

Modelado molecular de quinolonas tricíclicas con actividad antimalárica: Diseño de un farmacóforo tipo B

Molecular Modeling of Antimalarial Tricyclic Quinolones: Design of a Type B Pharmacophore

CORDERO DE TROCONIS, MARY¹; MORENO, JOSÉ R.¹; CHARRIS, JAIME²;
DOMÍNGUEZ, JOSÉ N.² Y RIGGIONE, FLAVIA³

Resumen

La malaria es una de las enfermedades tropicales más comunes, cuya terapia se hace difícil por la resistencia que ha desarrollado el parásito a la cloroquina. En el presente trabajo se realizó un estudio de modelado molecular utilizando cálculos de mecánica molecular, dinámica molecular y mecánica cuántica de varias N-metil quinolonas tricíclicas sintetizadas en nuestro laboratorio que demostraron actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento del *Plasmodium falciparum*. Las propiedades calculadas se correlacionaron con los datos de inhibición *in vitro* del crecimiento del parásito y se identificaron varias propiedades que nos ayudaron a diseñar un posible farmacóforo para este tipo de compuestos que incluye un sistema tricíclico planar, posiciones importantes de sustitución en el anillo aromático, una zona de alta densidad en el HOMO y baja densidad en el LUMO, una distancia determinada entre el oxígeno del grupo carbonilo y el hidrógeno del grupo amino. Como un primer reporte, las propiedades evaluadas se correlacionaron con la actividad *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina para cada compuesto, y se realizó un análisis de regresión, concluyendo que la energía del LUMO, cargas parciales sobre el anillo aromático condensado C, coeficiente de participación Log P y factores estéricos, pueden ser relacionados con la actividad inhibitoria del crecimiento del parásito.

Palabras clave: modelado molecular, antimaláricos, quinolonas, farmacóforo.

Abstract

Malaria is one of the most common tropical diseases, its therapy is difficult to pursue because of chloroquine resistance developed by the parasite. In the present work we did a molecular modeling study using Molecular Mechanics, Molecular Dynamics and Quantum Mechanical Calculations of several antimalarial N-methyl tricyclic quinolones modeled, synthesized and biologically tested in our laboratories. Calculated properties were related with inhibition of *in vitro Plasmodium falciparum* growth. Using this results we identified several properties that help us to design a possible pharmacophore for these compounds that includes a planar tricyclic system, important substituted positions in the aromatic ring, a high density zone in the HOMO and low density zone in the LUMO, and a particular distance between the carbonyl oxygen and the hydrogen of the amino group. As a first report evaluated properties were related with *in vitro* activity against chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* for each compound, and a regression analysis was made, concluding that LUMO energy, partial charges over the condensed phenyl ring C, log P and steric factors could be related to the quinolone analogs *in vitro* antimalarial activity.

Key Words: molecular modeling, antimalarials, quinolones, pharmacophore.

¹ Laboratorio de Modelaje Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 40109, Caracas, 1040-A, Venezuela. Prof. Mary I. Cordero de Troconis. Dirección: Departamento de Química, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 40109, Caracas, 1040-A, Venezuela. Email: mdetroconis@net-uno.net Telf.: 58-212-6052695, Fax: 58-212-605.2707.

² Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

³ Laboratorio de Malaria, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Introducción

La malaria es una de las enfermedades de mayor incidencia en el mundo, por lo que se requiere una búsqueda constante de nuevos fármacos para su tratamiento. Es una de las enfermedades tropicales más comunes, siendo de terapia complicada ya que los parásitos que la causan desarrollan resistencia rápidamente a los fármacos antimaláricos de mayor uso (Wernsdorfer 1994, 1980; Moran, 1989; Sidhu, 2002). Otros reportes indican que este problema podría ser controlado con la introducción periódica de nuevos fármacos para su tratamiento (Oaks, 1991; Oduola, 1993; Wellems, 2002). Esto hace necesario que los investigadores continúen en la búsqueda de compuestos que puedan presentar actividad contra las cepas resistentes del *plasmodium*, parásito causante de la enfermedad (Domínguez, 2002).

En el presente trabajo se estudiaron las relaciones estructura-actividad de varios análogos del tipo N-metil quinolona, los cuales fueron previamente sintetizados y determinada su actividad inhibitoria del crecimiento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina, por nuestro grupo de trabajo (Charris, 2001). Este estudio se realizó con la finalidad de buscar patrones estructurales comunes que pudiesen ser correlacionados con su actividad inhibitoria del crecimiento del parásito. Aunque trabajos previos han mostrado que algunas de estas nuevas quinolonas tricíclicas son efectivas contra cepas de *plasmodium* resistentes a la cloroquina, no ha sido determinado efectivamente su mecanismo de acción, la selectividad hacia los parásitos, la resistencia cruzada y los requerimientos estructurales para su actividad (Charris, 2001; Domínguez, 2002).

En vista de que los receptores reconocen efectos electrónicos más que átomos *per se*, estudios de las propiedades moleculares estéricas y electrónicas pueden ser muy efectivos para ayudarnos a interpretar la estructura electrónica de estos nuevos fármacos (Bhattacharjee, 1996 y 2000; Karle, 1999).

En el presente trabajo se realizó un estudio de modelado molecular utilizando cálculos de mecánica molecular (Burkert, 1982; Allinger, 1977; Seibel, 1990), dinámica molecular (Karplus, 1990; Stewart, 1983; Lesyng, 1993) y mecánica cuántica (Stewart, 1983; Friesner, 1998) de las N-metilquinolonas tricíclicas en la Figura 1. Las propiedades evaluadas se correlacionaron con la actividad *in vitro* contra una cepa de *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina, y se realizó un análisis de regresión múltiple con el fin de determinar las características de los compuestos que pudieran correlacionarse con la actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento del parásito, y por tanto con su potencial actividad antimalárica.

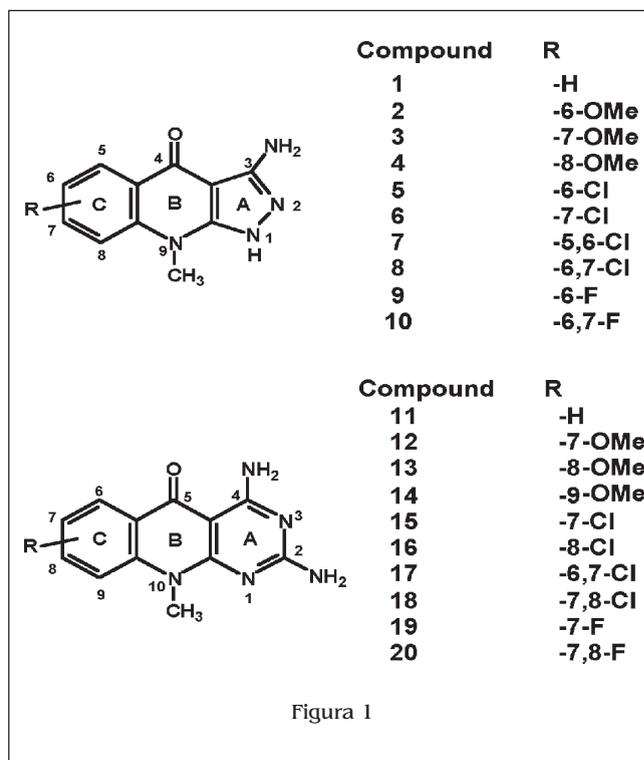


Figura 1

Utilizando estos resultados se logró identificar varias propiedades que nos ayudaron a diseñar un posible farmacóforo para estos compuestos.

El análisis conformacional se realizó utilizando cálculos de mecánica molecular y de dinámica molecular. Se identificaron las conformaciones de menor energía y con ellas se realizaron los cálculos semiempíricos de mecánica cuántica. Los resultados obtenidos fueron tabulados para obtener gráficos moleculares computarizados de densidad electrónica, orbitales de frontera y potencial electrostático de los compuestos estudiados. Fue de particular interés examinar los efectos de la sustitución química en el anillo aromático condensado C (Figura 1), sobre la energía y las propiedades electrostáticas de los compuestos estudiados. Datos del análisis conformacional, de los potenciales electrostáticos moleculares (PMEs), del estudio de propiedades moleculares tales como orbital más bajo desocupado (LUMO) y orbital más alto ocupado (HOMO), momento dipolar, cargas parciales, índices Kappa de forma y coeficiente de partición (Log P), fueron correlacionados con la actividad inhibitoria del crecimiento de *Plasmodium falciparum*. Se identificaron varias propiedades que nos permitieron diseñar un farmacóforo tipo B. Un farmacóforo tipo B es un modelo que representa al menos tres puntos posibles para la unión del receptor y ha sido utilizado por otros investigadores para diseñar farmacóforos, tomando en cuenta propiedades estéricas y electrónicas (Bensen, 2000; Loew, 1993; Mason, 2001; Marshall, 1995).

Métodos

Los cálculos y gráficos moleculares se realizaron en una estación de trabajo CAChe utilizando *software* propiedad de la compañía Fujitsu/CAChe Scientific (Fujitsu/CAChe Scientific, 2002) y en una estación de trabajo Silicon Graphics utilizando *software* propiedad de la compañía Accelrys/Biosym (Accelrys/Biosym, 2001).

A. ANÁLISIS CONFORMACIONAL

En el presente estudio se utilizaron dos series de compuestos, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1. Los cálculos se realizaron utilizando *software* de la compañía CAChe Scientific versión 4.1.1 y en una estación Silicon Graphics utilizando los *software* Insight y Discovery de la compañía Accelrys/Biosym versión 5.3.

Se construyeron modelos tridimensionales de las quinolonas sustituidas objeto del presente estudio, utilizando el editor molecular del sistema CAChe. La estructura tricíclica básica se comparó con los datos cristalográficos del compuesto 1 (Charris, comunicación personal). Estas estructuras sirvieron como puntos iniciales para un análisis conformacional exhaustivo de cada compuesto, para definir sus posibles requerimientos para unirse al receptor. Inicialmente se minimizó cada estructura utilizando mecánica molecular (Allinger, 1977, Seibel 1990). Con el fin de obtener conformaciones lo más cercanas posible al mínimo global, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (Brucoleri, 1990; Auffinger, 1990) en una estación de trabajo Silicon Graphics, utilizando *software* propiedad de la compañía Accelrys/Byosim; los cálculos se realizaron a 900 K por 1000 ps, con un intervalo de tiempo de 1.0 fs. No se incluyeron en los cálculos

moléculas de solvente. Se analizaron los archivos de trayectoria obtenidos y se seleccionaron en cada caso las conformaciones que diferían no más de 5 kcal/mol del mínimo de energía; estas conformaciones se minimizaron nuevamente utilizando mecánica molecular y se seleccionó en cada caso la conformación de menor energía para realizar una nueva simulación de dinámica molecular a 300 K por 1000 ps, con un intervalo de tiempo de 1.0 fs. El archivo de Trayectoria resultante se analizó y se seleccionaron las conformaciones que no diferían en más de 5 kcal/mol de la conformación de mínima energía. Estas conformaciones fueron minimizadas utilizando mecánica molecular y se escogió la conformación de menor energía para ser utilizada para realizar cálculos de mecánica cuántica. Este procedimiento se repitió para cada uno de los compuestos.

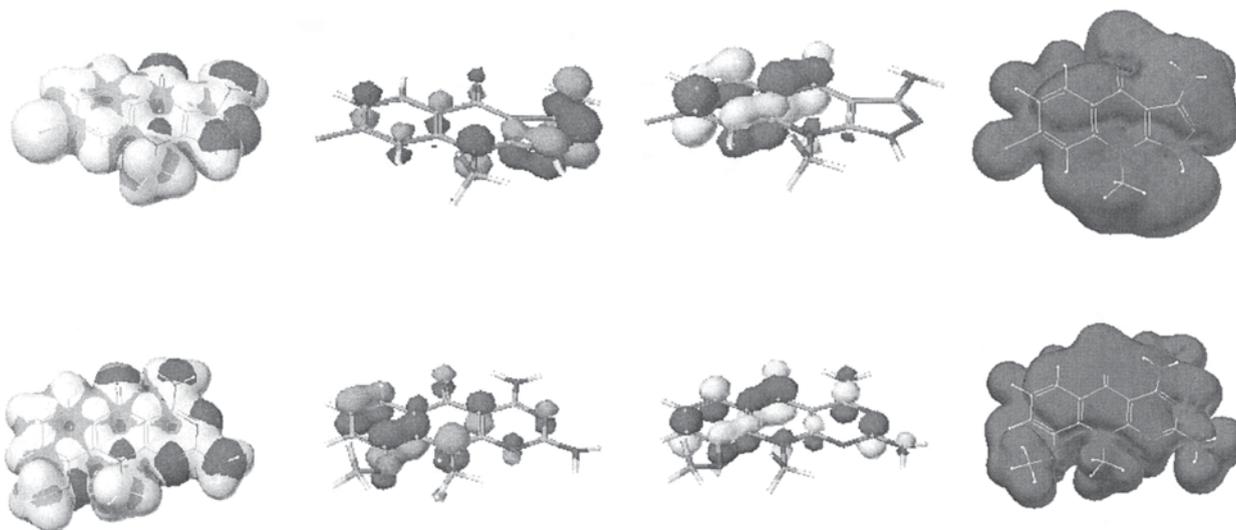
B. CÁLCULOS SEMIEMPÍRICOS DE MECÁNICA CUÁNTICA

Las conformaciones de menor energía de cada uno de los compuestos se utilizaron para realizar cálculos de mecánica cuántica semiempírica utilizando MOPAC, Molecular Orbital Package (Stewart, 1983), usando AM1 (Dewar, 1985). Con los resultados obtenidos se generaron gráficos en tres dimensiones de densidad electrónica, orbitales de frontera y potenciales moleculares electrostáticos. Ejemplo de estos gráficos de los compuestos 6 y 14 (menor y mayor actividad inhibitoria del crecimiento de *P. falciparum* respectivamente) se muestran en la Figura 2.

Adicionalmente a estas propiedades se utilizó el *software* CAChe Project Leader propiedad de la compañía Fujitsu/CAChe Scientific para calcular los índices de forma Kappa (Hall, 1991) y Log P (Ghose, 1987); también

Figura 2

Gráficos obtenidos para los compuestos 6 (mayor actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*) y 14 (menor actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*)



se realizó una tabla con todas las otras propiedades determinadas (Tabla 1). Esta tabla muestra las siguientes propiedades: conformación de mínima energía, momento dipolar, energía del orbital ocupado más alto (HOMO), energía del orbital desocupado más bajo (LUMO), diferencia en energía entre HOMO y LUMO ($\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$), Índices Kappa de forma 1, 2 y 3, cargas parciales en átomos relevantes: N9 ó N10, N del NH₂ en C3 ó C4, C6 ó C7, C7 ó C8, C8 ó C9, N1, N2 ó N3 (cuando utilizamos dos posiciones diferentes para una carga parcial el número más bajo se refiere a la posición en los análogos en los cuales el anillo A es de 5 átomos, y el número más alto se refiere a la posición en los análogos en los cuales el anillo A es de 6 átomos); distancia del oxígeno del carbonilo al hidrógeno del NH₂; área de densidad de isosuperficie, volumen de densidad de isosuperficie, y Log P. En esta tabla también se incluye el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Plasmodium falciparum* determinado experimentalmente. Finalmente se realizaron regresiones simples y múltiples con el fin de tratar de establecer una ecuación que correlacione las propiedades calculadas con la actividad inhibitoria del crecimiento de *Plasmodium falciparum* determinada experimentalmente.

C. PRUEBAS BIOLÓGICAS

Se utilizó una cepa de *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina, la FCBI, la cual fue originalmente obtenida de un paciente colombiano, y mantenida en cultivo continuo de acuerdo con las técnicas de Trager y Jensen (Trager, 1976). El cultivo se sincronizó utilizando el método descrito por Lambros y Vanderberg (Lambros, 1979). El efecto de los compuestos sobre la proliferación de *P. falciparum* se midió como inhibición de la incorporación de ³H-hipoxantina a ácido nucleico, utilizando el método descrito por Desjardin (Desjardin, 1979).

Resultados y discusión

Se utilizó una combinación de mecánica molecular, seguida de dinámica molecular a alta temperatura seguida de minimización; esta combinación provee de una manera rápida de explorar el espacio conformacional e identificar conformaciones de baja energía de los compuestos a estudiar, aun cuando no esperábamos grandes cambios en cuanto a conformación.

Luego de identificar conformaciones de baja energía para cada uno de los compuestos, se utilizaron para una simulación de dinámica molecular a alta temperatura. Esta técnica se utiliza para sobrepasar las barreras de energía y se utiliza frecuentemente para explorar el espacio conformacional de compuestos cíclicos. La búsqueda de estructuras razonables de moléculas grandes

usualmente se hace utilizando dinámica molecular, ya que es poco práctico realizar mapas de moléculas con varios ángulos rotables por otros métodos que consumen mucho más tiempo de computación.

Los archivos de trayectoria obtenidos fueron analizados y se seleccionaron las conformaciones que diferían en ± 5 kcal/mol del mínimo de energía obtenido y se minimizaron utilizando MM. La conformación de menor energía en cada caso fue utilizada para realizar los cálculos de mecánica cuántica, cuyos resultados fueron transformados en gráficos tridimensionales que nos permitieron un mejor análisis de algunas de las propiedades estudiadas.

Desde un punto de vista cualitativo, pudimos realizar las siguientes observaciones analizando estos gráficos.

Todos los compuestos presentan una zona de alta densidad electrónica alrededor del oxígeno del grupo carbonilo y una zona de densidad media alrededor de los átomos de nitrógeno. Otra zona de alta densidad adicional se encontró en los análogos sustituidos con flúor (compuestos 9,10 y 19,20) o grupos metoxi (compuestos 2-4 y 12-14) en el anillo aromático C (ver figura 1). Todos estos análogos mostraron una actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *P. falciparum* relativamente importante, con la excepción del compuesto 19 (41% de inhibición del crecimiento de *P. falciparum*). Sin embargo, compuestos que no tenían esta zona adicional de alta densidad, pero tenían sustituciones en las mismas posiciones, también mostraron una importante actividad (compuestos 5, 6, 7, 15, 16, 17), lo que indica que quizás el efecto sobre la actividad se deba a un efecto estérico más que a un efecto electrónico.

Aunque reportes previos señalan que el potencial molecular electrostático (PME) es importante para la actividad antimalárica (Bhattacharjee, 1996, Vippagunta, 1999), nuestros cálculos no mostraron diferencias significativas que pudiesen relacionarse con la actividad inhibitoria de los compuestos sobre el crecimiento *in vitro* del *P. falciparum* (ejemplo de estos gráficos puede verse en la Figura 2).

En los gráficos correspondientes al orbital más alto ocupado se observó que los compuestos de la serie I (anillo A de cinco átomos) presentaban una mayor densidad sobre el anillo A que los correspondientes compuestos de la serie II (anillo A de seis átomos), con una sustitución similar en el anillo C, los cuales resultaron ser menos activos. Por lo tanto, esta propiedad podría ser uno de los factores que pudiesen relacionarse con las diferencias en actividad inhibitoria del crecimiento de *P. falciparum* (por ejemplo, el compuesto 1 comparado con el compuesto 11, el compuesto 6 comparado con el 16, el 9 con el 19) (ejemplo de estos gráficos puede observarse en la Figura 3).

Tabla I

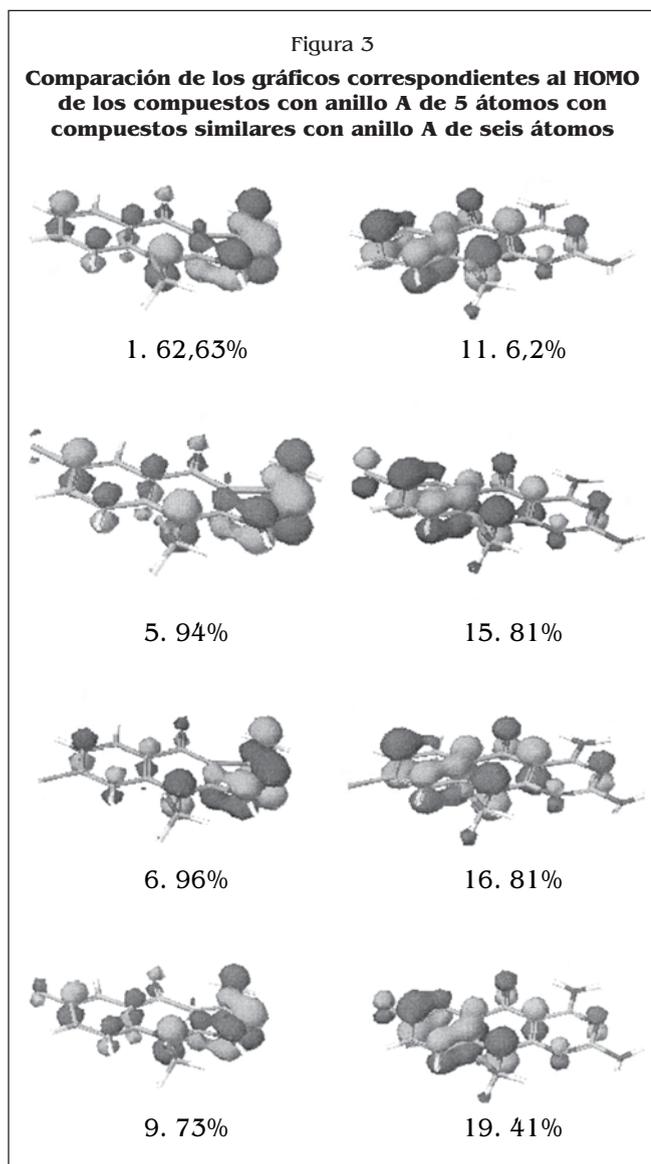
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Compuesto Numero	Conformacion de minima energia (kcal/mol)	Momento Dipolar (Debyes)	Energia del HOMO (kcal/mol)	Energia del LUMO (kcal/mol)	EHOMO - LUMO	Kappa 1	Kappa 2	Kappa 3	Carga parcial de N9 o N10	Carga parcial de NH2 en C3 o C4	Carga parcial en C5 or C6
1	73.86	5.367	-8.448	-0.274	-8.174	11.111	4.053	1.593	-0.201	-0.314	-0.047
2	36.75	4.285	-8.298	-0.323	-7.975	13.005	4.836	1.983	-0.200	-0.310	-0.128
3	35.54	4.915	-8.440	-0.193	-8.247	13.005	4.836	1.983	-0.203	-0.310	-0.013
4	39.68	5.952	-8.275	-0.301	-7.965	13.005	4.836	1.896	-0.184	0.313	-0.080
5	67.53	5.796	-8.532	-0.465	-8.067	12.055	4.281	1.778	-0.203	-0.310	-0.043
6	67.34	4.594	-8.562	-0.547	-8.015	12.055	4.281	1.778	-0.202	-0.313	-0.039
7	69.91	6.266	-8.560	-0.656	-7.904	13.005	4.529	1.815	-0.201	-0.317	0.020
8	62.44	5.254	-8.632	-0.727	-8.569	13.005	4.529	1.896	-0.201	-0.312	-0.055
9	29.99	5.955	-8.512	-0.525	-7.987	12.055	4.281	1.778	-0.202	-0.312	-0.084
10	-12.83	5.381	-8.663	-0.799	-7.864	13.005	4.529	1.896	-0.201	-0.312	-0.062
11	55.26	3.074	-8.679	-0.335	-8.344	13.005	4.836	2.077	-0.197	-0.351	-0.043
12	18.01	2.297	-8.404	-0.389	-8.015	14.917	5.653	2.493	-0.193	-0.351	-0.126
13	16.97	1.932	-8.716	-0.307	-8.409	14.917	5.653	2.493	-0.196	-0.351	-0.010
14	21.95	3.080	-8.404	-0.322	-8.082	14.917	5.653	2.391	-0.184	-0.353	-0.072
15	48.54	4.136	-8.727	-0.492	-8.184	13.959	5.080	2.276	-0.195	-0.350	-0.037
16	48.57	3.133	-8.849	-0.543	-8.306	13.959	5.080	2.276	-0.196	-0.350	-0.035
17	51.36	4.780	-8.784	-0.630	-8.154	14.917	5.325	2.294	-0.196	-0.346	0.026
18	43.42	4.298	-8.863	-0.697	-8.166	14.917	5.325	2.391	-0.195	-0.348	-0.030
19	10.94	4.385	-8.711	-0.537	-8.174	13.959	5.080	2.276	-0.196	-0.350	-0.080
20	-32.13	4.873	-8.912	-0.765	-8.147	14.917	5.325	2.391	-0.195	-0.348	-0.058

Propiedades calculadas y valores de inhibición del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* (%) determinado experimentalmente para los compuestos 1-20. En las columnas con diferentes números de átomos, los números más bajos corresponden a los compuestos con anillo A de 5 átomos y los más altos a los análogos con el anillo B de seis átomos

Tabla 1 (continuación)

A	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
Compuesto Numero	Carga parcial en C6 o C7	Carga Parcial en C7 o C8	Carga parcial En C8 o	Carga parcial en N1	Carga parcial en N2 o N3	Distancia Oxigeno carbonílico-NH2	Area de Densidad de Isosuperficie	Volumen de Densidad de Isosuperficie	Log P	Percent. de inhibicion del crecimiento de <i>P.falciparum</i>
1	-0.172	-0.076	-0.194	-0.180	-0.165	2.434	173.630	118.120	1.318	62.63
2	0.041	-0.102	-0.161	-0.186	-0.162	2.422	198.730	134.110	1.065	53.25
3	-0.242	0.132	-0.234	-0.185	-0.161	2.438	198.890	134.010	1.065	70.25
4	-0.155	0.029	0.101	-0.177	-0.168	2.490	198.340	133.130	1.065	81.60
5	-0.106	-0.072	-0.187	-0.183	-0.159	2.428	186.340	127.150	1.836	94.00
6	-0.168	-0.008	-0.195	-0.181	-0.161	2.435	186.270	127.020	1.836	96.00
7	-0.116	-0.063	-0.196	-0.179	-0.163	2.377	198.380	135.580	2.354	92.00
8	-0.106	-0.009	-0.189	-0.181	-0.158	2.424	198.680	135.330	2.354	No determinado
9	0.049	-0.112	-0.171	-0.185	-0.159	2.404	177.690	120.380	1.457	73.00
10	0.017	0.115	-0.220	-0.181	-0.157	2.422	181.990	122.530	1.597	83.00
11	-0.179	-0.074	-0.195	-0.357	-0.348	2.404	193.070	132.390	1.097	6.20
12	0.036	-0.097	-0.163	-0.355	-0.349	2.043	217.790	147.540	0.845	60.60
13	-0.244	0.132	-0.231	-0.353	-0.349	2.047	218.350	147.630	0.845	85.63
14	-0.148	-0.145	0.020	-0.358	-0.351	2.058	217.600	146.680	0.845	31.43
15	-0.113	-0.068	-0.188	-0.354	-0.349	2.055	205.500	141.210	1.615	81.00
16	-0.174	-0.005	-0.196	-0.355	-0.347	2.046	205.520	140.940	1.615	81.00
17	-0.121	-0.062	-0.195	-0.357	-0.347	2.038	217.700	149.530	2.133	90.00
18	-0.112	-0.005	-0.190	-0.354	-0.348	2.040	217.790	149.960	2.133	No determinado
19	0.042	-0.109	-0.170	-0.356	-0.349	2.039	197.010	134.640	1.237	41.00
20	0.012	0.118	-0.220	-0.351	-0.345	2.049	201.240	136.560	1.376	94.00

(continuación) Propiedades calculadas y valores de inhibición del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* (%) determinado experimentalmente para los compuestos 1-20. En las columnas con diferentes números de átomos, los números más bajos corresponden a los compuestos con anillo A de 5 átomos y los más altos a los análogos con el anillo B de seis átomos



Los gráficos correspondientes al orbital más bajo desocupado (LUMO) mostraron que los análogos con un anillo A de cinco átomos no presentaban densidad electrónica significativa en el anillo A, a diferencia de los compuestos con un anillo de seis átomos en el anillo A que resultaron ser menos activos, de forma tal que esta diferencia también pudiese afectar la actividad (ejemplo en la Figura 2).

En la Figura 2 se muestran ejemplos de los gráficos de densidad de isosuperficie, PME, HOMO y LUMO para compuestos con diferente actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento de *Plasmodium falciparum*.

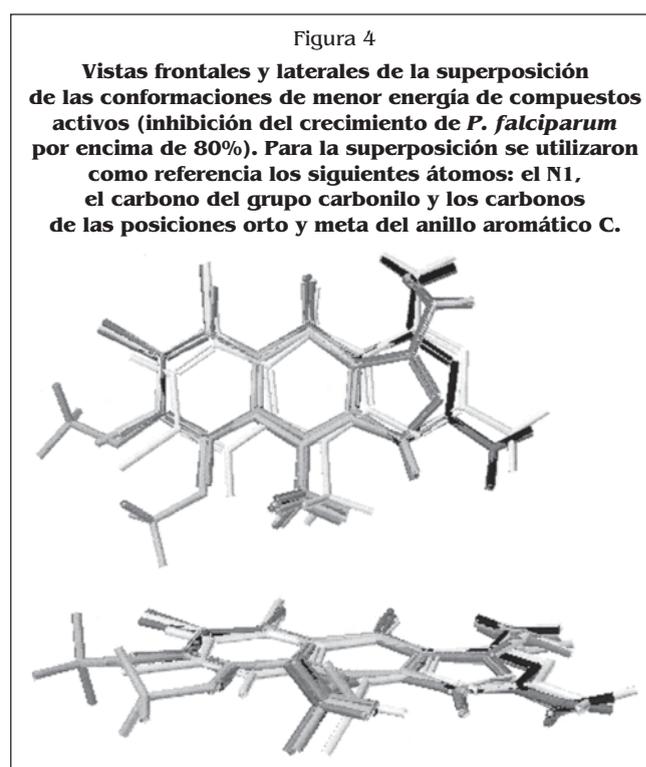
La presencia de átomos de cloro como sustituyente en el anillo C, parece ser crítica para la actividad ya que estos compuestos mostraron una significativa actividad inhibitoria del crecimiento del parásito *in vitro* (más de 80%) (compuestos 5, 6, 7, 16, 17). Este efecto puede deberse a una combinación muy específica de factores

electrónicos y estéricos, ya que la sustitución de átomos de cloro por átomos de flúor o por grupos metoxi produce compuestos de menor actividad.

Ya que todos los compuestos estudiados son análogos, relacionados con sólo pequeñas diferencias en estructura, puede presumirse que deben ocupar la misma región del receptor sobre el cual actúan. En la Figura 4 se muestra la superposición de las conformaciones de baja energía que producen una inhibición del crecimiento de *P. falciparum* superior a 80%. En esta figura se muestra que todos los compuestos presentan una región planar (RP) constituida por los tres anillos condensados. El grupo N-metilo también es importante ya que compuestos que carecen de este grupo no afectan el crecimiento del *Plasmodium falciparum* *in vitro*.

Adicionalmente, utilizando el programa CAChe Project Leader se calcularon los índices de forma Kappa con el fin de tener datos relacionados con la forma de los compuestos (Kappa 1 cuantifica el número de ciclos en una estructura química, Kappa 2 cuantifica el grado de linealidad o parecido a una estrella y Kappa 3 cuantifica el grado de ramificación desde el centro de una estructura química). También se calculó el valor del coeficiente de partición Log P, ya que este valor es un indicativo de las diferencias de absorción de los compuestos a través de una membrana lipídica.

Las propiedades calculadas se muestran en la Tabla 1. Utilizando estas propiedades y la actividad inhibitoria del crecimiento sobre el *P. falciparum* determinada experimentalmente (columna V, tabla 1), se realizaron



regresiones simples y se determinaron los valores de índice de correlación r^2 . Estos valores se muestran en la Tabla 2. Luego se utilizaron las propiedades con los mayores valores de r^2 y algunas propiedades que han sido reportadas como importantes para la actividad antimalárica, tal como las cargas relativas sobre ciertos átomos (Bhattacharjee, 1996) para realizar un análisis de regresión múltiple y obtener una ecuación que correlacione la actividad inhibitoria *in vitro* con las propiedades calculadas.

Se obtuvieron varios modelos posibles, que fueron analizados sobre la base de los valores de r^2 y de la menor dispersión de los datos obtenidos al graficar los valores de inhibición calculados vs. los valores experimentales. En estas primeras regresiones se obtuvieron tres modelos posibles con valor de r^2 de alrededor de 0,7, lo que indica que reproducen los resultados experimentales aproximadamente en un setenta por ciento. En todos se observa la influencia del nivel energético del orbital LUMO (orbital mas bajo desocupado), de la distancia entre el oxígeno carbonílico y el H del grupo NH_2 , del índice Kappa 3 y del coeficiente de participación Log P. Adicionalmente, en cada uno de los modelos la

otra variable se refiere a la carga parcial sobre los carbonos del anillo aromático C. Al graficar los valores calculados por estos modelos de regresión vs. los valores determinados experimentalmente se observó que cualquiera de estos gráficos presentaba una dispersión aceptable de los datos. En vista de estos resultados se decidió hacer una nueva regresión en la que se incluyeran las variables comunes y las cargas sobre los tres átomos de carbono del anillo aromático C, y se observó que se mantiene el valor de r^2 , pero el índice de validación cruzada rcv^2 baja a 0,1555. Por este motivo realizamos nuevas regresiones múltiples, incluyendo las variables comunes y sólo las cargas de dos de los átomos de carbono del anillo aromático C, y se obtuvo una mejor regresión de 0,78, lo que indica que este modelo reproduce los resultados experimentales en un 78%.

$$\begin{aligned} \% \text{ de Inhibición calculada} = & - 55,74 \text{ Elumo} + 74,96 \text{ Kappa}3 - \\ & 263,59 \text{ Carga } C_5 \text{ o } C_6 + \\ & + 165,84 \text{ Cargas } C_7 \text{ o } C_8 + 79,25 \text{ distancia O del Carbonilo} \\ & \text{ a H del } \text{NH}_2 + \\ & + 76,71 \text{ log P} - 352,04 \quad r^2 = 0,78, \text{rcv}^2 = 0,31 \end{aligned}$$

Este modelo de regresión es el que mejor reproduce la actividad inhibitoria sobre el crecimiento del *P. falciparum* y en el que se observa la influencia del LUMO, de la constante de forma Kappa 3, las cargas parciales sobre los átomos (C_5 ó C_6) y (C_7 ó C_8), la distancia oxígeno del carbonilo al hidrógeno del grupo amino y log P. (Figura 5).

Conclusiones:

Este estudio permitió la identificación de una región que debe ser ocupada en el receptor para producir actividad inhibitoria.

Utilizando como base el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los datos obtenidos en el presente estudio de modelado molecular y en los datos de actividad inhibitoria determinada experimentalmente, se proponen las siguientes conclusiones:

1. El farmacóforo debe tener una región planar (RP) alrededor de los anillos tricíclicos y otra región no planar sustituyendo al nitrógeno de la quinolona.

2. Debido a que los compuestos activos presentaron una mayor densidad electrónica sobre el anillo A, esta densidad parece ser uno de los requisitos necesarios para la actividad. También parece importante carecer o tener una baja densidad sobre el anillo A en el LUMO.

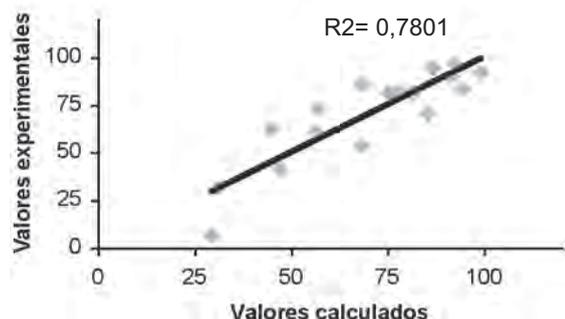
3. La sustitución en el anillo C por uno o más átomos de cloro es óptima para la actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento del *Plasmodium falciparum*.

Tabla 2

Valores de r^2 obtenidos por regresión simple utilizando las propiedades calculadas y la inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. falciparum* determinada experimentalmente

PROPIEDAD	r^2
Conformación de min energía	0.001
Momento dipolar	0.177
Energía del HOMO	0.054
Energía del LUMO	0.221
$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$	0.070
Índice de forma Kappa 1	0.003
Índice de forma Kappa 2	0.039
Índice de forma Kappa 3	0.029
Carga parcial sobre N_9 o N_{10}	0.076
Carga parcial sobre el N del NH_2	0.227
Carga parcial sobre C_5 o C_6	0.157
Carga parcial sobre C_6 o C_7	0.003
Carga parcial sobre C_7 o C_8	0.220
Carga parcial sobre C_8 o C_9	0.051
Carga parcial sobre N_1	0.107
Carga parcial sobre N_2 o N_3	0.103
Distancia Oxígeno del Carbonilo- Hidrógeno del grupo amino	0.094
Area de Isosuperficie de densidad	0.003
Volumen de isosuperficie de densidad	0.003
Log P	0.341

Figura 5
Valores experimentales vs. Valores calculados de inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. falciparum*



Compuesto	Valores experimentales	Valores Calculados
1	62,63	45,10
2	53,25	68,52
3	70,25	85,56
4	81,60	77,69
5	94,00	86,93
6	96,00	92,45
7	92,00	99,33
8	-	128,68
9	73,00	57,05
10	83,00	94,54
11	6,20	29,57
12	60,60	56,55
13	85,63	68,84
14	31,43	31,55
15	81,00	75,45
16	81,00	81,82
17	90,00	91,66
18	-	119,55
19	41,00	47,39
20	94,00	86,59

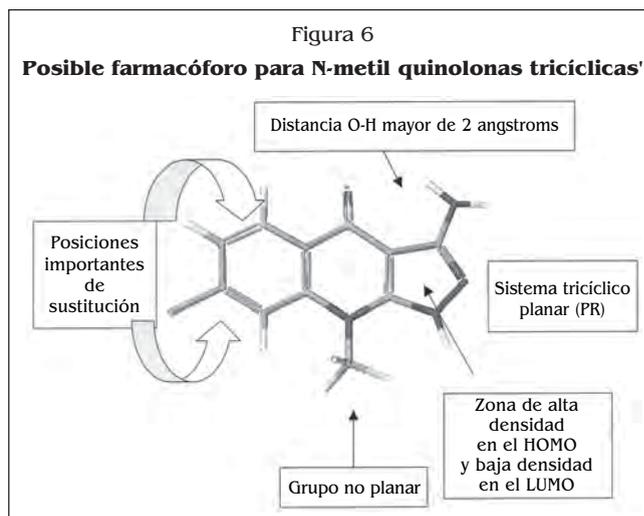
% de Inhibición calculada = - 55,74 Elumo + 74,96 Kappa 3 - 263,59 Carga C₅ o C₆ + 165,84 Cargas C7 o C8 + 79,25 distancia O del Carbonilo a H del NH₂ + 76,71 log P - 352,04
r² = 0,78, rcv² = 0,31

4. Las cargas parciales sobre los carbonos en el anillo aromático C (C5 y C7 en los análogos con un anillo A de cinco átomos o los correspondientes carbonos C6 y C8 en los análogos con un anillo A de seis átomos) son importantes para la actividad estudiada.

5. Una distancia mayor de 2 angstroms entre el hidrógeno del grupo amino y el oxígeno del grupo carbonilo también parece afectar la actividad inhibitoria. En virtud de los resultados obtenidos, se propone un

farmacóforo el cual está representado esquemáticamente en la Figura 6.

6. Adicionalmente, los valores de coeficiente de partición también son importantes para la actividad inhibitoria del crecimiento del cultivo de *Plasmodium falciparum*.



Agradecimientos

Los autores agradecen por el financiamiento para este proyecto al CONICIT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Venezuela) Proyecto S1-95000496 y a la Universidad Central de Venezuela proyectos CDCH-06.30.3440.95 y 06-10.3543.95

Bibliografía:

- ALLINGER, N.L., 1977; Conformational Analysis 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms, *J. Am.Chem.Soc.*, 99, 8127-8134.
- AUFFINGER, P. y WIPFF, G., 1990; High temperature annealed molecular dynamics simulations as a tool for conformational sampling. Application to the bicyclic «222» cryptand. *J. of Computational Chemistry*, 11, 19-31.
- BHATTACHARJEE, A.K., 2000, Electrostatic potential profiles may guide cation- π interaction in antimalarials chloroquine and mefloquine: an ab initio quantum chemical study. *J. Mol. Struct.* 529(SI): 193-201.
- BHATTACHARJEE, A.K. y KARLE, M., 1996, Molecular electronic properties of a series of 4-quinolinecarbinolamines define antimalarial activity profile. *J. Med.Chem.*, 39,4622-9.
- BENSEN D.D., MARSHALL, G.R., 2000; en *Pharmacophore Perception, Development, and use in Drug Design*, Ed. Osman Gunner, International University Line, La Jolla, C.A., 21-45.
- BRUCCOLERI R.E., KARPLUS M., 1990, Conformational sampling using high-temperature molecular dynamics *Biopolymers* 29 (14): 1847-62.
- BURKERT, U., & ALLINGER, N.L., 1982, *Molecular Mechanics*, American Chemical Society, Washington, DC. Monografía 177.

- CACHE (Computer Aided Chemistry), version 4.1.1, 2002, Reference Manual, Fujitsu, CACHE Scientific, Beaverton Oregon, EE.UU.
- CHARRIS J. y CAPPARELLI M., comunicación personal.
- CHARRIS J.E., DOMÍNGUEZ, J.N., LOBO G., CORDERO M.I., LÓPEZ, S.E., MÉNDEZ, B., PEKERAR, S. and Riggione, F., 2000, ^1H and ^{13}C NMR spectral characterization of some antimalaria in vitro 3-amino-9-methyl-1H-pyrazolo(3,4,b)-4-quinolones. *Magn.Reson.Chem.*, 38: 1039-1040
- CHARRIS J.E., DOMÍNGUEZ, J.N., LOBO G., CORDERO M.I., MORENO J.R. y RIGGIONE, F., 2001, Síntesis de quinolonas derivadas como potenciales antimaláricos, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, Suplemento 1, N° 1 (S00-S00), 72-75.
- DESJARDIN, R.E., CONFIELD, C.J., HAGNES, J.D., CHULAY, J.D., 1979, Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 16, 710-8.
- DEWAR, M.J.S., ZOEBSH, E.G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P., 1985, AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J.Am. Chem.Soc.*, 107, 3902-3909.
- DOMINGUEZ, J.N. and CHARRIS, J.E., 1993, Synthesis of N-Methylated Quinolones, *Org. Prep. Proced. Int.*, 25:683-686.
- DOMINGUEZ, J.N., 2002, Chemotherapeutic agents against malaria: What's next after chloroquine?, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2(11):1173-1185.
- FRIESNER, RA, BEACHY, M.D., 1998, Quantum mechanical calculations on biological systems, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8 (2): 257-62.
- GHOSE, AK, CRIPPEN, J.M., 1987, Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions, *J. Comput. Chem.*, 27(1):21-35.
- Insight II User Guide, 1997, Accelrys/Biosym, San Diego, E.E.U.U.
- HALL, L.H. and KIER, L.B. 1991, en *Reviews in Computational Chemistry*, Cap. 9, K.B. Lipkowitz y D. Boyd (Eds), 367-422.
- KARLE, M. y BHATTACHARJEE, A.K, 1999, Functional correlation of molecular electronic properties with potency of synthetic carbinolamine antimalarial agents, *Biorganic & Medicinal Chemistry* 7, 1769-1774.
- KARPLUS, M. y PETSKO, G.A., 1990, Molecular dynamics simulations in biology *Nature*, 347:631-639.
- LAMBROS, C., VANDERBERG, 1979, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture, *J. Parasitol.*, 65, 418-20.
- LOEW, G., VILLAR, H.O. y ALKORTA, Y., 1993, Strategies for indirect computer-aided drug design, *Pharm Res.*, 10,475-86.
- LESYNG, B, MCCAMMON, JA, 1993, Molecular Modeling Methods, Basic Techniques and Challenging problems 60 (2): 149-167.
- MASON, J.S.; GOOD, A.C.; MARTIN, E.J., 2001, 3-D pharmacophores in drug discovery. *Curr. Pharm. Des.*, 7, 567-597.
- MARSHALL, G.R., 1995, en *Molecular Modeling in Drug Design en Burger's Medicinal Chemistry*. 5th edición, Ed. M.E. Wolff John Wiley and Sons, Inc, New York, vol 1, 573-659.
- MORAN, J.S., BERNARD, K.W., 1989, The spread of chloroquine-resistant malaria in Africa. Implications for travelers, *J. Am. Med. Assoc.*, 262,245-8.
- OAKS, S.C., MITCHEL L, V.S, PEARSON, G.W., CARPENTER, C.C. 1991, en *MALARIA Obstacles and Opportunities*; National Academic Press, D.C.; pp 15, 144-168.
- ODUOLA, A. M.J., OMITOWOJU, G.O., GERENA, L., KYLE, D.E., MILHOUS, W.K., SOWUNMI, A., SALAKO, L.A., 1993, Reversal of mefloquine resistance with penfluridol in isolates of *Plasmodium falciparum* from south-west Nigeria *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87, 81-3.
- SIDHU, AB, VERDIER-PINARD, D, FIDOCK, DA, 2002, Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations, *Science*. Oct 4; 298(5591): 210-3.
- SEIBEL, G.L., KOLLMAN, P.A., 1990, Molecular Mechanics and the modeling of drug structures, in *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Vol. 4. *Quantitative Drug Design*, C. Hansch, P.G. Sammes, J.B. Taylor, C.A. Ramsden (Eds), Pergamon. 125-138.
- STEWART, J.P., 1983, Quantum Chemistry Program exchange, program 445.
- TRAGER, W., JENSEN, B.B, 1976, Human malaria parasites in continuous culture *Science*, 193, 673-5.
- VIPPAGUNTA, S.R., DORN, A., MATILE, H., BHATTACHARJEE, A.K., KARLE, J.M., ELLIS, W.Y., RIDLEY, R.G., VENNERSTROM, J.L. 1999, Structural Specificity of Chloroquine-hematin binding related to inhibition of hematin polymerization and parasite growth, *J. Med. Chem.*, 42, 4630-9.
- WELLEMS, T.E., 2002, *Plasmodium* chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug, *Science*, oct 4; 298 (5591): 124-6.
- WERNSDORFER, W.H., KOUZNETOV, R.L. 1980, Drug resistant malaria occurrence, control and surveillance, *Bull. WHO*, 58, 341-352.
- WERNSDORFER, W.H. 1994, Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica* 56: 143-156.

Recibido: marzo 2004

Aceptado: junio 2004