 – 1,74 (m, 4H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,24 (t, $J = 11,2$ Hz, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,57 (t, $J = 10,0$ Hz, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,85 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,96 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,24 (t, $J = 8,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,27 (doblete ancho, 2H,

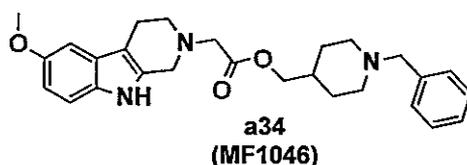
CONHCH₂CH), 3,29 (doblete ancho, 2H, NCH₂CONH), 3,85 (s, 2H, CCH₂N), 7,49 – 7,02 (m, 4H, ArH), 9,02 (s, 1H, CONH).

6.1.18. 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1050) (a33)



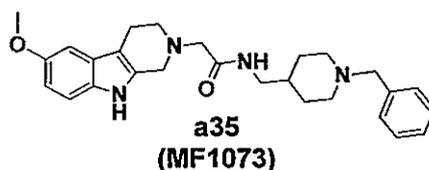
El compuesto **MF050** se obtuvo empleando el procedimiento **6.1.17** usando como reactantes el compuesto **a2** (95 mg, 0,55 mmol) y el compuesto **a21** (155 mg, 0,55 mmol) disueltos en DMF (5 mL) y usando como base Cs₂CO₃ (197 mg, 0,61 mmol) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (**a33**, 104 mg, 0,25 mmol, 45% rendimiento) p.f. 82-84°C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,27 – 1,42 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,66 (m, 1H, CH), 1,67 – 1,71 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,95 (dd, *J*₁ = 11,8 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,83 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 2,90 (t, *J* = 11,8 Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 3,02 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,49 (s, 4H, NCH₂CO, ArCH₂), 3,88 (s, 2H, CCH₂N), 4,02 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, CONHCH₂CH), 7,06 – 7,49 (m, 9H, ArH), 7,79 (s, 1H, NH indol). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 170,81, 138,38, 136,02, 131,18, 129,20, 128,20, 127,23, 127,00, 121,43, 119,38, 117,98, 110,70, 108,12, 69,08, 63,41, 57,94, 53,19, 50,72, 49,67, 35,31, 28,93, 20,92.

6.1.19. 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1046) (**a34**)



El compuesto **MF1046** se sintetizó empleando el procedimiento **6.1.17** usando como reactantes el compuesto **a6** (250 mg, 1,23 mmol) y el compuesto **a21** (346 mg, 1,23 mmol) disueltos en DMF (4 mL) y usando como base Cs₂CO₃ (802 mg, 2,46 mmol) obteniéndose como producto final un sólido de color amarillo (**a34**, 434 mg, 78% rendimiento) p.f. 78-80°C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,28 – 1,41 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,65 – 1,68 (m, 1H, CH), 1,67 – 1,72 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,91 – 2,00 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,80 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 2,90 (t, *J* = 11,5 Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 3,02 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,49 (s, 2H, ArCH₂), 3,50 (s, 2H, NCH₂CONH), 3,85 (s, 5H, CH₃O, CCH₂N), 4,02 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, CONHCH₂CH), 6,81 – 7,34 (m, 8H, ArH), 7,72 (s, 1H, NH indol). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 170,81, 154,00, 138,29, 132,12, 131,09, 129,23, 128,21, 127,65, 127,02, 111,35, 111,04, 107,93, 100,36, 69,05, 63,39, 57,93, 55,92, 53,17, 50,75, 49,77, 35,29, 28,89, 20,96.

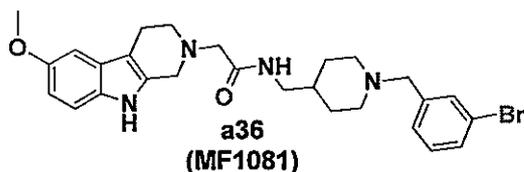
6.1.20. N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1073) (a35)



El compuesto **a25** (533 mg, 1,2 mmol) se disolvió en AcCN (20 mL) y se agregó K_2CO_3 (1,65 g, 12 mmol) sobre la solución. Se agregó una solución de cloruro de bencilo (173 mg, 1,4 mmol) en AcCN (10 mL) sobre la mezcla a temperatura ambiente y con agitación constante. La mezcla resultante fue calentada a 80°C por 6 horas y la solución obtenida se concentró en un rotavapor a presión reducida. El crudo se disolvió con agua destilada (40 mL) y la disolución se lavó con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se colectó y posteriormente se secó con Na_2SO_4 anhidro; se filtró la sal y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida. El sólido resultante se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel y utilizando como fase eluyente DCM y MeOH (9:1) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (**MF1073 (a35)**, 312 mg, 58% rendimiento) p.f. 95-97°C. RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,21 – 1,28 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 1,39 – 1,51 (m, 1H, CH), 1,52 – 1,61 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 1,88 (t, $J = 11,0$ Hz, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 2,74 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 2,83 (m, 4H, CCH_2CH_2N), 3,12 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, $CONHCH_2CH$), 3,18 (s, 2H, NCH_2CONH), 3,42 (s, 2H, ArCH $_2$), 3,66 (s, 2H, CCH_2N), 3,79 (s, 3H, CH $_3$ O), 6,75 (dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H, ArH), 6,87 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, ArH), 7,13 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, ArH), 7,15 – 7,21 (m, 2H, ArH), 7,24 – 7,25 (m, 2H, ArH), 7,33 (m, 1H, ArH), 7,87 (s, 1H, NH indol).

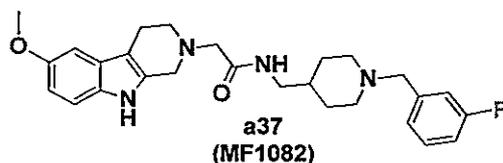
RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 169,39, 153,13, 137,29, 131,03, 130,06, 128,17, 127,15, 126,34, 125,96, 110,43, 106,82, 99,34, 62,30, 59,86, 54,93, 52,27, 50,67, 49,87, 43,40, 35,11, 28,92, 20,62.

6.1.21. N-((1-(3-bromobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1081) (a36)



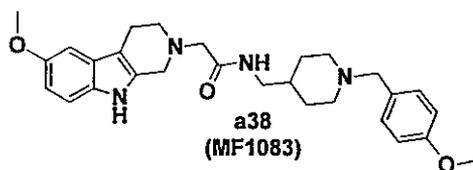
El compuesto **MF1081** se obtuvo empleando el procedimiento **6.1.20** usando como reactivos de partida el compuesto **a25** (208 mg, 0,48 mmol), bromuro de 3-bromobencilo (120 mg, 0,48 mmol) y K₂CO₃ (337 mg, 2,4 mmol) en AcCN (5 mL) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (**MF1081 (a36)**, 177 mg, 70% rendimiento) p.f. 94-96°C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,27 – 1,33 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,48 – 1,55 (m, 1H, CH), 1,61 – 1,67 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,94 (t, *J* = 11,0 Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,80 – 2,86 (m, 4H, CCH₂CH₂N), 2,91 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 3,19 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, CONHCH₂CH), 3,25 (s, 2H, NCH₂CONH), 3,44 (s, 2H, ArCH₂), 3,74 (s, 2H, CCH₂N), 3,85 (s, 3H, CH₃O), 6,81 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H, ArH), 6,94 (s, 1H, ArH), 7,15 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, ArH), 7,18 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, ArH), 7,21 (s, 1H, ArH), 7,34 – 7,41 (m, 1H, ArH), 7,47 (s, 1H, ArH), 7,84 (s, 1H, NH indol). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 169,40, 153,16, 130,87, 129,03, 128,72, 126,58, 121,37, 110,45, 106,90, 99,37, 61,58, 59,86, 54,93, 52,27, 49,88, 43,38, 35,05, 28,93, 20,63.

6.1.22. N-((1-(3-fluorobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1082) (a37)



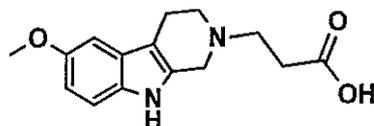
El compuesto **MF1082** se sintetizó empleando el procedimiento **6.1.20** usando como reactivos de partida el compuesto **a25** (200 mg, 0,47 mmol), bromuro de 3-fluorobencilo (88 mg, 0,47 mmol) y K_2CO_3 (337 mg, 2,4 mmol) en AcCN (5 mL) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (180 mg, 80% rendimiento) p.f. 97-98°C. RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,27 – 1,35 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 1,45 – 1,56 (m, 1H, CH), 1,60 – 1,68 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 1,95 (t, $J = 11,1$ Hz, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 2,83 (m, 4H, CCH_2CH_2N), 2,91 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 3,19 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, $CONHCH_2CH$), 3,25 (s, 2H, NCH_2CONH), 3,46 (s, 2H, $ArCH_2$), 3,73 (s, 2H, CCH_2N), 3,85 (s, 3H, CH_3O), 6,79 – 6,83 (m, 1H, ArH), 6,94 (s, 1H, ArH), 7,06 (m, 2H, ArH), 7,17 – 7,25 (m, 2H, ArH), 7,40 (m, 1H, ArH), 7,90 (s, 1H, NH indol). RMN- ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169,42, 153,15, 131,00, 130,06, 128,53, 123,45, 114,75, 114,54, 112,88, 112,62, 110,44, 106,85, 99,34, 61,65, 59,86, 54,92, 52,28, 50,67, 49,88, 43,37, 35,05, 28,93, 20,63.

6.1.23. N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1083) (a38)

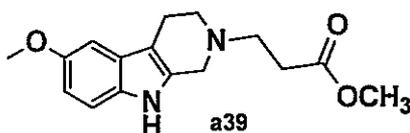


El compuesto **MF1083** se sintetizó empleando el procedimiento **6.1.20** usando como reactivos de partida el compuesto **a25** (266 mg, 0,62 mmol), cloruro de 4-metoxibencilo (106 mg, 0,62 mmol) y K_2CO_3 (428 mg, 3,1 mmol) en AcCN (8 mL) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (205 mg, 69% rendimiento) p.f. 91-92°C. RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,21 – 1,24 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 1,56 – 1,64 (m, 1H, CH), 1,64 – 1,71 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 1,74 (m, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 2,79 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H, $CHCH_2CH_2N$), 2,90 (m, 4H, CH_2), 3,20 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, $CONHCH_2CH$), 3,23 (s, 2H, NCH_2CONH), 3,69 (s, 2H, $ArCH_2$), 3,78 (s, 3H, CH_3O -bencilo), 3,81 (s, 2H, CCH_2N), 3,82 (s, 3H, CH_3O -indol), 6,77 (dd, $J_1 = 8,6$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H, ArH), 6,84 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, ArH), 6,90 (s, 1H, ArH), 7,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, ArH), 7,31 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, ArH), 7,43 (m, 1H, ArH), 8,13 (s, 1H, NH indol). RMN- ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169,62, 159,94, 152,83, 130,92, 130,92, 129,96, 127,91, 127,30, 126,03, 112,71, 110,63, 110,37, 106,69, 99,29, 59,88, 54,93, 54,33, 50,82, 49,96, 42,84, 35,63, 29,12, 20,87.

6.1.24. Síntesis de ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) propanoico (a40)

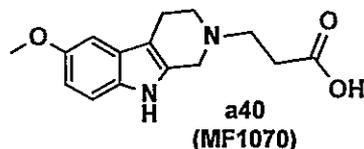


6.1.24.1. 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)propionato de metilo (a39)



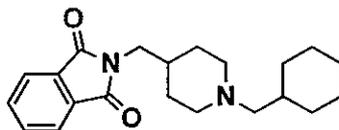
El compuesto **a6** (400 mg, 1,97 mmol) se disolvió en una mezcla de DCM y MeOH (8 mL y 1 mL, respectivamente) a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente la solución se enfrió a 0°C. Por otro lado, el acrilato de metilo (170 mg, 1,97 mmol) se disolvió en DCM (5 mL) y se enfrió a 0°C. La solución del compuesto **a6** se agregó, gota a gota, sobre la solución de acrilato de metilo. Terminada la adición, la mezcla fue calentada a temperatura ambiente y se agitó por 2 horas. Luego el solvente se evaporó en un rotavapor a presión reducida obteniéndose un líquido de color amarillo como producto (**a39**, 539 mg, 1,87 mmol, 95% rendimiento). RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,54 (t, *J* = 12,0 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 2,75 (dd, *J*₁ = 11,2 Hz, *J*₂ = 3,1 Hz, 4H, CCH₂CH₂N), 3,55 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,74 (s, 3H, CH₃O-indol), 3,81 (t, *J* = 12,0 Hz, 2H, CH₂CH₂CO), 4,46 (s, 2H, CCH₂N), 6,70 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, ArH), 6,91 (s, 1H, ArH), 7,20 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, ArH), 10,78 (s, 1H, NH indol).

6.1.26.1. **Ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)propanoico (a40)**

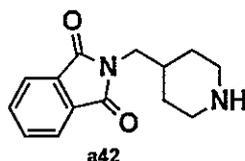


El compuesto **a39** (250 mg, 0,86 mmol) se disolvió en una mezcla de THF (8 mL), MeOH (4 mL) y agua destilada (4 mL) a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se agregó LiOH hidrato (188 mg, 4,33mol) y se calentó la mezcla a reflujo por 3 horas. La solución resultante se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó el solvente en un rotavapor a presión reducida. La suspensión obtenida se acidificó con HCl 3N hasta obtener una mezcla con un pH igual 3. Se agregaron 5 mL de éter etílico sobre la suspensión y la mezcla se agitó vigorosamente. El sólido formado se filtró y se lavó con 5 mL de agua destilada obteniéndose un sólido de color blanco como producto (**a40**, 236 mg, 99% rendimiento). p.f. 187-189°C. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,92 – 3,04 (m, 4H, CCH₂CH₂N), 3,46 – 3,55 (m, 4H, CH₂H₂CO₂H), 3,76 (s, 3H, CH₃O), 4,45 (s, 2H, CCH₂N), 6,75 (dd, *J*₁ = 8,8 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H, ArH), 6,97 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, ArH), 7,26 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, ArH), 10,97 (s, 1H, NH indol). RMN-¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,06, 153,84, 131,77, 127,17, 126,51, 112,54, 105,47, 100,49, 55,81, 51,09, 50,26, 48,76, 29,34, 18,71.

6.1.25. Síntesis de 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil) isoindolin-1,3-diona (MF1056) (a43)

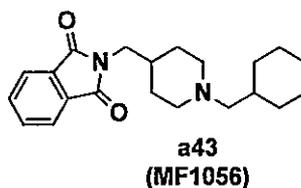


6.1.25.1. 2-((piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (a42)¹⁰⁹



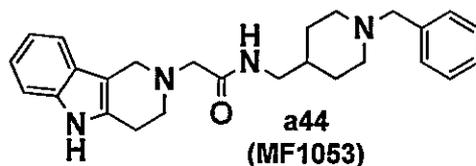
En una reacción libre de solvente los reactivos 4-(metilamino)piperidina (3,9 g, 26,3 mmol) y anhídrido ftálico (*a41*, 3,0 g, 26,3 mmol) fueron calentados y fundidos a 170°C y se permitió que reaccionaran por 1 hora. La pasta anaranjada resultante se enfrió y se agregaron 100 mL de una solución alcohólica de HCl 1M en EtOH y se calentó a reflujo hasta que el sólido se disolvió completamente. Posteriormente la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el sólido obtenido se colectó por filtración y se recristalizó desde una mezcla metanol/2-butanona (1:1) obteniéndose como producto un sólido de color blanco (*a42*, 3,2 g, 50% rendimiento) p.f. 234-237°C, RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,40 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 1,77 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 1,96 (m, 1H, CH), 2,78 (t, *J* = 11,9 Hz, 4H, CH₂NHCH₂), 3,48 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, NCH₂CH), 7,87 (m, 4H, ArH).

6.1.25.2. 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona
(MF1056) (a43)



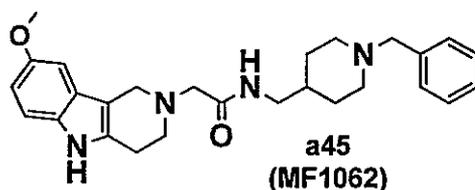
El compuesto **a42** (500 mg, 2,04 mmol) y el (bromometil)ciclohexano (362 mg, 2,04 mmol) se disolvieron en MeOH (100 mL) y se adicionó K_2CO_3 (509 mg, 3,68 mmol) con agitación constante. La mezcla fue calentada a reflujo por 2 horas y luego se enfrió temperatura ambiente; el solvente de la reacción se evaporó en un rotavapor a presión reducida y el crudo se disolvió en DCM (10 mL) y se lavó con agua destilada (20 mL). La fase orgánica se colectó y se secó con $MgSO_4$ anhidro, se filtró la sal y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida obteniéndose como producto un sólido de color blanco (MF1056, **a43**, 408 mg, 59% rendimiento) p.f. 169-171°C. RMN- 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0,76 – 0,91 (m, 2H, CH_2CHCH_2 -piperidina), 1,10 – 1,30 (m, 3H, $CHCH_2CH_2N$ (piperidina), CH-piperidina), 1,28 – 1,51 (m, 3H, $CHCH_2CH_2N$, CH-ciclohexil), 1,56 – 1,86 (m, 10H, ciclohexil), 2,07 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 2,83 (d, $J = 11,6$ Hz, 2H, piperidin- NCH_2CH), 3,59 (d, $J = 11,6$ Hz, 2H, indolin- NCH_2CH), 7,74 – 7,81 (m, 4H, ArH). RMN- ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 168,65, 133,90, 132,06, 123,21, 65,91, 53,80, 43,43, 35,62, 35,28, 32,01, 30,02, 26,82, 26,18.

6.1.26. N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetamida (MF1053) (a44)



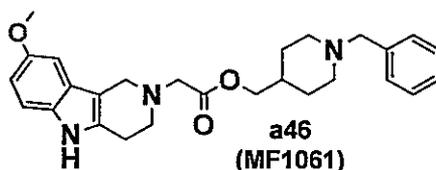
El compuesto *MF1053* se sintetizó empleando el procedimiento *6.1.19* usando como reactantes el compuesto *a27* (146 mg, 0,52 mmol) y el compuesto *a17* (89,5 mg, 0,52 mmol) disueltos en DMF (3 mL) usando como base Cs_2CO_3 (203,3 mg, 0,62 mmol) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (*MF1053* (*a44*) 100 mg, 46% rendimiento) p.f. 86-88°C RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,22 – 1,35 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,45 – 1,58 (m, 1H, CH), 1,63 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,93 (t, $J = 10,5$ Hz, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,87 (m, 4H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,93 (t, $J = 10,5$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,18 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CONHCH_2CH), 3,28 (s, 2H, NCH_2CONH), 3,47 (s, 2H, ArCH_2), 3,80 (s, 2H, CCH_2N), 7,06 – 7,17 (m, 2H, ArH), 7,22 – 7,29 (m, 5H, ArH), 7,35 – 7,46 (m, 2H, ArH), 7,99 (s, 1H, NH indol). RMN- ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 170,63, 138,45, 135,95, 131,48, 129,19, 128,17, 126,95, 125,79, 121,59, 119,64, 117,54, 110,73, 108,41, 63,36, 61,15, 53,31, 51,04, 50,24, 44,50, 36,15, 30,03, 23,97.

6.1.27. N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetamida (MF1062) (a45)



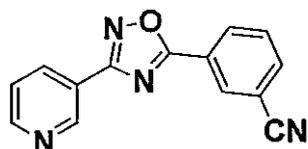
El compuesto **MF1062** se sintetizó empleando el procedimiento **6.1.19** usando como reactantes el compuesto **a29** (127 mg, 0,45 mmol) y el compuesto **a17** (77,8 mg, 0,45 mmol) disueltos en DMF (3 mL) usando como base Cs_2CO_3 (162 mg, 0,5 mmol). El crudo obtenido se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel (fase móvil: DCM:MeOH / 8:2) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (**MF1062** (**a45**), 85 mg, 42% rendimiento) p.f. 81-82°C, RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,25 – 1,34 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,45 – 1,58 (m, 1H, CH), 1,63 – 1,67 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,93 (dd, $J_1 = 11,6$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,84 – 2,90 (m, 4H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,93 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,18 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, CONHCH_2CH), 3,28 (s, 2H, NCH_2CONH), 3,47 (s, 2H, ArCH_2), 3,77 (s, 2H, CCH_2N), 3,83 (s, 3H, CH_3O), 6,77 – 6,84 (m, 2H, ArH), 7,17 – 7,25 (m, 2H, ArH), 7,27 – 7,32 (m, 3H, ArH), 7,41 (m, 1H, ArH), 7,80 (s, 1H, NH indol). RMN- ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 170,58, 154,15, 138,48, 132,32, 130,97, 129,16, 128,16, 126,94, 126,18, 111,39, 111,27, 108,32, 99,88, 63,36, 61,20, 55,91, 53,32, 51,05, 50,29, 44,50, 36,15, 30,05, 24,10.

6.1.28. 2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (MF1061) (a46)

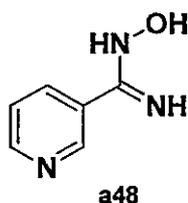


El compuesto **MF1061** se sintetizó empleando el procedimiento **6.1.19** usando como reactantes el compuesto **a29** (205 mg, 0,73 mmol) y el compuesto **a17** (147 mg, 0,73 mmol) disueltos en DMF (3 mL) usando como base Cs₂CO₃ (260 mg, 0,8 mmol). El crudo obtenido se purificó en una columna cromatográfica con sílica gel (fase móvil: DCM:MeOH/ 8:2) obteniéndose como producto un sólido de color amarillo (**MF1061** (**a46**), 134 mg, 41% rendimiento), p.f. 80-81°C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,28 – 1,41 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,60 – 1,65 (m, 1H, CH), 1,67 – 1,72 (m, 2H, CHCH₂CH₂N), 1,96 (dd, *J*₁ = 11,8 Hz, *J*₂ = 2,0 Hz, 2H, CHCH₂CH₂N), 2,88 (m, 4H, CCH₂CH₂N, CHCH₂CH₂N), 3,03 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H, CCH₂CH₂N), 3,49 (s, 2H, NCH₂CO₂), 3,53 (s, 2H, ArCH₂), 3,83 (s, 3H, CH₃O), 3,86 (s, 2H, CCH₂N), 4,03 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH), 6,77 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,5 Hz, 1H, ArH), 6,83 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, ArH), 7,17 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, ArH), 7,22 – 7,26 (m, 1H, ArH), 7,28 – 7,33 (m, 4H, ArH), 7,69 (s, 1H, NH indol). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 170,91, 153,96, 138,46, 132,52, 131,02, 129,17, 128,19, 126,97, 126,52, 111,20, 110,87, 108,26, 100,01, 69,08, 63,42, 58,47, 55,88, 53,21, 50,16, 49,23, 35,33, 28,98, 23,67.

6.1.29. Síntesis de 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) benzonitrilo (NS9283) (a51)

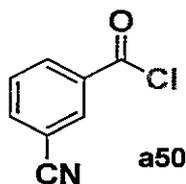


6.1.29.1. N'-hidroxinicotinimidamida (a48)



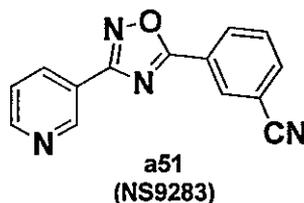
El clorhidrato de hidroxilamina (5,0 g 72,1 mmol) se disolvió en agua destilada (55 mL) y luego se agregó NaHCO_3 (8,8 g 105,7 mmol) a la mezcla con agitación constante. La solución resultante se agitó por 15 minutos en un rango de temperatura entre 25°C y 30°C. Posteriormente se agregó 3-cianopiridina (**a47**, 5,0 g, 48 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 85°C por 4 horas. Luego, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 50 mL de una solución acuosa saturada de NaCl y se extrajeron los compuestos orgánicos empleando AcOEt (4 x 50 mL). La fase orgánica se colectó y se secó con Na_2SO_4 anhidro. La sal se filtró y el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida obteniéndose un sólido blanco como producto (**a48**, 6,0 g, 43 mmol, 91% rendimiento). p.f. 81-82°C. RMN- ^1H (400 MHz, D_2O) δ 7,53 (dd, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 4,9$ Hz, 1H, ArH), 8,05 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, ArH), 8,61 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, ArH), 8,73 (s, 1H, ArH).

6.1.29.2. Cloruro de 3-cianobenzoilo (**a50**)



El ácido 3-cianobenzoico (**a49**, 1,5 g, 10,2 mmol) fue puesto en suspensión en DCM (40 mL) y posteriormente se agregó cloruro de oxalilo (1,5 mL 17,1 mmol) y DMF (1 mL). La solución fue calentada a reflujo por 2 horas. La mezcla resultante se concentró en un rotavapor a presión reducida obteniéndose un aceite anaranjado (**a50**) que se utilizó inmediatamente en el siguiente paso de reacción.

6.1.29.3. 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)benzonitrilo (NS9283) (**a51**)



El compuesto **a50** (662 mg, 4,0 mmol) se disolvió en piridina (20 mL) y se agregó el compuesto **a48** (549 mg, 4,0 mmol) a la solución. La mezcla de reacción fue calentada a reflujo por 4 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. La solución resultante se vertió en 500 mL de agua destilada y el sólido formado se filtró y se lavó con agua destilada fría. El compuesto se secó obteniéndose como producto un sólido de color blanco (NS9283 (**a51**), 598 mg, 60,2% rendimiento). p.f. 185-186°C RMN-¹H (400 MHz,

DMSO-d₆ δ 7,64 – 7,68 (m, 1H, ArH), 7,86 – 7,92 (m, 1H, ArH), 8,20 – 8,24 (m, 1H, ArH), 8,43 – 8,47 (m, 1H, ArH), 8,48 – 8,52 (m, 1H, ArH), 8,63 (m, 1H, ArH, py), 8,83 (m, 1H, ArH, py), 9,26 (m, 1H, ArH, py). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 179,45, 171,93, 157,87, 153,12, 142,01, 140,03, 137,66, 136,72, 136,17, 129,62, 127,40, 122,86, 118,08.

7. REFERENCIAS

1. McCormick, D. a, Wang, Z. & Huguenard, J. 1993. Neurotransmitter control of neocortical neuronal activity and excitability. *Cereb. cortex* 3, 387–398
2. Lauder, J. M. 1993. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.* 16, 233–240
3. Richerson, G. B. & Wu, Y. 2003. Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J. Neurophysiol.* 90, 1363–1374
4. Meldrum, B. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 8, 1007–1015
5. Decavel, C. & Van den Pol, a N. 1990. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 302, 1019–1037
6. Blokland, A. 1995. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res. Rev.* 21, 285–300
7. Sarkar, C., Basu, B., Chakroborty, D., Dasgupta, P. S. & Basu, S. 2010. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav. Immunity* 24, 525–528
8. Berecek, K. H. & Brody, M. J. 1982. Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla. *Am. J. Physiol.* 242, 593–601
9. van Kammen, D. P. 1987. 5-HT, a neurotransmitter for all seasons? *Biol. Psychiatry* 22, 1–3
10. Hernandez, M. S. & Troncone, L. R. P. 2009. Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *J. Neural Transm.* 116, 1551–1560
11. Nicoll, R. 1988. The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science (80-.)*. 241, 545–551
12. Rasmusson, D. D. 2000. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav. Brain Res.* 115, 205–218
13. Protais, P., Dubuc, I. & Costentin, J. 1983. Pharmacological characteristics of dopamine receptors involved in the dual effect of dopamine agonists on yawning behaviour in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 94, 271–280
14. Lule, D., Ludolph, A.C. Ludolph, A.G. 2008. Neurodevelopmental and neurodegenerative diseases - is there a pathophysiological link? Attention-deficit/hyperactivity disorder and amyotrophic lateral sclerosis as examples. *Med. Hypotheses* 70, 1133–1138
15. Thase, M. E. & Denko, T. 2008. Pharmacotherapy of mood disorders. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 4, 53–91

16. Benes, F. M. 2001. Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 46–47
17. Goodall, M. & Alton, H. 1969. Dopamine (3-hydroxytyramine) metabolism in parkinsonism. *J. Clin. Invest.* 48, 2300–2308
18. Nieoullon, A. 2002. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog. Neurobiol.* 67, 53–83
19. Goetz, C. G. 1997. New strategies with dopaminergic drugs: modified formulations of levodopa and novel agonists. *Exp. Neurol.* 144, 17–20
20. Youdim, M. B. H. & Bakhle, Y. S. 2006. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br. J. Pharmacol.* 147, 287–296
21. McGleenon, B., Dyan, K. & Passmore, A. 1999. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48, 471–480
22. Buckingham, S., Jones, A., Brown, L. & Sattelle, D. 2009. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol. Rev.* 61, 39–61
23. Bartus, R. T. 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163, 495–529
24. Kalivas, P. W. 1993. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res. Rev.* 18, 75–113
25. Edmondson, D., Binda, C. & Mattevi, A. 2007. Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Arch. Biochem.* 464, 269–276
26. Sulzer, D. 2005. The complex regulation of dopamine output: A review of current themes. *Clin. Neurosci. Res.* 5, 117–121
27. Südhof, T. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein protein interactions. *Nature* 375, 645–653
28. Raiteri, M., Marchi, M. & Maura, G. 1982. Presynaptic muscarinic receptors increase striatal dopamine release evoked by "quasi-physiological" depolarization. *Eur. J. Pharmacol.* 83, 127–129
29. Seeman, P. & Lee, T. 1975. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science.* 188, 1217–1219
30. Cragg, S. J. & Greenfield, S. a. 1997. Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J. Neurosci.* 17, 5738–5746

31. Cardozo, D. L. & Bean, B. P. 1995. Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. *Voltage-Dependent Calcium Channels in Rat Midbrain Dopamine Neurons: Modulation by Dopamine and GABA, Receptors. J. Neurophysiol.* 74, 1137–1148
32. Dajas-Bailador, F. a, Heimala, K. & Wonnacott, S. 2003. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine is transduced into cellular responses in neurons: Ca²⁺ signals and neurotransmitter release. *Mol. Pharmacol.* 64, 1217–26
33. Macintosh, F. 1941. The distribution of acetylcholine in the peripheral and the central nervous system. *J. Physiol.* 99, 436–442
34. Mogenson, G., Jones, D. & Yim, C. 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.* 14, 69–97
35. Birks, R. & Macintosh, F. 1961. Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39, 787-845
36. Chiappinelli, V. & Giacobini, E. 1976. Induction of cholinergic enzymes in chick ciliary ganglion and iris muscle cells during synapse formation. *J. Physiol.* 257, 749–766
37. Paton, W. 1963. Cholinergic transmission and acetylcholine output. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 2637–2653
38. Kandel, E. R. (McGraw-Hill, 2001). *Principios de Neurociencias.*
39. Frazier, C. J., Buhler, a V, Weiner, J. L. & Dunwiddie, T. V. 1998. Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 18, 8228–8235
40. Mcgehee, D. S., Heath, M. J. S., Gelber, S., Devay, P. & Role, L. W. 1995. Nicotine Enhancement of Fast Excitatory Synaptic Transmission in CNS by Presynaptic Receptors Published by: American Association for the Advancement of Science. *Science.* 269, 1692–1696
41. Guyton, A. C. & Hall, J. E. (Mc Graw Hill., 2001). *Tratado de Fisiología Médica.*
42. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, y colaboradores, editors. *Neuroscience.* 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>
43. Nachmansohn, D. & Wilson, I. B. 1951. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 12, 259–339
44. Francis, P. T., Palmer, a. M., Snape, M. & Wilcock, G. K. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 137–147

45. Ladner, C. J. & Lee, J. M. 1998. Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: the cholinergic hypothesis revisited. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 719–731
46. Scarpini, E., Scheltens, P. & Feldman, H. 2003. Review Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* 2, 539–547
47. Krall, W. J., Sramek, J. J. & Cutler, N. R. 1999. Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer disease. *Ann. Pharmacother.* 33, 441–450
48. Nordberg, A. 1993. Effect of long-term treatment with tacrine (THA) in Alzheimer's disease as visualized by PET. *Acta Neurol. Scand.* 88, 62–65
49. Nordberg, A. & Svensson, A. 1998. Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease A Comparison of Tolerability and Pharmacology. *Drug Saf.* 19, 465–480
50. Kryger, G., Silman, I. & Sussman, J. L. 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* 7, 297–307
51. Villalobos, A. y colaboradores 1994. Novel benzisoxazole derivatives as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* 37, 2721–2734
52. Villalobos, A. y colaboradores 1995. 5,7-Dihydro-3-[2-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]ethyl]-6H-pyrrolo[3,2-f]-1,2-benzisoxazol-6-one: A Potent and Centrally-Selective Inhibitor of Acetylcholinesterase with an Improved Margin of Safety. *J. Med. Chem.* 38, 2802–2808
53. Andreani, A. y colaboradores 2001. Synthesis and Screening for Antiacetylcholinesterase Activity of (1-Benzyl-4-oxopiperidin-3-ylidene)methylindoles and pyrroles Related to Donepezil. *J. Med. Chem.* 44, 4011–4014
54. Martinez, A., Fernandez, E., Castro, A., Conde, S. & Rodriguez-franco, I. 2000. Original article N-Benzylpiperidine derivatives of 1,2,4-thiadiazolidinone as new acetylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 35, 913–922
55. Vidaluc, J. L. y colaboradores 1994. Novel [2-(4-piperidinyl)ethyl](thio)ureas: synthesis and antiacetylcholinesterase activity. *J. Med. Chem.* 37, 689–695
56. Shao, D., Zou, C., Luo, C., Tang, X. & Li, Y. 2004. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4639–4642
57. Contreras, J. M., Rival, Y. M., Chayer, S., Bourguignon, J. J. & Wermuth, C. G. 1999. Aminopyridazines as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 42, 730–741
58. Contreras, J. M., Parrot, I., Sippl, W., Rival, Y. M. & Wermuth, C. G. 2001. Design,

- synthesis, and structure-activity relationships of a series of 3-[2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethylamino]pyridazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 44, 2707–2718
59. Sippl, W., Contreras, J. M., Parrot, I., Rival, Y. M. & Wermuth, C. G. 2001. Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 15, 395–410
 60. Otto, R. y colaboradores 2014. Beta and gamma carboline derivatives as potential anti-Alzheimer agents: A comparison. *Eur. J. Med. Chem.* 87, 63–70
 61. Schröder, H., Zilles, K., Luiten, P. G., Strosberg, a D. & Aghchi, A. 1989. Human cortical neurons contain both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors: an immunocytochemical double-labeling study. *Synapse* 4, 319–326
 62. Gotti, C. & Clementi, F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* 74, 363–296
 63. Karlin, A. 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 102–114
 64. Le Novère, N., Corringer, P.-J. & Changeux, J.-P. 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* 53, 447–456
 65. Edmonds, B., Gibb, A. & Colquhoun, D. 1995. Mechanisms of activation of muscle nicotinic acetylcholine receptors and the time course of endplate currents. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 469–493
 66. Brejc, K. y colaboradores 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269–276
 67. Lippiello, P. M. 1989. Properties of putative nicotine receptors identified on cultured cortical neurons. *Prog. Brain Res.* 79, 129–135
 68. Wonnacott, S. 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20, 92–98
 69. Fucile, S. 2004. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8
 70. Dajas-Bailador, F. & Wonnacott, S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 317–324
 71. Guan, Z.-Z., Zhang, X., Ravid, R. & Nordberg, A. 2001. Decreased Protein Levels of Nicotinic Receptor Subunits in the Hippocampus and Temporal Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* 74, 237–243
 72. Nashmi, R. y colaboradores 2003. Assembly of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits:

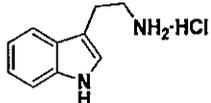
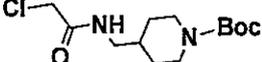
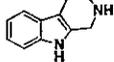
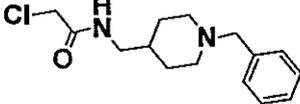
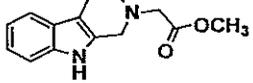
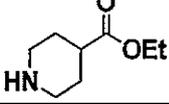
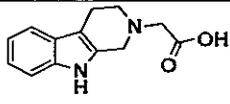
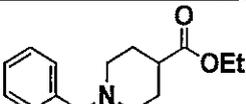
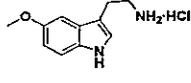
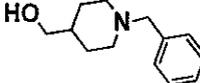
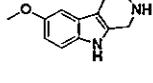
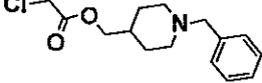
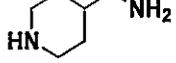
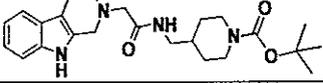
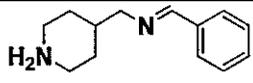
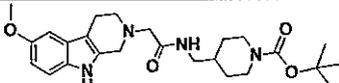
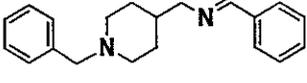
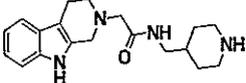
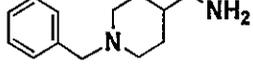
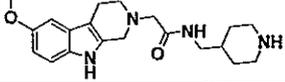
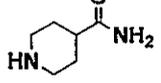
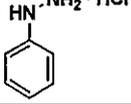
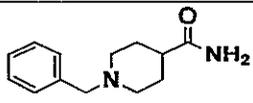
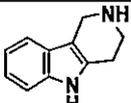
- effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J. Neurosci.* 23, 11554–11567
73. Levin, E. D. & Simon, B. B. 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)*. 138, 217–230
 74. Paterson, D. & Nordberg, A. 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 61, 75–111
 75. Abin-Carriquiry, J. A. y colaboradores 2006. C3-halogenation of cytosine generates potent and efficacious nicotinic receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 536, 1–11
 76. Maelicke, A., Schratzenholz, A. & Schröder, H. 1995. Modulatory control by non-competitive agonists of nicotinic cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *Semin. Neurosci.* 7, 103–114
 77. Eadie, G. 1942. Inhibition of cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 214, 540–555
 78. Pereira, E. y colaboradores 1994. Physostigmine Receptors and Galanthamine : Expressed Probes for a Novel Binding Site on the $\alpha 4\beta 2$ Subtype Stably of Neuronal Nicotinic Acetylcholine in Fibroblast. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 768–778
 79. Storch, A. y colaboradores 1995. Physostigmine, galanthamine and codeine act as “noncompetitive nicotinic receptor agonists” on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 290, 207–219
 80. Schratzenholz, A. y colaboradores 1996. Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* 49, 1–6
 81. Dilger, J., Brett, R. & Lesko, L. 1992. Effects of isoflurane on acetylcholine receptor channels. 1. Single-channel currents. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* 41, 127–133
 82. Spitzmaul, G. F., Esandi, M. C. & Bouzat, C. 1999. Amphetamine acts as a channel blocker of the acetylcholine receptor. *Neuroreport* 10, 2175–2181
 83. Bourin, M., Ripoll, N. & Dailly, E. 2003. Nicotinic receptors and Alzheimer's disease. *Curr. Med. Res. Opin.* 19, 169–177
 84. Maelicke, A. & Albuquerque, E. 2000. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 165–170
 85. Henderson, B. y colaboradores 2010. Negative Allosteric Modulators That Target Human $\alpha 4\beta 2$ Neuronal Nicotinic Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 761–774
 86. Pavlovicz, R. y colaboradores 2011. Identification of a negative allosteric site on

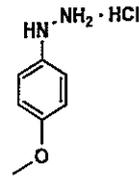
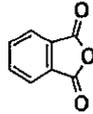
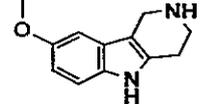
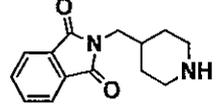
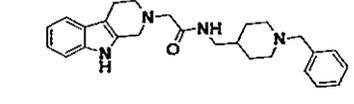
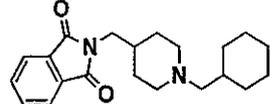
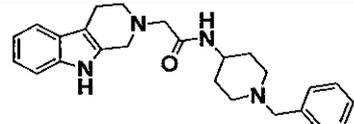
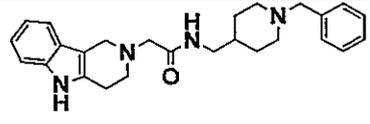
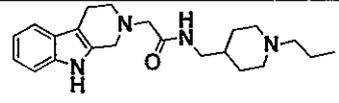
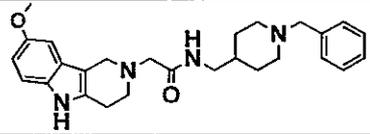
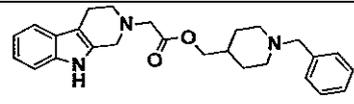
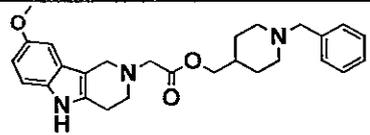
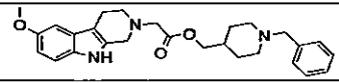
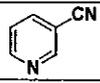
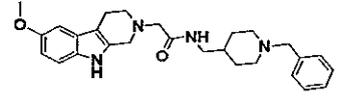
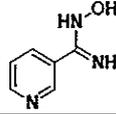
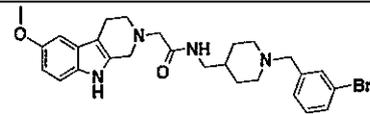
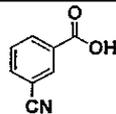
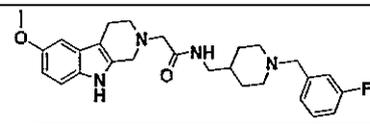
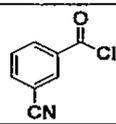
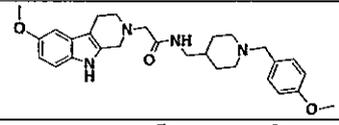
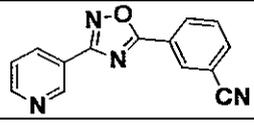
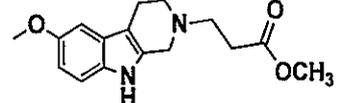
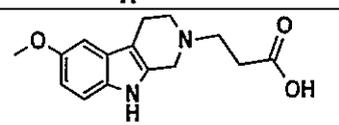
- human $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* 6, 24949
87. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95
 88. Moroni M, Zwart R, Sher E, Cassels BK, B. I. 2006. Alpha4 Beta2 Nicotinic Receptors With High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity To Long-Term Exposure To Nicotine. *Mol Pharmacol.* 70, 755–768
 89. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926–935
 90. Phillips, J. C. y colaboradores 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802
 91. Melo, F., Devos, D., Depiereux, E. & Feytmans, E. 1997. ANOLEA: a www server to assess protein structures. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 5, 187–190
 92. Laskowski, R. a., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291
 93. Morris, G. M. y colaboradores 1998. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662
 94. Pictet, A. & Spengler, T. 1911. über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyläthylamin, Phenylalanin und Tyrosin. *Gerichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* 44, 2030–2036
 95. Beng T. Ho and K. E. Walker. 1971. 1,2,3,4-Tetrahydro-Beta-Carboline. *Org. Synth.* 51, 136
 96. König, W. & Geiger, R. 1970. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* 103, 788–798
 97. Kim, B. R. y colaboradores 2012. Tert-butoxide-assisted amidation of esters under green conditions. *Synthesis (Stuttg).* 44, 42–50
 98. Mark S. Tichenor. (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, 2007). Total Synthesis of Yatakemycin: Structure revision, Analogue Studies, and Biological Properties.
 99. Stephen, H. 2008. Gamma Secretase Modulators. WO2009075874

100. Lerner, A. B., Lee, T. E. H. H., Sheehan, J. C. & Hess, G. P. 1955. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1067–1068
101. Kádas, I., Szántó, G., László, T., Simon, A. & Tóth, G. 2007. Stereochemistry of 1,3-Dipolar-cycloaddition of 3,4-dihydro-isoquinoline and 3,4-dihydro-carboline-N-methoxycarbonyl- and N-phenacyl-methylides with maleic and fumaric nitrile. *J. Heterocycl. Chem.* 44, 1373–1381
102. Bridoux, A., Goossens, L., Houssin, R. and Héanichart, J.-P. (2006), Synthesis of 8-substituted tetrahydro- γ -carbolines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 43, 571–578
103. Yedukondalu, M., Sridhar, R., Luther, B. J. & Rao, M. V. B. 2014. Synthesis of Tetrahydro Carbazoles And Tetrahydro- γ -Carbolines Catalyzed By PEG-400 As Recyclable Reaction Medium. *J. Appl. Chem.* 3, 1295–1305
104. Bertrand, S. y colaboradores 2005. A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization. *J. Neurosci.* 25, 4396–4405
105. Guzior, N. y colaboradores 2015. Bioorganic & Medicinal Chemistry Isoindoline-1,3-dione derivatives targeting cholinesterases : Design, synthesis and biological evaluation of potential anti-Alzheimer's agents. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 1–9
106. Diouf, O., Depreux, P., Chavatte, P. & Henri, J. 2000. Preliminary communication Synthesis and preliminary pharmacological results on new naphthalene derivatives as 5-HT 4 receptor ligands. *Synthesis (Stuttg).* 35, 24–26
107. Shidore, M. y colaboradores 2016. Benzylpiperidine-Linked Diarylthiazoles as Potential Anti-Alzheimer's Agents: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* 59, 5823–5846
108. Luo, Z. y colaboradores 2013. Synthesis and evaluation of multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and ebselen. *J. Med. Chem.* 56, 9089–9099
109. Yoneda, Y. y colaboradores 2001. Synthesis of polyamine derivatives having non-hypotensive Ca^{2+} permeable AMPA receptor antagonist activity. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 1261–1264.

ANEXO II

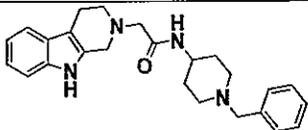
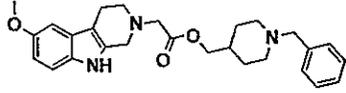
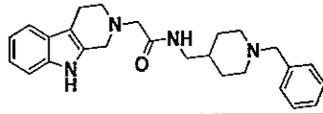
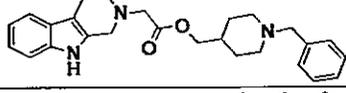
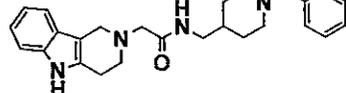
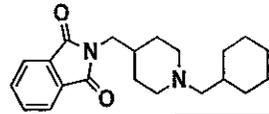
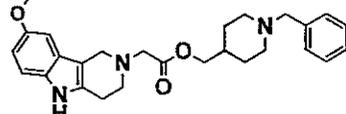
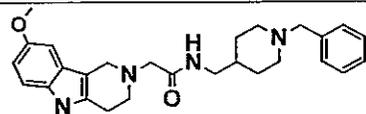
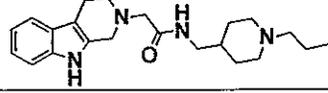
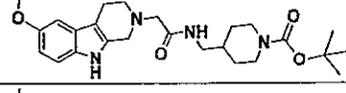
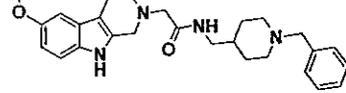
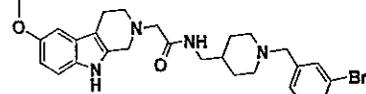
Moléculas involucradas en esta tesis

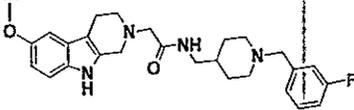
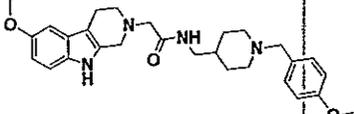
Molécula	Nombre abreviado	Molécula	Nombre abreviado
	a1		a16
	a2		a17
	a3		a18
	a4		a19
	a5		a20
	a6		a21
	a7		a22
	a8		a23 (MF1066)
	a9		a24
	a10		a25
	a11		a26
	a12		a27
	a13		

	a28		a41
	a29		a42
	a30 (MF1047)		a43 (MF1056)
	a31 (MF1042)		a44 (MF1053)
	a32 (MF1064)		a45 (MF1062)
	a33 (MF1050)		a46 (MF1061)
	a34 (MF1046)		a47
	a35 (MF1073)		a48
	a36 (MF1081)		a49
	a37 (MF1082)		a50
	a38 (MF1083)		a51
	a39		
	a40		

Moléculas evaluadas como inhibidores de acetilcolinesterasa.

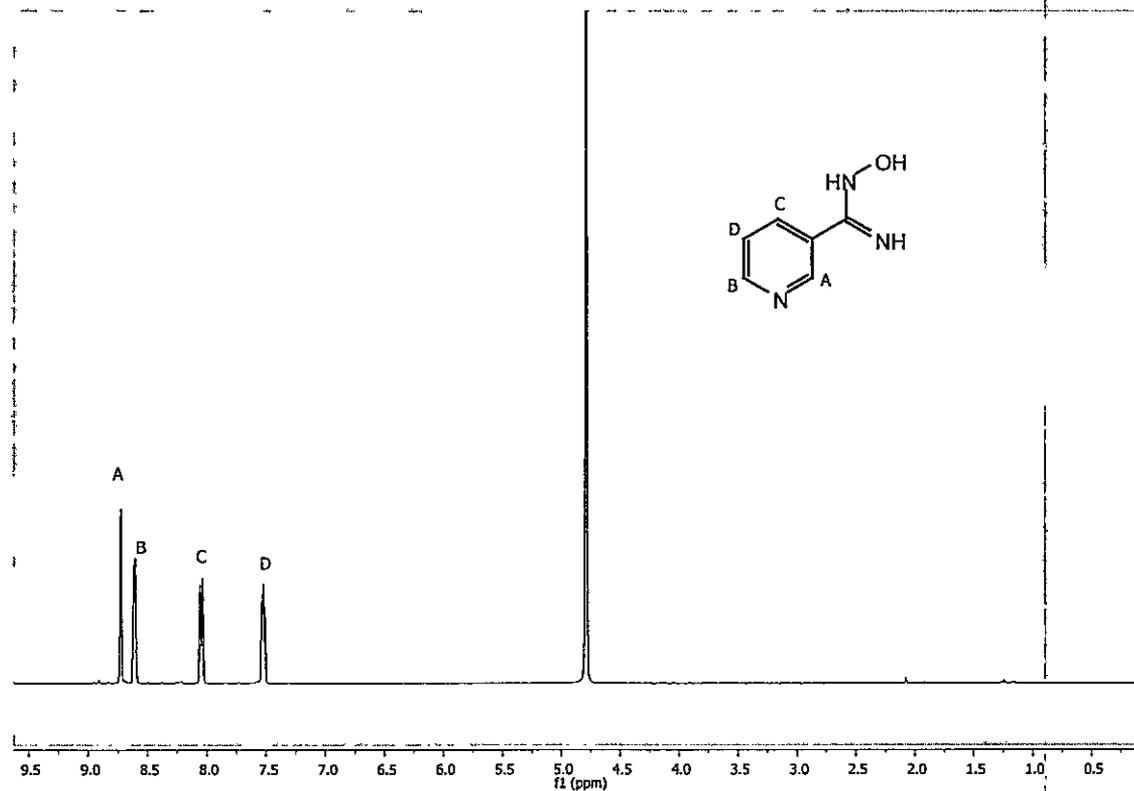
(ordenadas por nombre)

Nombre	Molécula
MF1042	
MF1046	
MF1047	
MF1050	
MF1053	
MF1056	
MF1061	
MF1062	
MF1064	
MF1066	
MF1073	
MF1081	

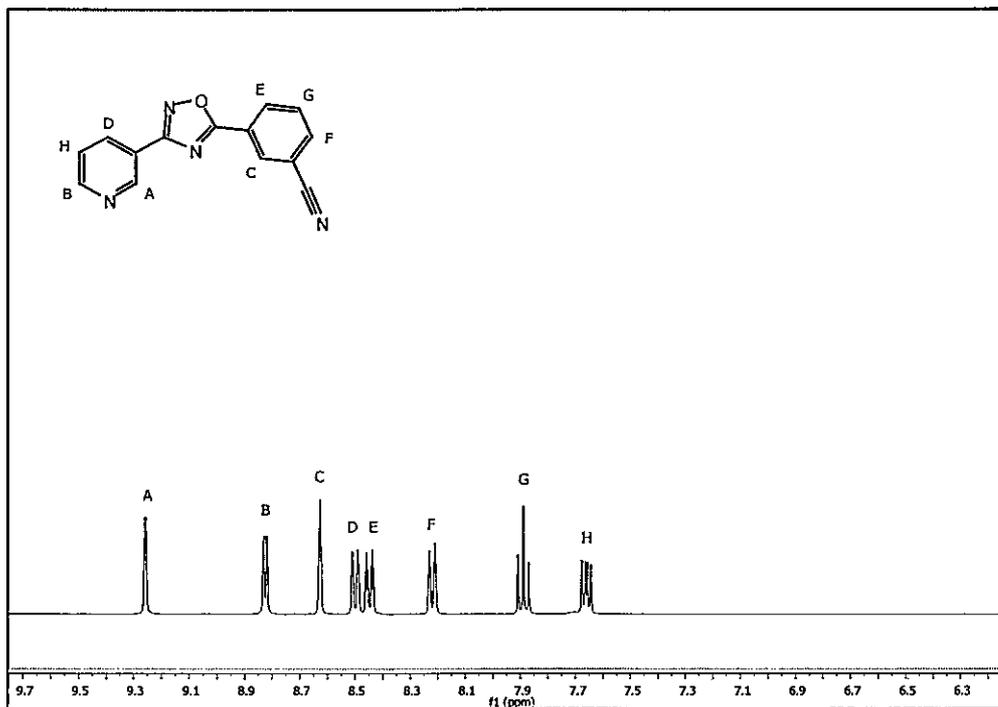
Nombre	Molécula
MF1082	
MF1083	

ANEXO III

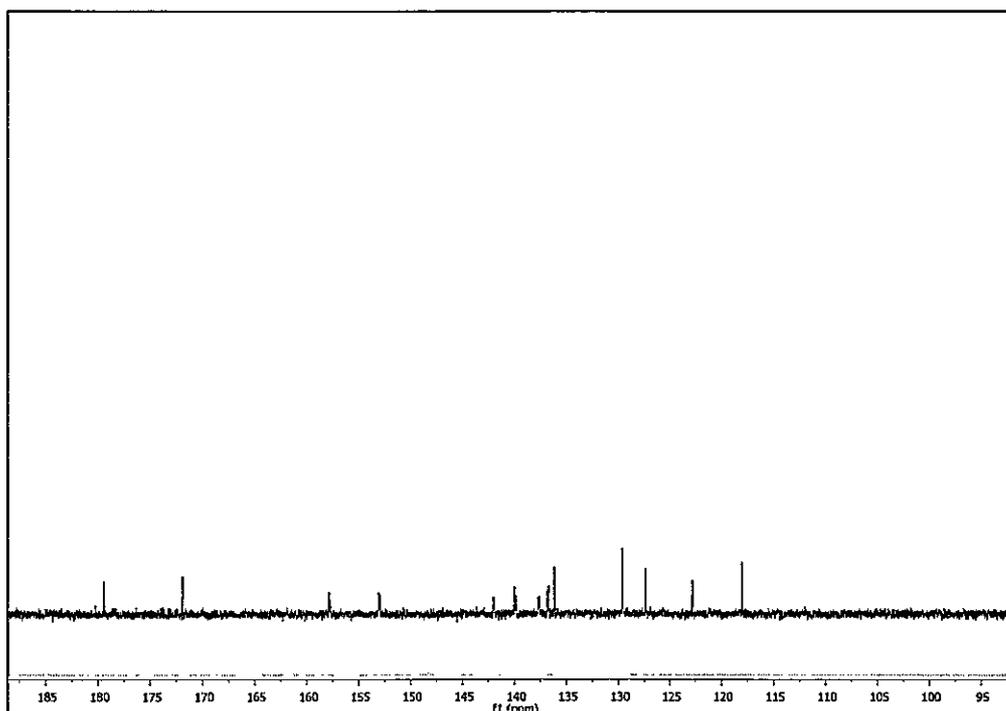
RMN-¹H N'-Hidroxinicotinimidamida (a48)



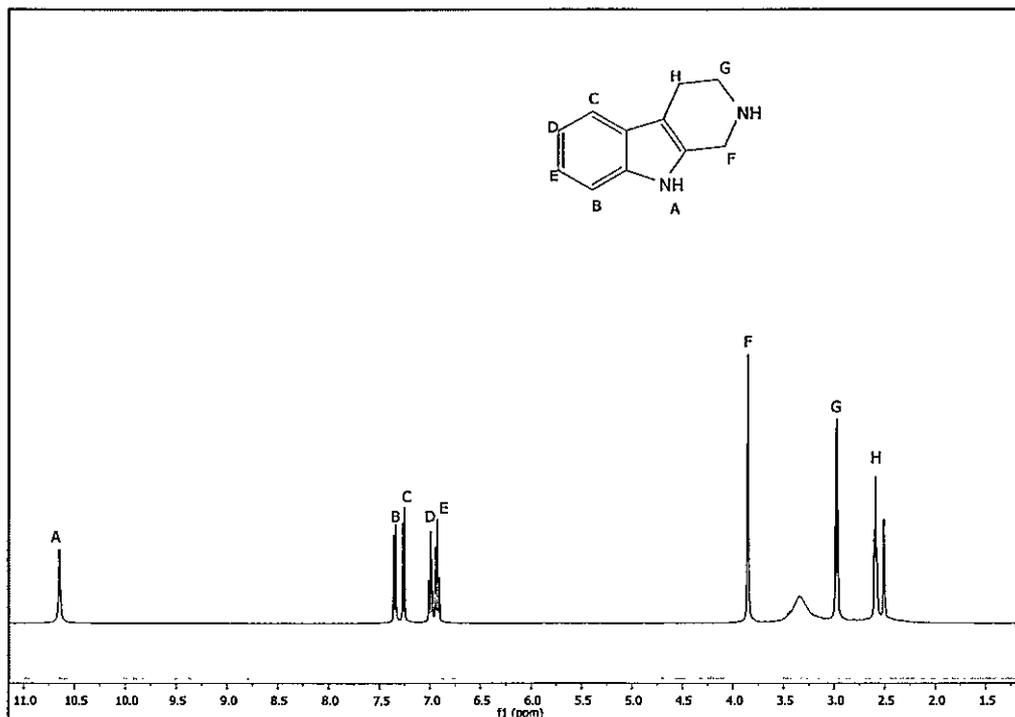
RMN-¹H 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) benzonitrilo (NS9283) (a51)



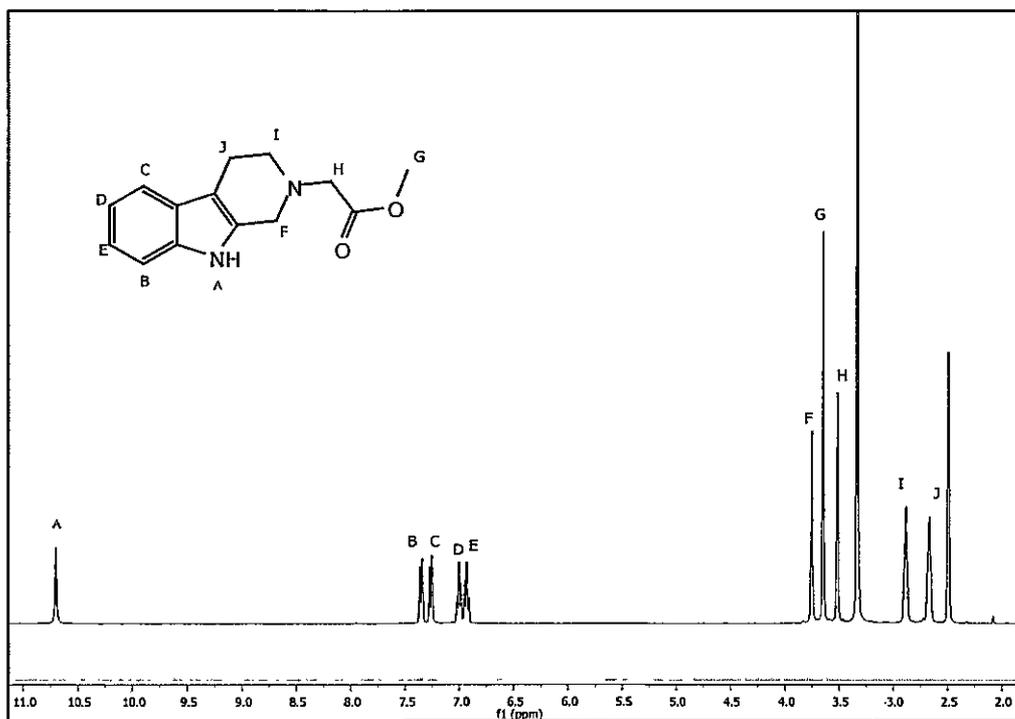
RMN-¹³C 3-(3-(piridin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il) benzonitrilo (NS9283) (a51)



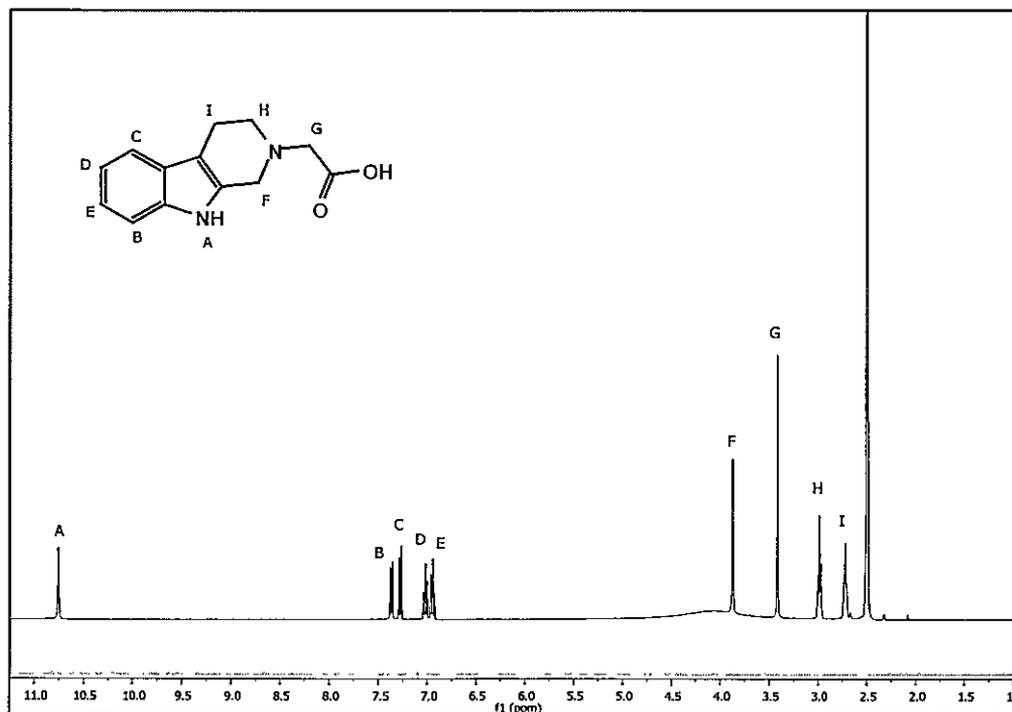
RMN-¹H 2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol (a2)



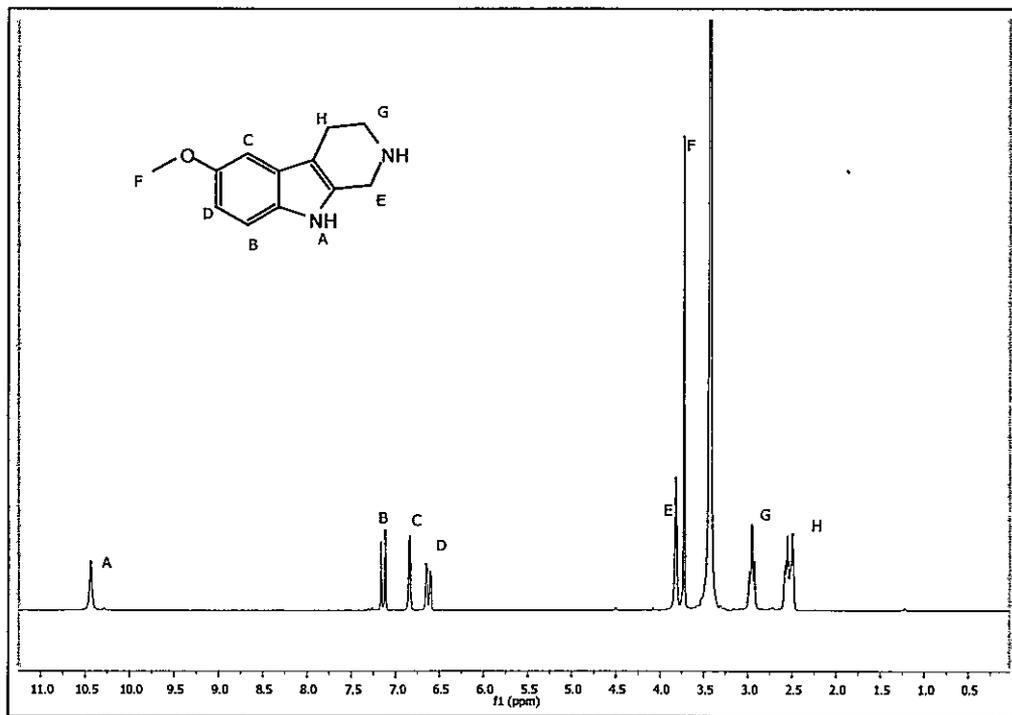
RMN-¹H 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il) acetato de metilo (a3)



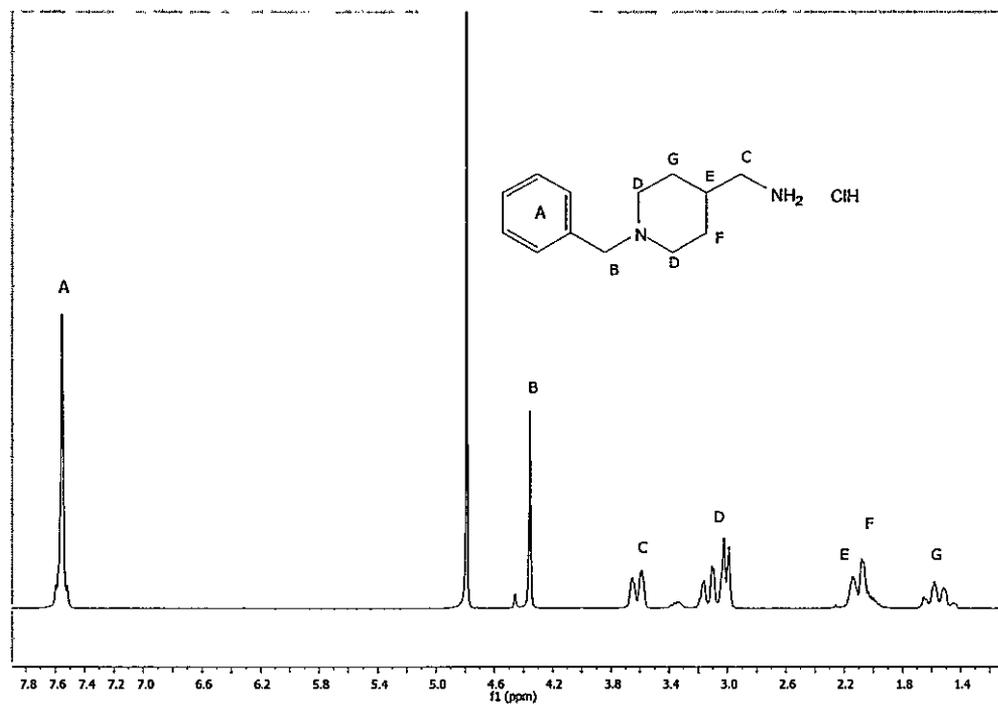
RMN-¹H Ácido 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il) acético (a4)



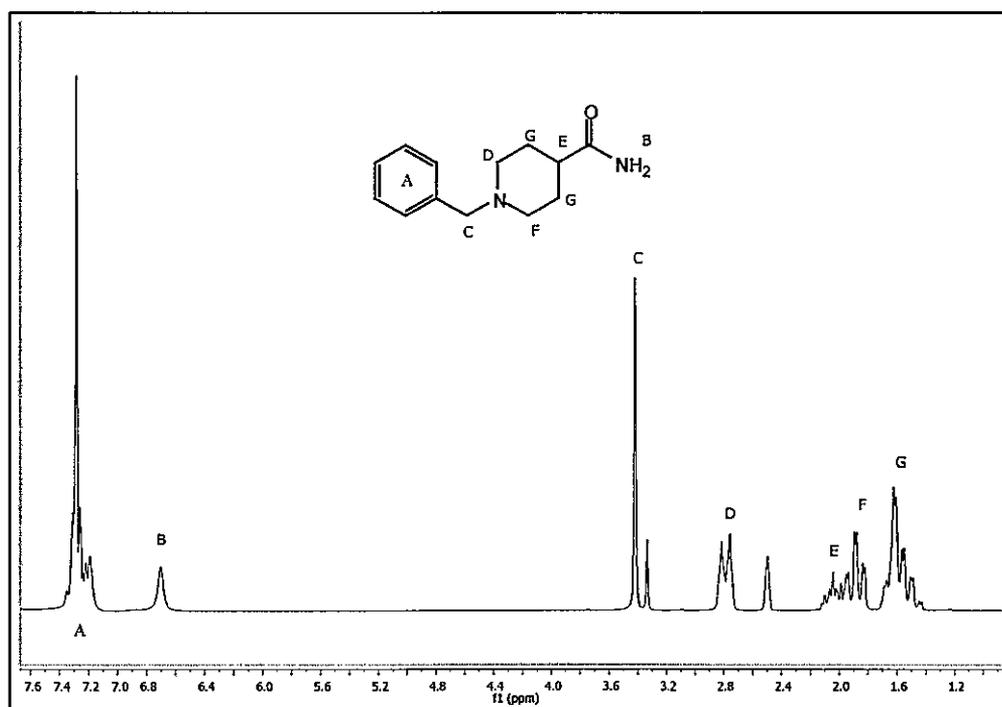
RMN-¹H 6-metoxi-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol (a6)



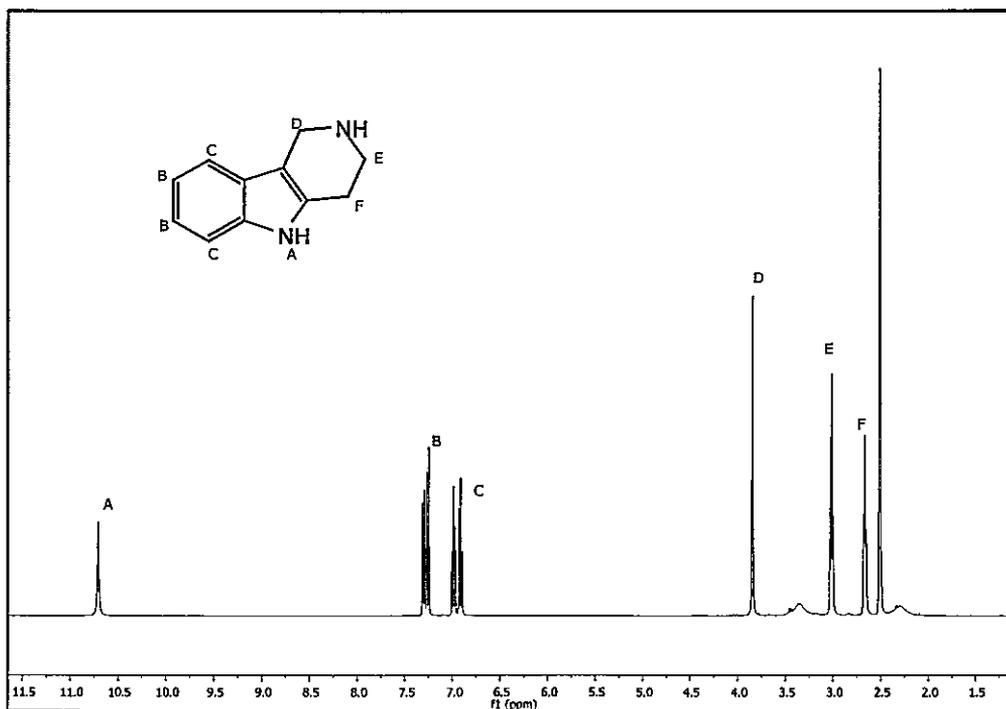
RMN-¹H 1-bencil-4-(metilamino)piperidina (a10)



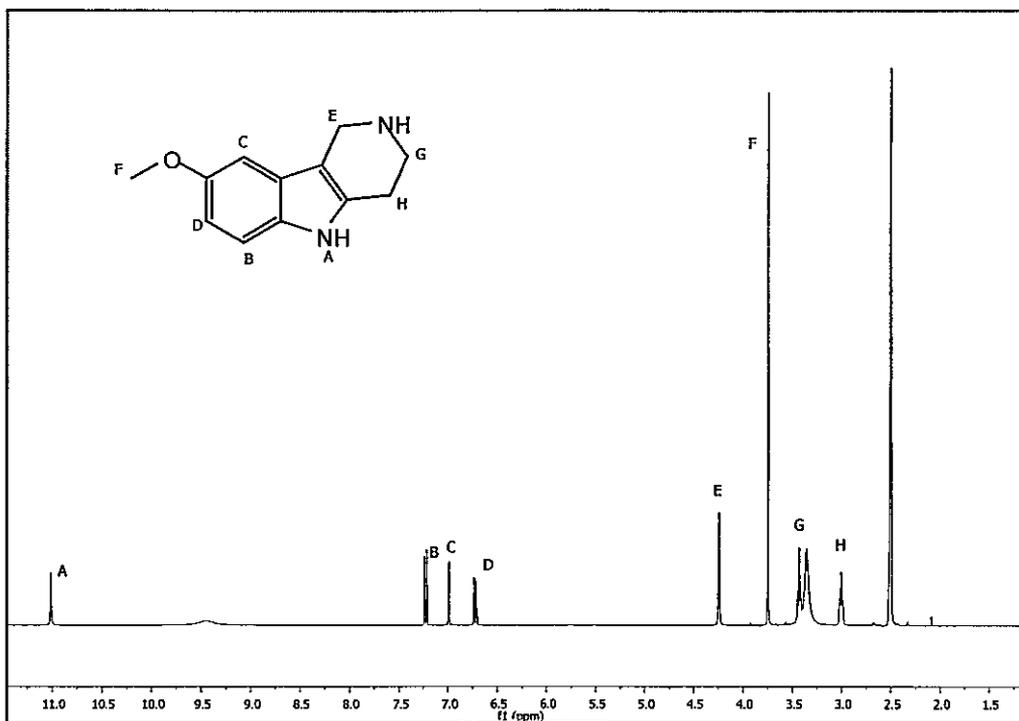
RMN-¹H 1-bencilpiperidin-4-carboxamida (a12)



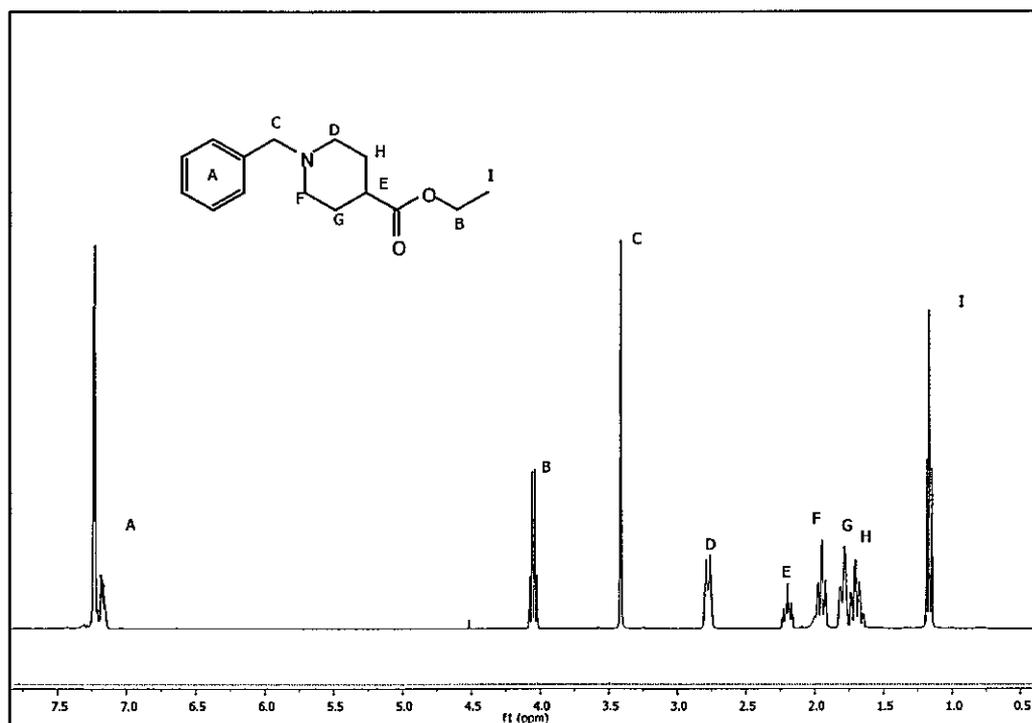
RMN-¹H 2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol (a27).



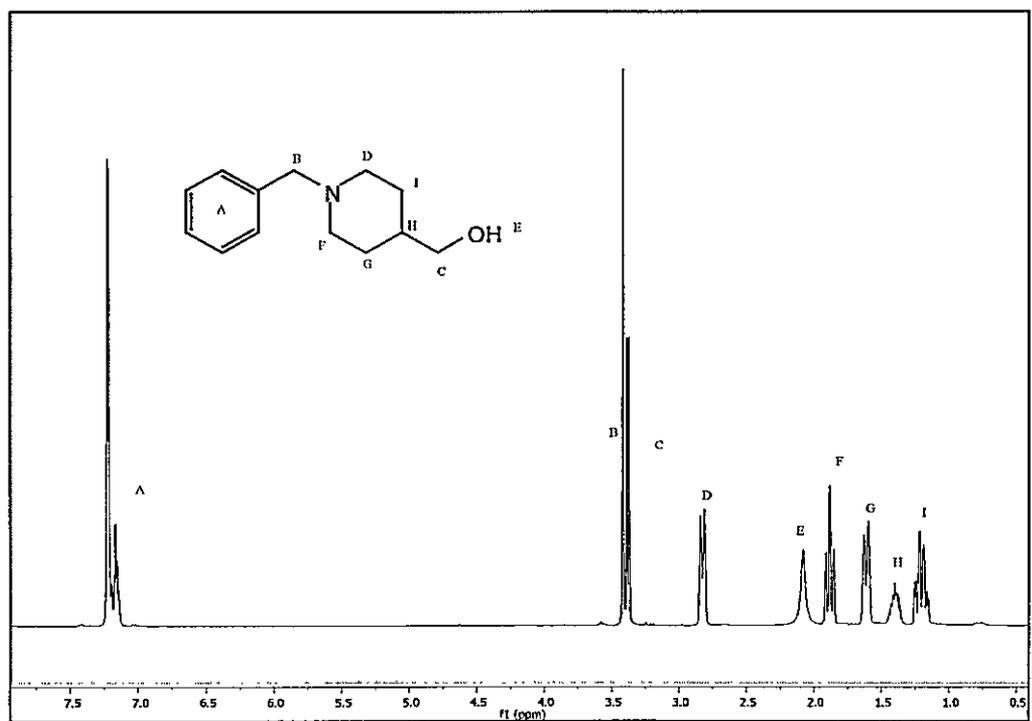
RMN-¹H 8-metoxi-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol (a29)



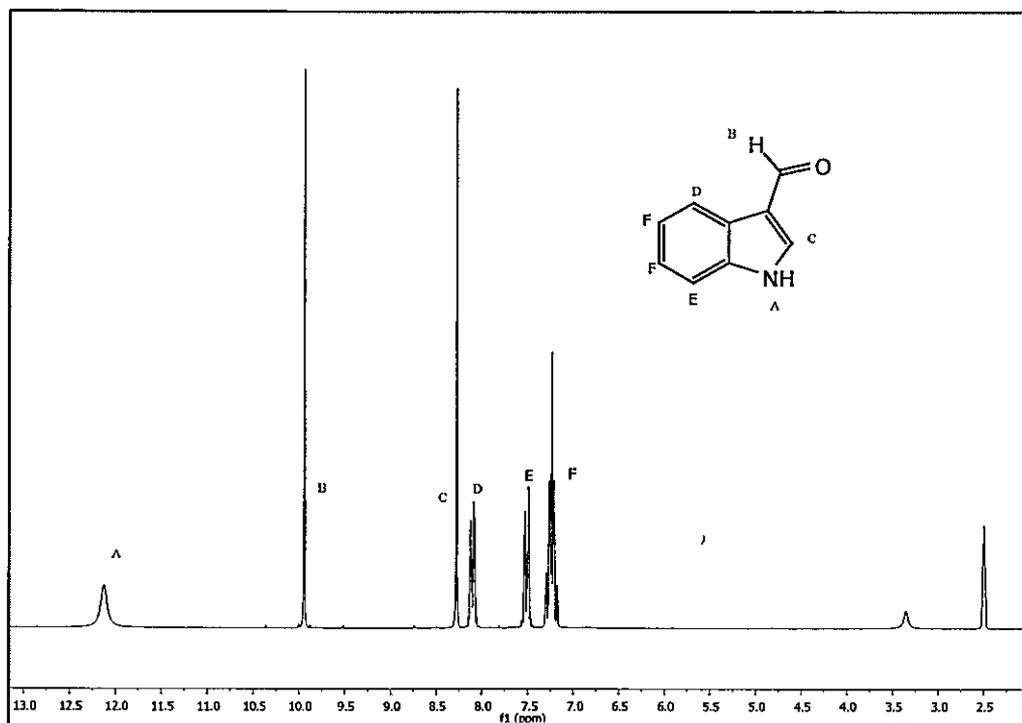
RMN-¹H 1-bencilpiperidin-4-carboxilato de etilo (a19)



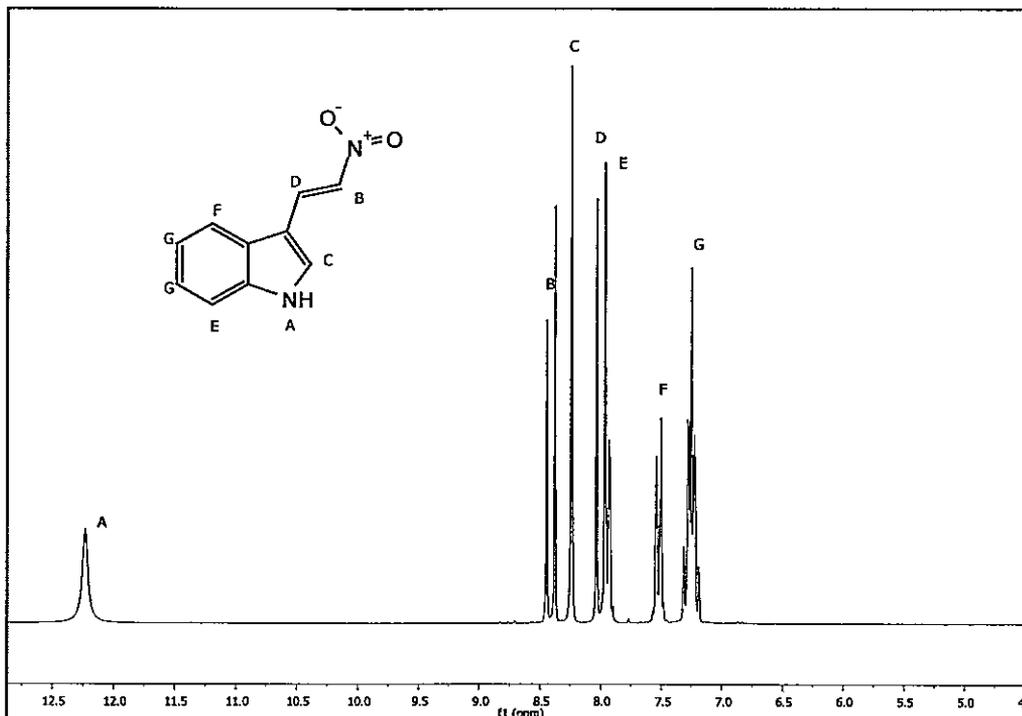
RMN-¹H 1-bencil-4-(metilhidroxi)piperidina (a20)



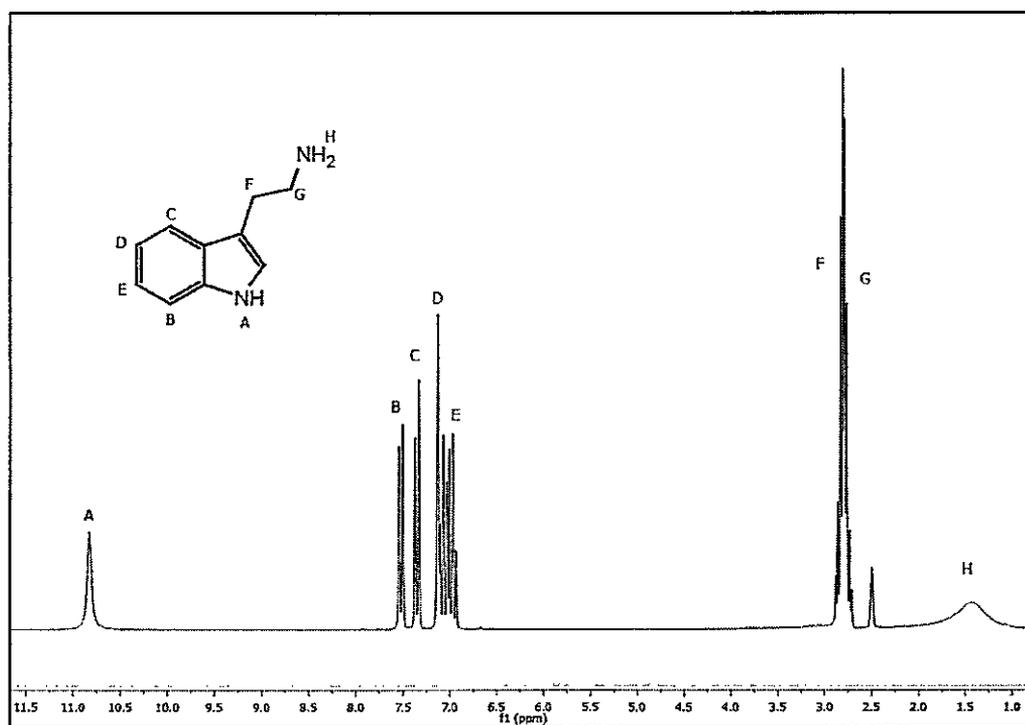
RMN-¹H 1*H*-indol-3-carboxaldehído



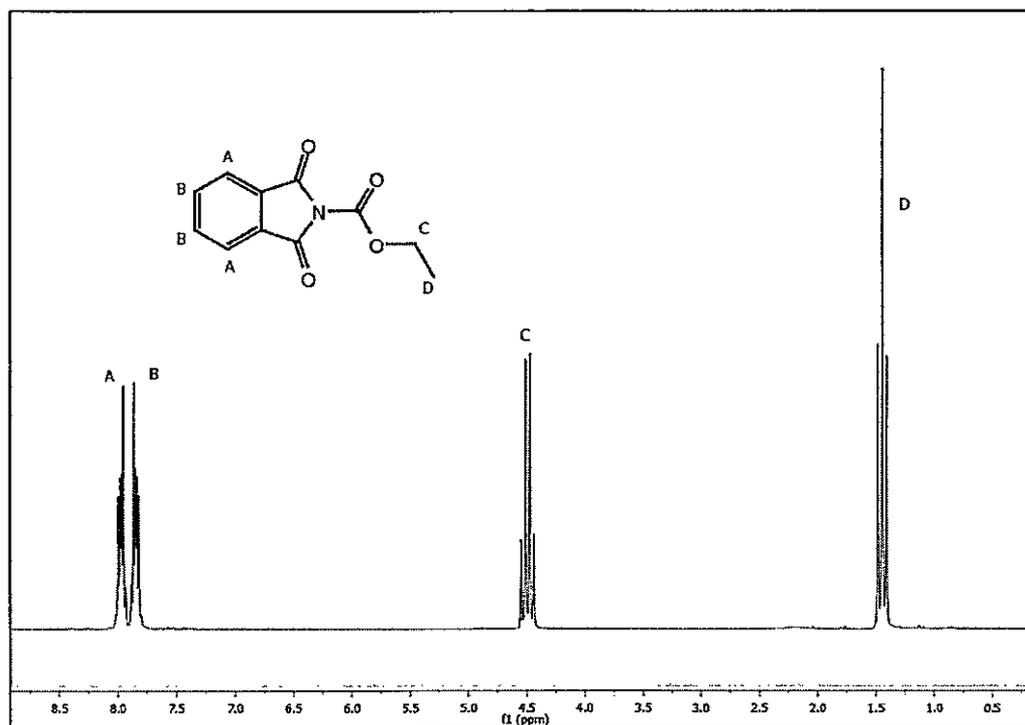
RMN-¹H 3-(2-nitrovinil)-1*H*-indol.



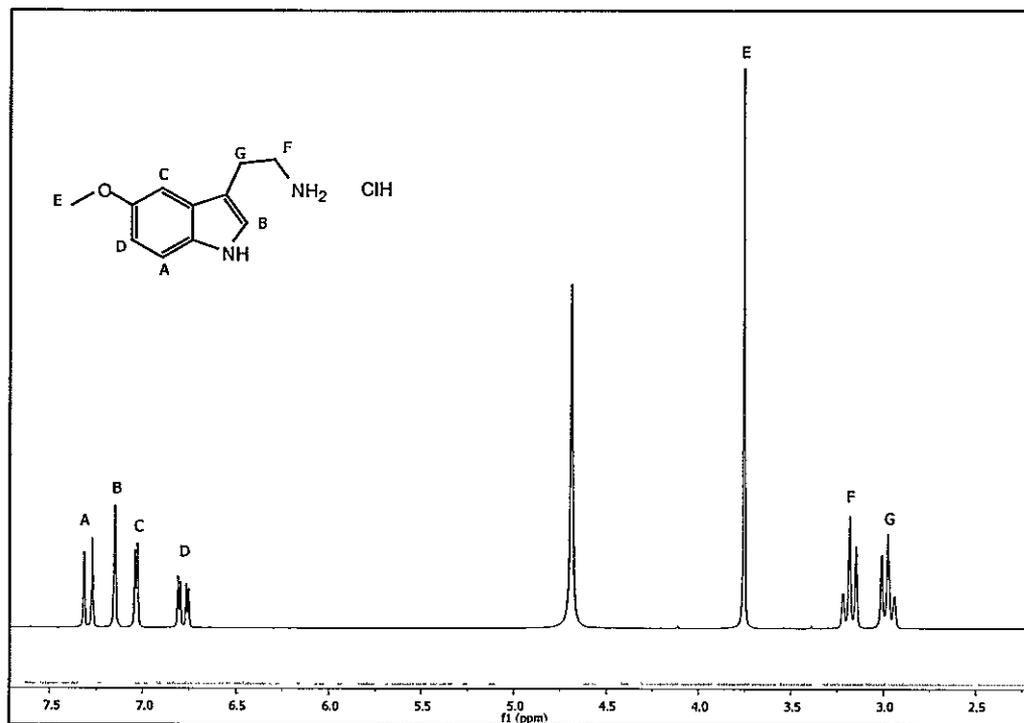
RMN-¹H (1*H*-indol-3-il)metanoamina



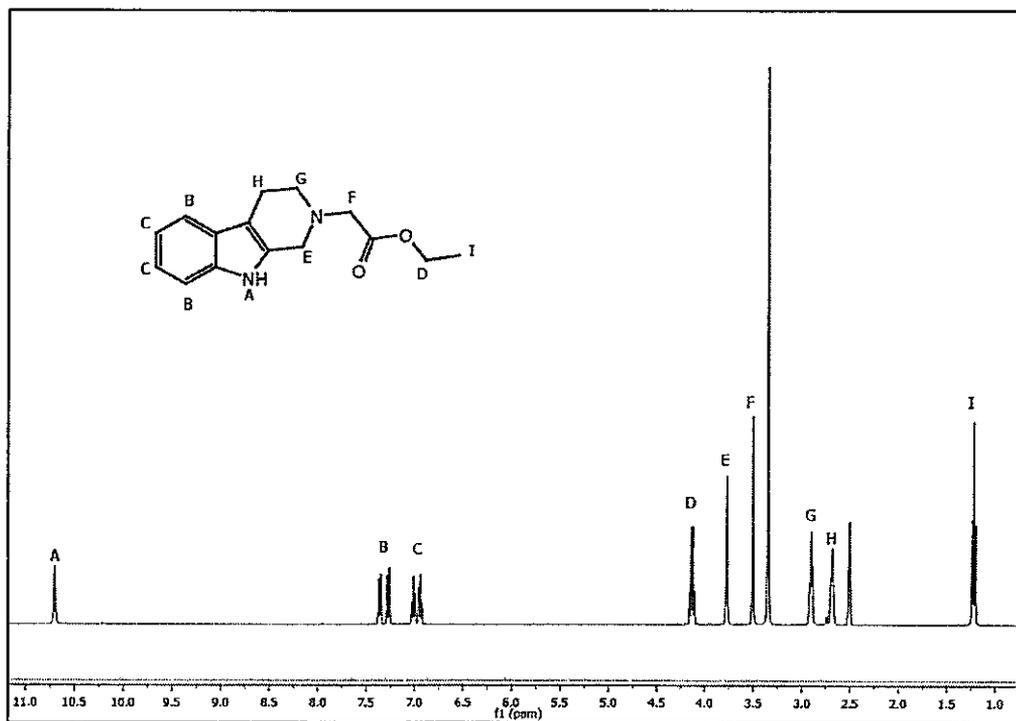
RMN-¹H 1,3-dioxoisindolin-2-carboxilato de etilo



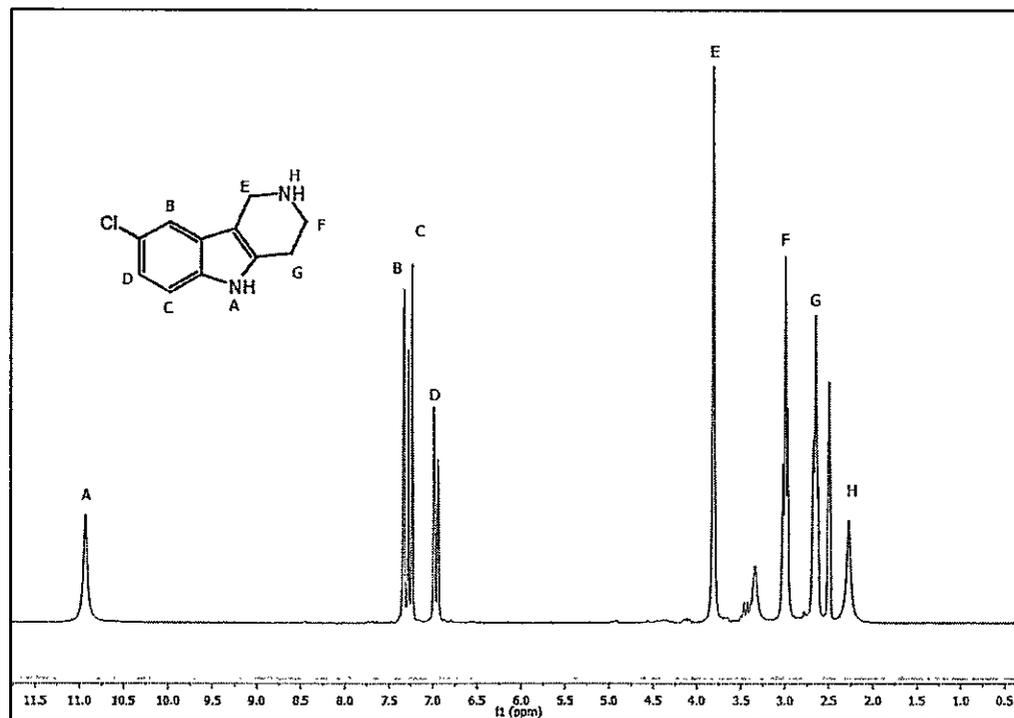
RMN-¹H 5-metoxitriptamina



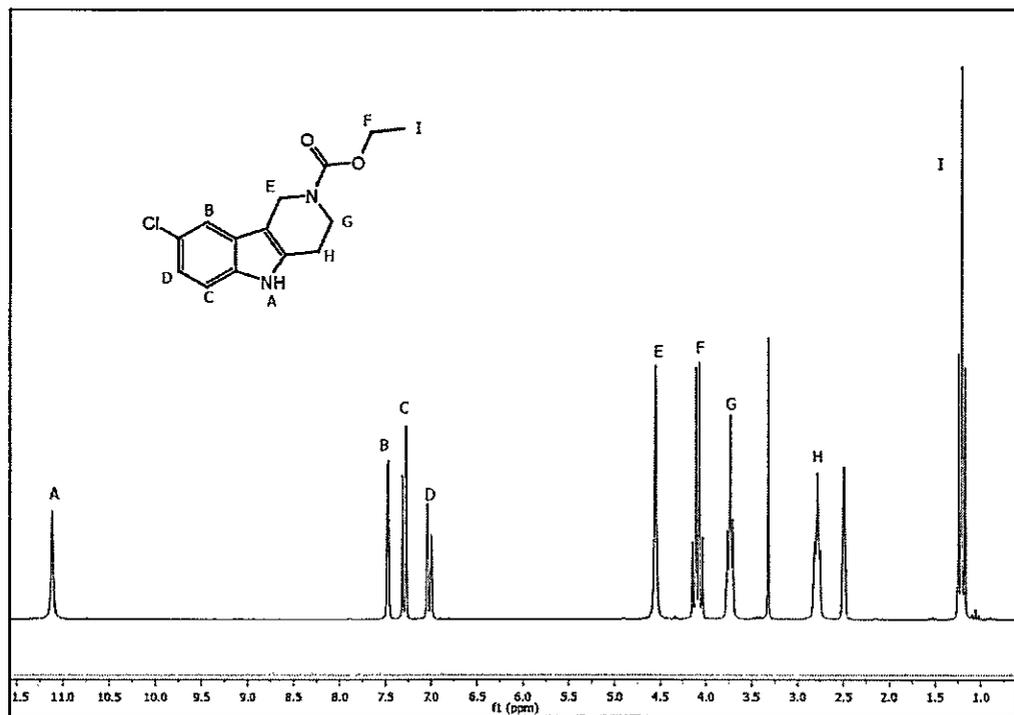
RMN-¹H 2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetato de etilo



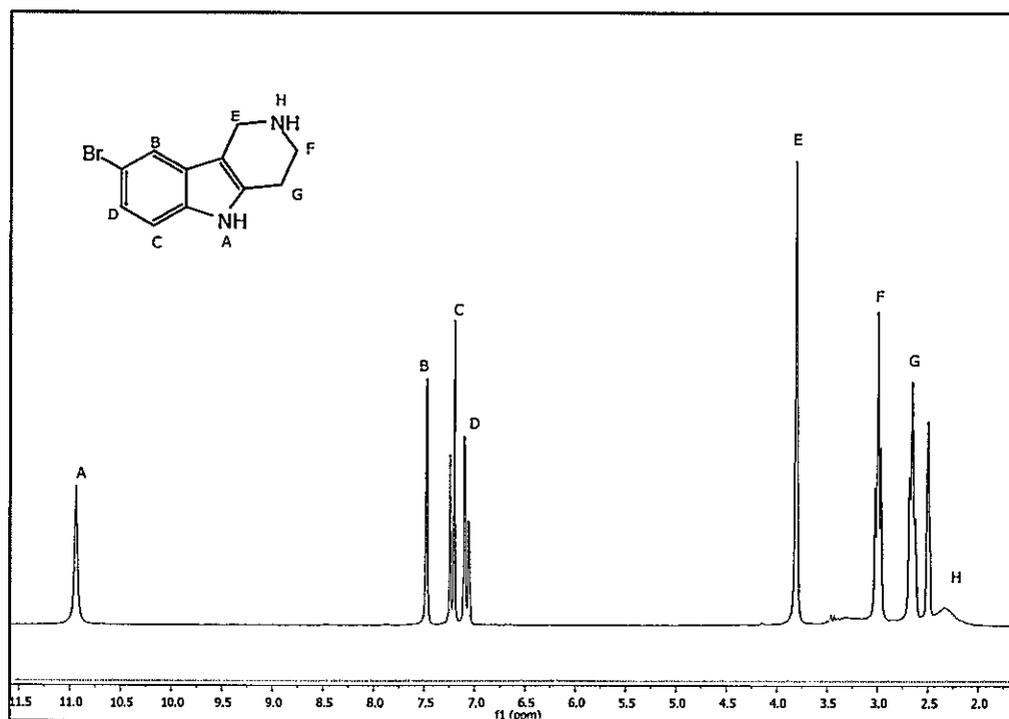
RMN-¹H 8-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol.



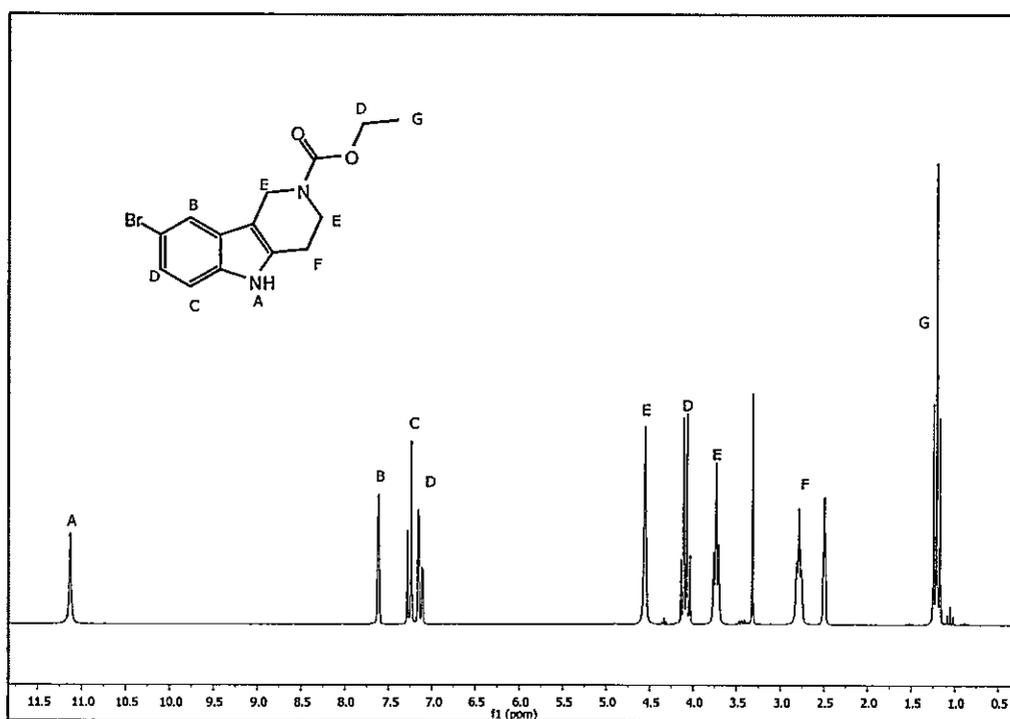
RMN-¹H (8-cloro-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)) carboxilato de etilo.



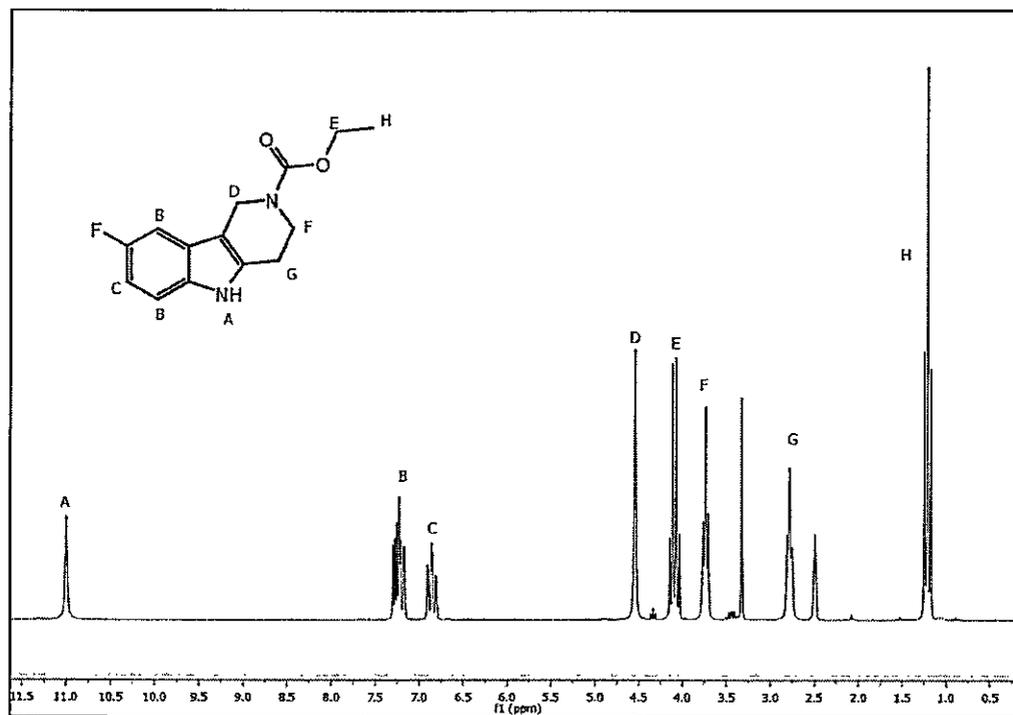
RMN-¹H 8-bromo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-pirido[4,3-b]indol.



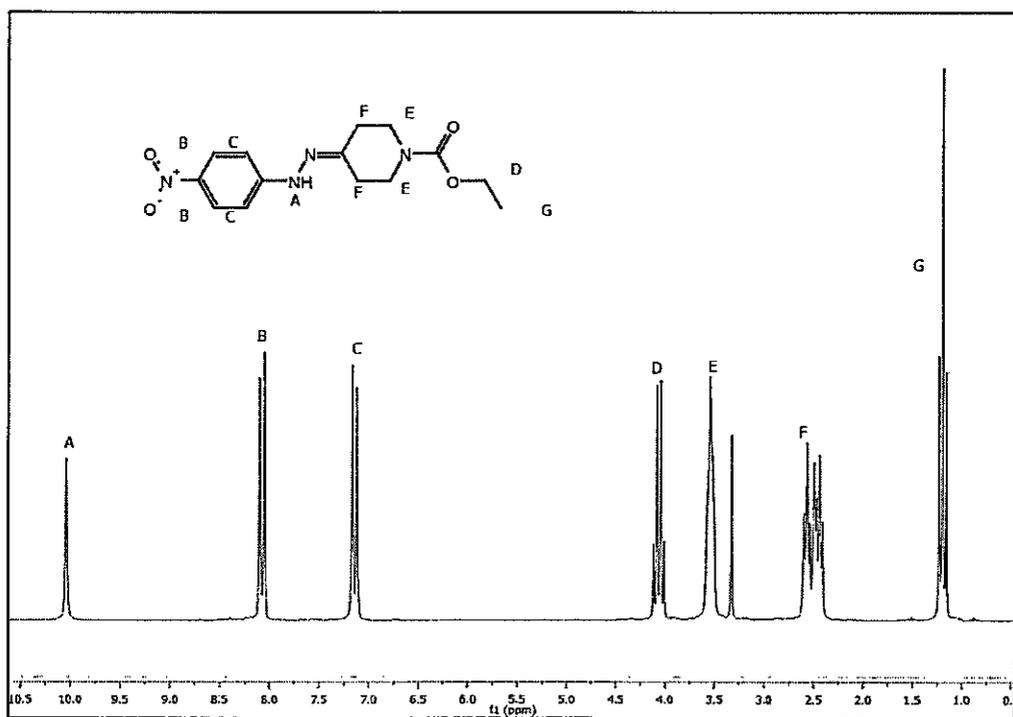
RMN-¹H (8-bromo-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)) carboxilato de etilo.



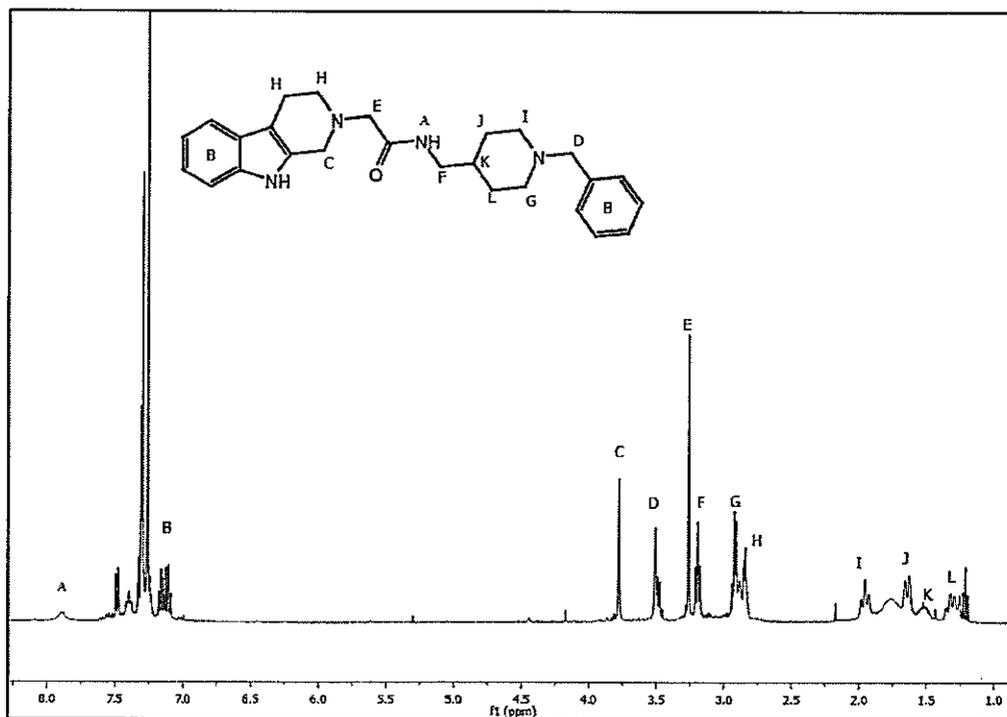
RMN-¹H (8-fluor-3,4-dihidro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol-2(5*H*)) carboxilato de etilo.



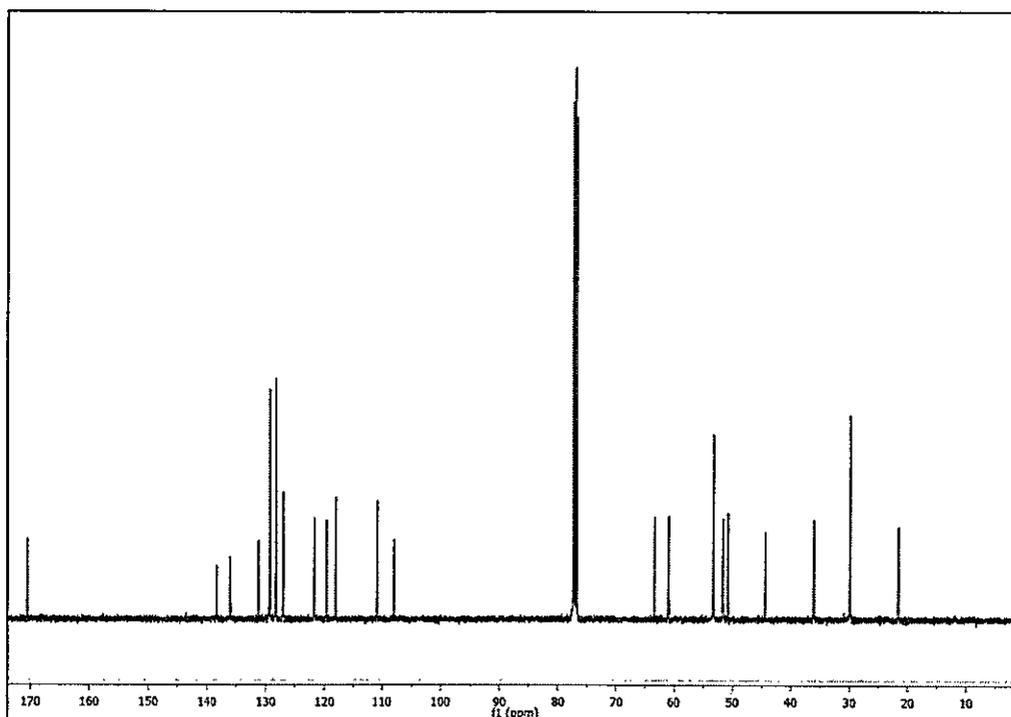
RMN-¹H (4-(2-(4-nitrofenil)hidrazono)piperidin)-1-carboxilato de etilo.



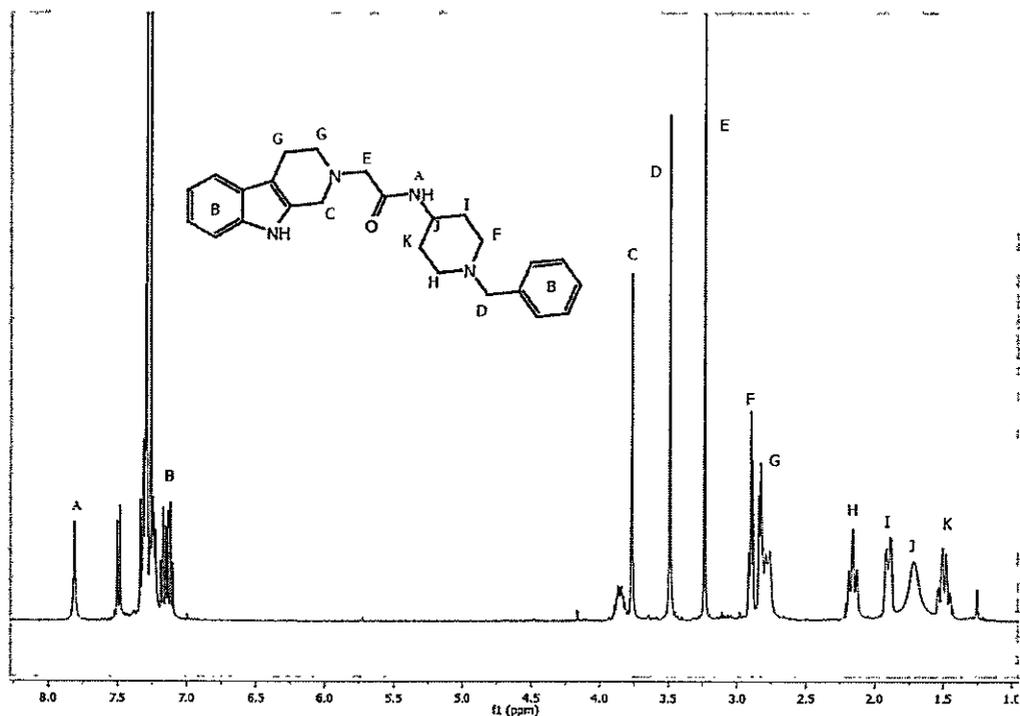
RMN-¹H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetamida (MF1047) (a30)



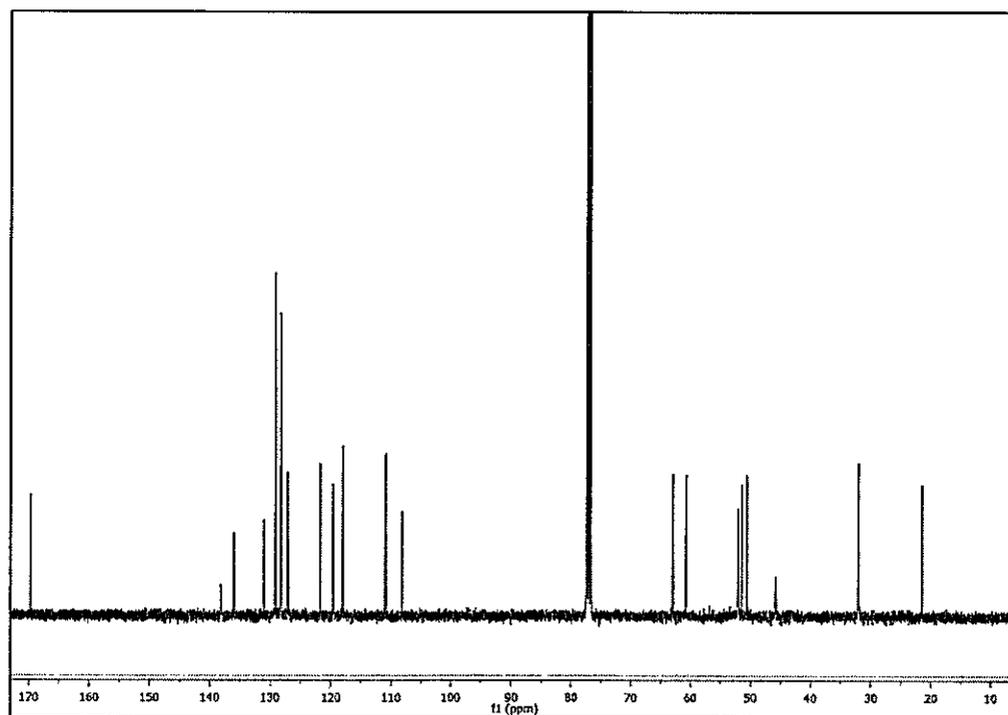
RMN-¹³C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetamida (MF1047) (a30)



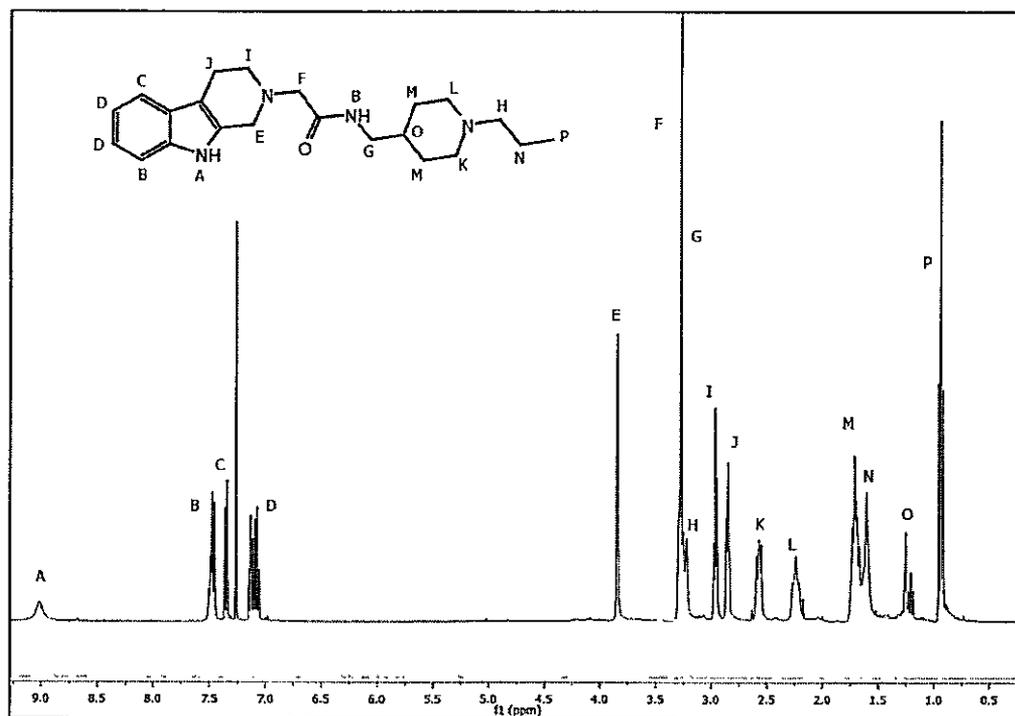
RMN-¹H N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetamida (MF1042) (a31)



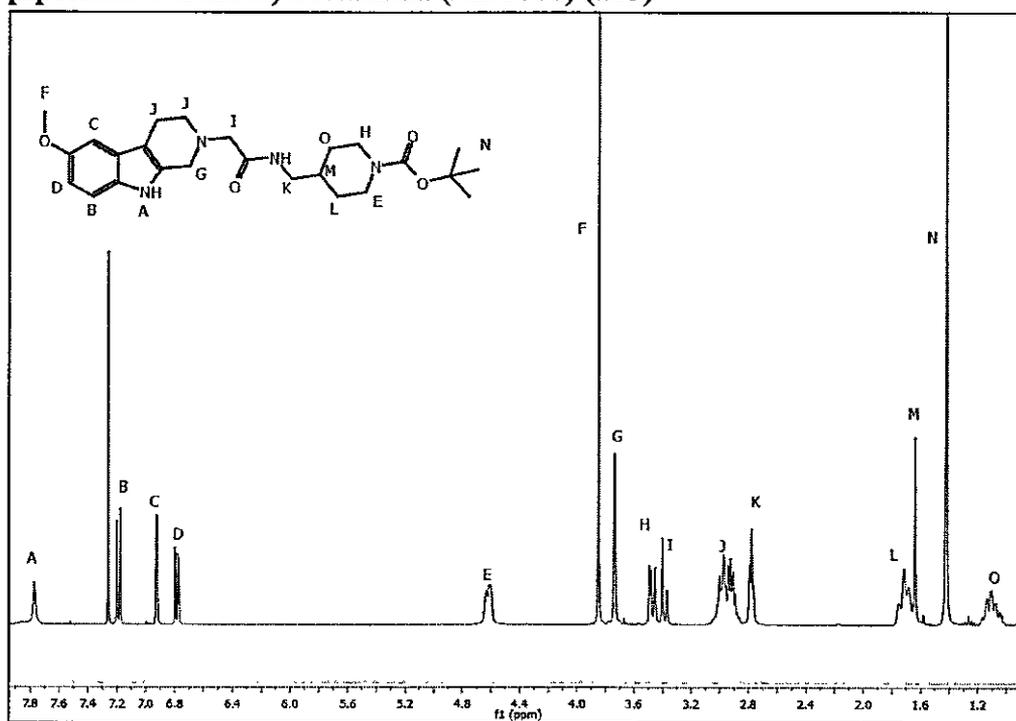
RMN-¹³C N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) acetamida (MF1042) (a31)



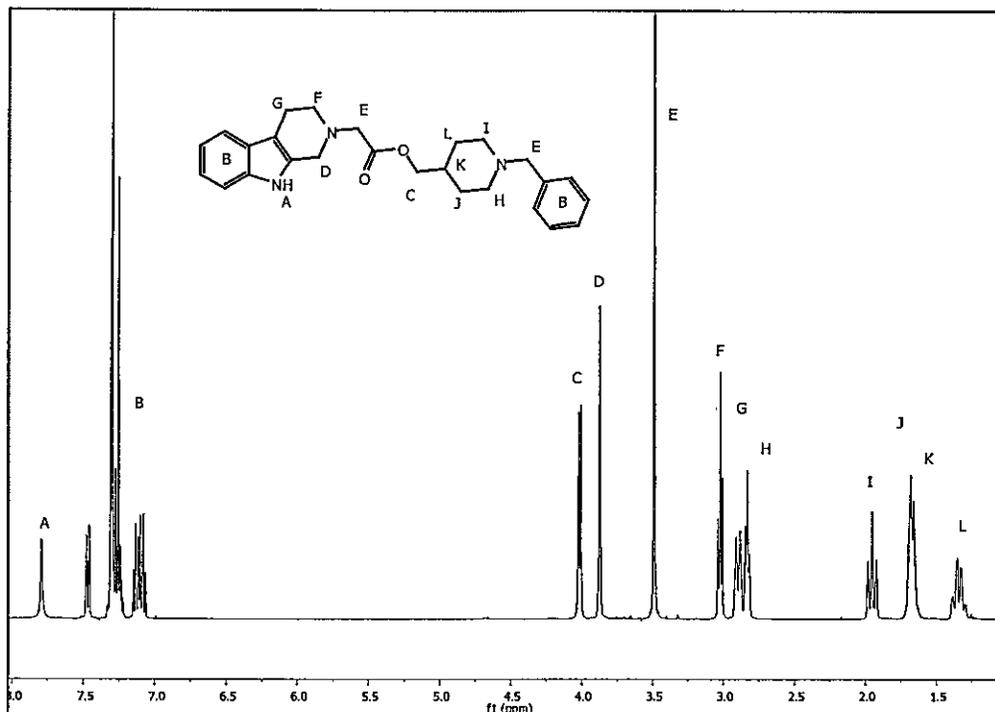
RMN-¹H N-((1-propilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H-il)acetamida (MF1064) (a32)



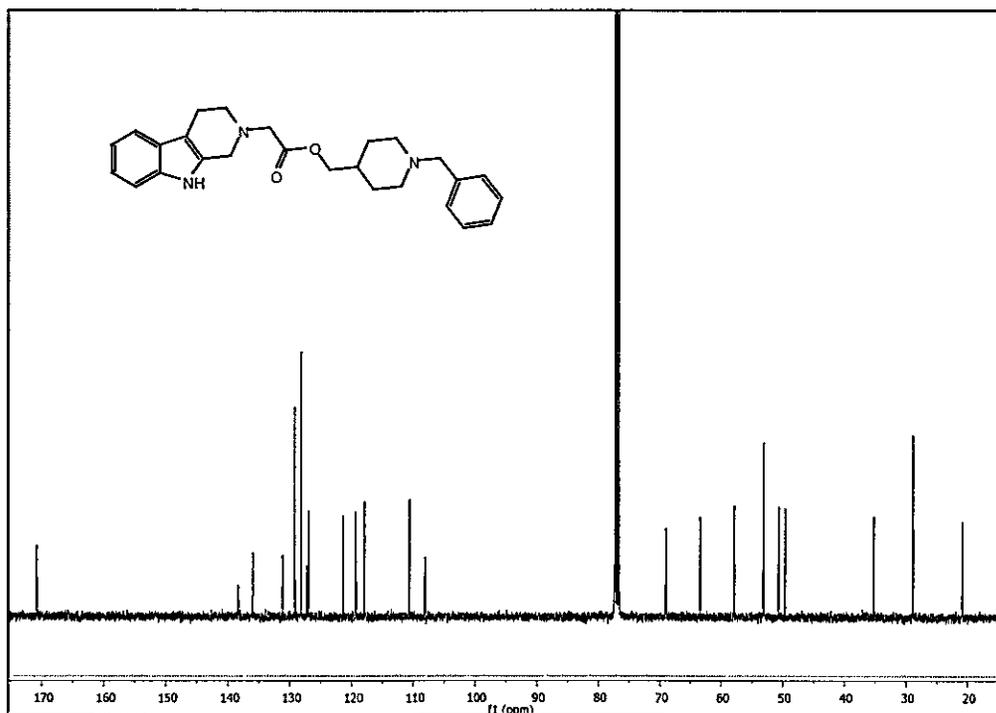
RMN-¹H 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H-il)-N-(1-Boc-piperidin-4-il-metil) acetamida (MF1066) (a23)



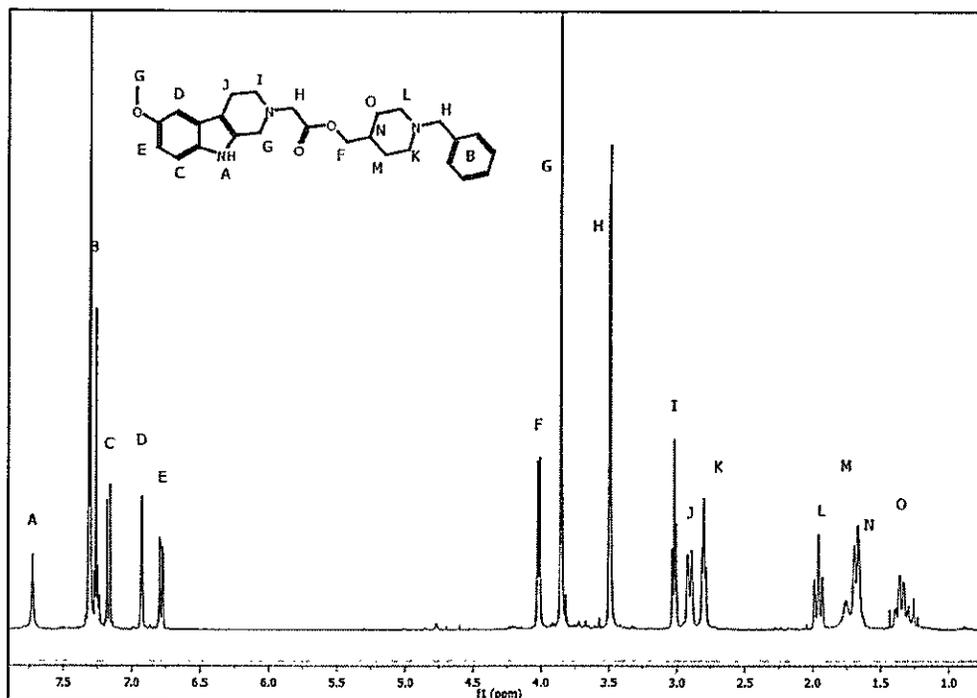
RMN-¹H 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1050) (a33)



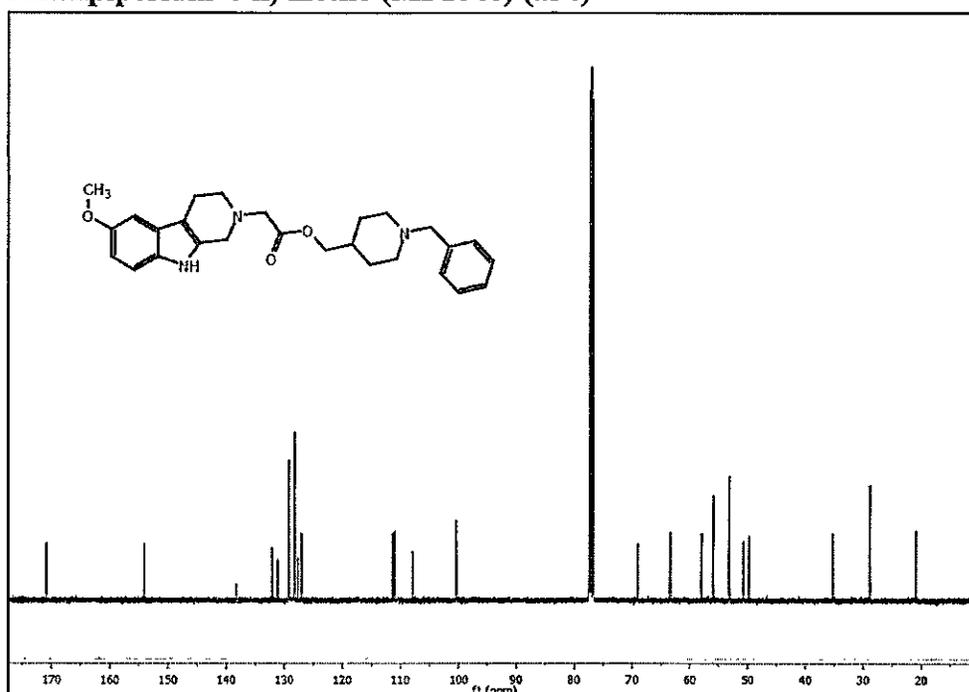
RMN-¹³C 2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1050) (a33)



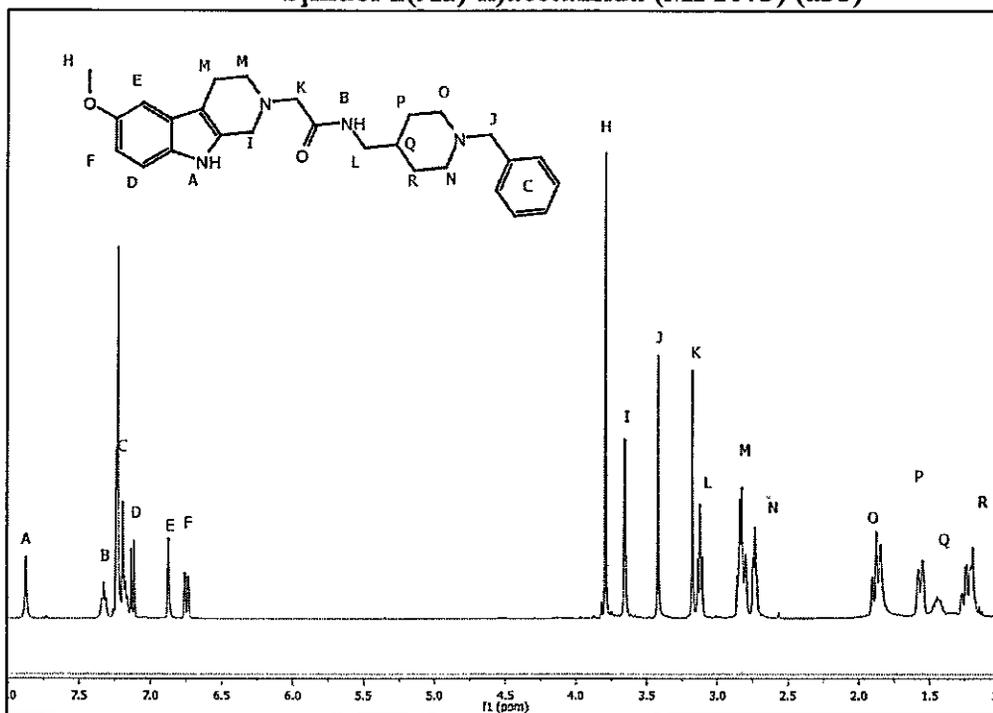
RMN-¹H 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1046) (a34)



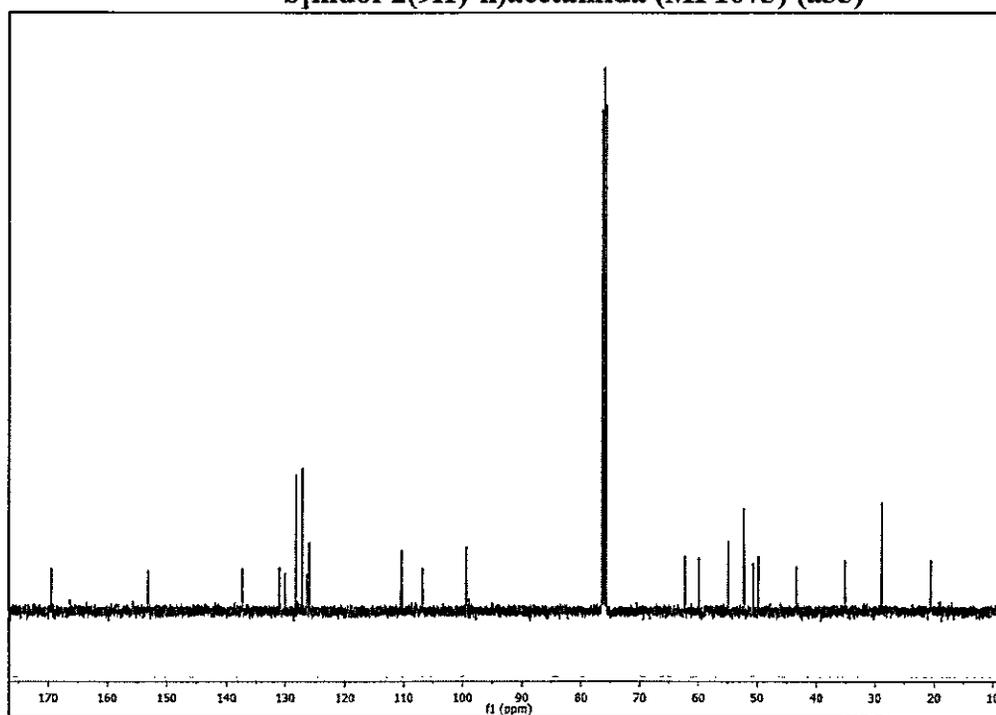
RMN-¹³C 2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il) metilo (MF1046) (a34)



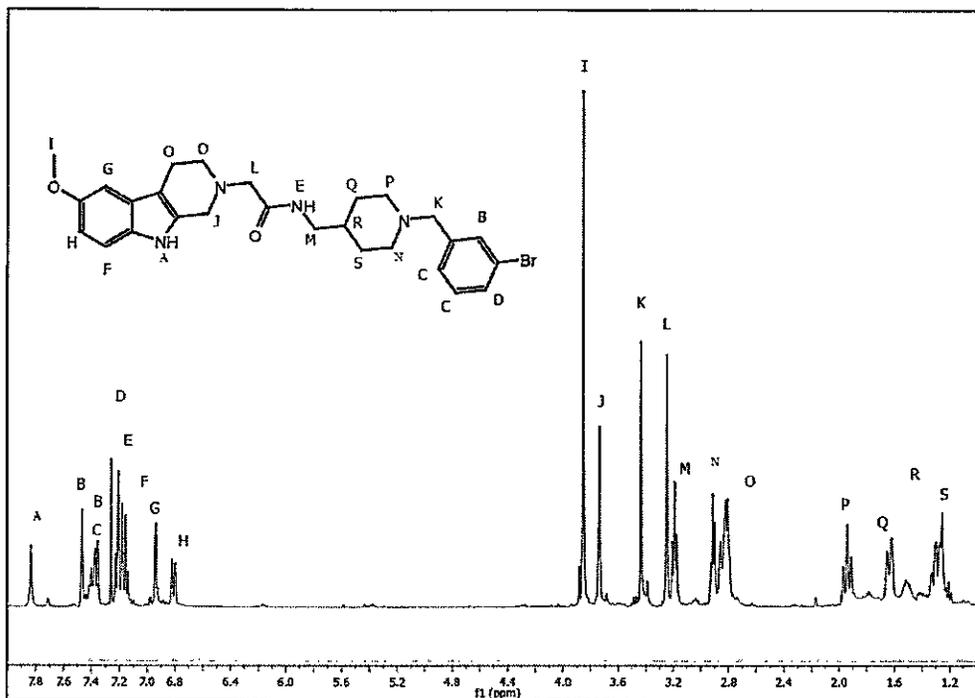
RMN-¹H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1073) (a35)



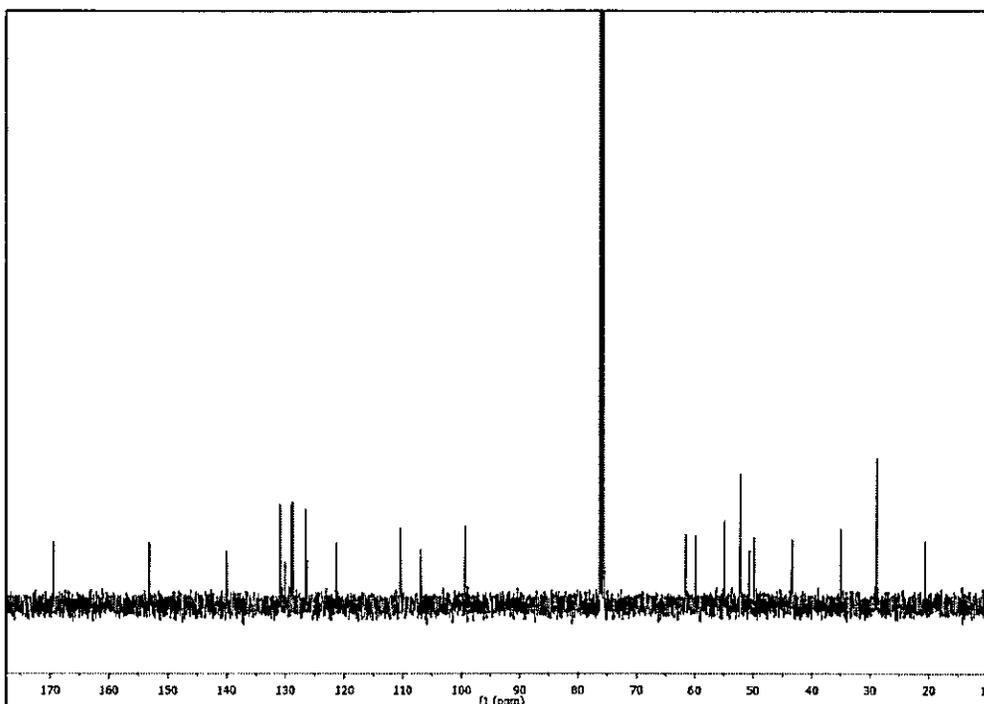
RMN-¹³C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1073) (a35)



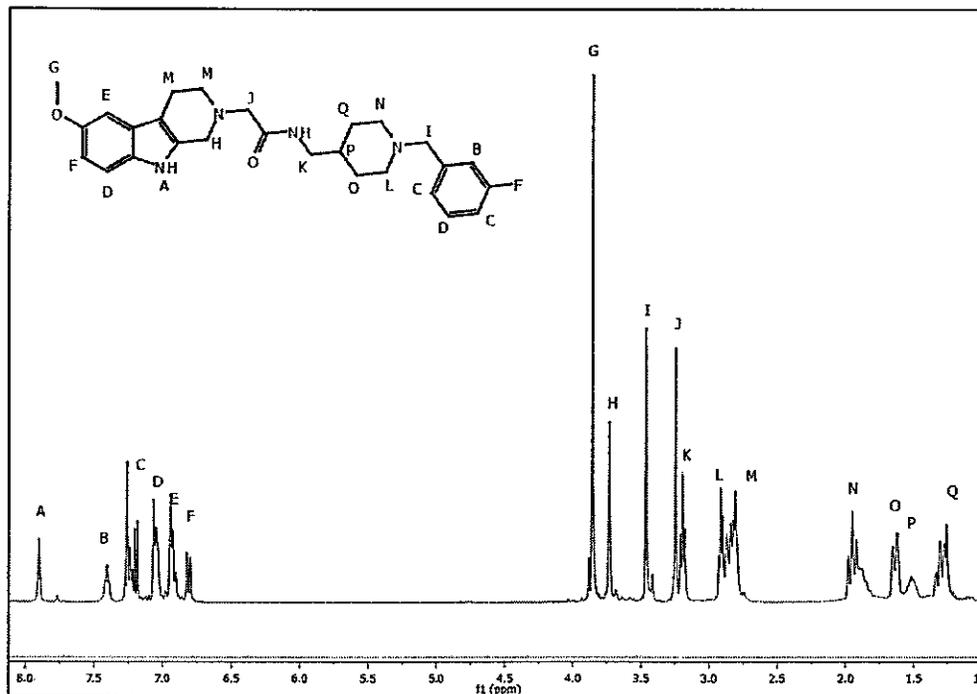
RMN-¹H N-((1-(3-bromobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1081) (a36)



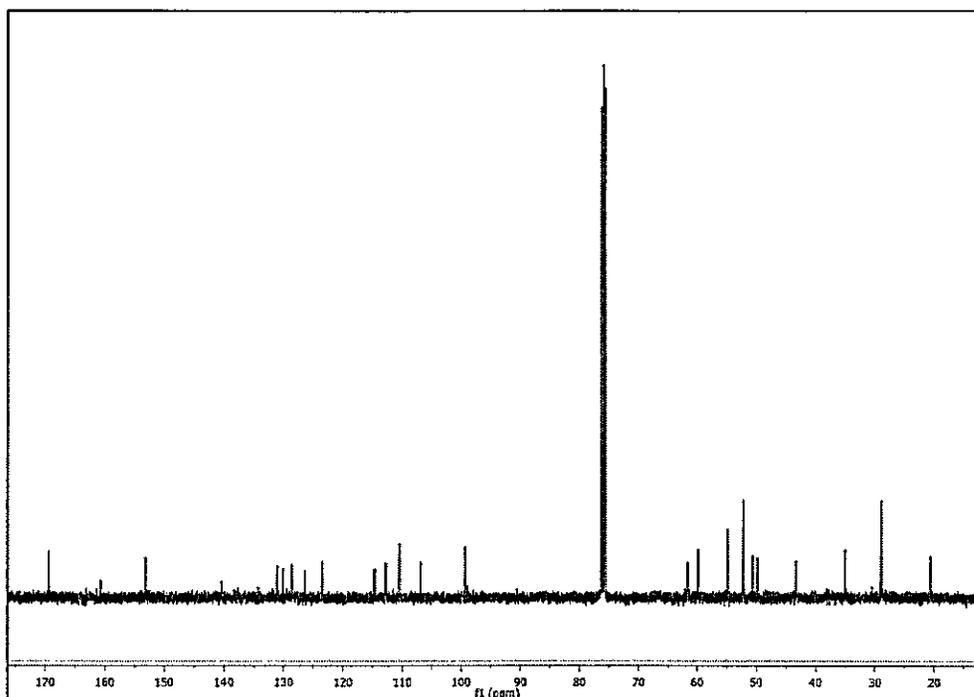
RMN-¹³C N-((1-(3-bromobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1081) (a36)



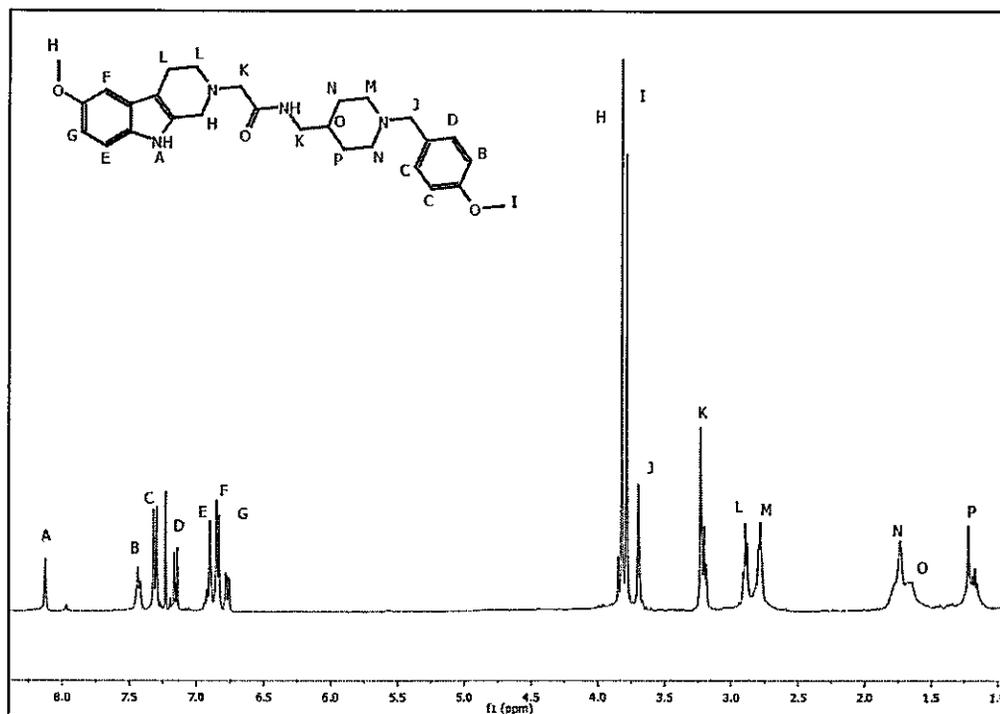
RMN-¹H N-((1-(3-fluorobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1082) (a37)



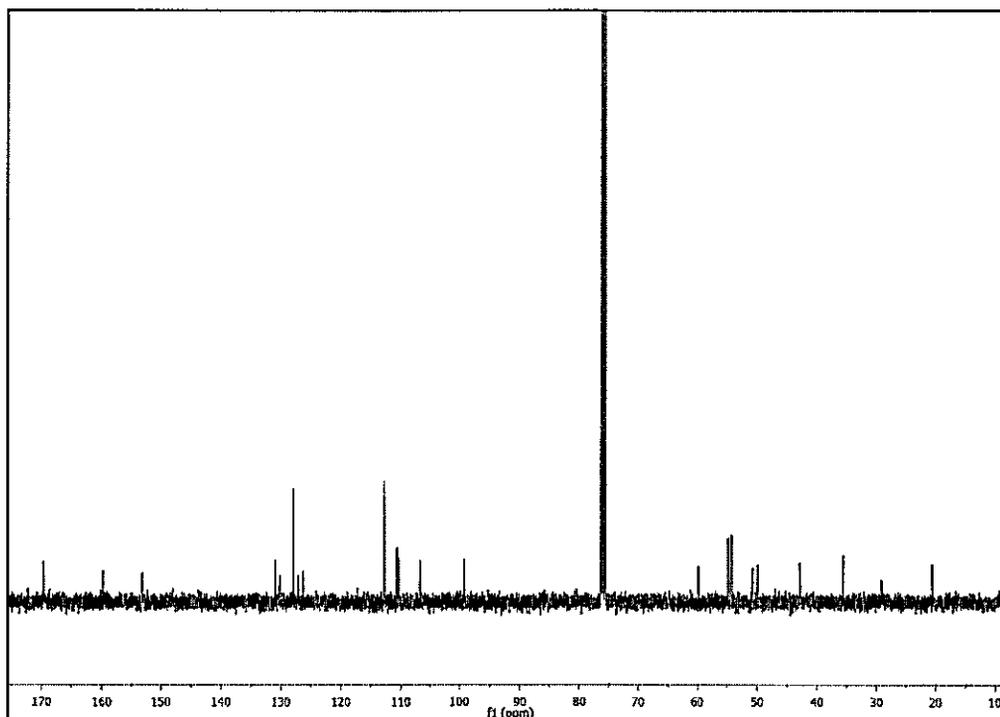
RMN-¹³C N-((1-(3-fluorobencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1082) (a37)



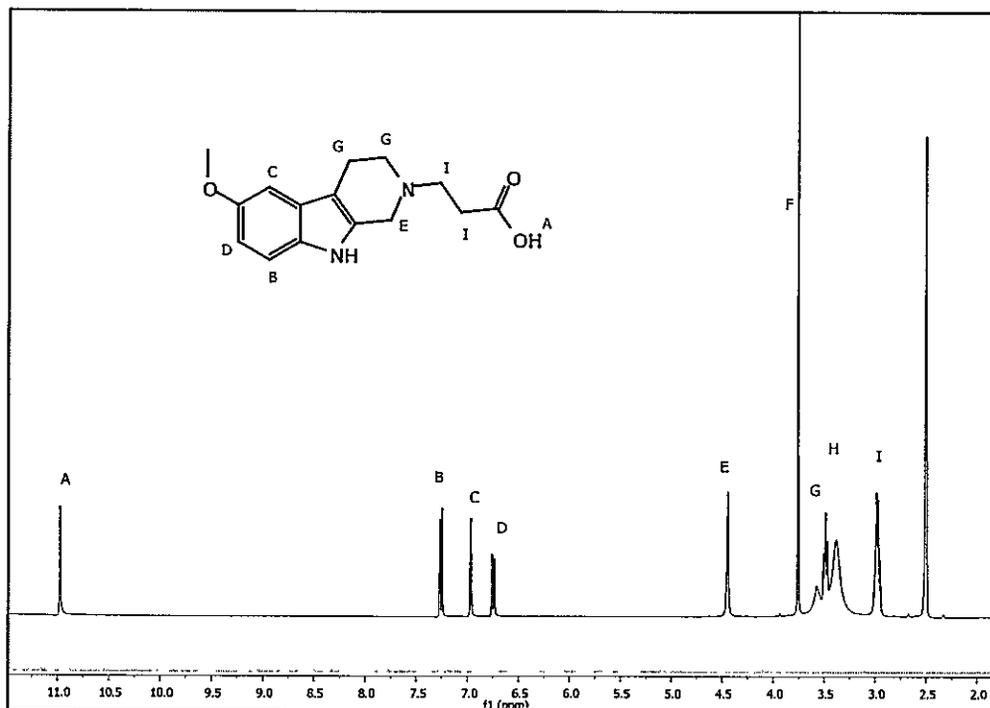
RMN-¹H N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1083) (a38).



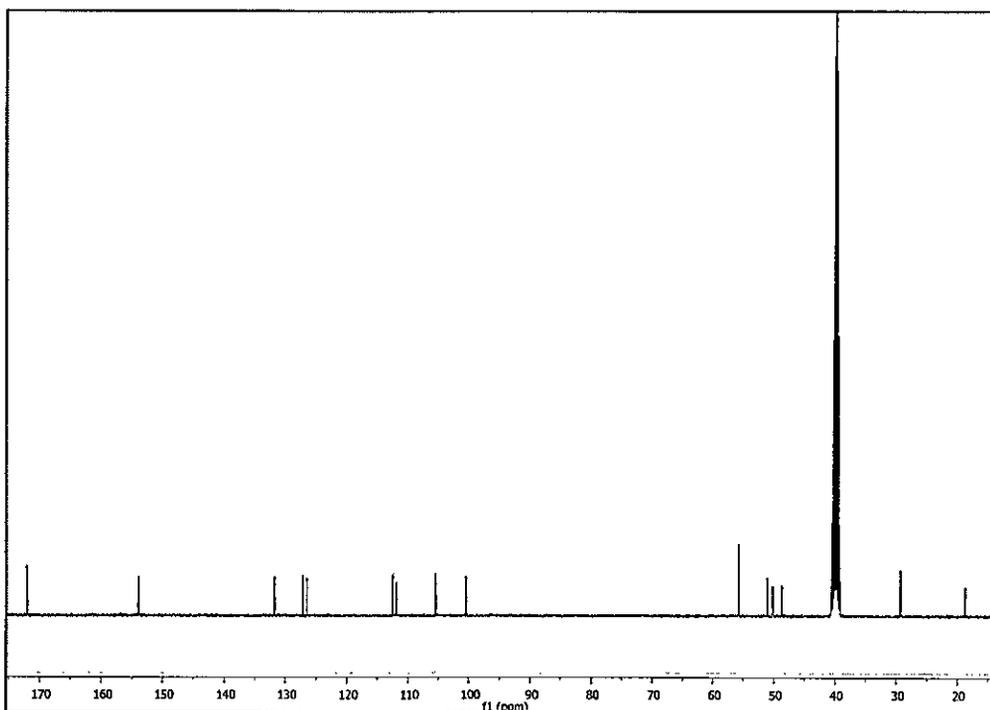
RMN-¹³C N-((1-(4-metoxibencil)piperidin-4-il)metil)-2-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)acetamida (MF1083) (a38).



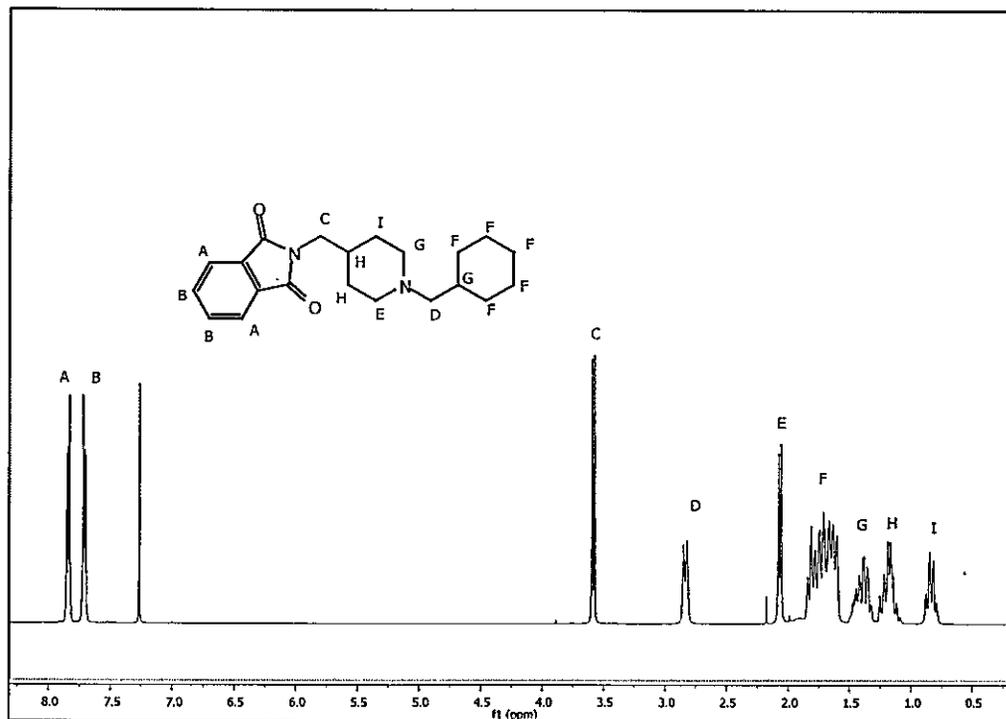
RMN-¹H ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) propanoico
(a40)



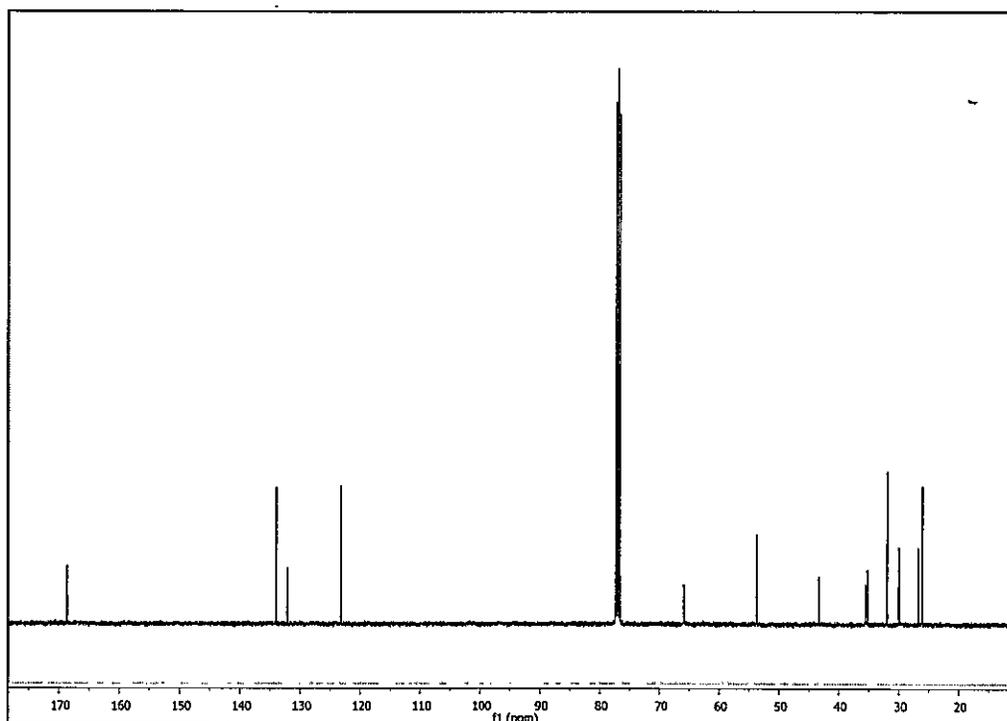
RMN-¹³C ácido 3-(6-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il) propanoico
(a40)



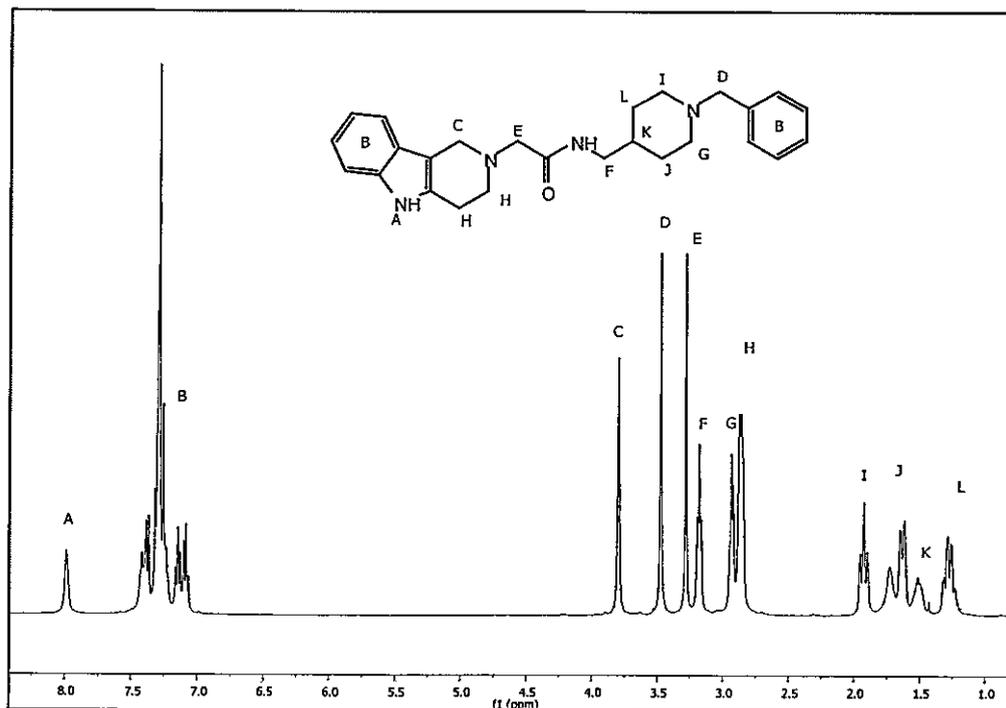
RMN-¹H 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (MF1056)
(a43)



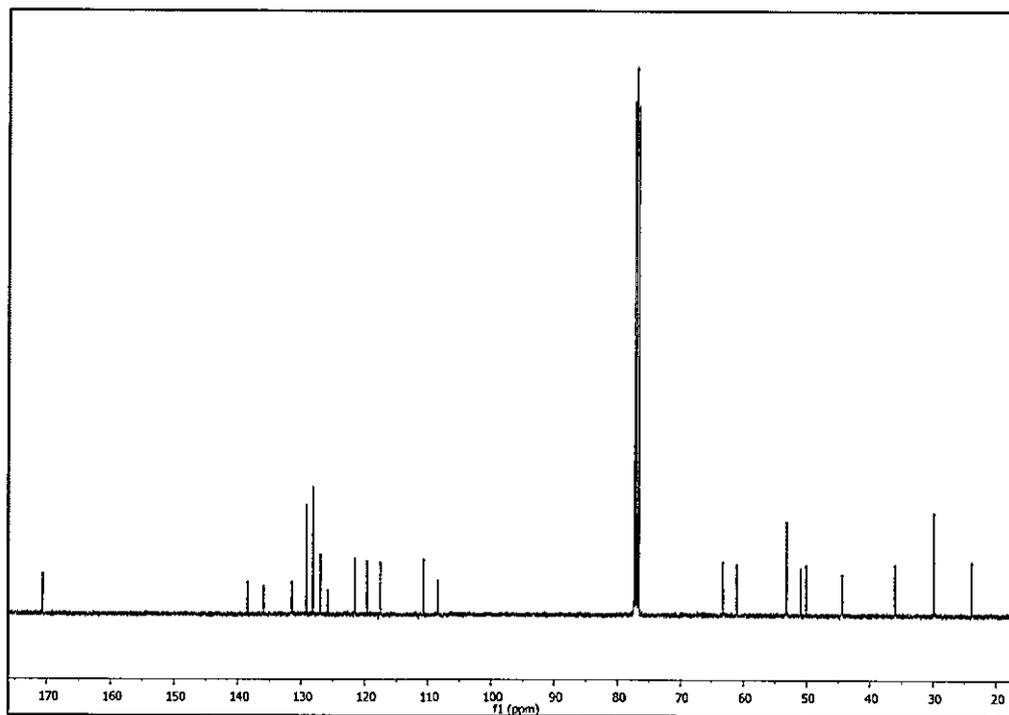
RMN-¹³C 2-((1-(ciclohexilmetil)piperidin-4-il)metil)isoindolin-1,3-diona (MF1056)
(a43)



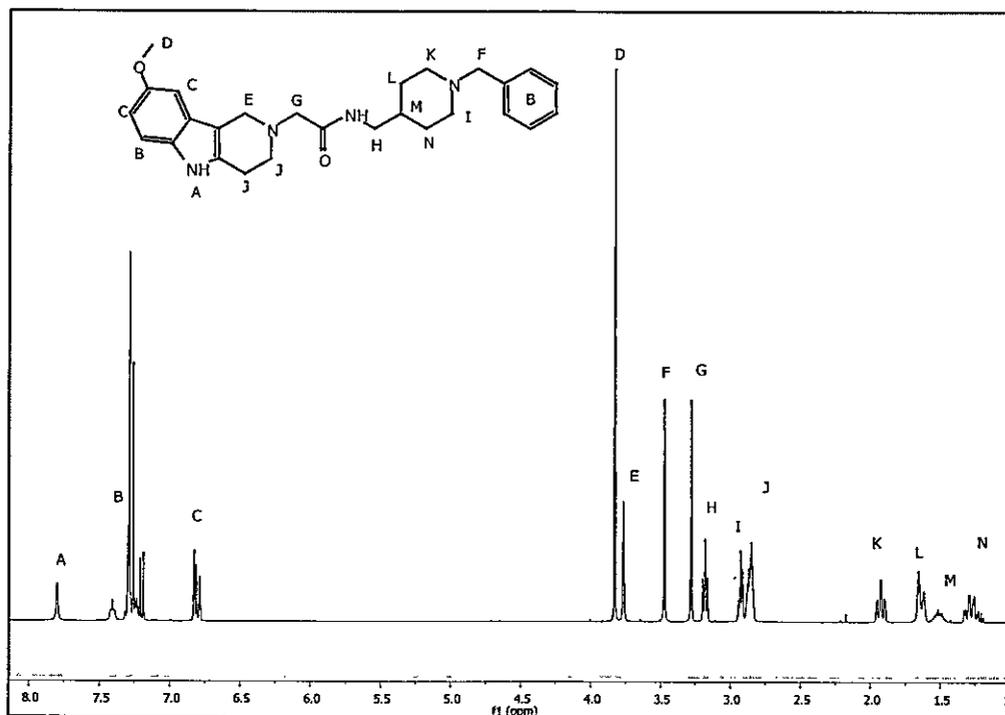
RMN-¹H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol-2(5*H*)-il)acetamida (MF1053) (a44)



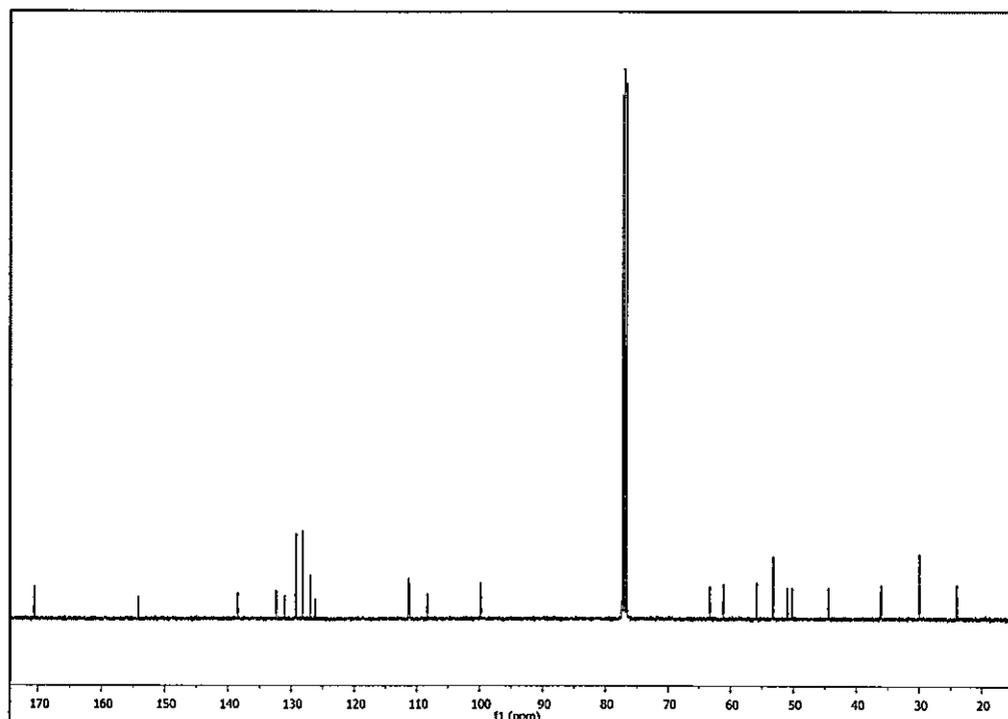
RMN-¹³C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(3,4-dihidro-1*H*-pirido[4,3-*b*]indol-2(5*H*)-il)acetamida (MF1053) (a44)



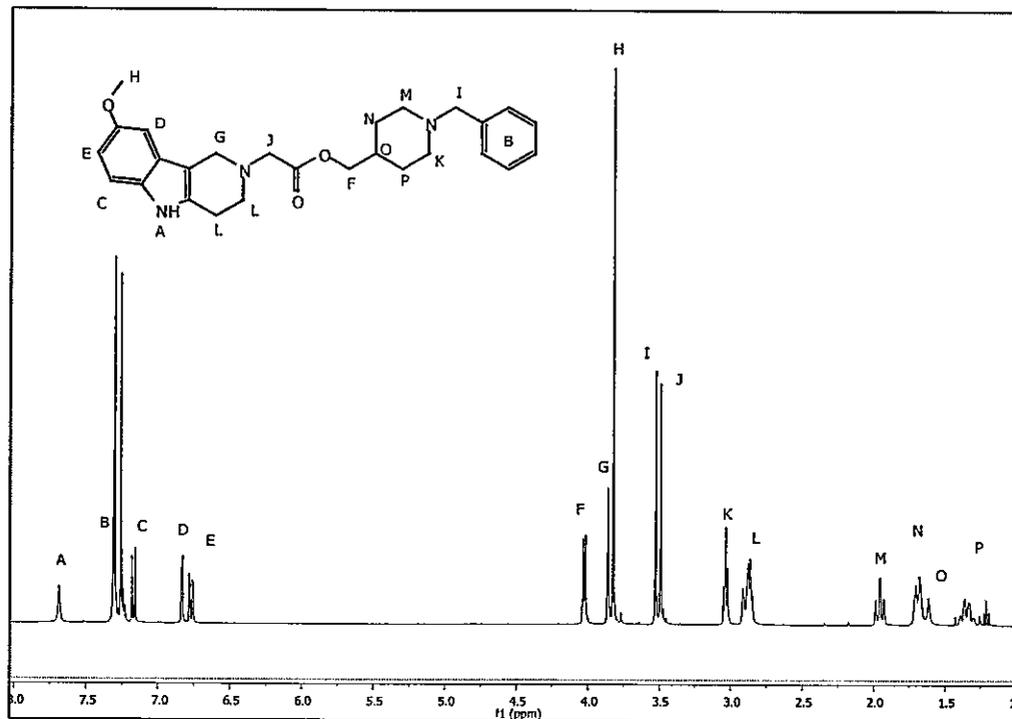
RMN-¹H N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetamida (MF1062) (a45)



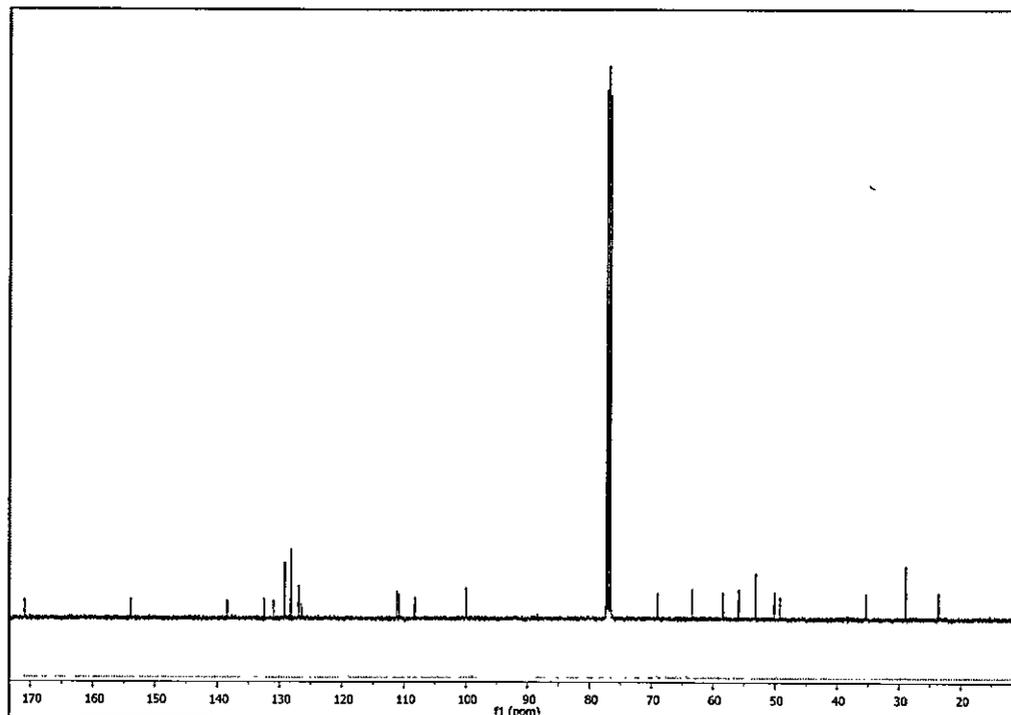
RMN-¹³C N-((1-bencilpiperidin-4-il)metil)-2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetamida (MF1062) (a45)



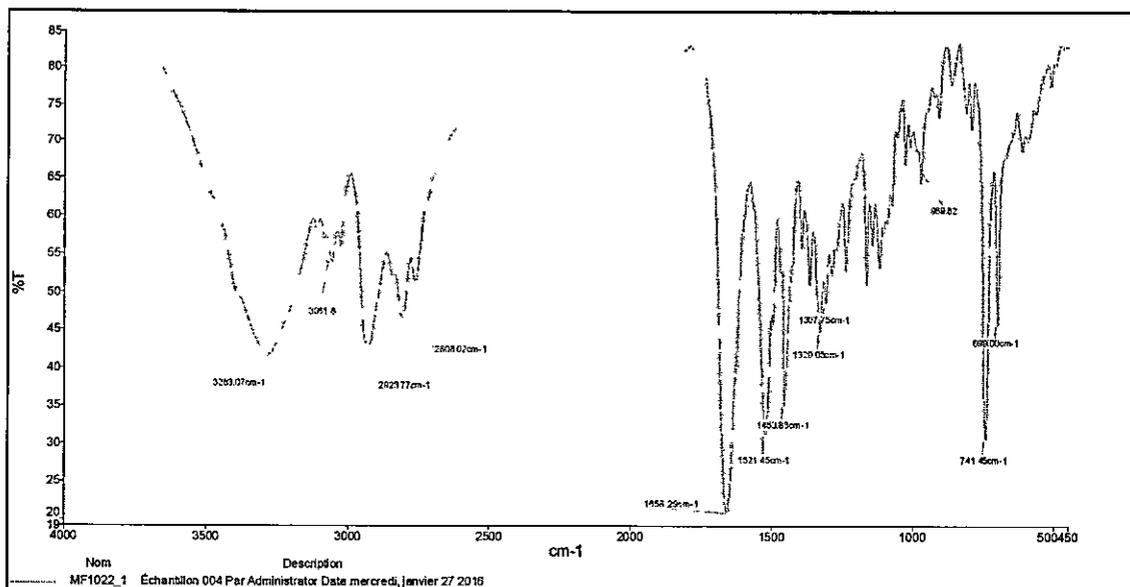
RMN-¹H 2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (MF1061) (a46)



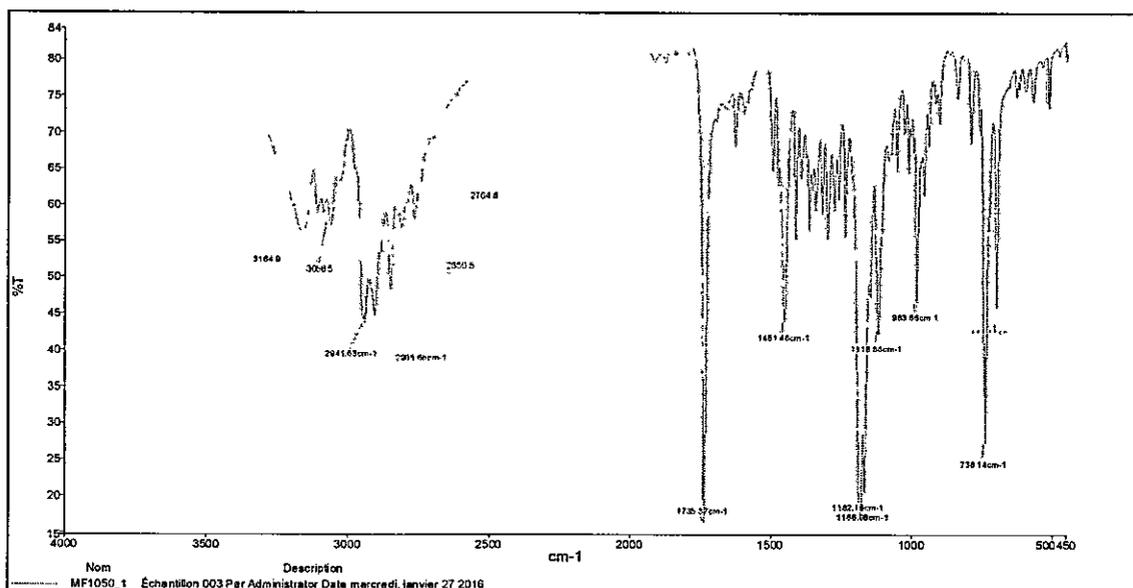
RMN-¹³C 2-(8-metoxi-3,4-dihidro-1H-pirido[4,3-b]indol-2(5H)-il)acetato de (1-bencilpiperidin-4-il)metilo (MF1061) (a46)



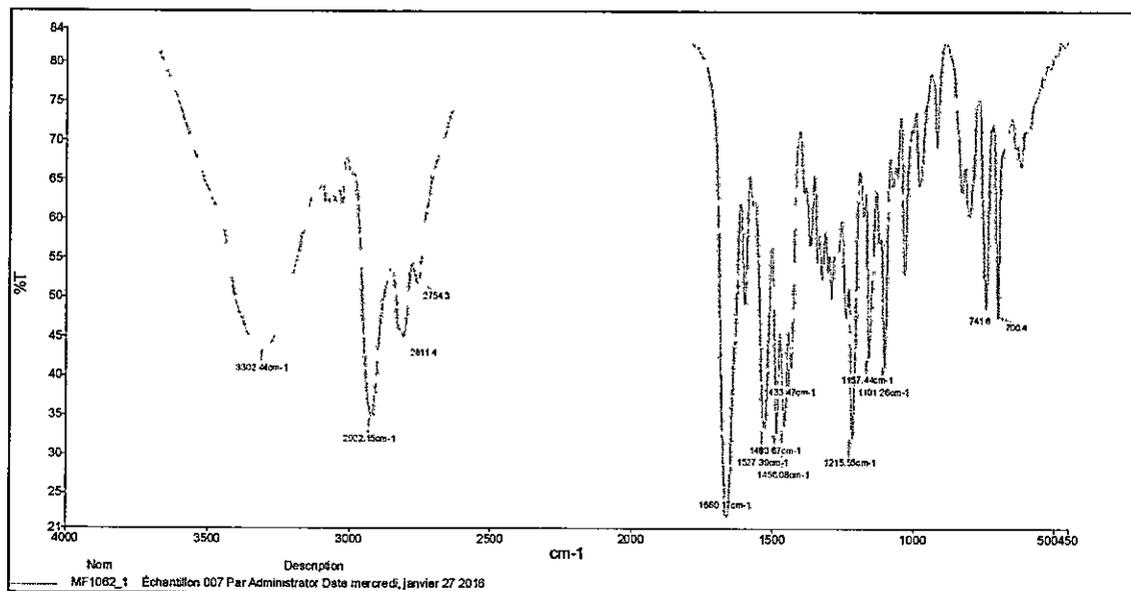
Espectro IR MF1042



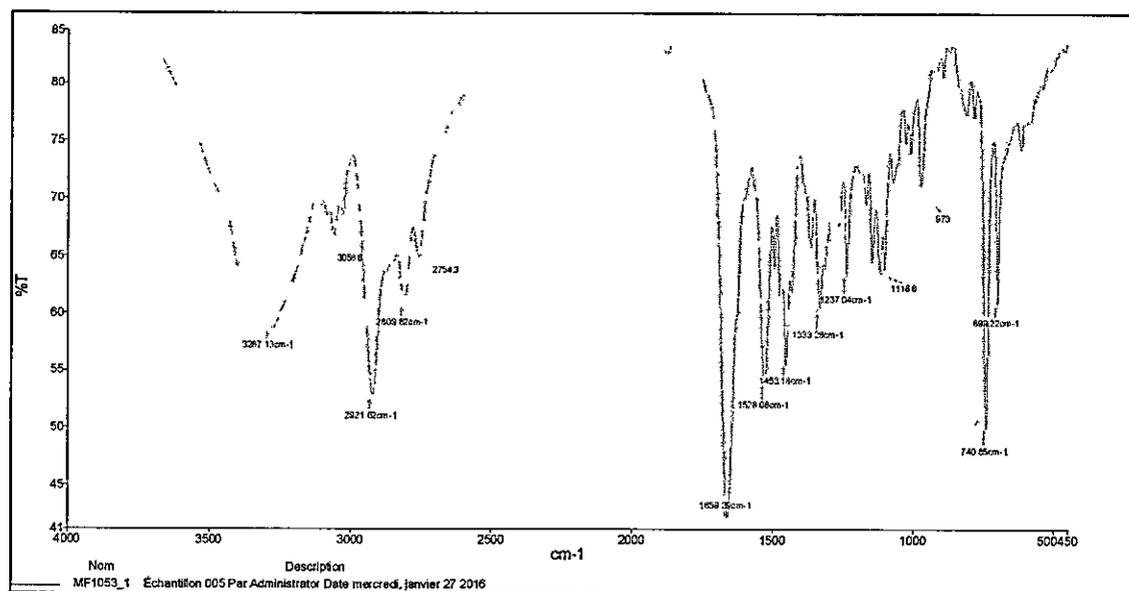
Espectro IR MF1050



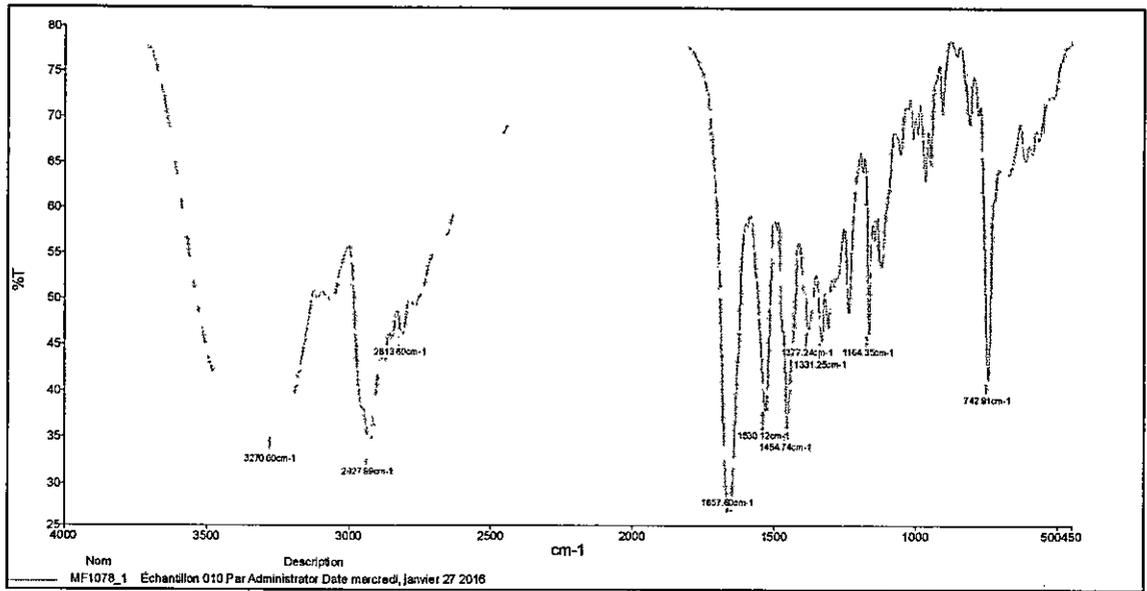
Espectro IR MF1062



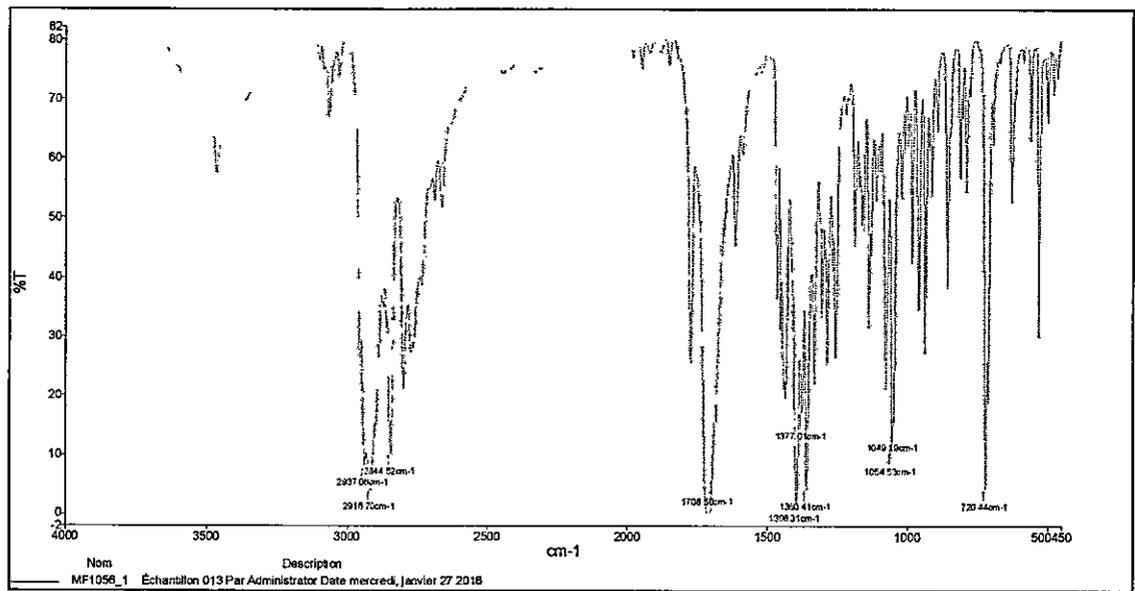
Espectro IR MF1053



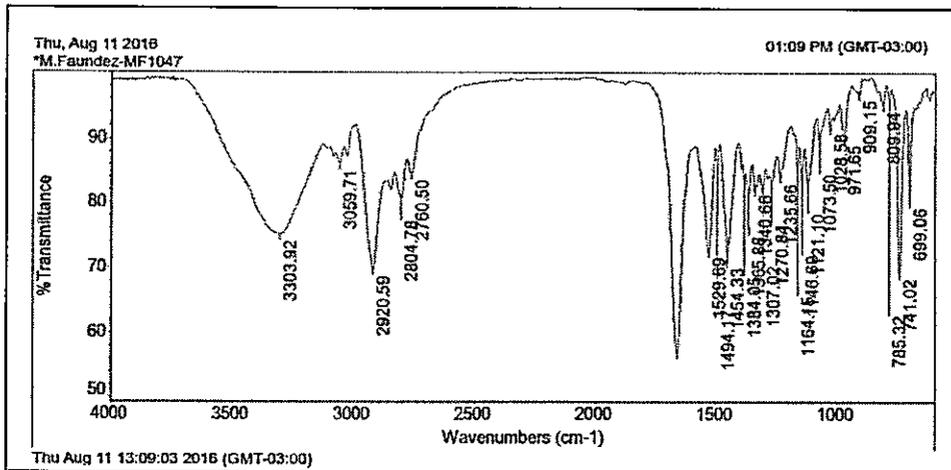
Espectro IR MF1064



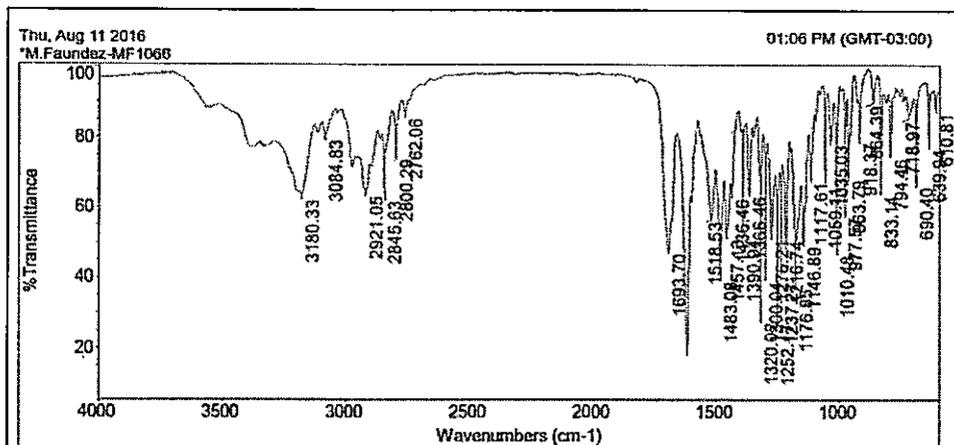
Espectro IR MF1056



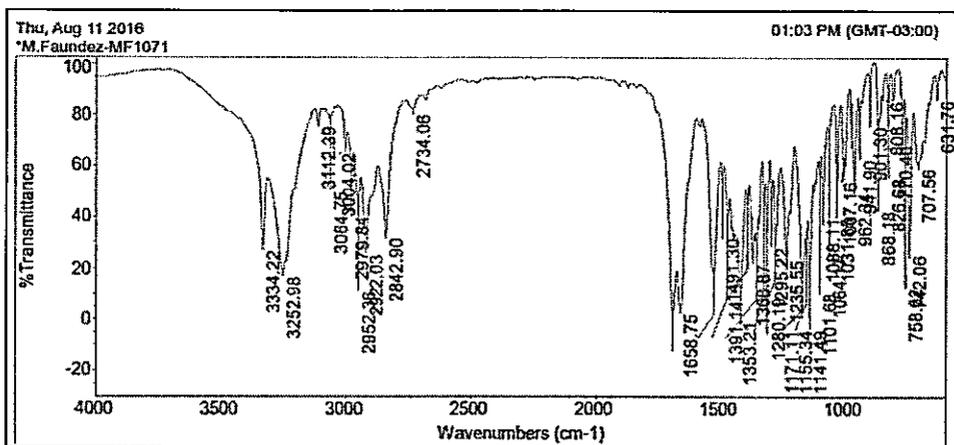
Espectro IR MF1047



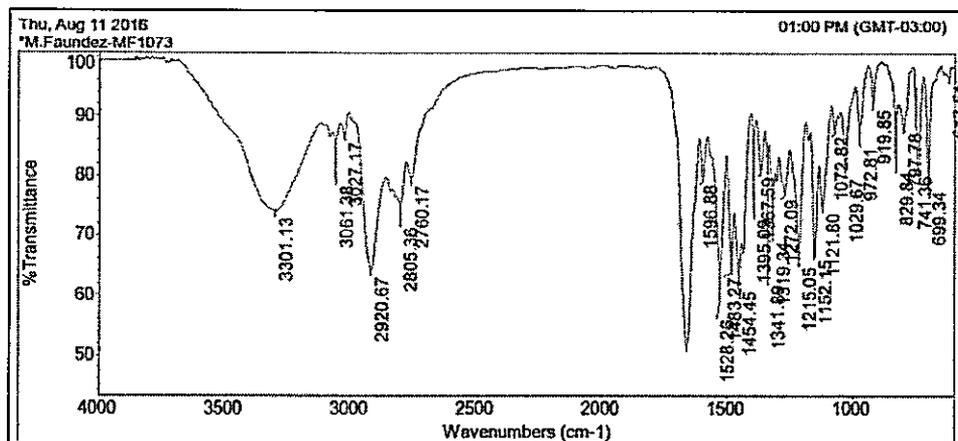
Espectro IR MF1066



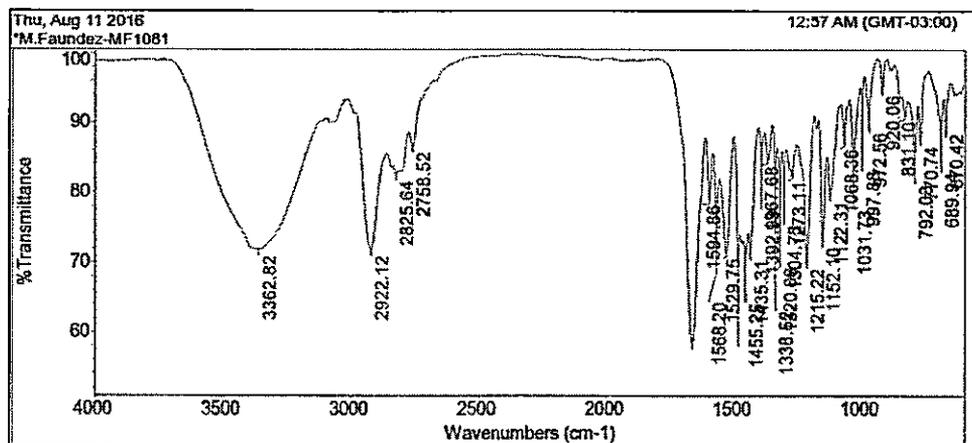
Espectro IR a22



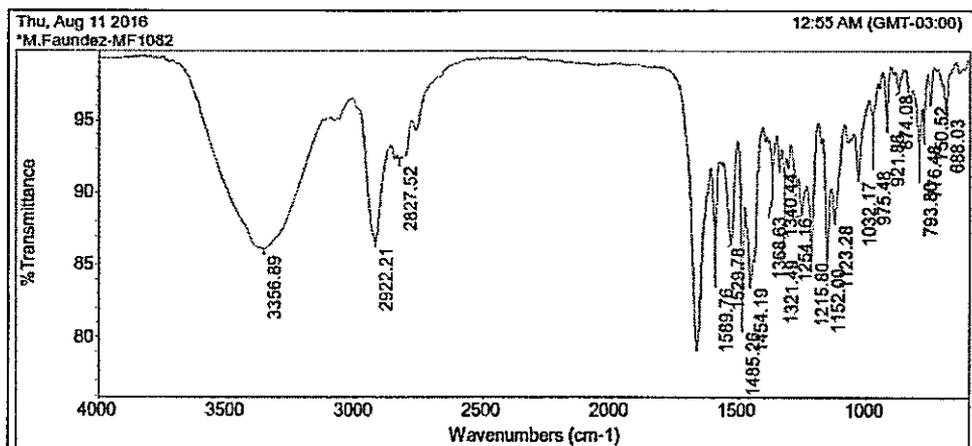
Espectro IR MF1073



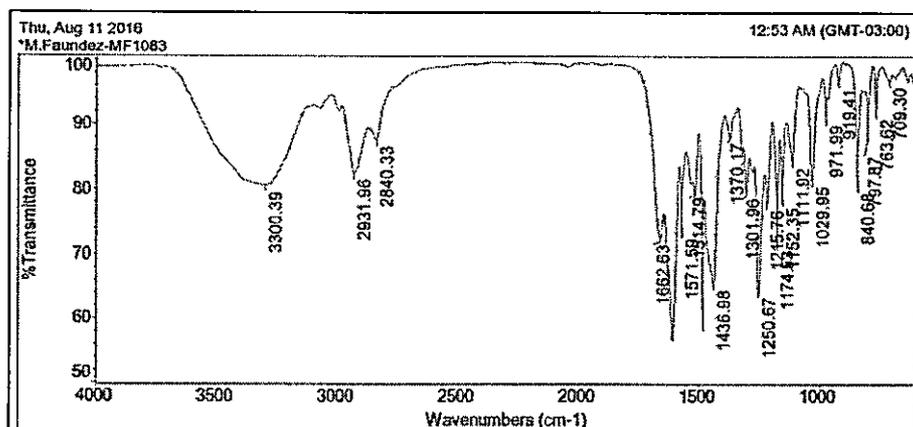
Espectro IR MF1081



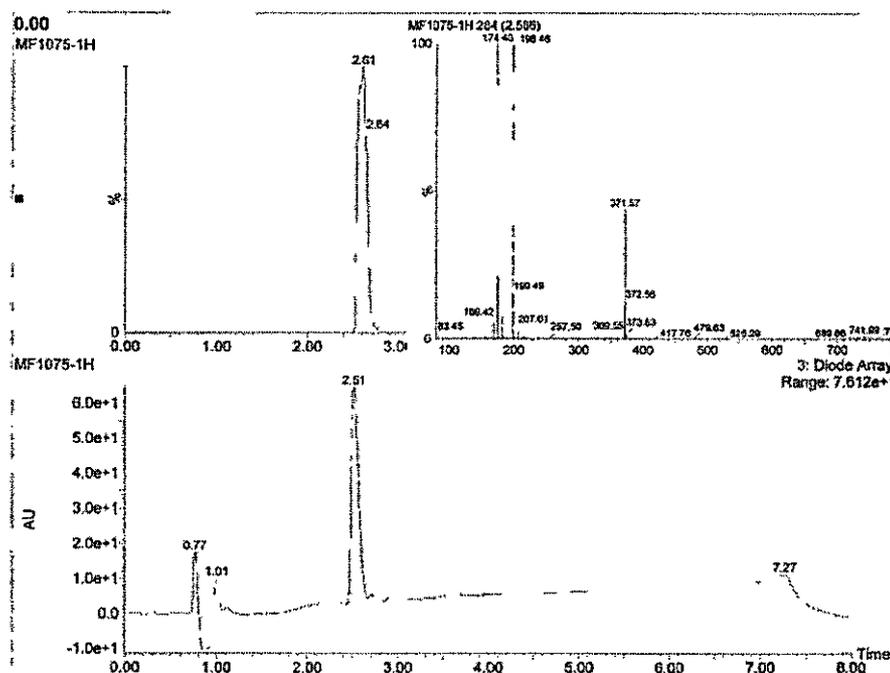
Espectro IR MF1082



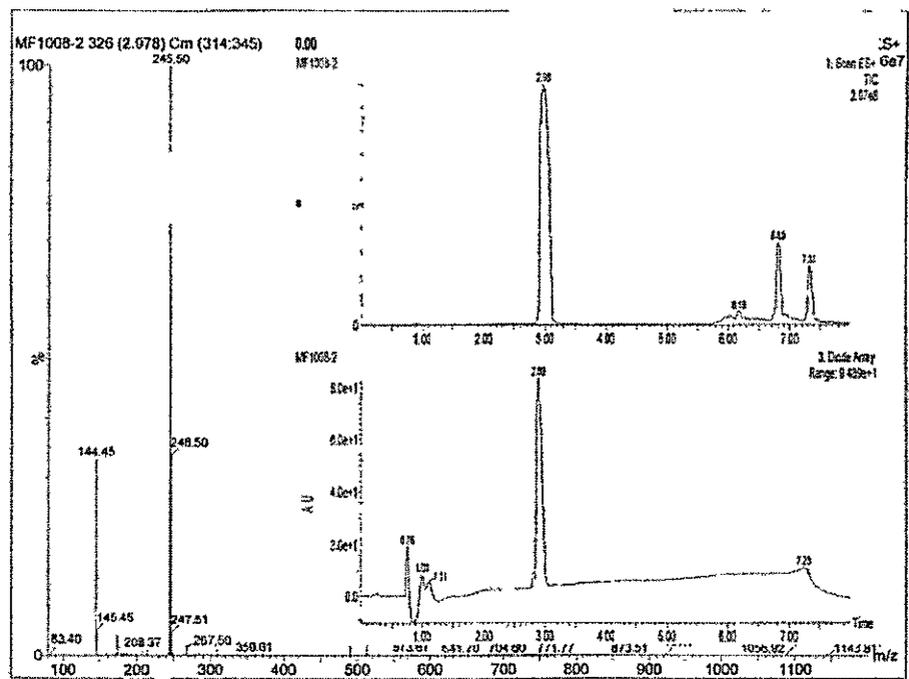
Espectro IR MF1083



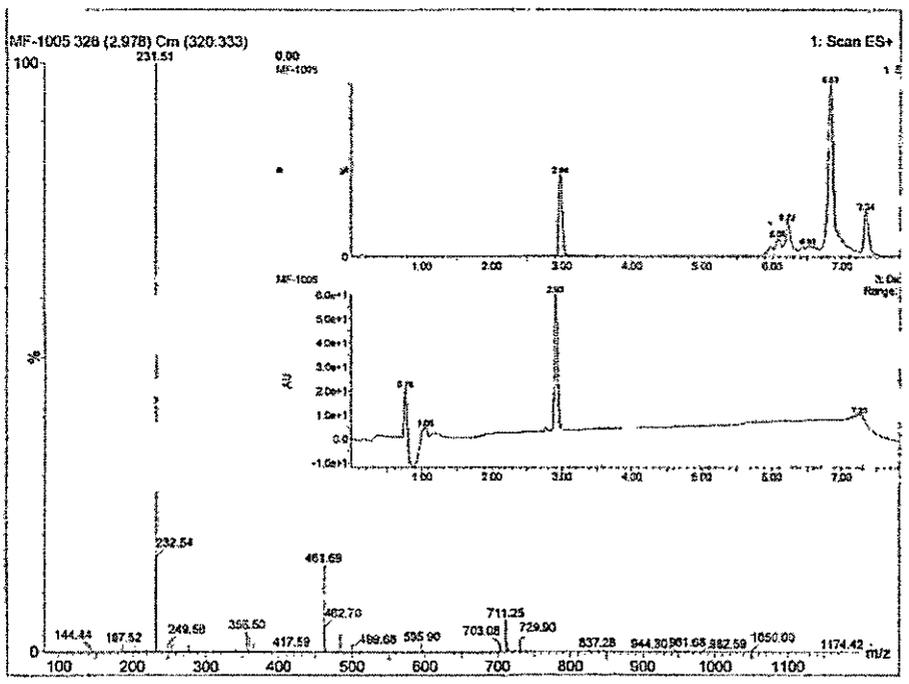
Espectro de masa a25



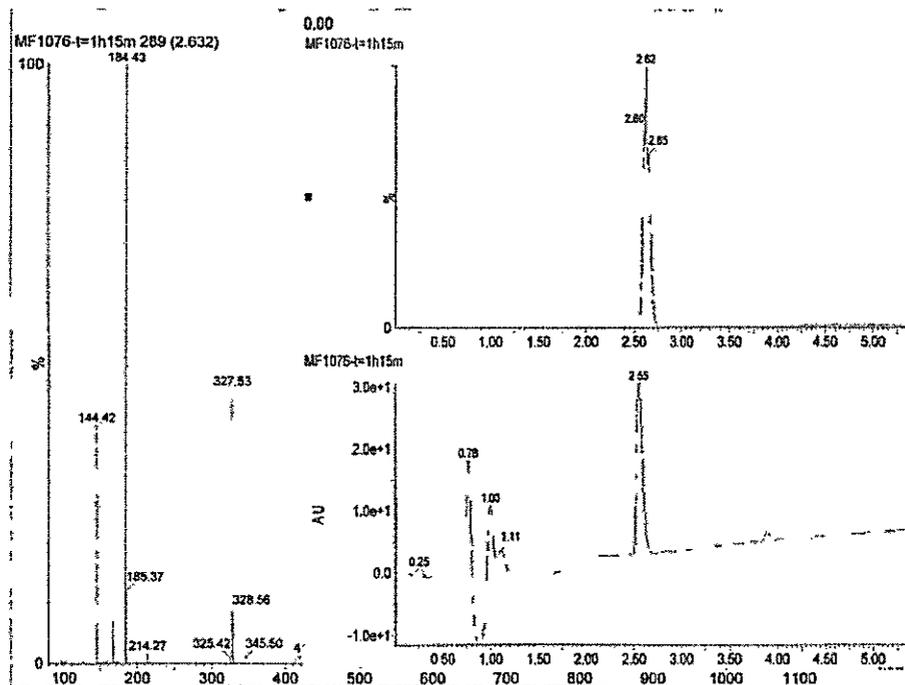
Espectro de masa a3



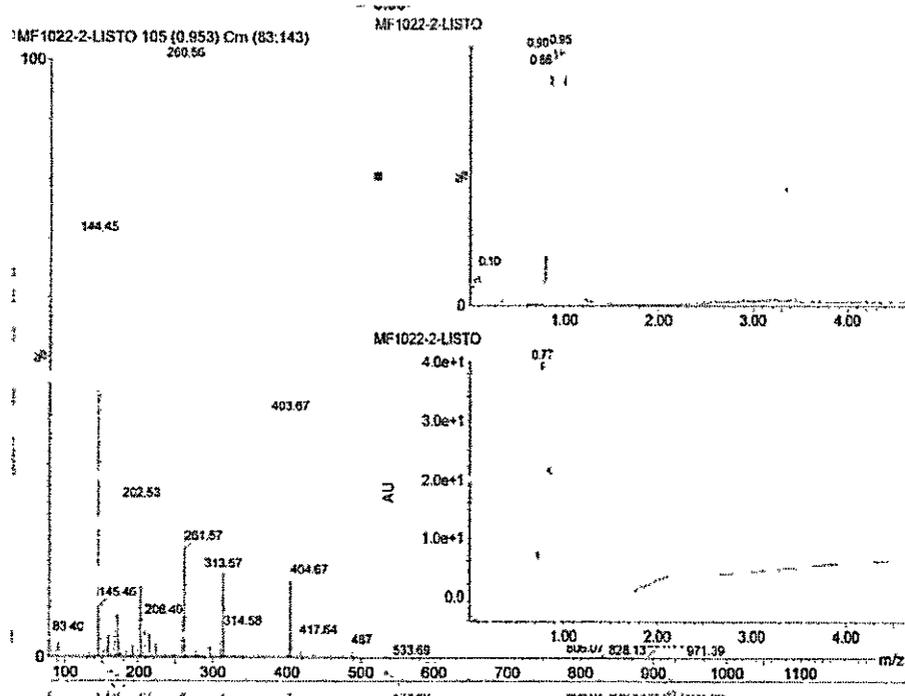
Espectro de masa a4



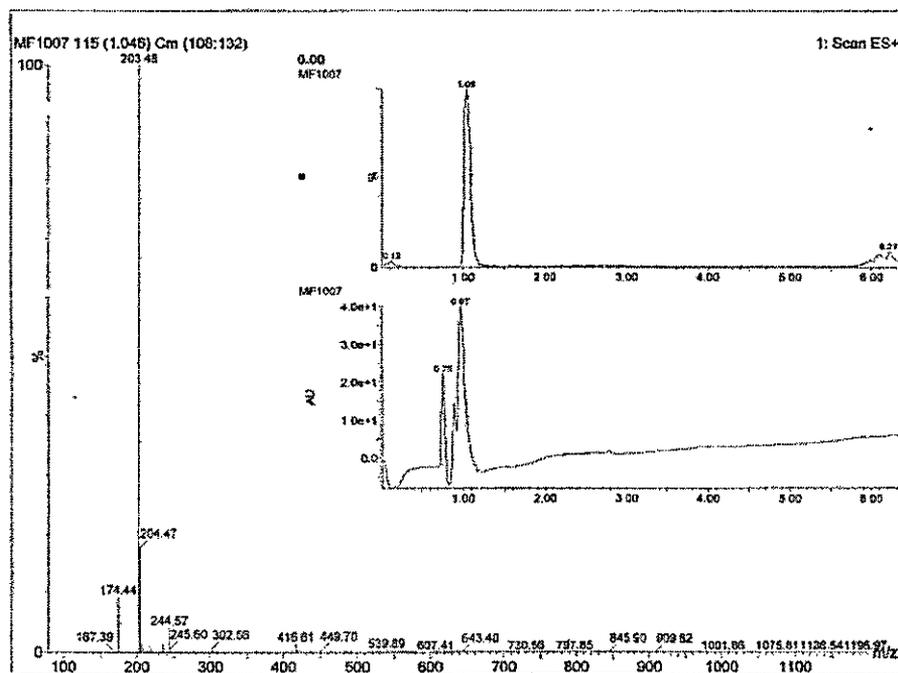
Espectro de masa a24



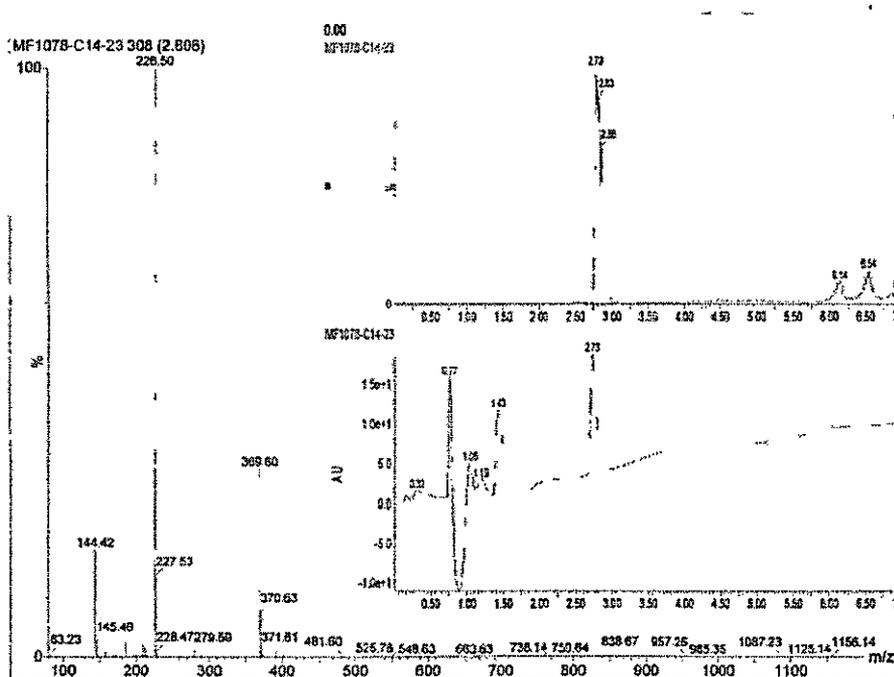
Espectro de masa MF1042



Espectro de masa a6



Espectro de masa MF1064



Espectro de masa MF1047

