



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollos metodológicos en la exploración de la especie bioactiva en fármacos: Búsqueda de agentes antimaláricos

Antonio Viayna Gaza

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Programa de Doctorat en Biomedicina

*Desarrollos metodológicos en la
exploración de la especie bioactiva en
fármacos: Búsqueda de agentes
antimaláricos*

Antonio Viayna Gaza
Santa Coloma de Gramenet, 2019



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Programa de Doctorat en Biomedicina

*Desarrollos metodológicos en la
exploración de la especie bioactiva en
fármacos: Búsqueda de agentes
antimaláricos*

Memoria presentada por Antonio Viayna Gaza
para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Dr. F. Javier Luque Garriga
Director

Dr. F. Javier Luque Garriga
Tutor

Antonio Viayna Gaza
Doctorando

Antonio Viayna Gaza
Santa Coloma de Gramenet, 2019

*A la meva família, la que va estar, la actual i la nova,
pel vostre amor incondicional i immutable.*

¡Ultreia et Suseia!

AGRADECIMIENTOS

Y así sin darme cuenta, ya han pasado 5 años desde que decidí empezar mi tesis, cuando conceptos como terminal, pozo conformacional, bash o “lanzar una dinámica” me parecían de otro planeta. Fue entonces, cuando, entre dudas y nervios, pero con ganas y motivación, decidí montarme en este “montaña rusa” de emociones, denominada tesis doctoral. He conseguido llegar a la meta propuesta, pero obviamente, este camino no lo he hecho sólo, he ido encontrando personas, que en mayor o menor medida me han permitido conseguirlo, haciéndome crecer como profesional y como persona. Por ello, quiero empezar con un MUCHAS GRACIAS A TODOS, sin excepción, a los que conocí antes, durante o después de la tesis doctoral, desde los que habéis creído en mí hasta los que no, y en general a todos aquellos que me habéis hecho aprender algo durante este viaje, ya sea positivo o negativo, pequeño o grande, todos sois parte de este proceso y soy lo que soy actualmente gracias a vosotros.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el profesor Francisco Javier Luque Garriga, sin él este objetivo hubiera sido infinitamente más difícil. Gracias Javi por todo lo que he podido aprender de ti en estos 5 años, por ser un excelente investigador, y profesional, un apasionado de tu trabajo, pero por encima de todo, ser una persona cercana y humana.

També vull agrair als altres *group leaders* del *CBDD group*, els professors Xavier Barril i Carles Curutchet. Moltes gràcies Xavi pels teus consells al *group meetings* i retreats, pels teus consells als projectes que compartim. Gràcies per mostrar-nos les coses tal com son i potenciar la nostra professionalitat. Gràcies “*Curu*” pels teus coneixements i ajudes en el complexe i sovint inexplicable mon del QM, per anar plegats a congressos a llocs inòspits (Helsinki, Mariapfarr, etc), per trobar espais sempre per resoldre qualsevol problema i per tenir sempre un somriure a punt davant les dificultats.

També vull agrair a tots els professors que vaig coincidir a la meva primera etapa del doctorat al Campus Diagonal de la Facultat de Farmàcia. En especial al Prof. Ramón Pouplana, per les seves aparicions sobtades al pis de adalt per dir-nos “Anem a dinar?”, pels seus consells en el disseny de la portada, les seves calçotades a Can Taps i per la seva peculiar visió de vida. També gràcies al Prof. Josep María Campanera “*Campa*”, per tenir al teva ajuda sempre a punt i especialment pels teus consells a l’hora d’intentar fer rutilar els MSM.

El meu agraïment continua, per aquells professors i investigadors, amb qui he tingut el plaer de coincidir en la segona part de la tesis al Campus de Torribera, tan aquells que han format part del meu grup de recerca, com aquells d’altres equips presents al Departament. Més concretament, gràcies al Dr. Axel Bidon-Chanal, pels teus consells computacionals i scripting, els teus coneixements de ordinadors i per encarregarte que el nostre cluster funcionés correctament (malgrat que “*Marc*” decidís deixar de funcionar molt sovint). Dirigeixo un agraïment especial a la Dra. Carolina Estarellas. Infinites gràcies pel teu temps, pels teus coneixements, la teva infinita paciència, per ser una gran professional, per ensenyar-nos a ser tant metòdics i en resum per fer-nos una mica de “*mare computacional*” en moltes ocasions. Gràcies de tot cor. Tambien quiero agradecer a la Dra. Tiziana Ginex, por los consejos y debates computacionales, aunque muchas veces también culinarios, como todo buen italiano (café, pizza, etc.)

Tornant altre cops al Campus Diagonal, vull fer un agraïment a tots aquells amb els que vaig començar la difícil i incerta aventura que es diu Tesis Doctoral. Per començar, vull fer un agraïment especial al Dr. Jordi Juárez-Jiménez, per ser una de les persones que em va fer aprendre més als inicis d'aquesta tesis (i encara avui), quan la química computacional era quelcom estrany per mí, també per la paciència que vas tenir i, per haver-te convertit en un referent per mí durant aquests anys (i ho dic de debó, malgrat que em diràs que soc un pilota!). De la mateixa forma, moltes gràcies a la Dra. Salomé Llabrés, per ajudar-me tant, per tenir un SI sempre que et demanava consell i ajuda, però sobretot per fer fàcil el integrar-me ràpid al grup. També per aconsellar-me noms chulos de ordinadors que substituïssin al "Mac Book Pro de Antonio". Sempre us tindrè molta estima a Jordi i tu. Moltes gràcies a la Dra. Marina Corbella, pels teus consells de pK_a 's, les hores de practiques plegats a Torribera, i per escoltar els meus moments dramàtics alguns dies, però també pels congressos a Finlàndia i Àustria, per "les Gavatxones" i les disfresses de "Viancops". Espero que tingueu molta sort amb el Sergi i el Roc a Uppsala. Muchas gracias también a la Dra. Ornella Di Pietro. A pesar de que ya nos conocíamos de mucho antes de empezar esta tesis (cuando apenas hablabas castellano y hacías reacciones de Povarov), gracias por tu ayuda y consejos, pero también por las "esssssss" larguísimas, por tus pizzas buenísimas, y sobretodos por inventar y difundir el idioma Ornelliano y aprender el concepto del verbo ornellizar. También, *Obrigado* a la Dra. Sylvana Pinheiro, o también conocida como la *garota rosa* o la *Mae de Iara*, por hacerme más fácil la integración en mis inicios en el grupo con todos vosotros y ser una gran compañera de trabajo. Me alegro mucho de la familia que estáis creando con Will! Gràcies a la Sonia Romero, alias *Soniafan*, que malgrat coincidir poc temps, vaig aprendre molt de tú, gràcies pels consells de Python, els teus coneixements computacionals, les xerrades i els cafés de maquina i del "Juan".

Gràcies també a aquells que vau estar poc temps però vau deixar la vostre empremta de sorra: gràcies Lluç, per tenir tantes ganes de aprendre i per tenir paciència quan vas ser el meu primer estudiant i encara estava aprenent com anava això del Multilevel. *Merci beaucoup Téo, pour pour tes mois ici, pour être une si gentille personne et pour nous avoir montré tes connaissances musicales.* Muchas gracias también Miguel Angel, por los meses aquí en Barcelona, una gran presentación de Máster y espero que todo te vaya genial por Granada.

Moltes gràcies també al llarg i extensa llista de membres del grup de recerca del Prof. Xavier Barril, a aquells que ja no están: Sergi, Dani, Montse, a les *Minoryx*: Aida, Elena i aquells més recents: Miriam, Morena, Moira, Maciej, Serena, Salvo, Guillermo, Marina, Álvaro, etc.

Retornant al Campus de Torribera, vull agrair aquells companys de feina amb qui he passat més temps en aquell campus. Tan aquells del meu grup, com aquells Post-docs, PhD, Master, etc d'altres grups de recerca. Incloent-hi els estudiants amb qui he tingut la sort de compartir hores de classes i practiques.

Anant més al detall, vull començar amb un agraïment especial al Dr. Constantí Seira, el meu principal company de despatx (al 15 i al 6), durant una bona part d'aquesta tesis. Moltes gràcies per ajudar-me de forma incondicional, per aguantar els meus moments *darks* i per fer-me de psicòleg de guardia en moments difícils. Tinc el convenciment que has passat de ser un bon company a un bon amic amb el que "acumular moments", més enllà d'aquesta tesi. Muchas gracias al Dr. William Zamora, otro de mis compañeros de

despacho durante gran parte de estas tesis, desde los inicios en Farmacia hasta ahora en Torribera. Agradezco mucho tu facilidad y disponibilidad para ayudarme en cualquier duda o problema, por ser un gran profesional, una persona tan constante y por todos los conocimientos que me has transmitido. También por ser uno de los co-fundadores del F.O. con Consta, por todas las bromas e historias compartidas por los tres y por ser nuestro *Titán Latino* y *Tico* favorito. Muchas gracias a Javi Vázquez (aunque quizás a estás alturas estarás a punto de ser Dr.), alias el *Pharmacelerado*. Muchas gracias por ser un apasionado y loco de tu trabajo, por tus ganas y motivación como compañero de prácticas y también por tu ideas y ganas de mejorar. Ha sido un placer trabajar contigo. Podemos al final decir ya: *Conseguido!*

Thank you to Elnaz Aledavood. Aunque esta parte la voy a poner en castellano, para que así puedas practicar tu super nivel de español: Muchas gracias por ser una gran compañera, por quererte integrar tan rápido al grupo, por ser un chica tan metódica y profesional y por entender el sentido del humor que tenemos los locos del despacho 6 (antiguo 15). Gracias también a Shahin, por poder compartir con vosotros cenas y cervezas (sin alcohol) todos los Torriberos juntos. Muchas gracias a David Vílchez, alias *Broncano* (después de una larga lista de mote que Consta decidió ponerte), por ser un gran impulso para nuestro proyecto de Malaria, por trabajar de forma fluida en equipo y por tener la suerte de poder codirigir mi primera tesis de Máster contigo. También por las birras y cenas de viernes con todo el grupo, con alguna incursión a tu territorio Marina. Muchas suerte a los dos en vuestras respectivas tesis! Moltes gràcies també a la Laia Julió (amb accent a la ó, ni Julio, ni Julío), gràcies per ser una “muchahota”, membre a la sombra del F.O. i per deixar-nos sorpresos amb el teu accent argentí. Una forta abraçada a tú i al Fede (Pedrón).

Muchas gracias también a aquellos que a pesar de estar poco tiempo en el grupo, habéis dejado en mayor o menor parte un huella en mí. Lo siento si me dejo a alguien por el camino. *Grazie Giulia Medici, per il tuo lavoro e professionalità in i pochi mesi che sei stata con noi è un ringraziamento speciale per farè tanto felice al mio amico Consta (P.S. Pazienza con lui! Haha) In bocca al lupo per tutto! Grazie a Salvatore Antermite (alias Jürgen Klopp) per avere stato una bella oportunità di codirigire una tesi de laurea e per esserè tanto preciso e curioso in il nostro progetto de pK_a. Ha stato un piacere lavorare insieme a te. Grazie a Emanuele e Alessandro (il secondo Pharmacellerado), il duo di sardi, per i vostri conocimiento di sMD, docking e altre cose che non sono relazionate con la ricerca...Grazie Eleonora, non abbiamo stato insieme in il grupo molto tempo, ma ti ringrazio per avere cuidado tanto il mio computer quando sono stato a Madrid, per i tuoi momento pazzi e dramaqueen e... Ciao Pescao! In bocca al lupo a tutti!* Muchas gracias Fede, por las distintas visitas que hiciste a nuestro grupo, por los vinos y cervezas juntos y por cuidar también junto a Elenora de mi computer. Espero que nos veamos pronto! Moltes gràcies també a la Irene, pels seus moments *pavos* i el cotilleos als dinars i cafés. Muchas gracias a Natalia y mucha suerte ahora que empiezas esa nueva etapa de madre. Muchas gracias Camila, por que a pesar de estar poco tiempo en el grupo, pudimos compartir momentos agradables (tus dulces caseros y y no tanto (homocisteina!!)). Thank you Ahmed, for being a hard worker and motivated person in your projects! Good Luck! Grazie anche a Carmine (alias Carmain), *il nostro napoletano preferito. Grazie a Stella, per il nostro lavoro insieme e per essere innamorata da la mia città, Barcelona.*

A pesar de que no han formado directamente parte de mi tesis doctoral, quiero hacer un agradecimiento especial a los profesores Pelayo Camps, Santí Vázquez, Carmen Escolano y especialmente, al profesor Diego Muñoz-Torrero, por haber sido mi puerta entrada y primer contacto con la investigación. Gracias por haber confiado en mi hace casi 9 años, cuando decidí hacer un trabajo dirigido en la Unitat de Química Farmacèutica, más adelante en 2012 con la beca de colaboración y por ayudarme en la búsqueda para realizar mi tesis doctoral. Moltes gràcies també a tota la gent que vaig poder coneixer en aquells anys i amb qui de forma més o menys continuada he pogut mantenir contacte i una bona amistat (ho sento si em deixo a algú!): Irene, Eva, David, Ane, Rosana, Tània, Matu, Melen, Javi Illo, Marta Barniol, Arnau, Marta Frigolé, Paye, Matteo, Mattia, Albert, Enric, etc. i també a les més noves: Katia, Andrea, Eugenia i Sandra.

Muchas gracias también a aquellos que conocí en mi estancia en Madrid, lo que permitió tener una bonita experiencia en la capital y adquirir nuevos conocimientos. Gracias a Chema, Antonio, Amalia, Mila, Armando, Dario, Erika, Isa, Susi, Paloma, Sandra, Laura y Ayalén.

Ja acabant, vull fer el agraïment més gran a la meva família, pel vostre amor i suport incondicional, tan la que va estar, com la actual, com aquella nova més recent. Al meu nucli més important: Moltes gràcies Papà, per no haver-me fallat mai, estar en les dures i les madures i per gaudir el món plegats amb unes bambes posades. Moltes gràcies Mamà, per ser una de les persones que millor em coneix i per seguir sent aquella *maga* que mirant-me als ulls sap que em passa. Moltes gràcies Carles, per ser el meu primer *jefe* en el món de la investigació, per ser sempre crític i per exercir moltes vegades com un germà gran per mi. Moltes gràcies Eli, perquè desde sempre, encara ara i fins sempre, exercir com a una germana gran exemplar, per ser el meu referent i per dir-me les coses clares quan més ho necessitava. Obviament, també moltes gràcies al *nou membre del equip*, el Pol, que ara mateix no podràs entendre el que et dedico, però amb els anys ho podràs fer i també entendràs el molt que t'estimo. Moltes gràcies família, us estimo molt!

Finalment, vull fer la agraïment més especial a la Cris. Perquè malgrat has aparegut al tram final de la meva tesi, n'has acabat sent una de les parts més importants. Gràcies per la teva infinita paciència en els meus dies de més nervis, per fer-ho tot absolutament fàcil, per ser un equip que treballem a la perfecció i per coneixem tant, molts cops més del que em conec jo a mí. Tinc moltes ganes de seguir "acumulant moments" amb tú. T'estimo!

Resumen

La presente tesis doctoral se divide, de forma general, en dos principales vertientes, una de carácter metodológica y otra de carácter aplicada.

La primera de ellas se ha focalizado en la caracterización de la especie bioactiva, comprendiendo en particular el estudio metodológico necesario para identificar tanto el estado de ionización (pK_a) como la diversidad conformacional de ligandos tipo fármaco, pasando por aspectos tautoméricos. Para ello, se han utilizado diversas metodologías. En primer lugar, la aproximación Multinivel, anteriormente implementada en el grupo, se ha aplicado a un conjunto de 50 moléculas, siendo por tanto una muestra más grande en comparación con anteriores estudios del grupo. En concreto, se ha concentrado en la correcta estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva, lo que ha permitido ver que la penalización conformacional es de forma general relativamente baja ($< 2,0$ kcal/mol), así como determinar el término entrópico y entrópico de dicho coste, detectando el mayor impacto del primero y la importancia de tomar en consideración el segundo. En segundo lugar, se han probado diferentes esquemas computacionales basados principalmente en métodos de mecánica cuántica, que combinan diversos niveles de teoría así como bases de distinta flexibilidad así como cálculos en fase gas con modelos continuos de solvatación. Ello ha permitido obtener una estimación muy exacta del valor de pK_a de diferentes tipos de moléculas, lo que ha supuesto correlacionar el estado de ionización con el grado de actividad de un grupo de nuevos análogos huprina-reína. Finalmente, ambas metodologías se han combinado para poder examinar el efecto de las modificaciones estructurales introducidas en una serie de derivados éster de tetrahydrozocinas, donde se ha examinado el impacto de un equilibrio entre formas tautoméricas sobre el estado de ionización, y a su vez sobre su especie bioactiva en condiciones fisiológicas.

En la segunda de ellas, se han centrado esfuerzos en la búsqueda de nuevas estructuras con capacidad de inhibir de forma selectiva el enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Plasmodium falciparum* (PfG6PD). Concretamente, el estudio se ha basado en un modelo de homología de secuencia, que puso de relieve la existencia de una diferencia fundamental, correspondiente al cambio de Arg750 en el enzima humana por Asp en PfG6PD, lo cual permitió diseñar una serie de análogos de sustrato con actividad

inhibidores frente a esta enzima. Siguiendo dichos estudios, gracias al uso de diferentes técnicas de computacionales, se ha realizado una búsqueda de nuevas estructuras tipo fármaco con potencial actividad inhibitora frente a *PfG6PD*. En particular, se ha conseguido determinar un potencial modo de unión de dos compuestos descritos en la literatura con actividad submicromolar, y por otro lado, la combinación de métodos de cribado virtual y técnicas farmacológicas han permitido avanzar en la selección de diferentes compuestos con una prometedora actividad frente a la cepa DD2 de *P. falciparum* y potencial actividad frente *PfG6PD*.

Summary

The present doctoral thesis is focused, in a general way, on two major aims, one dealing with methodological refinement to address the identification of the bioactive species, and the other consisting in the application of drug-design techniques to the development of antimalarial compounds.

The methodological studies have been focused on the characterization of the bioactive species, comprising both the identification of the ionization state (pK_a) and the analysis of the conformational flexibility of drug-like ligands, including also tautomeric equilibria. To this end, a variety of computational techniques have been exploited and refined. First, the Multilevel methodology, previously implemented in the group, has been applied to set of 50 molecules, which enlarges the sample considered in former studies. In particular, this study has addressed the correct estimation of the conformational cost required to access the bioactive conformation, which has allowed to conclude that the conformational penalty is generally relatively low (<2.0 kcal/mol), as well as to decompose the conformational cost into its enthalpic and entropic contributions, detecting the greater impact of the enthalpic contribution in most cases, as well as the need to take into account the entropic component. Secondly, different schemes based mainly on quantum mechanics methods, which combine distinct levels of theory and basis sets with gas phase calculations and solvation models, have been tested to predict the pK_a value of different molecules. This has enabled to identify approaches well suited to provide accurate estimates of pK_a of a series of huprine-rhein hybrid compounds, providing a basis to rationalize the differences in biological activity. Finally, the two methodological approaches have been used to examine the effect of chemical differences in a series of ester derivatives of tetrahydroazocines, examining the impact of tautomerism on the ionization state, and in turn on the nature of the bioactive species in physiological conditions.

In the second one, efforts have been focused in the search of new structures able to selectively inhibit the enzyme Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (PfG6PD). In particular, this study was based on a structural model obtained from homology modeling that revealed a fundamental difference in the binding site, corresponding to the replacement of Arg750 in the human enzyme by Asp in PfG6PD.

The relevance of this difference was validated via the design of substrate analogs with inhibitory activity against *Pf*G6PD. Following these studies, thanks to the use of different computational techniques, it has been possible to determine a potential binding mode of compounds with submicromolar potency reported in the literature. Finally, the combination of virtual screening methods and pharmacological techniques have allowed us to find compounds with a promising activity against *P. falciparum* DD2 strain and potential activity against *Pf*G6PD.

ÍNDICE GENERAL

Índice

Resumen.....	13
Summary.....	15
Abreviaturas.....	23
<u>Capítulo 1: Introducción.....</u>	29
1.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.....	31
1.1.1. Estudio conformacional de pequeñas moléculas.....	31
1.1.1.1. Modelos de reconocimiento ligando-receptor.....	31
1.1.1.2. Conformación bioactiva y coste conformacional.....	32
1.1.1.3. Predicción conformacional mediante métodos computacionales.....	35
1.1.1.4. Metodología Multinivel.....	38
1.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas.....	42
1.1.2.1. Concepto de pK_a	42
1.1.2.2. Determinación del pK_a	43
1.1.2.3. El Ciclo Termodinámico.....	45
1.1.2.4. Limitación de valores experimentales.....	47
1.1.3. Caracterización conformacional y de ionización.....	49
1.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Plasmodium falciparum</i> para el tratamiento de Malaria.....	49
1.2.1. Malaria.....	49
1.2.1.1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	51
1.2.1.2. Tratamiento de Malaria.....	52
1.2.2. Ruta de las Pentosas Fosfato.....	56
<u>Capítulo 2: Objetivos.....</u>	59
2.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.....	60
2.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Plasmodium falciparum</i> para el tratamiento de Malaria.....	60
<u>Capítulo 3: Metodología.....</u>	63
3.1. Metodologías generales.....	65
3.2. Metodologías específicas.....	65
3.2.1. Metodología Multinivel (ML).....	65

3.2.1.1. Parametrización y preparación del sistema.....	65
3.2.1.2. Muestreo a bajo nivel de teoría (<i>Low-Level, LL</i>).....	66
3.2.1.3. Definición de los mínimos conformacionales.....	67
3.2.1.4. Refinado a alto nivel de teoría (HL).....	69
3.2.1.5. Estimación del coste conformacional.....	69
3.2.2. Estimación computacional del pK_a de los análogos huprina-reína.....	70
3.2.3. Modelaje de análogos huprina-reína.....	73
3.2.4. Estimación computacional del pK_a de los compuestos derivados de azocino...	73
3.2.5. Estudios de estabilidad del anillo azocino.....	75
3.2.6. Caracterización conformacional y estructural de los compuestos ML-276 y ML-304.....	76
3.2.7. Determinación del modo de unión de ML-276 y ML-304 a <i>PfG6PD</i>	77
3.2.8. Metodología con el software <i>PharmScreen</i> ®.....	79
3.2.9. Validación farmacológica.....	81
3.2.9.1. Metodología para el ensayo de EC_{50}	81

Capítulo 4: Resultados.....85

4.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.....	87
4.1.1. Aplicación de la metodología Multinivel en la estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva.....	87
4.1.1.1. Exhaustividad y suficiencia del muestreo conformacional.....	88
4.1.1.2. Capacidad de identificación de la forma bioactiva.....	92
4.1.1.3. Estimación del coste conformacional.....	95
4.1.1.4. Tendencias observadas. Balance entálpico-entrópico.....	97
4.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores duales de acetilcolinesterasa huprina-reína.....	99
4.1.2.1. Estimación computacional del pK_a de los análogos huprina-reína.....	100
4.1.2.2. Estimación de la actividad en AChE y BACE-1 a partir del pK_a	103
4.1.3. Estudio de las preferencias conformacionales y de ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores de AchE basados en azocina.....	108
4.1.3.1. Equilibrios tautoméricos de los compuestos N14 y N5	109
4.1.3.2. Preferencias conformacionales del compuesto N14	111
4.1.3.3. Preferencias conformacionales del compuesto N5	114
4.1.3.4. Estimación del pK_a de los compuestos N14 y N5	116

4.1.3.5. Estudios de estabilidad del anillo azocínico.....	119
4.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Plasmodium falciparum</i> para el tratamiento de Malaria.....	122
4.2.1. Desarrollo de inhibidores contra <i>PfG6PD</i> con un mejor perfil tipo fármaco...122	
4.2.1.1. Estudio del modo de unión de inhibidores con actividad conocida frente <i>PfG6PD</i>	123
4.2.1.2. Relación-estructura actividad (REA).....	127
4.2.1.3. Descubrimiento del modo de unión de inhibidores con potencial actividad frente <i>PfG6PD</i>	129

Capítulo 5: Discusión.....137

5.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.....	139
5.1.1. Aplicación de la metodología Multinivel en la estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva.....	139
5.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores duales de acetilcolinesterasa huprina-reína.....	149
5.1.3. Estudio de la preferencias conformacionales y de ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores de AChE basados en azocina.....	151
5.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Plasmodium falciparum</i> para el tratamiento de Malaria.....	153

Capítulo 6: Conclusiones.....157

6.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.....	159
6.1.1. Metodología Multinivel en la estimación del coste conformacional de la conformación bioactiva.....	159
6.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores duales de acetilcolinesterasa huprina-reína.....	159
6.1.3. Estudio de las preferencias conformacionales y de ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a de inhibidores de AChE basados en azocina.....	160
6.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de <i>Plasmodium falciparum</i> para el tratamiento de Malaria.....	161

<u>Bibliografía</u>	163
<u>Anexos</u>	183
<u>Anexo I: Artículo I</u>	185
<i>Design, synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rehin-huprine hybrids</i>	
<u>Anexo II: Artículo II</u>	235
<i>First homology model of Plasmodium falciparum glucose-6-phosphate dehydrogenase: Discovery of selective substrate analog-based inhibitors as novel antimalarial agents</i>	
<u>Anexo III: Artículo III</u>	295
<i>Enantioselective Synthesis of Spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles]</i>	

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- PES** – Superficie de Energía Potencial / *Potential Energy Surface*
- K_d** – Constante de disociación / *Dissociation Constant*
- K_i** – Constante de inhibición / *Inhibition Constant*
- K_a** – Constante de disociación ácida / *Acid Dissociation Constant*
- MMFF** – *Merck Molecular Force Field*
- OPLS-AA** – *Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atom*
- DFT** – Teoría del funcional de la densidad / *Density Functional Theory*
- MST** – *Miertus-Scrocco-Tomasi*
- AMBER** – Assisted Model Building with Energy Refinement
- GBIS** – *Generalized Born Implicit Solvent*
- MM** – Mecánica Molecular / *Molecular Mechanics*
- QM** – Mecánica Cuántica / *Quantum Mechanics*
- UFF** – *Universal Force Field*
- GAFF** – *General Amber Force Field*
- ML** – *Multinivel / Multilevel*
- LL** – Bajo Nivel / *Low-Level*
- HL** – Alto Nivel / *High-Level*
- RM1** – *Recife Model 1*
- IEFPCM/MST** – *Integral Equation Formalism of the Polarizable Continuum Model / Miertus-Scrocco-Tomasi Solvation Model*
- B3LYP** – *Becke Three-Parameter Lee-Yang-Parr Exchange-Correlation Functional*
- MP2** – *Møller-Plesset 2*
- ZPE** – *Zero Point Energy*
- RMN/NMR** – Resonancia Magnética Nuclear / *Nuclear Magnetic Resonance*
- HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography*
- NIST** – National Institute of Standards and Technology
- SERCA** – *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} - ATPase*
- TCA/ACT** – Tratamiento Cominado con Artemisinina / *Artemisinin-based combination therapy*
- OMS** – Organización Mundial de la Salud
- PPP** – Ruta de las Pentosas Fosfato / *Pentose Phosphate Pathway*
- G6P** – Glucosa-6-fosfato / *Glucose-6-phosphate*

G6PD – Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa / *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*

6PGL – 6-fosfogluconolactonasa / *6-phosphogluconolactonase*

PfGluPho (G6PD-6PGL) – Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-6-fosfogluconolactonasa / *Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase*

NADP+ – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidized form*

NAPDH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form*

ADN/DNA – *Ácido Desoxirribonucleico / Deoxyribonucleic acid*

ARN/RNA – *Ácido Ribonucleico / Ribonucleic acid*

ROS – *Especies Reactivas de Oxígeno / Reactive Oxygen Species*

PfG6PD – Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Plasmodium falciparum* / *Plasmodium falciparum Glucose-6-phosphate dehydrogenase*

hG6PD – Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa humana / *Human Glucose-6-phosphate dehydrogenase*

HF – *Hartree-Fock*

RESP – *Restrained Electrostatic Potential*

TIP3P – *Transferable Intermolecular Potential with 3 Points*

NTV/NVT – *Colectivo canónico / Canonical ensemble*

NTP/NPT – *Colectivo Isotérmico-Isobárico / Isothermical-Isobaric ensemble*

PME – *Particle Mesh Ewald*

MD – *Molecular Dynamics*

SCS-MP2 – *Spin-Component-Scaled Møller–Plesset 2*

CCSD – *Coupled Cluster Single-Double*

CBS – *Complete Basis Set*

PDB – *Protein Data Bank*

AChE – *Acetilcolinesterasa / Acetylcholinesterase*

BACE-1 – *β-secretasa / β-secretase*

BChE – *Butirilcolinesterasa / Butyrylcholinesterase*

MAO – *Monoaminoxidasa / Monoamineoxidase*

BSSE – *Basis Set Superposition Error*

MMV – *Medicines for Malaria Venture*

SMILES – *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*

SDF – *Structure-Data File*

MOPAC – *Molecular Orbital PACkage*

EC₅₀ – Concentración Máxima Efectiva al 50% / *Half maximal effective concentration*

IC₅₀ – Concentración Máxima Inhibitoria al 50% / *Half maximal inhibitory concentration*

K-L – *Kullback-Leibler divergence*

RMSD – *Root Mean Square Deviation*

CCDC – *Cambridge Crystallographic Data Centre*

REA/SAR – Relación Estructura-Actividad / *Structure-Activity Relationship*

PDP – *Product Development Partnership*

TCAMS – *Tres Cantos Antimalarial Set*

EDS – *Electron Density Server*

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: Introducción

1.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas

La interacción selectiva entre dos entidades químicas es un fenómeno esencial en casi todos los procesos biológicos.¹ Ello supone la existencia de una serie de características químicas bien definidas que regulan el reconocimiento y unión entre las moléculas, siendo asimismo responsable de la selectividad y especificidad de la interacción. Un ejemplo bien conocido es la catálisis enzimática, donde tiene lugar el reconocimiento de sustratos por enzimas con objeto de llevar a cabo una reacción química catalizada en condiciones fisiológicas, dando lugar en ocasiones a productos caracterizados por una elevada regioselectividad.²

Dentro del campo de diseño de fármacos, es especialmente relevante conocer y determinar qué factores influyen en el hecho de que una pequeña molécula bioactiva (ligando) pueda unirse de forma selectiva y específica a una macromolécula (receptor). Sin embargo, dado que las modificaciones químicas que pueden introducirse dentro de una serie congénica de compuestos pueden alterar drásticamente la naturaleza de la especie bioactiva, existe un interés creciente y significativo en desarrollar enfoques computacionales para predecir propiedades relacionadas con las preferencias de ionización y/o tautoméricas, así como la exploración conformación de pequeñas moléculas, puesto que puede tener un destacado impacto en el proceso de desarrollo de fármacos.

1.1.1. Estudio conformacional de pequeñas moléculas

1.1.1.1. Modelos de reconocimiento ligando-receptor

Uno de los modelos más conocidos para explicar el reconocimiento ligando-receptor fue establecido hace más de 100 años por el químico alemán Emil Fisher, siendo conocido como “modelo de llave-cerradura”. Dicho modelo postula que la estructura del sustrato y del sitio activo son exactamente complementarias de la misma forma que una llave

encaja en una cerradura.³ A pesar del importante avance que supuso en su tiempo dicho modelo, poco a poco fue quedando obsoleto puesto que concibe el ligando y el receptor como dos entidades rígidas, en tanto que existen numerosas evidencias que reflejan el importante papel de la flexibilidad y adaptabilidad conformacional sobre la interacción ligando-receptor.^{4,5,6}

En 1958, el bioquímico alemán Daniel E. Koshland, puso de manifiesto las limitaciones que tenía el modelo de 1944 de Fisher, sugiriendo que la interacción ligando-receptor originaba cambios en el segundo que provocaban un aumento de la complementariedad molecular entre ambos, introduciendo así el “modelo de adaptación inducida”.⁷

Finalmente, en 1964 el bioquímico rumano Brunó Ferenc Straub propuso el “modelo de selección conformacional” o “modelo de adaptación fluctuante”, el cual proponía que existen dos entidades químicas (ligando y receptor) que fluctúan entre múltiples conformaciones y donde solo algunas favorecen la interacción entre ambas especies. Cuando se da dicha situación, ambas conformaciones son secuestradas, formándose así el complejo y desplazándose el equilibrio hacia aquellas poblaciones que favorecen la interacción.⁸

De entre los distintos modelos comentados, muchos estudios apuntan que el propuesto por Straub es uno de los que mejor describe la interacción ligando-receptor.⁹ No obstante, algunos estudios apuntan que una visión híbrida del de Koshland y Straub, puede describir el comportamiento de algunos sistemas,¹⁰ donde sucedería primero un evento de selección conformacional y una optimización de las cadenas principales y laterales de la proteína, seguido por un mecanismo de adaptación inducida.^{11,12}

1.1.1.2. Conformación bioactiva y coste conformacional

Existen un conjunto muy variado de contribuciones energéticas que participan en el proceso de interacción entre un ligando y un receptor (**Figura 1**), y que por lo tanto contribuirán a la energía libre de unión (ΔG_{bind}). Por un lado, cabe tener presente contribuciones de naturaleza entálpica, como corresponde a la propia interacción entre ligando y receptor, así como la energía asociada a cambios en la estructura de las

moléculas de agua o el coste de (de)solvatación de las moléculas interacciones, y finalmente contribuciones debidas a cambios conformacionales necesarios tanto en el receptor como en el ligando, entre otras. Por otra parte, existen contribuciones entrópicas resultantes de la pérdida de flexibilidad conformacional en ligando y receptor resultante de la formación del complejo, así como cambios entrópicos asociados a la reorganización de las moléculas de solvente.

Uno de los aspectos en que se centra esta tesis es precisamente el coste asociado a la selección de especie bioactiva, incluyendo por ello el análisis de la flexibilidad conformacional de una pequeña molécula (ligando) en solución acuosa. La flexibilidad conformacional tiende a aumentar de forma exponencial con el número de átomos presentes en una molécula, y especialmente con el número de torsiones flexibles. Ello, pues, plantea el problema de determinar la contribución que puede tener la selección e la conformación activa sobre la actividad biológica de una pequeña biomolécula, tal como se describe en la **Figura 1**.

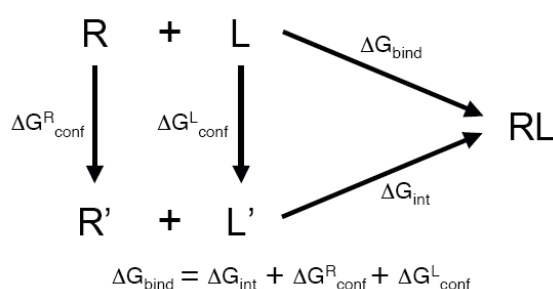


Figura 1. Ciclo termodinámico del proceso de formación del complejo ligando-receptor. De forma genérica, la energía libre de unión (ΔG_{bind}) se puede descomponer en la suma de 3 energías: la energía libre de interacción (ΔG_{int}), el coste energético de adopción de la conformación bioactiva del ligando ($\Delta G_{\text{conf}}^{\text{L}}$) y el del receptor ($\Delta G_{\text{conf}}^{\text{R}}$)

Diferentes aspectos, tales como el tamaño, la forma y las propiedades fisicoquímicas del ligando, juegan un papel clave en el reconocimiento molecular, provocando que los ligandos con mayor actividad presenten una óptima complementariedad electrostática, estérica e hidrofóbica con los residuos que rodean al ligando en el centro de unión del receptor. No obstante, en el caso de moléculas flexibles, alcanzar dicha complementariedad puede precisar como paso previo la selección de la conformación bioactiva, es decir, identificar de entre todas las preferencias conformacionales en solución de un ligando aquella – la conformación bioactiva – que será capaz de

maximizar la interacción con los residuos presentes en el sitio de unión del receptor. A pesar de ser una definición simple, permite introducir el concepto de que existe una reorganización conformacional en ligando y que dicha contribución energética debe considerarse en el proceso de interacción ligando-receptor.

Si observamos la superficie de energía potencial (*PES*, *Potential Energy Surface*) de un ligando, como la representada en la **Figura 2**, encontraremos diferentes mínimos o pozos conformacionales, de entre ellos es probable encontrar la conformación bioactiva en alguno de ellos. Sin embargo, el conformero bioactivo no siempre recae en el mínimo energético global, sino que pueda corresponder a un mínimo local. Por lo tanto, dependiendo de las características químicas del ligando, la selección de la conformación bioactiva puede conllevar un penalty conformacional elevado, que se traducirá en una disminución de la afinidad de unión.

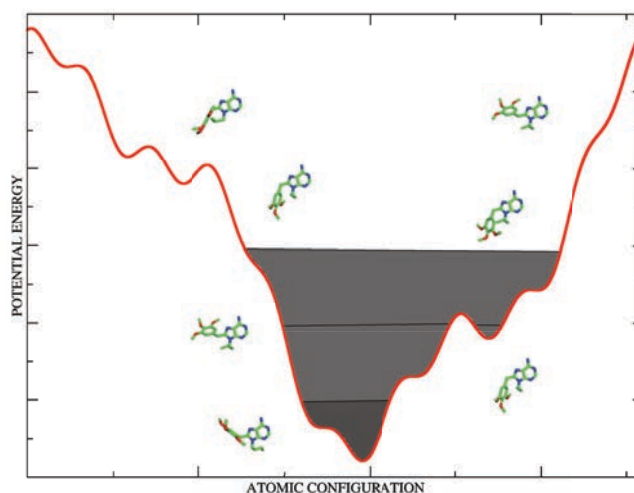


Figura 2. Representación de la Superficie de Energía Potencial (*PES*) de un pequeño ligando flexible. A lo largo de la *PES* existen diferentes mínimos conformacionales, siendo razonable esperar que la conformación bioactiva sea uno de los mínimos de menor energía conformacional.

Además de este penalty entálpico, existe otra contribución de naturaleza entrópica, que está relacionada con el número total de estados conformacionales que puede adoptar el ligando en solución. Así, el proceso de reconocimiento y unión que lleva a la formación del complejo ligando-receptor conlleva una pérdida en el número de microestados accesibles para el ligando libre (así como para las cadenas laterales de los residuos que definen el centro de unión en el receptor), considerando en primera aproximación que el ligando únicamente puede adoptar un único estado en la forma unida al receptor.

El penalty conformacional, lejos de ser irrelevante, debe ser tenido en cuenta dentro del conjunto de energías a considerar y de forma general, en el proceso de diseño de fármacos, puesto que puede añadir de forma significativa un error en la actividad predicha. Así, distintos ligandos de igual ΔG_{int} , pero con diferencias en el coste conformacional, pueden tener valores de actividad bien diferenciados.

1.1.1.3. Predicción conformacional mediante métodos computacionales

Debido al impacto que puede tener una estimación incorrecta del coste conformacional, existe un interés creciente en diseñar estrategias computacionales efectivas que permitan explorar las posibilidades conformacionales de ligandos pequeños y flexibles, y conducir a una estimación del coste de selección de la conformación bioactiva.

Para que estos métodos de predicción sean efectivos, estas herramientas deben superar dos limitaciones aparentemente contradictorias. En primer lugar, la flexibilidad conformacional de una pequeña molécula en solución es a menudo demasiado extensa para poder ser explorada exhaustivamente, y por ello, algunas aproximaciones son necesarias para así conseguir resultados en un periodo más o menos corto de tiempo. En segundo lugar, las predicciones llevadas a cabo deben ser muy precisas, puesto que pequeñas incertidumbres en la estimación de esta energía, pueden llevar a errores inaceptables en la predicción de las afinidades ligando-receptor.

En los últimos años, distintos trabajos y grupos de investigación han tratado de focalizar sus esfuerzos en desarrollar herramientas que permitan determinar de forma adecuada las preferencias conformacionales de ligandos flexibles, así como la estimación del coste conformacional que supone adoptar la conformación bioactiva.¹³

En 2004, los investigadores E. Perola y P. S. Charifson llevaron a cabo un extenso estudio donde examinaron el coste de reorganización de pequeños ligandos de un conjunto de 150 estructuras proteína-ligando escogidas en base a diferentes criterios y empleando diferentes metodologías.¹⁴

En dicho trabajo la selección de los complejos a estudiar se basó en los siguientes criterios generales: disponibilidad de constantes de afinidad (K_d o K_i), unión proteína-ligando no covalente, resolución cristalográfica de los cristales menor de 3 Å. Además por un lado, al seleccionar los ligandos se optó por compuestos tipo fármaco (*drug-like*) estructuralmente diversos que tuvieran un peso molecular entre 200–600 g/mol y entre 1-12 enlaces rotables. Por otro lado, se seleccionaron diferentes clases de proteínas (proteasas, quinasas, fosfatasas, etc.) que fueran relevantes en diseño de fármacos y con una cierta diversidad dentro de estas clases. En lo que refiere a los métodos empleados en dicha publicación para estudiar el coste de reorganización conformacional de los ligandos, se emplearon métodos basados en campos de fuerzas conocidos como MMFF y OPLS-AA.

En la investigación llevada a cabo, llegaron a diferentes conclusiones. Primeramente, encontraron una clara correlación entre valores aceptables de coste conformacional y flexibilidad del ligando. En cambio, no observaron una correlación entre energías de reorganización y afinidad de unión, poniendo de manifiesto que puede darse una elevada reorganización conformacional sin suponer un elevado coste conformacional. Sin embargo, mediante el uso de los métodos empleados en el trabajo, mayoritariamente basados en campos de fuerzas o mecánica cuántica, los costes conformacionales estimados llegaban a valores excesivamente altos, ya que por ejemplo un 10% de los casos estudiados se encontraban en valores superiores a 9 kcal/mol, quedando muy lejos del mínimo donde se encuentra la conformación bioactiva.

En 2006, en un trabajo realizado por J. Tirado-Rives y W. L. Jorgensen, se examinó el impacto que tiene el *conformer focusing* en la predicción de la energía de unión ligando-proteína, entendido como la aportación entrópica al penalty conformacional que existe debida a la pérdida de estados conformacionales que se produce en esta unión. En este, se estudia la incertidumbre de la energía libre de unión para un conjunto de compuestos *drug-like*, donde se concluye que si se evalúa con métodos ab initio o DFT esta se mueve en valores en torno a 5 kcal/mol, mientras que si se realiza con métodos de campos de fuerzas este aumenta a valores entre 5-10 kcal/mol.¹⁵

En 2009, siguiendo la misma dirección de otros trabajos, Butler y colaboradores, probaron de predecir las conformaciones más probables sobre un conjunto de 99 moléculas tipo fármaco, a partir de cálculos con el método de solvatación MST.¹⁶ En este caso, a pesar de que obtuvieron resultados mucho más consistentes y convincentes, si bien la principal desventaja de la aproximación era que la conformación bioactiva únicamente se comparaba con el mínimo local más cercano, sin ser completamente seguro que dicho mínimo fuera uno local o global.

Más adelante, C. Gao y colaboradores presentaron un método para estimar la contribución energética que supone la selección de la conformación bioactiva usando el campo de fuerzas de Amber y modelo GBIS (*Generalized Born Implicit Solvent*) poniendo de manifiesto que para la mayoría de ligandos, existe una diferencia significativa entre la conformación unida a proteína y la conformación no unida más favorable y mostrando que dicha diferencia de energía tiene un impacto muy relevante en la afinidad de unión, tanto la parte entrópica como la entálpica.¹⁷

A continuación, un trabajo de J. Poehlsgaard y colaboradores en 2012, pretendió el uso de un método basado en *force fields* para determinar las energías de los mínimos globales en moléculas cargadas, donde lo aplicaron con buenos resultados a un compuesto zwitteriónico GluA2 y como herramienta para el filtrado de falsos positivos en un estudio de docking.¹⁸

En 2015, un trabajo de H. H. Avgy-David y H. Senderowitz presentó un estudio donde testeaban diferentes metodologías a un grupo de compuestos aprobados por la FDA donde determinaron que la mayoría tienen una ventana energética entre 4-6 kcal/mol en la que identifican la forma unida a proteína con respecto al mínimo global y siendo capaz de reducirla a 2-5 kcal/mol cuando se trabaja con B-factors o el método de Knee Point Detection (KPD).¹⁹

En 2016, M. Rosa y colaboradores publicaron un trabajo donde desarrollaron y probaron con el compuesto cianidin-3-glucosido una metodología basada en MM y QM para determinar las poblaciones relativas de sus diferentes conformeros.²⁰

En 2018, Kanal y colaboradores, alejándose un poco de lo comentado, realizaron un estudio donde trataron de comprobar la precisión y fiabilidad de distintos campos de fuerzas clásicos para llevar a cabo el *screening* conformacional de los distintos conformeros de baja energía, donde supuestamente puede residir la conformación bioactiva. Dicho estudio pone de manifiesto que el uso de según qué *force fields* como MMFF94, UFF o GAFF pueden mostrar una mala correlación con respecto a métodos semiempíricos, dando a entender que dichos métodos pueden ser buenos para explorar el espacio conformacional pero las energías obtenidas para cada conformación son claramente pobres.²¹

A pesar de la distinta variedad de trabajos comentados, todos ellos tienen en común que a pesar de que de las experiencias y resultados que se pudieron extraer numerosas y prometedoras conclusiones, que el correcto estudio de las preferencias conformacionales y la estimación del coste conformacional del ligando, son a día de hoy todavía un problema sin resolver en el ámbito del diseño de fármacos.

1.1.1.4. Metodología Multinivel

Orientándose en la misma dirección que algunos de los trabajos anteriormente comentados, en el marco de la tesis del Dr. Flavio Forti y del Dr. Jordi Juárez-Jiménez se inició e implementó el desarrollo de una herramienta que permitiera la exploración conformacional de pequeñas moléculas y la predicción del coste conformacional asociado a adoptar la conformación bioactiva, conocido con el nombre de Estrategia Multinivel.^{22,23}

La metodología Multinivel está sustentada principalmente en dos fundamentos: el primero es la aplicación de “la aproximación de los estados predominantes”, y el segundo es la combinación de métodos multinivel para la determinación precisa de las diferencias energéticas entre familias conformacionales.

La aproximación de los estados predominantes, desarrollada por Gilson y colaboradores en 1997,^{24,25} establece que el espacio conformacional de una molécula se puede dividir en conjunto de mínimos locales (M) y que la integral configuracional de dicha molécula es igual a la suma de las integrales configuracionales individuales de todos estos pozos. Siendo la integral configuracional, en el caso de una molécula flexible, la suma del conjunto de factores conformacionales y estructurales, que pueden influir en la energía libre de dicha molécula, como por ejemplo, la vibración de los enlaces, los ángulos o la rotación de los diferentes diedros.

Con ello, la energía libre (A) de una molécula flexible se puede aproximar a partir de las contribuciones de un número finito de pozos conformacionales de la siguiente forma:

$$A \approx -RT \ln \sum_{j=1}^M e^{-A_j/RT} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$A_j \approx -RT \ln \left[\frac{v_j}{N_j} \sum_{\substack{k=i \\ k \in j}}^{N_j} e^{-E_k/RT} \right] \quad \text{(Ecuación 2)}$$

A partir de realizar una serie de modificaciones, aproximaciones y consideraciones se puede llegar a la siguiente ecuación:

$$\Delta A_i^j = \Delta E_{i_{min}j_{min}} + \Delta A_{i,j}^{local} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

que establece que la energía libre relativa entre dos pozos (ΔA_i^j) es igual a la suma de la diferencia de energía entre las dos conformaciones más estables de cada pozo ($\Delta E_{i_{min}j_{min}}$) y la diferencia de curvaturas o distribución de conformaciones asociadas a cada pozo ($\Delta A_{i,j}^{local}$).

El nombre del método, proviene de que la estrategia Multinivel (ML) está basada en combinar diferentes métodos de distinto nivel de teoría. Por un lado, un método de bajo nivel de teoría (LL, *Low Level*), como por ejemplo métodos semiempíricos o campos de fuerza clásicos que permiten explorar la superficie de energía potencial con un bajo coste computacional, aunque sin predecir de forma exacta la estabilidad de las conformaciones obtenidas. Por otro lado, emplea un método de alto nivel (HL, *High Level*), como por ejemplo métodos *Ab initio* o Mecánica Cuántica (*QM, Quantum*

Mechanics), los cuáles permite una gran exactitud en la predicción de la energía libre, sin embargo sólo pueden ser aplicados a un pequeño número de estructuras.

El enfoque Multinivel (ML) propone que la energía libre conformacional se puede aproximar localizando los mínimos con una técnica de bajo nivel de teoría (LL) y a continuación emplear una técnica de alto nivel (HL) a un conjunto de estructuras representativas llevando a cabo un rescalado energético de las mismas.

En la implementación original del método de 2011, la primera parte, correspondiente al muestreo conformacional, se llevaba a cabo mediante un algoritmo de Metropolis Monte Carlo^{26,27} empleando el Hamiltoniano semiempírico RM1²⁸ para describir la energía del sistema. Si el estudio se realizaba en fase gas, la energía de las conformaciones se describía por la energía interna obtenida con el Hamiltoniano, por el contrario si se realizaba en solución, se utilizaba una energía efectiva obtenida al combinar la energía interna de la conformación con la energía libre de solvatación estimada mediante la versión RM1 del método IEF-MST.²⁹

En la segunda parte, el rescalado HL se llevaba a cabo mediante un cálculo puntual a nivel MP2/aug-cc-pvDZ sobre las geometrías optimizadas a nivel B3LYP/6-31G(d), ($E_{i_min}^{MP2}$), añadiendo la energía de punto cero (ZPE) ($ZPE_{i_min}^{B3LYP || IEF-MST}$) y los efectos del solvente se consideraban mediante la versión B3LYP del modelo continuo polarizable IEF-MST ($A_{sol,i_min}^{B3LYP || IEF-MST}$). Finalmente, la estimación de la energía para un mínimo conformacional mediante la estrategia Multinivel (A_i^{ML}) se obtenía aplicando la siguiente expresión:

$$A_i^{ML} = E_{i_min}^{MP2} + A_{sol,i_min}^{B3LYP || IEF-MST} + ZPE_{i_min}^{B3LYP || IEF-MST} + A_i^{local, RM1} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Los tres primeros términos se obtenían mediante cálculos cuánticos, mientras que el último, la curvatura del pozo, se conseguía a partir del post-procesado del muestreo LL. Posteriormente, en 2015, la metodología fue modificada. Siendo ésta la que se usa actualmente. Más concretamente, en el contexto de la tesis del Dr. Jordi Juárez Jiménez, se desarrolló una nueva implementación del método que permitió el uso de campos de fuerza clásicos para llevar a cabo la exploración conformacional inicial, en lugar del

método semiempírico RM1. Empleando los mismos métodos High-Level en la segunda parte de la estrategia. Por lo tanto, la estimación de la energía para cada mínimo conformacional mediante la estrategia Multinivel se usaba la misma **Ecuación 4** anteriormente presentada, cambiando únicamente la metodología de muestreo con la que posteriormente se obtenía el valor de A_i^{local} .

Tanto en la metodología original como en la actual, un paso clave es la determinación del tamaño del pozo conformacional. Esto se llevaba a cabo, a partir de la proyección de los resultados de las simulaciones sobre una cuadrícula n-dimensional (donde n representa el número de torsiones activas de la molécula en estudio) espaciada en intervalos regulares, de forma que cada conformación (entendida como combinación de valores de sus torsiones activas) quedaba asignada a un punto. Si más de una estructura quedaba asignada al mismo punto de la cuadrícula, únicamente aquella de mínima energía era retenida como representativa de ese punto.

A continuación, partiendo de la estructura de mínima energía proyectada en la cuadrícula se realizaba una búsqueda sistemática sobre cada una de las direcciones posibles de su alrededor. Si la búsqueda encontraba una estructura de mayor energía que la anterior, dicha estructura se incluía en el mismo pozo conformacional, si por el contrario, se encontraba una estructura de menor energía, se consideraba como perteneciente a otro pozo, deteniéndose la búsqueda en esta dirección. En el caso que no se encontraba ninguna estructura en una determinada dirección también cesaba la búsqueda. Una vez finalizada la búsqueda, se determinaba el tamaño del pozo en base a los valores más externos de las n-dimensiones y se reiniciaba la búsqueda en el espacio no asignado aún a ningún pozo. Una vez determinado el tamaño del pozo se obtenía la curvatura del pozo (A_i^{local}).

En los trabajos previos, dicha metodología fue testeada frente a un grupo reducido de moléculas, inicialmente simples y neutras y posteriormente a otras más complejas y cargadas, comparándolo con valores experimentales y poniendo de manifiesto la adecuación de esta estrategia para el objetivo que se había propuesto.

1.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas

1.1.2.1. Concepto de pK_a

El pK_a es una propiedad fisicoquímica que determina la capacidad de un compuesto para llevar a cabo una reacción ácido-base y es un reflejo de su propensión a ser dador o aceptor de un protón. Matemáticamente, el pK_a se expresa como el logaritmo negativo de la constante de disociación ácida (K_a), siendo un valor esencial para entender muchas reacciones fundamentales en química y bioquímica.

$$pK_a = -\log K_a \quad \text{(Ecuación 5)}$$

El valor de pK_a , conjuntamente con el pH del medio donde se encuentra, determinarán la cantidad o porcentaje de compuesto que se encuentra ionizado. Matemáticamente, la fórmula que relaciona estos conceptos es la ecuación de Henderson-Hasselbalch.^{30,31,32,33,34}

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

En el caso de que el pH sea igual al pK_a , el logaritmo de la relación de las formas desprotonada/protonada será cero, y el ácido se encontrará disociado al 50%. Si el pH es inferior al valor de pK_a , el compuesto predominará en la forma no disociada, mientras que si el pH es superior al pK_a , la forma mayoritaria será la disociada.

En moléculas con diversos puntos titrables, el estado de protonación de un grupo puede afectar al grado de disociación de un protón de otro grupo funcional. Por ello, cabe distinguir el pK_a microscópico y el pK_a macroscópico.^{35,36,37} El primero se refiere al pK_a de un grupo titrable, que refleja el grado de ionización para un microestado del compuesto, caracterizado por un determinado estado de otros grupos ionizables presentes en la molécula. En cambio, el pK_a macroscópico define la constante de disociación efectiva, independientemente del grupo funcional del cual se disocia.

En aquellas moléculas con un solo grupo protonable, el pK_a microscópico coincide con el pK_a macroscópico. En cambio, para una molécula con diversos protonables, el pK_a

macroscópico reflejará contribuciones de múltiples pK_a microscópicos con valores similares, o constantes de disociación ácidas de múltiples microestados.

A nivel fisiológico, la ionización de un grupo químico tiene un destacado impacto sobre la actividad de un compuesto. Por una parte, el grado de ionización tiene gran impacto sobre la solubilidad de un compuesto en un determinado medio, así como la capacidad para distribuirse a lo largo del todo organismo. Así, los compuestos cargados son más solubles en solventes polares, como el agua, y por otro lado, son muy poco solubles en medios apolares, En consecuencia, las moléculas cargadas se distribuirán únicamente en fluidos acuosos y su distribución generalmente será peor, mientras que las moléculas no cargadas tendrán la posibilidad de distribuirse muchos mejor a través de las membranas celulares. Por otra parte, el pK_a determinará la presencia de grupos funcionales asociados con la presencia de carga neta, que pueden estar implicados bien en el reconocimiento específico con otros grupos presentes en dianas macromoleculares, o bien tener un efecto sobre determinados procesos reactivos.

Des del punto de vista del diseño de fármacos, la capacidad de tener herramientas rápidas y simples que permitan determinar de forma más o menos precisa el pK_a , podrá dar una idea del estado de ionización de las moléculas, y por lo tanto determinar su biodisponibilidad, así como su capacidad para interaccionar con una diana y ejercer una efecto biológico.

1.1.2.2. Determinación del pK_a

Experimentalmente, existen diferentes técnicas que permiten estimar el pK_a , metodologías, que van desde la potenciometría a la polarimetría pasando por NMR o HPLC. Sin entrar en detalle, cabe citar un trabajo de Reijenga y colaboradores de 2013³⁸ donde se lleva a cabo una discusión de los puntos fuertes y débiles de algunas de las más conocidas, resumidos en la **Tabla 1** en base a 6 criterios: cantidad y concentración de analito, restricciones de muestra, rango de pK_a , relación coste/tiempo, precisión, y finalmente susceptibilidad a temperatura, fuerza iónica y constante dieléctrica.

A pesar de existir una gran variedad de técnicas experimentales con las que medir el pK_a con relativa facilidad, hay muchas veces donde una medición experimental no es

sencilla debido a diferentes limitaciones, algunas de ellas reflejadas en la Tabla 1 o simplemente porque las moléculas en cuestión aún no han sido sintetizadas, pero a la vez se desea disponer de una estimación aproximada de su pK_a .

Un buen ejemplo de la dificultad comentada son los aminoácidos que forman parte de una cadena polipeptídica. Estos tienen un valor de pK_a que puede variar en función del ambiente donde se encuentran, dificultando así la asignación unívoca de su pK_a . De la misma forma, la determinación experimental puede complicarse cuando existe una excesivamente alta o baja acidez de los sustratos en cuestión debido al efecto del entorno.³⁹

Tabla 1. Resumen de los puntos fuertes y débiles sobre distintas técnicas de estimación del pK_a

	Cant./ Conc.	Restric.	Rango pK_a	Coste/ Tiempo	Precisión	Temperatura, Fuerza Iónica y Constante Dieléctrica
Potenciometria	-	+	--	++	+	+
Conductimetria	-	++	-	+	+	-
Voltametria	-	+	+	+	+	+
Calorimetria	-	++	++	+	+	+
RMN	-	-	++	--	++	-
Electroforesis	++	+	+	+	++	++
HPLC	++	+	-	+	+	+
Solubilidad	-	-	+	--	+	-
Espectrometria	+	+	+	+	++	++
Fluorimetria	+	-	+	+	--	+
Polarimetria	+	--	+	+	+	+
Cinética	--	--	-	-	+	+
Computacional	++	-	++	-	--	-

++ Muy bueno + Bueno - Malo -- Muy malo

Por ello, la habilidad de determinar computacionalmente el pK_a de forma precisa ha adquirido una importancia decisiva en la investigación científica⁴⁰ Una de las principales bazas de esta estimación es que los cálculos computacionales no requieren muestra y no tiene restricciones en términos de condiciones físicas. Por otra parte, su aplicación se ha visto favorecida por el desarrollo de métodos de química cuántica con una elevada precisión en la evaluación energética de las especies neutras e ionizadas, así como para la inclusión efectiva de efectos del solvente.

Ello es relevante por cuanto una pequeña imprecisión en dichas contribuciones puede suponer una desviación relevante con respecto al valor experimental. No obstante, un aspecto limitante es el elevado coste computacional de dichos métodos, provocando que su aplicación en sistemas de gran tamaño sea poco común.

1.1.2.3. El Ciclo Termodinámico

La estimación computacional del valor de pK_a es una ardua y tediosa tarea, puesto que por ejemplo, un error de 1,36 kcal/mol en el cambio de energía libre de una reacción de desprotonación, puede acarrear un error de una unidad de pK_a .^{41,42} Según establecieron Liptak y Shields en 2001, al menos, pueden existir tres fuentes de error en un cálculo de pK_a . La primera es el modelo que se emplea para calcular el pK_a , que generalmente implica el uso de un ciclo termodinámico, y comporta la evaluación de la energía libre en fase gas (ΔG_{gas}) de la reacción de ionización, y la energía libre de solvatación (ΔG_{sol}) de las especies neutras y cargadas. La precisión con la que se estiman ambos valores, son la segunda y tercera fuente de potenciales errores del cálculo de pK_a .⁴¹

A lo largo de los años, se han ido definiendo diferentes ciclos termodinámicos para calcular los valores de pK_a . Uno de los más conocidos y empleados es el ciclo termodinámico basado en el protón. Existen dos variantes de este tipo de ciclo termodinámico, el que parte de una estructura con carga neutra y el que parte de una estructura con carga positiva (ver **Figura 3**).^{41,42,43,44}

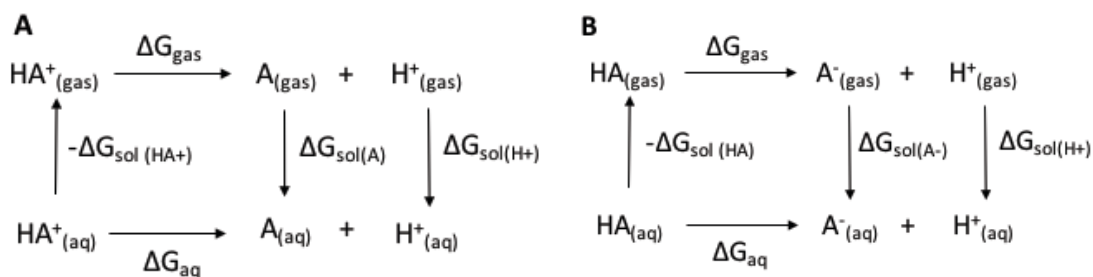


Figura 3. Ciclos termodinámicos basados en protón, con dos variantes: estructura protonada con carga positiva +1 (A) y con carga neutra 0 (B).

El conjunto de energías libres usadas en dichos ciclos termodinámicos se pueden calcular mediante técnicas QM, a excepción de la energía libre de solvatación del protón ($\Delta G_{\text{sol}(\text{H}^+)}$) y la energía libre en gas del protón ($G_{\text{gas}(\text{H}^+)}$), donde se suele asignar un valor experimental, siendo $-265,9$ kcal/mol y $-6,28$ kcal/mol, respectivamente, los valores más aceptados actualmente.

Otros ciclos termodinámicos se basan en la reacción de desprotonación con la participación de una molécula de agua, como los que se muestran en la **Figura 4**.^{44,45,46,47} En estos casos, el número de aguas incluidas puede variar, siendo necesario considerar términos de corrección por el efecto de concentración para obtener valores referidos al estado estándar 1M.^{46,47}

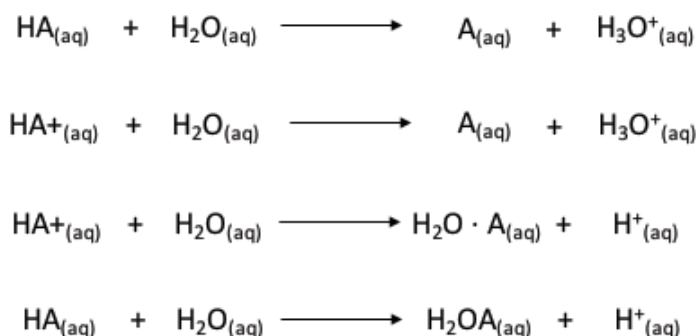


Figura 4. Reacciones de desprotonación con la participación de molécula de agua, a partir de las cuales establecer un ciclo termodinámico.

La principal limitación de los ciclos termodinámicos derivados de estas reacciones es la presencia del ion hidronio (H_3O^+), puesto que la estimación de su energía libre de solvatación ($\Delta G_{\text{sol}(\text{H}_3\text{O}^+)}$) es difícil de estimar debido a su reducido tamaño y la elevada magnitud de interacciones formadas con otras moléculas de agua. Por ello, se suele usar

valores experimentales en condiciones estándar de 1M de la energía libre de solvatación del ion hidronio ($\Delta G_{\text{sol}(\text{H}_3\text{O}^+)(1\text{M})} = -110,3 \text{ kcal/mol}$) y de la molécula de agua ($\Delta G_{\text{sol}(\text{H}_2\text{O})(1\text{M})} = -6,32 \text{ kcal/mol}$).^{48,49,50} Al igual que antes, añadir moléculas de agua adicionales en el ciclo termodinámico incrementa el error computacional en la determinación del $\text{p}K_{\text{a}}$.

Finalmente, otros tipo de ciclos termodinámicos son aquellos derivados de la reacción de disociación del protón con la participación de un ion hidróxido (OH^-) (ver **Figura 5**).^{44,51}

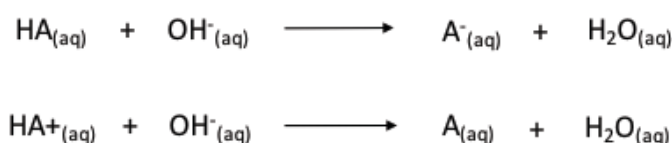


Figura 5. Reacciones de desprotonación con la participación del ion hidróxido, a partir de las cuáles establecer un ciclo termodinámico.

El aumento del número de reactivos conlleva un incremento en el número de cálculos, siendo difícil evaluar con precisión la energía libre de solvatación del ion hidróxido, debido a pequeño tamaño y a las intensas interacciones con moléculas de agua, siendo conveniente emplear el valor experimental en condiciones estándar de 1 M ($\Delta G_{\text{sol}(\text{OH}^-)} = -104,7 \text{ kcal/mol}$).^{50,52}

1.1.2.4. Limitación de valores experimentales

Dentro de las fuentes de error que pueden tener los cálculos computacionales de $\text{p}K_{\text{a}}$, conviene comentar brevemente los valores experimentales empleados para la energía libre de solvatación ($\Delta G_{\text{sol}(\text{H}^+)}$) y la energía libre en fase gas del protón ($G_{\text{gas}(\text{H}^+)}$).

En lo que refiere a $G_{\text{gas}(\text{H}^+)}$, existe un consenso acerca del valor de $-6,28 \text{ kcal/mol}$, que puede deducirse a partir de la combinación de las ecuaciones estándar de termodinámica y la ecuación de Sackur-Tetrode, dando lugar a un valor muy parecido al experimental, reportado en la base de datos NIST.⁵³

En contraste, ha habido mayor debate acerca de $\Delta G_{\text{sol}(\text{H}^+)}$, cuyo valor se había fijado en el rango de -254 a -261 kcal/mol ⁵¹ hasta llegar a un valor más o menos aceptado de -

265,9 kcal/mol.⁵⁰ El principal problema en la determinación de $\Delta G_{\text{sol(H+)}}$ ha sido que los iones nunca se encuentran aislados, y que por tanto ha sido necesario deducir su valor a partir de datos experimentales para pares iónicos.

Uno de los primeros valores de $\Delta G_{\text{sol(H+)}}$ empleados fue el de -261,4 kcal/mol, siendo estimado a partir de la media de 5 medidas independientes con un electrodo de ion hidrogeno.⁵⁰ Más adelante, Karplus y colaboradores reportaron que los métodos continuos no eran lo suficientemente precisos para determinar energías absolutas de solvatación. Sobre 2001, con la aparición de nuevos métodos de solvatación, se llegó a la conclusión que el uso del valor previamente comentado era erróneo.⁵⁴ Posteriormente algunos grupos, como Liptak y Shields, empezaron a usar un valor de $\Delta G_{\text{sol(H+)}}$ de -264,61 kcal/mol, es decir, 3 unidades más negativo que el antiguo valor experimental.^{41,42}

En 1998, Coe, Tissandier y colaboradores derivaron un nuevo valor de $\Delta G_{\text{sol(H+)}}$ de -264,0 kcal/mol.⁴⁸ Cuando dicho valor fue propuesto, en su día se creía que era en condiciones estándar 1M^{55,56,57}, más adelante, y tras unos años de confusión, se concluyó que dicho valor realmente era en condiciones estándar de 1 atm, y que por lo tanto el valor real en condiciones 1M era -265,9 kcal/mol. Este último valor de -265,9 kcal/mol es uno de los valores más aceptados, siendo confirmado más adelante por un trabajo de 2006 de Kelly y colaboradores.^{49,50} A pesar que el valor propuesto por Tissandier es muy aceptado, sigue existiendo un posible margen de error, que podría oscilar en torno a 2 kcal/mol.⁵⁰

Otro aspecto clave a tener en cuenta en los cálculos QM del valor de pK_a es las condiciones estándar en las cuales se encuentran las especies del ciclo termodinámico. Generalmente, se trabaja en condiciones estándar 1 M y condiciones estándar de 1 atm. El factor de conversión entre ambos estados es 1,89 kcal/mol,^{40,50} siendo necesario fijar el estado de referencia para evitar un error significativo en la estimación del pK_a .

1.1.3. Caracterización conformacional y de ionización

Analizados distintos aspectos conformacionales, sobretodo en la estimación del penalty conformacional para acceder a la conformación bioactiva y, de la ionización, tratando de obtener un valor preciso de pK_a que permita ver su comportamiento farmacocinético y farmacológico, parece evidente que es necesaria una visión conjunta de ambos aspectos que permita una correcta exploración y caracterización de las especie bioactiva de pequeñas biomoléculas flexibles.

En la misma línea, un error en la identificación de la *conformación bioactiva* o del *estado de ionización* puede llevar no sólo a una estimación incorrecta de la afinidad ligando-receptor, sino también a hipótesis mal sustentadas acerca del posible modo de unión. De la misma forma, es fundamental de cara a seleccionar el conjunto de conformaciones relevantes en proyectos de cribado virtual de moléculas, reduciendo de forma considerable el coste computacional y contribuyendo a mejorar el éxito en la identificación de posibles candidatos a fármaco.

1.2. Estudio y diseño de nuevo inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para el tratamiento de Malaria

1.2.1. Malaria

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium sp.* transmitidos al ser humano por la picadura de mosquitos hembras infectados del género *Anopheles*, que ejercen de vectores.⁵⁸ Existen más de 400 especies de dicho mosquito, aunque solamente 30 de ellas son vectores importantes del paludismo.⁵⁹ La intensidad de la transmisión depende de factores relacionados con el parásito *Plasmodium*, el vector *Anopheles*, el huésped humano y el medio ambiente.

Existen cinco especies del parásito capaces de causar Malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*,⁶⁰ si bien las dos primeras son las más peligrosas. Así, *P. falciparum* es el parásito causante del paludismo más prevalente en el continente

africano y en general el responsable de la mayoría de muertes provocadas por malaria en el mundo. A su vez, *P. vivax* es la forma dominante en la mayoría de los países del África subsahariana.

La malaria es una enfermedad febril aguda, cuyos primeros síntomas en personas no inmunes suelen aparecer a los 10-15 días tras la picadura del mosquito *Anopheles*. Dichos síntomas iniciales son inespecíficos y de difícil reconocimiento, como fiebre, dolor de cabeza y escalofríos. Cuando la infección no se trata durante las 24 horas iniciales, el paludismo por la especie más problemática, *P. falciparum*, puede agravarse suponiendo normalmente la muerte del huésped.

Existen diferentes grupos específicos, que corren un riesgo más elevado de contraer la enfermedad y presentar sintomatología más grave, tales como lactantes, niños menores de cinco años, embarazadas, pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA), emigrantes no inmunizados de zonas endémicas, así como viajeros y grupos de población itinerante. Especialmente destacable, el grupo de niños menores de 5 años, siendo un grupo vulnerable a contraer infección, enfermar y fallecer, representando un 70% de las muertes por paludismo. En niños con enfermedad grave, el cuadro clínico empeora con anemia grave, sufrimiento respiratorio relacionado con la acidosis metabólica o paludismo cerebral. En adultos es muy frecuente la afectación multiorgánica. En algunos casos, en zonas donde el paludismo es endémico, las personas pueden adquirir una inmunidad parcial, dando lugar a infecciones asintomáticas.

Respecto a la incidencia, se calcula que en 2016 hubo 216 millones de casos de paludismo en 91 países, suponiendo un aumento en 5 millones con respecto al año anterior.⁶¹ Con respecto a la mortalidad, en 2016 murieron 445.000 personas, unos número parecido a los de 2015. La inmensa mayoría de casos y muertes ocurren en el África Subsahariana, registrando en 2016 el continente africano un 90% de los casos y un 91% de la mortalidad.

1.2.1.1. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

Plasmodium necesita dos huéspedes para desarrollar su ciclo vital. Por un lado, las hembras del mosquito *Anopheles sp.*, que actuará como vector transmisor, y por otro lado el ser humano.

El ciclo de vida del parásito se inicia con la inoculación de la forma **esporozoíto** del parásito desde las glándulas salivales y el tubo digestivo del vector *Anopheles*, donde este se encuentra alojado, al torrente sanguíneo del huésped humano (**Figura 6**). A través de la circulación, el **esporozoíto** alcanza el hígado, donde entra dentro de las células hepáticas. Una vez invadido, el esporozoíto adopta la forma madura de *Plasmodium*: el **esquizonte**. A menudo, algunas formas de esquizonte son capaces de mantenerse en forma latente durante largos períodos de tiempo, en una forma del parásito conocida como **hipnozoíto**. Dado que fortuitamente puede activarse, provoca la misma sintomatología de malaria sin tener asociación directa a la picadura del mosquito, especialmente en *P. ovale* y *P. vivax*.

Posteriormente, el esquizonte lleva a cabo una replicación asexual que da lugar a la forma de **merozoíto**. En un sola célula hepática infectada se pueden generar entre 10.000 y 30.000 merozoítos, en un relativo corto plazo de tiempo. Cuando el número de merozoítos es muy elevado, estos rompen el hepatocito, liberándose nuevamente al torrente sanguíneo. Una vez los merozoítos abandonan el hígado, estos invaden los eritrocitos y lo van degradando, donde acaban alcanzando la fase de trofozoíto. En esta etapa, el merozoíto sufre diferentes reproducciones asexuales, liberando más merozoítos al torrente sanguíneo.

Dentro del hematíe, el trofozoíto inicia su proceso de maduración. En las primeras fases, el parásito presenta una forma de anillo muy característica, que a medida que madura pierde. El parásito va degradando el eritrocito hasta provocar su lisis, liberándose en forma de nuevos merozoítos. En este punto, los merozoítos pueden seguir invadiendo nuevos eritrocitos, o bien adquieren forma de **gametocito**, que puede ser masculino (microgametocito) y/o femenino (macrogametocito).

El ciclo se cierra, cuando los gametocitos masculinos y femeninos infectan nuevas hembras sanas de *Anopheles* al picar estas al ser humano y absorberlos del torrente sanguíneo. Posteriormente, *Plasmodium* se desplaza al intestino del mosquito donde evolucionará la fase de **ooquineto** y más adelante a **ooquiste**. Esta última forma iniciará la producción de nuevos miles de esporozoítos que podrán ser inoculados a nuevos seres humanos.

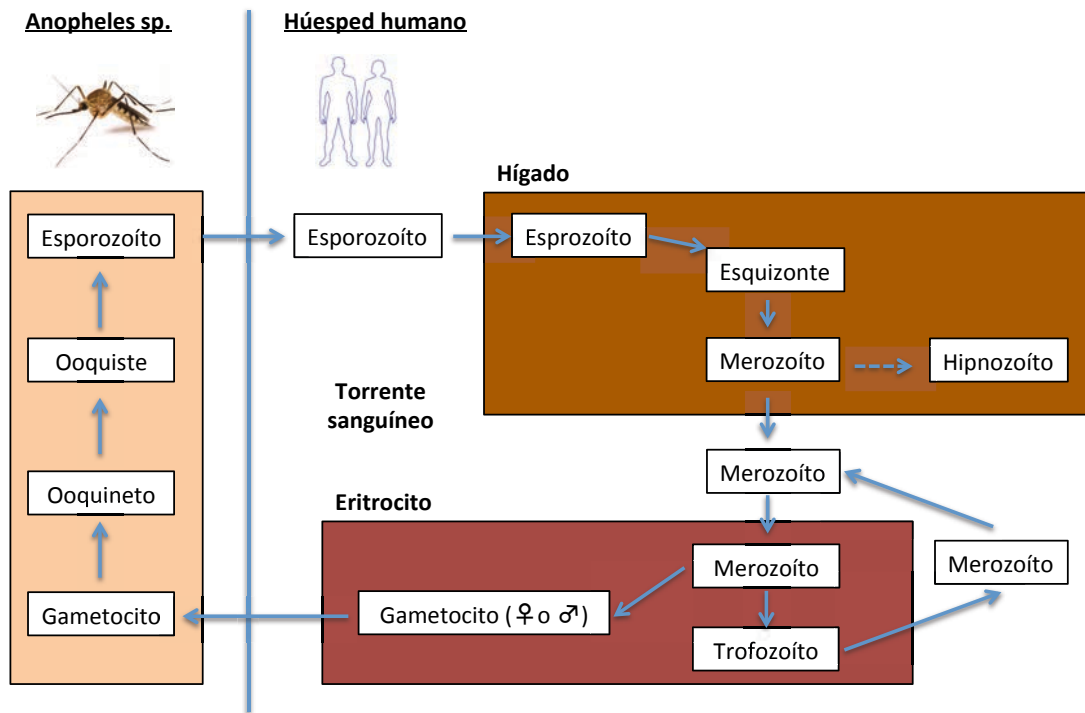


Figura 6. Ciclo de vida esquemático de *Plasmodium sp.*

1.2.1.2. Tratamiento de Malaria ^{62,63}

A pesar de ser una enfermedad con una elevada incidencia, el paludismo es una patología prevenible y tratable. La estrategia general consiste en lograr una eliminación rápida y completa del agente infeccioso de la sangre del paciente para así limitar el cuadro a un paludismo no complicado, evitando un cuadro de enfermedad más grave. Los tratamientos empleados tratan de reducir la transmisión de la infección a otras personas, a base de reducir el reservorio infeccioso y en prevenir la aparición y/o propagación de resistencias a los tratamientos efectivos actuales.

La artemisinina (**Figura 7**) fue aislada por primera vez por científicos chinos en el año 1972 a partir de la planta *Artemisia annua*, también llamada ajeno dulce o ajeno chino,

una planta usada en el país asiático durante más de 2000 años, con el nombre tradicional de *Qinghao*.⁶⁴

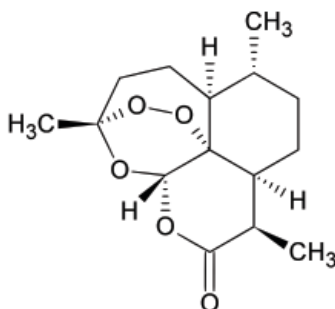


Figura 7. Estructura química de la artemisinina

Junto a otros fármacos derivados, como artesunato, artemeter, dihidroartemisinina, ácido artelínico, artemimol o artemotil, la artemisinina es la primera línea de defensa farmacológica frente al paludismo en muchas partes del Sudeste Asiático. El perfil farmacológico favorable de artemisinina radica principalmente en que es capaz de eliminar gran parte de las formas asexuales del parásito en sangre⁶⁵ e incluso afecta a las formas sexuales (gametocitos) de *P. falciparum*.⁶⁶ Por el contrario, no consigue atacar las formas pre-eritoricíticas ni las formas latentes de hipnozoítos, estas últimas típicas de *P. vivax* y *P. ovale*.

El mecanismo de acción de la artemisinina sigue siendo poco claro. La integridad del puente endoperoxido parece necesaria, aunque no suficiente. Un posible mecanismo que se sospecha es la alquilación dependiente del ion Fe^{2+} por parte de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplasmático (SERCA, *Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*).^{67,68} Publicaciones más recientes apuntan a que la artemisinina podría actuar dañando proteínas e inhibiendo el proteasoma del parásito.⁶⁹

A pesar de que artemisinina por sí sola es un potente fármaco, se ha visto que esta potencia es especialmente alta cuando se combina con otros fármacos antimaláricos. Por ello, actualmente, los Tratamientos Combinados con Artemisinina (TCA) son la piedra angular de la terapia contra el paludismo no complicado causado por *P. falciparum*.

Dicha estrategia se basa en la combinación de dos principios activos con diferentes mecanismos de acción, siendo uno de ellos artemisinina.⁷⁰ Normalmente, el otro fármaco suele tener una semivida más elevada, lo cual facilita una mayor eficacia de la

artemisinina, reduce la duración general del tratamiento y parece tener una gran influencia en reducir el desarrollo de resistencias. Además, de forma general su perfil de seguridad es favorable.⁷¹

La OMS recomienda hasta cinco tratamientos combinados, basados en artemesinina, siendo de elección uno u otro en función de los resultados de eficacia terapéutica contra las cepas locales de *P. falciparum*. De la misma forma, desaconseja el uso individual de ésta y de sus derivados, puesto que su administración en monoterapia favorece la aparición de farmacoresistencia.⁷²

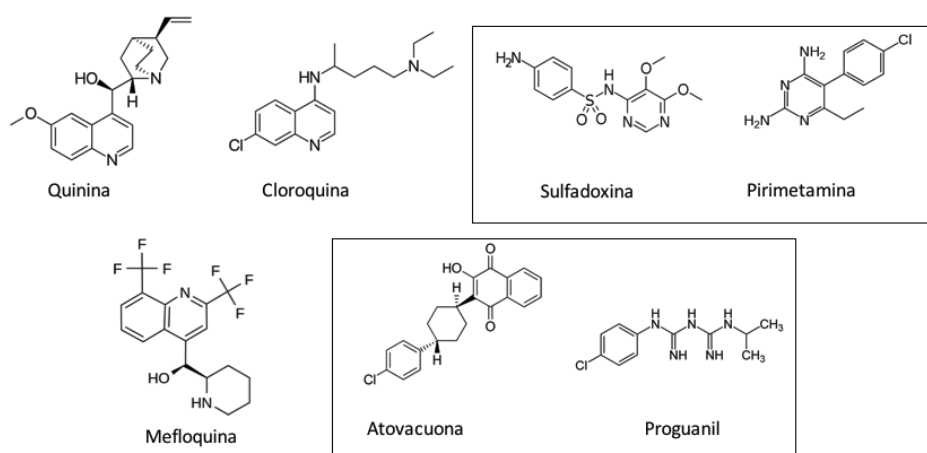


Figura 8. Estructura química de algunos conocidos fármacos antipalúdicos

A parte del TCA existen otros tratamientos preventivos o curativos que pueden ser útiles frente al parásito (**Figura 8**), tales como la quinina, cloroquina, sulfadoxina/primetamina, mefloquina, atovacuona/proguanil, entre otros. Todos ellos se encuentran indicados en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud.⁷³

La quinina es un compuesto proveniente de la corteza del quino (*Chincona calisaya*) que fue empleado durante muchos años como el tratamiento del paludismo hasta que fue sustituido por otros fármacos antimaláricos más eficaces como cloroquina.

La cloroquina es una 4-aminoquinolina que fue sintetizada por los laboratorios Bayer en 1934, y que entre sus otros usos fue y es empleado como uno de los fármacos antimaláricos de referencia durante casi 40 años, del cual se desconoce su mecanismo

de acción. Sin embargo, como otros fármacos antimaláricos se empezaron a desarrollar resistencias en la frontera entre Tailandia y Camboya en 1957.

El tratamiento combinado Sulfadoxina/Primetamina, comercializado con el nombre de Fansidar®, es empleado también como tratamiento y prevención frente a *Plasmodium falciparum*, pero debido a los efectos adversos que produce no se recomienda como tratamiento de rutina y solamente se hace en áreas donde otros tratamientos no funcionan. También, la mefloquina es otro fármaco usado en la prevención y tratamiento del Paludismo, sin embargo sobreque durante unos años supuso una ventaja puesto que era activo frente a cepas resistentes a quinina y cloroquina, pero a partir de 1985 se empezaron a detectar resistencias, aparte se han descrito algunos efectos adversos.

La combinación de fármacos Atovaquona-Proguanil, comercializado como Malarone®, a pesar que se puede usar tanto como preventivo como tratamiento, actualmente es uno de los tratamiento habituales para prevenir la Malaria, el cual se toma antes, durante y después de viajar a países donde Malaria es endémica.

Sin embargo, en los últimos años *Plasmodium falciparum* ha empezado a desarrollar resistencias a la mayoría de fármacos antimaláricos, incluido el TCA, lo que supone un riesgo serio a los avances que se han conseguido en la eliminación del Paludismo.^{74,75}

Por otra parte, como ya se ha comentado, en ciertos casos se pueden dar lugar a efectos adversos. En el tratamiento de primer elección, TCA, los efectos adversos vienen determinados principalmente por el otro fármaco con el que acompañamos artemisinina. Por ejemplo, trombocitopenia causada por quinina⁷⁶ o toxicidad cardiaca relacionada con cloroquina.⁷⁷ Además, también se han descrito algunos casos donde artemisinina puede causar disminución de la eritropoiesis, hipersensibilidad y no queda claro su potencial efecto teratogénico.

Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos capaces de sobrepasar estas limitaciones y ser más eficientes frente al parásito. De la misma forma, se debe

profundizar en el conocimiento del ciclo de vida básico y la biología de desarrollo de *Plasmodium*, para así identificar posibles nuevas dianas terapéuticas que permitan obtener tratamientos antimaláricos efectivos y de bajo coste.^{78,79}

1.2.2. Ruta de las Pentosas Fosfato

La Ruta de las Pentosas Fosfato, o en su nombre en inglés, *Pentose Phosphate Pathway* (PPP), es una ruta metabólica clave y fundamental en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (ADN y ARN). Adicionalmente, dicha vía permite la obtención de poder reductor en forma de NADPH, el cual será usado como coenzima de otras enzimas.⁸⁰

La PPP consta de dos fases: la Fase Oxidativa (**Figura 9**), donde se lleva a cabo la producción de NADPH, y la Fase No Oxidativa, donde se sintetizan las pentosas-fosfato.

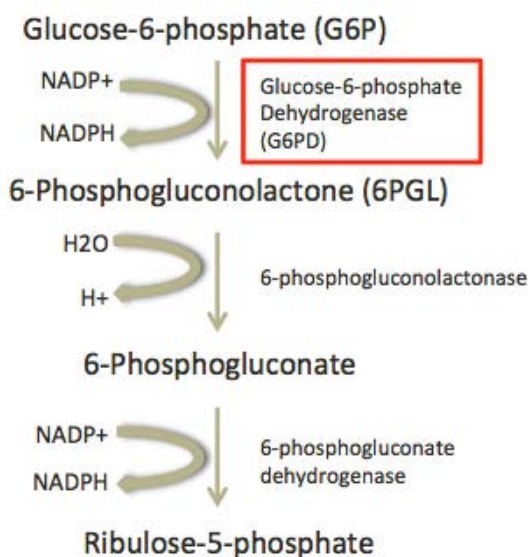


Figura 9. Fase oxidativa de la Ruta de las Pentosas Fosfato (PPP, *Pentose Phosphate Pathway*)

En la Fase Oxidativa, a partir de la Glucosa-6-fosfato se obtiene la 6-fosfogluconolactona, gracias a la acción de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Más concretamente, se produce una deshidrogenación, donde el carbono 1 de la G6P se convierte en un carbonilo, lo cual genera una lactona. En este proceso una primer molécula de NADPH es generada.

El siguiente paso consiste en la hidrólisis de la lactona formada en el paso previo, rompiendo así el ciclo y dando lugar a 6-fosfogluconato, todo regulado por la enzima 6-Fosfogluconolactonasa. Finalmente, el último paso, metabolizado por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, provoca la descarboxilación del 6-fosfogluconato en Ribulosa-5-P, que produce CO₂ y una segunda molécula de NADPH.

Centrándose nuevamente en el parásito, dicha vía metabólica se encuentra presente tanto en el ser humano como en *P. falciparum*. De forma general, los pasos, intermedios y enzimas son los mismos. La diferencia más importante reside en los dos primeros pasos de la Fase Oxidativa: mientras que en el ser humano, son realizados por dos enzimas separados, en el caso del parásito, son realizados por un mismo enzima de carácter bifuncional.^{81,82,83,84,85,86,87}

En lo que refiere a los eritrocitos, este proceso es clave para mantener la homeostasis redox celular, que es de particular importancia en los hematíes, puesto que no disponen de mitocondrias y por lo tanto no tienen otra fuente de NADPH.^{88,89,90,91} Por lo que refiere al parásito, también es necesario para reducir equivalentes para reacciones biosintéticas, rutas anabólicas y protegerse frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS).^{92,93,94}

Diferentes evidencias parecen indicar que la actividad de la ruta PPP, tanto el ser humano como en el parásito, son cruciales durante la infección eritrocítica. En primer lugar, se ha visto que la deficiencia de G6PD alcanza niveles muy elevados en aquellas áreas donde el Paludismo es endémico, a través de la selección de aquellos individuos que tienen deficiencia de G6PD, quedando estos protegidos frente a Malaria.^{95,96} En segundo lugar, se ha observado que hay un incremento en hasta 78 veces de más actividad de PPP en aquellos eritrocitos infectados por el parásito.⁹⁷ En tercer lugar, se ha visto que el enzima dual G6PD-6PGL tiene un papel metabólico esencial, puesto que el silenciamiento temporal de su gen ha mostrado que el parásito se detenga en el estado de trofozoíto y una formación de potenciada de gametocitos.⁹⁸

Por estos y otros motivos, se pone de manifiesto que G6PD es esencial para la biología de *Plasmodium* y proporcionan un base para considerar este enzima como una diana con potenciales beneficios terapéuticos sobre la que desarrollar inhibidores selectivos.⁹³

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Capítulo 2: Objetivos

En el proyecto de la presente tesis se persiguen dos objetivos principales, ambos ubicados en el contexto del diseño de fármacos.

2.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas

El **primer objetivo**, de carácter eminentemente metodológico, persigue refinar metodologías para la caracterización de la especie bioactiva, especialmente en cuanto concierne al estado de ionización y a su conformación bioactiva. Por ello, se ha planteado la evaluación de diferentes métodos QM para predecir el pK_a de compuestos, así como el empleo de la estrategia Multinivel para el estudio de las preferencias conformacionales y la estimación del coste conformacional de acceder a la conformación bioactiva.

En primer lugar, se pretende validar la metodología Multinivel a un conjunto de moléculas tipo fármaco más grande que en anteriores trabajos, centrándose en una correcta estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva. También se ha probado dichas metodologías en el estudio de nuevos híbridos huprina-reína, particularmente en el desarrollo de una segunda generación de compuestos a partir de la modificación del anillo de clorobenceno de la Huprina Y con distintos anillos heteroaromáticos, para así modular su perfil multidiana. Finalmente, también se han aplicado a una serie de tetrahidroazocinas con el objetivo de comprender las características moleculares que modulan su actividad, tratando diferentes aspectos como la libertad conformacional, la tautomería y su capacidad de ionización.⁹⁹

2.2. Estudio y diseño de nuevo inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para el tratamiento de Malaria

El segundo objetivo, de carácter aplicado, se centra en el desarrollo de inhibidores frente al enzima *PfG6PD* con un mejor perfil *drug-like*. Con ello, se pretende mejorar el perfil sintético y de biodisponibilidad de los compuestos análogos de glucosa, llevando

a cabo la inhibición de uno de los enzimas claves en la biología del desarrollo de *Plasmodium*, y a su vez incidir en el desarrollo de posibles fármacos antimaláricos.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

Capítulo 3: Metodología

3.1. Metodologías generales

De forma general, la presente tesis doctoral ha conllevado el uso de diferentes técnicas computacionales:

a) Métodos de mecánica cuántica (QM): Implicados en el análisis conformacional de moléculas, incluyendo optimización de geometría, análisis de frecuencias y refinado de energía con métodos de tratamiento de correlación electrónica de alto nivel, la inclusión de efectos de solvatación mediante modelos continuos, el cálculo en las cargas parciales en los ligandos empleados en Dinámica Molecular mediante ajuste al potencial electrostático en puntos alrededor de la molécula, así como el cálculo de pK_a (principalmente *Gaussian09*^{®100}).

b) Modelización molecular: Incluye el uso de programas de visualización molecular (*Pymol*^{®101}), *Gaussview 5.0*^{®102}, etc.), acoplamiento molecular (*docking*) y cribado virtual (*virtual screening*) (*Glide*^{®103,104,105,106}, *Autodock4*¹⁰⁷, *PharmScreen*^{®108}).

c) Simulación molecular: Se ha usado dinámica molecular (principalmente *AMBER14*^{®109}) con objeto de estudiar el espacio conformacional de ligandos en solución acuosa o bien de complejos ligando-receptor. Ha sido una parte muy relevante de la estrategia Multinivel (ML). También ha sido empleada en el diseño de fármacos basado en estructura del receptor, con objeto de proceder a la optimización de los hits obtenidos inicialmente en el grupo, así como explorar otras estructuras químicas susceptibles de unirse selectivamente a *PfG6PD*.

3.2. Metodologías específicas

3.2.1. Metodología Multinivel (ML)

Por lo que refiere a la metodología ML, concretamente en su aplicación para la estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva, el

procedimiento computacional consta esencialmente de los pasos mostrados en la **Figura 10**.²³

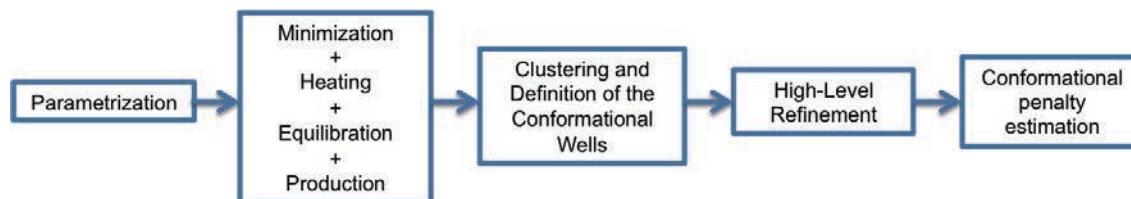


Figura 10. Representación del procedimiento computacional asociado a la metodología ML en la estimación del coste conformacional de la selección la especie bioactiva.

3.2.1.1. Parametrización y preparación del sistema

En primer lugar, se tomaron las estructuras de partida y se llevó a cabo una optimización a nivel HF/6-31G(d), optimizando así la estructura de partida y simultáneamente mediante el método *RESP*¹¹⁰ se calcularon las cargas atómicas puntuales. A continuación, con el uso de *Antechamber*, uno de los módulos en los que se organiza el programa de dinámica molecular *AMBER14*®, se asignaron los diferentes tipos atómicos cada uno de los átomos de la molécula en estudio, llevando a cabo así su parametrización, con el campo de fuerzas general de *AMBER* o *gaff* (*General Amber Force Field*).¹¹¹

Posteriormente, mediante el modulo *xLeap* de *AMBER14*®, se sumergieron cada uno de los ligandos en una caja de aguas octaédrica TIP3P,¹¹² limitando el diámetro de esta a 12 Å. También se añadieron el número suficiente de contraiones sodio (Na⁺) y cloro (Cl⁻), dependiendo del la carga de la molécula.¹¹³

3.2.1.2. Muestreo a bajo nivel de teoría (*Low-Level, LL*)

El protocolo de dinámica molecular consta de 4 pasos. El primero de ellos empieza con un minimizado del sistema de unos 10.000 pasos, donde se combinan los algoritmos de gradiente descendente (*steepest descent*) (2.500 pasos) y gradiente conjugado (*conjugate gradient*) (7.500 pasos).

A continuación, se aumenta la temperatura del sistema lentamente, en un primer paso de 50 a 150 K y en un segundo paso de 150 a 298 K, durante un total 500 ps, en

condiciones de *colectivo canónico* (NTV). Posteriormente, se equilibró la densidad del sistema durante 500 ps más, en condiciones de *colectivo isotérmico-isobárico* (NTP) a 298 K. Finalmente, se llevó a cabo el muestreo del espacio conformacional mediante ciclos de producción donde la longitud de simulación varió entre 0,5 μ s para los compuestos menos flexibles a 1,5 μ s para los más flexibles.

Se aplicó el algoritmo *SHAKE* a todos los enlaces que involucraban átomos de hidrógeno¹¹⁴, asignando un tiempo de integración de 2 fs. El método *Particle-Mesh Ewald* (PME)¹¹⁵ se usó con un valor de corte de 8 Å para el tratamiento de las interacciones electrostáticas de largo alcance, y se aplicó el mismo valor de corte a todas las interacciones no enlazantes.

Se realizaron tres simulaciones concatenadas para cada ligando con el fin de verificar la convergencia en la población conformacional. Con este fin, se inició una primera simulación de MD a partir de la conformación del ligando en solución acuosa obtenida en el paso de equilibrado utilizando el protocolo comentado anteriormente. Una vez corrida una quinta parte de la trayectoria, se extrajo la estructura y se usó como estructura de inicio para una segunda trayectoria, después de sumergirla en una caja de solvente y asignarle nuevas velocidades. Finalmente, se utilizó este procedimiento nuevamente para la preparación de una tercera simulación a partir de la segunda trayectoria.

3.2.1.3. Definición de los mínimos conformacionales

La obtención de los mínimos conformacionales se realizó a partir de la proyección de las diferentes conformaciones muestreadas en una cuadrícula de n -dimensiones, donde n es el número de torsiones activas (**Figura 11**). A continuación se llevó a cabo una búsqueda sistemática basada en la energía de las estructuras proyectadas, donde se partía de la estructura de mínima energía en un punto determinado de la cuadrícula y extendía la búsqueda en todas las posiciones adyacentes. En caso de detectar conformaciones con mayor energía que el punto precedente, se incluía la estructura en el mismo pozo conformacional. Si por contra, era de menor energía que el punto precedente, este se consideraba como parte de otro pozo conformacional, deteniéndose

la búsqueda. Dicha búsqueda también se paraba si no se detectaban conformaciones en ninguna de las direcciones adyacentes. Una vez finalizada una búsqueda se determinaba el tamaño del pozo y se buscaba una nueva estructura de mínima energía sobre la que iniciar otro proceso de búsqueda.

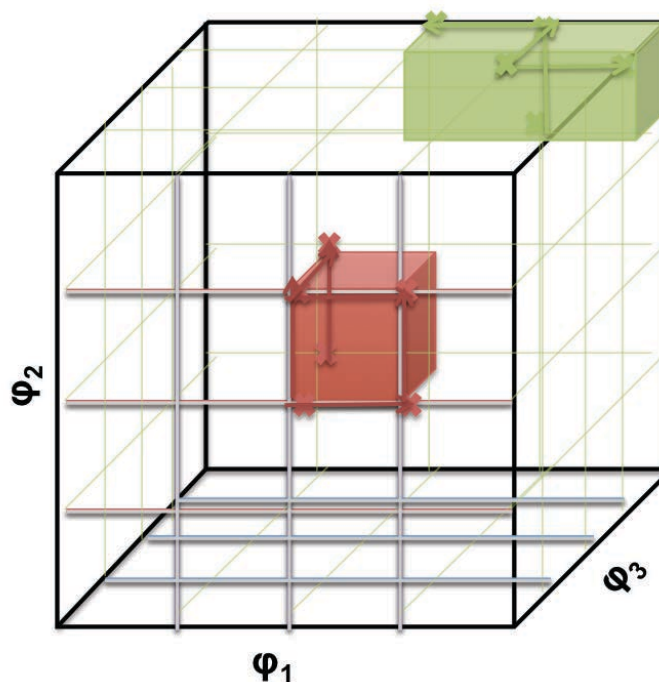


Figura 11. Representación esquemática de la cuadrícula y los pozos conformacionales detectados, para un espacio conformacional definido por tres torsiones activas (ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3), obtenida de la tesis doctoral del Dr. Jordi Juárez-Jiménez.¹¹⁶

La selección de las torsiones activas se realizó en base a aquellos ángulos diedros que pueden tener mayor impacto en definir la flexibilidad conformacional de los compuestos en cuestión. Por ello, la flexibilidad molecular de determinados enlaces flexibles, como el movimiento de grupos terminales incapaces de participar en interacciones intramoleculares o enlaces con cierto carácter de doble enlace, no se consideraron. En dicha selección se empleó la ayuda del programa *DataWarrior*®,¹¹⁷ aunque la asignación final fue revisada por inspección visual.

Los requerimientos establecidos para escoger el conjunto total de pozos conformacionales para un compuesto consistían en alcanzar como mínimo un 85% del total de las estructuras muestreadas en la MD, y se trató de excluir aquellos con una población inferior al 3%.

3.2.1.4. Refinado a alto nivel de teoría (HL)

Para cada pozo conformacional, se escogió la estructura del centroide como conformación representativa, optimizándose la geometría molecular a nivel B3LYP/6-31G(d) con la inclusión de efectos del solvente a través de la versión del formalismo de Ecuación Integral (*Integral Equation Formalism, IEF*) del modelo continuo de solvente de Miertus-Scrocco-Tomasi (MST).^{118,119}

Se verificó la naturaleza de mínimo energético de la estructura optimizada a partir del análisis vibracional de frecuencias, que a su vez permitió estimar el término de energía de punto cero (*Zero-point energy, ZPE*). Luego, la energía interna de la molécula se refinó por un cálculo puntual a nivel MP2/aug-cc-pVDZ. Finalmente, todo ello permitió determinar la energía libre relativa entre familias conformacionales i y j ($\Delta A_{i,j}$) que se expresa en la **Ecuación 7**.

$$\Delta A_{i,j} = \Delta E_{i_min,j_min}^{MP2} + \Delta ZPE_{i_min,j_min}^{IEF-MST/B3LYP} + \Delta \Delta A_{hyd}^{IEF-MST/B3LYP} + \Delta A_{i,j}^{local} (LL) \quad \text{(Ecuación 7)}$$

donde $\Delta E_{i_min,j_min}^{MP2}$ representa la diferencia de energía en la fase gaseosa entre los mínimos representativos de los pozos i y j en el nivel MP2/aug-cc-pVDZ, $\Delta ZPE_{i_min,j_min}^{IEF-MST/B3LYP}$ es la diferencia en la corrección de ZPE calculada a partir frecuencias vibracionales a nivel IEF-MST/B3LYP/6-31G(d), $\Delta \Delta A_{hyd}^{IEF-MST/B3LYP}$ es la energía relativa libre de solvatación derivada de los cálculos de IEF-MST, y $\Delta A_{i,j}^{local} (LL)$ explica la diferencia en la contribución de energía libre local determinada a partir del muestreo de LL.

3.2.1.5. Estimación del coste conformacional

Para estimar el coste conformacional de seleccionar la conformación bioactiva de un compuesto flexible, la geometría del compuesto se extrajo de la estructura de rayos X¹²⁰ y se optimizó a nivel IEF-MST//B3LYP/6-31G(d), pero imponiendo restricciones armónicas a los átomos pesados que forman parte de las torsiones activas ($RHarmonic =$

10). A continuación, se evaluó la energía a nivel MP2/aug-cc-pVDZ y se determinó el coste conformacional entálpico a partir de la diferencia entre la conformación más estable en solución según ML y la conformación bioactiva. Las energías empleadas en este caso obviaban la contribución ZPE, debido a la presencia de frecuencias vibracionales negativas y la de la energía local, debido a su pequeño valor $\Delta A_{i,j}^{local}(LL)$, tal como se muestra en la **Ecuación 8**.

$$\Delta A_{i_min,bio} = \Delta E_{i_min,bio}^{MP2} + \Delta \Delta A_{hyd}^{IEF-MST/B3LYP} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Además del término entálpico detallado en la **Ecuación 8**, también se estimó el coste conformacional debido a la pérdida de estados conformacionales (o coste entrópico) el cual se estimó a partir de la **Ecuación 9**.

$$\Delta A_i^{conf} = \frac{1}{\beta} \ln \left[\sum_{k=1}^{N_k} e^{-\beta(E_{i_min} - E_k)} \right] \quad \text{(Ecuación 9)}$$

donde β es el producto de la constante de los gases ideales R (1,987 cal/K·mol) y la temperatura T (298 K).

3.2.2. Estimación computacional del pK_a de los análogos huprina-reína

De forma general, en el cálculo de pK_a de los derivados huprina-reína se ha llevado a cabo una serie de cálculos cuánticos basados en el ciclo termodinámico de la reacción de desprotonación en agua y en gas.^{40,41} Dichos cálculos implican un refinado con extrapolación CBS (*Complete Basis Set extrapolation*) y corrección SCS-MP2 (*Spin-Component Scaled MP2 correction*) y CCSD para introducir efectos de correlación de alto nivel (**Figura 12**).

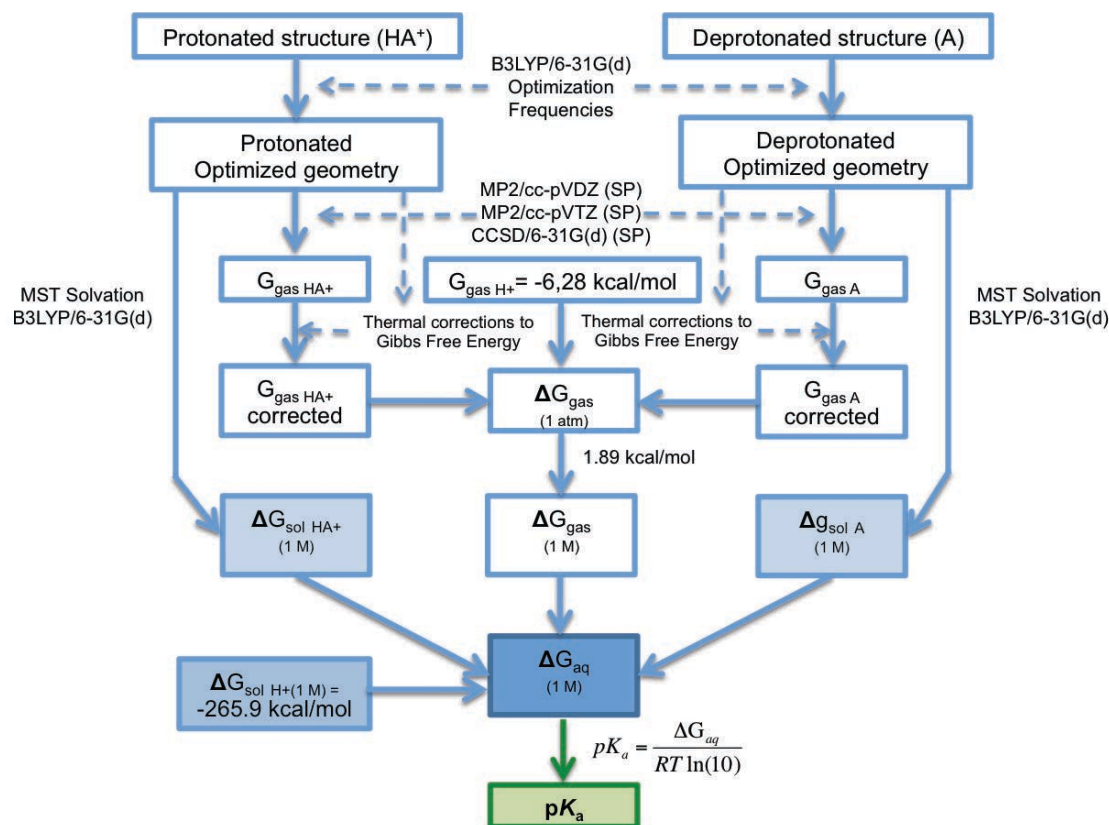


Figura 12. Representación del esquema de trabajo empleado para el cálculo de pK_a de los inhibidores huprina-reína

En primer lugar, las geometrías de las estructuras protonada y deprotonada se optimizaron a nivel B3LYP/6-31G(d)^{121,122,123} [REF] [REF] [REF] y se verificó la naturaleza de mínimo energético a partir del análisis de la frecuencias vibracionales. El cambio en la energía libre en fase gas (ΔG_{gas}) se refinó a partir de la extrapolación al límite de funciones de base (CBS, Complete Basis Set) (E_{CBS})^{124,125} cuya fórmula se detalla en la **Ecuación 10**.

$$E_{CBS} = E_{HF} + E_{corr} + \Delta CCSD \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Respecto los diferentes términos que conforman la energía CBS, la energía Hartree- a energía de correlación (E_{corr}) se determinó mediante la combinación de energías MP2 y HF con bases de Dunning de doble (cc-pVDZ) y triple (cc-pVTZ) zeta, y finalmente la corrección de correlación electrónica de alto orden (ΔCCSD) se determinó a partir de cálculos de cluster acoplado, con excitaciones simples y dobles (CCSD, Coupled

Cluster Single Double), usando la base 6-31G(d). Las fórmulas que permiten calcular los dos últimos términos se especifican en las **Ecuaciones 11 y 12**.

$$E_{corr} = \frac{(E_{MP2/TZ} - E_{HF/TZ})3^3 - (E_{MP2/DZ} - E_{HF/DZ})2^3}{3^3 - 2^3} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

$$\Delta CCSD = (E_{CCSD/6-31G(d)} - E_{HF/6-31G(d)}) - (E_{MP2/6-31G(d)} - E_{HF/6-31G(d)}) \quad \text{(Ecuación 12)}$$

En todos los cálculos MP2 anteriormente comentados se aplicó la corrección de componentes de spin (*SCS-MP2*, *Spin-Component-Scaled MP2*), la cual permite tener en consideración de los tres términos de spin en la energía MP2, y se obtuvo siguiendo la fórmula representada en la **Ecuación 13**.¹²⁶

$$E_{SCS-MP2} = E_{HF} + \frac{1}{3}(E_{corr(alfa-alfa)} + E_{corr(beta-beta)}) + \frac{6}{5}E_{corr(alfa-beta)} \quad \text{(Ecuación 13)}$$

Finalmente, la energía libre en fase gaseosa (ΔG_{gas}) fue obtenida sumando las correcciones térmicas y entrópicas y la energía libre experimental del protón en fase gas ($G_{gas H^+} = -6,28 \text{ kcal / mol}$).^{47,48,49,53}

Para estimar el cambio de energía libre en solución (ΔG_{aq}), se corrigió el valor de ΔG_{gas} , cambiando las condiciones de estado estándar de 1 atm a 1 M, y se añadieron las energías libres de solvatación de la forma protonada ($\Delta G_{sol HA^+}$) y deprotonada ($\Delta G_{sol A}$) determinadas con el método de solvatación continuo de MST a nivel B3LYP/6-31G(d)¹¹⁹ y la energía libre experimental de solvatación del protón ($\Delta G_{sol H^+} = -265,9 \text{ kcal/mol}$).⁵⁰ Finalmente, el pK_a se estimó a partir de la relación expresada en la **Ecuación 14**.

$$pK_a = \frac{\Delta G_{aq}}{RT \ln(10)} \quad \text{(Ecuación 14)}$$

3.2.3. Modelaje de análogos huprina-reína

Respecto al modelaje de los derivados de huprina, se ha trabajado con modelos simplificados de la parte huprina de los ligandos con los residuos más cercanos situados a unos 4 Å.

Respecto a la unión al sitio catalítico de AChE, se comparó las características estructurales de la unión de AChE humana unido a Huprina W (código PDB código: 4BDT),¹²⁷ la forma apo del AChE humana (código PDB: 4PQE) y la del complejo de AChE de *Torpedo californica* con Huprina X (código PDB: 1E66).¹²⁸ A continuación se reemplazó la Huprina W por estructuras optimizadas a nivel M062X/6-31G(d)¹²⁹ de la Huprina X y los diferentes derivados, y se extrajeron todos los residuos cercanos a 4 Å, los cuales también fueron optimizados de forma separada al mismo nivel de teoría.

En lo que refiere a BACE-1, el procedimiento fue el mismo, con la diferencia que las estructuras de la proteína se obtuvieron a partir de estructuras obtenidas de MD, y que en este caso se consideraron las dos orientaciones enantioméricas de la Huprina.¹³⁰

En ambos casos, las estructuras optimizadas de los ligandos y los residuos se superpusieron sobre los aminoácidos obtenidos de las estructuras de referencia. Finalmente, se calculó la energía de interacción mediante cálculos puntuales con corrección BSSE (*Basis Set Superposition Effects*) al mismo nivel de teoría previo.¹³¹

3.2.4. Estimación computacional del pK_a de los compuestos derivados de azocino

La estimación de pK_a de los derivados azocino también se realizó a partir del ciclo termodinámico de la reacción de desprotonación en fase acuosa. Las principales diferencias radican en el nivel de teoría empleado, el cual incluye la energía interna de la molécula a nivel MP2/aug-cc-pVDZ, con correcciones de punto cero (ZPE) y efectos de solvatación mediante el método MST (HF/6-31+G(d)), además de considerar la flexibilidad conformacional mediante la estrategia ML anteriormente comentada, y los equilibrios tautoméricos en la estimación de dichos compuestos. El protocolo ha incluido diferentes pasos que se detallan en la **Figura 13**.

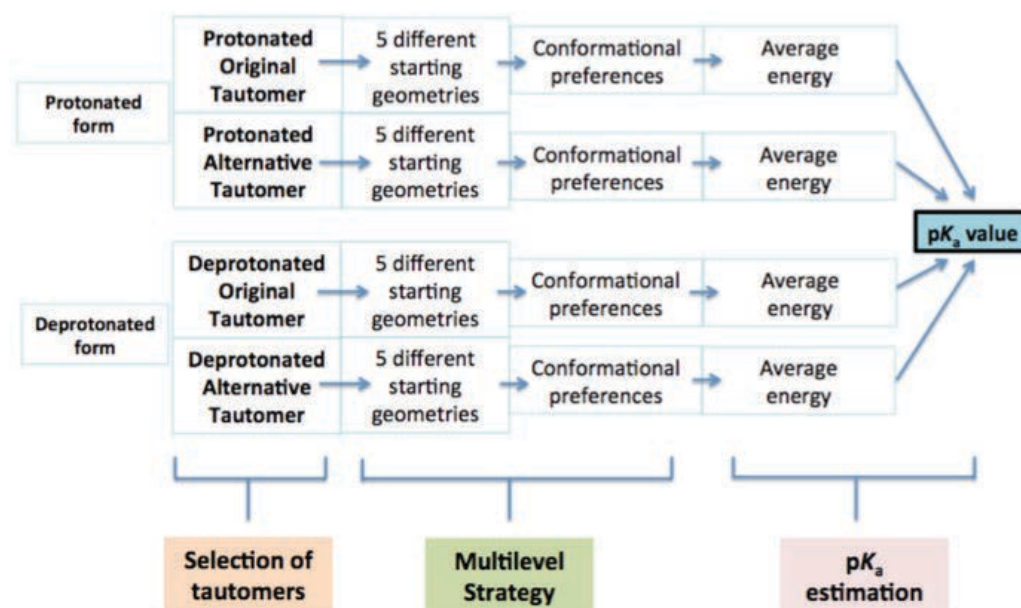


Figura 13. Representación del esquema de trabajo empleado para el cálculo de pK_a de los derivados éster de tetrahidroazocinas

El protocolo consistió en la selección de los posibles formas tautoméricas de los derivados, tanto para la forma tautomérica original y alternativa, así como de cinco conformaciones de partida sobre las que iniciar el proceso de muestreo con la ayuda del programa *Avogadro*®.¹³²

Una vez seleccionadas las geometrías, se inició la estrategia ML, que consistió en un muestreo inicial mediante técnicas de MD, posterior obtención de los mínimos conformacionales, y finalmente refinado mediante métodos cuánticos de alto nivel de teoría.

La energía individual de cada conformero en solución se obtuvo a partir de la suma de las energías MP2/aug-cc-pVDZ, correcciones de punto cero (ZPE) y energías de solvatación con el método MST, tal como se muestra en la **Ecuación 15**. La energía ponderada para cada especie ($G_{avg(1M)}^{ML}$), tanto protonada como deprotonada, se determinó separadamente a partir de la **Ecuación 16**, considerando la energía de la conformación más estable según ML ($G_{i_min(1M)}^{ML}$), y así como la contribución ponderada del resto de familias conformacionales de dicho compuesto.

$$G_{i(1M)}^{ML} = E_{i(1M)}^{MP2} + ZPE_{i(1M)}^{IEF-MST/B3LYP} + \Delta G_{sol(1M)}^{IEF-MST/HF} \quad \text{(Ecuación 15)}$$

$$G_{avg(1M)}^{ML} = G_{i_{min}(1M)}^{ML} - RT \ln \left(\sum_{i=1}^N e^{-\frac{G_{i(1M)}^{ML} - G_{i_{min}(1M)}^{ML}}{RT}} \right) \quad \text{(Ecuación 16)}$$

Finalmente, a partir de las energías de las dos especies participantes en el proceso de desprotonación, juntamente con la suma de $\Delta G_{sol\ H+(1M)}$ y $G_{gas\ H+(1M)}$ (-265,9 y -4,39 kcal/mol, respectivamente), se determinó la $\Delta G_{aq\ H+(1M)}$ del proceso, que finalmente permitió estimar el valor de pK_a a partir de la **Ecuación 17**.

$$\Delta G_{aq} = G_{avg,A,(1M)}^{ML} + \Delta G_{sol,H+(1M)} + G_{gas,H+(1M)} - G_{avg,HA+(1M)}^{ML} \quad \text{(Ecuación 17)}$$

3.2.5. Estudios de estabilidad del anillo azocino

En el estudio de estabilidad del anillo azocino presente en los compuestos N14 y N5, se tomaron los conformeros más estables según la estrategia ML de la forma desprotonada de ambas formas tautoméricas (2A y 2B) y se crearon sistemas simplificados conteniendo el anillo de azocina, sustituyendo los grupos eliminados por átomos de hidrógeno. Todo ello con la ayuda del software *GaussView 5.0*¹⁰².

En el caso del compuesto N14, se crearon cuatro sistemas: (4Z,7Z)-1,6-dimetil-1,2,3,6-tetrahydroazocina, (4Z)-1,6-dimetil-1,2,3,8-tetrahydroazocina, metil (2E,5Z)-1,4-dimetil-1,4,7,8-tetrahydroazocina-3-carboxilato y metil (5Z)-1,4-dimetil-1,2,7,8-tetrahydroazocina-3-carboxilato. Los dos primeros corresponden a sistemas con el “anillo desnudo” y el sustituyente éster de los tautómeros 2A y 2B, respectivamente, y los dos últimos con el grupo éster en posición alfa con respecto al nitrógeno protonable, de los tautómeros 2A y 2B, respectivamente.

En el caso del compuesto N5, se crearon ocho sistemas: (4Z,7Z)-1-metil-1,2,3,6-tetrahydroazocina, (4Z,6Z)-1-metil-1,2,3,8-tetrahydroazocina, metil (2Z,5Z)-1-metil-1,4,7,8-tetrahydroazocina-2-carboxilato, metil (3Z,5Z)-1-metil-1,2,7,8-tetrahydroazocina-2-carboxilato, metil (2Z,5Z)-1-metil-1,4,7,8-tetrahydroazocina-3-

carboxilato, metil (3Z,5Z)-1-metil-1,2,7,8-tetrahidroazocina-3-carboxilato, dimetil (2Z,5Z)-1-metil-1,4,7,8-tetrahidroazocina-2,3-dicarboxilato y dimetil (3Z,5Z)-1-metil-1,2,7,8-tetrahidroazocina-2,3-dicarboxilato. En todas ellas se eliminó la parte indólica de los compuestos. El primero y el segundo son las formas desnudas sin grupos éster, el tercero y el cuarto las formas con el grupo éster en posición alfa, el quinto y el sexto, las formas con el grupo éster en posición beta, y el séptimo y el octavo las formas con ambos sustituyentes éster. Además, el primero, el tercero, el quinto y el séptimo se corresponden con el tautómero 2A y las otras cuatro con el tautómero 2B.

Posteriormente, los sistemas fueron optimizados a nivel B3LYP/6-31+G(d), manteniendo congelada toda la molécula, salvo los átomos de hidrogeno introducidos manualmente. La energía final de la geometría resultante se calculó a partir de la suma de su energía a nivel MP2/aug-cc-pVDZ, la corrección de punto zero (ZPE) y energía de solvatación mediante el método MST. Adicionalmente, también se estimó la energía de solvatación en cloroformo. Dichos cálculos se realizaron con el programa *Gaussian09*[®].¹⁰⁰

3.2.6. Caracterización conformacional y estructural de los compuestos ML-276 y ML-304

En el estudio de las preferencias conformacionales del fragmento (R)-N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)acetamida, común en ambos compuestos, se consideraron dos posibles orientaciones del protón, entrando por una cara u otra del anillo protonable (denominadas cara-A y cara-B) y el resto de la molécula se sustituyó por un metilo con la ayuda de *GaussView 5.0*[®].¹⁰² A continuación, considerando diferentes valores de las dos torsiones activas (τ_1 y τ_2) de dicho fragmento, siendo τ_1 el enlace que une el anillo de N-etilpirrolidina con el carbono intermedio y τ_2 el enlace que une el carbono intermedio con el grupo acetamida se generaron diferentes conformaciones. Los valores de τ_1 fueron 60°, 180° y 300° y τ_2 0°, 90°, 180° y 270°, que dieron lugar a 12 conformaciones iniciales. Luego, se optimizaron mediante *Gaussian09*[®]¹⁰⁰ a nivel B3LYP/6-31G(d) congelando ambas torsiones para conocer la energía inicial del sistema, y posteriormente activándolas para determinar la conformación más estable.

Finalmente, se refinó la energía de la estructura obtenida a nivel MP2/6-311++G(d,p), considerando la energía de solvatación a nivel IEFPCM/MST.^{118,119}

Para el estudio de la planaridad del anillo heterocíclico presente en ambos compuestos, se eliminó gran parte de la molécula, dejando únicamente el doble anillo de 2H-benzo[b][1,4]tiazin-3(4H)-ona, en el caso del compuesto ML-276 y el triple anillo de 4-metildibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11(10H)-ona, en el caso del compuesto ML-304. Los grupos eliminados se sustituyeron por metilos. Posteriormente se fijaron dos conformaciones para cada anillo, con respecto al ángulo en el que participa el átomo de azufre, una con el valor original que le asigna *GaussView 5.0*® y en la otra se forzaba la planaridad de dicho ángulo. Finalmente, se optimizaron ambas con *Gaussian09*®.

Con respecto al posible coste energético debido a la conformación del grupo estirilo del compuesto ML-276, se trabajó con el compuesto completo. Se eliminó el doble enlace de dicho grupo y se generaron diferentes conformaciones, variando cada una 30°, con *Gaussview 5.0*®, dando lugar a 6 conformaciones diferentes. A continuación se optimizó la estructura a nivel B3LYP/6-31G(d), primeramente manteniendo la estructura congelada, para así conocer la energía inicial y posteriormente, permitiendo la libertad de dicho grupo, para así conocer la preferencia mayoritaria. Finalmente, se calculó la energía puntual de las geometrías resultantes a nivel MP2/6-311++G(d,p) y se incluyó efectos de solvente con el método MST, todo ello mediante el software *Gaussian09*®.

3.2.7. Determinación del modo de unión de ML-276 y ML-304 a PfG6PD

En lo referente a la metodología usada en la obtención de los potenciales modos de unión de ML-276 y ML-304 a *PfG6PD*, se obtuvo a partir de una combinación de técnicas de acoplamiento molecular (*docking*) y simulaciones de MD con restricciones, tal como se muestra en la **Figura 14**.

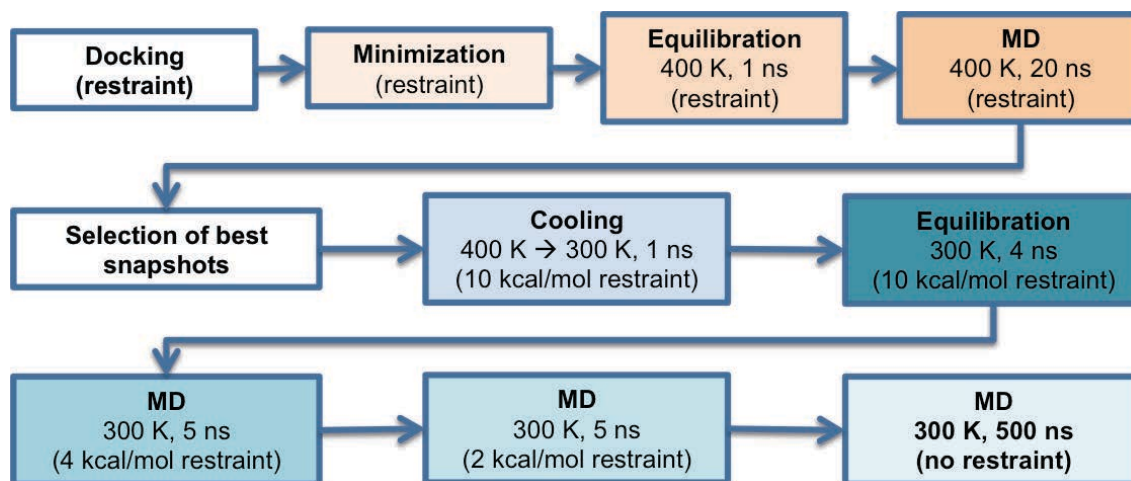


Figura 14. Protocolo computacional llevado a cabo para el modo de unión de ML-276 y ML-304 al modelo de homología de *Pfg6PD*

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular mediante los programas *Glide*®^{103,104,105,106} y *Autodock4*®¹⁰⁷ con tal de conseguir diferentes modos de unión, que posteriormente fueron calificados por los algoritmos internos de cada uno de los programas. En el caso de *Glide*® la caja se centró en la cavidad donde se encuentra el residuo clave Asp750, determinando restricciones farmacofóricas, para así forzar la interacción entre el nitrógeno protonable de los compuestos con el carbono γ del aspartato. En el caso de *Autodock*®, no se impusieron restricciones farmacofóricas, sino que únicamente se diseñó una caja de tamaño 20x-30y-26z Å en forma longitudinal, facilitando la disposición del ligando.

Posteriormente, se seleccionaron las poses prometedoras en base a la interacción electrostática con la carga positiva del Asp750, la capacidad de desplazar la Glucosa-6-fosfato (G6P) de la cavidad, y la ausencia de choques estéricos con las zonas donde se unen los NADP⁺. Aquellas poses prometedoras se sometieron a estudios de estabilidad mediante MD.

Previamente al proceso de MD, se parametrizaron los ligandos a partir de la obtención de las cargas atómicas de los compuestos mediante el método RESP¹¹⁰ gracias al programa *Gaussian09*® a nivel HF/6-31G(d) y se asignaron los tipos atómicos del campo de fuerzas *gaff*¹¹¹ mediante el módulo *Antechamber*.

Una vez preparados los topologías y las coordenadas iniciales, se comenzó el protocolo de MD con un proceso de minimizado con aplicación de restricciones en la interacción entre el nitrógeno protonable y el carbono γ del aspartato de 10 kcal/mol, posteriormente se calentó y equilibró el sistema hasta 400 K y se llevó a cabo un MD corta de 20 ns, siempre manteniendo dichas restricciones. De allí se seleccionaron 5 estructuras diferentes, las cuales se sometieron a un proceso de enfriado hasta 300 K durante 1 ns, para evitar problemas posteriores debidos a la energía térmica acumulada en el sistema, y a continuación a un equilibrado durante 4 ns. Finalmente, de forma progresiva se fue reduciendo la energía de la restricción de 10 a hasta eliminarla completamente y corriendo dinámicas largas de en condiciones suaves hasta 500 ns.

3.2.8. Metodología con el software *PharmScreen*®

La búsqueda de compuestos que potencialmente actúen frente *PfG6PD* se realizó mediante técnicas de cribado virtual basadas en ligando, en particular *PharmScreen*®,¹⁰⁸ así como en técnicas farmacológicas que permitan validar experimentalmente la potencia y actividad frente al dicho enzima. El esquema de trabajo empleado en este caso se presenta en la **Figura 15**.

En primer lugar se obtuvo la librería original de *Malaria Box*®,¹³³ que se encuentra disponible en la página web del *Medicines for Malaria Venture (MMV)*. Dicha librería se encuentra en 2 dimensiones en formato SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*). Mediante el uso de la herramienta *LigPrep*®¹³⁴ se convirtió la librería a formato SDF (*Structure-Data File*). Puesto que la diversidad química de *Malaria Box*® es muy elevada, únicamente se seleccionaron estructuras con menos de 300 átomos, se limitó el máximo de estereoisómeros y tautómeros por molécula, a 8 y 6 respectivamente y el estado de ionización se ajustó teniendo en cuenta un pH=7,4 ($\pm 0,5$).

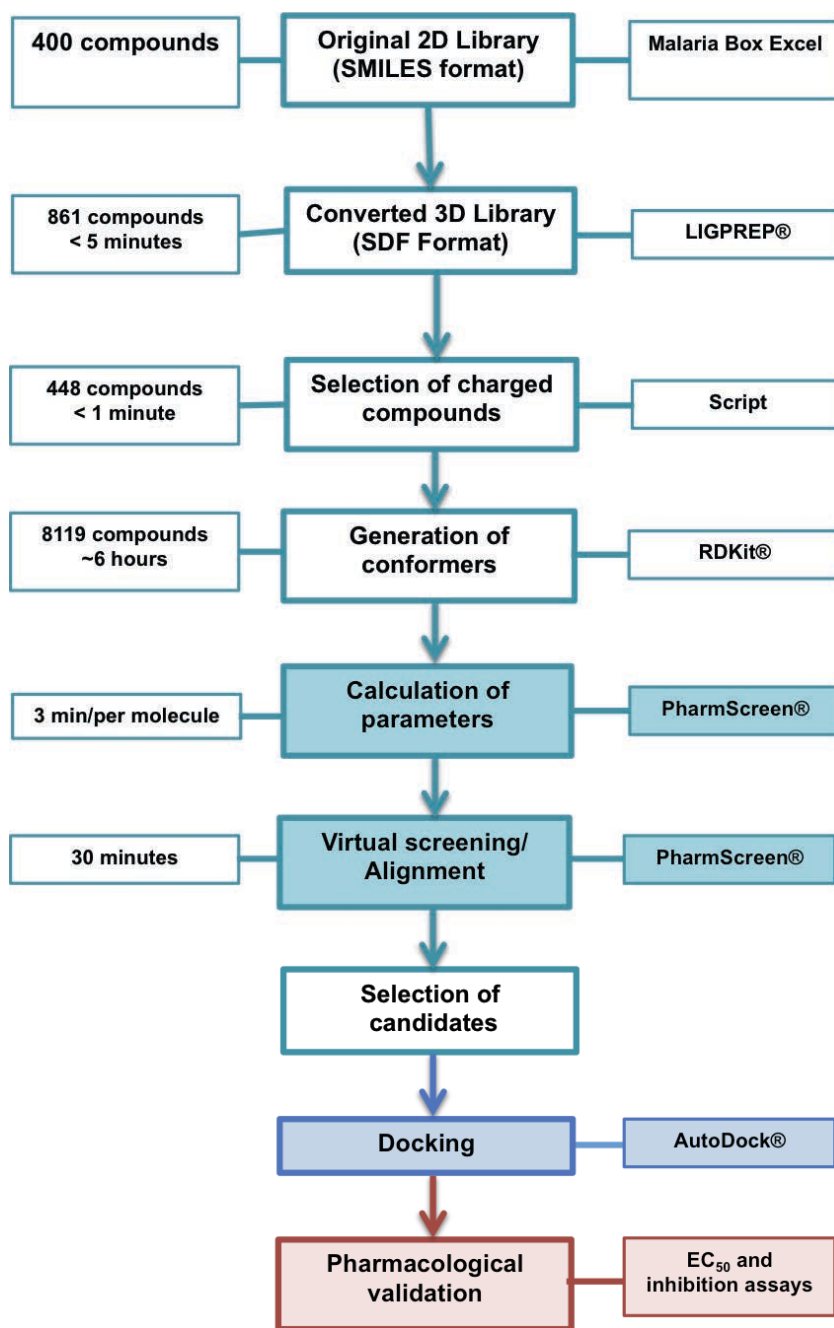


Figura 15. Protocolo computacional llevado a cabo en la preparación y selección con el software PharmScreen® de los posibles candidatos a ser validados farmacológicamente.

De la diversidad de compuestos y disposiciones obtenida en el paso anterior, se seleccionaron aquellos compuestos con carga +1, para asegurar que los candidatos seleccionados pueden llevar a cabo la interacción con Asp750. Con el objetivo de explorar el espacio conformacional, fundamental en la interacción ligando-receptor,¹³⁵ se generaron hasta 100 conformeros por ligando mediante el software *RDKit*®.¹³⁶

PharmScreen® es una herramienta de cribado virtual que permite estimar relaciones de similitud entre moléculas en base a su patrón tridimensional de distribución hidrofóbica, determinada a través de cálculos de solvatación MST parametrizado para el Hamiltoniano semiempírico RM1.^{28,29} Estos descriptores han sido obtenidos con una versión localmente modificada de MOPAC 6.0.¹³⁷

De los alineamientos obtenidos, se seleccionaron diferentes candidatos en base a tres criterios: inspección visual, valor de similitud de Tanimoto y disponibilidad comercial. Posteriormente, se corroboró la selectividad, la posibilidad de encajar en la cavidad y la capacidad de interacción con el residuo Asp750, mediante un estudio de acoplamiento molecular con el programa *AutoDock4*® frente el modelo de homología *PfG6PD* y la estructura de rayos X de *hG6PD*. Finalmente, los candidatos seleccionados entraron en un proceso de validación farmacológica que involucra ensayos de actividad frente a parásito y frente a los enzimas *PfGluPho* y *hG6PD*.

3.2.9. Validación farmacológica

A pesar de tratarse de una tesis eminentemente computacional, gracias a la colaboración con el grupo experimental del Prof. Dr. José Manuel Bautista se usaron también diferentes técnicas experimentales. Algunas de estas técnicas y procedimientos de laboratorio incluyen estudios para determinar la actividad (EC_{50}) de diferentes inhibidores frente a cepas DD2 de *P. falciparum* y el ensayo de inhibición enzimática frente a los enzimas humano y parasitario. De este último, al estar pendientes de ensayo, no se especifica la metodología.

La metodología empleada en el estudio preliminar a dos concentraciones (2 y 0,2 μ M) previo a la EC_{50} se llevó a cabo de la misma forma, únicamente cambiando el número de diluciones y concentraciones empleadas.

3.2.9.1. Metodología para el ensayo de EC_{50}

Los ensayos biológicos se realizaron en microplacas de 96 pocillos, en las cuales el cultivo intraeritrocítico de *Plasmodium* se confrontó con los inhibidores a diferentes

concentraciones. En cada pocillo había un volumen total de 150 μL , el cual estaba formado por 75 μL de fármaco y 75 μL de sangre.

Por un lado, se prepararon las diluciones seriadas de cada candidato en tubos eppendorf a partir de disoluciones madre de 10 mM. Para un mejor manejo de los volúmenes, se preparó una dilución intermedia a 400 μM , a partir de la cual se prepararon las diluciones empleadas en la placa de 96 pocillos. Las diluciones empleadas en el estudio fueron 20 o 40, 2, 0,5, 0,2, 0,05, 0,025, 0,0125 y 0,005 μM . Únicamente varió la concentración más alta, siendo 20 μM para los inhibidores 1, 3 y 5 y de 40 μM para los inhibidores 2 y 4. En todos los casos, se añadieron controles negativos (sin fármaco) y control positivo con el fármaco cloroquina a concentraciones en el pocillo de: 20, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,02 y 0,01 μM . Para todas las concentraciones estudiadas se realizaron tres replicados.

Por otro lado, se prepararon las diluciones de sangre, las cuales contenían glóbulos rojos infectados con parásito en forma de anillos, glóbulos rojos no infectados por parásito y medio de cultivo previamente preparado. Los cultivos de parásito se controlaron de forma periódica siguiendo protocolos internos del grupo de investigación.¹³⁸

El volumen total de la mezcla de medio de cultivo y glóbulos rojos se determinó multiplicando el número total de pocillos por el volumen necesario para cada uno de ellos, calculando siempre en exceso. Entonces, se calculó la cantidad de sangre a ser usada considerando un hematocrito al 4%, para así mantenerlo a un 2% una vez dentro del pocillo. La cantidad necesaria de eritrocitos infectados se calculó a partir de la sangre total calculada y la parasitemia del cultivo al día de iniciar el experimento, reduciéndola a un 1%. Por diferencia se determinó la cantidad necesaria de eritrocitos sin infectar. Finalmente, se mezcló en un tubo Falcon las cantidades pertinentes de medio de cultivo, eritrocitos infectados y sin infectar.

Una vez preparadas las diluciones de fármaco y sangre, se adicionaron 75 μL del inhibidor en cuestión a diferentes concentraciones en cada uno de los pozos correspondientes de la microplaca. A continuación, la mezcla de medio de cultivo y eritrocitos se vertió en una cubeta de pipeteo, y con la ayuda de una pipeta multicanal se

añadieron 75 μL a grupos de 8 pocillos, resuspendiendo para así mezclar con las diluciones de fármaco y evitar posible precipitación en la mezcla de sangre.

La placa de 96 pocillos se incubó durante 48 horas en condiciones 37°C / 5% CO₂. Luego, se centrifugó el contenido de cada uno a 2000 rpm durante 3 minutos y se realizó frotis de sangre. Para una mejor observación de los anillos, se optó por una tinción de Giemsa, siguiendo el protocolo establecido en el grupo de investigación. Se observaron y realizaron fotos con un microscopio electrónico *Motic*®, que posteriormente se usaron para contar los porcentajes de Parasitemia mediante contaje manual con el programa *Plasmoscore*®.¹³⁹ Por último, los valores de parasitemia fueron convertidos a supervivencias, que al confrontarlas con el LOG₁₀ de las concentraciones se graficaron mediante el software *GraphPad Prism 6*®,¹⁴⁰ obteniendo así las distintas curvas de EC₅₀.

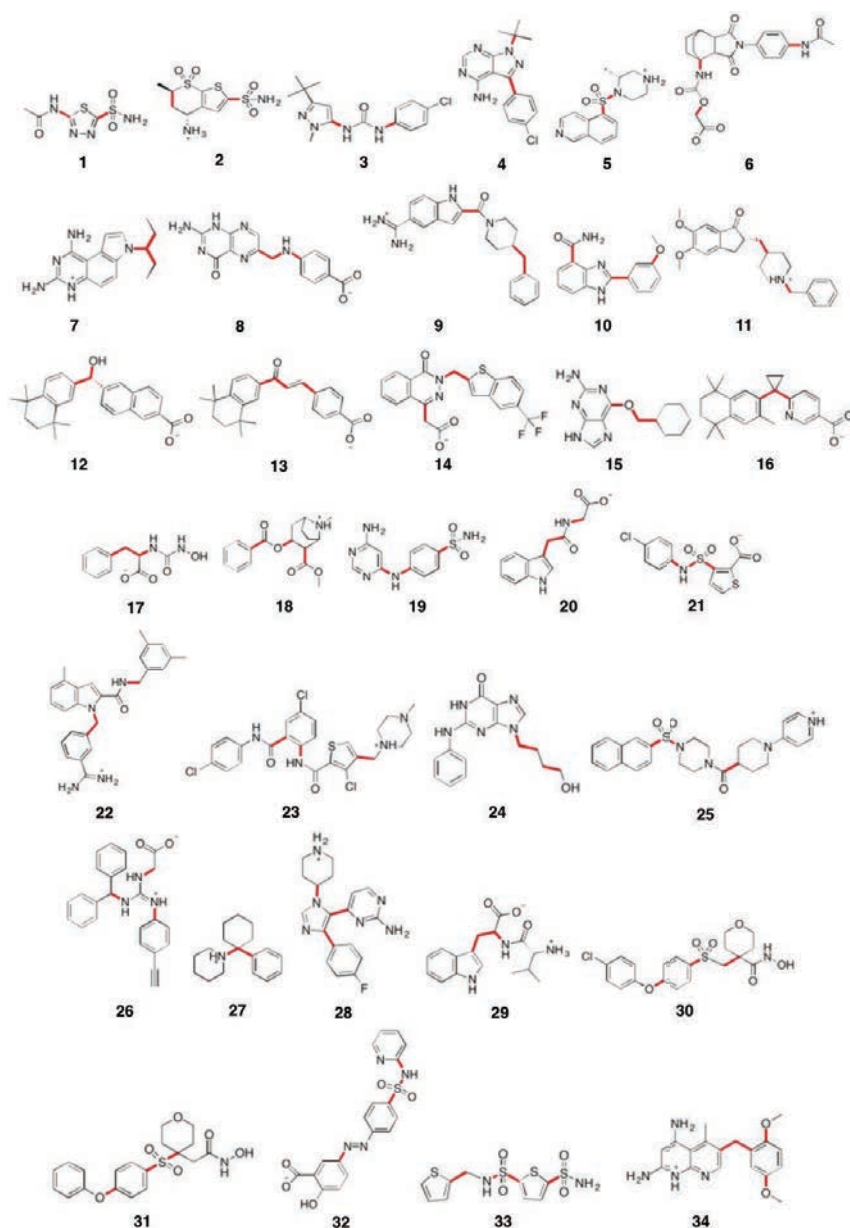
CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Capítulo 4: Resultados

4.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas

4.1.1. Aplicación de la metodología Multinivel en la estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva

La aplicación de la estrategia ML en la estimación del coste energético al seleccionar la conformación bioactiva se ha determinado para un conjunto de 52 moléculas tipo fármaco, las cuales se encuentran representadas en la **Figura 16**.



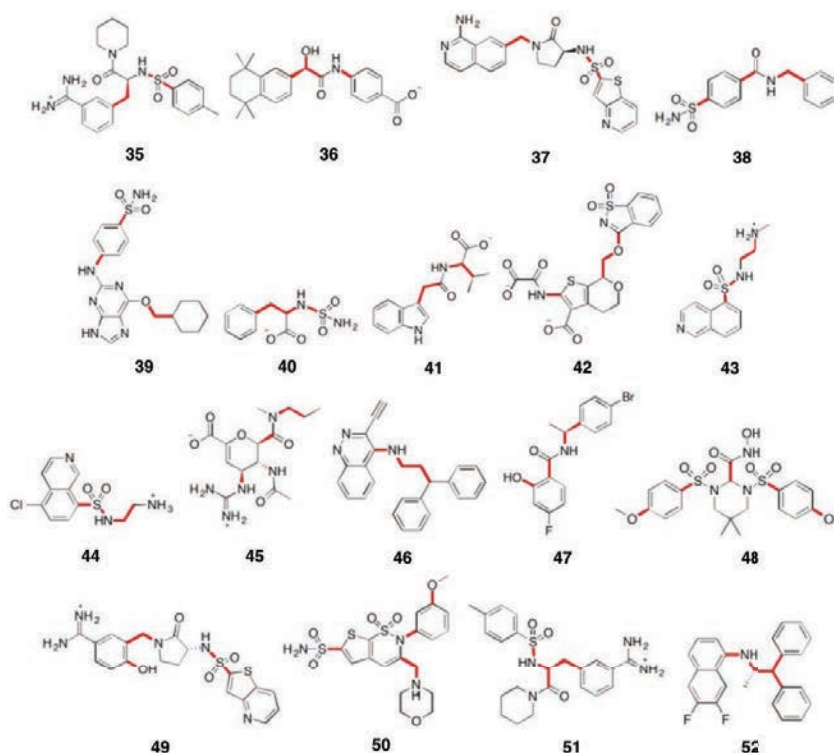


Figura 16. Representación del conjunto de moléculas sobre las cuales se ha estimado el coste energético que supone acceder a la conformación bioactiva mediante la metodología ML.

Esta serie de moléculas es aproximadamente una tercera parte de la que fue analizada por Emanuele Perola y Paul S. Charifson en su trabajo de 2004,¹⁴ anteriormente comentado en el apartado de Introducción. Su estudio abarcaba un grupo de 150 compuestos estructuralmente diversos con pesos moleculares comprendidos entre 200 y 600 g/mol, menos de 12 enlaces flexibles y modo de unión conocido con sus dianas en estructuras cristalográficas con una resolución inferior a 3,0 Å. Para los objetivos planteados en la presente tesis, hemos considerado un conjunto de compuestos que contiene menos de 6 enlaces flexibles para asegurar un correcto muestreo de las preferencias conformacionales, tal y como se comenta en apartados posteriores.

4.1.1.1. Exhaustividad y suficiencia del muestreo conformacional

Un paso clave para estimar correctamente el coste conformacional de la especie bioactiva es examinar la correcta convergencia del espacio conformacional realizado a bajo nivel de teoría.

Dicho aspecto se analizó a partir de comparar la distribución conformacional obtenida para cada trayectoria, así como a través de la medición de la divergencia Kullback-

Leibler¹⁴¹ (ver **Ecuación 18**), que permite cuantificar la diferencia entre las distribuciones conformacionales recopiladas de las simulaciones MD realizadas separadamente para cada compuesto.

$$Div_p^Q = - \sum_{\tau} P(\tau) \log \frac{Q(\tau)}{P(\tau)} \quad \text{(Ecuación 18)}$$

En la anterior ecuación, $P(\tau)$ y $Q(\tau)$ significan las distribuciones de probabilidad obtenidas a partir de dos simulaciones de dinámica molecular y τ representa los valores de los ángulos diedros.

Los resultados obtenidos para todos los compuestos muestran que de forma general las divergencias entre las diferentes simulaciones para cada una de las torsiones son mínimas y que el muestreo obtenido ha convergido. A modo de ejemplo, se muestra en la **Figura 17** la distribución en forma de histograma para 3 réplicas de compuesto **28 (3ERK)**. Para cada una de sus 3 torsiones activas representadas como τ_1 , τ_2 y τ_3 , las cuales definen la rotación de los anillos de pirimidin-2-amina, fluorobenceno y piperidino, respectivamente, se observa una elevada similitud entre los perfiles obtenidos para las diversas simulaciones. En el caso de τ_1 , se detecta una única preferencia a colocar el anillo en torno a un valor de $\sim 100^\circ$. Las posibles disposiciones de τ_2 se mueven en torno a 4 valores diferentes (60° , 120° , 250° y 320°), aunque existe cierto solapamiento entre las dos primeras y las dos últimas. Finalmente, en τ_3 se observan 2 preferencias conformacionales diferenciadas, concretamente en torno a 60° y 270° .

Entrando en aspectos más cuantitativos, los valores de divergencia de Kullback-Leibler obtenidos al comparar la población conformacional de cada uno de los diedros entre distintas réplicas calculadas, también se pone de manifiesto que las diferencias son muy bajas y cercanas a cero, moviéndose entre valores del orden de 10^{-2} a 10^{-5} (**Tabla 2**).

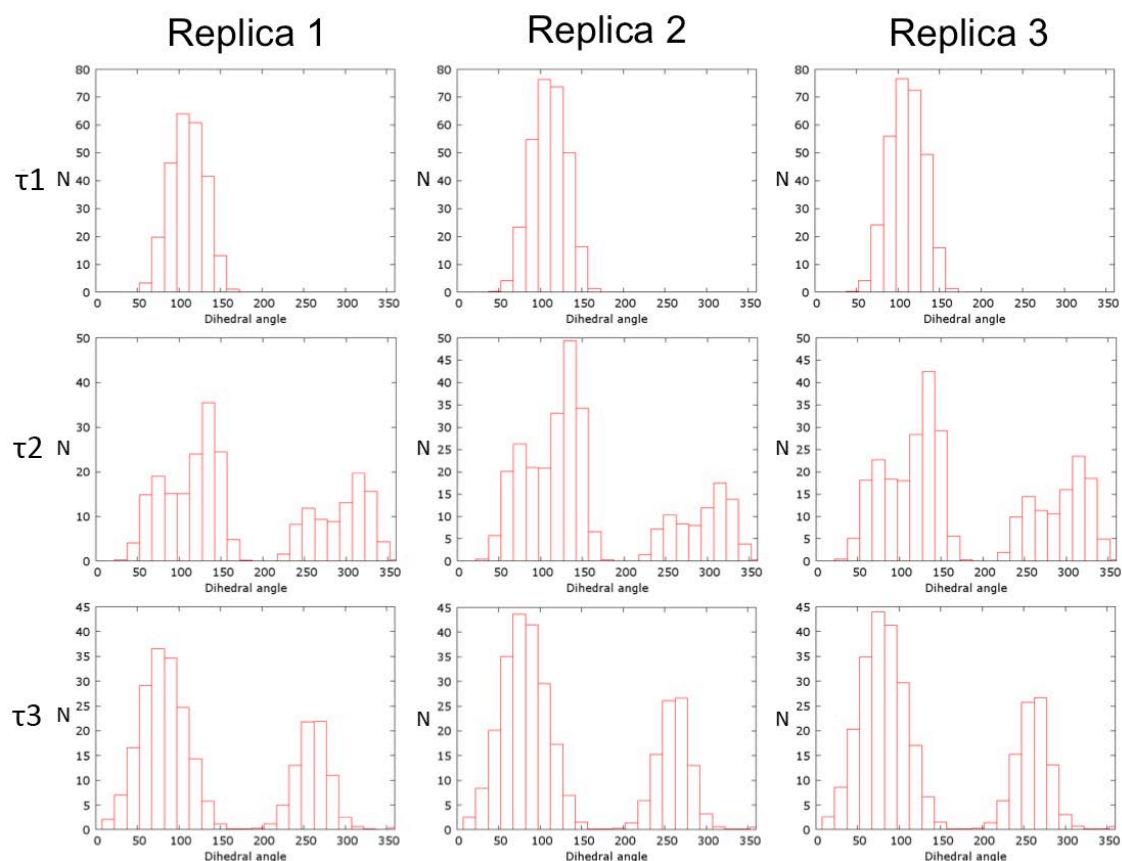
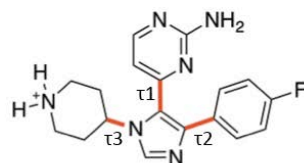


Figura 17. Histogramas de cada una de las torsiones activas para cada una de las replicas del compuesto **28** (3ERK). En el eje de las abscisas se encuentran los valores de ángulos diedros (*Dihedral angle*) y en el eje de ordenadas el número de estructuras (N).

Tabla 2. Valores de divergencia de Kullback-Leibler (Div_p^0) entre las réplicas 1, 2 y 3 al 100% de muestreo para cada una de las torsiones activas del compuesto **28** (3ERK).

Torsión	R1 100% Vs R2 100%	R1 100% vs R3 100%	R2 100% vs R3 100%
τ_1	$5,96 \times 10^{-4}$	$4,15 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-4}$
τ_2	$2,07 \times 10^{-2}$	$8,81 \times 10^{-5}$	$2,21 \times 10^{-2}$
τ_3	$6,15 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-4}$	$6,60 \times 10^{-5}$

Adicionalmente, para todos los compuestos y sus respectivas réplicas, también se ha analizado la convergencia de cada una de ellas por separado y para cada una de las

torsiones activas, calculando el valor de divergencia a diferentes tiempos de simulación, para comprobar la convergencia en el muestreo de dicha torsión. Los resultados obtenidos (**Figura 18**) muestran que a porcentajes cercanos al 5% de simulación la divergencia es ligeramente más elevada en la 3 torsiones activas de **3ERK**. Puntualmente, se producen ligeros picos de divergencia, pero que en todos los casos se mueven en torno a valores del orden de 10^{-1} . Finalmente, en todos los diedros para las 3 réplicas, a partir de un 40-50% de tiempo de simulación la divergencia es mínima, y por lo tanto podemos afirmar que la simulaciones convergen correctamente en ese punto.

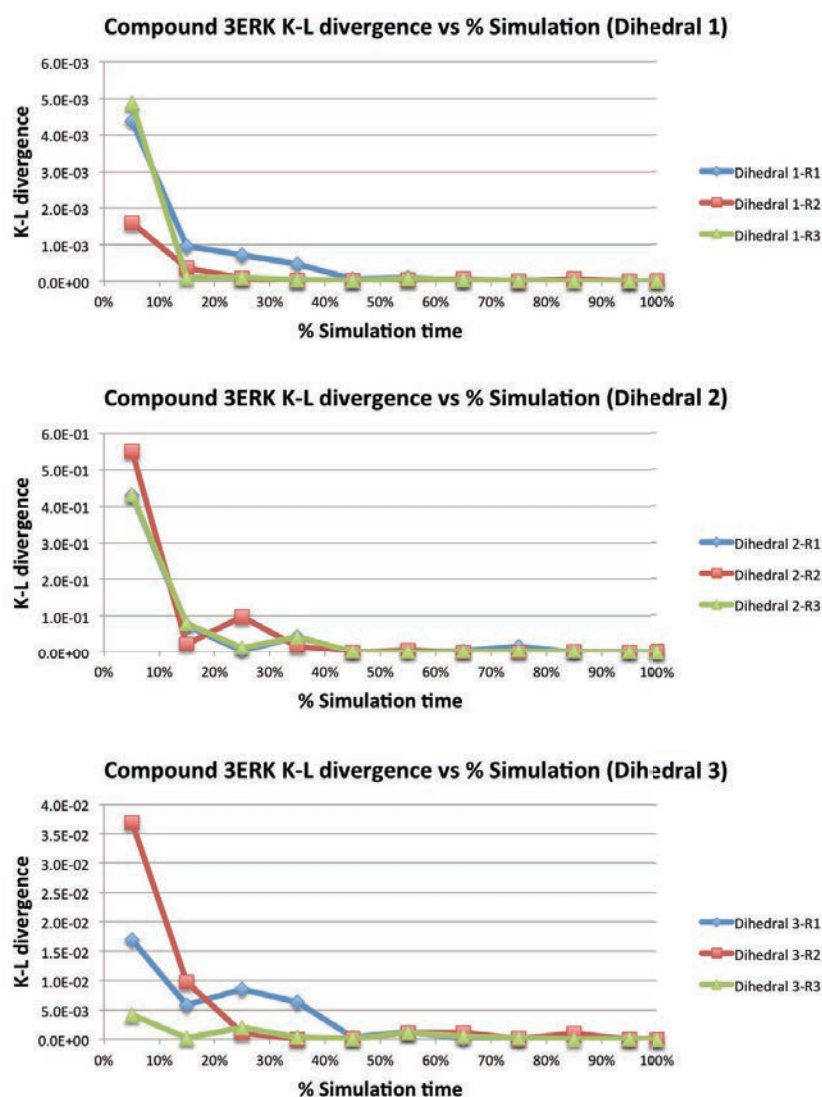


Figura 18. Representación de los valores de divergencia de Kullback-Leibler (Div_p^0) (*K-L divergence*) (eje de ordenadas) y porcentaje de simulación (*% Simulation time*) (eje de abscisas) de cada una de las 3 torsiones activas del compuesto **28 (3ERK)**.

Dicha tendencia también se ha observado para el resto de compuestos del conjunto de compuestos. En algunos casos la convergencia se obtiene sobre tiempos de simulación anteriores al observado en el compuesto **28**, como por ejemplo a un 20% de simulación en el caso del compuesto **2CSN**, o posteriores, como ocurre a un 60% de simulación en el compuesto **1BQO**. Sin embargo, en todos los casos, los pequeños picos de mayor divergencia observados a tiempos avanzados de simulación son poco marcados y moviéndose en valores de un orden de 10^{-2} - 10^{-3} .

4.1.1.2. Capacidad de identificación de la forma bioactiva

Es conocido que el uso de métodos clásicos, como la dinámica molecular, para explicar las preferencias conformacionales de compuestos flexible viene muy marcada por la precisión del campo de fuerzas empleado. Por ello, es relevante considerar si el muestreo conformacional es capaz de detectar la conformación bioactiva.

Para responder a este aspecto, se ha determinado la Desviación de la Media Cuadrática o *Root Mean Square Deviation* (RMSD) de los diferentes pozos conformacionales visitados durante el muestreo de bajo nivel con respecto a la conformación bioactiva descrita en el complejo con su diana. Los valores de RMSD del mínimo con respecto a la conformación bioactiva se encuentran reportados en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Valores más bajos de RMSD (en Å) entre la conformación bioactiva del compuesto y el pozo conformacional más cercano en el muestreo de bajo nivel (*Low-Level, LL*) o después del refinamiento a alto nivel (*High-Level, HL*). Se determinan los valores promedio para cada subgrupo de compuestos con el mismo número de torsiones activas y para todo el conjunto de 52 compuestos

Identificador del compuesto	RMSD Bioactiva-mínimo LL (Å)	RMSD Bioactiva-Mínimo HL (Å)	RMSD Mínimo HL-Mínimo LL (Å)
2 Torsiones Activas			
1	0.37	0.11	0.36
2	0.58	1.26	1.09
3	1.47	1.15	0.99

4	0.35	0.01	0.43
5	2.17	2.02	0.15
Promedio	0.99	0.91	
3 Torsiones Activas			
6	1.16	1.03	0.87
7	0.29	0.26	0.36
8	2.15	0.03	1.52
9	2.72	1.78	0.51
10	0.46	0.58	0.27
11	1.27	0.85	1.39
12	0.95	0.54	0.49
13	2.52	2.42	0.30
14	2.50	2.34	1.76
15	0.75	0.02	1.08
16	0.74	1.11	0.95
17	1.65	0.17	1.48
18	0.88	0.14	0.82
19	0.80	1.39	0.48
20	0.37	1.67	1.63
21	0.48	0.10	0.68
22	1.77	2.49	2.48
23	3.02	1.32	2.80
24	1.97	1.02	1.48
25	2.79	2.51	1.80
26	1.21	2.63	2.42
27	0.28	0.01	0.16
28	1.12	0.99	0.36
29	2.38	2.16	1.89
30	2.23	1.53	1.58
31	2.30	2.40	0.40
Promedio	1.56	1.21	
4 Torsiones Activas			
32	1.13	0.59	1.14
33	1.41	1.71	1.24
34	0.56	1.92	2.06
35	2.44	0.69	2.18
36	1.56	2.29	1.82
37	2.82	2.54	1.19
38	1.42	0.80	1.16
39	1.43	1.09	1.40
40	1.07	1.44	1.47
41	1.50	1.06	1.31
42	3.19	2.01	1.68
43	2.55	2.51	0.71
44	1.77	2.41	0.68
45	0.65	2.53	2.73

46	2.72	2.42	1.34
47	1.76	0.61	1.78
Promedio	1.75	1.66	
5 Torsiones Activas			
48	2.99	3.31	1.00
49	2.96	2.25	1.35
50	1.99	2.18	1.02
51	2.82	1.67	3.14
52	2.14	2.29	1.26
Promedio	2.58	2.34	
Promedio (Todo)	1.66	1.43	

Por lo que refiere a nivel LL, el RMSD promedio para los 52 compuestos estudiados es de $1,66 \pm 0,87 \text{ \AA}$, con un valor mínimo y máximo de 0,28 y 3,19 \AA , respectivamente. De forma general, el RMSD tiende a aumentar a mayor número de torsiones activas, tal y como indican los valores promedio de RMSD determinados para compuestos: con 2 (0,99 \AA), 3 (1,56 \AA), 4 (1,75 \AA) y 5 (2,58 \AA) torsiones activas. Si consideramos un valor de umbral de 2,0 \AA , el valor de similitud generalmente considerado en soluciones de acoplamiento molecular (*docking*), podemos afirmar que el muestreo LL es capaz de identificar un pozo conformacional que se asemeja a la conformación bioactiva para un 62% de los casos (32 compuestos).

Posteriormente, el refinado a nivel HL conduce a una mejora modesta pero consistente en la identificación de la especie bioactiva. Esto se observa en el RMSD promedio para el conjunto de todos los compuestos, que equivale a 1,43 \AA , así como en el RMSD promedio obtenido para cada subconjunto de compuestos, con valores de 0,91, 1,21, 1,66 y 2,34 \AA para compuestos con 2, 3, 4 y 5 torsiones activas, respectivamente. La mejora en la descripción de las especies bioactivas también se refleja en la distribución de compuestos basada en RMSD (ver **Figura 19**), que muestra perfiles similares tanto a nivel de LL como de HL, aunque acompañada por una ligera reducción en el número de compuestos con los valores más altos de RMSD.

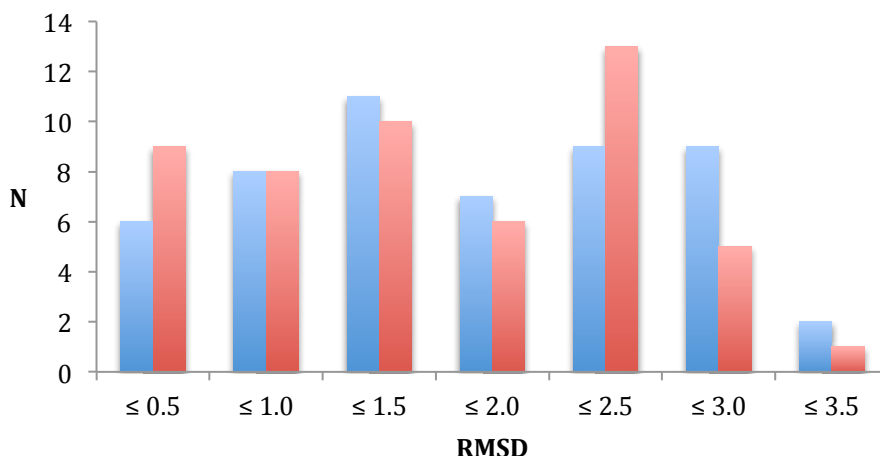


Figura 19. Distribución de RMSD para todo el conjunto de compuestos. En el eje de abscisas, diferentes *cut-off* de RMSD y en el eje de ordenadas, número de compuestos que se incluyen en dicho grupo. En azul, según la metodología de bajo nivel (*LL*) y en rojo, después del refinado a alto nivel (*HL*).

4.1.1.3. Estimación del coste conformacional

Para cada compuesto, el coste conformacional se ha estimado como la suma de los componentes entálpico y entrópico, calculada entre el mínimo localizado en la solución y la conformación encontrada en la estructura cristalográfica complejada con su correspondiente diana biomolecular. Los costes conformacionales obtenidos se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Valores de coste conformacional entálpico, entrópico y total de los compuestos estudiados

Identificador del compuesto	Código PDB	Coste conformacional entálpico (kcal/mol)	Coste conformacional entrópico (kcal/mol)	Coste conformacional total (kcal/mol)
1	1AZM ¹⁴²	0,1	0,8	0,9
2	1CIM ¹⁴³	0,3	1,0	1,3
3	1KV1 ¹⁴⁴	2,7	1,1	3,8
4	1QPE ¹⁴⁵	0,0	0,0	0,0
5	1YDR ¹⁴⁶	4,2	1,2	5,4
6	1A4K ¹⁴⁷	1,8	1,5	3,3
7	1AOE ¹⁴⁸	0,1	0,3	0,4
8	1BR6 ¹⁴⁹	0,0	1,5	1,5
9	1D4P ¹⁵⁰	0,8	1,6	2,4
10	1EFY ¹⁵¹	0,0	1,6	1,6

11	1EVE ¹⁵²	5,5	1,1	6,6
12	1FCX ¹⁵³	1,9	2,4	4,3
13	1FCZ ¹⁵³	0,6	1,4	2,0
14	1FRB ¹⁵⁴	1,0	2,3	3,3
15	1H1P ¹⁵⁵	0,0	2,5	2,5
16	1H9U ¹⁵⁶	2,4	0,0	2,4
17	1HDQ ¹⁵⁷	0,3	0,1	0,4
18	1I7Z ¹⁵⁸	0,7	0,5	1,2
19	1JSV ¹⁵⁹	0,5	1,8	2,3
20	1K7E ¹⁶⁰	0,2	1,8	2,0
21	1L2S ¹⁶¹	0,0	1,2	1,2
22	1LQD ¹⁶²	2,3	0,6	2,9
23	1MQ5 ¹⁶³	0,6	2,1	2,7
24	1QHI ¹⁶⁴	1,7	2,8	4,5
25	1QL9 ¹⁶⁵	- ^a	- ^a	- ^a
26	2CGR ¹⁶⁶	1,2	1,6	2,8
27	2PCP ¹⁶⁷	0,0	0,2	0,2
28	3ERK ¹⁶⁸	2,0	0,2	2,2
29	3TMN ¹⁶⁹	3,5	1,6	5,1
30	830C ¹⁷⁰	2,6	2,0	4,6
31	966C ¹⁷⁰	0,7	2,1	2,9
32	13GS ¹⁷¹	1,2	2,7	3,9
33	1BNW ¹⁷²	3,7	1,1	4,8
34	1DLR ¹⁷³	1,2	3,0	4,2
35	1ETT ¹⁷⁴	0,6	0,7	1,3
36	1EXA ¹⁷⁵	1,4	1,6	3,0
37	1F0R ¹⁷⁶	2,8	1,1	3,9
38	1G4O ¹⁷⁷	1,3	2,9	4,2
39	1H1S ¹⁵⁵	1,7	1,0	2,7
40	1IY7 ¹⁷⁸	0,0	0,5	0,5
41	1K7F ¹⁶⁰	2,2	0,3	2,5
42	1L8G ¹⁷⁹	1,5	1,0	2,5
43	1YDS ¹⁴⁶	4,9	1,1	6,0
44	2CSN ¹⁸⁰	1,2	2,0	3,2
45	2QWI ¹⁸¹	5,9	0,1	6,0
46	3STD ¹⁸²	0,1	1,1	1,2
47	4STD ¹⁸³	0,9	0,1	1,0
48	1BQO ¹⁸⁴	2,8	2,7	5,5
49	1F0T ¹⁷⁶	0,1	1,6	1,7
50	1I8Z ¹⁸⁵	4,8	0,7	5,5
51	1PPH ¹⁸⁶	1,8	1,3	3,1
52	5STD ¹⁸³	1,2	0,0	1,2

^a Debido a problemas en el muestreo conformacional derivados del campo de fuerzas *gaff* no se pudo estimar correctamente el coste conformacional del compuesto **25 (1QL9)**

Para 44 de los 52 compuestos, la predicción del coste conformacional dio valores por debajo de 5,0 kcal/mol, siendo inferior a 2,5 kcal/mol para 25 compuestos. De los

compuestos por encima del umbral de 5 kcal/mol, **1YDR** (5,4 kcal/mol) y **1YDS** (6,0 kcal/mol) se unen a su diana biológica con afinidades en el rango bajo de μM . En cambio, los compuestos **1BQO** (5,5 kcal/mol) y **1I8Z** (5,5 kcal/mol) se unen a la estromelisina-1 y la anhidrasa carbónica II, respectivamente, gracias a la complejación de ambos con un catión Zn en el sitio de unión que interactúa directamente con los ligandos. Los compuestos **3TMN** (5,1 kcal/mol) y **1EVE** (6,6 kcal/mol) se unen a sus dianas a través de una delicada red de moléculas de agua. Finalmente, la única excepción es el compuesto **2QWI** (5,9 kcal/mol) que no ha sido posible asociar a ninguna de estas situaciones.

4.1.1.4. Tendencias observadas. Balance entálpico-entrópico

De forma genérica, el umbral energético sobre el cual reside qué es un valor elevado o bajo de coste conformacional, se encuentra sobre las 2,5 kcal/mol. En el caso que nos ocupa, la tendencia general de costes conformacionales obtenidos muestra que cuando se considera el coste total (suma de términos entálpicos y entrópicos), los valores se mueven entre 0,0 y 7,0 kcal/mol. De los 51 compuestos sobre los que se ha podido estimar el valor exacto, en la mitad de los casos se puede observar un coste conformacional inferior a 2,5 kcal/mol (ver **Figura 20**).

Un análisis más detallado de los resultados obtenidos (ver **Tabla 4**) indica que el coste conformacional entálpico y entrópico suele ser relativamente bajo. Concretamente, si nos concentramos sobre la parte entálpica, tres cuartas partes de los ligandos estudiados, muestran costes conformacionales relativamente bajos (ver **Figura 20**), donde los valores son inferiores a 3,0 kcal/mol, si bien en algunos casos se observan valores entre 3,0 y 6,0 kcal/mol. Esta tendencia contrasta con muchas publicaciones donde se ha tratado de usar de métodos de Mecánica Cuántica en vacío o modelos simplificados de solvatación. Este resultado no es sorprendente puesto que gran parte de las moléculas analizadas son de tipo fármaco. Por ello, cabe esperar que durante su diseño se ha minimizado el coste conformacional. Aplicando el criterio de 2,5 kcal/mol como valor umbral, únicamente 11 casos de los 52 estudiados muestran un coste conformacional entálpico superior a dicho umbral.

Al poner el foco en los resultados de la parte entrópica, se puede apreciar claramente que los valores se mueven en un rango de valores mucho más pequeño, encontrándose los más altos cercanos a 3 kcal/mol. Si aplicamos el criterio de 2,5 kcal/mol, podemos afirmar que prácticamente todo el conjunto de compuestos tendría un coste por pérdida de estados conformacionales poco relevante, quedando únicamente 5 casos con valores ligeramente por encima de 2,5 kcal/mol.

Si los costes entálpico y entrópico se consideran simultáneamente, los costes conformacionales son mucho más elevados. Este último hecho apoya la idea de considerar siempre ambos términos cuando se desea ser preciso en la estimación del coste conformacional, especialmente en la parte entrópica, que a menudo se obvia o se trata de manera incorrecta en los estudios de predicción de afinidad de unión.

Otro aspecto observado con bastante claridad es que el coste conformacional entálpico es mucho más relevante que el entrópico, tal como se muestra en la **Figura 19**. Así, el rango en que se mueve el coste de reorganización es más amplio que el del coste por pérdida de estados conformacionales y proporcionalmente tiene más influencia en la suma total del coste conformacional. Es decir aquellos casos con un coste conformacional total muy elevado, como por ejemplo los compuestos **1YDR**, **1YDS**, **1BQO**, **1I8Z**, **3TMN**, **1EVE** y **2QWI**, que se mueven en valores entorno a 5,1-6,6 kcal/mol, tienen todos ellos un término entálpico muy elevado, que se mueve entre 2,8-5,5 kcal/mol en estos casos.

En la **Figura 20** también se evidencia que al confrontar ambos costes conformacionales, suele suceder que aquellos casos que tienen una penalización entálpica elevada suelen tener una penalización entrópica baja. De la misma forma, aquellos casos con una elevado coste por pérdida de estados conformacionales, muestran un bajo coste de reorganización. Únicamente se ha detectado un caso, el del compuesto **1BQO**, donde el valor de coste conformacional entálpico y entrópico se encuentre simultáneamente por encima de 2,5 kcal/mol, que se discutirá más adelante.

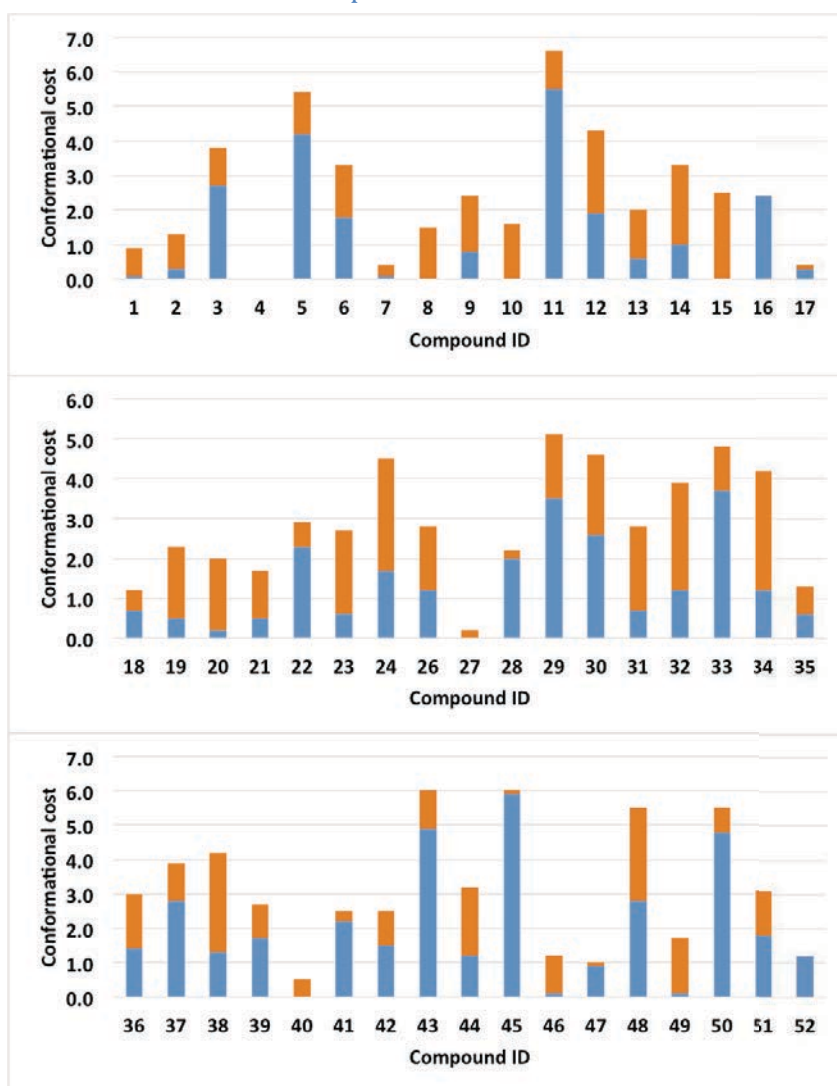


Figura 19. Distribución de los componentes entálpico y entrópico de los compuestos estudiados. En azul, el término entálpico y en naranja, el término entrópico.

4.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores duales de acetilcolinesterasa huprina-reína.

El trabajo publicado en 2017 en colaboración con grupos experimentales, se focalizó en el diseño, síntesis y caracterización biológica de una segunda generación de híbridos huprina-reína para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Estos compuestos fueron diseñados como fármacos multidiana para actuar contra distintas dianas, puesto que tienen como base el hecho de que la enfermedad de Alzheimer es una patología multifactorial.^{187,188,189} En el grupo de investigación del Prof. Dr. Diego Muñoz Torrero, en colaboración con nuestro grupo, hace años que se sintetizan inhibidores duales capaces de actuar sobre el enzima Acetilcolinesterasa (AChE), β -secretasa (BACE-1), Butirilcolinesterasa (BChE) y Monoaminoxidasa (MAO).

La mayoría de inhibidores duales, se basan, en dos subunidades, unidas por una cadena de una longitud variable. En este caso concreto, se trata de una subunidad Huprina Y (1), un potente inhibidor de acetilcolinesterasa que fue sintetizado por el grupo del Prof. Dr. Pelayo Camps y Prof. Dr. Diego Muñoz-Torrero en los años 90. La otra subunidad es el producto natural reína (2), el cual ha demostrado una moderada potencia antiagregante frente β -amiloide y proteína tau. Ambas subunidades quedan unidas por una cadena de 9 miembros. En este trabajo se perseguía el desarrollo de una segunda generación de compuestos que partían de la modificación del anillo de clorobenceno de la Huprina Y de un análogo previamente (3) publicado con anterioridad^{190,191} por distintos anillos heteroaromáticos, con el objetivo de mejorar su perfil multidiana y de biodisponibilidad en los nuevos híbridos. Para ello, se ensayaron cuatro motivos: pirdinhuprina (4a), difluorohuprina (4b) tiohuprina (4c) y metoxihuprina (4d) (ver **Figura 21**).

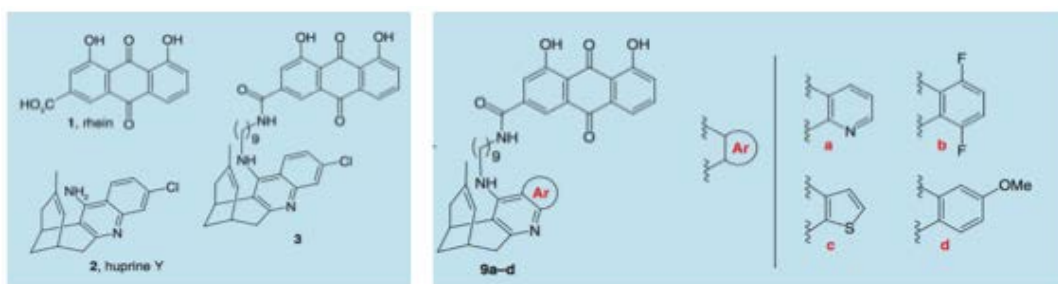


Figura 21. Estructura del inhibidor original 3 y los análogos propuestos en este proyecto (4a, 4b, 4c y 4d).

Al tratarse de una proyecto de colaboración, nuestro trabajo persiguió la estimación computacional del valor de pK_a de los distintos inhibidores sintetizados, para así deducir su posible estado de ionización frente AChE y BACE-1 y el modelaje del ligando unido a la cavidad de la proteína.

4.1.2.1. Estimación computacional del pK_a de los análogos huprina-reína

Un aspecto clave del proyecto es la estimación correcta del estado de ionización de las moléculas, puesto que su valor de pK_a determina el estado de protonación del nitrógeno endocíclico de la huprina, que es básico para la formación del puente de hidrógeno con

la His447. Por tanto, el estado de ionización debe afectar directamente a la actividad inhibidora, así como de los aspectos de distribución y biodisponibilidad del fármaco.

Para estimar el pK_a nos hemos concentrado únicamente en la subunidad huprina de los diferentes análogos dado que el pK_a vendrá determinado principalmente por las diferentes modificaciones/sustituciones de dicha subunidad. Por lo tanto, se midieron por un lado, los valores de huprinas monoméricas, es decir, con el nitrógeno exocíclico de la huprina sin sustitución y por otro lado, de sus derivados metilados en el nitrógeno previamente comentados, tratando de asemejar así el efecto que tendría la cadena metilénica del compuesto original.

Inicialmente, al tratar de medir dichos compuestos con el predictor *MarvinSketch*[®],¹⁹² se observaron valores de pK_a coherentes salvo en los derivados **1a** y **4a**, que dieron valores 5 unidades más bajos del valor computacional finalmente reportado. Esta situación deja entrever que, a pesar de que los predictores son sistemas de cálculo muy fiables y ampliamente verificados, es necesario tener una visión crítica y cautelosa hacia este tipo de programas de predicción, teniendo claro en qué basan sus cálculos y en consecuencia la necesidad de emplear métodos computacionales de alto nivel.

La metodología empleada en este caso se basó en cálculos de mecánica cuántica de alto nivel, donde se combinan cálculos de Møller-Plesset (MP2) con extrapolación a CBS (*Complete Basis Set*), efecto de correlación electrónica a nivel CCSD (*Coupled Cluster Single-Double*) y efectos solvatación mediante modelos de solvatación continuo. Esta estrategia se ha empleado en otras publicaciones del grupo¹²⁵ y se encuentra detallada con más precisión en el apartado de Metodología.

Para poner a prueba la fiabilidad de la estimación computacional de los pK_a , se corroboró inicialmente a partir de la comparación de valores previamente expuestos con otros calculados y experimentales reportados de compuestos como la quinolina, 1,8-naftipiridina y tacrina, que se usaron como valores de referencia, cuyos valores se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Valores de pK_a del compuestos de referencia seleccionados

Compuesto	pK_a (experimental)	pK_a (QM)
Quinolina	4,9 ^{193,194}	2,9
4-aminoquinolina	-	8,2
1,8-naftipiridina	3,4 ^{194,195}	2,4
4-amino-1,8-naftipiridina	-	8,0
Tacrina	9,9 ¹⁹⁶	10,5
6-clorotacrina	-	9,4

El caso de la tacrina se empleó, por su similitud estructural con la huprina Y (**1**) y derivados, ya que dicho compuesto se diseñó a partir de la fusión del doble anillo de 4-aminoquinolina con el anillo con puente de la huperzina A. El valor experimental reportado por D.D. Perrin en 1972 de 9,9 unidades de pK_a se asemeja al reportado computacionalmente por nuestra metodología (10,5). También se midió el valor de clorotacrina. En este caso, a pesar de no disponer de valores experimentales, el valor de 9,4 unidades de pK_a se sitúa en un rango de valores similar al de la Huprina Y (**1**), ya que ambas tienen un cloro en la misma posición de su parte aminoquinolina.

Finalmente, también se compararon los valores experimentales y teóricos de quinolina, 1,8-naftipiridina, juntamente con sus correspondientes derivados 4-amino. Según valores experimentales, los dos primeros tienen valores de pK_a de 4,9 y 3,4 respectivamente. Computacionalmente, estos compuestos dieron valores de 2,9 y 2,4, respectivamente. A pesar de no ser exactamente iguales, dichos valores siguen una tendencia similar y se encuentra al menos a 2 unidades de pK_a , en un rango aceptable de error. En lo que concierne a los derivados 4-amino, de los que no se disponen valores experimentales, la estimación computacional provoca un aumento drástico del valor, subiendo a 8,2 el derivado 4-aminoquinolina, y a 8,0 el derivado 4-amino-1,8-naftipiridina.

Estas últimas comprobaciones permiten corroborar la correcta orientación de los valores de pK_a de los derivados huprónicos **1a** y **4a**, los cuales dan un valor de 10,1 (**1a**) y 9,2 (**4a**) respectivamente, siendo similares a los dos derivados 4-amino comentados

anteriormente, donde se ve claramente el impacto que tiene la sustitución del grupo amino en ambos anillos, de una forma parecida a como se produce en huprinas o tacrina.

Los valores obtenidos permiten ver claramente que la metilación del grupo amino provoca la disminución de aproximadamente una unidad de pK_a con respecto al derivado monomérico (ver **Tabla 6**).

Tabla 6. Valores de pK_a del compuesto Huprina Y y derivados, en forma monomérica y metilada

Compuesto	R	pK_a (experimental)	pK_a (QM)
Huprina Y (1)	H	8,9 ^{a,197}	9,5
Huprina Y (dual) (3)	CH ₃	-	8,2
Derivado Piridina (1a)	H	-	10,1
Derivado Piridina (dual) (4a)	CH ₃	-	9,2
Derivado Difluorobenceno (1b)	H	-	7,8
Derivado Difluorobenceno (dual) (4b)	CH ₃	-	7,0
Derivado Tiofeno (1c)	H	-	7,6
Derivado Tiofeno (dual) (4c)	CH ₃	-	6,7
Derivado Metoxibenceno (1d)	H	-	10,1
Derivado Metoxibenceno (dual) (4d)	CH ₃	-	8,8

^a Valor experimental para Huprina X reportado por P. Camps y colaboradores en la referencia 197.

El valor de $pK_a = 8,9$ obtenido experimentalmente para Huprina X se corresponde perfectamente con el obtenido mediante nuestra metodología, que es de 9,5. Aunque Huprina X y Huprina Y (**1**) no son exactamente la misma molécula, la principal diferencia entre ellas viene dada por el reemplazamiento del grupo metil (en la Huprina Y (**1**)) por el grupo etil (en la Huprina X), por lo tanto, el impacto que dicha modificación pueda tener es mínimo y en consecuencia sus valores de pK_a deberían ser casi idénticos.

4.1.2.2. Estimación de la actividad en AChE y BACE-1 a partir del pK_a

La presencia de una carga neta positiva en el nitrógeno endocíclico de la huprina es muy importante para la inhibición de AChE, ya que es una característica clave para poder formar un puente de hidrógeno entre el nitrógeno protonado y el grupo carbonilo de la

His447 (ver **Figura 22**). Además, la carga positiva se encuentra estabilizada por la formación de interacciones catión- π con la densidad electrónica del anillo de indol del Trp86 y el anillo de benzeno de la Tyr337.

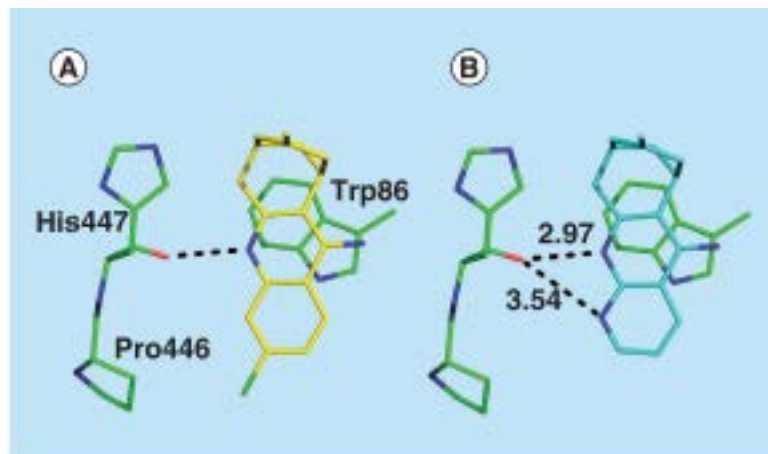


Figura 22. (A) Representación de las interacciones del nitrógeno endocíclico de la Huprina Y (**1**) con el oxígeno carbonílico de la His447. (B) Representación de la interacción del nitrógeno endocíclico con el oxígeno carbonílico de la His447 (a 2,97 Å) y de las interacciones desestabilizantes (a 3,54 Å) del derivado piridínico (**1a**)

Respecto a AChE tanto a pH fisiológico como al pH empleado en el estudio experimental de actividad inhibitoria de AChE (pH=8.0), el derivado **4a** (pK_a calculado = 9,2) y **4d** (pK_a calculado = 8,8) deberían estar mayoritariamente protonados. De esta forma se favorecería las interacciones previamente comentadas con el enzima, y por lo tanto mejorando su actividad, aunque ello podría empeorar su perfil de distribución de tejidos. En cambio, los derivados **4b** (pK_a calculado = 7,0) y **4c** (pK_a calculado = 6,7), deberían estar mayoritariamente en forma neutra, yendo en detrimento de su actividad pero favoreciendo su distribución en tejidos. Por lo tanto, los derivados **4a** y **4d** son claramente más potentes que los **4b** y **4c** frente a AChE. En lo que refiere a la menor potencia inhibitoria del derivado **4a** y **4d** con respecto a Huprina Y (**3**), se puede achacar a interacciones desestabilizantes específicas en la cavidad de unión.

Con respecto al derivado **4d**, si se supone que se une al sitio catalítico de AChE de la misma forma en que lo hacen otros derivados huprina, la presencia de un grupo metoxi daría lugar a choques estéricos con el anillo de indol del Trp439, lo cual explicaría su menor potencia frente a AChE. El caso del derivado piridínico **4a**, a priori, no parece poder ser explicado en términos de impedimento estérico. La reducida actividad de este derivado con respecto a Huprina Y (**3**) se puede atribuir a la ausencia del grupo cloro en

posición 3 en el derivado, que sí está presente en la Huprina X e Y. Así, se conoce que este átomo interaccionaría con un bolsillo hidrofóbico formado por Trp439, Met443 y Pro446. Esta diferencia también podría darse por la presencia de interacciones secundarias desfavorables debidas al par libre del oxígeno carbonílico de la His447. Si se observa la estructura de rayos X de Huprina X con *Torpedo californica* se puede ver la interacción del nitrógeno protonado con el carbonilo de la His447 (2,97 Å), que a su vez se estabiliza con interacciones secundarias del enlace carbono hidrógeno en posición 4, a una distancia de 3,54 Å del carbonilo. Por lo tanto, la sustitución de la cloroquinolina de las huprinas X e Y por un sistema piridínico reduce la actividad debido a repulsiones electrostáticas entre los pares libres del nitrógeno adicional y el carbonilo de la His447.

Sabiendo que el derivado **4a** era el más potente de los nuevos frente a AChE, se trató de estudiar con técnicas QM el papel de la interacciones secundarias en la unión mediante el uso de modelos reducidos de la cavidad de unión. Para ello, se determinó la energía de interacción con la corrección BSSE (*Basis Set Superposition Error*), revelando que el análogo piridinuhuprina era 3,3 kcal/mol más desfavorable comparado con Huprina Y. También se puso de manifiesto que el coste de desolvatación era más grande para este derivado, ya que el cambio en la energía libre de solvatación agua-otanol está desfavorecido en 1,7 kcal/mol.

Los sistemas reducidos se crearon tanto para AChE como BACE-1. En todos los casos se crearon sistemas a partir de la diferente información estructural disponible, donde había el ligando en cuestión y los residuos (completos o incompletos) que estuvieran a unos 4 Å de distancia. En el caso de AChE se corroboró que la forma humana complejada con Huprina W (PDB: 4BDT), la forma apo del enzima humano (PDB: 4PQE) y el cristal de *Torpedo californica* AChE con Huprina X (PDB: 1E66) tenían una orientación y un patrón de residuos similar alrededor de la huprina. Posteriormente la Huprina W se reemplazó por las huprinas correspondientes. Respecto a BACE-1, ante la falta de información estructural, se usaron estructuras de simulaciones de dinámica molecular del compuesto reina-huprina de trabajo anteriores, donde se consideraron las dos posibles orientaciones que puede tener la huprina, puesto que ambas son potentes.

Los residuos específicos incluidos en los sistemas simplificados se detallan en la **Tabla 7**. Aquellos casos donde no se usa el residuo entero, se especifica la molécula entre paréntesis.

Tabla 7. Residuos utilizados para la simulación de modelos reducidos del modo de unión de los enzimas AChE humana y BACE-1 (en sus dos orientaciones enantioméricas).

AChE	BACE-1 (orientación 1)	BACE-1 (orientación 2)
Tyr337 (Fenol)	Asp228 (Acetato)	Asp228 (Acetato)
Trp439 (Indol)	Asp32 (Ácido acético)	Asp32 (Ácido acético)
Trp86 (Indol)	Leu30 (Isopentano)	Leu30 (Isopentano)
Tyr449 (Fenol)	Ile118 (2-metilbutano)	Ile118 (2-metilbutano)
Glu202 (Acetato)	Phe108 (Benceno)	Phe108 (Benceno)
Pro446- His447	Ser35 (Metanol)	Gly34-Ser35
Ser203 (Metanol)	Gly230-Thr231	Gly230-Thr231
Gly121- Gly122	Tyr71-Tyr72	Tyr71 (Fenol)
-	Gln73-Gly74	Gln73-Gly74

Por otro lado, respecto a la interacción con BACE-1, esta podría venir dada principalmente por la interacción del puente salino formado entre el nitrógeno protonado y la pareja de residuos catalítica formada por Asp32 y Asp228 (**ver Figura 23**). De la misma forma que antes, aquellos compuestos capaces de estar protonados al pH fisiológico y experimental, se les presupone una mayor potencia. Según los

resultados de pK_a obtenidos, todos los híbridos deberían estar protonados en los compartimentos endosomales ácidos ($pH=4,5-6,5$) donde se encuentra localizada BACE-1.

Los resultados indican que todos los inhibidores son menos potentes que el análogo original. En este caso, la reducción de actividad frente BACE-1 de los nuevos compuestos también se podría deber a interacciones específicas dentro de la cavidad de unión.

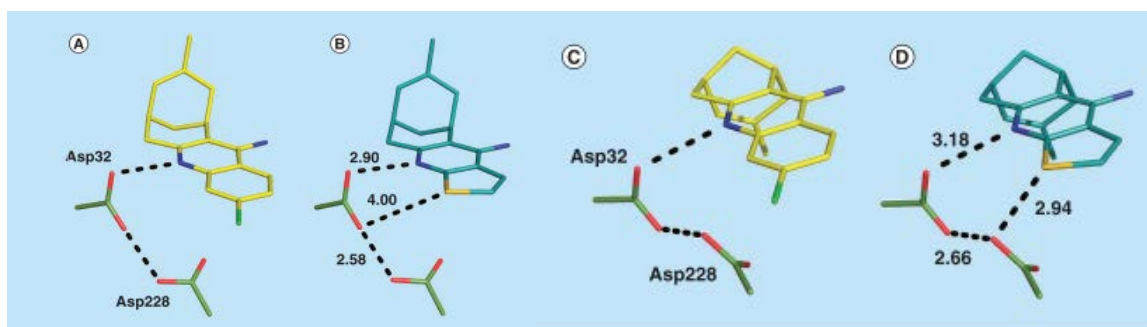


Figura 23. Representación de la interacciones del nitrógeno endocíclico de la Huprina Y (**1**) con la diada Asp32-Asp228 en sus dos orientaciones enantioméricas. (A y C). Representación de la interacción del nitrógeno endocíclico con la diada Asp32-Asp228 y de las interacciones desestabilizantes del derivado tiofeno (**1c**) en sus dos orientaciones enantoméricas (B y D)

El compuesto más potente frente a BACE-1 fue el derivado tiofeno (**4c**), sin embargo es menos potente con respecto al análogo original (**3**). Este hecho, podría deberse a interacciones electrostáticas desfavorables con la los residuos Asp32-Asp228. Los cálculos de energía de interacción con los sistemas simplificados sustentan este hecho, puesto que este derivado está desestabilizado en 0,6 kcal/mol y 2,8 kcal/mol con respecto a los dos enantiómeros de la Huprina Y. Adicionalmente, la desolvatación también está ligeramente desfavorecida en 1,0 kcal/mol según el valor de solvatación agua octanol con respecto a la Huprina Y. De forma similar, el compuesto **4a** tiene una actividad inferior, que de forma similar al caso de AChE reduce su actividad debido a la gran repulsión originada como consecuencia de la aparición de un par libre del nitrógeno piridínico.

4.1.3. Estudio de las preferencias conformacionales y de ionización de biomoléculas.
Estimación del pK_a a inhibidores de AChE basados en azocina.

En colaboración con grupo del Prof. Dr. Altomare, se ha estudiado otro tipo de estructuras tricíclicas: derivados éster de tetrahidroazocinas. Dichos compuestos tienen una mayor complejidad tanto conformacional como en la estimación de su pK_a . Desde el punto de vista biológico, dichos compuestos son inhibidores de AChE en el rango micromolar (IC_{50} entre 5 a 40 μM). Según los datos reportados anteriormente por el grupo de investigación del Prof. Dr. Altomare, el estado de ionización de estos derivados de azocina, a pesar de tener patrones estructurales muy similares, tienen marcadas tendencias en sus valores de pK_a , los cuales se pueden agrupar claramente en 2 tipos: aquellos cercanos a 6 y aquellos cercanos a 9.^{198,199}

Sin embargo, al proceder a la estimación de algunas estructuras reportadas en la publicación, mediante software estándar de predicción rápida de pK_a , como *MarvinSketch*®,¹⁹² detectamos una gran diferencia de valor, de entre 8 a 11 unidades de pK_a con respecto al valor experimental. Ello nos llevó a contemplar la posibilidad de que existiera una tautomería prototrópica en el anillo de azocino, involucrando un tautómero alternativo al contemplado originalmente en la publicación. Para examinar esta hipótesis, se seleccionaron los compuestos etil 3-etil-6-metil-2,3,6,7-tetrahydro-1H-azocino[5,4-b]indol-5-carboxilato (**N14**) y dimetil 3-etil-8-fluoro-2,3,6,11-tetrahydro-1H-azocino[4,5-b]indol-4,5-dicarboxilato (**N5**) para su estudio (**Figura 24**).

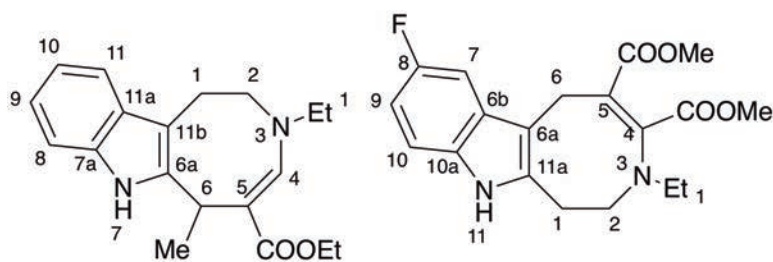


Figura 24. Estructuras en 2D de los compuestos **N14** (a la izquierda) y **N5** (a la derecha) reportadas en la publicación original del Prof. Dr. Altomare

Los valores experimentales de los compuestos escogidos son de $8,8 \pm 0,1$, en el caso del compuesto **N14** y $6,1 \pm 0,0$, en el caso del compuesto **N5**, siendo cada uno un buen representante de las dos tendencias de valores de pK_a observadas en los datos

experimentales.¹⁹⁹ Respecto al Compuesto **N14**, *MarvinSketch*® predice que el valor del tautómero original es de -0,9 y el del tautómero alternativo es 7,6, es decir una diferencia de 8,5 unidades de pK_a , mientras que en el caso de compuesto **N5**, el valor del tautómero original es -6,0, mientras que el alternativo da lugar a una valor de 5,1, es decir una diferencia de 11,1 unidades de pK_a .

Con tal de buscar mayor soporte experimental y descartar posibles fuentes de error, se consultaron los datos RMN y cristalográficos disponibles.¹⁹⁸ En este último caso se revisaron los estructuras de rayos X depositadas en la web del *Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)*.²⁰⁰ Respecto al compuesto **N5**, se disponía del cristal idéntico (Código CCDC: 218170). Por el contrario, para el compuesto **N14**, no se disponía de una forma cristalográfica idéntica al compuesto, pero si de uno muy parecida, la del compuesto **N13**, que se diferencian por la sustitución del grupo metilo por un isopropilo (CCDC code: 229769). Ambas estructuras cristalográficas se muestran en la **Figura 25**.

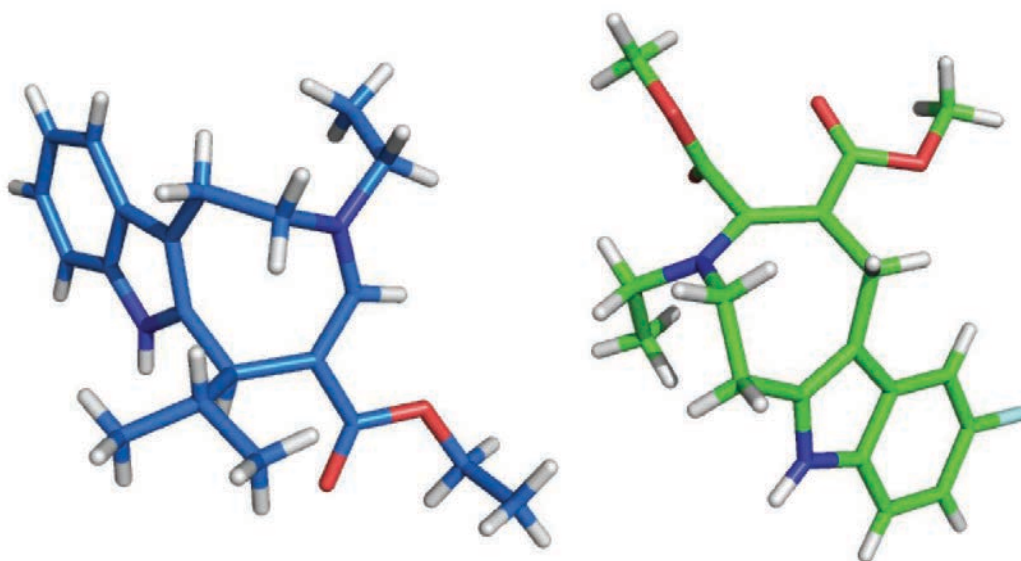


Figura 25. A la izquierda, representación de la estructura cristalográfica depositada en el *CCDC* del compuesto **N13** (similar al compuesto **N14**) (átomos de carbono en azul). A la derecha, representación de la estructura cristalográfica depositada en el *CCDC* del compuesto **N5** (átomos de carbono en verde).

4.1.3.1. Equilibrios tautoméricos y conformacionales de los compuestos **N14** y **N5**

Los datos experimentales consultados dejan entrever que la estructura sintetizada en su momento y sobre la cual teóricamente se midieron los pK_a eran los tautómeros originales presentados en la publicación.¹⁹⁹ Sin embargo, en estos compuestos cabe

plantear un posible equilibrio tautomérico, que se presenta en las Figuras 26 y 27, donde el doble enlace del anillo de 8 miembros se desplaza hacia una posición contigua, pudiendo afectar claramente a la conjugación del anillo. Así, existe un tautómero original que identificamos como A, y una forma alternativa a la cual identificamos como B. La especie tautomérica alternativa se considera tanto en la forma protonada, a la cual identificamos como 1B, como en la forma deprotonada, a la cual identificamos como 2B, teniendo así un total de 4 posibles especies químicas para cada compuesto.

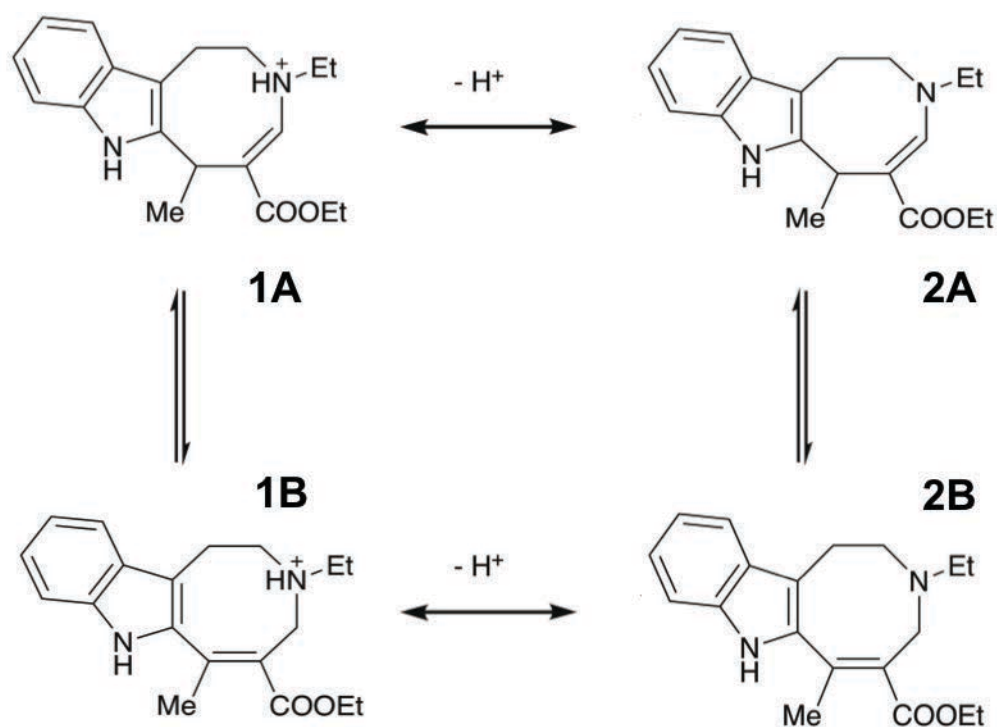


Figura 26. Equilibrios tautoméricos del compuesto N14

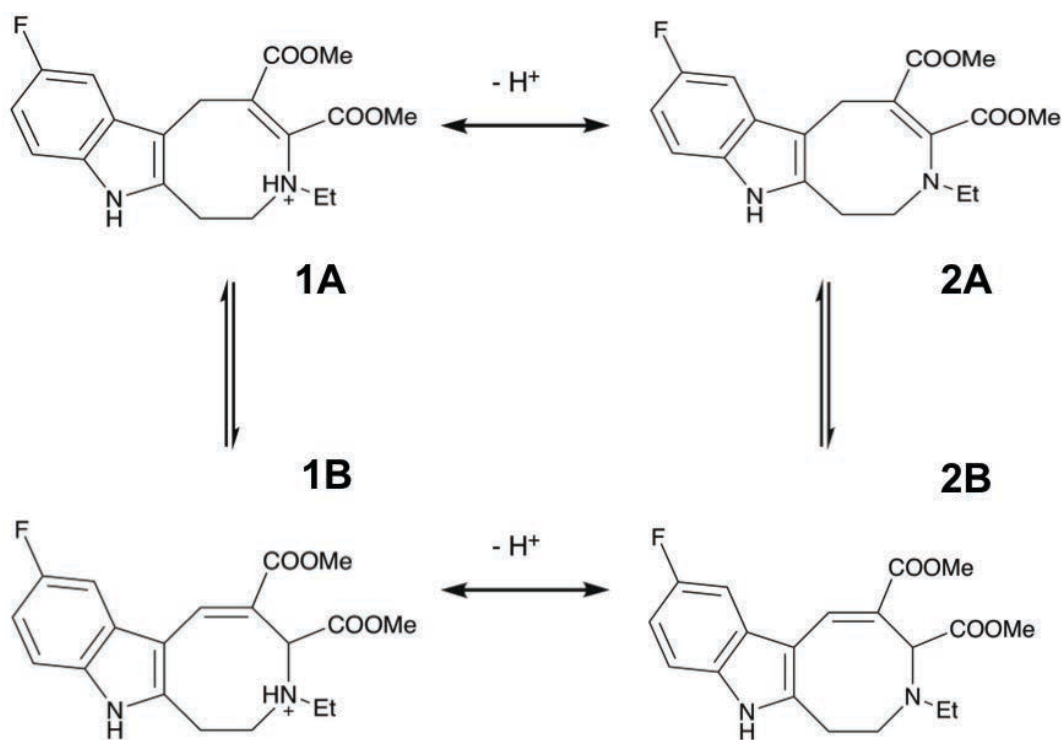


Figura 27. Equilibrios tautoméricos del compuesto **N5**

Por otra parte, cabe considerar la flexibilidad conformacional de dichos compuestos, que se examinó mediante la metodología ML, la cual nos ha permitido obtener las preferencias conformacionales de los diferentes tautómeros 1A, 1B, 2A y 2B. A pesar de que el compuesto **N14** y **N5** son de una misma familia y tienen patrones parecidos, las diferencias estructurales pueden afectar a sus preferencias conformacionales. Por un lado, la diferente colocación del nitrógeno protonable con respecto a la posición del nitrógeno del indol, ya que en el compuesto **N14** se encuentra a una distancia de 3 carbonos, pero en el **N5** se encuentra a 2 carbonos. Por otro lado, la diferente sustitución del anillo azocinico. Así, mientras el compuesto **N14** tiene únicamente un sustituyente éster, el compuesto **N5** tiene un segundo éster, que se encuentra en posición alfa del nitrógeno protonado. También este segundo compuesto no tiene el sustituyente metilo presente en el primero.

4.1.3.2. Preferencias conformacionales del compuesto **N14**

En lo que refiere a la forma tautomérica 1A del compuesto **N14**, se obtuvieron 8 conformaciones diferentes (ver **Figura 28**), quedando cinco de ellas con un porcentaje

individual superior a un 10%. Todas ellas tienen en común que el nitrógeno protonado apunta hacia el doble anillo indólico, asemejándose a una interacción catión- π .

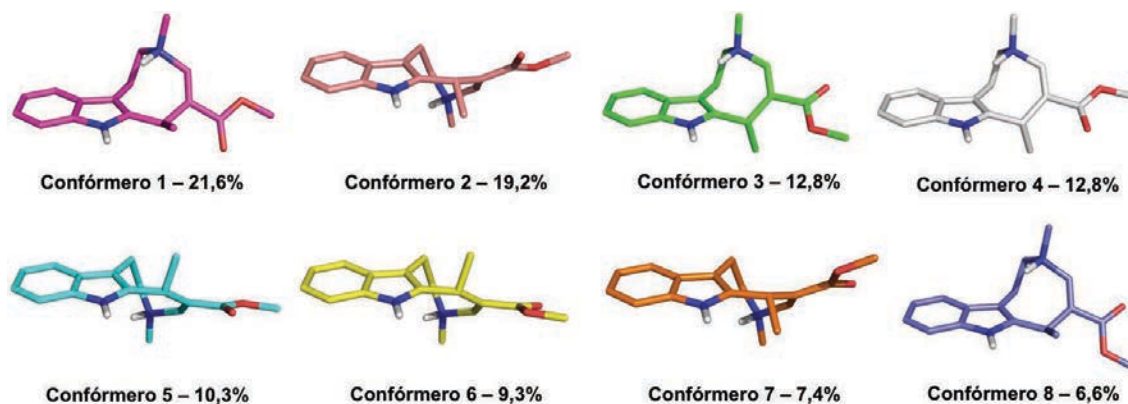


Figura 28. Preferencias conformacionales del Tautómero **1A** del compuesto **N14**, con sus porcentajes correspondientes.

Por otro lado, la forma protonada con la tautomería alternativa **1B**, presenta una variedad conformacional mucho menor, donde existe principalmente 1 conformación mayoritaria (ver **Figura 29**) caracterizada por la presencia de una interacción intramolecular de puente de hidrogeno, donde el hidrogeno del nitrógeno protonado del azocino ejerce de dador y el carbonilo del único sustituyente éster ejerce de aceptor, limitando a su vez la rotación del éster.

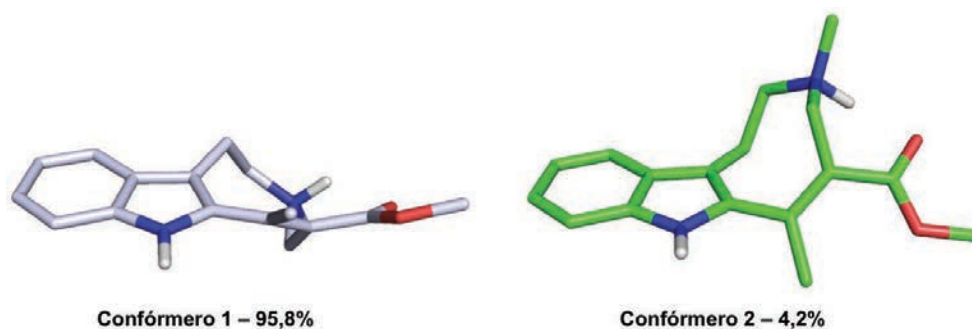


Figura 29. Preferencias conformacionales del Tautómero **1B** del compuesto **N14**, con sus porcentajes correspondientes.

Al confrontar las dos formas deprotonadas (**2A** y **2B**) entre ellas podemos observar que la forma **2A** tiene 4 conformaciones (ver **Figura 30**), mientras que la forma **2B**, tiene 6 conformaciones, aunque dos de ellas con un porcentaje inferior a un 3 % (ver **Figura 31**).

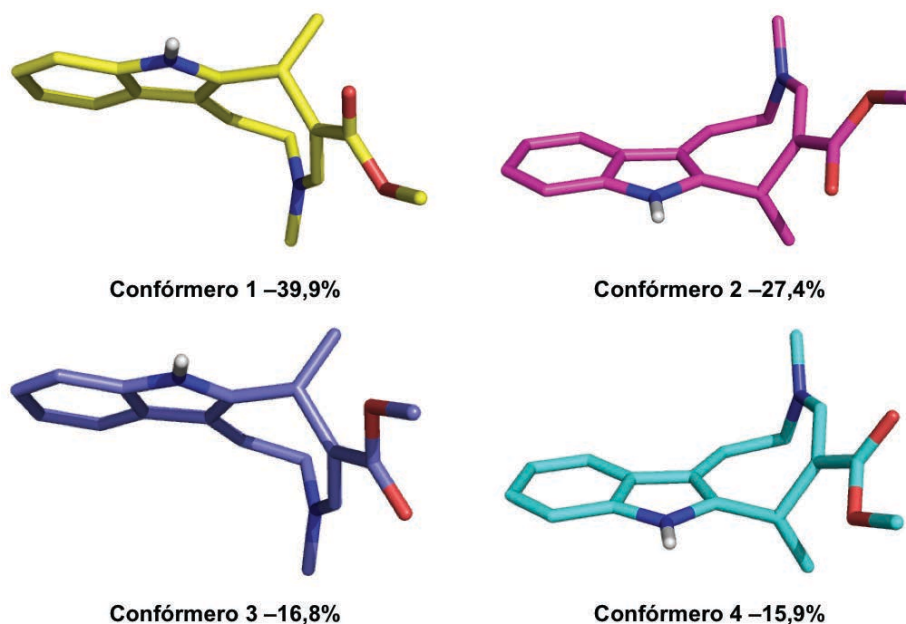


Figura 30. Preferencias conformacionales del Tautómero 2A del compuesto N14, con sus porcentajes correspondientes.

En ambos casos, al tratarse de estructuras deprotonadas, la ausencia de protón permite una ligera mayor libertad conformacional y el giro del sustituyente éster, anteriormente bloqueado por interacciones intramoleculares en el tautómero 1B. Cabe hacer notar que según el tautómero, el grupo metilo alterna posiciones axial y ecuatorial, según la orientación del resto de la molécula.

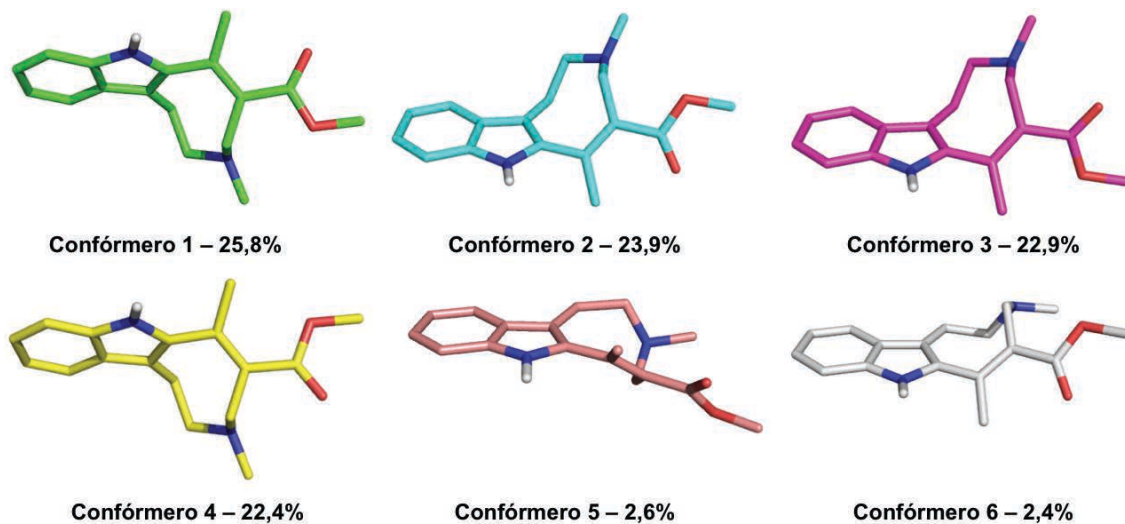


Figura 31. Preferencias conformacionales del Tautómero 2B del compuesto N14, con sus porcentajes correspondientes.

4.1.3.3. Preferencias conformacionales del compuesto **N5**

Al observar los posibles conformémeros del tautómero 1A del compuesto **N5**, se pueden destacar 2 posibles conformaciones, donde la mayoritaria predomina con un 71,4% (ver **Figura 32**), caracterizada por la interacción catión- π . La orientación del éster alfa es siempre la misma, mientras que el éster beta puede estar en dos conformaciones bien diferenciadas.

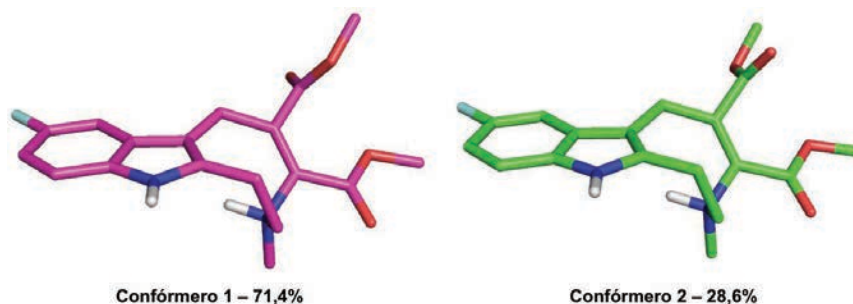


Figura 32. Preferencias conformacionales del Tautómero **1A** del compuesto **N5**, con sus porcentajes correspondientes.

En el caso del tautómero 1B, la interacción intramolecular entre el protón del nitrógeno y el oxígeno carbonílico del éster tiene un peso muy relevante, donde domina principalmente una conformación que representa el 63,6% de la población (ver **Figura 33**).



Figura 33. Preferencias conformacionales del Tautómero **1B** del compuesto **N5**, con sus porcentajes correspondientes.

El tautómero 2A, debido a la posición del doble enlace y a la ausencia de protón en el nitrógeno dan lugar a un variedad conformacional más amplia, dando hasta 10 conformaciones diferentes (ver **Figura 34**), aunque las 3 conformaciones mayoritarias abarcan por ellas solas más de un 70% de la población total. Ambos esterés parecen

tener movilidad, dando lugar a dos posiciones posibles en ambos casos. Así mismo el puente del anillo de azocino suele orientarse en ambas caras, a pesar de que lo hace en una posición más relajada, ante la falta de protón que pueda llevar a cabo interacciones catión- π .

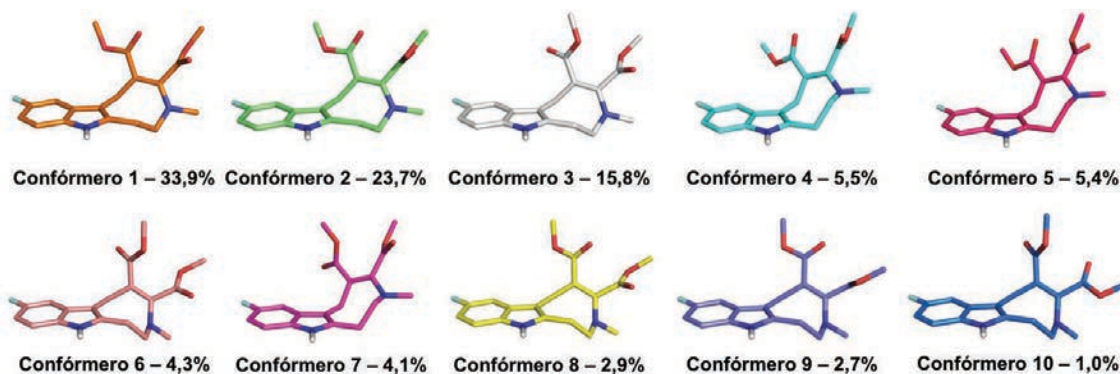


Figura 34. Preferencias conformacionales del Tautómero **2A** del compuesto **N5**, con sus porcentajes correspondientes.

Finalmente, en el caso del tautómero **2B**, las posibilidades conformacionales se concentran en 4 conformaciones, donde destaca la mayoritaria con un 62,2%, (ver **Figura 35**) y la variedad conformacional de dicho tautómero viene dada principalmente por la diferente disposición de los dos sustituyentes ésteres.

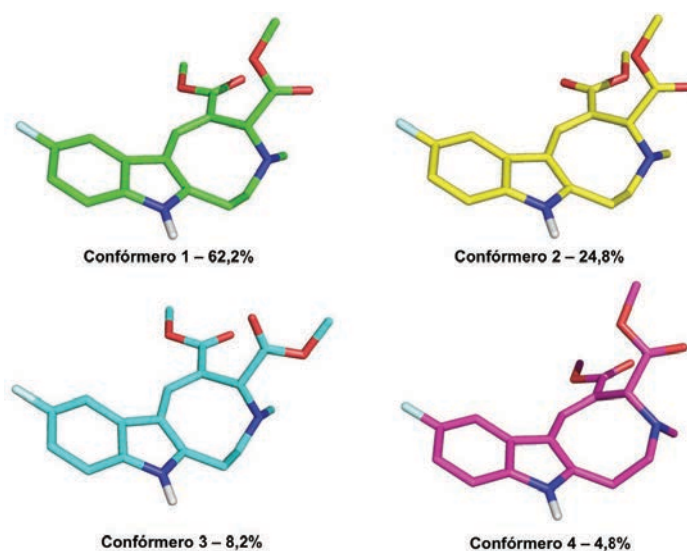


Figura 35. Preferencias conformacionales del Tautómero **2B** del compuesto **N5**, con sus porcentajes correspondientes.

Al solapar los cristales originales de los compuestos comentados al inicio, frente las conformaciones mayoritarias del tautómero 2A según ML, se pone de manifiesto que dicha metodología reproduce con gran exactitud la estructura que fue cristalizada con anterioridad. Concretamente, el compuesto **N14** tiene un solapamiento perfecto, mientras que el compuesto **N5** está afectado principalmente por ligeros cambios en la orientación del anillo azocínico y de los sustituyentes éster (ver **Figura 36**).

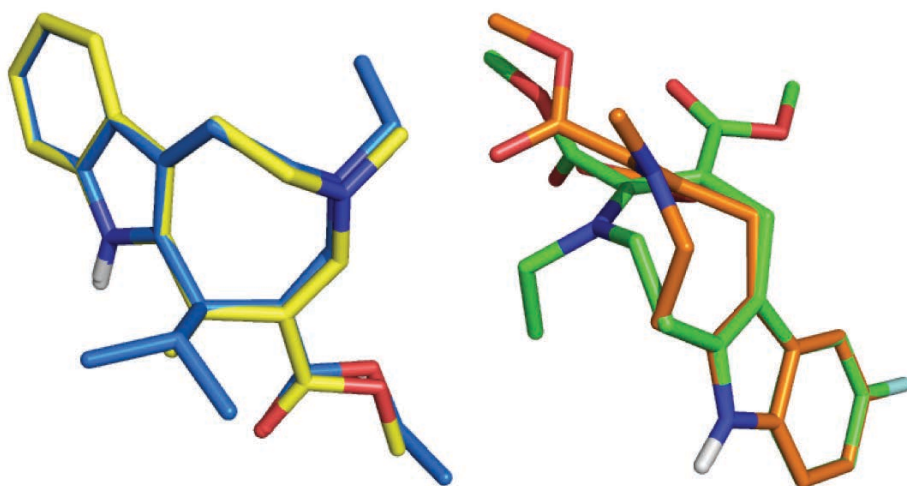


Figura 36. A la izquierda, solapamiento del cristal CCDC-229769 (compuesto **N13**) (átomos de carbono en azul), frente a la conformación mayoritaria (39,9%) del compuesto **N14** según la metodología ML (átomos de carbono en amarillo). A la derecha, solapamiento del cristal CCDC-218170 (átomos de carbono en verde), frente a la conformación mayoritaria (33,9%) del compuesto **N5** según la metodología ML (átomos de carbono en amarillo).

4.1.3.4. Estimación de pK_a de los compuestos **N14** y **N5**

De la misma forma que en el caso de los inhibidores huprina-reína, la estimación de pK_a se basó a calcular la diferencia de energía libre de la reacción de desprotonación en medio acuoso (ΔG_{aq}) mediante el uso de un ciclo termodinámico. Dado el mayor tamaño molecular, en este caso se ha usado la suma de las energías MP2/aug-cc-pVDZ, junto con la corrección de punto zero (ZPE, Zero Point Correction) y añadiendo el factor de solvatación con el método MST a nivel HF/6-31+G(d). Los detalles de dicha metodología se encuentran en el apartado de métodos.

Los resultados indican que la forma tautomérica 1B siempre es mucho más estable. En el caso del compuesto **N14** la diferencia energética es de 10,9 kcal/mol, y en el caso del compuesto **N5** aumenta hasta 15,4 kcal/mol. Por tanto, en ambos casos la población de la forma protonada 1A es mínima. Por el contrario, en lo referente a la forma

deprotonada, la forma tautomérica 2A es más estable que 2B en el caso del compuesto **N14**, si bien esta tendencia se invierte en el caso del compuesto **N5** (ver **Tabla 8**). Para el compuesto **N5**, la forma 2A es mayoritaria con respecto a la forma 2B, siendo la diferencia energética de 2,6 kcal/mol. En cambio en el compuesto **N5** la forma tautomérica alternativa 2B tiene mayor importancia con respecto a la original 2A, con una diferencia similar al compuesto **N14** pero en sentido inverso.

Tabla 8. Diferencias de energía promedio obtenidas mediante la metodología MP2/aug-cc-pVDZ + ZPE + MST(HF/6-31+G(d)) para cada una de las formas tautoméricas de los compuestos **N14** y **N5**.

Compuesto N14	Energía (kcal/mol)	Compuesto N5	Energía (kcal/mol)
1A	10,9	1A	15,4
1B	0,0	1B	0,0
2A	0,0	2A	1,9
2B	2,6	2B	0,0

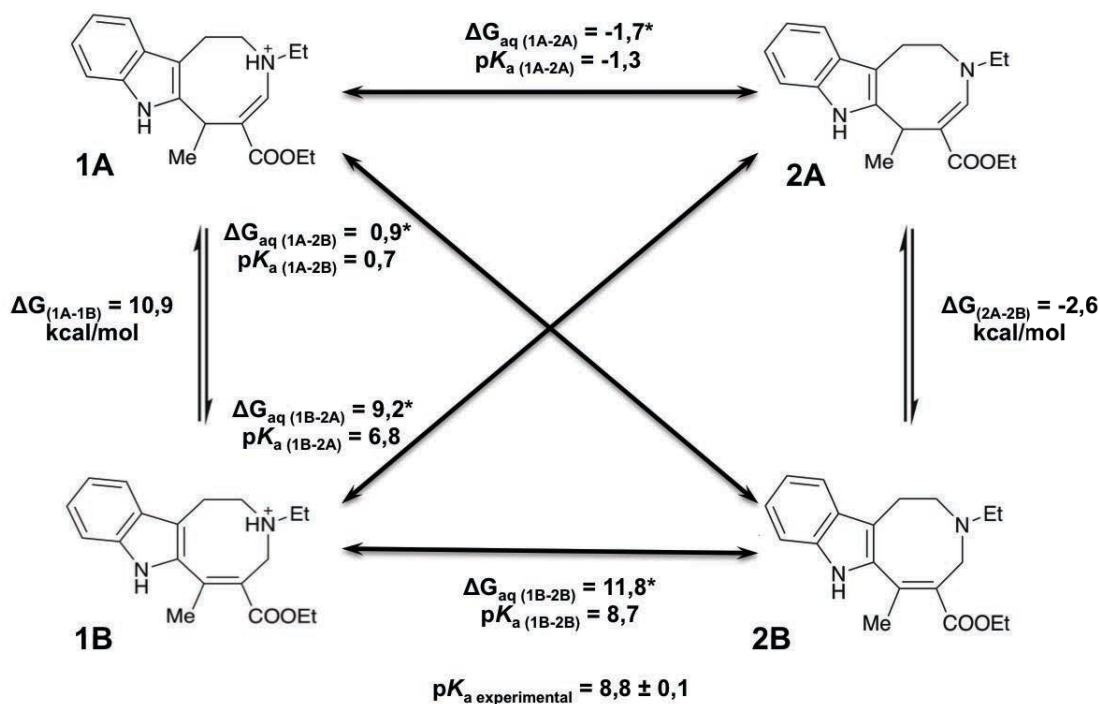


Figura 37. Esquema con los equilibrios tautoméricos y los correspondientes valores de dG_{aq} (*expresados en kcal/mol) y $\text{p}K_{\text{a}}$ calculados computacionalmente del compuesto **N14**.

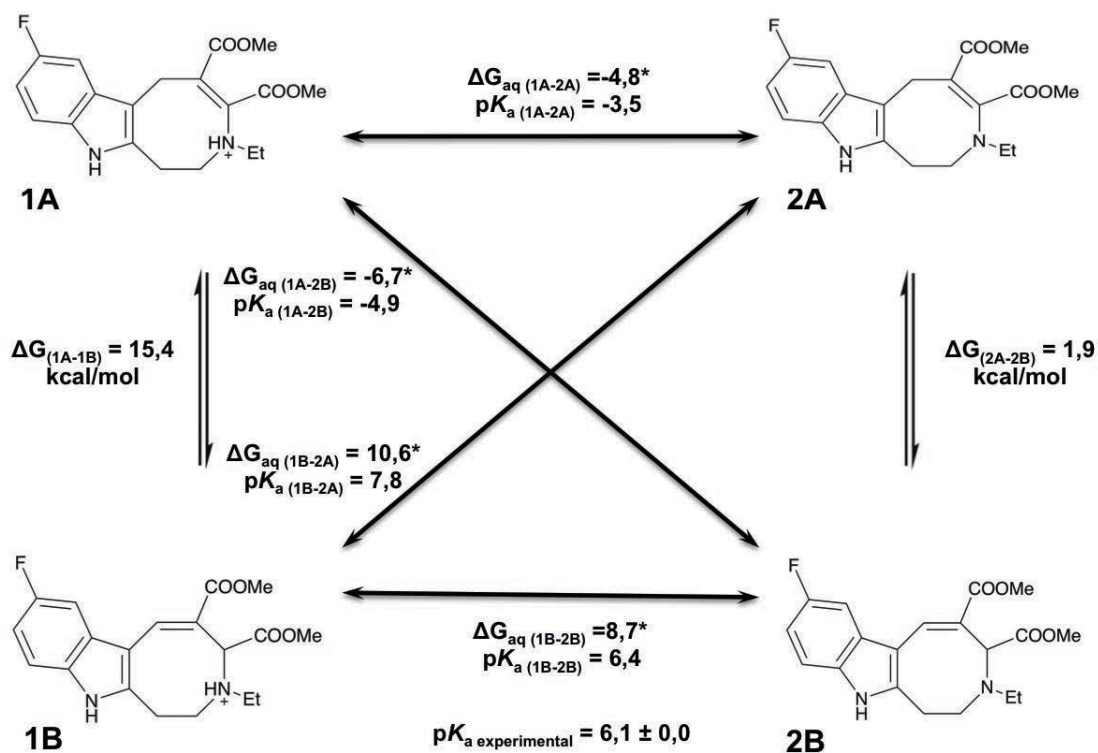


Figura 38. Esquema con los equilibrios tautoméricos y los correspondientes valores de dG_{aq} (*expresados en kcal/mol) y $\text{p}K_{\text{a}}$ calculados computacionalmente del compuesto **N5**.

En base a los resultados presentados en las **Figuras 37, 38** y a los valores experimentales reportados, parecen ser que el proceso principal que guía el valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ es el proceso de desprotonación que se da lugar entre las dos formas tautoméricas alternativas **1B** y **2B**. En esos casos el valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ se ajusta casi a la perfección a los valores experimentales comentados al inicio, estando 0,3 unidades por encima en el caso del compuesto **N5** y a menos de 0,1 unidades por debajo en el caso de compuesto **N14**. Además, los valores del proceso de desprotonación entre **1A** y **2A** están en consonancia, con las predicciones de *MarvinSketch*®. Con nuestro método, dicho proceso da un valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ de -1,3 en el caso del compuesto **N14** y de -3,5, en el caso del compuesto **N5**, en cambio, en el caso de *MarvinSketch*® estas mediciones dan -0,9 y -6,0 respectivamente.

Estos resultados sugieren que la presencia de formas tautoméricas tiene una importancia clave para entender el valor de $\text{p}K_{\text{a}}$ y que probablemente la forma que se midió en la estimación experimental era realmente la forma tautomérica **1B** y no la que reportan en la publicación original. Probablemente, dicha forma no fue considerada y no fue detectada ni según los datos de RMN ni los de cristalografía de rayos X.

4.1.3.5. Estudios de estabilidad del anillo azocínico

Para tratar de entender el diferente peso existente entre los tautómeros 2A y 2B para cada compuesto, se ha llevado a cabo un estudio de estabilidad focalizado en el anillo azocino y la sustitución de los grupos éster. Los estudios consisten en determinar el efecto de la diferente sustitución de ésteres sobre el anillo azocino.

En el caso del compuesto **N14**, existen 2 posibilidades por tautómero: anillo desnudo (sin sustituyentes) y con el éster en posición beta (el único que tiene). Por el contrario, en el compuesto **N5**, existen 4 posibilidades por tautómero: anillo desnudo, con el éster en posición alfa, con el éster en posición beta y con los dos ésteres simultáneamente (ver **Figura 39**).

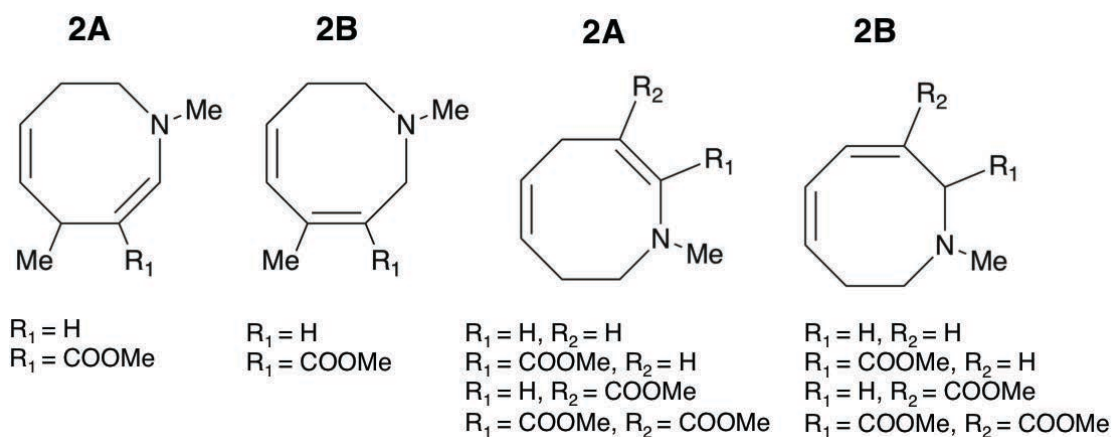
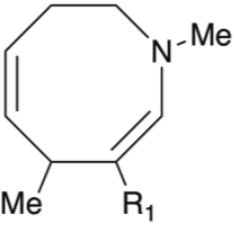
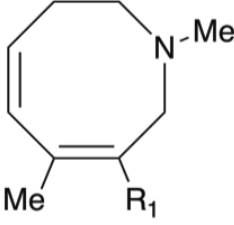


Figura 39. Representación de las 12 estructuras implicadas en el estudio del anillo azocino, siendo la primera y la segunda, las dos tautomerías del compuesto **N14** y la tercera y la cuarta, las dos tautomerías del compuesto **N5**.

De forma general los resultados parecen apuntar que la presencia de grupos en posiciones específicas dan lugar a un mayor o menor estabilización de un tautómero u otro (ver **Tabla 9 y 10**). En el caso del compuesto **N14**, si consideramos el anillo desnudo, la conformación más estable es 2B con respecto a 2A en unas 4,4 kcal/mol. Dicha tendencia sería contradictoria con las diferencias de energía obtenidas con la molécula entera, donde la estructura más estable es 2A por 2,6 kcal/mol. A continuación, al añadir el único sustituyente éster de dicho compuesto, el perfil de estabilidad cambia completamente. La adición de dicho grupo cambia el balance a favor de la forma 2A. Esta situación, hace pensar que la adición del grupo éster es crucial para la sutil estabilización del tautómero 2A y con respecto la forma 2B. Los valores de

estabilización en cloroformo, mantienen un perfil de estabilidad similar, dando a entender que la influencia de dicho solvente, donde se realiza los estudios de RMN, es mínima en las tendencias observadas.

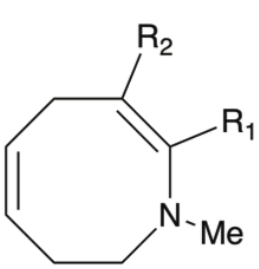
Tabla 9. Energías relativas entre tautómeros 2A y 2B para el compuesto **N14** en sus diferentes formas del anillo azocínico.

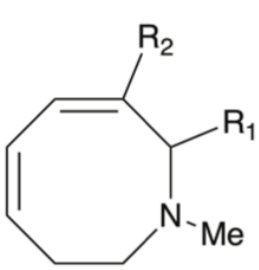
	Energía relativa en agua (kcal/mol)	Energía relativa en cloroformo (kcal/mol)
R ₁ = H	4,4	4,5
R ₁ = COOMe	0,0	0,0
	Energía relativa en agua (kcal/mol)	Energía relativa en cloroformo (kcal/mol)
R ₁ = H	0,0	0,0
R ₁ = COOMe	1,4	0,5

En el caso del compuesto **N5**, si se considera la molécula entera, el tautómero 2B es 1,9 kcal/mol más estable que 2A. Cuando se mide la estabilidad del anillo desnudo, la forma 2B también es más estable que la forma 2A en 4,1 kcal/mol, de forma similar al compuesto **N14**. Cuando se añade un éster en posición beta del nitrógeno protonable, la estabilidad se invierte ligeramente siendo 2A más estable que 2B en 0,6 kcal/mol. En cambio, si se añade un éster en posición alfa de dicho nitrógeno, los niveles de estabilidad vuelven a aquellos de la forma desnuda del anillo, existiendo una diferencia de 4,6 kcal/mol. En cambio, si se añaden ambos ésteres simultáneamente al anillo de azocino la amplitud de la barrera energética queda en un punto intermedio, siendo 2B 2,9 kcal/mol más estable que 2A. Finalmente, la adición de efectos de solvatación en

cloroformo, al igual que en el compuesto **N14** tiene una influencia muy baja, manteniendo las tendencias de estabilidad en unos rangos muy parecidos.

Tabla 10. Energías relativas entre tautómeros 2A y 2B para el compuesto **N5** en sus diferentes formas del anillo azocínico.

	Energía relativa en agua (kcal/mol)	Energía relativa en cloroformo (kcal/mol)
R ₁ = H, R ₂ = H	4,1	3,5
R ₁ = COOMe, R ₂ = H	4,6	3,6
R ₁ = H, R ₂ = COOMe	0,0	0,0
R ₁ = COOMe, R ₂ = COOMe	2,9	1,6

	Energía relativa en agua (kcal/mol)	Energía relativa en cloroformo (kcal/mol)
R ₁ = H, R ₂ = H	0,0	0,0
R ₁ = COOMe, R ₂ = H	0,0	0,0
R ₁ = H, R ₂ = COOMe	0,6	0,6
R ₁ = COOMe, R ₂ = COOMe	0,0	0,0

4.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato para el tratamiento de Malaria

Un aspecto relevante que ha limitado un correcto estudio de *PfG6PD* es la ausencia de una estructura cristalográfica definida del enzima del parásito. Por ello, se compararon las secuencias de G6PD humana (hG6PD) y las diferentes especies de *Plasmodium*, entre ellas *P. falciparum* (*PfG6PD*), detectando que los residuos presentes en la zona de unión de G6P se mantenían muy conservados, con la excepción de un cambio R750D, donde la Arginina de la forma hG6PD²⁰¹ es sustituida por un Aspártico en *PfG6PD*. Dicha modificación es sustancial, ya que supone un cambio en la longitud del residuo y una alteración electrostática. Ante esta situación, se planteó la hipótesis que dicho cambio podía tener un papel relevante en la selectividad de aquellos fármacos que actúan ante esta diana.

En base a las evidencias anteriormente comentadas, se construyó un modelo estructural de *PfG6PD* y diseñó una serie de análogos del sustrato que debían interaccionar preferentemente con el enzima del parásito. Los resultados biológicos de los análogos sintetizados confirmaban la hipótesis inicial, dando lugar a una inhibición de *PfG6PD* con mayor selectividad en comparación a hG6PD, con valores de K_i en el rango μM y un perfil de citotoxicidad hepática muy positivo. Sin embargo, a pesar que dichos análogos han servido como una forma de validar el modelo de homología y la mutación anteriormente comentada, desde un punto de vista sintético, de biodisponibilidad y farmacológico dichos compuestos eran limitados.

4.2.1. Desarrollo de inhibidores contra *PfG6PD* con un mejor perfil tipo fármaco

Gracias a la validación experimental del modelo de homología de *PfG6PD*, se pudo plantear un proyecto para poder tratar de encontrar nuevas estructuras capaces de interaccionar e inhibir la forma parasitaria de G6PD. El trabajo a realizar se centró en dos estrategias. Por un lado, realizar una búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad conocida frente al enzima, para así mediante técnicas computacionales poder determinar su modo de unión. Por el otro, una estrategia inversa, consistente en consultar librerías de compuestos, con gran variedad molecular, de los cuales

únicamente se conoce su potencial actividad frente a Malaria pero se desconocen sus posibles dianas, modos de unión o mecanismos de acción, sometiéndolas a procesos de cribado virtual, para así descubrir posibles compuestos que actúen frente a nuestro enzima de interés.

4.2.1.1. Estudio del modo de unión de inhibidores con actividad conocida frente *PfG6PD*

Esta primer estrategia condujo a dos compuestos que fueron sintetizados por el grupo de investigación de la Prof. Dra. Katja Becker en el año 2012: (R, Z)-N-((1-etilpirrolidin-2-il) metil)-2-(2-fluorobenciliden)-3-oxo-3,4-dihidro-2H benzo [b] [1,4] tiazina-6-carboxamida, y N-[[2R)-1-etilpirrolidin-2-il]metil]-10-metil-6-oxo-5H-benzo[b][1,4]benzotiazepina-3-carboxamida, ambos resumidos con los nombres ML-276 y ML-304 (Figura 40).^{202,203,204}

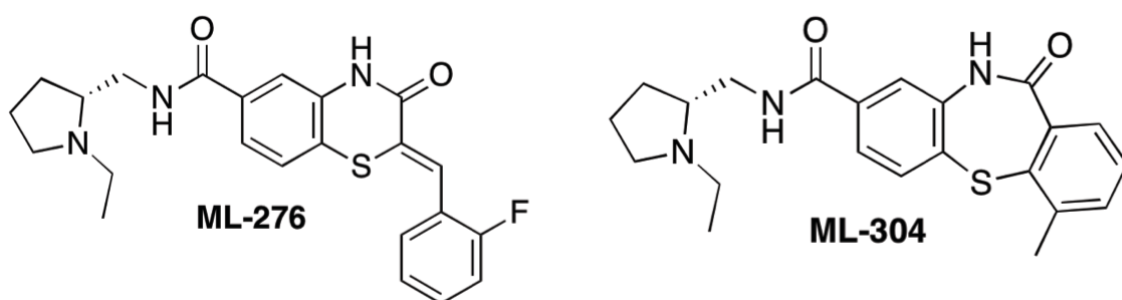


Figura 40. Estructuras en 2D de ML-276 y ML-304

Ambos compuestos cumplen características muy relevantes para nuestros objetivos, ya que son selectivos frente a *PfG6PD* reportando unos valores de IC_{50} de 889 nM (ML-276) y de 190 nM (ML-304), en tanto que presentan una inhibición μM ($> 80 \mu M$) contra la forma humana del enzima. Además, los diferentes estudios reportan una inhibición competitiva frente al sustrato original G6P y un de tipo mixta frente al cofactor $NADP^+$.

En primer lugar, tanto ML-276 como ML-304 tienen la particularidad de poseer un nitrógeno protonable en el fragmento *N*-etilpirrolidina, un aspecto clave ya que la carga positiva debería facilitar la interacción con el Asp750 del enzima parásitario, mientras que la dificultaría con el Arg750 de la forma humana, siendo un motivo de posible selectividad. Además, una vez observadas las diferentes características de las moléculas encontradas, se detectaron diferentes aspectos comunes a ser considerados y que son

estudiados previamente a la determinación del modo de unión de ambos compuestos en los siguientes apartados. Estos tres aspectos son: la disposición del fragmento N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)acetamida, la planaridad del anillo heterocíclico fusionado y la flexibilidad conformacional del grupo estirilo.

i) El fragmento N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)acetamida es un patrón común presente en ambos compuestos. La disposición de las dos torsiones τ_1 y τ_2 , que unen el anillo cargado con el grupo amida, así como la dos posibles caras (A y B) por las que podía unirse el protón del nitrógeno pueden tener una gran relevancia en la estabilidad de los compuestos. Los estudios realizados sobre modelos simplificados de los compuestos del fragmento N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)acetamida determinaron que las estructuras protonadas por la cara B y con los valores de τ_1 - τ_2 en 60° - 0° previas a optimización eran la conformación más estable. La primera torsión apenas modifica su valor una vez optimizado ($72,3^\circ$), sin embargo τ_2 varía en 80° su disposición la cual se dispone de una forma que facilita la interacción intramolecular del nitrógeno cargado del anillo de N-etilpirrolidina y el oxígeno carbonílico de la amida. Una vez optimizada dicha estructura en agua, se observa que dicha conformación se podría llevar a cabo en la cavidad proteica, aunque si se produjera dificultaría la interacción con el Asp750, puesto que el nitrógeno protonado interaccionaría intramolecularmente y no con el residuo clave.

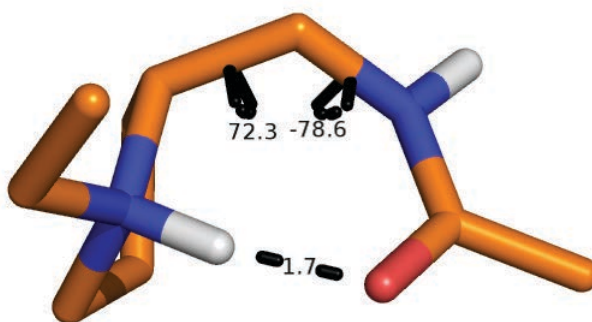


Figura 41. Disposición del fragmento N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)acetamida más estable en solución, obtenida del Trabajo de Final de Máster de David Vílchez.²⁰⁵

ii) Tanto ML-276 como ML-304 tienen un anillo fusionado en su estructura. En el caso del primero un anillo doble de 3,4-dihidro-2H-1,4-benzotiazin-3-ona y en el caso del segundo con un anillo de 4-metildibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11(10H)-ona. En ambos casos se ha probado de forzar la planaridad de ambos anillos, pero sin embargo, en el

caso del biciclo se produce un plegamiento más ligero, por el contrario este es mucho más pronunciado en el triciclo donde se coloca sobre un valor de 100°.

iii) El grupo estirilo se encuentra únicamente en el compuesto ML-276, concretamente en la unión del grupo fluorobencilo al biciclo de la molécula. Aquí probamos de eliminar dicho grupo y colocar el grupo fluorobencilo en diferentes disposiciones. Al final, de las 6 distintas posibilidades en las que se colocó dicho grupo, 4 casos convergieron a estructuras casi idénticas en valor de diedro de unos -5,4 grados. Una de las disposiciones subecuatoriales y la disposición subaxial se optimizan hacia otras posibilidades conformacionales, dando lugar a una mayor libertad del grupo estirilo pero que supone una penalización de casi 3,0 kcal/mol en solución acuosa con respecto a las otras.

Una vez analizados dichos aspectos conformacionales y estructurales, se usó una técnica de acoplamiento molecular (*docking*) y posterior refinado mediante dinámica molecular para determinar el modo de unión. Sin embargo, dicha estrategia presentó dificultades, principalmente debidas a que las poses de docking eran escasas, poco convincentes o simplemente el posterior refinado provocaba la salida de los ligandos de la cavidad. Dicha problemática podía venir por estar trabajando con un modelo de homología de únicamente una de las dos partes de la proteína dual del parásito y con unas condiciones de dinámica suaves que no permitían un correcto muestreo de las cadenas del enzima. Por ello, se optó por aplicar restricciones y condiciones de temperatura más elevadas (ver Métodos). Ello condujo a resultados más satisfactorios, ya que la presencia de restricciones de distancia (10 kcal/mol) forzaban a los ligandos a llevar a cabo la interacción con el Asp750, y el uso de altas temperaturas (400 K) permitía explorar mejor el ajuste del ligando en la proteína.

Se emplearon inicialmente dos programas de acoplamiento molecular: *Autodock*® y *Glide*®. Únicamente en el caso de *Glide*® se impusieron restricciones para forzar las interacciones con el Asp750. En ambos casos la protonación por la Cara B daba lugar a un mejor encaje en el sitio de unión del ligando. Las puntuaciones obtenidas en cada caso diferían bastante, a pesar de que se movían en torno a valores parecidos. Para el compuesto ML-276, *Autodock*® le asignó una calificación de -5,51 y *Glide*® de -4,18,

mientras que para el compuesto ML-304, fueron de -5,26 y -4,47, respectivamente. Ambos programas de acoplamiento molecular coincidieron en la disposición del grupo N-((1-etilpirrolidin-2-il)metil)acetamida, dando lugar a una conformación tensionada que no permite la interacción intramolecular previamente comentada. Con *Autodock*® la disposición era parecida aunque no coincidían en la orientación especial del resto de la molécula.

Las poses obtenidas con *Glide*® pusieron de manifiesto la actuación como inhibidores competitivos con respecto a G6P, donde el choque estérico del inhibidor con G6P está en consonancia con el mecanismo de acción propuesto en la publicación de dicho compuesto. Esta situación no es tan evidente en las poses obtenidas con *Autodock*®. Por ello, se optó por seguir adelante con las poses obtenidas para *Glide*®. Tras una corta dinámica con restricciones de 10 kcal/mol y a temperaturas de 400 K, se tomaron réplicas a diferentes tiempos de simulación, las cuales se sometieron a enfriado y retirada de las restricciones, tal y como se comentan en el apartado de métodos.

De las diferentes réplicas lanzadas, los resultados obtenidos a 500 ns fueron dispares. A excepción de una réplica, los ligandos se mantuvieron dentro de la cavidad una vez las restricciones fueron eliminadas. A pesar de que en algunas réplicas la interacción clave con el Asp750 se perdía, en al menos una réplica de cada compuesto dicha interacción se mantenía de forma estable. Dicha situación puede darse ya que se trata de una zona rica en cargas positivas que pueden desestabilizar puntual o totalmente la interacción del nitrógeno protonado con el carboxilato del Asp750. Además al tratarse de un modelo de homología pueden existir contactos locales alejados de conformaciones estables, afectando a la estructura del complejo formado. También cabe destacar que en casi todas las réplicas donde hay pérdida de interacción, se observa una tendencia a tratar de restablecer dicha interacción en posteriores pasos de dinámica. El resto de interacciones más profundas de la cavidad se mantienen de forma continua, lo cual permite un correcto acomodado del ligando a la cavidad.

A pesar de que el estudio se llevó a cabo en ambos compuestos, el modo más estable fue el del compuesto ML-276, (ver **Figura 42**) pues conservó su integridad estructural durante 500 ns de simulación, manteniendo la interacción clave con el residuo Asp750.

Además, el anillo de fluorobenceno se unió firmemente a un hueco hidrofóbico conformado por Val585 y Leu778. El modo de unión propuesto impediría la correcta unión del sustrato G6P, debido principalmente a los choques estéricos entre el doble anillo de ML-276 y grupo fosfato de G6P, lo cual justificaría la inhibición competitiva por parte de este compuesto.

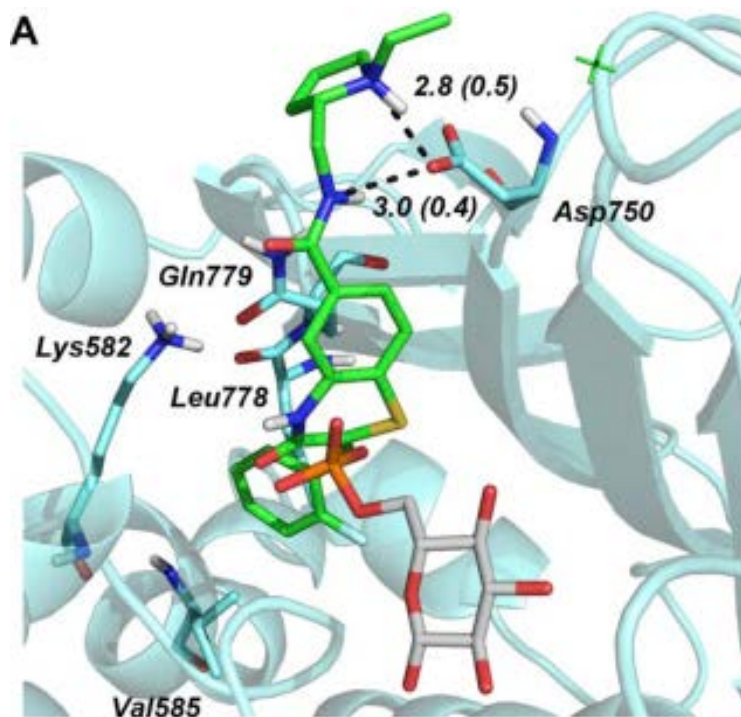


Figura 42. Representación del modo de unión de ML-276 (en verde), rodeado de los residuos clave de la cavidad (en azul claro) y con la inhibición competitiva frente G6P (en gris).

4.2.1.2. Relación-estructura actividad (REA)

El hecho de que ambos compuestos se unan de forma parecida dentro de la cavidad, permite plantear la selección de determinantes moleculares que expliquen las relaciones estructura-actividad (REA) de compuestos relacionados.²⁰³ Dichos determinantes se muestran en la **Figura 43**.

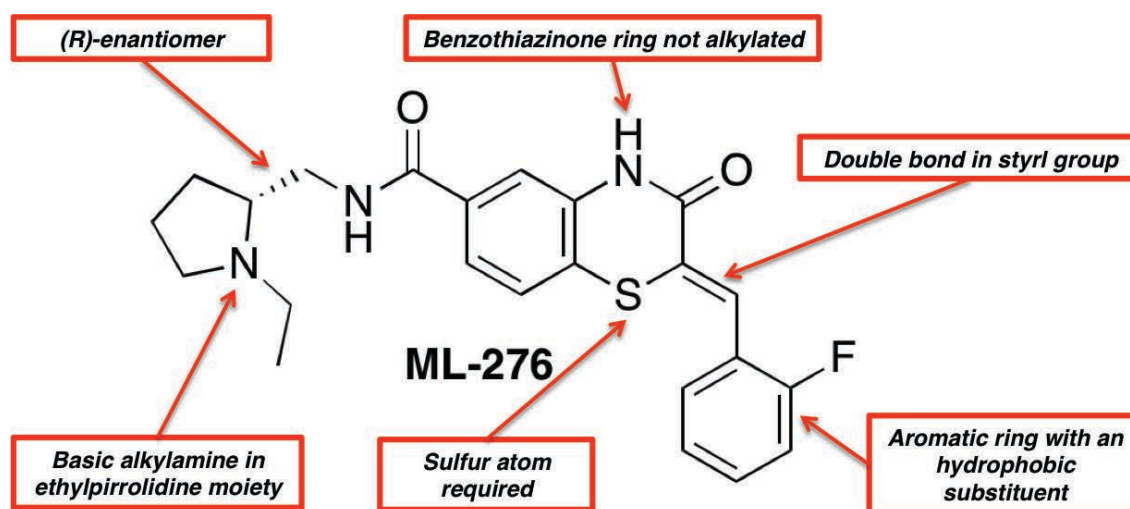


Figura 43. Determinantes moleculares de ML-276 estudiados

i) La protonación del compuesto es básica, pues ello explica la estabilización electrostática con Asp750 en *PfG6PD*. Además, los estudios previos apuntan a una preferencia de protonación por una de las caras del anillo de N-etilpirrolidina y una ligera preferencia hacia el enantiómero R, lo cual facilitaría más la interacción. Además, la disposición de “pinza” de ambos compuestos provoca la rotura de una interacción intramolecular, que se encuentra presente en la conformación más estable en solución acuosa. En este caso se modifica hacia valores de τ_1 - τ_2 de 297,6°-209,1° en ML-276 y 185,6°-167,8° en ML-304, estando penalizadas en 3,8 y 5,1 kcal/mol respectivamente, lo cual corrobora el hecho de que la conformación bioactiva no tiene porqué ser la más estable en términos energéticos.¹⁴

ii) La presencia de un grupo azufre en el anillo de tiazina del doble (ML-276) o triple (ML-304) anillo parece permitir un mayor acomodo del ligando en la cavidad debido a que en ambos casos se produce una ligera torsión en esta parte del compuesto. Los estudios previos al acoplamiento molecular permiten verificar que en ambos casos hay una tendencia a converger en un estructura con dicha curvatura cuando se trata de forzar la planaridad del anillo.

iii) El nitrógeno del anillo tiazínico no debe estar metilado según los estudios REA de la publicación original, lo cual estaría en concordancia a lo observado en nuestros modos de unión, donde especialmente en el compuesto ML-304 parece llevar a cabo interacciones con Lys y Glu que estabilizarían la cavidad.

iv) En el caso concreto del ML-276, la presencia del doble enlace del grupo estirilo es clave para reducir la flexibilidad conformacional del compuesto, lo cual permite una correcta colocación del anillo de fluorobenceno en la cavidad hidrofóbica. El penalti conformacional al comparar la conformación bioactiva, frente la mayoritaria en solución indican que el término entálpico sería de 0,4 kcal/mol, lo que hace pensar que dicho coste sea eminentemente entrópico.

v) Finalmente, la presencia de un sustituyente hidrofóbico en el anillo aromático fijado por el grupo estirilo permite la creación de un pequeño sub-bolsillo que se presume clave en aumentar la potencia del compuesto y permitiendo al correcto anclaje en la cavidad. Esto cuadraría con los datos de REA, donde la ausencia de dicho grupo flúor disminuye ligeramente la actividad. En el caso del compuesto ML-304, una función parecida vendría dada presumiblemente por el sustituyente metilo unido al triple anillo.

4.2.1.3. Descubrimiento del modo de unión de inhibidores con potencial actividad frente *PfG6PD*

La otra estrategia planteada para la búsqueda de nuevas estructuras con capacidad de inhibir la forma parasitaria de G6PD ha sido el cribado virtual de distintas librerías con conocida actividad frente a malaria, pero mecanismo de acción desconocido, y en particular *Malaria Box*.¹³³ Comprende un conjunto de moléculas, ensamblado por la organización *Medicines for Malaria Venture* (MMV), que es una asociación para desarrollo de productos o *Product Development Partnership* (PDP) y que focaliza sus esfuerzos en la investigación, diseño y desarrollo de nuevos fármacos frente a Malaria. *Malaria Box* está formada por un total de 400 compuestos activos frente a *P. falciparum*, pero se desconoce la diana a través de la cual llevan a cabo su actividad. Todos los compuestos tienen actividad confirmada frente a la forma eritrocitaria del parásito y tienen disponibilidad comercial.

La librería de Malaria Box fue conformada a partir de 20.000 moléculas hit que se obtuvieron de una extensa campaña de cribado previa de casi 4 millones de compuestos de librerías provenientes del *St. Jude Children's Research Hospital*, el *Novartis-GNF Malaria Box Data Set* y del *GlaxoSmithKline Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS)*. Posteriormente, se filtraron por criterios de disponibilidad comercial, diversidad

química y ensayos de conformación que dan lugar a las 400 moléculas de las que está formada la librería, siendo 200 de ellas moléculas tipo fármaco y 200 de ellas moléculas tipo sonda.

Las tentativas iniciales consistieron en lanzar cribados virtuales usando *Glide*®, aplicando restricciones farmacofóricas para primar compuestos capaces de interactuar con Asp750. Sin embargo, dichos resultados fueron poco satisfactorios por la excesiva variedad molecular de las librerías, que conducía a modos de unión poco convincentes o moléculas poco prácticas desde un punto de vista sintético y de diseño de fármacos, y por el uso de un modelo de homología, que podía dificultar la consecución de modos de unión fiables.

Ante esta situación, se usó el software *Pharmscreen*®, desarrollado por la empresa *Pharmacellera*, que consiste en un método de alineamiento de ligandos en base a diferentes criterios (hidrofobicidad y puente de hidrogeno). Dicho programa ha sido desarrollado en el marco de la tesis doctoral de Javier Vázquez y publicado recientemente.¹⁰⁸

Para llevar a cabo el solapamiento, es necesario el uso de una molécula de referencia, sobre la cual llevaremos a cabo el alineamiento con la librería en cuestión. En este caso, se emplearon como referencias los modos de unión comentados en el apartado anterior de ML-276 (Referencia 1) y ML-304 (Referencia 2), así como el de un análogo donde se sustituye el grupo 2-clorobenceno de ML-276 por un grupo naftilo (Referencia 3), también descrito en la publicación de 2012.²⁰³

Una vez realizados los diferentes alineamientos los resultados muestran que distintos compuestos dan lugar a alineamientos prometedores con ML-276, y por lo tanto a otras potenciales estructuras en que basar el diseño de nuevos inhibidores de *PfG6PD*. A continuación, se seleccionaron posibles candidatos a ser validados experimentalmente basándose en 3 criterios: inspección visual del alineamiento, valor de Tanimoto obtenido con *Pharmscreen*® y disponibilidad comercial. Una vez pasados estos filtros, los candidatos seleccionados concretamente fueron: MMV019871, MMV020651, MMV396723, MMV006587 y MMV019313, que se denominaron de forma más simplificada como inhibidor 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, cuyas estructuras en 2D, se

encuentran en la **Figura 44** y sus alineamientos se muestran en la **Figura 45**. Sus valores de Tanimoto se mueven en torno a 0,5 y se detallan en la **Tabla 11**.

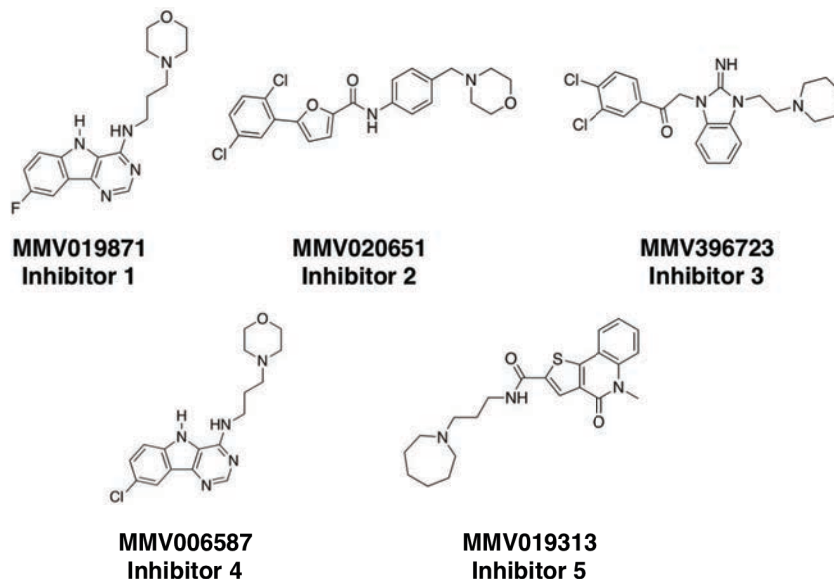


Figura 44. Representación en 2D de los cinco candidatos seleccionados después del alineamiento con *Pharmscreen*®, junto con su código MMV.

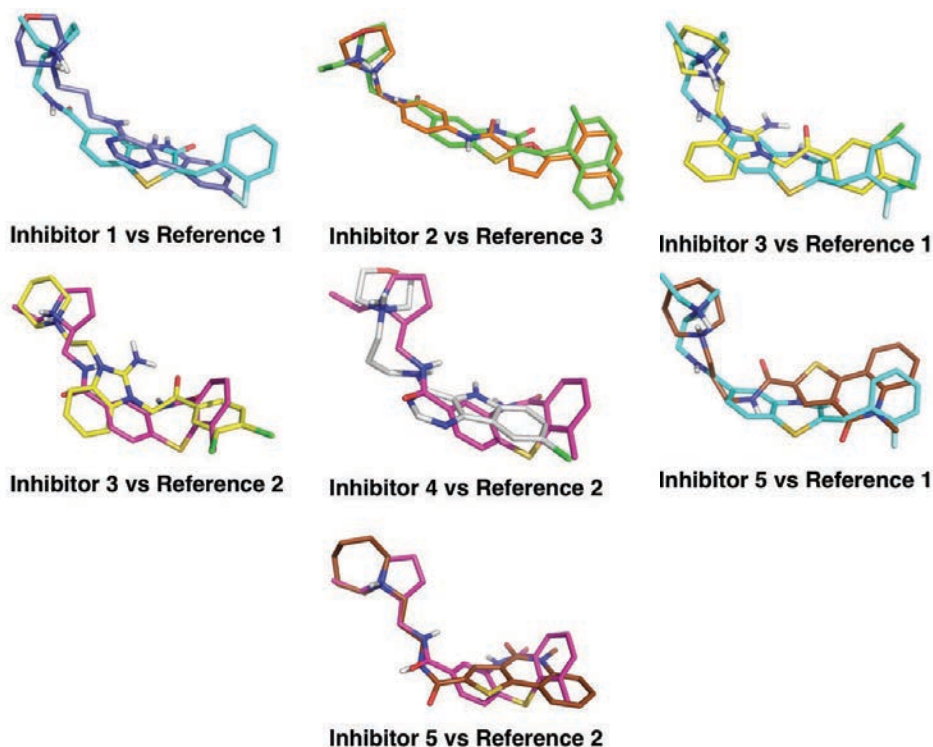


Figura 45. Alineamientos de los cinco candidatos seleccionados (Inhibidor 1 (átomos de carbono en color azul), Inhibidor 2 (átomos de carbono en color naranja), Inhibidor 3 (átomos de carbono en color amarillo), Inhibidor 4 (átomos de carbono en color gris) e Inhibidor 5 (átomos de carbono en color marrón)) con las diferentes moléculas de referencia. Referencia 1 (átomos de carbono en color turquesa), Referencia 2 (átomos de carbono en color magenta) y Referencia 3 (átomos de carbono en color verde)

Tabla 11. Valores de Tanimoto de los candidatos seleccionados con respecto a las diferentes moléculas de referencia.

	MMV019871 (Inhibidor 1)	MMV020651 (Inhibidor 2)	MMV396723 (Inhibidor 3)	MMV006587 (Inhibidor 4)	MMV019313 (Inhibidor 5)
Referencia 1	0,50	-	0,50	-	0,50
Referencia 2	-	-	0,52	0,53	0,53
Referencia 3	-	0,54	-	-	-

A continuación, llevamos a cabo un estudio de acoplamiento molecular de los 5 candidatos escogidos anteriormente con el software *AutoDock*® sin restricciones farmacofóricas hacia ningún residuo frente al modelo de homología de *PfG6PD* y la forma cristalográfica de rayos X de hG6PD. Los resultados mostraron que, para la forma del parásito, todos los inhibidores se ajustaron bien dentro de la cavidad. Por el contrario, contra la forma humana ninguno de ellos fue capaz de entrar dentro de la cavidad, manteniendo así nuestra hipótesis de la selectividad.

Respecto a *PfG6PD*, los inhibidores 1, 4 y 5 tendieron a dar modos de unión preferentes, cosa que no sucedió con los otros dos. Sin embargo, los modos de unión principales de los inhibidores 1 y 4 tendieron a enfocar los nitrógenos de la pirimidina hacia zonas hidrofóbicas, lo cual puede representar un penalti conformacional. Esta situación no se produce en el inhibidor 5. En todos los casos, además, pudieron mantener una interacción más o menos clara con el residuo clave de Asp750 (tal como se muestra en la **Figura 46**).

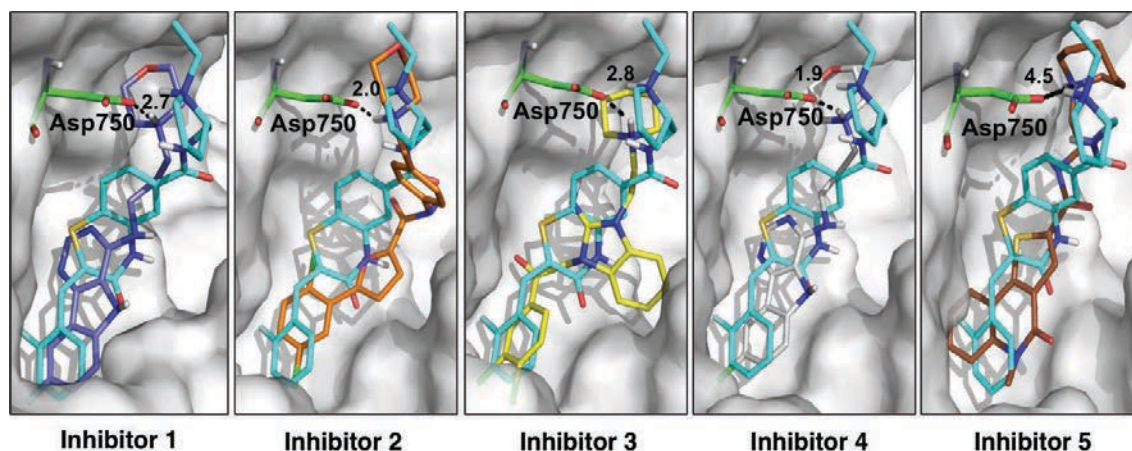


Figura 46. Poses más convincentes de los acoplamientos moleculares con *AutoDock*® de los 5 candidatos escogidos (Inhibidor 1 (átomos de carbono en color azul), Inhibidor 2 (átomos de carbono en color naranja), Inhibidor 3 (átomos de carbono en color amarillo), Inhibidor 4 (átomos de carbono en

color gris) y Inhibidor 5 (átomos de carbono en color marrón)), dentro de la cavidad de PfG6PD junto con la pose del compuesto de Referencia 1 (ML-276) (átomos de carbono en color turquesa). Se detalla el residuo clave Asp750 y la distancia (en Å) del nitrógeno protonable a dicho residuo.

Adicionalmente las puntuaciones otorgadas por el programa de acoplamiento molecular a las poses más convincentes visualmente fueron muy prometedoras, siendo el valor medio de su grupo de -6,87, -7,41, -8,04, -7,40 y -8,05, para los inhibidores 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente

Una vez sustentada computacionalmente nuestra idea, se llevó a cabo una validación farmacológica. Esta validación comprendió 3 experimentos: dos ensayos de actividad frente a una cepa DD2 resistente a cloroquina de *P. falciparum*, y una última consistente en un ensayo enzimático frente a hG6PD y PfG6PD.

En el primer experimento se estudió la actividad frente al parásito a dos concentraciones: 2,0 y 0,2 µM para confirmar su actividad frente a las cepas disponibles DD2 de *P. falciparum*. Los porcentajes de parasitemia reportados en la **Tabla 12**, apuntaban al inhibidor 5 como un candidato potente y prometedor, que mantiene su porcentaje de parasitemia a una concentración de 0,2 µM a 0,7%, cuando el valor para el control sin fármaco fue de 5,8%, lo que se traduce en una supervivencia media relativamente baja de aproximadamente un 11% para dicho compuesto.

Tabla 12. Valores medios para 3 replicas de los % de Parasitemia y % de Supervivencia de los 5 candidatos a concentraciones de 2,0 y 0,2 µM y control negativo, frente a la cepa DD2 de *Plasmodium falciparum*

% Parasitemia del control negativo (Sin inhibidor)		5,8	
2 µM		0,2 µM	
	% Parasitemia	% Supervivencia	% Supervivencia
Inhibidor 1	2,3	40,5	43,3
Inhibidor 2	0,7	12,3	46,2
Inhibidor 3	0,2	3,3	51,9
Inhibidor 4	0,6	11,1	53,6
Inhibidor 5	0,4	6,2	11,6

Los resultados para los inhibidores 2, 3 y 4, permiten intuir una actividad moderada, ya que a 2,0 μM el porcentaje de parasitemia se mueve entre 0,19 y 0,71 %, pero aumentando a valores que oscilan entorno al 3%, cuando se disminuye la concentración a 0,2 μM . Finalmente, el peor candidato parece ser el Inhibidor 1, que se acerca a un 50% de la supervivencia del parásito en la concentración de 2,0 μM , tal como se muestra en la **Tabla 12**.

En el segundo experimento se realizó un estudio completo de actividad frente al parásito donde se trató de determinar la concentración efectiva al 50% (EC_{50}). Concretamente, se determinó la curva de EC_{50} usando ocho concentraciones de fármaco (que se detallan en la **Tabla 13**), las cuales fueron las mismas para los cinco candidatos, a excepción de la más alta, que fue 20 μM para los inhibidores 1, 3 y 5, y 40 μM para los inhibidores 2 y 4.

Por temas de organización, este estudio se dividió en dos sub-estudios. En uno de ellos se llevó a cabo un único estudio del inhibidor 5, el candidato más prometedor según se ha comentado en el apartado anterior. En el otro, se completó el estudio de EC_{50} para los otros cuatro inhibidores. En todos los casos, se incluyó el correspondiente control negativo sin inhibidor y el control positivo con cloroquina.

De forma general, los porcentajes de parasitemia y supervivencia mostrados en la **Tabla 14** corroboran las tendencias observadas en el primer estudio, donde sigue destacando el inhibidor 5 como un candidato prometedor que incluso a concentración de 0,005 μM mantiene un porcentaje de supervivencia cercano al 75%. Más lejanos de este, los inhibidores 3 y 4 se muestran como candidatos aceptables, pues a valores de 2 μM siguen manteniendo un valor de parasitemia bajo pero que aumenta exponencialmente al pasar a un concentración de 0,5 μM . Finalmente, los peores perfiles son mostrados por los inhibidores 1 y 2, que a concentraciones relativamente elevadas muestran un porcentaje de Supervivencia entre un 50-60%.

Tabla 14. Porcentajes de Parasitemia (% P) y Supervivencia (% S) a diferentes concentraciones para el Inhibidor 1 (I1), Inhibidor 2 (I2), Inhibidor 3 (I3), Inhibidor 4 (I4) y Inhibidor 5 (I5). En la parte inferior el % de Parasitemia del Control Negativo sin inhibidor.

Conc. (µM)	I5 % P	I5 % S	I4 % P	I4 % S	I3 % P	I3 % S	I2 % P	I2 % S	I1 % P	I1 % S
0,005	8,2	73,3	4,7	93,4	4,5	89,3	5,0	99,3	4,8	95,9
0,0125	7,7	69,2	4,7	94,5	5,1	100,8	5,0	100,3	4,6	92,3
0,025	7,6	67,5	4,6	92,0	4,8	96,5	4,9	97,7	4,4	88,5
0,05	6,6	58,8	4,7	94,6	4,7	93,8	5,0	98,7	4,9	98,6
0,2	0,8	7,4	4,9	97,4	4,6	90,7	4,8	95,1	4,3	84,8
0,5	0,1	1,0	3,4	67,3	3,3	65,2	4,7	94,1	3,7	74,2
2	0,1	0,4	0,2	4,9	0,2	4,1	2,4	48,3	3,1	61,7
20 o 40 ^a	0,0	0,0	0,1	1,9	0,0	0,0	0,4	7,2	0,2	3,2
Control Negativo	11,2		5,0		5,0		5,0		5,0	

^aDebido a resultados experimentales previos, se decidió fijar la concentración más elevada en 20 µM para los inhibidores 1, 3 y 5, y en 40 µM para los inhibidores 2 y 4.

Estos resultados, una vez traducidos a sus correspondientes valores de EC₅₀ (mostrados en la **Tabla 15**) dan lugar a resultados dispares, con casos muy prometedores como es el caso del inhibidor 5 (I5, MMV019313), donde se obtiene un valor incluso mejor que el reportado frente a la cepa 3D7 (88,8 nM vs 669,2 nM), y otros decepcionantes como es el caso del Inhibidor 1 (I1, MMV019871), el cual pasa a valores excesivamente elevados, del rango µM, en comparación con los valores experimentales. Los valores de EC₅₀ para el control de cloroquina fueron 750,7 nM para el experimento del inhibidor 5 y 185,3 nM para el experimento conjunto de los otros 4 inhibidores.

Tabla 15. Valores de EC₅₀ obtenidos frente a la cepa DD2 de *Plasmodium falciparum*

Candidato	Código MMV	EC ₅₀ (nM) (DD2)	Malaria Box EC ₅₀ (nM) (3D7)
I1	MMV019871	1,887 x 10 ⁵	345
I2	MMV020651	1832,0	1945
I3	MMV396723	664,5	1240
I4	MMV006587	669,2	700
I5	MMV019313	88,8	669

Finalmente, una vez analizados los valores de EC₅₀, se escogieron los inhibidores 4 y 5 como candidatos sobre los cuales llevar a cabo un estudio de actividad enzimática frente

*Pf*GluPho y hG6PD. Sin embargo, por problemas experimentales, dicho estudio no se ha podido finalizar, lo cual deja este proyecto aún pendiente de finalizar. Este estudio debería permitir corroborar que los inhibidores tienen la capacidad de actuar de forma selectiva frente a *Pf*GluPho, para así concluir el estudio satisfactoriamente.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Capítulo 5: Discusión

5.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.

5.1.1. Aplicación de la metodología Multinivel en la estimación del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva

Con objeto de identificar y estimar el coste de seleccionar la conformación bioactiva, se ha aplicado la estrategia ML para un conjunto de 52 moléculas tipo fármaco. Dicha estrategia ha permitido obtener un muestreo adecuado del espacio conformacional de los compuestos seleccionados, mostrando en general una correcta convergencia del espacio conformacional realizado a bajo nivel de teoría. Así, las divergencias observadas entre las diferentes simulaciones para cada una de las torsiones son mínimas, tal como pone de manifiesto que las diferencias en la divergencia KL son muy bajas y cercanas a cero.

El muestreo LL, concretamente mediante el campo de fuerzas *gaff*, ha sido capaz de identificar un pozo conformacional que se asemeja a la conformación bioactiva para un 62% de los casos (32 compuestos). No obstante, el refinado a nivel HL conduce a una mejora modesta pero consistente en la identificación de la especie bioactiva, tal como se observa en el hecho de que el RMSD promedio para el conjunto de todos los compuestos equivale a 1,43 Å.

Para 45 compuestos, los niveles LL y HL encontraron el mismo mínimo global. De estos, 41 casos eran muy similares a la conformación bioactiva. En 7 compuestos, el mínimo en solución identificado entre la estrategia ML y el campo de fuerzas *gaff* era diferentes, de los cuales en 3 casos el mínimo detectado con la metodología ML era similar a la conformación bioactiva y en otros 4 casos el mínimo obtenido con el campo de fuerzas *gaff* era el que más se acercaba.

Entrando en un análisis más detallado, el refinado HL ha llevado a diferentes situaciones en lo que refiere a la detección y al peso de la conformación bioactiva, lo cual se ilustra con diferentes ejemplos:

a) Existen casos donde el muestreo MD detecta la conformación bioactiva, pero donde el posterior refinado HL acaban subestimando energéticamente. Un ejemplo es el compuesto **1YDR**, el cual a nivel LL detecta la conformación bioactiva en un porcentaje relativamente bajo, pero cuyo peso es inferior a nivel HL, dando lugar a un coste conformacional entálpico de 4,2 kcal/mol.¹⁴⁶

b) Hay casos donde la conformación más parecida a la bioactiva, según el campo de fuerzas *gaff*, representa un porcentaje bajo, pero aumenta su peso en el refinado HL. Ello es debido principalmente a una convergencia de varios pozos en uno de idéntico y a la subestimación de otros pozos relevantes según la metodología de bajo nivel, pero con poco peso según la descripción de alto nivel. Por ejemplo, para el compuesto **4STD**, el muestreo LL indica que el conformero más cercano a la forma bioactiva representa un 18,0 % y posteriormente, la estrategia HL la considera en un porcentaje de un 96,0%, en una conformación muy cercana a la bioactiva, donde el coste conformacional entálpico es de 0,8 kcal/mol.¹⁸³

c) Finalmente, se han detectado situaciones donde el porcentaje del conformero según la dinámica molecular y la estrategia ML apenas cambia, como es el caso del compuesto **1H1P**, donde el mínimo según el enfoque ML representa un 27,2%, en cambio en el muestreo LL indica que a pesar de no ser la mayoritaria tiene un peso parecido de un 22,7%.¹⁵⁵

A pesar del comportamiento comentado anteriormente, se han detectado situaciones donde la estrategia ML ha presentado dificultades para completar un muestreo exhaustivo del espacio conformacional. Así, en algunos casos la exploración LL no ha sido capaz de detectar ciertas conformaciones debido a la presencia de barreras energéticas elevadas, generalmente en moléculas donde las torsiones activas tienen dificultades estéricas. Un caso representativo es el compuesto **1H9U**, cuya flexibilidad viene dada principalmente por dos torsiones activas: el enlace que une el ciclopropano

con la unidad piridina-3-carboxilato (τ_1), y el que une la parte 1,1,4,4,6-pentametil-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno y el ciclopropano (τ_2).¹⁵⁶

Centrándose en el muestreo de bajo nivel, τ_1 adquiere dos valores principales (75° y 255°) y la τ_2 uno (270°), dando lugar a dos pozos conformacionales, que posteriormente se reescalaron a alto nivel. Sin embargo, al revisar las conformaciones, respecto τ_2 , parecía posible que esta torsión pudiera tener también un valor cercano a 90° , que el método de muestreo no detectaba. Tal como se muestra en la **Figura 47**, la evolución de la torsión colocada manualmente a 90° durante el tiempo de simulación muestra la imposibilidad de volver a la conformación original, lo que demuestra la existencia de esta barrera. Además, al aplicar la estrategia ML a la conformación alternativa, los mínimos conformacionales tenían valores parecidos a los obtenidos para la conformación original (τ_1 : 105° y 300° , τ_2 : 90°), con energías y distribución de poblaciones similares.

Así, pues, si bien en este caso ello no afecta al impacto en el coste entálpico, no se considera correctamente el número de conformaciones relevantes para cada ligando, lo que afectaría directamente al término entrópico del coste conformacional.

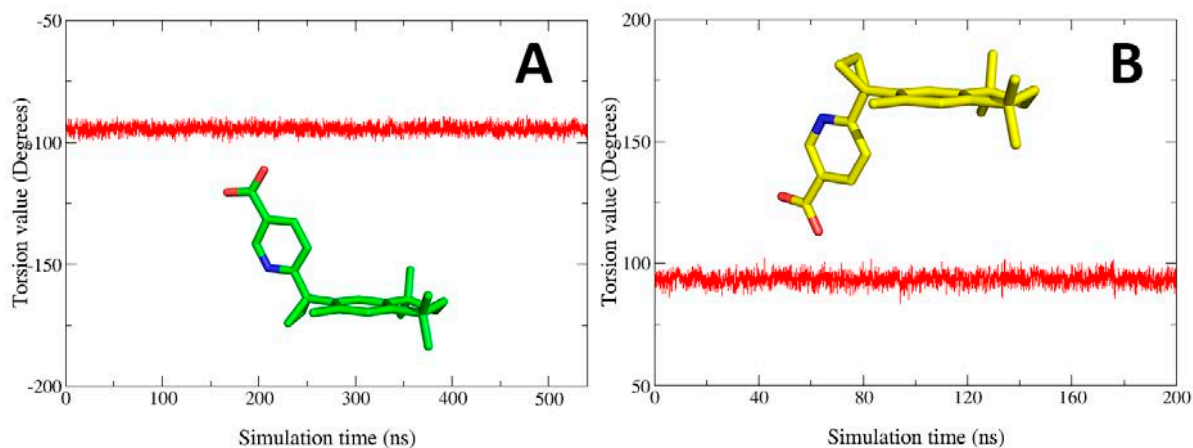


Figura 47. A la izquierda, evolución del tiempo (en ns) (540 ns) del valor de la torsión (en grados) de la τ_2 del compuesto 1H9U en la conformación original detectada por la estrategia Multinivel (átomos de carbono en verde) (A). A la derecha, evolución del tiempo (en ns) (200 ns) del valor de la torsión (en grados) de la τ_2 del compuesto 1H9U en la conformación modificada alternativa no detectada por la estrategia Multinivel (átomos de carbono en amarillo) (B).

En otros casos, se ha observado que el campo de fuerzas *gaff* tiene limitaciones al describir determinados grupos químicos, como los grupos sulfonamida, tal como se ha descrito en estudios previos.²¹

Un ejemplo representativo es el compuesto **1CIM**, cuya flexibilidad conformacional viene dada principalmente por la rotación del grupo sulfonamida unido al doble anillo de (4*S*,6*S*)-6-metil-5,6-dihidro-4*H*-tieno[2,3-*b*]tiopiran-4-amino-7,7-dioxido (τ_1).¹⁴³ Esta torsión tiene una importancia notable, puesto que es el enlace que interviene en la complejación con un átomo de Zn y un grupo Thr. A nivel LL, se han detectado dos mínimos conformacionales; uno que tiene dicha torsión a 90° y otro a 255°, representando cada uno un 53 y un 47% de la población. Estos valores se han modificado hacia 40° y 310°, con un ligero cambio en las poblaciones relativas: un 45% la primera y un 55% la segunda. Las estructuras se pueden ver en la **Figura 48**. Así, *gaff* falla en la adecuada definición de la torsión sulfonamida. Afortunadamente, ello no tiene gran impacto, puesto que el coste conformacional entálpico es de 0,3 kcal/mol.

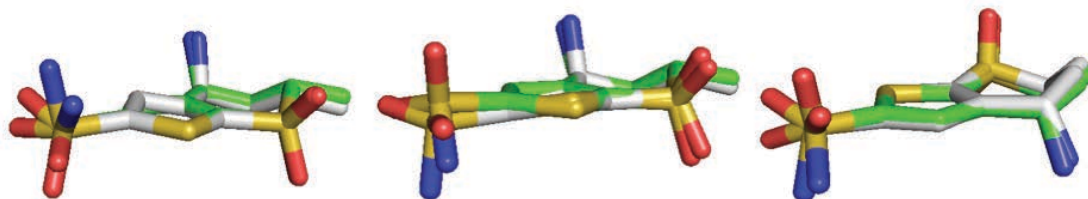


Figura 48. Superposición de las diferentes conformaciones a bajo nivel de teoría (átomos de carbono en color gris) y a alto nivel de teoría (átomos de carbono en color verde). A la izquierda, el primero conformero, al centro el segundo conformero y a la derecha el conformero bioactivo.

Gracias a nuestro enfoque ML, los diedros incorrectamente definidos en el primer paso de dinámica molecular, son posteriormente ajustados en el segundo paso de reescalado a alto nivel, dando otro argumento sobre la importancia de nuestra estrategia.

Otro caso es el compuesto **1QL9**, donde la conformación bioactiva no es detectada en el muestreo LL, probablemente debido a una incorrecta definición de la torsión sulfonamida.¹⁶⁵ Además, la energía de la conformación bioactiva era mucho más estable que la de las posibles conformaciones en solución, dando el coste conformacional entálpico un valor incoherente de -2,0 kcal/mol. Tal y como se muestra en la **Figura 49**, los métodos LL y HL dan lugar a diferentes preferencias conformacionales, donde los valores de la torsión que define la rotación del grupo sulfonamido se mueven principalmente en torno a 70° y 150°, mientras que en la conformación bioactiva dicha

torsión está en 292° . De hecho, la energía de la conformación bioactiva a nivel de Mecánica Molecular (MM) es 8,0 kcal/mol más inestable que la mayoritaria en solución, siendo por lo tanto energéticamente casi inexistente. Por ello, aquí nuestra metodología falla, puesto que no es capaz de detectar dicha conformación en el primer paso. Debido a ello, ha sido el único caso del conjunto de compuestos cuyo coste conformacional no se ha podido estimar.

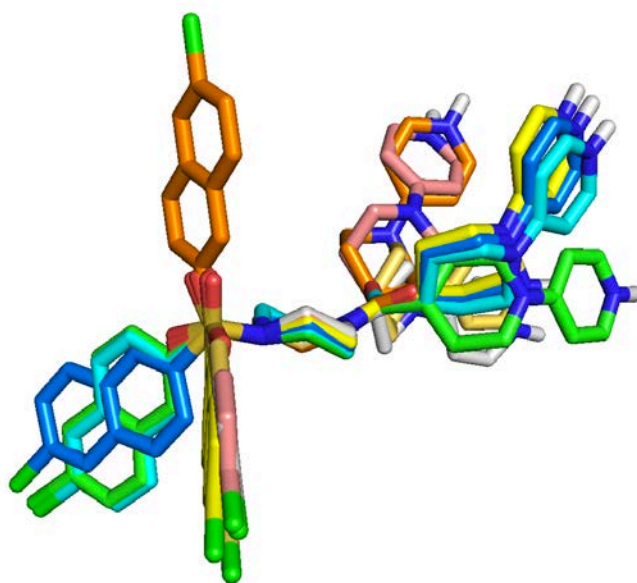


Figura 49. Solapamiento de las preferencias conformacionales según la metodología ML (átomos de carbono en diferentes colores) y la conformación bioactiva del compuesto 1QL9 (átomos de carbono en naranja).

A pesar de estas limitaciones, de los 51 compuestos sobre los que se ha podido estimar el valor exacto, en la mitad de los casos se puede observar un coste conformacional inferior a 2,5 kcal/mol. Por tanto, el coste conformacional entálpico y entrópico para el conjunto de compuestos tipo fármaco suele ser relativamente bajo, probablemente debido a la optimización del diseño molecular durante su desarrollo. Así, únicamente 11 casos de los 52 estudiados muestran un coste conformacional entálpico superior a 2,5 kcal/mol.

Asimismo, prácticamente todo el conjunto de compuestos tendría un coste por pérdida de estados conformacionales poco relevante, quedando únicamente 5 casos con valores ligeramente por encima de 2,5 kcal/mol. Generalmente, el coste conformacional entálpico es mucho más relevante que el entrópico. Así, el coste de reorganización es

más amplio que el del coste por pérdida de estados conformacionales y proporcionalmente tiene más influencia en la suma total del coste conformacional.

Existen casos específicos, sin embargo, donde el coste conformacional es muy elevado. En los siguientes apartados se analiza casos concretos de nuestro conjunto de compuestos.

a) Un caso se encuentra en el complejo formado entre el enzima acetilcolinesterasa (AChE) y donepezil (**1EVE**).¹⁵² Según la estrategia ML, en solución el compuesto alterna entre una conformación mayoritaria (con una abundancia de un 84,2% de la población) y una conformación minoritaria (que representa un 14,5% de la población), tal como se muestra en la **Figura 50**. De ahí, para unirse a AChE, experimenta una reorganización conformacional con un coste energético entálpico asociado de 5,5 kcal/mol.

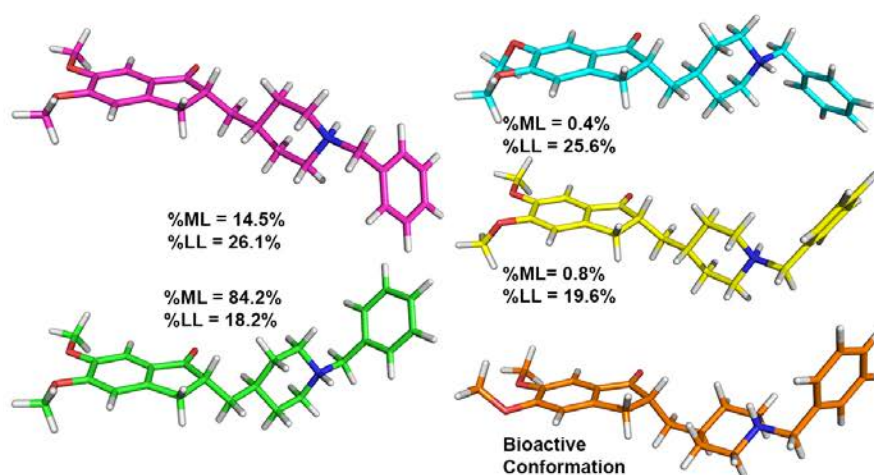


Figura 50. Representación de las diferentes conformaciones del Donepezilo (con sus % de población relativa según la estrategia LL y ML) y la conformación bioactiva (átomos de carbono en naranja). La conformación mayoritaria según la estrategia Multinivel tiene los átomos en verde.

La principal diferencia entre la conformación principal en solución y la conformación bioactiva es la diferente orientación de los grupos piperidina y bencilo. Estas dos partes de la molécula deben adoptar una conformación determinada para poder mantener de forma simultánea la interacción de apilamiento con el Trp84 y la interacción catión- π con la Phe330. Esta disposición, sin embargo, reduce la exposición del grupo amino protonado, con una pérdida importante en la estabilización por solvatación, que no se ve

compensada por la red de aguas formadas en el complejo con el enzima (ver **Figura 51**).

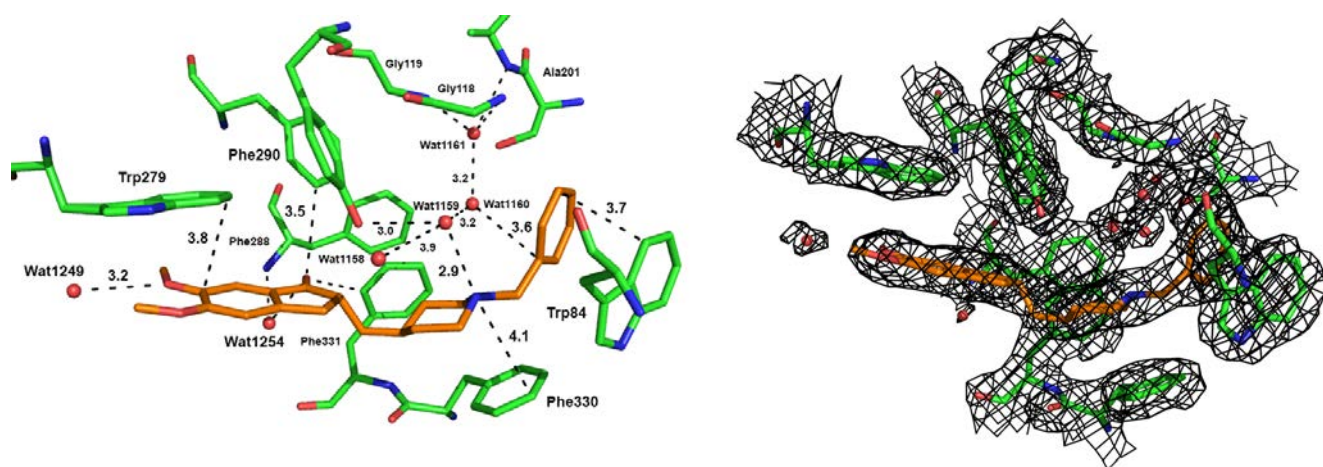


Figura 51. A la izquierda, representación de las interacciones clave (distancias en Å) de la conformación bioactiva del Donepezilo (átomos de carbono en naranja) a lo largo de las diferentes partes de la garganta catalítica en su estructura de rayos X (Código PDB: 1EVE) . A la derecha, representación de la conformación bioactiva del ligando, aguas cristalográficas y residuos clave, según la estructura de Rayos X (1EVE) rodeada por el mapa de densidad electrónica (2mFo-DFc / Nivel de controno=2,0)

Puesto que las estructuras de PDB siempre deben analizarse de forma crítica, se consultó el mapa de densidad electrónica del cristal 1EVE (disponible en el servidor EDS (*Electron Density Server*) de la *Uppsala Universitet*).²⁰⁶ Al observar en dicha estructura, las zonas con mayor densidad electrónica, especialmente en las partes donde se encuentra el ligando y los residuos adyacentes, se puede confirmar que la estructura PDB es correcta, la pose del ligando también y por lo tanto el coste conformacional estimado razonable (ver **Figura 51**).

Esta tendencia también se ha detectado en otras moléculas cargadas como los compuestos 1YDS (4,9 kcal/mol) y 1YDR (4,2 kcal/mol), los cuales tienen un coste conformacional entálpico de 4,9 y 4,2 kcal/mol, respectivamente.¹⁴⁶ Este resultado resalta la necesidad de aumentar la tolerancia a la energía cuando se consideran conformaciones bioactivas donde los átomos cargados quedan enterrados en la cavidad, con un elevado coste de desolvatación.

b) La inhibición de diferentes dianas supramoleculares, como anhidrasas carbonicas, termolisinas o colagenasas, gracias a la mediación de un átomo de Zn es un proceso

relativamente frecuente.^{207,208,209} En concreto, en nuestro caso, 11 de los 52 compuestos analizados se unen de esta forma. En este contexto, se ha detectado cierta coincidencia entre este tipo de compuestos y costes conformacionales más elevados. Como ejemplo, el compuesto **1BQO**, el cual lleva a cabo una interacción con un átomo de Zn, gracias a la participación del grupo N-hidroxiacetamida conjuntamente con las His201, His205 y His211 (**Figura 52**).¹⁸⁴

La conformación principal de acuerdo con la metodología ML se dispone de una manera diferente con respecto al grupo N-hidroxiacetamida (ver **Figura 52**) ya que no es capaz de llevar a cabo la coordinación de la misma forma que lo hace la especie bioactiva, donde ciertas interacciones de los dos anillos de 4-metoxi-bencenosulfonilo no se pueden producir. Este hecho podría explicar el alto coste en término entálpico de 2,8 kcal/mol observado, que posteriormente aumenta a un total de 5.5 kcal/mol, cuando se agrega la parte entrópica.

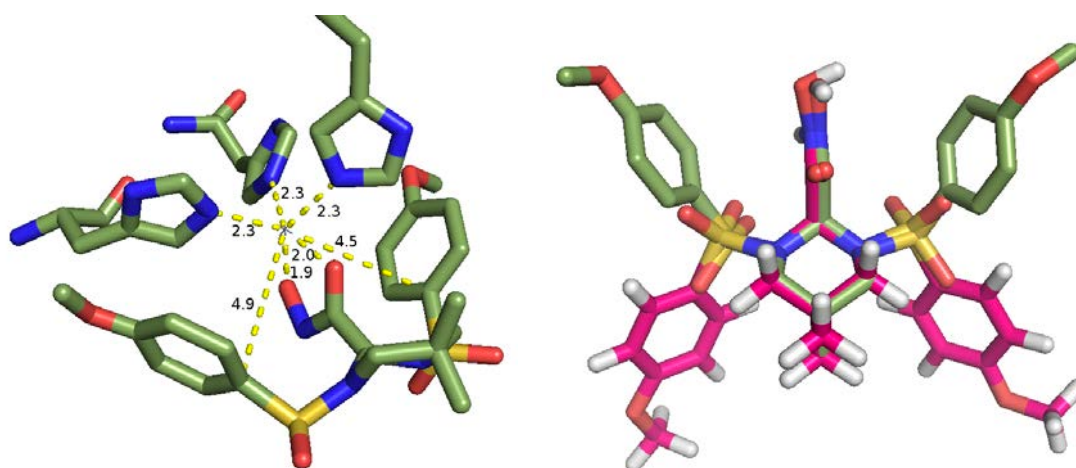


Figura 52. A la izquierda, representación de las interacciones clave (distancias en Å) del compuesto 1BQO según la estructura de rayos X. A la derecha, superposición de la conformación bioactiva (átomos de carbono en verde) y el mínimo conformacional en solución según el enfoque ML (átomos de carbono en rosa).

c) Las interacciones intramoleculares son un fenómeno habitual en la química y la biología, teniendo un elevado impacto sobre las propiedades de ciertas moléculas.²¹⁰ En nuestro conjunto de moléculas está el caso del compuesto **2QWI**, el cual tiene una elevada penalización entálpica de 5,9 kcal/mol.¹⁸¹

El ligando presente en el cristal es el ácido 4-acetil-4-guanidino-6-metil(propil)carboxamida-4,5-dihidro-2H-piran-2-carboxílico, el cual es un inhibidor de

neuraminidasa, formado por un anillo central de dihidropirano con diferentes sustituyentes: carboxi, guanidina, acetamida y metil-propil-carboxamida. Además, dicho ligando presenta la particularidad de tener una forma zwitteriónica. Con nuestra metodología, detectamos que la conformación principal en solución (que representa un 88,6% de la población) presenta un par de interacciones intramoleculares gracias a la participación del grupo guanidino. Por contra, ésta varía mucho de la conformación bioactiva, que presenta una disposición plana que permite llevar a cabo diferentes interacciones en el sitio activo, como interacciones de tipo hidrofóbico o enlaces puente de hidrógeno con residuos Arg, Trp y Asp. Según la solvatación, la conformación bioactiva expone ambas cargas al solvente; en cambio en la conformación principal en solución la exposición se reduce y, por lo tanto, la energía de solvatación es considerablemente peor. Esta situación podría explicar la enorme diferencia en la energía interna de la molécula entre ambas estructuras, las cuales se pueden ver en la **Figura 53**.

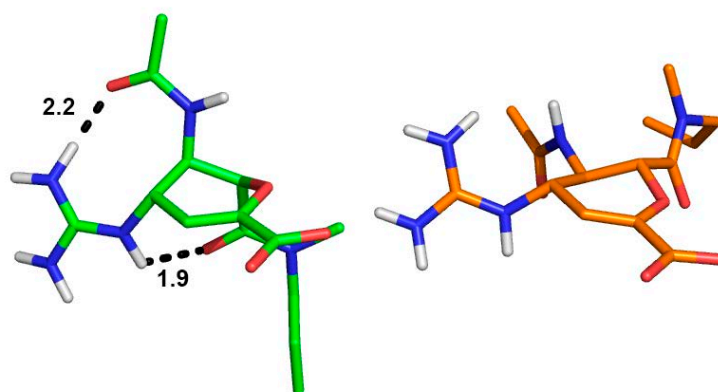


Figura 53. A la izquierda, representación del ligando 2QWI en su conformación mayoritaria en solución según la metodología Multinivel (átomos de carbono en verde), especificando las interacciones intramoleculares relevantes (distancias en Å). A la derecha, conformación bioactiva según la estructura cristalográfica (átomos de carbono en naranja) (Código PDB: 2QWI).

d) Finalmente, se han observado únicamente 5 casos donde el coste conformacional entrópico sobrepase el valor de 2,5 kcal/mol, concretamente los compuestos presentes en 1QHI, 13GS, 1DLR, 1G4O y 1BQO.^{164,171,173,177,184} Un patrón común observado en estos compuestos es la gran variedad de pozos conformacionales energéticamente cercanos, entre 6 y 12 mínimos conformacionales, que causan un aumento en la penalización debido a su término entrópico.

Para estos casos, excepto por el compuesto 1BQO, que ya tiene una alta penalización entálpica, en general considerar también la parte entrópica provoca un aumento

significativo en la penalización conformacional, provocando un incremento del valor promedio de 1.0-1.5 kcal / mol (si solo se considera el término entálpico) a 4.0-4.5 kcal/mol (si se consideran ambos). Esto coincide con la idea general de que ambos términos deben contemplarse para tener una visión más completa del coste conformacional para acceder a la conformación bioactiva.¹⁵

En la **Figura 54** se pueden observar dos ejemplos con su distribución de familias y sus energías para un par de compuestos. El primero, corresponde al compuesto **1DLR** donde el coste entrópico es de los más elevados del conjunto estudiado. El segundo, el compuesto **1HIP**, un caso donde el término entrópico no es tan elevado, pero se pone de manifiesto dado que el ligando no tiene un coste entálpico pero su coste entrópico representa 2,5 kcal/mol.

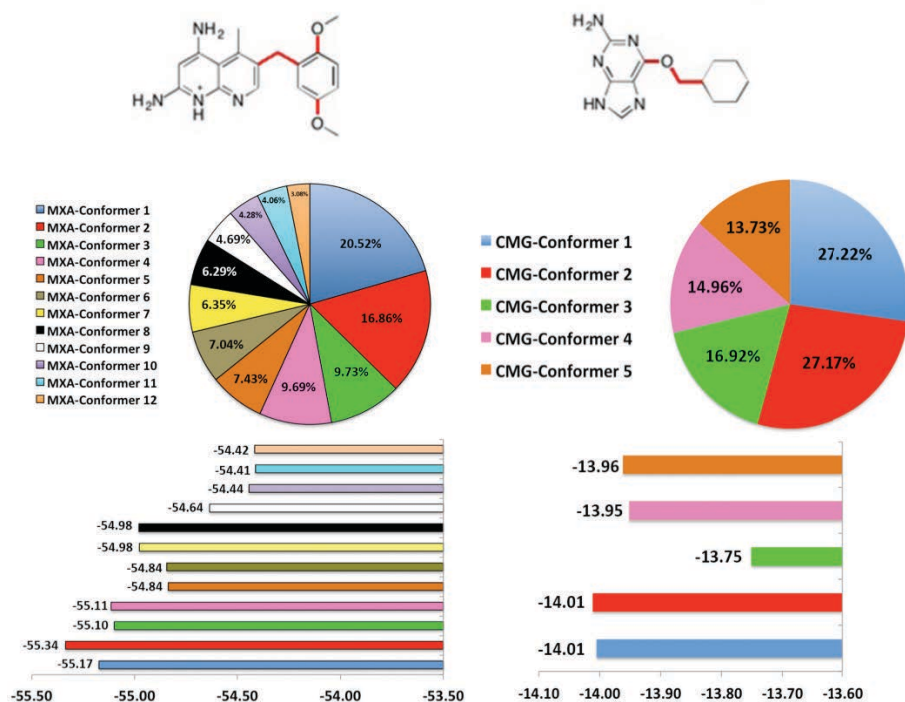


Figura 54. A la izquierda, representación en 2D del compuesto 1DLR con las torsiones analizadas en rojo (parte superior) y distribución de conformeros con la energía para cada uno de ellos (parte inferior). A la derecha, representación en 2D del compuesto 1HIP con las torsiones analizadas en rojo (parte superior) y distribución de conformeros con la energía para cada uno de ellos (parte inferior).

5.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores duales de acetilcolinesterasa huprina-reína.

El diseño de fármacos multidiana es una estrategia ampliamente explorada para el tratamiento de enfermedades multifactoriales, como la enfermedad de Alzheimer. En base a la colaboración con el grupo de investigación del Prof. Dr. Diego Muñoz Torrero, nuestro objetivo ha sido explorar la influencia del pK_a de una serie de análogos de Huprina Y introducidos en un compuesto híbrido huprina Y-reína, concebidos en el desarrollo de una segunda generación de compuestos para mejorar su perfil multidiana y su biodisponibilidad en los nuevos híbridos. Concretamente, nuestro trabajo persiguió la estimación computacional del valor de pK_a de los distintos inhibidores sintetizados, para así deducir su posible estado de ionización frente AChE y BACE-1 y el modelaje del ligando unido a la cavidad de la proteína.

Cabe hacer notar que las predicciones realizadas inicialmente con *MarvinSketch*® no fueron consistentes en todos los casos, pues de hecho los valores de pK_a para los derivados **1a** y **4a** presentaban un comportamiento discordante con respecto al resto de compuestos, hecho que además no encajaba con su perfil de actividad. Por ello, si bien estos programas son muy útiles para estimar el pK_a , es necesario tener una visión crítica y cautelosa, al menos en cuanto a su valor de predicción cuantitativa. Por ello, se decidió aplicar un protocolo sofisticado de mecánica cuántica para determinar el valor de pK_a de dichos compuestos, apoyado por la similitud entre valores experimentales y predichos para una serie de compuestos heterocíclicos similares, como quinolina, 1,8-naftipiridina y tacrina, que se usaron como valores de referencia.

Los resultados obtenidos, a diferencia del predictor *MarvinSketch*®, dan un perfil de pK_a coherente para los derivados huprínicos **1a** y **4a**, los cuales dan un valor de 10,1 (**1a**) y 9,2 (**4a**) respectivamente en un rango de valores muy similar a los dos derivados 4-amino comentados anteriormente. Ello, por tanto, sugiere que ambos compuestos se hallan en su forma protonada, que es la especie bioactiva requerida para poder unirse tanto a AChE como a BACE-1. Sin embargo, este resultado pone en cuestión el origen de la menor actividad inhibidora con respecto al compuestos huprina-reína original, lo

cual nos llevó a investigar el efecto de posibles interacciones secundarias en el centro de unión de las dianas biológicas.

En el caso de AChE, la protonación del nitrógeno endocíclico de la huprina es muy importante, ya que forma un puente de hidrógeno entre el nitrógeno protonado y el grupo carbonilo de la His447. Además, la carga positiva se encuentra estabilizada por la formación de interacciones catión- π con la densidad electrónica del anillo de indol del Trp86 y el anillo de benzeno de la Tyr337. En este contexto, los derivados **4b** (pK_a calculado = 7,0) y **4c** (pK_a calculado = 6,7), deberían estar mayoritariamente en forma neutra, yendo en detrimento de su actividad.

Sin embargo, los derivados **4a** y **4d** deberían estar protonados, al igual que Huprina Y. Con respecto al derivado **4d**, la presencia de un grupo OMe daría lugar a choques estéricos con el anillo de indol del Trp439, lo cual explicaría su menor potencia frente a AChE. En el caso del derivado **4a**, puede tener un doble origen. Por un lado, la ausencia del grupo cloro en posición 3, pues en el caso de la Huprina X e Y dicho átomo llena un bolsillo hidrofóbico formado por Trp439, Met443 y Pro446. Por otra parte, la presencia de interacciones secundarias desfavorables debidas al par libre del oxígeno carbonílico de la His447, reflejando repulsiones electrostáticas entre los pares libres del nitrógeno adicional y el carbonilo de la His447.

En cuanto a la interacción con BACE-1, cabe esperar que la unión involucre la interacción del puente salino formado entre el nitrógeno protonado y la pareja de residuos Asp32 y Asp228. Por tanto, todos los compuestos deben estar protonados al pH del compartimentos endosomal ácido (pH=4,5-6,5) donde se encuentra localizada BACE-1. La reducción de actividad frente BACE-1 cabe atribuirlo a interacciones específicas desfavorables dentro de la cavidad de unión, como serían de nuevo las repulsiones electrostáticas entre los residuos Asp32-Asp228 con los pares electrónicos no compartidos del derivado tiofeno **4c** y del derivado piridínico **4a**.

5.1.3. Estudio de las preferencias conformacionales y de ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores de AchE basados en azocina.

Además del ejemplo anterior, un segundo caso donde ha sido necesario plantear la relación entre estructura química, pK_a y actividad biológica corresponde al conjunto de tetrahidroazocinas sintetizadas por el Prof. Altomare en la Universidad de Bari. Así, el estado de ionización de estos compuestos, a pesar de tener patrones estructurales muy similares, tienen marcadas tendencias en sus valores de pK_a , los cuales se pueden agrupar con valores cercanos a 6 y a 9.

Al igual que en el caso anterior, la estimación del pK_a mediante *MarvinSketch*®, resultó en una gran diferencia de valor, de entre 8 a 11 unidades de pK_a , con respecto al valor experimental. Por ello, se planteó la posibilidad de que existiera una tautomería prototrópica dando lugar a un tautómero alternativo al contemplado en los estudios originales.

Los resultados muestran claramente que en la especie protonada hay una marcada preferencia hacia la especie tautomérica alternativa (1B), que es más estable que la especie original (1A) por más de 10 kcal/mol en el caso del compuesto **5**, y más de 15 en el compuesto **6**. Por el contrario, en lo referente a la forma desprotonada, la forma tautomérica 2A es más estable que 2B en el caso del compuesto **5**, si bien esta tendencia se invierte en el caso del compuesto **6**. Además, las diferencias energéticas son menores, siendo 2A mayoritaria con respecto a 2B por 2,6 kcal/mol para el compuesto **5**, mientras que 2B está favorecida por 1,9 kcal/mol en el compuesto **6**.

Teniendo en cuenta estas estabilidades relativas, la predicción de pK_a realizada para ambos compuestos concuerda razonablemente con los valores experimentales. Así, para el compuesto **5**, la desprotonación de 1B tiene lugar según un pK_a de 8,7, que concuerda muy bien con el dato experimental de 8,8, en tanto que para el compuesto **6** el valor calculado es de 6,4, que compara con el dato experimental de 6,1. Así, pues, el proceso principal que guía el valor de pK_a es el proceso de desprotonación que se da lugar entre las dos formas tautoméricas alternativas 1B y 2B. Cabe hacer notar que en el caso del compuesto **5**, termodinámicamente la forma desprotonada debería convertirse hacia la

2A, que es más estable, pero nuestra hipótesis es que cinéticamente la conversión de 2B hacia 2A debería ser un proceso lento que provocaría que el pK_a vendría regido por 1B-2B.

Finalmente, los resultados parecen apuntar que la presencia de grupos en posiciones específicas dan lugar a un mayor o menor estabilización de un tautómero u otro. Así, la presencia de un éster en posición beta cambia de forma drástica los equilibrios entre ambos tautómeros, por lo tanto puede explicar la mayor o menor estabilidad de cada una de las parejas de tautómeros y en consecuencia puede ser una explicación a las diversas tendencias de valores de pK_a observadas para los diferentes derivados.

5.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato para el tratamiento de Malaria

Esta parte de la tesis aborda la aplicación de técnicas de diseño basada en estructura a la identificación de inhibidores de *PfG6PD*, aprovechando el modelo de homología elaborado previamente, que puso en evidencia la existencia de un cambio muy relevante, Arg750Asp, entre el enzima humano y el de *Plasmodium*. De hecho, el diseño de una serie de derivados análogos del sustrato que debían interactuar preferentemente con el enzima del parásito confirmaban dicha hipótesis, dando lugar a una inhibición de *PfG6PD* con mayor selectividad en comparación a hG6PD, con valores de K_i en el rango μM y un perfil de citotoxicidad hepática muy positivo.

En base a ello, se pudo plantear un proyecto para poder tratar de encontrar nuevas estructuras capaces de interactuar e inhibir la forma parasitaria de G6PD en base a i) una búsqueda bibliográfica de compuestos con actividad conocida frente al enzima, y ii) un cribado de librerías de compuestos.

La primera estrategia condujo a los compuestos ML-276 y ML-304, que son selectivos frente a *PfG6PD* reportando unos valores de IC_{50} de 889 nM (ML-276) y de 190 nM (ML-304), en tanto que presentan una inhibición μM contra la forma humana del enzima. Además, los diferentes estudios reportan una inhibición competitiva frente al sustrato original G6P y un de tipo mixta frente al cofactor NADP^+ . Las poses obtenidas tras los cálculos de acoplamiento realizados con *Glide*® y posterior refinado mediante dinámica molecular ponen de manifiesto la actuación como inhibidores competitivos con respecto a G6P. Así, ambos compuestos establecen una interacción electrostática con el residuo Asp750, formando interacciones de puente de hidrogeno estables entre la amina protonada y el hidrogeno del grupo amida del inhibidor. El resto de interacciones más profundas de la cavidad se mantienen de forma continua, lo cual permite un correcto acomodado del ligando a la cavidad. En particular, en el caso del compuesto ML-276, el anillo de fluorobenceno se unió firmemente a un hueco hidrofóbico conformado por Val585 y Leu778.

Dicho modo de unión proporciona una base para racionalizar las relaciones estructura-actividad de compuestos relacionados con ML-276.²⁰³ En primer lugar, la protonación del compuesto es básica, puesto que ello explica la estabilización electrostática con el Asp750 en *PfG6PD*. La presencia de un grupo azufre en el anillo de tiazina de ML-276 o ML-304 debe permitir un mejor acomodo del ligando en la cavidad. La torcedura observada se ha detectado en compuestos de estructura similar como algunos antidepresivos tricíclicos.²¹¹ Respecto a ML-276, la presencia del doble enlace del grupo estirilo es clave para reducir la flexibilidad conformacional del compuesto, lo cual permite una correcta colocación del anillo de fluorobenceno en la cavidad hidrofóbica. El nitrógeno del anillo tiazínico no debe estar metilado, pues especialmente en el compuesto ML-304 parece llevar a cabo interacciones con Lys y Glu que estabilizarían la cavidad. Finalmente, la presencia de un sustituyente hidrofóbico en el anillo aromático fijado por el grupo estirilo facilita el correcto anclaje en la cavidad, justificando el incremento de actividad en ML-276 bajo presencia del átomo de flúor, y presumiblemente de un grupo metilo en ML-304.

Usando dicho modo de unión como referencia, los estudios realizados sobre la librería de *Malaria Box* con *Pharmscreen*®, permitió extraer un subconjunto de 5 compuestos para un análisis más detallado (MMV019871, MMV020651, MMV396723, MMV006587 y MMV019313, denominados del 1 al 5, respectivamente). Dichos compuestos se ajustaron bien dentro de la cavidad de *PfG6PD*, especialmente en los compuestos 1, 4 y 5, manteniendo la interacción con el residuo clave de Asp750. Por ello, se procedió a su validación farmacológica frente a una cepa DD2 de *P. falciparum* resistente a cloroquina.

Los porcentajes de parasitemia apuntan al inhibidor 5 como un candidato potente y prometedor, que mantiene su porcentaje de parasitemia a una concentración de 0,2 μM a 0,67%, cuando el valor para el control sin fármaco fue de 5,78%, lo que se traduce en una supervivencia media relativamente baja de aproximadamente un 11% para dicho compuesto. De hecho, el valor de EC_{50} es 88,8 nM, que mejora el valor de 669,2 nM reportado a la cepa 3D7. Los resultados para los inhibidores 3 y 4 permiten intuir una actividad moderada, con EC_{50} de 0,6-0,7 μM , que aumenta a 1,8 μM para el compuesto 2, siendo aún peor el resultado obtenido para el compuesto 1.

Actualmente se están llevando a cabo los estudios de inhibición in vitro sobre *PfGluPho* y hG6PD, con el fin de comprobar su actividad y selectividad frente a dicha diana. Este estudio debería permitir corroborar que los inhibidores tienen la capacidad de actuar de forma selectiva frente a *PfGluPho*, para así concluir el estudio satisfactoriamente.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Capítulo 6: Conclusiones.

6.1. Exploración de la especie bioactiva de pequeñas moléculas.

6.1.1. Metodología Multinivel en la estimación del coste conformacional de la conformación bioactiva.

Los resultados obtenidos permiten concluir que los compuestos tipo fármaco examinados de forma general tienden a dar costes conformacionales bajos, en muchos casos inferior a 2,0 kcal/mol, seguramente como resultado del propio proceso de optimización del diseño molecular. Solamente en algunos casos dichos costes son elevados, y pueden explicarse por la propia estructura del ligando y/o su interacción con el receptor. Así, el penalti entálpico refleja que existe un estrés conformacional inducido que es necesario para ajustarse a la cavidad de unión y formar interacciones adecuadas con los residuos del receptor.

Adicionalmente, el coste entrópico puede llegar a ser significativo, incrementando de forma considerable la penalización si se considera conjuntamente con la reorganización interna del ligando. No obstante, el penalti entálpico tiende a ser más relevante que el penalti entrópico.

La metodología ML parece ser una técnica fiable para primeramente muestrear el espacio conformacional de un ligando en solución y posteriormente rescalar los mínimos obtenidos, determinar su energía libre y aproximar el penalti conformacional. No obstante, es conveniente introducir mejoras en el muestreo LL, asegurando principalmente la correcta convergencia de dicho muestreo.

6.1.2. Estudio de la ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a a inhibidores duales de acetilcolinesterasa huprina-reína.

El trabajo de colaboración con el grupo del Dr. Diego Muñoz Torrero ha desembocado en el desarrollo de dos nuevos compuestos (derivados naftipiridina **4a** y tiazol **4c**) con un perfil multidiana muy similar a la molécula lead original **3**, así como de una gran

actividad antioxidante. Dichos compuestos presentan una menor, pero notable actividad inhibitoria frente AChE y BACE-1 respecto al lead **3**, resultando en un mejor perfil multidiaria.

Los estudios computacionales de pK_a han demostrado que el método tiene valor predictivo, apuntando la tendencia que seguirán los compuestos en cuanto a su ionización, ya que se ha observado una buena correlación entre el estado de ionización, la energía de interacción y los valores farmacológicos obtenidos.

Este perfil biológico, abre el camino a llevar a cabo más estudios (farmacocinética, toxicidad, etc.) para evaluar el potencial de estos compuestos como candidatos anti-Alzheimer, si bien estudios futuros se centrarán en posibles modificaciones del fragmento reína.

6.1.3. Estudio de las preferencias conformacionales y de ionización de biomoléculas. Estimación del pK_a de inhibidores de AChE basados en azocina.

En base a los resultados presentados, los valores experimentales indican que el valor de pK_a determinado experimentalmente es el proceso de desprotonación entre las dos formas tautoméricas alternativas 1B y 2B. Así, el valor calculado se ajusta casi a la perfección a los datos experimentales, con un diferencia inferior a 0.3 unidades de pK_a . Parece claro que la forma protonada sufre una conversión hacia al tautómero 1B, que posteriormente sufre la desprotonación hacia 2B.

La combinación de la estrategia ML, para reducir el error debido a la variedad conformacional, conjuntamente con metodologías QM de un coste computacional relativamente bajo ha demostrado la capacidad de estimar de forma casi exacta el valor de pK_a y poniendo de manifiesto de forma clara la relevancia de las tautomerías desde un punto de vista fisicoquímico.

Los resultados sugieren que la presencia de determinadas especies tautoméricas puede llegar a tener una importancia clave para entender el valor de propiedades

fisicoquímicas, como el pK_a , y por tanto afectar a la comprensión de los determinantes moleculares implicados en la actividad biológica de compuestos bioactivos

6.2. Estudio y diseño de nuevos inhibidores de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Plasmodium falciparum* para el tratamiento de Malaria

El hipotético modo de unión descrito en el apartado de resultados proporciona una base estructural para racionalizar las diferencias de actividad entre compuestos, y abre la puerta al diseño de nuevos compuestos más potentes y selectivos.

En lo que refiere a la búsqueda de estructuras y posterior validación farmacológica, los resultados apuntar hacia un candidato prometedor, el inhibidor 5, el cual parece tener un valor de EC_{50} frente cepa DD2, incluso mejor que el dato experimental disponible frente a cepa 3D7. También merecen atención los inhibidores 3 y 4, los cuales se encuentran en un rango de valores aceptable. Los valores obtenidos para los inhibidores 2 y especialmente 1 los hacen poco prometedores para seguir trabajando sobre ellos. El desconcertante caso de inhibidor 1 da a pensar en que probablemente algún problema de estabilidad, del conservación o incorrecto suministro por parte del proveedor, son la razón del gran desvío en su valor de EC_{50} .

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- ¹ Gohlke, H.; Klebe, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2644–2676
- ² Gao, J.; Ma, S.; Major, D. T.; Nam, K.; Pu, J.; Truhlar, D. G. Mechanisms and Free Energies of Enzymatic Reactions. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3188–3209
- ³ Fisher, E. Einfluss Der Configuration Auf Die Wirkung Der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- ⁴ Carlson, H. A.; McCammon, J. A. Accommodating Protein Flexibility in Computational Drug Design. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 57, 213–218.
- ⁵ Cozzini, P.; Kellogg, G. E.; Spyralis, F.; Abraham, D. J.; Costantino, G.; Emerson, A.; Fanelli, F.; Gohlke, H.; Kuhn, L. A.; Morris, G. M.; Orozco, M.; Pertinhez, T. A.; Rizzi, M.; Sotriffer, C. A. Target Flexibility: An Emerging Consideration in Drug Discovery and Design. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6237–6255.
- ⁶ Spyralis, F.; Bidon-Chanal, A.; Barril, X.; Luque, F. J. Protein Flexibility and Ligand Recognition: Challenges for Molecular Modeling. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 192–210.
- ⁷ Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, 44, 98–104.
- ⁸ Straub, F. B.; Szabolcsi, G. O dinamicsezskij aszpektah szstrukturü fermentov. (On the dynamic aspects of protein structure) In: *Molecular Biology, Problems and Perspectives*, (Ed: Braunstein, A. E., Russian), Izdat. Nauka, Moscow, pp. **1964**. 182–187.
- ⁹ Vogt, A. D.; Di Cera, E. Conformational Selection Is a Dominant Mechanism of Ligand Binding. *Biochemistry.* **2013**, 52, 5723–5729.
- ¹⁰ Gibbs, A. C. Elements and Modulation of Functional Dynamics. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 7819–7837.
- ¹¹ Boehr, D. D.; Nussinov, R.; Wright, P. E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 789–796.
- ¹² Nussinov, R.; Ma, B.; Tsai, C. J. Multiple conformational selection and induced fit events take place in allosteric propagation. *Biophys. Chem.* **2014**, 186, 22–30.
- ¹³ Yang, C.-Y.; Sun, H.; Chen, J.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S. Importance of Ligand Reorganization Free Energy in Protein-Ligand Binding-Affinity Prediction. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13709–13721.

- ¹⁴ Perola, E.; Charifson, P.S. Conformational Analysis of Drug-Like Molecules Bound to Proteins: An Extensive Study of Ligand Reorganization upon Binding. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2499–2510.
- ¹⁵ Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Contribution of Conformer Focusing to the Uncertainty in Predicting Free Energies for Protein-Ligand Binding. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5880–5884.
- ¹⁶ Butler, K.T.; Luque, F. J.; Barril, X. Toward Accurate Relative Energy Predictions of the Bioactive Conformation of Drugs. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 601–610.
- Artículo I. ¹⁷ Gao, C.; Park, M. S.; Stern, H. A. Accounting for Ligand Conformational Restriction in Calculations of Protein-Ligand Binding Affinities. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 901–910.
- Sección 1.01 ¹⁸ Pohelsgaard, J.; Harpsøe, K.; Jørgensen, F. S.; Olsen, L. A Robust Force Field Based Method for Calculating Conformational Energies of Charged Drug-Like Molecules. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 409–419.
- ¹⁹ Avgy-David, H. H.; Senderowitz, H. Toward Focusing Conformational Ensembles on Bioactive Conformations: A Molecular Mechanics/Quantum Mechanics Study. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2154–2167.
- ²⁰ Rosa, M.; Micciarelli, M.; Laio, A.; Baroni, S. Sampling Molecular Conformers in Solution with Quantum Mechanical Accuracy at a Nearly Molecular-Mechanics Cost. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 4385–4389.
- ²¹ Kanal, I. Y.; Keith, J. A.; Hutchison, G. R. A Sobering assessment of small-molecule force field methods for low energy conformer predictions. *Int. J. Quantum Chem.* **2018**, *118*, e25512.
- ²² Forti, F.; Cavasotto, C.; Orozco, M.; Barril, X.; Luque, F. J. A Multilevel Strategy for the Exploration of the Conformational Flexibility of Small Molecules. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 1808–1819.
- ²³ Juárez-Jiménez, J.; Barril, X.; Orozco, M.; Pouplana, R.; Luque, F.J. Assessing the Suitability of the Multilevel Strategy for the Conformational Analysis of Small Ligands. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, *119*, 1164–1172.
- ²⁴ Head, M.; Given, J.; Gilson, M. “Mining Minima”: Direct Computation of Conformational Free Energy. *J. Phys. Chem.* **1997**, *5639*, 1609–1618.
- ²⁵ Chen, W.; Chang, C. -E.; Gilson, M. K. Calculation of Cyclodextrin Binding Affinities: Energy, Entropy and Implications for Drug Design. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3035–3049.
- ²⁶ Metropolis, N. The Beginning of the Monte Carlo Method. *Los Alamos Sci.* **1987**, *15*, 125–130.

- ²⁷ Metropolis, N.; Ulam, S. The Monte Carlo Method. *J. Am. Stat. Assoc.* **1949**, *44*, 335–341.
- ²⁸ Rocha, G. B.; Freire, R. O.; Simas, A. M.; Stewart, J. J. P. RM1: A Reparametrization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br and I. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1101–1111.
- ²⁹ Forti, F.; Barril, X.; Luque, F. J.; Orozco, M. Extension of the MST Continuum Solvation Model to the RM1 Semiempirical Hamiltonian. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 578–587.
- ³⁰ Henderson, L. J. Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality. *J. Am. J. Physiol.* **1908**, *21*, 173–179.
- ³¹ Henderson, L. J. The theory of neutrality regulation in the animal organism. *J. Am. J. Physiol.* **1908**, *21*, 427–448.
- ³² Sørensen, S. P. L. On the measurement and significance of hydrogen ion concentration in enzymatic processes. *Biochem. Z.* **1909**, *21*, 131–200.
- ³³ Hasselbalch, K. A. Die Berechnung der Wasserstoffzahl des blutes auf der freien und gebundenen Kohlensäure desselben, und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl. *Biochem. Z.* **1916**, *78*, 112–144.
- ³⁴ Po, H. N.; Senozan, N. M. The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations. *J. Chem. Educ.* **2001**, *78*, 1499–1503.
- ³⁵ Darvey, I. G. The Assignment of pK_a Values to Functional Groups in Amino Acids. *Biochem. Educ.* **1995**, *23*, 80–82.
- ³⁶ Bodner, G. M. Assigning the pK_a's of Polyprotic Acids. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 246–247.
- ³⁷ Murray, R. Microscopic Equilibria. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 462a – 462a.
- ³⁸ Reijenga, J.; van Hoof, A.; van Loon, A.; Teunissen, B. Development of Methods for the Determination of pK_a Values. *Anal. Chem. Insights.* **2013**, *8*, 53–71.
- ³⁹ Ho, J.; Coote, M. L. A universal approach for continuum solvent pK_a calculations: are we there yet?. *Theor. Chem. Acc.* **2009**, *125*, 3–21.
- ⁴⁰ Alongi, K. S.; Shields, G. C. Theoretical Calculations of Acid Dissociation Constants: A Review Article. *Annu. Rep. Comput. Chem.* **2010**, *6*, 113–138.
- ⁴¹ Liptak, M. D.; Shields, G. C. Accurate pK_a Calculations for Carboxylic Acids Using Complete Basis Set and Gaussian-n Models Combined with CPCM Continuum Solvation Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7314–7319.
- ⁴² Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. Absolute pK_a Determinations for Substituted Phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421–6427.

- ⁴³ Liptak, M. D.; Shields, G. C. Experimentation with different thermodynamic cycles used for pK_a calculations on carboxylic acids using complete basis set and Gaussian n models combined with CPCM continuum solvation methods. *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, 85, 727–741.
- ⁴⁴ Brown, T. N.; Mora-Diez, N. Computational determination of aqueous pK_a values of protonated benzimidazoles (part 1). *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 9270–79.
- ⁴⁵ Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Adding explicit solvent molecules to continuum solvent calculations for the calculation of aqueous acid dissociation constants. *J. Phys. Chem. A.* **2006**, 110, 2493–2499.
- ⁴⁶ Pliego, J. R. Thermodynamic cycles and the calculation of pK_a. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, 367, 145–149.
- ⁴⁷ Bryanstev, V. S.; Diallo, M. S.; Goddard, W. A. Calculation of solvation free energies of charged solutes using mixed cluster/continuum models. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 9709–9719.
- ⁴⁸ Tissandier, M. D.; Cowen, K. A.; Feng, W. Y.; Gundlach, E.; Cohen, M. H.; Earhart, A. D.; Coe, J. V.; Tuttle, T. R. The proton's absolute aqueous enthalpy and Gibbs free energy of solvation from cluster ion solvation data. *J. Phys. Chem. A.* **1998**, 102, 7787–7794.
- ⁴⁹ Camaioni, D. M.; Schwerdtfeger, C. A. Comment on “accurate experimental values for the free energies of hydration of H⁺, OH⁻ and H₃O⁺”. *J. Phys. Chem. A.* **2005**, 109, 10795–10797.
- ⁵⁰ Kelly, C. P.; Cramer, C. J. Truhlar, D. G. Aqueous solvation free energies of ions and ion water clusters based on an accurate value for the absolute aqueous solvation free energy of the proton. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 16066–16081.
- ⁵¹ Takano, Y.; Houk, K. N. Benchmarking the conductor like polarizable continuum model (CPCM) for aqueous solvation free energies of neutral and ionic organic molecules. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, 1, 70–77.
- ⁵² Pliego, J. R.; Riveros, J. M. Gibbs free energy of solvation of organic ions in aqueous and dimethyl sulfoxide solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, 4, 1622–1627.
- ⁵³ McQuarrie, D. M. *Statistical Mechanics*, Harper and Row, New York, **1970**, p. 86.
- ⁵⁴ Toth, A. M.; Liptak, M. D.; Phillips, D. L.; Shields, G. C. Accurate relative pK_a calculations for carboxylic acids using complete basis set and Gaussian n-models combined with continuum solvation models. *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 4595–4606.
- ⁵⁵ Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, **2004**, p. 579.

- ⁵⁶ Palascak, M. W.; Shields, G. C. Accurate experimental values for the free energies of hydration of H^+ , OH^- and H_3O^+ . *J. Phys. Chem. A*. **2004**, 108, 3692–3694.
- ⁵⁷ Kelly, C. P.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. SM6: A density functional theory continuum solvation model for calculating aqueous solvation free energies of neutrals, ions, and solute water clusters. *J. Chem. Theory. Comput.* **2005**, 1, 1133–1152.
- ⁵⁸ Warrell, D. A.; Firth, J. D.; Cox, T.M. Malaria. 5th Edition. In *Oxford Text Book of Medicine*; **2010**, 7.8.2. Malaria.
- ⁵⁹ World Health Organization (WHO): <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- ⁶⁰ Medicines for Malaria Venture (MMV). <https://www.mmv.org/malaria-medicines/five-species>.
- ⁶¹ World Health Organization (WHO). World malaria report 2016. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
- ⁶² Medicines for Malaria Venture (MMV). <https://www.mmv.org/malaria-medicines/malaria-treatment>.
- ⁶³ Medicines for Malaria Venture (MMV). <https://www.mmv.org/malaria-medicines/history-antimalarials>.
- ⁶⁴ Qinghaosu Antimalarial Coordinating Research Group. Antimalaria studies on Qinghaosu. *Chin. Med. J.* **1979**, 92, 811–816.
- ⁶⁵ ter Kuile, F.; White, N. J.; Holloway, P.; Pasvol, G.; Krishna, S. Plasmodium falciparum: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp. Parasitol.* **1993**, 76, 85–95.
- ⁶⁶ Chen, P. Q.; Li, G. Q.; Guo, X. B.; He, K. R.; Fu, Y. X.; Fu, L. C.; Song, Y. Z. The infectivity of gametocytes of Plasmodium falciparum from patients treated with artemisinin. *Chin. Med. J.* **1994**, 107, 709–711.
- ⁶⁷ Haynes, R. K.; Chan, W. C.; Lung, C. M.; Uhlemann, A. C.; Eckstein, U.; Taramelli, D.; Parapini, S.; Monti, D.; Krishna, S. The Fe^{2+} -mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: the unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. *ChemMedChem*. **2007**, 2, 1480–1497.
- ⁶⁸ Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; Van Goethem, I. D.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature*. **2003**, 424, 957–961.
- ⁶⁹ Bridgford, J. L.; Xie, S. C.; Cobbold, S. A.; Pasaje, C. F. A.; Herrmann, S.; Yang, T.; Gillett, D. L.; Dick, L. R.; Ralph, S. A.; Dogovski, C.; Spillman, N. J.; Tilley, L.

Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat Commun.* **2018**, 9, 3801–3810.

- ⁷⁰ World Health Organization, *The Treatment of Malaria* (WHO, Geneva, 2006).
- ⁷¹ White, N. J. Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success. *Science.* **2008**, 320, 330–334.
- ⁷² Peters, W. The prevention of antimalarial drug resistance. *Pharmacol. Ther.* **1990**, 47, 499–508.
- ⁷³ WHO Model List of Essential Medicines: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>
- ⁷⁴ Njoroge, M.; Njuguna, N. M.; Mutai, P.; Ongarora, D. S. B.; Smith, P. W.; Chibale, K. Recent approaches to chemical discovery and development against malaria and the neglected tropical diseases human African trypanosomiasis and schistosomiasis. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 11138–11163.
- ⁷⁵ Egan, T. J. Drug-resistant *Plasmodium falciparum*: are recent advances a cause for optimism?. *Future Microbiol.* **2015**, 10, 1261–1263.
- ⁷⁶ Gottschall, J. L.; Elliot, W.; Lianos, E.; McFarland, J. G.; Wolfmeyer, K.; Aster, R. H. Quinine-induced immune thrombocytopenia associated with hemolytic uremic syndrome: a new clinical entity. *Blood.* **1991**, 77, 306–310.
- ⁷⁷ Veinot, J. P.; Mai, K. T.; Zarychanski, R. Chloroquine related cardiac toxicity. *J. Rheumatol.* **1998**, 25, 1221–1225.
- ⁷⁸ Callaway, N. Malaria research should go “back to basics”. *Nature.* **2007**, 449, 226.
- ⁷⁹ Lorenz, V.; Karanis, P. Malaria vaccines: looking back and lessons learnt. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, 1, 74–78.
- ⁸⁰ Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. The pentose phosphate pathway. 5th edition. In *Biochemistry textbook*; **2002**.
- ⁸¹ Clarke, J. L.; Scopes, D. A.; Sodeinde, O.; Mason, P. J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. A novel bifunctional enzyme in malaria parasites. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2013–2019.
- ⁸² Allen, S. M.; Lim, E. E.; Jortzik, E.; Preuss, J.; Chua, H. H.; MacRae, J. I.; Rahlfs, S.; Haeussler, K.; Downton, M. T.; McConville, M. J.; Becker, K.; Ralph, S.A. *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase is a potential drug target. *FEBS J.* **2015**, 282, 3808–3823.
- ⁸³ Kurdi-Haidar, B.; Luzzatto, L. Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, 41, 83–92.

- ⁸⁴ Scopes, D. A. Bautista, J. M.; Vulliamy, T. J.; Mason, P. J. *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-the N-terminal portion is homologous to a predicted protein encoded near to G6PD in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **1997**, 23, 847–848.
- ⁸⁵ Kotaka, M.; Gover, S.; Vandeputte-Rutten, L.; Au, S. W. N.; Lam, V. M. S.; Adams, M. J. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, 61, 495–504.
- ⁸⁶ Bautista, J. M.; Mason, P. J.; Luzzato, L. Purification and properties of human glucose-6-phosphate dehydrogenase made in *E. Coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, 1119, 74–80.
- ⁸⁷ Jortzik, E.; Mailu, B. M.; Preuss, J.; Fischer, M.; Bode, L.; Rahlfs, S.; Becker, K. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique functional enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2011**, 436, 641–650.
- ⁸⁸ Luzzatto, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica.* **2006**, 91, 1303–1306.
- ⁸⁹ Mason, P. J.; Bautista, J. M. Gilsanz, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev.* **2007**, 21, 267–283.
- ⁹⁰ Beutler, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood.* **2008**, 111, 16–24.
- ⁹¹ Cappellini, M. D.; Fiorelli, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet.* **2008**, 371, 64–74.
- ⁹² Linares, M.; Puyet, A.; Diez, A.; Bautista, J. M. Oxidative Stress and Protein Carbonylation in Malaria. In: J. Ros (Ed.), *Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2017, pp, 131–166.
- ⁹³ Preuss, J.; Jortzik, E.; Becker, K. Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life.* **2012**, 64, 603–611.
- ⁹⁴ Bozbech, Z.; Ginsburg, H. *Malar. J.* **2005**, 4, 17–28.
- ⁹⁵ Wajcman, H.; Galácteros, F. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents. *C. R. Biol.* **2004**, 327, 711–720.
- ⁹⁶ Guindo, A.; Fairhurst, R. M.; Doumbo, O. K.; Wellem, T. E.; Diallo, D. A. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLOS Med.* **2007**, 4, 516–522.

- ⁹⁷ Atamna, H.; Pascarmona, G.; Ginsburg, H. Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1994**, *67*, 79–89.
- ⁹⁸ Crooke, A.; Diez, A.; Mason, P. J.; Bautista, J. M. Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. *FEBS J.* **2006**, *273*, 1537–1546.
- ⁹⁹ Phillip, D. M. Watson, M. A.; Yu, H. S.; Steinbrecher, T. B.; Bochevarov, A. D. Quantum chemical pKa prediction for complex organic molecules. *Int. J. Quantum Chem.* **2018**, *118*, e25561.
- ¹⁰⁰ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V.G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. *Gaussian 16*, revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2016**.
- ¹⁰¹ The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2018**.
- ¹⁰² Dennington, R.; Keith, T. A.; Millam, J. M. *GaussView*, Version 5.0, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, **2016**.
- ¹⁰³ Glide, Version 5.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2009**.
- ¹⁰⁴ Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shaw, D. E.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- ¹⁰⁵ Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L., Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750–1759.
- ¹⁰⁶ Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.

- ¹⁰⁷ Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*. **2009**, *16*, 2785–91.
- ¹⁰⁸ Vázquez, J.; Deplano, A.; Herrero, A.; Ginex, T.; Gibert, E.; Rabal, O.; Oyarzabal, J.; Herrero, E.; Luque, F. J. Development and Validation of Molecular Overlays Derived from Three Dimensional Hydrophobic Similarity with PharmScreen. *J. Chem. Inf. Model*. **2018**, *58*, 1596–1609.
- ¹⁰⁹ Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, III, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Gusarov, S.; Homeyer, N.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kolossváry, I.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Paesani, F.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Salomon-Ferrer, R.; Seabra, G.; Simmerling, C. L.; Smith, W.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Kollman, P. A. *AMBER 14*, University of California: San Francisco, CA, **2014**.
- ¹¹⁰ Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269–10280.
- ¹¹¹ Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- ¹¹² Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- ¹¹³ Joung, I. S.; Cheatham, T. E. Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B*. **2008**, *112*, 9020–9041.
- ¹¹⁴ Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- ¹¹⁵ Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N-log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- ¹¹⁶ Juárez-Jiménez, J. Modelización en diseño de fármacos: Exploración conformacional de ligandos y diseño de inhibidores multipotentes. Ph. D. Thesis, Universitat de Barcelona, December 2014.
- ¹¹⁷ Sander, T.; Freyss, J.; von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J. Chem. Inf. Model*. **2015**, *55*, 460–473.
- ¹¹⁸ Soteras, I.; Curutchet, C.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J. Extension of the MST Model to the IEF Formalism: HF and B3LYP Parametrizations. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*. **2005**, *727*, 29–40.

- ¹¹⁹ Curutchet, C.; Bidon-Chanal, A.; Soteras, I.; Orozco, M.; Luque, F. J. MST Continuum Study of the Hydration Free Energies of Monovalent Ionic Species. *J. Phys. Chem. B*. **2005**, 109, 3565–3574.
- ¹²⁰ Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissing, H.; Shindyalov, I. N.; Bouren, P. E. *Nucleic Acids Research*. **2000**, 28, 235–242.
- ¹²¹ Becke, A. D. Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648–5652.
- ¹²² Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*. **1988**, 37, 785–789.
- ¹²³ Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11623–11627.
- ¹²⁴ Halkier, A.; Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Klopper, W.; Koch, H.; Olsen, J.; Wilson, A. K. Basis-set convergence in correlated calculations on Ne, N₂, and H₂O. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 286, 243–252.
- ¹²⁵ Corbella, M.; Toa, Z. S. D.; Scholes, G. D.; Luque, F. J.; Curutchet, C. Determination of the protonation preferences of bilin pigments in cryptophyte antenna complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20, 21404–21416.
- ¹²⁶ Grimme, S. Improved second-order Møller-Plesset perturbation theory by separate scaling of parallel- and antiparallel-spin pair correlation energies. *J. Chem. Phys.* **2003**, 118, 9095–9102.
- ¹²⁷ Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C. Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; Renard, P. Y. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem. J.* **2013**, 453, 393–399.
- ¹²⁸ Dvir, H.; Wong, D. M.; Harel, M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Muñoz-Torrero, D.; Camps, P.; Rosenberry, T. L.; Silman, I.; Sussman, J. L. 3D Structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with huprine X at 2.1 Å resolution: kinetic and molecular dynamic correlates. *Biochemistry*. **2002**, 41, 2970–2981.
- ¹²⁹ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120, 215–241.
- ¹³⁰ Di Pietro, O.; Juárez-Jiménez, J.; Muñoz-Torrero, D.; Laughton, C. A.; Luque, F. J. Unveiling a novel transient druggable pocket in BACE-1 through molecular simulations: Conformational analysis and binding mode of multisite inhibitors. *PLoS One*. **2017**, 12, e0177683.

- ¹³¹ Boys, S. F.; Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553–566.
- ¹³² Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics.* **2012**, *4*, 17.
- ¹³³ Spangenberg, T.; Burrows, J. N.; Kowalczyk, P.; McDonald, S.; Wells, T. N. C.; Willis, P. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLoS ONE.* **2013**, *8*, e62906.
- ¹³⁴ Schrödinger Release 2019-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- ¹³⁵ Chen, Q.; Higgs, R. E.; Vieth, M. Geometric Accuracy of Three-Dimensional Molecular Overlays. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1996–2002.
- ¹³⁶ RDKit: Open-source cheminformatics; <http://www.rdkit.org>
- ¹³⁷ MOPAC 6.0.; version locally modified by Luque, F. J.; Orozco, M.; University of Barcelona, **2008**.
- ¹³⁸ Radfar, A.; Méndez, D.; Moneriz, C.; Linares, M.; Marín-García, P.; Puyet, A.; Diez, A.; Bautista, J. M. Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1899–1915.
- ¹³⁹ Proudfoot, O.; Drew, N.; Scholzen, A.; Xiang, S.; Plebanski, M. Investigation of a novel approach to scoring Giemsa-stained malaria-infected thin blood films. *Malar. J.* **2008**, *7*, 62–67.
- ¹⁴⁰ GraphPad Prism version 6.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.
- ¹⁴¹ Kullback, S.; Liebler, R.A. On Information and Sufficiency. *The Annals of Mathematical Statistics.* **1951**, *22*, 79–86.
- ¹⁴² Chakravarty, S.; Kannan, K. K. Drug-protein interactions. Refined structures of three sulfonamide drug complexes of human carbonic anhydrase I enzyme. *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 298–309.
- ¹⁴³ Smith, G. M.; Alexander, R. S.; Christianson, D. W.; McKeever, B. M.; Ponticello, G. S.; Springer, J. P.; Randall, W. C.; Baldwin, J. J.; Habecker, C. N. Positions of His-64 and a bound water in human carbonic anhydrase II upon binding three structurally related inhibitors. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 118–125.
- ¹⁴⁴ Pargellis, C.; Tong, L.; Churchill, L.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Grob, P. M.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Pav, S.; Regan, J. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, *9*, 268–272.

- ¹⁴⁵ Zhu, X.; Kim, J. L.; Newcomb, J. R.; Rose, P. E.; Stover, D. R.; Toledo L. M.; Zhao, H.; Morgenstern, K. A. Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. *Structure*. **1999**, 7, 651–661.
- ¹⁴⁶ Engh R. A.; Girod, A.; Kinzel, V.; Huber, R.; Bossemeyer, D. Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 26157–26164.
- ¹⁴⁷ Romesberg, F. E.; Spiller, B.; Schultz, P. G.; Stevens, R. C. Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody. *Science*. **1998**, 279, 1929–1933.
- ¹⁴⁸ Whitlow, M.; Howard, A. J.; Stewart, D.; Hardman, K. D.; Kuyper, L. F.; Baccanari, D. P.; Fling, M. E.; Tansik, R. L. X-ray crystallographic studies of *Candida albicans* dihydrofolate reductase. High resolution structures of the holoenzyme and an inhibited ternary complex. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 30289–30298.
- ¹⁴⁹ Yan, X.; Hollis, T.; Svinth, M.; Day, P.; Monzingo, A. F.; Milne, G. W.; Robertus, J. D. Structure-based identification of a ricin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **1997**, 266, 1043–1049.
- ¹⁵⁰ Chirgadze, N. Y.; Sall, D. J.; Klimkowski, V. J.; Clawson, D. K.; Briggs, S. L.; Hermann, R.; Smith, G. F.; Gifford-Moore, D. S.; Wery, J. P. The crystal structure of human alpha-thrombin complexed with LY178550, a nonpeptidyl, active site-directed inhibitor. *Protein Sci.* **1997**, 6, 1412–1417.
- ¹⁵¹ White, A. W.; Almassy, R.; Calvert, A. H.; Curtin, N. J.; Griffin, R. J.; Hostomsky, Z.; Maegley, K.; Newell, D. R.; Srinivasan, S.; Golding, B. T. Resistance-modifying agents. 9. Synthesis and biological properties of benzimidazole inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4084–4097.
- ¹⁵² Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*. **1999**, 7, 297–307.
- ¹⁵³ Klaholz, B. P.; Mitschler, A.; Moras, D. Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor. *J. Mol. Biol.* **2000**, 302, 155–170.
- ¹⁵⁴ Wilson, D. K.; Nakano, T.; Petrash, J. M.; Quioco, F. A. 1.7 A structure of FR-1, a fibroblast growth factor-induced member of the aldo-keto reductase family, complexed with coenzyme and inhibitor. *Biochemistry*. **1995**, 34, 14323–14330.
- ¹⁵⁵ Davies, T. G.; Bentley, J.; Arris, C. E.; Boyle, F. T.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Gibson, A. E.; Golding, B. T.; Griffin, R. J.; Hardcastle, I. R.; Jewsbury, P.; Johnson, L. N.; Mesguiche, V.; Newell, D. R.; Noble, M. E.; Tucker, J. A.; Wang, L.; Whitfield, H. J. Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, 9, 745–749.

- ¹⁵⁶ Love, J. D.; Gooch, J. T.; Benko, S.; Li, C.; Nagy, L.; Chatterjee, V. K.; Evans, R. M.; Schwabe, J. W. The structural basis for the specificity of retinoid-X receptor-selective agonists: new insights into the role of helix H12. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11385–11391.
- ¹⁵⁷ Cho, J. H.; Kim, D. H.; Chung, S. J.; Ha, N. -C.; Oh, B. -H.; Choi, K. Y. Insight into the stereochemistry in the inhibition of carboxypeptidase A with N-(hydroxyaminocarbonyl)phenylalanine: binding modes of an enantiomeric pair of the inhibitor to carboxypeptidase A. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2015–2022.
- ¹⁵⁸ Larsen, N. A.; Zhou, B.; Heine, A.; Wirsching, P.; Janda, K. D.; Wilson, I. A. Crystal structure of a cocaine-binding antibody. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 9–15.
- ¹⁵⁹ Clare, P. M.; Poorman, R. A.; Kelley, L. C.; Watenpaugh, K. D.; Bannow, C. A.; Leach, K. L. The cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5 act by a random, anticooperative kinetic mechanism. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48292–48299.
- ¹⁶⁰ Weyand, M.; Schlichting, I.; Marabotti, A.; Mozzarelli, A. Crystal structures of a new class of allosteric effectors complexed to tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *J. Biol. Chem.* *277*, 10647–10652.
- ¹⁶¹ Powers, R. A.; Morandi, F.; Schoichet, B. K. Structure-based discovery of a novel, noncovalent inhibitor of AmpC beta-lactamase. *Structure.* **2002**, *10*, 1013–1023.
- ¹⁶² Matter, H.; Defossa, E.; Heinelt, U.; Blohm, P. M.; Schneider, D.; Mueller, A.; Herok, S.; Schreuder, H. A.; Liesum, A.; Brachvogel, V.; Loenze, P.; Walser, A.; Al-Obeidi, F.; Wildgoose, P. Design and Quantitative Structure-Activity relationship of 3-amidinobenzyl-1H-indole-2-carboxamides as potent, nonchiral, and selective inhibitors of blood coagulation factor Xa. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2749–2769.
- ¹⁶³ Adler, M.; Kochanny, M. J.; Bin, Y.; Rumennik, G.; Light, D. L.; Biancalana, S.; Whitlow, M. Crystal Structures of Two Potent Nonamidine Inhibitors Bound to Factor Xa. *Biochemistry.* **2002**, *41*, 15514–15523.
- ¹⁶⁴ Bennett, M. S.; Wien, F.; Champness, J. N.; Batuwangala, T.; Rutherford, T.; Summers, W. C.; Sun, H.; Wright, G.; Sanderson, M. R. Structure to 1.9 Å resolution of a complex with herpes simplex virus type-1 thymidine kinase of a novel, non-substrate inhibitor: X-ray crystallographic comparison with binding of acyclovir. *FEBS Lett.* **1999**, *443*, 121–125.
- ¹⁶⁵ Reyda, S.; Sohn, C.; Klebe, G.; Rall, K.; Ullmann, D.; Jakubke, H. D.; Stubbs, M. T. Reconstructing the Binding Site of Factor Xa in Trypsin Reveals Ligand-Induced Structural Plasticity. *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 963–977.
- ¹⁶⁶ Guddat, L. W.; Shan, L.; Anchin, J. M.; Linthicum, D. S.; Edmundson, A. B. Local and transmitted conformational changes on complexation of an anti-sweetener Fab. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 247–274.

- ¹⁶⁷ Lim, K.; Owens, S. M.; Arnold, L.; Sacchettini, J. C.; Linthicum, D. S. Crystal structure of monoclonal 6B5 Fab complexed with phencyclidine. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28576–28582.
- ¹⁶⁸ Wang, Z.; Canagarajah, B. J.; Boehm, J. C.; Kassisa, S.; Cobb, M. H.; Young, P. R.; Abdel-Meguid, S.; Adams, J. L.; Goldsmith, E. J. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure.* **1998**, *6*, 1117–1128.
- ¹⁶⁹ Holden, H. M.; Matthews, B. W. The binding of L-valyl-L-tryptophan to crystalline thermolysin illustrates the mode of interaction of a product of peptide hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3256–3260.
- ¹⁷⁰ Lovejoy, B., Welch, A.R., Carr, S., Luong, C., Broka, C., Hendricks, R.T., Campbell, J.A., Walker, K.A., Martin, R., Van Wart, H., Browner, M.F. Crystal structures of MMP-1 and -13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **1999**, *6*, 217–221.
- ¹⁷¹ Oakley, A. J.; Lo Bello, M.; Nuccetelli, M.; Mazzetti, A. P.; Parker, M. W. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 913–926.
- ¹⁷² Boriack-Sjodin, P. A.; Zeitlin, S.; Chen, H. H.; Crenshaw, L.; Gross, S.; Dantanarayana, A.; Delgado, P.; May, J. A.; Dean, T.; Christianson, D. W. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2483–2489.
- ¹⁷³ Lewis, W. S., Cody, V., Galitsky, N., Luft, J. R., Pangborn, W., Chunduru, S. K., Spencer, H. T., Appleman, J. R., Blakley, R. L. Methotrexate-resistant variants of human dihydrofolate reductase with substitutions of leucine 22. Kinetics, crystallography, and potential as selectable markers. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 5057–5064.
- ¹⁷⁴ Brandstetter, H.; Turk, D.; Hoeffken, H. W.; Grosse, D.; Sturzebecher, J.; Martin, P. D.; Edwards, B. F.; Bode, W. Refined 2.3 Å X-ray crystal structure of bovine thrombin complexes formed with the benzamidine and arginine-based thrombin inhibitors NAPAP, 4-TAPAP and MQPA. A starting point for improving antithrombotics. *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1085–1099.
- ¹⁷⁵ Klaholz, B. P.; Mitschler, A.; Belema, M.; Zusi, C.; Moras, D. Enantiomer discrimination illustrated by high-resolution crystal structures of the human nuclear receptor hRAR γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6322–6327.
- ¹⁷⁶ Maignan, S.; Guilloteau, J. P.; Pouzieux, S.; Choi-Sledeski, Y. M.; Becker, M. R.; Klein, S. I.; Ewing, W. R.; Pauls, H. W.; Spada, A. P.; Mikol, V. Crystal structures of human factor Xa complexed with potent inhibitors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3226–3232.
- ¹⁷⁷ Kim, C. -Y.; Chang, J. S.; Doyon, J. B.; Baird Jr., T. T.; Fierke, C. A.; Jain, A.; Christianson, D. W. Contribution of Fluorine to Protein-ligand Affinity in the Binding

of Fluoroaromatic Inhibitors to Carbonic Anhydrase II. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12125–12134.

¹⁷⁸ Park, J. D.; Kim, D. H.; Kim, S. J.; Woo, J. R.; Ryu, S. E. Sulfamide-Based Inhibitors for Carboxypeptidase A. Novel Type Transition State Analogue Inhibitors for Zinc Proteases. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5295–5302.

¹⁷⁹ Iversen, L. F.; Andersen, H. S.; Møller K. B.; Olsen, O. H.; Peters, G. H.; Branner, S.; Mortensen, S. B.; Hansen, T. K.; Lau, J.; Ge, Y.; Holsworth D. D.; Newman, M. J.; Hundahl Møller, N. P. Steric hindrance as a basis for structure-based design of selective inhibitors of protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry.* **2001**, 40, 14812–14820.

¹⁸⁰ Xu, R. M.; Carmel, G.; Kuret, J.; Cheng, X. Structural basis for selectivity of the isoquinoline sulfonamide family of protein kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 6308–6313.

¹⁸¹ Varghese, J. N.; Smith, P. W.; Sollis, S. L.; Blick, T. J.; Sahasrabudhe, A.; McKimm-Breschkin, J. L.; Colman, P. M. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure.* **1998**, 6, 735–746.

¹⁸² Chen, J. M.; Xu, S. L.; Wawrzak, Z.; Basarab, G. S.; Jordan, D. B. Structure-based design of potent inhibitors of scytalone dehydratase: displacement of a water molecule from the active site. *Biochemistry.* **1998**, 37, 17735–17744.

¹⁸³ Wawrzak, Z.; Sandalova, T.; Steffens, J. J.; Basarab, G. S.; Lundqvist, T.; Lindqvist, Y.; Jordan, D. B. High-resolution structures of scytalone dehydratase-inhibitor complexes crystallized at physiological pH. *Proteins.* **1999**, 35, 425–439.

¹⁸⁴ Pikul, S.; McDow Dunham, K. L.; Almstead, N. G.; De, B.; Natchus, M. G.; Anastasio, M. V.; McPhail, S. J.; Snider, C. E.; Taiwo, Y. O.; Rydel, T.; Dunaway, C. M.; Gu, F.; Mieling, G. E. Discovery of potent, achiral matrix metalloproteinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3568–3571.

¹⁸⁵ Kim, C. Y.; Whittington, D. A.; Chang, J. S.; Liao, J.; May, J. A.; Christianson, D. W. Structural aspects of isozyme selectivity in the binding of inhibitors to carbonic anhydrases II and IV. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 888–893.

¹⁸⁶ Turk, D.; Struzebecher, J.; Bode, W. Geometry of binding of the N alpha-tosylated piperidides of m-amidino-, p-amidino- and p-guanidino phenylalanine to thrombin and trypsin. X-ray crystal structures of their trypsin complexes and modeling of their thrombin complexes. *FEBS Lett.* **1991**, 287, 133–138.

¹⁸⁷ Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing multiple ligands – medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, 15, 587–600.

¹⁸⁸ Cavalli, A.; Bolognesi, M.L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 347–372.

- ¹⁸⁹ Muñoz-Torrero D. Multitarget anti-Alzheimer hybrid compounds: Do they work in vivo? In: Design of Hybrid Molecules for Drug Development. Decker, M. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2017**, 165-190.
- ¹⁹⁰ Viayna, E.; Sola, I.; Bartolini, M.; De Simone, A.; Tapia-Rojas, C.; Serrano, F. G.; Sabaté, R.; Juárez-Jiménez, J.; Pérez, B.; Luque, F. J.; Andrisano, V.; Clos, M. V.; Inestrosa, N. C.; Muñoz-Torrero, D. Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rhein derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2549–2567.
- ¹⁹¹ Serrano, F.G.; Tapia-Rojas, C.; Carvajal, F.J.; Cisternas, P.; Viayna, E.; Sola, I.; Muñoz-Torrero, D.; Inestrosa, N.C. Rhein-huprine derivatives reduce cognitive impairment, synaptic failure and amyloid pathology in A β PPswe/PS-1 mice of different ages. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, *13*, 1017–1029.
- ¹⁹² Marvin 17.29.0, 2017, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)
- ¹⁹³ Weast, R.C.; Astle, M. J.; Beyer, W. H. CRC Handbook of Chemistry and Physics (66th edition), Boca Raton, Florida, USA (1985-1986).
- ¹⁹⁴ Paulder, W. W.; Kress, T. J. The Naphthypyridine Chemistry. X: Protonation and Methylation of the 1,X-Naphthyridines. *J. Heterocycl. Chem.* 1968, *5*, 561–564.
- ¹⁹⁵ Albert, A. Naphthypyridine Chemistry. X: Protonation and Methylation of the 1,X-Naphthypyridines. *J. Heterocycl. Chem.* 1968, 1790–1793.
- ¹⁹⁶ Perrin, D. D. Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution, Butterworths, London, UK (1965); Supplement (1972).
- ¹⁹⁷ Camps, P.; Cusack, B.; Mallender, W. D. El Achab, R. E.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Rossenberry, T. L. Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 409–417.
- ¹⁹⁸ Voskressensky, L. G.; Borisova, T. N.; Kulikova, L. N.; Varlamov, A. V.; Catto, M.; Altomare, C.; Carotti, A. Tandem Cleavage of Hydrogenated β - and γ -Carbolines – New Practical Synthesis of Tetrahydroazocino[4,5-b]indoles and Tetrahydroazocino[5,4-b]- indoles Showing Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *14*, 3128–3135.
- ¹⁹⁹ Carotti, A.; de Candia, M.; Catto, M.; Borisova, T. N.; Varlamov, A. V.; Méndez-Álvarez, E.; Soto-Otero, R.; Voskressensky, L. G.; Altomare, C. Ester derivatives of annulated tetrahydroazocines: A new class of selective acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7205–7212.
- ²⁰⁰ Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr. B.* **2016**, *B72*, 171–179.

- ²⁰¹ Kotaka, M.; Gover, S.; Vandeputte–Rutten, L.; Au, S. W. N.; Lam, V. M. S.; Adams, M. J. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D.* **2005**, 61, 495–504.
- ²⁰² Preuss, J.; Hedrick, M.; Sergienko, E.; Pinkerton, A.; Mangravita–Novo, A.; Smith, L.; Marx, C.; Fischer, E.; Jortzik, E.; Rahlfs, S.; Becker, K. A.; Bode, L. High-throughput screening for small-molecule inhibitors of *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase. *J. Biol. Screen.* **2012**, 17, 738–751.
- ²⁰³ Preuss, J.; Maloney, P.; Peddibhotia, S.; Hedrick, M. P.; Hershberger, P.; Gosalia, P.; Milewski, M.; Li, L.; Sugarman, E.; Hood, B.; Suyama, E.; Nguyen, K.; Vasile, S.; Sergienko, E.; Mangravita–Novo, A.; Vicchiarelli, M.; McAnally, D.; Smith, L. H.; Roth, G. P.; Diwan, J.; Chung, T. D. Y., Jortzik, E.; Rahlfs, S.; Becker, K.; Pinkerton, A. B.; Bode, L. Discovery of a *Plasmodium falciparum* Glucose-6-phosphate Dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase Inhibitor (R,Z)-N-((1-Ethylpyrrolidin-2-yl)methyl)-2-(2-fluorobenzylidene)-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]thiazine-6-carboxamide (ML276) That Reduces Parasite Growth in Vitro. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 7262–7272.
- ²⁰⁴ Maloney, P.; Hedrick, M. P.; Peddibhotia, S.; Hershberger, P.; Milewski, M.; Gosalia, P.; Li, L.; Preuss, J.; Sugarman, E.; Hood, B.; Suyama, E.; Nguyen, K.; Vasile, S.; Sergienko, E.; Salanwil, S.; Stonich, D.; Su, Y.; Dahl, R.; Mangravita–Novo, A.; Vicchiarelli, M.; McAnally, D.; Smith, L. H.; Roth, G.; Diwan, J.; Chung, T. D. Y.; Pinkerton, A. B.; Bode, L.; Becker, K. A. Selective Inhibitor of *Plasmodium falciparum* Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (PfG6PDH) – Probe 2. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, Bethesda (MD). **2010**.
- ²⁰⁵ Vílchez, D. Estudio del modo de union de potenciales compuestos *lead* frente a Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Plasmodium falciparum* (PfG6PD) para el tratamiento de Malaria. MSc. Thesis, Universitat de Barcelona, July 2017.
- Modelización en diseño de fármacos: Exploración conformacional de ligandos y diseño de inhibidores multipotentes. Ph. D. Thesis, Universitat de Barcelona, December 2014.
- ²⁰⁶ Kleywegt, G. J.; Harris, M. R.; Zou, J. Y.; Taylor, T. C.; Wählby, A.; Jones, T. A. The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2004, 60, 2240–2249.
- ²⁰⁷ Maret, W.; Li, Y. Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4682–4707.
- ²⁰⁸ Namuswe, F.; Berg, J. M. Secondary Interactions Involving Zinc-Bound Ligands: Roles in Structural Stabilization and Macromolecular Interactions. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 111, 146–149.
- ²⁰⁹ Kawai, K.; Nagata, N. Metal–Ligand interactions: An analysis of zinc binding groups using the Protein Data Bank. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 51, 271–276.

²¹⁰ Huque, F. T. T.; Platts, J. A. The effect of intramolecular interactions on hydrogen bond acidity. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1410–1424.

²¹¹ Singh, S. K.; Yamashita, A.; Gouaux, E. Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature.* **2007**, 448, 952–956.



ANEXOS

Anexo I: Artículo I

Design, synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rhein-huprine hybrids.

Future Medicinal Chemistry

(Future Med. Chem. **2017**, 9, 965–981)

Francisco Javier Pérez-Areales^{1,2}, Nibal Betari¹, Antonio Viayna^{2,3}, Caterina Pont^{1,2}, Alba Espargaró⁴, Manuela Bartolini⁵, Angela De Simone⁶, José Fernando Rinaldi-Alvarenga³, Belén Pérez⁷, Raimón Sabaté⁴, Rosa Maria Lamuela-Raventós^{3,8}, Vincenza Andrisano⁶, Francisco Javier Luque^{2,3}, Diego Muñoz-Torrero^{*,1,2}

¹Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028 Barcelona, Spain.

²Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain.

³Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

⁴Department of Pharmacy & Pharmaceutical Technology & Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028, Barcelona, Spain.

⁵Department of Pharmacy & Biotechnology, Alma Mater Studiorum University of Bologna, Via Belmeloro 6, I-40126 Bologna, Italy.

⁶Department for Life Quality Studies, University of Bologna, Corso d' Augusto 237, I-47921 Rimini, Italy.

⁷Department of Pharmacology, Therapeutics & Toxicology, Autonomus University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

⁸CIBER 06/003 Physiopathology of Obesity & Nutrition (CIBEROBN), Institute of Health Carlos III, E-28029 Madrid, Spain.

*Corresponding author

For reprint orders, please contact reprints@future-science.com

Design, synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rhein–huprine hybrids

Aim: Simultaneous modulation of several key targets of the pathological network of Alzheimer's disease (AD) is being increasingly pursued as a promising option to fill the critical gap of efficacious drugs against this condition. **Materials & methods:** A short series of compounds purported to hit multiple targets of relevance in AD has been designed, on the basis of their distinct basicities estimated from high-level quantum mechanical computations, synthesized, and subjected to assays of inhibition of cholinesterases, BACE-1, and A β 42 and tau aggregation, of antioxidant activity, and of brain permeation. **Results:** Using, as a template, a lead rhein–huprine hybrid with an interesting multitarget profile, we have developed second-generation compounds, designed by the modification of the huprine aromatic ring. Replacement by [1,8]-naphthyridine or thieno[3,2-e]pyridine systems resulted in decreased, although still potent, acetylcholinesterase or BACE-1 inhibitory activities, which are more balanced relative to their A β 42 and tau antiaggregating and antioxidant activities. **Conclusion:** Second-generation naphthyridine- and thienopyridine-based rhein–huprine hybrids emerge as interesting brain permeable compounds that hit several crucial pathogenic factors of AD.

First draft submitted: 27 February 2017; Accepted for publication: 7 April 2017; Published online: 20 June 2017

Keywords: antiaggregating agents • anticholinesterasic agents • antioxidants • BACE-1 inhibitors • molecular hybridization • multitarget agents

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder and a major cause of death worldwide [1]. Because it is broadly accepted that AD is a multifactorial disorder, the development of drug candidates that simultaneously hit several key pathogenic factors is being increasingly pursued as a more realistic option to halt or slow the progression of the disease than compounds aimed at modulating a single molecular target [2–10]. Indeed, AD drug discovery is one of the fields in which the development of multitarget agents has experienced a greater growth in the past years [11]. Multitarget compounds are usually designed by combining into hybrid molecules two or more pharmacophoric moieties that are known to enable the interaction

with the selected molecular targets [12]. Choice of the pharmacophores to be combined into a multitarget hybrid compound is guided by the selection of the molecular targets or pathological events to be hit and, in the absence of an accurate chart of the AD network [13], these are selected on the basis of the separately reported pathogenic relevance of one or another molecular target. The precise underlying mechanisms of AD have not been fully elucidated yet, but several potential causal factors have been depicted, prominently the formation and aggregation of β -amyloid peptide (A β) and the hyperphosphorylation and aggregation of tau protein [14], which, together with synaptic dysfunction and a marked cholinergic deficit, are the main hallmarks of AD.

Francisco Javier Pérez-Areales^{1,2}, Nibal Betari¹, Antonio Viayna^{2,3}, Caterina Pont^{1,2}, Alba Espargaró⁴, Manuela Bartolini⁵, Angela De Simone⁶, José Fernando Rinaldi Alvarenga³, Belén Pérez⁷, Raimon Sabate⁴, Rosa Maria Lamuela-Raventós^{3,8}, Vincenza Andrisano⁶, Francisco Javier Luque^{2,3} & Diego Muñoz-Torrero^{*1,2}

*Author for correspondence: dmunoztorrero@ub.edu

The full author affiliations list can be found on page 981

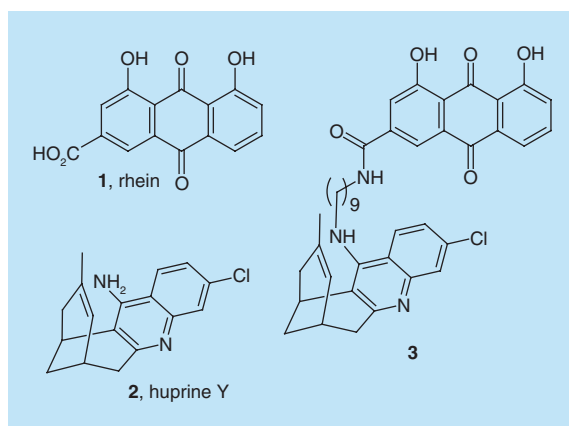


Figure 1. Chemical structures of rhein, huprine Y and the lead rhein–huprine hybrid 3.

We have recently developed a novel class of multi-target hybrid compounds that hit most of these key pathogenic factors. These hybrids combine a unit of the natural product rhein (**1**, Figure 1), for which we demonstrated a moderately potent A β and tau antiaggregating activity, and a unit of the potent acetylcholinesterase (AChE) inhibitor huprine Y (**2**, Figure 1) [15,16]. The lead compound (**3**, Figure 1) displayed a very interesting *in vitro* multitarget profile, including cholinergic activity through inhibition of human cholinesterases (hAChE, IC₅₀ = 3.60 nM; human butyrylcholinesterase [hBChE], IC₅₀ = 620 nM), and A β 42 and tau antiaggregating activity (48 and 30% inhibition at 10 μ M, respectively, in a cell-based assay that uses intact *Escherichia coli* cells overexpressing A β 42 and tau). Gratifyingly, we found that this compound potently inhibited human BACE-1 (IC₅₀ = 120 nM), the enzyme involved in the first and rate-limiting step of A β formation from the APP, which leads to a significant A β lowering effect in a transgenic mouse model of AD [15,16]. Molecular modeling studies have suggested that the potent inhibitory activity of the rhein–huprine hybrid **3** against human AChE and BACE-1 stems from a dual site binding in both enzymes, in other words, to the catalytic anionic site and the peripheral anionic site of AChE, and to the catalytic site and a so far unexplored secondary site of BACE-1 [15,17].

The huprine moiety of **3**, protonated at physiological pH, interacts at the catalytic site of both AChE and BACE-1. In AChE, it enables cation– π interactions with the indole ring of Trp86 and the benzene ring of Tyr337, and hydrogen bonding with the His447 carbonyl oxygen [18]. In BACE-1, it might be involved in a salt bridge with the Asp32 and Asp228 residues of the catalytic dyad [15,17]. The basicity of the huprine moiety of **3** is therefore crucial for AChE and BACE-1 inhibition. However, in general, high basicity has been associated with poor permeation through biological

membranes and P-gp-mediated efflux [19,20]. Indeed, reduction of the basicity of amidine-based BACE-1 inhibitors has been successfully used to ameliorate permeability and reduce P-gp efflux, thereby increasing oral bioavailability and brain exposure [21].

The 4-aminopyridine system that is embedded in the huprine moiety of hybrid **3** can be considered a vinylogous amidine. The experimentally determined pK_a value of huprine X, a 9-methyl analog of huprine Y, is 8.9 [22], which compares well with the pK_a values reported for some cyclic amidines [21]. Huprine Y and its derivatives such as the rhein–huprine hybrid **3** should have a similar pK_a value, and hence, they should be prevalently protonated at physiological pH and might suffer from poor permeability or P-gp efflux issues.

Herein, we describe a short series of novel analogs of the rhein–huprine hybrid **3**, which were designed by structural modification of the huprine moiety to modulate its basicity, with the final aim of identifying novel analogs with favorable multitarget activity profile and reduced basicity, and hence with a presumably better bioavailability. In particular, we report the synthesis and the *in vitro* evaluation of the inhibitory activity of the novel monomeric huprines and the corresponding rhein–huprine hybrids against hAChE, hBChE, hBACE-1 and A β 42 and tau aggregation. Because the rhein moiety of these hybrids features phenolic groups, we inferred that these compounds might additionally display antioxidant activity. Thus, we have also assessed the antioxidant activity of all the novel compounds by the DPPH, ABTS, and total phenolic assays. The brain permeability of the novel compounds has been studied using the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA)/blood–brain barrier (BBB) assay (PAMPA-BBB). Finally, the mechanism of action of some selected rhein–huprine hybrids within AChE and BACE-1 has been studied by molecular modeling.

Materials & methods

Chemistry

Melting points were determined in open capillary tubes with an MFB 595010M Gallenkamp apparatus. The 400 MHz ¹H/100.6 MHz ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 400 spectrometer at the Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona. The chemical shifts are reported in ppm (δ scale) relative to residual solvent signals (CD₃OD at 3.31 and 49.0 ppm in the ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively), and coupling constants are reported in Hertz (Hz). Assignments given for the NMR spectra of the new compounds have been carried out by comparison with the NMR data of hybrids **9a–c** as model compounds, which, in turn, were assigned on the basis

of distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT), COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (standard procedures) and COSY $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (gHSQC or gHMBC sequences) experiments. The protons at position 13 of the huprine moiety of the hybrids denoted as *syn* (*anti*) are those located on the same (different) side of the heteroaromatic ring with respect to the cyclohexene ring. IR spectra were recorded on Perkin–Elmer Spectrum RX I or Shimadzu IR Affinity-1 spectrophotometers. Only significant absorption bands are given, expressed in cm^{-1} . For TLC analyses and column chromatography purifications, aluminum-backed plates with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, ref 1.05554) and silica gel 60 AC.C (35–70 mesh, SDS, ref 2000027) were used, respectively. In TLC analyses, the spots were revealed using UV light and 1% aqueous KMnO_4 . High-resolution mass spectrometry (HRMS) analyses were performed with an LC/MSD TOF Agilent Technologies spectrometer at the Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona. The purity of the target compounds was determined by HPLC, with a Waters Alliance HT system, using a reversed phase YMC-Pack ODS-AQ column (4.6 × 50 mm, D S. 3 μm , 120 Å) and a gradient water with 0.1% formic acid/acetonitrile with 0.1% formic acid 95:5 to acetonitrile with 0.1% formic acid within 3.5 min, at a flux of 1.6 ml/min at 50°C, as described in [23]. The synthetic procedures for the preparation of huprines **6a–d**, nitriles **7a–d**, amines **8a–d** and the novel rhein–huprine hybrids **9a–d** are exemplified through the synthesis of **6a**, **7a**, **8a** and **9a** (Figure 2). The synthesis of the rest of huprines,

nitriles, amines and rhein–huprine hybrids is included in the **Supplementary Material**. The analytical samples of all of the rhein–huprine hybrids, which were subjected to pharmacological evaluation, possess a purity of $\geq 95\%$ as indicated by HPLC measurements.

6,7,10,11-Tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[*b*][1,8]naphthyridin-5-amine (**6a**)

To a suspension of 2-aminopyridine-3-carbonitrile, **5a** (1.05 g, 8.81 mmol) and AlCl_3 (1.18 g, 8.85 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (14 ml), a solution of enone **4** (885 mg, 5.89 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (53 ml) was added. The reaction mixture was stirred under reflux overnight, then allowed to cool to room temperature, diluted with water (30 ml) and tetrahydrofuran (THF; 30 ml), alkalized with 5 N NaOH (11 ml) and stirred at room temperature for 30 min. The phases were separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (6 × 45 ml). The combined organic layers were dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to provide a brown solid residue (1.76 g), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH mixtures, gradient elution). On elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 99:1:0.4, huprine **6a** (1.04 g, 70% yield) was isolated as a pale yellow solid; $R_f = 0.51$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **6a** (47 mg, 0.19 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 (3 ml) was filtered through a 0.2- μm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter, treated with a

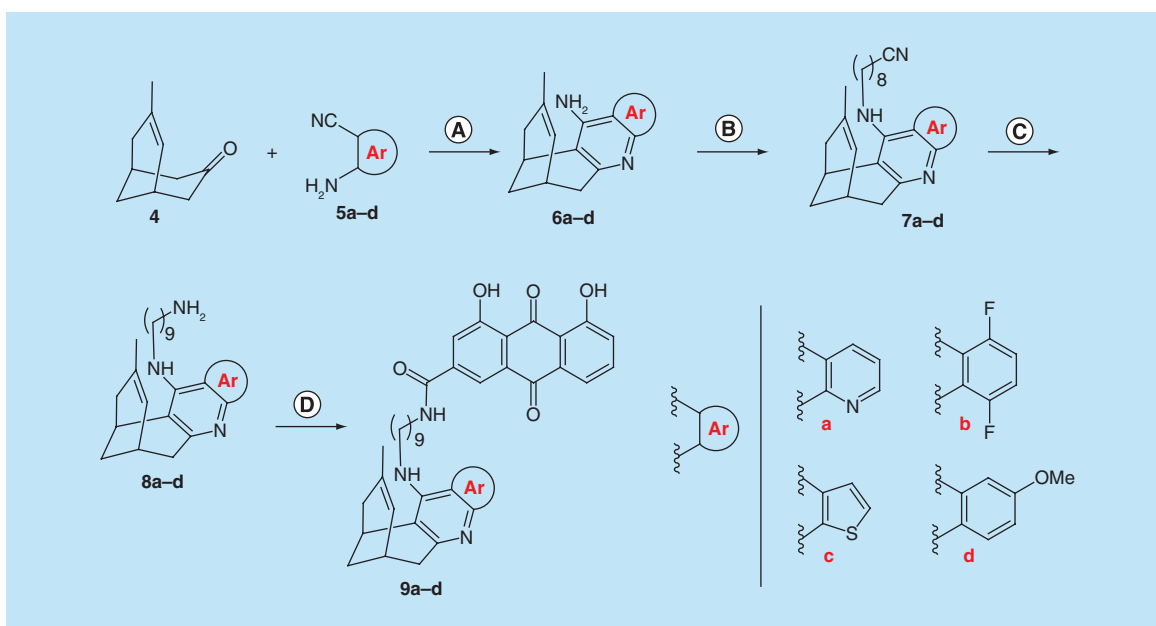


Figure 2. Reagents and conditions. (A) AlCl_3 , refluxing 1,2-dichloroethane; (B) KOH, DMSO and 9-bromononanenitrile, room temperature; (C) LiAlH_4 , Et_2O , room temperature; (D) rhein, EDC, HOBT, Et_3N and EtOAc/DMF , room temperature.

solution of HCl in Et₂O (3 N, 0.18 ml) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 ml) to give, after drying at 65°C/2 Torr for 48 h, **6a**·HCl (55 mg) as a yellow solid: mp 240–244°C; IR attenuated total reflectance (ATR) ν 3500–2500 (maximum at 3049, 2908, 2454, N–H, N⁺–H, C–H st), 1669, 1635, 1624, 1604, 1586, 1535 (ar–C–C, ar–C–N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.59 (s, 3H, 8-CH₃), superimposed in part 1.97 (dm, J = 12.4 Hz, 1H, 13-H_{syn}), 1.99 (d, J = 18.0 Hz, 1H, 7-H_{endo}), 2.08 (dm, J = 12.4 Hz, 1H, 13-H_{anti}), 2.52 (dd, J = 18.0 Hz, J' = 4.8 Hz, 1H, 7-H_{exo}), 2.79 (m, 1H, 10-H), 2.92 (ddd, J = 18.0 Hz, J' = 2.0 Hz, J'' = 1.2 Hz, 1H, 11-H_{endo}), 3.21 (dd, J = 18.0 Hz, J' = 5.6 Hz, 1H, 11-H_{exo}), 3.39 (m, 1H, 6-H), 4.91 (s, NH, +NH), 5.59 (br d, J = 4.8 Hz, 1H, 9-H), 7.64 (dd, J = 8.8 Hz, J' = 4.4 Hz, 1H, 3-H), 8.85 (dd, J = 8.8 Hz, J' = 1.6 Hz, 1H, 4-H), 8.95 (dd, J = 4.4 Hz, J' = 1.6 Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.4 (CH₃, 8-CH₃), 27.6 (CH, C6), 28.1 (CH, C10), 29.1 (CH₂, C13), 35.8 (CH₂), 35.9 (CH₂) (C7, C11), 111.9 (C, C4a), 115.8 (C, C5a), 123.0 (CH, C3), 125.1 (CH, C9), 134.3 (CH, C4), 134.9 (C, C8), 148.6 (C, C11a), 154.5 (C, C12a), 156.6 (CH, C2), 157.8 (C, C5); HPLC purity: 100%.

9-[(6,7,10,11-Tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[b][1,8]naphthyridin-5-yl)amino]nonanenitrile (**7a**)

A suspension of huprine **6a** (992 mg, 3.95 mmol), finely powdered KOH (85% purity, 860 mg, 13.0 mmol) and 4 Å molecular sieves in anhydrous DMSO (17 ml) was stirred, heating every 10 min approximately with a heat gun for 1 h and at room temperature one additional hour and then treated with 9-bromononanenitrile (947 mg, 4.34 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, diluted with 2 N NaOH (120 ml) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 ml). The combined organic extracts were washed with H₂O (5 × 100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure to give a reddish oil (1.49 g), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99.4:0.6:0.4 to 99:1:0.4, nitrile **7a** (618 mg, 40% yield) was isolated as reddish oil; R_f = 0.84 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **7a** (25 mg, 0.06 mmol) in CH₂Cl₂ (1 ml) was filtered through a 0.2- μ m PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.06 ml) and evaporated under reduced pressure. The resulting

solid was washed with pentane (3 × 2 ml) to give, after drying at 65°C/2 Torr for 48 h, **7a**·HCl (27 mg) as an orange solid: mp 110–113°C; IR (ATR) ν 3500–2500 (maximum at 3204, 2925, 2852, N–H, N⁺–H, C–H st), 2245 (CN st), 1612, 1589, 1519 (ar–C–C, ar–C–N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.36–1.52 (complex signal, 8H, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.59 (s, 3H, 8'-CH₃), 1.63 (tt, J = J' = 7.2 Hz, 2H, 3-H₂), superimposed in part 1.89 (tt, J = J' = 7.2 Hz, 2H, 8-H₂), 1.95 (br d, J = 17.6 Hz, 1H, 7'-H_{endo}), superimposed in part 1.96 (dm, J = 12.8 Hz, 1H, 13'-H_{syn}), 2.09 (dm, J = 12.8 Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.43 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 2-H₂), 2.54 (dd, J = 17.6 Hz, J' = 4.4 Hz, 1H, 7'-H_{exo}), 2.78 (m, 1H, 10'-H), 2.91 (br d, J = 18.0 Hz, 1H, 11'-H_{endo}), 3.21 (dd, J = 18.0 Hz, J' = 5.6 Hz, 1H, 11'-H_{exo}), 3.45 (m, 1H, 6'-H), 4.01 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 9-H₂), 4.85 (s, NH, +NH), 5.59 (br d, J = 4.8 Hz, 1H, 9'-H), 7.60 (dd, J = 8.4 Hz, J' = 4.4 Hz, 1H, 3'-H), 8.86 (br d, J = 8.4 Hz, 1H, 4'-H), 8.91 (dd, J = 4.4 Hz, J' = 1.2 Hz, 1H, 2'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 17.3 (CH₂, C2), 23.4 (CH₃, 8'-CH₃), 26.4 (CH₂, C3), 27.3 (CH, C6'), 27.7 (CH₂, C7), 27.8 (CH, C10'), 29.2 (CH₂, C13'), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.0 (CH₂) (C4, C5, C6), 30.9 (CH₂, C8), 35.9 (CH₂), 36.0 (CH₂) (C7', C11'), 49.6 (CH₂, C9), 112.0 (C, C4a'), 117.6 (C, C5a'), 121.2 (C, C1), 121.9 (CH, C3'), 125.1 (CH, C9'), 134.6 (C, C8'), 137.4 (CH, C4'), 149.7 (C, C11a'), 152.3 (C, C12a'), 156.2 (CH, C2'), 157.4 (C, C5'); HRMS (ESI) calculated for (C₂₅H₃₂N₄ + H⁺): 389.2700, found 389.2692.

N-(6,7,10,11-Tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[b][1,8]naphthyridin-5-yl)nonane-1,9-diamine (**8a**)

A suspension of nitrile **7a** (608 mg, 1.56 mmol) in anhydrous Et₂O (27 ml) was cooled to 0°C with an ice bath and treated dropwise with LiAlH₄ (4 M solution in Et₂O, 1.21 ml, 4.84 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, then cooled to 0°C with an ice bath, diluted dropwise with 1 N NaOH (40 ml) and water (95 ml), and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 ml). The combined organic extracts were dried with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure to give a brown solid residue (584 mg), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 98:2:0.4, amine **8a** (189 mg, 31% yield) was isolated as a beige sticky solid; R_f = 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **8a** (19 mg, 0.05 mmol) in CH₂Cl₂ (2 ml) was filtered through a 0.2- μ m PTFE filter,

treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.15 ml) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 ml) to give, after drying at 65°C/2 Torr for 48 h, **8a**·2HCl (27 mg) as an orange solid: mp 173–176°C; IR (ATR) ν 3500–2500 (maximum at 3367, 3224, 2919, 2852, N–H, N⁺–H, C–H st), 1609, 1589, 1519 (ar–C–C and ar–C–N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.34–1.50 (complex signal, 10H, 3-H₂, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.59 (s, 3H, 8'-CH₃), 1.66 (m, 2H, 8-H₂), 1.88 (m, 2H, 2-H₂), 1.94 (br d, J = 18.0 Hz, 1H, 7'-H_{endo}), superimposed in part 1.95 (dm, J = 12.4 Hz, 1H, 13'-H_{syn}), 2.09 (dm, J = 12.4 Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.55 (dm, J = 18.0 Hz, 1H, 7'-H_{exo}), 2.77 (m, 1H, 10'-H), 2.84–2.94 (complex signal, 3H, 9-H₂, 11'-H_{endo}), 3.20 (dd, J = 17.6 Hz, J' = 5.6 Hz, 1H, 11'-H_{exo}), 3.45 (m, 1H, 6'-H), 4.00 (m, 2H, 1-H₂), 4.86 (s, NH, +NH), 5.59 (br d, J = 4.4 Hz, 1H, 9'-H), 7.60 (m, 1H, 3'-H), 8.85 (br d, J = 8.4 Hz, 1H, 4'-H), 8.91 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.5 (CH₃, 8'-CH₃), 27.4 (CH, C6'), 27.5 (CH₂, C3), 27.8 (CH, C10'), 28.0 (CH₂, C4), 28.6 (CH₂, C5), 29.3 (CH₂, C13'), 30.2 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.5 (CH₂) (C6, C7, C8), 31.2 (CH₂, C2), 36.0 (CH₂), 36.1 (CH₂) (C7', C11'), 40.9 (CH₂, C9), 49.3 (CH₂, C1), 112.0 (C, C4a'), 117.6 (C, C5a'), 122.0 (CH, C3'), 125.2 (CH, C9'), 134.6 (C, C8'), 137.6 (CH, C4'), 149.7 (C, C11a'), 152.2 (C, C12a'), 156.2 (CH, C2'), 157.4 (C, C5'); HRMS (ESI) calculated for (C₂₅H₃₆N₄ + H⁺) 393.3013, found 393.3022.

9,10-Dihydro-4,5-dihydroxy-9,10-dioxo-N'-{9-[(6,7,10,11-tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[b][1,8]naphthyridin-5-yl)amino]nonyl}anthracene-2-carboxamide (9a)

A suspension of rhein, **1** (80 mg, 0.28 mmol), in a mixture of EtOAc (2.3 ml) and DMF (0.3 ml) was treated with *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC (60 mg, 0.31 mmol), Et₃N (0.09 ml, 65 mg, 0.65 mmol) and 1-hydroxy-1*H*-benzotriazole, HOBT (52 mg, 0.38 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and treated with a suspension of amine **8a** (101 mg, 0.26 mmol) in a mixture of EtOAc (5 ml) and DMF (2.5 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 day and concentrated under reduced pressure, to give a dark brown oil (447 mg), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99:1:0.4, hybrid **9a** (152 mg, 90% yield) was isolated as a reddish solid; R_f = 0.75 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of hybrid **9a** (88 mg, 0.13 mmol) in CH₂Cl₂ (3 ml) was filtered through a 0.2- μ m PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.13 ml) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 ml) to give, after drying at 65°C/2 Torr for 48 h, **9a**·HCl (89 mg) as an orange solid: mp 173–176°C; IR (ATR) ν 3500–2500 (maximum at 3214, 2919, 2852, O–H, N–H, N⁺–H, C–H st), 1622, 1589 (C=O, ar–C–C, ar–C–N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.38–1.50 (complex signal, 10H, 3'-H₂, 4'-H₂, 5'-H₂, 6'-H₂, 7'-H₂), 1.59 (s, 3H, 8''-CH₃), 1.65 (m, 2H, 2'-H₂), 1.82–1.96 (complex signal, 3H, 8'-H₂, 13''-H_{syn}), 1.94 (br d, J = 16.8 Hz, 1H, 7''-H_{endo}), 2.08 (dm, J = 12.4 Hz, 1H, 13''-H_{anti}), 2.53 (dm, J = 16.8 Hz, 1H, 7''-H_{exo}), 2.76 (m, 1H, 10''-H), 2.87 (br d, J = 18.0 Hz, 1H, 11''-H_{endo}), 3.16 (dd, J = 18.0 Hz, J' = 5.6 Hz, 1H, 11''-H_{exo}), superimposed in part 3.38 (m, 1H, 6''-H), 3.41 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 1'-H₂), 3.93 (br t, J = 6.0 Hz, 2H, 9'-H₂), 4.85 (s, OH, NH, +NH), 5.59 (br d, J = 5.2 Hz, 1H, 9''-H), 7.37 (dd, J = 7.6 Hz, J' = 2.4 Hz, 1H, 6-H), 7.51 (dd, J = 8.8 Hz, J' = 4.0 Hz, 1H, 3''-H), 7.69 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 3-H), 7.74–7.81 (complex signal, 2H, 7-H, 8-H), 8.14 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 1-H), 8.74 (dd, J = 8.8 Hz, J' = 1.6 Hz, 1H, 4''-H), 8.84 (dd, J = 4.0 Hz, J' = 1.6 Hz, 1H, 2''-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.5 (CH₃, 8''-CH₃), 27.2 (CH, C6''), 27.7 (CH, C10''), 27.78 (CH₂), 27.84 (CH₂) (C6', C7'), 29.2 (CH₂, C13''), 30.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.4 (CH₂) (C2', C3', C4', C5'), 31.0 (CH₂, C8'), 35.9 (2CH₂, C7'', C11''), 41.5 (CH₂, C1'), 49.3 (CH₂, C9'), 111.7 (C, C4a''), 116.6 (C, C10a), 117.5 (C, C5a''), 118.1 (C, C4a), 118.9 (CH, C1), 120.8 (CH, C8), 121.8 (CH, C3''), 123.7 (CH, C3), 125.1 (CH, C9''), 125.8 (CH, C6), 134.3 (C, C8''), 134.6 (C, C8a), 134.7 (C, C9a), 137.2 (CH, C4''), 138.7 (CH, C7), 143.5 (C, C2), 149.4 (C, C11a''), 152.1 (C, C12a''), 156.0 (CH, C2''), 157.1 (C, C5''), 163.2 (C, C4), 163.5 (C, C5), 166.9 (C, CONH), 181.6 (C, C9), 193.2 (C, C10); HRMS (ESI) calculated for (C₄₀H₄₂N₄O₅ + H⁺) 659.3228, found 659.3230; HPLC purity: 99.8%.

Biological studies

Assay of inhibition of AChE & BChE

The inhibitory activity toward hAChE and hBChE was evaluated spectrophotometrically by the method of Ellman *et al.* [24], as described in [25,26].

Stock solutions of compounds (1 mM) were prepared in MeOH and diluted in the same solvent. Assay solutions consisted of 340 μ M 5,5'-dithio-*bis*(2-nitrobenzoic acid), 0.02 unit/ml of human recombinant AChE (Sigma, Milan, Italy) or BChE

from human serum (Sigma, Milan, Italy) and 550 μM of substrate (acetylthiocholine iodide or butyrylthiocholine iodide, respectively) in a 0.1 M phosphate-buffered saline pH 8.0 with or without an inhibitor. Each sample was preincubated at 37°C for 20 min before the addition of the substrate. The rate of substrate hydrolysis was determined by monitoring the increase in the absorbance at 412 nm for 210 s by a Jasco V-530 double beam spectrophotometer. The percentage of inhibition was calculated by comparing the rate of hydrolysis in the absence and in the presence of an inhibitor. IC_{50} values were calculated using Microcal Origin 3.5 software (Microcal Software, Inc.).

Kinetic study of hAChE inhibition by hybrid **9a**

The mechanism of action of hybrid **9a** was studied by constructing reciprocal plots of $1/\text{velocity}$ versus $1/[\text{substrate}]$ at a relatively low concentration of the substrate (0.557–0.111 mM) and final inhibitor concentrations in the range 35.1–175 nM. The evaluation was performed on human recombinant AChE (Sigma) following the procedure described in [15]. The inhibition constant (K_i) was calculated by replotting slopes of lines from the Lineweaver–Burk plot versus inhibitor concentration while K'_i was determined from the $1/v_{\text{max}}$ versus $[I]$ plot.

Assay of inhibition of BACE-1

This assay was performed as described in [15], using β -secretase 1 (BACE-1, Sigma) and the peptide methoxycoumarin-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys-dinitrophenyl (M-2420, Bachem, Germany), which mimics the APP sequence, as the substrate. The assay solution was prepared by adding 5 μl of the target compounds or DMSO (control) and 175 μl of BACE-1 to 20 mM sodium acetate at pH 4.5 containing CHAPS3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 0.1% w/v and was preincubated for 1 h at room temperature, before the addition of the substrate (3 μM , final concentration). The substrate was left to react for 15 min at 37°C, then the fluorescence signal was read at $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$). The percentage of inhibition was obtained by comparing the fluorescent intensities with (IF_i) and without inhibitor (IF_o) following the expression: $100 - (\text{IF}_i/\text{IF}_o \times 100)$. It was not possible to determine IC_{50} values due to interferences in fluorescence emission of compounds at higher concentrations.

Assay of inhibition of A β 42 & tau aggregation in *E. coli* cells that overexpress A β 42 & tau

These assays were conducted as described in [27]. *E. coli* BL21 (DE3) competent cells were transformed with

the pET28a vector (Novagen, Inc., WI, USA), which carries the DNA sequence of A β 42, or with pTARA, which contains the RNA polymerase gene of T7 phage (T7RP) under the control of the promoter PBAD, and then transformed with the vector pRKT42, which encodes four repeats of tau protein in two inserts. A volume of 10 ml of M9 minimal medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin (for A β 42 overexpression) or 0.5% of glucose, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ampicillin and 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of chloramphenicol (for tau overexpression) were inoculated with a colony of BL21 (DE3) cells bearing the plasmids. The volume of overnight culture necessary to obtain a 1:500 dilution was added into fresh M9 minimal medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin and 250 μM of thioflavin-S (Th-S; T1892, Sigma, MO, USA) (for A β 42 overexpression) or 0.5% of glucose, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ampicillin, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of chloramphenicol and 250 μM of Th-S (for tau overexpression). The cultures were grown overnight at 37°C and 250 $\times g$ r.p.m. until cell density reached $\text{OD}_{600} = 0.6$. A volume of 980 μl of the cultures was transferred into 1.5-ml eppendorf tubes that contained 10 μl of a solution of the target compound in DMSO and 10 μl of isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside at 100 mM (for A β 42 overexpression) or 10 μl of arabinose at 25% (for tau overexpression), so that a final inhibitor concentration of 10 μM was reached. The resulting cultures were grown overnight at 37°C and 1400 $\times g$ r.p.m. with a Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany). The same amount of DMSO without the target compound was added to the sample as negative control (maximal amount of A β 42 or tau), whereas noninduced samples (in the absence of isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside or arabinose) were prepared as positive controls (absence of A β 42 or tau) and to assess the potential intrinsic toxicity of the target compounds.

The fluorescence assay to assess the effects of the target compounds on A β 42 or tau aggregation was performed as described in [27], using a 2500-mM stock solution of Th-S (T1892, Sigma) in double-distilled water (Milli-Q system, Millipore, MA, USA), and measuring the Th-S spectra on an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrophotometer (Aminco-Bowman AB2, SLM Aminco, NY, USA) in the range 460–600 nm at 25°C, with an excitation wavelength of 440 nm, a slit width of 4 nm and an emission wavelength of 485 nm.

Assay of antioxidant activity

Sample pretreatment

Samples (1 mg) were weighed and homogenized with EtOH (1 ml). The homogenate was sonicated for 5 min and filtered through a 0.22- μm PTFE filter from Waters (CT, USA) into a 2-ml amber vial. All the compounds were analyzed in triplicate for each assay.

Free radical scavenging capacity

The free radical scavenging activity of the modified huprines and the novel rhein–huprine hybrids was quantified using a six-point calibration curve (125–750 μM of trolox [Sigma-Aldrich, Madrid, Spain]) prepared with 1 mM of trolox (Sigma-Aldrich) solution in EtOH. Each point was prepared in triplicate. The calibration curve was plotted using the difference of absorbance of the radical ABTS^{•+} or DPPH[•] before reaction and at the end of the reaction versus trolox concentration. The results are expressed as trolox equivalents (μmol of trolox/ μmol of the tested compound).

ABTS^{•+} assay

This assay was performed as described in [25]. Briefly, a 5-mm stock solution of ABTS (Sigma-Aldrich) in MeOH was passed through manganese dioxide powder (Sigma-Aldrich) to generate the ABTS^{•+} radical cations, and was filtered through a 0.22- μm PTFE filter. A volume of 245 μl of this solution was added to 5 μl of trolox or to samples. The resulting solution was stirred for 30 s, shaken vigorously and kept in the dark for 1 h. Absorption of the samples was measured on a UV/VIS Thermo Multiskan Spectrum spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) at a wavelength of 734 nm [28].

DPPH assay

A volume of 5 μl of samples or trolox was mixed with 250 μl of methanolic DPPH (Extrasynthèse, Genay, France; 0.025 g/l). The homogenate was shaken vigorously and kept in darkness at room temperature for 30 min. Absorption of the samples was measured on the spectrophotometer at 515 nm [28].

Analysis of total polyphenols

For the TP assay, each sample was analyzed three-times; 20 μl of the samples was mixed with 188 μl of Milli-Q water in a thermo microtiter 96-well plate (nuncTM, Roskilde, Denmark), and 12 μl of Folin-Ciocalteu (F-C) reagent (Sigma-Aldrich) and 30 μl of sodium carbonate (200 g/l) were added following a described procedure [28]. The mixtures were incubated for 1 h at room temperature in the dark. After the reaction period, 50 μl of Milli-Q water was added and the absorbance was measured at 765 nm in a UV/Vis Thermo Multiskan Spectrum spectrophotometer. The same reaction was performed without F-C reagent to subtract color interferences of the compounds. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents/g sample.

BBB permeation assay

The brain penetration of the synthesized hybrids was assessed using the PAMPA for BBB developed by

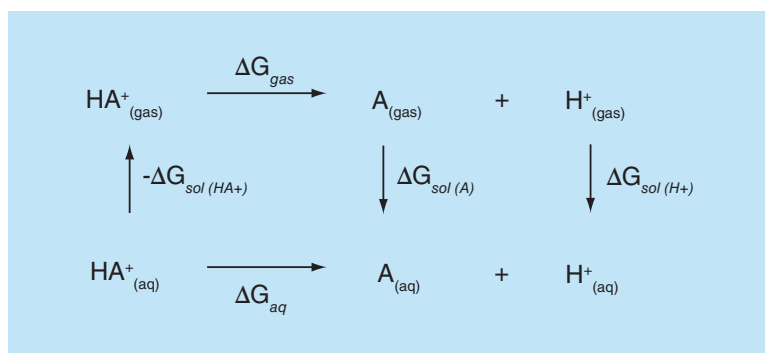


Figure 3. Thermodynamic cycle used for pK_a calculations.

Di *et al.* [29], by measuring the *in vitro* permeability (P_c) of the target compounds and 14 commercial drugs (for assay validation) through a lipid extract of porcine brain membrane in phosphate-buffered saline/EtOH 70:30 as described in [25]. The thresholds for high (CNS+), low (CNS-) and uncertain (CNS \pm) BBB permeation were established at P_c (10^{-6} cm/s) >5.1, <2.1 and 2.1–5.1, respectively.

Molecular modeling

pK_a calculation

The pK_a of the modified huprines was estimated using the thermodynamic cycle, as shown in Figure 3, following previous studies in the literature [30–34].

The geometries of protonated (HA^+) and non-protonated (A) compounds were optimized at the B3LYP/6–31G(d) level [35–37], and the minimum energy nature of the stationary points was verified from the analysis of the vibrational frequencies. The free energy change in the gas phase (ΔG_{gas}) was refined through extrapolation to the complete basis set (E_{CBS} ; Equation 1):

$$E_{\text{CBS}} = E_{\text{HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta\text{CCSD}$$

The Hartree–Fock energy (E_{HF}) was obtained from single-point calculations with the cc-pVTZ basis, and the correlation energy (E_{corr}) was determined by combining MP2 and HF energies with double-zeta and triple-zeta Dunning’s consistent basis sets (Equation 2):

$$E_{\text{corr}} = \frac{(E_{\text{MP2/TZ}} - E_{\text{HF/TZ}})3^3 - (E_{\text{MP2/DZ}} - E_{\text{HF/DZ}})2^3}{3^3 - 2^3}$$

The high-order electron correlation correction (ΔCCSD) was determined from coupled cluster (single and double excitations) calculations using the 6–31G(d) basis set (Equation 3):

$$E_{\text{SCS-MP2}} = E_{\text{HF}} + \frac{1}{3}(E_{\text{corr}}(\text{alfa-alfa}) + E_{\text{corr}}(\text{beta-beta})) + \frac{6}{5}E_{\text{corr}}(\text{alfa-beta})$$

The spin-component scaled MP2 correction (SCS-MP2) was used in all MP2 calculations (Equation 4) [38]:

$$\Delta G_{\text{gas}} = G_{\text{gas,H}^+} + G_{\text{gas,A}} - G_{\text{gas,HA}^+}$$

Finally, the free energies in the gas phase (ΔG_{gas}) were obtained by adding the thermal and entropic corrections, which were estimated within the harmonic oscillator-rigid rotor approximation at 1 atm and 298 K, and the experimental free energy of the proton in the gas phase ($G_{\text{gas,H}^+} = -6.28$ kcal/mol) [39–42]:

$$\Delta G_{\text{aq}} = -\Delta G_{\text{sol,HA}^+} + \Delta G_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{sol,H}^+} + \Delta G_{\text{sol,A}}$$

To estimate the free energy change in solution (ΔG_{aq}), ΔG_{gas} was corrected by the change in the standard state from 1 atm to 1 M conditions, and by adding the solvation free energies of protonated ($\Delta G_{\text{sol,HA}^+}$) and non-protonated ($\Delta G_{\text{sol,A}}$) compounds determined with the MST (B3LYP/6–31G(d)) continuum method [43] and the experimental solvation free energy of the proton ($\Delta G_{\text{sol,H}^+} = -265.9$ kcal/mol) [44]. Finally, pK_{a} was estimated as:

$$\text{pK}_{\text{a}} = \frac{\Delta G_{\text{aq}}}{RT \ln(10)}$$

Modeling of the ligand-bound complex

The role of secondary interactions in the binding of the modified huprines to human AChE, BChE and BACE-1 was examined by means of quantum mechanical (QM) computations using reduced models of the binding site.

Regarding the binding to the catalytic site of AChE, we first compared the structural features of the binding pocket of human AChE bound with huprine W (PDB code: 4BDT) [45] with the apo form of the human enzyme (PDB code: 4PQE), as well as with the *Torpedo californica* AChE complex with huprine X (PDB code 1E66) (see Supplementary Figure 1) [18]. This analysis revealed that the relative arrangement of all residues in the binding pocket is well preserved, showing a common geometrical arrangement for the residues around the heterocyclic ring of huprine. The only exception is Tyr337 in hAChE, since the positional root-mean-square deviation (RMSD) of the benzene ring relative to Phe330 in *T. californica* AChE is 1.3 Å, which reflects the influence originated from the presence of the hydroxyl group in Tyr337.

Huprine W was replaced by the optimized geometries of huprine X and the modified huprine in the binding pocket of hAChE. All the residues located at 4 Å from the ligand were extracted to build up the binding site model used in QM calculations (Supplementary Table 2).

A similar procedure was adopted to build up the reduced model of the binding pocket that accommodates the modified huprine in BChE and BACE-1. With regard to BChE, the model was built up using the x-ray structure of the complex with tacrine (PDB entry 4BDS) [45]. Taking advantage of this structure, calculations were performed for tacrine and its naphthyridine analog, as well for **6a** and huprine X, albeit for this latter compound the chlorine atom at position 3 was not considered, since it is known that it would collide with the side chain of Met437, which is replaced by Pro446 in hAChE [18]. On the other hand, due to the lack of experimentally derived structural information about the binding mode of huprine Y to the enzyme, we used the energy-minimized average snapshot of molecular dynamics simulation run for the lead rhein–huprine hybrid **3**, which takes into account two potential orientations of the enantiomeric forms of the huprine Y moiety bound to BACE-1. The residues used to build up the reduced models of the binding site are indicated in Supplementary Table 2.

The geometries of the molecular fragments in the binding pocket were separately optimized at the M062X/6–31G(d) level, and the optimized geometries were superposed onto the corresponding amino acids taken from the reference structure of the ligand–enzyme complex. Single-point M062X/6–31G(d) calculations [46] were performed to evaluate the interaction energy with the bound ligand, taking into account the correction due to basis set superposition effects (BSSE), which were corrected by using the counterpoise correction [47].

Results & discussion

Design

For the design of the novel rhein–huprine hybrids with varied basicities, we envisaged the replacement of the chlorobenzene ring of the huprine Y moiety of hybrid **3** by other aromatic or heteroaromatic rings, and then a selection was made on the basis of the calculated pK_{a} values of the corresponding modified huprines. The pK_{a} values of the modified huprine moieties were estimated from high-level QM computations, which combine MP2 calculations with extrapolation to complete basis set effects, higher-order electron correlation effects at the CCSD level and solvation effects through continuum solvation models. The reliability of this strategy is supported by the comparison of calculated and reported experimental pK_{a} values of quinoline, 1,8-naphthyridine and tacrine (see Supplementary Table 1), as the calculated values differ on average from the experimental ones by 1.2 pK_{a} units. Calculations were performed both for different unsubstituted monomeric modified huprines as well as their corresponding derivatives

methylated at the exocyclic primary amino group, in order to take into account the effect of the methylenic linker of the hybrids. We found that methylation of the primary amino group consistently led to a reduction of *ca.* 1 pK_a unit.

Using this protocol, we selected the naphthyridine-based huprine **6a** (Figure 3, calculated pK_a of the methylated derivative = 9.2) and the methoxyhuprine **6d** (calculated pK_a of the methylated derivative = 8.8), which were predicted to be slightly more basic than huprine Y (calculated pK_a of the methylated derivative = 8.2), and the 1,4-difluorohuprine **6b** (calculated pK_a of the methylated derivative = 7.0) and the thienohuprine **6c** (calculated pK_a of the methylated derivative = 6.7), with reduced basicity compared with huprine Y.

Taking into account the range of calculated pK_a values, all the novel rhein–huprine hybrids **9a–d** (Figure 3) should be protonated in the acidic endosomal compartments (pH 4.5–6.5) where BACE-1 localizes and is optimally active [48–50], and, hence, they should retain the ability to establish a salt bridge with the aspartate residues of the catalytic dyad of BACE-1. Likewise, at physiological pH and at the experimental conditions for evaluation of the AChE inhibitory activity (pH 8.0), the most basic huprines **6a** and **6d** and the corresponding hybrids **9a** and **9d** should be mostly protonated, with consequent positive implications regarding AChE inhibition but possible issues regarding membrane permeability or P-gp efflux liability. In contrast, the least basic huprines **6b** and **6c** and the hybrids **9b** and **9c** should predominate in the neutral form in both conditions, which might be detrimental for AChE inhibition but favorable for tissue distribution.

Chemistry

The target rhein–huprine hybrids were prepared through the four-step synthetic sequence depicted in Figure 3. Friedländer condensation of enone **4** [51] with the adequate aminonitrile **5** (Figure 3) under AlCl₃ catalysis afforded the known huprine **6a** [52] and the novel huprines **6b–d** in 37–80% yield. Alkylation of the modified huprines **6a–d** with 9-bromononanenitrile led to the nitriles **7a–d** (29–82% yield), which were reduced with LiAlH₄ to the corresponding primary amines **8a–d** (31–100% yield). Final amide coupling of rhein with amines **8a–d** in the presence of EDC, HOBt and Et₃N afforded the target rhein–huprine hybrids **9a–d** in moderate to good yields (45–90%).

All the novel compounds were converted into the corresponding hydrochloride or dihydrochloride salts for chemical characterization and biological profiling (huprines **6a–d** and hybrids **9a–d**).

Biology & molecular modeling studies

The novel rhein–huprine hybrids **9a–d** were tested for their inhibitory activities against hAChE, hBChE, hBACE-1 and Aβ42 and tau aggregation, as well as for their antioxidant activity and brain permeability (Table 1). For comparison purposes, the modified huprines **6a–d** were also tested in most of these assays. Likewise, the activities of rhein (**1**), huprine Y (**2**) and the lead rhein–huprine hybrid **3**, as well those of tacrine, bis(7)tacrine and gallic acid as reference compounds are also included in Table 1.

It is well known that the best substitution pattern for a high AChE inhibitory activity in huprines involves the presence of a chlorine atom at position 3, as in huprine Y and its 9-ethyl analog huprine X, which are the most potent huprines developed so far [55]. Introduction of other substituents at the benzene ring [56,57] or replacement of the chlorobenzene ring of huprine Y by different heteroaromatic systems [52] results in a drop of activity. Even though a lower AChE inhibitory activity of the modified huprines **6a–d** and the corresponding rhein–huprine hybrids **9a–d**, compared with huprine Y and the lead rhein–huprine Y hybrid **3**, might have been anticipated, the novel hybrids might be endowed with a more balanced multitarget profile. In the event, huprines **6a–d** and rhein–huprine hybrids **9a–d** were clearly less potent hAChE inhibitors than huprine Y and **3**, with IC₅₀ values spanning from the submicromolar to low micromolar range, in most cases (Table 1). The most potent hybrid of the new series was the naphthyridine derivative **9a**, which displayed a good hAChE inhibitory activity (IC₅₀ = 180 nM).

As previously mentioned, the presence of a net positive charge at the quinoline nitrogen atom of the huprine moiety is important for AChE inhibition, as one of the key features that mediate binding to the AChE catalytic site is the formation of a hydrogen-bond interaction between that protonated nitrogen and the carbonyl group of His447. Furthermore, the positive charge is stabilized by the formation of cation–π interactions with the electron density of the indole ring of Trp86 and the benzene ring of Tyr337. Accordingly, the most basic rhein–huprine hybrids, **9a** (calculated pK_a = 9.2) and **9d** (calculated pK_a = 8.8), which should be mostly protonated under the experimental conditions used for the evaluation of AChE inhibitory activity (pH = 8.0), should benefit from these stabilizing interactions with AChE, whereas the opposite should apply to the least basic hybrids, **9b** (calculated pK_a = 7.0) and **9c** (calculated pK_a = 6.7), which will be mostly in the neutral form. In agreement with these considerations, hybrids **9a** and **9d** are clearly more potent hAChE inhibitors than **9b** and **9c**.

The lower inhibitory potency of hybrids **9a** and **9d** compared with the lead **3** may be ascribed to less favor-

Table 1. Inhibitory activities against acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, β -secretase 1, and A β 42 and tau aggregation, antioxidant activities and parallel artificial membrane permeability assay's permeabilities of the hydrochlorides of huprines 6a–d and rhein–huprine hybrids 9a–d and reference compounds.

Compound	hAChE IC ₅₀ (μ M) [†]	hBChE IC ₅₀ (μ M) [†]	hBACE-1 (% inhibition) [‡] or IC ₅₀ (μ M) [†]	A β 42 aggregation (% inhibition) [§]	Tau aggregation (% inhibition) [§]	ABTS ^{•+} (Trolox equiv) [¶]	DPPH (Trolox equiv) [¶]	Total phenolics (mg gallic acid equivalent/g sample) [¶]	P _e [#] (10 ⁻⁶ cm/s, prediction)
6a	0.66 ± 0.04	0.21 ± 0.01	–	1.0 ± 3.9	3.6 ± 1.8	3.9 ± 0.8	5.5 ± 0.3	34.1 ± 0.7	11.6 ± 1.4 (CNS+)
6b	1.25 ± 0.17	1.68 ± 0.14	–	1.1 ± 5.0	7.7 ± 2.9	5.1 ± 0.3	6.0 ± 0.2	37.7 ± 3.9	10.6 ± 0.8 (CNS+)
6c	2.61 ± 0.17	0.53 ± 0.05	–	-3.7 ± 0.9	2.6 ± 3.6	4.8 ± 0.4	3.9 ± 0.3	152 ± 5.7	18.6 ± 1.4 (CNS+)
6d	5.16 ± 0.44	2.90 ± 0.02	–	-5.4 ± 2.1	12.8 ± 4.5	5.0 ± 0.2	2.6 ± 0.1	90.1 ± 6.2	16.8 ± 1.3 (CNS+)
9a	0.18 ± 0.01	2.55 ± 0.26	na ^{††}	46.2 ± 3.9	34.2 ± 1.9	10.4 ± 0.9	12.7 ± 0.4	37.9 ± 3.2	10.5 ± 0.8 (CNS+)
9b	18.5 ± 1.5	>10 ^{**}	22.0 ± 0.1%	36.2 ± 2.5	26.4 ± 1.7	11.8 ± 0.6	13.4 ± 0.6	41.3 ± 4.0	9.1 ± 0.1 (CNS+)
9c	>10 ^{§§}	40.8 ± 8.9	(0.49 ± 0.08) ^{¶¶}	23.9 ± 1.1	40.7 ± 2.2	20.7 ± 2.5	12.4 ± 0.4	99.9 ± 5.0	8.4 ± 0.8 (CNS+)
9d	1.40 ± 0.24	100 ± 9	nd ^{##}	40.0 ± 2.7	52.4 ± 1.9	21.6 ± 1.2	12.4 ± 1.0	10.7 ± 1.2	10.4 ± 0.8 (CNS+)
1	>10	17.0 ± 4.22	na ^{††}	49.9 ± 6.4	40.8 ± 0.7	4.0 ± 0.2	5.8 ± 0.3	29.5 ± 2.0	2.7 ± 0.1 (CNS±)
2	0.001 ^{†††}	0.18 ± 0.01	14.0 ± 0.5% ^{†††}	8.9 ± 1.3	7.6 ± 3.4	2.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	10.2 ± 1.3	23.8 ± 2.7 (CNS+)
3	0.004 ^{§§§}	0.62 ± 0.02	0.12 ± 0.09	47.9 ± 14.5	29.6 ± 8.5	–	–	–	21.5 ± 0.7 (CNS+)
Tacrine	0.32 ^{¶¶¶}	0.024 ^{¶¶¶}	na	<10	<10	–	–	–	–
bis(7)-tacrine	0.00081 ^{####}	0.00566 ^{####}	7.50 ± 0.40 ^{####}	–	–	–	–	–	–
Gallic acid	–	–	–	–	–	12.5 ± 0.4	9.7 ± 0.4	1004 ± 3.1	–

[†]IC₅₀ inhibitory concentration (μ M) of human recombinant AChE, human serum BChE or human recombinant BACE-1. Values are expressed as mean ± SEM of at least two experiments, each performed in duplicate or triplicate.

[‡]% inhibition of BACE-1 at 1 μ M.

[§]% inhibition of A β 42 and tau aggregation in intact *Escherichia coli* cells with inhibitor at 10 μ M. Values are expressed as mean ± SEM of four independent experiments (n = 4).

[¶]Antioxidant capacity measured through ABTS^{•+}, DPPH and total phenolics assays. Values expressed as means ± SD of three experiments.

[#]Permeability values from the PAMPA-BBB assay. Values are expressed as the mean ± SD of three independent experiments.

^{††}na: Not active.

^{**}22.5% inhibition at 10 μ M.

^{§§}15.2% inhibition at 15 μ M.

^{¶¶}Value extrapolated from 4–80 nM inhibitor concentration range (beyond this range, spectroscopic interferences arose).

^{##}nd: Not detectable.

^{†††}IC₅₀ = 1.07 ± 0.05 nM.

^{####}14% Inhibition at 5 μ M.

^{§§§}IC₅₀ = 3.60 ± 0.21 nM.

^{¶¶¶}IC₅₀ hAChE = 317 ± 15.3 nM, IC₅₀ hBChE = 24.5 ± 0.6 nM, from [53].

^{####}IC₅₀ hAChE = 0.81 ± 0.09 nM, IC₅₀ hBChE = 5.66 ± 0.15 nM, from [54].

BBB: Blood–brain barrier; hAChE: Human acetylcholinesterase; hBChE: Human butyrylcholinesterase; PAMPA: Parallel artificial membrane permeability assay; SD: Standard deviation; SEM: Standard error of the mean.

able specific interactions in the binding site. In particular, for hybrid **9d**, assuming that the methoxyquinoline system binds the AChE catalytic site with the usual pattern of intermolecular interactions of huprines, the presence of the methoxy group would lead to a steric clash with the indole ring of Trp439, which might account for its lower anticholinesterase activity compared with hybrid **3**, featuring a huprine Y moiety. However, no apparent steric conflict can be observed at first sight for the naphthyridine derivative (**9a**). For this reason, and taking into account that **9a** was the most potent hAChE inhibitor of the new series of rhein–huprine hybrids, we studied the role of secondary interactions in its binding with AChE by means of QM computations using reduced models of the binding site (see the ‘Materials & methods’ section). The reduced activity of **9a** compared with **3** might be attributed to the absence of the chlorine atom present at position 3 of huprine Y and X, which fills a hydrophobic pocket formed by Pro446, Trp439 and Met443, as well as to unfavorable secondary interactions with the lone pair of His447 carbonyl oxygen (Figure 4). Thus, in the x-ray structure of the complex *T. californica*/huprine X this atom forms a hydrogen bond with the protonated nitrogen of huprine X (distance of 2.8 Å), an interaction that is stabilized with the favorable secondary interaction with the C–H bond at position 4 (distance of 3.4 Å). However, replacement of the chloroquinoline moiety of huprine X or Y by a naphthyridine system should weaken the binding due to the electrostatic repulsion between the lone pairs of the nitrogen atom and of the His447 carbonyl oxygen. Indeed, QM calculations point out that the BSSE-corrected interaction energy is estimated to be 3.3 kcal/mol less favorable for the naphthyridine analog compared with huprine Y. Finally, it is worth noting that the predicted desolvation cost is also larger for the naphthyridine derivative, as noted in the fact that the change in water → octanol solvation free energy ($\Delta G_{\text{wat} \rightarrow \text{oct}}$) is disfavored by 1.7 kcal/mol for the naphthyridine moiety.

The mechanism of hAChE inhibition by hybrid **9a**, the most potent hAChE inhibitor of the series, was investigated. As expected, kinetic studies showed that **9a** acted as a mixed-type inhibitor of hAChE (Figure 5), as previously found for the lead compound **3** [15] and for structurally related rhein–tacrine hybrids [58]. The inhibitor dissociation constant (K_i) and the dissociation constant for the enzyme–substrate–inhibitor complex (K'_i) were estimated to be 0.130 and 0.237 μM , respectively.

Unlike most huprines developed so far, which are selective for AChE over BChE inhibition, the IC_{50} values determined against these enzymes for huprines **6a–6d** are quite similar. In fact, **6a**, **6c** and **6d** are twofold to fivefold more potent against hBChE than

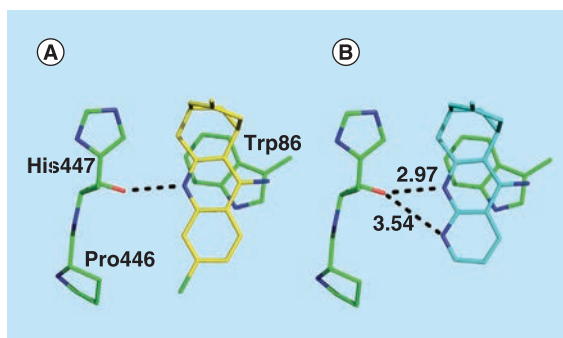


Figure 4. Binding mode of huprine Y and the modified huprine 6a within hAChE. Representation of selected key interactions that modulate the binding of (A) huprine Y (carbon atoms in yellow) and (B) huprine 6a (carbon atoms in blue) to the catalytic site of hAChE. Binding involves cation– π interactions of the positively charged heteroaromatic ring of huprine with both Trp86 and Tyr337. A hydrogen bond with the carbonyl oxygen of His447 is formed. Replacement of the CH bond in position 4 of huprine Y by a nitrogen atom in the naphthyridine analog **6a** leads to unfavorable secondary interactions with the lone pairs of the His447 carbonyl oxygen (distances in Å). For the sake of clarity, hydrogen atoms are omitted. hAChE: Human acetylcholinesterase.

against hAChE, whereas **6b** was roughly equipotent toward both enzymes. This effect can be attributed to the absence of the chlorine atom which is present at position 3 of huprine Y, **2**. Thus, although huprine Y is 600-fold more potent against hAChE than **6a**, the steric hindrance of the chlorine atom with Met437

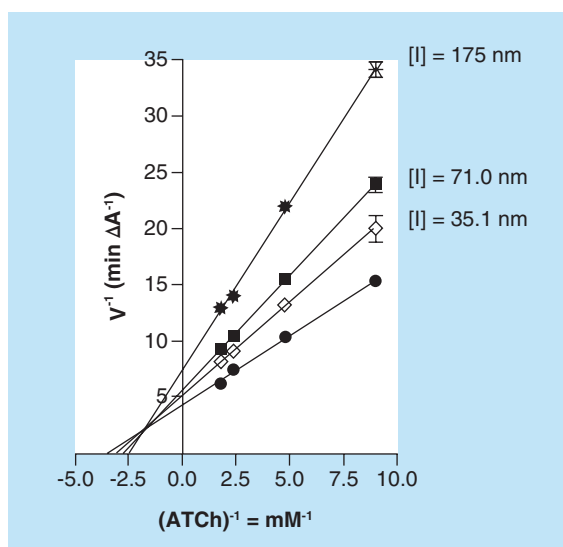


Figure 5. Mechanism of human acetylcholinesterase inhibition by 9a. Overlaid Lineweaver–Burk reciprocal plots showing the variation of the initial velocity (v) as a function of increasing substrate (ATCh) concentrations in the absence and in the presence of increasing concentrations of **9a**. ATCh: Acetylthiocholine iodide.

in hBChE reduces the inhibitory potency, making huprine Y and **6a** almost equipotent against this latter enzyme. The most potent modified huprine, **6a** ($IC_{50} = 0.21 \mu M$), is nearly tenfold less potent than tacrine ($IC_{50} = 24.5 nM$ [53]), which may be attributed, at least in part, to the destabilizing electrostatic repulsion between the lone pairs of the nitrogen atom in the naphthyridine moiety and of the His438 carbonyl oxygen. Indeed, QM calculations point out that the BSSE-corrected interaction energy is 1.0 kcal/mol less favorable for tacrine than for its naphthyridine analog (a similar destabilization is found between the dechlorinated huprine X and its naphthyridine analog; see Supplementary Figure 2). In contrast, hybrids **9a–d** were selective hAChE inhibitors, as they displayed micromolar IC_{50} values against hBChE (Table 1). Again, hybrid **9a** was the most potent of the series against hBChE, with a one-digit micromolar potency ($IC_{50} = 2.55 \mu M$).

The evaluation of the BACE-1 inhibitory activity of the novel hybrids turned out to be troublesome, due to interferences in fluorescence emission of these compounds at concentrations above 1 or 5 μM , which precluded the determination of IC_{50} values. Anyway, we could measure BACE-1 inhibitory activity for hybrids **9b** (22% inhibition at 1 μM) and **9c** (34% inhibition at 80 nM), whereas **9a** and **9d** seemed to be essentially inactive. Gratifyingly, in the case of the most potent hybrid, **9c**, an interesting IC_{50} value of 490 nM could be extrapolated (Table 1).

As previously mentioned, all the novel rhein–huprine hybrids must be protonated at the acidic pH adopted in experimental assays for the evaluation of BACE-1 inhibitory activity, which mimics the acidic conditions of the endosomal compartments where BACE-1 localizes and, hence, in optimal conditions to interact with the enzyme catalytic dyad. Therefore, the decrease in inhibitory potency relative to the lead hybrid **3** may be ascribed to specific interactions formed at the binding site. In this regard, the lower inhibitory potency of the most potent compound, **9c**, likely arises from unfavorable electrostatic interactions with the dyad formed by Asp32 and Asp228 (Figure 6), as the interaction energy of **9c** is destabilized relative to the binding of the two enantiomeric forms of huprine Y (by 0.6 and 2.8 kcal/mol). Similarly, the lower inhibitory activity of **9a** could be attributed to the larger electrostatic repulsion originated from the lone pair of the pyridine-type nitrogen of the naphthyridine ring. On the other hand, desolvation of **9c** is also predicted to be slightly disfavored relative to huprine Y, as the $\Delta G_{\text{wat} \rightarrow \text{oct}}$ value is estimated to be 1 kcal/mol more favorable for the latter compound.

The inhibitory activity of the novel rhein–huprine hybrids and the monomeric huprines against the

aggregation of A β 42 and tau was assessed in an *in vitro* cell-based model that uses *E. coli* cells genetically modified to overexpress either one or the other amyloidogenic protein [59,60]. Interestingly, the novel rhein–huprine hybrids retained the A β 42 antiaggregating activity of lead compound **3** and showed slightly increased tau antiaggregating potency, with percentages of inhibition of A β 42 and tau aggregation of 24–46% and 26–52%, respectively, for an inhibitor concentration of 10 μM (Table 1). The most potent A β 42 (**9a**, 46.2% inhibition) and tau (**9d**, 52.4% inhibition) antiaggregating compounds of the series are endowed with IC_{50} values close to 10 μM . As expected, the modified huprines **6a–d** were essentially inactive, as previously found for huprine Y and structurally related compounds such as tacrine and 6-chlorotacrine [15,25,27,61]. Altogether, these results are in line with previous reports from our group, which suggest the need of homo- or heterodimeric structures ended with two aromatic systems for A β 42 and tau antiaggregating activity [15,25,27,61].

Because of the presence of phenolic groups in the rhein moiety of hybrids **9a–d**, we inferred that they might display antioxidant activity, which would be a very valuable component of their multitarget profile due to the prominent role that oxidative stress seems to play in AD pathogenesis [62,63]. Indeed, it has been recently reported that rhein exhibits reactive oxygen species and free radical scavenging activity [64–66]. Also, we have reported that huprine Y and a class of huprine-based hybrids featuring a phenolic moiety display antioxidant activity [25]. The putative antioxidant activity of the novel rhein–huprine hybrids **9a–d**, the modified huprines **6a–d** and rhein, **1**, was assessed by the ABTS⁺, DPPH and F-C (total phenolics) assays. The known antioxidants, gallic acid, a naturally occurring phenolic acid, and trolox, a water-soluble derivative of vitamin E, were also tested as reference compounds. As expected, rhein and huprines, **6a–d**, exhibited a remarkable antioxidant activity, which was particularly high in the ABTS⁺ and DPPH assays (3–6 trolox equivalents [$\mu\text{mol trolox}/\mu\text{mol tested compound}$]) (Table 1). Interestingly, the rhein–huprine hybrids **9a–d** displayed a very potent antioxidant activity, with these compounds being 10–22-fold and 12–13-fold more potent than trolox in the ABTS⁺ and DPPH assays, respectively, and slightly more potent than gallic acid.

A necessary, even though not sufficient, attribute for a drug candidate purported to treat AD is the ability to cross the BBB. The relatively high molecular weight of compounds resulting from molecular hybridization, like the novel rhein–huprine hybrids, can be regarded as an inherent liability that might compromise their

ability to cross cell membranes [12]. However, good oral bioavailability and/or brain permeability in mice have been found in the first-generation rhein–huprine hybrids [15,16] and other structurally related families of huprine-based hybrids with similar molecular weights [27,54]. As a preliminary assessment of the ability of the novel rhein–huprine hybrids to enter the CNS, their brain permeability has been evaluated *in vitro* using the well-established PAMPA-BBB, using a lipid extract of porcine brain membrane [29]. From the correlation obtained by comparing the experimental and reported permeability (P_c) values of 14 reference drugs [$P_c(\text{exp}) = 1.5219 P_c(\text{lit}) - 0.9129$ ($R^2 = 0.9387$)] and the limits established by Di *et al.* [29], the threshold for high BBB permeation (CNS+) was set at $P_c (10^{-6} \text{ cm/s}) > 5.1$. P_c values over this threshold were obtained for all the novel rhein–huprine hybrids (Table 1), so that all of them should be able to cross BBB by passive diffusion and reach their multiple targets at the CNS.

Conclusion

We have developed second-generation rhein–huprine hybrids as potential multitarget anti-Alzheimer agents. These compounds have been designed by replacement of the chlorobenzene ring of the huprine Y moiety of the first-generation hybrids by other differently substituted benzene or heteroaromatic rings. The main aim of such structural modification was to further delineate the structural determinants that mediate the interaction of the huprine moiety of these hybrids to the catalytic site of BACE-1, one of their putative molecular targets, and to assess the influence of the basicity of the huprine moiety, and hence, of the protonation state of the hybrids, on their multiple biological activities, especially AChE and BACE-1 inhibition. We have found that second-generation rhein–huprine hybrids display lower hAChE and hBACE-1 inhibitory activities than the first-generation lead **3**, even though they retain or display increased potencies as A β 42 and tau antiaggregating agents. Also, we have demonstrated, for the first time, for this struc-

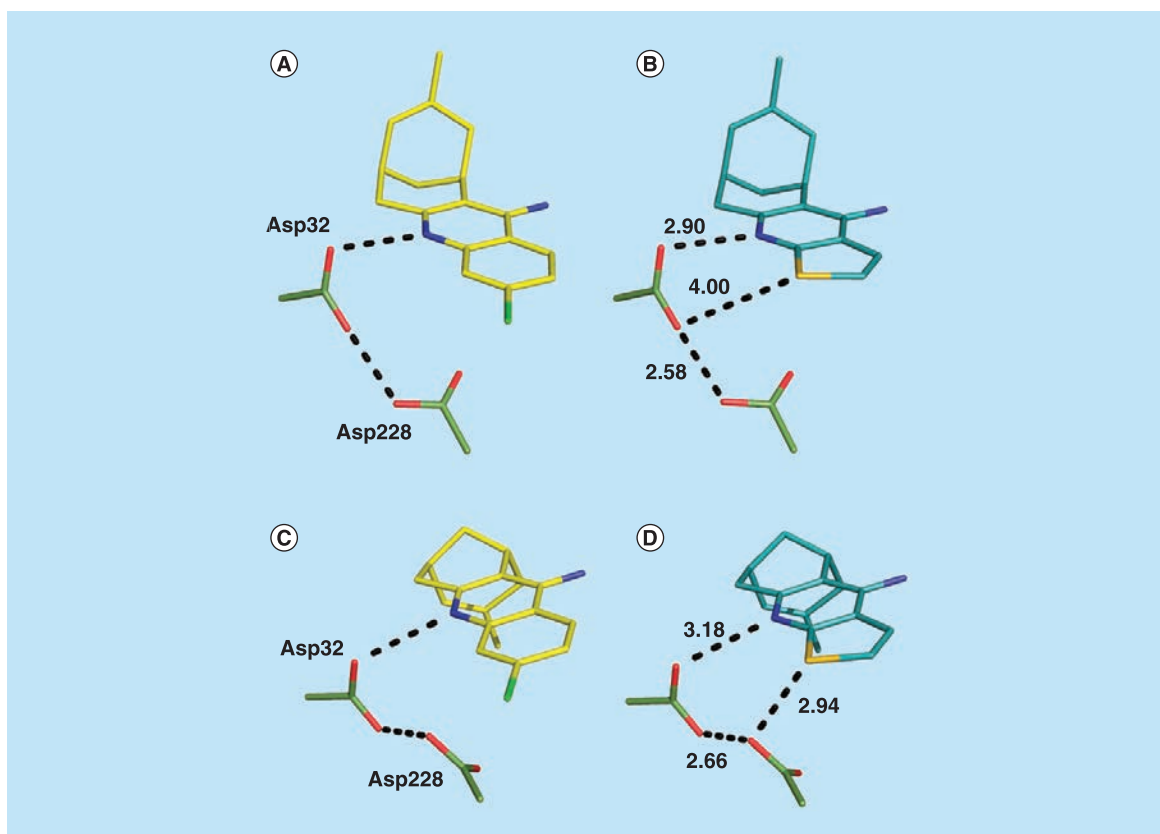


Figure 6. Binding mode of huprine Y and the modified huprine 6c within BACE-1. Representation of selected key interactions that modulate the binding of (A & C) huprine Y (carbon atoms in yellow) and (B & D) huprine 6c (carbon atoms in blue) to the catalytic site of BACE-1, taking into account the distinct arrangements of the two enantiomeric forms. Binding involves interactions with the dyad formed by Asp32 (deprotonated) and Asp228 (protonated), which are hydrogen bonded. Replacement of the fused benzene ring in huprine Y by a thiophene ring yields unfavorable secondary interactions with the carboxylate oxygens (distances in Å). For the sake of clarity, hydrogen atoms are omitted.

tural class that they are endowed with a potent antioxidant activity, with some of the novel hybrids being more potent than the known antioxidants trolox and gallic acid. PAMPA-BBB studies suggest that the novel rhein-huprine hybrids should be able to readily penetrate into the CNS. Overall, hybrids **9a** and **9c** display an interesting multitarget profile that encompasses moderately potent A β 42 and tau antiaggregating activity, potent antioxidant activity and submicromolar hAChE or hBACE-1 inhibitory activity. The least basic hybrid **9c**, which should be mostly in neutral form at physiological pH, might circumvent some potential membrane permeability issues and P-gp efflux liabilities that are usually associated with highly basic compounds as most huprine derivatives.

Future perspective

Multitarget agents are increasingly regarded as a promising option to afford the eagerly awaited disease-modifying treatment of AD, thereby fulfilling one of the most important unmet medical needs. A rationally designed multitarget agent, ladostigil, is advancing in Phase II clinical trials for mild cognitive impairment, considered a prodromal stage of AD, and a number of other multitarget compounds are showing efficacy in animal models of AD. One of such compounds is rhein-huprine hybrid **3**, which has been used as a template for the development of second-generation hybrids featuring a modified huprine moiety. This research has led to the identification of two compounds with a similar multitarget profile to lead **3**, expanded by the finding of

an outstanding antioxidant activity. These compounds display lower but still remarkable hAChE or hBACE-1 inhibitory activities in comparison with **3**, resulting in a more balanced activity profile. This biological profile warrants further studies (e.g., pharmacokinetics and toxicity) to assess the potential of these compounds as anti-Alzheimer drug candidates.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF2014-57094-R), startup grant of the Ramón y Cajal program RYC-2011-07987 (R Sabate), Generalitat de Catalunya (GC) (2014SGR52, 2014SGR1189 and 2014SGR938), and the Italian Ministry of Education, University and Research – MIUR. A contract from the Juan de la Cierva program of MINECO to A Espargaró (JCI-2012-12193) and fellowships from GC to FJ Pérez-Areales and A Viayna, and from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte to C Pont are gratefully acknowledged. FJ Luque acknowledges the support from ICREA Academia. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.future-science/doi/full/10.4155/fmc-2017-0049

Summary points

- Multitarget agents seem a realistic option to efficiently manage multifactorial disorders such as Alzheimer's disease.
- A number of multitarget compounds have shown efficacy in animal models of Alzheimer's disease and one of them is in Phase II clinical trials for mild cognitive impairment.
- Rhein-huprine hybrids, developed in our group, display activity against human cholinesterases, BACE-1 and A β 42 and tau aggregation.
- In this work, the first-generation rhein-huprine lead has been structurally modified at the benzene ring of the huprine moiety.
- The best second-generation hybrids exhibit lower, albeit still potent and more balanced, hAChE and hBACE-1 inhibitory activity than the lead, as well as moderately potent A β 42 and tau antiaggregating activity and potent antioxidant effect.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest; •• of considerable interest
- 1 Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina M. *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: an Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*. Alzheimer's Disease International, London, UK, 2015. www.alz.co.uk
 - 2 Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A *et al.* Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 51(3), 347–372 (2008).
 - Outstanding review that inspired the development of novel classes of anti-Alzheimer multitarget agents.
 - 3 Kosak U, Knez D, Coquelle N *et al.* *N*-Propargylpiperidines with naphthalene-2-carboxamide or naphthalene-2-sulfonamide moieties: potential multifunctional anti-Alzheimer's agents. *Bioorg. Med. Chem.* 25(2), 633–645 (2017).

- 4 Li Y, Qiang X, Luo L *et al.* Aurone Mannich base derivatives as promising multifunctional agents with acetylcholinesterase inhibition, anti- β -amyloid aggregation and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 126, 762–775 (2017).
- 5 Joubert J, Foka GB, Repsold BP, Oliver DW, Kapp E, Malan SF. Synthesis and evaluation of 7-substituted coumarin derivatives as multimodal monoamine oxidase-B and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 125, 853–864 (2017).
- 6 Chen Z, Digiacoio M, Tu Y *et al.* Discovery of novel rivastigmine–hydroxycinnamic acid hybrids as multi-targeted agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 125, 784–792 (2017).
- 7 Panek D, Więckowska A, Wichur T *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* 125, 676–695 (2017).
- 8 Jeřábek J, Uliassi E, Guidotti L *et al.* Tacrine–resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 127, 250–262 (2017).
- 9 Benchekroun M, Bartolini M, Egea J *et al.* Novel tacrine-grafted Ugi adducts as multipotent anti-Alzheimer drugs: a synthetic renewal in tacrine–ferulic acid hybrids. *ChemMedChem* 10(3), 523–539 (2015).
- 10 Rochais C, Lecoutey C, Gaven F *et al.* Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT₄R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride. *J. Med. Chem.* 58(7), 3172–3187 (2015).
- 11 Muñoz-Torrero D. Multitarget anti-Alzheimer hybrid compounds: do they work *in vivo*? In: *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*. Decker M (Ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 165–190 (2017).
- 12 Morphy R, Rankovic Z. Designing multiple ligands – medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Des.* 15(6), 587–600 (2009).
- **Discusses outstandingly the most important factors to be taken into account when designing multitarget compounds.**
- 13 Soler-López M, Badiola N, Zanzoni A, Aloy P. Towards Alzheimer's root cause: ECSIT as an integrating hub between oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction. *Bioessays* 34(7), 532–541 (2012).
- 14 Bachurin SO, Bovina EV, Ustyugov AA. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. *Med. Res. Rev.* doi:10.1002/med.21434 (2017) (Epub ahead of print).
- 15 Viayna E, Sola I, Bartolini M *et al.* Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rhein derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents. *J. Med. Chem.* 57(6), 2549–2567 (2014).
- **Describes the development of the first-generation rhein–huprine hybrids.**
- 16 Serrano FG, Tapia-Rojas C, Carvajal FJ *et al.* Rhein–huprine derivatives reduce cognitive impairment, synaptic failure and amyloid pathology in A β PPswe/PS-1 mice of different ages. *Curr. Alzheimer Res.* 13(9), 1017–1029 (2016).
- 17 Di Pietro O, Juárez-Jiménez J, Muñoz-Torrero D, Laughton CA, Luque FJ. Unveiling novel transient druggable pockets in BACE-1 through molecular simulations: conformational analysis and binding mode of multisite inhibitors. *PLoS ONE* 12(5), e0177683 (2017).
- 18 Dvir H, Wong DM, Harel M *et al.* 3D Structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with huprine X at 2.1 Å resolution: kinetic and molecular dynamics correlates. *Biochemistry* 41(9), 2970–2981 (2002).
- 19 Rankovic Z. CNS drug design: balancing physicochemical properties for optimal brain exposure. *J. Med. Chem.* 58(6), 2584–2608 (2015).
- 20 Ginman T, Viklund J, Malmström J *et al.* Core refinement toward permeable β -secretase (BACE-1) inhibitors with low hERG activity. *J. Med. Chem.* 56(11), 4181–4205 (2013).
- 21 Rombouts FJR, Tresadern G, Delgado O *et al.* 1,4-Oxazine β -secretase 1 (BACE1) inhibitors: from hit generation to orally bioavailable brain penetrant leads. *J. Med. Chem.* 58(20), 8216–8235 (2015).
- **Describes outstandingly the influence of the basicity of BACE-1 inhibitors on their potency and pharmacokinetics.**
- 22 Camps P, Cusack B, Mallender WD *et al.* Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* 57(2), 409–417 (2000).
- 23 Di Pietro O, Viayna E, Vicente-García E *et al.* 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[*b*][1,6]naphthyridines as a new family of potent peripheral-to-midgorge-site inhibitors of acetylcholinesterase: synthesis, pharmacological evaluation and mechanistic studies. *Eur. J. Med. Chem.* 73, 141–152 (2014).
- 24 Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95 (1961).
- 25 Pérez-Areales FJ, Di Pietro O, Espargaró A *et al.* Shogaol–huprine hybrids: dual antioxidant and anticholinesterase agents with β -amyloid and tau anti-aggregating properties. *Bioorg. Med. Chem.* 22(19), 5298–5307 (2014).
- 26 Rizzo S, Tarozzi A, Bartolini M *et al.* 2-Arylbenzofuran-based molecules as multipotent Alzheimer's disease modifying agents. *Eur. J. Med. Chem.* 58, 519–532 (2012).
- 27 Sola I, Aso E, Frattini D *et al.* Novel levetiracetam derivatives that are effective against the Alzheimer-like phenotype in mice: synthesis, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* efficacy studies. *J. Med. Chem.* 58(15), 6018–6032 (2015).
- 28 Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huélamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventós RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* 154, 299–307 (2014).
- 29 Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 38(3), 223–232 (2003).

- 30 Alongi KS, Shields GC. Theoretical calculations of acid dissociation constants: a review article. *Annu. Rep. Comput. Chem.* 6, 113–138 (2010).
- 31 Liptak MD, Shields GC. Accurate pKa calculations for carboxylic acids using complete basis set and Gaussian n-models combined with CPCM continuum solvation methods. *J. Am. Chem. Soc.* 123(30), 7314–7319 (2001).
- 32 Liptak MD, Gross KC, Seybold PG, Feldgus S, Shields GC. Absolute pKa determinations for substituted phenols. *J. Am. Chem. Soc.* 124(22), 6421–6427 (2002).
- 33 Liptak MD, Shields GC. Experimentation with different thermodynamic cycles used for pKa calculations on carboxylic acids using complete basis set and Gaussian n-models combined with CPCM continuum solvation methods. *Int. J. Quantum Chem.* 85, 727–741 (2001).
- 34 Brown TN, Mora Diez N. Computational determination of aqueous (pKa) values of protonated benzimidazoles (part 1). *J. Phys. Chem. B.* 110(18), 9270–9279 (2006).
- 35 Becke AD. Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 98, 5648–5652 (1993).
- 36 Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle–Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* 37, 785–789 (1988).
- 37 Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. *Ab initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.* 98, 11623–11627 (1994).
- 38 Grimme S. Improved second-order Møller–Plesset perturbation theory by separate scaling of parallel- and antiparallel-spin pair correlation energies. *J. Chem. Phys.* 118(20), 9095–9102 (2003).
- 39 Bryantsev VS, Diallo MS, Goddard WA. Calculation of solvation free energies of charged solutes using mixed cluster/continuum models. *J. Phys. Chem. B* 112(32), 9709–9719 (2008).
- 40 Tissandier MD, Cowen KA, Feng WY et al. The proton's absolute aqueous enthalpy and Gibbs free energy of solvation from cluster ion solvation data. *J. Phys. Chem. A* 102(40), 7787–7794 (1998).
- 41 Camaioni DM, Schwerdtfeger CA. Comment on 'accurate experimental values for the free energies of hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺'. *J. Phys. Chem. A.* 109(47), 10795–10797 (2005).
- 42 McQuarrie DM. *Statistical Mechanics*. Harper and Row, NY, USA, 86 (1970).
- 43 Curutchet C, Bidon-Chanal A, Soteras I, Orozco M, Luque FJ. MST Continuum study of the hydration free energies of monovalent ionic species. *J. Phys. Chem. B* 109(8), 3565–3574 (2005).
- 44 Kelly CP, Cramer CJ, Truhlar DG. Aqueous solvation free energies of ions and ion–water clusters based on an accurate value for the absolute aqueous solvation free energy of the proton. *J. Phys. Chem. B.* 110(32), 16066–16081 (2006).
- 45 Nachon F, Carletti E, Ronco C et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem. J.* 453(3), 393–399 (2013).
- 46 Zhao Y, Truhlar DG. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* 120(1), 215–241 (2008).
- 47 Boys SF, Bernardi F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* 19(4), 553–566 (1970).
- 48 Zhang X, Song W. The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 46 (2013).
- 49 Sorkin A, von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(8), 600–614 (2002).
- 50 Hook VYH, Toneff T, Aaron W, Yasothornsrikul S, Bunday R, Reisine T. β -Amyloid peptide in regulated secretory vesicles of chromaffin cells: evidence for multiple cysteine proteolytic activities in distinct pathways for β -secretase activity in chromaffin vesicles. *J. Neurochem.* 81(2), 237–256 (2002).
- 51 Camps P, El Achab R, Font-Bardia M et al. Easy synthesis of 7-alkylbicyclo[3.3.1]non-6-en-3-ones by silica gel-promoted fragmentation of 3-alkyl-2-oxadamant-1-yl mesylate. *Tetrahedron* 52(16), 5867–5880 (1996).
- 52 Ronco C, Sorin G, Nachon F et al. Synthesis and structure–activity relationship of Huprine derivatives as human acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 17(13), 4523–4536 (2009).
- 53 Galdeano C, Viayna E, Sola I et al. Huprine–tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases. *J. Med. Chem.* 55(2), 661–669 (2012).
- 54 Zha X, Lamba D, Zhang L et al. Novel tacrine–benzofuran hybrids as potent multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biological evaluation and x-ray crystallography. *J. Med. Chem.* 59(1), 114–131 (2016).
- 55 Muñoz-Torrero D, Camps P. Huprines for Alzheimer's disease drug development. *Expert Opin. Drug Discov.* 3(1), 65–81 (2008).
- 56 Camps P, El Achab R, Morral J et al. New tacrine–huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 43(24), 4657–4666 (2000).
- 57 Camps P, El Achab R, Görbig D et al. Synthesis, *in vitro* pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine–huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 42(17), 3227–3242 (1999).
- 58 Li SY, Jiang N, Xie SS, Wang KDG, Wang XB, Kong LY. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–rhein hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Org. Biomol. Chem.* 12(5), 801–814 (2014).

- 59 Espargaró A, Medina A, Di Pietro O, Muñoz-Torrero D, Sabate R. Ultra rapid *in vivo* screening for anti-Alzheimer anti-amyloid drugs. *Sci. Rep.* 6, 23349 (2016).
- 60 Pouplana S, Espargaró A, Galdeano C *et al.* Thioflavin-S staining of bacterial inclusion bodies for the fast, simple, and inexpensive screening of amyloid aggregation inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 21(9), 1152–1159 (2014).
- 61 Di Pietro O, Pérez-Areales FJ, Juárez-Jiménez J *et al.* Tetrahydrobenzo[*b*][1,6]naphthyridine-6-chlorotacrine hybrids as a new family of anti-Alzheimer agents targeting β -amyloid, tau, and cholinesterase pathologies. *Eur. J. Med. Chem.* 84, 107–117 (2014).
- 62 Sharma AK, Taneja G, Khanna D, Rajput SK. Reactive oxygen species: friend or foe? *RSC Adv.* 5(71), 57267–57276 (2015).
- 63 Rosini M, Simoni E, Milelli A, Minarini A, Melchiorre C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: are we connecting the dots? *J. Med. Chem.* 57(7), 2821–2831 (2014).
- 64 Wang Y, Fan X, Tang T *et al.* Rhein and rhubarb similarly protect the blood–brain barrier after experimental traumatic brain injury via gp91^{phox} subunit of NADPH oxidase/ROS/ERK/MMP-9 signaling pathway. *Sci. Rep.* 6, 37098 (2016).
- 65 Zhen YZ, Lin YJ, Li KJ. Effects of rhein lysinate on D-galactose-induced aging mice. *Exp. Ther. Med.* 11(1), 303–308 (2016).
- 66 Vargas F, Díaz Y, Carbonell K. Antioxidant and scavenging activity of emodin, aloe-emodin, and rhein on free-radical and reactive oxygen species. *Pharm. Biol.* 42(4–5), 342–348 (2004).

Author affiliations

Francisco Javier Pérez-Areales

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27–31, E-08028 Barcelona, Spain
Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Nibal Betari

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27–31, E-08028 Barcelona, Spain

Antonio Viayna

Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain
Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

Caterina Pont

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27–31, E-08028 Barcelona, Spain
Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Alba Espargaró

Department of Pharmacy & Pharmaceutical Technology & Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27–31, E-08028 Barcelona, Spain

Manuela Bartolini

Department of Pharmacy & Biotechnology, Alma Mater Studiorum University of Bologna, Via Belmeloro 6, I-40126 Bologna, Italy

Angela De Simone

Department for Life Quality Studies, University of Bologna, Corso d'Augusto 237, I-47921 Rimini, Italy

José Fernando Rinaldi Alvarenga

Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

Belén Pérez

Department of Pharmacology, Therapeutics & Toxicology, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Raimon Sabate

Department of Pharmacy & Pharmaceutical Technology & Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27–31, E-08028 Barcelona, Spain

Rosa Maria Lamuela-Raventós

Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
CIBER 06/003 Physiopathology of Obesity & Nutrition (CIBEROBN), Institute of Health Carlos III, E-28029 Madrid, Spain

Vincenza Andrisano

Department for Life Quality Studies, University of Bologna, Corso d'Augusto 237, I-47921 Rimini, Italy

Francisco Javier Luque

Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain
Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

Diego Muñoz-Torrero

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27–31, E-08028 Barcelona, Spain
Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

Supplementary Data

Design, synthesis, and multitarget biological profiling of a second generation of anti-Alzheimer rehin-huprine hybrids

F. Javier Pérez-Areales,^{1,2} Nibal Betari,¹ Antonio Viayna,^{2,3} Caterina Pont,^{1,2} Alba Espargaró,⁴ Manuela Bartolini,⁵ Angela De Simone,⁶ José Fernando Rinaldi Alvarenga,³ Belén Pérez,⁷ Raimon Sabate,⁴ Rosa M. Lamuela-Raventós,^{3,8} Vincenza Andrisano,⁶ F. Javier Luque,^{2,3} and Diego Muñoz-Torrero^{*,1,2}

¹Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028, Barcelona, Spain. ²Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona.

³Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain. ⁴Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028, Barcelona, Spain. ⁵Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum University of Bologna, Via Belmeloro 6, I-40126, Bologna, Italy. ⁶Department for Life Quality Studies, University of Bologna, Corso d' Augusto 237, I-47921-Rimini, Italy. ⁷Department of Pharmacology, Therapeutics, and Toxicology, Autonomous University of Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain. ⁸CIBER 06/003 Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

* Author for correspondence: dmunoztorrero@ub.edu.

TABLE OF CONTENTS

Synthetic procedures	S3
Table S1. Calculated pK_a values of reference and target compounds determined from high-level QM calculations	S23
Table S2. Residues utilized to simulate the reduced model of the binding site for the human AChE, BChE, and BACE-1 enzymes	S25
Figure S1. Superposition of active site residues of AChE in complex with huprines W and X	S26
Figure S2. Selected key interactions that modulate the binding of huprine and the naphthyridine analog 6a to the catalytic site of hBChE	S27
Table S3. PAMPA-BBB assay results of commercial drugs for assay validation	S28
References	S29

Synthetic procedures

6,7,10,11-Tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[*b*][1,8]naphthyridin-5-amine (**6a**)

To a suspension of 2-aminopyridine-3-carbonitrile, **5a** (1.05 g, 8.81 mmol) and AlCl₃ (1.18 g, 8.85 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (14 mL), a solution of enone **4** (885 mg, 5.89 mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (53 mL) was added. The reaction mixture was stirred under reflux overnight, then allowed to cool to room temperature, diluted with water (30 mL) and THF (30 mL), alkalized with 5 N NaOH (11 mL), and stirred at room temperature for 30 min. The phases were separated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (6 × 45 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure to provide a brown solid residue (1.76 g), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99:1:0.4, huprine **6a** (1.04 g, 70% yield) was isolated as a pale yellow solid; *R_f* = 0.51 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **6a** (47 mg, 0.19 mmol) in CH₂Cl₂/MeOH 9:1 (3 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.18 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **6a**·HCl (55 mg) as a yellow solid: mp 240–244 °C; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3049, 2908, 2454, N-H, N⁺-H, C-H st), 1669, 1635, 1624, 1604, 1586, 1535 (ar-C-C, ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.59 (s, 3H, 8-CH₃), superimposed in part 1.97 (dm, *J*=12.4 Hz, 1H, 13-H_{syn}), 1.99 (d, *J*=18.0 Hz, 1H, 7-H_{endo}), 2.08 (dm, *J*=12.4 Hz, 1H, 13-H_{anti}), 2.52 (dd, *J*=18.0 Hz, *J'*=4.8 Hz, 1H, 7-H_{exo}), 2.79 (m, 1H, 10-H), 2.92 (ddd, *J*=18.0 Hz, *J'*=2.0

Hz, $J''=1.2$ Hz, 1H, 11- H_{endo}), 3.21 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 11- H_{exo}), 3.39 (m, 1H, 6-H), 4.91 (s, NH, ^+NH), 5.59 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H, 9-H), 7.64 (dd, $J=8.8$ Hz, $J'=4.4$ Hz, 1H, 3-H), 8.85 (dd, $J=8.8$ Hz, $J'=1.6$ Hz, 1H, 4-H), 8.95 (dd, $J=4.4$ Hz, $J'=1.6$ Hz, 1H, 2-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 23.4 (CH_3 , 8- CH_3), 27.6 (CH, C6), 28.1 (CH, C10), 29.1 (CH_2 , C13), 35.8 (CH_2), 35.9 (CH_2) (C7, C11), 111.9 (C, C4a), 115.8 (C, C5a), 123.0 (CH, C3), 125.1 (CH, C9), 134.3 (CH, C4), 134.9 (C, C8), 148.6 (C, C11a), 154.5 (C, C12a), 156.6 (CH, C2), 157.8 (C, C5); HPLC purity: 100%.

1,4-Difluoro-6,7,10,11-tetrahydro-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-amine (6b)

It was prepared as described for **6a**. From 2-amino-3,6-difluorobenzonitrile (270 mg, 1.75 mmol), enone **4** (219 mg, 1.46 mmol), and $AlCl_3$ (292 mg, 2.19 mmol), and stirring the reaction mixture in a closed vessel at 100 °C for 2 days, a brown solid residue (437 mg) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, hexane/EtOAc/ Et_3N mixtures, gradient elution). On elution with hexane/EtOAc/ Et_3N 90:10:0.2, huprine **6b** (155 mg, 37% yield) was isolated as a pale yellow solid; $R_f = 0.78$ (hexane/EtOAc/ Et_3N 1:1:0.01).

A solution of **6b** (44 mg, 0.15 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et_2O (3N, 0.15 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **6b**·HCl (58 mg) as a pale beige solid: mp 185–188 °C; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3354, 3312, 3198, 2914, N-H, N^+H , C-H st), 1646, 1594 (ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.60 (s, 3H, 9- CH_3), superimposed in part 1.96 (dm, $J=12.8$ Hz, 1H, 13- H_{syn}), 1.99 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 10- H_{endo}), 2.09 (dm, $J=12.8$ Hz, 1H, 13'- H_{anti}), 2.53 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=4.8$ Hz, 1H, 10- H_{exo}), 2.79 (m, 1H, 7-H), 2.99 (ddd, $J=18.0$ Hz, $J'=J''=1.6$ Hz, 1H, 6- H_{endo}), 3.20 (dd,

$J=18.0$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 6- H_{exo}), 3.40 (m, 1H, 11-H), 4.85 (s, NH, ^+NH), 5.58 (dm, $J=5.2$ Hz, 1H, 8-H), 7.33 (ddd, $J=13.2$ Hz, $J'=9.2$ Hz, $J''=4.0$ Hz, 1H, 2-H), 7.68 (ddd, $J=10.0$ Hz, $J'=9.2$ Hz, $J''=4.0$ Hz, 1H, 3-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 23.4 (CH_3 , 9- CH_3), 27.3 (CH, C11), 28.0 (CH, C7), 29.0 (CH_2 , C13), 35.5 (CH_2), 36.0 (CH_2) (C6, C10), 108.5 (d, $J=14.3$ Hz, C, C12a), 111.4 (dd, $J=26.4$ Hz, $J'=7.4$ Hz, CH, C2), 117.0 (C, C11a), 118.5 (dd, $J=19.6$ Hz, $J'=10.8$ Hz, CH, C3), 125.0 (CH, C8), 130.3 (d, $J=15.6$ Hz, C, C4a), 134.9 (C, C9), 149.4 (d, $J=247.7$ Hz, C, C1), 153.9 (C, C5a), 155.4 (C, C12), 157.1 (d, $J=249.0$ Hz, C, C4); HRMS (ESI) calcd for ($C_{17}H_{16}F_2N_2 + H^+$): 287.1354, found 287.1362; HPLC purity: 94.7%.

5,6,9,10-Tetrahydro-7-methyl-5,9-methanocycloocta[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridin-4-amine (6c)

It was prepared as described for **6a**. From 2-aminothiophene-3-carbonitrile (1.00 g, 8.05 mmol) and enone **4** (1.01 g, 6.72 mmol), and $AlCl_3$ (1.34 g, 10.0 mmol), a brown solid residue (1.92 g) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, hexane/EtOAc/ Et_3N mixtures, gradient elution). On elution with hexane/EtOAc/ Et_3N 60:40:0.2 to 50:50:0.2, huprine **6c** (1.37 g, 80% yield) was isolated as a yellow solid; $R_f = 0.45$ (hexane/EtOAc/ Et_3N 1:1:0.01).

A solution of **6c** (200 mg, 0.78 mmol) in CH_2Cl_2 (4 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et_2O (3N, 0.78 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 2 mL) to give, after drying at 65 $^\circ C/2$ Torr for 48 h, **6c**·HCl (230 mg) as a yellow solid: mp 227–228 $^\circ C$; IR (KBr) ν 3500–2500 (max at 3418, 3190, 2905, N-H, N^+ -H and C-H st), 1651, 1584, 1520 (ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.58 (s, 3H, 7- CH_3), superimposed in part 1.92 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 12- H_{syn}), 1.95 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 6- H_{endo}), 2.05 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 12- H_{anti}), 2.50 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=4.4$ Hz,

1H, 6-*H*_{exo}), 2.76 (m, 1H, 9-H), 2.80 (br d, *J*=17.6 Hz, 1H, 10-*H*_{endo}), 3.17 (dd, *J*=17.6 Hz, *J'*=5.6 Hz, 1H, 10-*H*_{exo}), 3.34 (m, 1H, 5-H), 4.86 (s, NH, ⁺NH), 5.56 (br d, *J*=4.8 Hz, 1H, 8-H), 7.53 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, 3-H), 7.68 (d, *J*=6.0 Hz, 1H, 2-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.5 (CH₃, 7-CH₃), 27.4 (CH, C5), 28.3 (CH, C9), 29.2 (CH₂, C12), 35.5 (CH₂, C10), 35.9 (CH₂, C6), 116.2 (C, C4a), 120.8 (CH, C3), 121.7 (C, C3a), 123.8 (CH, C2), 125.0 (CH, C8), 134.7 (C, C7), 149.1 (C, C10a), 149.8 (C, C11a), 154.2 (C, C4); HRMS (ESI) calcd for (C₁₅H₁₆N₂S + H⁺): 257.1107, found 257.1107; HPLC purity: 98.0%.

6,7,10,11-Tetrahydro-2-methoxy-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-amine (6d)

It was prepared as described for **6a**. From 2-amino-5-methoxybenzotrile (223 mg, 1.51 mmol), enone **4** (188 mg, 1.25 mmol), and AlCl₃ (250 mg, 1.87 mmol), and stirring the reaction mixture under reflux for 3 days, a yellow solid residue (300 mg) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99.8:0.2:0.4, huprine **6d** (150 mg, 43% yield) was isolated as a yellow solid; *R*_f = 0.38 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9:1:0.1).

A solution of **6d** (100 mg, 0.36 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was filtered through a 0.2 μ m PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.36 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **6d**·HCl (118 mg) as a yellow solid: mp 285–286 °C; IR (KBr) ν 3500–2500 (max at 3325, 3177, 2963, 2893, 2835, N-H, N⁺-H and C-H st), 1659, 1589 (ar-C-C and ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.58 (s, 3H, 9-CH₃), superimposed in part 1.95 (dm, *J*=12.4 Hz, 1H, 13-*H*_{syn}), 1.99 (br d, *J*=17.6 Hz, 1H, 10-*H*_{endo}), 2.07 (dm, *J*=12.4 Hz, 1H, 13-*H*_{anti}), 2.51 (dd, *J*=17.6 Hz,

$J'=4.0$ Hz, 1H, 10- H_{exo}), 2.77 (m, 1H, 7-H), 2.87 (br d, $J=17.6$ Hz, 1H, 6- H_{endo}), 3.18 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 6- H_{exo}), 3.40 (m, 1H, 11-H), 3.97 (s, 3H, 2-OCH₃), 4.87 (s, NH, ^+NH), 5.57 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H, 8-H), 7.47 (dd, $J=9.2$ Hz, $J'=2.4$ Hz, 1H, 3-H), 7.67 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 4-H), 7.70 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 1-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.5 (CH₃, 9-CH₃), 27.6 (CH, C11), 28.3 (CH, C7), 29.4 (CH₂, C13), 35.7 (CH₂), 36.0 (CH₂) (C6, C10), 56.7 (CH₃, 2-OCH₃), 102.8 (CH, C1), 114.7 (C, C12a), 117.9 (C, C11a), 121.7 (CH), 126.1 (CH) (C3, C4), 125.0 (CH, C8), 134.2 (C), 134.9 (C) (C4a, C9), 150.4 (C, C5a), 155.4 (C, C12), 159.3 (C, C2); HRMS (ESI) calcd for (C₁₈H₂₀N₂O + H⁺): 281.1648, found 281.1650; HPLC purity: 98.0%.

9-[(6,7,10,11-Tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[*b*][1,8]naphthyridin-5-yl)amino]nonanenitrile (7a)

A suspension of huprine **6a** (992 mg, 3.95 mmol) and finely powdered KOH (85% purity, 860 mg, 13.0 mmol), and 4 Å molecular sieves in anhydrous DMSO (17 mL) was stirred, heating every 10 min approximately with a heat gun for 1 h and at room temperature one additional hour, and then treated with 9-bromononanenitrile (947 mg, 4.34 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, diluted with 2N NaOH (120 mL), and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). The combined organic extracts were washed with H₂O (5 × 100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated under reduced pressure to give a reddish oil (1.49 g), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99.4:0.6:0.4 to 99:1:0.4, nitrile **7a** (618 mg, 40% yield) was isolated as reddish oil; R_f 0.84 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **7a** (25 mg, 0.06 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.06 mL) and evaporated under

reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **7a**·HCl (27 mg) as an orange solid: mp 110–113 °C; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3204, 2925, 2852, N-H, N⁺-H, C-H st), 2245 (CN st), 1612, 1589, 1519 (ar-C-C, ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.36–1.52 (complex signal, 8H, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.59 (s, 3H, 8'-CH₃), 1.63 (tt, $J=J'=7.2$ Hz, 2H, 3-H₂), superimposed in part 1.89 (tt, $J=J'=7.2$ Hz, 2H, 8-H₂), 1.95 (br d, $J=17.6$ Hz, 1H, 7'-H_{endo}), superimposed in part 1.96 (dm, $J=12.8$ Hz, 1H, 13'-H_{syn}), 2.09 (dm, $J=12.8$ Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.43 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, 2-H₂), 2.54 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=4.4$ Hz, 1H, 7'-H_{exo}), 2.78 (m, 1H, 10'-H), 2.91 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 11'-H_{endo}), 3.21 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 11'-H_{exo}), 3.45 (m, 1H, 6'-H), 4.01 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, 9-H₂), 4.85 (s, NH, ⁺NH), 5.59 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H, 9'-H), 7.60 (dd, $J=8.4$ Hz, $J'=4.4$ Hz, 1H, 3'-H), 8.86 (br d, $J=8.4$ Hz, 1H, 4'-H), 8.91 (dd, $J=4.4$ Hz, $J'=1.2$ Hz, 1H, 2'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 17.3 (CH₂, C2), 23.4 (CH₃, 8'-CH₃), 26.4 (CH₂, C3), 27.3 (CH, C6'), 27.7 (CH₂, C7), 27.8 (CH, C10'), 29.2 (CH₂, C13'), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.0 (CH₂) (C4, C5, C6), 30.9 (CH₂, C8), 35.9 (CH₂), 36.0 (CH₂) (C7', C11'), 49.6 (CH₂, C9), 112.0 (C, C4a'), 117.6 (C, C5a'), 121.2 (C, C1), 121.9 (CH, C3'), 125.1 (CH, C9'), 134.6 (C, C8'), 137.4 (CH, C4'), 149.7 (C, C11a'), 152.3 (C, C12a'), 156.2 (CH, C2'), 157.4 (C, C5'); HRMS (ESI) calcd for (C₂₅H₃₂N₄ + H⁺): 389.2700, found 389.2692.

9-[(1,4-Difluoro-6,7,10,11-tetrahydro-9-methyl-7,11-methanocycloocta[b]quinolin-12-yl)amino]nonanenitrile (7b)

It was prepared as described for **7a**. From huprine **6b** (185 mg, 0.65 mmol) and 9-bromononanenitrile (155 mg, 0.71 mmol), a brown oily residue (269 mg) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μ m silica gel, hexane/EtOAc/Et₃N mixtures, gradient elution). On elution with hexane/EtOAc/Et₃N

85:15:0.2, nitrile **7b** (225 mg, 82% yield) was isolated as a yellow oil; $R_f = 0.83$ (hexane/EtOAc/Et₃N 1:1:0.01).

A solution of **7b** (31 mg, 0.07 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.07 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **7b**·HCl (33 mg) as a yellow solid: mp 58–62 °C; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3071, 2925, 2852, N-H, N⁺-H, C-H st), 2255 (CN st), 1648, 1586, 1514 (ar-C-C and ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.30–1.46 (complex signal, 8H, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.60 (s, 3H, 9'-CH₃), superimposed in part 1.60 (tt, $J=J'=7.2$ Hz, 2H, 3-H₂), 1.79 (tt, $J=J'=6.8$ Hz, 2H, 8-H₂), 1.97 (br d, $J=17.2$ Hz, 1H, 10'-H_{endo}), superimposed 1.94–2.00 (m, 1H, 13'-H_{syn}), 2.09 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.42 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, 2-H₂), 2.58 (dd, $J=17.2$ Hz, $J'=4.0$ Hz, 1H, 10'-H_{exo}), 2.78 (m, 1H, 7'-H), 2.99 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 6'-H_{endo}), 3.19 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 6'-H_{exo}), 3.59 (m, 1H, 11'-H), 3.73 (dt, $J=J'=6.8$ Hz, 2H, 9-H₂), 4.85 (s, NH, ⁺NH), 5.61 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H, 8'-H), 7.30 (ddd, $J=12.8$ Hz, $J'=8.8$ Hz, $J''=4.0$ Hz, 1H, 2'-H), 7.68 (ddd, $J=10.0$ Hz, $J'=8.8$ Hz, $J''=4.0$ Hz, 1H, 3'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 17.3 (CH₂, C2), 23.4 (CH₃, 9'-CH₃), 26.4 (CH₂, C3), 27.5 (CH, C11'), 27.6 (CH₂, C7), 27.8 (CH, C7'), 29.0 (CH₂, C13'), 29.5 (CH₂, C3), 29.6 (CH₂), 29.9 (CH₂) (C4, C5, C6), 31.6 (CH₂, C8), 36.4 (CH₂, C6'), 37.0 (CH₂, C10'), 51.2 (d, $J=12.3$ Hz, CH₂, C9), 109.4 (d, $J=13.9$ Hz, C, C12a'), 111.2 (dd, $J=26.8$ Hz, $J'=7.0$ Hz, CH, C2'), 118.2 (m, CH, C3'), 119.0 (C, C11a'), 121.2 (C, C1), 125.5 (CH, C8'), 131.6 (m, C, C4a'), 134.1 (C, C9'), 149.5 (d, $J=249.2$ Hz, C, C1'), 153.2 (C, C5a'), 156.1 (C, C12'), 155.6 (d, $J=247.4$ Hz, C, C4'); HRMS (ESI) calcd for (C₂₆H₃₁F₂N₃ + H⁺): 424.2559, found 424.2565.

9-[(5,6,9,10-Tetrahydro-7-methyl-5,9-methanocycloocta[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridin-4-yl)amino]nonanenitrile (7c)

It was prepared as described for **7a**. From huprine **6c** (1.00 g, 3.90 mmol) and 9-bromononanenitrile (935 mg, 4.29 mmol), a brown oily residue (1.51 g) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, hexane/EtOAc/Et₃N mixtures, gradient elution). On elution with hexane/EtOAc/Et₃N 50:50:0.2, nitrile **7c** (760 mg, 50% yield) was isolated as a yellow oil; $R_f = 0.56$ (hexane/EtOAc/Et₃N 1:1:0.01).

A solution of **7c** (100 mg, 0.26 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.25 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 2 mL) to give, after drying at 65 $^{\circ}\text{C}$ /2 Torr for 48 h, **7c**·HCl (103 mg) as a yellow solid: mp 92–93 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr) ν 3500–2500 (max at 3404, 3252, 2928, 2855, N-H, N⁺-H and C-H st), 2243 (CN st), 1580, 1553 (ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.36–1.54 (complex signal, 8H, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.59 (s, 3H, 7'-CH₃), 1.64 (tt, $J=J'=7.2$ Hz, 2H, 3-H₂), 1.81 (tt, $J=J'=7.2$ Hz, 2H, 8-H₂), 1.89 (br d, $J=17.2$ Hz, 1H, 6'-H_{endo}), superimposed in part 1.91 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 12'-H_{syn}), 2.07 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 12'-H_{anti}), 2.43 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, 2-H₂), 2.52 (dd, $J=17.2$ Hz, $J'=4.8$ Hz, 1H, 6'-H_{exo}), superimposed in part 2.75 (m, 1H, 9'-H), 2.76 (br d, $J=17.6$ Hz, 1H, 10'-H_{endo}), 3.16 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 10'-H_{exo}), 3.33 (m, 1H, 5'-H), 3.86 (tm, $J=7.2$ Hz, 2H, 9-H₂), 4.85 (s, NH, ⁺NH), 5.57 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H, 8'-H), 7.54 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, 3'-H), 7.72 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, 2'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 17.4 (CH₂, C2), 23.6 (CH₃, 7'-CH₃), 26.4 (CH₂, C3), 27.1 (CH, C5'), 27.7 (CH₂, C7), 27.9 (CH, C9'), 29.5 (CH₂, C12'), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.1 (CH₂) (C4, C5, C6), 30.9 (CH₂, C8), 35.5 (CH₂, C10'), 35.9 (CH₂, C6'), 46.7 (CH₂, C9), 117.3 (C, C4a'),

119.1 (C, C3a'), 121.3 (C, C1), 122.7 (CH, C3'), 123.5 (CH, C2'), 125.0 (CH, C8'), 134.5 (C, C7'), 147.0 (C, C10a'), 152.4 (C, C11a'), 153.2 (C, C4'); HRMS (ESI) calcd for (C₂₄H₃₁N₃S + H⁺): 394.2311, found 394.2313.

9-[(6,7,10,11-Tetrahydro-2-methoxy-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-yl)amino]nonanenitrile (7d)

It was prepared as described for **7a**. From huprine **6d** (260 mg, 0.93 mmol) and 9-bromononanenitrile (222 mg, 1.02 mmol), a brown oily residue (450 mg) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99.8:0.2:0.2, nitrile **7d** (114 mg, 29% yield) was isolated as a yellow oil; R_f = 0.81 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9:1:0.1).

A solution of **7d** (23 mg, 0.06 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.06 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **7d**·HCl (23 mg) as a yellow solid: mp 162–163 °C; IR (KBr) ν 3500–2500 (max at 3474, 3412, 3258, 2930, 2859, N-H, N⁺-H and C-H st), 2241 (CN st), 1622, 1582, 1524 (ar-C-C and ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.32–1.50 (complex signal, 8H, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.58 (s, 3H, 9'-CH₃), 1.62 (tt, *J*=*J*'=6.8 Hz, 2H, 3-H₂), superimposed in part 1.88 (m, 2H, 8-H₂), 1.94 (br d, *J*=17.6 Hz, 1H, 10'-H_{endo}), superimposed in part 1.96 (dm, *J*=12.8 Hz, 1H, 13'-H_{syn}), 2.09 (dm, *J*=12.8 Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.43 (m, 2H, 2-H₂), 2.56 (dm, *J*=17.6 Hz, 1H, 10'-H_{exo}), 2.77 (m, 1H, 7'-H), 2.88 (br d, *J*=17.6 Hz, 1H, 6'-H_{endo}), 3.20 (dd, *J*=17.6 Hz, *J*'=5.6 Hz, 1H, 6'-H_{exo}), 3.48 (m, 1H, 11'-H), 3.96 (s, 3H, 2'-OCH₃), superimposed in part 3.98 (m, 2H, 9-H₂), 4.85 (s, NH, ⁺NH), 5.59 (br d, *J*=4.4 Hz, 1H, 8'-H), 7.53 (dd, *J*=9.2 Hz, *J*'=2.4 Hz, 1H, 3'-H), 7.66 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 1'-H), 7.72 (d, *J*=9.2 Hz, 1H,

4'-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 17.1 (CH_2 , C2), 23.3 (CH_3 , 9'- CH_3), 26.2 (CH_2 , C3), 27.3 (CH , C11'), 27.6 (CH_2 , C7), 27.8 (CH , C7'), 29.3 (CH_2 , C13'), 29.4 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.9 (CH_2) (C4, C5, C6), 31.7 (CH_2 , C8), 35.8 (CH_2 , C6'), 36.4 (CH_2 , C10'), 48.9 (CH_2 , C9), 56.3 (CH_3 , 2'- OCH_3), 105.9 (CH , C1'), 117.2 (C), 118.6 (C) (C11a', C12a'), 121.1 (C, C1), 121.6 (CH), 125.4 (CH) (C3', C4'), 125.0 (CH , C8'), 134.4 (C), 135.1 (C) (C4a', C9'), 149.4 (C, C5a'), 156.1 (C, C12'), 158.1 (C, C2'); HRMS (ESI) calcd for ($\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O} + \text{H}^+$): 418.2853, found 418.2862.

***N*-(6,7,10,11-Tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[*b*][1,8]naphthyridin-5-yl)nonane-1,9-diamine (8a)**

A suspension of nitrile **7a** (608 mg, 1.56 mmol) in anhydrous Et_2O (27 mL) was cooled to 0 °C with an ice bath and treated dropwise with LiAlH_4 (4M solution in Et_2O , 1.21 mL, 4.84 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, then cooled to 0 °C with an ice bath, diluted dropwise with 1N NaOH (40 mL) and water (95 mL), and extracted with CH_2Cl_2 (3×100 mL). The combined organic extracts were dried with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure, to give a brown solid residue (584 mg), which was subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH mixtures, gradient elution). On elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 98:2:0.4, amine **8a** (189 mg, 31% yield) was isolated as a beige sticky solid; R_f 0.24 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **8a** (19 mg, 0.05 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et_2O (3N, 0.15 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3×2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **8a**·2HCl (27 mg) as an orange solid: mp 173–176 °C; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3367, 3224, 2919, 2852, N-H, $\text{N}^+\text{-H}$, C-H st), 1609,

1589, 1519 (ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.34–1.50 (complex signal, 10H, 3- H_2 , 4- H_2 , 5- H_2 , 6- H_2 , 7- H_2), 1.59 (s, 3H, 8'- CH_3), 1.66 (m, 2H, 8- H_2), 1.88 (m, 2H, 2- H_2), 1.94 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 7'- H_{endo}), superimposed in part 1.95 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 13'- H_{syn}), 2.09 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 13'- H_{anti}), 2.55 (dm, $J=18.0$ Hz, 1H, 7'- H_{exo}), 2.77 (m, 1H, 10'-H), 2.84–2.94 (complex signal, 3H, 9- H_2 , 11'- H_{endo}), 3.20 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 11'- H_{exo}), 3.45 (m, 1H, 6'-H), 4.00 (m, 2H, 1- H_2), 4.86 (s, NH, ^+NH), 5.59 (br d, $J=4.4$ Hz, 1H, 9'-H), 7.60 (m, 1H, 3'-H), 8.85 (br d, $J=8.4$ Hz, 1H, 4'-H), 8.91 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, 2'-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 23.5 (CH_3 , 8'- CH_3), 27.4 (CH, C6'), 27.5 (CH_2 , C3), 27.8 (CH, C10'), 28.0 (CH_2 , C4), 28.6 (CH_2 , C5), 29.3 (CH_2 , C13'), 30.2 (CH_2), 30.3 (CH_2), 30.5 (CH_2) (C6, C7, C8), 31.2 (CH_2 , C2), 36.0 (CH_2), 36.1 (CH_2) (C7', C11'), 40.9 (CH_2 , C9), 49.3 (CH_2 , C1), 112.0 (C, C4a'), 117.6 (C, C5a'), 122.0 (CH, C3'), 125.2 (CH, C9'), 134.6 (C, C8'), 137.6 (CH, C4'), 149.7 (C, C11a'), 152.2 (C, C12a'), 156.2 (CH, C2'), 157.4 (C, C5'); HRMS (ESI) calcd for ($\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_4 + \text{H}^+$) 393.3013, found 393.3022.

***N*-(1,4-Difluoro-6,7,10,11-tetrahydro-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-yl)nonane-1,9-diamine (8b)**

It was prepared as described for **8a**. From nitrile **7b** (101 mg, 0.24 mmol), amine **8b** (100 mg, 98% yield) was obtained as a yellow oil, without the need of any column chromatography purification; R_f 0.18 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **8b** (23 mg, 0.05 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et_2O (3N, 0.15 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3×2 mL) to give, after drying at 65 $^\circ\text{C}/2$ Torr for 48 h, **8b**·2HCl (30 mg) as a yellow solid: mp 153–155 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3369, 3214, 2919, 2852, N-H, $\text{N}^+\text{-H}$, C-H st), 1646, 1586, 1516 (ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.28–1.42 (complex

signal, 10H, 3-H₂, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.60 (s, 3H, 9'-CH₃), 1.64 (m, 2H, 8-H₂), 1.78 (tt, $J=J'=6.8$ Hz, 2H, 2-H₂), 1.97 (br d, $J=17.2$ Hz, 1H, 10'-H_{endo}), superimposed 1.94–2.00 (m, 1H, 13'-H_{syn}), 2.08 (dm, $J=12.0$ Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.58 (dd, $J=17.2$ Hz, $J'=4.8$ Hz, 1H, 10'-H_{exo}), 2.77 (m, 1H, 7'-H), 2.90 (br t, $J=7.6$ Hz, 2H, 9-H₂), 2.99 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 6'-H_{endo}), 3.19 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=5.2$ Hz, 1H, 6'-H_{exo}), 3.60 (m, 1H, 11'-H), 3.73 (dt, $J=J'=6.8$ Hz, 2H, 1-H₂), 4.86 (s, NH, +NH), 5.61 (br d, $J=5.2$ Hz, 1H, 8'-H), 7.29 (ddd, $J=12.8$ Hz, $J'=8.8$ Hz, $J''=4.0$ Hz, 1H, 2'-H), 7.68 (ddd, $J=10.0$ Hz, $J'=8.8$ Hz, $J''=4.4$ Hz, 1H, 3'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.4 (CH₃, 9'-CH₃), 27.4 (CH, C11'), 27.5 (CH₂, C3), 27.7 (CH + CH₂, C7', C4), 28.6 (CH₂, C5), 29.0 (CH₂, C13'), 30.11 (CH₂), 30.14 (CH₂), 30.3 (CH₂) (C6, C7, C8), 31.6 (CH₂, C2), 36.2 (CH₂, C6'), 37.0 (CH₂, C10'), 40.8 (CH₂, C9), 51.3 (d, $J=14.6$ Hz, CH₂, C1), 109.3 (d, $J=14.6$ Hz, C, C12a'), 111.3 (dd, $J=27.5$ Hz, $J'=7.6$ Hz, CH, C2'), 118.4 (dd, $J=18.6$ Hz, $J'=12.3$ Hz, CH, C3'), 118.8 (C, C11a'), 125.4 (CH, C8'), 131.1 (m, C, C4a'), 134.1 (C, C9'), 149.3 (d, $J=250.9$ Hz, C, C1'), 152.9 (C, C5a'), 155.6 (d, $J=249.2$ Hz, C, C4'), 156.3 (C, C12'); HRMS (ESI) calcd for (C₂₆H₃₅F₂N₃ + H⁺) 428.2872, found 428.2880.

***N*-(5,6,9,10-Tetrahydro-7-methyl-5,9-methanocycloocta[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridin-4-yl)nonane-1,9-diamine (8c)**

It was prepared as described for **8a**. From nitrile **7c** (585 mg, 1.49 mmol), amine **8c** (599 mg, quantitative yield) was obtained as a yellow oil, without the need of any column chromatography purification; R_f 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of **8c** (88 mg, 0.22 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was filtered through a 0.2 μ m PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.20 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 2 mL) to give, after

drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **8c**·2HCl (100 mg) as a yellow solid: mp 86–87 °C; IR (KBr) ν 3500–2500 (max at 3441, 3291, 3198, 3003, 2855, N-H, N⁺-H and C-H st), 1580, 1553 (ar-C-C and ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.36–1.54 (complex signal, 10H, 3-H₂, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.58 (s, 3H, 7'-CH₃), 1.66 (tt, $J=J'=7.6$ Hz, 2H, 8-H₂), 1.81 (tt, $J=J'=7.6$ Hz, 2H, 2-H₂), 1.89 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 6'-H_{endo}), superimposed in part 1.91 (dm, $J=12.8$ Hz, 1H, 12'-H_{syn}), 2.07 (dm, $J=12.8$ Hz, 1H, 12'-H_{anti}), 2.52 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=4.8$ Hz, 1H, 6'-H_{exo}), superimposed in part 2.76 (m, 1H, 9'-H), 2.77 (br d, $J=17.6$ Hz, 1H, 10'-H_{endo}), 2.91 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, 9-H₂), 3.16 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 10'-H_{exo}), 3.34 (m, 1H, 5'-H), 3.86 (tm, $J=7.6$ Hz, 2H, 1-H₂), 4.85 (s, NH, ⁺NH), 5.57 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H, 8'-H), 7.54 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, 3'-H), 7.72 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, 2'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.5 (CH₃, 7'-CH₃), 27.2 (CH, C5'), 27.5 (CH₂, C3), 27.8 (CH₂, C4), 28.0 (CH, C9'), 28.6 (CH₂, C5), 29.4 (CH₂, C12'), 30.1 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.4 (CH₂) (C6, C7, C8), 31.0 (CH₂, C2), 35.5 (CH₂, C10'), 35.9 (CH₂, C6'), 40.8 (CH₂, C9), 46.6 (CH₂, C1), 117.3 (C, C4a'), 119.2 (C, C3a'), 122.6 (CH, C3'), 123.5 (CH, C2'), 125.0 (CH, C8'), 134.6 (C, C7'), 147.1 (C, C10a'), 152.5 (C, C11a'), 153.3 (C, C4'); HRMS (ESI) calcd for (C₂₄H₃₅N₃S + H⁺) 398.2624, found 398.2629.

***N*-(6,7,10,11-Tetrahydro-2-methoxy-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-yl)nonane-1,9-diamine (8d)**

It was prepared as described for **8a**. From nitrile **7d** (60 mg, 0.14 mmol), amine **8d** (34 mg, 58% yield) was obtained as a yellow oil, without the need of any column chromatography purification; R_f 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9:1:0.1).

A solution of **8d** (34 mg, 0.08 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was filtered through a 0.2 μ m PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.08 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 2 mL) to give, after

drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **8d**·2HCl (37 mg) as a yellow solid: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.28–1.48 (complex signal, 10H, 3-H₂, 4-H₂, 5-H₂, 6-H₂, 7-H₂), 1.58 (s, 3H, 9'-CH₃), 1.66 (m, 2H, 8-H₂), 1.88 (m, 2H, 2-H₂), 1.93 (br d, *J*=17.6 Hz, 1H, 10'-H_{endo}), superimposed in part 1.96 (dm, *J*=12.8 Hz, 1H, 13'-H_{syn}), 2.09 (dm, *J*=12.8 Hz, 1H, 13'-H_{anti}), 2.56 (dd, *J*=17.6 Hz, *J'*=4.0 Hz, 1H, 10'-H_{exo}), 2.77 (m, 1H, 7'-H), superimposed in part 2.89 (d, *J*=18.0 Hz, 1H, 6'-H_{endo}), 2.91 (m, 2H, 9-H₂), 3.20 (dd, *J*=18.0 Hz, *J'*=5.6 Hz, 1H, 6'-H_{exo}), 3.49 (m, 1H, 11'-H), 3.96 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.97 (m, 2H, 1-H₂), 4.86 (s, NH, ⁺NH), 5.59 (br d, *J*=4.4 Hz, 1H, 8'-H), 7.53 (dd, *J*=9.2 Hz, *J'*=2.4 Hz, 1H, 3'-H), 7.66 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, 1'-H), 7.73 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, 4'-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆) δ 23.1 (9'-CH₃), 25.4, 25.8, 26.0, 26.1, 26.9, 27.9, 28.4, 28.5, 28.7 (C3, C4, C5, C6, C7, C8, C7', C11', C13'), 30.1 (C2), 34.5, 35.6 (C6', C10'), 38.7 (C9), 47.0 (C1), 55.8 (2'-OCH₃), 104.7 (C1'), 115.4, 117.0 (C11a', C12a'), 120.9, 123.9, 124.2 (C3', C4', C8'), 132.6, 133.4 (C4a', C9'), 148.1 (C5a'), 153.7 (C, C12'), 156.0 (C, C2'); HRMS (ESI) calcd for (C₂₇H₃₉N₃O + H⁺) 422.3166, found 422.3181.

9,10-Dihydro-4,5-dihydroxy-9,10-dioxo-N-{9-[(6,7,10,11-tetrahydro-8-methyl-6,10-methanocycloocta[*b*][1,8]naphthyridin-5-yl)amino]nonyl}anthracene-2-carboxamide (9a)

A suspension of rhein, **1** (80 mg, 0.28 mmol), in a mixture of EtOAc (2.3 mL) and DMF (0.3 mL) was treated with *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC (60 mg, 0.31 mmol), Et₃N (0.09 mL, 65 mg, 0.65 mmol), and 1-hydroxy-1*H*-benzotriazole, HOBt (52 mg, 0.38 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and treated with a suspension of amine **8a** (101 mg, 0.26 mmol) in a mixture of EtOAc (5 mL) and DMF (2.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 day and concentrated under reduced pressure, to give a dark brown oil (447 mg), which was subjected to column chromatography

purification (35–70 μm silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH mixtures, gradient elution). On elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 99:1:0.4, hybrid **9a** (152 mg, 90% yield) was isolated as a reddish solid; R_f 0.75 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of hybrid **9a** (88 mg, 0.13 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et_2O (3N, 0.13 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3×2 mL) to give, after drying at 65 $^\circ\text{C}/2$ Torr for 48 h, **9a**·HCl (89 mg) as an orange solid: mp 173–176 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3214, 2919, 2852, O-H, N-H, $\text{N}^+\text{-H}$, C-H st), 1622, 1589 (C=O, ar-C-C, ar-C-N st) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.38–1.50 (complex signal, 10H, 3'-H₂, 4'-H₂, 5'-H₂, 6'-H₂, 7'-H₂), 1.59 (s, 3H, 8''-CH₃), 1.65 (m, 2H, 2'-H₂), 1.82–1.96 (complex signal, 3H, 8'-H₂, 13''-H_{syn}), 1.94 (br d, $J=16.8$ Hz, 1H, 7''-H_{endo}), 2.08 (dm, $J=12.4$ Hz, 1H, 13''-H_{anti}), 2.53 (dm, $J=16.8$ Hz, 1H, 7''-H_{exo}), 2.76 (m, 1H, 10''-H), 2.87 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 11''-H_{endo}), 3.16 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 11''-H_{exo}), superimposed in part 3.38 (m, 1H, 6''-H), 3.41 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, 1'-H₂), 3.93 (br t, $J=6.0$ Hz, 2H, 9'-H₂), 4.85 (s, OH, NH, ^+NH), 5.59 (br d, $J=5.2$ Hz, 1H, 9''-H), 7.37 (dd, $J=7.6$ Hz, $J'=2.4$ Hz, 1H, 6-H), 7.51 (dd, $J=8.8$ Hz, $J'=4.0$ Hz, 1H, 3''-H), 7.69 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, 3-H), 7.74–7.81 (complex signal, 2H, 7-H, 8-H), 8.14 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, 1-H), 8.74 (dd, $J=8.8$ Hz, $J'=1.6$ Hz, 1H, 4''-H), 8.84 (dd, $J=4.0$ Hz, $J'=1.6$ Hz, 1H, 2''-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 23.5 (CH₃, 8''-CH₃), 27.2 (CH, C6''), 27.7 (CH, C10''), 27.78 (CH₂), 27.84 (CH₂) (C6', C7'), 29.2 (CH₂, C13''), 30.0 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.4 (CH₂) (C2', C3', C4', C5'), 31.0 (CH₂, C8'), 35.9 (2CH₂, C7'', C11''), 41.5 (CH₂, C1'), 49.3 (CH₂, C9'), 111.7 (C, C4a''), 116.6 (C, C10a), 117.5 (C, C5a''), 118.1 (C, C4a), 118.9 (CH, C1), 120.8 (CH, C8), 121.8 (CH, C3''), 123.7 (CH, C3), 125.1 (CH, C9''), 125.8 (CH, C6), 134.3 (C, C8''), 134.6

(C, C8a), 134.7 (C, C9a), 137.2 (CH, C4''), 138.7 (CH, C7), 143.5 (C, C2), 149.4 (C, C11a''), 152.1 (C, C12a''), 156.0 (CH, C2''), 157.1 (C, C5''), 163.2 (C, C4), 163.5 (C, C5), 166.9 (C, CONH), 181.6 (C, C9), 193.2 (C, C10); HRMS (ESI) calcd for (C₄₀H₄₂N₄O₅ + H⁺) 659.3228, found 659.3230; HPLC purity: 99.8%.

***N*-{9-[(1,4-Difluoro-6,7,10,11-tetrahydro-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-yl)amino]nonyl}-9,10-dihydro-4,5-dihydroxy-9,10-dioxoanthracene-2-carboxamide (**9b**)**

It was prepared as described for **9a**. From rhein, **1** (53 mg, 0.19 mmol), and amine **8b** (73 mg, 0.17 mmol), a brown oily residue (295 mg) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 99.7:0.3:0.4 to 99:1:0.4, hybrid **9b** (82 mg, 69% yield) was isolated as a yellow solid; *R_f* 0.87 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 9.5:0.5:0.1).

A solution of hybrid **9b** (56 mg, 0.08 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.10 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 × 2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **9b**·HCl (51 mg) as an orange solid: mp 145–150 °C; IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3271, 2925, 2852, O-H, N-H, N⁺-H and C-H st), 1622, 1591 (C=O, ar-C-C and ar-C-N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.26–1.42 (complex signal, 10H, 3'-H₂, 4'-H₂, 5'-H₂, 6'-H₂, 7'-H₂), 1.59 (s, 3H, 9''-CH₃), superimposed in part 1.64 (m, 2H, 2'-H₂), 1.76 (m, 2H, 8'-H₂), superimposed in part 1.95 (dm, *J*=11.6 Hz, 1H, 13''-H_{syn}), 1.97 (br d, *J*=18.0 Hz, 1H, 10''-H_{endo}), 2.06 (dm, *J*=11.6 Hz, 1H, 13''-H_{anti}), 2.56 (dm, *J*=18.0 Hz, 1H, 10''-H_{exo}), 2.75 (m, 1H, 7''-H), 2.97 (br d, *J*=18.0 Hz, 1H, 6''-H_{endo}), 3.16 (dm, *J*=18.0 Hz, 1H, 6''-

H_{exo}), 3.39 (m, 2H, 1'-H₂), 3.58 (m, 1H, 11''-H), 3.70 (m, 2H, 9'-H₂), 4.86 (s, OH, NH, ⁺NH), 5.59 (br d, $J=4.0$ Hz, 1H, 8''-H), 7.22 (m, 1H, 2''-H), 7.32 (m, 1H, 6-H), 7.56–7.78 (complex signal, 3H, 7-H, 8-H, 3''-H), 7.64 (s, 1H, 3-H), 8.07 (s, 1H, 1-H); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 23.4 (CH₃, 9''-CH₃), 27.5 (CH, C11''), 27.6 (CH₂), 27.7 (CH₂) (C6', C7'), 27.8 (CH, C7''), 29.0 (CH₂, C13''), 29.9 (CH₂), 30.0 (CH₂), 30.2 (CH₂), 30.3 (CH₂) (C2', C3', C4', C5'), 31.6 (CH₂, C8'), 36.2 (CH₂, C6''), 37.0 (CH₂, C10''), 41.1 (CH₂, C1'), 51.1 (d, $J=12.2$ Hz, CH₂, C9'), 109.2 (d, $J=16.9$ Hz, C, C12a''), 111.3 (br d, $J=21.6$ Hz, CH, C2''), 116.8 (C, C10a), 118.4 (CH + C, C3'', C4a), 118.7 (C, C11a''), 118.8 (CH, C1), 120.9 (CH, C8), 123.7 (CH, C3), 125.5 (CH, C8''), 125.8 (CH, C6), 130.9 (d, $J=18.3$ Hz, C, C4a''), 134.1 (C, C9''), 134.6 (C, C8a), 135.0 (C, C9a), 138.7 (CH, C7), 143.6 (C, C2), 149.2 (d, $J=244.9$ Hz, C, C1''), 153.0 (C, C5a''), 155.6 (d, $J=250.4$ Hz, C, C4''), 156.1 (C, C12''), 163.3 (C, C4), 163.6 (C, C5), 167.1 (C, CONH), 181.9 (C, C9), 193.5 (C, C10); HRMS (ESI) calcd for (C₄₁H₄₁F₂N₃O₅ + H⁺) 694.3087, found 694.3089; HPLC purity: 99.3%.

9,10-Dihydro-4,5-dihydroxy-9,10-dioxo-N-{9-[(5,6,9,10-tetrahydro-7-methyl-5,9-methanocycloocta[*b*]thieno[3,2-*e*]pyridin-4-yl)amino]nonyl}anthracene-2-carboxamide (9c)

It was prepared as described for **9a**. From rein, **1** (387 mg, 1.36 mmol), and amine **8c** (493 mg, 1.24 mmol), a brown oily residue (1.53 g) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 95:5:1, hybrid **9c** (581 mg, 71% yield) was isolated as an orange solid; R_f 0.39 (hexane/EtOAc/Et₃N 1:1:0.01).

A solution of hybrid **9c** (581 mg, 0.88 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was filtered through a 0.2 μ m PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et₂O (3N, 0.9 mL) and evaporated

under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3×2 mL) to give, after drying at 65 °C/2 Torr for 48 h, **9c**·HCl (562 mg) as an orange solid: mp 174 – 175 °C; IR (KBr) ν 3500 – 2500 (max at 3225 , 3094 , 2926 , 2853 , O-H, N-H, N^+ -H and C-H st), 1674 , 1628 , 1609 , 1553 (C=O, ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.37 – 1.50 (complex signal, 10H , $3'$ - H_2 , $4'$ - H_2 , $5'$ - H_2 , $6'$ - H_2 , $7'$ - H_2), 1.57 (s, 3H , $7''$ - CH_3), 1.66 (tt, $J=J'=6.8$ Hz, 2H , $2'$ - H_2), 1.76 (tt, $J=J'=7.2$ Hz, 2H , $8'$ - H_2), 1.86 (br d, $J=17.2$ Hz, 1H , $6''$ - H_{endo}), superimposed in part 1.87 (dm, $J=11.6$ Hz, 1H , $12''$ - H_{syn}), 2.03 (dm, $J=11.6$ Hz, 1H , $12''$ - H_{anti}), 2.49 (dm, $J=17.2$ Hz, 1H , $6''$ - H_{exo}), superimposed in part 2.71 (br d, $J=17.6$ Hz, 1H , $10''$ - H_{endo}), 2.73 (m, 1H , $9''$ -H), 3.08 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H , $10''$ - H_{exo}), 3.26 (m, 1H , $5''$ -H), 3.41 (t, $J=6.8$ Hz, 2H , $1'$ - H_2), 3.72 (tm, $J=7.2$ Hz, 2H , $9'$ - H_2), 4.85 (s, OH, NH, ^+NH), 5.54 (br d, $J=4.8$ Hz, 1H , $8''$ -H), 7.25 (d, $J=8.0$ Hz, 1H , 6-H), 7.40 (d, $J=6.0$ Hz, 1H , $3''$ -H), 7.52 (d, $J=6.0$ Hz, 1H , $2''$ -H), 7.59 (br s, 1H , 3-H), superimposed in part 7.60 (d, $J=8.0$ Hz, 1H , 8-H), 7.68 (dd, $J=J'=8.0$ Hz, 1H , 7-H), 7.99 (br s, 1-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 23.5 (CH_3 , $7''$ - CH_3), 27.1 (CH, $\text{C}5''$), 27.7 (CH + CH_2), 28.0 (CH_2) ($\text{C}9''$, $\text{C}6'$, $\text{C}7'$), 29.3 (CH_2 , $\text{C}12''$), 29.9 (CH_2), 30.0 (CH_2), 30.1 (CH_2), 30.3 (CH_2) ($\text{C}2'$, $\text{C}3'$, $\text{C}4'$, $\text{C}5'$), 30.9 (CH_2 , $\text{C}8'$), 35.4 (CH_2 , $\text{C}10''$), 35.8 (CH_2 , $\text{C}6''$), 41.1 (CH_2 , $\text{C}1'$), 46.7 (CH_2 , $\text{C}9'$), 116.8 (C, $\text{C}10\text{a}$), 117.2 (C, $\text{C}4\text{a}''$), 118.3 (C, $\text{C}4\text{a}$), 118.9 (CH, C1), 119.0 (C, $\text{C}3\text{a}''$), 120.9 (CH, C8), 122.5 (CH, $\text{C}3''$), 123.3 (CH, $\text{C}2''$), 123.7 (CH, C3), 125.0 (CH, $\text{C}8''$), 125.8 (CH, C6), 134.5 (C, $\text{C}8\text{a}$), 134.6 (C, $\text{C}7''$), 135.0 (C, $\text{C}9\text{a}$), 138.7 (CH, C7), 143.6 (C, C2), 147.0 (C, $\text{C}10\text{a}''$), 152.4 (C, $\text{C}11\text{a}''$), 153.2 (C, $\text{C}4''$), 163.3 (C, C4), 163.5 (C, C5), 167.1 (C, CONH), 181.8 (C, C9), 193.4 (C, C10); HRMS (ESI) calcd for ($\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{S} + \text{H}^+$) 664.2840 , found 664.2838 ; HPLC purity: 98.5%.

9,10-Dihydro-4,5-dihydroxy-9,10-dioxo-N-{9-[(6,7,10,11-tetrahydro-2-methoxy-9-methyl-7,11-methanocycloocta[*b*]quinolin-12-yl)amino]nonyl}anthracene-2-carboxamide (9d)

It was prepared as described for **9a**. From rhein, **1** (74 mg, 0.26 mmol), and amine **8d** (100 mg, 0.24 mmol), a brown solid residue (425 mg) was obtained and subjected to column chromatography purification (35–70 μm silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH mixtures, gradient elution). On elution with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 95:5:1, hybrid **9d** (73 mg, 45% yield) was isolated as an orange solid; R_f 0.90 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/50\%$ aq. NH_4OH 9:1:0.1).

A solution of hybrid **9d** (73 mg, 0.11 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was filtered through a 0.2 μm PTFE filter, treated with a solution of HCl in Et_2O (3N, 0.10 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3×2 mL) to give, after drying at 65 $^\circ\text{C}/2$ Torr for 48 h, **9d**·HCl (76 mg) as an orange solid: mp 137–138 $^\circ\text{C}$; IR (KBr) ν 3500–2500 (max at 3264, 3055, 2926, 2855, O-H, N-H, $\text{N}^+\text{-H}$ and C-H st), 1674, 1628, 1585, 1558 (C=O, ar-C-C and ar-C-N st) cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.38–1.46 (complex signal, 10H, 3'-H₂, 4'-H₂, 5'-H₂, 6'-H₂, 7'-H₂), 1.60 (s, 3H, 9''-CH₃), 1.67 (tt, $J=J'=6.4$ Hz, 2H, 2'-H₂), 1.85 (tt, $J=J'=6.8$ Hz, 2H, 8'-H₂), 1.93 (br d, $J=18.0$ Hz, 1H, 10''-H_{endo}), superimposed in part 1.94 (dm, $J=13.2$ Hz, 1H, 13''-H_{syn}), 2.07 (dm, $J=13.2$ Hz, 1H, 13''-H_{anti}), 2.53 (dd, $J=18.0$ Hz, $J'=5.2$ Hz, 1H, 10''-H_{exo}), 2.75 (m, 1H, 7''-H), 2.80 (br d, $J=17.6$ Hz, 1H, 6''-H_{endo}), 3.14 (dd, $J=17.6$ Hz, $J'=5.6$ Hz, 1H, 6''-H_{exo}), 3.39 (m, 1H, 11''-H), 3.43 (dt, $J=J'=6.4$ Hz, 2H, 1'-H₂), 3.83 (s, 3H, 2''-OCH₃), superimposed in part 3.84 (m, 2H, 9'-H₂), 4.85 (s, OH, NH, ^+NH), 5.59 (br d, $J=5.2$ Hz, 1H, 8''-H), 7.33 (dd, $J=8.0$ Hz, $J'=1.2$ Hz, 1H, 6-H), 7.37 (dd, $J=9.2$ Hz, $J'=2.4$ Hz, 1H, 3''-H), 7.41 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, 1''-H), 7.50 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, 4''-H), 7.65 (dd, $J=7.6$ Hz, $J'=1.2$ Hz, 1H, 8-H), 7.69 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, 3-H), 7.73

(dd, $J=8.0$ Hz, $J'=7.6$ Hz, 1H, 7-H), 8.12 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, 1-H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ 23.5 (CH_3 , 9''- CH_3), 27.4 (CH, C11''), 27.5 (CH_2), 27.7 (CH_2) (C6', C7'), 27.9 (CH, C7''), 29.4 (CH_2 , C13''), 29.7 (CH_2), 29.9 (CH_2), 30.0 (CH_2), 30.1 (CH_2) (C2', C3', C4', C5'), 32.0 (CH_2 , C8'), 35.8 (CH_2 , C6''), 36.3 (CH_2 , C10''), 41.0 (CH_2 , C1'), 49.1 (CH_2 , C9'), 56.3 (CH_3 , 2''- OCH_3), 105.8 (CH, C1''), 116.7 (C, C10a), 117.1 (C), 118.2 (C), 118.3 (C) (C4a, C11a'', C12a''), 118.8 (CH, C1), 120.7 (CH, C8), 121.6 (CH), 125.2 (2CH) (C3'', C4'', C8''), 123.7 (CH, C3), 125.8 (CH, C6), 134.4 (C), 134.9 (2C) (C9a, C4a'', C9'') C8''), 134.6 (C, C8a), 138.7 (CH, C7), 143.6 (C, C2), 149.3 (C, C5a''), 155.7 (C, C12''), 157.9 (C, C2''), 163.3 (C, C4), 163.5 (C, C5), 167.1 (C, CONH), 181.8 (C, C9), 193.3 (C, C10); HRMS (ESI) calcd for ($\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_6 + \text{H}^+$) 688.3381, found 688.3378; HPLC purity: 97.6%.

Table S1. Calculated pK_a values of selected reference and target compounds determined from high-level QM calculations.

Compound	R	pK_a (exp)	pK_a (QM)
Reference compounds			
Quinoline		4.9 [1,2]	2.9
4-aminoquinoline		---	8.2
[1,8]-naphthyridine		3.4 [2,3]	2.4
4-amino-[1,8]- naphthyridine		---	8.0
tacrine		9.9 [4]	10.5
6-chlorotacrine		---	9.4
Compounds in this work			
Compound			
Huprine Y	H	8.9 [5] ^a	9.5
	CH ₃	-	8.2
6a	H	-	10.1
9a model	CH ₃	-	9.2
6b	H	-	7.8
9b model	CH ₃	-	7.0
6c	H	-	7.6
9c model	CH ₃	-	6.7
6d	H	-	10.1
9d model	CH ₃	-	8.8

^a Value determined for huprine X. Note that the difference between huprine X and Y is the replacement of methyl by ethyl at position 9 in the fused bicyclic ring, and hence the pK_a values of the two compounds are expected to be nearly identical.

Table S2. Residues utilized to simulate the reduced model of the binding site for the human AChE, BChE, and BACE-1 enzymes. In the latter case, because the two enantiomers of the rhein-huprine hybrid **3** exhibit similar inhibitory potency, the two enantiomeric forms were considered for the binding of the huprine moiety to BACE-1. When a small molecule was used to represent the side chain of a given amino acid, this is indicated in parenthesis.

AChE	BChE	BACE-1	BACE-1
Tyr337 (phenol)	Ala328	Asp228 (acetate)	Asp228 (acetate)
Trp439 (indole)	Trp430 (indole)	Asp32 (acetic acid)	Asp32 (acetic acid)
Trp86 (indole)	Trp82 (indole)	Leu 30 (isopentane)	Leu 30 (isopentane)
Tyr449 (phenol)	Tyr440 (phenol)	Ile 118 (2-methylbutane)	Ile 118 (2-methylbutane)
Glu202 (acetate)	Glu197 (acetate)	Phe108 (benzene)	Phe108 (benzene)
Pro446-His447	Met437-His438	Ser35 (methanol)	Gly34-Ser35
Ser203 (methanol)	Ser198 (methanol)	Gly230-Thr231	Gly230-Thr231
Gly121-Gly122	Gly116-Gly117	Tyr71-Thr72	Tyr71 (phenol)
-	-	Gln73-Gly74	Gln73-Gly74

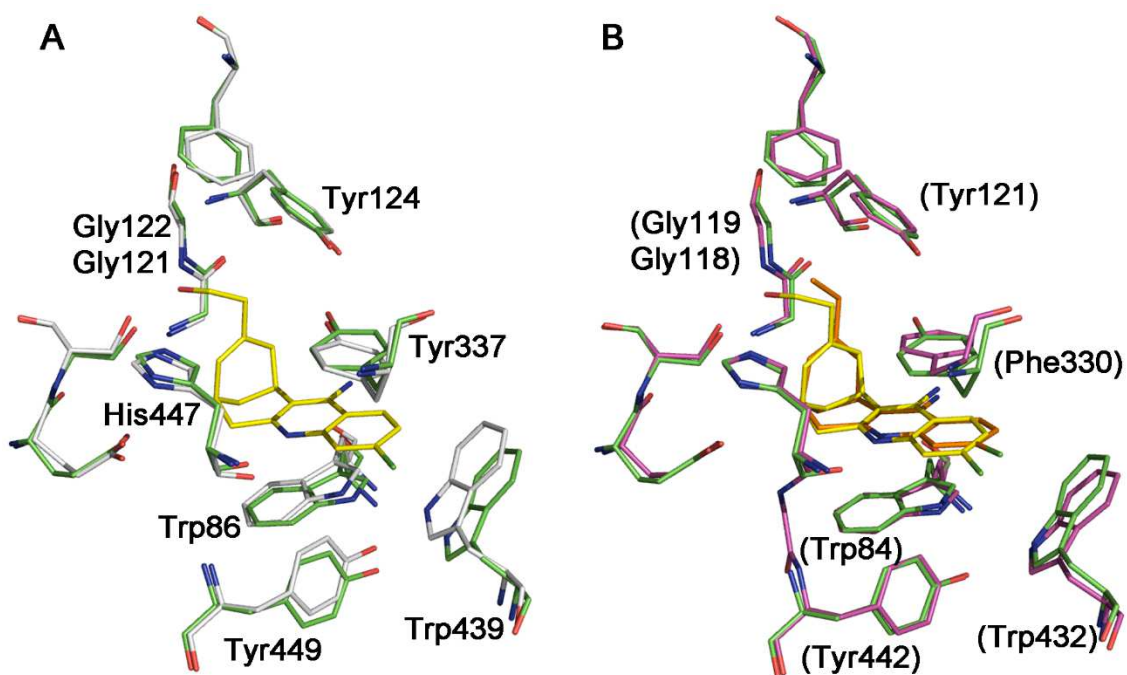


Figure S1. (A) Superposition of the residues in the catalytic site of human AChE in the apo form (PDB code: 4PQE) and bound to huprine W (carbon atoms in yellow; PDB code: 4BDT). (B) Superposition of the residues in the catalytic site of human AChE bound to huprine W (yellow; PDB code: 4BDT), and to huprine X in *Torpedo californica* AChE (TcAChE, carbon atoms in orange; PDB code: 1E66). Numbering of residues corresponds to the human enzyme, while the corresponding residues in TcAChE are given in parenthesis. For the sake of clarity, hydrogen atoms are omitted.

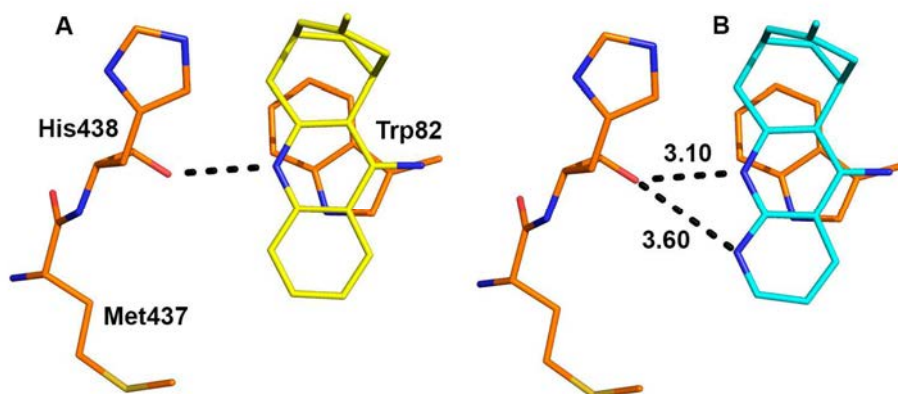


Figure S2. Representation of selected key interactions that modulate the binding of (A) huprine (carbon atoms in yellow) and (B) the naphthyridine analog 6a (carbon atoms in blue) to the catalytic site of hBChE. Binding involves cation- π interactions of the positively charged heteroaromatic ring of huprine with both Trp82. A hydrogen bond with the carbonyl oxygen of His438 is formed. Replacement of the CH bond in position 4 of tacrine by a nitrogen atom in the naphthyridine analog **6a** leads to unfavourable secondary interactions with the lone pairs of the His438 carbonyl oxygen (distances in Å). For the sake of clarity, hydrogen atoms are omitted.

BBB Permeation Assay

Table S3. Literature and experimental permeability (Pe 10^{-6} cm s^{-1}) values in the PAMPA-BBB assay of 14 commercial drugs used for assay validation.

Compound	Bibliography value^a	Experimental value (n=3) \pm S.D.
Cimetidine	0.0	0.7 ± 0.03
Norfloracin	0.1	0.9 ± 0.02
Ofloxacin	0.8	1.0 ± 0.05
Lomefloxacin	1.1	0.7 ± 0.06
Hydrocortisone	1.9	1.4 ± 0.05
Piroxicam	2.5	1.9 ± 0.03
Costicosterone	5.1	6.7 ± 0.10
Clonidine	5.3	6.5 ± 0.05
Promazine	8.8	13.8 ± 0.3
Progesterone	9.3	16.8 ± 0.03
Desipramine	12	17.8 ± 0.10
Imipramine	13	12.3 ± 0.10
Verapamil	16	26.1 ± 0.40
Testosterone	17	24.0 ± 0.30

^a From ref. [6].

References

- 1 Weast RC, Astle MJ, Beyer WH. CRC Handbook of Chemistry and Physics (66th edition), Boca Raton, Florida, USA (1985-1986).
- 2 Paulder WW, Kress TJ. The Naphthypyridine Chemistry. X: Protonation and Methylation of the 1,X-Naphthyridines. *J. Heterocycl. Chem.* 5, 561–564 (1968).
- 3 Albert A. Naphthyridines: ionization constants and spectra of four parent substances. *J. Chem. Soc.* 1790–1793 (1960).
- 4 Perrin DD. Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution, Butterworths, London, UK (1965); Supplement (1972).
- 5 Camps P, Cusack B, Mallender WD *et al.* Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* 57(2), 409–417 (2000).
- 6 Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 38, 223–232 (2003).

Anexo II: Artículo II

First homology model of Plasmodium falciparum glucose-6-phosphate dehydrogenase: Discovery of selective substrate analog-based inhibitors as novel antimalarial agents

European Journal of Medicinal Chemistry

(Eur. J. Med. Chem. 2018, 146, 108–122)

Nelson Alencar^{1,α}, Irene Sola^{2,α}, María Linares^{3,α}, Jordi Juárez-Jiménez¹, Caterina Pont², Antonio Viayna¹, David Vílchez¹, Cristina Sampedro², Paloma Abad^{3,4}, Susana Perez-Benavente⁴, Jeronimo Lameira⁵, Jose Manuel Bautista^{3,4}, Diego Munoz-Torrero^{*2}, Francisco Javier Luque^{*1}

¹Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

²Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy & Food Sciences and IBUB, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028 Barcelona, Spain.

³ Research Institute Hospital 12 de Octubre, Avda. de Cordoba s/n, 28041, Madrid, Spain

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

⁵Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos-LPDF, Instituto de Ciências Exatas e Naturais – ICEN, Universidade Federal do Pará – UFPA, Av. Augusto Correa, Nº 1: Guamá, Cep: 66.075-900 Belém-Pará, Brazil

*Corresponding author

^αThese authors contributed equally to this work



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

First homology model of *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase: Discovery of selective substrate analog-based inhibitors as novel antimalarial agents



Nelson Alencar^{a,1,2}, Irene Sola^{b,1}, María Linares^{c,1}, Jordi Juárez-Jiménez^a, Caterina Pont^b, Antonio Viayna^a, David Vélchez^a, Cristina Sampedro^b, Paloma Abad^{c,d}, Susana Pérez-Benavente^d, Jerónimo Lameira^e, José M. Bautista^{c,d}, Diego Muñoz-Torrero^{b,*}, F. Javier Luque^{a,**}

^a Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

^b Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy and Food Sciences and IBUB, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028 Barcelona, Spain

^c Research Institute Hospital 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^e Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos-LPDF, Instituto de Ciências Exatas e Naturais- ICEN, Universidade Federal do Pará – UFPA, Av. Augusto Correa, N° 1- Bairro: Guamá, Cep: 66.075-900 Belém-Pará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2017

Received in revised form

27 December 2017

Accepted 15 January 2018

Available online 4 February 2018

Keywords:

Malaria

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Plasmodium falciparum

Homology modeling

Selective inhibitors

Drug design

ABSTRACT

In *Plasmodium falciparum* the bifunctional enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase (PfG6PD-6PGL) is involved in the catalysis of the first reaction of the pentose phosphate pathway. Since this enzyme has a key role in parasite development, its unique structure represents a potential target for the discovery of antimalarial drugs. Here we describe the first 3D structural model of the G6PD domain of PfG6PD-6PGL. Compared to the human enzyme (hG6PD), the 3D model has enabled the identification of a key difference in the substrate-binding site, which involves the replacement of Arg365 in hG6PD by Asp750 in PfG6PD. In a prospective validation of the model, this critical change has been exploited to rationally design a novel family of substrate analog-based inhibitors that can display the necessary selectivity towards PfG6PD. A series of glucose derivatives featuring an α -methoxy group at the anomeric position and different side chains at position 6 bearing distinct basic functionalities has been synthesized, and their PfG6PD and hG6PD inhibitory activities and their toxicity against parasite and mammalian cells have been assessed. Several compounds displayed micromolar affinity (K_i up to 23 μ M), favorable selectivity (up to > 26-fold), and low cytotoxicity. Phenotypic assays with *P. falciparum* cultures revealed high micromolar IC₅₀ values, likely as a result of poor internalization of the compounds in the parasite cell. Overall, these results endorse confidence to the 3D model of PfG6PD, paving the way for the use of target-based drug design approaches in antimalarial drug discovery studies around this promising target.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: dmunoztorrero@ub.edu (D. Muñoz-Torrero), fjluque@ub.edu (F.J. Luque).¹ These authors contributed equally to this work.² Present address: Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos-LPDF, Instituto de Ciências Exatas e Naturais- ICEN, Universidade Federal do Pará – UFPA, Av. Augusto Correa, N° 1- Bairro: Guamá, Cep: 66.075-900 Belém-Pará, Brazil.

1. Introduction

Malaria caused by *Plasmodium* spp. remains one of the major causes of death worldwide, with over two-hundred million new infections each year and hundreds of thousands of deaths in 2015 [1]. Most deaths occur in sub-Saharan Africa (90%) and in children under 5 years old (70%) by infection with *Plasmodium falciparum*

(Pf), the deadliest of the five malaria parasite species that affect humans [1]. Despite the huge current health and economic impact of malaria, the past two decades have witnessed a tremendous advance in its management. Indeed, malaria has been or is in the process of being eradicated in 30 countries and its incidence, childhood prevalence, and mortality have significantly decreased, mainly as a consequence of improved vector control measures, chemoprophylaxis, diagnosis, and chemotherapy. However, *P. falciparum* has developed resistance to standard antimalarial drugs, including artemisinin, i.e. the core component of the current first-line treatment (artemisinin combination therapies), which poses a serious risk to the recent advances in management and eradication of malaria [2,3]. To overcome the increasing emergence of resistance, new drugs that operate by novel mechanisms of action and feature novel chemotypes, avoiding cross-resistance to current antimalarial drugs, are urgently needed [4–11].

G6PD is a housekeeping enzyme that catalyzes the first and rate-limiting step of the pentose phosphate pathway (PPP), where glucose-6-phosphate (G6P) is converted into 6-phosphogluconolactone, thereby leading to the production of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Next, 6-phosphogluconolactonase transforms the product into 6-phosphogluconate, which in turn is converted into ribulose-5-phosphate by the following enzyme in the PPP, 6-phosphogluconate dehydrogenase, producing another molecule of NADPH. This process contributes to maintain the cell redox homeostasis, which is of particular importance in RBC, since they do not contain mitochondria and therefore any other source of NADPH [12–15]. In *P. falciparum* the bifunctional enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase (PfG6PD-6PGL) catalyzes the first step in the parasitic PPP route, which affords reducing equivalents for biosynthetic reactions, anabolic pathways, and protection against reactive oxygen species [16–18]. Although other enzymes can contribute to NADPH production in Plasmodium spp. [19,20], PfG6PD-6PGL is essential for parasite survival during infection, as supported by profuse experimental studies, including reverse genetics, enzymatic inhibitory studies, chemical and RNAi targeting, and metabolic profiling [21–23]. Moreover, PfG6PD-6PGL (107 kDa) evolutionary and structurally differs notably from its human counterpart (hG6PD, 59 kDa), since it combines G6PD and 6PGL activities into a single protein [23–28]. PfG6PD-6PGL also differs from the human enzyme in substrate affinity and kinetic mechanism [23,24,29]. However, the lack of detailed 3D atomic information has precluded the development of target-based rational design of inhibitors, even though high throughput screening studies have led to the identification of a family of selective inhibitors, which are active at the sub-micromolar range and competitive with respect to G6P (Fig. 1) [30–32].

Malaria parasites have exerted selective pressure on the cellular phenotype of human erythrocytes, driving to the strongest known evolutionary adaptation behind sickle-cell trait, thalassemia, G6PD deficiency, and other erythrocyte pathologies that coexist in areas

where malaria is present [33,34]. Concurrently, G6PD deficiency in the human host provides some degree of tolerance against malaria, partially protecting from severe clinical manifestations [35]. G6PD deficiency is an X-linked recessive hereditary disorder in RBC caused by missense mutations at the housekeeping G6PD gene. More than 160 mutations have been described for this deficiency, giving rise to clinical phenotype from mild to severe dysfunction of the red cells [12,13]. Polymorphic distribution of G6PD-deficient alleles in different malaria endemic areas -with over 400 million people carrying polymorphic variants-supports the original malaria protection hypothesis [36–40], which is suggested to be the consequence of natural selection processes [12–14].

The association of the RBC redox homeostasis maintenance, the polymorphic G6PD selection in human populations to protect against malaria, and the biological significance of PfG6PD-6PGL in the parasite cycle and in response to oxidative stress, make PfG6PD-6PGL a promising target for the development of novel antimalarial drugs. Hence, we describe here the first 3D structural model of the G6PD domain of PfG6PD-6PGL, which has unveiled a critical difference in the substrate binding site compared to the hG6PD enzyme. To validate this structural model, a prospective study has been carried out, involving the synthesis of a series of substrate analog-based inhibitors, which have been rationally designed on the basis of the homology model, and their biological evaluation, including enzymatic inhibition assays against PfG6PD and hG6PD enzymes, phenotypic assays in cultured *P. falciparum*, and the assessment of their cytotoxic activities against a mammalian cell line.

2. Results and discussion

2.1. 3D structural model of PfG6PD

In order to build a 3D model of the Plasmodium enzyme, the sequence homology of PfG6PD was compared with the sequences of the G6PD enzyme from human, *Mycobacterium avium*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leuconostoc mesenteroides*, taking advantage of the availability of X-ray structures of the enzymes of these organisms (Supplementary Material Table S1), using the multiple alignment COBAL tool [41] implemented in BLAST [42,43].

The multiple alignment of the G6PD sequences of these four organisms revealed sequence similarities in the range of 33–50% and 50–67% considering both identities and conservative changes between residues, respectively (Supplementary Material Fig. S1). Nevertheless, there is a high structural resemblance in the 3D fold of the protein skeleton of these proteins, as it can be stated from the structural superposition of the X-ray structures (Fig. 2A). This structural analysis also revealed the large resemblance between the residues that are directly implicated in the binding of the substrate G6P (Fig. 2B). As expected from the negative charge of G6P, the binding of the phosphate group is assisted by interactions with positively charged residues, such as Lys205 and Arg365, and hydrogen-bond interactions with His201 [44,45]. On the other

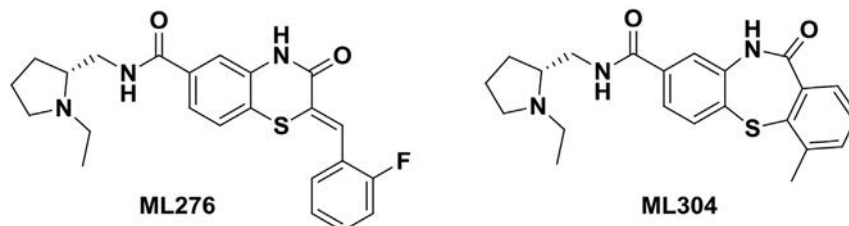


Fig. 1. Chemical structures of the selective PfG6PD inhibitors ML276 and ML304.

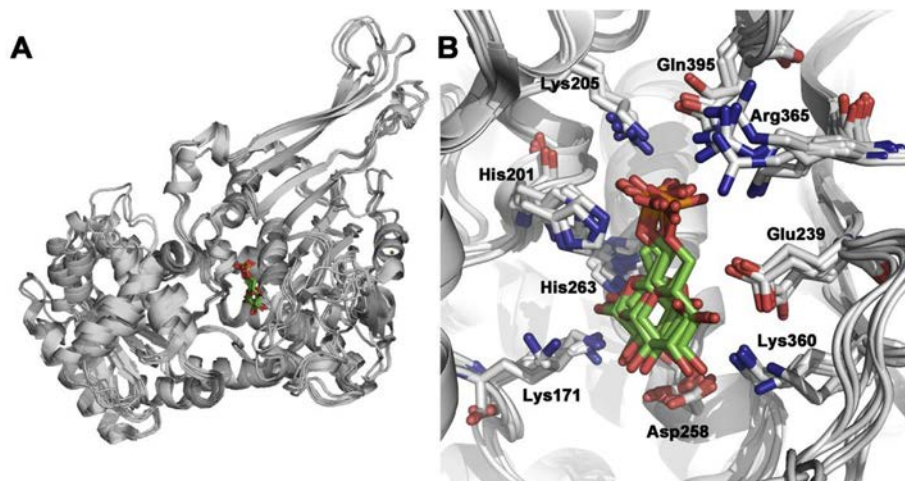


Fig. 2. Representation of selected X-ray structures of G6PD enzymes that contain G6P in the substrate-binding site from *H. sapiens* (PDB ID 2BHL and 5UKW), *T. cruzi* (PDB ID 5AQ1 and 4EM5), and *L. mesenteroides* (PDB ID 1E77 and 1E7Y). A) Superposition of the protein backbone (grey cartoon). G6P is shown as sticks (carbon atoms coloured in green). B) Superposition of key residues involved in the binding of G6P in these proteins. Numbering of residues in the human enzyme (see Table 1 for correspondence with residues in the other proteins). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

hand, the hydroxyl groups of the glucose moiety participate in hydrogen bonds with several residues in the binding pocket, such as Asp258, Glu239 and Lys360, which in turn are also bound through salt bridges.

The functional relevance of these residues is supported by the high degree of conservation between the enzymes of the distinct organisms (Table 1 and Supplementary Material Fig. S1), as the only alteration is the conserved replacement of Arg365 in *H. sapiens* (Arg408 in *T. cruzi*) by Lys344 in *L. mesenteroides*, thus enabling the electrostatic stabilization of the substrate-bound state via the formation of a salt bridge with the G6P phosphate group. Another difference concerns residue Gln395 (Gln437 in *T. cruzi*), which is replaced by Asp375 in *L. mesenteroides*, but this residue, which does not form a direct interaction with G6P, appears to be implicated in assisting the proper arrangement of Lys205 in the human enzyme (Lys183 in *L. mesenteroides*). Overall, the conservation of the residues involved in substrate binding accounts for the similar K_M values determined for human (52 μM [27]; 72 and 69 μM in RBC and recombinant G6PD, respectively [28]) and *L. mesenteroides* enzymes (69 and 114 μM with NAD^+ and NADP^+ , respectively [46,47]).

In light of these considerations, the sequence of PfG6PD–6PGL was compared with the sequence of the four organisms mentioned above. The multiple alignment shows that the PfG6PD domain, which roughly corresponds to the range of residues 335–910, has similarities in the range of 28–44% and 46–62% for identities and positive changes, respectively (Supplementary Material Fig. S2). Because these values are only slightly lower than the results obtained for the proteins of *H. sapiens*, *T. cruzi*, *M. avium*, and *L. mesenteroides* (see above), it is reasonable to expect that the overall fold of the G6PD domain should resemble the common 3D structure of the four known proteins. Furthermore, there is a close conservation of the residues implicated in G6P binding, and for Arg365 (human G6PD), which unexpectedly is aligned to Asp750 in PfG6PD (Table 1 and Supplementary Material Fig. S2). Noteworthy, this specific change is also observed in the enzyme of other Plasmodium species (Supplementary Material Table S2 and Fig. S3).

Because the Arg365 \rightarrow Asp750 mutation represents a drastic alteration in both the size and charged nature of the side chain between human and Plasmodium enzymes, a homology model of PfG6PD was built using SWISSMODEL [48] in order to assess the

potential structural effect on the binding of G6P. The 3D structural model was built using the X-ray structure of the human G6PD complexed to G6P (PDB ID 2BHL [27]) as template (Supplementary Material Table 1). The results depicted in Fig. S4 (Supplementary Material) led to a model with a global quality estimate of 0.64 (QMEAN Z-score of -3.36 ; a detailed list of the individual parameters that contribute to the QMEAN score is provided in Fig. S4) [49,50]. These values can be explained by the existence of three insertions in the PfG6PD sequence. The longest insertion involves 61 residues (Glu448–Pro508), whereas the other two correspond to shorter stretches (Leu400–Ser408 and Lys692–Glu700). However, these insertions are located in areas distinct from the substrate binding site, which suggests that they do not alter the spatial arrangement of the residues involved in G6P binding (Fig. 3). To further check this finding, an additional model was built after deletion of the inserted stretches in the PfG6PD domain. The 3D model had improved global quality estimate (0.74) and QMEAN Z-score (-2.09) (further information available in Supplementary Material Fig. S5). Note that these values compare well with the QMEAN Z-score obtained for the human enzyme (QMEAN Z-score of -2.10 ; Fig. S6 in Supplementary Material). Noteworthy, the structure of the substrate binding site remained unaltered, with the only exception of the replacement of Arg365 in hG6PD by Asp750 in PfG6PD (Fig. 3).

After homology modeling, molecular dynamics (MD) simulations were used to assess the structural and energetic stability of G6P bound to both human and *P. falciparum* enzymes. This was deemed necessary to ascertain the potential impact of the Arg365 \rightarrow Asp750 mutation on the binding of G6P, given the availability of experimental data for the two enzymes [25,27,28,51]. The simulation run for the hG6PD–G6P complex was stable along the whole trajectory, as noted in RMSD values of 2.3 Å for the protein backbone, 1.5 Å for the residues that define the binding pocket, and 1.3 Å for G6P (Supplementary Material Fig. S7). The structural stability of the complex is also reflected in the resemblance between the arrangement of G6P in the X-ray structure and the last snapshot of the MD simulation (Fig. 4A).

As expected from the structural relaxation of the homology model, a larger RMSD value was obtained for the protein backbone in the first 30 ns of the trajectory run for PfG6PD, but it remained stable for the rest of the simulation (Supplementary Material

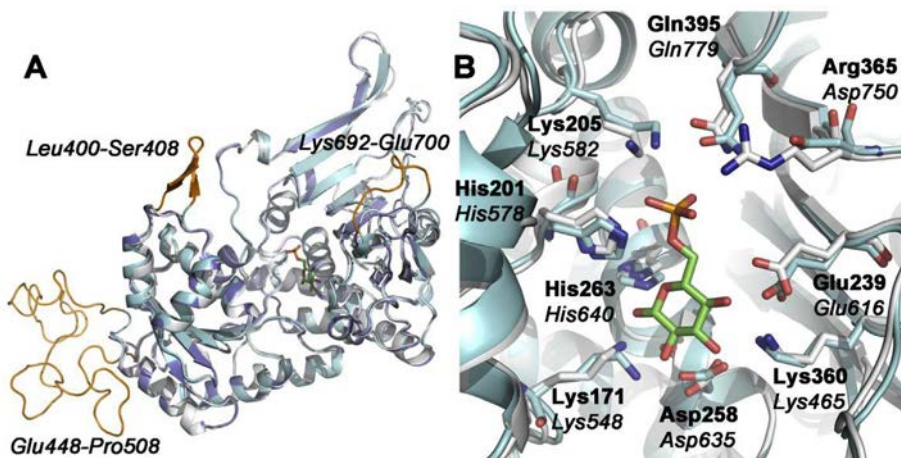


Fig. 3. Representation of the 3D structural model of *PfG6PD*. A) Superposition of the X-ray structure of hG6PD with G6P in the substrate binding site (PDB ID 2BHL; white cartoon), and the homology model built for *PfG6PD* (residues 335–910; light blue cartoon), and after elimination of insertion loops (dark blue cartoon). The inserted regions in *PfG6PD* are shown in orange. B) Superposition of key residues involved in the binding of G6P in these proteins. Numbering of residues in the human and *Plasmodium* enzymes are given in bold and italics, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

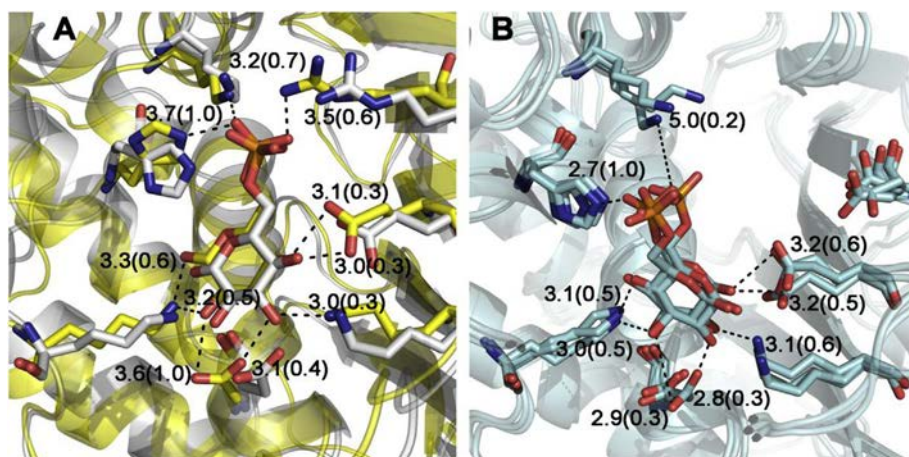


Fig. 4. Representation of sampled structures of the complexes between human and *P. falciparum* G6PD enzymes with G6P. A) Superposition of the last MD snapshot with the X-ray structure (PDB ID 2BHL) for the hG6PD-G6P complex. B) Representation of MD snapshots taken at 60, 80 and 100 ns from the MD trajectory run for the *PfG6PD*-G6P complex. Average values of selected distances between G6P and residues in the binding pocket are shown in bold (Å; standard deviation given in parenthesis).

(Fig. S7). It is important to point out that the residues in the binding pocket showed small fluctuations (RMSD of 1.7 Å), preserving the integrity of the binding site. With regard to the ligand, the glucose ring of G6P rearranges in the binding site after the first 20 ns, but then remains stable (RMSD of 2.9 Å), as noted in the superposition of the snapshots taken at 60, 80 and 100 ns (Fig. 4B). Noteworthy, despite the replacement of Arg365 by Asp750, a dense network of interactions maintains G6P tightly bound in the binding pocket (Fig. 4B).

Finally, the binding affinity of G6P for the two enzymes was determined by using the Solvation Interaction Energy (SIE) method [52], which is a MM/PBSA approach with weighting factors for the free energy components that were parameterized to reproduce the experimental binding affinities for a diverse set of protein-ligand complexes. The results point out that G6P binds both human and *P. falciparum* enzymes with similar binding affinities (i.e., -7.4 and -7.7 kcal mol $^{-1}$; Supplementary Material Table S3). This finding is in agreement with the slightly larger K_M determined experimentally for G6P upon binding to *PfG6PD*, which has been estimated to be 11–27 μ M [25,51], compared to the human enzyme

(K_M of 52–72 μ M [27,28]), which gives confidence to the structural model of the *PfG6PD*-G6P complex.

2.2. Chemistry

Keeping in mind the local difference in the substrate binding site model afforded by the Arg365 \rightarrow Asp750 mutation between hG6PD and *PfG6PD*, it may be inferred that replacement of the phosphate group of the substrate G6P by a short side chain terminated with a basic functionality, protonatable at physiological pH, should be a useful strategy to inhibit selectively the *PfG6PD* enzyme. Such a chemical modification should enable the formation of an ionic interaction with Asp750 in *PfG6PD*, whereas the enlarged size and the positive charge of the protonatable group should be detrimental for the interaction with Arg365 in the human enzyme, thereby making it possible the selective inhibition of the parasite enzyme. It may be expected that the success of this strategy, especially regarding the selective inhibition of *PfG6PD* versus the human enzyme, will be dictated by the nature of the protonatable basic moiety, which should interact with Asp750, and

by the linker that connects the glucose unit and the protonatable group, which should permit the proper arrangement of these groups in the substrate binding site.

Accordingly, taking advantage of the 3D model of PfG6PD, we envisaged the synthesis of several substrate (G6P) analogs in which the phosphate group was replaced by different hydrogen bond donor and/or acceptor groups, namely thioether or sulfone (Scheme 1) or sulfonamide (Scheme 2), with short side chains terminating with protonatable amino or guanidino groups, to exploit the putative selective interaction with the negatively charged PfG6PD Asp750 residue. For comparison purposes, some nitrile precursors, i.e. nitriles **4** and **6** (Scheme 1), were also subjected to biological evaluation.

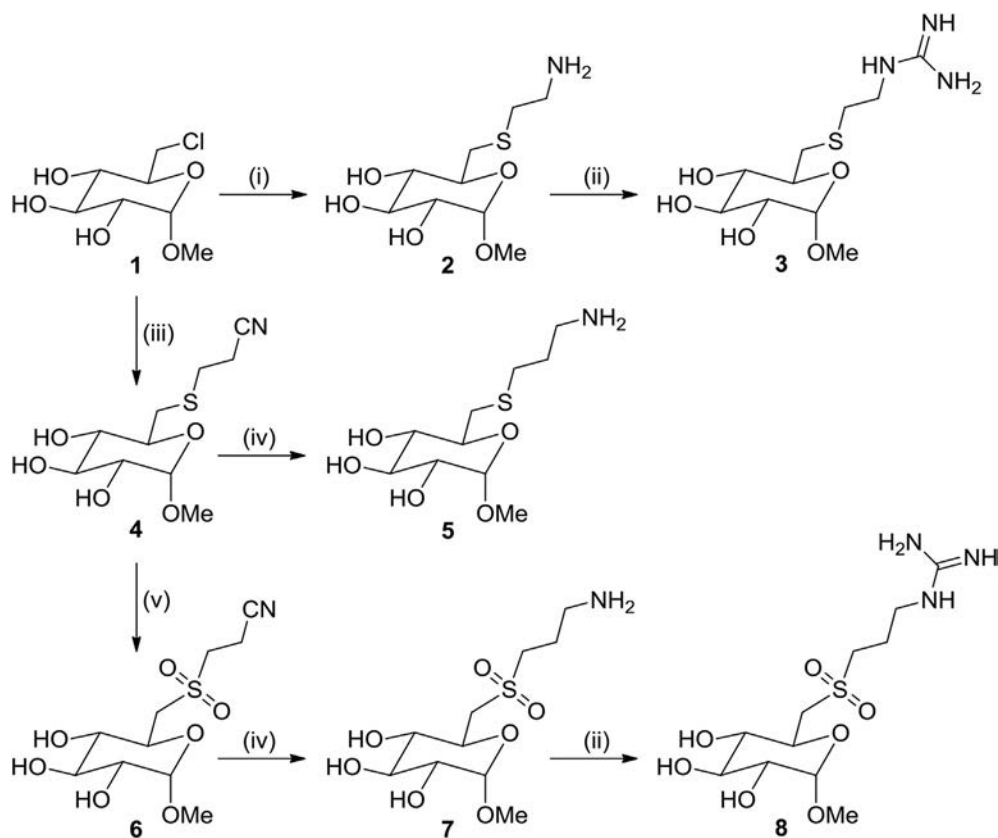
During the enzymatic reaction catalyzed by G6PD, the anomeric position of the substrate G6P is oxidized by proton abstraction from the hydroxyl group to form a carbonyl group (in 6-phosphogluconolactone), with the departure of the anomeric hydrogen atom as a hydride that is transferred to the nicotinamide ring of the cofactor NADP⁺, which is thereby reduced to NADPH. To avoid the possibility of being transformed by G6PD, generating NADPH, and to avoid glucopyranoside ring opening and, hence, the potential epimerization at the anomeric position, the anomeric hydroxyl group of the substrate G6P was replaced by an α -methoxy group in the target inhibitors. Although this may be somewhat detrimental for the binding affinity of the designed inhibitors compared to the unsubstituted glucose moiety, this chemical modification was deemed convenient in order to increase the stability of the target inhibitors.

The synthesis of thioether derivatives **2–5** and sulfones **6–8** was

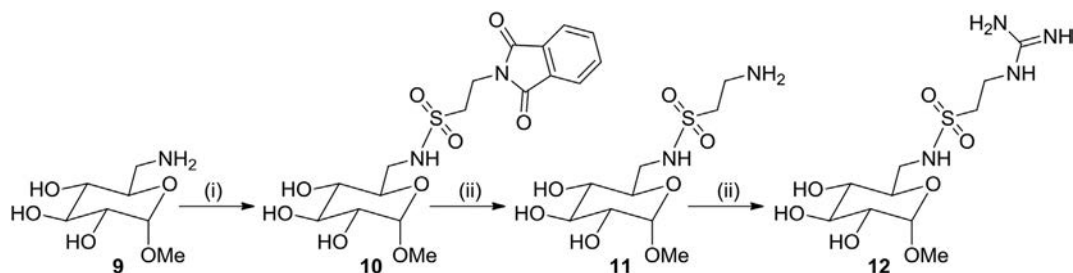
undertaken starting from the known chloroderivative **1** [53], which was readily prepared by reaction of commercially available methyl α -D-glucopyranoside with methanesulfonyl chloride in DMF at 65 °C [54]. Amine **2**, a compound recently described as an intermediate for the preparation of glycoclusters [55], was prepared in quantitative yield by nucleophilic substitution reaction of chloroderivative **1** with cysteamine (Scheme 1). The novel guanidine **3** was synthesized from amine **2** upon reaction with 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride and Et₃N in refluxing acetonitrile, and isolated in the form of its hydrochloride salt.

Reaction of chloroderivative **1** with the thiolate formed by deprotonation of 3-mercaptopropanenitrile with NaH in DMF afforded the novel cyanothioether **4** in quantitative yield, from which the novel thioether **5** and sulfones **6–8** were subsequently synthesized following standard procedures (Scheme 1). Thus, the aminothioether **5** was synthesized in moderate yield upon hydrogenation at 16 atm of cyanothioether **4** using Raney-Ni as the catalyst. *M*-Chloroperbenzoic acid oxidation of **4** gave in quantitative yield the corresponding cyanosulfone, **6**, from which the aminosulfone **7** was synthesized by Raney-Ni-catalyzed hydrogenation. Treatment of **7** with 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride and Et₃N in refluxing acetonitrile afforded the guanidinosulfone **8** in 68% yield.

For the synthesis of the novel amino- and guanidinosulfonamides **11** and **12**, the known methyl 6-amino-6-deoxy- α -D-glucopyranoside, **9** [56], was used as starting material (Scheme 2). In turn, amine **9** was readily synthesized by reaction of chloroderivative **1** with potassium phthalimide in DMF at 100 °C for 7 days, followed by hydrazinolysis. Reaction of amine **9** with 2-



Scheme 1. Synthesis of thioether and sulfone derivatives **2–8**. Reagents and conditions: (i) cysteamine hydrochloride, NaH, DMF, 0 °C, 10 min; then, **1**, room temperature, 48 h, quantitative yield; (ii) 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride, Et₃N, acetonitrile, reflux, 6 h to overnight; then, HCl/MeOH, 39% yield (**3**-HCl), 62% yield (**8**-HCl); (iii) 3-mercaptopropanenitrile, NaH, DMF, 0 °C, 10 min; then, **1**, room temperature, 72 h, quantitative yield; (iv) H₂ (16 atm), Raney-Ni, MeOH, room temperature, overnight, 41% yield (**5**), 28% yield (**7**); (v) *m*-chloroperbenzoic acid, NaHCO₃, CH₂Cl₂, 0 °C; then, room temperature, 3 h, quantitative yield.



Scheme 2. Synthesis of sulfonamido derivatives **11** and **12**. Reagents and conditions: (i) 2-phthalimidoethanesulfonyl chloride, Et₃N, DMF, 0 °C; then, room temperature, 6 days, 96% yield; (ii) hydrazine monohydrate, MeOH, reflux, overnight, 29% yield; (iii) 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride, Et₃N, acetonitrile, reflux, 6 h; then, HCl/MeOH, 29% yield.

phthalimidoethanesulfonyl chloride [57], previously prepared by reaction of taurine with phthalic anhydride, followed by reaction with PCl₅, gave in excellent yield the phthalimidodisulfonamide **10**. Hydrazinolysis of **10** in refluxing MeOH afforded aminosulfonamide **11**, in low yield, after two tedious silica gel column chromatography purifications. Finally, aminosulfonamide **11** was converted into the corresponding guanidinosulfonamide, **12**, under the usual guanidinylation conditions (Scheme 2).

2.3. Biological profiling

The novel compounds designed to differentially bind at the G6P site of the catalytic pocket of the PfG6PD–6PGL enzyme were tested for *in vitro* inhibition of the parasite enzyme and the homologous human enzyme. Four out of the 9 tested compounds displayed a considerably higher affinity towards the parasite enzyme, i.e. lower K_i^{G6P} values in the parasite enzyme than in the human enzyme. Thus, compounds **2**, **3**, **6**, and **11** showed K_i^{G6P} values between 23 and 76 μM in the parasite dual enzyme, but >200 μM to >2000 μM in the human enzyme (Table 2). Conversely, the human enzyme was significantly inhibited by compounds **7**, **8**, and **12** at K_i^{G6P} values below 40 μM, very similar or even lower to the K_i^{G6P} values obtained for the malaria parasite enzyme.

As expected, those compounds that feature a terminal protonatable amino or guanidino group display higher affinities towards PfG6PD than those with a nonbasic cyano group, and among them, amino derivatives are more selective than guanidino derivatives for PfG6PD over hG6PD. Regarding the inner functionality of the side chain at position 6, the affinity towards PfG6PD follows the order sulfonamide > sulfone > thioether, with the sulfonyl oxygen atoms of sulfonamides and sulfones likely mimicking the hydrogen acceptor capability of the phosphate oxygen atoms of the substrate G6P.

Kinetic studies performed for compounds **2** and **11** using either PfG6PD or hG6PD enzymes, a fixed concentration of NADP (200 μM)

Table 1

List of residues in the substrate binding site of G6PD from *H. sapiens*, *T. cruzi*, *M. avium*, *L. mesenteroides*, and *P. falciparum*.

<i>H. sapiens</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>M. avium</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>P. falciparum</i>
Lys171	Lys217	Lys142	Lys149	Lys548
His201	His247	His172	His179	His578
Lys205	Lys251	Lys206	Lys183	Lys582
Glu239	Glu285	Glu210	Glu217	Glu616
Asp258	Asp304	Asp229	Asp236	Asp635
His263	His309	His234	His241	His640
Lys360	Lys403	Lys321	Lys339	Lys465
Arg365	Arg408	Lys326	Lys344	Asp750
Gln395	Gln437	Asp359	Asp375	Gln779

The mutation of Arg365 in human G6PD by Asp750 in the *P. falciparum* enzyme is highlighted in bold.

Table 2

Affinity values toward PfG6PD and hG6PD and antiplasmodial activity of the novel compounds.^a

compound	K_i^{G6P} (μM) [PfG6PD–6PGL]	K_i^{G6P} (μM) [hG6PD]	SI ^b	IC ₅₀ (mM) <i>P. falciparum</i>
2	76.1	>2000	>26	1.75
3	45.6	>200	>4.4	0.59
4	259	>200	>0.8	1.02
5	289	129	0.4	>2
6	68.8	>200	>2.9	0.96
7	34.4	35.4	1.0	>2
8	42.9	22.3	0.5	1.57
11	22.8	>400	>18	1.47
12	32.4	16.8	0.5	0.33

^a K_i values are those of the forward enzymatic reaction using G6P as non-saturating substrate (between 10 and 300 μM) and saturating NADP concentrations (200 μM) using the purified parasite (K_i^{G6P} [PfG6PD–6PGL]) or human (K_i^{G6P} [hG6PD]) enzyme. IC₅₀ values were obtained in triplicate in *P. falciparum* cultures in human erythrocytes.

^b SI: selectivity index = K_i^{G6P} [hG6PD]/ K_i^{G6P} [PfG6PD–6PGL].

and variable concentrations of G6P and *viceversa*, have shown that these compounds are competitive with the substrate G6P, but not with NADP⁺. Indeed, regarding the parasite enzyme, the K_i^{G6P} values are clearly lower than the K_i^{NADP} values (76 μM vs 364 μM for compound **2**; 23 μM vs 269 μM for compound **11**). The same trend is found for hG6PD, with compound **11** displaying K_i^{G6P} and K_i^{NADP} values of 440 μM and 1.26 mM, respectively, whereas in compound **2** both K_i values were above 2.0 mM.

Overall, the results point out that compounds **2** and **11**, both bearing a terminal amino group, connected through 4-mer and 5-mer tethers to the glucose ring, respectively, fit the empty room generated by the Arg365 → Asp750 mutation in the binding pocket, leading to an effective salt bridge interaction with Asp750 in PfG6PD. At this point, it is worth noting that the K_i obtained for these compounds (76.1 and 22.8 μM for **2** and **11**, respectively; Table 2) compares well with the K_M of G6P in PfG6PD, which varies between 11 and 27 μM [25,51]. This can be realized from a similar binding of the glucose moiety in the substrate binding cavity, and by the replacement of the salt bridge between the phosphate group of G6P and the guanidinium moiety of Arg365 by the interaction formed between the protonated amino group of **2** and **11** with the carboxylate group of Asp750.

The *in vivo* phenotypic assay of the novel compounds on *P. falciparum* cultures showed curves clearly indicating a dose response effect, although with IC₅₀ values in the high micromolar range from 330 μM to 1.75 mM (Table 2). To trace the targeting of the inhibitors on the *P. falciparum* intraerythrocytic cycle, the phenotype of the parasites growing in the presence of some selected inhibitors (**3**, **4**, **6**, and **12**) was analysed at 2 mM (Fig. 5). Interestingly, these G6PD–6PGL inhibitors showed a full effect in killing the parasites since upon 48 h incubation most parasite forms

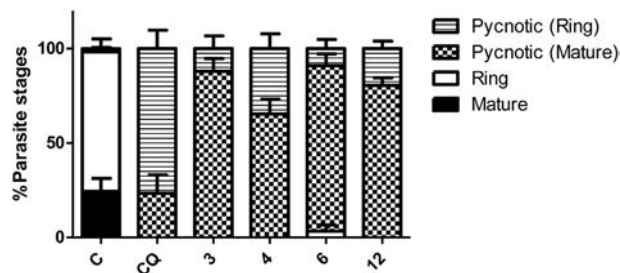


Fig. 5. Phenotypic analysis of *P. falciparum* intraerythrocytic cycle upon exposure to compounds **3**, **4**, **6**, and **12** in comparison to chloroquine (CQ) and a control (C). *In vitro* culture of *P. falciparum* during a complete erythrocytic cycle (48 h) was performed starting from young rings and incubated with the G6PD–6PGL inhibitors at 2 mM concentration and CQ at 10 μ M in parallel to a control culture in the absence of inhibitors.

showed unviable pyknotic forms, mostly in mature stages (trophozoites). This result suggests a different stage of action of these compounds relative to that of chloroquine, which kills the parasite at the stage of rings, the immature form, i.e. earlier than the new inhibitors. This is in agreement with the increased oxidative stress along the developmental erythrocytic cycle of the parasite [58], where inhibition of *Pf*G6PD–6PGL impedes to cope with the ROS generation upon heme release, leading to its death at mature stages.

Cytotoxicity of the novel G6PD–6PGL inhibitors towards mammalian cells was also assayed using HEPG2 human hepatoma cells and concentrations of the inhibitors between 0.2 and 2.0 mM (Fig. 6). The novel compounds did not lead to significant loss of viability of HEPG2 human hepatoma cells, which showed percentages of survival above 80% for the range of inhibitor concentrations between 0.2 and 1.0 mM. Moreover, most of the inhibitors

showing selectivity towards *Pf*G6PD, with K_i^{G6P} values for the human enzyme above 200 μ M (**2**, **3**, **4**, **6**, and **11**) still maintained these viability values at the highest tested concentration of 2 mM. In contrast, those inhibitors showing a higher selectivity towards hG6PD, with K_i^{G6P} values for the human enzyme below 200 μ M (**5**, **7**, **8**, and **12**) decreased cell viability below 80% at 1.5 and 2 mM concentrations.

2.4. Binding mode of ML276

To further calibrate the reliability of the 3D structural model of *Pf*G6PD, we attempted to identify the potential binding mode of compound ML276. To the best of our knowledge, ML276 and ML304 (Fig. 1) are the only compounds that have been found to inhibit *Pf*G6PD through a competitive mechanism with the substrate, with IC_{50} values of 0.9 and 0.19 μ M, respectively. Furthermore, they are selective inhibitors of *Pf*G6PD ($IC_{50} > 80 \mu$ M for the human enzyme). However, further development of novel drug candidates has been limited by the lack of information about the binding mode in *Pf*G6PD.

Keeping in mind the selective and competitive inhibition of ML276 and ML304, it may be expected that they must bind to the enzyme in a similar way, reflecting their structural resemblance. Furthermore, we hypothesize that the *Pf*G6PD/hG6PD selectivity arises from the interaction between the protonated tertiary amine of these compounds and Asp750. Assuming this hypothesis, we performed a computational study that combined guided docking and refinement by MD simulations in order to find a stable binding mode for ML276 in the substrate-binding pocket of *Pf*G6PD (see Experimental section). The proposed binding mode (Fig. 7) retained the structural integrity along an unbiased 0.5 μ s MD simulation, maintaining the interaction with the carboxylate group of Asp750, which formed stable hydrogen-bond contacts with the protonated

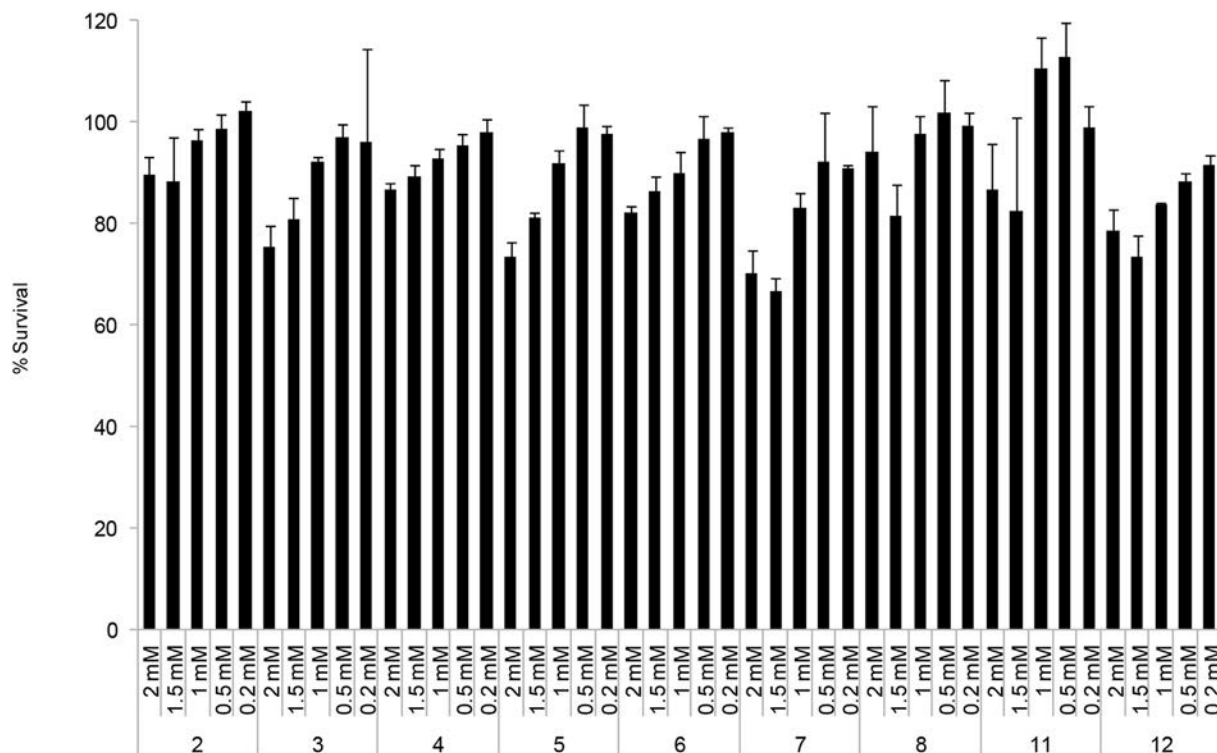


Fig. 6. Cytotoxicity assays of the novel G6PD–6PGL inhibitors. HEPG2 human hepatoma cells were incubated with the inhibitors at five different concentrations (0.2, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mM). Viability of the HEPG2 human hepatoma cells after 24 h is plotted in comparison with 100% viability of control cultures in the absence of inhibitors.

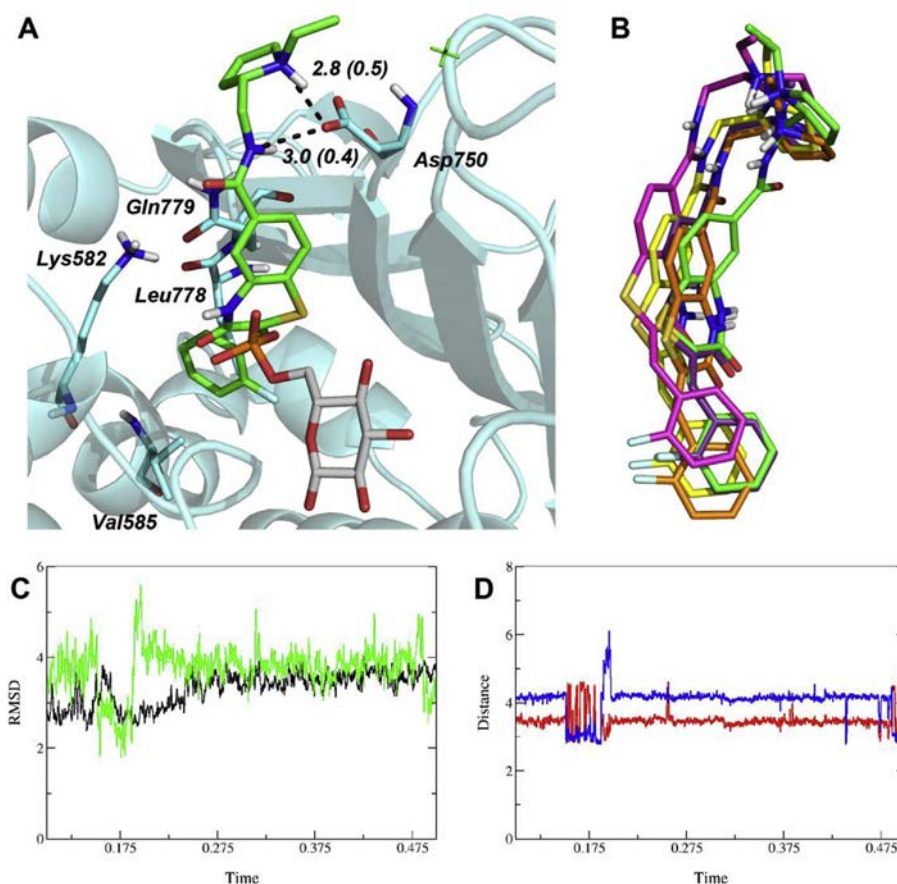


Fig. 7. Representation of the putative binding mode of ML276 to the substrate binding cavity of *PfG6PD*. A) Superposition of the *PfG6PD*/ML276 complex and the X-ray structure G6P-bound hG6PD (PDB ID 2BHL). The protein backbone is shown as light blue cartoon, and selected residues are shown as blue sticks. ML276 and G6P are represented using sticks (with carbon atoms shown in green and white, respectively). Selected distances are shown as dashed line (average value in Å, and standard deviation in parenthesis are given in italics). B) Superposition of the ML276 orientation sampled at 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 μ s along the MD simulation. C) Time (μ s) evolution of the RMSD (Å) of the residues in the binding pocket (black), and the ligand (green). D) Time (μ s) evolution of the distances (Å) from the carboxylate oxygen of Asp750 to the protonated amine (red) and amide NH group (blue) of ML276. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

amine and the amide NH groups of ML276. On the other hand, the fluorobenzene ring was firmly bound in a hydrophobic pocket shaped by Val585 and Leu778. It is worth noting that this binding mode would impede the binding of the substrate due to the severe steric clash between the fused ring of ML276 and the phosphate group of G6P, which would justify the competitive inhibition by this compound.

3. Conclusions

Selective inhibition of the *PfG6PD* enzyme has recently emerged as a promising novel therapeutic approach, which is expected to derive new drugs that may circumvent one of the main drawbacks of the current antimalarial drugs, namely the development of resistance. In the absence of experimental 3D structural information of *PfG6PD*-6PGL, we have provided proof of concept for the selective substrate competitive inhibition of *PfG6PD* as a promising therapeutic approach. To this end, we have built a homology model with the aim of boosting the rational design of novel inhibitors. Unexpectedly, the homology model of *PfG6PD* revealed the presence of Asp750 instead of the arginine residue (Arg365), which is present in the equivalent position in the human enzyme, thus paving the way for the design of substrate analogs that selectively inhibit *PfG6PD*. In agreement with this hypothesis, introduction at position 6 of the glucose moiety of a short chain terminating with a

basic amino or guanidino group has led to inhibitors with moderate two-digit micromolar affinity and up to >26-fold selectivity for *PfG6PD* over hG6PD. These compounds exhibit a competitive inhibition mechanism with regard to the substrate G6P but not to NADP⁺, and are nontoxic to mammalian cells up to a concentration as high as 2 mM. In phenotypic assays with cultured *P. falciparum* parasites, the compounds exhibit submillimolar to low millimolar IC₅₀ values, reflecting a poor permeation across cell membranes as a consequence of their high polarity. Interestingly, these compounds seem to act at a different stage of the parasite development than chloroquine, killing the parasites at the mature stages instead of at the earlier ring stage. Overall, these findings provide a basis for the application of target-based drug design techniques that drive the design of novel selective *PfG6PD* inhibitors, with improved physicochemical properties for ameliorating the pharmacokinetic profile, and valuable for combination therapies with sequential action at different stages of the parasite life cycle.

4. Experimental section

4.1. Molecular modeling

Multiple sequence alignments were performed using the CO-BALT tool [41] as implemented in BLAST [42,43] using the protein sequences taken from the Uniprot database [59]. To this end, the

sequences of human (Uniprot ID: P11413, 515 residues), *T. cruzi* (Uniprot ID: Q4E0B2, 555 residues), *M. avium* (Uniprot ID: A0A0H3A0Q9, 469 residues), and *L. mesenteroides* (Uniprot ID: P11411, 486 residues) G6PD enzymes were used as reference, due to the availability of X-ray structures in the apo form or bound to the substrate (G6P) and/or to the NADP⁺ cofactor (Supplementary Material Table S1). On the other hand, besides the sequence of PfG6PD–6PGL enzyme (Uniprot ID: Q8IKU0, 910 residues), the sequences of other Plasmodium G6PD–6PGL enzymes were also examined (*P. reichenowi*: Uniprot ID: A0A060S5P3, 907 residues; *P. malariae*: Uniprot ID: A0A1A8WAC7, 891 residues; *P. knowlesi*: Uniprot ID: A0A1A7vNJ6, 914 residues; *P. vivax*: Uniprot ID: A0A1G4HHS1, 927 residues; *P. yoelii yoelii*: Uniprot ID: Q7RRD8, 949 residues; *P. chabaudi chabaudi*: Uniprot ID: A0A1C6XJL2, 946 residues).

Homology modeling was used to build up the 3D structure of PfG6PD. The FASTA sequence of PfG6PD was obtained from the Uniprot database with code Q8IKU0. To this end, only the ~570 residues of the PfG6PD–6PGL enzyme were used to build up the 3D structural model, in conjunction with the human enzyme (PDB code: 2BLH [27], containing D-glucose-6-phosphate), which was found to be a suitable template according to the homology modeling analysis performed with SWISSMODEL.

4.2. Molecular dynamics

Classical MD simulations were performed with the CUDA-accelerated version of the PMEMD module as implemented in AMBER12 [60] software package. The protein and substrate were simulated using the parm99SBILDN [61,62] and glycam06 [63] force fields. Each enzyme–G6P complex was immersed in an octahedral box of TIP3P [64] water molecules, and the systems were neutralized by adding the proper number of counter ions [65] to neutralize the overall charge of the simulated system. To this end, titration calculations were previously performed with PROPKA3.1 [66] in order to verify the ionization state of the ionizable residues in the protein, and the potential effect exerted by G6P binding on the residues in the binding pocket. The results revealed that the presence of G6P had no effect on the ionization state of the residues for hG6PD. However, the pK_a of His578 was increased to ~7.7 upon G6P binding to PfG6PD, an effect that may be justified by the Arg365 (hG6PD) → Asp750 (PfG6PD) mutation, and the concomitant loss of the electrostatic influence exerted by the positive charge of Arg365 on the binding of the negative charges of the phosphate group in G6P. Accordingly, His578 was simulated in the protonated state in MD simulations of the PfG6PD–G6P complex (let us note that additional MD simulations performed for this complex with His578 in the neutral state revealed that binding of G6P was not stable, and that ligand was released from the binding pocket; data not shown).

Prior to the production runs, the energy of each system was minimized, and then the system was equilibrated. First, water molecules and counterions were refined through 3000 steps of steepest descent algorithm and 7000 steps of conjugate gradient. Then, the position of hydrogen atoms was optimized using 500 steps of steepest descent algorithm and 4500 steps of conjugate gradient. At the third stage, hydrogen atoms, water molecules, and counterions were further optimized using 2500 steps of steepest descent algorithm and 11500 steps of conjugate gradient. Thermalization of the system was performed in five steps of 50 ps, increasing the temperature from 50 to 298 K at constant volume. The residues that define the binding site and G6P were restrained during thermalization using a variable restraining force. Thus, a force constant of 10 kcal mol⁻¹ Å⁻² was used in the first stage of the thermalization and was subsequently decreased by increments of

2 kcal mol⁻¹ Å⁻² in the next stages. The density of the system was equilibrated in a subsequent 250 ps run using the NPT (298 K, 1 bar) ensemble. Finally, 100 ns production runs were performed for the two systems. SHAKE was used for those bonds containing hydrogen atoms in conjunction with a time step of 2 fs. Periodic boundary conditions were used with particle mesh Ewald for the treatment of long electrostatic interactions, and a cutoff of 10 Å for nonbonded interactions.

The solvent interaction energies (SIE) technique developed by Purisima and co-workers [52] was used to estimate the interaction free energies between G6P and both human and *P. falciparum* enzymes. In order to check the consistency of the interaction free energies, calculations were performed for three 20 ns windows along the last 40 ns of the production trajectory. For each window, a set of 200 snapshots were used in SIE computations.

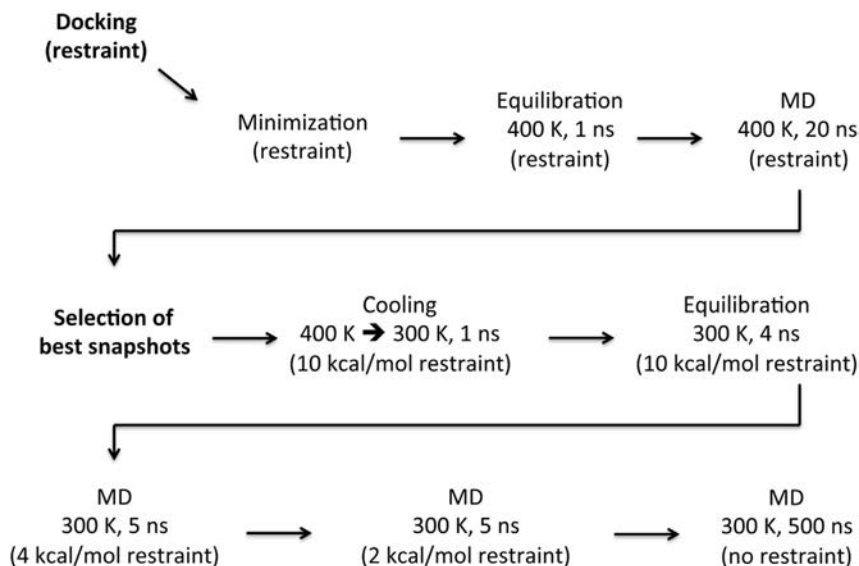
4.3. Binding mode of ML276

Exploration of the putative binding mode of ML276 was accomplished by using an elaborate protocol that combined docking and restrained MD simulations, as shown in Scheme 3.

Briefly, the ligand was docked in the substrate-binding cavity with Glide [67]. Docking was performed using an inner/outer box of 15/30 Å, and the contact between the protonated amine of the ligand and the carboxylate group of Asp750 as pharmacophoric restraint. The best pose was then used to build the ligand-bound complex following the same procedure described above. Each system was refined by energy minimization, thermalized at 400 K, and simulated using restrained MD simulations (20 ns) at 400 K by imposing a restraint (10 kcal mol⁻¹ Å⁻²) to the distance between the ligand's amine nitrogen and the Asp750 carboxylate carbon atom. Five snapshots (taken at the end of the equilibration step, and at simulation times of 5, 10, 15, and 20 ns) were then used for the preparation of simulation systems that were thermalized at 300 K, and subsequently subjected to gradual reduction of the restraint in 5 ns MD steps. Finally, the structural stability of the most favorable binding mode was examined using a 0.5 μs unrestrained MD simulation.

4.4. Chemistry. General methods

Melting points were determined in open capillary tubes with a MFB 595010 M Gallenkamp melting point apparatus. 400 MHz ¹H/100.6 MHz ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 400 spectrometer at the Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona (CCiTUB). The chemical shifts are reported in ppm (δ scale) relative to solvent signals (CD₃OD at 3.31 and 49.0 ppm in the ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively), and coupling constants are reported in Hertz (Hz). Assignments given for the NMR spectra of the new compounds have been carried out by comparison with the NMR data of compounds **4**, **6**, and **10**, which in turn, were assigned on the basis of DEPT, COSY ¹H/¹H (standard procedures), and COSY ¹H/¹³C (gHSQC and gHMBC sequences) experiments. IR spectra were run on a Perkin Elmer Spectrum RX I spectrophotometer. Absorption values are expressed as wavenumbers (cm⁻¹); only significant absorption bands are given. Optical rotations were measured on a PerkinElmer model 241 polarimeter. Column chromatography was performed on silica gel 60 AC. C (40–60 mesh, SDS, ref 2000027). Thin-layer chromatography was performed with aluminium-backed sheets with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, ref 1.05554), and spots were visualized with UV light and 1% aqueous solution of KMnO₄. High resolution mass spectra were carried out at the CCiTUB with a LC/MSD TOF Agilent Technologies spectrometer. Due to the hygroscopic nature of most of the target compounds, they were stored under drying conditions



Scheme 3. Computational protocol adopted for the binding of ML276 to PfG6PD.

in a vacuum oven before preparation of the samples for biological assays.

4.4.1. Methyl 6-[(2-aminoethyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**2**)

A solution of cysteamine hydrochloride (235 mg, 2.07 mmol) in anhydrous DMF (9 mL) was cooled at 0 °C with an ice bath, and then treated portionwise with NaH (60% dispersion in oil, 166 mg, 4.14 mmol). After stirring the mixture for 10 min, chloroderivative **1** (400 mg, 1.88 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h and evaporated under reduced pressure to give a yellow solid (877 mg), which was purified through column chromatography (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 80:20:0 to 75:25:1, amine **2** (508 mg, quantitative yield) was isolated as a beige very hygroscopic solid; *R*_f 0.04 (CH₂Cl₂/MeOH 7:3).

2·HCl: [α]_D²⁰ = + 74 (c 0.88, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3221, 2907, 2839, OH, +NH, CH st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.74 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J'* = 8.0 Hz, 1H, 6-H_a), 2.88 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 7.6 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.92 (dd, *J* = 14.0 Hz, *J'* = 7.6 Hz, 1H, 1'-H_b), 3.00 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J'* = 2.0 Hz, 1H, 6-H_b), 3.16 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 2'-H₂), 3.25 (dd, *J* = *J'* = 9.6 Hz, 1H, 4-H), 3.39 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 3.6 Hz, 1H, 2-H), 3.43 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.59 (dd, *J* = *J'* = 9.6 Hz, 1H, 3-H), 3.68 (ddd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 8.0 Hz, *J''* = 2.0 Hz, 1H, 5-H), 4.66 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH, +NH₃); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 31.1 (CH₂, C1'), 34.2 (CH₂, C6), 39.9 (CH₂, C2'), 55.7 (CH₃, 1-OCH₃), 73.50 (CH), 73.54 (CH) (C2, C5), 74.3 (CH, C4), 74.9 (CH, C3), 101.3 (CH, C1); HRMS (ESI), calcd for (C₉H₁₉NO₅S + H⁺) 254.1057, found 254.1056.

4.4.2. Methyl 6-deoxy-6-[(2-guanidinoethyl)thio]- α -D-glucopyranoside (**3**)

To a suspension of amine **2** (77 mg, 0.30 mmol) in acetonitrile (3 mL), Et₃N (0.04 mL, 29 mg, 0.29 mmol) and 1*H*-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride (58 mg, 0.40 mmol) were added. The reaction mixture was stirred under reflux overnight and cooled to room temperature. The solvent was poured off and the precipitate was dried in vacuo. The resulting brown sticky solid (46 mg) was taken in MeOH (5 mL), treated with methanolic HCl (0.5 N, 5 mL), and filtered through a 0.2 μ m NYL filter. The filtrate was

evaporated under reduced pressure, washed successively with CH₃CN (2 \times 3 mL), CH₂Cl₂ (2 \times 5 mL), and pentane (2 \times 3 mL), and finally dried at 35 °C/30 Torr, to provide guanidine **3**·HCl (39 mg, 0.12 mmol, 39% yield) as a brownish hygroscopic solid; [α]_D²⁰ = + 72 (c 2.2, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3303, 3173, 2918, OH, +NH, NH, CH st), 1659, 1643, 1617 (C=N st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.71 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J'* = 8.0 Hz, 1H, 6-H_a), 2.81 (dt, *J* = 13.6 Hz, *J'* = 6.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.86 (dt, *J* = 13.6 Hz, *J'* = 6.8 Hz, 1H, 1'-H_b), 3.00 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J'* = 2.4 Hz, 1H, 6-H_b), 3.24 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 9.2 Hz, 1H, 4-H), 3.39 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 3.6 Hz, 1H, 2-H), 3.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 2'-H₂), 3.43 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.59 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 9.2 Hz, 1H, 3-H), 3.66 (ddd, *J* = 9.6 Hz, *J'* = 8.0 Hz, *J''* = 2.4 Hz, 1H, 5-H), 4.65 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, 1-H), 4.84 (s, OH, NH, NH₂, +NH₂); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 33.0 (CH₂, C1'), 34.5 (CH₂, C6), 42.1 (CH₂, C2'), 55.6 (CH₃, 1-OCH₃), 73.5 (CH, C2), 73.7 (CH, C5), 74.4 (CH, C4), 74.9 (CH, C3), 101.1 (CH; C1), 158.6 (C, guanidine C); HRMS (ESI), calcd for (C₁₀H₂₁N₃O₅S + H⁺) 296.1275, found 296.1279.

4.4.3. Methyl 6-[(2-cyanoethyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**4**)

A solution of 3-mercaptopropanenitrile (646 mg, 7.41 mmol) in anhydrous DMF (12 mL) was cooled at 0 °C with an ice bath, and then treated portionwise with NaH (60% dispersion in oil, 296 mg, 7.40 mmol). After stirring the mixture for 10 min, chloroderivative **1** (700 mg, 3.29 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 72 h and evaporated under reduced pressure to give a yellow solid (2.05 g), which was purified through column chromatography (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH 92:8 to 90:10, nitrile **4** (891 mg, quantitative yield) was isolated as a beige solid; *R*_f 0.34 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

A solution of **4** (50 mg, 0.19 mmol) in MeOH (5 mL) was filtered through a 0.20 μ m NYL filter and evaporated under reduced pressure. After washing the resulting solid successively with CH₂Cl₂ (2 \times 5 mL) and pentane (2 \times 3 mL), and drying at 35 °C/30 Torr, the analytical sample of **4** (43 mg) was obtained as a yellowish hygroscopic solid; [α]_D²⁰ = + 143 (c 0.86, MeOH); IR (ATR) ν 3335, 3192 (OH st), 2251 (CN st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.73 (dd, *J* = 14.4 Hz, *J'* = 8.0 Hz, 1H, 6-H_a), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2'-H₂), 2.86 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J'* = 7.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.93 (dd, *J* = 13.6 Hz,

$J' = 7.2$ Hz, 1H, 1'-H_b), 3.03 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J' = 2.4$ Hz, 1H, 6-H_b), 3.24 (dd, $J = J' = 9.6$ Hz, 1H, 4-H), 3.40 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 3.6$ Hz, 1H, 2-H), 3.44 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.58 (dd, $J = J' = 9.6$ Hz, 1H, 3-H), 3.66 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.0$ Hz, $J'' = 2.4$ Hz, 1H, 5-H), 4.65 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 1-H), 4.84 (s, OH); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 19.3 (CH₂, C_{2'}), 29.9 (CH₂, C_{1'}), 34.7 (CH₂, C₆), 55.6 (CH₃, 1-OCH₃), 73.6 (CH, C₂), 73.8 (CH, C₅), 74.4 (CH, C₄), 75.0 (CH, C₃), 101.2 (CH, C₁), 120.2 (C, CN); HRMS (ESI), calcd for (C₁₀H₁₇NO₅S + NH₄⁺) 281.1166, found 281.1166.

4.4.4. Methyl 6-[(3-aminopropyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**5**)

A mixture of nitrile **4** (213 mg, 0.81 mmol) and Raney-Ni (50% water, 300 mg) in MeOH (80 mL) was reacted with hydrogen (16 atm) at room temperature overnight in a Parr stirred reactor. The resulting suspension was filtered through Celite[®] and rinsed with MeOH (25 mL). The solvent was removed in vacuo to afford a brownish oil (205 mg), which was purified through column chromatography (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 75:25:1 to 65:35:1, amine **5** (88 mg, 41% yield) was isolated as a colourless sticky solid; R_f 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 7:3:0.1).

A solution of **5** (40 mg, 0.15 mmol) in MeOH (5 mL) was filtered through a 0.20 μ m NYL filter, treated with methanolic HCl (0.5 N, 1.35 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed successively with CH₂Cl₂ (2 \times 5 mL) and pentane (2 \times 3 mL) to give, after drying at 35 °C/30 Torr, **5**·HCl (44 mg) as a yellowish hygroscopic solid; $[\alpha]_D^{20} = +171$ (c 0.46, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3301, 2912, 2854, 2839, OH, ⁺NH, CH st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.99 (tt, $J = J' = 8.0$ Hz, 2H, 2'-H₂), 2.66 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 8.0$ Hz, 1H), 2.68 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 8.0$ Hz, 1H), 2.73 (m, 1H) (6-H_a, 1'-H_a, 1'-H_b), 2.98 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 2.8$ Hz, 1H, 6-H_b), 3.13 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, 3'-H₂), 3.22 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 4-H), 3.38 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 3.6$ Hz, 1H, 2-H), 3.42 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.58 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 3-H), 3.65 (br dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.0$ Hz, 1H, 5-H), 4.63 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH, ⁺NH₃); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 27.1 (CH₂, C_{2'}), 30.6 (CH₂, C_{1'}), 34.4 (CH₂, C₆), 47.9 (CH₂, C_{3'}), 55.6 (CH₃, 1-OCH₃), 73.5 (CH, C₂), 73.6 (CH, C₅), 74.5 (CH, C₄), 75.0 (CH, C₃), 101.1 (CH, C₁), HRMS (ESI), calcd for (C₁₀H₂₁NO₅S + H⁺) 268.1213, found 268.1214.

4.4.5. Methyl 6-[(2-cyanoethyl)sulfonyl]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**6**)

A suspension of nitrile **4** (210 mg, 0.80 mmol) and NaHCO₃ (181 mg, 2.16 mmol) in CH₂Cl₂ (3.5 mL) was cooled at 0 °C with an ice bath and treated with *m*-chloroperbenzoic acid (77% purity, 483 mg, 2.16 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and evaporated under reduced pressure to give a solid residue (726 mg), which was purified through column chromatography (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH 92:8 to 88:12, slightly impure cyanosulfone **6** (289 mg, quantitative yield) was isolated; R_f 0.57 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). A solution of **6** (21 mg, 0.07 mmol) in MeOH (5 mL) was filtered through a 0.20 μ m NYL filter and evaporated under reduced pressure. The analytical sample of **6** (18 mg) was obtained by washing the resulting solid successively with CH₂Cl₂ (2 \times 5 mL) and pentane (2 \times 3 mL), and drying at 35 °C/30 Torr; mp 151–153 °C; $[\alpha]_D^{20} = +127$ (c 0.38, MeOH); IR (ATR) ν 3378, 3308 (OH st), 2270 (CN st), 1295, 1137, 1115 (SO₂ st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 3.00 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2'-H₂), 3.16 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 4-H), 3.41 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 3.6$ Hz, 1H, 2-H), superimposed in part 3.46 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 2.4$ Hz, 1H, 6-H_a), 3.47 (s, 3H, 1-OCH₃), superimposed in part

3.51 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 9.6$ Hz, 1H, 6-H_b), 3.53 (m, 1H, 1'-H_a), 3.58 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 7.2$ Hz, 1H, 1'-H_b), 3.62 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.06 (ddd, $J = J' = 9.6$ Hz, $J'' = 2.4$ Hz, 1H, 5-H), 4.71 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 11.5 (CH₂, C_{2'}), 51.3 (CH₂, C_{1'}), 56.0 (CH₂, C₆), 56.4 (CH₃, 1-OCH₃), 68.7 (CH, C₅), 73.2 (CH, C₂), 74.1 (CH, C₄), 74.7 (CH, C₃), 101.6 (CH, C₁), 118.6 (C, CN); HRMS (ESI), calcd for (C₁₅H₁₇NO₇S + NH₄⁺) 313.1064, found 313.1062.

4.4.6. Methyl 6-[(3-aminopropyl)sulfonyl]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**7**)

A mixture of cyanosulfone **6** (289 mg, 0.98 mmol) and Raney-Ni (50% water, 300 mg) in MeOH (80 mL) was reacted with hydrogen (16 atm) at room temperature overnight in a Parr stirred reactor. The resulting suspension was filtered through Celite[®] and rinsed with MeOH (25 mL). The solvent was removed in vacuo to afford a yellow oil (186 mg), which was purified through column chromatography (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH 82:18 to 78:22, aminosulfone **7** (82 mg, 28% yield) was isolated; R_f 0.09 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 7:3:0.1).

A solution of **7** (29 mg, 0.10 mmol) in MeOH (5 mL) was filtered through a 0.20 μ m NYL filter, treated with methanolic HCl (0.5 N, 0.87 mL) and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed successively with CH₂Cl₂ (2 \times 5 mL) and pentane (2 \times 3 mL) to give, after drying at 35 °C/30 Torr, **7**·HCl (19 mg) as a yellowish hygroscopic solid; $[\alpha]_D^{20} = +147$ (c 1.3, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3241, 2916, 2844, OH, ⁺NH, CH st), 1280, 1132, 1102 (SO₂ st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.19 (tt, $J = J' = 7.6$ Hz, 2H, 2'-H₂), 3.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 3'-H₂), 3.15 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 4-H), superimposed in part with the solvent signal 3.22 (dt, $J = 14.0$ Hz, $J' = 7.6$ Hz, 1H, 1'-H_a), superimposed in part with the solvent signal 3.33 (dt, $J = 14.0$ Hz, $J' = 7.6$ Hz, 1H, 1'-H_b), 3.40 (dd, $J = 10.0$ Hz, $J' = 3.6$ Hz, 1H, 2-H), superimposed in part 3.45 (dd, $J = 12.0$ Hz, $J' = 8.0$ Hz, 1H, 6-H_a), superimposed in part 3.459 (dd, $J = 12.0$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 1H, 6-H_b), 3.460 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.62 (dd, $J = 10.0$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.06 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.0$ Hz, $J'' = 4.0$ Hz, 1H, 5-H), 4.69 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH, ⁺NH₃); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 21.3 (CH₂, C_{2'}), 39.5 (CH₂, C_{3'}), 53.0 (CH₂, C_{1'}), 55.9 (CH₂, C₆), 56.3 (CH₃, 1-OCH₃), 68.6 (CH, C₅), 73.3 (CH, C₂), 74.2 (CH, C₄), 74.7 (CH, C₃), 101.5 (CH, C₁); HRMS (ESI), calcd for (C₁₀H₂₁NO₇S + H⁺) 300.1111; found 300.1114.

4.4.7. Methyl 6-deoxy-6-[(3-guanidinopropyl)sulfonyl]- α -D-glucopyranoside (**8**)

To a suspension of aminosulfone **7** (27 mg, 0.09 mmol) in acetonitrile (1 mL), Et₃N (0.02 mL, 15 mg, 0.14 mmol) and 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride (16 mg, 0.11 mmol) were added. The reaction mixture was stirred under reflux for 6 h and cooled to room temperature. The solvent was poured off and the precipitate was dried in vacuo. The resulting yellow sticky solid (39 mg) was taken in MeOH (2 mL), treated with methanolic HCl (0.5 N, 2 mL), and filtered through a 0.2 μ m NYL filter. The filtrate was evaporated under reduced pressure, washed successively with CH₃CN (2 \times 2 mL), CH₂Cl₂ (2 \times 2 mL), and pentane (2 \times 2 mL), and dried at 35 °C/30 Torr, to provide guanidine **8**·HCl (21 mg, 0.05 mmol, 62% yield) as a yellowish hygroscopic solid; $[\alpha]_D^{20} = +155$ (c 0.80, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3335, 3313, 3160, 2928, 2912, OH, NH⁺, NH, CH st), 1644, 1630 (C=N st), 1293, 1104 (SO₂ st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.10 (tt, $J = J' = 7.6$ Hz, 2H, 2'-H₂), 3.15 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 9.2$ Hz, 1H, 4-H), 3.24–3.35 (complex signal, 2H, 1'-H_a, 1'-H_b), 3.35 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, 3'-H₂), 3.41 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 1H, 2-H), 3.42–3.48 (complex signal, 2H, 6-H_a, 6-H_b), 3.46 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.62 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 9.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.06 (ddd, $J = J' = 9.6$ Hz, $J'' = 5.6$ Hz, 1H, 5-H),

4.70 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH, NH, NH₂, ⁺NH₂); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 22.7 (CH₂, C2'), 40.9 (CH₂, C3'), 53.0 (CH₂, C1'), 55.9 (CH₂, C6), 56.3 (CH₃, 1-OCH₃), 68.6 (CH, C5), 73.3 (CH, C2), 74.2 (CH, C4), 74.7 (CH, C3), 101.5 (CH, C1), 158.7 (C, guanidine C); HRMS (ESI), calcd for (C₁₁H₂₃N₃O₇S + H⁺) 342.1329; found 342.1367.

4.4.8. Methyl 6-deoxy-6-(2-phthalimidoethanesulfonamido)- α -D-glucopyranoside (**10**)

A solution of amine **9** (500 mg, 2.59 mmol) and Et₃N (0.51 mL, 370 mg, 3.66 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) was cooled at 0 °C with an ice bath and treated with 2-phthalimidoethanesulfonyl chloride (744 mg, 2.72 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 days, treated with NH₄Cl (5 mL), and evaporated under reduced pressure to give a solid residue (2.51 g), which was purified through column chromatography (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH mixtures, gradient elution). On elution with CH₂Cl₂/MeOH 90:10, phthalimidosulfonamide **10** (1.07 g, 96% yield) was isolated as a white solid; R_f 0.52 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); mp 143–145 °C; $[\alpha]_D^{20} = +100$ (c 0.28, MeOH); IR (ATR) ν 3449, 3311 (OH, NH st), 1770, 1705 (C=O st), 1316, 1142 (SO₂ st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ superimposed in part 3.23 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 4-H), 3.24 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, 1H, 6-H_a), superimposed in part 3.42 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 3.6$ Hz, 1H, 2-H), 3.43 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.47 (dt, $J = 12.0$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, 1H, 1'-H_a), 3.49 (dt, $J = 12.0$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, 1H, 1'-H_b), 3.52 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 2.8$ Hz, 1H, 6-H_b), 3.59 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, $J'' = 2.8$ Hz, 1H, 5-H), 3.61 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 8.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.12 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, 2'-H₂), 4.71 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 1-H), 4.84 (s, OH, NH), 7.80 (m, 2H, phthalimide H_{meta}), 7.87 (m, 2H, phthalimide H_{ortho}); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 33.8 (CH₂, C2'), 45.1 (CH₂, C6), 50.2 (CH₂, C1'), 55.8 (CH₃, 1-OCH₃), 72.1 (CH, C5), 72.9 (CH, C4), 73.5 (CH, C2), 74.9 (CH, C3), 101.3 (CH, C1), 124.3 (2CH, phthalimide C_{ortho}), 133.4 (2C, phthalimide C_{ipso}), 135.5 (2CH, phthalimide C_{meta}), 169.4 (2C, phthalimide CO); HRMS (ESI), calcd for (C₁₇H₂₂N₂O₉S + H⁺) 431.1119; found 431.1120.

4.4.9. Methyl 6-(2-aminoethanesulfonamido)-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**11**)

To a solution of phthalimidosulfonamide **10** (473 mg, 1.10 mmol) in MeOH (3.3 mL), hydrazine monohydrate (0.07 mL, 72 mg, 1.44 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred under reflux overnight. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure to give a solid residue (516 mg). After two consecutive column chromatography purifications (40–60 μ m silica gel, CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH mixtures, gradient elution), aminosulfonamide **11** (95 mg, 29% yield) was isolated on elution with CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 80:20:0.2; R_f 0.06 (CH₂Cl₂/MeOH/50% aq. NH₄OH 8:2:0.05).

A solution of **11** (95 mg, 0.32 mmol) in MeOH (1 mL) was filtered through a 0.2 μ m NYL filter, treated with methanolic HCl (0.5 N, 2.84 mL), and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was washed with pentane (3 \times 3 mL) and dried at 35 °C/30 Torr, to provide **11**·HCl (85 mg) as a brown highly hygroscopic solid; mp 72–76 °C; $[\alpha]_D^{20} = +6$ (c 0.52, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3221, 3141, 2902, 2839, OH, NH⁺, NH, CH st), 1310, 1141 (SO₂ st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 3.19 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 9.2$ Hz, 1H, 4-H), 3.26 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, 1H, 6-H_a), 3.39 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 1H, 2-H), 3.37–3.40 (complex signal, 2H), 3.43–3.48 (complex signal, 2H) (1'-H_a, 1'-H_b, 2'-H₂), 3.43 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.53 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 2.8$ Hz, 1H, 6-H_b), 3.59 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 6.8$ Hz, $J'' = 2.8$ Hz, 1H, 5-H), 3.61 (dd, $J = 9.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.70 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH, NH); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 35.9 (CH₂, C2'), 45.0 (CH₂, C6), 50.2 (CH₂, C1'), 55.8 (CH₃, 1-OCH₃), 72.1 (CH, C5), 72.8 (CH, C4), 73.5 (CH,

C2), 74.9 (CH, C3), 101.3 (CH, C1); HRMS (ESI), calcd for (C₉H₂₀N₂O₇S + H⁺) 301.1064; found 301.1060.

4.4.10. Methyl 6-deoxy-6-(2-guanidinoethanesulfonamido)- α -D-glucopyranoside (**12**)

To a suspension of aminosulfonamide **11** (67 mg, 0.22 mmol) in acetonitrile (2 mL), Et₃N (0.06 mL, 44 mg, 0.43 mmol) and 1H-pyrazole-1-carboxamide hydrochloride (38 mg, 0.26 mmol) were added. The reaction mixture was stirred under reflux for 6 h and cooled to room temperature. The solvent was poured off and the precipitate was dried in vacuo. The resulting brown sticky solid (65 mg) was taken in MeOH (5 mL), treated with methanolic HCl (0.5 N, 5 mL), and filtered through a 0.2 μ m NYL filter. The filtrate was evaporated under reduced pressure, washed successively with CH₃CN (2 \times 3 mL), CH₂Cl₂ (2 \times 5 mL), and pentane (2 \times 3 mL), and dried at 35 °C/30 Torr, to provide guanidine **12**·HCl (24 mg, 0.06 mmol, 29% yield) as a brownish highly hygroscopic solid; $[\alpha]_D^{20} = +17$ (c 0.35, MeOH); IR (ATR) ν 3500–2500 (max at 3340, 3174, 2907, 2844, OH, ⁺NH, NH, CH st), 1650, 1643, 1630 (C=N st), 1309, 1139 (SO₂ st) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ superimposed in part 3.20 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 9.2$ Hz, 1H, 4-H), 3.24 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 7.2$ Hz, 1H, 6-H_a), 3.34–3.39 (complex signal, 2H, 1'-H_a, 1'-H_b), superimposed in part 3.42 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 4.0$ Hz, 1H, 2-H), 3.43 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.52 (dd, $J = 14.0$ Hz, $J' = 2.8$ Hz, 1H, 6-H_b), superimposed in part 3.59 (ddd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 7.2$ Hz, $J'' = 2.8$ Hz, 1H, 5-H), 3.61 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J' = 9.2$ Hz, 1H, 3-H), 3.66 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 2'-H₂), 4.69 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 1-H), 4.85 (s, OH, NH, NH₂, ⁺NH₂); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD) δ 37.6 (CH₂, C2'), 44.9 (CH₂, C6), 51.9 (CH₂, C1'), 55.8 (CH₃, 1-OCH₃), 72.1 (CH, C5), 72.7 (CH, C4), 73.4 (CH, C2), 74.8 (CH, C3), 101.2 (CH, C1), 158.6 (C, guanidine C); HRMS (ESI), calcd for (C₁₀H₂₂N₄O₇S + H⁺) 343.1282; found 343.1280.

4.5. In vitro culture of Plasmodium falciparum

P. falciparum strain Dd2 (clone MRA-150; Malaria Research and Reference Reagent Resource Center: <http://www.mr4.org>) was maintained in continuous culture following the protocol previously described [68]. The culture media consisted of standard RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.5% Albumax I (Gibco), 100 μ M hypoxanthine (Sigma-Aldrich), 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 12.5 μ g/mL gentamicine (Sigma-Aldrich), and 25 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), and incubated in 5% CO₂ at 37 °C in tissue culture flasks (Iwaki). Growth progress was monitored by microscopy in thin blood smears stained with Wright's eosin methylene blue solution (Merck), using the freely available Plasmoscore software [69] to determine parasitemia values. A detailed description of *P. falciparum* culture and synchronization methods used in this work has been reported previously [68].

4.6. Antimalarial drug activity assay

Drug activity was assayed by the PicoGreen microfluorimetric DNA-based assay monitoring parasite growth inhibition at different drug concentrations [70]. PicoGreen (P7589) was purchased from Invitrogen and diluted as indicated by the manufacturer in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Synchronized rings from stock cultures were used to test serial dilutions of the inhibitors in 96-well culture microplates. Thus, 150 μ L of parasites at 2% hematocrit and 1% parasitemia were allowed to grow for 48 h in 5% CO₂ at 37 °C. The parasites were then centrifuged at 600 \times g for 10 min and resuspended in saponin (0.15%, wt/vol, in phosphate-buffered saline (PBS)) to lyse the erythrocytes and release the malaria parasites. To eliminate all traces of hemoglobin, the pellet was washed by the addition of 200 μ L of PBS followed by

centrifugation at $600 \times g$. The washing step was repeated twice to ensure complete removal of hemoglobin. Finally, pellets were resuspended in $100 \mu\text{L}$ of PBS. A $100\text{-}\mu\text{L}$ volume of PicoGreen diluted in TE was added to each well. Plates were incubated for 30–60 min in the dark, and the fluorescence intensity was measured at 485-nm excitation and 528-nm emission. Growth inhibition defining the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated as previously described [68]. Upon treatment, the parasite morphology was evaluated by microscopic analysis of thin blood smears stained with Wright's stain. Smears from drug-free cultures were used as a control.

4.7. Steady-state enzymatic assays to characterize human and parasite G6PD inhibition

To compare the mechanism of action of the inhibitors, the kinetic parameters of human and *PfG6PD* were determined in a range of concentrations in the linear portion of the Lineweaver-Burk plots in the presence and absence of inhibitor for analysis and curve fitting into the Michaelis-Menten equation. These assays were run in triplicate in a $900 \mu\text{L}$ of a mixture containing 0.1 M Tris (pH 8.0) and varying concentrations of G6P ($10\text{--}300 \mu\text{M}$) or NADP^+ ($5\text{--}200 \mu\text{M}$) at the corresponding saturating concentrations of the other substrate: NADP^+ or G6P ($200 \mu\text{M}$) [28]. The inhibitor was added to the mixture without prior incubation at concentrations between 40 and $160 \mu\text{M}$. In all experiments the exact concentrations of the solutions of G6P and NADP^+ were enzymatically determined. The assays were carried out at 25°C in a Perkin-Elmer LS-50B spectrofluorimeter, and the linear increase in fluorescence intensity of the NADPH levels were observed at 450 nm emission (excitation at 340 nm). Care was taken to ensure that initial rates were measured along the time length of the assay ($5\text{--}10 \text{ min}$). K_i , K_M and V_{max} values were calculated using Graphpad Prism software.

Recombinant human G6PD was obtained as previously reported [28]. *PfG6PD* was partially purified from cultures at $80\text{--}90\%$ trophozoites according to previously reported procedures [25].

4.8. In vitro cell viability assay

HEPG2 human hepatoma cells were cultured 24 h in triplicate in 96-well flat-bottomed microplates in DMEM Glutamax (GIBCO) growth medium in a final volume of $100 \mu\text{L}$ per well. Cells grown in the presence of medium alone were used as controls. To evaluate the potential cytotoxic effect of the G6PD inhibitors, one set of plates received serial dilutions from 0.2 to 2 mM of each inhibitor. Cells were seeded during 24 h and 48 h in triplicate in 96-well flat-bottomed microplates at a density of 5×10^3 cells per well in $100 \mu\text{L}$ growth medium. Treatment and control in growth medium was performed after 24 h and during further 24 h incubation in a final volume of $200 \mu\text{L}$ ($100 \mu\text{L}$ cells + $100 \mu\text{L}$ medium with or without treatment). Following treatment, cell viability was determined by means of the colorimetric EZ4U (Biomedica, Vienna, Austria) according to the manufacturers instructions, and absorbance at $490/610 \text{ nm}$ was measured spectrophotometrically in a Cary 50 BIO Microplate Reader 50MPR (Varian).

Author contributions

The manuscript was written through contributions from all authors. All authors have given approval of the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest about this article.

Abbreviations

G6P	glucose-6-phosphate
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
G6PD-6PGL	glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase
hG6PD	human glucose-6-phosphate dehydrogenase
MD	molecular dynamics
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PBS	phosphate-buffered saline
<i>PfG6PD</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> glucose-6-phosphate dehydrogenase
PPP	pentose phosphate pathway
RBC	red blood cells

Acknowledgments

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (SAF2014-57094-R, BIO2013-44565R and BIO2016-77430R) and Generalitat de Catalunya (GC) (2014SGR52, 2014SGR1189). Fellowships from GC to I.S. and C.P.; from FIS to J.J.-J.; from University of Barcelona to A.V.; from Institute of Biomedicine - University of Barcelona to D.V.; and from Comunidad de Madrid (PEJ16/MED/AI-0792) to P.A. are acknowledged. Thanks are also due to the ICREA Academia program (to F.J.L.), and to the Unión Iberoamericana de Universidades (to D.M.-T., F.J.L. and J.M.B.). The Center for Scientific and Academic Services of Catalonia (CESCA; Molecular Recognition project) is acknowledged for providing access to computational facilities. M.L. held a postdoctoral Fellowship of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FPDI-2013-16409).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.044>.

References

- [1] World Malaria Report 2016, World Health Organization: Geneva, 2016. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>.
- [2] M. Njoroge, N.M. Njuguna, P. Mutai, D.S.B. Ongarora, P.W. Smith, K. Chibale, Recent approaches to chemical discovery and development against malaria and the neglected tropical diseases human African trypanosomiasis and schistosomiasis, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11138–11163.
- [3] T.J. Egan, Drug-resistant *Plasmodium falciparum*: are recent advances a cause for optimism? *Future Microbiol.* 10 (2015) 1261–1263.
- [4] J. Okombo, K. Chibale, Antiplasmodial drug targets: a patent review (2000–2013), *Expert Opin. Ther. Pat.* 26 (2016) 107–130.
- [5] E.M. Novoa, N. Camacho, A. Tor, B. Wilkinson, S. Moss, P. Marín-García, I.G. Azcárate, J.M. Bautista, A.C. Mirando, C.S. Francklyn, S. Varon, M. Royo, A. Cortés, L. Ribas de Pouplana, Analogs of natural aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors clear malaria in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111 (2014) E5508–E5517.
- [6] F. Belluti, R. Perozzo, L. Lauciello, F. Colizzi, D. Kostrewa, A. Bisi, S. Gobbi, A. Rampa, M.L. Bolognesi, M. Recanatini, R. Brun, L. Scapozza, A. Cavalli, Design, synthesis, and biological and crystallographic evaluation of novel inhibitors of *Plasmodium falciparum* enoyl-ACP-reductase (*PfFabI*), *J. Med. Chem.* 56 (2013) 7516–7526.
- [7] C. Boss, H. Aissaoui, N. Amaral, A. Bauer, S. Bazire, C. Binkert, R. Brun, C. Bürki, C.-L. Ciana, O. Corminboeuf, S. Delahaye, C. Dollinger, C. Fischli, W. Fischli, A. Flock, M.-C. Frantz, M. Girault, C. Grisostomi, A. Friedli, B. Heidmann, C. Hinder, G. Jacob, A. Le Bihan, S. Malrieu, S. Mamzed, A. Merot, S. Meyer, S. Peixoto, N. Petit, R. Siegrist, J. Trollux, T. Weller, S. Wittlin, Discovery and characterization of ACT-451840: an antimalarial drug with a novel mechanism of action, *ChemMedChem* 11 (2016) 1995–2014.
- [8] B. Baragaña, I. Hallyburton, M.C.S. Lee, N.R. Norcross, R. Grimaldi, T.D. Otto,

- W.R. Proto, A.M. Blagborough, S. Meister, G. Wirjanata, A. Ruecker, L.M. Upton, T.S. Abraham, M.J. Almeida, A. Pradhan, A. Porzelle, M. Santos Martínez, J.M. Bolscher, A. Woodland, T. Luksch, S. Norval, F. Zuccotto, J. Thomas, F. Simeons, L. Stojanovski, M. Osuna-Cabello, P.M. Brock, T.S. Churcher, K.A. Sala, S.E. Zakutansky, M.B. Jiménez-Díaz, L.M. Sanz, J. Riley, R. Basak, M. Campbell, V.M. Avery, R.W. Sauerwein, K.J. Dechering, R. Noviyanti, B. Campo, J.A. Frearson, I. Angulo-Barturo, S. Ferrer-Bazaga, F.J. Gamó, P.G. Wyatt, D. Leroy, P. Siegl, M.J. Delves, D.E. Kyle, S. Wittlin, J. Marfurt, R.N. Price, R.E. Sinden, E.A. Winzeler, S.A. Charman, L. Bebrevska, D.W. Gray, S. Campbell, A.H. Fairlamb, P.A. Willis, J.C. Rayner, D.A. Fidock, K.D. Read, I.H. Gilbert, A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis, *Nature* 522 (2015) 315–320.
- [9] S.N. Hewitt, D.M. Dranow, B.G. Horst, J.A. Abendroth, B. Forte, I. Hallyburton, C. Jansen, B. Baragaña, R. Choi, K.L. Rivas, M.A. Hulverson, M. Dumais, T.E. Edwards, D.D. Lorimer, A.H. Fairlamb, D.W. Gray, K.D. Read, A.M. Lehane, K. Kirk, P.J. Myler, A. Wernimont, C. Walpole, R. Stacy, L.K. Barrett, I.H. Gilbert, W.C. Van Voorhis, Biochemical and structural characterization of selective allosteric inhibitors of the *Plasmodium falciparum* drug target, prolyl-tRNA-synthetase, *ACS Infect. Dis.* 3 (2017) 34–44.
- [10] A. Mital, D. Murugesan, M. Kaiser, C. Yeates, I.H. Gilbert, Discovery and optimisation studies of antimalarial phenotypic hits, *Eur. J. Med. Chem.* 103 (2015) 530–538.
- [11] B. Baragaña, N.R. Norcross, C. Wilson, A. Porzelle, I. Hallyburton, R. Grimaldi, M. Osuna-Cabello, S. Norval, J. Riley, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, P.G. Wyatt, M.J. Delves, S. Meister, S. Duffy, V.M. Avery, E.A. Winzeler, R.E. Sinden, S. Wittlin, J.A. Frearson, D.W. Gray, A.H. Fairlamb, D. Waterson, S.F. Campbell, P. Willis, K.D. Read, I.H. Gilbert, Discovery of a quinoline-4-carboxamide derivative with a novel mechanism of action, multistage antimalarial activity, and potent in vivo efficacy, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 9672–9685.
- [12] L. Luzzatto, Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype, *Haematologica* 91 (2006) 1303–1306.
- [13] P.J. Mason, J.M. Bautista, F. Gilsanz, G6PD deficiency: the genotype-phenotype association, *Blood Rev.* 21 (2007) 267–283.
- [14] E. Beutler, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective, *Blood* 111 (2008) 16–24.
- [15] M.D. Cappellini, G. Fiorelli, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Lancet* 371 (2008) 64–74.
- [16] J. Preuss, E. Jortzik, K. Becker, Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*, *IUBMB Life* 64 (2012) 603–611.
- [17] Z. Bozdech, H. Ginsburg, Data mining of the transcriptome of *Plasmodium falciparum*: the pentose phosphate pathway and ancillary processes, *Malar. J.* 4 (2005) 17–28.
- [18] M. Linares, A. Puyet, A. Diez, J.M. Bautista, Oxidative stress and protein carbonylation in malaria, in: J. Ros (Ed.), *Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2017, pp. 131–166.
- [19] J. Storm, J. Perner, I. Aparicio, E.M. Patzewitz, K. Olszewski, M. Llinas, P.C. Engel, S. Müller, *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase is dispensable and not a drug target during erythrocytic development, *Malar. J.* 10 (2011) 193–204.
- [20] C. Wrenger, S. Müller, Isocitrate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*: energy metabolism or redox control? *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1775–1783.
- [21] H. Atamna, G. Pascarmona, H. Ginsburg, Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites, *Mol. Biochem. Parasitol.* 67 (1994) 79–89.
- [22] A. Crooke, A. Diez, P.J. Mason, J.M. Bautista, Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase - 6-phosphogluconolactonase, *FEBS J.* 273 (2006) 1537–1546.
- [23] S.M. Allen, E.E. Lim, E. Jortzik, J. Preuss, H.H. Chua, J.I. MacRae, S. Rahlfs, K. Haessler, M.T. Downton, M.J. McConville, K. Becker, S.A. Ralph, *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase is a potential drug target, *FEBS J.* 282 (2015) 3808–3823.
- [24] J.L. Clarke, D.A. Scopes, O. Sodeinde, P.J. Mason, Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase. A novel bifunctional enzyme in malaria parasites, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 2013–2019.
- [25] B. Kurdi-Haidar, L. Luzzatto, Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 41 (1990) 83–92.
- [26] D.A. Scopes, J.M. Bautista, T.J. Vulliamy, P.J. Mason, *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) - the N-terminal portion is homologous to a predicted protein encoded near to G6PD in *Haemophilus influenzae*, *Mol. Microbiol.* 23 (1997) 847–848.
- [27] M. Kotaka, S. Gover, L. Vandeputte-Rutten, S.W.N. Au, V.M.S. Lam, M.J. Adams, Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61 (2005) 495–504.
- [28] J.M. Bautista, P.J. Mason, L. Luzzatto, Purification and properties of human glucose-6-phosphate dehydrogenase made in *E. coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1119 (1992) 74–80.
- [29] E. Jortzik, B.M. Mailu, J. Preuss, M. Fischer, L. Bode, S. Rahlfs, K. Becker, Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from *Plasmodium falciparum*, *Biochem. J.* 436 (2011) 641–650.
- [30] J. Preuss, M. Hedrick, E. Sergienko, A. Pinkerton, A. Mangravita-Novo, L. Smith, C. Marx, E. Fischer, E. Jortzik, S. Rahlfs, K. Becker, L. Bode, High-throughput screening for small-molecule inhibitors of *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase, *J. Biomol. Screen* 17 (2012) 738–751.
- [31] P. Maloney, S. Peddibhotla, M.P. Hedrick, P. Hershberger, P. Gosalia, M. Milewski, Y.L. Li, E. Sugarman, B. Hood, E. Suyama, K. Nguyen, S. Vasile, E. Sergienko, A. Mangravita-Novo, M. Vicchiarelli, D. McAnally, L.H. Smith, G.P. Roth, J. Diwan, T.D.Y. Chung, E. Jortzik, S. Rahlfs, K. Becker, A.B. Pinkerton, L. Bode, J. Preuss, Discovery of a *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase inhibitor (RZ)-N-((1-Ethylpyrrolidin-2-yl)methyl)-2-(2-fluorobenzylidene)-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]thiazine-6-carboxamide (ML276) that reduces parasite growth *in vitro*, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 7262–7272.
- [32] P. Maloney, M. Hedrick, S. Peddibhotla, P. Hershberger, M. Milewski, P. Gosalia, L. Li, J. Preuss, E. Sugarman, B. Hood, E. Suyama, K. Nguyen, S. Vasile, E. Sergienko, S. Salanawil, D. Stonich, Y. Su, R. Dahl, A. Mangravita-Novo, M. Vicchiarelli, D. McAnally, L.H. Smith, G. Roth, J. Diwan, T.D.Y. Chung, A.B. Pinkerton, L. Bode, K.A. Becker 2nd, Selective Inhibitor of *Plasmodium falciparum* Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (PFG6PDH) - Probe 2, 2010. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program, Bethesda (MD), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK184495/>.
- [33] T.E. Wellem, K. Hayton, R.M. Fairhurst, The impact of malaria parasitism: from corpses to communities, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 2496–2505.
- [34] D.P. Kwiatkowski, How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria, *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2005) 171–190.
- [35] L. Luzzatto, E.A. Usanga, S. Reddy, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites, *Science* 164 (1969) 839–842.
- [36] A. Guindo, R.M. Fairhurst, O.K. Doumbo, T.E. Wellem, D.A. Diallo, X-Linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria, *PLoS Med.* 4 (2007), e66.
- [37] A.K. Ouattara, C. Bisseye, B.V. Bazie, B. Diarra, T.R. Compaore, F. Djigma, V. Pietra, R. Moret, J. Simpore, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is associated with asymptomatic malaria in a rural community in Burkina Faso, *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 4 (2014) 655–658.
- [38] C. Louicharoen, E. Patin, R. Paul, I. Nuchprayoon, B. Witoonpanich, C. Peerapittayamongkol, I. Casademont, T. Sura, N.M. Laird, P. Singhasivanon, L. Quintana-Murci, A. Sakuntabhai, Positively selected G6PD-Mahidol mutation reduces *Plasmodium vivax* density in southeast Asians, *Science* 326 (2009) 1546–1549.
- [39] H.M. Peixoto, M.A.M. Brito, G.A.S. Romero, W.M. Monteiro, M.V.G. de Lacerda, M.R.F. de Oliveira, G6PD deficiency in male individuals infected by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: a cost study, *Malar. J.* 14 (2015) 126–134.
- [40] N. Khim, C. Benedet, S. Kim, S. Kheng, S. Siv, R. Leang, S. Lek, S. Muth, N. Chea, C.M. Chuur, S. Duong, A. Kerleguer, P. Tor, P. Chim, L. Canier, B. Witkowski, W.R.J. Taylor, D. Ménard, G6PD deficiency in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria-infected Cambodian patients, *Malar. J.* 12 (2013) 171–180.
- [41] J.S. Papadopoulos, R. Agarwala, COBAL: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences, *Bioinformatics* 23 (2007) 1073–1079.
- [42] M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, T.L. Madden, NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W5–W9.
- [43] G.M. Boratyn, C. Camacho, P.S. Cooper, G. Coulouris, A. Fong, N. Ma, T.L. Madden, W.T. Matten, S.D. McGinnis, Y. Merezuk, Y. Raytselis, E.W. Sayers, T. Tao, J. Ye, I. Zaretskaya, BLAST: a more efficient report with usability improvements, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) W29–W33.
- [44] S.W. Au, S. Gover, M.J. Adams, Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecules and provides insights into enzyme deficiency, *Structure* 8 (2000) 293–303.
- [45] J.M. Bautista, P.J. Mason, L. Luzzatto, Human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Lysine 205 is dispensable for substrate binding but essential for catalysis, *FEBS Lett.* 366 (1995) 61–64.
- [46] M.S. Cosgrove, C. Naylor, S. Paludan, M.J. Adams, H.R. Levy, On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry* 37 (1998) 2759–2767.
- [47] M.S. Cosgrove, S. Gover, C.E. Naylor, L. Vandeputte-Rutten, M.J. Adams, H.R. Levy, An examination of the role of Asp-177 in the His-Asp catalytic dyad of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: X-ray structure and pH dependence of kinetic parameters of the D177N mutant enzyme, *Biochemistry* 39 (2000) 15002–15011.
- [48] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, THE SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [49] P. Benkert, S.C.E. Tosatto, D. Schomburg, QMEAN: a comprehensive scoring function for model quality assessment, *Proteins* 71 (2008) 261–277.
- [50] P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models, *Bioinformatics* 27 (2011) 343–350.
- [51] A. Yoshida, E.F. Roth Jr., Glucose-6-phosphate dehydrogenase of malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Blood* 69 (1987) 1528–1530.
- [52] M. Naïm, S. Bhat, K.N. Rankin, S. Dennis, S.F. Chowdhury, I. Siddiqi, P. Drabik, T. Sulea, C.I. Bayly, A. Jakalian, E.O. Purisima, Solvated interaction energy (SIE) for scoring protein-ligand binding affinities. 1. Exploring the parameter space, *J. Chem. Inf. Model.* 47 (2007) 122–133.

- [53] H.B. Sinclair, An improved method for the preparation of methyl 6-chloro-6-deoxy- α -D-glucopyranoside, *J. Org. Chem.* 30 (1965) 1283–1284.
- [54] M.E. Evans, L. Long Jr., F.W. Parrish, Reaction of carbohydrates with methylsulfonyl chloride in *N,N*-dimethylformamide. Preparation of some methyl 6-chloro-6-deoxyglycosides, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 1074–1076.
- [55] M. Gómez-García, J.M. Benito, R. Gutiérrez-Gallego, A. Maestre, C. Ortiz Mellet, J.M. García Fernández, J.L. Jiménez Blanco, Comparative studies on lectin-carbohydrate interactions in low and high density homo- and heteroglycoclusters, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 1849–1860.
- [56] J.M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, Chiral 2-thioxotetrahydro-1,3-*O,N*-heterocycles from carbohydrates. 2. Stereocontrolled synthesis of oxazoline pseudo-C-nucleosides and bicyclic oxazine-2-thiones, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 5192–5199.
- [57] M.A.K. Zarchi, M. Tayefi, F. Tirgir, M.R. Sabzalian, An environmentally compatible synthesis of polyesters derived from 5-(2-phthalimidoethanesulfonamido) isophthalic acid as a novel diacid monomer, *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2011) 2573–2583.
- [58] A. Radfar, A. Diez, J.M. Bautista, Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 2034–2042.
- [59] The Uniprot Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D158–D169.
- [60] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Goetz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, AMBER 12, University of California, San Francisco, CA, 2012.
- [61] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins* 65 (2006) 712–725.
- [62] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99SB protein force field, *Proteins* 78 (2010) 1950–1958.
- [63] K.N. Kirshner, A.B. Yongye, S.M. Tschampel, J. González-Outeiriño, C.R. Daniels, B.L. Foley, R.J. Woods, GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 622–655.
- [64] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935.
- [65] I.S. Joung, T.E. Cheatham, Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 9020–9041.
- [66] C.R. Sondergaard, M.H.M. Olsson, M. Rostkowski, J.H. Jensen, Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values, *J. Chem. Theor. Comput.* 7 (2011) 2284–2295.
- [67] T.A. Halgren, R.B. Murphy, R.A. Friesner, H.S. Beard, L.L. Frye, W.T. Polland, J.L. Banks, Glide. A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1750–1759.
- [68] A. Radfar, D. Méndez, C. Moneriz, M. Linares, P. Marín-García, A. Puyet, A. Diez, J.M. Bautista, Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1899–1915.
- [69] O. Proudfoot, N. Drew, A. Scholzen, S. Xiang, M. Plebanski, Investigation of a novel approach to scoring Giemsa-stained malaria-infected thin blood films, *Malar. J.* 7 (2008) 62.
- [70] C. Moneriz, P. Marín-García, J.M. Bautista, A. Diez, A. Puyet, Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia *Plasmodium* infected erythrocytes, *Malar. J.* 8 (2009) 279.

Supplementary Material

First homology model of *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase: Discovery of selective substrate analog-based inhibitors as novel antimalarial agents

Nelson Alencar,^{a,1,#} Irene Sola,^{b,#} María Linares,^{c,#} Jordi Juárez-Jiménez,^a Caterina Pont,^b Antonio Viayna,^a David Vílchez,^a Cristina Sampedro,^b Paloma Abad,^c Susana Pérez-Benavente,^c Jerónimo Lameira,^d José M. Bautista,^c Diego Muñoz-Torrero,^{b,} and F. Javier Luque^{a,*}*

^a Department of Nutrition, Food Science and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

¹ Present address: Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos-LPDF, Instituto de Ciências Exatas e Naturais- ICEN, Universidade Federal do Pará – UFPA, Av. Augusto Correa, Nº 1- Bairro: Guamá, Cep: 66.075-900, Belém-Pará, Brazil

^b Laboratory of Pharmaceutical Chemistry (CSIC Associated Unit), Faculty of Pharmacy and Food Sciences and IBUB, University of Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, E-08028, Barcelona, Spain

^c Research Institute Hospital 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Ciudad Universitaria, 28040-Madrid, Spain

^e Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos-LPDF, Instituto de Ciências Exatas e Naturais- ICEN, Universidade Federal do Pará – UFPA, Av. Augusto Correa, Nº 1- Bairro: Guamá, Cep: 66.075-900, Belém-Pará, Brazil

Contents

Table S1	S3
Table S2	S4
Table S3	S5
Figure S1	S6
Figure S2	S8
Figure S3	S11
Figure S4	S14
Figure S5	S18
Figure S6	S21
Figure S7	S23
References	S24
NMR spectra of synthesized compounds	S25

Table S1

X-ray structures of the enzyme G6PD from different organisms available in the PDB.

PDB ID	Organism	Residues	Mutation	Ligand	Resolution (Å)	Ref.
1QKI	<i>H. sapiens</i>	2-515	R459L	NADP ⁺	3.0	1
2BHL	<i>H. sapiens</i>	27-515	H27V	G6P	2.9	2
2BH9	<i>H. sapiens</i>	28-515	H27V	NADP ⁺	2.5	2
5UKW	<i>H. sapiens</i>	29-511	A277C	G6P	2.65	3
4LGV	<i>M. avium</i>	1-460	---	---	2.3	4
5AQ1	<i>T. cruzi</i>	509	---	G6P NADPH	2.65	5
4E9I	<i>T. cruzi</i>	541	---	---	2.85	---
4EM5	<i>T. cruzi</i>	541		G6P	3.35	---
1DPG	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	S61C	---	2.0	6
2DPG	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	H240N	NADP ⁺	2.5	7
1E7Y	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	D177N	G6P NADPH	2.48	8
1E7M	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	D177N	---	2.54	8
1E77	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	Q365C	G6P	2.69	8
1H9B	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	Q365C	---	2.4	9
1H9A	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	Q365C	NADP ⁺	2.16	9
1H94	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	S215C	NAD ⁺	2.5	9
1H93	<i>L. mesenteroides</i>	2-486	S215C	---	2.2	9

Table S2

List of residues in the substrate binding site of G6PD from Plasmodium species (*P. falciparum*: Uniprot ID: Q8IKU0; *P. vivax*: Uniprot ID: A0A1G4HHS1; *P. malariae*: Uniprot ID: A0A1A8WAC7; *P. knowlesi*: Uniprot ID: A0A1A7vNJ6; *P. reichenowi*: Uniprot ID: A0A060S5P3; *P. yoelii yoelii*: Uniprot ID: Q7RRD8; *P. chabaudi chabaudi*: Uniprot ID: A0A1C6XJL2). The Asp residue that replaces Arg365 in human G6PD is shown in bold.

<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>	<i>P. reichenowi</i>	<i>P. yoelii yoelii</i>	<i>P. chabaudi chabaudi</i>
Lys548	Lys556	Lys517	Lys543	Lys545	Lys577	Lys577
His578	His586	His547	His573	His575	His607	His607
Lys582	Lys590	Lys551	Lys577	Lys579	Lys611	Lys611
Glu616	Glu624	Glu585	Glu611	Glu613	Glu645	Glu645
Asp635	Asp640	Asp601	Asp627	Asp632	Asp661	Asp661
His640	His648	His609	His635	His637	His669	His669
Lys745	Lys762	Lys717	Lys749	Lys745	Lys782	Lys777
Asp750	Asp767	Asp722	Asp754	Asp747	Asp787	Asp782
Gln779	Gln796	Gln751	Gln783	Gln776	Gln816	Gln811

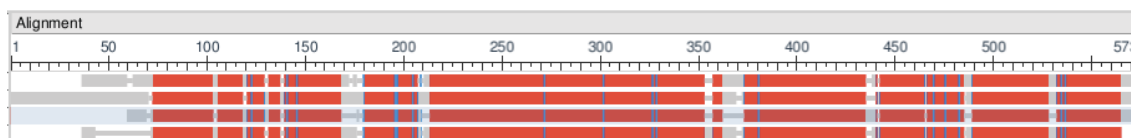
Table S3

Predicted binding affinities (kcal/mol) of G6P to the human and *P. falciparum* G6PD enzymes determined from SIE calculations. For the sake of consistency, calculations were performed for three time windows along the last part of the trajectory.

Time (ns)	vdW	Coulomb	RF	Cavity	DG
<i>Human</i>					
41-60	-11.8±0.6	-105.0±1.2	76.8±0.9	-4.3±0.1	-7.5±0.1
61-80	-11.8±0.6	-109.1±1.5	82.7±0.9	-4.4±0.1	-7.3±0.1
81-100	-10.9±0.6	-107.5±1.4	78.6±1.0	-4.4±0.1	-7.5±0.1
Average					-7.4±0.1
<i>P. falciparum</i>					
41-60	-9.4±0.6	-273.8±1.3	237.2±1.0	-3.7±0.1	-8.1±0.1
61-80	-9.7±0.5	-264.6±2.2	235.2±1.8	-3.3±0.1	-7.3±0.1
81-100	-10.2±0.5	-269.5±2.2	237.0±1.8	-3.4±0.1	-7.7±0.1
Average					-7.7±0.4

Fig. S1. Multiple sequence alignment of the G6PD enzyme from *H. sapiens* (Hs, Uniprot ID: P11413, 515 residues), *T. cruzi* (Tc, Uniprot ID: Q4E0B2, 555 residues), *M. avium* (Ma, Uniprot ID: A0A0H3A0Q9, 469 residues), and *L. mesenteroides* (Lm, Uniprot ID: P11411, 486 residues).

A) Representation of the relative alignment of the sequences of G6PD enzymes.



B) Selected parameters of the multiple alignment.

	Range of residues	Coverage (%)	Identity (%)	Positives (%)	E-value
<i>T. cruzi</i>	65-543	92	50	67	1e-168
<i>M. avium</i>	4-459	94	34	51	2e-88
<i>L. mesenteroides</i>	8-479	90	33	50	1e-83

C) Detailed view of the alignment of residues between the four proteins. Residues directly implicated in substrate binding are highlighted.

Hs	-----MAEQVALSRTQVCGILREELFQG-	23
Tc	MSGSENRCRFQKEVDKFFDTRLRERTLRDHPQELCEYLMENAKKVA AELRGEVCERIPDAV	60
Ma	-----M	1
Lm	-----MVSEIKT-----	7
Hs	--DAFHQSDTHIFIIMGASGDLAKKKIYPTIWFLFRDGLLPENTFIVGYARSRLTVADIR	81
Tc	SPELRSRALT--IVVLGASGDLAKKTFPALFQLYCNGMLPRDVNILGYARSTMEDVE--	116
Ma	ADDSHPSD--LLVIFGITGDLARKMTFRALYRLERREELEHP--IIGVASDDITLDQLL	57
Lm	-----LVTFFGGTGD LAKRKL YPSVFNLYKKG YLQKHFAIVGTARQALNDDEFK	56
	* **** * * * *	
Hs	KQSEPFKA--TPEEKL--KLEDFFARN SYVAGQYDDAASYQRLNSHMNALH--LG---S	132
Tc	KWKKDTLAGFFTRLDERGCHVGNFLRRISYMTGSYDRDED FARNLNERILRMEEAFQGPKE	176
Ma	DRAREAIKATGETFDDA--VFDRLAGRLSYLSGDVTD TGLYSELAEKI-----G--G	105
Lm	QLVRDSIKD--FTDDQA--QAEAFIEHFSYRAHDVTD AASYAVLKEAIEEAADKFD---I	109
	** *	
Hs	QANRLFYLALPPTVYEAVTKNIHESCM-S-QIGWNRIIVEK PFGRDLQSSDRLSNHISL	190
Tc	GGNRLFYLALPPSVFVGC RGLSKGAMQKPELGWRLIVEK PFGRDTETSEQLSNQLKPL	236
Ma	DSRPLYYLEMPPSLFAPIVENLAKADLLE----RARVAVEK PFGHDLESARDLNARLRAV	161
Lm	DGNRIFYMSVAPRFFGTIAKYLKSEGLLA-DTGYNRLMIEK PFGTSYDTAAELQNDLENA	168
	* * * ***** *	
Hs	FREDQIYRIDHYLGEKEMVQNLMLVLRFANRIFGPIWNRDNIACVILTFKEPFGTEGRGGYF	250
Tc	FNERQVFRIDHYLGEKEMVQNIIVTRFANRVFSALWNSNSIACVQITFKEKIGTAGRGGYF	296
Ma	LDEDQILRVDHFLGKQPVEELQYLRFANNALAKLWDRDSISEIHITMAEDFGIEDRGKFY	221
Lm	FDDNQLFRIDHYLGEKEMVQNI AALRFGNPIFDAAWNKD YIKNVQVTLSV LGVVEERAGYF	228
	* * ** * * ** * * * * *	
Hs	DEFGIIRDVMQNHLLQMLCLVAMEKPASTNSDDVRDEKVKVLCISEVQANNV----VLG	306
Tc	DSIGIIRDVIQNHLLTQILSLLTMEKPRSLSAEDIRDEKQVQLRQVVPANPAEC----VLG	352
Ma	DAVGAVRDVVQNHLLQVLALVAMEPPVGAGADDLNDKKAIEVFRAMPSLDPEHC----VRG	277
Lm	DTAGALLDMIQNHMTMQIVGWLAMEKPESFTDKDIRAAKNAAFNALKIYDEAEVNKYFVRA	288
	* * * ** * ** * * *	

```

Hs      QYVGNPDGEGEATKGYLDDPTVPRGSTTATFAAVVLYVENERWDGVPFILRCGKALNERK 366
Tc      QYTASADGS---TPGYLDDPSVPKGSCHCPTFAVLRRLHVNNDRWHGVVPIIRAGKALEERL 409
Ma      QY-----RGYTEVPGVAKDSTTETYVALRTEIDNWRWAGVPIFLRAGKALPHKV 327
Lm      QYGAGDSAD---FKPYLEELDVPADSKNNTFIAGELQFDLPRWEGVVPFYVRSKRLAAKQ 345
      **          *      *      *      *          ** ***  *  ** *

Hs      AEVRLQFHDVAGDIF---HQQ-CKRNELVIRVQNEAVYTKMMTKKPGMFFNPEESELDL 422
Tc      LDIRIQFKDEIRPFG-----ESTQRNELVIRAOPESEAMYKLTAKTPGLLNDTHQTELDL 464
Ma      TEVRMFLHHVPGFSFLPNRRP-PEPNQIVLRIDDPDGMRLQLSAQ-VGDSWHDVHLDSSF 385
Lm      TRVDIVFKAGTFNFG---SEQEAQEAVLSIIIDPKGAIELKLNKSVEDAFNTRTIDLGW 402
      *

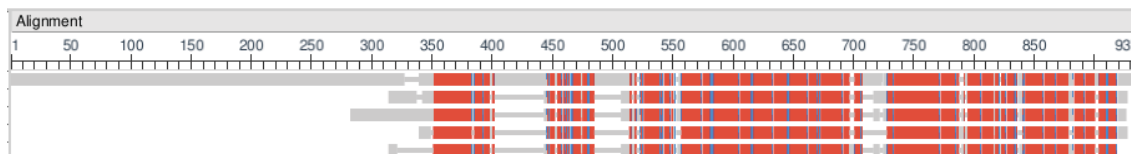
Hs      TYGNRYKNVKLPDAYERLILDVFCGSQMHFVRSDELREAWRIFTPLLHQIELEKPKPIPY 482
Tc      TYERR-YDVTLPDAYESLIHEALLGNSTNFVRVDELDAAWRIYTPLLHAIDRGEVKVLPY 523
Ma      AVDLG----EPVRPYERLLYAAFNGDRQLFAREDAIEETWRIVQPVLD----KPSRIHQY 437
Lm      TVSDE-DKKNTPEPYERMIHDTMNGDGSNFADWNGVSIAWKFVDAISAVYTADKAPLETY 461
      **          *      *          *          *

Hs      IYGSRGPTAEDELMKRVGFQYEGTYKWNPHKL 515
Tc      AAGSCGPEEAQEFIRISGYKTTNGNAYKCSNA- 555
Ma      EQGSWGPEAAQALVHGRHAWQQPWLQSTSTKR 469
Lm      KSGSMGPEASDKLLAANGDAWVFKG----- 486
      ** **

```

Fig. S2. Multiple sequence alignment of the *P. falciparum* G6PD–6PGL enzyme (Pf, Uniprot ID: Q8IKU0, 910 residues) and the G6PD enzymes from *H. sapiens* (Hs, Uniprot ID: P11413, 515 residues), *T. cruzi* (Tc, Uniprot ID: Q4E0B2, 555 residues), *M. avium* (Ma, Uniprot ID: A0A0H3A0Q9, 469 residues), and *L. mesenteroides* (Lm, Uniprot ID: P11411, 486 residues).

A) Representation of the relative alignment of the enzyme sequences.



B) Selected parameters of the multiple alignment.

	Range of residues	Coverage (%)	Identity (%)	Positives (%)	E-value
<i>H. sapiens</i>	135-498	67	44	62	2e-109
<i>T. cruzi</i>	65-533	63	36	52	4e-109
<i>M. avium</i>	112-466	52	30	50	4e-59
<i>L. mesenteroides</i>	112-469	50	28	46	6e-44

C) Detailed view of the alignment of residues between the five proteins. Residues directly implicated in substrate binding are highlighted.

Pf	MDYENFVKSAAEEINNLHNVNYLETKDLNDFNWKAAAYYICKEIYDKQKINKDGYVVIGLSG	60
Hs	-----	
Tc	-----	
Ma	-----	
Lm	-----	
Pf	GRTPIDVYKNMCLIKDIKIDKSKLIFFIIDERYKSDDHKFSNYYNNIKFLFHNLNINEKEQ	120
Hs	-----	
Tc	-----	
Ma	-----	
Lm	-----	
Pf	LYKPDTTKSIVDCILDYNDKIKIMIEKYKKVDIAILGMGSDFHIASLFPNIFYNIYMNNY	180
Hs	-----	
Tc	-----	
Ma	-----	
Lm	-----	
Pf	QNNYIYNEKTLDFINNDQDNDNLKYLKEYVYFTTTNQFDVRKRITVSLNLLANASSKIIFL	240
Hs	-----	
Tc	-----	
Ma	-----	
Lm	-----	
Pf	LNSKDKLDLWKNMLIKSYIEVNYNLYPATYLIDTSTNENVNINNNNNNNNNKKNKNNYCYS	300
Hs	-----	
Tc	-----MSGSENRCRFQKEVDKFF	18
Ma	-----	
Lm	-----	

Pf NTTVISCGYENYTKSIEEIIYDSKYALS-----LYSNSLNKEELLTIIIFGCSG 348
 Hs -----MAEQVALSRTQVCGILREELFQG-----DAFHQSDTHIFIIMGASG 41
 Tc DTLRERTLRDHPQELCEYLMENAKKVAEELRGEVCERIPDAVSPELRSRALTIVVLGASG 78
 Ma -----MADDDSHPSD---LLVIFGITG 19
 Lm -----MVSEIKT-----LVTFFGGTG 16
 * *

Pf DLAKKKIYPALFKLFCNNSLPKDLLIIGFARTVQDFDTFFDKIVIYLRCLLCYEDWSIS 408
 Hs DLAKKKIYPTIWWLFRDGLLPENTFIVGYARSRLTVAD--IR----- 81
 Tc DLAKKKTFPALFQLYCNGMLPRDVNILGYARSTMEDVEKWKK----- 120
 Ma DLARKMTFRALYRLERREELEHP--IIGVASDDITLDQLLDR----- 59
 Lm DLAKRKLYPVFNLYKKGYLQKHFAIVGTARQALNDDE--FK----- 56
 *** * * * *

Pf KKKDLLNGFKNRCRYFVGNYSSESFENFNKYLTTEIEEEEAKKKYYATCYKMNGSDYNIS 468
 Hs -----KQSEPFKA--TPEEKLKLEDFFARNYSVAG--QYDDA 115
 Tc -----DTLAGFFTR--LDERGCHVGNFLRRISYMTG--SYDRD 154
 Ma -----AREAIKATGETFDDAVFDRLAGRLSYLSG--DVTDT 93
 Lm -----QLVRDSIKD--FTDDQAQAEAFIEHFSYRAH--DVTDA 90

Pf NNVAEDNISIDDENKTNEYFQMCTPKNCPDNVSSNYNFP---YVINRMLYLALPPHIFV 525
 Hs ASYQR-----LNSHMNALH--LG---SQANRLFYLALPPTVYE 148
 Tc EDFAR-----LNERILRMEEAFQGPKEKGNRLFYLALPPSVFV 192
 Ma GLYSE-----LAEKIG---GDSRPLYLEMPPSLFA 121
 Lm ASYAV-----LKEATEEAADKFD---IDGNRIFYMSVAPRFFG 125
 * *

Pf STLKKNYKKNCLNS--KGTDKILLEKPFGNLDLSFKMLSKQILENFNEQQIYRIDHYLGKD 583
 Hs AVTKNIHESCM-S-QIGWNRIIVEKPFGRDLQSSDRLSNHSSLFREDQIYRIDHYLGKE 206
 Tc GVCRLSKGAMQKPELQWVRLIVEKPFGRDTETSEQLSNQLKPLFNERQVFRIDHYLGKE 252
 Ma PIVENLAKADLLE----RARVAIEKPFGHDLSEARDLNARLRAVLDEQILRVDFLQK 177
 Lm TIAYKYLKSEGLLA-DTGYNRLMIEKPFGTSYDTAAELQNDLENAFDDNQLFRIDHYLGKE 184
 ***** * * * *

Pf MVSGLLKLFKFTNTFLLSLMNRHFIKCIKITLKEITKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 643
 Hs MVQNLMLVRFANRIFGPIWNRDNIACVILTFKEIPFGTEGRGGYFDEFGIIRDVMQNHLLQ 266
 Tc MVQNIIVTRFANRVFSALWNSNSIACVQITFKEIKIGTAGRGGYFDSIGIIRDVIQNHLLTQ 312
 Ma PVEELQYLRFANNALAKLWDRDSISEIHITMAEDFGIEDRGKFDYAVGAVRVVQNHLLQ 237
 Lm MVQNI AALRFGNPIFDAAWNKYIKNVQVTLSEVLGVEERAGGYDTAGALLDMIQNHMTQ 244
 * * * * * * * * * *

Pf LLTLITMEDPIDLNDESVKNEKIKILKSIPSIKLEDT----IIGQYEKAENFKEDENDD 699
 Hs MLCLVAMEKPASTNSDDVRDEKVKVLCISEVQANNV----VLGQYVG-----NPD 313
 Tc ILSLLTMEKPRLSAEDIRDEKVQVLRQVVPANPAEC----VLGQYTA-----SAD 359
 Ma VLALVAMEPPVGAGADDLNDKKAEVFRAMPPLDPEHC----VRGQYRG----- 281
 Lm IVGWLAMEKPESFTDKDIRAAKNAAFNALKIYDEAEVNKYFVRAQYGA-----GDS 295
 * * * *

Pf ESKK-NHSYHDDPHIDKNSITPTFCTCILYINSINWYGVPPIIFKSGKLNKQICEIRIQF 758
 Hs GEGEATKGYLDDPTVPRGSTTATFAAVVLYVENERWDGVPFILRCGKALNERKAEVRLQF 373
 Tc GS---TPGYLDDPSVPKGSCHCPTFAVLRHLVNNDRWHGVPIIRAGKALEERLLDIRIQF 416
 Ma -----YTEVPGVAKDSTTETYVALRTEIDNWRWAGVPIFLRAGKALPHKVTEVRMFL 333
 Lm AD---FKPYLEELDVPADSKNNTFIAGELQFDLPRWEGVPFVYRSGKRLAAKQTRVDIVF 352
 * * * * * * *

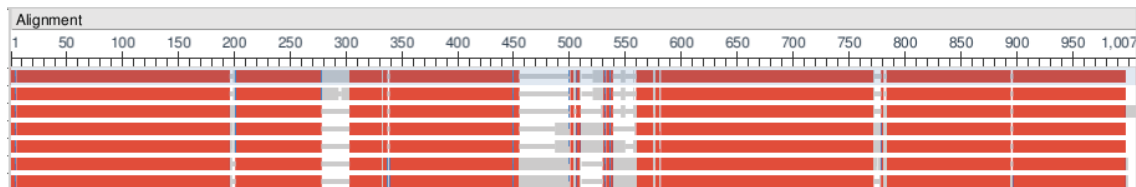
Pf HNIMGSSD----ENMNNNEFVILQIPEVAIYLRKMMIKKTGCE--EMEEVQLNLTVNEKNKK 813
 Hs HDVAGDIF--HQQ--CKRNELVIRVQPNQEAIVYTKMMTKKPGMFFNPEESELDTYGNRYKN 430
 Tc KDEIRPFG--EST--QRNELVIRAQPNSEAMYKLTAKTPGLLNDTHQTELDLTYERR--YD 471
 Ma HHVPGFSLPNRRPPEPNQIVLRIDPDPGMRLQLSAQ--VGDSWHDVHLDSSFAVDLG--- 389
 Lm KAGTFNFG--SEQEAQEAVLSIIIDPKGAIELKLNKAKSVEDAFNTRTIDLGWTVSDE--DK 409
 *

Pf INVPEAYETLLLECFKGHKKKFIISDEELYESWRIFTPLLKELQEKQVKPLKYSFGSSGPK 873

Hs	VKLPDAYERLILDVFCGSQMHFVRSDELREAWRIFTPLLHQIELEKPKPIPIYIYGSRGPT	490
Tc	VTLPDAYESLIHEALLGNSTNFVRVDELDAAWRIYTPLLHAIDRGEVKVLPYAAGSCGPE	531
Ma	-EPVRPYERLLYAAFNGDRQLFAREDAIEETWRIVQPVL-----DKPSRIHQYEQGSWGPE	444
Lm	KNTPEPYERMIHDTMNGDGSNFADWNGVSIAWKFVDAISAVYTADKAPLETYKSGSMGPE	469
	** * * * * ** **	
Pf	EVFGLVKKYYNYGKNYTHRPEFVRKSSFYEDDLLDIN	910
Hs	E---ADELMKRVGFQYEGTYKWVNPVKL-----	515
Tc	E---AQEFIRISGYKTTNGNAYKCSNA-----	555
Ma	A---AQALVHGRHAWQPWLPQSTSTKR-----	469
Lm	A---SDKLLAANGDAWVFKG-----	486

Fig. S3. Multiple sequence alignment of the G6PD–6PGL enzyme in Plasmodium species (*P. falciparum*: Pf, Uniprot ID: Q8IKU0, 910 residues; *P. reichenowi*: Pr, Uniprot ID: A0A060S5P3, 907 residues; *P. malariae*: Pm, Uniprot ID: A0A1A8WAC7, 891 residues; *P. knowlesi*: Pk, Uniprot ID: A0A1A7vNJ6, 914 residues; *P. vivax*: Pv, Uniprot ID: A0A1G4HHS1, 927 residues; *P. yoelii yoelii*: Pyy, Uniprot ID: Q7RRD8, 949 residues; *P. chabaudi chabaudi*: Pcc, Uniprot ID: A0A1C6XJL2, 946 residues).

A) Representation of the relative alignment of the enzyme sequences.



B) Selected parameters of the multiple alignment.

	Range of residues	Coverage (%)	Identity (%)	Positives (%)	E-value
<i>P. reichenowi</i>	1-907	100	98	98	0.0
<i>P. malariae</i>	1-882	100	77	85	0.0
<i>P. knowlesi</i>	1-914	100	72	81	0.0
<i>P. vivax</i>	1-927	100	71	79	0.0
<i>P. yoelii yoelii</i>	1-945	99	65	75	0.0
<i>P. chabaudi chabaudi</i>	1-942	99	64	75	0.0

C) Detailed view of the alignment of residues between the Plasmodium proteins. Residues directly implicated in substrate binding are highlighted.

```

Pf      MDYENFVKSAAEINNHLHNVNYLETKDLNDFNWKAAAYYICKEIYDKQQINKDGYVVIGLSG 60
Pr      MDYESFVKSAAEINNHLHNVNYLETKDLNDFNWKAAAYYICKEIYDKQQINKDGYVVIGLSG 60
Pm      MDYQLFLESLEEASYLRKVKYLNAKDLTDFNIKAAYYICKEIHEKQLSNENGYVVIGLSG 60
Pk      MDCQALAKSLEHMNHLQNVKYLESKDLTDFNQKSAYYICQIAEKQKSNEGHHVIGLSG 60
Pv      MDCQALAKSLEQMNHHLHNVKYLEAKDLTDFNQKSAYYICHQIAEKQLSKEGHHVIGLSG 60
Pyy     MEYETFLKCLDEIRCNNVVKYMETEDLTDFNKKSAAYYICKEIYEKQLSNENGYVVIGLSG 60
Pcc     MEFENFLKCLDEIKSVNNVVKYMETEDLADFNNKSAAYYICKEIHEKQLTNEGYYVVIGLSG 60
      *          * *      ** *** * ***** * **      * *****

Pf      GRTPIDVYKNMCLIKDIKIDKSKLIFFIIDERYKSDDHKFSNYNNIKFLFHNLNINEKEQ 120
Pr      GRTPIDVYKNMCLIKDIKIDKSKLIFFIIDERYKSDDHKFSNYNNIKFLFHNLNINEKEQ 120
Pm      GRTPIDVYKNICLIKDVEIDKSKLIFFIIDERYKSDDHKFSNYKNIKFLFYELRINEKEQ 120
Pk      GKTPIDVYKNMALVKDIKIDTSKLIFFIIDERYKSYDHKFSNYNNIKFLFESLKINEKEQ 120
Pv      GKTPIDVYKNIALVKDIKIDTSKLIFFIIDERYKRDDHKFSNYNNIKFLFESLKINEKEQ 120
Pyy     GKTPIDVYKNMCAIKDIKIDKNLIFFIIDERYKNDDHKFSNYNNIKFLFDELNINKETQ 120
Pcc     GKTPIDVYKNMCAIKDIQIDKNLIFFIIDERYKPDHFKFSNYNNIKFLFDELNINKETQ 120
      * *****      ** ** ********** ***** ***** * ** *

Pf      LYKPDTTKSIIVDCILDYNDKIKIMIEKYKKVDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
Pr      LYKPDTTKSIIDCILDYNDKIKMKIEKYKKVDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
Pm      LFRPDTTKNLVEICIREYNEKIKYMLKYYKIDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
Pk      LYKPDTSMNIVDCVRDYNEKIKNMVKKYKVDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
Pv      LYRPDTSKNIVECVRDYNEKIKNMVKKYTKVDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
Pyy     LYKPDTKKDLVSCIRDYNEQIKSMLEKYKKIDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
Pcc     LYKPDTKKDLVSCIKDYNEQIKSMLEKYKKIDIAILGMGSDFHIAFLPNIFFNYIYMNNY 180
      * ***      * ** ** * ** * ********** *****

```

Pf QNNYIYNEKTLDFINN---DQDNDNLKYLKEYVYFTTTNQFDVRKRITVSLNLLANASSK 237
Pr QNNYIYNEKTLDFINN---DQDNDNLKYLKEYVYFTTTNQFDVRKRITVSLNLLANASSK 237
Pm QNGYIYEDKSIHHMQNNENDNENDSNLLKEYVYFTTTNFDVRKRITVSLDVLGNALSK 240
Pk QNSYIYDESSIKVANSND-TSDNDNLDLLKEYVYFTTTNFDVRKRITVSLDVLGNASSK 239
Pv QNSYIYDESSIKVANSND-TSDNDNLDLLKEYVYFTTTNFDVRKRITVSLDVLGNASSK 239
Pyy QNNYIYEDNETIRSLNAD---NNVNLSSLNEHVYFTTTNFDVRKRITVSLNLLSNSTSK 237
Pcc QNNYIYEDNETIRSLHPD---NNVNLSSLNEHVYFTTTNFDVRKRITVSLNLLSNSTSK 237
** *** * * * * ***** ***** * * *

Pf IFLNLSKDKLDLWKNMLIKSYIEVNYNLYPATYLIDTSCNENVNINNNNNNNKKNKNNY 297
Pr IFLNLSKDKLDLWKNMLIKSYIEVNYNLYPATYLIDTSSNENVNINHNNNNNN---KNNY 294
Pm IFLNLSAEKLDLWKNMLLKSVIDANYNLYPAVYLIDTC----- 278
Pk IFLNLSAEKLDLWKNMLLKSVIDANYNLYPAVYLIEKM----- 277
Pv IFLNLSKDKLDLWKNMLLKSVIDVNYNLYPAVYLIDSM----- 277
Pyy IFLNLTADKLNLLWKNMLNFYVNPNYNLYPAFKVIDSR----- 275
Pcc IFLNLTADKLNLLWKNMLNFYVNPNYNLYPAFKVIDSN----- 275
***** ** ***** * ** ***** *

Pf CYSNTTVISCGYENYTKSIEEYDYSKYALSLSY-SNSL--NKEELLTIIIFGCSGDLAKKK 354
Pr CYSNTTVISCGYENYTKSIEEYDYSKYALSLSY-SNSL--NKEELLTIIIFGCSGDLAKKK 351
Pm ---NTTVITCGYENYTKLQEIYDSNNSISSHTSNF--HKRELLTIIIFGCSGDLAKKK 333
Pk ---NTTVVTCGYANYPQMLEDIYISHNSLSVH-SSSL--NRREFLTIIIFGCSGDLAKKK 331
Pv ---NTTVVTCGYTNPQMLEDIYVSNSLSVH-SPSL--NRRECLTIIIFGCSGDLAKKK 331
Pyy ---NTTVIACGHKNYSKMLEDLVQKDCALSPVSNNNVENKNELLTIVIFGCSGDLAKKK 332
Pcc ---NTTVIACGHKNYSKMLEDLVQKPDTLSPSCDNRVENKNELLTAVIFGCSGDLAKKK 332
**** ** ** * ** * ** *****

Pf IYPALFKLFCNNSLPKDLLIIGFARTVQDFDFFDKIVIYLRCLLCYEDWSISKKDLL 414
Pr IYPAIFKLFKCNNSLPKDLLIIGFARTVQDFDFFDKIVIYLRCLLCYEDWSISKKDLL 411
Pm IYPAIFKLFKCNKLLPKDLLVIGFARTAQDFESFFDKLVIYLRCLLCYEDLSISQKRDLL 393
Pk IYPAIFKLFKCNKHLPKDFLIVGFARTVQSFDSFFDRIVGYLRCLHSYEDLSLSQKRDLL 391
Pv IYPAIFKLFKCNKRLPKDLLIIGFARTVQSFDSFFDKIVGYLRCLHSYEDLSLTQKRDLL 391
Pyy IYPALFKLFCNLLPKNIIIGFARTEQDFESFFNKISYLRKLSNYSYKNSLVFEKAERL 392
Pcc IYPALFKLFCNLLPKNILIIGFARTEQDFESFFNKISVYLRKLSNYSYKNSLVFEKVERL 392
**** ***** *** ***** * * ** *** * * * * *

Pf NGFKNRCRYFVGNYSSESSEFENFNKYLTIIIEEEA----- 449
Pr NGFKNRCRYFVGNYSSESSEFENFNKYLTIIIEEEA----- 446
Pm NSFKNRCRYYIGNYACSESSEFENFNKYLTIEVEQEAH----- 428
Pk NCFKNRCRYYIGDYSSSESFEKFNKYLTQLEREDL----- 426
Pv NCFKNRCRYYIGDYSSSESFERFNKYLTQLERENL----- 426
Pyy NSFKSKCRYFIGNYLSTESFENFDVYITQEERIALGCFGQKNEKHKQVNSTSQFPNNHT 452
Pcc NSFKSKCRYFIGNYLSPESFEKFNVYLTTEEKVALGCCGQKNEKHKQVDATSQSPNNLT 452
* ** *** * * ***** * * *

Pf -----KKKYYATCYKM-----NGSDYNISNNVAEDNISI- 478
Pr -----KKKYYATCYKM-----NGSDYKISNNVEEDNISI- 475
Pm -----SNEY--TCYY-----NIIGEDKSCS- 446
Pk -----VGSNTIWGEEAAWKESFMNTAHSLELHSDPEPCEKGASIAATPVEVHGQDQAP- 478
Pv -----IGTAPTSWAAAAGNASFANDTDKVEHHPDEAILAKGTGAATPGEAPGGANGPA 479
Pyy NTNVTNIDNGCEPPMPNDSPKRCOPYSSSYS-----NTSGNATCPH 493
Pcc NINATNNINNECESPAPDLSLKRCPYSSGYG-----NTSGTNVCPH 493

Pf -----DDEN-----K--TNEYFQMCTPKNCPDNVFSNYPYVINRMLYLALPPHI 523
Pr -----DDEN-----K--TNEYFQMCTPKNCPDNVFSSTYNFPYVINRMLYLALPPHI 520
Pm -----SDLH-----KRGTDNEWSRCPPTDATD-VAHSTANYTYVINRMLYLALPPHI 492
Pk -----SIPMQSNLSHTDDTLQVQSGT-KCPFAINRVLYLALPPHI 518
Pv THGEAHGGAN-----GLSTPMQGGKAVPTDDTSDDEHSGA-NHPFAINRILYLALPPHI 531
Pyy SSHHSVKPSNTGCPYLSSQANTSDNSGCPYISHHIN-KSGNSGCPYTITRMLYLALPPHI 552
Pcc SSYHAVKSNTKCPYLSSHANISVNSGCPYISHHAN-KYGNISGCPYTITRMLYLALPPHI 552
* * *****

Pf FVSTLKNYKKNCLNSKGTDKILLEKPFGNLDLDFKMLSKQILENFNEQQIYRIDHLYLGD 583
Pr FVSTLKNYKKNCLNCKGTDKILLEKPFGNLDLDFKMLSKQILENFNEQQIYRIDHLYLGD 580
Pm FVSTLKNYKKNCLNSKGTDKILLEKPFGNLDLDFKMLSKQILENFNEQHIYRIDHLYLGD 552

Pk FVSTLKNYKKNCLNKNGTDKILLEKPF GKDLQTFKVLSKRILENFNEEHIYRIDHYLGKD 578
 Pv FVSTLKNYKKNQNGNGTDKILLEKPF GKDLQTFKVLSKQILENFNEEHIYRIDHYLGKD 591
 Pyy FVSTLQNYKKYCLNKNRITKILLEKPF GKDLQTFKVLSKQILEAFPEKNIYRIDHYLGKD 612
 Pcc FVSTLENYKKHCLNKNRINKILLEKPF GKDLQTFKVLSKQILEAFPEKNIYRIDHYLGKD 612
 ***** ** * * ***** ** ** ** * * *****

Pf MVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 643
 Pr MVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 640
 Pm MVSGMLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 612
 Pk MVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 638
 Pv MVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 651
 Pyy MVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 672
 Pcc MVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKE TKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHMLQ 672

Pf LLTLITMEDPIDLNDESVKNEKIKILKSIPSIKLEDTIIGQYEKAENFKEDEN-----N 697
 Pr LLTLITMEDPIDLNDESVKNEKIKILKSIPSIKLEDTIIGQYEKAENFKEDEN-----N 694
 Pm LLTLITMEDPIDLSDESVKNEKVKILKCIPIKLEDSTIIGQYIKSNNYQEDNS-----N 666
 Pk LLTLITMENPIDLNDESVKNEKIKILKCIPIKLEDSTIIGQYVKSNDYQEEKNSSTSPSD 698
 Pv LLALITMEDPIDLNDESVKNEKIKILKCIQSIKLDNTIIGQYVKSNEYQEEKNLSAPTS 711
 Pyy LLTLITMEHPTDLDDKSIQNEKIKILKSIAKLEDTVIGQYIKSNDDTNNNS-NISE 731
 Pcc LLTLITMEHPTDLNDKSIQNEKIKILKSIAKLEDTVIGQYIKSNDDTNN-----SE 726
 ** ***** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *

Pf D---DESKKNHSYHDDPHIDKNSITPTFCTCILYINSINWYGVPIIFKSGKGLNKDICEI 754
 Pr D---DESKKNHSYHDDPHIDKNSITPTFCTCILYINSINWYGVPIIFKSGKGLNKDICEI 751
 Pm EDNIDESKRNHSYHDDPHIDANSITPTFCTCILYINSINWYGVPIIFKSGKGLNKDICEI 726
 Pk DQPVDSEKRNHSYHDDPHIDSNSITPTFCTCILYINSINWYGVPIIFKAGKGLNKDICEI 758
 Pv DHPVDSEKRNHSYHDDPHIDSNSITPTFCTCILYINSINWYGVPIIFKAGKGLNKDICEI 771
 Pyy NANIDKSKINHSYHDDPHVDPNSITPTFCTCVLYINSINWYGVPIILKAGKGLNNDICEI 791
 Pcc NGNIDKSKINHSYLDPPHVDNSITPTFCACVLYINSVNWYGVPIIFKAGKALNNDICEI 786
 * ** ***** ** * * ***** * ***** ** ***** * ** * *****

Pf RIQFHNIMGSSDENMNNNEFVILOPVEAIYKMMIKKTGCEEMEEVQLNLTVNE--KNK 812
 Pr RIQFHNIMGSSDENMNNNEFVILOPVEAIYKMMIKKTGCEEMEEVQLNLTVND--KNK 809
 Pm RIQFHNIMGSSDENMYNNEFVILOPVEVIYKMMIKKTGCEEMEEVQLNLTVNE--KNK 784
 Pk RIQFHNIMGSSDESMYNNNEFVILOPVEVIYKMMIKKTGSEEMEEVQLNLTND--KNK 816
 Pv RLQFHNIMGSSDESMYNNNEFVILOPVEVIYKMMIKKTGCEEMEEVQLNLTVNH--KNK 829
 Pyy KIQFHNIMGSSDESMYNNNEFVILOPVEGIYKLMIKKMGSEEMEEVQLNLSLNE--NNN 849
 Pcc KIQFHNIMGSSDESMYNNNEFVILOPVEGIYKLMIKKMGSEEMEEVQLNLSLNENNNNN 846
 ***** * ***** ** * * ***** * ***** * ***** *

Pf KINVPEAYETLLECFKGHKKKFISDEELYESWRIFTPLKELQEKQVKPLKYSFGSSGP 872
 Pr KINVPEAYETLLECFKGHKKKFISDEELYESWRIFTPLKELQEKQVKPLKYSFGSSGP 869
 Pm KANVPEAYETLLECFKGKFKKKFISDEELYESWRIFTPLNELQEKQIKPLKYPFGSSGP 844
 Pk KNYVPEAYETLLECFKGFKKKFISDEELYESWRIFTPLNELQEKQVQPLKYPFGSSGP 876
 Pv KNYVPEAYETLLECFRFGFKKKFISDEELYESWRIFTPLNELQEKKVQPLKYPFGSSGP 889
 Pyy KAYVPEAYETLLECYKGYKRKFISDEELYESWRIFTPLNELQEKHVKPLSYFPFGSSGP 909
 Pcc KPYVPEAYETLLECYKGYKRKFISDEELYESWRIFTPLNELQEKNIKPLSYFPFGSSGP 906
 * ***** ** * * ***** ***** ***** ** * *****

Pf KEVFLVKYYNYGKNYTHRPEFVRKSSFYEDDLLDIN----- 910
 Pr KEVFLVKYYNYGKNYTHRPEFVRKSSFYEDDLLDIN----- 907
 Pm KEVFDLVKYYNYGKNYTNTPEFVRKSSYEDNLLDINWEKKCLKTS 891
 Pk KEVYDLVKYYNYGKNYANTPAFVRKSSFYEDDLLDIN----- 914
 Pv KEVYDLVKYYNYGKNYANTPAFVRKSSFYEDDLLDIN----- 927
 Pyy QEAYDLVRKYYNYGKNYDTTAKFCRKSSYDDSLFDNMRE----- 949
 Pcc QEAYDLIKYYNYGKNYETTAKFCRKSSYDDSLFDNMRG----- 946
 * * ***** * **** * * *

Fig. S4. Results of the sequence homology model obtained for the range of residues 335-910 of *Pf*G6PD–6PGL using hG6PD (PDB ID 2BHL) as template.

Model Quality Estimation

Within the framework of the SWISSMODEL homology modeling tool, the global and per-residue quality are assessed using the QMEAN scoring function [10, 11]. It was developed to provide a protein size-independent measure of the absolute quality of a protein structure model. It estimates the 'degree of nativeness' of the structural features observed in a model, indicating whether the model is of comparable quality to experimental structures.

The QMEAN4 scoring function consists of a linear combination of four structural descriptors:

- i) a distance-dependent interaction potential of all atom types of residues (All-atom),
- ii) a distance-dependent mean force potential based on the C β atoms of residues (CBeta),
- iii) a solvation potential that describes the burial status of residues (Solvation), and
- iv) a torsion angle potential over three consecutive amino acids (Torsion).

In order to correct for the dependence of these statistical potentials with protein size, they are normalized by the total number of interactions (i and ii), and by the number of residues (iii and iv).

The QMEAN4 score has been found to be constant over a wide range of protein sizes, but the variance of the distribution depends on protein size. Accordingly, the quality of a protein model can be estimated through comparison with a non-redundant set of high-resolution structures using a QMEAN4 Z-score. For a given model, this is determined from the normalized QMEAN4 score by subtracting the average normalized QMEAN4 and divided by the standard deviation of the observed distribution.

The QMEAN6 scoring function, besides the previous descriptors, takes into account the contribution of

- v) the agreement between predicted and calculated secondary structure (SS Agree), and
- vi) the agreement between predicted and calculated solvent accessibility (ACC Agree).

It has been reported that QMEAN6 score performs significantly better than QMEAN4 to estimate the quality of predicted structures.

For our purposes here, we provide

- 1) the alignment of the query (*Pf*) and target (human; PDB ID 2BHL) protein sequences,
- 2) the local (per-residue) quality estimate,
- 3) the QMEAN4 Z-score and the comparison with the set of non-redundant PDB structures, and
- 4) the QMEAN6 Z-score and the comparison with the set of non-redundant PDB structures.

1) Alignment of protein sequences

```

Pf    KEELLTIIIFGCSGDLAKKKIYPALFKLFCNNSLPKDLLIIGFARTVQDFDTFFDKIVIIYLKRCLLCYEDWSISKKKDLL
2BHL  -SDTHIFIIMGASGDLAKKKIYPTIWVWLFRDGLLPENTFIVGYARSRLTVADIRKQSEPFKATP-----EKLKLL

Pf    NGFKNRCRYFVGNYSSESFENFNKYLTTEIEEEAKKKYATCYKMNGSDYNISSNVAEDNISIDENKTNEYFQMCTPK
2BHL  EDFFARNSYVAGQYDDAASYQRLNSHMNALHLG-----

Pf    NCPDNVFSNNYFPYVINRMLYLALPPHIFVSTLKNYKKNCLNSKGTDKILLEKPFGNLDLDSFKMLSKQILENFNEQQIY
2BHL  -----SQANRLFYLALPPTVYEAVTKNIHESCMSQIGWNRIVEKPFGRDLQSSDRLSNHISSLFREDQIY

Pf    RIDHYLGKDMVSGLLKLFNTFLLSLMNRHFICIKITLKETKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHLQLLTLITMEDPI
2BHL  RIDHYLGKEMVQNLMLVLRFANRIFGPIWNRDNIACVILTFKEPFGTEGRGGYFDEFGIIRDVMQNHLQLMLCLVAMEKPA

Pf    DLNDESVKNEKIKILKSIPSIKLEDTIIGQYKAENFKEDENNDDESK-KNHSYHDDPHIDKNSITPTFTCTCILYINSIN
2BHL  STNSDDVRDEKVKVLCISEVQANNVVLGQYVGNPDG-----EGEATKGYLDDPTVPRGSTTATFAAVVLYVENER

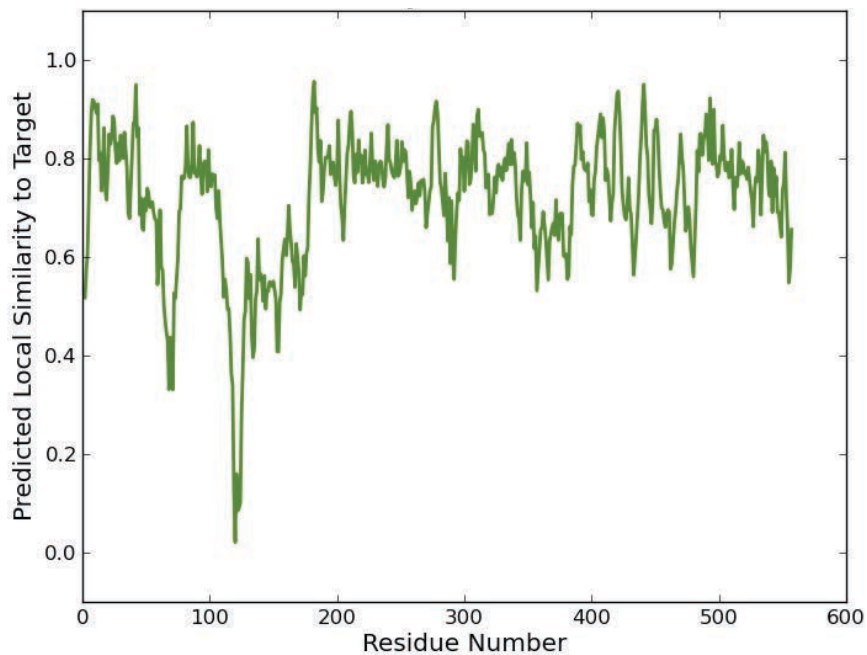
Pf    WYGVPIIFKSGKGLNKDICEIRIQFHNIMGSSD-ENMNNNEFVILIQPVEAIYKMMIKKTGCE-EMEEVQLNLTVNEKN
2BHL  WDGVPFILRCGKALNERKAEVRLQFHDVAGDIFHQCKRNELVIRVQPNEAVYTKMMTKKPGMFFNPEESELDLTYGNRY

Pf    KKINVPEAYETLLECFKGHKKKFISDEELYESWRIFTPLLQELQEKQVKPLKYSFGSSGPKVEFGLVKKYNYGKNYTH
2BHL  KNVKLPDAYERLILDVFCGSQMHFVRSDELREAWRIFTPLLHQIELEKPKPIPYIYGSRGPTADELMKRV---GFQYEG

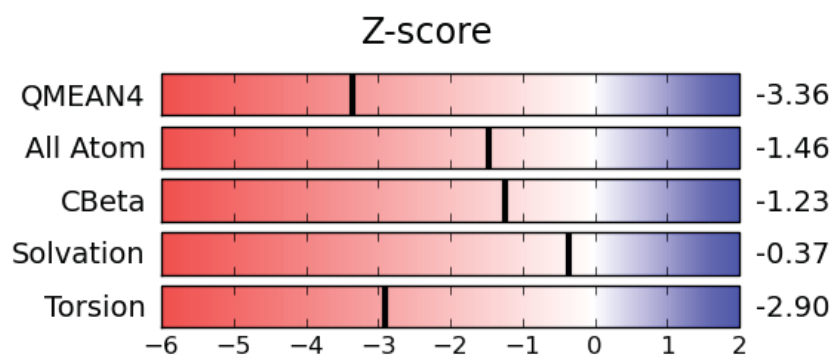
Pf    RPEFVRKSSFYEDDLLDIN
2BHL  TYKVVNPHK-----

```

2) Local Quality Estimate to Target

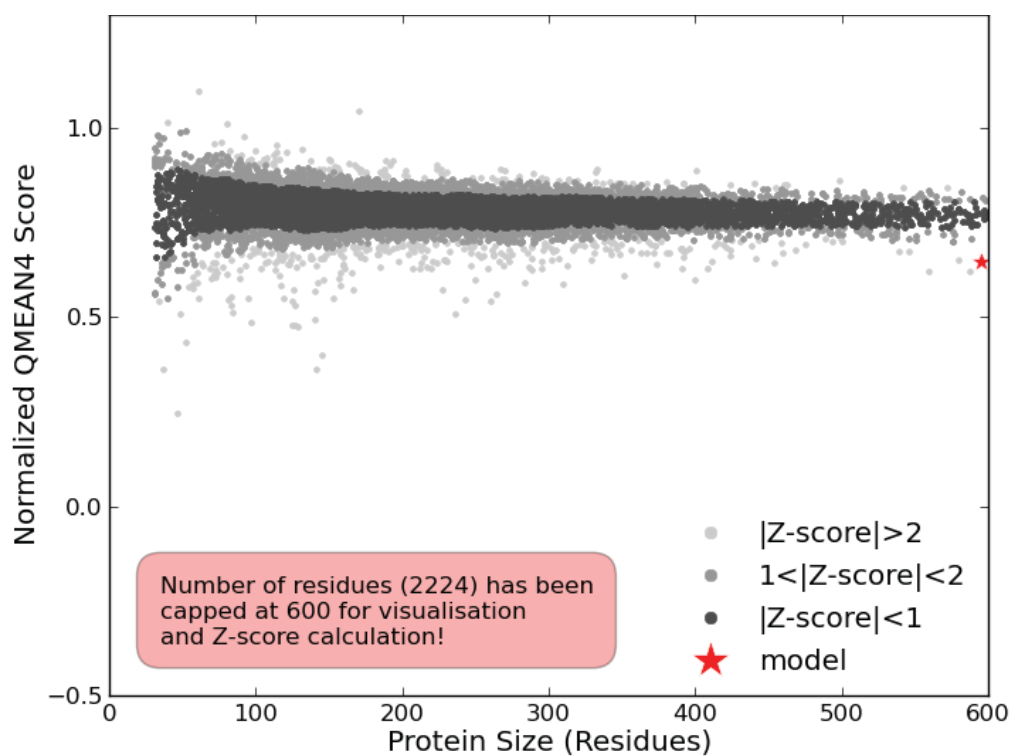


3) QMEAN4 Z-score: -3.36

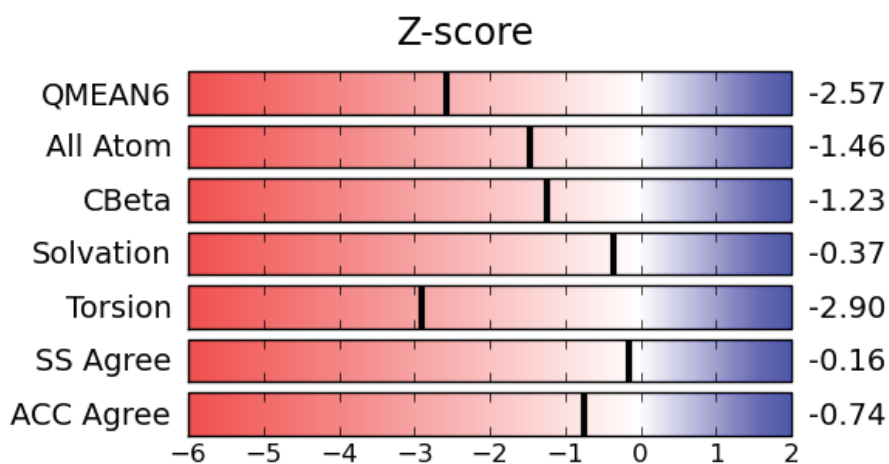


Comparison with non-redundant set of PDB structures

Normalized QMEAN4 Z-score: 0.65



4) QMEAN6 Z-score: -1.38



Comparison with non-redundant set of PDB structures

Normalized QMEAN6 Z-score: 0.65



Fig. S5. Results of the sequence homology model obtained for the range of residues 335-910 of *Pf*G6PD-6PGL (without stretches 400-408, 448-508, and 692-700) using hG6PD (PDB ID 2BHL) as template. See legend to Fig. S4 for details of the QMEAN score.

1) Alignment of protein sequences

```

Pf      KEELLTIIIFGCSGDLAKKKIYPALFKLFCNNSLPKDLLIIGFARTVQDFDTFFDKIIVIYLKRCLKKKDLLNGFKNRCRY
2BHL   -SDTHIFIIMGASGDLAKKKIYPTIWVWVFRDGLLPENTFIVGYARSRLTVADIRKQSEPFKATPEEKLKLEDFFARNRY

Pf      FVGNYSSESSEFENFNKYLTTIEEEYVINRMLYLALPPHIFVSTLKNYKKNCLNSKGTDKILLEKPFGNLDLDSFKMLSKQI
2BHL   VAGQYDDAASYQRLNSHMNALHLGSQANRLFYLALPPTVYEAVTKNIHESCMSQIGWNRIVEKPFGRDLQSSDRLSNHI

Pf      LENFNEQQIYRIDHYLGKDMVSGLLKLFNTNTFLLSLMNRHFIKCIKITLKETKGVYGRGQYFDPYGIIRDVMQNHLQL
2BHL   SSLFREDQIYRIDHYLGKEMVQNLMLVLRFANRIFGPIWNRDNIACVILTFKEPFGTEGRGGYFDEFGIIRDVMQNHLQLM

Pf      LTLITMEDPIDLNDESVKNEKIKILKSIPSIKLEDTIIGQYEKAENFSK-KNHSYHDDPHIDKNSITPTFCTCILYINSI
2BHL   LCLVAMEKPASTNSDDVRDEKVKVLKCISEVQANNVVLGQYVGNPDGEGEATKGYLDDPTVPRGSTTATFAAVVLYVENE

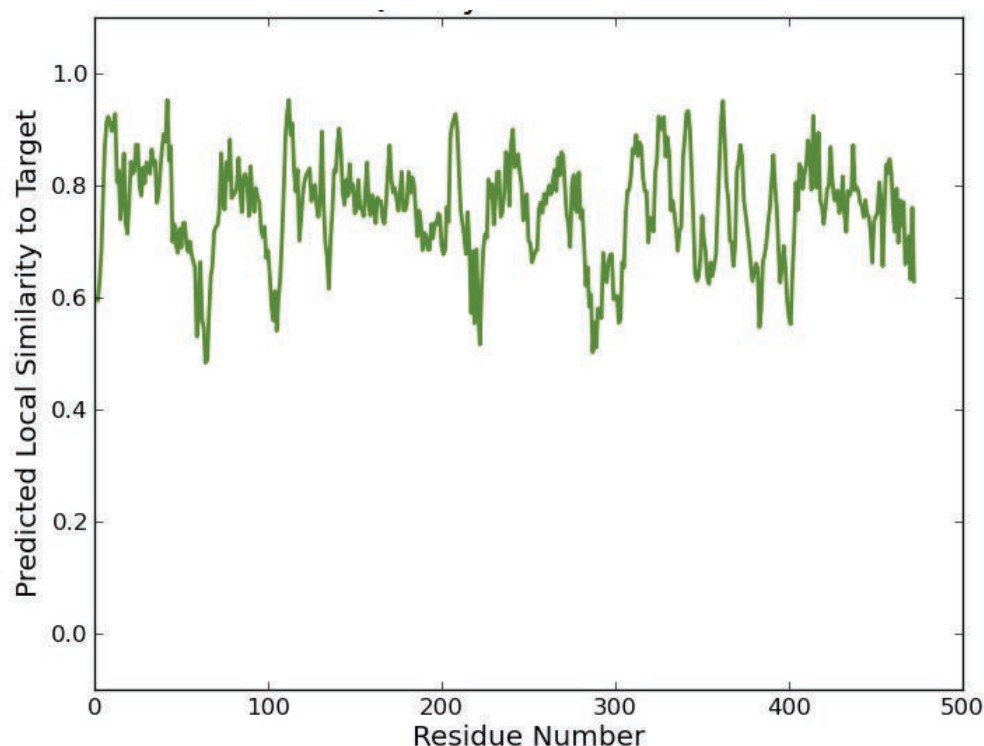
Pf      NWYGVPIIFKSGKGLNKDICEIRIQFHNIMGSS-DENMNNNEFVILQPVAEIYLKMMIKKTGCE-EMEEVQLNLTVNEK
2BHL   RWDGVPFILRCGKALNERKAEVRLQFHDVAGDIFHQQCKRNLVIRVQPNEAVYTKMMTKKPGMFFNPEESELDLTYGNR

Pf      NKKINVPEAYETLLECFKGHKKKFISDEELYESWRIFTPLLQELQEKQVKPLKYSFGSSGPKVEFGLVKKYNY-GKNY
2BHL   YKNVKLPDAYERLILDVFCGSQMHFVRSDELREAWRIFTPLLHQIELEKPKPIPIYIYGSRGPTAEDELMKRVGFQYEGTY

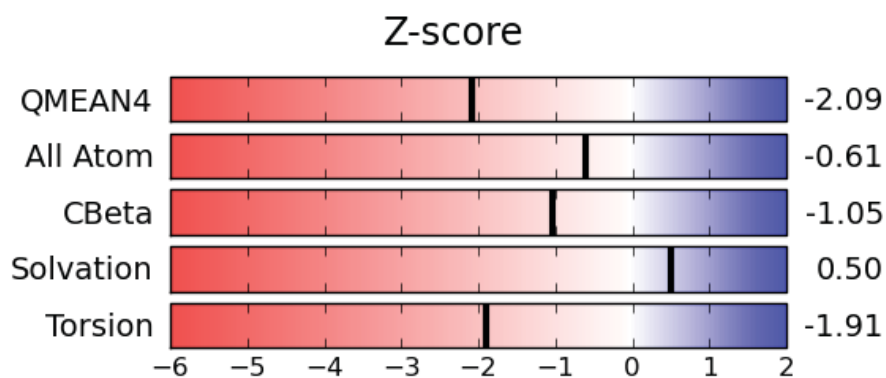
Pf      THRPEFVRKSSFYEDDLLDIN
2BHL   KWN-----

```

2) Local Quality Estimate to Target

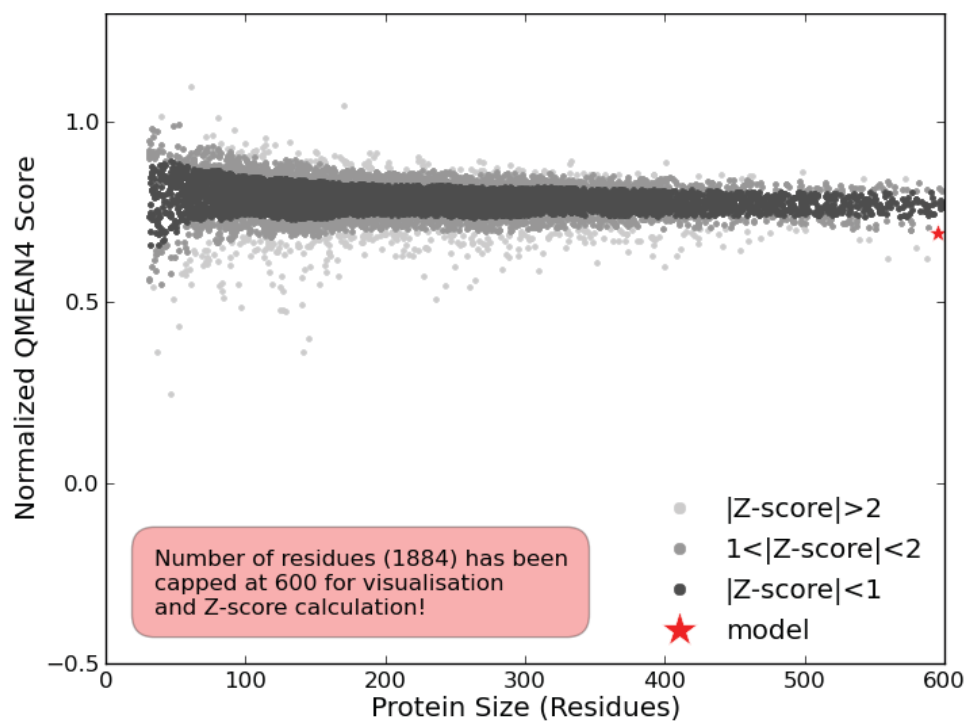


3) QMEAN4 Z-score: -2.09

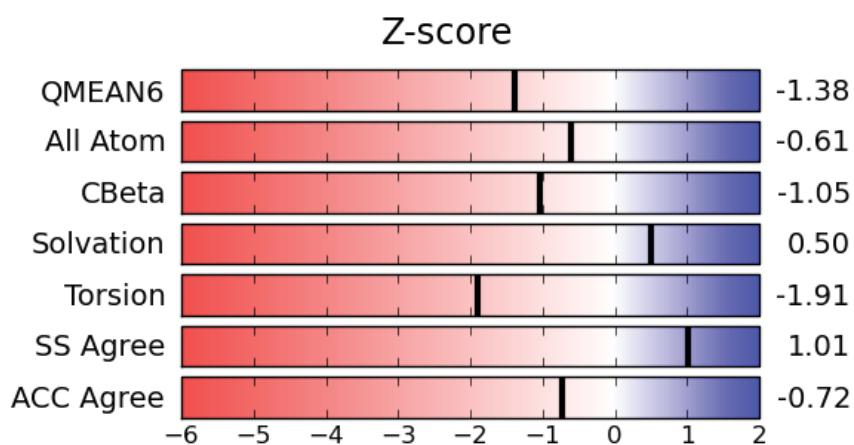


Comparison with non-redundant set of PDB structures

Normalized QMEAN4 Z-score: 0.74



4) QMEAN6 Z-score: -1.38



Comparison with non-redundant set of PDB structures

Normalized QMEAN6 Z-score: 0.76

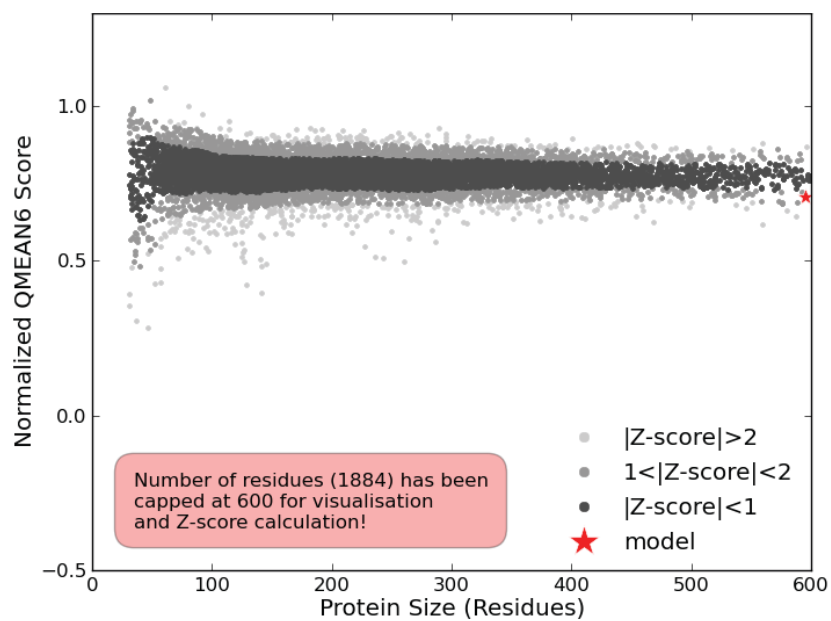
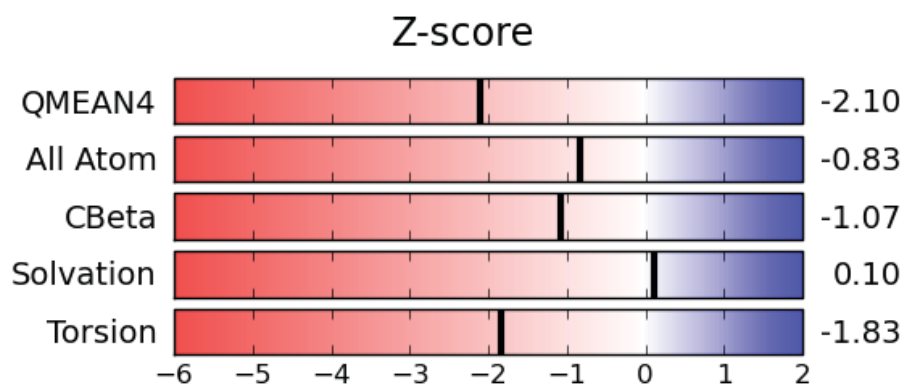


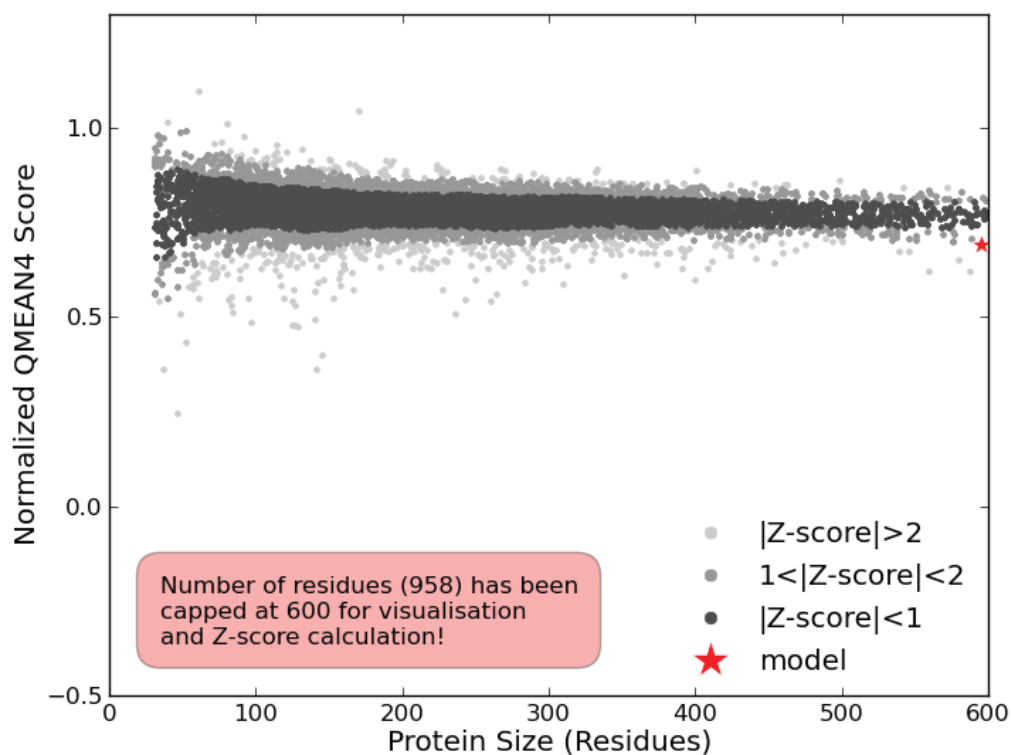
Fig. S6. Results of the QMEAN Z-score analysis performed for the human G6PD enzyme (PDB ID 2BHL) as template. See legend to Fig. S4 for details of the QMEAN score.

1) QMEAN4 Z-score: -2.10

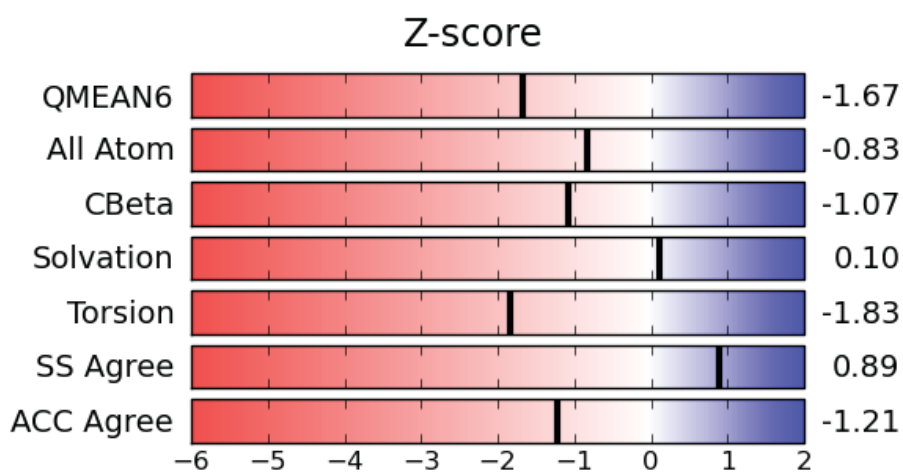


Comparison with non-redundant set of PDB structures

Normalized QMEAN4 Z-score: 0.69



2) QMEAN6 Z-score: -1.67



Comparison with non-redundant set of PDB structures

Normalized QMEAN6 Z-score: 0.70

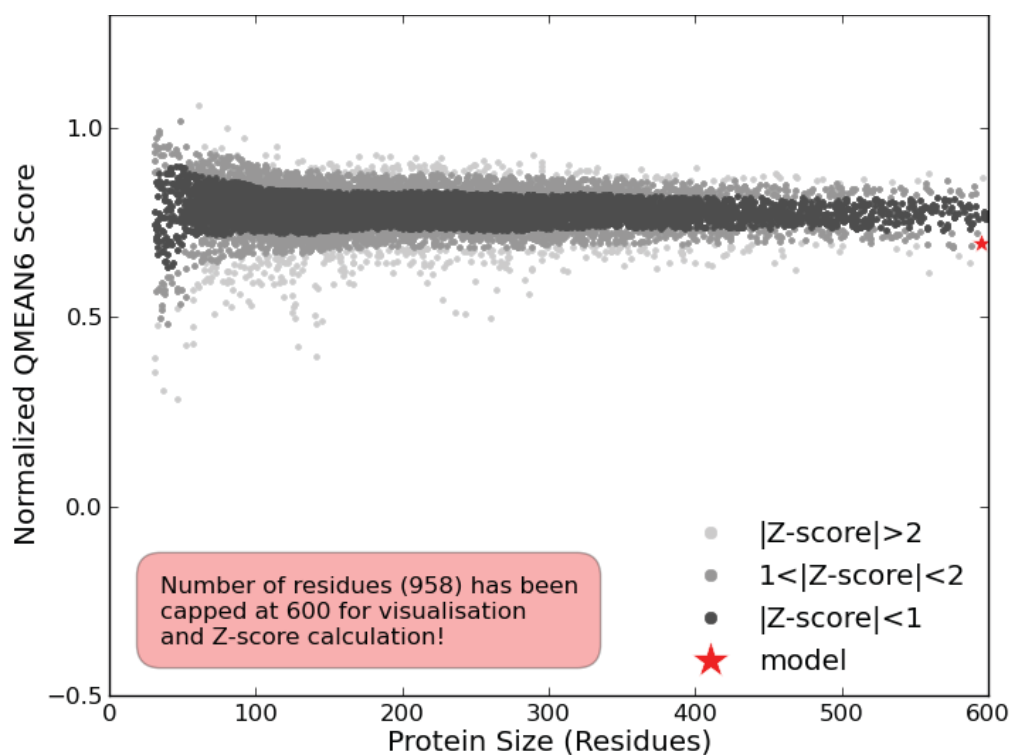
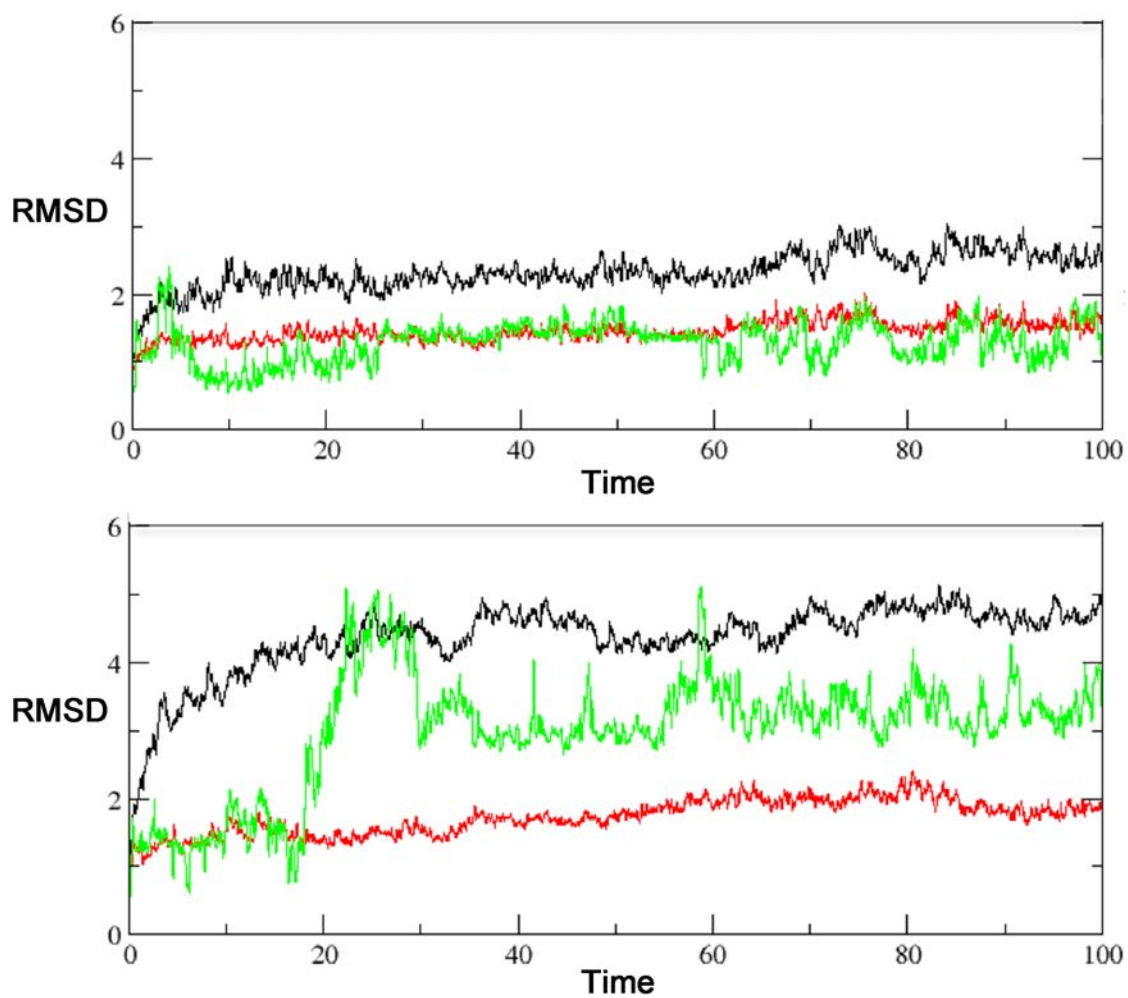


Fig. S7. Representation of the time evolution (ns) of the root-mean square deviation (RMSD; Å) along the MD simulations run for the G6P complexes with (top) hG6PD (simulated from the PDB ID 2BHL), and (bottom) *Pf*G6PD (from homology modeling). RMSD determined for the backbone atoms (black), residues in the substrate binding site (red), and G6P (green).

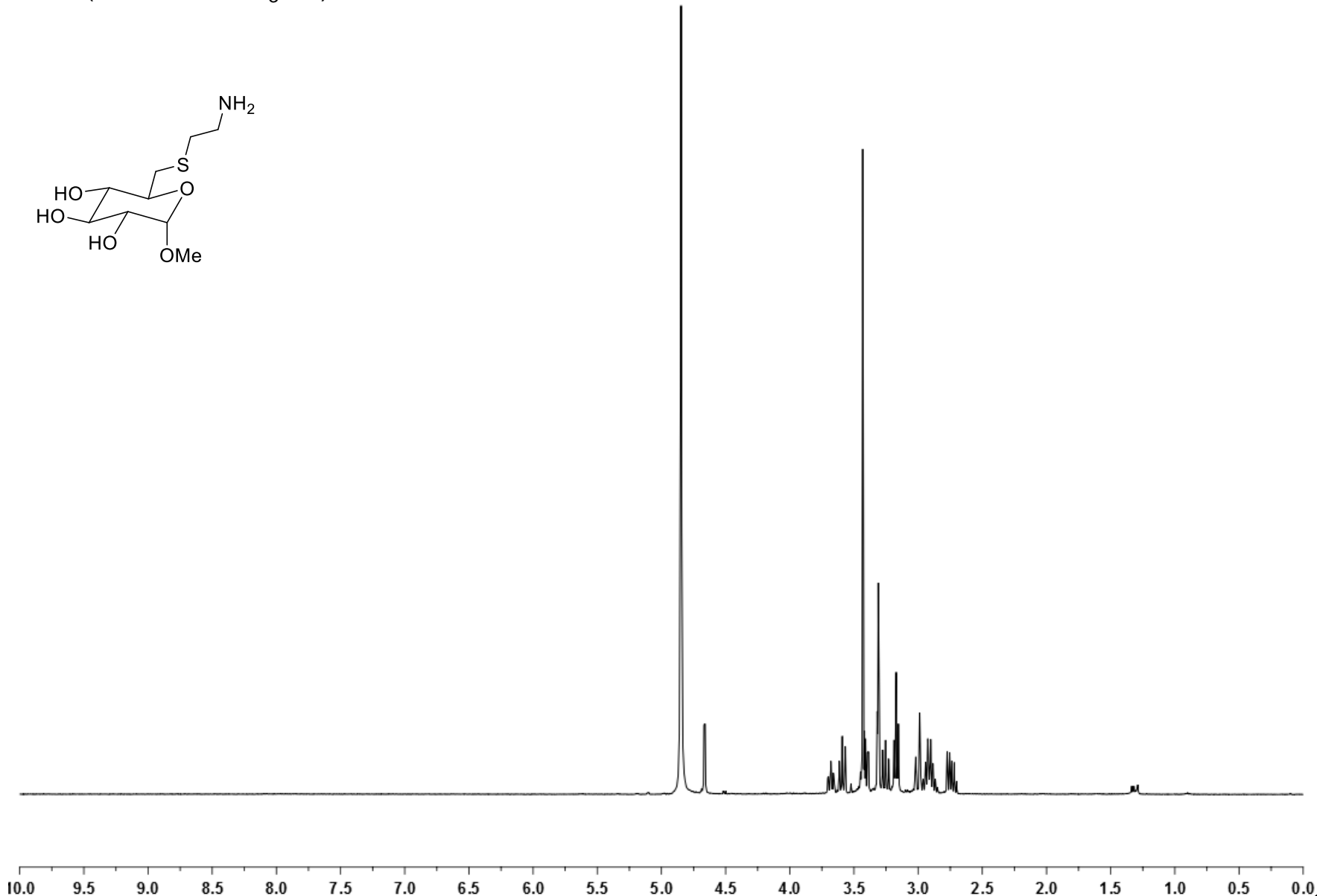
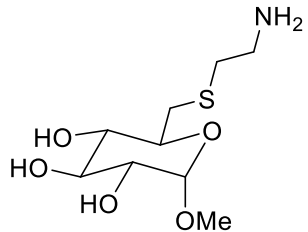


References

- [1] Au, S. W.; Gover, S.; Lam, V. M.; Adams, M. J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: The crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* **2000**, *15*, 293–303.
- [2] Kotaka, M.; Gover, S.; Vandeputte-Rutten, L.; Au, S. W.; Lam, V. M.; Adams, M. J. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 495–504.
- [3] Ranzani, A. T.; Cordeiro, A. T. Mutations in the tetramer interface of human glucose-6-phosphate dehydrogenase reveals kinetic differences between oligomeric states. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 1278–1284.
- [4] Baugh, L.; Phan, I.; Begley, D. W.; Clifton, M. C.; Armour, B.; Franow, D. M.; Taylor, B. M.; Muruthi, M. M.; Abendroth, J.; Fairman, J. W.; Fox, D., 3rd; Dieterich, S. H.; Staker, B. L.; Gardberg, A. S.; Choi, R.; Hewitt, S. N.; Napuli, A. J.; Myers, J.; Barrett, L. K.; Zhang, Y.; Ferrell, M.; Mundt, E.; Thompkins, K.; Tran, N.; Lyons-Abbott, S.; Abramov, A.; Sekar, A.; Serbzhinskly, D.; Lorimer, D.; Buchko, G. W.; Stacy, R.; Stewart, L. J.; Edwards, T. E.; Van Voorhis, W. C.; Myler, P. J. Increasing the structural coverage of tuberculosis drug targets. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 142–148.
- [5] Mercaldi, G. F.; Dawson, A.; Hunter, W. N.; Cordeiro, A. T. The structure of a *Trypanosoma cruzi* glucose-6-phosphate dehydrogenase reveals differences from the mammalian enzyme. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 2776–2786.
- [6] Rowland, P.; Basak, A. K.; Gover, S.; Levy, H. R.; Adams, M. J. The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure* **1994**, *15*, 1073–1087.
- [7] Cosgrove, M. S.; Naylor, C.; Paludan, S.; Adams, M. J.; Levy, H. R. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2759–2767.
- [8] Cosgrove, M. S.; Gover, S.; Naylor, C. E.; Vandeputte-Rutten, L.; Adams, M. J.; Levy, H. R. An examination of the role of Asp-177 in the His-Asp catalytic dyad of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: X-ray structure and pH dependence of kinetic parameters of the D177N mutant enzyme. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15002–15011.
- [9] Naylor, C. E.; Gover, S.; Basak, A. K.; Cosgrove, M. S.; Levy, H. R.; Adams, M. J. NADP⁺ and NAD⁺ binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: Different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 635–648.
- [10] Benkert, P.; Tosatto, S.C.E.; Schomburg, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins* **2008**, *71*, 261–277.
- [11] Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 343–350.

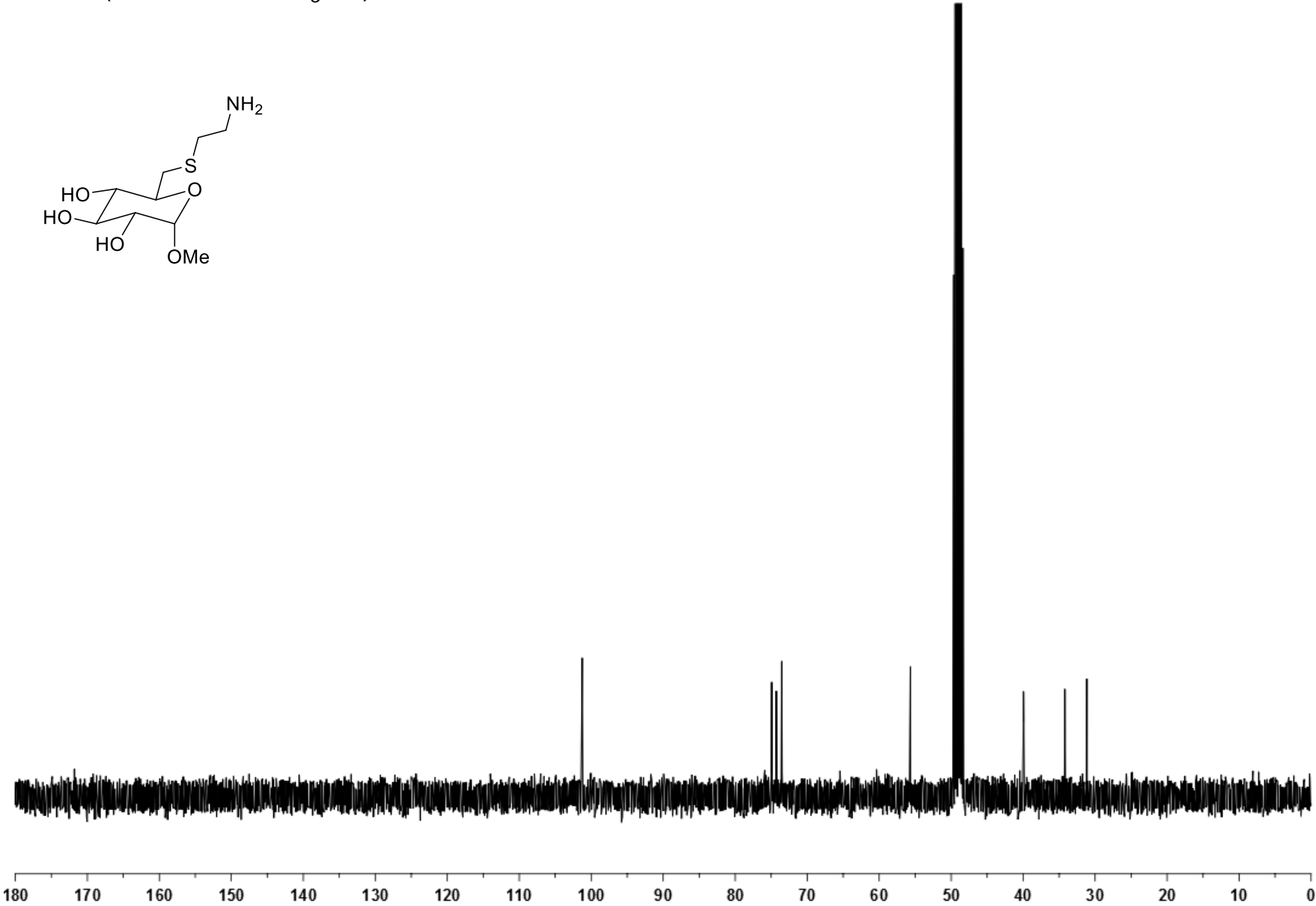
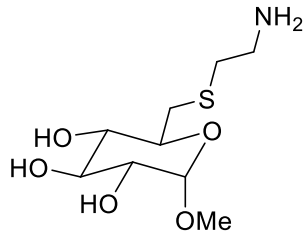
Methyl 6-[(2-aminoethyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**2**)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



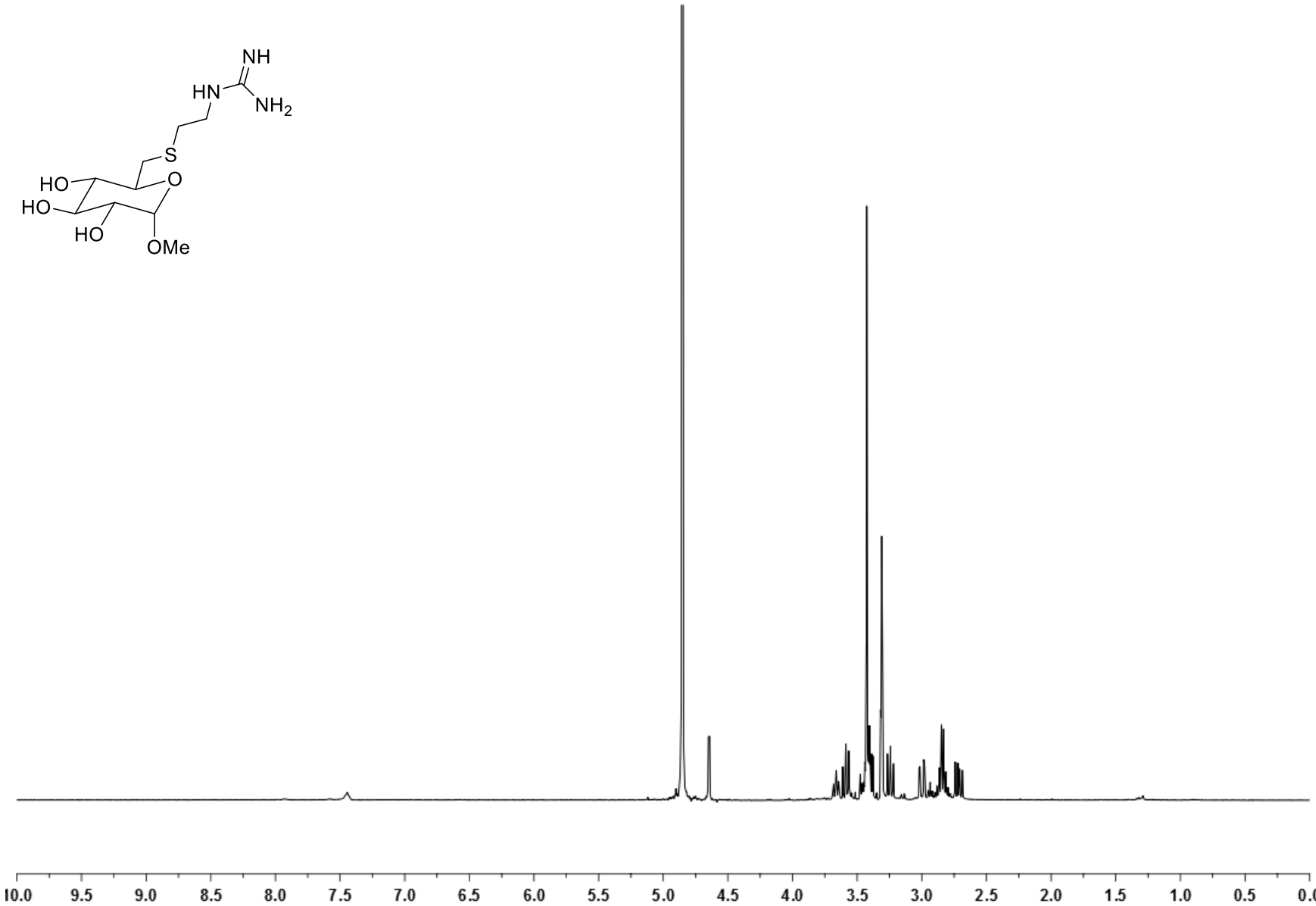
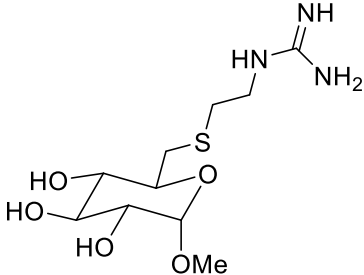
Methyl 6-[(2-aminoethyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (2)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



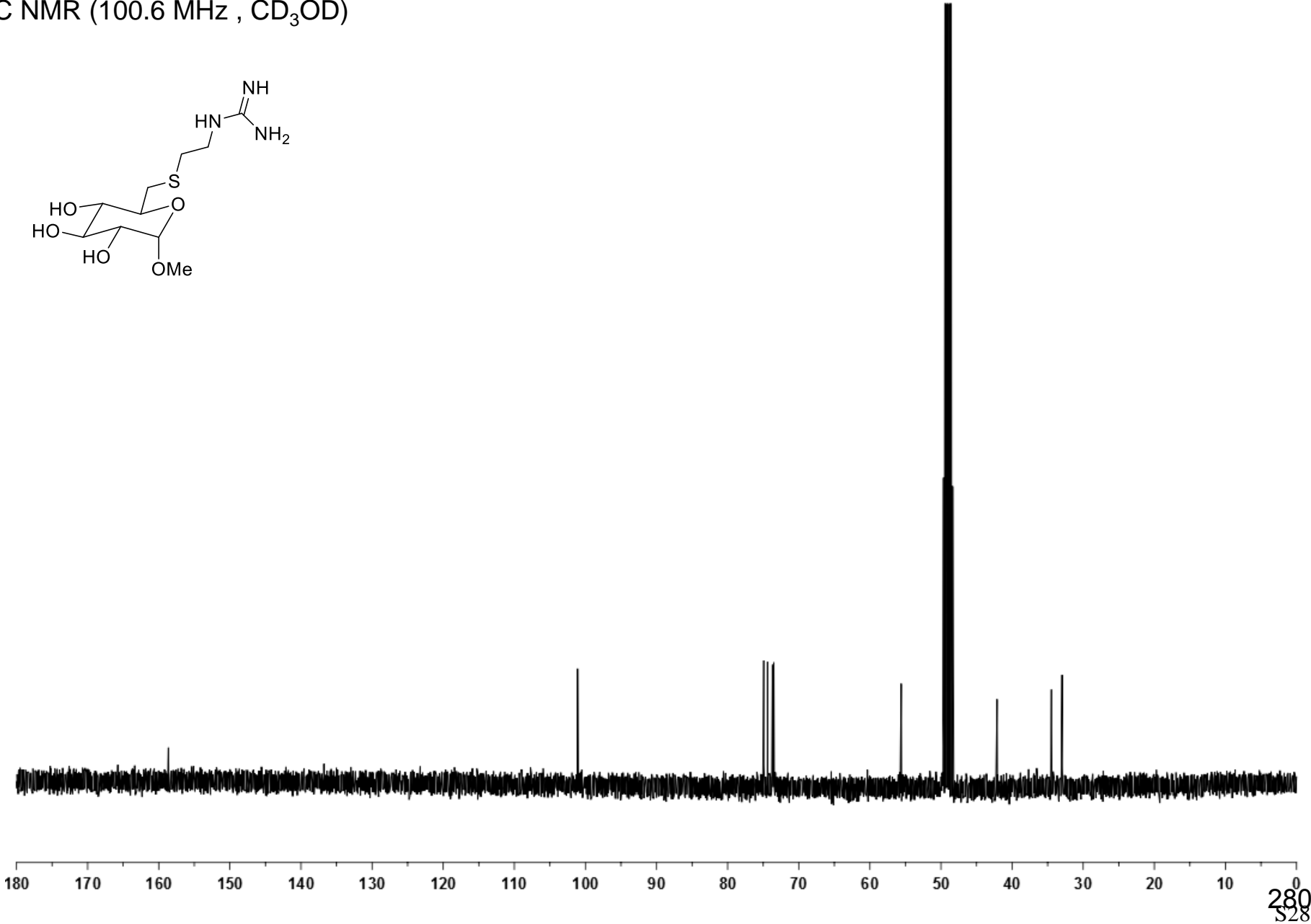
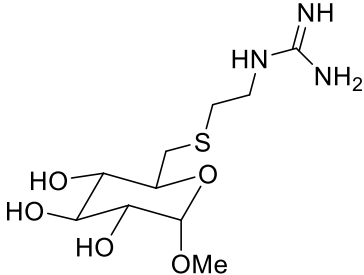
Methyl 6-deoxy-6-[(2-guanidinoethyl)thio]- α -D-glucopyranoside (3)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



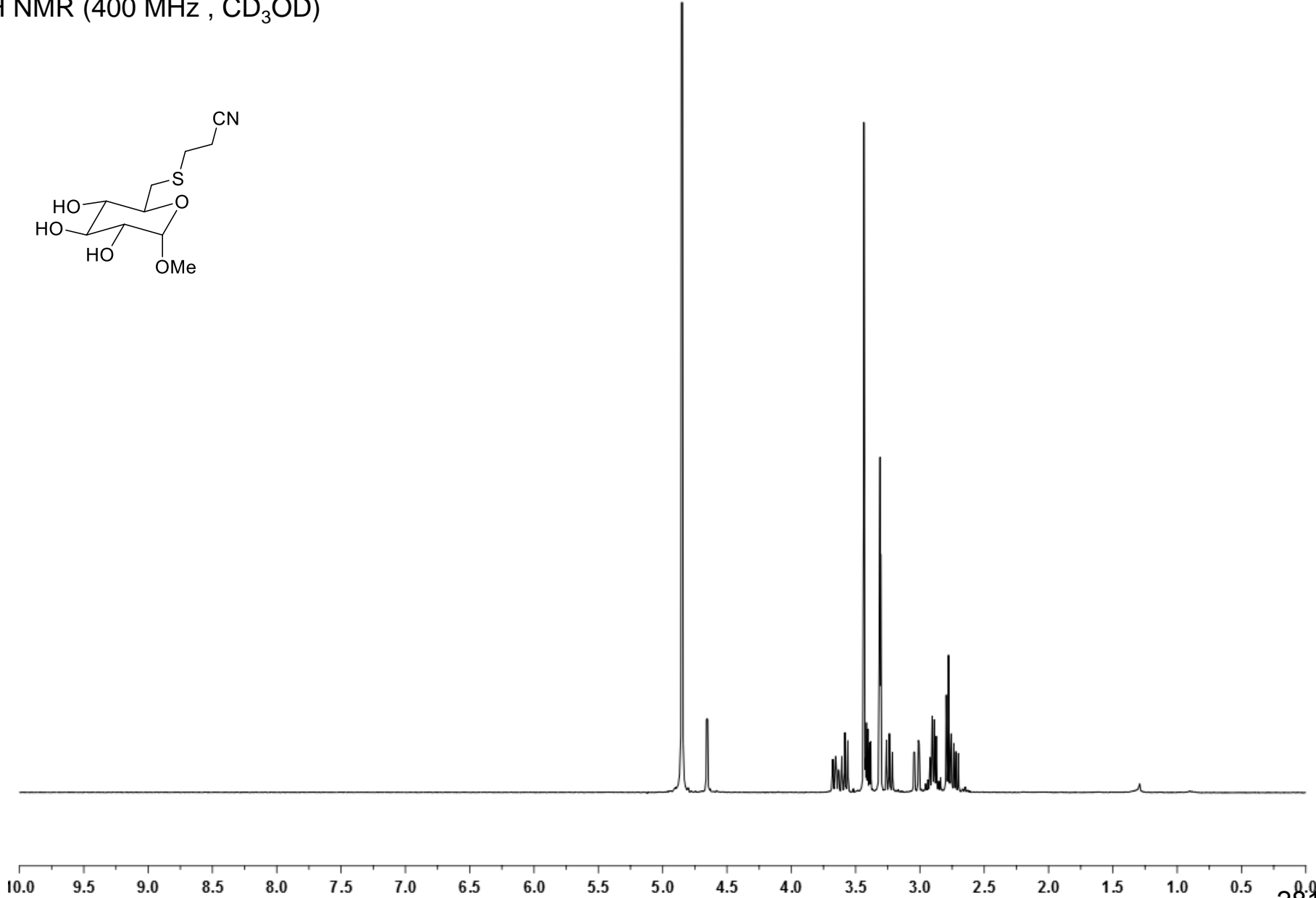
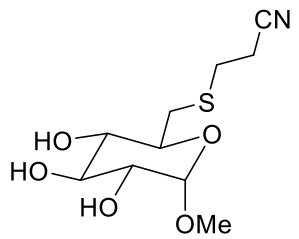
Methyl 6-deoxy-6-[(2-guanidinoethyl)thio]- α -D-glucopyranoside (3)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



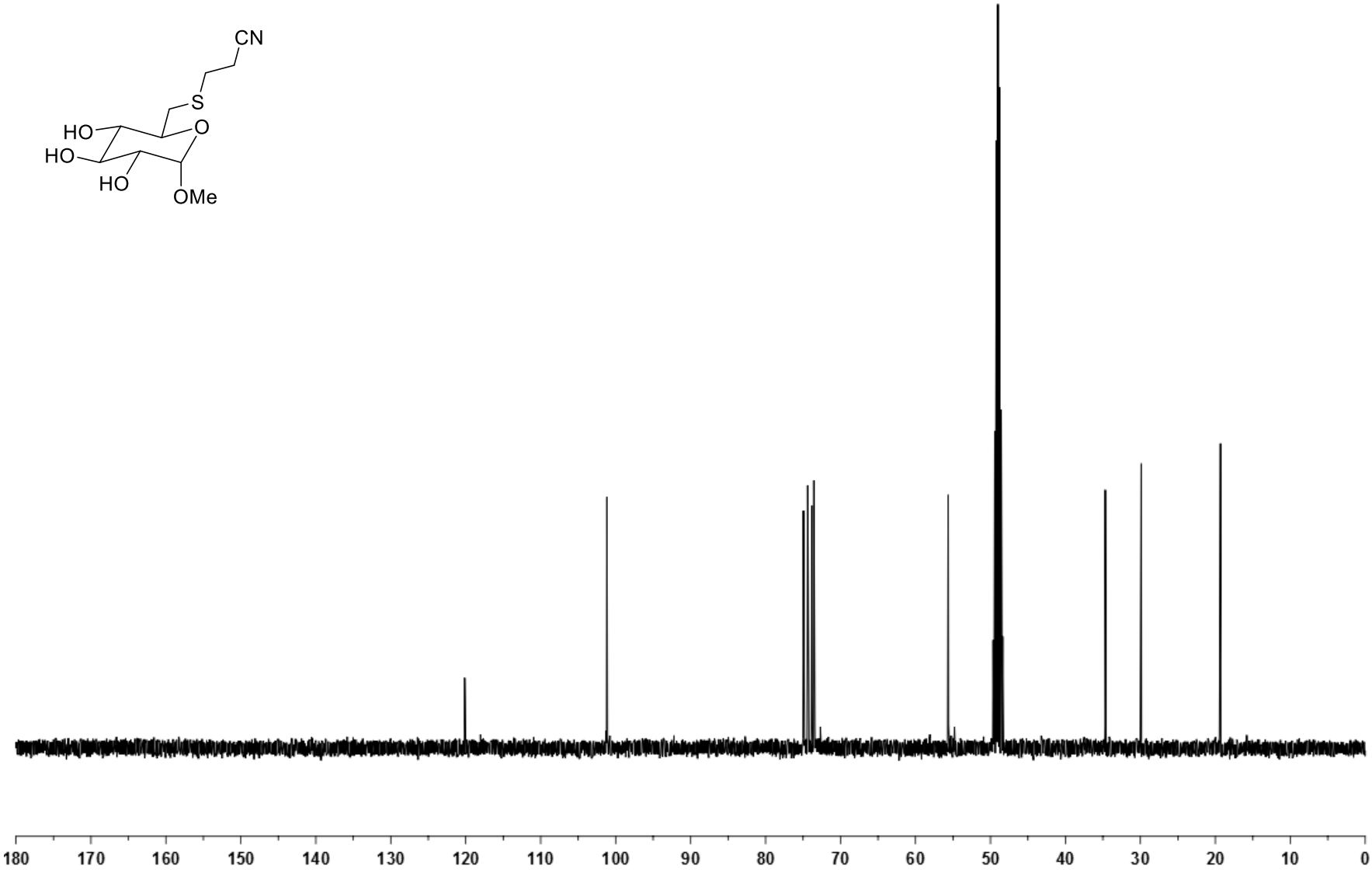
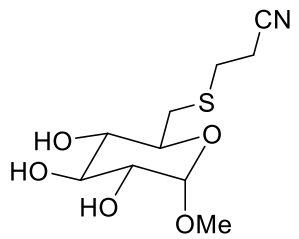
Methyl 6-[(2-cyanoethyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (4)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



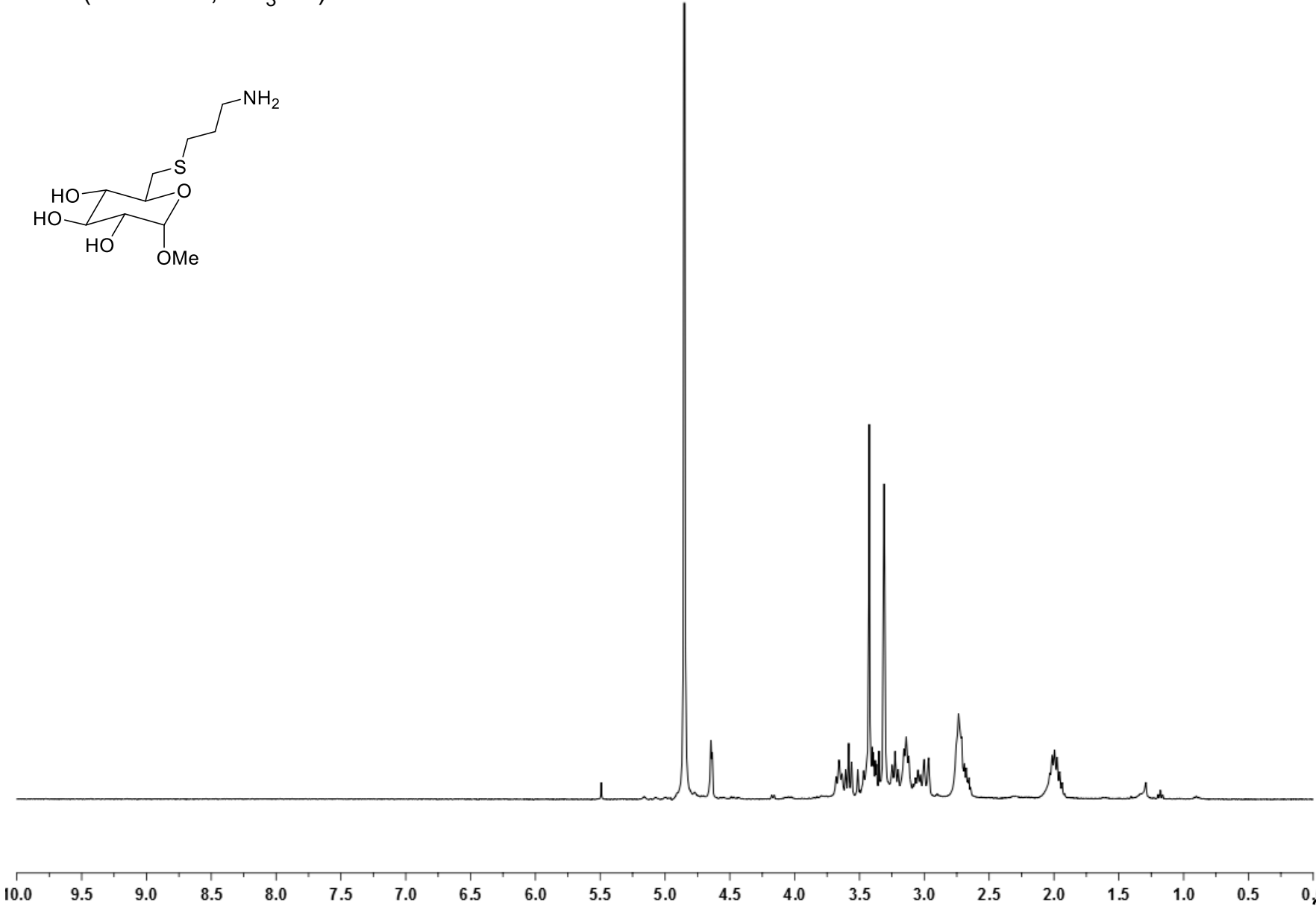
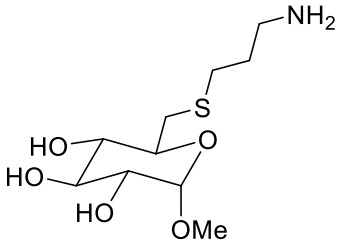
Methyl 6-[(2-cyanoethyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (4)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



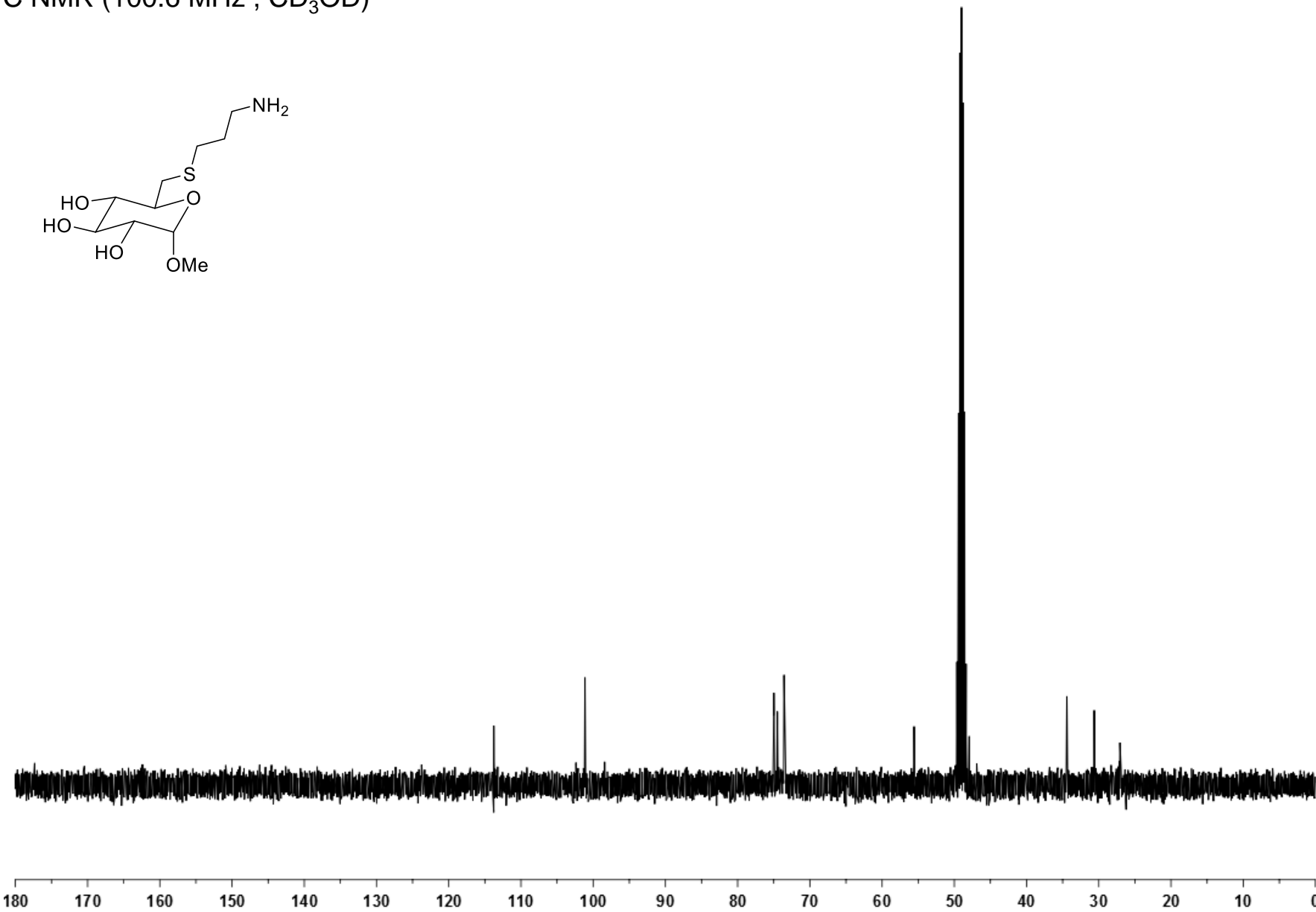
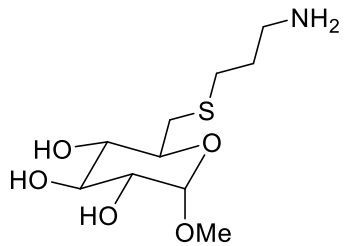
Methyl 6-[(3-aminopropyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (5)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



Methyl 6-[(3-aminopropyl)thio]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (**5**)

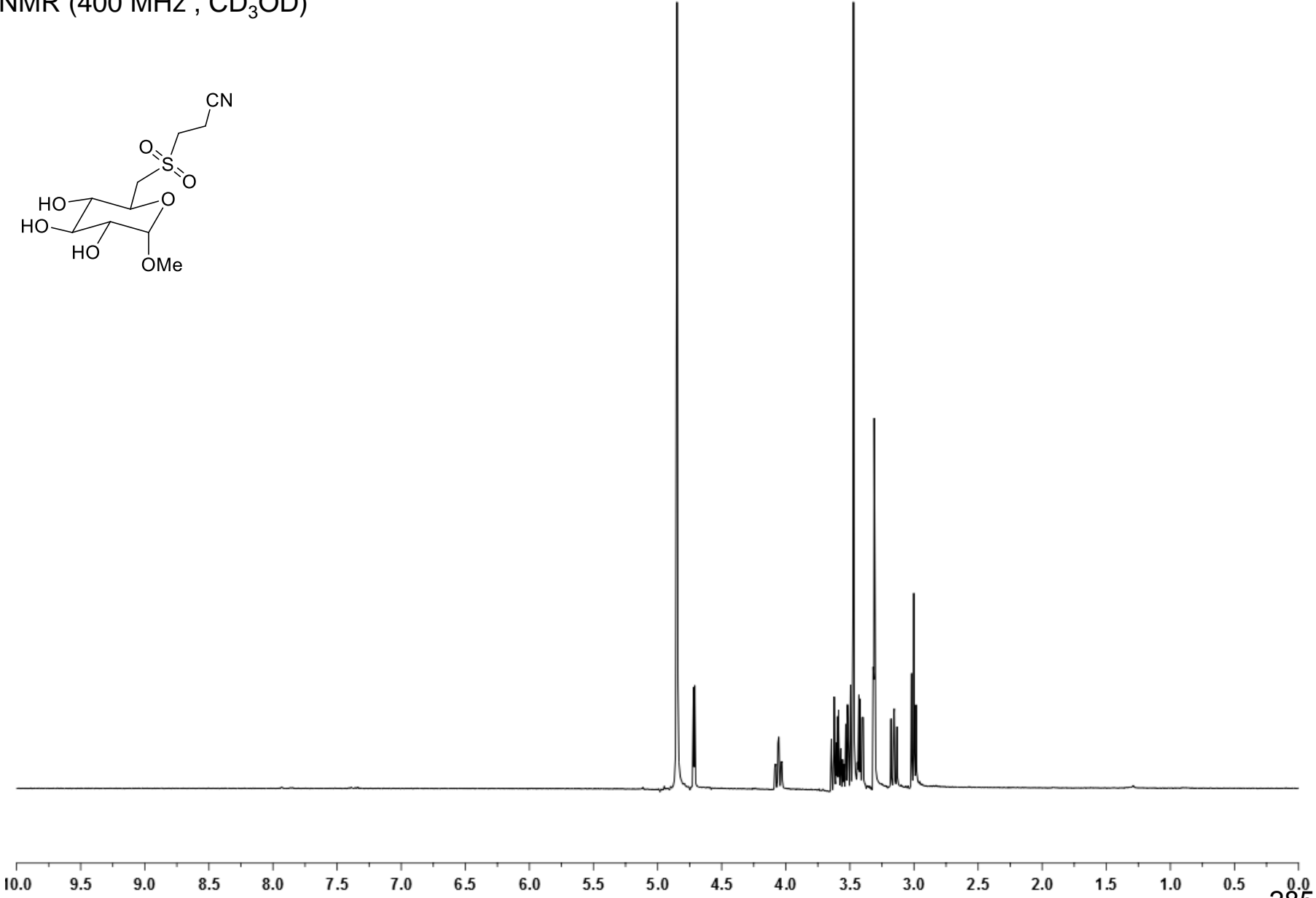
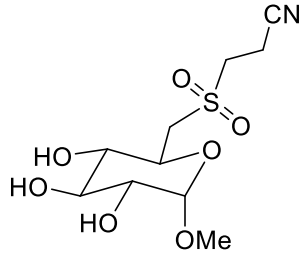
^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

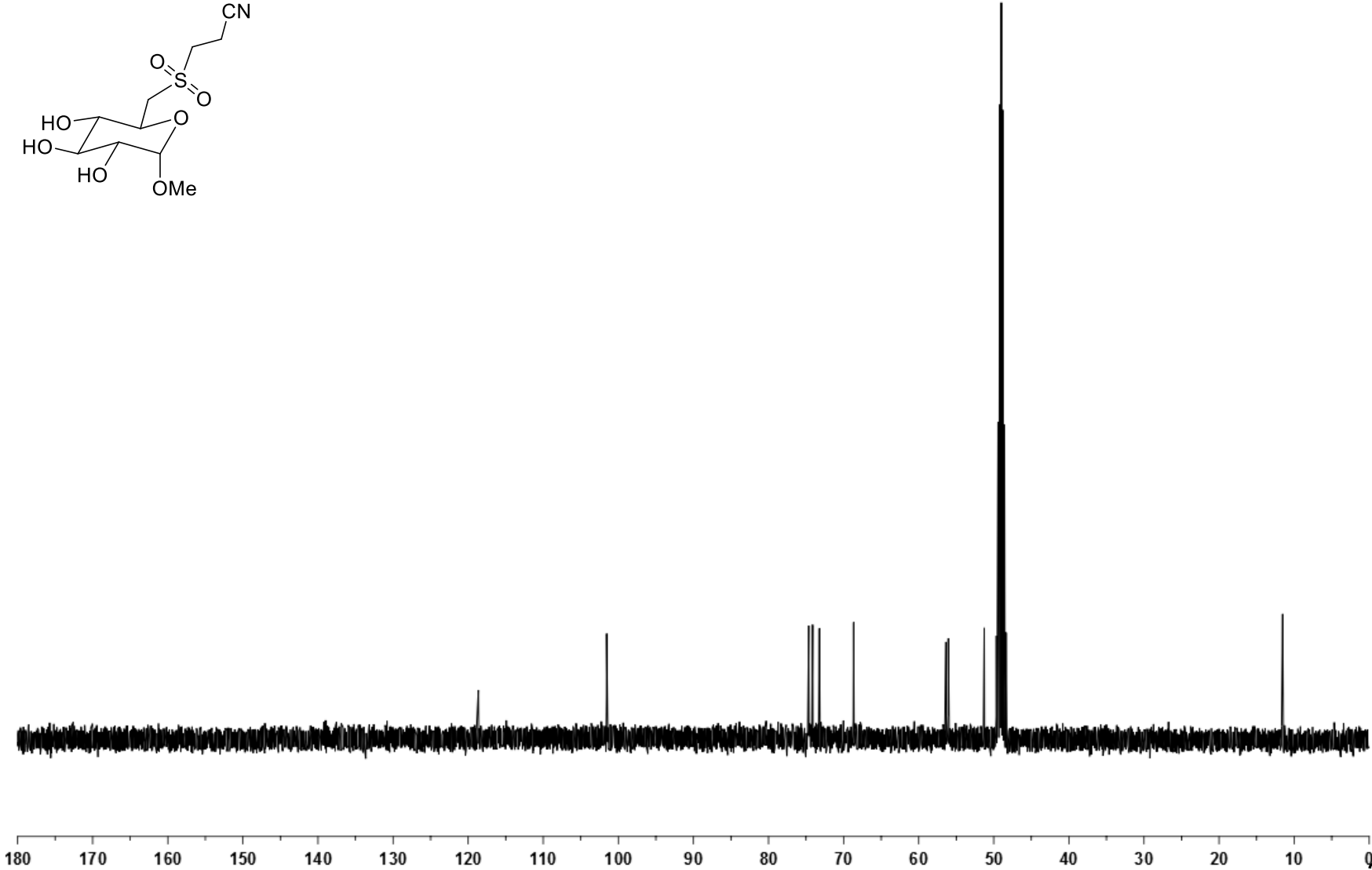
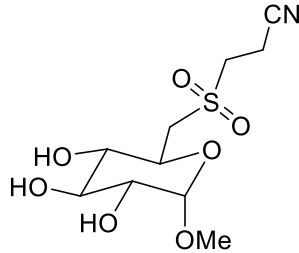
Methyl 6-[(2-cyanoethyl)sulfonyl]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (6)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



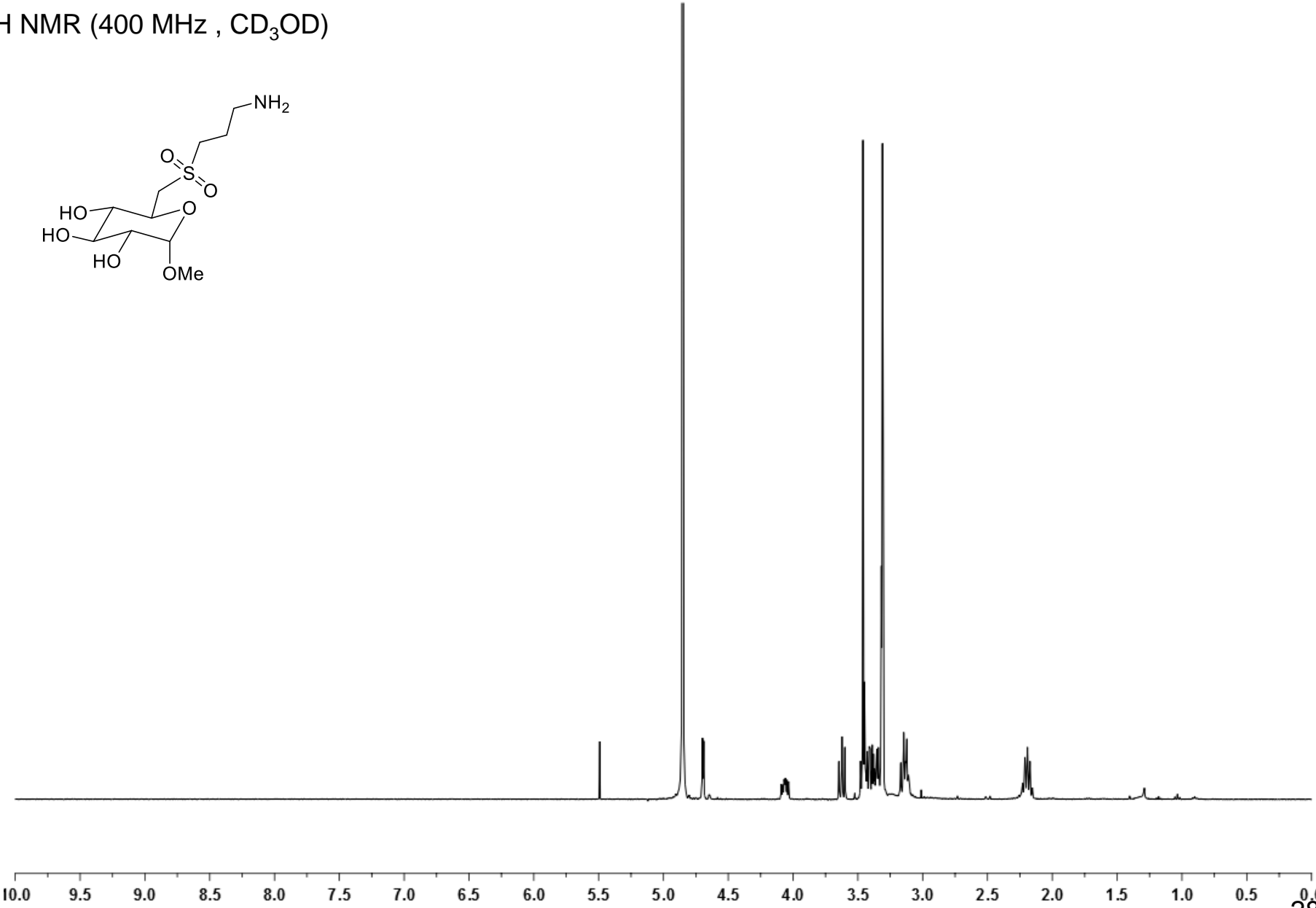
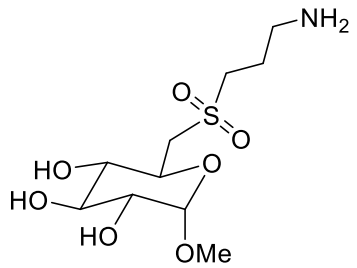
Methyl 6-[(2-cyanoethyl)sulfonyl]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (6)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



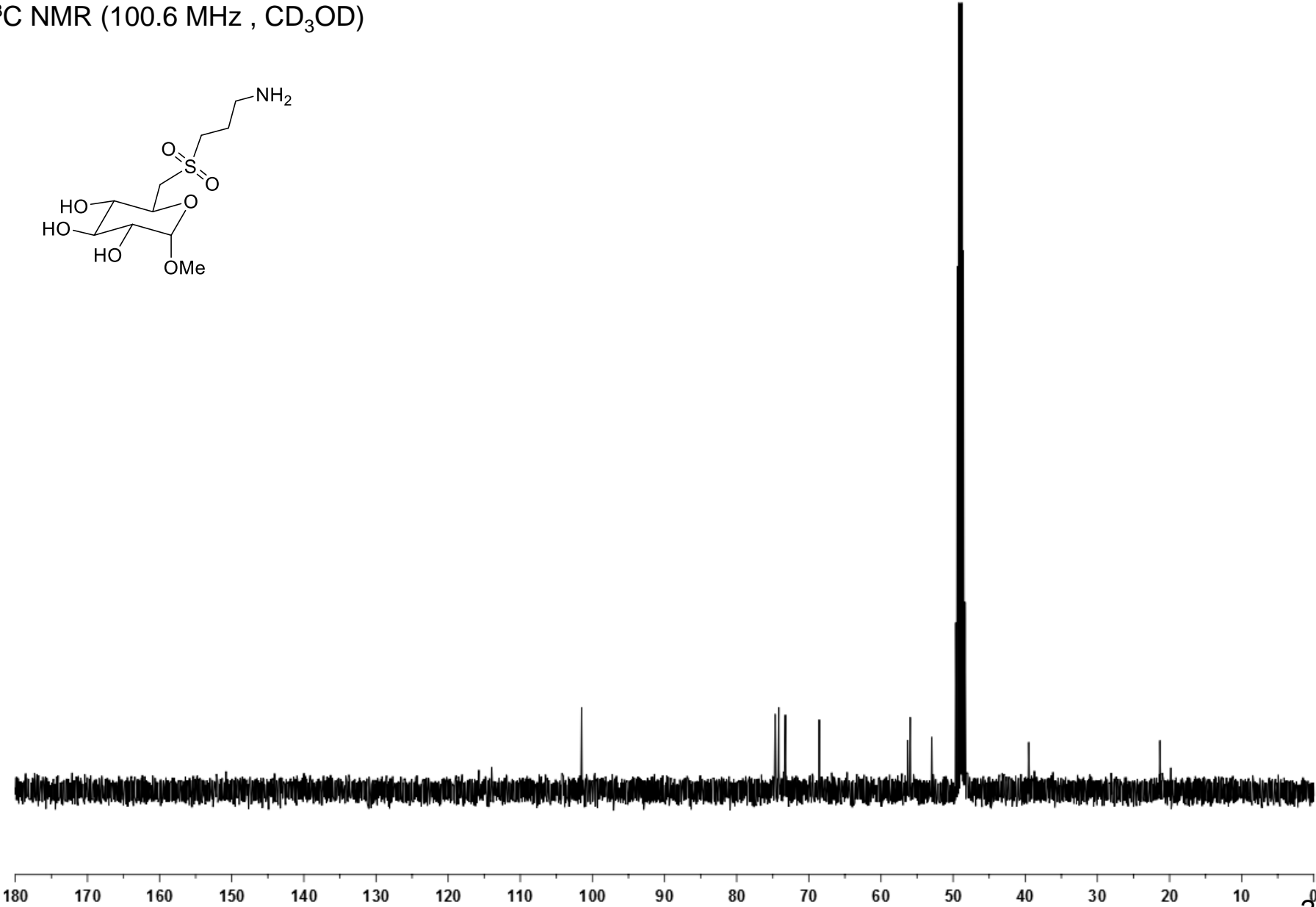
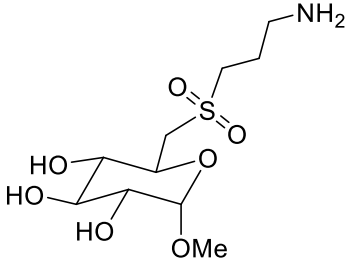
Methyl 6-[(3-aminopropyl)sulfonyl]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (7)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



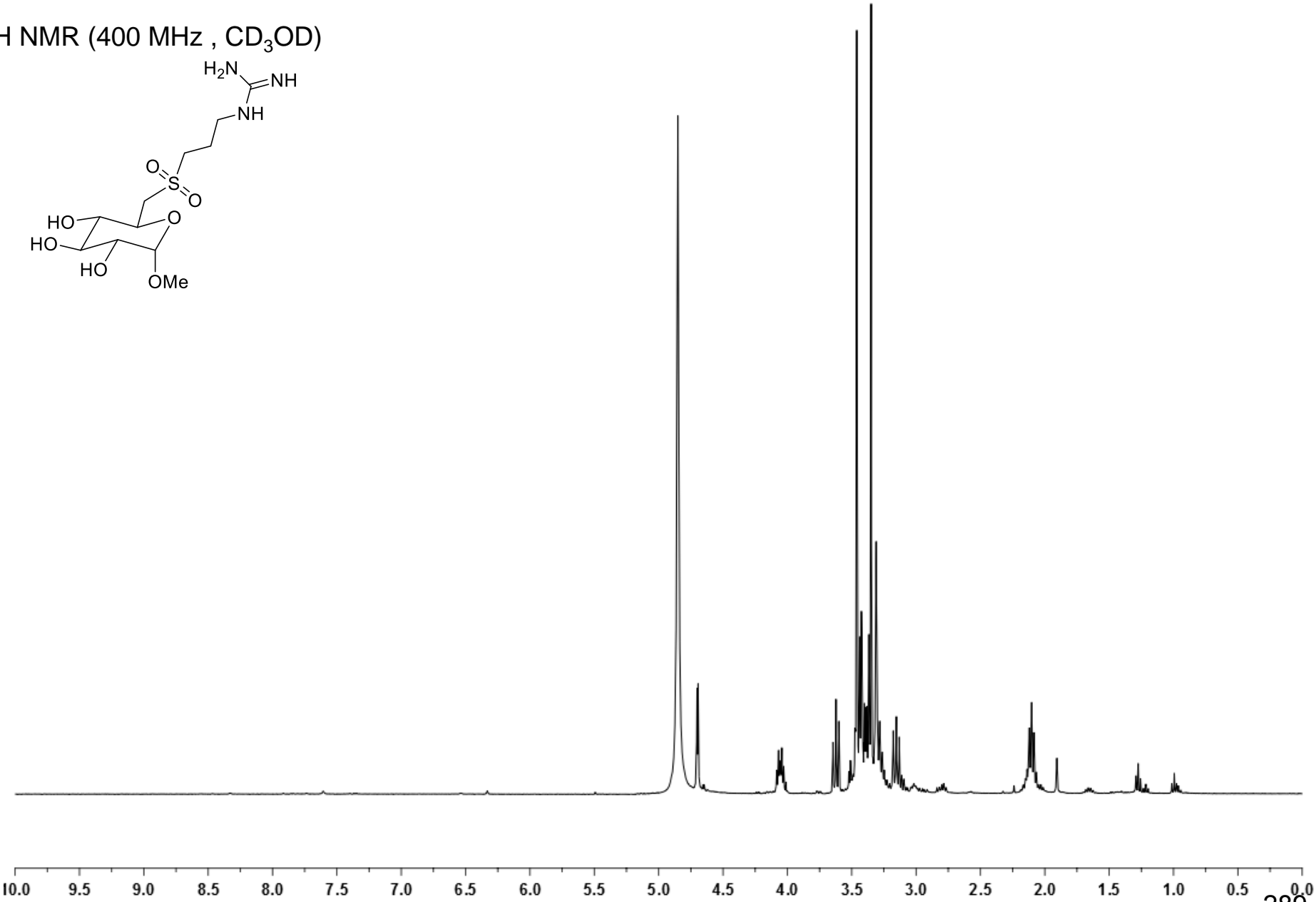
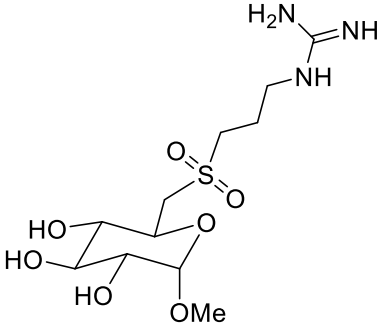
Methyl 6-[(3-aminopropyl)sulfonyl]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (7)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



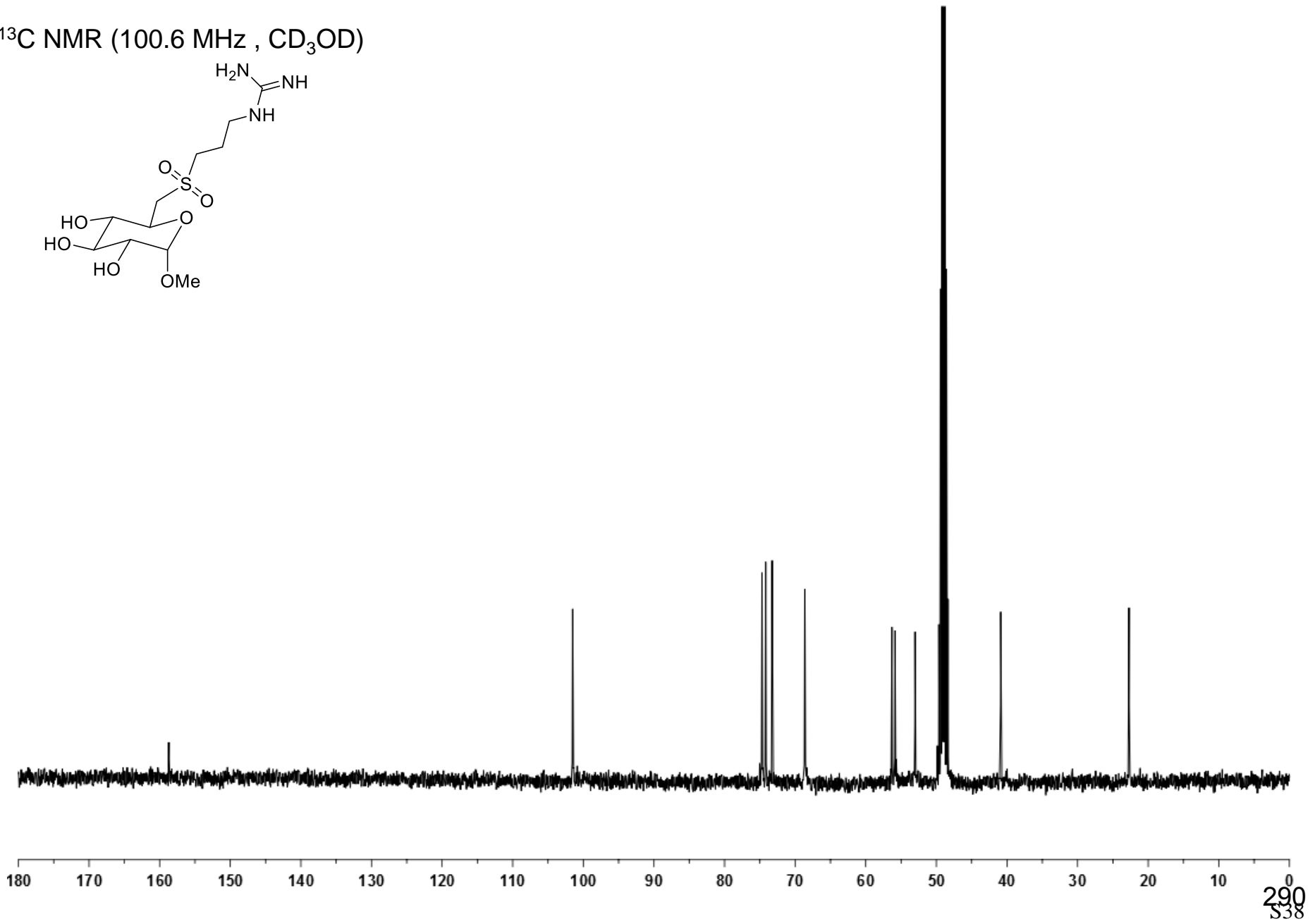
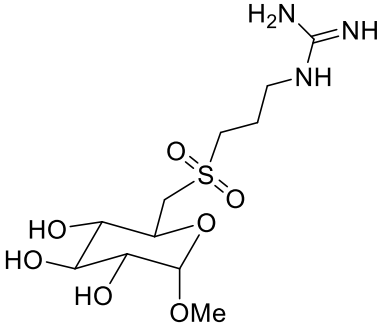
Methyl 6-deoxy-6-[(3-guanidinopropyl)sulfonyl]- α -D-glucopyranoside (8)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



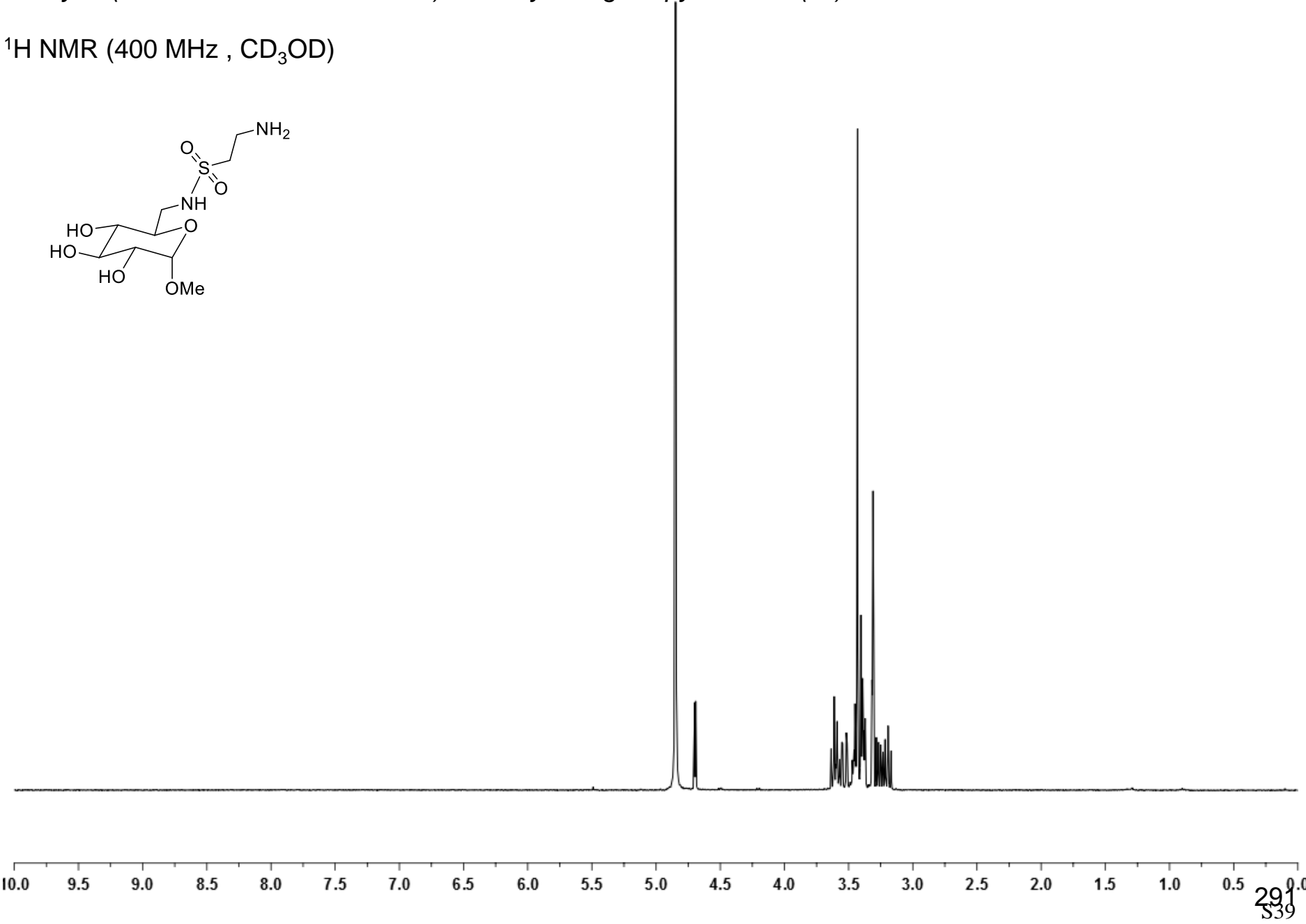
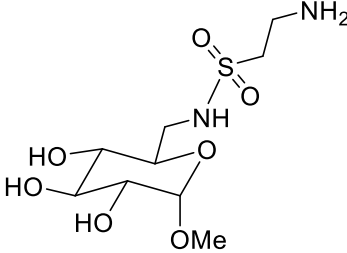
Methyl 6-deoxy-6-[(3-guanidinopropyl)sulfonyl]-α-D-glucopyranoside (8)

¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD)



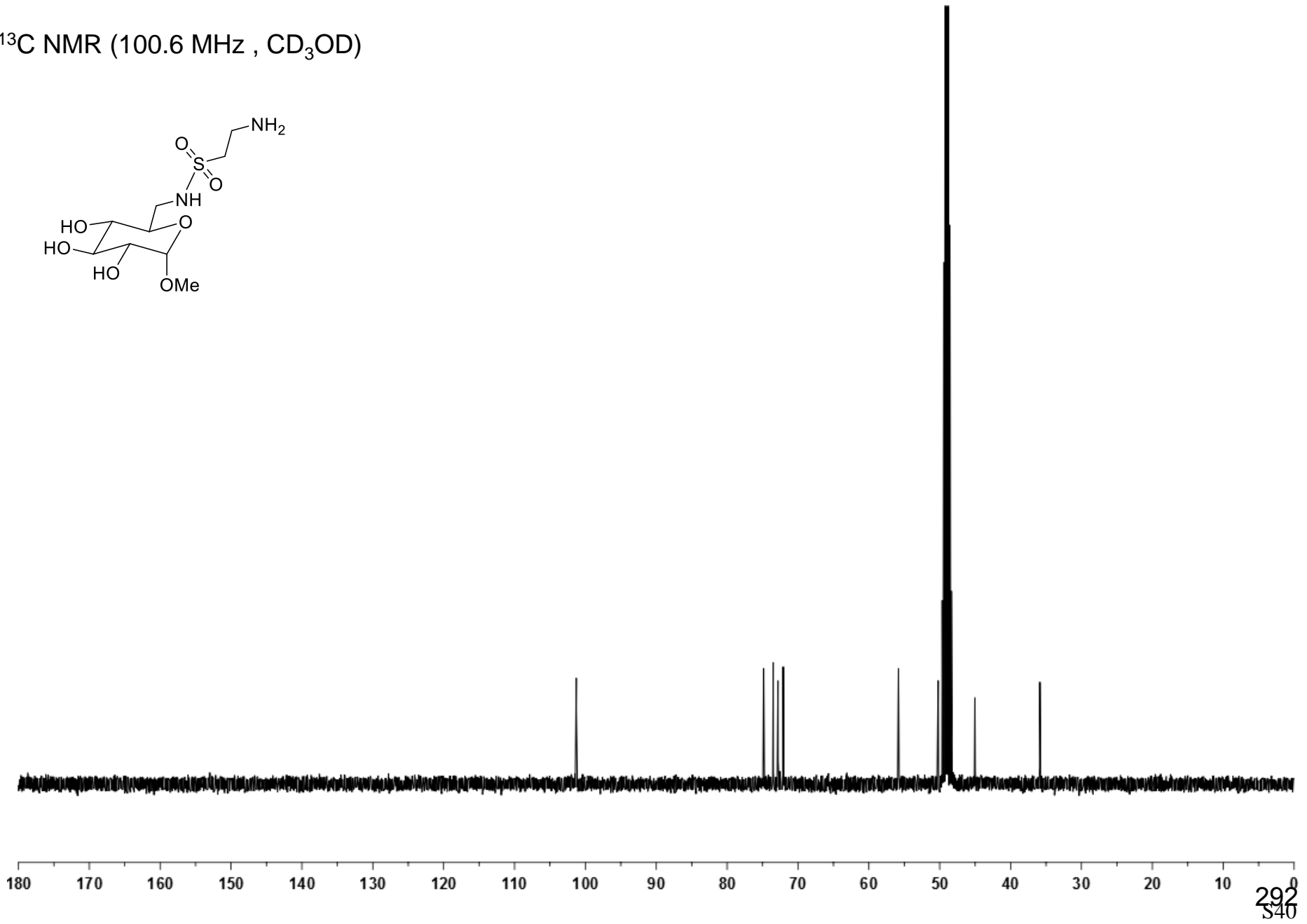
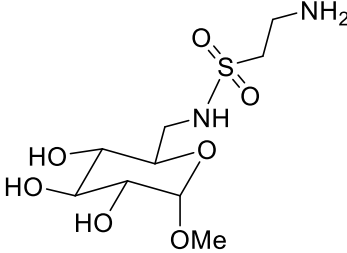
Methyl 6-(2-aminoethanesulfonamido)-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (11)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



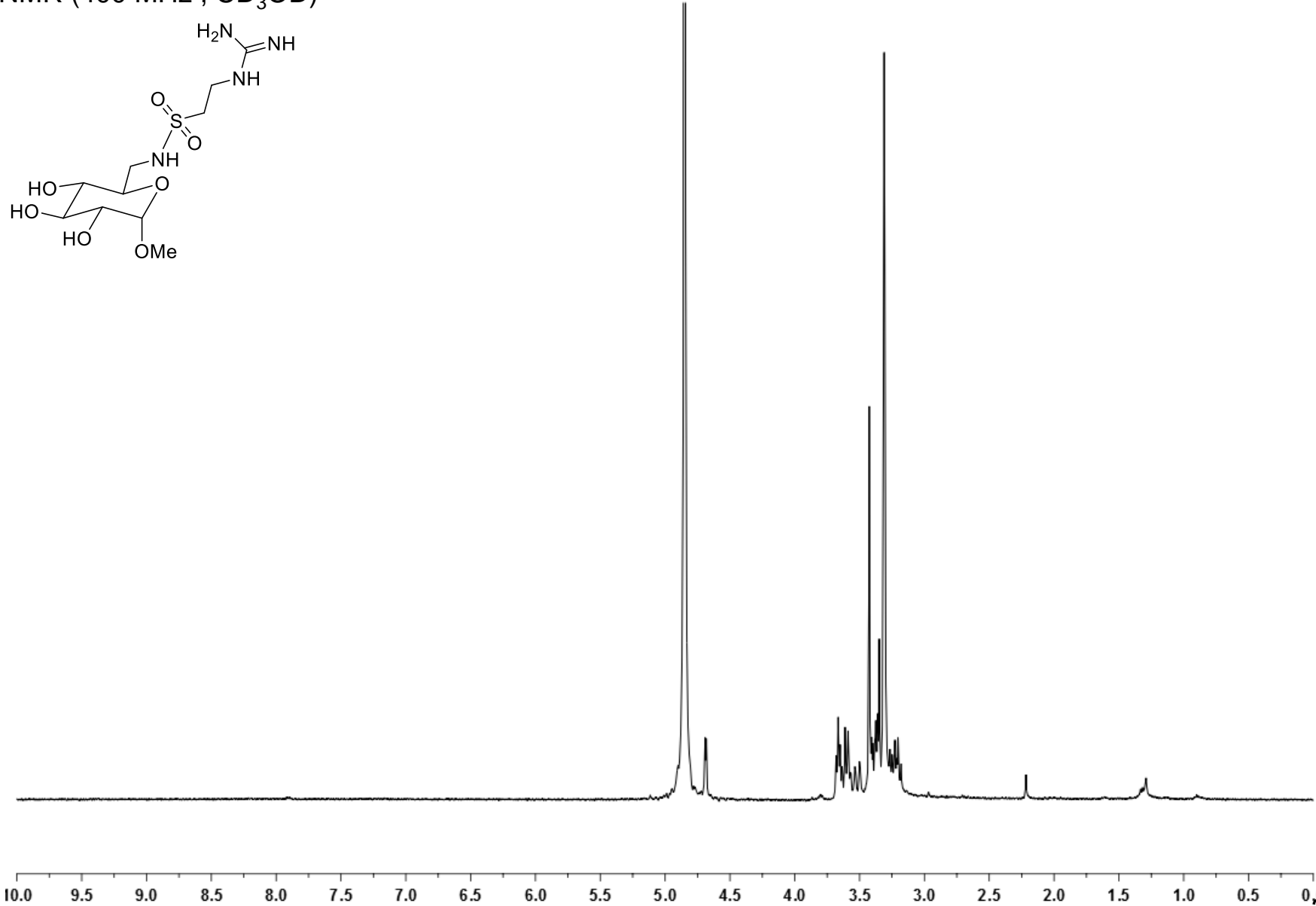
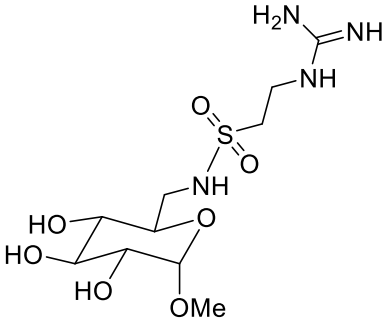
Methyl 6-(2-aminoethanesulfonamido)-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (11)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



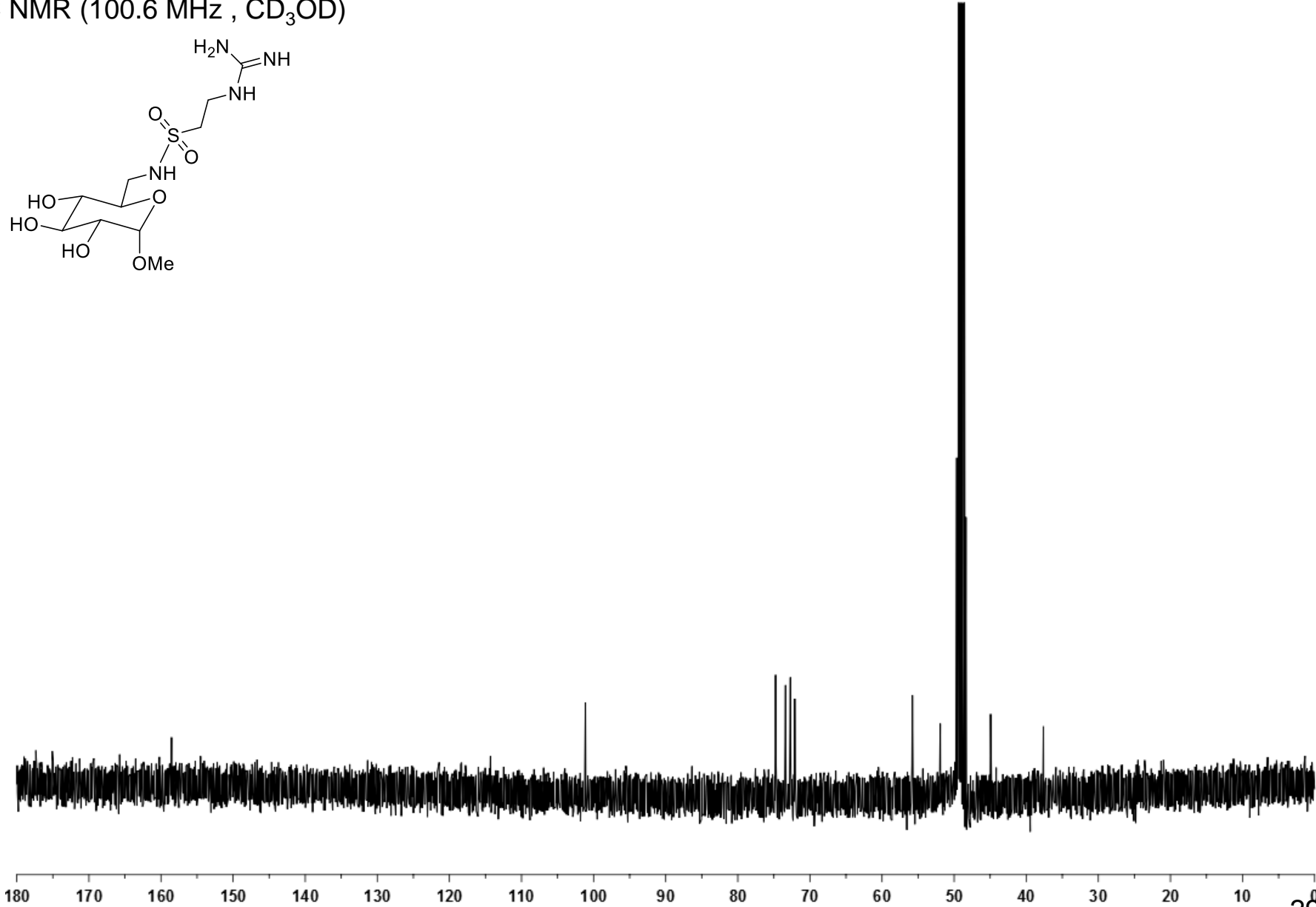
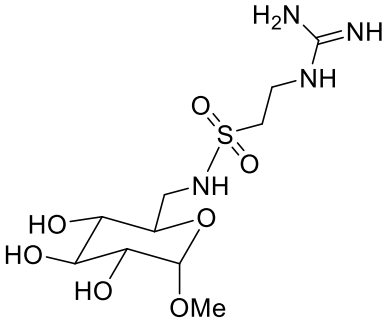
Methyl 6-deoxy-6-(2-guanidinoethanesulfonamido)- α -D-glucopyranoside (12)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD)



Methyl 6-deoxy-6-(2-guanidinoethanesulfonamido)- α -D-glucopyranoside (12)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD)



Anexo III: Artículo III

Enantioselective Synthesis of Spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles]

Organic Letters

(Org. Lett. 2017, 19, 4050–4053)

Maria Pérez^{*,1}, Carlos Ramos², Lucia Massi², Silvia Gazzola², Chiara Taglienti², Nihan Yayik², Elies Molins³, Antonio Viayna¹, Francisco Javier Luque¹, Joan Bosch², Mercedes Amat^{*,2}

¹Department of Nutrition, Food Science & Gastronomy, Faculty of Pharmacy & Food Sciences, University of Barcelona, Av. Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain.

²Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, 08028, Barcelona, Spain

³Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB, CSIC), Campus UAB, 08193 Bellaterra, Spain

*Corresponding author

Enantioselective Synthesis of Spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles]

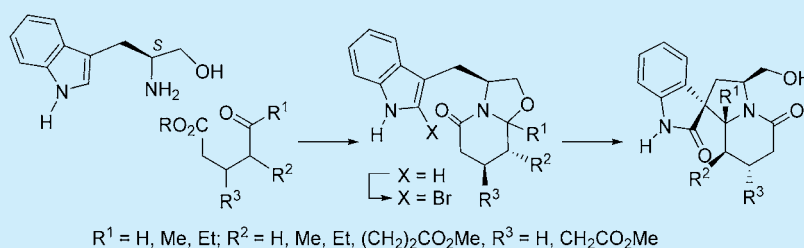
Maria Pérez,^{*,†} Carlos Ramos,[‡] Lucia Massi,[‡] Silvia Gazzola,[‡] Chiara Taglienti,[‡] Nihan Yayik,[‡] Elies Molins,[§] Antonio Viayna,[†] F. Javier Luque,[†] Joan Bosch,[‡] and Mercedes Amat^{*,‡}

[†]Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

[‡]Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, 080028 Barcelona, Spain

[§]Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB, CSIC), Campus UAB, 08193 Bellaterra, Spain

Supporting Information



ABSTRACT: A three-step procedure for the enantioselective synthesis of spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles], consisting of a stereoselective cyclocondensation reaction between (*S*)-tryptophanol and a prochiral or racemic δ -oxoester, bromination of the resulting oxazolopiperidone lactam, and a final stereoselective spirocyclization, is reported.

The tetracyclic spiro[indolizidine-1,3'-oxindole] ring system is a ubiquitous structural motif present in over 100 indole alkaloids,¹ some of them isolated from plant species used in traditional Oriental medicine² (Figure 1). Many of these oxindole alkaloids, as well as those containing the more simple tricyclic spiro[pyrrolidine-3,3'-oxindole] moiety, show interesting biological activities³ and have inspired the development of new potential therapeutic agents.⁴ Due to these reasons and because of their complex molecular architecture, spirooxindoles have received considerable attention.⁵

A well-established procedure for the asymmetric construction of the spiro[indolizidine-1,3'-oxindole] framework is the biomimetic oxidative rearrangement of indolo[2,3-*a*]-quinolizidine derivatives.⁶ Another approach uses intramolecular Mannich reactions of iminium ions derived from 2-hydroxytryptamines. Although the latter reactions have been extensively used to generate tricyclic spiro[pyrrolidine-3,3'-oxindoles],⁷ with the exception of the pioneering work by van Tamelen,⁸ they have not been applied to directly assemble the tetracyclic spiro-

[indolizidine-1,3'-oxindole] skeleton.⁹ The enantioselective organocatalytic version of this methodology, via cyclic *N*-acyl iminium ions derived from 2-halotryptamines, has recently been explored.¹⁰ However, despite all synthetic efforts, development of direct and efficient stereoselective methodologies to access enantiopure spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles], with their characteristic all-carbon spiro stereocenter vicinal to another stereogenic center, still remains a challenging synthetic goal.

Previously, we reported¹¹ stereoconvergent cyclocondensation reactions between tryptophanol and δ -oxoesters **A**, either prochiral or as mixtures of stereoisomers, leading to enantiopure oxazolopiperidone lactams **B**, which can undergo three complementary regio- and stereocontrolled types of cyclization to form either indolo[2,3-*a*]quinolizidines **C** or **D**^{11,12} or spiro[indoline-3,1'-indolizidines]¹³ **E** (Scheme 1).

Spirocyclization occurs with complete regio- and stereocontrol by treatment of the lactam with TFA or a Lewis acid (TiCl_4 , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) in the presence of Et_3SiH . Success of the reaction depends on the presence of a deactivating arylsulfonyl group on the indole nitrogen. The *N*-acyl iminium ion resulting from the oxazolidine ring opening attacks the indole 3-position to generate a spiroindolenium intermediate, which after trapping by Et_3SiH affords a single spiroindoline in excellent yield. The reaction involves generation of two contiguous stereogenic centers, one of them quaternary.

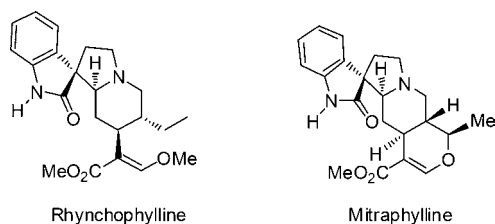
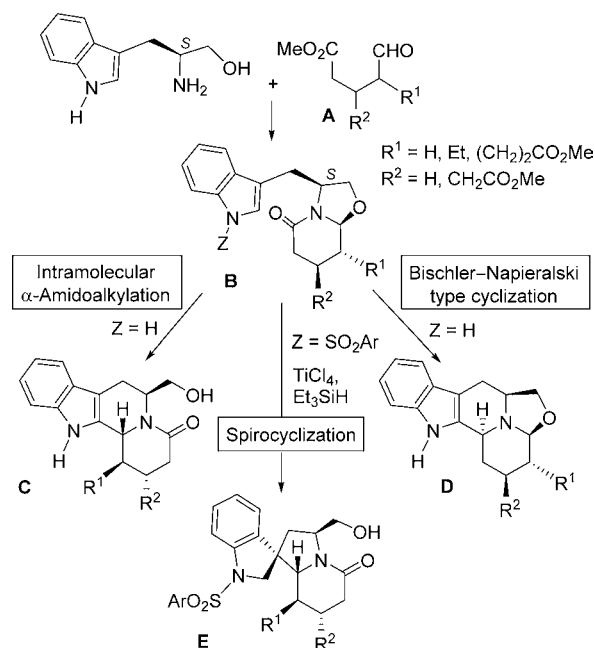


Figure 1. Representative bioactive oxindole alkaloids.

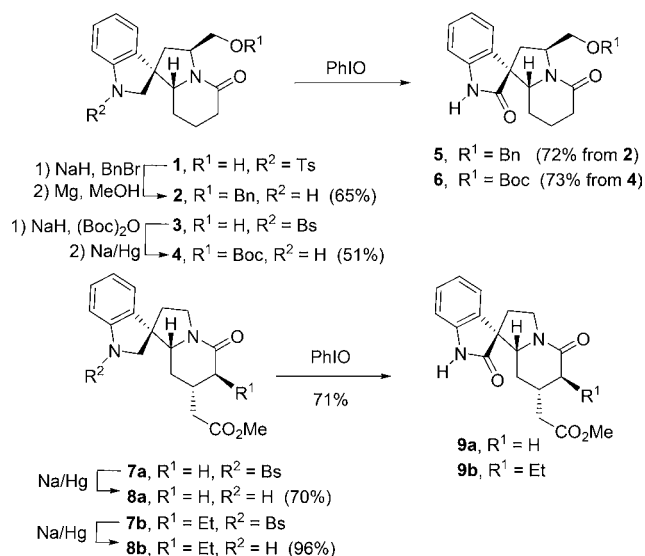
Received: June 15, 2017

Published: July 21, 2017

Scheme 1. Complementary Types of Cyclization from Tryptophanol-Derived Lactams

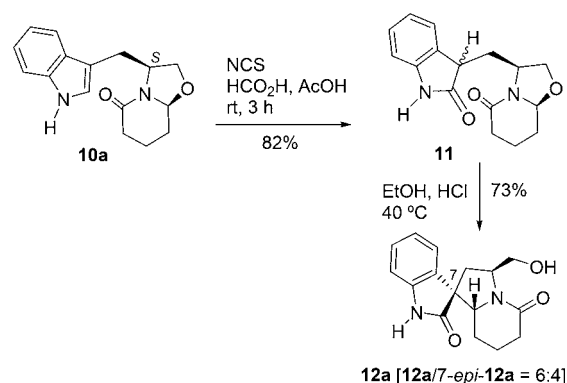


Scheme 2. Oxidation of Spiro[indoline-3,1'-indolizidines] to Spirooxindoles



With a procedure in hand for the direct assembly of enantiopure spiro[indoline-3,1'-indolizidines], access to the corresponding spirooxindoles would simply require oxidation of the indoline moiety. This was accomplished using iodobenzene as the oxidant.¹⁴ Under these conditions, oxidation of *N*-unsubstituted *O*-protected spiroindolines **2** and **4** provided the respective oxindoles **5** and **6** in yields >70% (Scheme 2). The procedure was also successfully applied to spiroindolines **8a** and **8b**, which lack the hydroxymethyl chain, to give the corresponding tetracyclic spirooxindoles **9a** and **9b**, the latter being an advanced intermediate in the synthesis of *ent*-rhyngophylline and *ent*-isoryngophylline.¹⁵

Although the above oxidations led to spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles], we explored alternative procedures that would allow direct access to these tetracyclic derivatives by spirocycliza-

Scheme 3. Generation of a Spirooxindole by Intramolecular Attack of an *N*-Acyl Iminium Ion on an Oxindole

tion of tryptophanol-derived oxazolopiperidone lactams. Despite the failure of previous efforts to build this tetracyclic spiro system by intramolecular Mannich reaction between a 2-oxo-2,3,4,5-tetrahydropyridinium cation and an oxindole,^{10a,b} we investigated spirocyclization of lactam **11**. The oxindole moiety of this masked *N*-acyl iminium cation was generated in excellent yield by NCS oxidation of the indole ring of tryptophanol-derived lactam **10a**. After some unsuccessful attempts (TFA, CH₂Cl₂, rt; aq HCl, reflux), the desired spirocyclization occurred by treatment of **11** (mixture of epimers) with HCl/EtOH at 40 °C to afford in 73% yield a mixture (6:4 ratio) of spirooxindole **12a** and its C-7 epimer (Scheme 3).

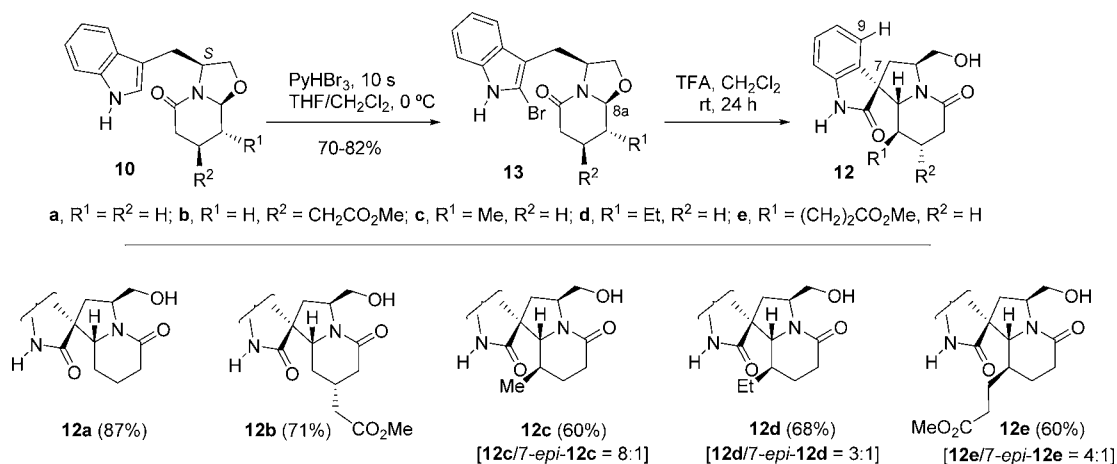
This promising result prompted us to search for more stereoselective spirocyclizations leading to spiro[indolizidine-3,1'-oxindoles]. We focused on the spirocyclization of 2-bromoindoles **13**,¹⁶ which were easily accessible by PyHBr₃-promoted bromination¹⁷ of tryptophanol-derived lactams **10** (Scheme 4). Treatment of **13a** with TFA at rt for 24 h provided spirooxindole **12a** in 87% yield as a single stereoisomer. The same result was obtained from the 8a-epimer of **13a**, indicating spirocyclization occurs via the *N*-acyl iminium cation resulting from the opening of the oxazolidine ring. Similarly, bromolactam **13b**, which incorporates a substituent at the piperidone 4-position, was stereoselectively converted to a single oxindole **12b** in 71% yield.

The procedure was also applied to bromolactams **13c–e**, substituted at the piperidone 5-position, although in these cases, the corresponding spirooxindoles **12c–e**¹⁸ were obtained with minor amounts of the respective epimers at the spiro-carbon.¹⁹ The relative stereochemistry of the spiro-carbon in these epimers can be assigned by ¹H NMR from the shielding (0.23–0.35 ppm) of the aromatic H-9 proton caused by the nearby piperidone carbonyl group in the major 7*R* epimers **12c–e** (also **14a,b**; see below).

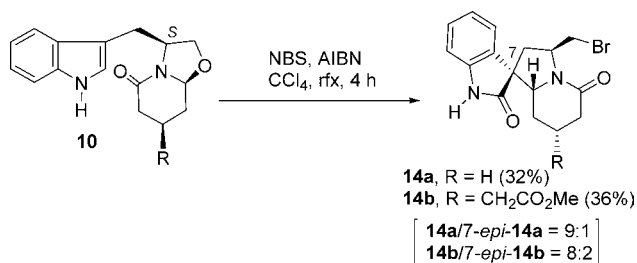
Use of NBS/AIBN²⁰ in the bromination of **10a** and **10b** resulted in direct generation of spirooxindoles **14** (with minor amounts of the corresponding C-7 epimers),¹⁸ in which the hydroxy group of the hydroxymethyl substituent underwent substitution by bromine (Scheme 5). Due to the low yields, these conditions were not further explored.

To expand the scope of the methodology, we applied it to tryptophanol-derived lactams bearing a substituent at the 8a position. Required lactams **17** were prepared by cyclocondensation of (*S*)-tryptophanol with ketoacids **15**, followed by bromination with PyHBr₃ (Scheme 6). Subsequent treatment of **17a** or **17b** with TFA stereoselectively provided the respective

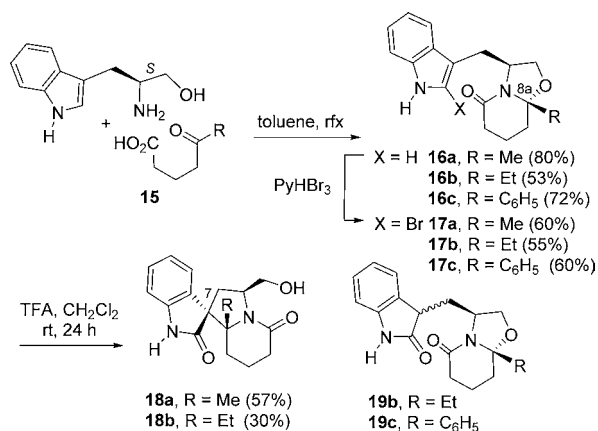
Scheme 4. Access to Spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles] from 2-Bromoindoles



Scheme 5. Direct Generation of Spirooxindoles



Scheme 6. Access to Spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles] Bearing Two Contiguous Quaternary Stereocenters

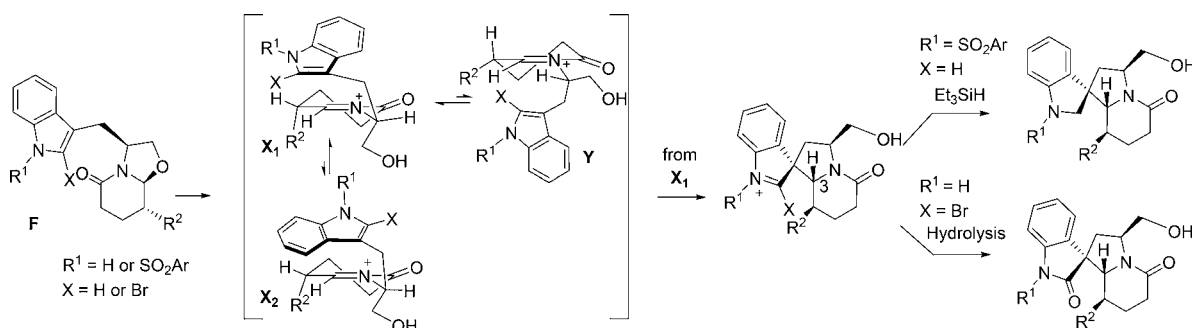


tetracyclic spirooxindoles **18a** or **18b**, in a process that involves generation of two contiguous quaternary stereogenic centers.¹⁸ In contrast, a similar treatment from the phenyl-substituted **17c** did not bring about spirocyclization and only caused conversion of the 2-bromoindole moiety to an oxindole, leading to **19c**.²¹

A rationale for the origin of the stereoselectivity in the above spirocyclizations to either spiroindolines or spirooxindoles is provided in Scheme 7, highlighting the decisive role played by the hydroxymethyl group as an element of stereocontrol. The initially formed *N*-acyl iminium cation approaches the indole 3-position under stereoelectronic control,²² as depicted in conformation X_1 , via a transition state that avoids the interaction between the carbonyl and hydroxymethyl groups (see Y). Electrophilic attack occurs from the *Si* face of the iminium cation, thus originating the *R* configuration at C-3. In conformation X_1 , the indole ring is oriented in a way that it allows an antiperiplanar arrangement of the π -bond system involved in the spirocyclization (in contrast with conformation X_2), thus determining the *R* configuration at the spiro-carbon. Theoretical calculations (M062X/6-31G(d) combined with solvation effects using the MST method)²³ confirmed that spirocyclization of **F** ($R_1 = C_6H_5SO_2$; $X = R_2 = H$) involving conformation X_1 is kinetically favored over cyclizations involving X_2 - or Y -type conformations (see Supporting Information).

In conclusion, we report a straightforward procedure for the enantioselective synthesis of spiro[indolizidine-3,1'-oxindoles] from (*S*)-tryptophan and prochiral or racemic δ -oxoesters. In only three synthetic steps, a stereoselective cyclocondensation reaction, bromination of the resulting oxazolopiperidone lactam, and a final stereoselective spirocyclization, the procedure

Scheme 7. Stereochemical Outcome of the Spirocyclization



provides practical access to enantiopure tetracyclic spirooxindoles containing up to three contiguous stereogenic centers or even two adjacent quaternary stereocenters.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01818.

Complete experimental procedures, copies of ^1H and ^{13}C NMR spectra of all new compounds, crystallographic data for **12c**, **14a**, and **18a**, and computational details (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: mariaperez@ub.edu.

*E-mail: amat@ub.edu.

ORCID

F. Javier Luque: 0000-0002-8049-3567

Joan Bosch: 0000-0001-5974-1733

Mercedes Amat: 0000-0002-9551-4690

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support is from the MINECO/FEDER (Projects CTQ2015-65384-R and SAF2014-57094-R) and the Generalitat de Catalunya (Grants 2014SGR-0155 and 2014SGR-1189). Thanks to the MICINN (Spain) for a fellowship to C.R., Universitat de Barcelona for an APIF fellowship to A.V., ICREA Academia for financial support to F.J.L., and the Leonardo da Vinci programme (Unipharma-Graduates 10) for a mobility grant to L.M. We acknowledge the Consorci de Serveis Universitaris de Catalunya (CSUC) for their computational facilities, as well as the networking contribution from the COST Action CM1407.

■ REFERENCES

- (1) (a) Saxton, J. E. In *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*; Manske, R. H. F., Ed.; Academic Press: New York, 1968; Vol. 10, p 521. (b) Bindra, J. S. In *The Alkaloids*; Manske, R. H. F., Ed.; Academic Press: New York, 1973; Vol. 14, p 83.
- (2) For reviews, see: (a) Heitzman, M. E.; Neto, C. C.; Winiarz, E.; Vaisberg, A. J.; Hammond, G. B. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 5. (b) Tang, W.; Eisenbrand, G. *Handbook of Chinese Medicinal Plants*; Wiley: New York, 2011; Vol. 2, p 1213. (c) Zhou, J.-Y.; Zhou, S.-W. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 617. (d) Ndagijimana, A.; Wang, X.; Pan, G.; Zhang, F.; Feng, H.; Olaleye, O. *Fitoterapia* **2013**, *86*, 35. (e) Zhang, Q.; Zhao, J. J.; Xu, J.; Feng, F.; Qu, W. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *173*, 48.
- (3) (a) Shi, J.-S.; Yu, J.-X.; Chen, X.-P.; Xu, R.-X. *Acta Pharmacol. Sin.* **2003**, *24*, 97. (b) Zhou, J.; Zhou, S. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *132*, 15. (c) Yu, B.; Yu, D.-Q.; Liu, H.-M. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 673. (d) Ye, N.; Chen, H.; Wold, E. A.; Shi, P.-Y.; Zhou, J. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 382. (e) Galliford, C. V.; Scheidt, K. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8748.
- (4) (a) Marti, C.; Carreira, E. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 2209. (b) Trost, B. M.; Brennan, M. K. *Synthesis* **2009**, *2009*, 3003. (c) Zhou, F.; Liu, Y.-L.; Zhou, J. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1381. (d) Ball-Jones, N. R.; Badillo, J. J.; Franz, A. K. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5165. (e) Santos, M. M. M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 9735. (f) Tsukano, C.; Takemoto, Y. *Heterocycles* **2014**, *89*, 2271. (g) Fonseca, G. O.; Cook, J. M. *Org. Chem. Insights* **2016**, *6*, 1. (h) Pavlovska, T. L.; Redkin, R. G.; Lipson, V. V.; Atamanuk, D. V. *Mol. Diversity* **2016**, *20*, 299.
- (6) (a) Finch, N.; Taylor, W. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1318. (b) Martin, S. F.; Benage, B.; Geraci, L. S.; Hunter, J. E.; Mortimore, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6161. (c) Deiters, A.; Pettersson, M.; Martin, S. F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6547. (d) Nagata, K.; Ishikawa, H.; Tanaka, A.; Miyazaki, M.; Kanemitsu, T.; Itoh, T. *Heterocycles* **2010**, *81*, 1791.
- (7) (a) Castedo, L.; Harley-Mason, J.; Kaplan, M. *J. Chem. Soc. D* **1969**, 1444. (b) Ban, Y.; Seto, M.; Oishi, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 2605. (c) Brown, R. T.; Chapple, C. L.; Platt, R. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1401. (d) Ponglux, D.; Wongseripipatana, S.; Aimi, N.; Nishimura, M.; Ishikawa, M.; Sada, H.; Haginiwa, J.; Sakai, S.-I. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 573. (e) von Nussbaum, F.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2175. (f) Wanner, M. J.; Ingemann, S.; van Maarseveen, J. H.; Hiemstra, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1100.
- (8) van Tamelen, E. E.; Yardley, J. P.; Miyano, M.; Hinshaw, W. B., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7333.
- (9) For an alternative approach involving a cross-dehydrogenative coupling from 3-(2-bromoethyl)indolin-2-one and a pyridine derivative, see: Xu, J.; Shao, L.-D.; Li, D.; Deng, X.; Liu, Y.-C.; Zhao, Q.-S.; Xia, C. J. *Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17962.
- (10) (a) Wu, X.; Liu, Q.; Fang, H.; Chen, J.; Cao, W.; Zhao, G. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 12196. (b) Antonchick, A. P.; López-Tosco, S.; Parga, J.; Sievers, S.; Schürmann, M.; Preut, H.; Höing, S.; Schöler, H. R.; Sternecker, J.; Rauh, D.; Waldmann, H. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 500. (c) Förster, T.; López-Tosco, S.; Ziegler, S.; Antonchick, A. P.; Waldmann, H. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1098. (d) Zhang, H.; Ma, X.; Kang, H.; Hong, L.; Wang, R. *Chem. - Asian J.* **2013**, *8*, 542.
- (11) (a) Amat, M.; Santos, M. M. M.; Bassas, O.; Llor, N.; Escolano, C.; Gómez-Esqué, A.; Molins, E.; Allin, S. M.; McKee, V.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5193. (b) Allin, S. M.; Thomas, C. I.; Doyle, K.; Elsegood, M. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 357.
- (12) (a) Amat, M.; Gómez-Esqué, A.; Escolano, C.; Santos, M. M. M.; Molins, E.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1205. (b) Pérez, M.; Arioli, F.; Rigacci, G.; Santos, M. M. M.; Gómez-Esqué, A.; Escolano, C.; Florindo, P.; Ramos, C.; Bosch, J.; Amat, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3858. (c) Amat, M.; Llor, N.; Subrizi, F.; Pérez, M.; Molins, E.; Bosch, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1246.
- (13) Amat, M.; Santos, M. M. M.; Gómez, A. M.; Jokic, D.; Molins, E.; Bosch, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2907.
- (14) Moriarty, R. M.; Vaid, R. K.; Duncan, M. P.; Ochiai, M.; Inenaga, M.; Nagao, Y. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6913.
- (15) Amat, M.; Ramos, C.; Pérez, M.; Molins, E.; Florindo, P.; Santos, M. M. M.; Bosch, J. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1954.
- (16) For early work on Mannich-type spirocyclizations of 2-halotryptophan or 2-halotryptamine imines leading to spirooxindoles, see: Miyake, F. Y.; Yakushijin, K.; Horne, D. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 5357.
- (17) Grieco, P. A.; Hon, Y. S.; Perez-Medrano, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1630.
- (18) The absolute configuration of spirooxindoles **12c**, **14a**, and **18a** was unambiguously established by X-ray crystallographic analysis. CCDC 1556168, CCDC 1556166, and CCDC 1556167 contain the supplementary crystallographic data for these compound. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.
- (19) Spirooxindoles **12c–e** did not undergo isomerization to the corresponding C-7 epimers under a variety of acidic conditions (HCl/MeOH, 40 °C, 24–72 h; TFA, 40–72 °C, 24–72 h).
- (20) For the use of these conditions in the bromination at the indole C-2 of 3-methylindole, see: Liu, R.; Zhang, P.; Gan, T.; Cook, J. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7447.
- (21) No spirocyclization was observed when **19c** was subjected to an additional treatment with HCl/EtOH (rt, 24 h) under the conditions used for **11**.
- (22) Deslongchamps, P. In *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*; Baldwin, J. E., Ed.; Pergamon: Oxford, 1983.
- (23) (a) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215. (b) Soteras, I.; Curutchet, C.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2005**, *727*, 29.

Enantioselective Synthesis of Spiro[indolizidine-1,3'-oxindoles]

Maria Pérez,^{†,*} Carlos Ramos,[‡] Lucia Massi,[‡] Silvia Gazzola,[‡] Chiara Taglienti,[‡] Nihan Yayik,[‡] Elies Molins,[§] Antonio Viayna,[†] F. Javier Luque,[†] Joan Bosch[‡] and Mercedes Amat^{‡,*}

[†] *Department of Nutrition, Food Sciences and Gastronomy, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, 08921-Santa Coloma de Gramenet, Spain*

[‡]*Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, and Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, 080028-Barcelona, Spain*

[§] *Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB, CSIC), Campus UAB, 08193-Bellaterra, Spain*

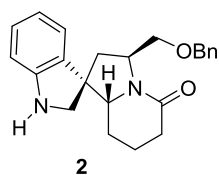
Supporting Information Available

- I) Experimental procedures and spectroscopic data for all compounds: pages S2-S30
- II) Computational methods and theoretical results: Page S31-S34
- III) Copies of ¹H and ¹³C NMR spectra for all compounds: pages S35-S74
- IV) X-ray crystallographic data for compounds **12c**, **14c** and **18a**: pages S75-S100

I) Experimental procedures and spectroscopic data

Experimental procedures and spectroscopic data

All air sensitive reactions were performed under a dry argon or nitrogen atmosphere with dry, freshly distilled solvents using standard procedures. Drying of organic extracts during the work-up of reactions was performed over anhydrous Na_2SO_4 or MgSO_4 . Evaporation of solvent was accomplished with a rotatory evaporator. Thin-layer chromatography was done on SiO_2 (silica gel 60 F₂₅₄), and the spots were located by UV and either a 1% KMnO_4 solution. Chromatography refers to flash column chromatography and was carried out on SiO_2 (silica gel 60, 230-400 mesh). NMR spectra were recorded at 300 or 400 MHz (^1H) and 100.6 MHz (^{13}C), and chemical shifts are reported in δ values, in parts per million (ppm) relative to Me_4Si (0 ppm) or relative to residual chloroform (7.26 ppm, 77.0 ppm) or methanol (3.31 ppm, 49.0 ppm) as an internal standard. Data are reported in the following manner: chemical shift, multiplicity, coupling constant (J) in hertz (Hz), integrated intensity, and assignment (when possible). Assignments and stereochemical determinations are given only when they are derived from definitive two-dimensional NMR experiments (HSQC-COSY). IR spectra were performed in a spectrophotometer Nicolet Avatar 320 FT-IR and only noteworthy IR absorptions (cm^{-1}) are listed. Optical rotation were measured on Perlin-Elmer 241 polarimeter. $[\alpha]_{\text{D}}$ values are given in $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$. High resolution mass spectra (HMRS) were performed by *Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona*.



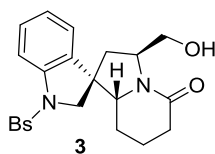
(1'S,3'S,8a'R)-3'-(Benzyloxymethyl)-5'-oxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (2).

A solution of spiro compound **1**¹ (430 mg, 1.0 mmol) in anhydrous THF (1 mL) was added at 0 °C under an inert atmosphere to a suspension of NaH (60%, 60 mg, 1.5 mmol) in THF (20 mL). After 1 h stirring at room temperature, BnBr (240 μL, 2.0 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 2h. Water and EtOAc were added, the phases separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic extracts were rinsed with brine, dried over MgSO₄ and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (3:7 hexane-EtOAc) of the resulting residue afforded **(1'S,3'S,8a'R)-3'-(benzyloxymethyl)-5'-oxo-1-(p-toluenesulfonyl)spiro[indoline-3,1'-indolizidine]** (440 mg, 85%): $[\alpha]_D^{22} = +39.2$ (c 1.0 in CHCl₃); IR (KBr): 1639 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.40-0.51 (m, 1H, H-14), 1.35-1.39 (m, 1H, H-14), 1.47-1.59 (m, 1H, H-15), 1.62-1.66 (m, 1H, H-15), 1.98-2.13 (m, 3H, 2H-20, H-6), 2.31-2.38 (m, 1H, H-6), 2.37 (s, 3H, CH₃ Ts), 3.51 (dd, *J* = 11.2, 4.4 Hz, 1H, H-3), 3.64 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 1H, CH₂OBn), 3.74 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, H-2), 3.83-3.89 (m, 2H, CH₂OBn, H-2), 4.44 (m, 1H, H-5), 4.51 (s, 2H, OCH₂C₆H₅), 6.71 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{AR}), 6.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.22-7.38 (m, 8H, H_{AR}), 7.66-7.71 (m, 3H, H_{AR}); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 19.9 (C-15), 21.5 (CH₃ Ts), 23.1 (C-14), 31.5 (C-6), 38.8 (C-20), 52.5 (C-7), 55.0 (C-5), 57.2 (C-2), 66.7 (C-3), 69.9 (CH₂OBn), 73.3 (OCH₂C₆H₅), 114.3 (CH_{AR}), 124.0 (CH_{AR}), 124.2 (CH_{AR}), 127.4 (CH_{AR}), 127.5 (CH_{AR}), 127.7 (CH_{AR}), 128.4 (CH_{AR}), 128.8 (CH_{AR}), 129.7 (2CH-Ts), 133.3 (C_{AR}), 133.5 (C_{AR}), 138.3 (C_{AR}), 141.9 (C_{AR}), 144.4 (C_{AR}), 169.2 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₃₀H₃₂N₂O₄S + H]⁺: 517.2161, found: 517.2147.

Mg turnings (190 mg, 7.8 mmol) were added under an inert atmosphere to methanol (10 mL) at room temperature and, after the generation of H₂ began, a solution of the above lactam (129 mg, 0.25 mmol) in methanol (2 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h (maintained in a water bath). The reaction was quenched with saturated NH₄Cl, and the mixture extracted with CH₂Cl₂. The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (1:4

¹ Amat, M.; Gómez-Esqué, A.; Escolano, C.; Santos, M. M. M.; Molins, E.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1205.

hexane-EtOAc) of the resulting residue afforded the deprotected indoline **2** (69 mg, 76%): $[\alpha]_D^{22} = +90.6$ (c 1.0 in CHCl_3); IR (KBr): 3321 (NH), 1623 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.74-0.87 (m, 1H, H-14), 1.54-1.59 (m, 1H, H-15), 1.69-1.79 (m, 1H, H-15), 1.82-1.91 (m, 1H, H-14), 2.04-2.21 (m, 2H, H-6, H-20), 2.28-2.41 (m, 2H, H-6, H-20), 3.48 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2), 3.55-3.59 (m, 1H, H-3), 3.59 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2), 3.74 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H, CH_2OBn), 3.87 (dd, $J = 9.4, 4.9$ Hz, 1H, CH_2OBn), 4.50-4.60 (m, 3H, H-5, $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 6.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.70 (td, $J = 7.3, 0.9$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.76 (dd, $J = 7.4, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.06 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.24-7.37 (m, 5H, H_{AR}); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 20.2 (C-15), 23.7 (C-14), 31.8 (C-20), 39.0 (C-6), 54.7 (C-2), 55.2 (C-5, C-7), 67.1 (C-3), 70.3 (CH_2O), 73.3 ($\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 109.9 (CH_{AR}), 119.5 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 127.5 (CH_{AR}), 127.6 (CH_{AR}), 128.3 (CH_{AR}), 128.4 (CH_{AR}), 131.8 (C_{AR}), 138.5 (C-*i* C_6H_5), 151.0 (C_{AR}), 169.4 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 363.2073, found: 363.2060.



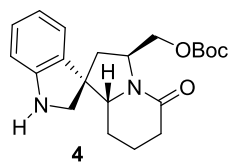
(1'S,3'S,8a'R)-3'-(Hydroxymethyl)-5'-oxo-1-(phenylsulfonyl)spiro[indoline-3,1'-indolizidine] (3).

Tetrabutylammonium iodide (57 mg, 0.155 mmol) and benzenesulfonyl chloride (701 μL , 5.44 mmol) were added at room temperature to a solution of lactam **10a**² (700 mg, 2.59 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL). The resulting mixture was cooled to 0 $^\circ\text{C}$, and 30% aqueous NaOH (30 mL, 2.59 mmol) was added. After stirring at room temperature overnight, CH_2Cl_2 was added, the phases were separated, and the aqueous phase was further extracted with CH_2Cl_2 . The organic phase was then washed with 2 N HCl, dried over MgSO_4 , and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (1:4 hexane-EtOAc) of the resulting residue afforded **(3S,8aS)-3-[1-(phenylsulfonyl)-3-indolylmethyl]-5-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahydro-5H-oxazolo-[3,2-*a*]pyridine** (940 mg, 88% yield): IR (KBr): 1643 (NCO) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, HSQC) δ 1.37 tdd, $J = 14.0, 14.0, 9.6, 4.0$ Hz, 1H, H-8), 1.62-1.74 (m, 1H, H-7), 1.92-1.99 (m, 1H, H-7), 2.20 (dm, $J = 14.0$ Hz, 1H, H-8), 2.36 (ddd, $J = 18.0, 10.4, 6.4$ Hz, 1H, H-6), 2.42 (ddd, $J = 18.0, 6.0, 3.2$ Hz, 1H, H-6), 2.69 (dd, $J = 14.0, 10.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.57 (dm, $J = 14.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.71 (ddd, $J = 9.6, 6.0, 1.2$ Hz, 1H, 1H, H-2), 3.93 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2), 4.24 (m, 1H, H-3), 4.65 (dd, $J = 10.0, 3.2$ Hz, 1H, H-8a), 7.26 (td, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.32

² Allin, S. M.; Thomas, C. I.; Allard, K.; Doyle, J. E.; Elsegood, M. R. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4179–4186

(td, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.37 (s, 1H, H_{AR}), 7.43 (dm, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-*m* C₆H₅), 7.52 (tt, $J = 7.2, 1.6$ Hz, 1H H-*p* C₆H₅), 7.74 (dm, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-*o* C₆H₅), 7.98 (dm, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_{AR}); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 17.5 (C-7), 26.7 (CH₂-Ind), 28.3 (C-8), 31.0 (C-6), 54.9 (C-3), 69.7 (C-2), 88.9 (C-8a), 113.6 (CH_{AR}), 119.4 (C_{AR}), 120.0 (CH_{AR}), 123.4 (CH_{AR}), 123.6 (CH_{AR}), 125.0 (CH_{AR}), 126.6 (C-*o* C₆H₅), 129.2 (C-*m* C₆H₅), 130.9 (C_{AR}), 133.7 (C-*p* C₆H₅), 135.1 (C_{AR}), 138.1 (C_{AR}), 168.2 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₂₂H₂₂N₂O₄S + H]⁺: 411.1373, found: 411.1371.

TiCl₄ (887 μ L, 8.04 mmol) and Et₃SiH (529 μ L, 3.22 mmol) were added at room temperature under an argon atmosphere to a solution of the above lactam (660 mg, 1.61 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL), and the resulting mixture was stirred at reflux overnight. Saturated solution of NaHCO₃ was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic extracts were dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (95:5 EtOAc-MeOH) of the resulting residue afforded the spiro compound **3** (530 mg, 80%) as white foam: IR (KBr): 3386 (OH), 1615 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.57 (tdd, $J = 13.2, 13.2, 11.2, 3.6$ Hz, 1H, H-14), 1.40-1.45 (dm, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-14), 1.53 (dd $J = 13.2, 10.0$ Hz, 1H, H-6), 1.60 (tq, $J = 13.2, 2.8$ Hz, 1H, H-15), 1.70 (m, 1H, H-15), 2.00 (dd, $J = 13.2, 8.0$ Hz, 1H, H-6), 2.11 (dq, $J = 18.0, 6.4$ Hz, 1H, H-20), 2.43 (dd, $J = 18.0, 4.8$ Hz, 1H, H-20), 3.50 (dd, $J = 11.2, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 3.62 (dd, $J = 12.0, 7.6$ Hz, 1H, CH₂OH), 3.70 (masked, 1H, CH₂OH), 3.74 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H-2), 3.85 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H-2), 4.46 (m, 1H, H-5), 5.06 (br. s, 1H, OH), 6.75 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.01 (td, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (td, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-*m* C₆H₅), 7.59 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H, H-*p* C₆H₅), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-*o* C₆H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 19.7 (C-15), 23.1 (C-14), 31.3 (C-20), 39.1 (C-6), 52.0 (C-7), 56.9 (C-2), 59.4 (C-5), 66.0 (C-3), 67.0 (CH₂OH), 114.7 (CH_{AR}), 124.0 (CH_{AR}), 124.5 (CH_{AR}), 127.3 (C-*o* C₆H₅), 129.2 (C-*m* C₆H₅), 129.3 (CH_{AR}), 132.9 (C_{AR}), 133.6 (C-*p* C₆H₅), 136.2 (C_{AR}), 141.9 (C_{AR}), 172.0 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₂₂H₂₄N₂O₄S + H]: 413.1530, found: 413.1520.

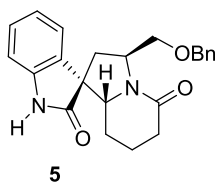


(1'S,3'S,8a'R)-3'-[(*tert*-Butoxycarbonyloxy)methyl]-5'-oxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (4).

NaH (186 mg of a 60% dispersion in mineral oil, washed with anhydrous hexane, 4.64 mmol) was added under an argon atmosphere at 0 °C to a solution of lactam **3** (319 mg, 0.77 mmol) in anhydrous THF (25 mL), and the resulting solution was stirred for 20 min at this temperature. After this time, (Boc)₂O (506 mg, 2.3 mmol) was added, and the solution was allowed to warm slowly to room temperature. After 20 h, more (Boc)₂O (506 mg, 2.3 mmol) was added, and the mixture was stirred at the same temperature for an additional 24 h. The solvent was concentrated under reduced pressure to afford **(1'S,3'S,8a'R)-1'-(benzenesulfonyl)-3'-[(*tert*-butoxycarbonyloxy)methyl]-5'-oxospiro[indoline-3,1'-indolizidine]** (256 mg, 65%) after flash chromatography (2:8 hexane-EtOAc): ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.47 (dq, *J* = 13.2, 3.6 Hz, 1H, H-14), 1.40 (m, 1H, H-14), 1.49 [s, 9H, (CH₃)₃C], 1.56 (m, 2H, H-15), 1.92 (dd, *J* = 12.8, 8.8 Hz, 1H, H-6), 2.01 (dd, *J* = 18.0, 6.8 Hz, 1H, H-20), 2.05 (dd, *J* = 12.8, 8.0 Hz, 1H, H-6), 2.38 (dd, *J* = 18.0, 5.2 Hz, 1H, H-20), 3.50 (dd, *J* = 11.2, 4.8 Hz, 1H, H-3), 3.76 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-2), 3.90 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-2), 4.18 (dd, *J* = 10.8, 2.8 Hz, 1H, CH₂O), 4.44 (d, *J* = 10.8, 4.0 Hz, 1H, CH₂O), 4.50 (m, 1H, H-5), 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 6.98 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-*m* C₆H₅), 7.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-*p* C₆H₅), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.82 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-*o* C₆H₅); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 19.8 (C-15), 23.2 (C-14), 27.7 [(CH₃)₃C], 31.5 (C-20), 38.7 (C-6), 52.5 (C-7), 53.9 (C-5), 57.0 (C-2), 66.3 (CH₂O), 66.4 (C-3), 82.4 [(CH₃)₃C], 114.4 (CH_{AR}), 123.9 (CH_{AR}), 124.4 (CH_{AR}), 127.3 (C-*o* C₆H₅), 129.1 (CH_{AR}), 129.2 (C-*m* C₆H₅), 133.4, 133.5 (C_{AR}, C-*p* C₆H₅), 136.3 (C_{AR}), 141.8 (C_{AR}), 153.3 (NCOO), 169.5 (NCO).

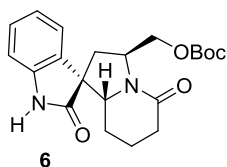
Sodium dihydrogen phosphate (917 mg, 7.65 mmol) and sodium amalgam (5% Na, 1.76 g, 3.82 mmol) were added under an inert atmosphere to a stirred solution of the above spiro compound (98 mg, 0.191 mmol) in MeOH (5 mL) cooled to 0 °C. After stirring for 15 min at 0 °C, EtOAc was added (20 mL) and the solution was washed with 10% NaHCO₃. The aqueous layer was further extracted with EtOAc, and the combined organic extracts were rinsed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc) afforded the deprotected indoline **4** (50 mg, 78%): ¹H

NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.85 (dq, J = 13.2, 3.2 Hz, 1H, H-14), 1.49 [s, 9H, (CH₃)₃C], 1.65 (dm, J = 12.4 Hz, 1H, H-15), 1.75 (m, 1H, H-15), 1.88 (dm, J = 13.2 Hz, 1H, H-14), 2.00 (dd, J = 12.8, 8.8 Hz, 1H, H-6), 2.11 (ddd, J = 18.4, 12.4, 6.8 Hz, 1H, H-20), 2.38 (dd, J = 12.8, 8.8 Hz, 1H, H-6), 2.41 (m, 1H, H-20), 3.50 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-2), 3.56 (dd, J = 11.2, 4.4 Hz, 1H, H-3), 3.60 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-2), 4.29 (dd, J = 10.4, 2.8 Hz, 1H, CH₂O), 4.48 (d, J = 10.4, 4.8 Hz, 1H, CH₂O), 4.62 (m, 1H, H-5), 6.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 6.69 (td, J = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.25 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.69 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 20.0 (C-15), 23.7 (C-14), 27.7 [(CH₃)₃C], 31.7 (C-20), 38.8 (C-6), 54.1 (C-5), 54.6 (C-7), 55.1 (C-2), 66.7 (C-3), 66.8 (CH₂O), 82.2 [(CH₃)₃C], 109.7 (CH_{AR}), 119.3 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 128.4 (CH_{AR}), 131.0 (C_{AR}), 151.3 (C_{AR}), 153.4 (NCOO), 169.7 (NCO).



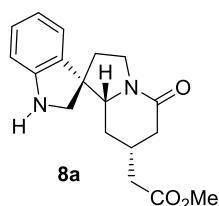
(1'R,3'S,8a'R)-3'-(Benzyloxymethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (5).

Iodosobenzene (440 mg, 2 mmol) was added to a solution of spiro compound **2** (73 mg, 0.20 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL). After 6 h stirring at room temperature, more iodosobenzene (440 mg, 2 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for a further 24 h. The mixture was then filtered through Celite® and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc) affording the oxindole spiro compound **5** (54 mg, 72%): $[\alpha]_D^{22} = +72.4$ (c 0.35 in CHCl₃); IR (KBr): 3204 (NH), 1722, 1618 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.75-0.91 (m, 1H, H-14), 1.56-1.81 (m, 3H, H-14, 2H-15), 2.17-2.24 (m, 2H, H-6, H-20), 2.44 (dd, J = 17.9, 5.2 Hz, 1H, H-20), 2.65 (dd, J = 12.8, 9.2 Hz, 1H, H-6), 3.80-3.92 (m, 2H, CH₂OBn), 4.59 (s, 2H, OCH₂C₆H₅), 4.60-4.68 (m, 1H, H-5), 6.90 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H-9), 6.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.02 (td, J = 7.6, 1.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.22-7.30 (m, 2H, H_{AR}), 7.31-7.38 (m, 4H, H_{AR}), 8.14 (NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 19.9 (C-15), 23.5 (C-14), 31.7 (C-20), 37.2 (C-6), 55.8 (C-5), 57.1 (C-7), 65.4 (C-3), 70.1 (CH₂OBn), 73.3 (OCH₂C₆H₅), 110.0 (CH_{AR}), 123.1 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 127.5 (CH_{AR}), 128.3 (CH_{AR}), 130.4 (C_{AR}), 131.2 (2C_{AR}), 139.9 (C_{AR}), 169.5 (NCO), 177.5 (NCO). HRMS (ESI) calcd for [C₂₃H₂₄N₂O₃ + H]⁺: 377.1865, found: 377.1869.



(1'R,3'S,8a'R)-3'-[(tert-Butoxycarbonyloxy)methyl]-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-

indolizidine] (6). Operating as described for the preparation of oxindole **5**, from a solution of spiro compound **4** (242 mg, 0.65 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) and iodobenzene (2 x 1.7 g, 2 x 7.8 mmol), oxindole **6** (182 mg, 73%) was obtained after flash chromatography (1:3 hexane-EtOAc): $[\alpha]_D^{22} = +9.02$ (c 1.0 in CHCl₃); IR (KBr): 3209 (NH), 1619 (NCO), 1742 (COO) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.85 (dq, $J = 12.8, 3.6$ Hz, 1H, H-14), 1.49 [s, 9H, (CH₃)₃C], 1.68 (m, 2H, H-14, H-15), 1.75 (m, 1H, H-15), 2.17 (ddd, $J = 18.4, 12.0, 6.4$ Hz, 1H, H-20), 2.21 (dd, $J = 12.8, 8.0$ Hz, 1H, H-6), 2.45 (dd, $J = 12.8, 9.6$ Hz, 1H, H-6), 2.49 (ddm, $J = 18.4, 4.4$ Hz, 1H, H-20), 4.03 (dd, $J = 11.2, 4.4$ Hz, 1H, H-3), 4.41 (dd, $J = 10.4, 5.2$ Hz, 1H, CH₂O), 4.46 (dd, $J = 10.4, 4.0$ Hz, 1H, CH₂O), 4.72 (m, 1H, H-5), 6.88 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.95 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.03 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.25 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.43 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 19.7 (C-15), 23.5 (C-14), 27.7 [(CH₃)₃C], 31.6 (C-20), 36.8 (C-6), 54.8 (C-5), 56.9 (C-7), 65.3 (C-3), 66.4 (CH₂O), 82.3 [(CH₃)₃C], 110.2 (CH_{AR}), 123.1 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 128.6 (CH_{AR}), 130.0 (C_{AR}), 140.1 (C_{AR}), 153.4 (COO), 169.8 (NCO), 177.2 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₂₁H₂₆N₂O₅ + H]⁺: 387.1914, found: 387.1923.

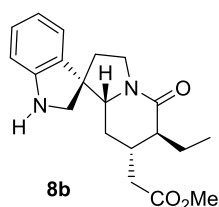


(1'S,7'R,8a'R)-7'-(Methoxycarbonylmethyl)-5'-oxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (8a).

Sodium dihydrogen phosphate (771 mg, 6.42 mmol) and sodium amalgam (5% Na, 1.8 g, 3.91 mmol) were added at 0 °C under an inert atmosphere to a stirred solution of spiro compound **7a**³ (73 mg, 0.16 mmol) in MeOH (7 mL). After stirring for 15 min at 0 °C, EtOAc was added (20 mL) and the solution was washed with 10% NaHCO₃. The aqueous layer was further extracted with EtOAc, and the combined organic extracts were rinsed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (1:3 hexane-EtOAc) of the resulting residue afforded the deprotected indoline **8a** (35 mg, 70%): IR (KBr): 3315

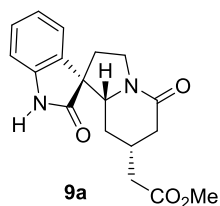
³ Amat, M.; Ramos, C.; Pérez, M.; Molins, E.; Florindo, P.; Santos, M. M. M.; Bosch, J. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 1954.

(NH), 1632, 1732 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.85 (q, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-14), 1.92 (m, 1H, H-14), 2.02 (m, 1H, H-20), 2.22 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.26 (m, 1H, H-20), 2.35 (m, 1H, H-15), 2.55 (ddd, $J = 17.6, 5.6, 2.0$ Hz, 1H, H-6), 3.51 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2), 3.57 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2), 3.54-3.66 (m, 2H, H-3, H-5), 3.63 (s, 3H, CH_3O), 3.87 (m, 1H, H-5), 6.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-12), 6.70 (td, $J = 7.6, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.77 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.08 (td, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H, H_{AR}); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 29.8 (C-15), 30.0 (C-14), 35.7 (C-20), 37.5 (C-6), 39.9 (CH_2CO), 43.3 (C-5), 51.6 (CH_3O), 54.6 (C-7), 55.2 (C-2), 65.7 (C-3), 109.8 (CH_{AR}), 119.2 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 128.4 (CH_{AR}), 130.6 (C_{AR}), 151.2 (C_{AR}), 168.2 (NCO), 172.1 (COO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}]^+$: 315.1703, found: 315.1707.



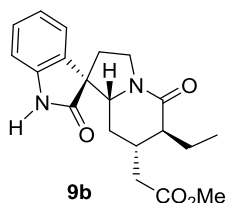
(1'S,6'S,7'S,8a'R)-6'-Ethyl-7'-(methoxycarbonylmethyl)-5'-oxospiro[indoline-3,1'-indolizidine]

(8b). Operating as above, from a cooled (0 °C) solution of spiro compound **7b**³ (47 mg, 0.097 mmol) in MeOH (4 mL), NaH_2PO_4 (467 mg, 3.9 mmol), and sodium amalgam (5% Na, 896 mg, 1.95 mmol), deprotected indole derivative **8b** (32 mg, 96%) was obtained after flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc): $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +36.8$ (c 0.6 in CHCl_3); IR (KBr): 3275 (NH), 1736, 1623 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.83 (q, $J = 12.4, 12.4, 12.4$ Hz, 1H, H-14), 0.88 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH_3 ethyl), 1.55 (m, 1H, CH_2 ethyl), 1.94 (dt, $J = 12.4, 3.2, 3.2$ Hz, 1H, H-14), 1.98-2.05 (m, 2H, H-20, H-6), 2.03 (dd, $J = 16.0, 9.6$ Hz, 1H, CH_2CO_2), 2.14 (m, 1H, CH_2 ethyl), 2.19-2.28 (m, 1H, H-15), 2.22 (ddd, $J = 12.4, 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H-6), 2.49 (dd, $J = 16.0, 3.4$ Hz, 1H, CH_2CO_2), 3.53 (s, 2H, H-2), 3.53-3.65 (m, 2H, H-3, H-5), 3.63 (s, 3H, CH_3O), 3.90 (ddd, $J = 12.4, 10.8, 8.0$ Hz, 1H, H-5), 6.65 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.68 (td, $J = 7.4, 7.4, 1.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.76 (dd, $J = 7.4, 0.9$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.07 (td, $J = 7.6, 7.6, 1.4$ Hz, 1H, H_{AR}); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 9.7 (CH_3 ethyl), 21.4 (CH_2 ethyl), 30.0 (C-14), 32.1 (C-15), 36.1 (C-6), 38.7 (CH_2CO_2), 43.8 (C-5), 47.1 (C-20), 51.6 (CH_3O), 55.0 (C-7), 55.2 (C-2), 64.7 (C-3), 109.9 (CH_{AR}), 119.1 (CH_{AR}), 124.1 (CH_{AR}), 128.4 (CH_{AR}), 130.6 (C_{AR}), 151.2 (C_{AR}), 170.7 (NCO), 172.7 (COO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}]^+$: 343.2022, found: 343.2017.



(1'R,7'R,8a'R)-7'-(Methoxycarbonylmethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (9a).

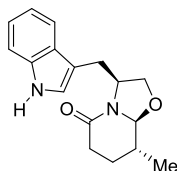
Operating as described for the preparation of oxindole **5**, from a solution of lactam **8a** (35 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) and iodosobenzene (2 x 245 mg, 2 x 1.11 mmol), oxindole **9a** (25 mg, 71%) was obtained after flash chromatography (1:3 hexane-EtOAc): ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC) δ 0.69 (q, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-14), 1.65 (dm, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-14), 1.93 (dd, *J* = 17.2, 11.2 Hz, 1H, H-20), 2.09 (ddd, *J* = 12.4, 8.4, 0.8 Hz, 1H, H-6), 2.14 (dd, *J* = 15.2, 7.6 Hz, 1H, CH₂CO), 2.23 (dd, *J* = 15.2, 6.4 Hz, 1H, CH₂CO), 2.35 (m, 1H, H-15), 2.52 (q, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-6), 2.61 (dd, *J* = 17.2, 3.6 Hz, 1H, H-20), 3.63 (s, 3H, CH₃O), 3.81 (t, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-5), 3.98 (tm, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-5), 4.03 (dd, *J* = 12.4, 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.92, 7.05 (2m, 3H, H_{AR}), 7.26 (m, 1H, H_{AR}), 7.46 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 29.7 (C-14), 32.0 (C-15), 33.5, 38.8 (C-20, C-6), 44.4 (CH₂CO), 47.0 (C-5), 51.7 (CH₃O), 57.2 (C-7), 64.0 (C-3), 110.3 (CH_{AR}), 123.0 (CH_{AR}), 123.9 (CH_{AR}), 128.6 (CH_{AR}), 129.7 (C_{AR}), 140.0 (C_{AR}), 169.5 (NCO), 172.3 (COO), 177.3 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₈H₂₁N₂O₄ + H]⁺: 329.1496, found: 329.1509.



(1'R,6'S,7'S,8a'R)-6'-Ethyl-7'-(methoxycarbonylmethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-

indolizidine] (9b). Operating as described for the preparation of oxindole **5**, from a solution of spiro compound **8b** (70 mg, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) and iodosobenzene (2 x 539 mg, 2 x 2.45 mmol), oxindole **9b** (51 mg, 71%) was obtained after flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc): IR (KBr): 1729, 1630, 1617 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, COSY, HSQC) δ 0.81 (q, *J* = 12.3, 12.3, 12.3 Hz, 1H, H-14), 0.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃ ethyl), 1.58 (m, 1H, CH₂ ethyl), 1.68 (dt, *J* = 12.3, 3.0, 3.0 Hz, 1H, H-14), 1.98 (dd, *J* = 15.6, 9.9 Hz, 1H, CH₂CO), 2.04-2.26 (m, CH₂ ethyl, 4H, H-6, H-15, CH₂CO), 2.44-2.57 (m, 2H, H-20, H-6), 3.60 (s, 3H, CH₃O), 3.81 (t, *J* = 11.4 Hz, 1H, H-5), 4.01 (dd, *J* = 11.4, 7.8 Hz, 1H, H-5), 4.05 (m, 1H, H-3), 6.91 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{AR}), 6.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.03 (td, *J* = 7.6, 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.26 (t, *J* = 7.2, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 8.35 (br s, 1 H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 9.6 (CH₃ ethyl), 21.6 (CH₂ ethyl), 29.7

(C-14), 32.0 (C-15), 33.5 (C-6), 38.7 (CH₂CO₂), 44.4 (C-20), 47.0 (C-5), 51.7 (CH₃O), 57.2 (C-7), 63.6 (C-3), 110.3 (CH_{AR}), 123.0 (CH_{AR}), 123.9 (CH_{AR}), 128.6 (CH_{AR}), 129.7 (C_{AR}), 140.0 (C_{AR}), 170.9 (NCO), 172.2 (COO), 177.3 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₂₀H₂₄N₂O₄ + H]⁺: 357.1809, found: 357.1807.

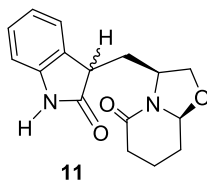


(3*S*,8*R*,8*aS*)-3-(3-Indolylmethyl)-8-methyl-5-oxo-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-

a]pyridine (10c). A three-necked flask, fitted with a Dean-Stark apparatus, was charged with (S)-tryptophanol (1.67 g, 8.8 mmol), toluene (115 mL), and methyl 4-methyl-5-oxopentanoate⁴ (1.9 g, 13.2 mmol). After refluxing for 16 h, the mixture was allowed to cool to room temperature and decanted. The solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (2:8 hexane-EtOAc) of the resulting residue gave lactam **10c** (1.43 g, 55%) and its 8*R*,8*aS* diastereomer **10c'** (220 mg, 11%). **Lactam 10c**: [α]_D²² = – 80.3 (c 0.97 in CHCl₃); IR (KBr): 3269 (NH), 1631 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.38-1.49 (m, 1H, H-7), 1.65-1.75 (m, 1H, H-8), 1.87-1.89 (m, 1H, H-7), 2.47-2.50 (m, 2H, H-6), 2.64 (dd, *J* = 13.8, 10.5 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.63-3.67 (m, 1H, H-2), 3.75 (td, *J* = 13.9, 1.3 Hz 1H, CH₂-Ind), 4.02 (dd, *J* = 9.5, 10.5 Hz, 1H, H-2), 4.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-8*a*), 4.28-4.32 (m, 1H, H-3), 7.01 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{AR}), 7.13 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.19 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.35 (d, *J* = 8.0, Hz, 1H, H_{AR}), 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 8.33 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 16.5 (CH₃), 26.7 (C-7), 26.9 (CH₂-Ind) 31.5 (C-6), 34.7 (C-8), 56.4 (C-3), 69.8 (C-2), 93.6 (C-8*a*), 111.0 (CH_{AR}), 112.5 (C_{AR}), 119.3 (CH_{AR}), 119.5 (CH_{AR}), 122.1 (CH_{AR}), 122.4 (CH_{AR}), 127.6 (C_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 168.0 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₇H₂₀N₂O₂ + H]⁺: 285.1598, found: 285.1599. **Lactam 10c'**: [α]_D²² = + 19.5 (c 0.99 in CHCl₃); IR (film): 3270 (NH), 1631 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.04 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.31-1.42 (m, 1H, H-7), 1.53 (m, 1H, H-8), 1.69-1.75 (m, 1H, H-7), 2.37 (ddd, *J* = 18.4, 12.0, 6.8 Hz, 1H, H-6), 2.54 (dd, *J* = 18.4, 6.0 Hz, 1H, H-6), 3.01 (dd, *J* = 14.4, 8.4 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.34 (ddd, *J* = 14.4, 3.6, 0.8 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.67 (dd, *J* = 8.8, 7.2 Hz, 1H, H-2), 4.04 (dd, *J* = 8.8, 7.6 Hz, 1H, H-2), 4.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8*a*), 4.61 (qd, *J* = 7.6, 3.6 Hz, 1H, H-3), 7.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{AR}), 7.12 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.19 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.35 (d, *J* = 8.0, Hz, 1H, H_{AR}),

⁴ Amat, M.; Guignard, G.; Llor, N.; Bosch, J. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 2792.

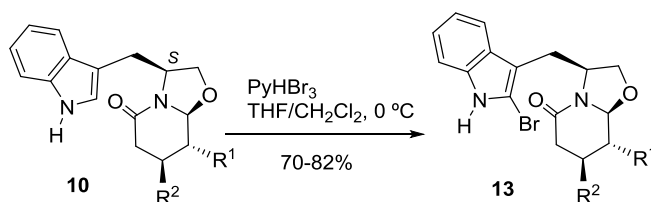
7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.19 (br. s, 1H, NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz) δ 17.0 (CH_3), 25.9 (C-7), 27.4 (CH_2 -Ind), 31.6 (C-6), 34.6 (C-8), 54.8 (C-3), 69.7 (C-2), 92.3 (C-8a), 111.0 (CH_{AR}), 111.3 (C_{AR}), 119.2 (CH_{AR}), 119.6 (CH_{AR}), 122.2 (CH_{AR}), 122.4 (CH_{AR}), 127.7 (C_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 168.6 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[C_{17}H_{20}N_2O_2 + H]^+$: 285.1598, found: 285.1597.



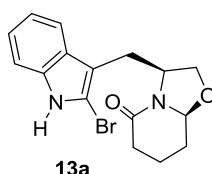
(3S,8aS)-3-[(1,2-Dihydro-2-oxo-3-indolyl)methyl]-5-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahydro-5H-

oxazolo[3,2-a]pyridine (11). NCS (61 mg, 0.456 mmol) was added at room temperature to a stirred solution of lactam **10a**² (112 mg, 0.414 mmol) in formic acid (1.1 mL, 29.8 mmol) and acetic acid (3.8 mL, 66.3 mmol), showing a color change (from orange to red). After 3 h of stirring at room temperature, the mixture was concentrated under reduce pressure. Flash chromatography (3:7 hexane-EtOAc) of the residue afforded inseparable lactams **11** (ratio 6:4, 97 mg, 82%): IR (film): 3212 (NH), 1714, 1621 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, COSY, g -HSQC) δ 1.38-1.51 (m, 2H, H-8 maj, min), 1.59-1.69 (m, 2H, H-7 maj, min), 1.85 (m, 2H, H-7 maj, min), 1.91 (ddd, $J = 14.1, 7.8, 5.7$ Hz, 1H, CH_2 -Ind maj), 2.08 (ddd, $J = 14.4, 7.5, 6.9$ Hz, 1H, CH_2 -Ind min), 2.17-2.32 (m, 4H, H-6 maj, min, H-8 maj, min), 2.37-2.43 (m, 2H, H-6 maj, min), 2.54 (m, 2H, CH_2 -Ind maj, min), 3.54-3.67 (m, 4H, H-2 maj, min, H-3 Ind maj, min), 4.13 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-2 maj), 4.29 (dd, $J = 9.0, 7.5$ Hz, 1H, H-2 min), 4.64 (m, 2H, H-3 maj, min), 4.74 (dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz, 1H, H-8a min), 4.85 (dd, $J = 8.4, 4.5$ Hz, 1H, H-8a maj), 6.88 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H_{AR} maj, min), 7.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{AR} maj, min), 7.17-7.25 (m, 3H, H_{AR} maj, min), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_{AR} maj), 9.00 (br. s, 2H, NH maj, min). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.6 MHz) δ 16.7 (C-7 maj), 16.8 (C-7 min), 28.0 (C-8 maj), 28.1 (C-8 min), 31.2 (C-6 min), 31.3 (C-6 maj), 33.6 (CH_2 -Ind min), 33.9 (CH_2 -Ind maj), 43.6 (C-3 Ind maj), 43.7 (C-3 Ind min), 51.8 (C-3 maj), 53.0 (C-3 min), 70.2 (C-2 maj), 70.7 (C-2 min), 86.6 (C-8a maj), 86.8 (C-8a min), 109.7 (CH_{AR} maj), 109.9 (CH_{AR} min), 122.3 (CH_{AR} min), 122.4 (CH_{AR} maj), 124.0 (CH_{AR} min), 124.9 (CH_{AR} maj), 128.0 (CH_{AR} maj), 128.1 (CH_{AR} min), 129.1 (C_{AR} min), 129.2 (C_{AR} maj), 141.4 (C_{AR} maj), 141.5 (C_{AR} min), 169.1 (NCO min), 169.7 (NCO maj), 179.8 (NCO min), 180.0 (NCO maj). HRMS (ESI) calcd for $[C_{16}H_{18}N_2O_3 + H]^+$: 287.1390, found: 287.1392; HRMS (ESI) calcd for $[C_{16}H_{18}N_2O_3 + H]^+$: 287.139, found: 287.139.

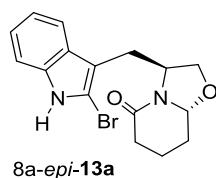
General PyHBr₃-bromination procedure:



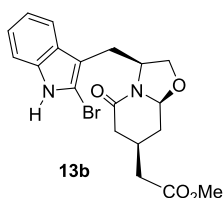
A solution of pyridinium tribromide (1.2-1.6 equiv) in anhydrous THF (0.15 M) was added via a dropping funnel under an inert atmosphere at 0 °C to a stirred solution of tryptophan-derived lactam **10** (1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (0.15 M). Aqueous saturated Na₂S₂O₃ and aqueous saturated NaHCO₃ (0.6 mL) were immediately added, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic extracts were dried, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc) afforded the corresponding bromo derivative **13**. Minor amounts of the oxindole byproduct were also detected.



(3S,8aS)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-5-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahydro-5H-oxazolo[3,2-a]pyridine (13a). Operating as in the general PyHBr₃-bromination procedure, from pyridinium tribromide (2.13 g, 8.88 mmol, 1.6 equiv) in anhydrous THF (35 mL) and a solution of lactam **10a**² (1.5 g, 5.55 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (35 mL), bromo derivative **13a** (1.68 g, 82%) was obtained: IR (KBr): 3182 (NH), 1625 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.50-1.60 (m, 1H, H-8), 1.64-1.76 (m, 1H, H-7), 2.00 (m, 1H, H-7), 2.28 (ddd, *J* = 11.7, 7.2, 3.6 Hz, 1H, H-8), 2.43-2.47 (m, 2H, H-6), 2.69 (dd, *J* = 14.1, 10.8 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.64-3.71 (m, 1H, CH₂-Ind), 7.08 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-2), 4.33 (m, 1H, H-3), 4.68 (dd, *J* = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H-2), 7.11-7.21 (m, 2H, H_{AR}), 7.28 (dm, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.83 (dm, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{AR}), 8.20 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 17.5 (C-7), 26.6 (CH₂-Ind), 28.4 (C-8), 31.0 (C-6), 55.6 (C-3), 69.9 (C-2), 89.0 (C-8a), 108.7 (C-Br), 110.3 (CH_{AR}), 112.4 (C_{AR}), 118.9 (CH_{AR}), 120.4 (CH_{AR}), 122.6 (CH_{AR}), 128.0 (C_{AR}), 136.1 (C_{AR}), 168.0 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₆H₁₇BrN₂O₂ + Na]⁺: 371.0366, found: 371.0367.

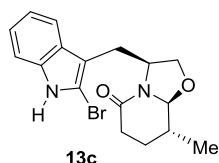


(3*S*,8*aR*)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-5-oxo-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (8a-epi-13a). Operating as in the general PyHBr₃-bromination procedure, from a solution of lactam **8a-epi-10a**² (315 mg, 1.16 mmol) in CH₂Cl₂ (7 mL) and a solution of pyridinium tribromide (522 mg, 1.63 mmol) in THF (7 mL), bromo derivative **8a-epi-13a** (256 mg, 63%) was obtained: IR (KBr): 3210 (NH), 1628 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.28-1.43 (m, 1H, H-8), 1.48-1.60 (m, 1H, H-7), 1.85 (m, 1H, H-7), 2.28 (dm, *J* = 12.3 Hz, 1H, H-8), 2.32 (ddd, *J* = 18.0, 11.4, 6.3 Hz, 1H, H-6), 2.54 (dd, *J* = 18.0, 6.0 Hz, 1H, H-6), 3.09 (dd, *J* = 14.1, 8.1 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.25 (dd, *J* = 14.1, 3.6 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.74 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 1H, H-2), 4.05 (dd, *J* = 8.7, 7.5 Hz, 1H, H-2), 4.45 (dd, *J* = 9.3, 4.5 Hz, 1H, H-8*a*), 4.67 (qd, *J* = 8.1, 8.1, 8.1, 3.6 Hz, 1H, H-3), 7.11 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.17 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.27 (dm, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.65 (dm, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{AR}), 8.32 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 17.0 (C-7), 26.8 (CH₂-Ind), 28.0 (C-8), 31.4 (C-6), 54.5 (C-3), 69.1 (C-2), 87.2 (C-8*a*) 109.3 (C-Br), 110.5 (CH_{AR}), 110.7 (C_{AR}), 118.5 (CH_{AR}), 120.0 (CH_{AR}), 122.3 (CH_{AR}), 127.9 (C_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 169.1 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₆H₁₇BrN₂O₂ + H]⁺: 349.0546, found: 349.0539.

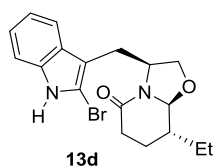


(3*S*,7*R*,8*aS*)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-7-(methoxycarbonylmethyl)-5-oxo-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (13b). Operating as in the general PyHBr₃-bromination procedure, from a solution of lactam **10b**³ (727 mg, 2.12 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (14 mL) and a solution of pyridinium tribromide (951 mg, 2.97 mmol, 1.2 equiv) in anhydrous THF (14 mL), bromo derivative **13b** (626 mg, 70%) was obtained: [α]_D²² = -74.1 (*c* 1.4 in CHCl₃); IR (KBr): 3171 (NH), 1630, 1734 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.31-1.40 (qm, *J* = 11.6 Hz, 1H, H-8), 2.17 (dd, *J* = 17.6, 10.4 Hz, 1H, H-6), 2.32 (dm, *J* = 11.6 Hz, 1H, H-8), 2.37 (m, 1H, H-7), 2.40 (s, 2H, CH₂CO₂), 2.65 (dd, *J* = 17.6, 4.8 Hz, 1H, H-6), 2.69 (dd, *J* = 14.0, 10.4 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.65-3.69 (m, 2H, CH₂-Ind, H-2), 3.71 (s, 3H, CH₃O), 4.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-2), 4.29 (ddd, *J* = 9.6, 6.8, 3.2 Hz, 1H, H-3), 4.72 (dd, *J* = 10.0, 3.2 Hz, 1H, H-8*a*), 7.11 (td, *J* = 8.0,

0.8 Hz, 1 H, H_{AR}), 7.16 (td, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1 H, H_{AR}), 7.27 (dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1 H, H_{AR}), 7.78 (dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1 H, H_{AR}), 8.59 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 26.4 (CH₂-Ind), 27.2 (C-7), 34.4 (C-8), 37.6 (C-6), 40.1 (CH₂CO), 51.8 (CH₃O), 55.5 (C-3), 70.2 (C-2), 88.3 (C-8a), 108.8 (C-Br), 110.4 (CH_{AR}), 112.0 (C_{AR}), 118.5 (CH_{AR}), 120.3 (CH_{AR}), 122.5 (CH_{AR}), 127.9 (C_{AR}), 136.1 (C_{AR}), 166.8 (NCO), 171.8 (COO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₉H₂₂BrN₂O₄ + Na]⁺: 421.0757, found: 421.0734.



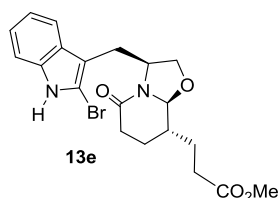
(3S,8R,8aS)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-8-methyl-5-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahydro-5H-oxazolo[3,2-a]pyridine (13c). Operating as in the general PyHBr₃-bromination procedure, from a solution of lactam **10c** (400 mg, 1.4 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (9 mL) and a solution of pyridinium tribromide (538 mg, 1.68 mmol, 1.2 equiv) in anhydrous THF (9 mL), the bromo-compound **13c** was obtained (360 mg, 71%) as a white powder: IR (KBr): 3250 (NH), 1615 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.12 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.39-1.58 (m, 1H, H-7), 1.71-1.81 (m, 1H, H-8), 1.87-1.91 (m, 1H, H-7), 2.49-2.54 (m, 2H, H-6), 2.65 (dd, *J* = 13.6, 10.0 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.61-3.64 (m, 1H, H-2), 3.69 (dd, *J* = 14.0, 1.2 Hz, 1H, CH₂-Ind), 4.06 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-2), 4.27 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-8a), 4.34 (qd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 1H, H-3), 7.09 (td, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.14 (td, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.82 (d, *J* = 8.0, Hz, 1H, H_{AR}), 8.88 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 16.5 (CH₃), 26.5 (CH₂-Ind), 26.7 (C-7), 31.5 (C-6), 34.6 (C-8), 55.9 (C-3), 69.9 (C-2), 93.6 (C-8a), 108.8 (C-Br), 110.4 (CH_{AR}), 112.1 (C_{AR}), 118.8 (CH_{AR}), 120.2 (CH_{AR}), 122.3 (CH_{AR}), 127.9 (C_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 168.2 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₇H₁₉BrN₂O₂ + H]⁺: 363.0703, found: 363.0705.



(3S,8R,8aS)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-8-ethyl-5-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahydro-5H-oxazolo[3,2-a]pyridine (13d). Operating as in the general PyHBr₃-bromination procedure, from a solution of lactam **10d**⁵ (187 mg, 0.627 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) and a solution of pyridinium tribromide (281 mg, 0.877 mmol, 1.4 equiv) in anhydrous THF (4 mL), bromo

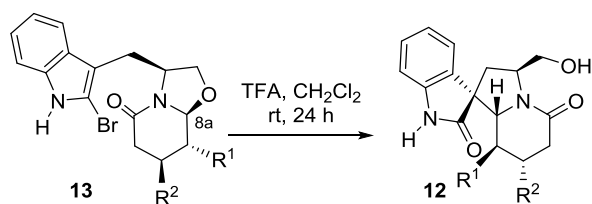
⁵ Amat, M.; Santos, M. M. M.; Bassas, O.; Llor, N.; Escolano, C.; Gómez-Esqué, A.; Molins, E.; Allin, S. M.; McKee, V.; Bosch, J. J. *Org. Chem.* **2007**, *72*, 5193.

derivative **13d** (171 mg, 72%) was obtained. IR (KBr): 3171 (NH), 1629 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.00 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.22-1.33 (m, 1H, CH_2CH_3), 1.34-1.43 (m, 1H, H-8), 1.54-1.61 (m, 1H, H-7), 1.76-1.85 (m, 1H, CH_2CH_3), 1.99-2.06 (m, 1H, H-7), 2.48 (m, 2H, H-6), 2.64 (dd, $J = 13.6, 10.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.64 (ddd, $J = 9.6, 5.6, 1.6$ Hz, 1H, H-2), 3.68 (ddd, $J = 13.6, 2.4, 1.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 4.06 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2), 4.32 (m, 1H, H-3), 4.34 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-8a), 7.13 (td, $J = 6.8, 1.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.18 (td, $J = 6.8, 1.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.27 (br. s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 10.8 (CH_3), 23.5 (C-7), 24.0 (CH_2CH_3), 26.6 ($\text{CH}_2\text{-Ind}$), 31.5 (C-6), 41.0 (C-8), 55.8 (C-3), 70.0 (C-2), 92.6 (C-8a), 108.6 (C-Br), 110.3 (CH_{AR}), 112.5 (C_{AR}), 119.0 (CH_{AR}), 120.3 (CH_{AR}), 122.5 (CH_{AR}), 128.0 (C_{AR}), 136.1 (C_{AR}), 168.1 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 377.0859, found: 377.0839.

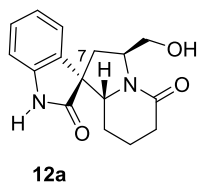


(3*S*,8*S*,8a*S*)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-8-[(2-methoxycarbonyl)ethyl]-5-oxo-2,3,6,7,8a-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (13e**).** Operating as in the general PyHBr_3 -bromination procedure, from a solution of lactam **10e** (200 mg, 0.56 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (4 mL) and a solution of pyridinium tribromide (214 mg, 0.673 mmol, 1.2 equiv) in anhydrous THF (4 mL), bromo derivative **13d** (170 mg, 70%) was obtained: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -61.88$ (c 0.26 in CHCl_3); IR (KBr): 3181 (NH), 1628, 1733 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, HSQC, COSY) δ 1.46 (m, 1H, H-1'), 1.62-1.69 (m, 2H, H-7, H-8), 1.92- 2.05 (m, 2H, H-7, H-1'), 2.52 (m, 4H, H-6, H-2'), 2.65 (dd, $J = 13.8, 10.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.63 (m, 2H, H-2, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.69 (s, 3H, CH_3O), 4.05 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-2), 4.31 (m, 1H, H-3), 4.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-8a), 7.11 (td, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.16 (td, $J = 7.2, 1.3$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (dd, $J = 7.7, 0.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.82 (dd, $J = 7.2, 0.5$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.64 (br s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 24.3 (C-1'), 26.5 (C-7), 27.0 ($\text{CH}_2\text{-Ind}$), 31.2, 31.4 (C-6, C-2'), 39.0 (C-8), 51.7 (CH_3O), 55.7 (C-3), 70.0 (C-2), 92.7 (C-8a), 108.8 (C-Br), 110.4 (CH_{AR}), 112.1 (C_{AR}), 118.8 (CH_{AR}), 120.2 (CH_{AR}), 122.4 (CH_{AR}), 127.9 (C_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 167.9 (NCO), 173.8 (COO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br} + \text{H}]^+$: 435.0913, found: 435.0899.

General TFA-spirocyclization from 2-bromoindoles



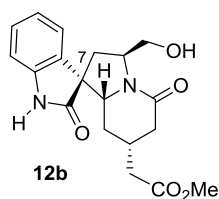
TFA (20-25 equiv) was added at room temperature and under an inert atmosphere to a solution of the bromo-lactam **13** (1 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (0.06 M). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight and then concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (1:1 to 1:9 hexane-EtOAc) gave the corresponding spirooxindole **12** as a pale foam.



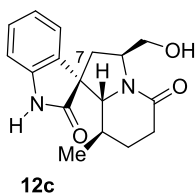
(1'*R*,3'*S*,8a'*R*)-3'-(Hydroxymethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (**12a**).

From bromo lactam 13a: Operating as in the general TFA-spirocyclization procedure, from a solution of bromo-lactam **13a** (1.4 g, 4.0 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (60 mL) and TFA (5.9 g, 50.0 mmol), spirooxindole **12a** (1.0 g, 87%) was obtained after flash chromatography (silica previously washed with triethylamine). *From bromo lactam 8a-epi-13a:* Operating as in the general TFA-spirocyclization procedure, from a solution of lactam 8a-epi-**13a** (191 mg, 547 μmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (11 mL) and TFA (1.9 g, 17 mmol), spirooxindole **12a** (119 mg, 76%) was obtained: $[\alpha]_D^{22} = +96.29$ (c 0.52 in CHCl₃); IR (KBr): 3213 (NH, OH), 1715, 1615 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 0.88 (qd, *J* = 13.2, 3.6 Hz, 1H, H-14), 1.65-1.83 (m, 3H, 2H-15, H-14), 2.12 (dd, *J* = 13.2, 10.4 Hz, 1H, H-6), 2.19 (dd, *J* = 13.2, 8.4 Hz, 1H, H-6), 2.25 (m, 1H, H-20), 2.54 (dd, *J* = 17.6, 4.4 Hz, 1H, H-20), 3.19 (br.s, 1H, OH), 3.85 (m, 2H, CH₂OH), 4.01 (dd, *J* = 11.2, 4.4 Hz, 1H, H-3), 4.66 (m, 1H, H-5), 6.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{AR}), 6.97 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.07 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 8.38 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 19.6 (C-15), 23.5 (C-14), 31.3 (C-20), 36.5 (C-6), 56.3 (C-7), 60.4 (C-5), 65.1 (C-3), 67.0 (CH₂OH), 110.4 (CH_{AR}), 123.2 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 128.8 (CH_{AR}), 129.5 (C_{AR}), 140.0 (C_{AR}), 172.3 (NCO), 177.0 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₆H₁₈N₂O₃ + H]⁺: 287.1390, found: 287.1387. *From a mixture of oxindoles 11:* EtOH-HCl (1 mL of a solution 1.25 M, 10.1 mmol) was added to a solution of oxindoles **11** (91 mg, 0.318 mmol) in EtOH (1 mL) and the mixture was stirred at 40 °C for 72 h. The solvent was concentrated under reduced pressure, and a

saturated solution of NaHCO₃ was added to the residue. The mixture was extracted with ethyl acetate, and the combined organic extracts were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (hexane to EtOAc) of the residue gave the spiro compounds **12a** and 7-*epi*-**12a** (66 mg, 73%, ratio 6:4). Spirooxindole 7-*epi*-**12a**: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.35 (qd, *J* = 13.2, 3.2 Hz, 1H, H-14), 1.63 (m, 2H, H-15, H-14), 1.86 (dd, *J* = 13.2, 10.0 Hz, 1H, H-6), 1.89 (m, 1H, H-15), 2.32 (m, 1H, H-20), 2.39 (dd, *J* = 13.2, 8.0 Hz, 1H, H-6), 2.53 (dd, *J* = 18.0, 5.2 Hz, 1H, H-20), 3.74 (dd, *J* = 11.2, 8.0 Hz, 1H, CH₂OH), 3.85 (dm, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-3), 3.90 (dd, *J* = 11.2, 4.0 Hz, 1H, CH₂OH), 4.80 (m, 1H, H-5), 5.52 (br. s, 1H, OH), 6.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.08 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.27 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 8.18 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 20.1 (C-15), 23.5 (C-14), 31.3 (C-20), 36.0 (C-6), 55.6 (C-7), 60.3 (C-5), 66.1 (C-3), 67.0 (CH₂OH), 110.0 (CH_{AR}), 122.5 (CH_{AR}), 122.8 (CH_{AR}), 127.6 (C_{AR}), 129.0 (CH_{AR}), 141.1 (C_{AR}), 172.0 (NCO), 178.5 (NCO).



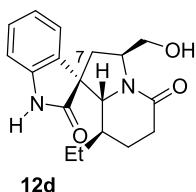
(1'R,3'S,7'R,8a'R)-3'-(Hydroxymethyl)-7'-(methoxycarbonylmethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (12b). Operating as in the general TFA-spirocyclization procedure, from a solution of bromo-lactam lactam **13b** (556 mg, 1.32 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (25 mL) and TFA (3.15 mL, 40.9 mmol), spirooxindole **12b** (337 mg, 71%) was obtained after flash chromatography (silica previously washed with triethylamine): [α]_D²² = -46.1 (*c* 1.0 in CHCl₃); IR (KBr): 3401 (NH, OH), 1617, 1724 (CO) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 0.70 (q, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-14), 1.71 (dm, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-14), 1.96 (dd, *J* = 18.0, 12.0 Hz, 1H, H-20), 2.14-2.26 (m, 4H, H-6, CH₂CO), 2.39 (m, 1H, H-15), 2.67 (ddd, *J* = 18.0, 3.6, 1.2 Hz, 1H, H-20), 3.63 (s, 3H, CH₃O), 3.82 (dd, *J* = 12.0, 2.4 Hz, 1H, CH₂OH), 3.89 (dd, *J* = 12.0, 7.2 Hz, 1H, CH₂OH), 4.10 (dd, *J* = 12.4, 4.4 Hz, 1H, H-3), 4.64 (m, 1H, H-5), 6.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.06 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 9.02 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 29.0 (C-15), 29.6 (C-14), 36.7 (C-6), 37.5 (C-20), 39.6 (CH₂CO), 51.7 (CH₃O), 53.2 (C-7), 60.0 (C-5), 64.5 (C-3), 66.5 (CH₂OH), 110.7 (CH_{AR}), 123.2 (CH_{AR}), 123.5 (CH_{AR}), 128.9 (CH_{AR}), 129.4 (C_{AR}), 140.3 (C_{AR}), 170.9 (NCO), 171.6 (COO), 177.2 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₉H₂₂N₂O₅ + Na]⁺: 359.1601, found: 359.1601.



(1'R,3'S,8'R,8a'R)-3'-(Hydroxymethyl)-8'-methyl-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine]

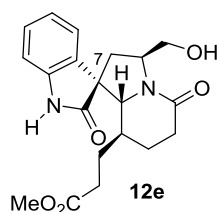
(12c). Operating as in the general TFA-spirocyclization procedure, from a solution of bromo-lactam lactam **13c** (150 mg, 0.413 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (9 mL) and TFA (800 μl, 10.5 mmol), spiro-oxindoles **12c** (65 mg, 53%) and 7-*epi*-**12c**⁶ (9 mg, 8%) were obtained after storage for 48 h and flash chromatography (hexane to EtOAc). Spiro-lactam **12c** [major isomer, (7R)¹]: [α]_D²² = – 59.5 (c 0.88 in CHCl₃/MeOH 1:1); IR (film): 3341 (NH, OH), 1705, 1618 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃), 1.33 (m, 1H, H-14), 1.65-1.73 (m, 2H, H-15), 2.36 (ddd, *J* = 18.6, 12.0, 7.2 Hz, 1H, H-20), 2.54 (ddd, *J* = 18.6, 4.8, 1.6 Hz, 1H, H-20), 2.58 (dd, *J* = 12.8, 9.6 Hz, 1H, H-6), 3.80 (dd, *J* = 11.6, 3.6 Hz, 1H, CH₂OH), 3.81 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-3), 4.05 (dd, *J* = 11.6, 4.4 Hz, 1H, CH₂OH), 4.50 (m, 1H, H-5), 6.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.13 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.36 (td, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}); ¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz) δ 17.6 (CH₃), 30.1 (C-15), 32.7 (C-20), 33.0 (C-14), 38.4 (C-6), 57.5 (C-7), 59.4 (C-5), 62.8 (CH₂OH), 72.4 (C-3), 111.6 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 124.7 (CH_{AR}), 129.8 (CH_{AR}), 131.7 (C_{AR}), 142.5 (C_{AR}), 172.7 (NCO), 180.2 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₇H₂₀N₂O₃ + H]⁺: 301.1547, found: 301.1557. Spiro-lactam 7-*epi*-**12c** [minor isomer, (7S)⁶]: ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 0.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃), 1.59 (td, *J* = 12.8, 6.0 Hz, 1H, H-15), 2.28-2.36 (m, 2H, H-15, H-14), 2.27-2.40 (m, 3H, 2H-6, H-20), 2.46 (d, *J* = 17.6, 4.8 Hz, 1H, H-20), 3.73-3.77 (dd, *J* = 11.6, 4.0 Hz, 1H, CH₂OH), 3.79-3.82 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-3), 4.05 (dd, *J* = 11.6, 4.0 Hz, 1H, CH₂OH), 4.53 (m, 1H, H-5), 6.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.09 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.28 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}); ¹³C NMR (CD₃OD, 100.6 MHz) δ 18.1 (CH₃), 30.8 (C-15), 32.5 (C-20), 33.2 (C-14), 37.3 (C-6), 57.2 (C-7), 59.0 (C-5), 63.4 (CH₂OH), 72.7 (C-3), 110.9 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 124.0 (CH_{AR}), 129.8 (C_{AR}), 131.5 (C_{AR}), 143.1 (C_{AR}), 172.7 (NCO), 181.5 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₇H₂₀N₂O₃ + H]⁺: 301.1547, found: 301.1556.

⁶ Biogenetic numbering.



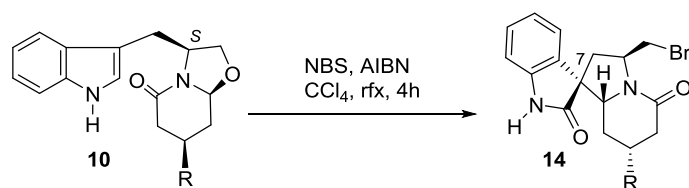
(1'*R*,3'*S*,8'*R*,8a'*R*)-8'-Ethyl-3'-(hydroxymethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine]

(12d). Operating as in the general TFA-spirocyclization procedure, from a solution of bromo-lactam lactam **13d** (111 mg, 0.294 mmol) and TFA (295 μ L, 3.82 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (6 mL), spirooxindoles **12d** (43 mg, 51%) and 7-*epi*-**12d**⁶ (20 mg, 17%) were obtained after flash chromatography (silica previously washed with triethylamine). Spiro-lactam **12d** [major isomer, (7*R*)¹]: IR (film): 3214 (NH, OH), 1712, 1616 (C=O) cm^{-1} ; ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, HSQC, COSY) δ 0.68 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.99-1.06 (m, 1H, CH_2CH_3), 1.13-1.23 (m, 2H, CH_2CH_3 , H-14), 1.46 (qd, $J = 13.2, 5.2$ Hz, 1H, H-15), 1.84 (dm, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-15), 2.09-2.12 (m, 2H, H-6), 2.33 (ddd, $J = 18.4, 12.8, 6.4$ Hz, 1H, H-20), 2.60 (dd, $J = 18.4, 4.4$ Hz, 1H, H-20), 3.81, 3.82 (2s, 2H, CH_2OH), 3.88 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H-3), 4.61 (m, 2H, H-5, OH), 6.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.06 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (td, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.75 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 10.1 (CH_3), 23.6 (CH_2CH_3), 24.6 (C-15), 31.5 (C-20), 37.7 (C-14), 38.0 (C-6), 55.7 (C-7), 59.9 (C-5), 67.0 (CH_2OH), 68.5 (C-3), 110.6 (CH_{AR}); 123.1 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 128.8 (CH_{AR}), 129.4 (C_{AR}), 140.0 (C_{AR}), 172.5 (NCO), 178.2 (NCO). Spiro-lactam 7-*epi*-**12d** [minor isomer, (7*S*)⁶]: ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, HSQC, COSY) δ 0.62 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.70 (m, 1H, CH_2CH_3), 0.80 (m, 1H, CH_2CH_3), 1.40 (qd, $J = 12.4, 5.6$ Hz, 1H, H-15), 1.64 (m, 1H, H-6), 1.64 (d, $J = 13.2, 10.4$ Hz, 1H, H-6), 1.91 (dm, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-15), 2.37-2.41 (m, 2H, H-14, H-20), 2.55 (dd, $J = 18.0, 4.8$ Hz, 1H, H-20), 3.72 (dd, $J = 11.6, 8.4$ Hz, 1H, CH_2OH), 3.79 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-3), 3.84 (m, 1H, CH_2OH), 4.71 (m, 1H, H-5), 5.40 (br. s, 1H, OH), 6.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.07 (td, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.26 (td, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.08 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 10.3 (CH_3), 23.6 (CH_2CH_3), 25.3 (C-15), 31.3 (C-20), 37.6 (C-14), 37.9 (C-6), 55.2 (C-7), 59.3 (C-5), 67.1 (CH_2OH), 68.8 (C-3), 110.0 (CH_{AR}), 122.5 (CH_{AR}), 128.9 (CH_{AR}), 129.5 (CH_{AR}), 129.5 (C_{AR}), 140.5 (C_{AR}), 172.5 (NCO), 178.4 (NCO).

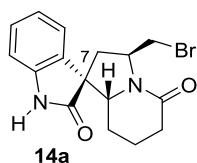


(1'R,3'S,8'S,8a'R)-3'-(Hydroxymethyl)-8'-[(2-methoxycarbonyl)ethyl]-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (12e). Operating as in the general TFA-spirocyclization procedure, from a solution of bromo-lactam **13e** (100 mg, 0.229 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL) and TFA (200 μL, 2.9 mmol), spirooxindoles **12e** (40 mg, 48%) and 7-*epi*-**12e**⁶ (10 mg, 12%) were obtained after storage for 48 h and flash chromatography (hexane to EtOAc). Spiro-lactam **12e** [major isomer, (7*R*)¹]: IR (film): 3341 (NH, OH), 1714, 1614 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, HSQC, COSY) δ 1.17-1.31 (m, 2H, H-1', H-14), 1.36-1.50 (m, 2H, H-1', H-15), 1.75 (dd, *J* = 13.6, 6.4 Hz, 1H, H-15), 1.97 (m, 1H, H-6), 2.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 2H-2'), 2.16 (qd, *J* = 8.4, 5.2 Hz, 1H, H-6), 2.26 (dq, *J* = 18.4, 6.4 Hz, 1H, H-20), 2.54 (dd, *J* = 18.4, 4.8 Hz, 1H, H-20), 3.39 (s, 3H, CH₃O), 3.71-3.75 (m, 2H, CH₂O), 3.80 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-3), 4.53 (m, 1H, H-5), 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 6.94-7.00 (m, 2H, H_{AR}), 7.22 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 24.9 (C-15), 26.0 (C-1'), 30.2 (C-6), 31.3 (C-20), 35.6 (C-14), 38.0 (C-2'), 51.6 (CH₃O), 55.6 (C-7), 59.9 (C-5), 66.7 (CH₂O), 68.3 (C-3), 110.7 (CH_{AR}), 123.0 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 128.8 (CH_{AR}), 129.2 (C_{AR}), 140.2 (C_{AR}), 172.0, 173.0 (NCO, COO), 177.8 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₂₀H₂₅N₂O₅ + H]⁺: 373.1758, found: 373.1767. Spiro-lactam 7-*epi*-**12e** [minor isomer, (7*S*)⁶]: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, HSQC, COSY) δ 0.90 (m, 1H, H-1'), 1.16 (m, 1H, H-1'), 1.42 (qd, *J* = 12.4, 5.6 Hz, 1H, H-15), 1.74 (m, 2H, H-6, H-15), 1.87 (dd, *J* = 14.0, 10.4 Hz, 1H, H-6), 2.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2H-2'), 2.37 (m 2H, H-14, H-20), 2.54 (ddd, *J* = 18.0, 5.2, 1.6 Hz, 1H, H-20), 3.54 (s, 3H, CH₃O), 3.72 (dd, *J* = 11.6, 7.6 Hz, 1H, CH₂O), 3.77 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-3), 3.82 (m, 1H, CH₂O), 4.71 (m, 1H, H-5), 6.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.07 (td, *J* = 7.6, 0.8 Hz, 1H, H_{AR}), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{AR}), 7.26 (td, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 8.30 (br. s, 1H NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 25.5 (C-15), 25.8 (C-1'), 30.2 (C-6), 31.0 (C-20), 31.9 (C-2'), 35.9 (C-14), 51.5 (CH₃O), 55.0 (C-7), 59.3 (C-5), 66.8 (CH₂O), 68.9 (C-3), 110.2 (CH_{AR}), 122.4 (CH_{AR}), 123.0 (CH_{AR}), 129.0 (CH_{AR}, C_{AR}), 140.5 (C_{AR}), 172.9 (NCO, COO), 184.0 (NCO).

General procedure for the direct generation of spirooxindoles

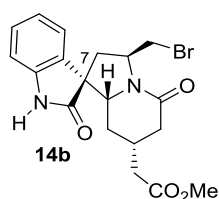


NBS (1.6 equiv) and AIBN (0.05 equiv) were added under an inert atmosphere in one portion to a refluxing solution of tryptophanol-derived lactam **10** (1 equiv) in anhydrous CCl_4 (0.25 M). The resulting mixture was heated to reflux for 4 h and then was cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (hexane to EtOAc) of the resulting residue afforded lactams **14** as a mixture of epimers at the spiranic stereocenter.



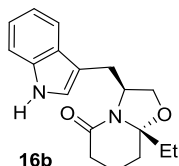
(1'R,3'S,8a'R)-3'-(Bromomethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (14a). Operating as in the above general procedure, from a solution of lactam **10a**² (131 mg, 0.485 mmol) in anhydrous CCl_4 (2 mL), NBS (138 mg, 0.775 mmol), and AIBN (4 mg, 0.024 mmol), lactam **14a** (47 mg, 28%) and its epimer 7-*epi*-**14a** (7 mg, 4%) were obtained. Spiro-compound **14a** [major isomer, (7R)⁶]: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +82.2$ (c 0.9 in CHCl_3); IR (film): 3215 (NH), 1716, 1616 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 0.86 (m, 1H, H-14), 1.65 (m, 1H, H-14), 1.71-1.81 (m, 2H, H-15), 2.18 (m, 1H, H-20), 2.27 (dd, $J = 12.8, 7.6$ Hz, 1H, H-6), 2.50 (dd, $J = 18.0, 5.2$ Hz, 1H, H-20), 2.54 (dd, $J = 12.8, 9.2$ Hz, 1H, H-6), 3.84 (dd, $J = 9.6, 3.2$ Hz, 1H, CH_2Br), 3.91 (dd, $J = 9.6, 6.8$ Hz, 1H, CH_2Br), 4.12 (dd, $J = 11.2, 4.0$ Hz, 1H, H-3), 4.68 (m, 1H, H-5), 6.89 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.04 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.26 (td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.16 (br. s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 19.9 (C-15), 23.6 (C-14), 31.6 (C-20), 35.1 (CH_2Br), 39.0 (C-6), 56.2 (C-5), 56.7 (C-7), 65.7 (C-3), 110.3 (CH_{AR}), 123.2 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 128.7 (CH_{AR}), 129.9 (C_{AR}), 140.0 (C_{AR}), 169.8 (NCO), 176.9 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 349.0546, found: 349.0548. Spiro-compound 7-*epi*-**14a** [minor isomer, (7S)⁶]: IR (KBr): 3210 (NH), 1776, 1713 (C=O) cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, selected resonances) δ 0.86 (m, 1H, H-14), 1.86 (m, 1H, H-14), 2.17 (m, 1H, H-20), 2.37-2.40 (m, 2H, H-

6), 2.51 (dm, $J = 18.8$ Hz, 1H, H-20), 3.69 (dd, $J = 10.4, 2.8$ Hz, 1H, CH₂Br), 4.03 (dm, $J = 10.8, 4.0$ Hz, 1H, H-3), 4.28 (dd, $J = 10.4, 4.8$ Hz, 1H, CH₂Br), 4.80 (m, 1H, H-5), 6.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.24-7.29 (m, 2H, H_{AR}), 8.63 (br. s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 20.2 (C-14), 31.4 (C-20), 37.2 (CH₂Br), 37.4 (C-6), 55.9 (C-5), 56.3 (C-7), 66.9 (C-3), 110.1 (CH_{AR}), 122.8 (CH_{AR}), 123.0 (CH_{AR}), 128.5 (C_{AR}), 129.0 (CH_{AR}), 140.5 (C_{AR}), 170.0 (NCO), 177.1 (NCO). HRMS (ESI) calcd for [C₁₆H₁₇BrN₂O₂ + H]⁺: 349.0546, found: 349.0541.



(1'R,3'S,7'R,8a'R)-3'-(Bromomethyl)-7'-(methoxycarbonylmethyl)-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (14b). Operating as in the above general procedure, from a solution of lactam **10b**³ (140 mg, 0.409 mmol) in anhydrous CCl₄ (2 mL), NBS (116 mg, 0.654 mmol), and AIBN (3 mg, 0.02 mmol), spiro-oxindole **14b** (52 mg, 30%) and its epimer *7-epi-14b*⁶ (10 mg, 6%) were obtained after flash chromatography (hexane to EtOAc). Spiro-compound **14b** [major isomer, (7R)⁶]: [α]_D²² = +50.9 (*c* 2.1 in CHCl₃); IR (film): 3216 (NH), 1729, 1620, 1616 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 0.66 (q, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-14), 1.70 (dm, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-14), 1.92 (dd, $J = 17.6, 12.0$ Hz, 1H, H-20), 2.14 (dd, $J = 15.6, 7.6$ Hz, 1H, CH₂CO₂Me), 2.23 (dd, $J = 15.6, 6.8$ Hz, 1H, CH₂CO₂Me), 2.27 (dd, $J = 13.2, 8.0$ Hz, 1H, H-6), 2.38 (m, 1H, H-15), 2.57 (dd, $J = 13.2, 10.0$ Hz, 1H, H-6), 2.65 (ddd, $J = 17.6, 5.2, 2.0$ Hz, 1H, H-20), 3.63 (s, 3H, CH₃O), 3.82 (dd, $J = 9.6, 2.8$ Hz, 1H, CH₂Br), 3.93 (dd, $J = 9.6, 6.8$ Hz, 1H, CH₂Br), 4.19 (dd, $J = 11.2, 4.0$ Hz, 1H, H-3), 4.67 (m, 1H, H-5), 6.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.05 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.28 (td, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.74 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 29.2 (C-15), 29.6 (C-14), 34.9 (CH₂Br), 37.8 (C-20), 39.1 (C-6), 39.7 (CH₂CO₂Me), 51.7 (CH₃O), 56.0 (C-5), 56.5 (C-7), 64.9 (C-3), 110.5 (CH_{AR}), 123.2 (CH_{AR}), 123.5 (CH_{AR}), 128.8 (CH_{AR}), 129.6 (C-8), 140.2 (C-13), 168.6 (NCO), 171.6 (COO), 177.1 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₉H₂₁BrN₂O₄ + H]⁺: 421.0757, found: 421.0752. Spiro-compound *7-epi-14b* [minor isomer, (7S)⁶]: IR (film): 3203 (NH), 1727, 1621 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.14 (q, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-14), 1.61 (dm, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-14), 2.00 (dd, $J = 17.6, 12.0$ Hz, 1H, H-20), 2.24 (dd, $J = 12.0, 6.8$ Hz, 2H, CH₂CO₂Me), 2.40 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 2H, H-6), 2.61 (ddd, $J = 17.6, 4.8, 1.6$ Hz, 1H, H-20), 3.62 (s, 2H, CH₃O), 3.69 (m, 1H, CH₂Br), 4.11 (dd, $J = 10.8, 3.6$ Hz, 1H, H-3), 4.28 (dd, $J = 10.8, 5.2$ Hz, 1H, CH₂Br), 4.78 (m, 1H, H-5), 6.90 (d, J

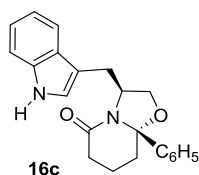
= 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.10 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.26 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 8.19 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 29.5 (C-15), 29.7 (C-14), 37.3 (CH₂Br), 37.6 (C-6), 37.7 (C-20), 39.7 (CH₂CO₂Me), 51.7 (CH₃O), 55.7 (C-7), 55.8 (C-5), 66.0 (C-3), 110.0 (CH_{AR}), 122.9 (CH_{AR}), 123.0 (CH_{AR}), 127.7 (CH_{AR}), 129.0 (C-8), 141.0 (C-13), 168.5 (NCO), 171.9 (COO), 178.8 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₉H₂₁BrN₂O₄ + H]⁺: 421.0757, found: 421.0751.



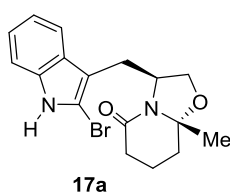
(3*S*,8*aR*)-3-(3-Indolylmethyl)-8*a*-ethyl-5-oxo-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-

***a*]pyridine (16b).** A 250 mL three-necked flask, fitted with a Dean-Stark apparatus, was charged with (*S*)-tryptophanol (754 mg, 3.9 mmol), toluene (100 mL), and 5-oxoheptanoic acid⁷ (570 mg, 3.9 mmol). After refluxing for 24 h, the mixture was allowed to cool to room temperature and decanted. The solvent was removed under reduced pressure. Flash chromatography (95:5 EtOAc-MeOH) of the residue afforded lactam **16b** (622 mg, 53%). [α]_D²² = – 27.03 (c 0.8 in CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, HSQC): 0.90 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃), 1.38 (tdd, *J* = 13.6, 4.8, 1.6 Hz, 1H, H-8), 1.59-1.75 (m, 3H, CH₂, H-7), 1.85 (m, 1H, H-7), 2.24 (dt, *J* = 13.2, 3.6 Hz, 1H, H-8), 2.40 (m, 1H, H-6), 2.52 (ddd, *J* = 18.0, 8.0, 2.8 Hz, 1H, H-6), 2.84 (dd, *J* = 14.0, 10.4 Hz, 1H, CH₂ ind), 3.64 (ddd, *J* = 14.0, 3.6, 1.2 Hz, 1H, CH₂ ind), 3.75 (dd, *J* = 9.2, 7.6 Hz, 1H, H-2), 3.95 (dd, *J* = 9.2, 8.0 Hz, 1H, H-2), 4.57 (m, 1H, H-3), 6.79 (s, 1H, H_{AR}), 7.12 (td, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.18 (td, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_{AR}), 8.45 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): 8.3 (CH₃), 16.5 (C-7), 27.8 (CH₂), 29.9, 30.0 (CH₂ ind, C-8), 30.4 (C-6), 56.1 (C-3), 68.2 (C-2), 95.5 (C-8*a*), 111.0 (CH_{AR}), 111.9 (C_{AR}), 119.2 (CH_{AR}), 119.4 (CH_{AR}), 121.9 (CH_{AR}), 122.0 (CH_{AR}), 127.5 (C_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 169.6 (NCO); HMRS calcd for [C₁₈H₂₂N₂O₂ + H]⁺ 299.1754, found 299.1752.

⁷ Schwarz; J. B.; Meyers, A. I. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1732.



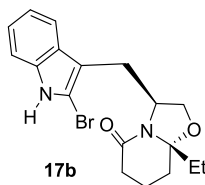
(3*S*,8*aS*)-3-(-3-Indolylmethyl)-5-oxo-8*a*-phenyl-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (16c**).** Operating as above, from (*S*)-tryptophanol (1.4 g, 7.3 mmol), toluene (86 mL), and 5-oxo-5-phenylvaleric acid (2.0 g, 10.4 mmol), lactam **16c** (1.8 g, 72%) was obtained after purification by flash chromatography (2:3 hexane-EtOAc): IR (KBr): 3179 (NH), 1627 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.49-1.62 (m, 1H, H-7), 1.73-1.80 (m, 1H, H-7), 1.91 (m, 1H, H-8), 2.22 (td, $J = 12.6, 3.9$ Hz, 1H, H-8), 2.41 (dd, $J = 13.8, 11.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 2.47 (ddd, $J = 18.4, 11.2, 7.7$ Hz, 1H, H-6), 2.68 (dd, $J = 18.4, 6.9$ Hz, 1H, H-6), 3.35 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-2), 3.68 (ddd, $J = 13.7, 3.5, 1.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.94 (dd, $J = 9.0, 7.7$ Hz, 1H, H-2), 4.66 (qd, $J = 15.0, 7.9$ Hz, 1H, H-3), 6.83 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.11 (td, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.17 (td, $J = 7.1, 1.1$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.29 (dt, $J = 8.1, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.39-7.49 (m, 5H, Ph), 7.65 (dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.94 (br s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 15.8 (C-7), 28.8 ($\text{CH}_2\text{-Ind}$), 30.9 (C-6), 36.4 (C-8), 56.5 (C-3), 69.1 (C-2), 96.3 (C-8*a*), 110.9 (CH_{AR}), 112.2 (C_{AR}), 119.4 (CH_{AR}), 119.5 (CH_{AR}), 121.6 (CH_{AR}), 122.2 (CH_{AR}), 126.7 (CH_{AR}), 127.3 (C_{AR}), 128.3 (CH_{AR}), 128.4 (CH_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 141.9 (C_{AR}), 170.0 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 347.1754, found: 347.1759.



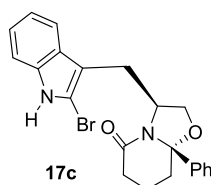
(3*S*,8*aR*)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-8*a*-methyl-5-oxo-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (17a**).** A solution of pyridinium tribromide (954 mg, 2.98 mmol) in anhydrous THF (13 mL) was added via a dropping funnel, under an inert atmosphere and at 0 °C, to a stirred solution of lactam **16a**⁸ (606 mg, 2.1 mmol) in CH_2Cl_2 (13 mL). Aqueous saturated $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and aqueous saturated NaHCO_3 (0.6 mL) were immediately added, and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic extract were dried, filtered, and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc) afforded

⁸ Amat, M.; Llor, N.; Subrizi, F.; Pérez, M.; Molins, E.; Bosch, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1246.

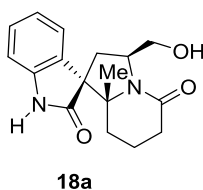
bromo derivative **17a** (462 g, 60% yield). Minor amounts of the oxindole **19a** were also detected. Bromo derivative **17a**: $[\alpha]_D^{22} = -32.5$ (c 0.78 in CHCl_3); IR (KBr): 3179 (NH), 1625 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.35 (s, 3H, CH_3), 1.57 (td, $J = 12.8, 3.6$ Hz, 1H, H-8), 1.73-1.85 (m, 1H, H-7), 1.89-1.97 (m, 1H, H-7), 2.08 (dt, $J = 12.8, 3.6$ Hz, 1H, H-8), 2.40 (ddd, $J = 18.4, 10.0, 8.0$ Hz, 1H, H-6), 2.56 (ddm, $J = 18.4, 7.2$ Hz, 1H, H-6), 2.97 (dd, $J = 14.0, 9.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.49 (dd, $J = 14.0, 3.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ind}$), 3.94 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-2), 3.96 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-2), 4.63 (qd, $J = 8.4, 3.6$ Hz, 1H, H-3), 7.11 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.16 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.46 (br. s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 17.1 (C-7), 23.6 (CH_3), 28.8 ($\text{CH}_2\text{-Ind}$), 30.6 (C-6), 35.1 (C-8), 55.7 (C-3), 67.6 (C-2), 93.3 (C-8a), 108.7 (C-Br), 110.3 (CH_{AR}), 111.8 (C_{AR}), 118.9 (CH_{AR}), 120.3 (CH_{AR}), 122.5 (C_{AR}), 127.9 (C_{AR}), 136.1 (C_{AR}), 169.5 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 363.0703, found: 363.0689.



(3*S*,8*aR*)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-8*a*-ethyl-5-oxo-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (17b**)** Operating as above, from a solution of pyridinium tribromide (257 mg, 0.8 mmol) in anhydrous THF (3 mL) and a solution of lactam **16b** (150 mg, 0.5 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (3 mL), bromo-lactam **17b** (105 mg, 55%) was obtained after flash chromatography (hexane to 7:3 hexane-EtOAc). Minor amounts of the oxindole **19b** were isolated. Bromo-lactam **17b**: IR (film): 3174 (NH), 1622 (C=O) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, HSQC): 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.38 (tdd, $J = 13.2, 4.8, 1.6$ Hz, 1H, H-8), 1.60-1.76 (m, 3H, CH_2 , H-7), 1.87 (m, 1H, H-7), 2.25 (dt, $J = 13.2, 4.0$ Hz, 1H, H-8), 2.35-2.45 (m, 1H, H-6), 2.53 (m, 1H, H-6), 2.89 (dd, $J = 14.0, 10.4$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-ind}$), 3.56 (dd, $J = 14.0, 3.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-ind}$), 3.84 (dd, $J = 9.2, 8.0$ Hz, 1H, H-2), 3.93 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-2), 4.95 (m, 1H, H-3), 7.13 (td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.18 (td, $J = 7.2, 1.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.81 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.15 (br. s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz): 8.4 (CH_3), 16.6 (C-7), 27.6 (CH_2), 29.2 (CH_2 ind), 30.1, 30.5 (C-8, C-6), 55.8 (C-3), 67.7 (C-2), 95.5 (C-8a), 108.4 (C_{AR}), 110.30 (CH_{AR}), 112.1 (C_{AR}), 119.0 (CH_{AR}), 120.4 (CH_{AR}), 122.6 (CH_{AR}), 122.0 (CH_{AR}), 127.8 (C_{AR}), 136.1 (C_{AR}), 168.8 (NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 377.0859, found: 377.0860.

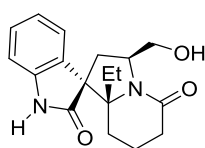


(3*S*,8*aS*)-3-[(2-Bromo-3-indolyl)methyl]-5-oxo-8*a*-phenyl-2,3,6,7,8,8*a*-hexahydro-5*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridine (17c**).** Operating as described in the preparation of the bromo derivative **17a**, from a solution of lactam **16c** (1.7 g, 4.9 mmol) in CH₂Cl₂ (31 mL), and a solution of pyridinium tribromide (2.2 g, 6.8 mmol) in THF (31 mL), the bromo-compound **17c** was obtained (1.26 g, 60%) as a white powder after flash chromatography (1:1 hexane-EtOAc): IR (KBr): 3211 (NH), 1627 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.53-1.65 (m, 1H, H-7), 1.74-1.81 (m, 1H, H-7), 1.91 (m, 1H, H-8), 2.23 (dt, *J* = 12.6, 3.1 Hz, 1H, H-8), 2.46 (dd, *J* = 13.6, 11.0 Hz, 1H, CH₂-Ind), 2.52 (ddd, *J* = 18.7, 11.1, 7.7 Hz, 1H, H-6), 2.73 (dd, *J* = 18.6, 6.6 Hz, 1H, H-6), 3.43 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-2), 3.60 (dd, *J* = 13.7, 3.6 Hz, 1H, CH₂-Ind), 3.87 (dd, *J* = 9.1, 7.8 Hz, 1H, H-2), 4.69 (m, 1H, H-3), 7.06 (td, *J* = 7.2, 1.1 Hz, 1H, H_{AR}), 7.13 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, H_{AR}), 7.24 (dt, *J* = 8.1, 0.9 Hz, 1H, H_{AR}), 7.39-7.49 (m, 5H, Ph), 7.62 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{AR}), 8.44 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 15.2 (C-7), 28.0 (CH₂-Ind), 30.9 (C-6), 36.2 (C-8), 56.1 (C-3), 68.5 (C-2), 96.3 (C-8*a*), 108.3 (C-Br), 110.3 (CH_{AR}), 111.6 (C_{AR}), 118.7 (CH_{AR}), 120.2 (CH_{AR}), 122.4 (CH_{AR}), 126.6 (CH_{AR}), 127.7 (C_{AR}), 128.3 (CH_{AR}), 128.5 (CH_{AR}), 136.2 (C_{AR}), 141.5 (C_{AR}), 170.3 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₂₂H₂₁BrN₂O₂ + H]⁺: 425.0859, found: 425.0856.



(1'*R*,3'*S*,8*a'R*)-3'-(Hydroxymethyl)-8*a'*-methyl-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (18a**).** TFA (380 μ L, 4.9 mmol) was added at room temperature under an inert atmosphere to a solution of lactam **17a** (137 mg, 0.377 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (7 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight and then concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (silica previously washed with triethylamine, 1:1 to 1:9 hexane-EtOAc) gave spirooxindole **18a** (64 mg, 57%): [α]_D²² = +10.3 (*c* 1.1 in CHCl₃); IR (KBr): 3359 (NH, OH), 1618, 1692 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.17 (td, *J* = 12.4, 3.2 Hz, 1H,

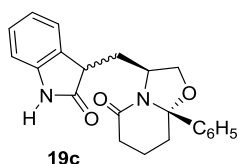
H-14), 1.45 (dm, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-14), 1.58 (s, 3H, CH₃), 1.65-1.70 (m, 1H, H-15), 1.85-1.92 (m, 1H, H-5), 2.18 (dd, $J = 13.2, 8.0$ Hz, 1H, H-6), 2.23 (ddd, $J = 18.4, 12.0, 7.2$ Hz, 1H, H-20), 2.37 (dd, $J = 13.2, 10.4$ Hz, 1H, H-6), 2.52 (dd, $J = 18.4, 5.6$ Hz, 1H, H-20), 3.86 (m, 2H, CH₂OH), 4.69 (m, 1H, H-5), 6.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.03 (td, $J = 7.6, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.25 (td, $J = 7.6, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 8.56 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 17.4 (C-15), 24.0 (CH₃), 30.3 (C-14), 30.8 (C-20), 34.8 (C-6), 59.0 (C-7), 59.5 (C-5), 68.0 (CH₂OH), 110.3 (CH_{AR}), 123.1 (CH_{AR}), 123.6 (CH_{AR}), 128.7 (CH_{AR}), 131.2 (C_{AR}), 140.1 (C_{AR}), 172.5 (NCO), 176.7 (NCO); HRMS (ESI) calcd for [C₁₇H₂₀N₂O₃ + H]⁺: 301.1546, found: 301.1547.



18b

(1'R,3'S,8a'R)-3'-(Hydroxymethyl)-8a'-ethyl-2,5'-dioxospiro[indoline-3,1'-indolizidine] (18b).

Operating as above, from a solution of lactam **17b** (92 mg, 0.24 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) and TFA (0.46 mL, 6.11 mmol), an inseparable mixture of spirooxindole **18b** (23 mg, yield 30%) and oxindole **19b** (\approx 21%) was obtained after flash chromatography (1:1 to 1:9 hexane-EtOAc). **Spirooxindole 18b**: IR (KBr): 3243 (NH, OH), 1716, 1616 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, COSY, *g*-HSQC, spectral data from a mixture with **19b**, selected resonances) δ 0.90 (m, 3H, CH₃), 2.44 (ddd, $J = 18.0, 7.6, 2.4$ Hz, 1H, H-20), 2.76 (td, $J = 13.6, 6.0$ Hz, 1H, H-6), 3.78 (m, 2H, CH₂OH), 4.72 (dq, $J = 9.2, 208$ Hz, 1H, H-5), 6.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 6.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.01 (td, $J = 7.6, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.25 (td, $J = 7.6, 0.8$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.74 (br. s, 1H, NH); ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ 8.8 (CH₃), 18.7 (C-15), 27.3 (CH₂), 30.5, 31.1 (C-14, C-20), 34.4 (C-6), 59.2 (C-7), 59.6 (C-5), 68.3 (CH₂OH), 109.8 (CH_{AR}), 122.7 (CH_{AR}), 124.2 (CH_{AR}), 128.8 (CH_{AR}), 131.3 (C_{AR}), 139.9 (C_{AR}), 173.6 (NCO), 176.5 (NCO).); HRMS (ESI) calcd for [C₁₈H₂₃N₂O₃ + H]⁺: 315.1703, found: 315.1699. **Oxindole 19b**: ¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz, spectral data from a mixture with **18b**, selected resonances) δ 8.3 (CH₃), 16.4 (C-7), 28.0 (CH₂), 30.0, 30.5 (CH₂, C-8), 34.6 (C-6), 44.0 (CHCO), 53.1 (C-3), 68.0 (C-2), 95.5 (C-8a), 109.4 (CH_{AR}), 122.6 (CH_{AR}), 125.4 (CH_{AR}), 128.0 (CH_{AR}), 127.5 (C_{AR}), 141.1 (C_{AR}), 170.2 (NCO), 179.4 (NCO).



(3S,8aS)-3-[(1,2-Dihydro-2-oxo-3-indolyl)methyl]-5-oxo-8a-phenyl-2,3,6,7,8,8a-hexahydro-5H-oxazolo[3,2-a]pyridine (19c). Operating as described in the preparation of **18a**, from a solution of bromo derivative **17c** (1.2 g, 2.8 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (46 mL) and TFA (4.3 mL, 56 mmol), oxindole **19c** (254 mg, 25%) was obtained as an inseparable mixture of isomers after flash chromatography (hexane to EtOAc): IR (KBr): 3252 (NH), 1622, 1712 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, COSY, *g*-HSQC) δ 1.47-1.62 (m, 3H, 2H-7, CH_2 -Ind), 1.67-1.74 (m, 3H, 2H-7, CH_2 -Ind), 1.80-1.92 (m, 2H, 2H-8), 2.18-2.21 (m, 2H, 2H-8), 2.33-2.45 (m, 2H, 2H-6), 2.57-2.67 (m, 4H, 2H-6, 2 CH_2 -Ind), 3.25-3.32 (m, 2H, 2H-2), 2.47 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, CHCO), 3.54 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CHCO), 4.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-2), 4.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-2), 4.45 (m, 1H, H-3), 4.61 (m, 1H, H-3), 6.82 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2H_{AR}), 6.95 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2H_{AR}), 6.95 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.02 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{AR}), 7.16 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{AR}), 7.32-7.49 (m, 12H, H_{AR}), 9.06 (br. s, 1H, NH), 9.10 (br. s, 1H, NH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ 15.6 (2C-7), 30.8, 30.9 (2C-6), 33.4, 34.6 (CH_2 -Ind), 36.3, 36.4 (2C-8), 43.9, 44.0 (2CHCO), 53.4, 55.0 (2C-3), 68.5, 69.5 (2C-2), 96.1, 96.2 (2C-8a), 109.6 (2 CH_{AR}), 109.7 (CH_{AR}), 122.1 (2 CH_{AR}), 122.3 (2 CH_{AR}), 124.0 (2 CH_{AR}), 124.9 (2 CH_{AR}), 141.3 (C_{AR}), 141.4 (C_{AR}), 141.4 (C_{AR}), 141.5 (C_{AR}), 170.2, 170.6 (NCO), 179.7 (2NCO); HRMS (ESI) calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}]^+$: 363.1703, found: 363.1701.

II) Computational Methods and Theoretical Results

Computational methods.

Full geometry optimizations of reactants, transition states, and products were performed with the M06-2X⁹ density functional method by using the 6-31G(d)¹⁰ basis set. The nature of the stationary points was verified by inspection of the vibrational frequencies within the harmonic oscillator-rigid rotor approximation. The reaction path that connects transition states with reactant and product states was checked by means of Intrinsic Reaction Path calculations.¹¹ The relative free energies were estimated by combining the energy differences with the thermal/entropy corrections derived from frequency analysis. Finally, the effect of solvation in carbon tetrachloride was taken into account using the MST version¹² of the IEF-PCM¹³ continuum solvation method. MST calculations were performed at the B3LYP/6-31G(d) level,¹⁴ which was used in the parametrization of this solvation continuum model. All DFT computations were carried out using the keyword Integral (Grid=Ultrafine) as implemented in Gaussian09,¹⁵ which was used to carry out these calculations.

⁹ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.

¹⁰ Hariharan, P. C.; Pople, J. A. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213.

¹¹ Fukui, K. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 363-368.

¹² Soterias, I.; Curutchet, C.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, *727*, 29.

¹³ Cancès, E.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032.

¹⁴ (a) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098. (b) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785. (c) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.

¹⁵ Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.

Theoretical Results

Quantum mechanical computational studies were performed to explore the molecular basis of the enantioselective spirocyclization shown in Scheme 7 ($R_1 = \text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $X = R_2 = \text{H}$). To this end, full geometry optimizations were performed for the structures corresponding to the reactants, taking into account not only the orientation of the indole ring relative to the *N*-acyl iminium cation (**X** and **Y** arrangements in Scheme 7), but also the conformational flexibility of the amide-containing ring and the hydroxymethyl chain bound to the chiral carbon atom.

The 3D arrangements corresponding to the four potential reactant states (**X1**, **X2**, **Y1**, and **Y2**) are shown in Figure S1, which also displays their stabilities (relative to **X1**) in carbon tetrachloride solution. It is worth noting the antiperiplanar arrangement of the π -bond system involved in the spirocyclization in **X1**, as noted in the N-C_{iminium}-C3-C2 dihedral angle of -158.7 degrees, whereas the same dihedral angle in **X2** is 118.5 degrees (the corresponding values for **Y1** and **Y2** are 156.3 and -115.3 degrees, respectively). On the other hand, the results point out the largest stability of the **X1** conformation in the reactant state, which is more stable than **X2** by 1.2 kcal/mol, and by ca. 2 kcal/mol relative to the **Y** conformations.

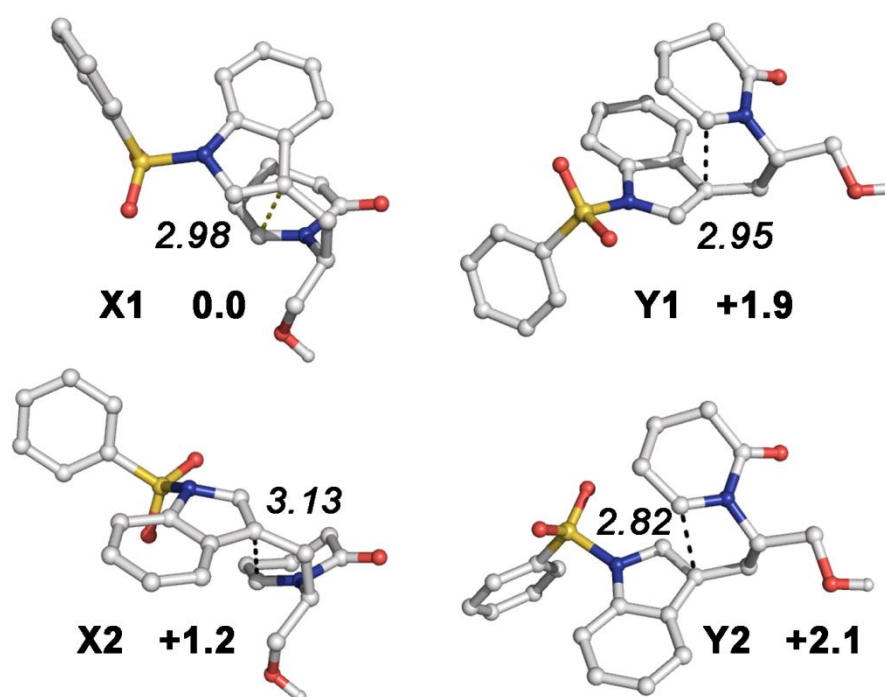


Figure S1. Representation of the most stable arrangements of reactant states in carbon tetrachloride. Relative free energies are in kcal/mol, and selected distances (from the indole C3 atom to the iminium carbon) are in Å.

Figure S2 shows the optimized structures of the transition states for the spirocyclization reaction in the four reactant orientations. The transition state for the **X1** conformation is found to be the most stable, being favored by 0.7 kcal/mol with regard to **X2**, and by more than 2 kcal/mol relative to **Y** conformations. The larger stability of the **X1** transition state may be ascribed to the more eclipsed arrangement of the side chain that links the indole and *N*-acyl iminium rings in **X2**, as the dihedral angle decreases from -27.1 degrees in **X1** to -20.1 degrees in **X2** (see Figure 3). As noted above, the antiperiplanar arrangement of the π -bond systems is reflected in the N-C_{iminium}-C3-C2 dihedral angle in **X1** (-174.2 degrees; 170.2 degrees in **Y1**) relative to **X2** (85.9 degrees; -100.4 degrees in **Y2**).

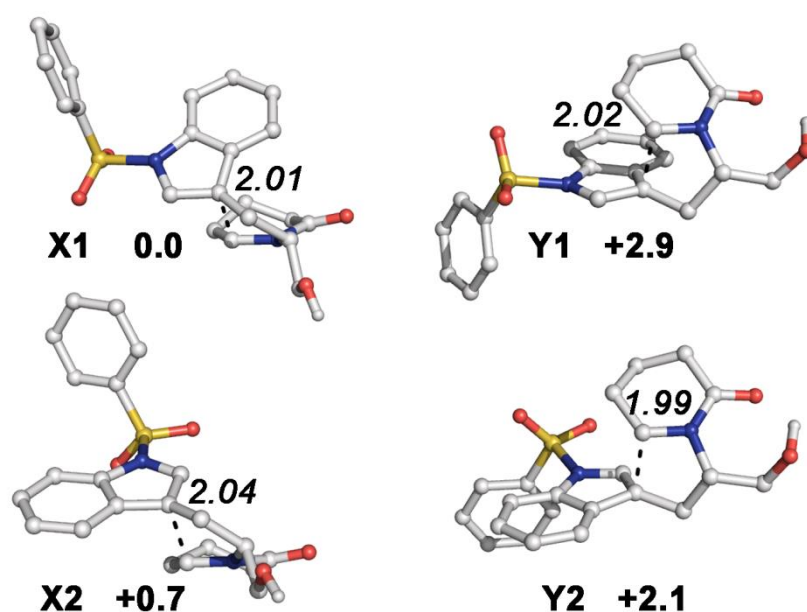


Figure S2. Representation of the most stable arrangements of transition states in carbon tetrachloride. Relative free energies are in kcal/mol, and selected distances (from the indole C3 atom to the iminium carbon) are in Å.

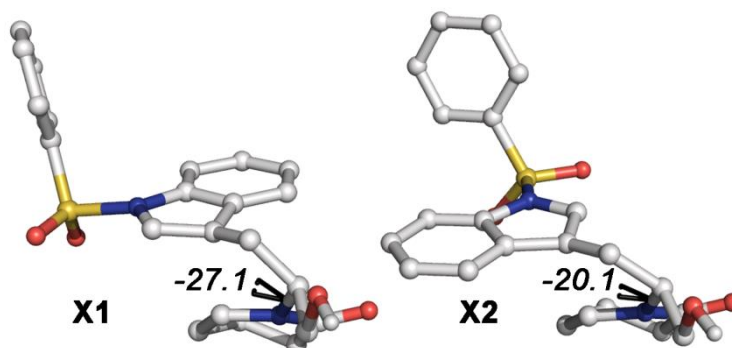
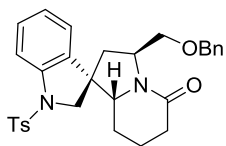
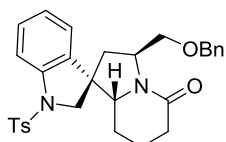
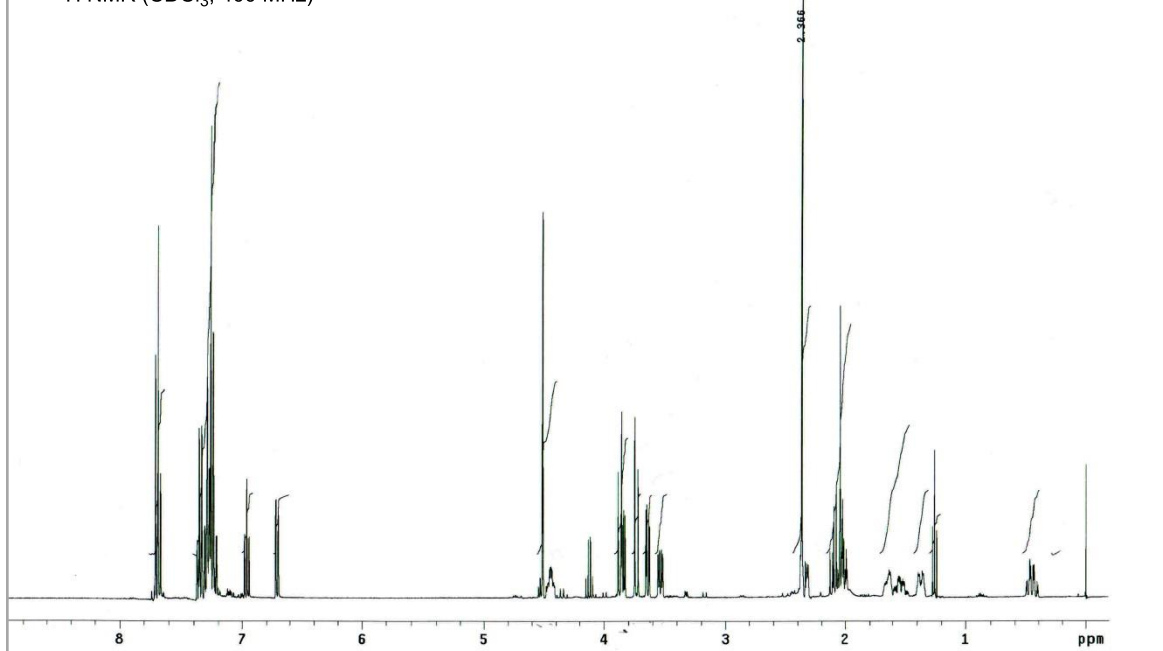


Figure S3. Representation of the arrangement of the side chain that links the indole and *N*-acyl iminium rings. The dihedral angle is in degrees.

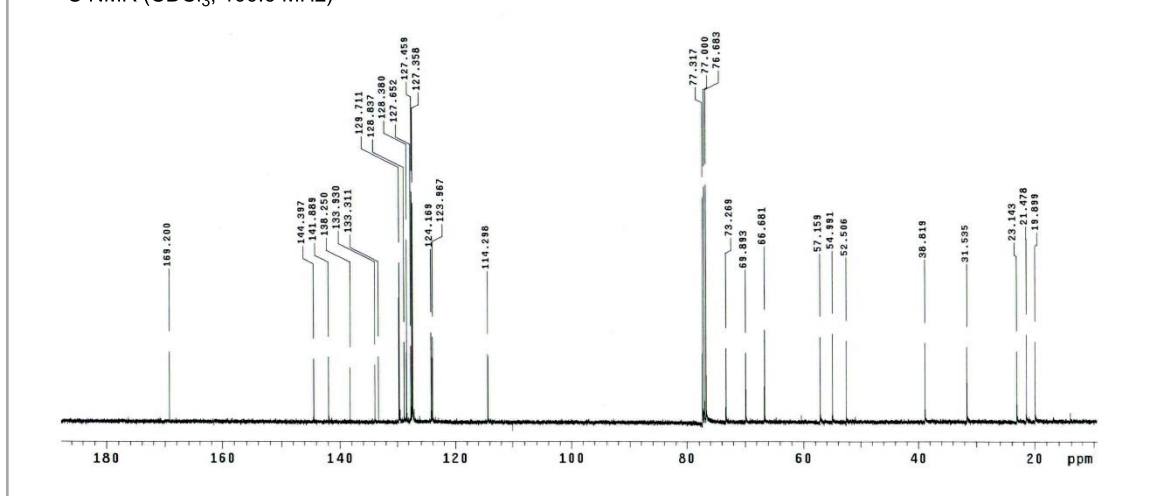
III) Copies of ^1H and ^{13}C NMR spectra for all compounds

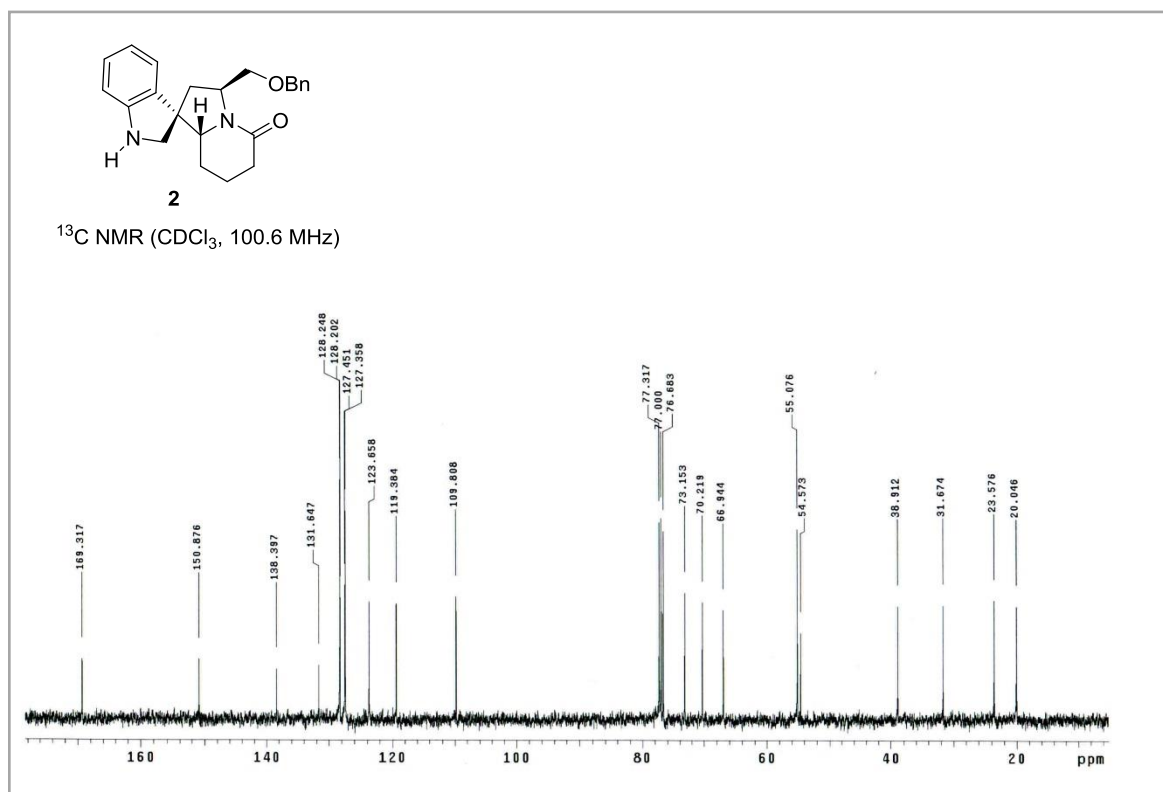
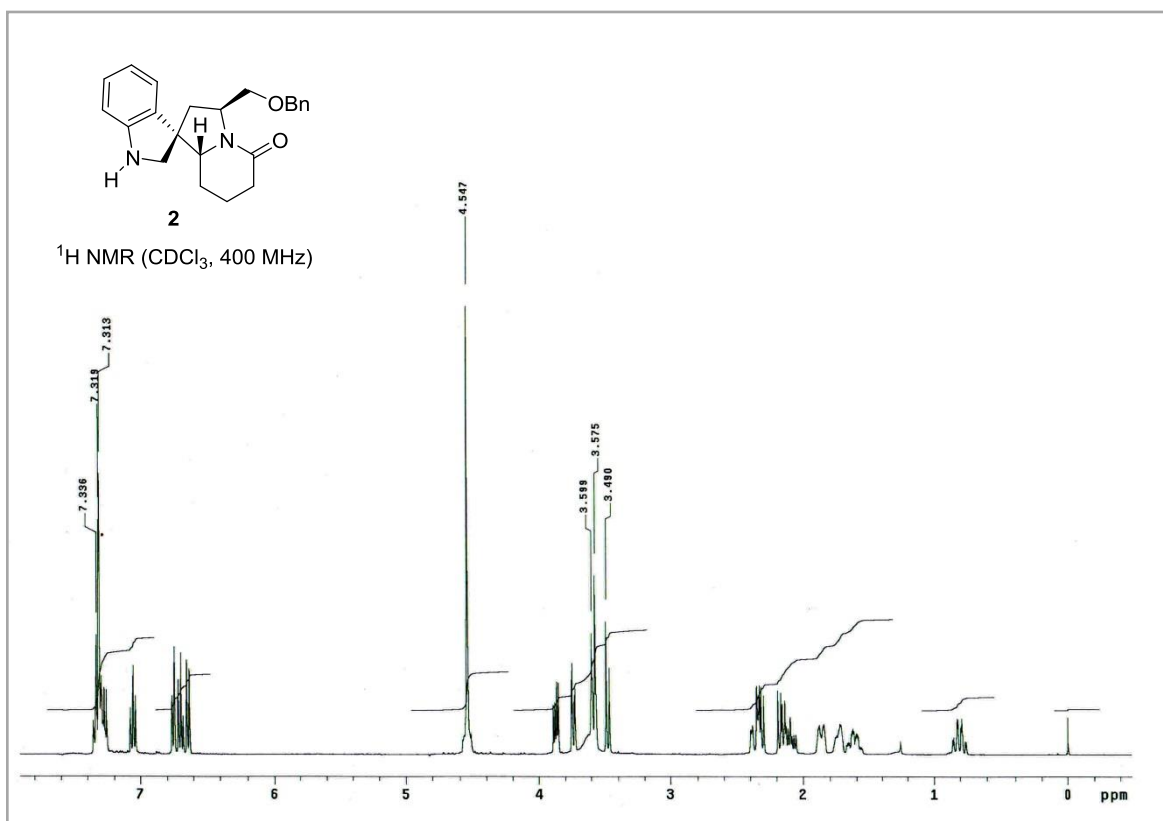


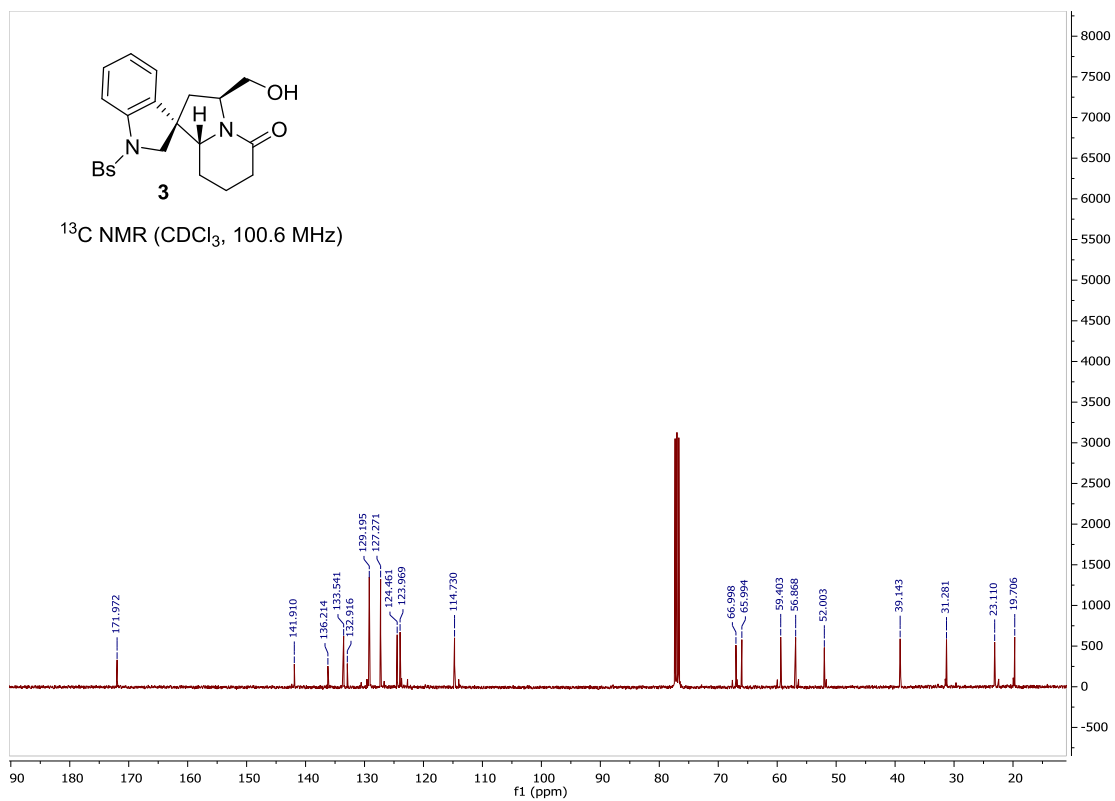
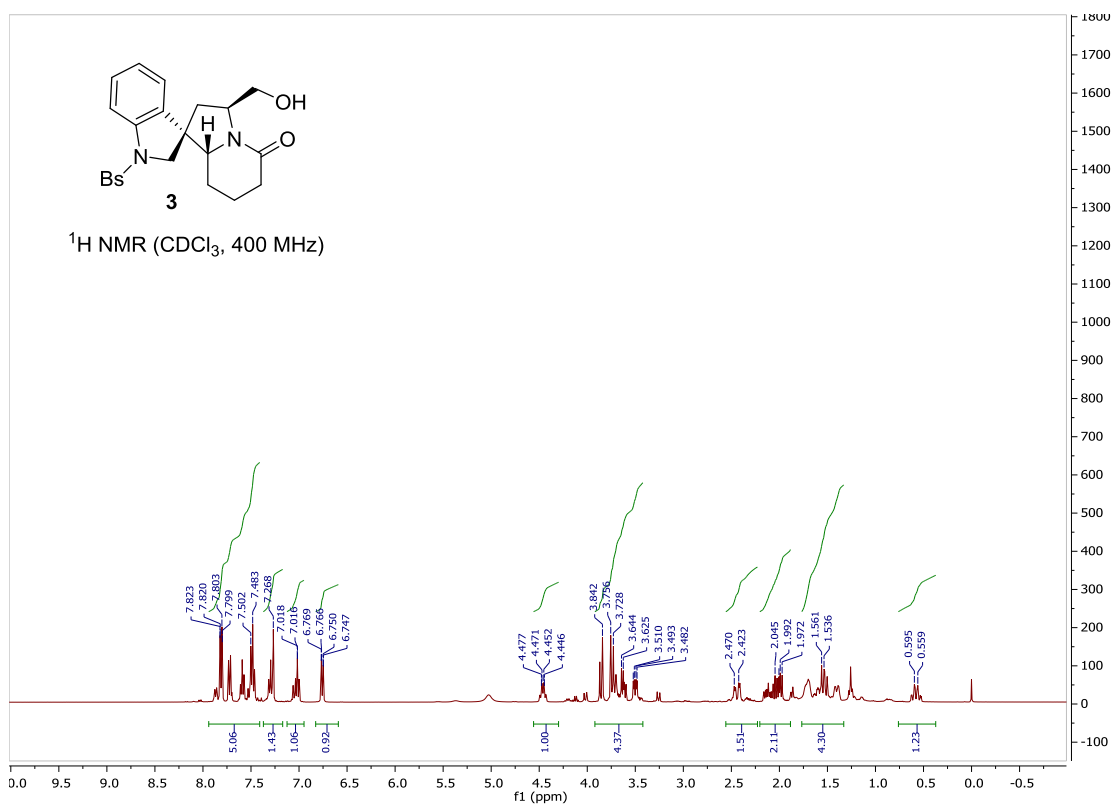
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz)

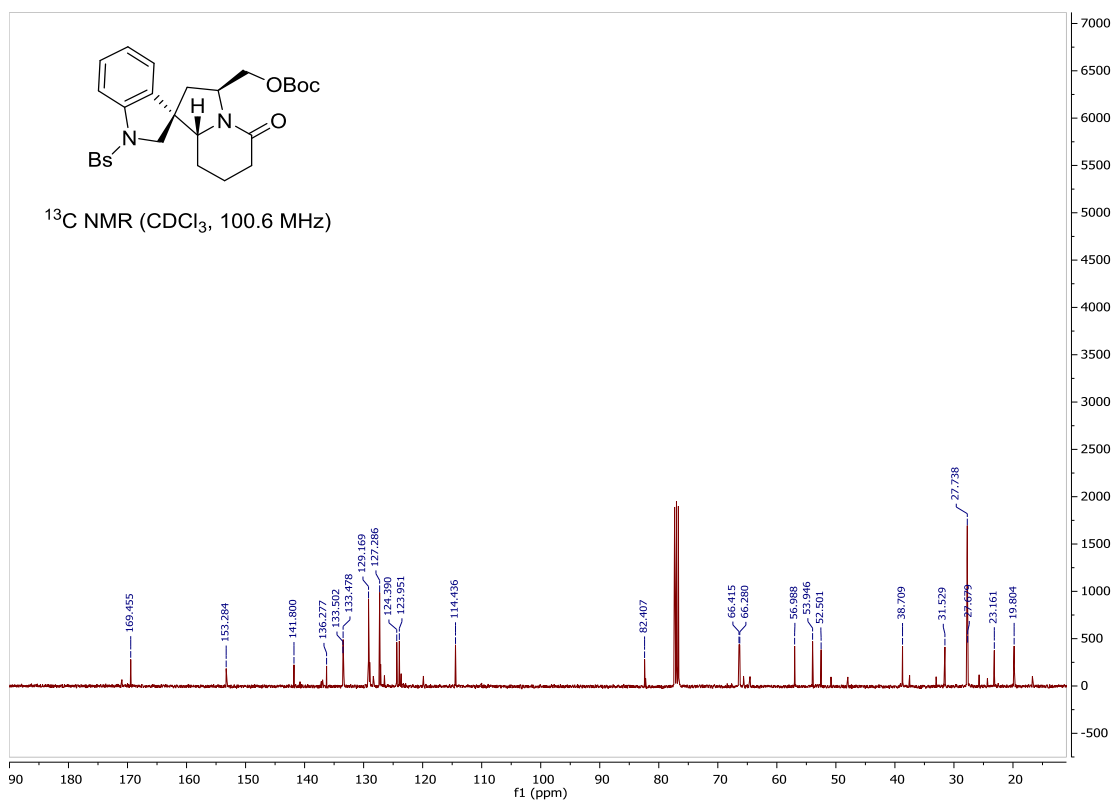
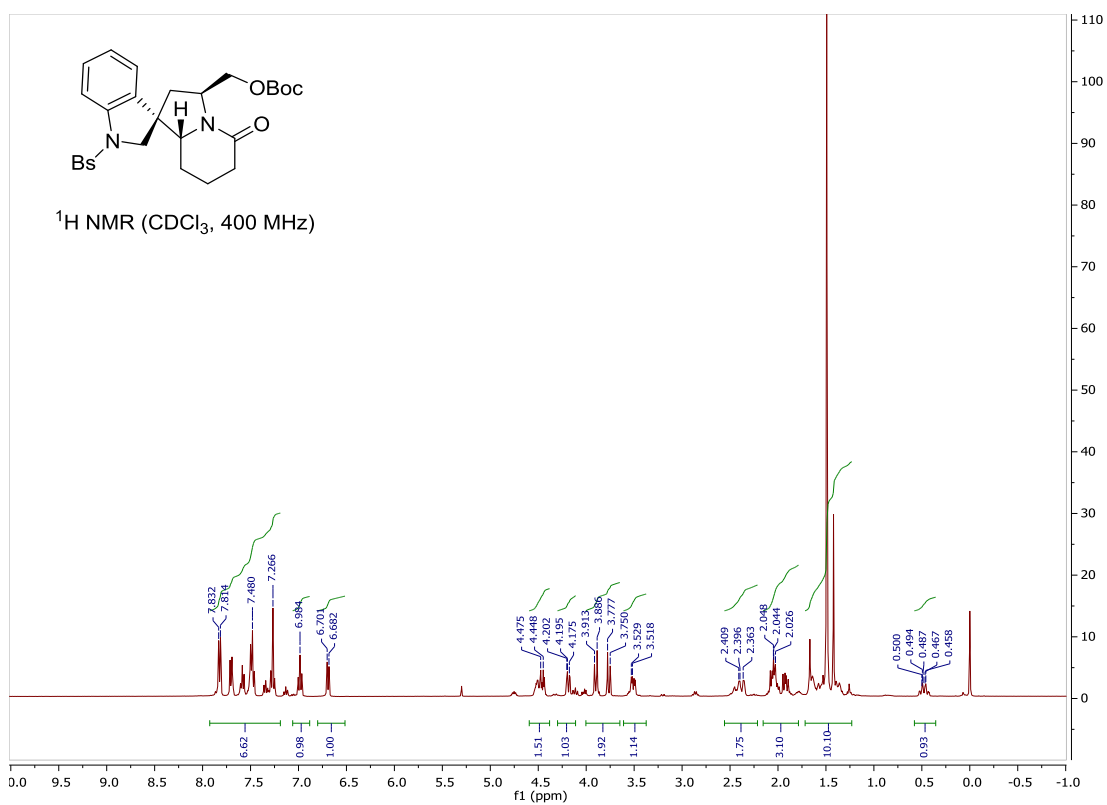


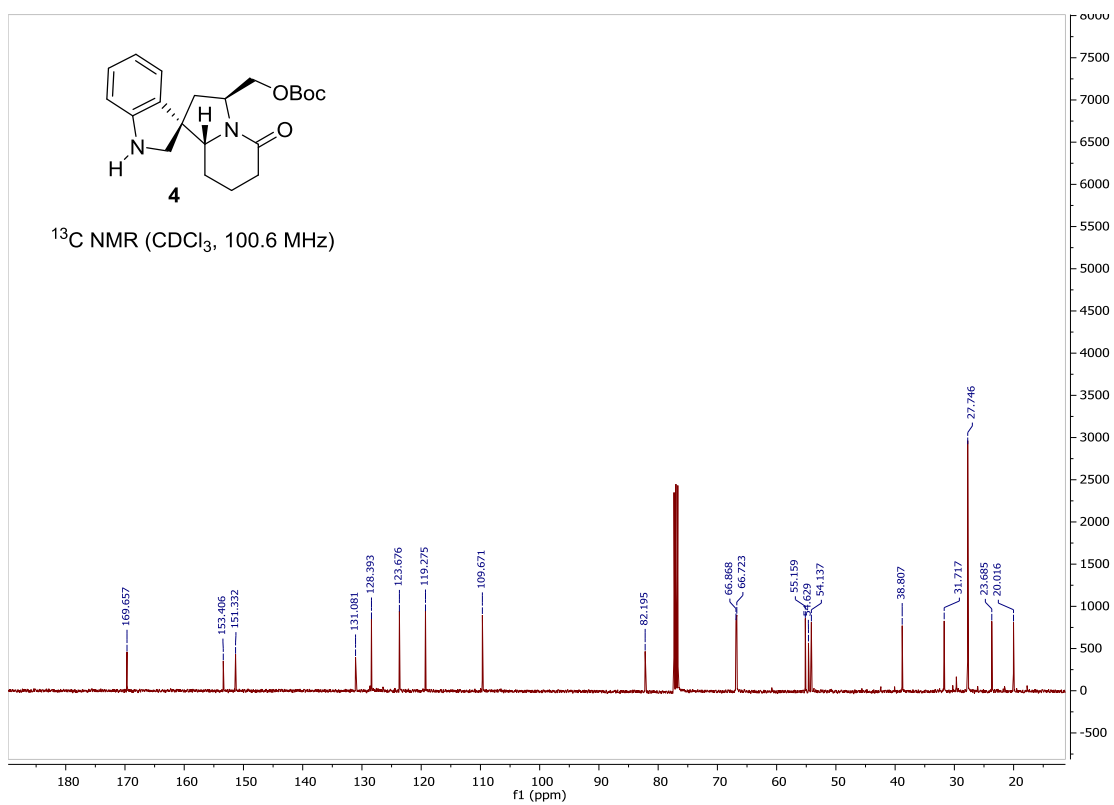
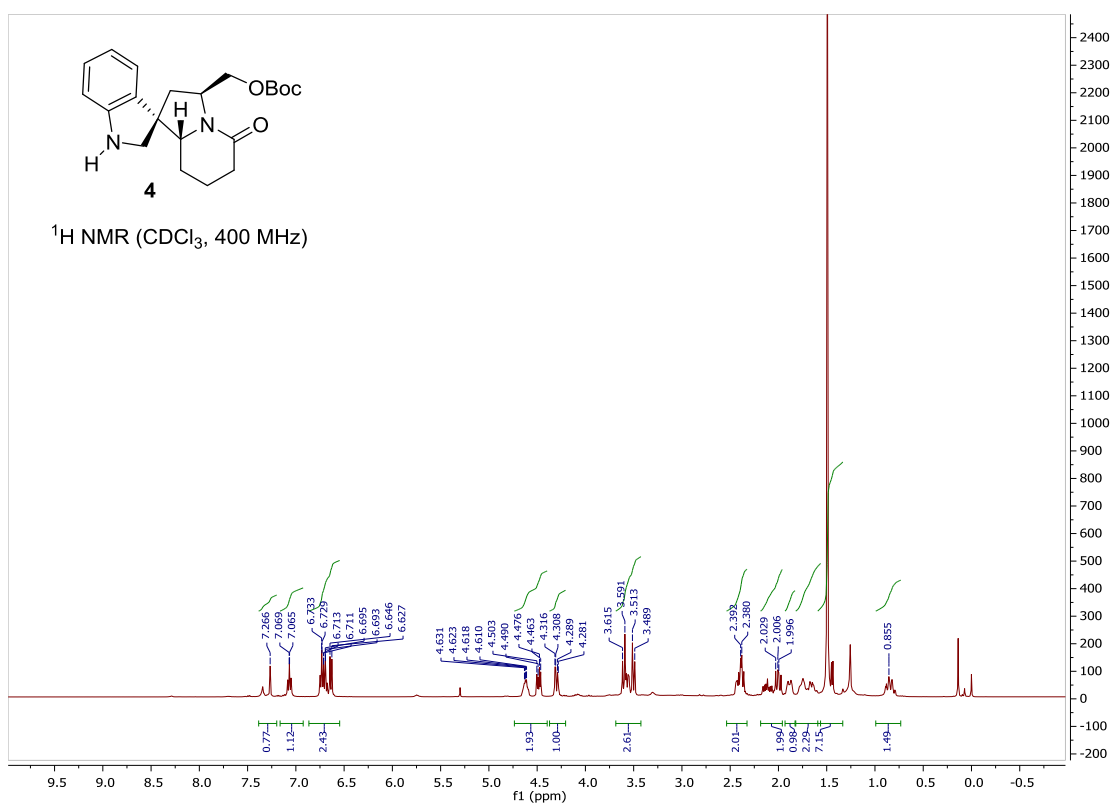
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz)

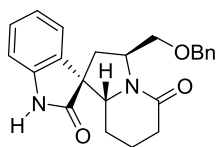






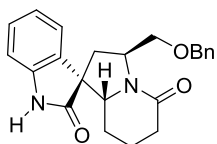
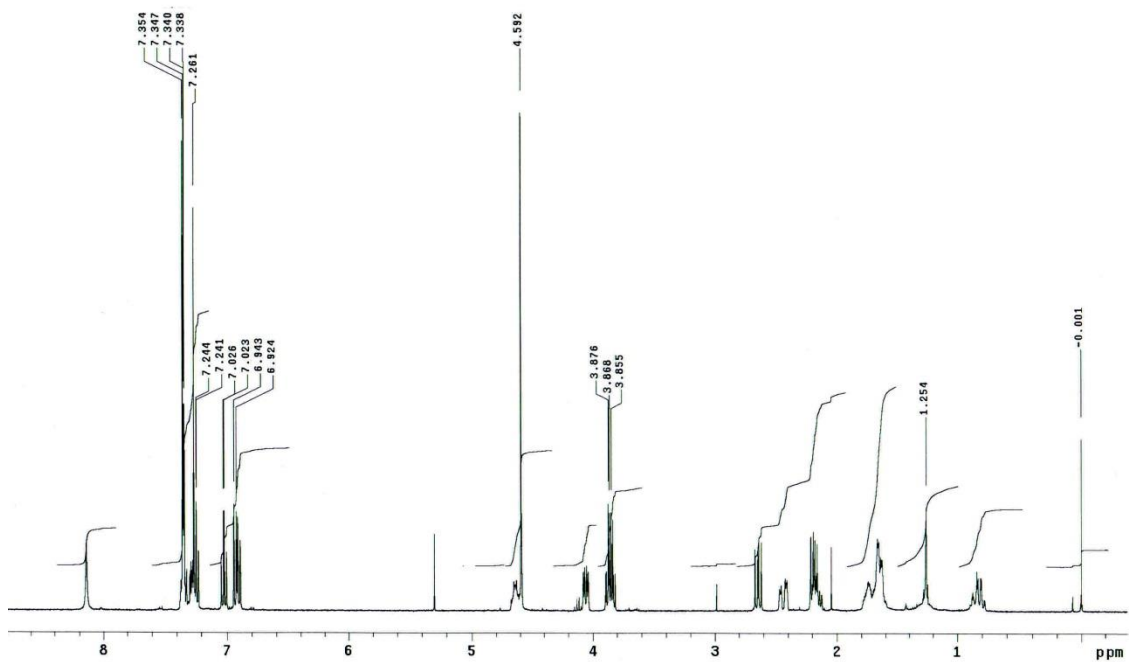






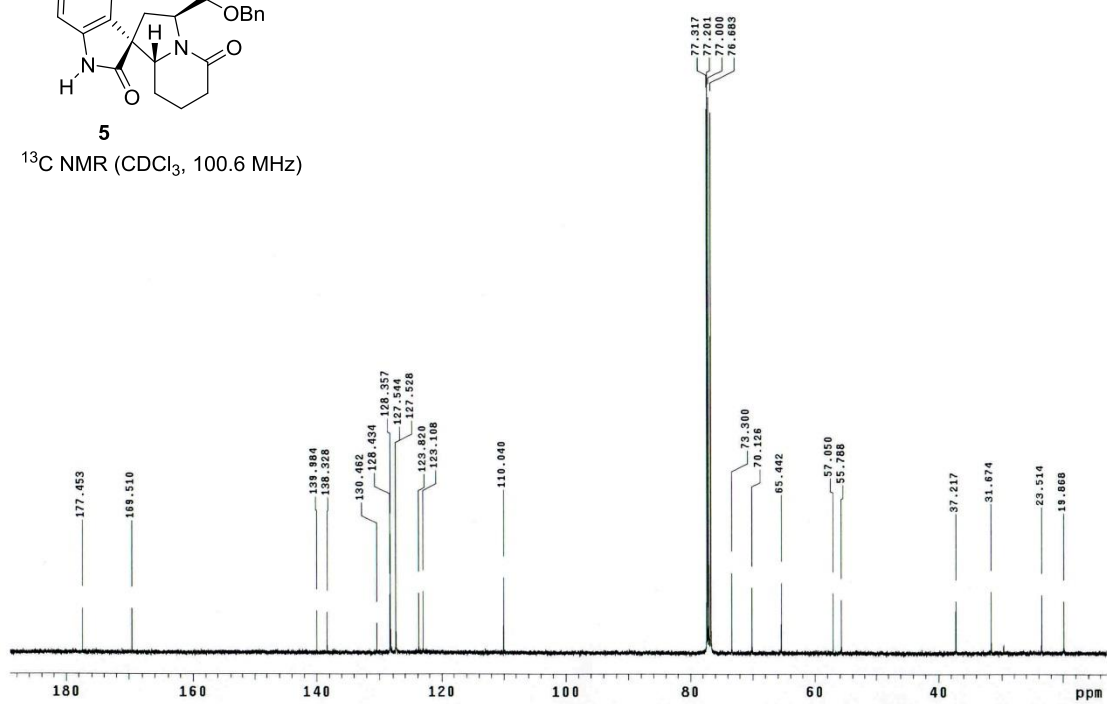
5

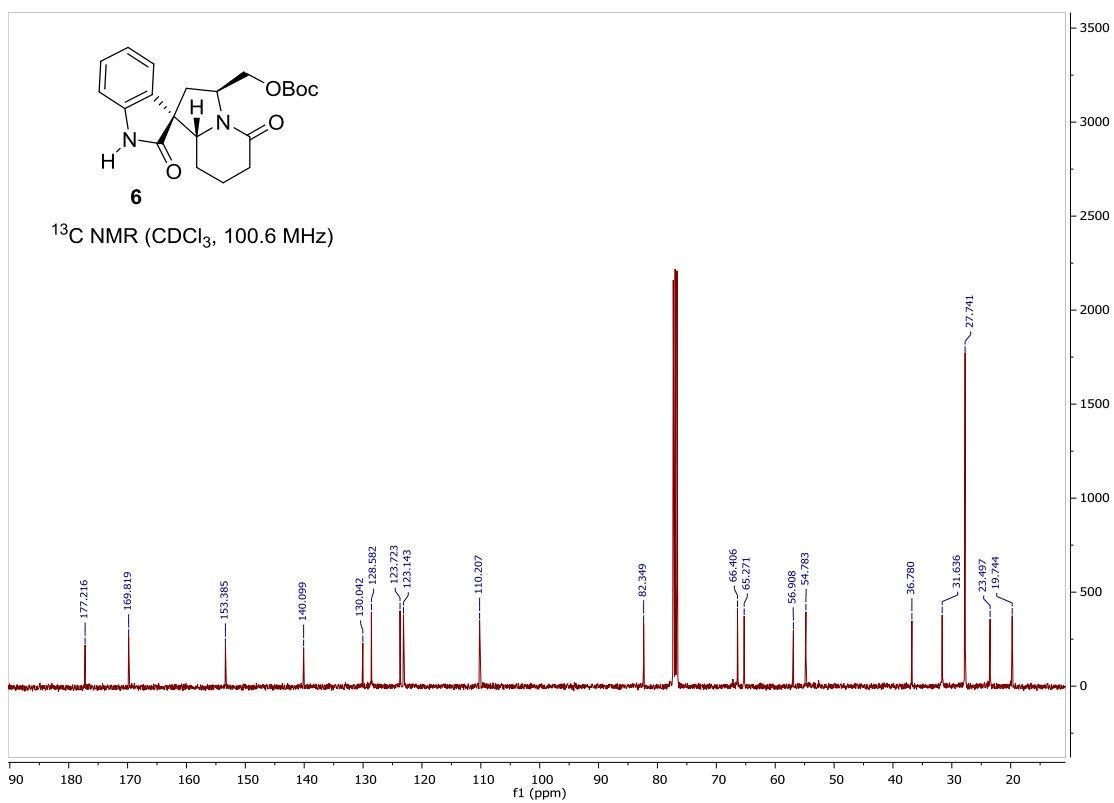
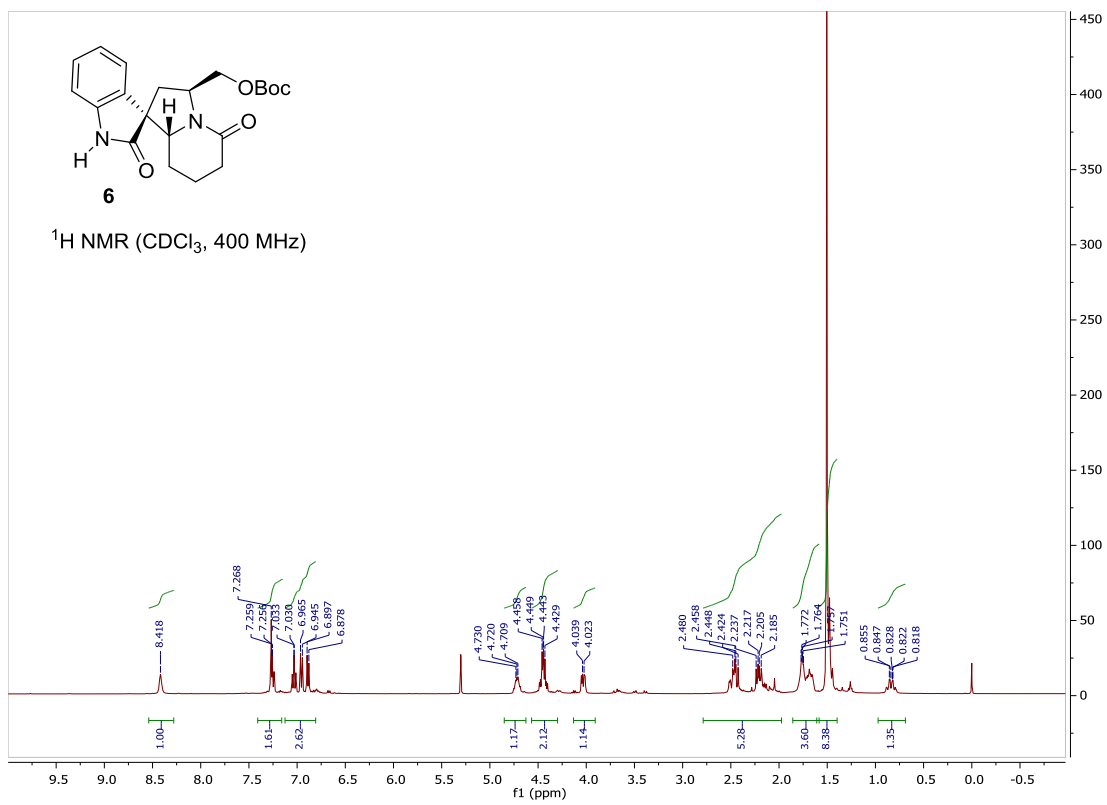
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

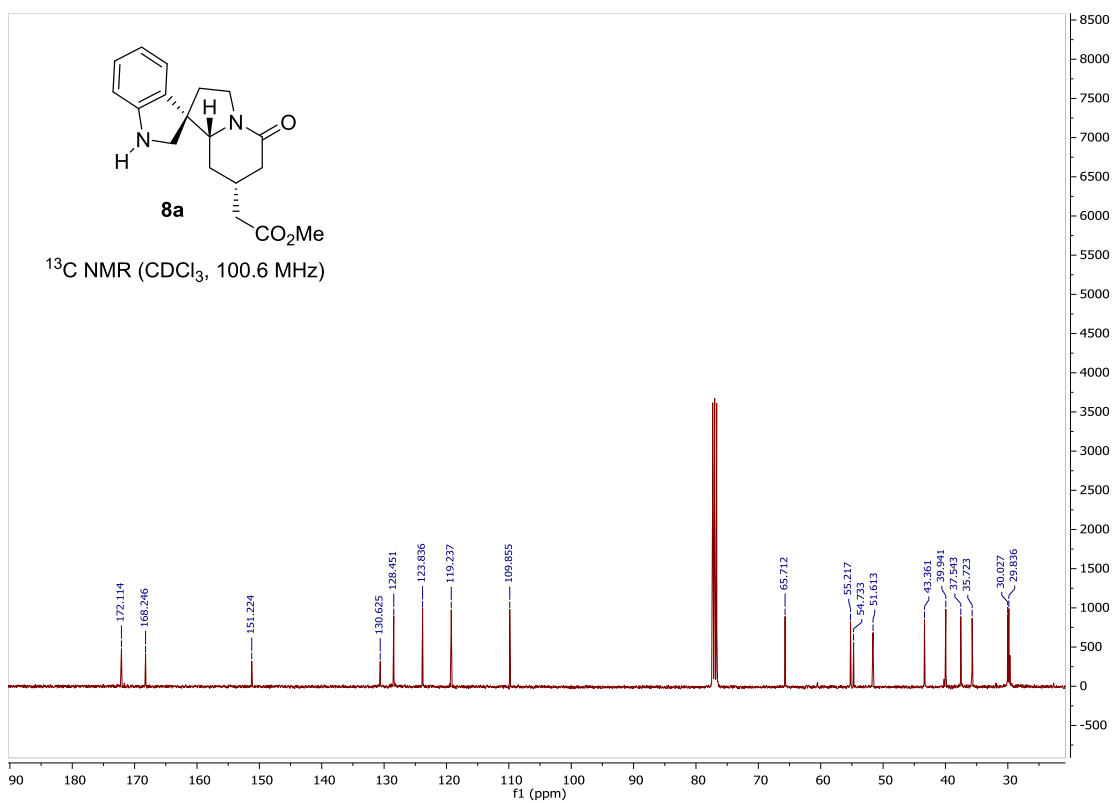
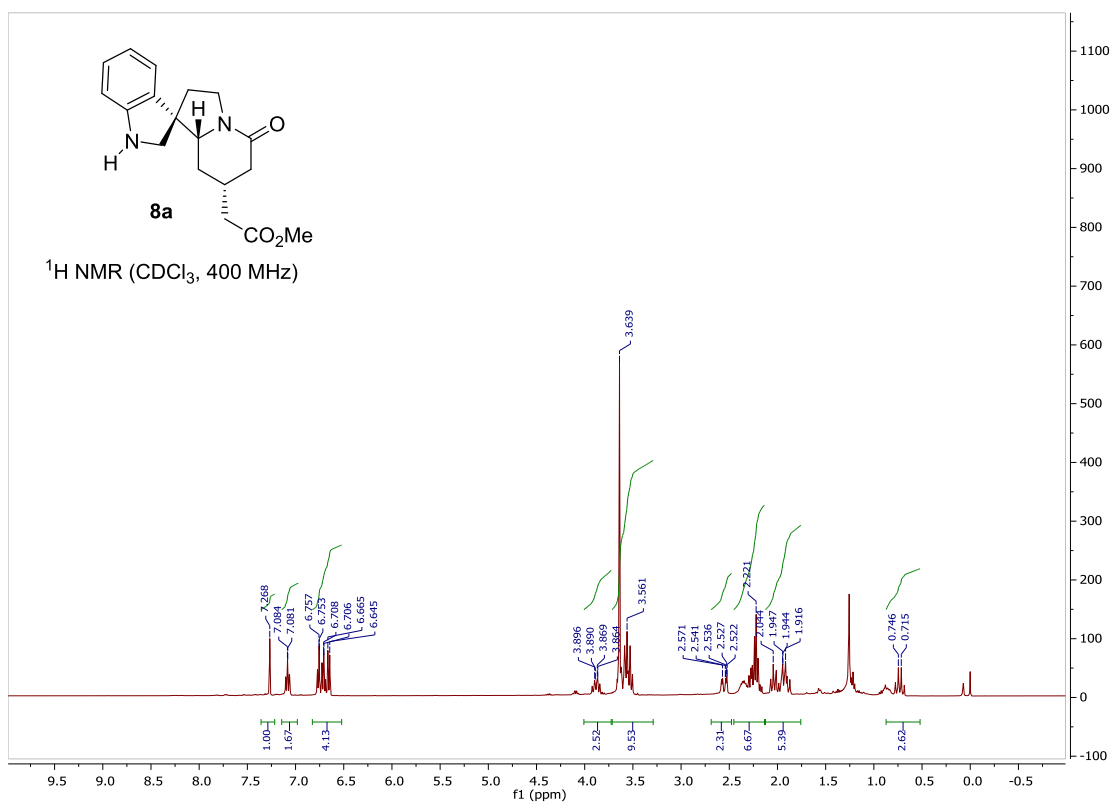


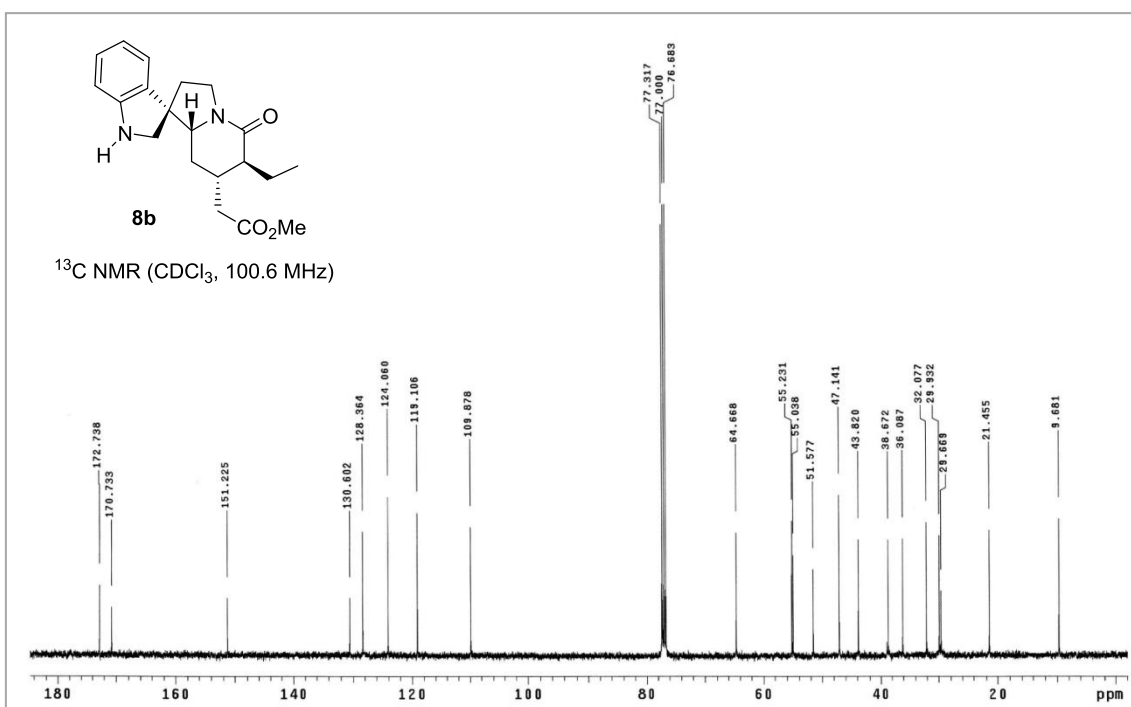
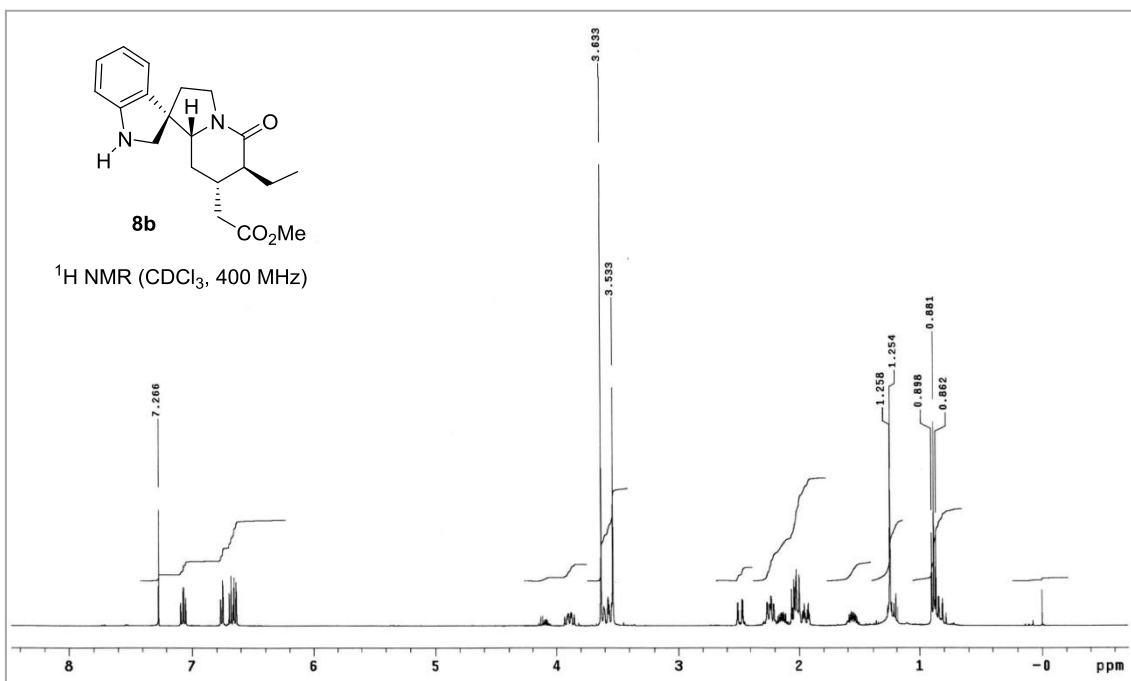
5

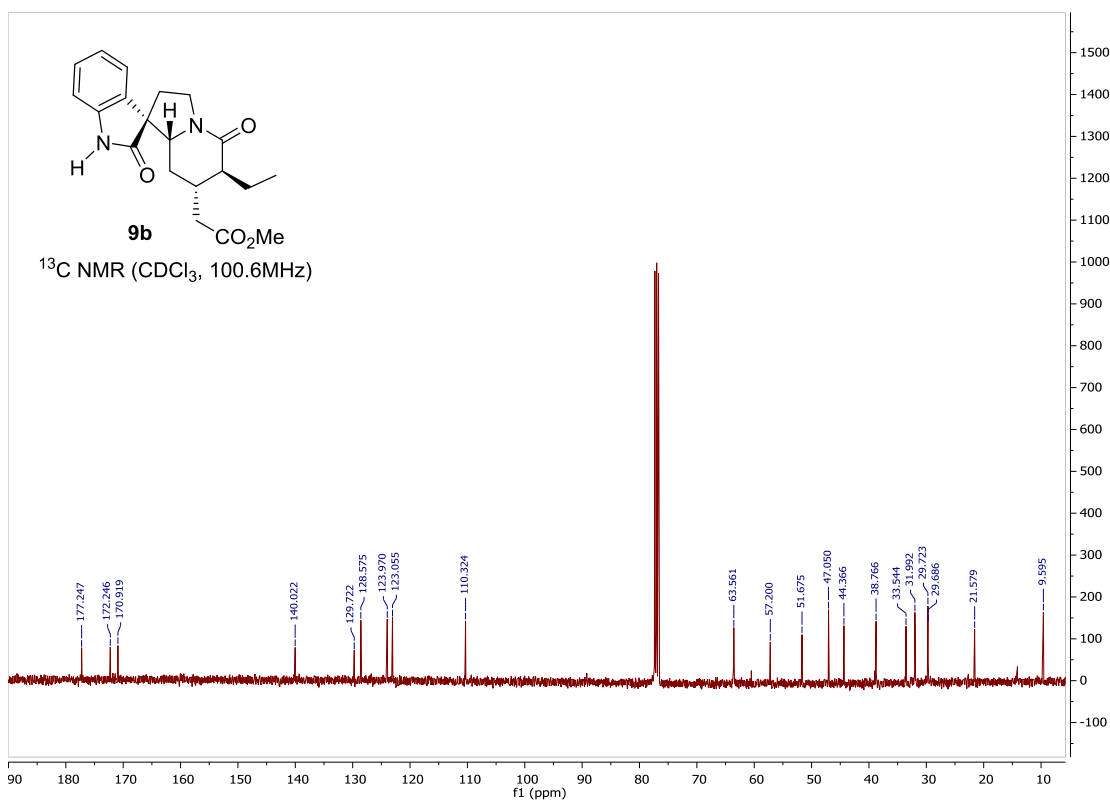
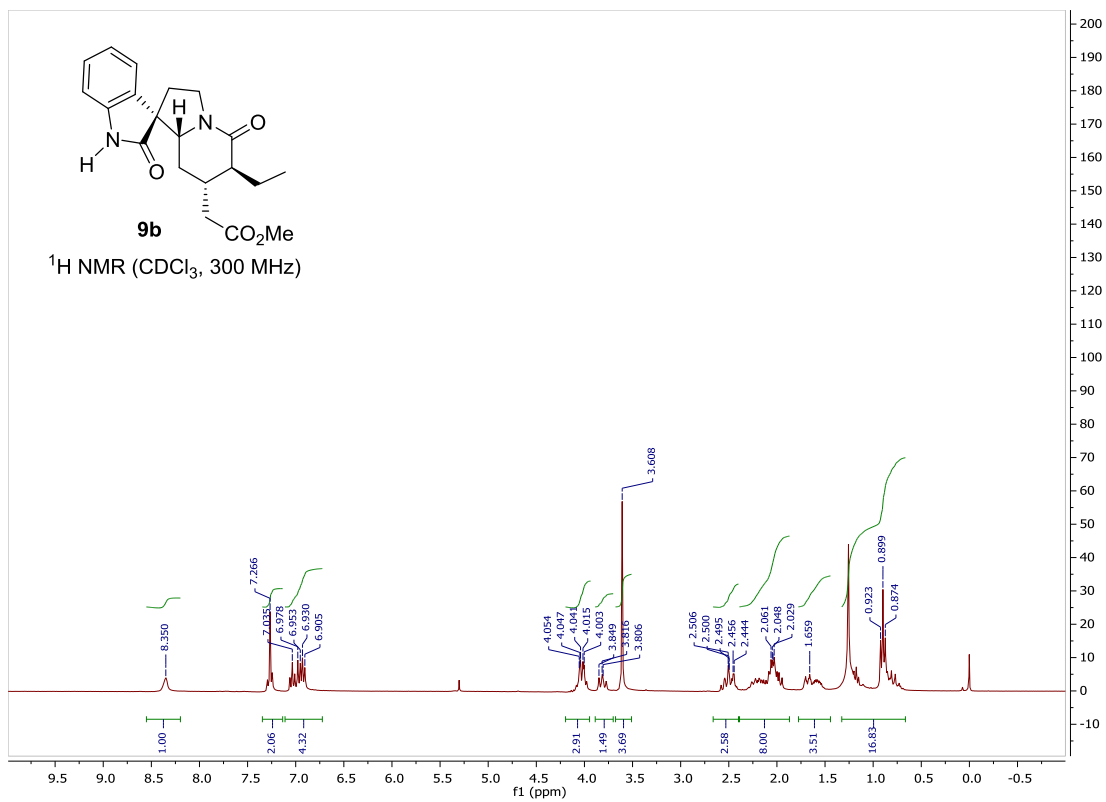
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz)

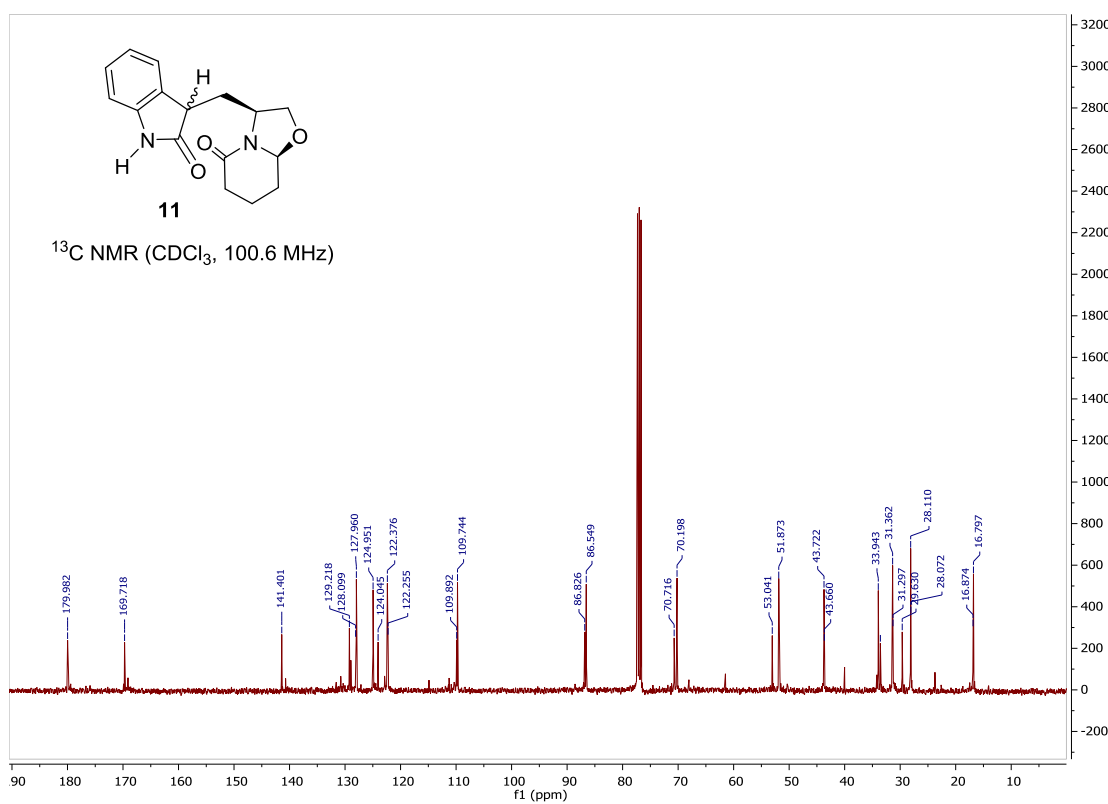
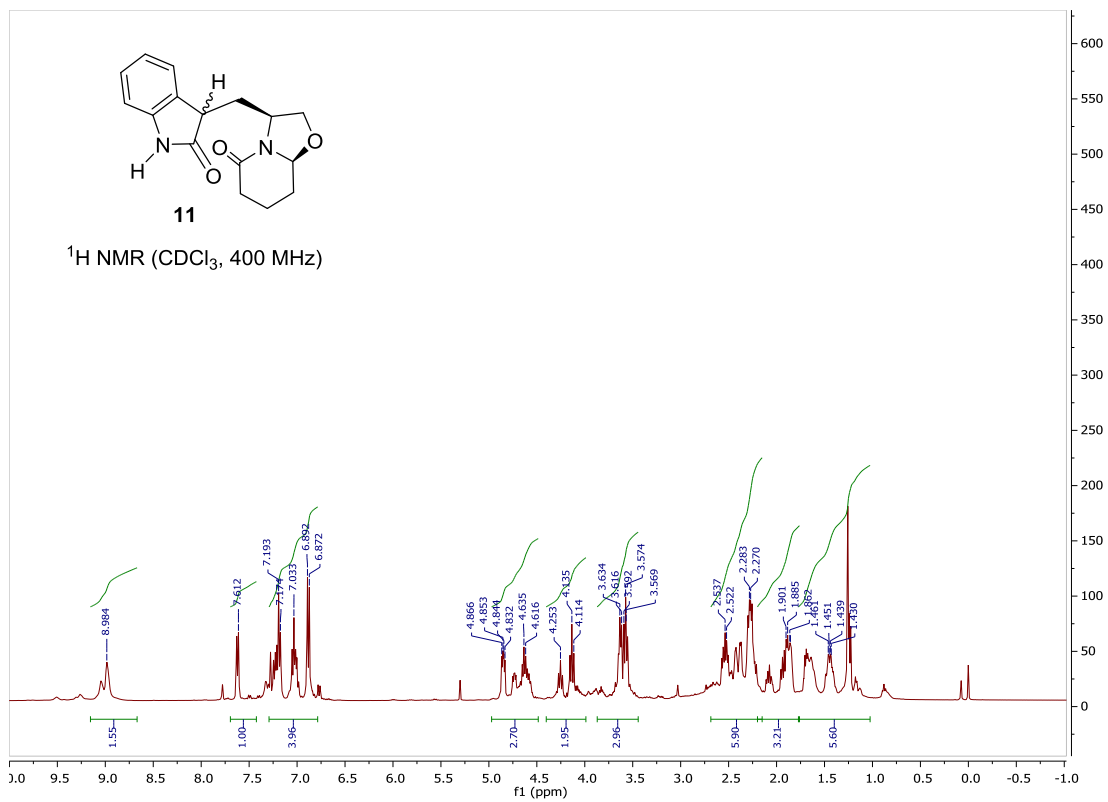


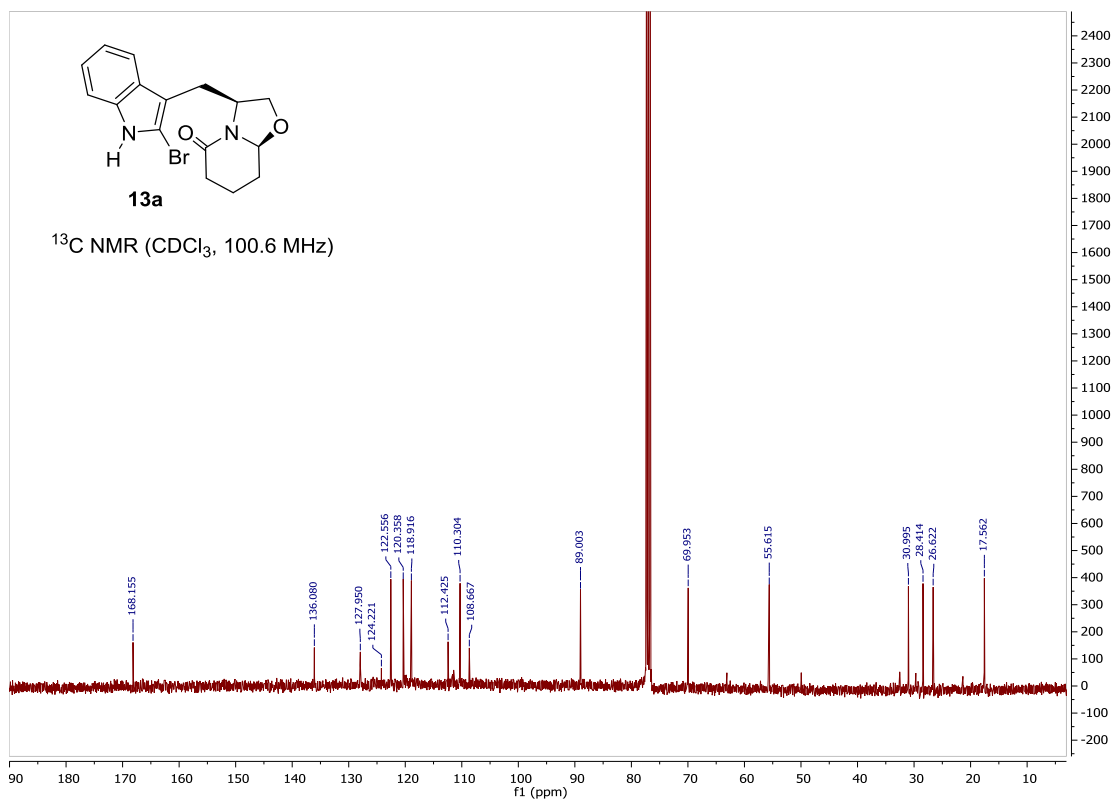
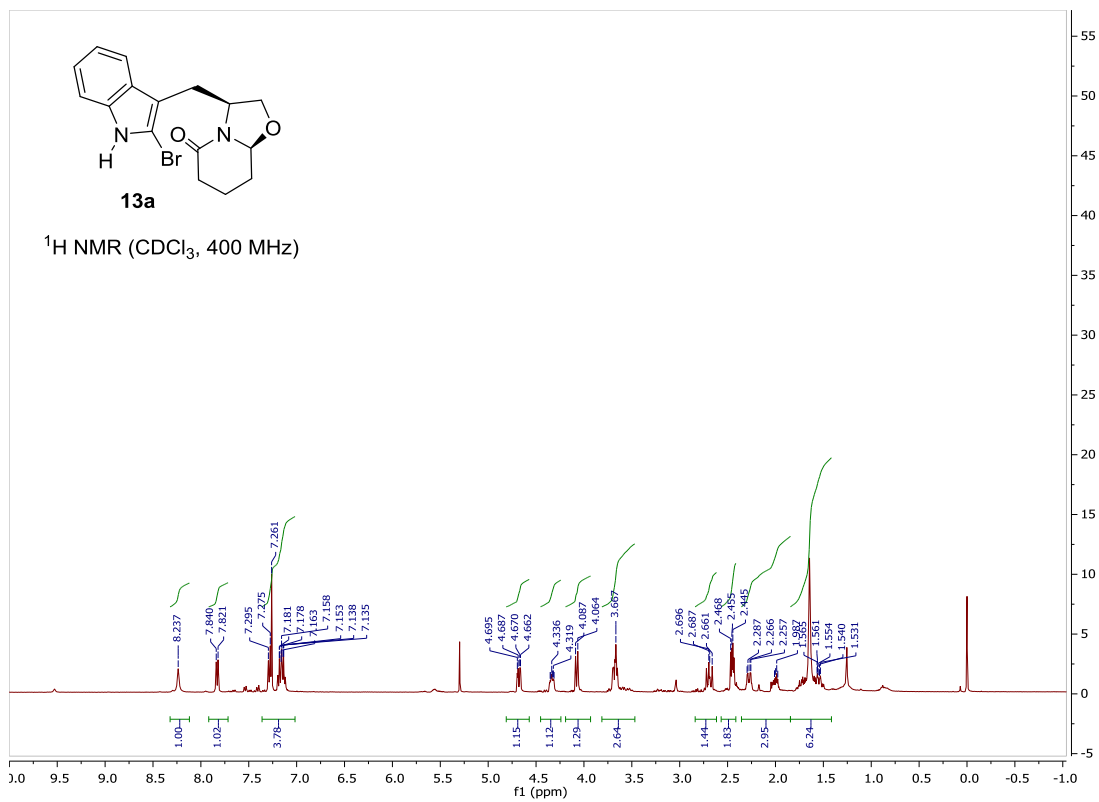


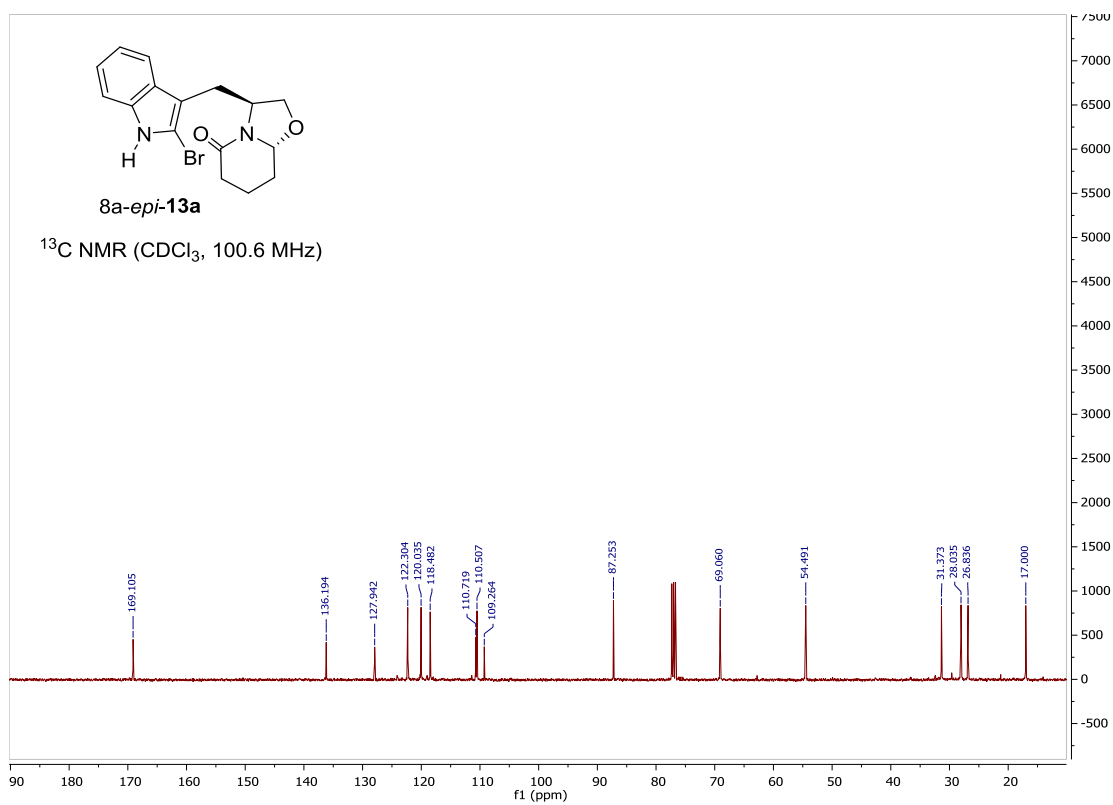
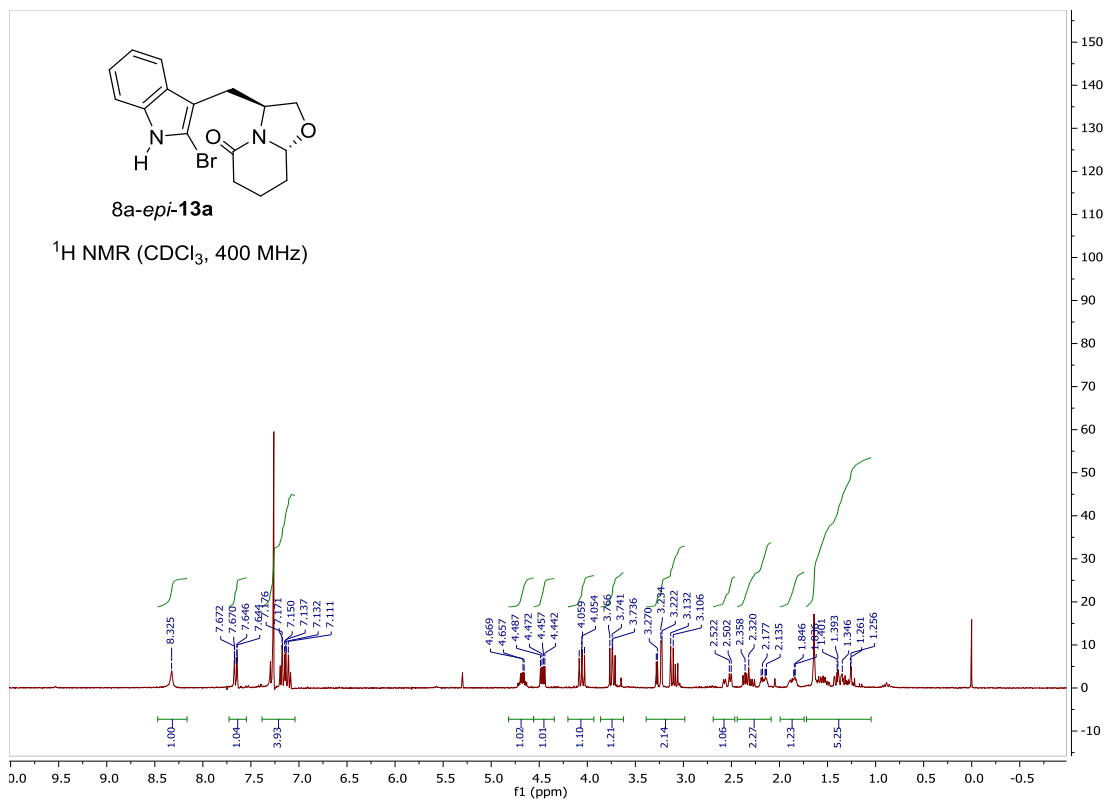


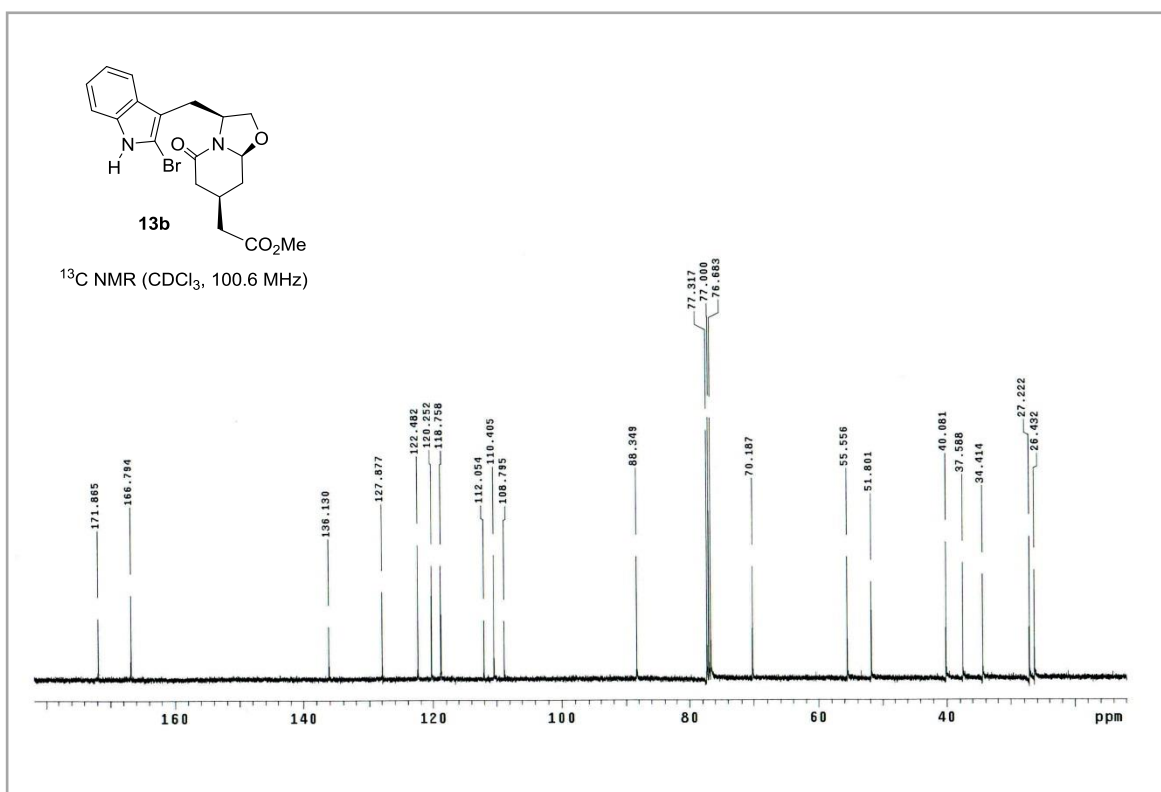
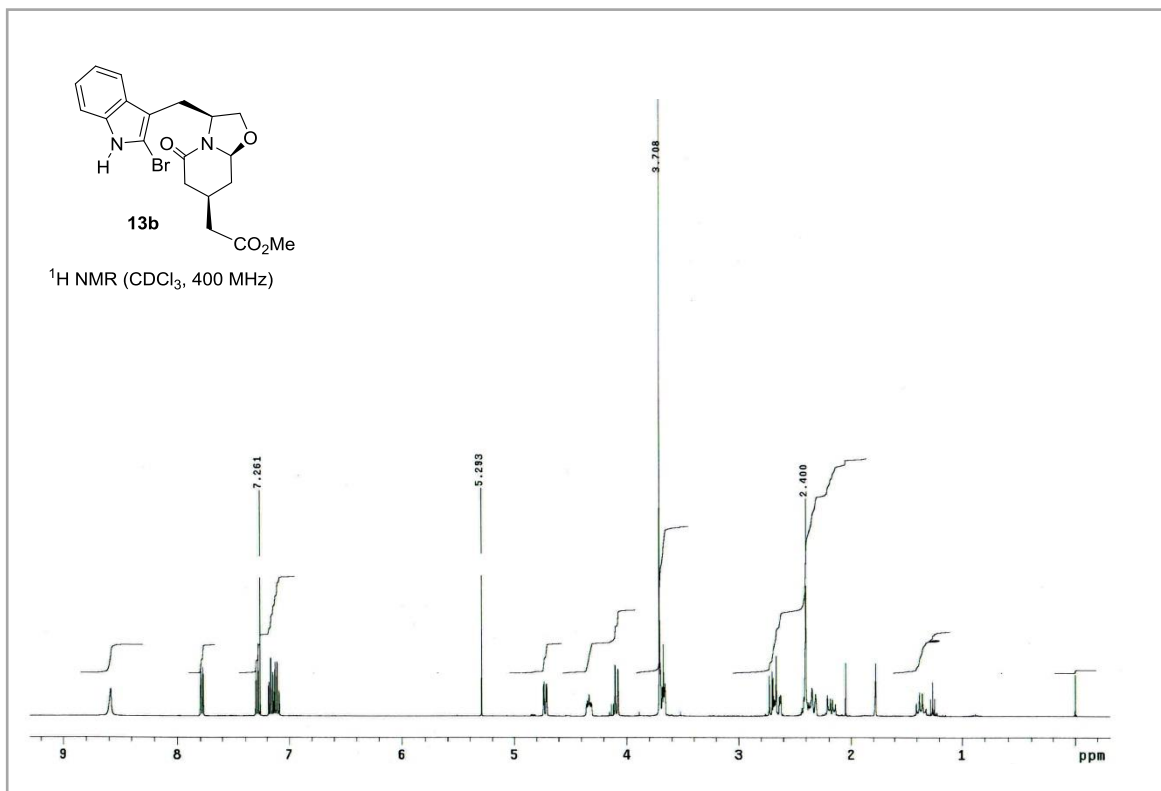


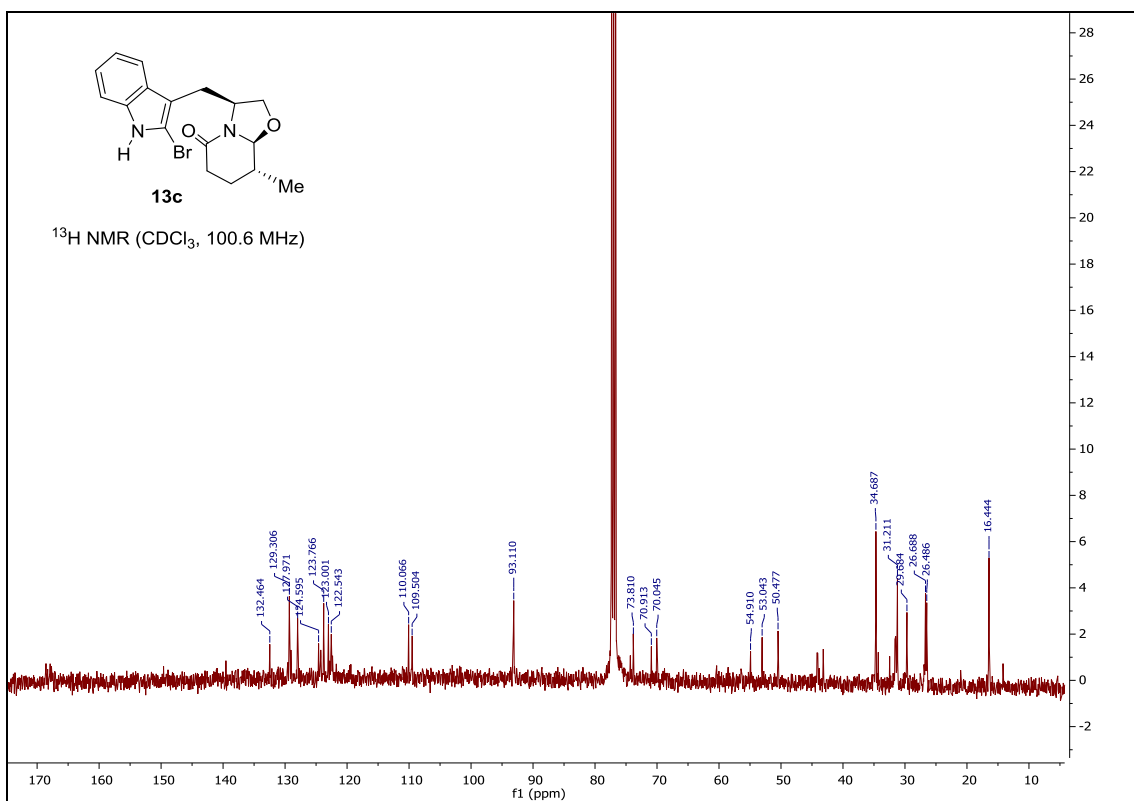
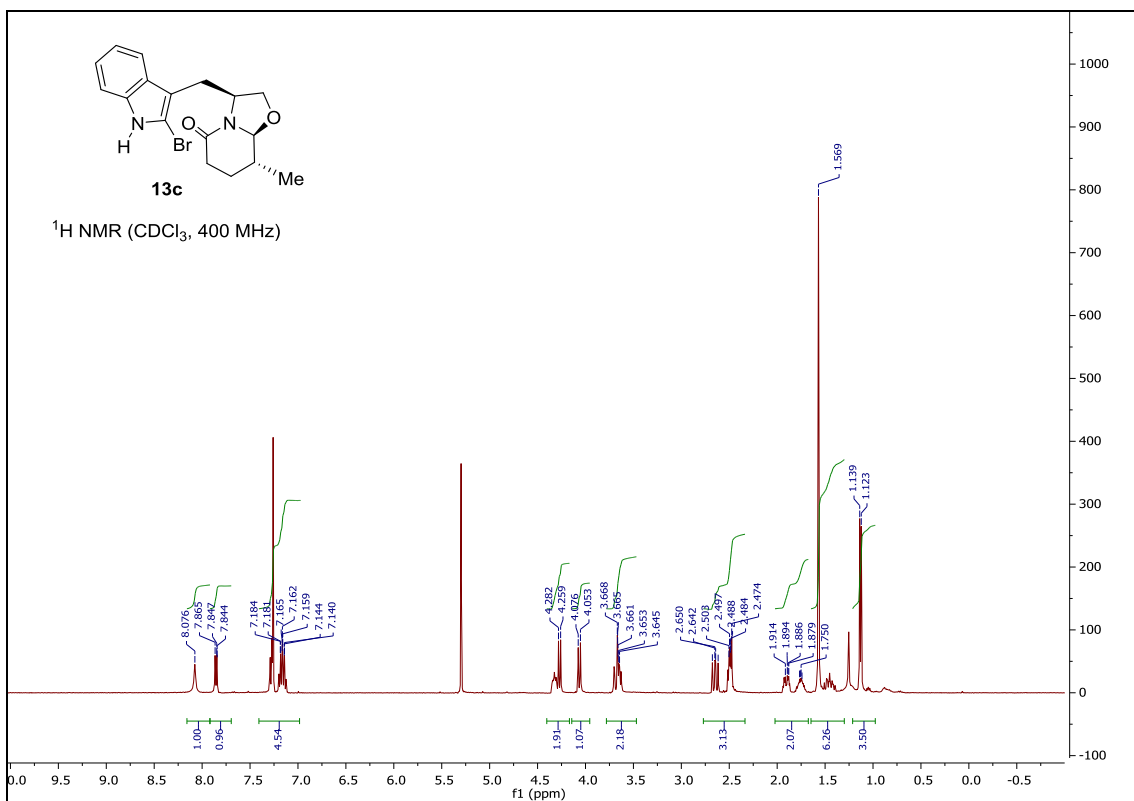


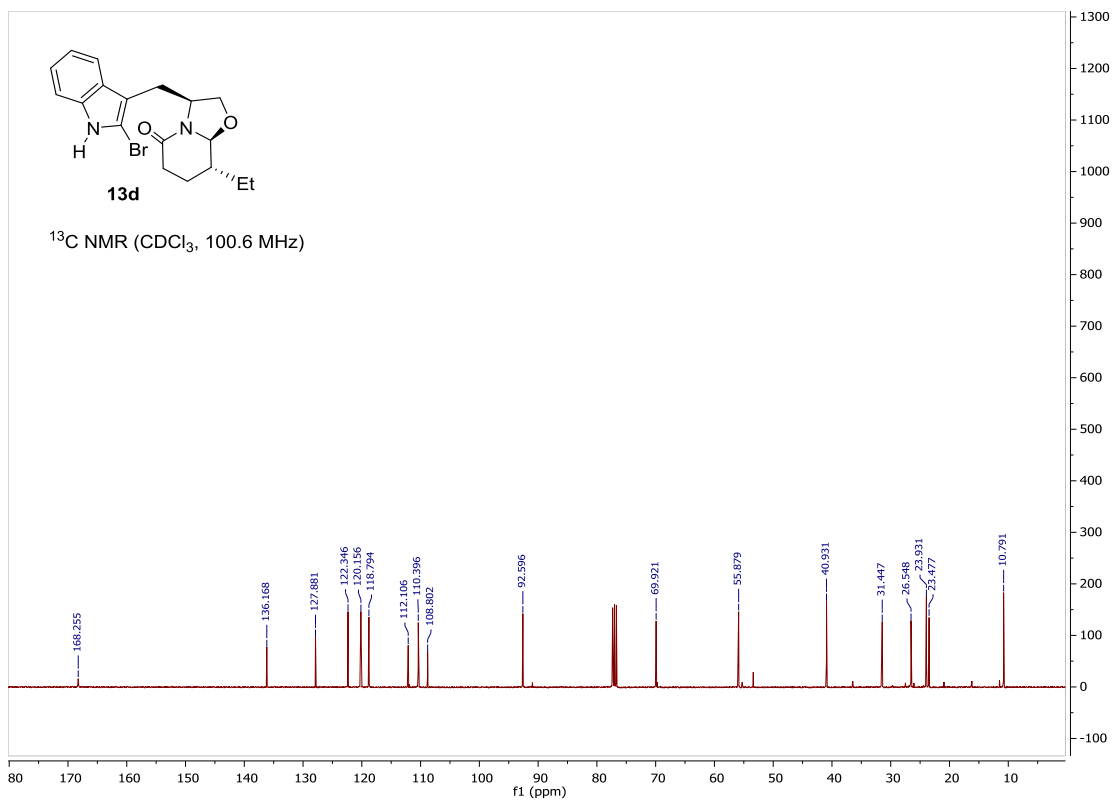
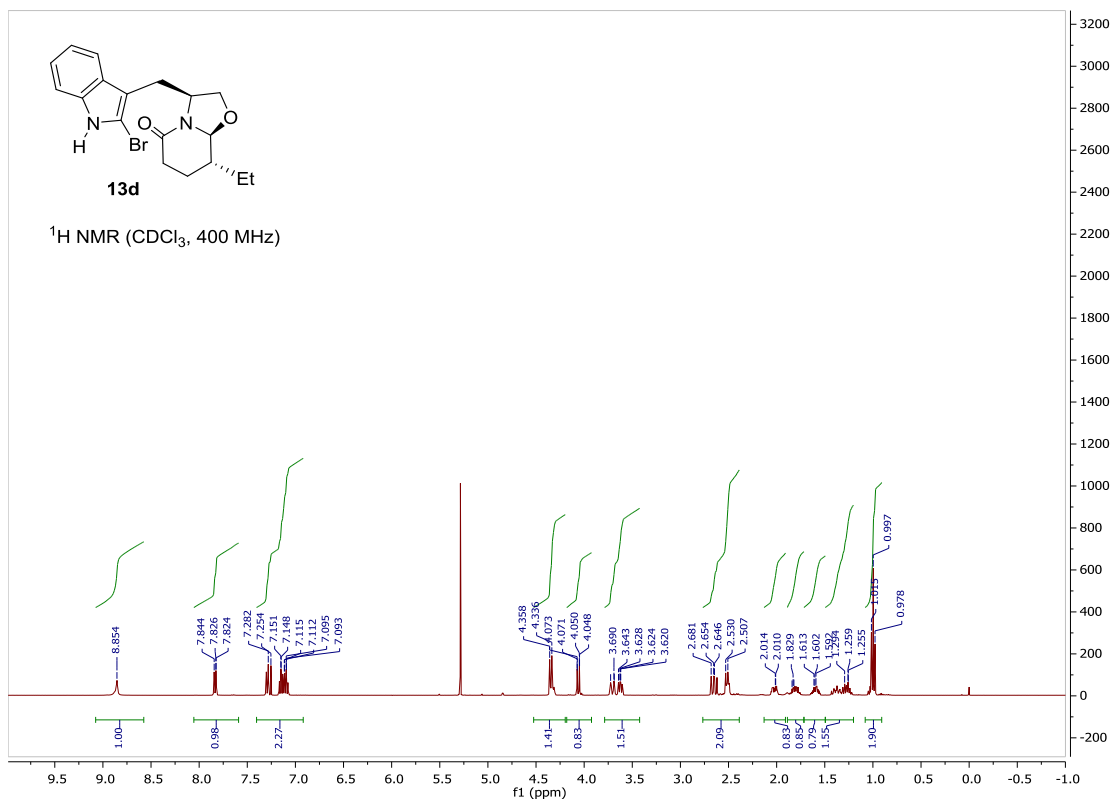


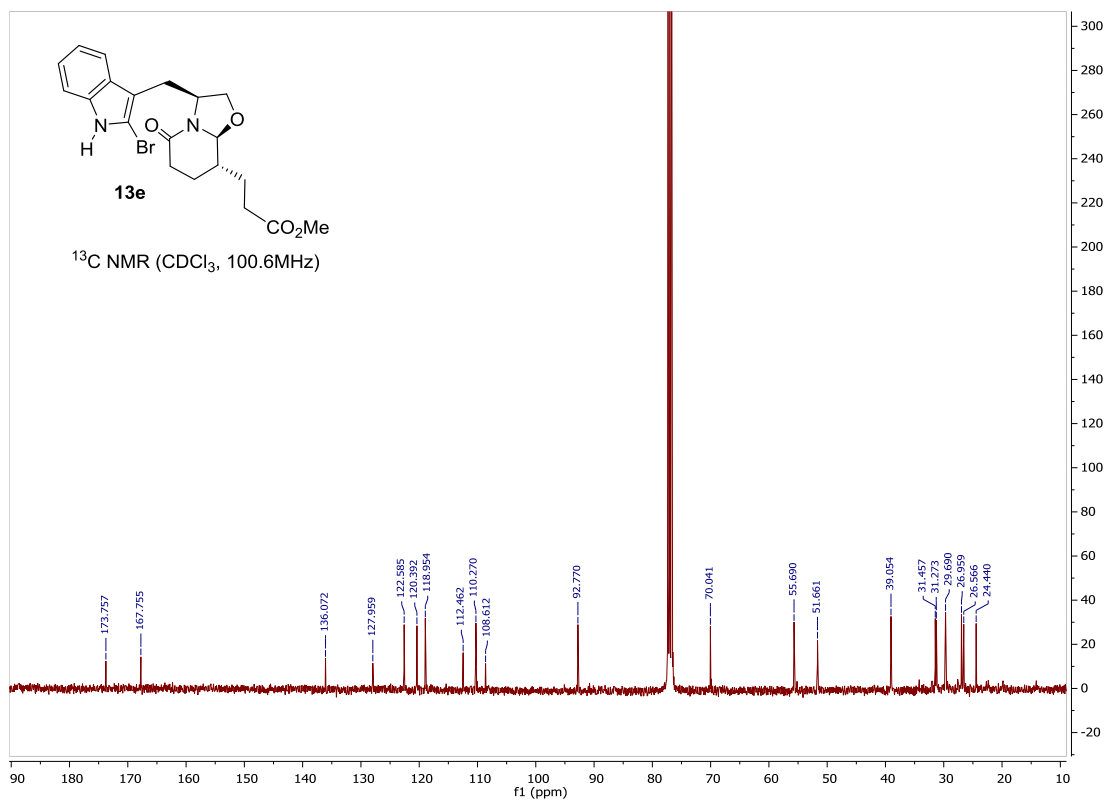
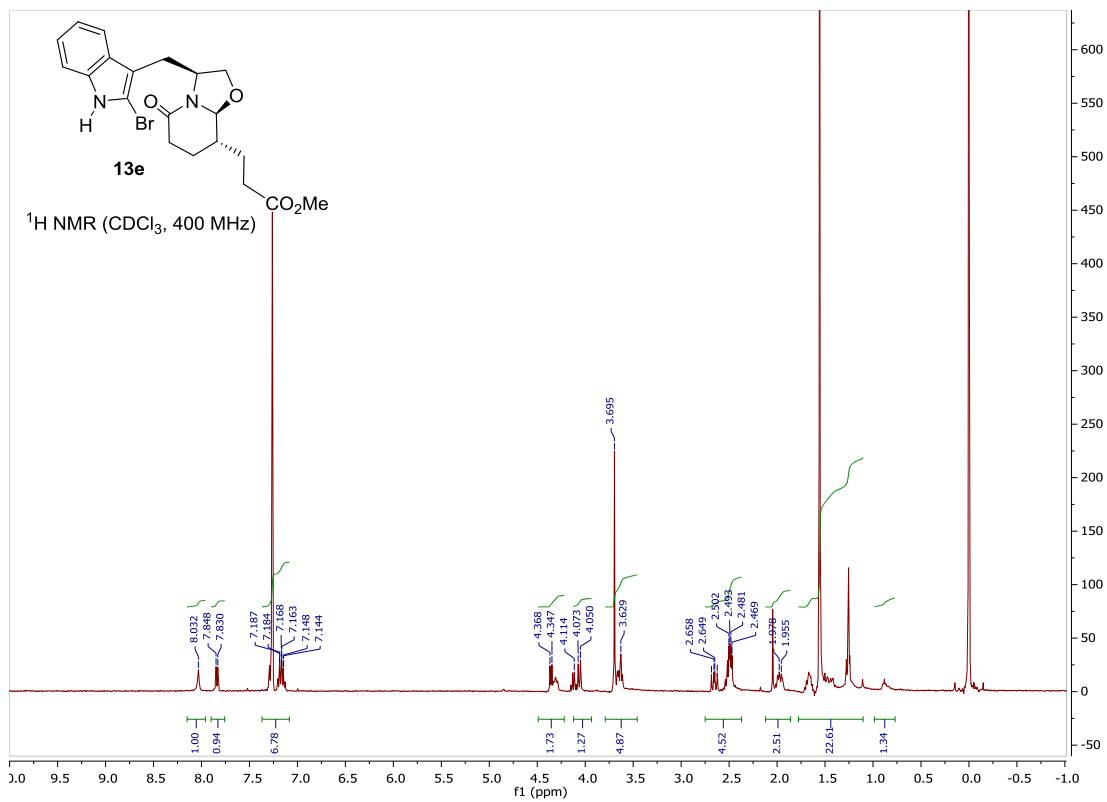


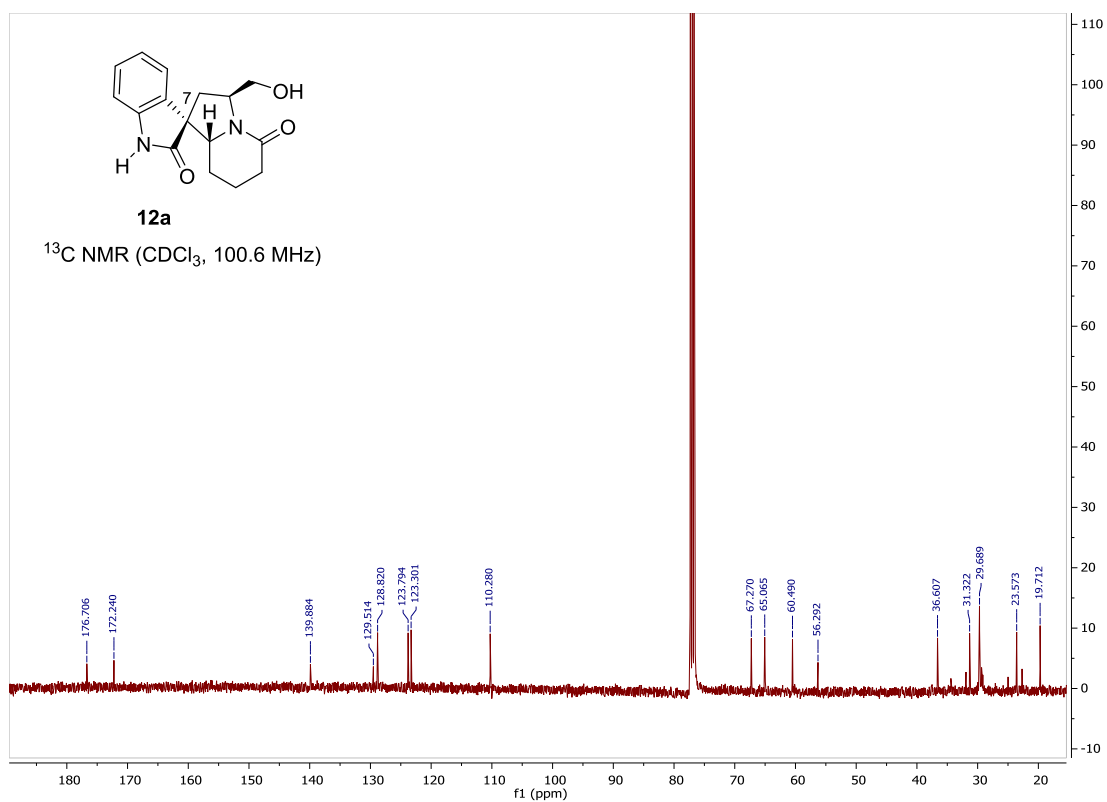
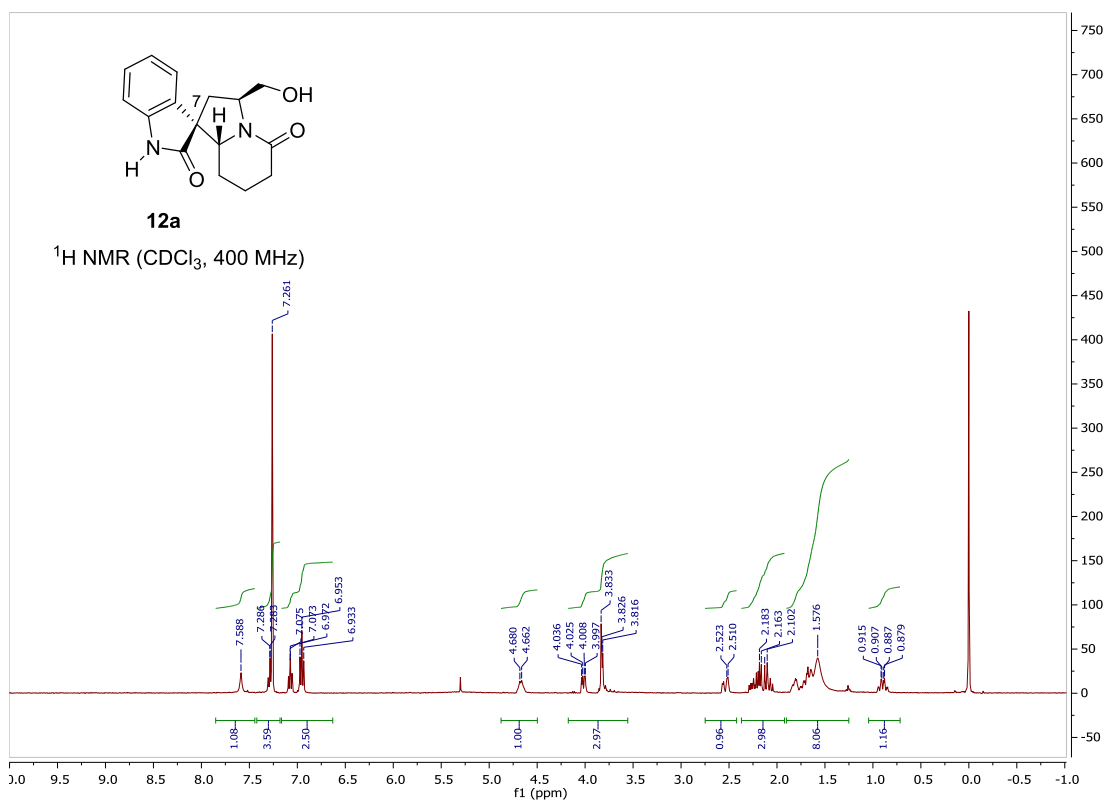


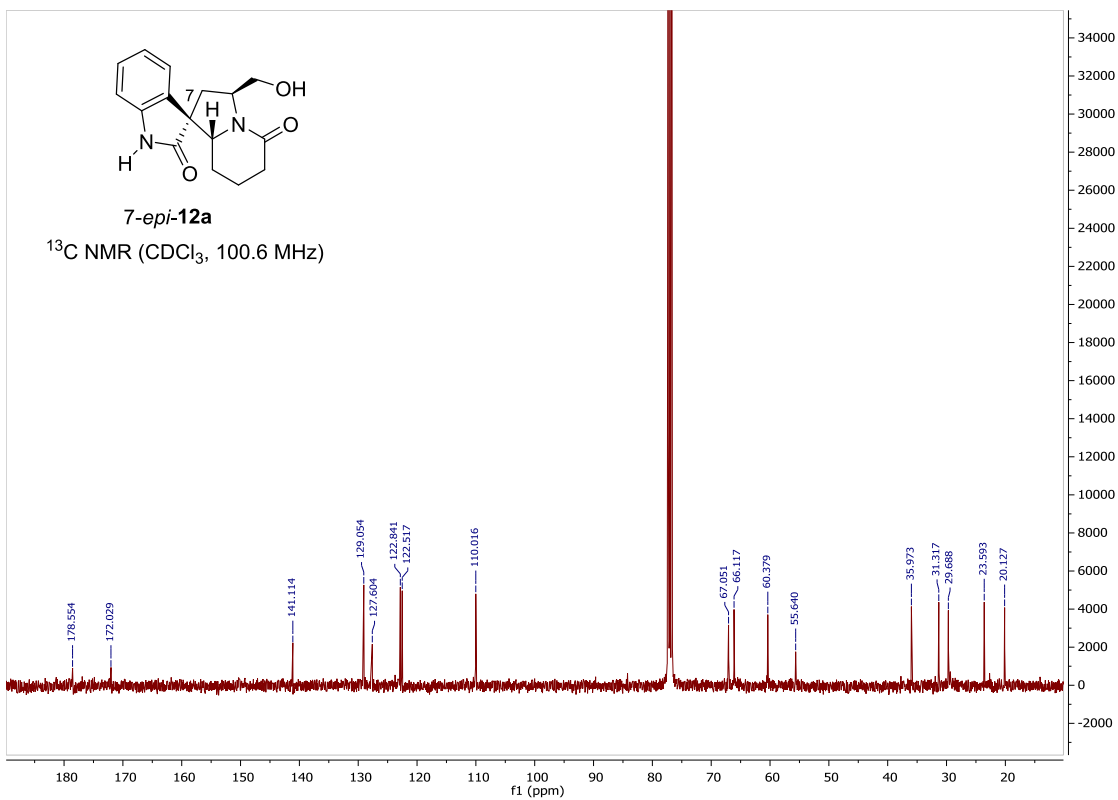
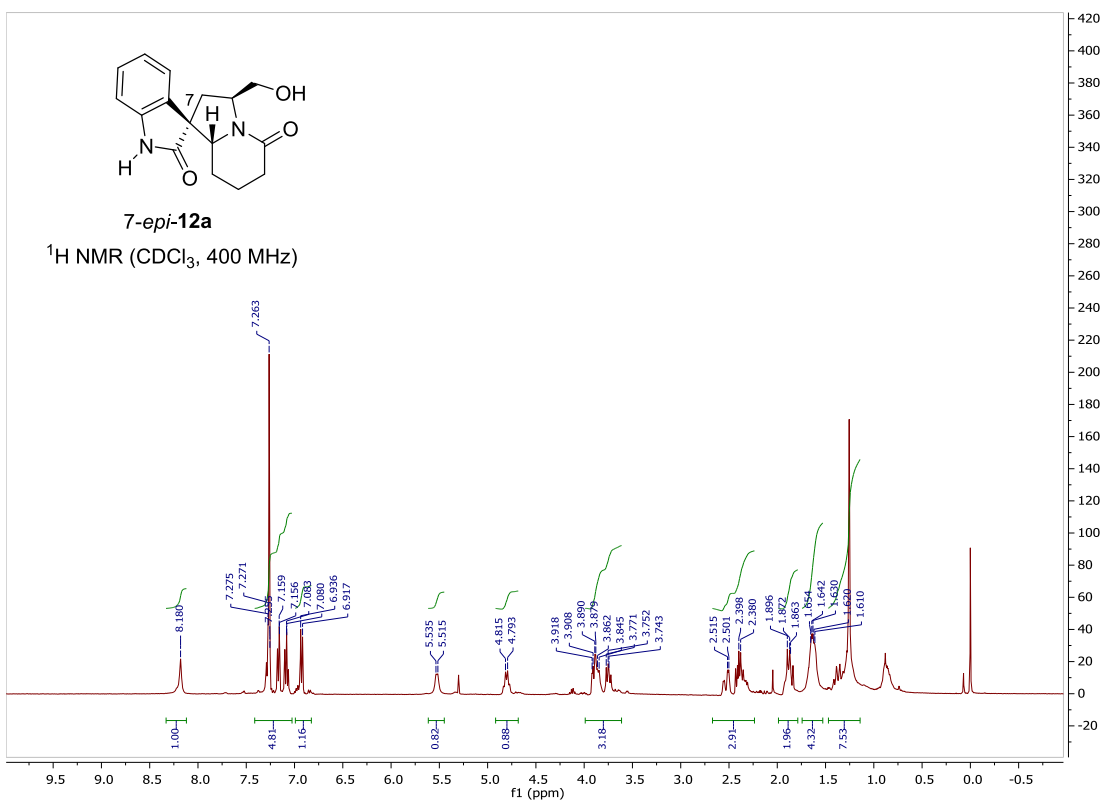


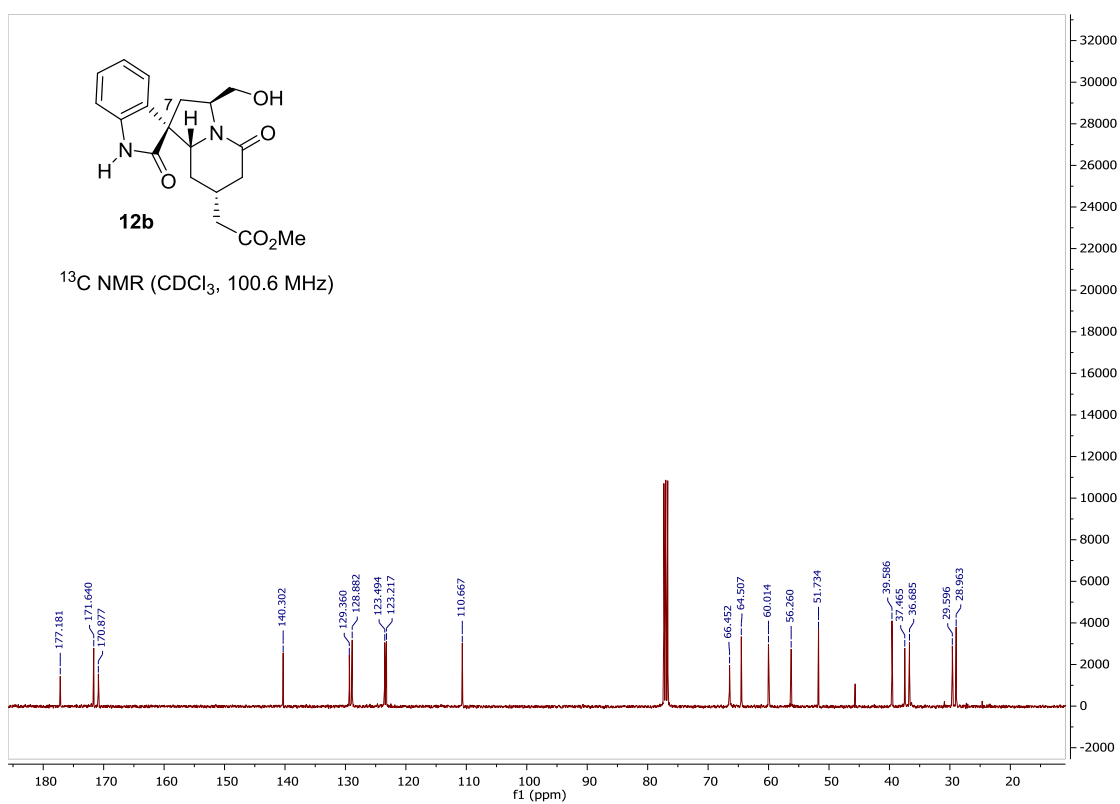
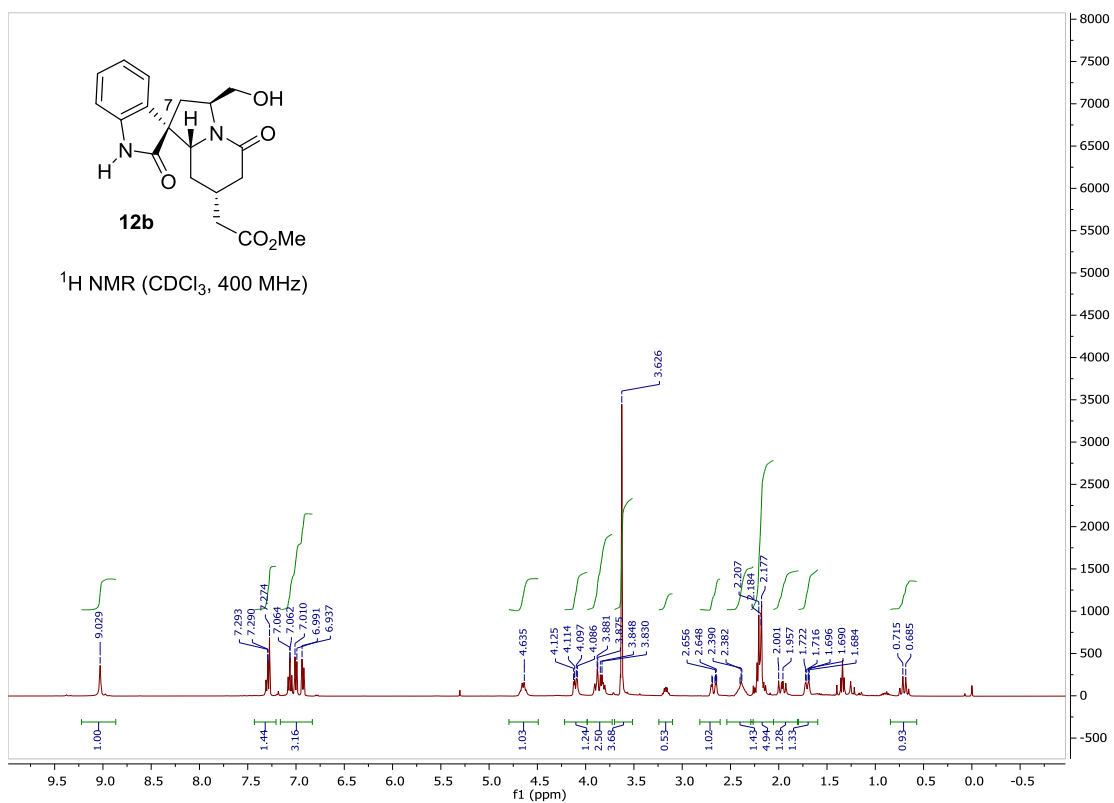


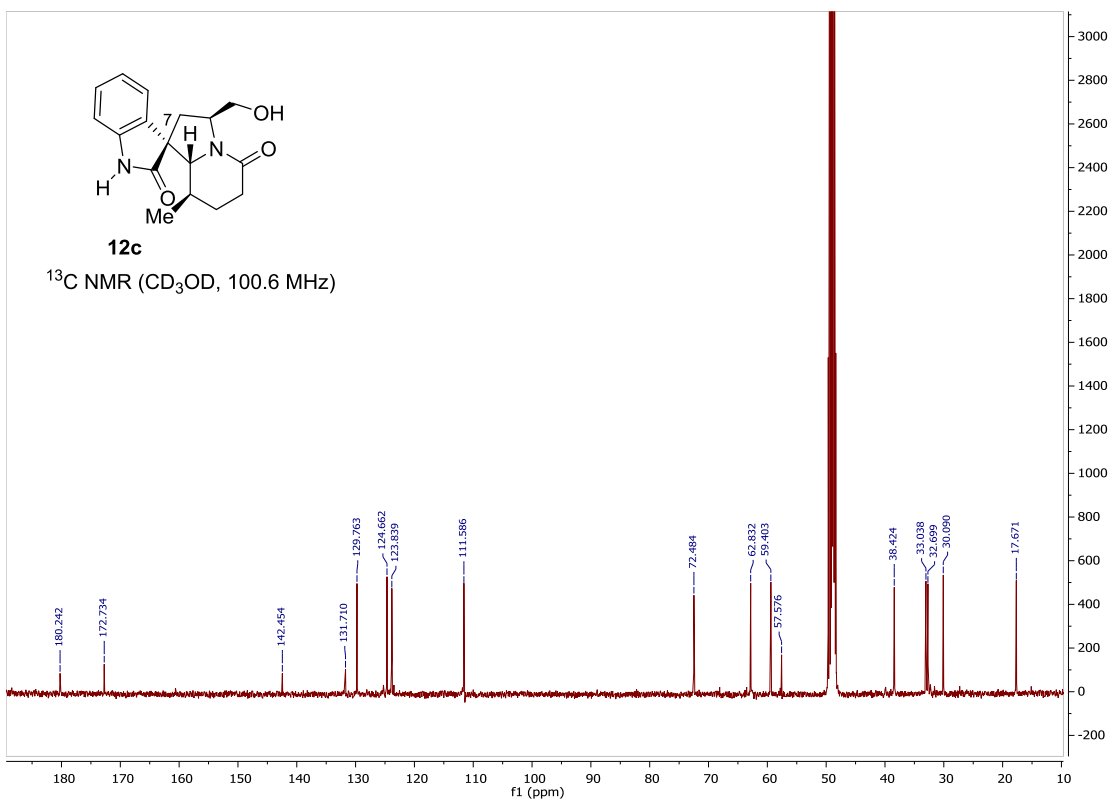
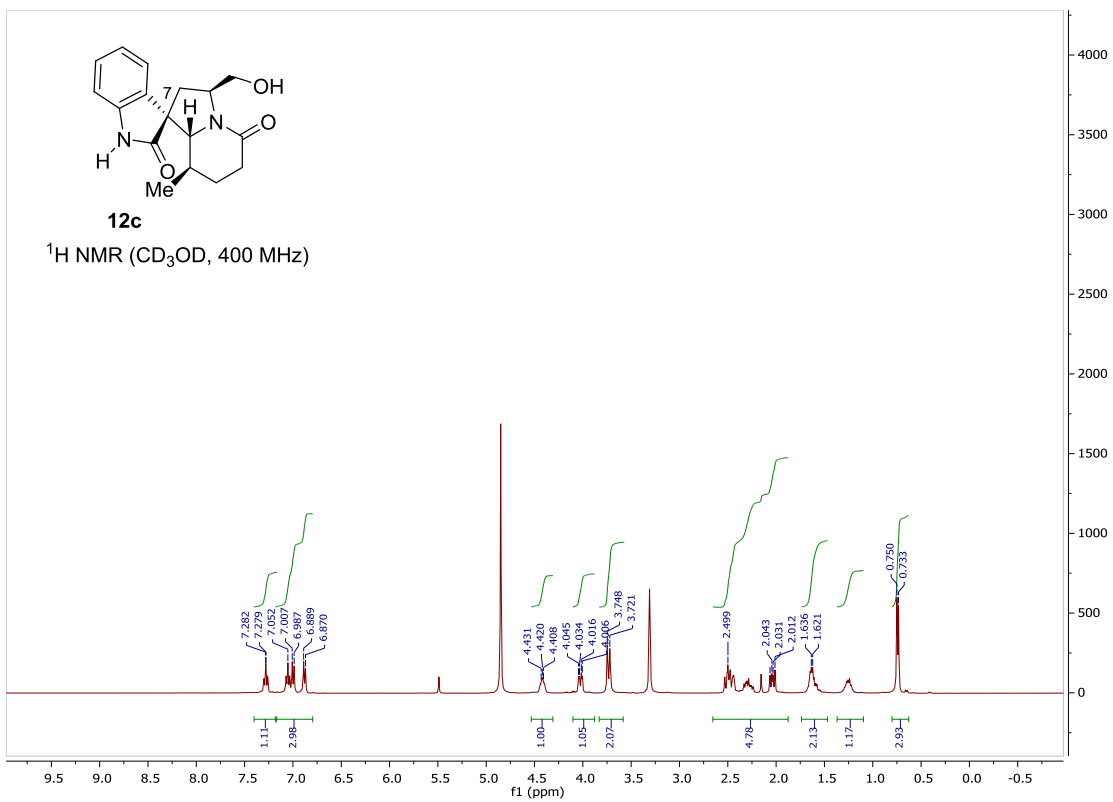


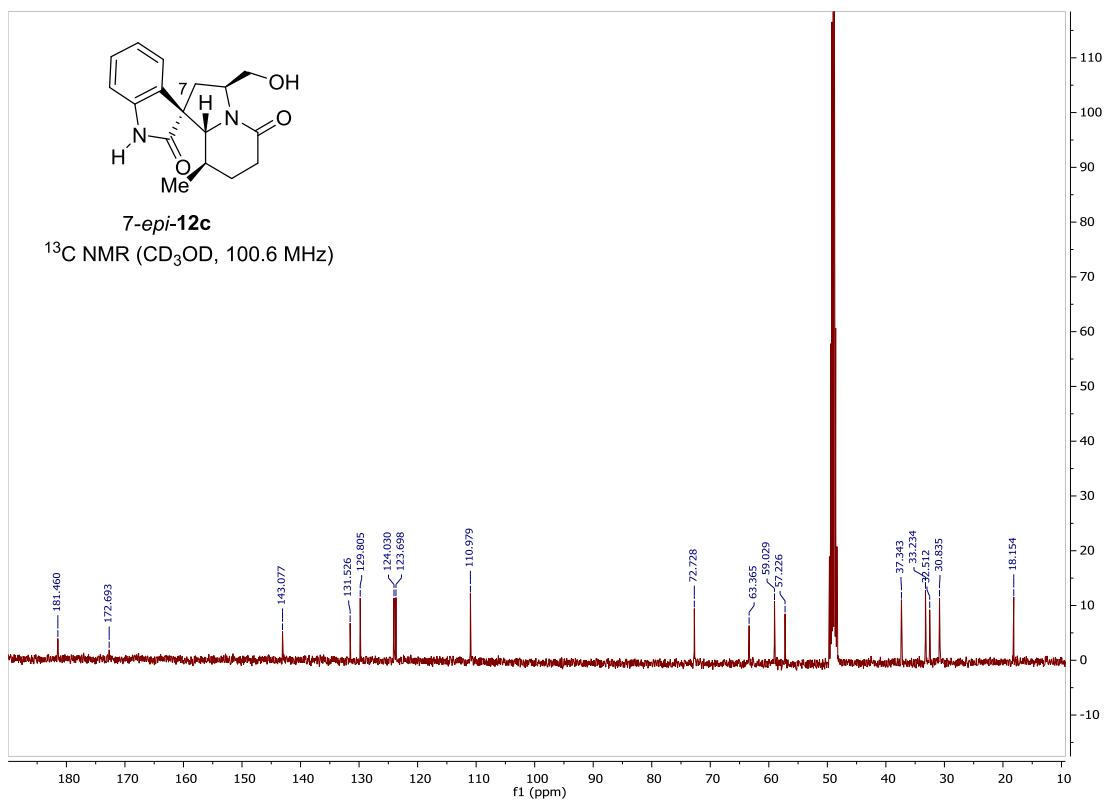
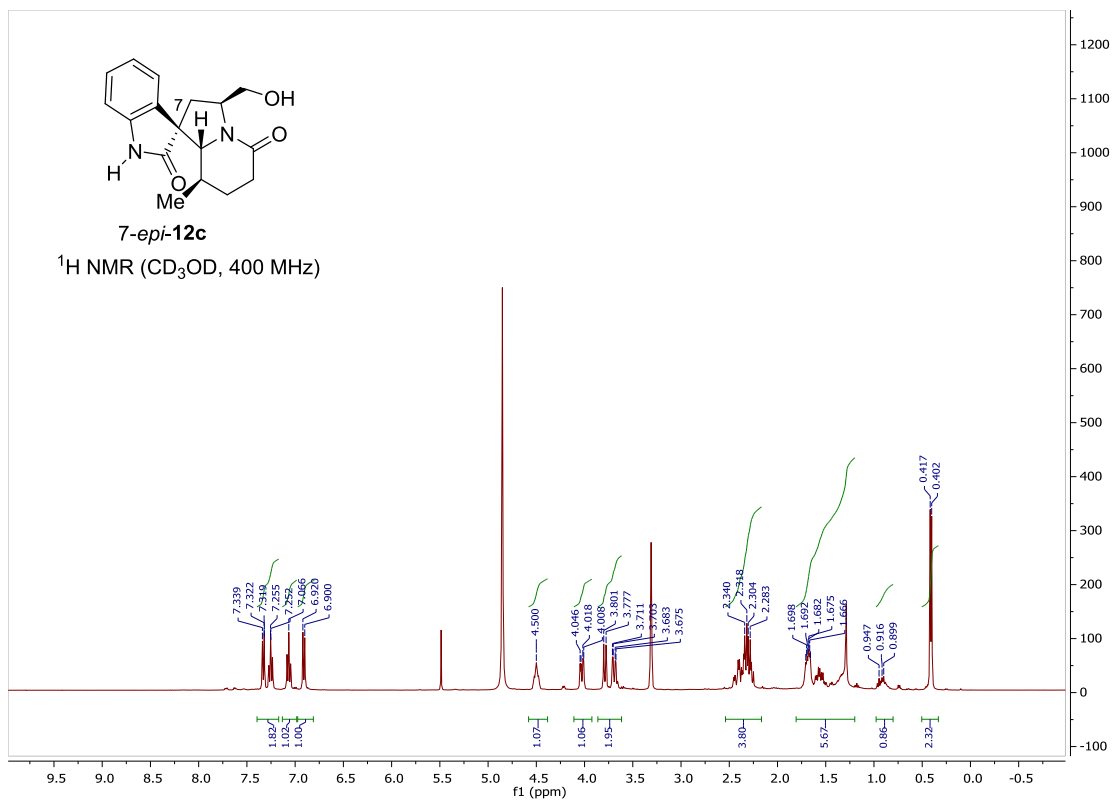


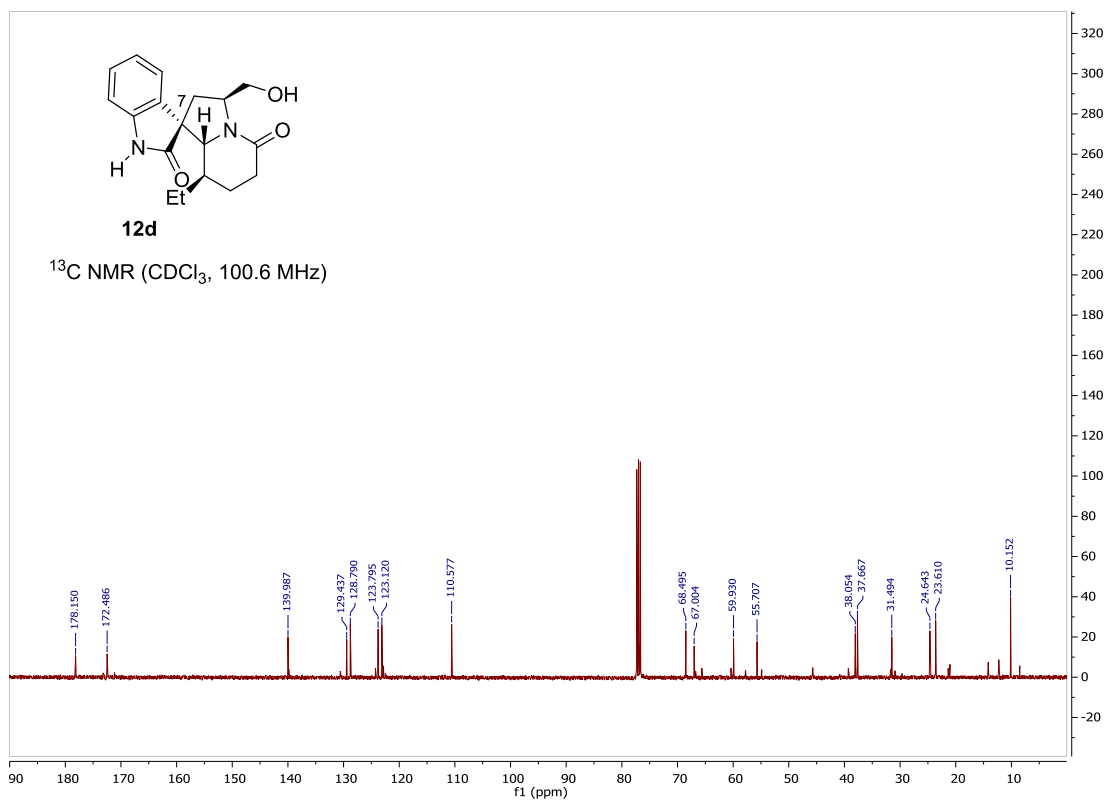
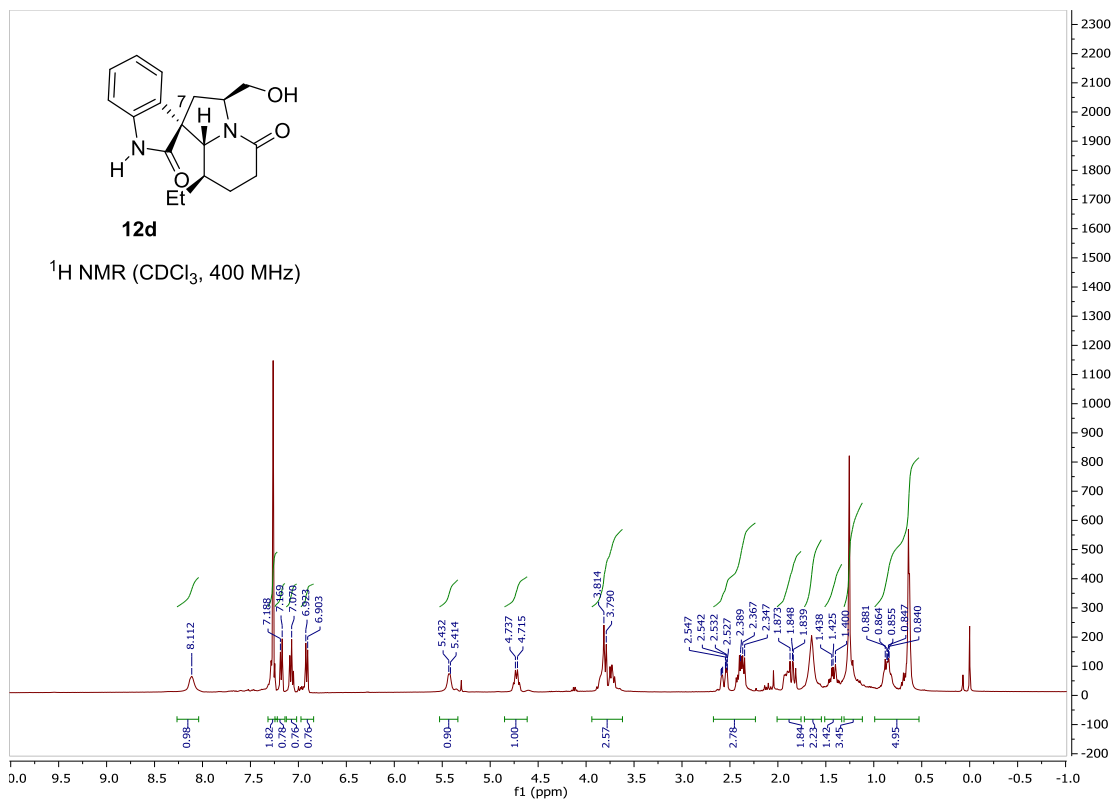


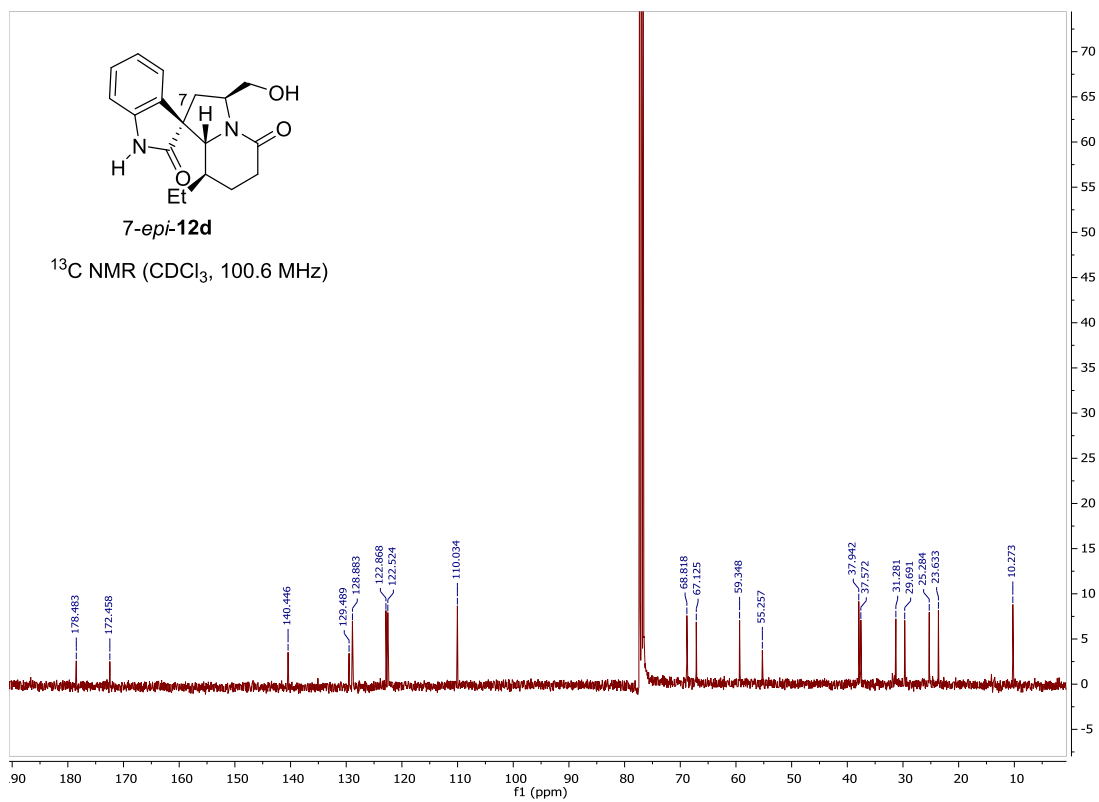
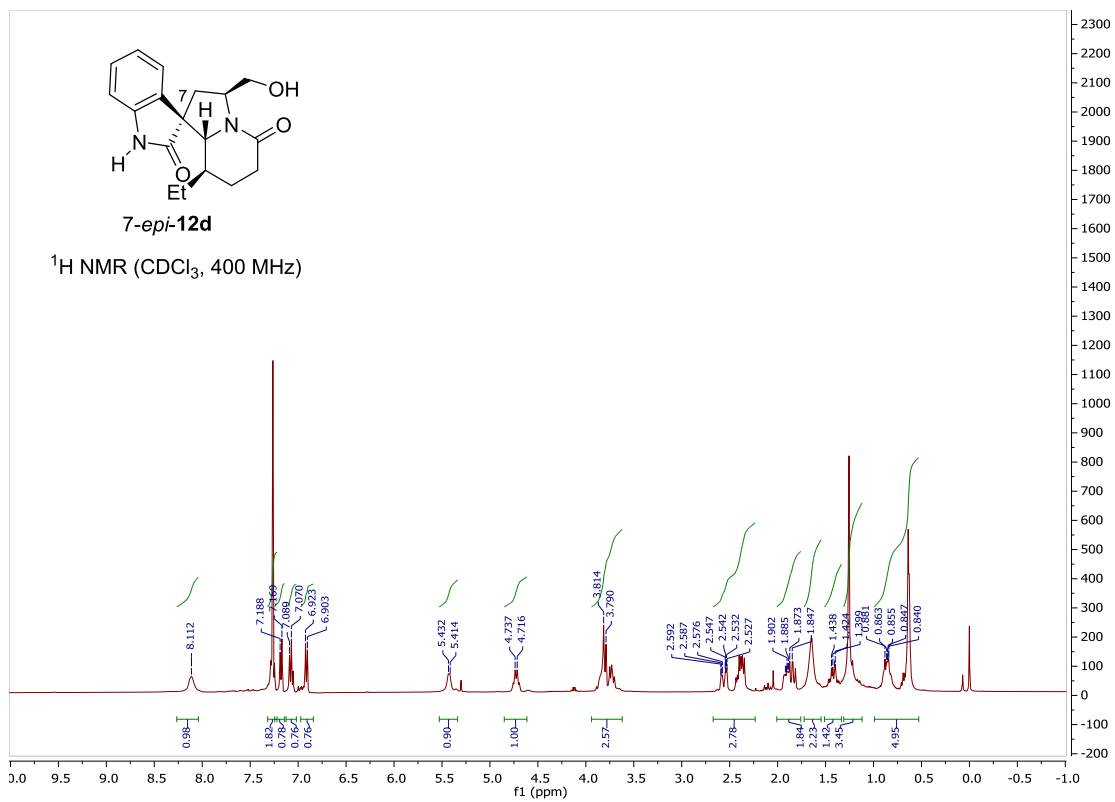


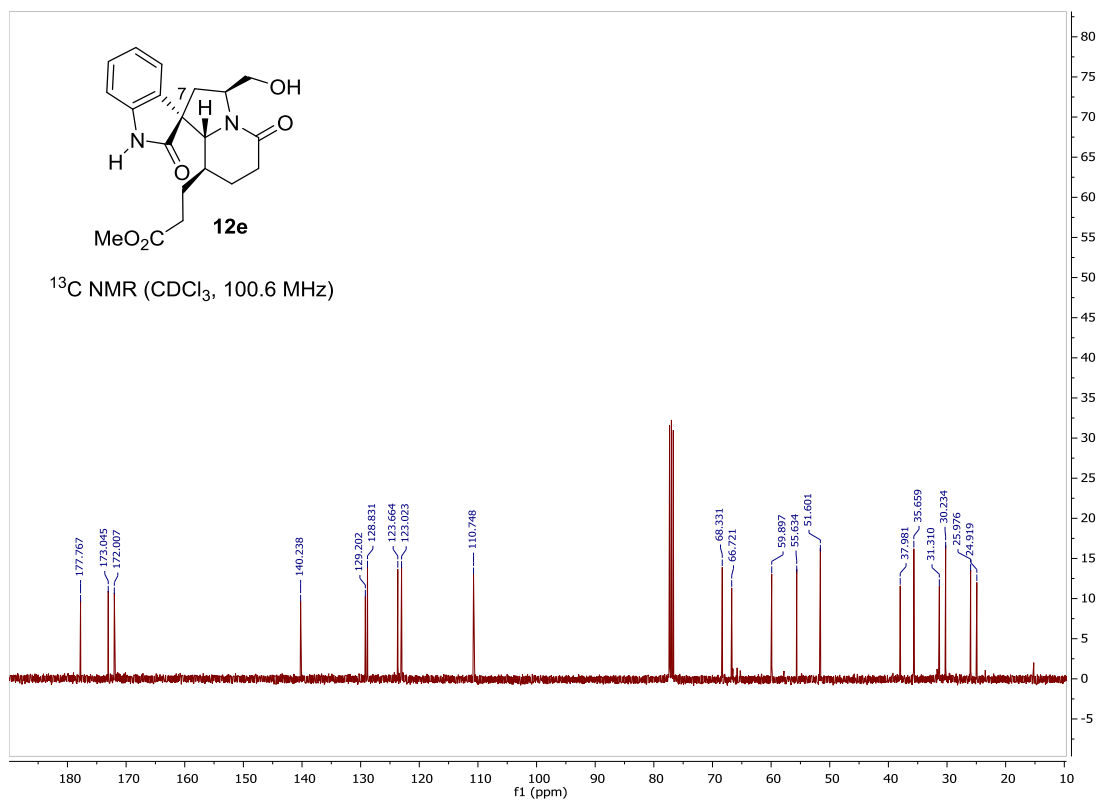
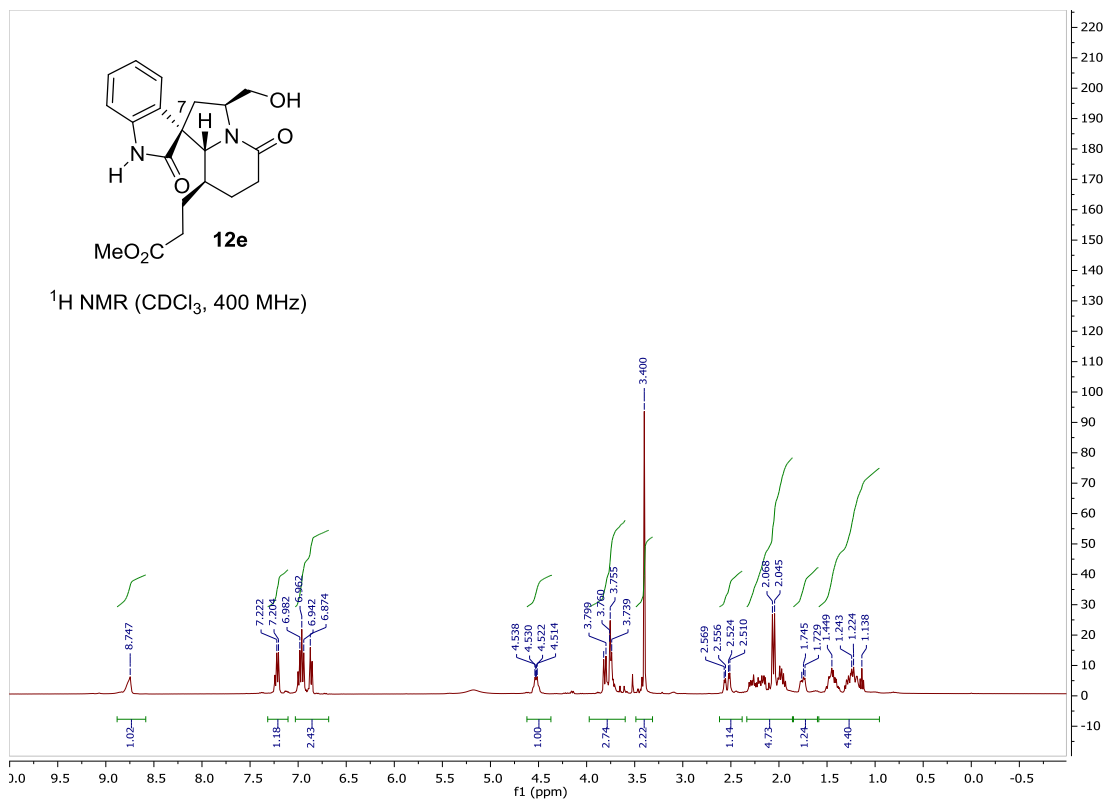


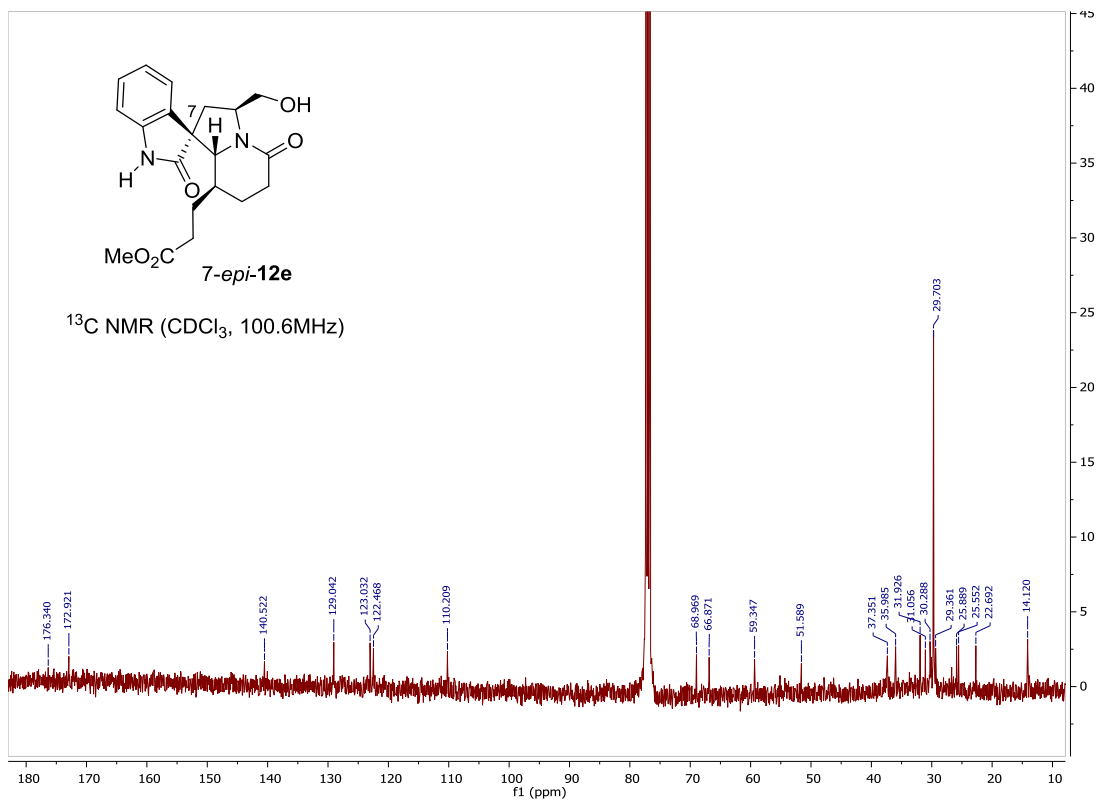
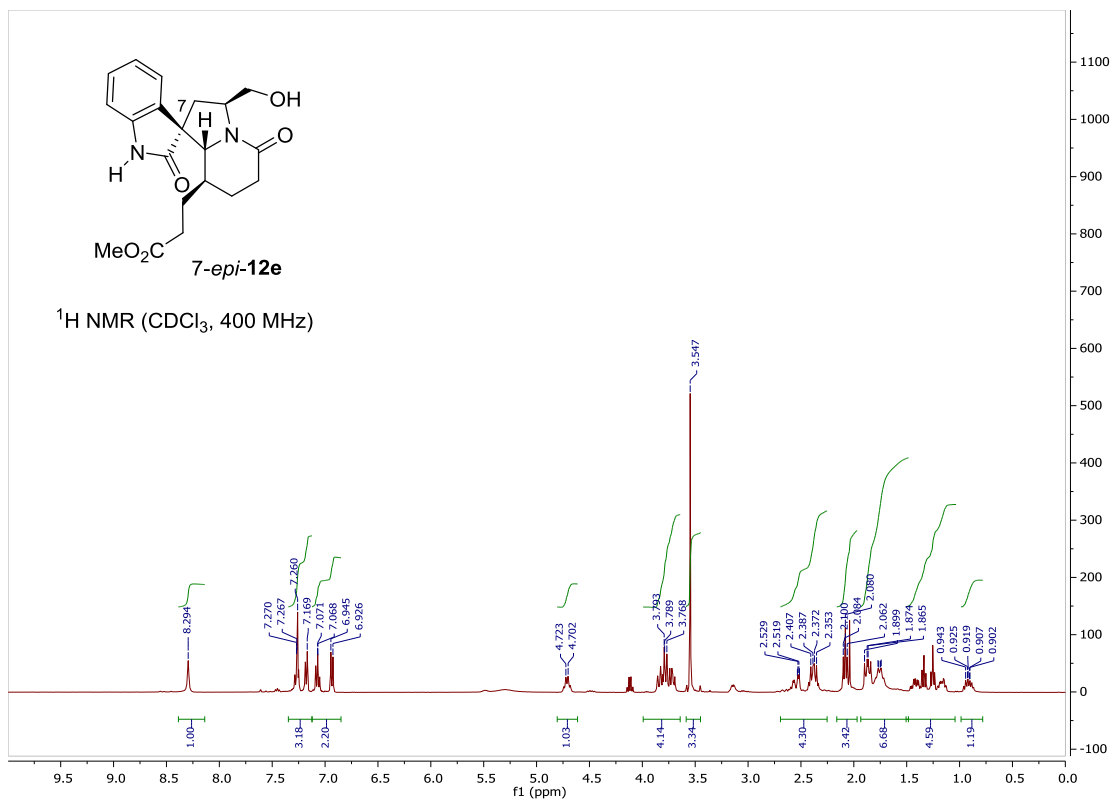


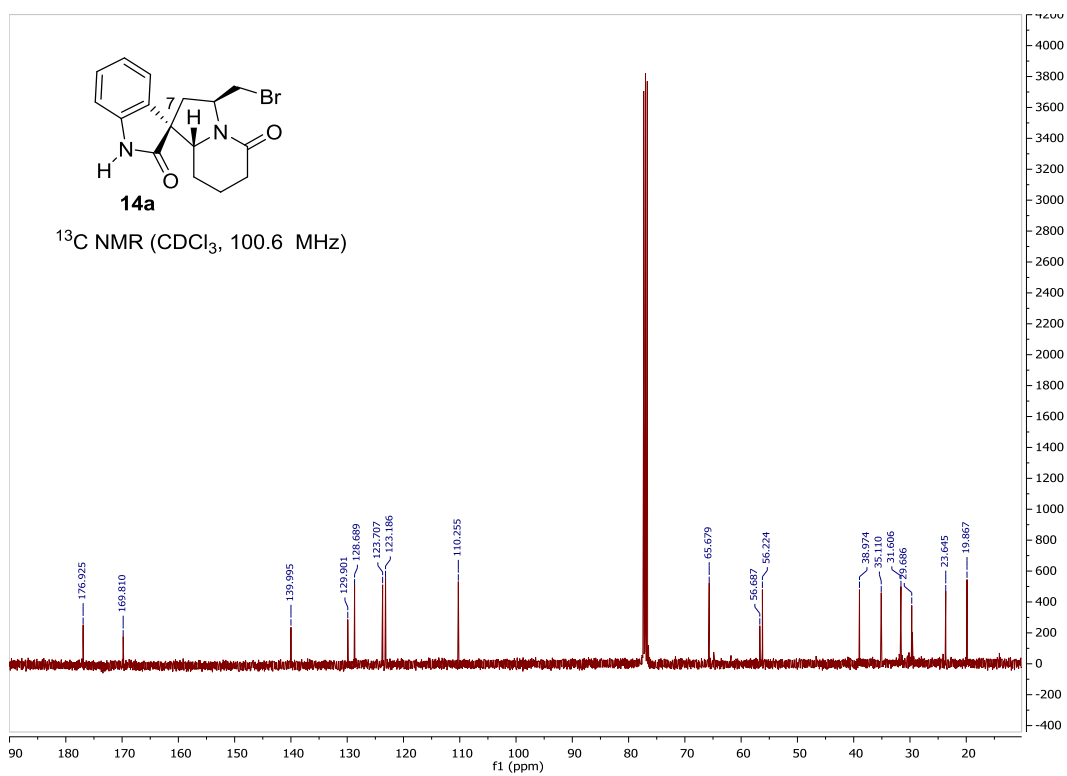
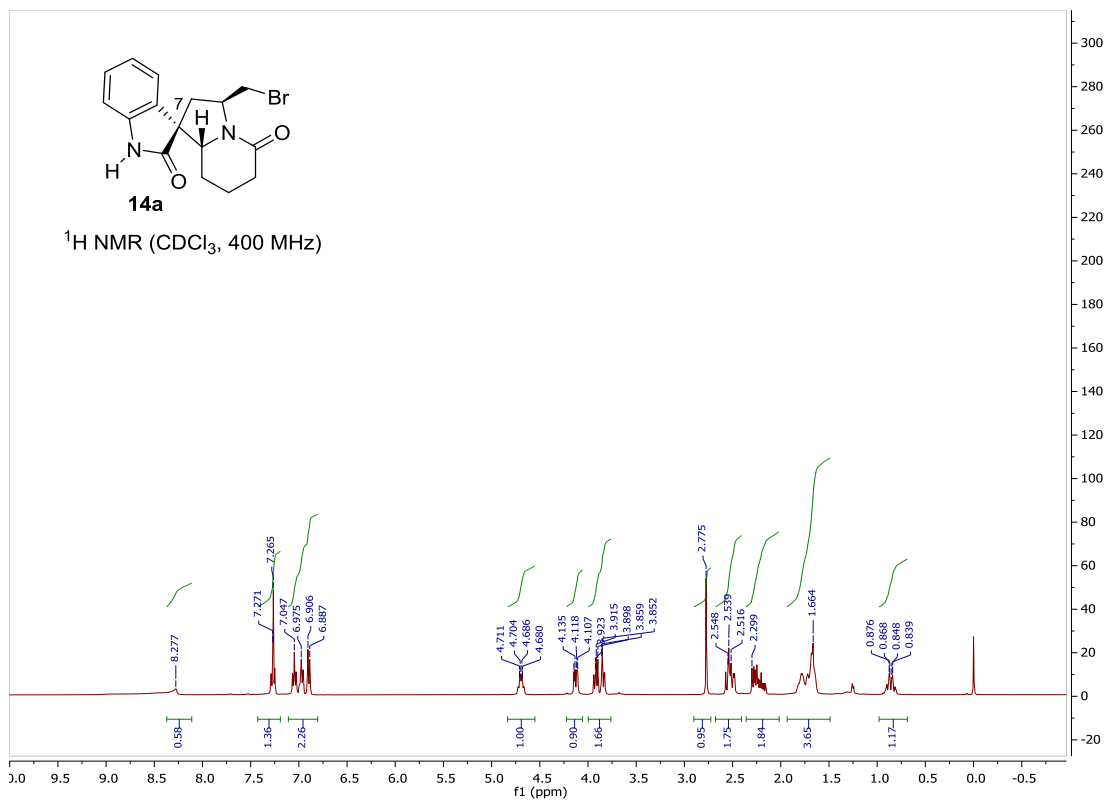


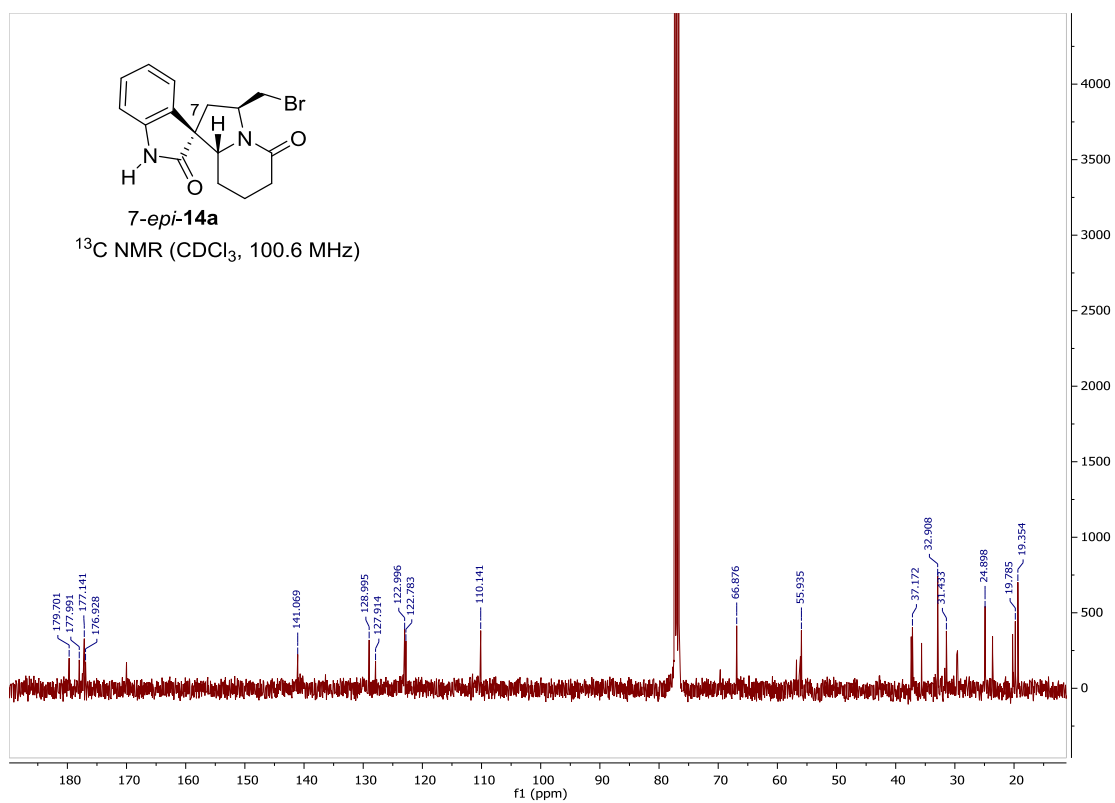
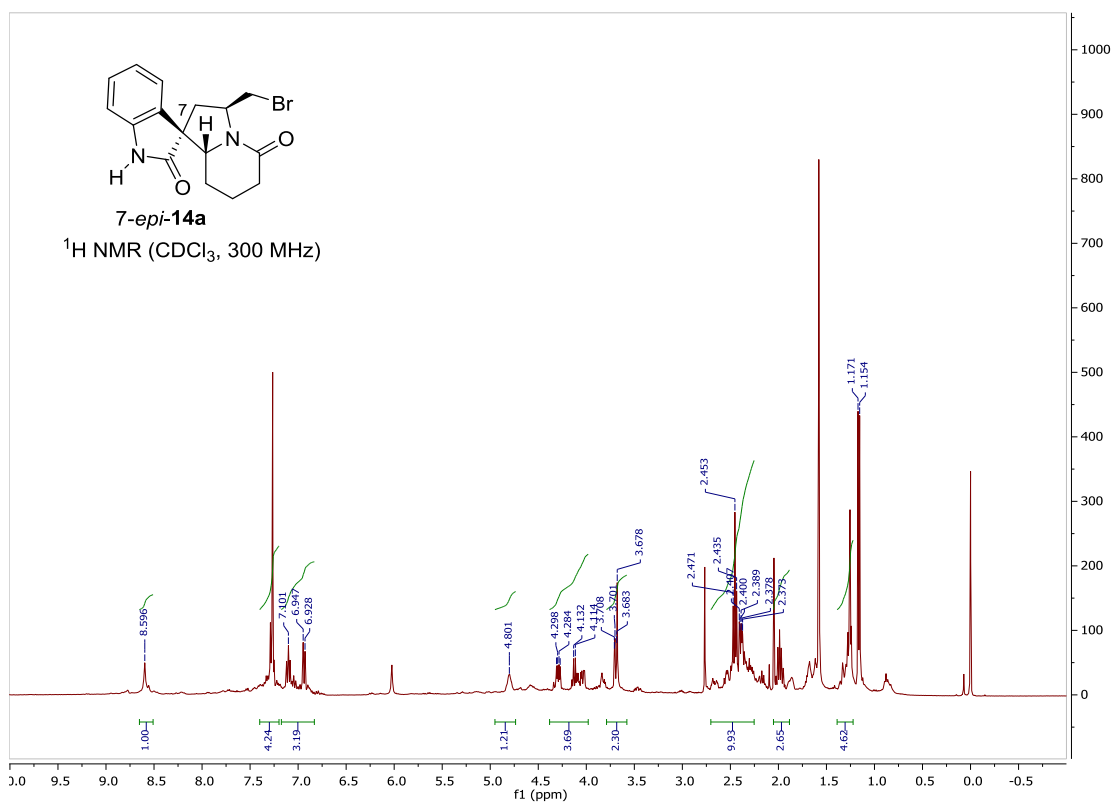


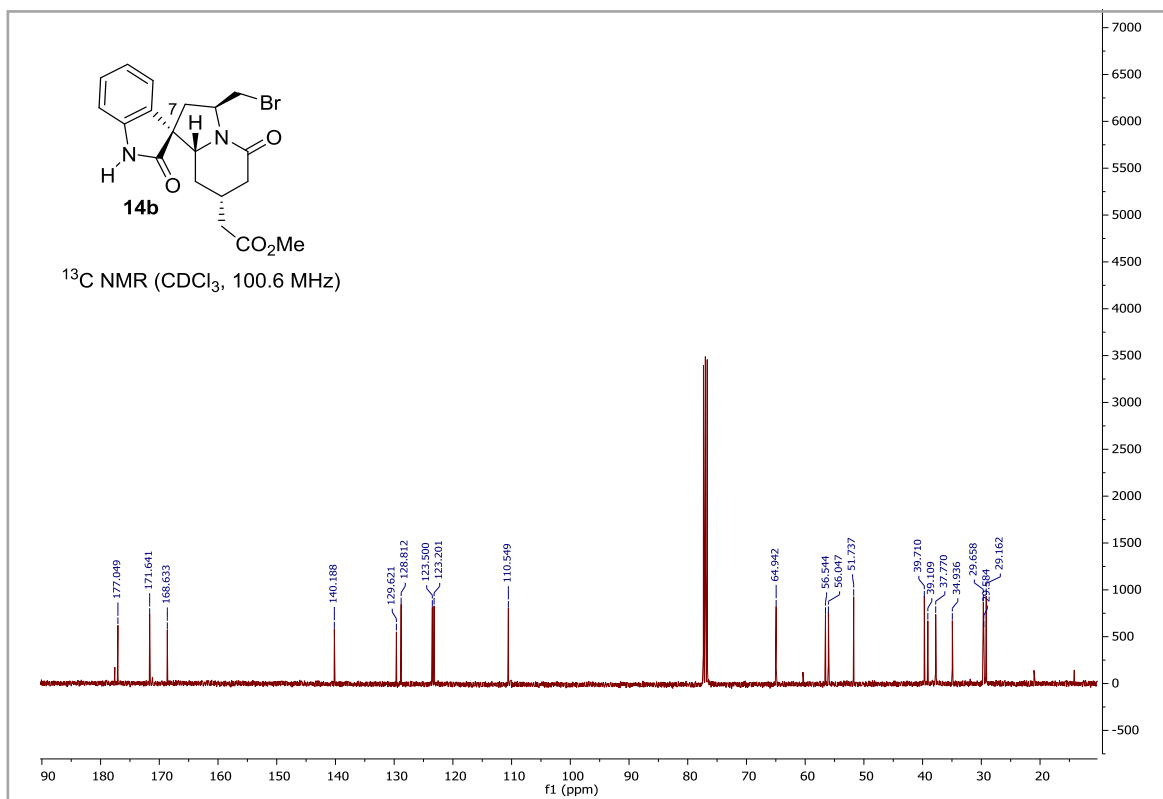
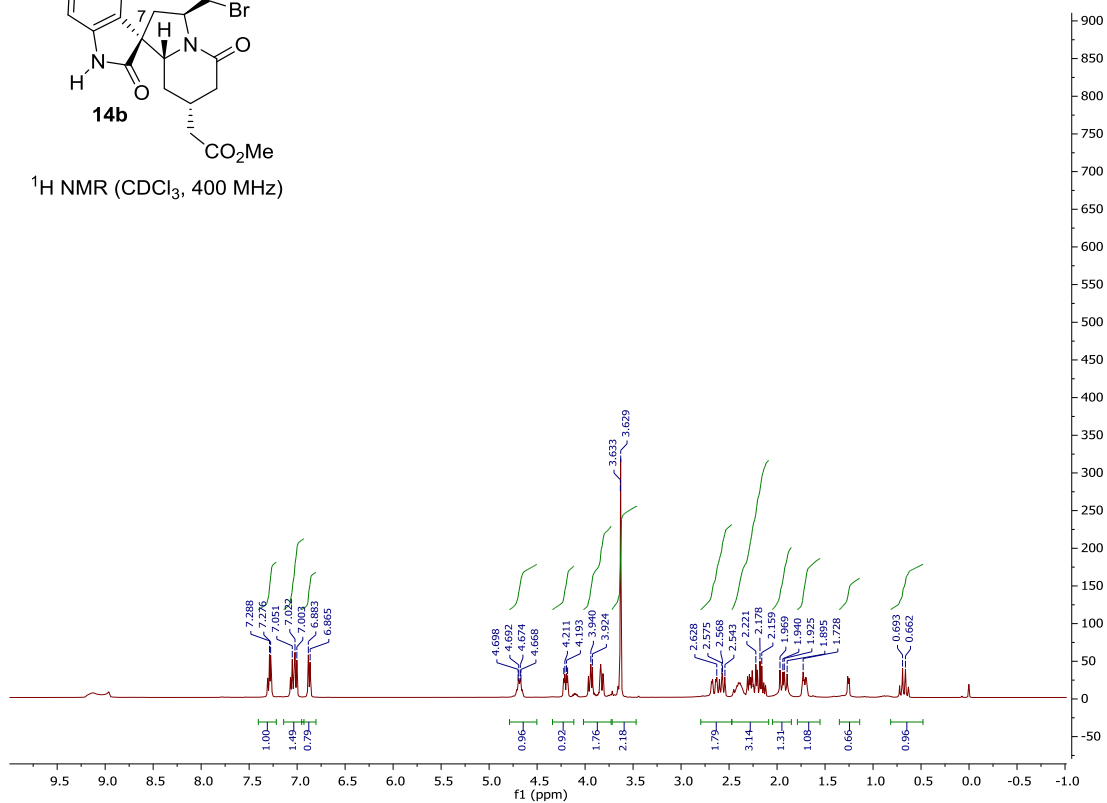
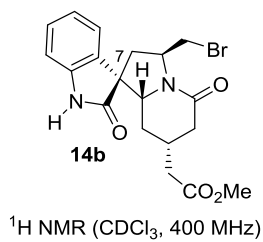


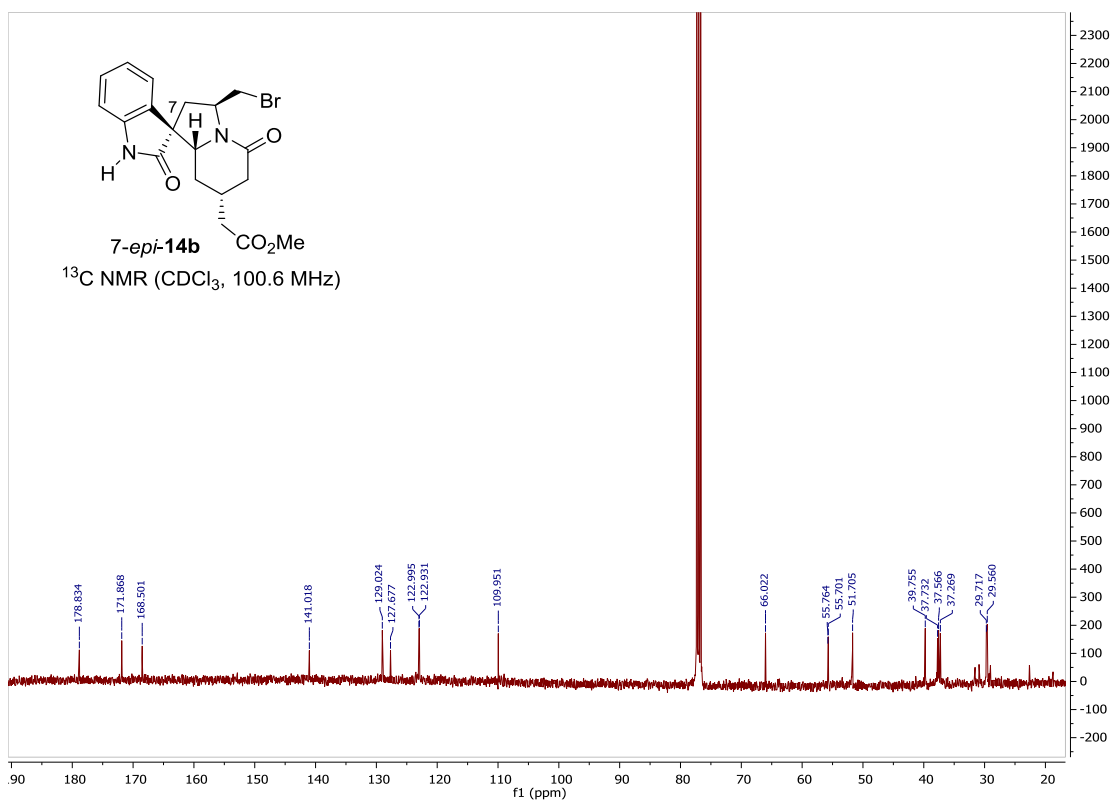
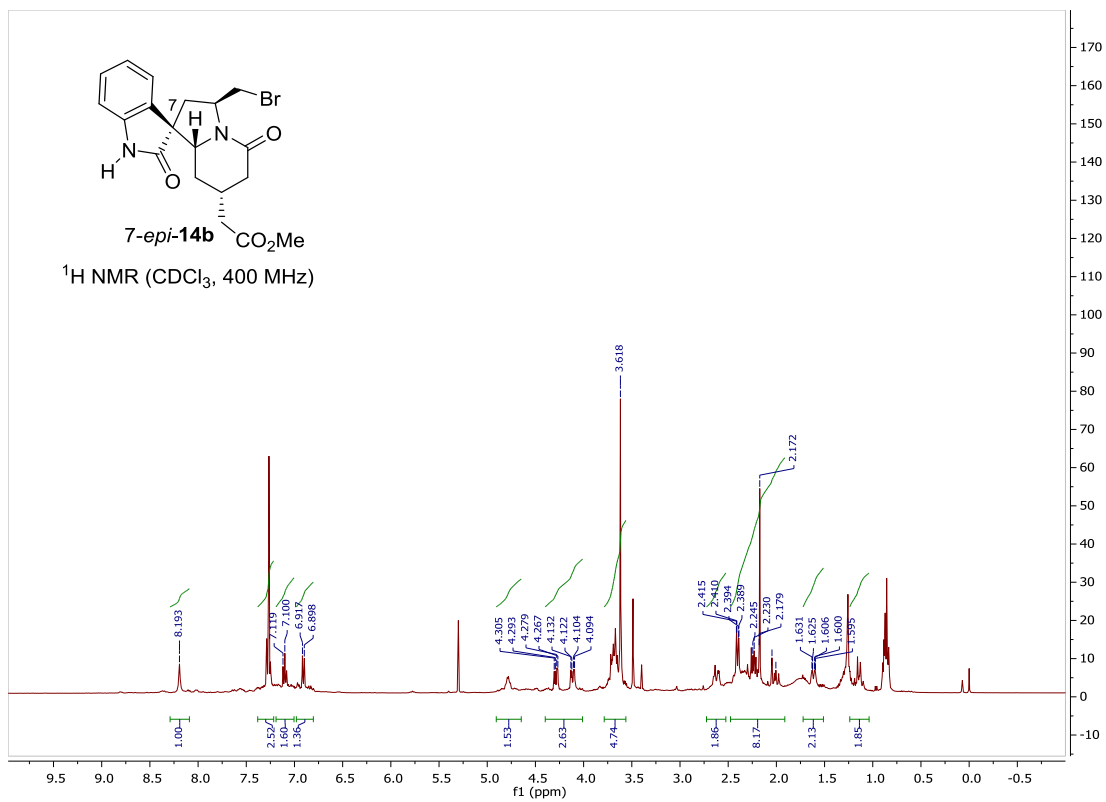


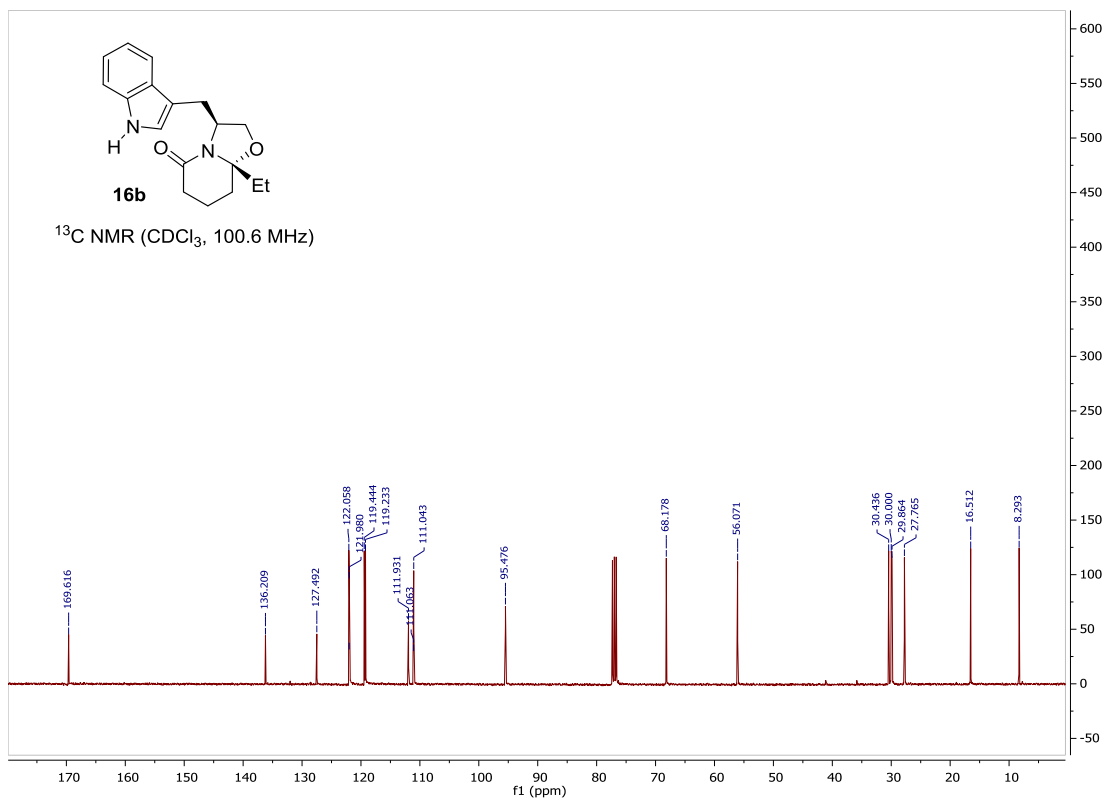
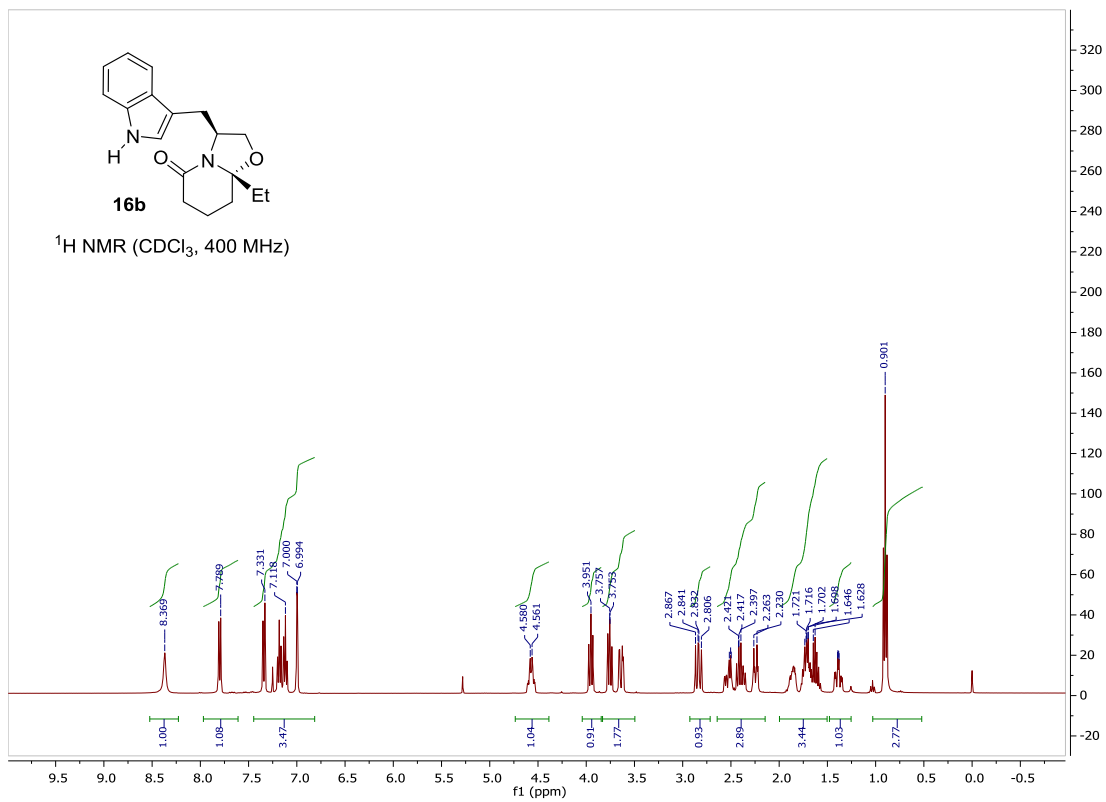


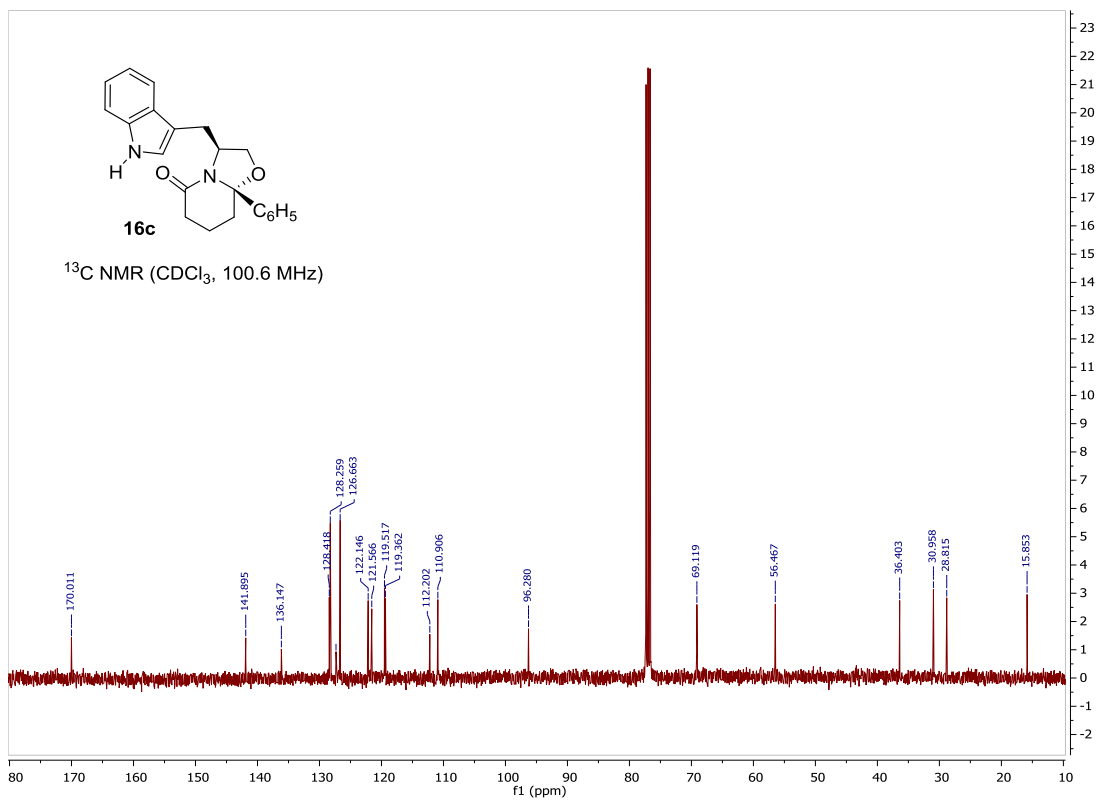
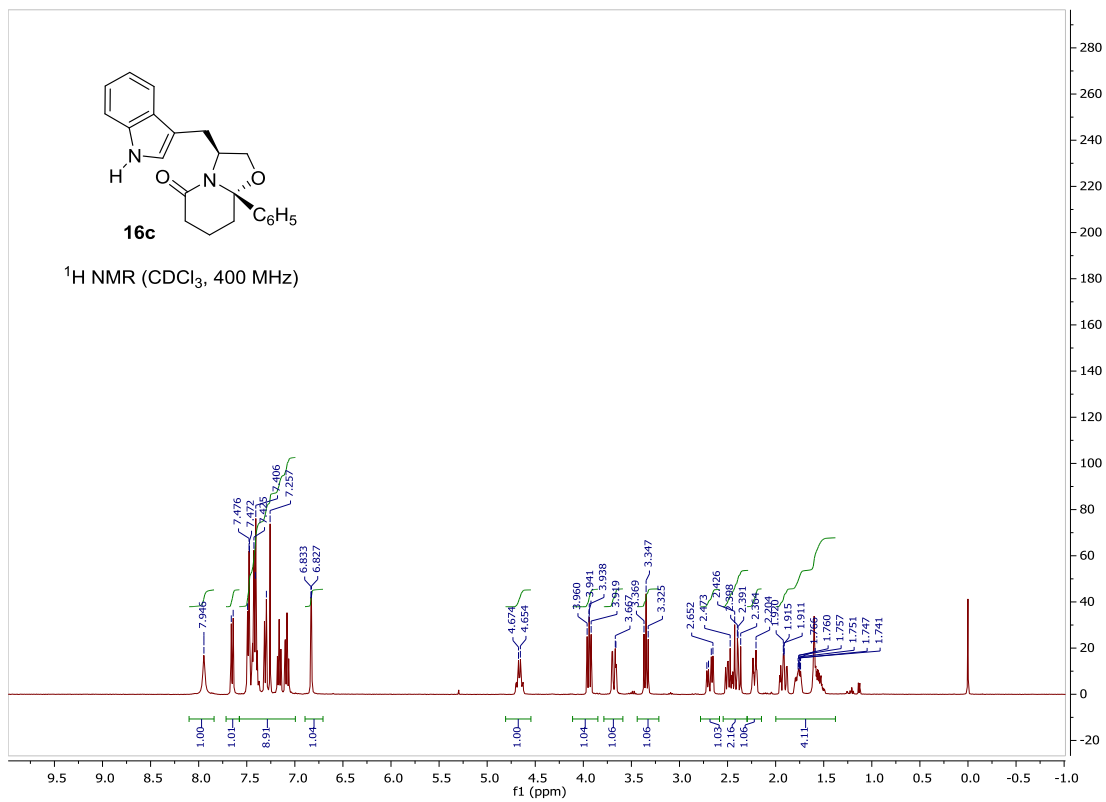


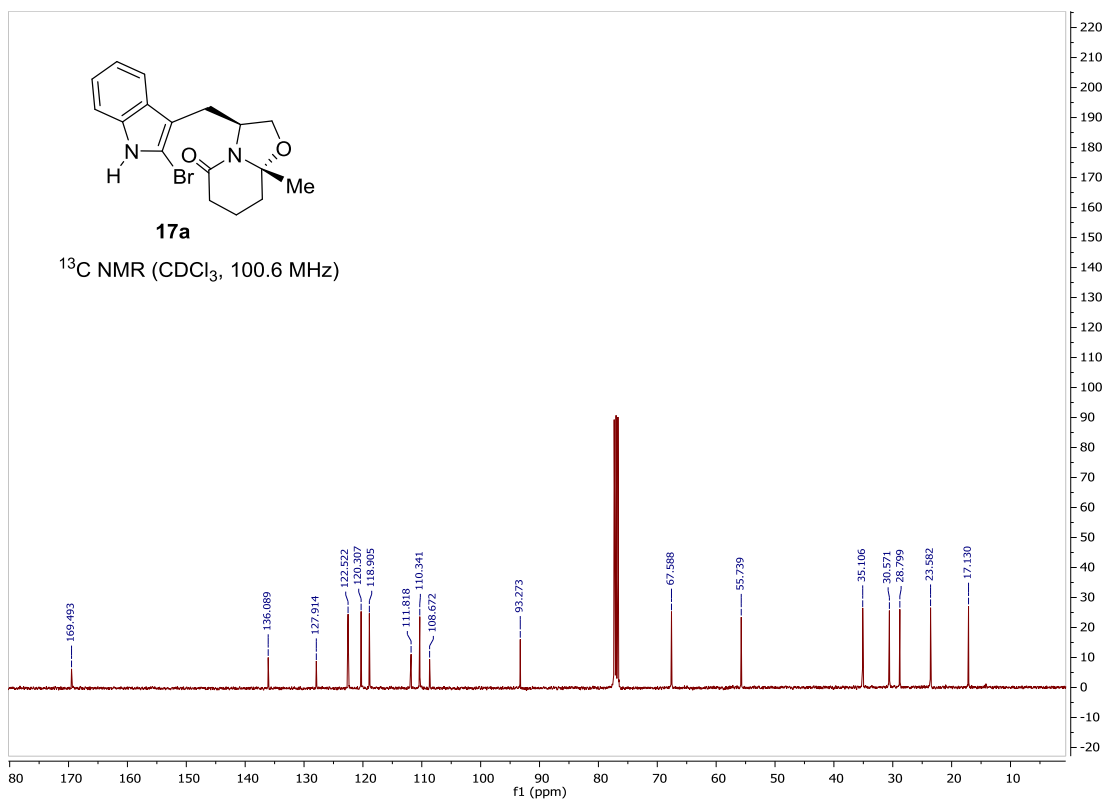
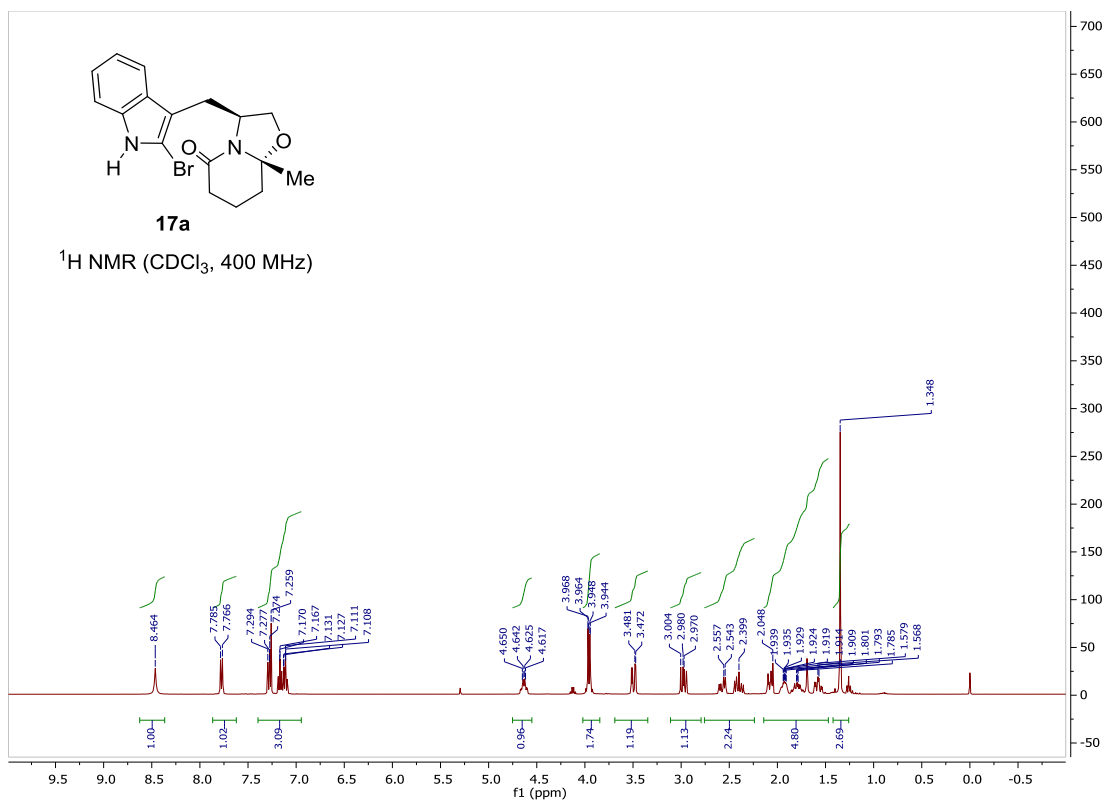


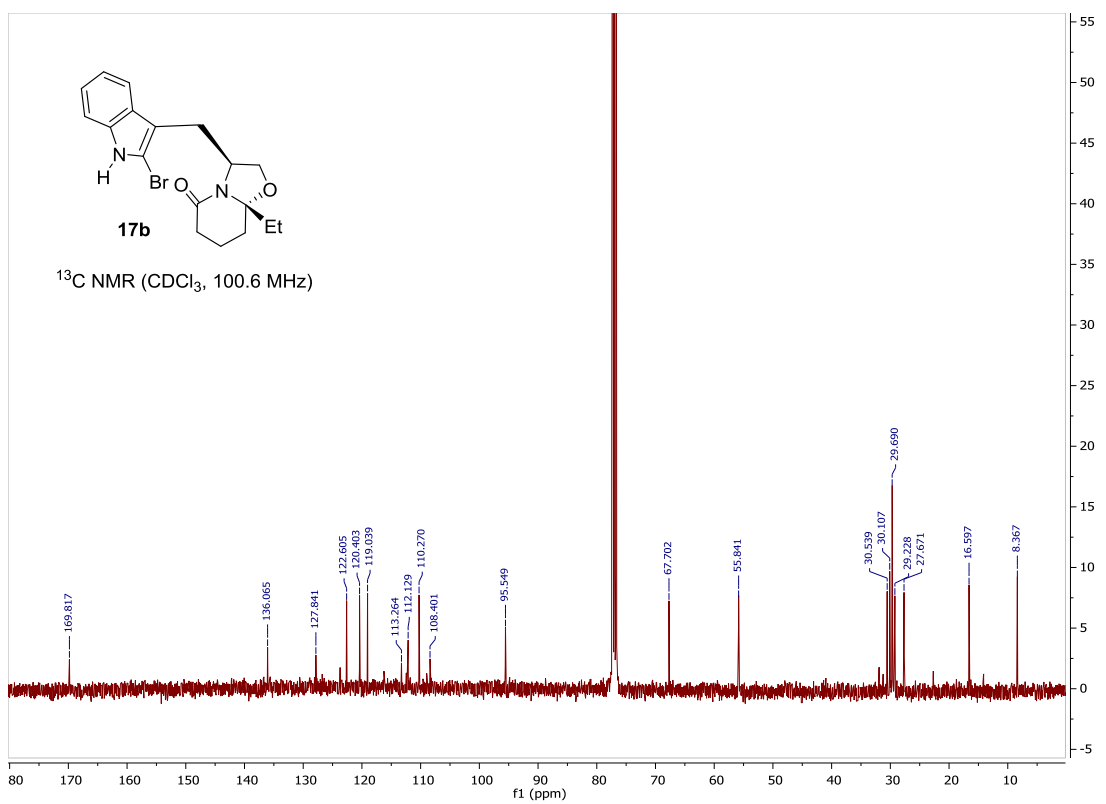
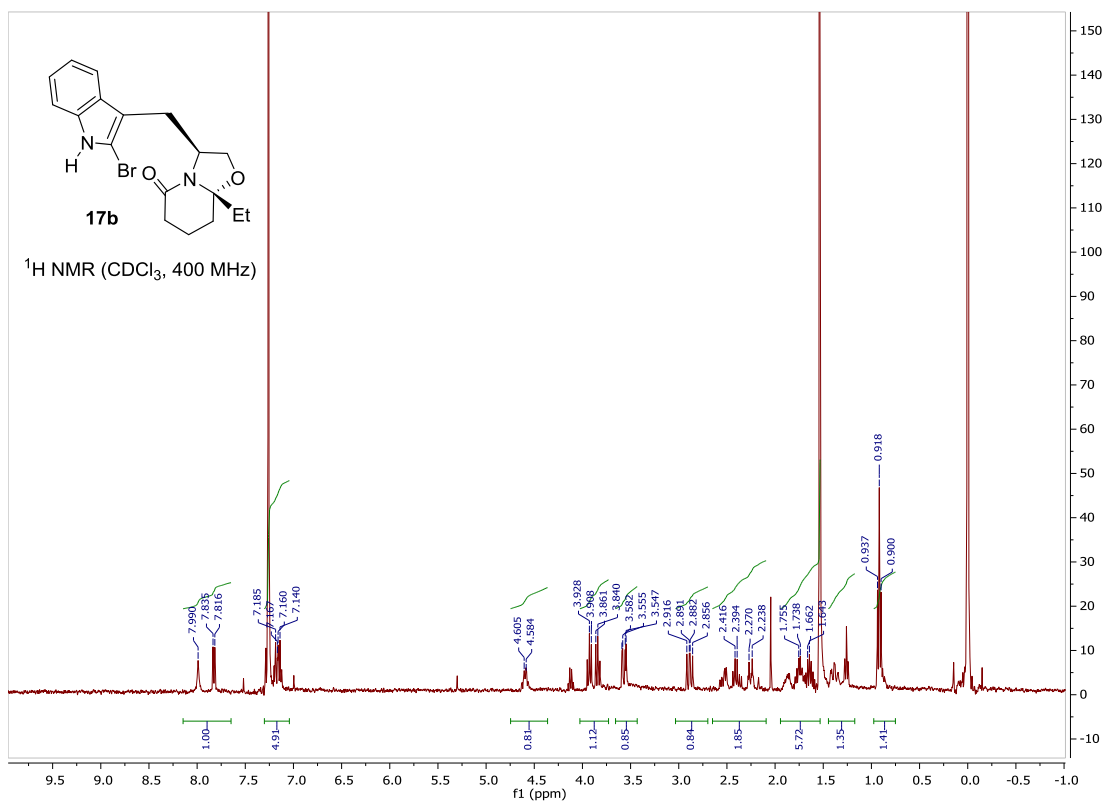


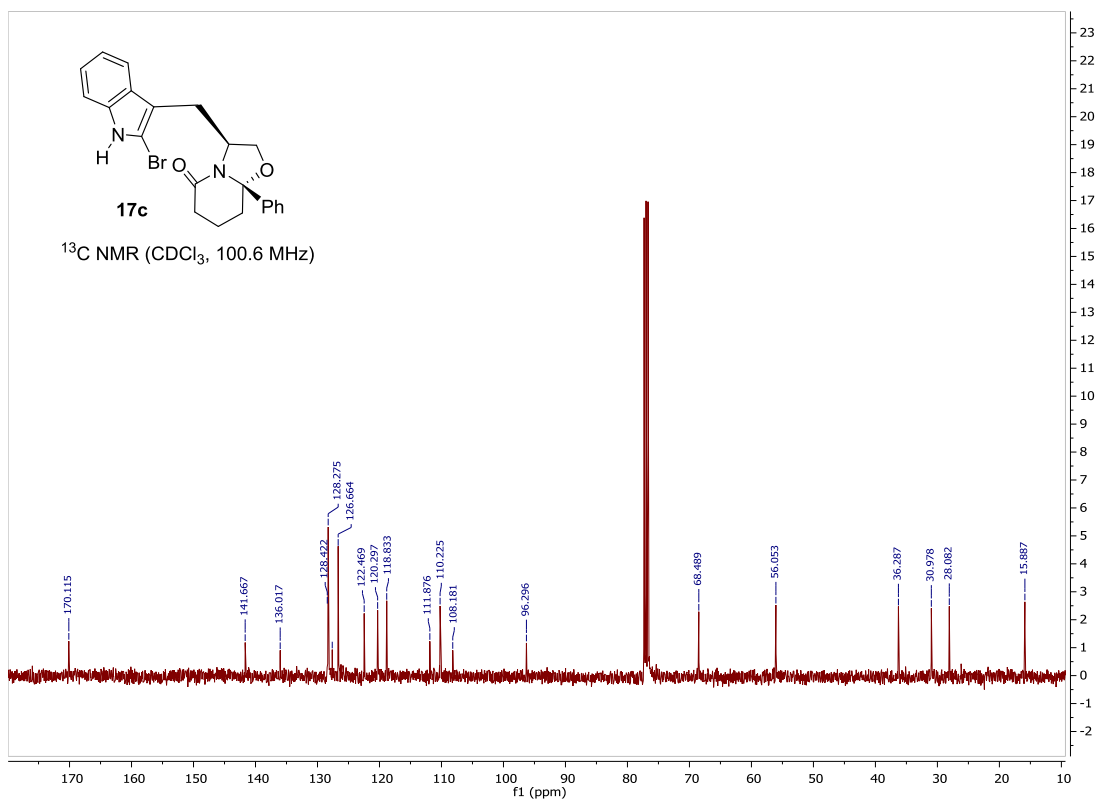
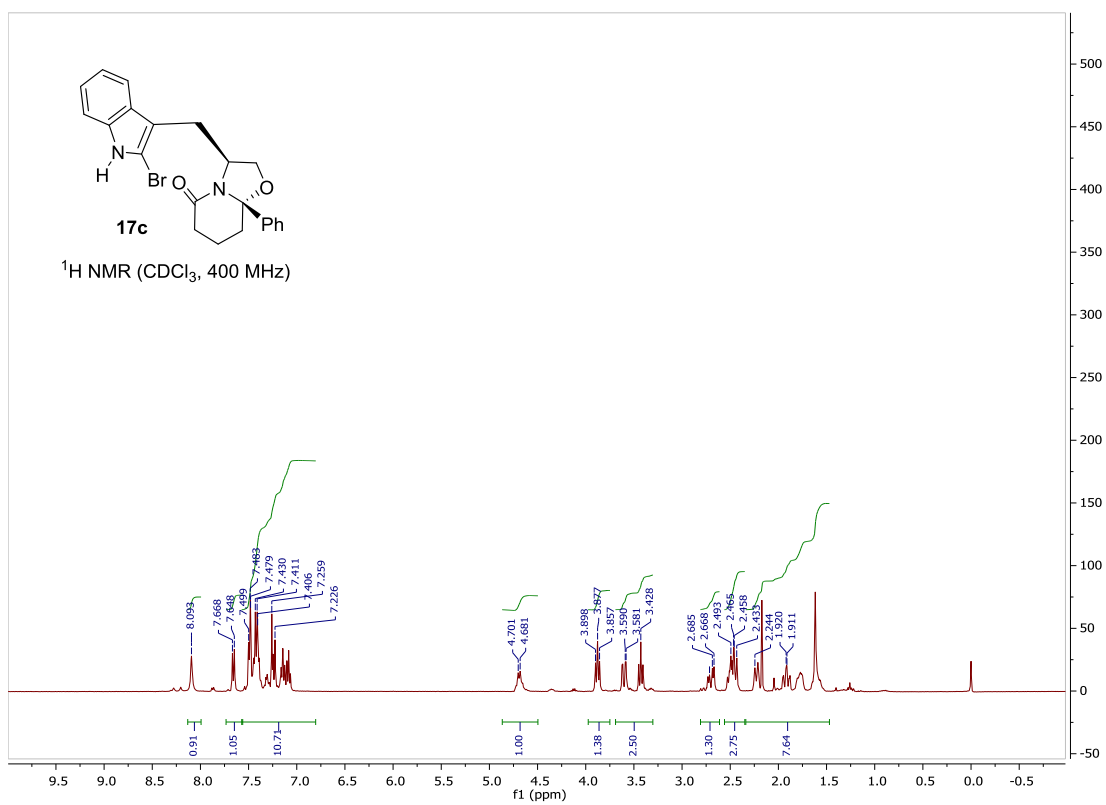


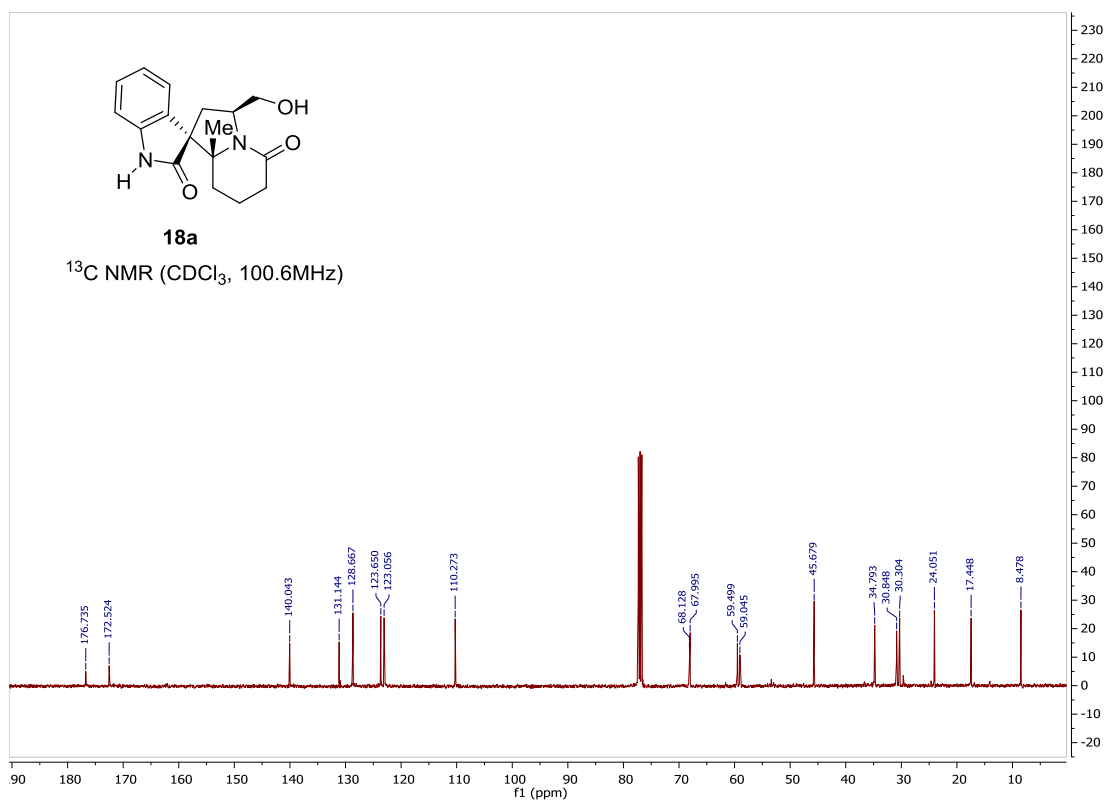
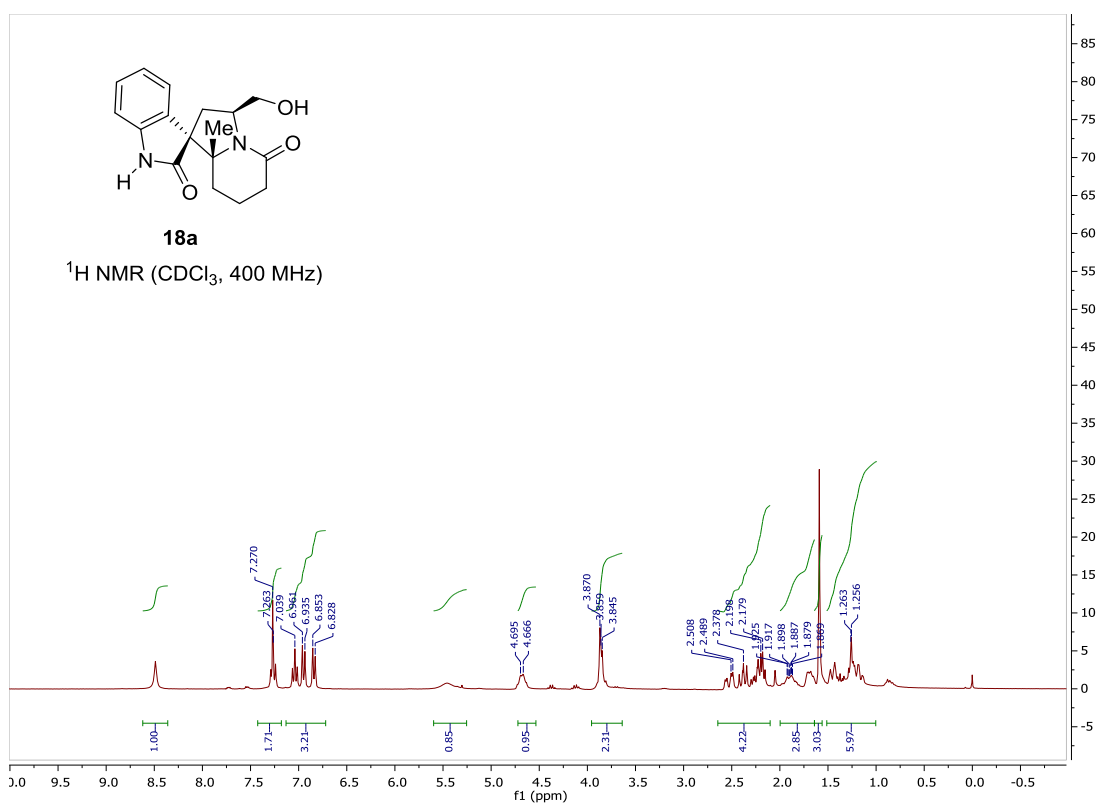


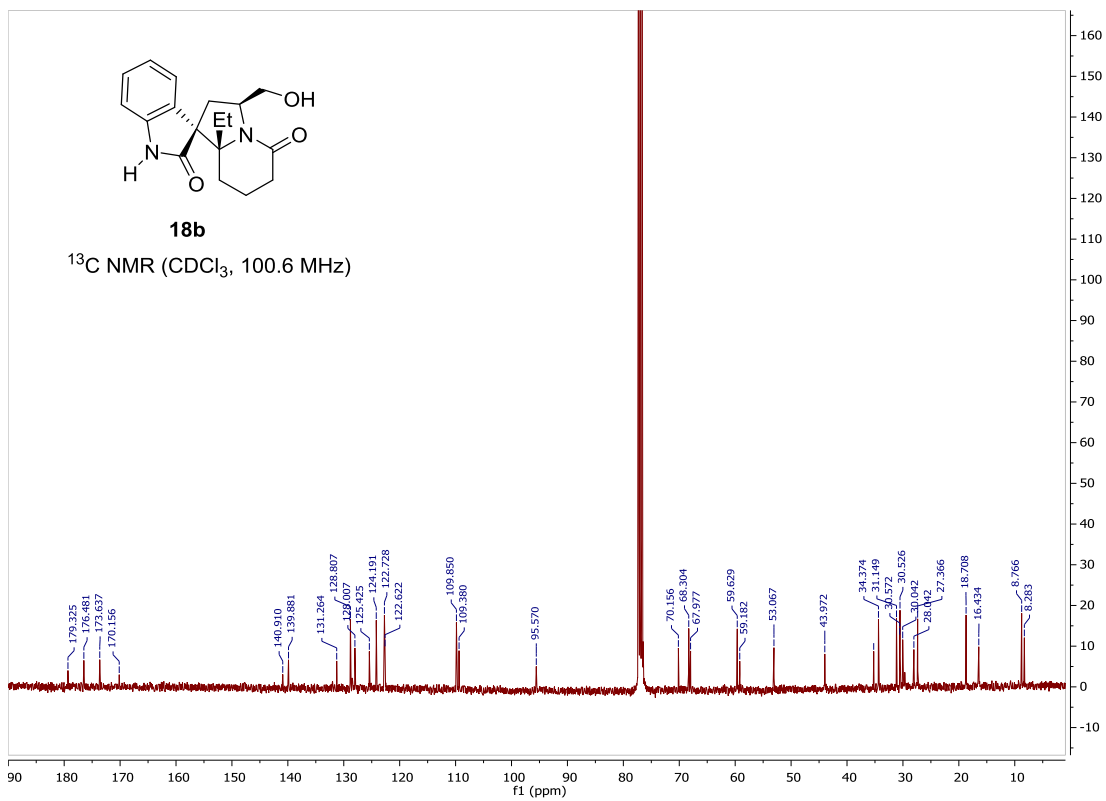
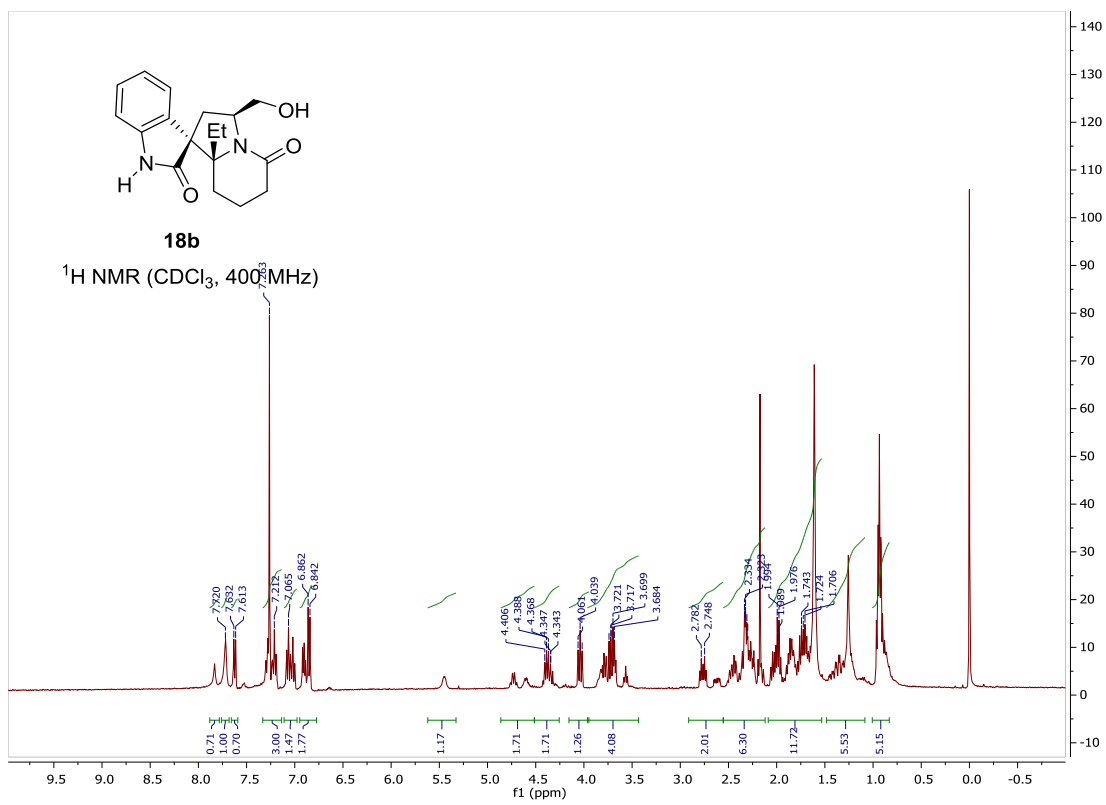


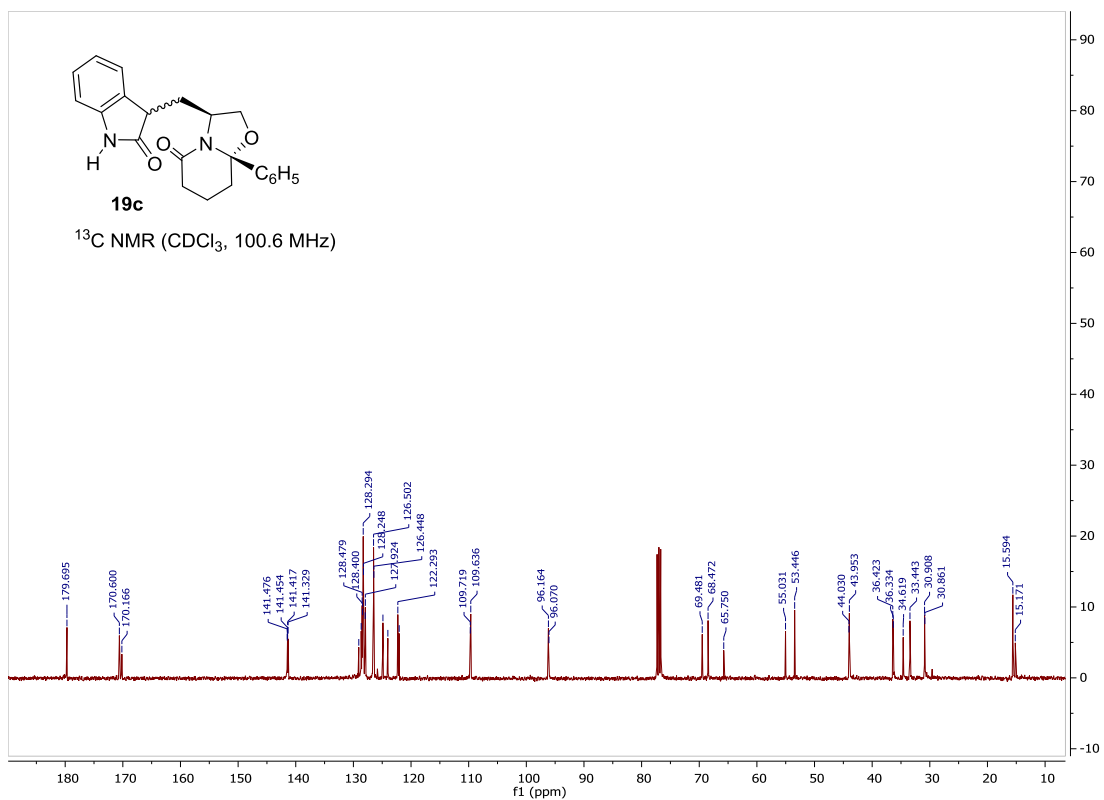
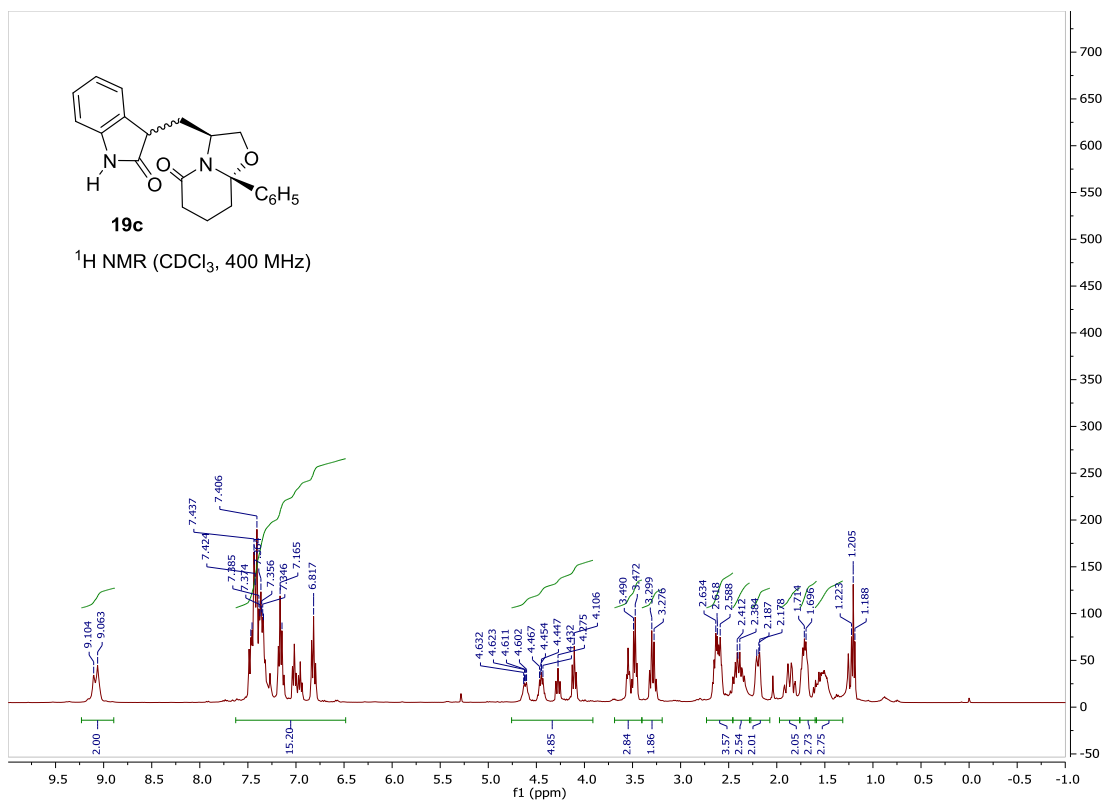












V) X- ray crystallographic data for compounds 12c, 14c and 18a

Table 1. Crystal data and structure refinement for compound **12c**.

Identification code	Jb114	
Empirical formula	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃	
Formula weight	300.35	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P 21 21 21	
Unit cell dimensions	a = 8.5333(13) Å	α = 90°.
	b = 13.2057(17) Å	β = 90°.
	c = 13.303(3) Å	γ = 90°.
Volume	1499.1(5) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.331 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.092 mm ⁻¹	
F(000)	640	
Crystal size	0.45 x 0.21 x 0.18 mm ³	
Theta range for data collection	2.173 to 24.964°.	
Index ranges	0 ≤ h ≤ 10, -15 ≤ k ≤ 15, 0 ≤ l ≤ 15	
Reflections collected	3060	
Independent reflections	2637 [R(int) = 0.0421]	
Completeness to theta = 25.242°	97.8 %	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2637 / 0 / 201	
Goodness-of-fit on F ²	0.974	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0565, wR2 = 0.1294	
R indices (all data)	R1 = 0.0914, wR2 = 0.1417	
Largest diff. peak and hole	0.320 and -0.145 e.Å ⁻³	

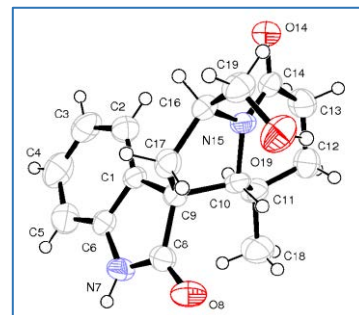


Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **12c**. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
O(8)	1462(4)	3211(3)	-702(3)	59(1)
O(14)	6145(4)	4130(3)	3025(2)	51(1)
O(19)	3895(5)	1677(3)	1966(3)	61(1)
N(7)	639(5)	4845(3)	-460(3)	48(1)
N(15)	4620(4)	3837(3)	1685(3)	36(1)
C(1)	1981(5)	5301(4)	950(3)	38(1)
C(2)	2427(7)	5950(4)	1714(4)	51(1)
C(3)	1786(7)	6920(4)	1742(4)	61(2)
C(4)	723(8)	7221(4)	1015(5)	70(2)
C(5)	255(7)	6572(4)	255(4)	59(2)
C(6)	911(6)	5631(4)	228(3)	42(1)
C(8)	1460(6)	4013(4)	-229(4)	42(1)
C(9)	2392(5)	4214(4)	730(3)	36(1)
C(10)	4158(5)	3980(4)	616(3)	38(1)
C(11)	5189(6)	4738(4)	76(3)	45(1)
C(12)	6870(6)	4500(5)	313(4)	56(1)
C(13)	7196(6)	4582(5)	1429(4)	56(1)
C(14)	5957(6)	4166(4)	2107(4)	41(1)
C(16)	3316(5)	3449(4)	2295(3)	40(1)
C(17)	1930(5)	3474(4)	1570(4)	44(1)
C(18)	4875(7)	4744(5)	-1055(4)	67(2)
C(19)	3639(7)	2405(4)	2718(4)	50(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for compound **12c**.

O(8)-C(8)	1.231(6)
O(14)-C(14)	1.232(5)
O(19)-C(19)	1.404(5)
N(7)-C(8)	1.340(6)
N(7)-C(6)	1.403(6)
N(15)-C(14)	1.344(6)
N(15)-C(16)	1.470(6)
N(15)-C(10)	1.488(5)
C(1)-C(2)	1.382(7)
C(1)-C(6)	1.395(6)
C(1)-C(9)	1.506(7)
C(2)-C(3)	1.393(8)
C(3)-C(4)	1.385(8)
C(4)-C(5)	1.384(8)
C(5)-C(6)	1.364(7)
C(8)-C(9)	1.527(6)
C(9)-C(17)	1.536(6)
C(9)-C(10)	1.545(7)
C(10)-C(11)	1.514(7)
C(11)-C(12)	1.502(7)
C(11)-C(18)	1.528(7)
C(12)-C(13)	1.515(7)
C(13)-C(14)	1.494(7)
C(16)-C(19)	1.514(7)
C(16)-C(17)	1.527(6)
C(8)-N(7)-C(6)	111.7(4)

C(14)-N(15)-C(16)	121.7(4)
C(14)-N(15)-C(10)	125.7(4)
C(16)-N(15)-C(10)	111.8(3)
C(2)-C(1)-C(6)	119.5(5)
C(2)-C(1)-C(9)	132.0(5)
C(6)-C(1)-C(9)	108.4(4)
C(1)-C(2)-C(3)	118.8(5)
C(4)-C(3)-C(2)	120.2(5)
C(5)-C(4)-C(3)	121.4(5)
C(6)-C(5)-C(4)	117.8(6)
C(5)-C(6)-C(1)	122.3(5)
C(5)-C(6)-N(7)	128.6(5)
C(1)-C(6)-N(7)	109.1(4)
O(8)-C(8)-N(7)	126.1(5)
O(8)-C(8)-C(9)	125.2(4)
N(7)-C(8)-C(9)	108.7(4)
C(1)-C(9)-C(8)	102.0(4)
C(1)-C(9)-C(17)	113.9(4)
C(8)-C(9)-C(17)	111.3(4)
C(1)-C(9)-C(10)	115.9(4)
C(8)-C(9)-C(10)	113.0(4)
C(17)-C(9)-C(10)	101.2(4)
N(15)-C(10)-C(11)	112.5(4)
N(15)-C(10)-C(9)	100.9(3)
C(11)-C(10)-C(9)	118.7(4)
C(12)-C(11)-C(10)	108.5(4)
C(12)-C(11)-C(18)	112.0(5)
C(10)-C(11)-C(18)	111.6(4)

C(11)-C(12)-C(13)	111.5(4)
C(14)-C(13)-C(12)	115.8(4)
O(14)-C(14)-N(15)	120.8(5)
O(14)-C(14)-C(13)	121.3(5)
N(15)-C(14)-C(13)	117.9(4)
N(15)-C(16)-C(19)	112.6(4)
N(15)-C(16)-C(17)	103.3(3)
C(19)-C(16)-C(17)	113.3(4)
C(16)-C(17)-C(9)	106.0(4)
O(19)-C(19)-C(16)	112.8(4)

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **12c**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
O(8)	59(2)	62(2)	56(2)	-17(2)	-10(2)	-6(2)
O(14)	51(2)	65(2)	37(2)	-6(2)	-8(2)	9(2)
O(19)	73(3)	48(2)	63(2)	-11(2)	12(2)	2(2)
N(7)	42(2)	67(3)	33(2)	-3(2)	-5(2)	1(2)
N(15)	33(2)	46(2)	29(2)	-3(2)	-1(2)	-2(2)
C(1)	35(3)	45(3)	35(2)	-2(2)	4(2)	-3(2)
C(2)	49(3)	54(3)	49(3)	-10(3)	-3(3)	-4(3)
C(3)	71(4)	49(4)	64(4)	-20(3)	11(4)	-6(3)
C(4)	87(5)	47(3)	78(4)	2(3)	18(4)	17(3)
C(5)	62(4)	61(4)	52(3)	13(3)	8(3)	12(3)
C(6)	39(3)	52(3)	36(3)	2(2)	9(2)	0(2)
C(8)	37(3)	47(3)	42(3)	-2(3)	0(2)	-2(3)
C(9)	29(3)	43(3)	36(3)	-5(2)	0(2)	-1(2)
C(10)	42(3)	42(3)	30(2)	-9(2)	-2(2)	-2(2)
C(11)	43(3)	57(3)	37(3)	2(3)	7(2)	-5(3)
C(12)	41(3)	72(4)	54(3)	-2(3)	10(3)	-5(3)
C(13)	35(3)	71(4)	61(3)	-1(3)	-2(3)	-6(3)
C(14)	41(3)	38(3)	42(3)	-9(2)	-2(2)	6(2)
C(16)	39(3)	49(3)	31(2)	-4(2)	2(2)	3(2)
C(17)	36(3)	48(3)	47(3)	-1(3)	3(2)	-4(2)
C(18)	63(4)	95(5)	44(3)	9(3)	5(3)	-7(3)
C(19)	60(4)	48(3)	42(3)	6(3)	9(3)	3(3)

-

Table 5. Hydrogen bonds for compound **12c** [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(19)-H(19)...O(8)#1	0.82	1.98	2.766(5)	161.4
N(7)-H(7)...O(14)#2	0.86	2.11	2.865(5)	146.4
N(7)-H(7)...O(19)#3	0.86	2.64	3.205(5)	124.1
C(19)-H(19A)...O(14)	0.97	2.62	3.151(6)	114.7

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 $x+1/2, -y+1/2, -z$ #2 $-x+1/2, -y+1, z-1/2$ #3 $x-1/2, -y+1/2, -z$

Table 1. Crystal data and structure refinement for compound **14a**.

Identification code	Jb99	
Empirical formula	C ₃₂ H ₃₄ Br ₂ N ₄ O ₄	
Formula weight	698.45	
Temperature	200(2) K	
Wavelength	1.54184 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21	
Unit cell dimensions	a = 11.2150(1) Å	α = 90°.
	b = 9.7912(1) Å	β = 92.710(1)°.
	c = 13.7473(1) Å	γ = 90°.
Volume	1507.88(2) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.538 Mg/m ³	
Absorption coefficient	3.768 mm ⁻¹	
F(000)	712	
Crystal size	0.33 x 0.12 x 0.08 mm ³	
Theta range for data collection	3.22 to 64.94°.	
Index ranges	-13 ≤ h ≤ 12, -11 ≤ k ≤ 11, -16 ≤ l ≤ 16	
Reflections collected	24316	
Independent reflections	5063 [R(int) = 0.0265]	
Completeness to theta = 64.94°	99.4 %	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5063 / 1 / 379	
Goodness-of-fit on F ²	1.071	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0234, wR2 = 0.0585	
R indices (all data)	R1 = 0.0245, wR2 = 0.0595	
Absolute structure parameter	-0.03(1)	
Largest diff. peak and hole	0.475 and -0.464 e.Å ⁻³	

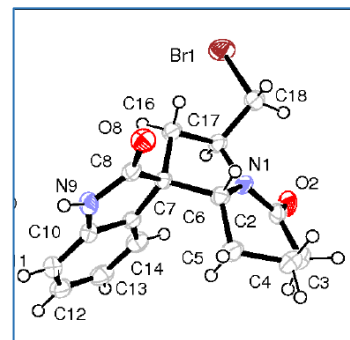


Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **14a**. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Br(1)	-5781(1)	-9492(1)	-8885(1)	45(1)
Br(2)	-8692(1)	-8714(1)	-4367(1)	57(1)
N(1)	-4513(2)	-5636(2)	-8058(1)	26(1)
N(9)	-6613(2)	-4778(2)	-5330(1)	29(1)
N(19)	-9646(2)	-5002(2)	-3116(1)	25(1)
N(27)	-11396(2)	-6243(2)	-317(2)	30(1)
O(2)	-2805(2)	-6331(2)	-8680(1)	39(1)
O(8)	-7762(1)	-4611(2)	-6754(1)	34(1)
O(20)	-8001(2)	-4142(2)	-3758(1)	45(1)
O(26)	-12510(1)	-6895(2)	-1683(1)	33(1)
C(2)	-3428(2)	-5383(3)	-8392(2)	29(1)
C(3)	-3010(2)	-3918(3)	-8395(2)	40(1)
C(4)	-3953(3)	-2879(3)	-8171(2)	40(1)
C(5)	-4619(2)	-3354(3)	-7290(2)	34(1)
C(6)	-5268(2)	-4659(2)	-7556(2)	26(1)
C(7)	-5728(2)	-5559(2)	-6729(2)	24(1)
C(8)	-6842(2)	-4925(2)	-6301(2)	26(1)
C(10)	-5468(2)	-5220(3)	-5040(2)	28(1)
C(11)	-4942(2)	-5229(3)	-4111(2)	35(1)
C(12)	-3796(2)	-5763(3)	-3992(2)	39(1)
C(13)	-3215(2)	-6278(3)	-4776(2)	37(1)
C(14)	-3747(2)	-6255(3)	-5711(2)	32(1)
C(15)	-4888(2)	-5716(2)	-5844(2)	25(1)
C(16)	-5990(2)	-6895(2)	-7286(2)	27(1)

C(17)	-4951(2)	-7044(2)	-7974(2)	27(1)
C(18)	-5293(2)	-7594(3)	-8983(2)	34(1)
C(20)	-8970(2)	-3946(3)	-3387(2)	30(1)
C(21)	-9417(2)	-2525(3)	-3198(2)	33(1)
C(22)	-10708(2)	-2467(3)	-2921(2)	32(1)
C(23)	-10878(2)	-3497(3)	-2117(2)	30(1)
C(24)	-10699(2)	-4914(2)	-2517(2)	24(1)
C(25)	-10446(2)	-6098(2)	-1790(2)	24(1)
C(26)	-11593(2)	-6484(2)	-1282(2)	26(1)
C(28)	-10226(2)	-5772(2)	-100(2)	26(1)
C(29)	-9724(2)	-5400(3)	794(2)	32(1)
C(30)	-8548(2)	-4937(3)	831(2)	36(1)
C(31)	-7909(2)	-4861(3)	2(2)	36(1)
C(32)	-8436(2)	-5234(3)	-903(2)	31(1)
C(33)	-9606(2)	-5694(2)	-947(2)	25(1)
C(34)	-9992(2)	-7201(3)	-2466(2)	29(1)
C(35)	-9229(2)	-6422(3)	-3183(2)	26(1)
C(36)	-9398(2)	-6907(3)	-4233(2)	36(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for compound **14a**.

Br(1)-C(18)	1.943(3)
Br(2)-C(36)	1.950(3)
N(1)-C(2)	1.343(3)
N(1)-C(17)	1.470(3)
N(1)-C(6)	1.471(3)
N(9)-C(8)	1.355(3)
N(9)-C(10)	1.396(3)
N(19)-C(20)	1.346(3)
N(19)-C(35)	1.471(3)
N(19)-C(24)	1.474(3)
N(27)-C(26)	1.355(3)
N(27)-C(28)	1.409(3)
O(2)-C(2)	1.238(3)
O(8)-C(8)	1.219(3)
O(20)-C(20)	1.237(3)
O(26)-C(26)	1.213(3)
C(2)-C(3)	1.509(4)
C(3)-C(4)	1.510(4)
C(4)-C(5)	1.526(4)
C(5)-C(6)	1.507(3)
C(6)-C(7)	1.546(3)
C(7)-C(15)	1.510(3)
C(7)-C(16)	1.537(3)
C(7)-C(8)	1.537(3)
C(10)-C(11)	1.381(3)
C(10)-C(15)	1.396(3)

C(11)-C(12)	1.391(4)
C(12)-C(13)	1.381(4)
C(13)-C(14)	1.391(4)
C(14)-C(15)	1.389(3)
C(16)-C(17)	1.543(3)
C(17)-C(18)	1.520(3)
C(20)-C(21)	1.505(4)
C(21)-C(22)	1.516(4)
C(22)-C(23)	1.515(4)
C(23)-C(24)	1.509(3)
C(24)-C(25)	1.547(3)
C(25)-C(33)	1.511(3)
C(25)-C(34)	1.527(3)
C(25)-C(26)	1.540(3)
C(28)-C(29)	1.376(3)
C(28)-C(33)	1.386(3)
C(29)-C(30)	1.393(4)
C(30)-C(31)	1.376(4)
C(31)-C(32)	1.401(3)
C(32)-C(33)	1.386(3)
C(34)-C(35)	1.538(3)
C(35)-C(36)	1.522(3)
C(2)-N(1)-C(17)	120.7(2)
C(2)-N(1)-C(6)	126.3(2)
C(17)-N(1)-C(6)	111.77(18)
C(8)-N(9)-C(10)	112.17(19)
C(20)-N(19)-C(35)	121.58(19)
C(20)-N(19)-C(24)	125.9(2)

C(35)-N(19)-C(24)	110.87(19)
C(26)-N(27)-C(28)	111.8(2)
O(2)-C(2)-N(1)	120.3(2)
O(2)-C(2)-C(3)	122.1(2)
N(1)-C(2)-C(3)	117.6(2)
C(2)-C(3)-C(4)	114.7(2)
C(3)-C(4)-C(5)	109.3(2)
C(6)-C(5)-C(4)	108.3(2)
N(1)-C(6)-C(5)	112.52(18)
N(1)-C(6)-C(7)	101.18(19)
C(5)-C(6)-C(7)	118.62(19)
C(15)-C(7)-C(16)	114.33(19)
C(15)-C(7)-C(8)	102.69(18)
C(16)-C(7)-C(8)	113.20(18)
C(15)-C(7)-C(6)	115.67(18)
C(16)-C(7)-C(6)	100.49(18)
C(8)-C(7)-C(6)	110.91(19)
O(8)-C(8)-N(9)	126.4(2)
O(8)-C(8)-C(7)	126.1(2)
N(9)-C(8)-C(7)	107.48(18)
C(11)-C(10)-C(15)	122.4(2)
C(11)-C(10)-N(9)	127.8(2)
C(15)-C(10)-N(9)	109.8(2)
C(10)-C(11)-C(12)	117.6(3)
C(13)-C(12)-C(11)	120.9(2)
C(12)-C(13)-C(14)	121.2(2)
C(15)-C(14)-C(13)	118.7(2)
C(14)-C(15)-C(10)	119.3(2)

C(14)-C(15)-C(7)	132.9(2)
C(10)-C(15)-C(7)	107.86(19)
C(7)-C(16)-C(17)	104.67(18)
N(1)-C(17)-C(18)	109.4(2)
N(1)-C(17)-C(16)	102.98(18)
C(18)-C(17)-C(16)	115.3(2)
C(17)-C(18)-Br(1)	109.60(18)
O(20)-C(20)-N(19)	120.8(2)
O(20)-C(20)-C(21)	121.4(2)
N(19)-C(20)-C(21)	117.8(2)
C(20)-C(21)-C(22)	114.1(2)
C(23)-C(22)-C(21)	108.3(2)
C(24)-C(23)-C(22)	108.85(19)
N(19)-C(24)-C(23)	112.4(2)
N(19)-C(24)-C(25)	100.91(17)
C(23)-C(24)-C(25)	118.50(19)
C(33)-C(25)-C(34)	115.97(18)
C(33)-C(25)-C(26)	102.66(18)
C(34)-C(25)-C(26)	114.4(2)
C(33)-C(25)-C(24)	112.83(19)
C(34)-C(25)-C(24)	101.17(18)
C(26)-C(25)-C(24)	110.17(18)
O(26)-C(26)-N(27)	126.8(2)
O(26)-C(26)-C(25)	125.7(2)
N(27)-C(26)-C(25)	107.49(19)
C(29)-C(28)-C(33)	122.4(2)
C(29)-C(28)-N(27)	127.8(2)
C(33)-C(28)-N(27)	109.8(2)

C(28)-C(29)-C(30)	117.7(2)
C(31)-C(30)-C(29)	121.1(2)
C(30)-C(31)-C(32)	120.5(2)
C(33)-C(32)-C(31)	118.8(2)
C(32)-C(33)-C(28)	119.5(2)
C(32)-C(33)-C(25)	132.3(2)
C(28)-C(33)-C(25)	108.16(19)
C(25)-C(34)-C(35)	104.5(2)
N(19)-C(35)-C(36)	109.17(19)
N(19)-C(35)-C(34)	103.84(19)
C(36)-C(35)-C(34)	113.9(2)
C(35)-C(36)-Br(2)	109.83(17)

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **14a**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Br(1)	53(1)	33(1)	50(1)	-14(1)	4(1)	-9(1)
Br(2)	85(1)	47(1)	39(1)	-16(1)	-4(1)	28(1)
N(1)	24(1)	28(1)	26(1)	-5(1)	10(1)	-6(1)
N(9)	24(1)	37(1)	27(1)	-5(1)	10(1)	4(1)
N(19)	25(1)	32(1)	20(1)	-3(1)	7(1)	7(1)
N(27)	29(1)	35(1)	27(1)	0(1)	12(1)	-2(1)
O(2)	34(1)	51(1)	33(1)	0(1)	18(1)	1(1)
O(8)	24(1)	41(1)	38(1)	-2(1)	1(1)	4(1)
O(20)	39(1)	55(1)	42(1)	-6(1)	25(1)	0(1)
O(26)	25(1)	34(1)	40(1)	-2(1)	3(1)	1(1)
C(2)	25(1)	42(2)	22(1)	1(1)	6(1)	-4(1)
C(3)	37(2)	49(2)	36(1)	2(1)	12(1)	-16(1)
C(4)	44(2)	34(2)	42(2)	4(1)	6(1)	-13(1)
C(5)	33(1)	29(1)	39(1)	-4(1)	8(1)	-6(1)
C(6)	22(1)	28(1)	27(1)	-3(1)	4(1)	-2(1)
C(7)	21(1)	27(1)	23(1)	-4(1)	6(1)	-2(1)
C(8)	22(1)	26(1)	30(1)	-2(1)	5(1)	-3(1)
C(10)	29(1)	29(1)	25(1)	2(1)	5(1)	-4(1)
C(11)	38(1)	41(2)	26(1)	-1(1)	5(1)	-8(1)
C(12)	36(1)	44(2)	35(1)	9(1)	-7(1)	-14(1)
C(13)	24(1)	38(1)	49(2)	7(1)	-4(1)	-5(1)
C(14)	24(1)	32(1)	41(1)	0(1)	4(1)	1(1)
C(15)	22(1)	25(1)	27(1)	0(1)	3(1)	-3(1)
C(16)	26(1)	26(1)	28(1)	-6(1)	7(1)	-5(1)

C(17)	27(1)	28(1)	27(1)	-5(1)	7(1)	-4(1)
C(18)	39(1)	34(1)	31(1)	-9(1)	9(1)	-6(1)
C(20)	33(1)	38(1)	19(1)	0(1)	7(1)	0(1)
C(21)	37(2)	34(1)	28(1)	2(1)	6(1)	-4(1)
C(22)	39(1)	29(1)	29(1)	-1(1)	1(1)	6(1)
C(23)	31(1)	33(1)	27(1)	0(1)	7(1)	8(1)
C(24)	22(1)	31(1)	21(1)	0(1)	3(1)	6(1)
C(25)	22(1)	27(1)	23(1)	0(1)	2(1)	3(1)
C(26)	26(1)	24(1)	30(1)	0(1)	4(1)	4(1)
C(28)	29(1)	26(1)	25(1)	3(1)	4(1)	3(1)
C(29)	40(1)	33(1)	24(1)	2(1)	4(1)	5(1)
C(30)	44(2)	35(1)	29(1)	-1(1)	-8(1)	1(1)
C(31)	30(1)	42(2)	36(1)	3(1)	-4(1)	-1(1)
C(32)	24(1)	39(1)	29(1)	2(1)	3(1)	5(1)
C(33)	24(1)	27(1)	23(1)	2(1)	1(1)	4(1)
C(34)	29(1)	30(1)	28(1)	-3(1)	4(1)	6(1)
C(35)	27(1)	30(1)	22(1)	-2(1)	4(1)	6(1)
C(36)	41(2)	40(2)	26(1)	-7(1)	2(1)	13(1)

-

Table 5. Hydrogen bonds for compound **14a** [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(9)-H(9)...O(20)	0.88	1.95	2.792(3)	161.0
N(27)-H(27)...O(2)#1	0.88	1.96	2.812(3)	163.7

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 x-1,y,z+1

Table 1. Crystal data and structure refinement for compound **18a**.

Identification code	Jb100	
Empirical formula	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃	
Formula weight	300.35	
Temperature	200(2) K	
Wavelength	1.54184 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P 21 21 21	
Unit cell dimensions	a = 8.06750(10) Å	α = 90°.
	b = 10.0328(2) Å	β = 90°.
	c = 18.4788(2) Å	γ = 90°.
Volume	1495.67(4) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.334 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.749 mm ⁻¹	
F(000)	640	
Crystal size	0.35 x 0.22 x 0.16 mm ³	
Theta range for data collection	4.786 to 64.931°.	
Index ranges	-8 ≤ h ≤ 9, -11 ≤ k ≤ 11, -20 ≤ l ≤ 21	
Reflections collected	12166	
Independent reflections	2521 [R(int) = 0.0232]	
Completeness to theta = 67.684°	93.8 %	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2521 / 2 / 212	
Goodness-of-fit on F ²	1.081	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0368, wR2 = 0.1025	
R indices (all data)	R1 = 0.0386, wR2 = 0.1047	
Absolute structure parameter	0.00(8)	
Extinction coefficient	0.0059(10)	
Largest diff. peak and hole	0.349 and -0.276 e.Å ⁻³	

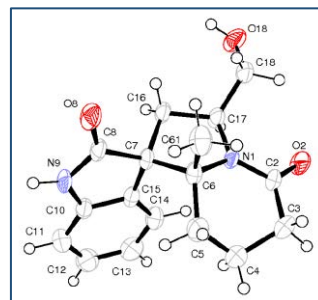


Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **18a**. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
N(1)	-2610(3)	-11027(2)	-3107(1)	29(1)
N(9)	-2133(3)	-9447(2)	-5453(1)	36(1)
O(2)	-3192(3)	-10969(2)	-1924(1)	57(1)
O(8)	-2216(3)	-11724(2)	-5400(1)	44(1)
O(18)	-6726(3)	-12700(3)	-3149(1)	55(1)
C(2)	-2161(4)	-10844(3)	-2420(1)	40(1)
C(3)	-427(5)	-10434(4)	-2278(2)	61(1)
C(4)*	234(7)	-9539(7)	-2899(3)	44(2)
C(4A)*	767(8)	-10414(11)	-2849(3)	44(3)
C(5)	54(4)	-10139(3)	-3604(2)	45(1)
C(6)	-1506(3)	-10978(3)	-3751(1)	31(1)
C(7)	-2741(3)	-10351(2)	-4316(1)	29(1)
C(8)	-2307(3)	-10618(3)	-5116(1)	31(1)
C(10)	-2426(3)	-8367(3)	-4985(1)	33(1)
C(11)	-2378(4)	-7030(3)	-5147(2)	46(1)
C(12)	-2732(4)	-6142(3)	-4594(2)	49(1)
C(13)	-3137(4)	-6591(3)	-3909(2)	47(1)
C(14)	-3163(4)	-7952(3)	-3754(1)	38(1)
C(15)	-2805(3)	-8847(3)	-4299(1)	30(1)
C(16)	-4398(3)	-11029(3)	-4121(1)	33(1)
C(17)	-4356(3)	-11247(3)	-3300(1)	32(1)
C(18)	-4980(4)	-12613(3)	-3072(1)	44(1)
C(61)	-1003(4)	-12403(3)	-3944(2)	46(1)

* disordered position: partial occupation factor for C(4) is 0.69(1), and for C(4A) is 0.39(1).

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for compound **18a**.

N(1)-C(2)	1.332(3)
N(1)-C(17)	1.470(3)
N(1)-C(6)	1.488(3)
N(9)-C(8)	1.338(3)
N(9)-C(10)	1.407(3)
O(2)-C(2)	1.244(4)
O(8)-C(8)	1.229(3)
O(18)-C(18)	1.419(4)
C(2)-C(3)	1.481(4)
C(3)-C(4A)	1.429(5)
C(3)-C(4)	1.551(6)
C(4)-C(5)	1.442(6)
C(4A)-C(5)	1.533(5)
C(5)-C(6)	1.539(4)
C(6)-C(61)	1.528(4)
C(6)-C(7)	1.574(3)
C(7)-C(15)	1.511(4)
C(7)-C(8)	1.542(3)
C(7)-C(16)	1.543(4)
C(10)-C(11)	1.375(4)
C(10)-C(15)	1.389(3)
C(11)-C(12)	1.385(4)
C(12)-C(13)	1.384(4)
C(13)-C(14)	1.395(4)
C(14)-C(15)	1.379(4)
C(16)-C(17)	1.533(3)

C(17)-C(18)	1.519(4)
C(2)-N(1)-C(17)	120.8(2)
C(2)-N(1)-C(6)	126.5(2)
C(17)-N(1)-C(6)	112.60(19)
C(8)-N(9)-C(10)	111.85(19)
O(2)-C(2)-N(1)	120.4(3)
O(2)-C(2)-C(3)	121.9(2)
N(1)-C(2)-C(3)	117.6(3)
C(4A)-C(3)-C(2)	120.6(3)
C(2)-C(3)-C(4)	110.8(3)
C(5)-C(4)-C(3)	113.1(4)
C(3)-C(4A)-C(5)	114.9(4)
C(4)-C(5)-C(6)	118.1(3)
C(4A)-C(5)-C(6)	111.7(4)
N(1)-C(6)-C(61)	108.3(2)
N(1)-C(6)-C(5)	111.4(2)
C(61)-C(6)-C(5)	109.6(2)
N(1)-C(6)-C(7)	99.51(19)
C(61)-C(6)-C(7)	112.8(2)
C(5)-C(6)-C(7)	114.6(2)
C(15)-C(7)-C(8)	101.59(18)
C(15)-C(7)-C(16)	113.9(2)
C(8)-C(7)-C(16)	110.13(19)
C(15)-C(7)-C(6)	114.1(2)
C(8)-C(7)-C(6)	115.0(2)
C(16)-C(7)-C(6)	102.56(19)
O(8)-C(8)-N(9)	126.0(2)
O(8)-C(8)-C(7)	125.4(2)

N(9)-C(8)-C(7)	108.5(2)
C(11)-C(10)-C(15)	122.9(2)
C(11)-C(10)-N(9)	127.8(2)
C(15)-C(10)-N(9)	109.3(2)
C(10)-C(11)-C(12)	117.4(3)
C(13)-C(12)-C(11)	121.0(3)
C(12)-C(13)-C(14)	120.6(3)
C(15)-C(14)-C(13)	119.0(3)
C(14)-C(15)-C(10)	119.1(2)
C(14)-C(15)-C(7)	132.2(2)
C(10)-C(15)-C(7)	108.7(2)
C(17)-C(16)-C(7)	106.0(2)
N(1)-C(17)-C(18)	112.7(2)
N(1)-C(17)-C(16)	103.9(2)
C(18)-C(17)-C(16)	113.3(2)
O(18)-C(18)-C(17)	110.9(3)

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for compound **18a**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
N(1)	33(1)	39(1)	15(1)	-1(1)	-1(1)	-2(1)
N(9)	43(1)	51(1)	15(1)	2(1)	5(1)	-4(1)
O(2)	75(2)	81(2)	15(1)	-5(1)	2(1)	-30(1)
O(8)	60(1)	48(1)	24(1)	-8(1)	7(1)	2(1)
O(18)	49(1)	90(2)	26(1)	-8(1)	3(1)	-31(1)
C(2)	54(2)	46(2)	19(1)	2(1)	-7(1)	-10(1)
C(3)	62(2)	78(2)	43(2)	13(2)	-27(2)	-24(2)
C(4)	40(3)	49(4)	42(3)	1(2)	-7(2)	-4(3)
C(4A)	30(4)	61(6)	40(4)	-8(4)	-5(3)	-2(4)
C(5)	33(1)	56(2)	44(2)	11(1)	-6(1)	-1(1)
C(6)	32(1)	41(1)	21(1)	2(1)	3(1)	3(1)
C(7)	34(1)	38(1)	16(1)	0(1)	2(1)	2(1)
C(8)	33(1)	45(1)	16(1)	-3(1)	2(1)	-1(1)
C(10)	32(1)	44(1)	23(1)	3(1)	-1(1)	-2(1)
C(11)	52(2)	49(2)	36(2)	12(1)	-2(1)	-4(1)
C(12)	56(2)	39(1)	52(2)	5(1)	-5(2)	2(1)
C(13)	49(2)	45(2)	46(2)	-10(1)	-1(1)	7(1)
C(14)	41(2)	45(2)	28(1)	-2(1)	2(1)	7(1)
C(15)	27(1)	41(1)	22(1)	2(1)	-1(1)	2(1)
C(16)	33(1)	48(1)	17(1)	2(1)	-1(1)	-5(1)
C(17)	31(1)	46(1)	19(1)	-2(1)	2(1)	-3(1)
C(18)	49(2)	60(2)	22(1)	5(1)	-1(1)	-19(2)
C(61)	54(2)	48(2)	35(2)	0(1)	6(1)	14(1)

Table 5. Hydrogen bonds for compound **18a** [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(9)-H(9)...O(2)#1	0.88	1.90	2.762(3)	166.6
O(18)-H(18)...O(8)#2	0.84	1.94	2.771(3)	168.1
C(16)-H(16B)...O(8)#2	0.99	2.62	3.322(3)	127.8
C(18)-H(18B)...O(2)	0.99	2.47	3.050(3)	116.8
C(61)-H(61B)...O(8)#3	0.98	2.63	3.402(4)	135.9

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 $-x-1/2, -y-2, z-1/2$ #2 $x-1/2, -y-5/2, -z-1$ #3 $x+1/2, -y-5/2, -z-1$