

DISCUSSIÓ DE RESULTATS: CAPÍTOL 1

ANDROSTANS

PART I: Androstans Lliures.

1. Introducció.

Com s'ha comentat en la introducció general, el grup de L. Kohout s'ha dedicat durant anys a sintetitzar anàlegs BRs sense cadena lateral, amb cadena lateral de pregnà i cadenes laterals diverses unides a l'esquelet esteroide del tipus colà i androstà mitjançant la formació d'un èster o amida. De tots ells, els més interessants són aquests últims ja que: 1) donen solució al principal problema de la síntesi de BRs naturals (la glicolització asimètrica del doble enllaç de la cadena lateral), i 2) permeten augmentar la diversitat estructural en l'extrem alquílic final de la cadena lateral.

Recordar que els anàlegs **1** i **2** no van resultar actius en el bioassaig del test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT) realitzat al Laboratori d'Esteroides, però sí en el del segon entrenús de la mongeta realitzat a la República Txeca i en proves de camp.

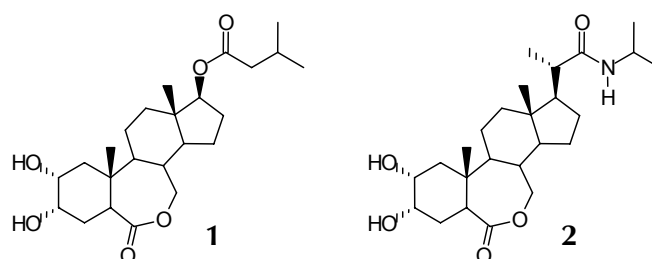


Figura 32: anàlegs **1** i **2**.

Es van iniciar estudis computacionals per avaluar la qualitat d'aquests anàlegs com a potencials BRs.^{95,96} Aquests es basen en l'aproximació a l'anàleg actiu (AAA), la qual suposa que quan més similar sigui l'anàleg d'interès al compost de referència, en aquest cas la brassinolida, més actiu serà. La similitud entre compostos es va avaluar de forma qualitativa mitjançant la superposició de mapes de GRID i de forma quantitativa mitjançant l'índex de similitud electrostàtic de Carbó (C_{ab}) (Figura 33).

Els dos compostos presenten una bona superposició amb la brassinolida. Estructuralment, tan el carbonil de l'èster com el de l'amida mimetitzen l'hidroxil en C22, però no passa el mateix amb l'hidroxil en C23. En el cas de l'èster no hi ha res que el mimetitzi i en el cas de l'amida la superposició és molt puntual i en l'extrem del diol. Per tant, la manca d'activitat en el RLIT pot ser deguda a: a) l'absència de funcionalitat equivalent a l'hidroxil en C23, b) la possibilitat que l'hidroxil en C22 actuï com a dador d'enllaç d'hidrogen amb la qual cosa el carbonil d'aquests anàlegs no seria capaç de mimetitzar-lo, i/o c) l'extrem alquílic de la cadena lateral és més curt de l'habitual.

Inicialment, a l'equip va considerar que el factor més important havia de ser l'absència de funcionalitat equivalent a l'hidroxil en C23. Per tant, els següents estudis han d'anar encaminats a la modelització d'estructures que siguin capaces de mimetitzar aquest hidroxil.

De les dos estructures, èster o amida, l'èster és la més adequada per treballar. D'una banda, perquè ofereix la possibilitat d'introduir un grup funcional en α de carbonil, de l'altra perquè l'enllaç entre el carbonil i el carboni en α no presenta restriccions de gir i en conseqüència la funcionalitat introduïda pot mimetitzar l'hidroxil en C23 de la bl.

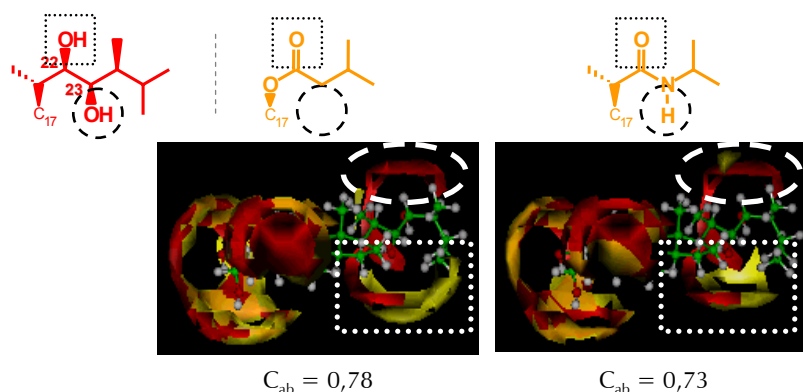


Figura 33: Superposició de mapes de GRID i valor de l'índex de similitud electrostàtica. Es remarca la zona d'interacció de l'hidroxil en C22 (quadrat) i la del l'hidroxil en C23 (elipse).

Les primeres propostes van ser: a) prenent com a referència la cadena lateral de **1**, afegir un hidroxil amb configuració *R* o *S* en α de carbonil, b) afegir una amina enloc de l'hidroxil i c) augmentar la longitud de la cadena lateral (Figura 34).¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ S'observa com els millors candidats són aquells on s'introdueix un grup funcional amb configuració *R* en α de carbonil. Introduir una amina enloc de l'hidroxil és factible i allargar la cadena lateral és recomanable.

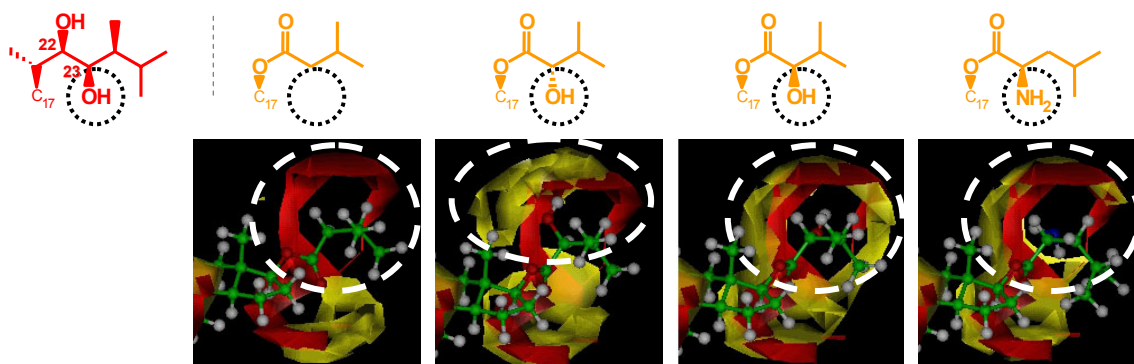


Figura 34: Superposició de mapes de GRID. Es remarca la zona de l'hidroxil en C23.

Aquest estudi preliminar, requereix d'un estudi exhaustiu en el qual també s'ampliarà el nombre d'anàlegs a estudiar. En aquesta ampliació es procura que les cadenes laterals proposades siguin àcids comercials.

La primera biblioteca virtual d'anàlegs BRs androstànics està formada per èsters obtinguts a partir de *D*- α -aminoàcids i els seus homòlegs α -hidroxiàcids (Figura 35). Els principals candidats són les cadenes laterals tipus *D*-valina, *D*-leucina, *D*-isoleucina i *D*-fenilalanina:

- La cadena tipus *D*-valina coincideix amb la cadena de l'anàleg **1** convenientment funcionalitzada. És més curta que la de la brassinolida ja que li falten els metils equivalents a 26 i 27, i per això la part alquíllica no té cap centre quiral.
- La cadena tipus *D*-leucina és llarga i només li falta el metil 28. Aquesta cadena és l'equivalent androstànic dels 28-norbrassinioesteroides.
- La cadena tipus *D*-isoleucina és una cadena llarga, presenta un centre quiral en 24 amb la configuració adequada i respecte la brassinolida només li falta el metil 26.
- La cadena tipus *D*-fenilalanina està en la línia de certs BRs descrits en la bibliografia, els quals presenten un anell benzènic en la cadena lateral.^{181,182}

En aquesta tesi les cadenes laterals dels anàlegs androstànics (Figura 35) s'anomenen prioritzant l'esquelet hidrocarbonat i deixant en un segon terme la funcionalitat polar en α de carbonil. La raó fonamental per fer-ho així és ressaltar la part hidrocarbonada de la cadena lateral i facilitar la seva comparació amb la brassinolida. Per tant, el nom de les cadenes laterals es compon segons: "Configuració del grup funcional en α de carbonil" + "Nom de l'aminoàcid que coincideix amb l'esquelet hidrocarbonat" + "Grup funcional en α de carbonil":

- Configuració del grup funcional en α de carbonil: Es fa d'acord amb la nomenclatura dels aminoàcids (*L* o *D*).
- Nom de l'aminoàcid que coincideix amb l'esquelet hidrocarbonat: es pot indicar tan sencer com abreviat.
- Grup funcional en α de carbonil: quan el grup funcional és una amina (NH_2) s'omet ja que és la funcionalitat pròpia dels aminoàcids.

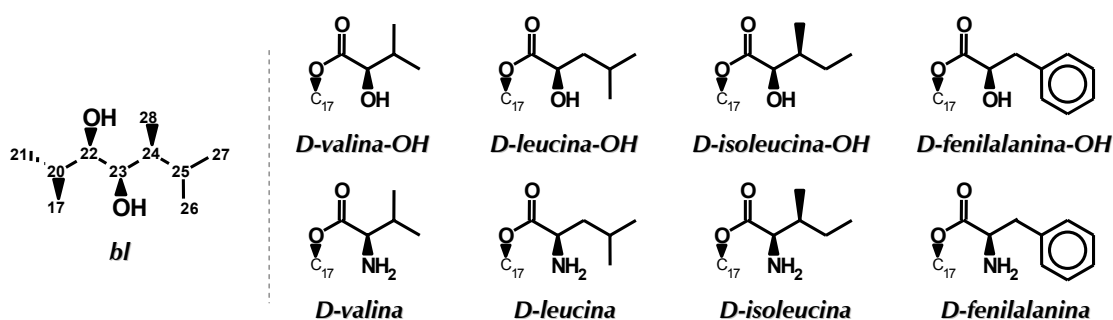


Figura 35: Cadenes laterals tipus dels anàlegs BRs androstànics i nomenclatura de les cadenes laterals.

A continuació es presenta l'anàlisi exhaustiu de les cadenes androstàniques. Cada part de l'estudi s'exemplifica amb la cadena lateral més rellevant.

2. Anàlisi conformacional.

Es realitza un anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular. Es realitza una simulació a temperatura ambient (298 K) i una altre a elevada temperatura (900 K) per tal de saltar barreres d'energia i garantir que s'ha explorat tot l'espai conformacional. L'anàlisi es centra en el subespai dels angles de torsió. En funció de la cadena hi haurà 4 o 5 angles de torsió. Aquests es defineixen progressivament començant des de l'esquelet esteroide per endinsar-se progressivament en la cadena lateral. La numeració de les cadenes d'androstà es realitza per equivalència amb la numeració de les cadenes dels BRs (Figura 36).

L'anàlisi conformacional es planteja en tres etapes: 1) simulació, 2) generació dels confòrmers i 3) anàlisi de components principals per estudiar les semblances i diferències entre els confòrmers.

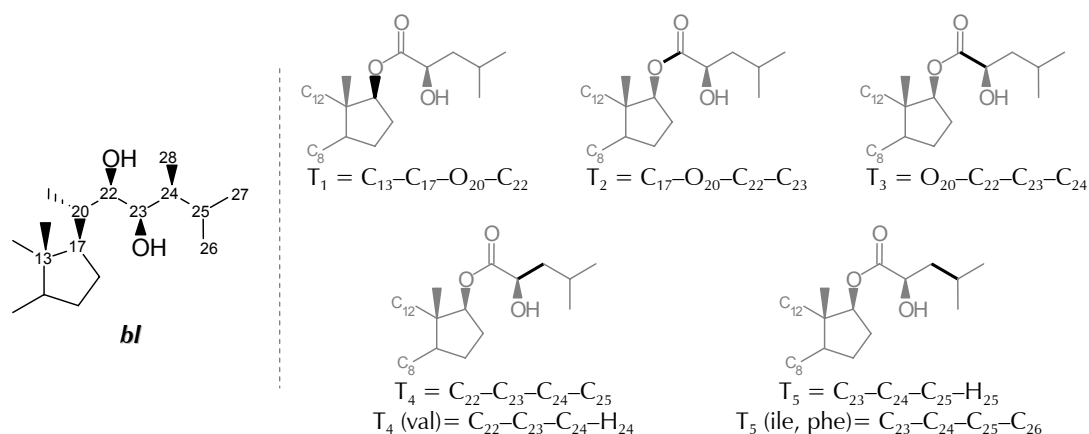


Figura 36: Definició dels angles de torsió de la cadena *D-leu*. $T_1 - T_3$ és comú a totes les cadenes. T_4 i T_5 varia en funció de la cadena lateral tipus.

2.1. Dinàmica molecular (DM): Simulació i anàlisi.

A mode d'exemple es mostren els resultats per la cadena androstànica tipus *D-valina-OH* a 298 K. Aquesta cadena lateral ha estat presa per l'equip com la cadena de referència en l'estudi dels androstans. En la *Figura 37* es mostra el gràfic de l'evolució dels angles en el temps i el gràfic de freqüències. Ambdós gràfics es complementen i permeten discutir: a) el nombre de valors que té cada angle de torsió, b) el seu valor aproximat, c) l'amplada respecte el valor aproximat i d) la facilitat de canviar d'un valor a l'altre. Amb els dos darrers punts es pot avaluar la flexibilitat de la cadena lateral i tenir una idea sobre les barreres d'energia potencial.

Les observacions més destacables per cada torsió són:

- T_1 : Presenta dos valors bastant propers entre si. Un cap a 200° i l'altre cap a 260° . La facilitat de passar d'un valor a l'altre és molt gran, primer per la proximitat i després perquè la barrera d'energia és d'unes 2 kcal/mol. Sembla que entre 75° i 90° vulgui aparèixer un tercer valor. Aquest situaria la cadena lateral cap a la cara β provocant un impediment estèric entre l'oxigen del carbonil i el metil C18.
- T_2 : Presenta el valor esperat de 180° . No obstant, aquest valor és poc robust ja que presenta una gran dispersió.
- T_3 : Presenta una gran flexibilitat on a priori tots els valors són possibles. En el gràfic de freqüències s'observen dos grans agrupacions en les quals és molt difícil estimar el valor més probable. Això és degut a que la superfície de potencial és molt plana i el valor exacte del mínim d'energia depèn enormement de la resta de torsions. És bastant fàcil passar d'una agrupació a l'altre ja que la barrera d'energia no és gaire gran.
- T_4 : Presenta els valors característics d'un enllaç Csp^3-Csp^3 on 180° és clarament el valor més freqüent.

La simulació a elevada temperatura (900 K) ha proporcionat resultats similars, el que indica que les barreres d'energia entre els confòrmers han de ser relativament baixes.

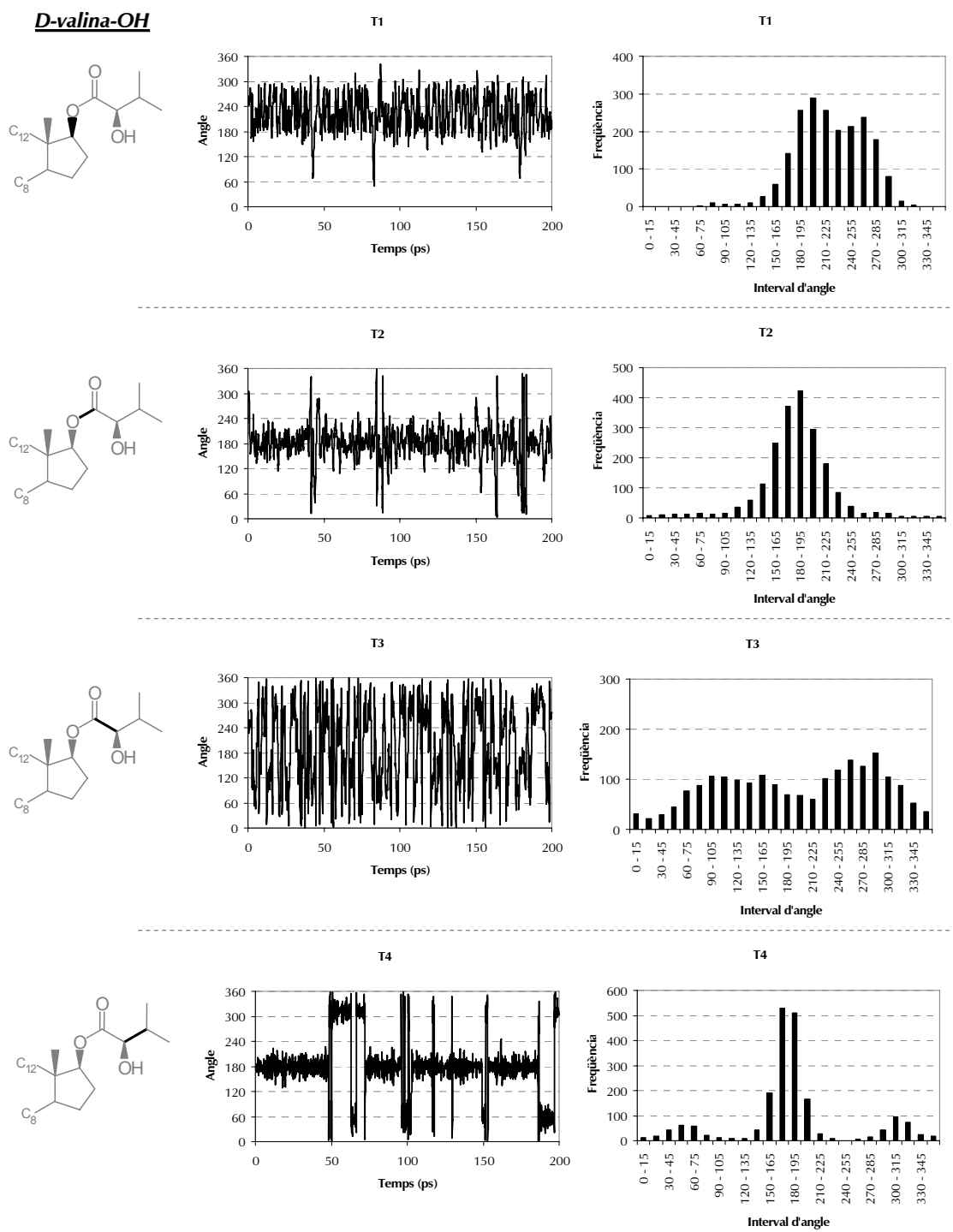


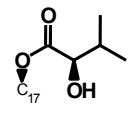
Figura 37: Resultats de la dinàmica molecular per la cadena androstatà tipus *D*-valina-OH. Gràfics de l'evolució dels angles en el temps i de freqüències.

El grup funcional (amina o hidroxil) no influeix en el resultat de la simulació. Totes dues simulacions coincideixen tan pel que fa als valors de les torsions com a la seva freqüència relativa. En la resta de cadenes laterals d'androstatà les simulacions donen resultats similars en $T_1 - T_3$ o equivalents en T_4 . A les cadenes de *D*-leucina i *D*-isoleucina T_5 presenta els valors característics d'un enllaç Csp^3-Csp^3 i a la cadena de *D*-fenilalanina presenta un únic valor cap a 80° amb una considerable dispersió.

2.2. Generació dels confòrmers.

A partir dels valors més estables de cada torsió es construeixen els confòrmers per combinació. El nombre final de confòrmers ve donat pel producte del nombre de valors que pot tenir cada torsió. Finalment, s'optimitza l'energia on s'assagen dos camps de forces diferents: TriposFF i MM94FF. Per comparar els confòrmers es contrasten els valors dels angles de torsió. Es considera que dos valors són iguals si difereixen en més/menys un angle determinat ($\pm 15^\circ$ per T_1 i T_3 , i $\pm 30^\circ$ per resta de torsions). Si dos confòrmers tenen tots els angles de torsió similars, dins dels marges establerts, es consideren confòrmers equivalents. A efectes pràctics, es selecciona el de menor energia relativa ($E - E_{\min}$) com el més representatiu. Els resultats es presenten ordenant els confòrmers segons els valors dels angles de torsió tenint en compte els valors observats en la dinàmica molecular. A les taules la separació entre confòrmers es realitza amb una ratlla negra a partir de la torsió en la qual són diferents. En alguns casos és complicat realitzar aquesta ordenació, o bé per la dificultat de la pròpia torsió, o bé perquè hi ha confòrmers que segons la DM haurien de ser iguals, però no ho són ja que no compleixen el criteri d'equivalència en alguna de les torsions. En el primer cas els confòrmers es separen amb una ralla puntejada. En el segon cas, s'indiquen els confòrmers en vermell i es marca en negreta la torsió que no ha complert amb el criteri d'equivalència.

A continuació es discuteixen els resultats de la cadena *D*-valina-OH, la simulació de la qual ha estat presentada en l'apartat anterior. En els gràfics de la simulació (Figura 37) s'observa com T_1 presenta dos valors al voltant de 200° i 260° , T_2 un únic valor a 180° , T_3 dos grans agrupacions amb uns valors centrals al voltant de 105° i 270° i T_4 amb els tres valors característics d'un enllaç Csp^3-Csp^3 (60° , 180° i 300°). Aquests són els valors inicials que es prenen per construir els confòrmers. La combinació d'aquests valors ha de donar 12 confòrmers. A la Taula 1 es mostren els confòrmers obtinguts després de minimitzar l'energia amb cadascun dels diferents camps de forces (TriposFF i MM94FF). En la taula es presenta: a) la numeració segons els valors dels angles de torsió, b) el valor dels angles de torsió, c) la diferència d'energia respecte el confòrmer de mínima energia per cadascun dels camps de forces i d) els confòrmers de cadascun dels anàlisi.



***D*-valina-OH**

Confòrmer segons els angles	T1	T2	T3	T4	E-E _{min} / MM94FF (kcal/mol)	E-E _{min} / Tripos-FF (kcal/mol)	Confòrmer	Confòrmer
							segons MM94FF	segons Tripos-FF
1	191	179	85	55	1,43	1,61	1	1
2	180	182	81	180	0,48	0,00	2	2
3	191	180	52	306	0,00	0,76	3	3
4	192	180	275	58	3,23		4	
5	181	180	302	65		1,20		4
6	194	179	263	178	2,49		5	
7	182	180	281	181		0,26		5
8	193	179	254	310	2,42		6	
9	182	181	276	306		1,22		6
10	267	179	87	56	2,05	3,12	7	7
11	267	179	77	174	1,27	1,80	8	8
12	266	178	52	306	0,63		9	
13	281	173	64	306		2,27		9
14	279	179	287	54	3,31	2,41	10	10
15	262	183	249	176	3,11		11	
16	279	186	284	187		2,29		11
17	269	178	214	309	2,12		12	
18	281	177	290	319		2,69		12

Taula 1: Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular per la cadena de *D*-valina-OH. Taula dels confòrmers segons el camp de forces.

S'obtenen 18 confòrmers que es corresponen amb els 12 esperats inicialment, si bé que 6 d'ells (indicats en vermell) s'han desdoblats ja que els valors de T_1 i/o T_3 difereixen més de 15° segons el camp de forces (angles en negreta). Especialment significatiu és el cas de 17 i 18 on la diferència en T_3 és de 74° . Destacar que en la majoria de casos (5 de 6) T_3 és

superior a 180° . També s'observa una gran dependència del valor de T_3 en funció dels valors de T_4 . Generalment, a mesura que T_4 passa de 60° a 180° i a 300° , T_3 disminueix observant-se diferències de fins a 35° amb MM94FF i 50° amb TriposFF.

A la Figura 38 es mostra la situació dins del gràfic de freqüències de la dinàmica molecular dels valors de T_3 un cop optimitzats. En la primera agrupació (entre 30° i 195°) els valors optimitzats s'acumulen al principi de l'agrupació (entre 45° i 90°). Això contrasta amb l'elevada dispersió trobada en la dinàmica molecular. En la segona agrupació (entre 225° i 330°) els resultats depenen del camp de forces. Mentre que amb MM94FF els valors optimitzats es distribueixen a llarg de tota l'agrupació, amb TriposFF es concentren en la zona central. En aquest sub-espai conformacional, cada camp de forces justificaria la dispersió dels resultats d'una manera diferent:

- MM94FF la justificaria degut a la presència de molts mínims locals molt diferents entre si, el valor exacte dels quals depèn de la resta de torsions.
- TriposFF la justificaria degut a la presència d'una superfície de potencial molt plana al voltant d'un mínim bastant ben localitzat en la zona central de l'agrupació.

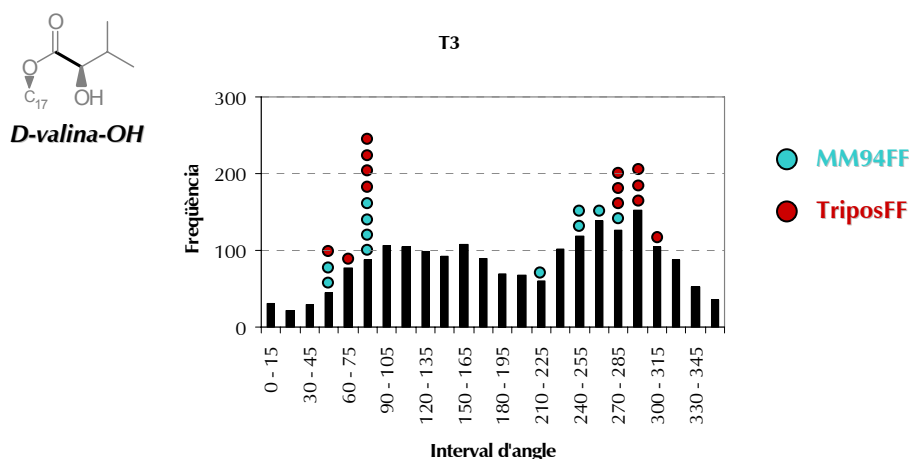
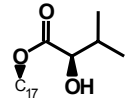


Figura 38: Posició dels valors optimitzats de T_3 dins del gràfic de freqüències de la dinàmica molecular.

Es decideix generar una nova tanda de confòrmers assignant inicialment 4 valors a T_3 , dos per cada agrupació, un al principi i l'altre al final. L'objectiu és acabar de determinar la influència del camp de forces i abastar més espai de T_3 . Per tant, es tornen a generar els confòrmers mantenint els valors inicials de T_1 , T_2 i T_4 i assignant a T_3 els valors inicials de 95° i 165° per la primera agrupació i de 260° i 300° per la segona. La combinació d'aquests valors ha de donar 24 confòrmers (Taula 2).

Amb el camp de forces MM94FF s'obtenen els mateixos 12 confòrmers de la Taula 1. En T_3 els dos valors donats inicialment per cada agrupació convergeixen en un únic valor donant lloc a confòrmers repetits. Aquest fet indica que MM94FF és un camp de forces robust.

Amb el camp de forces TriposFF els resultats depenen de l'agrupació. En la segona agrupació (entre 225° i 330°) els dos valors inicials convergeixen en un únic valor donant confòrmers repetits. En canvi, en la primera agrupació (entre 30° i 195°) els dos valors inicials donen lloc a confòrmers diferents. Al final s'obtenen 6 nous confòrmers (indicats en vermell), els quals tenen en general una energia superior a la resta.



Conformer segons els angles	T1	T2	T3	T4	E-Emin / MM94FF (kcal/mol)		E-Emin / Tripos-FF (kcal/mol)		Conformer segons MM94FF	Conformer segons Tripos-FF
1	191	179	85	55	1,43	1,65			1 i 4	1
2	181	182	81	180	0,48	0,00			2 i 5	2
3	191	180	52	306	0,00	0,86			3 i 6	3
4	180	184	143	60		2,00				4
5	181	182	178	181		1,96				5
6	181	181	192	310		2,05				6
7	192	180	275	58	3,23				7 i 10	
8	194	179	263	178	2,49				8 i 11	
9	193	179	254	310	2,42				9 i 12	
10	181	180	302	65		1,10				7 i 10
11	182	180	281	180		0,43				8 i 11
12	182	180	275	305		1,56				9 i 12
13	267	179	87	56	2,05	2,97			13 i 16	13
14	267	179	77	174	1,27	1,68			14 i 17	14
15	266	178	52	306	0,63				15 i 18	
16	281	173	64	305		2,31				15
17	281	172	158	56		3,05				16
18	282	171	188	179		2,67				17
19	282	172	193	310		2,52				18
20	279	179	287	54	3,31	2,55			19 i 22	19 i 22
21	262	183	249	176	3,11				20 i 23	
23	269	178	214	309	2,12				21 i 24	
22	279	186	284	187		2,31				20 i 23
24	281	177	290	319		2,67				21 i 24

Taula 2: Conformers generats per la cadena de D-valina-OH assignant inicialment 4 valors a T₃.

A la Figura 39 es mostra novament, la situació dins del gràfic de freqüències de la dinàmica molecular dels nous valors de T₃ un cop optimitzats. Els 6 nous conformers trobats exclusivament amb TriposFF es distribueixen al final de la primera agrupació (entre 135° i 195°). Per tant, aquest camp de forces justificaria la dispersió de resultats de la dinàmica molecular en aquest sub-espai conformacional argumentant la presència de dos mínims d'energia amb superfícies de potencial molt planes i barreres d'energia molt baixes.

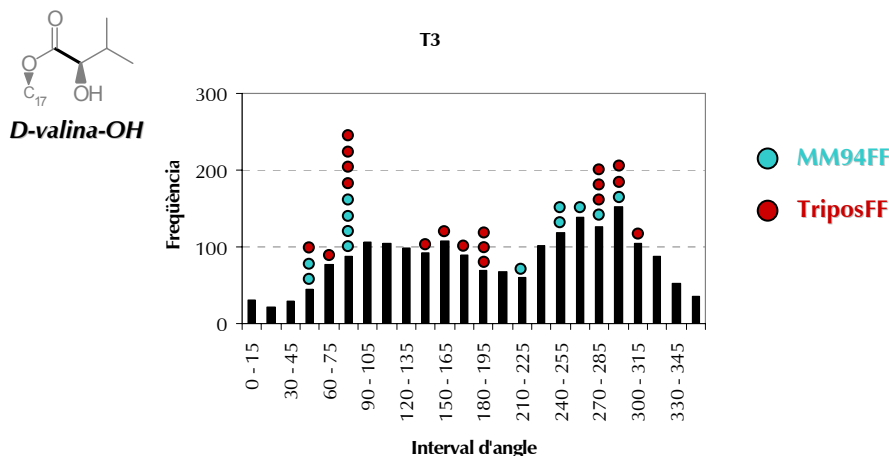
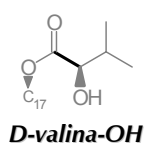


Figura 39: Posició dels valors optimitzats de T₃ de la segona tanda de conformers dins del gràfic de freqüències de la DM.

Com les incoherències entre els camps de forces persisteixen es decideix fer un anàlisi conformacional exhaustiu de T₃. Per cadascuna de les combinacions de T₁, T₂ i T₄ s'analitzen els valors de T₃ i la seva energia, fent un gir complet amb un pas d'angle de 30° (Figura 40). El resultat depèn del camp de forces. Amb el camp de forces MM94FF, tant els valors de T₃ com els d'energia estan ben definits. En canvi, amb el camp de forces TriposFF es té una gran dispersió tan en els valors optimitzats de T₃ com en l'energia. Això reafirma que el camp de forces MM94FF és més robust.



● MM94FF

● TriposFF

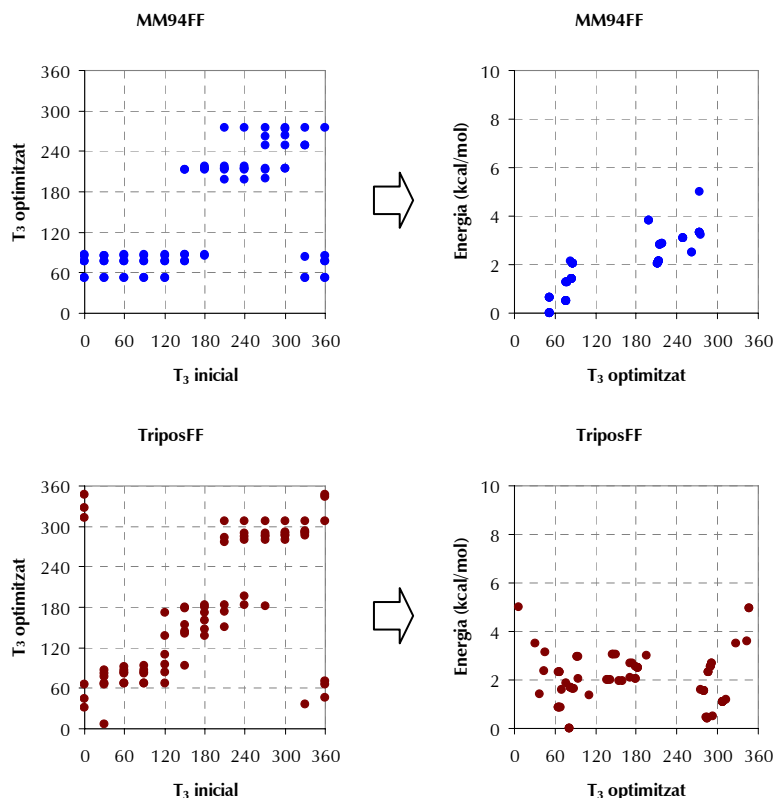


Figura 40: Anàlisi conformacional exhaustiu de T_3 en la cadena *D*-valina-OH. Gràfic dels valors de T_3 optimitzats en funció dels valors inicials i gràfic d'energia dels valors optimitzats.

Malgrat que a primer cop d'ull els resultats semblen diferents, hi ha certes similituds:

- Tots dos camps de forces concentren els valors optimitzats en tres nivells, i s'aprecia certa simetria en ells. Amb el camp de forces MM94FF els tres nivells es troben cap a 75° , 210° i 270° . Amb el camp de forces TriposFF els tres nivells es troben cap a 90° , 150° i 285° , els quals també poden expressar-se com -75° , -210° i -270° .
- S'aprecia certa simetria tan en la forma com en la posició relativa de cadascun dels nivells. De fet, si un dels gràfics es gira 180° i es superposen, gairebé s'està davant del mateix gràfic (Figura 41).

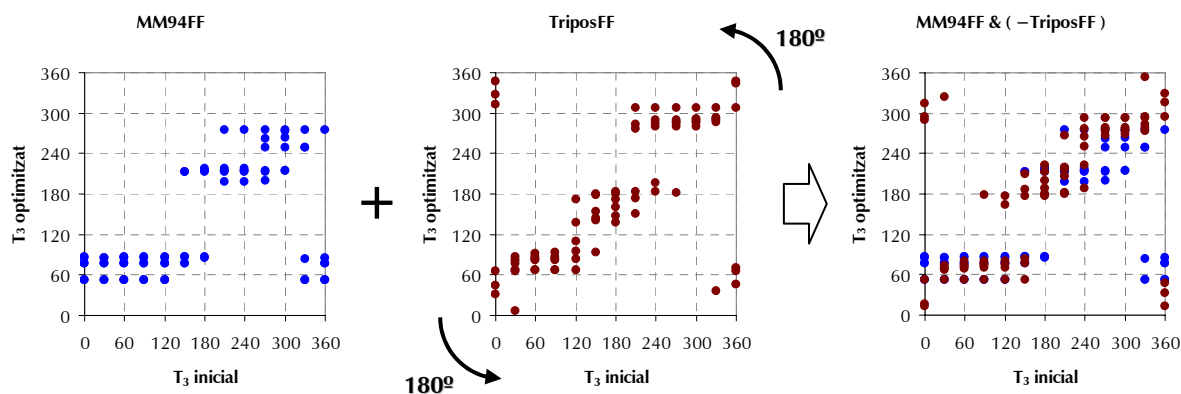


Figura 41: Gir i superposició dels gràfics de l'anàlisi conformacional exhaustiu de T_3 en la cadena *D*-valina-OH.

Es sospita que la diferència de resultats es deu a que mentre un camp de forces ha definit el gir de T_3 en sentit horari, l'altre ho ha fet en sentit antihorari. Concretament, es creu que és el camp MM94FF el responsable de tots aquests maldecaps. A la *Figura 42* s'observa que si es corregeix el sentit de gir del camp MM94FF, els valors optimitzats de T_3 expliquen bastant bé la distribució de freqüències de la dinàmica molecular. No obstant, hi ha un parell de contradiccions:

1. El canvi en el sentit de gir de T_3 no queda reflectit en els gràfics d'energia (*Figura 40*). Aquests haurien de ser imatge especular, i no ho són.
2. No s'observa cap canvi en el sentit de gir de T_1 . Tots dos camps de forces donen els mateixos resultats. Per tant, el canvi en el sentit de gir només afectaria a T_3 .

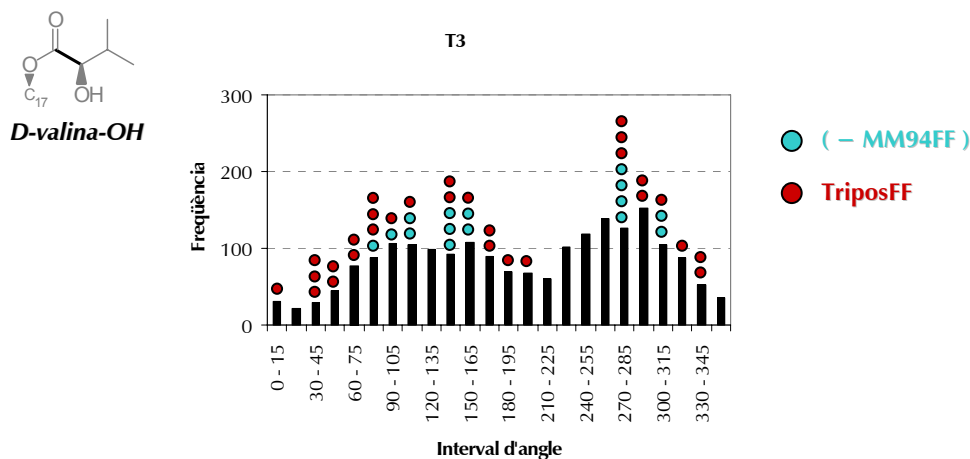


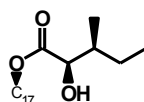
Figura 42: Posició dels valors optimitzats de T_3 de l'anàlisi sistemàtic dins del gràfic de freqüències de la DM.

En la resta de cadenes laterals d'androstà, la generació dels confòrmers presenta els mateixos problemes. L'anàlisi de T_3 és complexa degut a la seva elevada flexibilitat, i a la dependència del valor exacte de T_3 amb els valors de T_4 i amb el camp de forces.

2.3. Anàlisi de Components Principals (PCA).

Independentment del valor exacte de T_3 i de si el sentit de gir és horari o antihorari, l'important és l'estructura tridimensional dels confòrmers, així com les semblances i diferències entre ells. Per això, es realitza un anàlisi de components principals sobre els camps d'interacció molecular de GRID. Per fer aquest anàlisi els confòrmers s'alineen segons els anells C i D de l'esquelet esteroide.

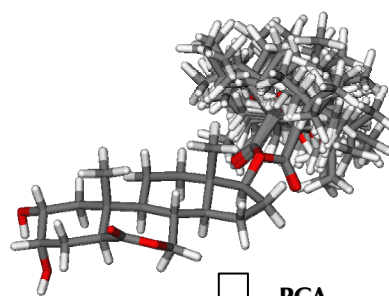
La discussió del PCA permet treure més conclusions si es fa sobre un anàleg androscànic de cadena lateral llarga. Per això, i a mode d'exemple, es mostren els resultats per la cadena *D*-isoleucina-OH enlloc de per la cadena de referència (*D*-valina-OH). Els tres primers components principals expliquen amb un 62% de la variància les principals diferències entre els confòrmers de la cadena *D*-isoleucina-OH. Aquests s'agrupen en 4 classes segons els valors de T_1 i T_3 (*Figura 43*).



D-isoleucina-OH

Confórmer segons els angles	T1	T2	T3	T4	T5	E-Emin (kcal/mol)
1	193	179	67	47	61	1,36
2	191	181	75	56	172	0,42
3	192	179	72	68	286	2,53
4	191	180	53	185	62	0,00
5	191	180	53	189	172	0,09
6	191	181	67	200	297	1,63
7	192	176	109	272	65	5,08
8	190	179	88	296	180	1,94
9	191	179	86	297	299	1,40
10	195	178	253	52	63	3,44
11	194	178	262	61	172	2,47
12	194	180	255	65	276	4,55
13	193	179	253	188	62	2,54
14	193	179	252	193	172	2,56
15	193	179	257	203	297	3,80
16	195	179	283	301	92	5,46
17	193	180	278	299	177	3,64
18	193	180	275	303	300	3,47
19	266	178	58	45	60	1,98
20	267	179	76	57	172	1,25
21	266	179	71	63	280	3,37
22	266	178	53	184	62	0,63
23	266	179	53	189	172	0,73
24	267	179	68	200	297	2,23
25	267	179	90	299	95	4,42
26	267	179	90	298	180	2,59
27	267	179	87	299	300	2,13
28	270	182	217	52	64	3,52
29	262	182	249	60	171	3,00
30	267	184	210	75	298	4,99
31	269	178	215	188	63	2,22
32	269	178	214	193	172	2,22
33	269	177	213	201	297	3,64
34	265	185	296	275	63	7,54
35	267	180	289	299	174	5,34
36	268	177	260	302	302	4,46

3D



PCA

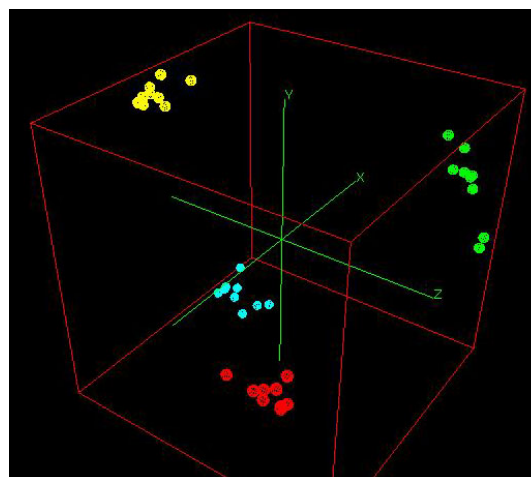


Figura 43: Confòrmers de la cadena de *D*-isoleucina-OH: Taula, estructura tridimensional i situació dins dels tres primers components principals del gràfic d'objectes. Coloració segons la classe.

El primer component principal explica la diferència entre els confòrmers on la zona d'interacció de l'hidroxil es troba el més allunyada possible de la zona d'interacció del carbonil. Els coeficients positius (en vermell) es corresponen amb les zones d'interacció dels confòrmers de la classe *vermella* i els negatius (en blau) amb les de la classe *blava* (Figura 44a).

El segon component principal explica la diferència entre els confòrmers on la zona d'interacció de l'hidroxil està adjacent a la zona d'interacció del carbonil. Els coeficients positius (en groc) es corresponen amb les zones d'interacció dels confòrmers de la classe *groc* i els negatius (en verd) amb les de la classe *verda* (Figura 44b).

El tercer component principal explica la diferència entre els confòrmers segons la zona d'interacció de l'hidroxil estigui orientada cap a la cara α o la cara β . Els coeficients positius (en vermell) es corresponen amb l'hidroxil dels confòrmers de les classes *vermella* i *verda*, i els negatius (en groc) amb les de les classes *groc* i *blava* (Figura 44c).

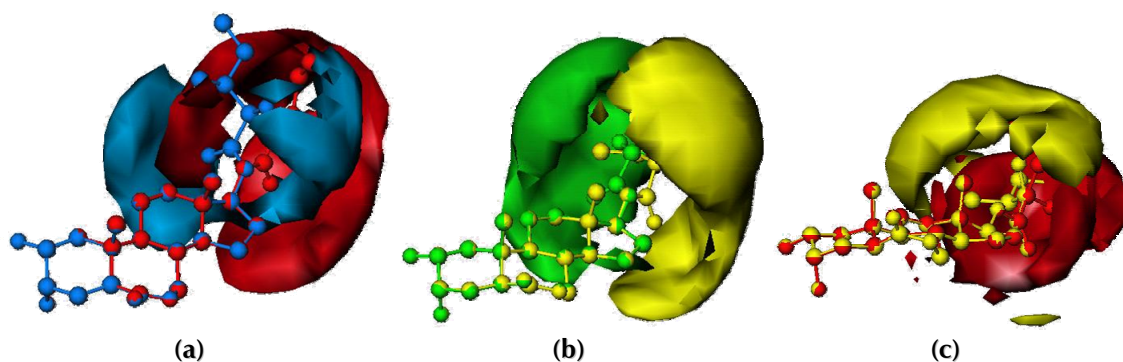


Figura 44: Gràfics de coeficients del **a)** primer, **b)** segon i **c)** tercer components principals. La coloració es correspon amb les característiques estructurals de la classe que explica.

En la resta de cadenes laterals androscàniques s'obtenen idèntics resultats. Els confòrmers sempre s'agrupen en quatre classes segons els valors de T_1 i T_3 .

3. Conformació activa i predicció de l'activitat.

El criteri de selecció de la conformació activa es basa en l'aproximació a l'anàleg actiu (AAA). Es comparen tots els confòrmers amb la conformació activa de la brassinolida i es selecciona el més similar. Quan més similar sigui el confòrmer a la conformació activa de la brassinolida, més actiu serà. Per tant, s'utilitza com a criteri de selecció l'activitat predita pel model QSAR. Fer servir el model comporta un gran avantatge ja que la comparació es fa amb tots els BRs del model i no amb un únic compost.

Per cada cadena lateral tipus, es seleccionen els confòrmers més actius dins d'un marge definit per l'error experimental del model ($\pm 0,56$). En totes les cadenes laterals, s'obté que els confòrmers seleccionats pertanyen al grup amb T_1 al voltant de 190° i T_3 entre 50° i 100° (grup vermell).

Igual que en el sub-apartat anterior, la discussió dels resultats resulta més interessant si es fa sobre un anàleg androscànic de cadena lateral llarga. Per això, es mostren a mode d'exemple, els resultats per la cadena *D*-isoleucina-OH, els grups de confòrmers de la qual han estat discutits en el sub-apartat anterior. La *Figura 45* mostra l'activitat predita dels 36 confòrmers. S'observa com l'activitat predita presenta diferents nivells d'acord amb els grups de confòrmers descrits en el PCA. Els confòrmers més actius corresponen al grup vermell que té T_1 al voltant de 190° i T_3 entre 50° i 100° .

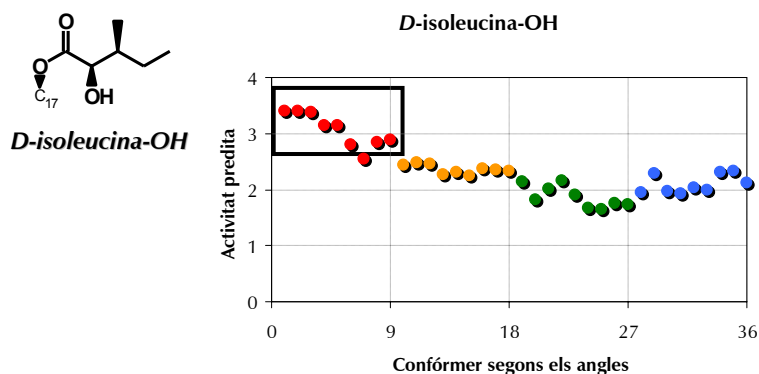


Figura 45: Activitat predita dels confòrmers de la cadena *D*-isoleucina-OH: Coloració segons el grup descrit en el PCA i selecció dels més actius.

L'activitat predita com a criteri de selecció és capaç de fixar els tres primers angles de torsió, però no és capaç de discriminar l'extrem final de la cadena lateral. A partir de T₄ es té una estructura hidrocarbonada, sense grups funcionals. Per tant, es decideix utilitzar el volum com a criteri de selecció i es selecciona el conformat que presenta un major índex de similitud de forma de Carbó amb la conformació activa de la brassinolida. Els resultats finals per cadascuna de les cadenes laterals es mostra en la *Figura 46*. Cal remarcar que els resultats són independents del grup funcional ja que no hi ha diferències entre els anàlegs amb hidroxil o amina.

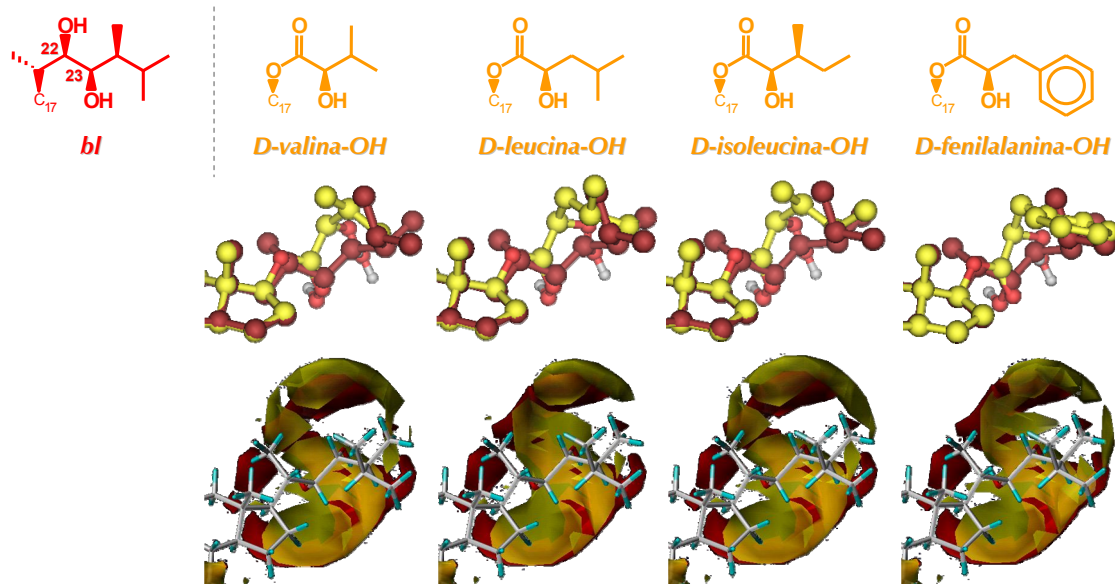


Figura 46: Resultats de la selecció de la conformació activa. Superposició amb la brassinolida de les cadenes laterals i dels mapes de GRID.

En general, l'activitat predita dels confòrmers seleccionats oscil·la al voltant de 3. Aquest valor els situaria dins de l'escala d'activitats dels BRs entre el tercer (la homobrassinolida (hbl) amb 3,27) i el cinquè (la epibrassinolida (epibl) amb 2,69) més actius. A priori, es considera que aquest valor està sobreestimat. La causa estaria en que l'esquelet esteroide és el millor possible (diol 2 α ,3 α en l'anell A i funcionalitat lactona en l'anell B) i per això la seva contribució a l'activitat és la màxima possible.

4. Conclusions.

Una característica dels anàlegs androstànics és l'elevada flexibilitat de la cadena lateral, la qual cosa dificulta l'estudi computacional. S'estima que la superfície de potencial és molt plana i les barreres d'energia no són gaire grans. A més a més, hi ha una gran dependència de la posició exacte dels mínims locals d'energia en funció dels valors de les torsions.

Malgrat les dificultats de l'estudi, es pot afirmar que els anàlegs androstànics esterificats amb D- α -aminoàcids o els seus homòlegs α -hidroxiaïcids són computacionalment bon candidats per presentar activitat brassinoesteroide.

PART II: Androstans Protegits.

1. Introducció.

A partir de la conclusió de l'estudi computacional dels anàlegs BRs androstànics, es va decidir abordar la seva síntesi. Una part s'ha realitzat al Laboratori d'Esteroides de l'IQS,^{85,183-185} i una altra part al Laboratori de "Steroids Chemistry" en el "Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Science" de la República Txeca.^{186,187} Al laboratori d'esteroides es van sintetitzar els anàlegs androstànics amb cadena de *D*-valina-OH i *D*-fenilalanina, i a la República Txeca els anàlegs amb cadena *D*-leucina, *D,L*-norvalina, *D,L*-alanina i glicina (Figura 47).

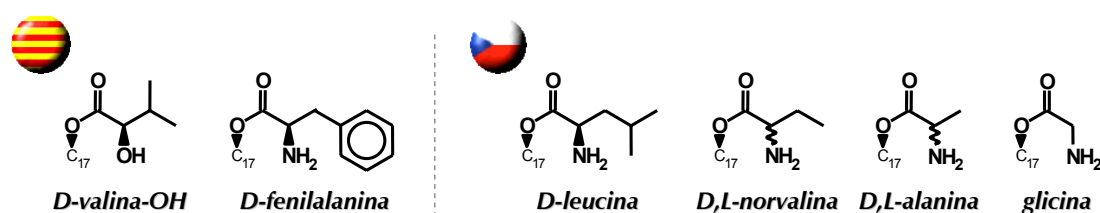


Figura 47: Cadenes laterals d'androstà sintetitzades a Barcelona i a Praga.

1.1. Síntesi d'anàlegs BRs amb cadena lateral d'androstà.

S'han desenvolupat dos estratègies diferents les quals es diferencien en l'ordre dels passos sintètics (Figura 48).⁸⁵ Les dos parteixen de la hidroxienona **3** com a sintó de partida. La seva síntesi ha estat àmpliament estudiada pel grup del L. Kohout i actualment s'arriba a produir a gran escala.¹⁸⁸

En la primera estratègia, primer s'uneix la cadena lateral i després es funcionalitzen els anells A i B. Això permet obtenir anàlegs androstànics amb modificacions estructurals en els anells A i B de forma similar al que es fa en la síntesi de BRs. El principal inconvenient es troba en l'obtenció de l'anàleg 2 α ,3 α . En el cas dels BRs, la dihidroxilació del doble enllaç de l'anell A dona majoritàriament l'isòmer 2 α ,3 α , però en el cas dels anàlegs androstànics dona una barreja dels isòmers 2 α ,3 α i 2 β 3 β molt difícil de separar. Finalment i després de molt esforç s'arriba a una puresa màxima de l'isòmer 2 α ,3 α del 90%.

En la segona estratègia, primer es funcionalitzen els anells A i/o B i després s'uneix la cadena lateral. Això permet obtenir una gran varietat d'anàlegs amb diferents cadenes laterals. Tot i que la dihidroxilació presenta els mateixos problemes, es dona en el primer pas de síntesi i un cop fixades les condicions de purificació, no cal modificar-les en funció de la cadena lateral. El principal inconvenient és que cal realitzar més etapes sintètiques corresponents a la protecció i desprotecció del diol de l'anell A.

En la etapa d'ancoratge de la cadena lateral és necessari que l'hidroxil o l'amina de la cadena lateral estiguin protegits per evitar dimeritzacions. Això comporta dos etapes de síntesi: protecció i desprotecció. Les condicions de la desprotecció han de ser molt suaus per a que no s'hidrolitzi l'èster de la cadena lateral.

En el cas de l'hidroxil la protecció es fa en forma d'acetat. Per cada cadena lateral cal trobar les condicions òptimes de desprotecció en les quals s'obtingui el producte d'interès amb un rendiment acceptable, alhora que es minimitza la hidròlisi de la cadena lateral.

En el cas de l'amina la protecció es fa amb *t*-butoxicarbonil (BOC) ja que l'aminoàcid protegit és comercial. La desprotecció amb àcid trifluoroacètic dóna amb molta facilitat sals de trifluoroacetat les quals són molt estables.

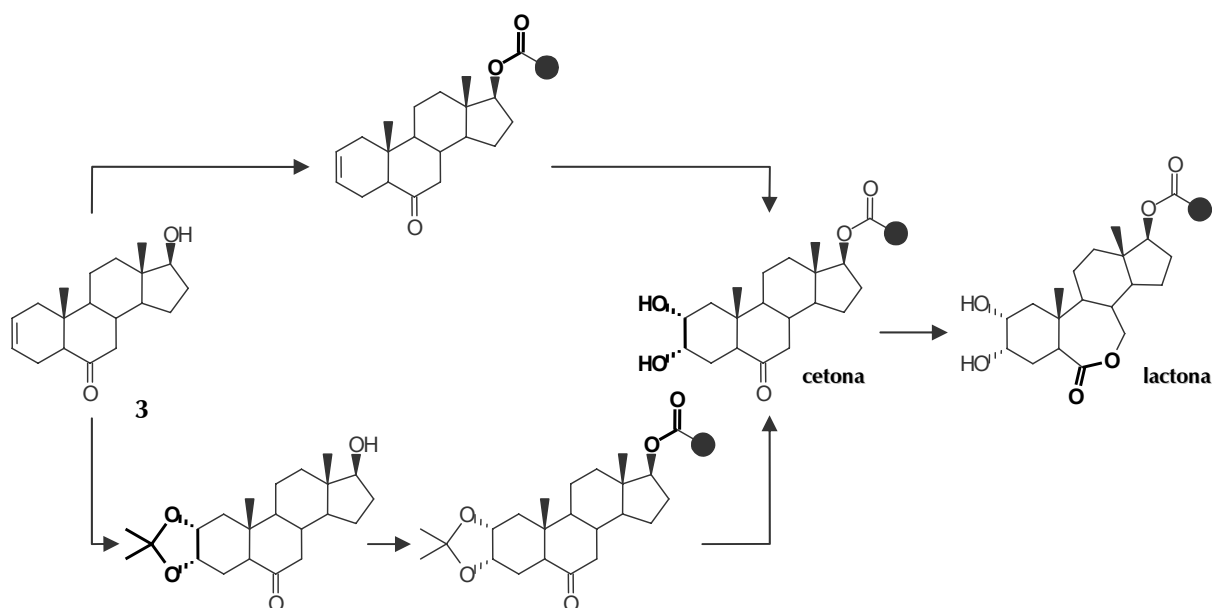


Figura 48: Estratègies generals de la síntesi d'anàlegs d'androstà.

1.2. Activitat dels anàlegs BRs amb cadena lateral d'androstà.

S'ha avaluat l'activitat dels anàlegs androstànics sintetitzats a través de la resposta a 1 µg/planta* en el test d'inclinació de la làmina d'arròs (RLIT).^{85,189} En el bioassaig s'han aplicat tan els anàlegs amb el grup funcional protegit, com amb el grup funcional lliure (Figura 49). S'observa:

- Els anàlegs amb l'hidroxil protegit segueixen la mateixa tendència que amb l'hidroxil lliure. Les lactones de l'anàleg amb l'esquelet hidrocarbonat de la valina poden considerar-se com moderadament actives, ja que han donat una resposta intermedia-alta. Les corresponents cetones presenten una resposta intermedia-baixa.
- En canvi, els anàlegs amb l'amina protegida no segueixen la mateixa tendència que amb l'amina lliures. Mentre que els tres anàlegs amb l'amina lliure han donat una resposta marginal i se'ls considera inactius, tres de les cinc cetones amb l'amina protegida amb BOC poden considerar-se actives o moderadament actives ja que han donat una resposta alta (*D*-leucina-BOC i *D,L*-norvalina-BOC) o intermedia-alta (*D*-fenilalanina-BOC). Els tres anàlegs actius corresponen a cadenes laterals de longitud intermèdia o llarga, mentre que els inactius corresponen a cadenes curtes.
- Destacar que en la cadena de *D*-fenilalanina-BOC la funcionalitat lactona presenta una resposta menor que la funcionalitat cetona. Això és contrari a la tendència natural dels BRs.

* Pel que fa als anàlegs amb un 90% de puresa, cal assumir que la impuresa no té cap efecte. Llavors, la dosi efectiva és de 0,9 µg/planta. Quan la diferència entre 1 µg/planta i 0,9 µg/planta es trasllada a l'escala logarítmica, resulta irrellevant (veure capítol d'activitat, pàgina 213).



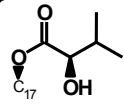
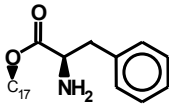
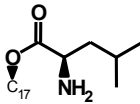
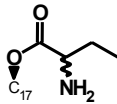
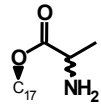
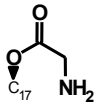
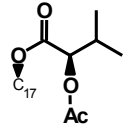
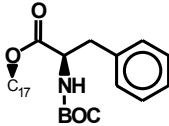
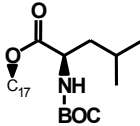
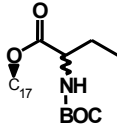
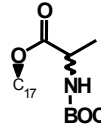
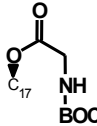
							
							
		<i>D-valina-OH</i>	<i>D-fenilalanina</i>	<i>D-leucina</i>	<i>D,L-norvalina</i>	<i>D,L-alanina</i>	<i>glicina</i>
	Cetona						
Anell/B	30°	-		5°	3°	-	-
	Lactona						
	65°	-		4°	-	-	-
							
		<i>D-valina-OAc</i>	<i>D-fenilalanina-BOC</i>	<i>D-leucina-BOC</i>	<i>D,L-norvalina-BOC</i>	<i>D,L-alanina-BOC</i>	<i>glicina-BOC</i>
	Cetona						
Anell/B	36°	75°		97°	100°	19°	6°
	Lactona						
	68°	33°		-	-	-	-

Figura 49: Resposta a 1 µg/planta dels anèlegs d'androstà sintetitzats. Els anèlegs en negreta s'han considerat actius o moderadament actius. Els anèlegs amb un guió no han estat sintetitzats.

La diferència en el nombre d'anèlegs sintetitzats amb l'amina lliure i l'amina protegida posa de manifest la dificultat de la desprotecció. Això provoca una manca de compostos que fa que les observacions anteriors no siguin sistematitzables i s'hagin de considerar només a nivell individual. No obstant, entre aquestes observacions la més rellevant és que quatre anèlegs amb la funcionalitat protegida han donat actius o moderadament actius.

Es proposa realitzar estudis computacionals per veure si és possible explicar el seu comportament.

2. Anàlisi conformacional.

L'hidroxil protegit com acetat presenta dos nous angles de torsió i les amines amb BOC quatre. Aquests es defineixen progressivament començant des de C22 per endinsar-se progressivament en el grup protector (*Figura 50*). La numeració es fa amb lletres.

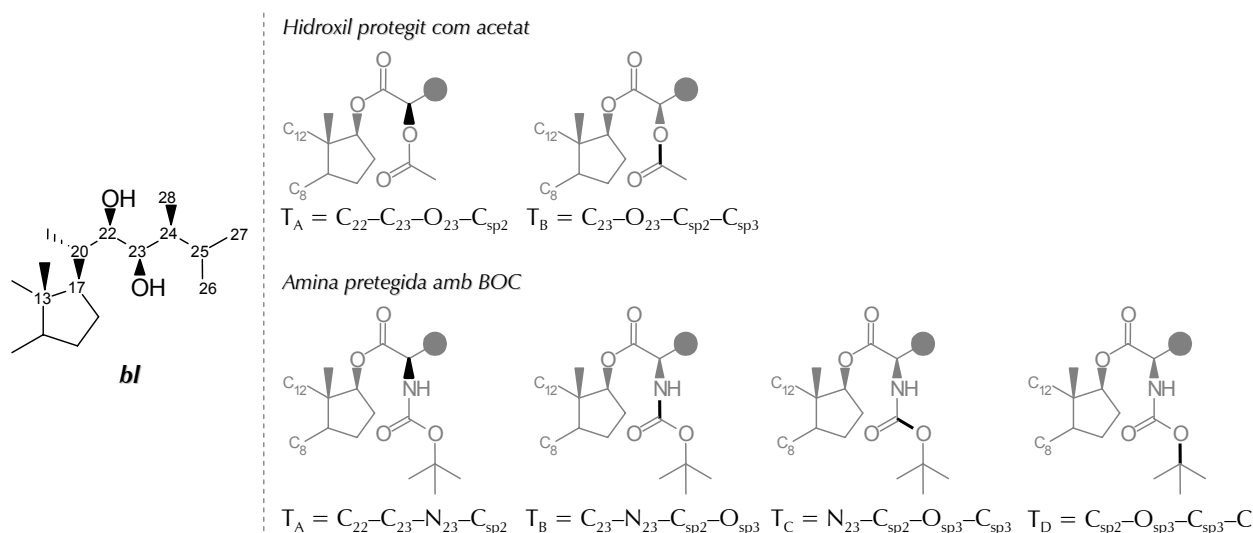


Figura 50: Definició dels nous angles de torsió de les cadenes protegides.

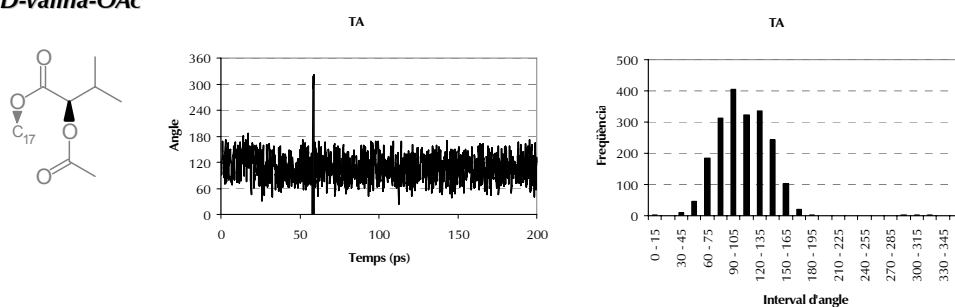
2.1. Dinàmica molecular (DM).

Es realitza una simulació a temperatura ambient (298 K). Novament, l'anàlisi es centra en el subespai dels angles de torsió.

Per il·lustrar la simulació de l'hidroxil protegit amb acetat es mostren els resultats per la cadena androstànica tipus *D*-valina-OAc. En la *Figura 51* es mostra el gràfic de l'evolució dels angles en el temps i el gràfic de freqüències dels nous angles. Les observacions més destacables per cada torsió són:

- T_A : Presenta una gran agrupació entre 45° i 165° . Amb els gràfic de freqüències no queda clar si hi ha un únic mínim d'energia amb una gran dispersió, o dos mínims molt propers entre si. Sembla que cap a 300° vulgui aparèixer un altre valor. Com es veurà tot seguit en les amines protegides amb BOC aquest valor apareixerà clarament definit.
- T_B : Presenta el valor esperat de 180° . La seva dispersió és menor que la de T_2 .

D-valina-OAc



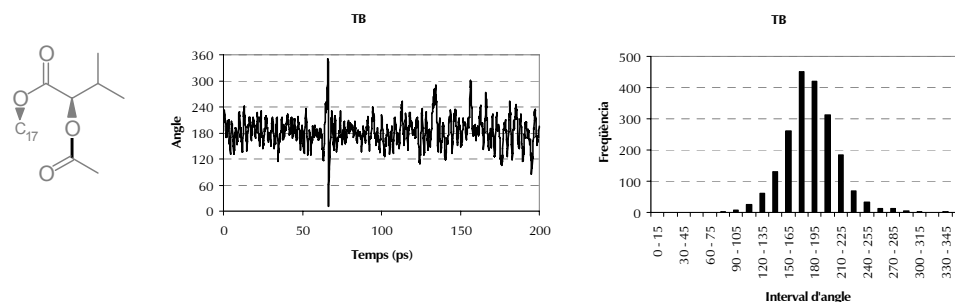


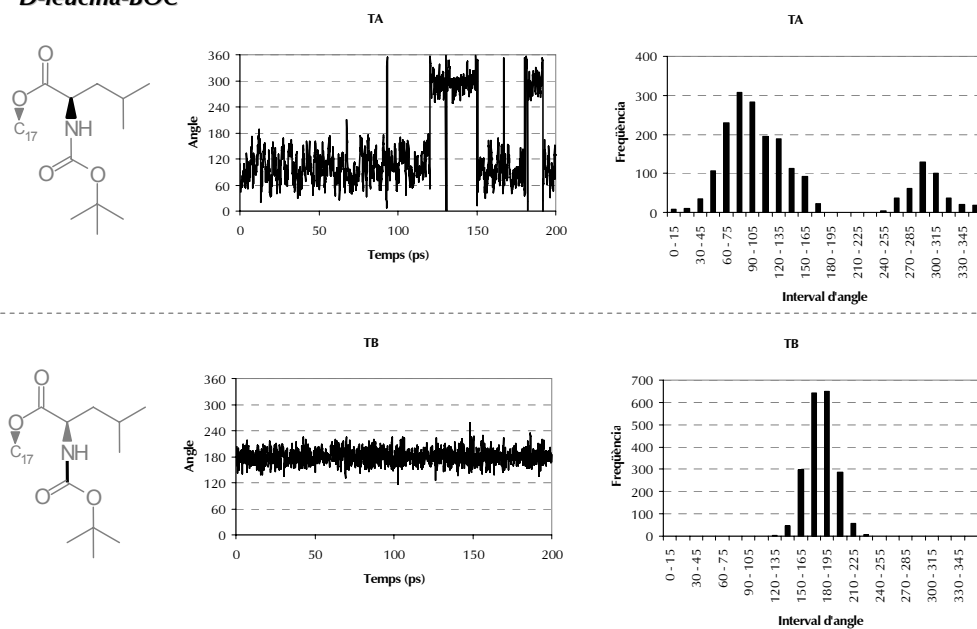
Figura 51: Resultats de la dinàmica molecular per la cadena androstatàica tipus *D*-valina-OAc. Gràfics de l'evolució dels angles en el temps i de freqüències.

Per il·lustrar la simulació de l'amina protegida amb BOC es mostren els resultats per la cadena androstatàica tipus *D*-leucina-BOC a 298 K. En la *Figura 52* es mostra el gràfic de l'evolució dels angles en el temps i el gràfic de freqüències dels angles corresponents al BOC. Les observacions més destacables per cada torsió són:

- T_A : Presenta dos agrupacions. La primera entre 45° i 165° , és similar a l'hidroxil protegit com acetat. La segona entre 270° i 315° , presenta una freqüència inferior a la primera.
- T_B : Presenta una configuració *trans* (180°) que no evoluciona cap a la *cis* (0°).
- T_C : Presenta el valor esperat al voltant de 180° .
- T_D : Presenta els tres valors característics d'un l'enllaç Csp^3-Csp^3 , els quals són intrascendents degut a la simetria del tercbutil.

Segons aquestes observacions, es pot concloure que el grup BOC és un grup voluminós i bastant rígid, l'orientació del qual depèn exclusivament del valor de T_A .

***D*-leucina-BOC**



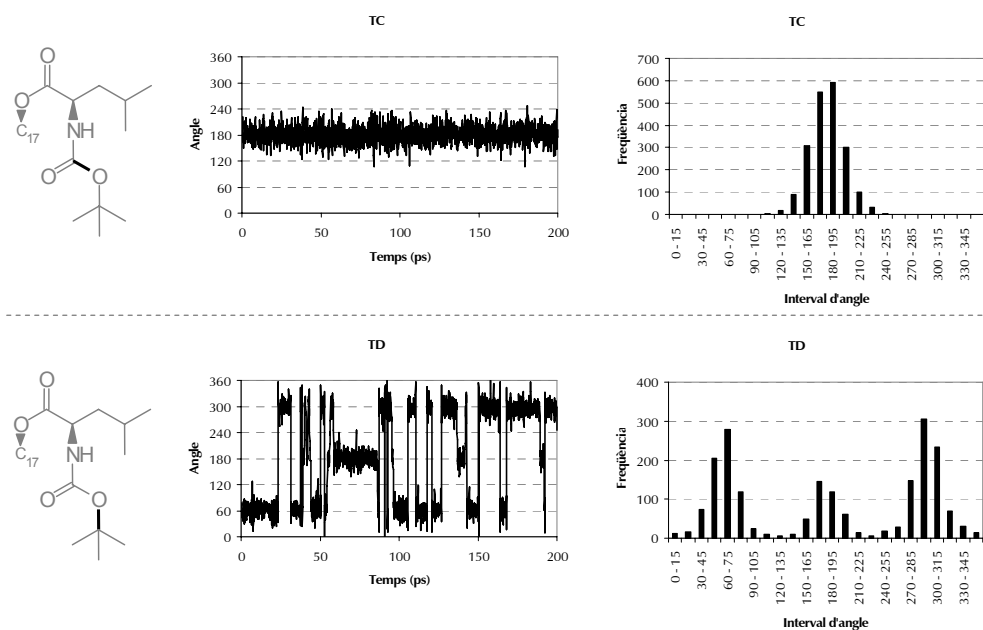


Figura 52: Resultats de la dinàmica molecular per la cadena androstànica tipus *D*-leucina-BOC. Gràfics de l'evolució dels angles en el temps i de freqüències.

2.2. Dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada (DM-SA).

En el transcurs de la tesi, s'ha posant a punt un mètode d'anàlisi conformational basat en la dinàmica molecular (DM) gestionada a través d'un procés de fusió simulada (*simulated annealing*).¹⁹⁰⁻¹⁹² Aquest mètode, que s'abreujarà DM-SA, genera directament la col·lecció de confòrmers. Això evita els problemes derivats de generar-los posteriorment: Canvi de software, canvi de camp de forces, incoherències entre camps de forces, augment del temps de càlcul, etcètera.

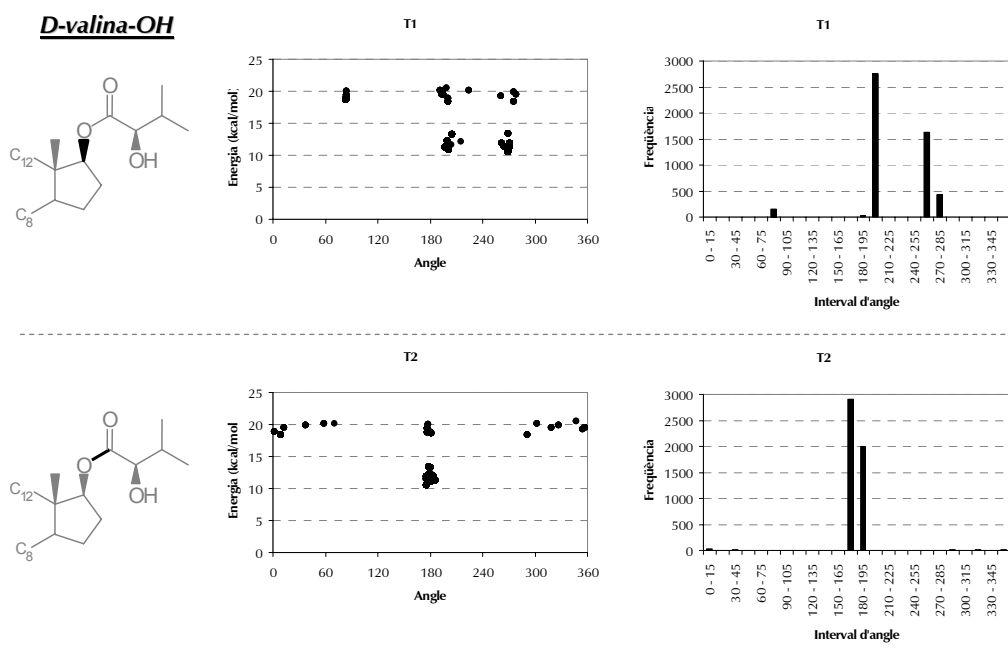
Es realitza una simulació de dinàmica molecular, en la qual la molècula d'estudi es porta de temperatura ambient (298K) a temperatura elevada (900K) i es deixa evolucionar durant un cert temps. Això permet saltar barreres d'energia i explorar tot l'espai conformational. Posteriorment, es refreda lentament fins a temperatura ambient (298K) i s'optimitza l'energia. Això permet tenir els valors d'angle perfectament definits enlloc de la seva estimació a través d'un promig. Aquest procés es repeteix un cert nombre de vegades (500 cops per cada angle de torsió flexible) per tal de generar un ampli nombre de conformacions que sigui representatiu de tot l'espai conformational.

No tots els confòrmers obtinguts són útils. Els hi ha de repetits, els hi ha que no es troben en un mínim d'energia ja que l'optimització ha finalitzat abans de convergir, i els hi ha que tot i estant en un mínim, l'energia d'aquest és molt alta respecte del mínim absolut d'energia. Per fer la selecció dels confòrmers d'interès, es realitza una comparació dels valors dels angles de torsió. Es considera que dos valors són iguals si difereixen en més/menys un angle determinat ($\pm 15^\circ$ per T_1 , T_3 i T_{Av} , $\pm 30^\circ$ per resta de torsions). Si dos confòrmers tenen tots els angles de torsió similars, dins dels marges establerts, es consideren confòrmers equivalents i es selecciona el de menor energia. Per tal de suprimir els confòrmers d'elevada energia s'aplica un tall d'energia que depèn de cada cas.

A continuació es mostren a mode d'exemple, els resultats de la cadena androstànica de referència *D*-valina-OH. Per aquesta cadena es va fer una excepció i es van fer 1.000 iteracions per angle de torsió flexible. En la *Figura 53* es mostren els gràfics corresponents a

la simulació. El gràfic de la distribució dels angles en funció de l'energia permet discutir: a) els valors que té cada angle de torsió, b) el seu valor promig, c) si el valor coincideix amb el teòric o està desplaçat, d) si el valor és únic o depèn dels valors de la resta d'angles de torsió, e) si el valor correspon a una posició eclipsada, i avaluar la seva energia, f) etcètera. El gràfic de freqüències complementa l'anterior indicant quins valors són més importants que altres. El gràfic d'energia és de control, permet veure que la simulació ha transcorregut correctament i serveix per definir el tall d'energia que s'aplicarà.

- T_1 : Presenta tres valors clarament definits. Tots tres es troben explicats en la dinàmica molecular (*Figura 37*, pàgina 61). El valor més freqüent es troba cap a 200° , el segueix de prop el valor cap a 270° i s'observa un valor d'elevada energia i molt baixa freqüència cap a 85° . Aquest darrer valor, només s'intuïa en la dinàmica molecular.
- T_2 : Presenta un únic valor destacable, cap a 180° . S'observen altres valors, però tenen una freqüència menyspreable.
- T_3 : Com era d'esperar, presenta una anàlisi més complexa. Entre 60° i 120° s'obtenen molts mínims locals molt propers entre si. El mateix passa entre 240° i 300° . Aquests coincideixen amb les dos grans agrupacions observades en la dinàmica molecular (*Figura 37*, pàgina 61). Cap a 175° s'observa un valor que té una baixa freqüència tot i tenir una energia relativament baixa. Que tingui una baixa freqüència concorda amb el fet que no s'hagi detectat en la dinàmica molecular. Que tingui un valor ben definit, cap a 175° , contrasta amb la dispersió dels valors observada pel camp de forces TriposFF, els quals oscil·len entre 143° i 193° (*Taula 2*, pàgina 64). També s'observen dos valors cap a 5° i 340° , els quals tenen una energia relativament alta i una baixa freqüència.
- T_4 : Presenta els valors característics d'un enllaç Csp^3-Csp^3 , tots ells amb una freqüència similar. Això contrasta amb la dinàmica molecular, en la qual el valor de 180° era de llarg el més freqüent (*Figura 37*, pàgina 61).
- Energia: S'observa que la major part dels confòrmers estan en un marge d'energia de 5 kcal/mol. Aquest valor es pren com a tall d'energia en la selecció dels confòrmers.



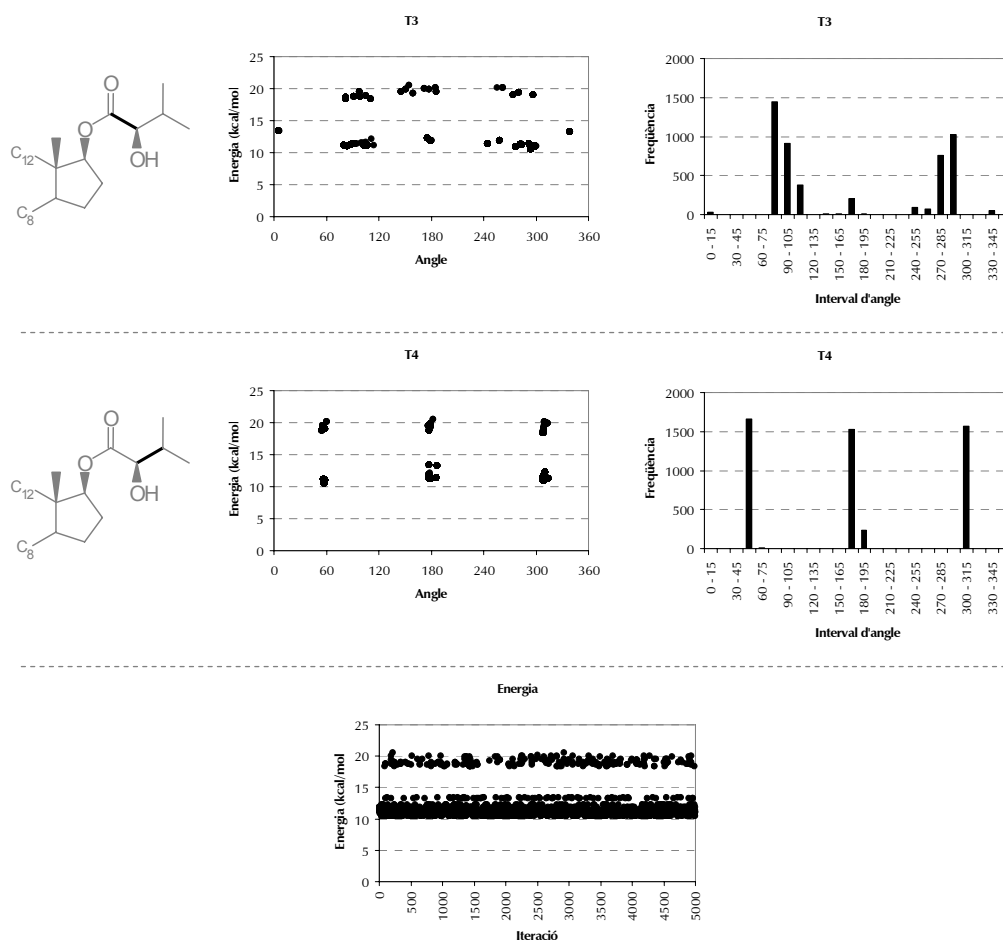
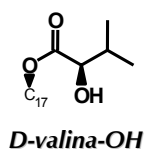


Figura 53: Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada per la cadena de *D*-valina-OH. Gràfics de distribució dels angles en funció de l'energia, freqüència dels angles, i energia al llarg de la simulació.

En la Taula 3 es mostra la selecció dels confòrmers d'interès endreçats segons els valors dels angles de torsió tal com s'ha explicat anteriorment. En la taula es presenta: a) la numeració segons els valors dels angles de torsió, b) la numeració segons energies creixents, c) el valor dels angles de torsió, d) la diferència d'energia respecte el confòrmer de mínima energia, e) el nombre de cops que ha aparegut en la simulació, i f) el primer cop que apareix en la simulació. S'obtenen 19 confòrmers diferents. La freqüència acumulada d'aquests representa un 95% de la simulació. Si s'exceptua el confòrmer 2, el confòrmer que triga més a aparèixer ho fa cap al 2,5% de la simulació (punt 125). Per tant, es considera que la simulació ha estat prou llarga com per explorar tot l'espai conformacional.

S'observen tres parells de confòrmers que, a priori, haurien d'haver estat equivalents, però que no ho són ja que no compleixen el criteri d'equivalència en T_3 ($\pm 15^\circ$). En el primer parell (confòrmers 2 i 3) la diferència en T_3 és tan sols de 16° , el confòrmer 2 és de major energia i presenta una freqüència molt petita en comparació amb 3. Això fa pensar que es tracta d'un confòrmer que no està en un mínim d'energia ja que l'optimització ha finalitzat abans d'hora. Els altres dos parells de confòrmers (16–17 i 18–19) els de major energia també presenten una freqüència menor, però aquestes no són menyspreables. A més a més, les diferències en el valor de T_3 estan al voltant dels 35° . Això fa pensar que hi ha dos mínims d'energia molt propers entre si.



Confómer segons els angles	Confómer segons l'energia	T1	T2	T3	T4	E-Emin (kcal/mol)	Freqüència	Primer punt en la simulació
1	7	198	181	103	57	0,64	424	35
2	14	205	181	105	178	1,16	2	1494
3	10	197	182	89	178	0,82	625	1
4	6	198	182	81	308	0,62	473	18
5	17	200	179	176	311	1,76	96	44
6	4	201	178	300	59	0,58	453	27
7	8	201	178	282	180	0,73	321	5
8	2	201	178	276	309	0,39	278	17
9	18	205	180	339	187	2,75	50	104
10	19	270	179	6	178	2,97	29	125
11	5	270	179	107	57	0,62	356	33
12	11	269	180	93	178	0,89	421	2
13	3	270	179	84	308	0,54	309	37
14	15	271	176	180	310	1,37	106	4
15	1	269	176	294	58	0,00	368	32
16	16	262	184	259	178	1,40	64	14
17	12	271	184	292	186	0,90	179	100
18	13	265	179	245	308	0,94	89	49
19	9	271	186	284	314	0,77	122	54

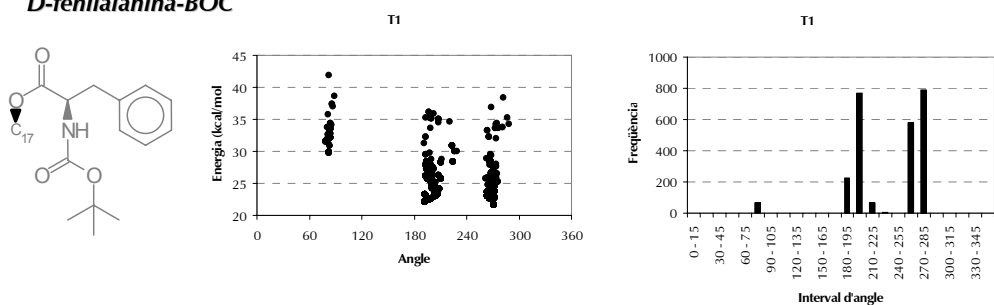
Taula 3: Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada per la cadena de D-valina-OH. Taula dels confòrmers d'interès.

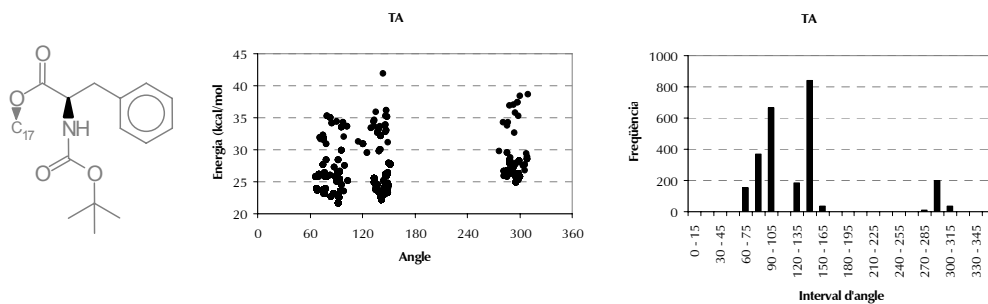
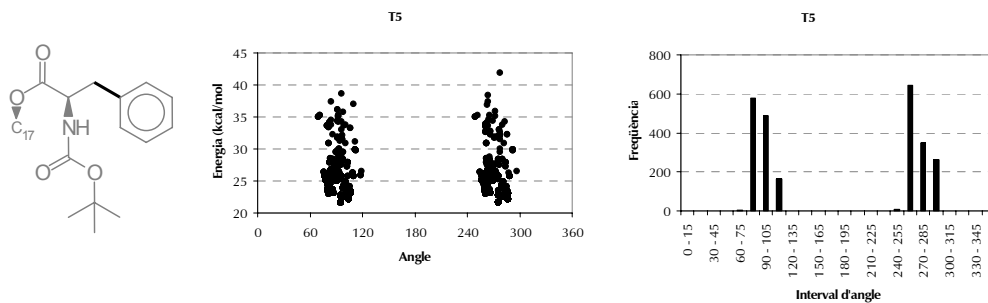
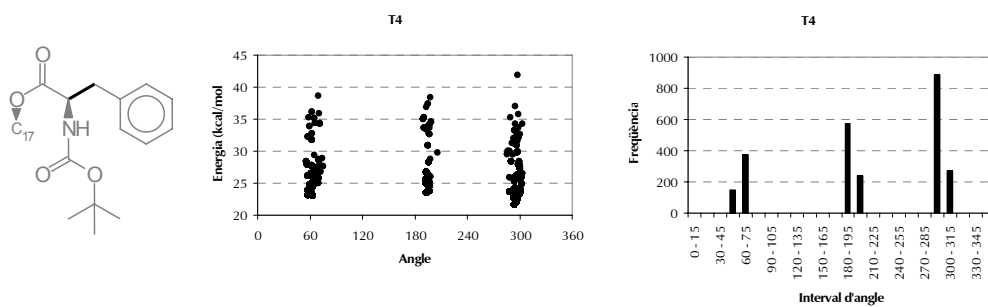
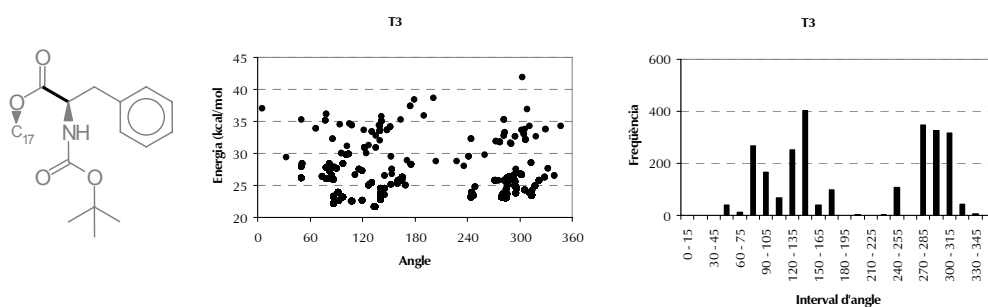
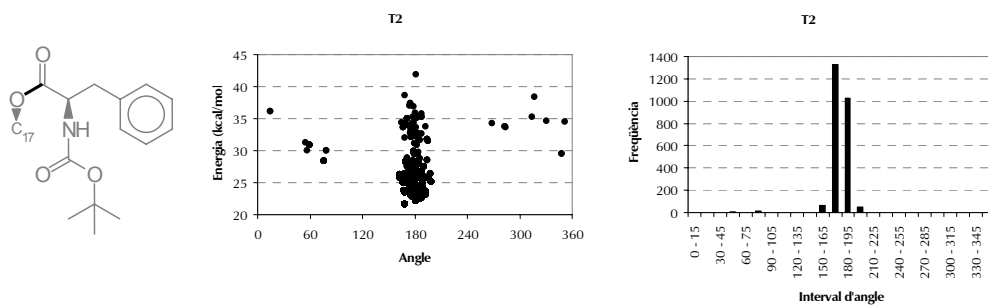
Els confòrmers no són comparables amb els de la dinàmica molecular (*Taula 2*, pàgina 64) ja que els valors d'angle s'han obtingut mitjançant un camp de forces diferent (CVFF) i en la majoria de casos difereixen en un valor superior al del criteri d'equivalència. No obstant, excepte en els confòrmers 9 i 10, es pot establir un paral·lelisme entre els resultats de la DM i els de la DM-SA. Els confòrmers 9 i 10 presenten un valor de T₃ poc usual (339^o i 6^o respectivament), tenen una freqüència baixa i una energia elevada. Això fa pensar que els confòrmers tenen lloc en condicions molt concretes i són poc estables.

Per il·lustrar la simulació d'una cadena amb el grup funcional protegit, es mostren a mode d'exemple els resultats de la cadena androstatànica D-fenilalanina-BOC. En la *Figura 54* es mostren els gràfics corresponents a la simulació. Igualment, es mostra el gràfic de la distribució dels angles en funció de l'energia, el gràfic de freqüències i el gràfic d'energia. Les observacions més destacables són:

- T₁ – T₅: Els resultats estan en la mateixa línia que la dinàmica molecular. Els angles més destacables tornarien a ser T₁ i T₃. Per T₁ la discussió és similar a la del cas anterior. Per T₃ s'observa com els valors estan més dispersos.
- T_A: Presenta tres valors clarament definits, tot i que el valor exacte pot variar lleugerament. Destacar que el valor cap a 300^o presenta una elevada energia i una baixa freqüència.
- T_B: S'obtenen dos valors corresponents a la configuració *cis* (0^o) i *trans* (180^o). La configuració *trans* és energèticament més estable i per això presenta una freqüència major.
- Energia: S'observa que la major part dels confòrmers estan en un marge d'energia de 7 kcal/mol. Aquest valor es pren com a tall d'energia en la selecció dels confòrmers.

D-fenilalanina-BOC





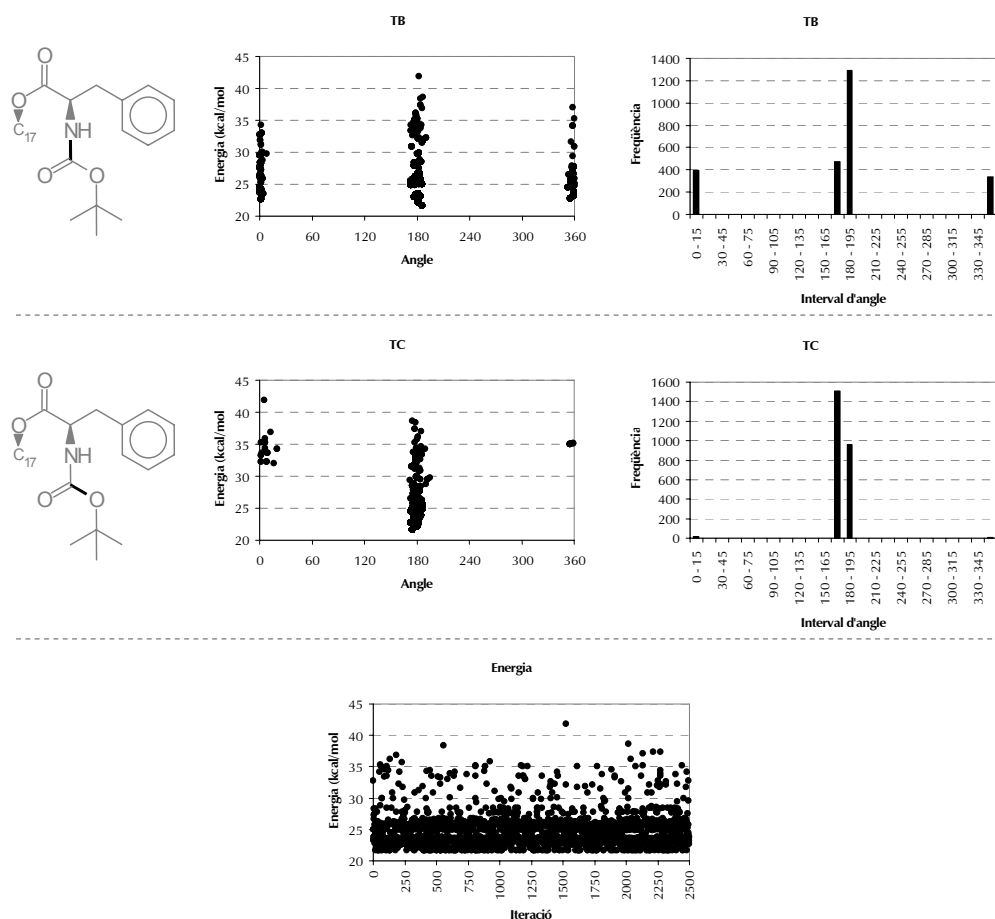
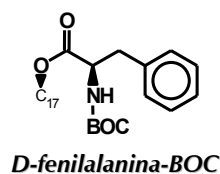


Figura 54: Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada per la cadena de *D*-fenilalanina-BOC. Gràfics de distribució dels angles en funció de l'energia, freqüència dels angles, i energia al llarg de la simulació.

En la *Taula 4* es mostra la selecció dels confòrmers d'interès endreçats segons els valors dels angles de torsió tal com s'ha explicat anteriorment. Només es consideren els confòrmers amb l'enllaç T_B amb configuració *trans*. En la taula es presenta: a) la numeració segons els valors dels angles de torsió, b) la numeració segons energies creixents, c) el valor dels angles de torsió, d) la diferència d'energia respecte el confòrmer de mínima energia, e) el nombre de cops que ha aparegut en la simulació, i f) el primer cop que apareix en la simulació. S'obtenen 33 confòrmers diferents. La freqüència acumulada d'aquests representa un 66% de la simulació. Del 33% restant, el 27% correspon a confòrmers amb l'enllaç amida en configuració *cis* i el 7% a confòrmers amb una energia superior a 7 kcal/mol respecte el confòrmer de mínima energia. El confòrmer que triga més a aparèixer ho fa cap al 25% de la simulació (punt 614). Per tant, en el primer quart ja s'obtenen els resultats desitjats, mentre que en els altres tres quarts la simulació es repeteix. Es considera, doncs, que la simulació ha estat prou llarga com per explorar tot l'espai conformacional.

Igual que amb els androstans lliures, l'anàlisi de T_3 continua sent el més complex, ja que el seu valor depèn de la resta de torsions. Aquest es complica quan s'analitzen les relacions entre les simulacions d'acord amb els criteris: a) anell B amb lactona o cetona, b) hidroxil lliure vs amina lliure, c) grup funcional lliure vs grup funcional protegit i d) hidroxil protegit vs amina protegida. Malgrat que s'observen certes similituds entre les simulacions, és bastant difícil establir una sistemàtica que permeti reduir el nombre de simulacions i agilitzar els estudis.



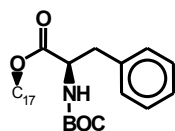
	Confòrmer segons els angles	Confòrmer segons l'energia	T1	T2	T3	TA	T4	T5	E-Emin (kcal/mol)	Freqüència	Primer punt en la simulació
1		60	199	182	85	94	62	93	4,91	17	120
2		3	198	186	108	93	298	282	0,88	52	60
3		52	194	179	50	146	57	83	4,47	25	118
4		51	200	182	79	148	63	269	4,42	29	54
5		2	193	182	87	142	297	286	0,47	104	25
6		76	195	181	80	289	299	284	6,23	14	33
7		43	210	168	165	90	70	89	4,17	36	121
8		10	205	192	279	77	62	267	1,56	50	30
9		44	198	187	283	78	194	258	4,19	52	197
10		8	204	188	285	146	63	82	1,44	32	29
11		40	200	181	295	134	193	261	3,92	46	26
12		14	207	184	314	139	301	106	1,71	174	3
13		68	194	191	296	304	63	263	5,84	2	614
14		65	197	187	302	287	193	84	5,18	20	232
15		32	201	189	318	296	303	281	3,21	19	50
16		48	271	176	87	147	64	90	4,22	24	104
17		4	266	185	93	141	296	98	0,99	54	23
18		34	272	167	127	93	67	90	3,37	34	2
19		35	273	170	170	91	70	268	3,44	4	328
20		17	271	169	141	95	194	81	1,94	256	22
21		1	271	169	134	93	294	95	0,00	164	21
22		55	268	163	166	298	195	84	4,60	42	35
23		41	271	163	161	301	293	96	4,10	20	114
24		9	266	177	245	77	58	84	1,50	58	46
25		11	265	176	281	87	296	286	1,57	39	64
26		15	265	176	248	143	59	260	1,78	11	123
27		37	267	198	286	145	63	77	3,55	20	56
28		33	270	174	295	134	193	80	3,32	122	4
29		7	264	176	284	141	293	287	1,44	83	41
30		78	274	174	237	299	58	92	6,39	1	254
31		62	269	178	302	286	193	84	5,03	27	5
32		46	262	177	284	286	296	103	4,20	2	374
33		42	268	196	323	296	301	288	4,17	19	32

Taula 4: Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada per la cadena de D-fenilalanina-BOC. Taula dels confòrmers d'interès.

2.3. Anàlisi de Components Principals (PCA).

Independentment de la complexitat i/o del valor exacte de T_3 , l'important és l'estructura tridimensional dels confòrmers, així com les semblances i diferències entre ells. Per això, es realitza un anàlisi de components principals sobre els camps d'interacció molecular de GRID. Igual que passarà amb els 22S,23S-BRs, els androstans són un clar exemple de que l'alineament a través dels anells C i D de l'esquelet esteroide no és el més adequat. Per tant, i a diferència de l'estudi anterior, els anàlegs s'alineen amb la brassinólida a través dels camps moleculars de GRID fent servir la sonda d'aigua. Aquest és un alineament global en el qual un petit desajust en els anells A i B provoca un gran ajust en la cadena lateral, de forma que l'alineament final és major. Com es veurà tot seguit, això repercuteix augmentant el nombre de confòrmers interessants.

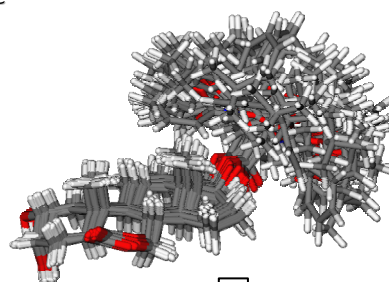
Igual que amb els androstans lliures, la discussió dels resultats del PCA és més interessant si es fa sobre un anàleg androstenic de cadena llarga. Per això i a mode d'exemple, es mostren els resultats per la cadena D-fenilalanina amb l'amina protegida amb BOC, la simulació de la qual ha estat presentada en l'apartat anterior. Els tres primers components principals expliquen les principals diferències entre els confòrmers fent servir un 32% de la variància. Aquests s'agrupen en 5 o 6 classes segons els valors de T_1 , T_3 i T_A (Figura 55).



D-fenilalanina-BOC

Conformer segons els angles	T1	T2	T3	T _A	T4	T5	TB	TC	E-Emin (kcal/mol)
1	199	182	85	94	62	93	183	179	4,91
2	198	186	108	93	298	282	182	179	0,88
3	194	179	50	146	57	83	180	181	4,47
4	200	182	79	148	63	269	178	181	4,42
5	193	182	87	142	297	286	181	180	0,47
6	195	181	80	289	299	284	177	181	6,23
7	210	168	165	90	70	89	184	177	4,17
8	205	192	279	77	62	267	184	177	1,56
9	198	187	283	78	194	258	178	179	4,19
10	204	188	285	146	63	82	177	181	1,44
11	200	181	295	134	193	261	173	187	3,92
12	207	184	314	139	301	106	181	180	1,71
13	194	191	296	304	63	263	183	177	5,84
14	197	187	302	287	193	84	181	179	5,18
15	201	189	318	296	303	281	177	182	3,21
16	271	176	87	147	64	90	178	181	4,22
17	266	185	93	141	296	98	181	180	0,99
18	272	167	127	93	67	90	186	175	3,37
19	273	170	170	91	70	268	183	177	3,44
20	271	169	141	95	194	81	181	177	1,94
21	271	169	134	93	294	95	186	175	0,00
22	268	163	166	298	195	84	178	184	4,60
23	271	163	161	301	293	96	175	185	4,10
24	266	177	245	77	58	84	184	177	1,50
25	265	176	281	87	296	286	181	179	1,57
26	265	176	248	143	59	260	179	181	1,78
27	267	198	286	145	63	77	177	181	3,55
28	270	174	295	134	193	80	173	187	3,32
29	264	176	284	141	293	287	180	180	1,44
30	274	174	237	299	58	92	182	179	6,39
31	269	178	302	286	193	84	183	177	5,03
32	262	177	284	286	296	103	177	182	4,20
33	268	196	323	296	301	288	179	181	4,17

3D



PCA

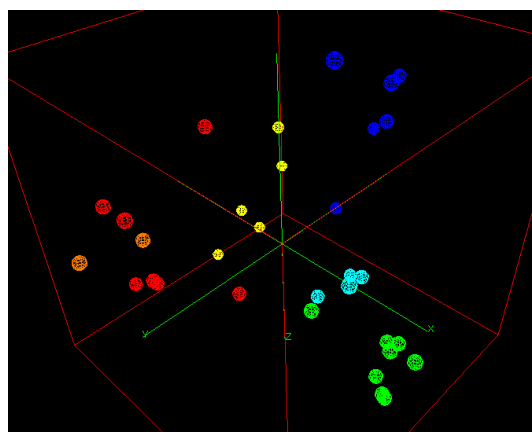


Figura 55: Confòrmers de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC: Taula, estructura tridimensional alineada segons el mapa de GRID amb la sonda d'aigua i situació dins dels tres primers components principals del gràfic d'objectes. Coloració segons la classe.

En funció de T₁ i T₃ s'identifiquen els mateixos 4 grups que amb els androstants lliures (veure *Figura 43*, pàgina 67). Aquests s'identifiquen amb els mateixos colors (*vermell*, *groc*, *verd* i *blau*). No obstant, hi ha dos subgrups (*taronja* i *cian*) amb T_A al voltant de 300° que canvien de grup degut a l'alineament. Els confòrmers en *taronja* passen del grup *groc* al grup *vermell*, i els confòrmers en *cian* es separen del grup *blau* per acostar-se al grup *verd*.

En la resta de cadenes laterals androstantiques s'obtenen resultats similars. Els confòrmers s'agrupen en diverses classes segons els valors de T₁, T₃ i T_A. No obstant, la distinció entre grups no sempre és tan clara degut a la complexitat de T₃ i a la influència de l'alineament.

3. Conformació activa i predicció de l'activitat.

Novament el criteri de selecció de la conformació activa es basa en l'aproximació a l'anàleg actiu (AAA). Es comparen tots els confòrmers amb la conformació activa de la brassinolida i es selecciona el més similar. El grau de similitud es determina amb dos paràmetres: a) l'activitat predita pel model i b) el grau d'intersecció amb la brassinolida de les zones d'interacció per enllaç d'hidrogen de les cadenes laterals.* El primer ja es va

* L'origen del càlcul de la intersecció dels mapes de GRID s'explicarà en el següent capítol de discussió de resultats, ja que inicialment va ser desenvolupat per estudiar els BRs. Degut als seus èxits en explicar els BRs va ser adoptat en l'estudi dels androstants protegits.

utilitzar en l'estudi dels androstans lliures, mentre que el segon és nou i substitueix a l'índex de similitud de forma de Carbó.

Igual que amb els androstans lliures, la discussió dels resultats és més interessant si es fa sobre un anàleg androstenic de cadena llarga. Per això i a mode d'exemple, es mostren els resultats per la cadena *D*-fenilalanina amb l'amina protegida amb BOC, l'anàlisi conformacional i l'agrupació dels confòrmers de la qual ha estat presentada en l'apartat anterior. La *Figura 56a* mostra l'activitat predita dels 33 confòrmers i la *Figura 56b* el grau d'intersecció amb la bl de les zones d'interacció per enllaç d'hidrogen de les cadenes laterals.

L'activitat predita per tots els confòrmers està al voltant de 2. Es considera que aquests valors estan sobreestimats, ja que l'esquelet esteroide torna a ser el millor possible (diol 2 α ,3 α en l'anell A i funcionalitat lactona en l'anell B) i per tant, la seva contribució a l'activitat és màxima. A més a més, l'activitat predita és un paràmetre global, ja que ha estat calculat tenint en compte tota la molècula, de la qual la cadena lateral suposa aproximadament un 30% de l'estructura. Això fa que les diferències notables entre les cadenes laterals dels confòrmers s'hagin de discutir a través d'un espai numèric relativament petit. La discussió sobre el grau d'activitat dels confòrmers es fa relatiu al marge d'activitats comprès entre 1,5 i 2,6. S'han seleccionat els confòrmers que d'aquest marge d'activitats estan en el 25% superior, es a dir, aquells que presenten una activitat predita superior a 2,35.

El grau d'intersecció dels mapes de GRID és un paràmetre local, ja que ha estat calculat tenint en compte només la cadena lateral. Això fa que les diferències entre les cadenes laterals dels confòrmers es puguin discutir a través d'un espai numèric relativament gran. En general, els confòrmers amb T₁ al voltant de 200° (confòrmers del 1 al 15, veure *Taula 4*, pàgina 81) presenten un grau d'intersecció amb la brassinolida superior als que tenen T₁ al voltant de 270° (confòrmers del 16 al 33). Això es deu a que en el primer cas el carbonil de l'èster mimetiza millor l'hidroxil en C22 de la brassinolida. També s'observa que quan T₁ està al voltant de 270° (confòrmers del 16 al 33) el grau d'intersecció és molt variable entre confòrmers similars. Això es deu a que en aquest grup de confòrmers, petites variacions en el valor de les torsions tenen una gran influència en el resultat final de l'alineament, i per tant en el grau d'intersecció. S'han seleccionat els confòrmers on el grau d'intersecció amb la brassinolida és superior al 33%.

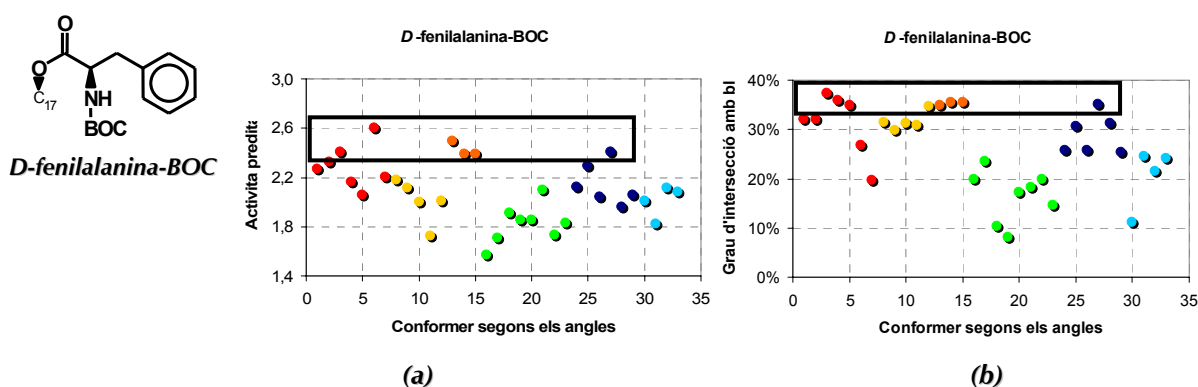


Figura 56: Confòrmers de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC colorats segons els grups descrits en el PCA: **a)** activitat predita i **b)** grau d'intersecció amb la bl de les zones d'interacció per enllaç d'hidrogen de les cadenes laterals.

En la selecció de conformers es diferencien tres casos: a) conformers que compleixen els dos criteris de selecció, b) conformers que compleixen només un dels criteris de selecció, i c) conformers especials que no compleixen cap dels criteris de selecció.

Hi ha 5 conformers (03, 13, 14, 15 i 27) que han estat seleccionats en els dos criteris de selecció. Les seves característiques són:

- El conformer 03 forma part d'una tríada de conformers (03, 04 i 05) que només es diferencien en la orientació del fenil de la cadena lateral. Tots presenten un grau d'intersecció amb la brassinolida superior al 33%, però només el conformer 03 presenta una activitat predita superior a 2,35 ja que és l'únic dels tres on el fenil mimetitza part de l'extrem final de la cadena lateral de la brassinolida.
- Els conformers 13, 14 i 15 formen part d'una tríada de conformers que només es diferencien en la orientació del fenil de la cadena lateral. Tots ells presenten una activitat predita superior a 2,35 i un grau d'intersecció amb la brassinolida superior al 33%. En els tres conformers, el grup BOC és el que mimetitza l'extrem final de la cadena lateral de la brassinolida.
- El conformer 27 té un duplicat (26) i forma part d'una tríada de conformers (26–27, 28 i 29) que només es diferencien en la orientació del fenil de la cadena lateral. Només el conformer 27 presenta una activitat predita superior a 2,35 ja que és l'únic dels quatre on el fenil mimetitza part de l'extrem final de la cadena lateral de la brassinolida, i és l'únic amb un grau d'intersecció amb la brassinolida superior al 33%.

Hi ha 4 conformers (04, 05, 06 i 12) que han estat seleccionats en un dels criteris, però no en l'altre. Les seves característiques són:

- Els conformers 04 i 05 ja han estat discutits en el primer punt.
- El conformer 06 només presenta un grau d'intersecció amb la brassinolida del 27%, però en canvi és el que presenta l'activitat predita més alta (2,60).
- El conformer 12 forma part d'una tríada de conformers (10, 11 i 12) que només es diferencien en la orientació del fenil de la cadena lateral. El grup BOC mimetitza la part intermèdia (C23, C24 i C28) de la cadena lateral de la brassinolida, però no l'extrem final (C26 i C27). Tots ells presenten una activitat predita inferior a 2,0, i només el conformer 12 té un grau d'intersecció amb la brassinolida superior al 33%.

Hi ha 1 conformer (25) que, tot i no estar seleccionat per cap dels dos criteris, crida especialment l'atenció.

- El conformer 25 és l'equivalent al conformer 12, però amb un valor de T_1 al voltant de 270° . Es de destacar que amb aquest valor de T_1 tingui un grau d'intersecció amb la brassinolida força elevat (31%, molt a prop de la frontera del criteri de selecció) i una activitat de 2,30 molt propera a la frontera del criteri de selecció.

Per estudiar la relació entre els conformers de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC comentats anteriorment i la brassinolida es representa 1) la superposició de les cadenes laterals en la qual s'ha suprimit l'esquelet esteroide perquè interferia en el camp de visió (el carboni C17 es marca en marró), 2) la superposició dels mapes de GRID sobre l'estructura de la brassinolida, i 3) el contorn del mapa de GRID de la bl i sobre aquest la intersecció (zona comuna) entre els mapes de GRID. Les observacions més destacades per cadascun dels conformers son:

- *Confórmer 03* (Figura 57): La intersecció es dona en la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22 i en la zona intermèdia del diol. Hi participa majoritàriament el carbonil en C22 i puntualment el nitrogen per la dreta i el carbonil del BOC per l'esquerra. Pel que fa als extrems de les cadenes laterals, només una part del fenil coincideix amb el grup isopropil terminal de la bl. El BOC es situa en el pla de l'esteroida.

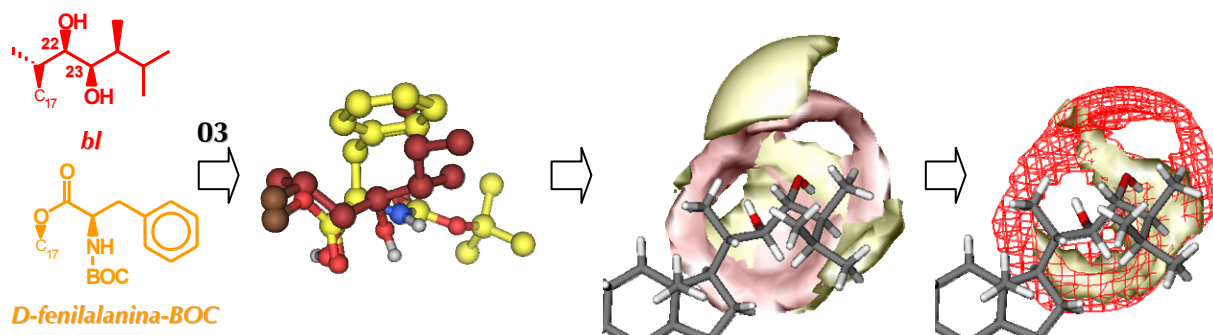


Figura 57: Relació entre el confórmer 03 de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC (en groc) i la brassinolida (en vermell): Superposició de les cadenes laterals, superposició dels mapes de GRID i intersecció.

- *Confórmer 06* (Figura 58): La intersecció es dona majoritàriament en la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22 i en menor grau la zona intermèdia del diol i en la part superior/esquerra de l'hidroxil en C23. En la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22 i en la zona intermèdia hi participa exclusivament el carbonil en C22, mentre que en la part superior/esquerra de l'hidroxil en C23 hi participa exclusivament el nitrogen. Pel que fa als extrems de les cadenes laterals, la cadena de *D*-fenilalanina ressegueix una part de la cadena de la bl. El BOC es situa en la cara α de l'esteroida.

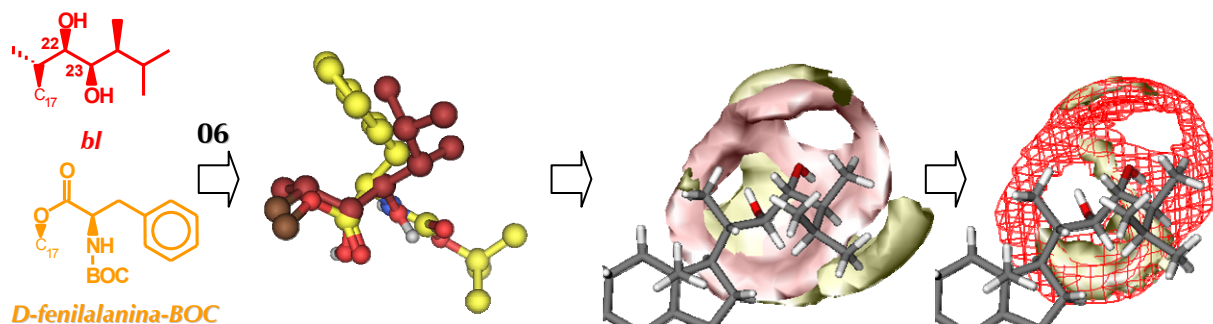


Figura 58: Relació entre el confórmer 06 de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC (en groc) i la brassinolida (en vermell): Superposició de les cadenes laterals, superposició dels mapes de GRID i intersecció.

- *Confórmer 12* (Figura 59): La intersecció es dona majoritàriament en la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22 i en la zona intermèdia del diol, i en menor grau en la part inferior/esquerra de l'hidroxil en C22 i en la part superior/esquerra de l'hidroxil en C23. En l'hidroxil en C22 i en la zona intermèdia del diol hi participa exclusivament el carbonil en C22, mentre que en la part superior/esquerra de l'hidroxil en C23 hi participa exclusivament el carbonil del BOC. El BOC es situa en el pla de l'esteroida i mimetitza els carbonis C23, C24 i C28 de la cadena lateral de la brassinolida.

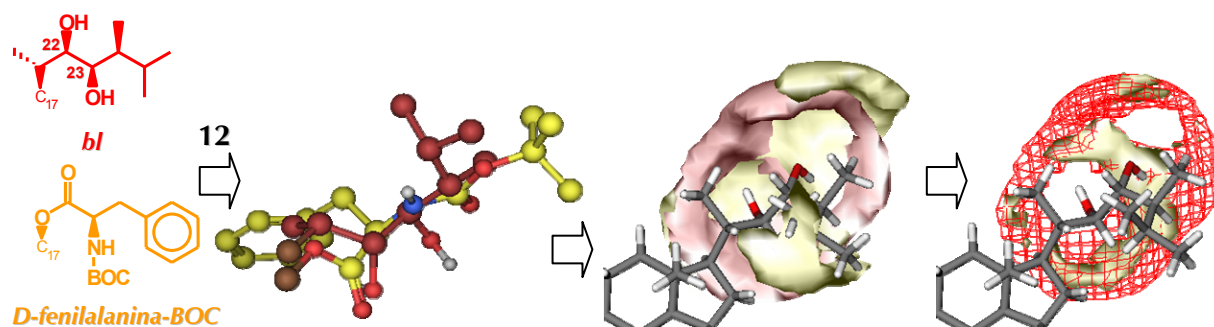


Figura 59: Relació entre el conòrmer 12 de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC (en groc) i la brassinolida (en vermell): Superposició de les cadenes laterals, superposició dels mapes de GRID i intersecció.

- *Tríada de conòrmers 13–14–15* (representats pel conòrmer 13, *Figura 60*): La intersecció es dona en la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22 i es deguda exclusivament al carbonil en C22. La cadena del BOC mimetitzza la cadena lateral de la bl. Això fa que tan el grau d'intersecció com l'activitat predita siguin independents de la cadena lateral i/o la seva orientació. Per aquest motiu 13, 14 i 15 presenten resultats quasi idèntics.

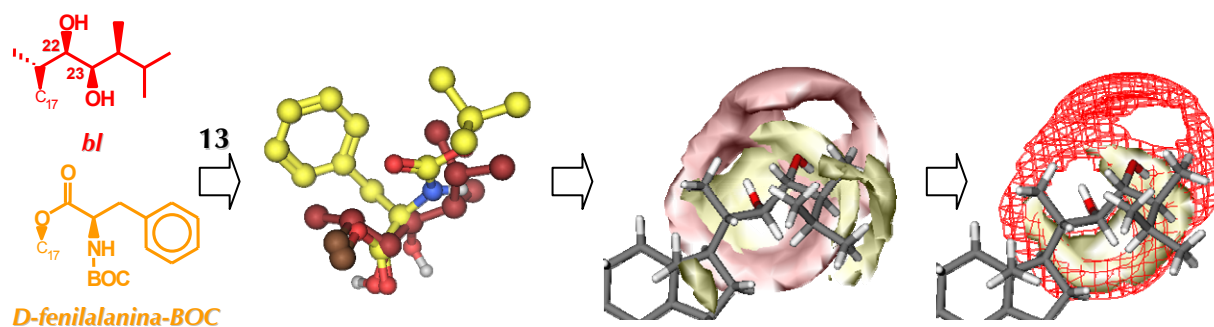


Figura 60: Relació entre el conòrmer 13 de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC (en groc) i la brassinolida (en vermell): Superposició de les cadenes laterals, superposició dels mapes de GRID i intersecció.

- *Conòrmer 25* (*Figura 61*): El conòrmer 25 té quelcom d'especial, amb un valor de T_1 al voltant de 270° presenta un grau d'intersecció amb la brassinolida i una activitat predita que estan en la frontera dels criteris de selecció. La intersecció es dona majoritàriament en la part esquerra del diol concentrant-se en la zona intermèdia i sent fragmentada en la part inferior/esquerra de l'hidroxil en C22 i en la part superior/esquerra de l'hidroxil en C23. En la part intermèdia del diol participen els carbonils en C22 i del BOC, en la part inferior/esquerra de l'hidroxil en C22 participa exclusivament el carbonil en C22, i en la part superior/esquerra de l'hidroxil en C23 participa exclusivament el carbonil del BOC. El BOC es situa en el pla de l'esteroide.

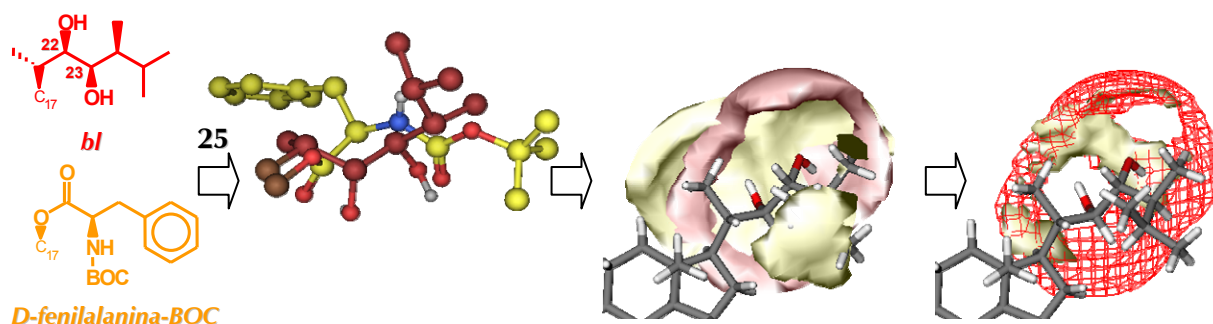


Figura 61: Relació entre el confómer 25 de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC (en groc) i la brassinolida (en vermell): Superposició de les cadenes laterals, superposició dels mapes de GRID i intersecció.

- *Confómer 27* (Figura 62): El confómer 27 té igual que 25 quelcom d'especial, amb l'afegit que presenta un elevat grau d'intersecció amb la brassinolida i una elevada activitat predita. La intersecció es dona majoritàriament en la part esquerra del diol abastant tan l'hidroxil en C22 com en C23. També hi ha una intersecció puntual en la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22. En la part esquerra del diol hi participen tan el carbonil en C22 com el carbonil del BOC. En la part inferior/dreta de l'hidroxil en C22 hi participa exclusivament el nitrogen de la cadena *D*-fenilalanina-BOC. Pel que fa als extrems de les cadenes laterals, la cadena de *D*-fenilalanina ressegueix una part de la cadena de la bl. El BOC es situa cap a la cara α de l'esteroida.

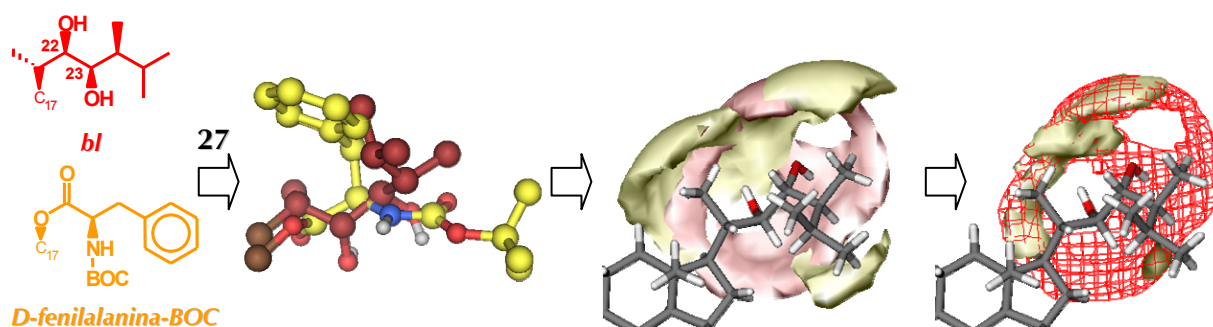


Figura 62: Relació entre el confómer 27 de la cadena de *D*-fenilalanina-BOC (en groc) i la brassinolida (en vermell): Superposició de les cadenes laterals, superposició dels mapes de GRID i intersecció.

En la selecció de la conformació activa es descarten els confòrmers 12 i 25 ja que la cadena lateral de la brassinolida només és mimetitzada parcialment pel grup BOC. Per als confòrmers restants, és complicat assignar de forma inequívoca a qualsevol d'ells l'etiqueta de conformació activa. Tota assignació presenta avantatges i inconvenients:

- En la tríada de confòrmers 13–14–15 el grup protector simula la cadena lateral dels BRs i la cadena lateral no té cap influència. Que el BOC simuli l'extrem final de la cadena lateral dels BRs explicaria perquè les amines protegides són actives mentre que les amines lliures no. En canvi que la cadena lateral no tingui cap influència va en contra del fet que algunes amines protegides (*D,L*-alanina-BOC i glicina-BOC) són inactives.

- En els confórmers 03, 06 i 27 l'extrem final de l'aminoàcid simula la cadena lateral dels BRs i el grup protector participa de manera dispar. Que l'esquelet hidrocarbonat de l'aminoàcid simuli l'extrem final de la cadena lateral dels BRs explicaria perquè els anàlegs d'aminoàcids de cadena llarga són actius mentre que els de cadena curta són inactius. En canvi el paper secundari del BOC no explica perquè les amines protegides són actives mentre que les amines lliures no.

Tampoc ajuda el fet que en alguns casos la intersecció es doni majoritàriament per la dreta (confórmer 03 i tríada de confórmers 13–14–15), majoritàriament per l'esquerra (confórmer 27) o descrigui una "S" (confórmer 06).

4. Conclusions.

L'anàlisi conformacional continua sent molt complexa degut a l'elevada flexibilitat de les cadenes. L'anàlisi s'ha millorat considerablement amb la metodologia DM-SA. No obstant, és difícil establir una sistemàtica en els resultats de les simulacions i en conseqüència, no es possible reduir el nombre de simulacions i agilitzar els estudis.

És difícil assignar una conformació activa *in silico* als anàlegs BRs androstànics amb el grup funcional protegit. Hi ha diverses conformacions possibles, les quals presenten uns paràmetres numèrics molt similars. Cada conformació té una forma diferent d'explicar la manera d'actuar dels androstans sent coherent en alguns aspectes i incoherent en altres.