

## ***Capítol 4. Resultats i discussió***



## **4.1 Introducció**

Tal i com hem vist en el capítol 2 tant en el procés inflamatori (osteoartritis, artritis reumatoïde) com en malalties relacionades com l'asma, càncer i processos neurodegeneratius hi ha una sobreproducció per increment de l'expressió dels enzims COX i la 5-LOX, en aquest capítol es mostraran els diferents resultats obtinguts en l'estudi del possible mecanisme d'inhibició d'aquests dos enzims amb fàrmacs que pertanyen a diferents famílies de compostos antiinflamatoris no esteroïdals.

## **4.2 Estudi del mecanisme d'inhibició competitiu temps dependent de la COX-1**

Un ampli grup de fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) com la indometacina, el flurbiprofè, el ketoprofè, el naxoprè, l'àcid meclofenàmic, el diclofenac, l'etodolac, l'amfenac entre altres inhibeixen als dos isoenzims de la COX a través d'un mecanisme competitiu amb el substrate àcid araquidònic, aquest mecanisme és temps dependent amb una unió en alguns casos de caràcter fort però no tant com ho seria un enllaç covalent tal i com fa l'àcid acetil salicílic (AAS) que acetil·la [1-2] un residu serina (Ser- 530) de la COX inactivant-la irreversiblement [3]; si no que els compostos d'aquest grup interaccionen amb àrees específiques de l'enzim a través d'unions electrostàtiques, ponts de hidrogen, interaccions hidrofòbiques i/o de van der Waals tal i com les faria el substrate àcid araquidònic.

Aquests AINE's no selectius que inhibeixen tant a la COX-1 com a la COX-2 en un percentatge variable [93-94] tal i com s'indica en la taula 2, que mostra [4] una relació entre les concentracions de fàrmac necessàries per inhibir un o l'altre enzim mitjançant el quocient COX2/COX1 : un valor inferior a 1 indica una inhibició preferent de la COX2 que en definitiva són els compostos més interessants [5,93] des d'un punt de vista farmacològic, ja que com hem vist en el capítol 2, convé inhibir a la COX2 respectant al màxim l'activitat de la COX1, però que per l'estudi del seu mecanisme d'interacció tant els inhibidors COX1 com COX2 s'han inclòs en la present tesi.

Grup	AINE	Relació concentracions inhibició COX2 /COX1
AINE No selectius	Indometacina	0,7 --107
	Ibuprofèn	0,6 -- 15
	Diclofenac	0,7 -- 7,6
	Naproxèn	0,6 -- 5,9
	Etodolac	0,8 -- 8
AINE selectius	AAS	100 --166
	Meloxicam	0,013 -- 0,8
	Nimesulida	0,01 -- 0,1
	Celecoxib	0,04 -- 0,4
	Rofecoxib	0,001 – 0,1

Taula 2. Comparació de la inhibició selectiva dels dos isoenzims de la COX per diferents AINE mitjançant el quocient de concentracions necessàries per inhibir als dos isoenzims COX2/COX1 [4, 93-94]

#### 4.2.1 Flexibilitat molecular, estudi conformacional de l'àcid araquidònic

Per estudiar els fàrmacs que han d'inhibir a l'enzim COX amb un mecanisme d'inhibició competitiva del substrate àcid araquidònic, primer ens cal estudiar aquest substrate tant estructuralment com conformacionalment. El primer pas és analitzar la seva flexibilitat molecular i comparar-la amb la dels inhibidors, ja que *a priori* han de tenir propietats de rotació i distribució espacial dels grups actius similars.

L'optimització inicial de l'àcid araquidònic va presentar l'inconvenient que és una molècula amb una cadena llarga i amb 20 àtoms de carboni, xifra que saturava la capacitat de càlcul dels primers programes de càlcul que es van utilitzar. Malgrat tot, es va poder aconseguir una primera optimització total amb el mètode semiempíric AM1 [15] obtenint una primera conformació on tots els enllaços simples són en posició *trans* i els dobles són *cis*, aquesta conformació amb una disposició que plega la cadena en sí mateixa per aquest motiu s'anomena *plegada* i és força estable amb una entalpia de formació de  $-86,68$  Kcal/mol, però que no respon al mecanisme de ciclooxigenació

proposat per Samuelsson [16], ja que la distància entre els C8 i C12 es troben a una distància que no permetria formar l'endoperòxid, a més el doble enllaç  $\Delta^{5,6}$  hauria d'adoptar una posició antiperiplanar respecte al  $\Delta^{8,9}$  per així poder formar la PGG<sub>1</sub>, per aquest motiu s'ha tornat a fer un segon estudi conformacional rotant l'angle dihedre que defineix la lliure rotació de C6-C7 de 0° a 350° i efectuant una optimització total a intervals de 10°. Aquest estudi obté una segona conformació anomenada *desplegada* i que tot sent una mica menys estable (-84 Kcal/mol) sí que aconsegueix amb els requeriments estereoquímics i de mecanisme anteriorment descrits.

Aquestes dues conformacions *plegada* i *desplegada* es mostren en la Figura 2 de l'article: *A new dynamic model for cyclooxygenase receptor site inhibition by antiinflammatory arilacetics*. C. Silipo i A. Vittoria (Eds.) QSAR: Rational approaches to the design of bioactive compounds. pp.315-318, (1991) que es mostra en l'apèndix.

Degut a la importància d'aquestes conformacions que han de servir de base per posteriors estudis comparatius amb les conformacions de fàrmacs que actuen amb un possible mecanisme d'inhibició competitiva, es van verificar [15] aquests primers resultats conformacionals amb mètodes més acurats de dinàmica molecular (veure també article: de l'apèndix *Conformational search and transitional states study of arachidonic acid using molecular dynamics and AM1 semiempirical calculations*. C.G. Wermuth (ed.) en Trends in QSAR and Molecular Modeling 92, pp. 429-430 (1993).

Així una primera simulació de dinàmica molecular és va realitzar per a 300°K a intervals de 8 ps obtenint 8000 possibles configuracions que en una segona etapa amb l'algoritme de Newton-Rapson a intervals de 80 fs es van reduir a 100 conformacions la majoria de les quals presentava una gran similitud estructural ja que quedaven agrupades a l'entorn d'una mateixa àrea (cluster) en un mapa conformacional que es mostra en la Figura 1 de l'article: *Conformational search and transitional states study of arachidonic acid using molecular dynamics and AM1 semiempirical calculations*. C.G. Wermuth (ed.) en Trends in QSAR and Molecular Modeling 92, pp. 429-430 (1993).

Finalment després d'un exhaustiu estudi comparatiu per RMS de les conformacions restants, aquestes es va reduir a dues conformacions que van correspondre amb petites variacions a les conformacions inicials *plegada* i *desplegada* obtingudes per optimització amb el mètode semiempíric AM1.

Segons el model proposat per Gund i Send [17] l'àcid araquidònic podria interaccionar amb la COX en la conformació *plegada* per després i mentres és forma l'endoperòxid corresponent adoptar la conformació *desplegada*.

Aquesta possibilitat que la conformació activa en el locus de l'enzim fos la desplegada també queda justificada per l'estudi de les energies de l'orbital  $\pi$ -HOMO dels àtoms de carboni implicats en la transformació del substrate, que s'han relacionat amb l'energia dels àtoms corresponents per superposició amb els inhibidors Amfenac i Fenclofenac i que es mostra en la Figura 1 de l'article: *A new dynamic model for cyclooxygenase receptor site inhibition by antiinflammatory arilacetics*. C.Silipo i A. Vittoria (Eds.) QSAR: Rational approaches to the design of bioactive compounds, pp. 315-318 (1991).

Les energies  $\pi$ -HOMO d'aquests dos AINE es corresponen millor amb la forma desplegada que amb la plegada, fet que corroboraria que la forma activa del substrate dins de la COX i a partir de la qual es formaria la prostaglandina PGG<sub>1</sub> és efectivament la conformació *desplegada*, també designada *up* en l'article *Conformational search and transitional states study of arachidonic acid using molecular dynamics and AM1 semiempirical calculations*. C.G. Wermuth (ed.) en Trends in QSAR and Molecular Modeling 92, pp. 429-430 (1991).

Posteriors estudis cristal·logràfics (Malkowski, 2000) [95] han confirmat que efectivament la conformació desplegada de l'àcid araquidònic es correspon amb la trobada per difracció de raigs X en el complex PGHS-1-àcid araquidònic [95].

### **4.2.2 Estudi del mecanisme de compostos Arilacètics**

La família dels compostos arilacètics presenta importants AINE que pot ser ens atreviríem a dir que són els més clàssics després de l'aspirina, entre ells destaquen com més coneguts el diclofenac (Voltarén<sup>®</sup>, Dolotrén<sup>®</sup>), el fentiazac (Donorest<sup>®</sup>, Riscalon<sup>®</sup>), el fenclofenac, l'oxepinac, l'aceclofenac (Airtal<sup>®</sup>, Falcol<sup>®</sup>) i l'etodolac; altres pot ser no tan coneguts són l'alclofenac, l'ibufenac, pedemolac i l'amfenac, cap d'ells és selectiu de la COX2 fet que els hi suposa d'entrada un inconvenient [5], però degut a la seva eficàcia encara tenen un gran ús en el tractament de diversos processos inflamatoris.

Estructuralment tal i com mostra la figura 18, presenten en comú un grup acetat unit a un o més nuclis aromàtics que a la vegada pot tenir diferents substituents.

Tots ells presenten un  $pK_a$  àcid, motiu pel qual a pH fisiològic es troben en forma ionitzada i s'administren en forma de sals sòdiques afavorint la seva distribució sistèmica fins arribar a la biofase on interaccionaran amb el receptor ciclooxigenasa, no es descarta la possibilitat d'una fase inicial de transferència protònica poguessin actuar en la fase d'inhibició en forma neutra [6].

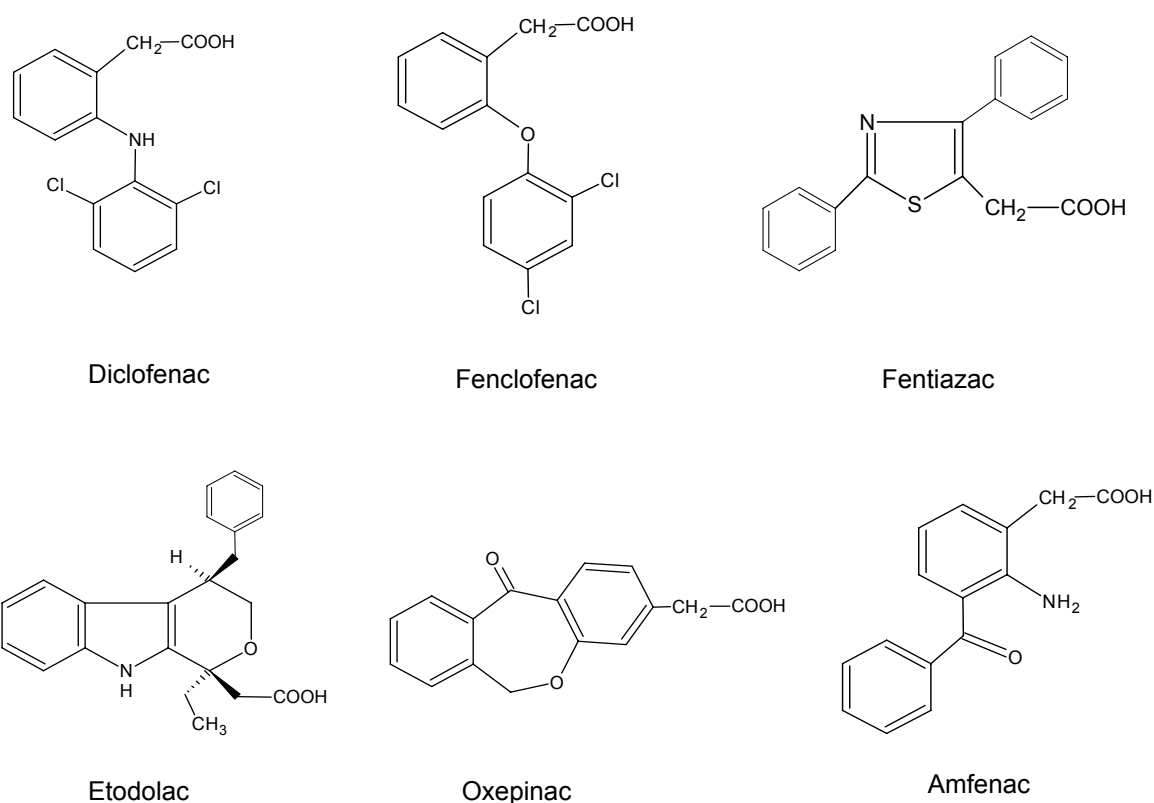


Figura 18. Alguns dels antiinflamatoris de la família dels arilacètics.

#### 4.2.2.1 Anàlisi estructural dels compostos arilacètics: Amfenac i Fenclofenac

L'amfenac (àcid 2-amino-3-benzoïlfenilacètic) i el fenclofenac (àcid 2-(2,4-diclorfenoxi)fenilacètic) són dos importants arilacètics: el fenclofenac molt similar estructuralment al diclofenac (fig. 18) i l'amfenac dissenyat [7] per farmacomodulació (replicació disjuntiva) d'un metabolit de la indometacina presenta en comú tal i com mostra la figura 19 el nucli de la 7-benzoïl-indolina amb una activitat antiinflamatòria

comparables a la fenilbutazona i major que la indometacina i amb menors efectes secundaris [8].

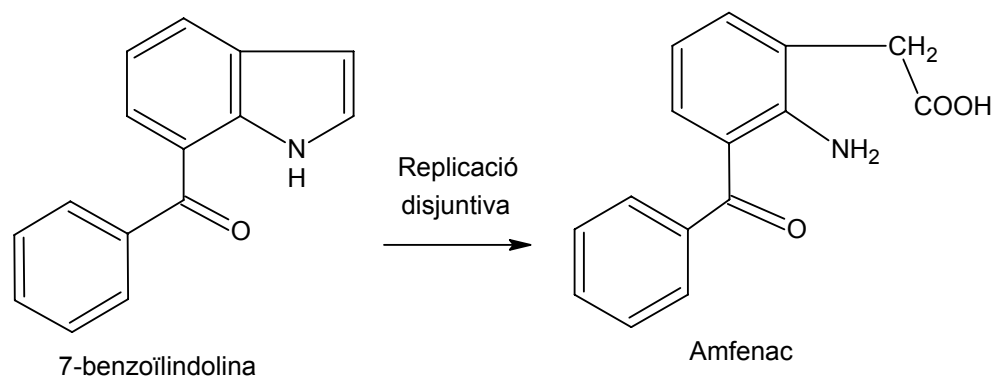


Figura 19. Replicació disjuntiva d'un dels metablits de la indometacina, resultant un compost més actiu per obertura de l'anell indòlic i posterior introducció de grups actius.

#### 4.2.2.1.1 Metodologia i etapes d'estudi

L'estudi del possible mecanisme d'inhibició amb que actuarien els derivats d'aquests dos compostos s'ha realitzat seguint les següents etapes:

- 1) En una primera etapa s'ha optimitzat la geometria inicial tant de l'amfenac i del fenclofenac com del mateix substracte àcid araquidònic amb els mètodes semiempírics MNDO i AM1. Les geometries inicials de partida s'han obtingut a partir de dades cristal·logràfiques [9-11] i amb l'ús de la Bases de dades estructural de Cambridge [12].
- 2) En una segona etapa s'ha procedit a l'estudi conformacional amb mètodes mecanoquàntics i de dinàmica molecular ja descrits en el capítol 3. Aquest estudi ha comportat l'optimització total de la geometria amb mètodes semiempírics AM1 i MNDO per la rotació d'aquells enllaços on era permesa la lliure rotació que s'ha fet des de 0° a 345° a intervals de 15°, obtenint les conformacions més estables energèticament (minimum energy conformations) que després s'han verificat amb l'algoritme del programa DISCOVER [13].
- 3) Seleccionar la/les possible/s conformacions bioactives per superposició o *fitting* amb l'estructura optimitzada del substracte àcid araquidònic.



4) A partir de la conformació bioactiva s'han optimitzat per substitució tots els compostos de la sèrie que inclou a compostos derivats de l'estructura principal (*pattern*) de l'amfenac i del fenclofenac. Aquests compostos s'han seleccionat en funció de la variabilitat de substituents i d'activitat, ja que la sèrie objecte d'estudi ha d'incloure tant a compostos farmacològicament actius com aquells derivats amb menor activitat.

5) Obtenció de diferents paràmetres (hidrofòbics, electrònics i estèrics) de tots els compostos de la sèrie per tal d'obtenir una relació entre l'activitat i l'estructura.

6) Per últim, sabent els factors que són favorables a una major activitat farmacològica dels compostos estudiats és pot proposar un possible mecanisme d'acció conjuntament amb un model estructural que inclogui a aquells substituents que degut a la seva natura química potencien l'activitat antiinflamatòria del *pattern* o del compost cap de sèrie en el nostre cas de l'amfenac i fenclofenac.

#### 4.2.2.1.2 Resultats i discussió

D'altra banda els estudis conformacionals realitzats amb l'Amfenac [18] i el Fenclofenac [19] s'han realitzat a partir de la lliure rotació en els enllaços simples que permeten el lliure gir, aquests són:

- la lliure rotació del grup acètic a través de dos enllaços simples el del grup carboxil i l'altra a través del  $C\alpha$  del grup acetat ( $C\alpha$ -COOH).
- i la del substituent del grup fenil (3-benzoïl per l'Amfenac i 2,4-diclorfenòxid pel Fenclofenac) aquestes lliures rotacions queden representades per els angles dihedres que es representen en la figura 20 per l'Amfenac i similars per l'estructura del Fenclofenac.

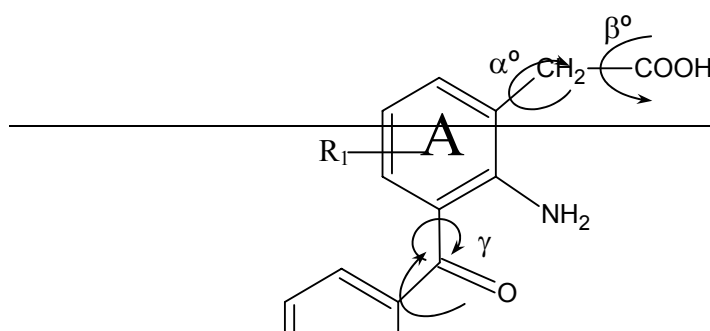


Figura 20. Possibles angles dihedres de lliure rotació utilitzats en l'estudi conformacional de l'Amfenac

Com a resultat ambdós compostos poden presentar 8 conformacions de mínima energia que serien les següents: primer atenent a la rotació dels angles implicats en la lliure rotació del substituent aromàtic del grup fenil existirien 4 conformacions: 2 "phenyl-up" amb el grup fenil del substituent cap amunt respecte al pla de l'anell aromàtic central ( C i D en la figura 21) i 2 "phenyl-down" amb el grup fenil del substituent cap avall respecte al pla de l'anell aromàtic central ( A i B).

Segon, mantenint constant la geometria del substituent del grup fenil, la lliure rotació del grup acètic obtindria també 4 conformacions: 2 "carboxy-up" (E-F) i 2 "carboxy down" (G i H en la figura 21).

Cal justificar el perquè de l'estabilitat aquestes conformacions de mínima energia tant per l'Amfenac com per el Fenclofenac i la raó és l'existència de ponts d'hidrogen intramoleculars que les fan més estables i que tenen lloc per exemple per l'Amfenac: el primer pont entre l'oxigen carbonílic del grup acetat i un hidrogen del grup amino i el segon pont d'hidrogen entre l'altre hidrogen amino i l'oxigen del grup benzoïl tal i com mostra la figura 21.

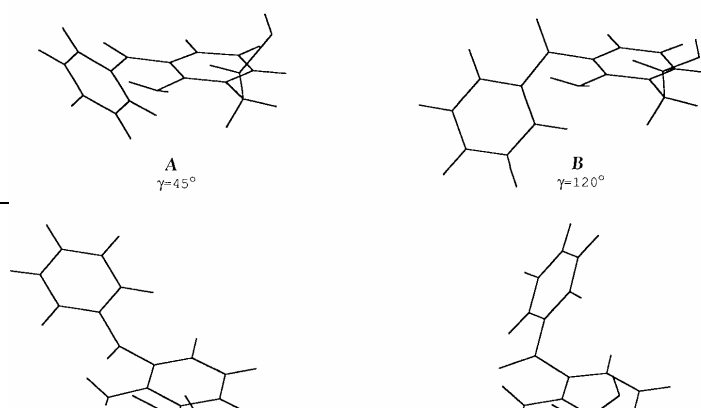


Figura 21. Conformacions de mínima energia de l'Amfenac

Per tal de seleccionar la possible conformació bioactiva amb la qual l'amfenac i el Fenclofenac i pot ser la resta de compostos arilacètics inhibirien a la COX, s'han superposat per *fitting* les conformacions obtingudes amb la conformació desplegada de l'àcid araquidònic.

D'acord amb els dos models d'inhibició dels AINE són possibles dos superposicions:

1) la que aconsegueix el model de Gund and Shen [17] on el grup carboxílic dels AINE competiria amb el grup carboxílic de l'àcid araquidònic, i 2) el model d'Appleton i Brown [20] segons la qual el grup carboxílic dels AINE competiria amb el grup 11-peròxid de l'àcid araquidònic. Com a resultat d'aquestes superposicions es mostren en la figura 22.

La conformació "phenyl-down" i "carboxyl-up" (també designada conformació E) és la que millor es superposa amb el substracte àcid araquidònic (RMS=0,176) i aconsegueix amb els dos models de superposició de Gund –Shen i d'Appleton-Brown.

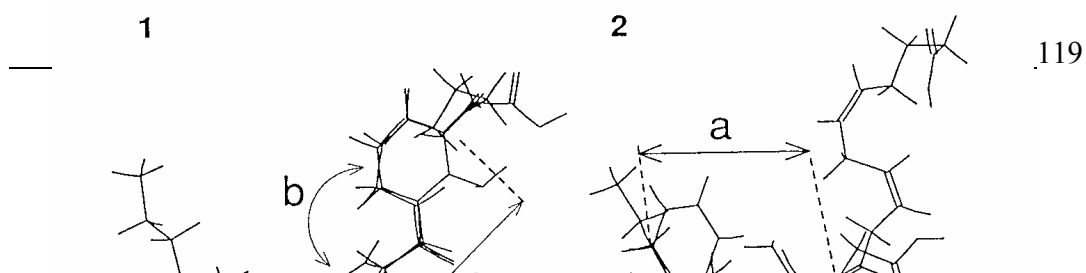


Figura 22. Superposició de la possible conformació de mínima energia E (carboxi-up, fenil-down) de mínima energia de l'Amfenac amb la conformació desplegada de l'àcid araquidònic el substracte àcid araquidònic, acomplint els models de Gund-Shen (1) i Appleton-Brown (2).

A partir d'aquesta conformació seleccionada com a possiblement bioactiva s'han optimitzat totalment la geometria de 12 derivats del Fenclofenac i 19 derivats del Fenclofenac. Aquests derivats es mostren la taula-1 de l'article *QSAR in the nonsteroidal antiinflammatory agents Amfenac, Fenclofenac and analogues*. C.Silipo i A. Vittoria (Eds.) *QSAR: Rational approaches to the design of bioactive compounds*, pp.477-480, (1991).

I que en el cas de l'Amfenac s'han estudiat 19 derivats que es mostren en la taula 1 de l'article *QSAR and conformational analysis of the antiinflammatory agent amfenac and analogues*. *J.Comput- Aided Mol. Design*, 7, 183-198 (1993).

Després d'optimitzar totalment la geometria dels derivats, tots els compostos estudiats de la sèrie de l'amfenac i del fenclofenac van adoptar la conformació de mínima energia seleccionada mantenint valors dels angles dihedres molt propers als obtinguts per l'amfenac. A continuació i a mode d'exemple s'indiquen en la següent taula els valors dels angles dihedres que van obtenir alguns compostos, el primer compost de la taula-3 correspon al cap de sèrie (Amfenac).

Una vegada optimitzats tots els derivats de les sèries respectives de l'Amfenac i del Fenclofenac es va procedir al càlcul de diversos paràmetres electrònics, hidrofòbics i estèrics per tal de relacionar-los quantitativament amb les activitats antiinflamatòries.

Comp.	R1	R2	$\alpha^\circ$	$\beta^\circ$	$\gamma^\circ$	$\delta^\circ$	H <sup>of</sup> (Kcal/mol)
1	H	H	109,11°	252,76°	38,42°	31,20°	-82,24
2	4-CH <sub>3</sub>	H	108,48°	251,06°	39,35°	41,97°	-84,64
3	5-CH <sub>3</sub>	H	110,09°	255,04°	38,52°	30,93°	-85,59
4	6-CH <sub>3</sub>	H	105,81°	253,95°	38,55°	30,25°	-85,62
5	4-Cl	H	110,34°	251,22°	36,37°	31,90°	-91,14
6	5-Cl	H	110,27°	256,24°	37,37°	30,96°	-92,24
7	H	2-Cl	108,67°	251,24°	35,37°	66,90°	-90,23
8	H	3-Cl	108,47°	253,52°	38,70°	31,08°	-90,80
9	H	4-Cl	108,43°	252,80°	38,76°	30,96°	-126,08
10	H	4-Br	108,73°	251,04°	34,90°	68,78°	-134,58
11	H	2,4-Cl <sub>2</sub>	108,73°	251,04°	34,90°	68,78°	-90,58
12	H	3,4-Cl <sub>2</sub>	108,44°	253,20°	38,81°	31,02°	-94,33
13	H	4-CH <sub>3</sub>	108,48°	251,06°	39,35°	41,97°	-86,24
14	H	4-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	108,66°	253,16°	36,22°	61,92°	-98,11
15	5-F	4-Cl	109,11°	252,76°	38,42°	31,20°	-132,84
16	5-F	4-Br	109,43°	253,34°	38,34°	30,24°	-143,76
17	5-CH <sub>3</sub>	4-Cl	108,34°	253,06°	38,33°	30,62°	-99,04
18	5-OCH <sub>3</sub>	4-Cl	108,46°	253,11°	38,22°	47,07°	-97,43
19	5-OCH <sub>3</sub>	4-Br	108,45°	258,11°	38,06°	42,67°	-134,67
20	5-Cl	2-Cl,4-Br	108,72°	253,04°	39,01°	68,11°	-144,66

Taula 3. Valors dels angles dihedres definits en la figura 20 de 20 derivats de l'Amfenac que després de la seva optimització total de la seva geometria mantenen la conformació bioactiva de l'Amfenac (R1=H, R2=H).

Entre aquests paràmetres destaquen les energies moleculars en els orbitals frontera HOMO-LUMO que com hem vist en el capítol 3 són paràmetres que indiquen la reactivitat molecular, també i segons dades bibliogràfiques [16-17] que apunten sobre l'existència de regions en el centre actiu de l'enzim que es comportarien com acceptors de càrrega  $\pi$ -electrònica. En aquest sentit s'ha estudiat la distribució densitat electrònica dels orbitals-  $\pi$  en els orbitals frontera HOMO-LUMO.

Cal destacar que tots els derivats presenten una distribució topològica molt similar per l'orbital HOMO que es situa en el primer anell aromàtic (veure figura 23), sent en l'orbital Next-HOMO on s'observen les diferències més significatives. Així els compostos més actius incrementen la densitat electrònica del segon anell aromàtic.

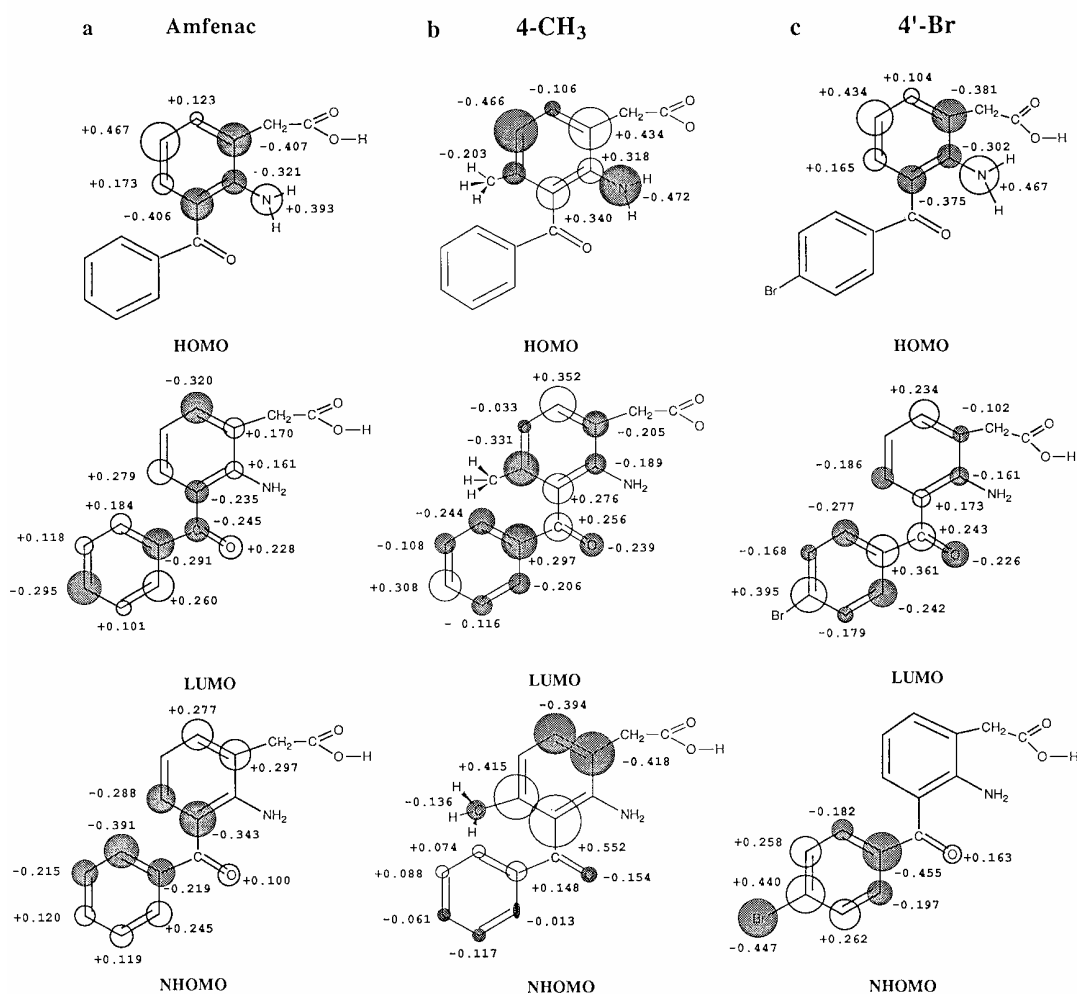


Figura 23. Orbitals HOMO, LUMO i Next-HOMO per a) l'Amfenac, b) un compost poc actiu (4-metil) i c) un compost actiu (p-brom-fenil), els compostos actius (c) incrementen la densitat electrònica en el segon anell aromàtic.

Atenent a la importància dels paràmetres electrònics es va analitzar el moment dipolar AM1 obtenint un valor umbral per tots aquests derivats, fet que indicaria que tots serien capaços d'interaccionar amb l'enzim, però majoritàriament és la capacitat de transferència electrònica la que diferencia la potència d'aquests derivats.

Com paràmetres hidrofòbics s'ha calculat amb ajuda del programa TRIBL [21] el Log P com caldria esperar els compostos més actius presenten un major Log P, resultat que concorda amb anteriors estudis [16,17] que postulen l'existència d'una regió hidrofòbica en la regió del centre actiu de la COX.

Finalment com paràmetres estèrics s'ha considerat la distància per l'Amfenac entre el nitrogen amino i l'àtom en posició *para* del segon anell aromàtic (6,69 Å) i pel Fenclofenac la distància entre el carboni en meta del grup fenilacètic i el substituent en *orto* del segon anell aromàtic (6,61 Å), ja que aquestes distàncies millor defineixen la longitud de la regió reactiva del centre actiu i que es corresponen amb la que presenta la conformació *desplegada* de l'àcid araquidònic entre el C5 i el C12 que són els carbons que participen en les reaccions de formació de l'endoperòxid i que és de 6,97 Å. En les taules dels articles referits aquestes distàncies oscil·len entre 6,3 i 7,2 Å pels diferents derivats del Fenclofenac i de l'Amfenac.

La correlació per regressió múltiple obté que tant per l'amfenac com pel fenclofenac l'activitat antiinflamatòria *in vivo* correlaciona amb la suma de la densitat electrònica  $\pi$  dels anells aromàtics i amb el paràmetre estèric de distància. En aquest sentit els compostos més actius presenten una elevada densitat electrònica en els anells aromàtics a diferència dels menys actius que la presenten més baixa, aquest fet concorda amb els resultats obtinguts per altres autors [17,20] que assenyalaven la possible existència d'una regió acceptora d'electrons  $\pi$  en la regió del centre actiu.

Cal destacar que a més en l'Amfenac la densitat elèctronica  $\pi$  del segon anell aromàtic correlaciona amb l'activitat antiinflamatòria *in vivo* segons l'equació 1.

$$p\Delta V = 1.524 (\pm 0.04) (\pi_B) + 0.201 (\pm 0.05) \quad (\text{eq. 1})$$

$$n = 20, r = 0.855, s = 0.213, F = 49.02$$

Aquests resultats concorden amb resultats experimentals obtinguts per altres autors que indicaven [17,20] que en el centre actiu de la COX existiria una regió acceptora d'electrons.

La representació dels mapes de PEM indiquen que els derivats fenilacètics tindrien cinc mínims de potencial electrostàtic, sent cinc possibles punts d'interacció complementaris amb residus del locus de la COX: A) situat en el grup carboxílic, B) en l'entorn del grup amino, C) en el grup carbonil que connecta els dos anells aromàtics i D) i E) a cada banda del segon anell aromàtic. Aquests mapes de PEM es representen en la figura 24, per: a) el compost cap de sèrie (Amfenac), b) un derivat poc actiu 4-metil i c) un derivat més actiu (*p*-brom).

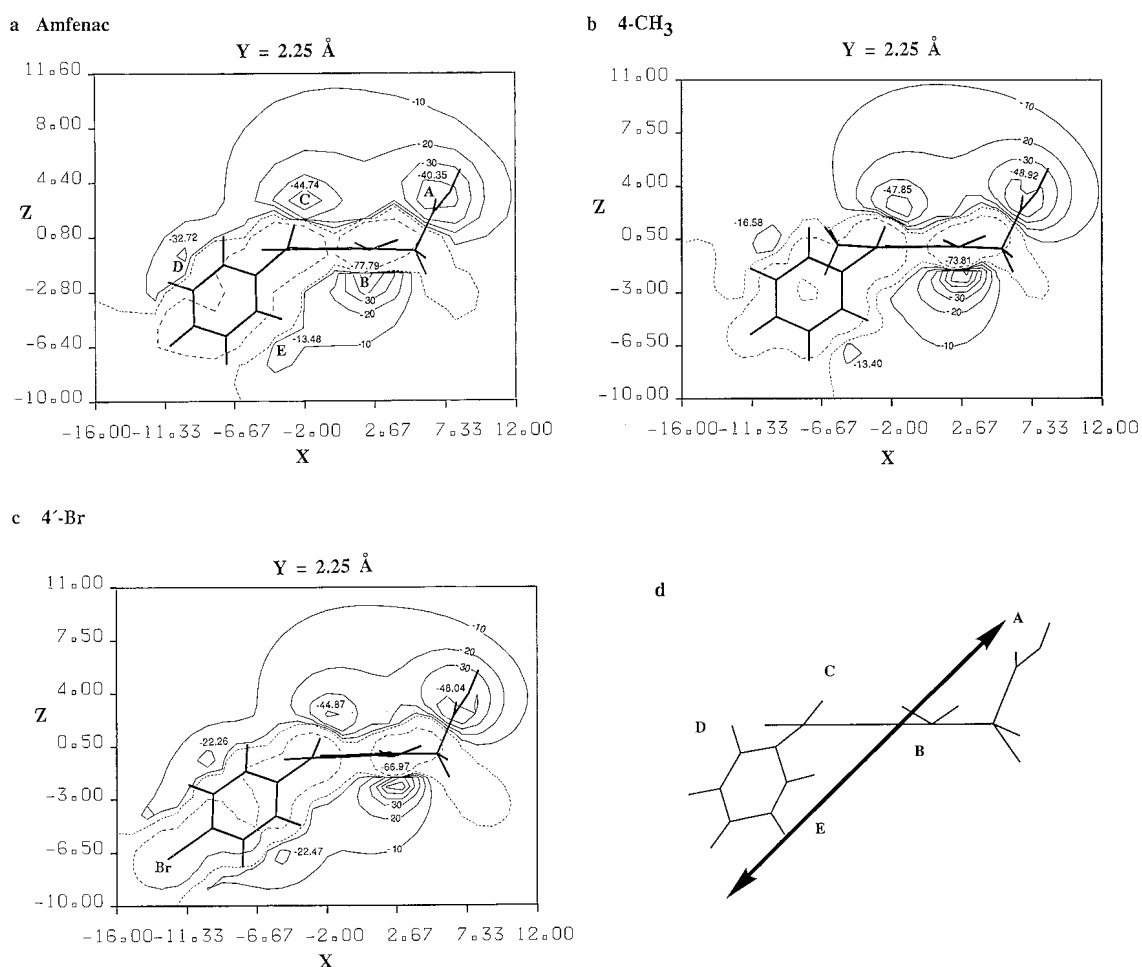


Figura 24. Representació dels mapes de PEM per a) l'Amfenac, b) un compost poc actiu (4-metil) i c) un compost actiu (*p*-brom-fenil), els compostos actius (c) incrementen els mínims de potencial electrostàtic en l'entorn del segon anell aromàtic. En d) es proposa un possible vector d'orientació dels inhibidors.

Aquests resultats mostren per una banda una similitud de flexibilitat conformacional entre el substracte àcid araquidònic i els inhibidors derivats de l'Amfenac i del Fenclofenac. Sent un possible mecanisme d'aquests compostos la inhibició competitiva



del substrate àcid araquidònic. Aquesta flexibilitat permetria una adaptació dels grups actius que han d'interaccionar amb els grups complementaris del locus de la COX, entre aquests grups destaquen el grup carboxílic que seria un primer punt d'anclatge i el segon anell aromàtic que permetria una transferència de càrrega electrònica  $\pi$  amb una regió complementària del centre actiu.

### 4.2.3 Estudi del mecanisme dels Fenamats

La família dels Fenamats és també coneguda com dels *N*-arilantranílics, ja que tots aquests derivats tenen en comú el nucli de l'àcid *N*-arilantranílic que es representa en la figura 25, aquest grup de fàrmacs comprèn importants AINE que s'utilitzen en el tractament de molts processos antiinflamatoris tant aguts com crònics.

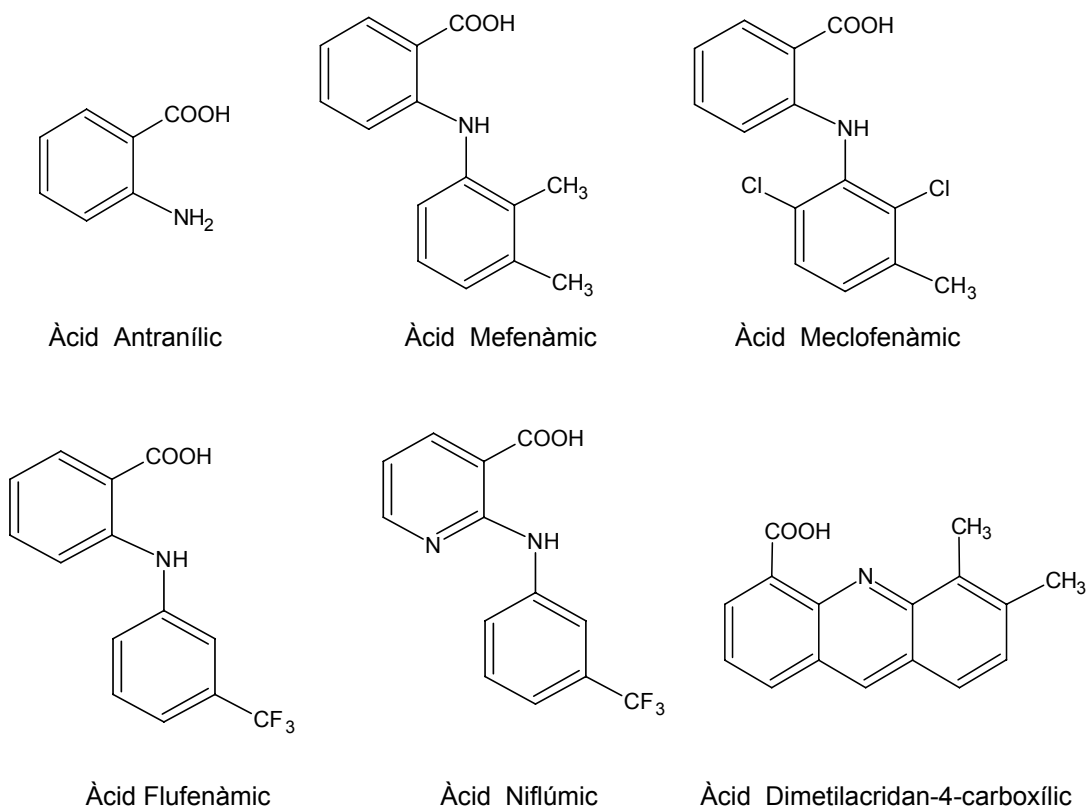


Figura 25. Importants Fenamats antiinflamatoris derivats de l'àcid antranílic.

Entre els Fenamats més coneguts destacaríem a l'àcid meclofenàmic (Meclomen<sup>®</sup>), l'àcid niflúmic (Actol<sup>®</sup>), l'àcid flufenàmic (Movilisin<sup>®</sup>) i a l'àcid mefenàmic (Coslan<sup>®</sup>), (Landruma<sup>®</sup>), tots ells es representem en la Figura 25.

#### 4.2.3.1 Metodologia i etapes d'estudi

L'estudi QSAR i del possible mecanisme d'inhibició amb que actuarien els derivats *N*-Ariланtranílics s'ha realitzat seguint les següents etapes:

1) A l'igual que per l'Amfenac i Fenclofenac, en una primera etapa s'ha optimitzat la geometria inicial dels compostos objecte d'estudi entre els quals s'han inclòs dos compostos de la família de l'àcid acridan-4-carboxílic amb l'objectiu d'analitzar la importància de l'angle entre els dos anells aromàtics, ja que com s'observa en la figura 20 els compostos acridan-carboxílics són plans. Les geometries inicials de partida s'han obtingut a partir de dades cristal·logràfiques [22] i amb l'ús de la Bases de dades estructural de Cambridge [12].

2) En una segona etapa s'ha procedit a l'estudi conformacional amb mètodes mecanoquàntics i de mecànica molecular ja descrits en el capítol 3. Aquest estudi ha comportat l'optimització total de la geometria amb mètodes semiempírics AM1 i PM3 per cada estructura generada per la lliure rotació que s'ha fet des de 0° a 345° a intervals de 15°, obtenint les conformacions més estables energèticament (minimum energy conformations) que després s'han verificat amb l'algoritme de Newton-Raphson del programa DISCOVER [13]. A més d'utilitzar els mètodes semiempírics AM1 i PM3, també s'han optimitzat i comparat entre sí les estructures de mínima energia amb mètodes *ab initio* STO-3G, 3-21-G i 6-31G\*. Mètodes que s'han comparat entre ells per tal de discernir quin o quins d'ells serien més convenients per a l'estudi d'aquestes molècules.

3) Superposició o *fitting* de les conformacions de mínima energia obtingudes en l'etapa anterior amb la conformació bioactiva de l'àcid araquidònic. Estudi de la geometria de les conformacions obtingudes incloent a l'anàlisi de l'angle entre els anells aromàtics i relació amb l'activitat antiinflamatòria.

4) Càlcul de diferents paràmetres estructura-activitat (hidrofòbics, electrònics i estèrics) dels compostos estudiats per tal d'obtenir una relació entre l'activitat *in vivo* que han estat obtingudes a partir dels estudis de Westby [23] i de Scherrer [24,25] i que corresponen al test *in vivo* de disminució del volum pleural en l'edema provocat per

injecció intramuscular de blau de carragenina, sent la dosi de compost antiinflamatori administrada de 50 mg/Kg.

6) Per últim, sabent els factors estructurals i fisicoquímics que són favorables a una major activitat farmacològica dels compostos estudiats és pot proposar un model estructural que expliqui el possible mecanisme d'acció dels compostos derivats de l'àcid antranílic.

#### 4.2.3.2 Resultats i discussió

En un primer estudi s'ha optimitzat completament l'estructura de set compostos entre els quals es troben els àcids mefenàmic i flufenàmic, així com dos compostos derivats de l'àcid acridan carboxílic que al ser pleners ens informaran sobre la importància de l'angle entre els dos anells aromàtics. En una segona etapa s'ha procedit a l'anàlisi conformacional AM1 de la lliure rotació dels angles dihedres que permeten la lliure rotació dels grups carboxílic, amino i del segon anell aromàtic tal i com mostra la figura 26.

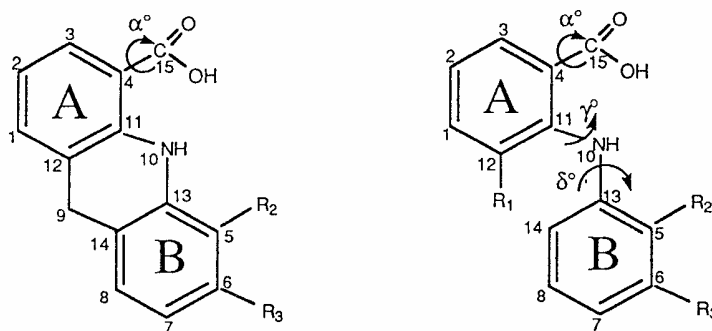


Figura 26. Definició dels angles dihedres utilitzats en l'estudi conformacional dels derivats de l'àcid acridan-4-carboxílic i N-aryl-antranílic.

Com a resultat de l'anàlisi conformational que es va realitzar amb el mètode semiempíric AM1 es van obtenir els mapes energètics que es mostren en la figura 27 i que posteriorment per mecànica molecular.

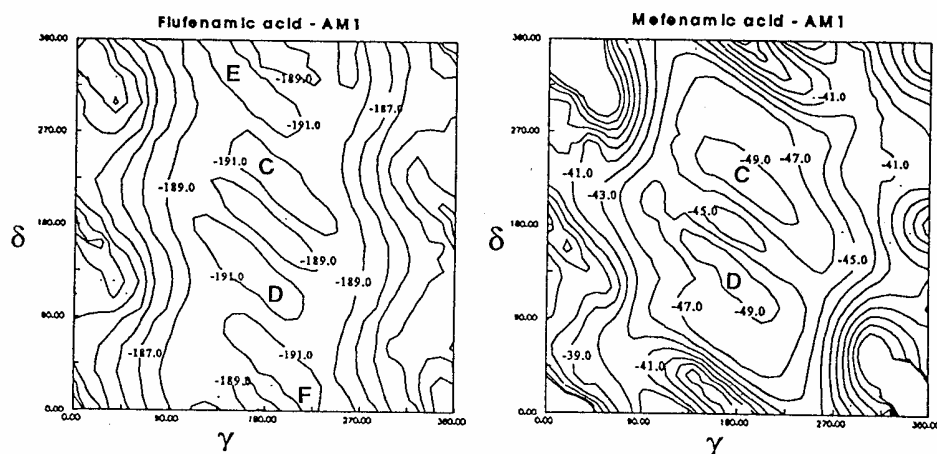


Figura 27. Mapes conformationals obtinguts amb el mètode semiempíric AM1 per l'àcid flufenàmic i mefenàmic.

L'àcid flufenàmic va mostrar 4 conformacions de mínima energia dos amb el grup trifluorometil per sobre i dos amb el grup trifluorometil per sota del segon anell aromàtic. En canvi, l'àcid mefenàmic va obtenir dues conformacions: una amb els grups metil per sobre i una altra amb els grups metil per sota del segon anell aromàtic. Aquestes conformacions es mostren en la figura 28.

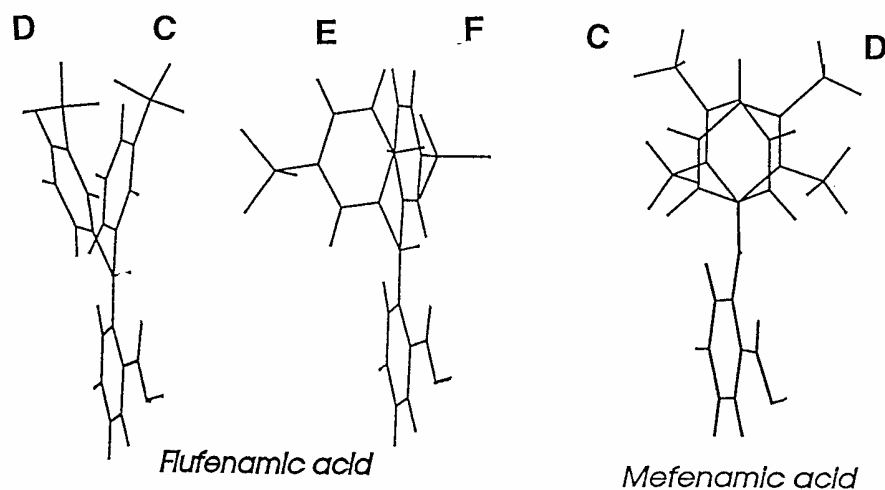


Figura 28. Conformacions de mínima energia dels àcids flufenàmic i mefenàmic obtingudes dels mapes conformationals de la figura 27.

Aquestes estructures de mínima energia obtingudes com a resultat de l'anàlisi conformational van ser comparades amb la conformació bioactiva de l'àcid araquidònic per superposició o *fitting* aconpleint amb el model de Gund i Shen [17] i d'Appleton i Brown [20] tal i com mostra la figura 29, sent la distància entre dos punts d'interacció de l'ordre de 7 Å sent molt semblant a la de l'àcid araquidònic (6,97 Å).

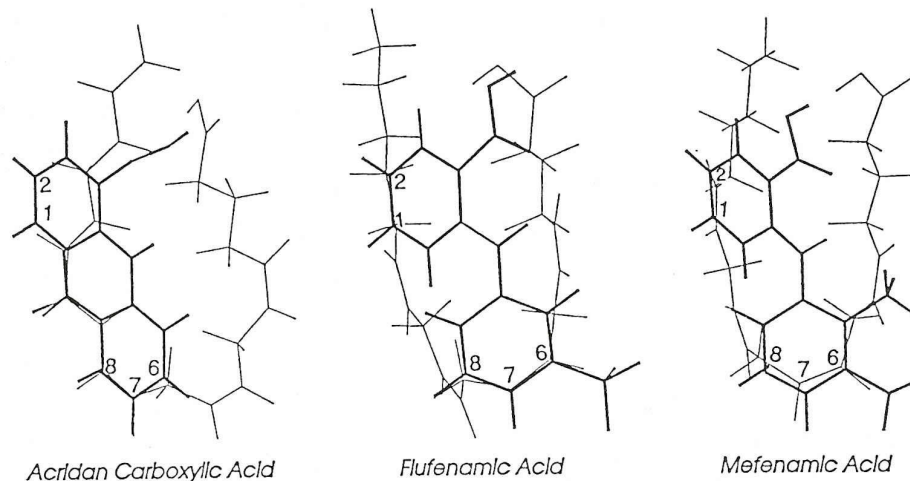


Figura 29. Superposició de les conformacions de mínima energia dels fenamats objecte d'estudi amb l'àcid araquidònic segons el model d'Appleton i Brown.

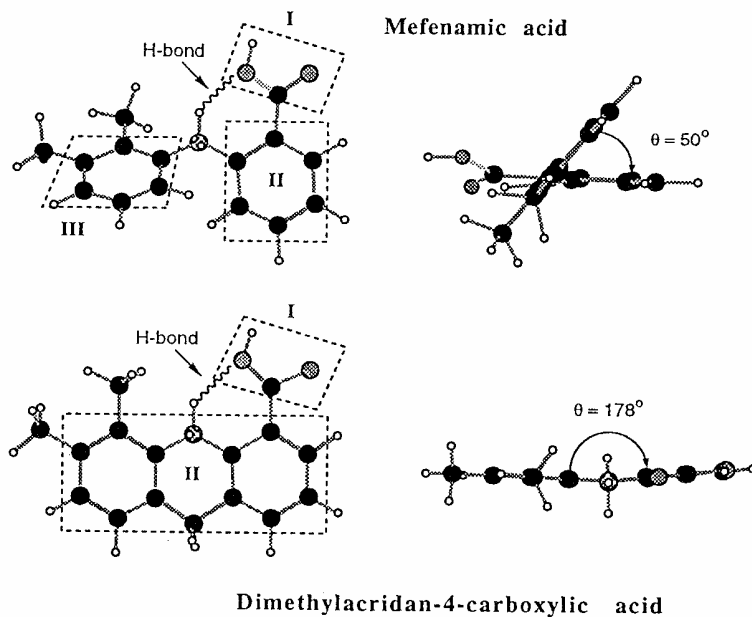


Figura 30. Estudi comparatiu de la geometria dels mínims conformationals obtinguts per l'àcid mefenàmic i dimetil-acridan-4-carboxílic.

En quant a l'angle entre els dos anells aromàtics per l'àcid flufenàmic va ser de  $44^\circ$  i per el mefenàmic de  $50^\circ$  dades que coincidien plenament amb les dades cristal·logràfiques [22], com era d'esperar els dos derivats de l'àcid acridancarboxílic van mostrar una disposició planar sent de  $177,78^\circ$  per l'àcid acridan-4-carboxílic i  $176,35^\circ$  per l'àcid dimetilacridan-4-carboxílic tal i com mostra la figura 30.

Els derivats acridan-4-carboxílic tot i presentant propietats electròniques òptimes per a una bona activitat antiinflamatòria (densitat electrònica en els anells aromàtics) en canvi mostren experimentalment una menor l'activitat en comparació amb els àcids flufenàmic i mefenàmic a causa de la dificultat d'adaptació dels anells aromàtics al receptor provocada per la seva disposició planar.

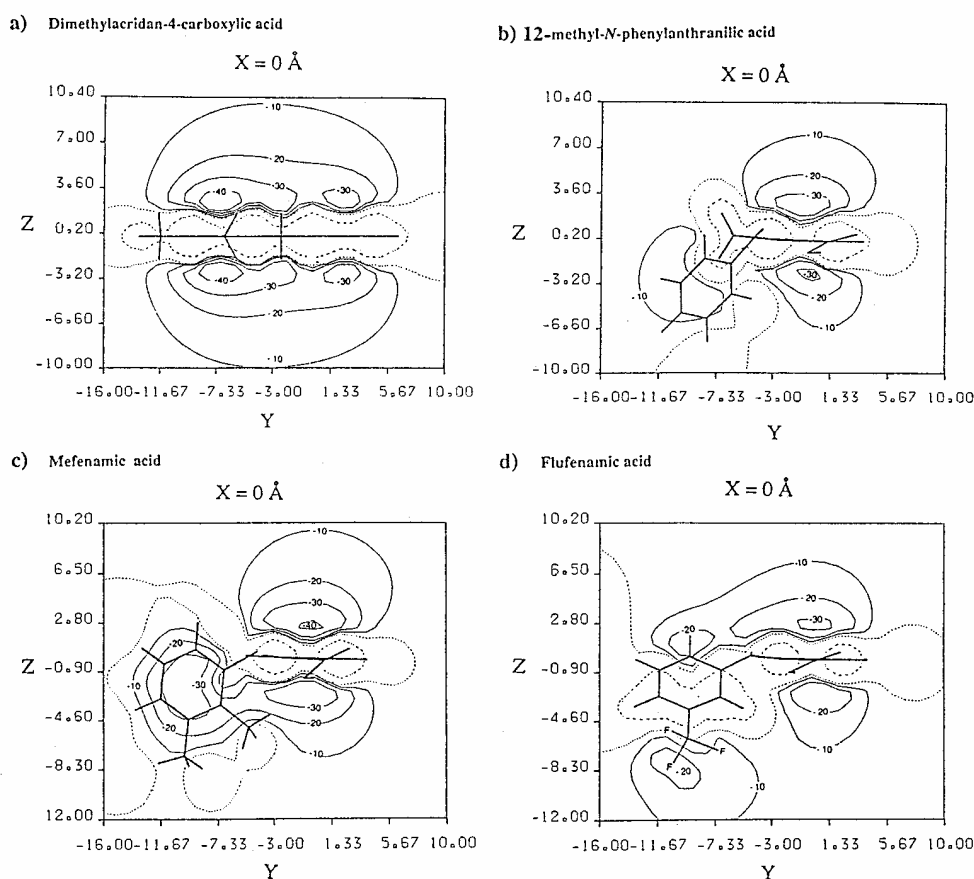


Figura 31. Representació dels mapes de PEM per a) l'àcid dimetilacridan-4-carboxílic, b) un compost poc actiu àcid 2-metil-N-fenil-antranílic, c) àcid mefenàmic i d) àcid flufenàmic. Els derivats més actius incrementen els mínims de potencial en el segon anell aromàtic.

La representació dels mapes de MEP representats en la figura 31 demostra la importància de la distribució dels mínims de potencial electrostàtic en l'entorn del segon anell aromàtic i com la disposició d'aquests mínims amb un angle entre 40°-55° és la que mostren els compostos més actius (Mefenàmic, Flufenàmic).

Tanmateix, l'àcid dimetilacridan-4-carboxílic presenta mínims de potencial molt extensos però que no adopten l'angle adequat.

La importància de l'angle entre els dos anells aromàtics coincideix amb els resultats que ja han postulat ja alguns autors com Moser i col.laboradors [26].

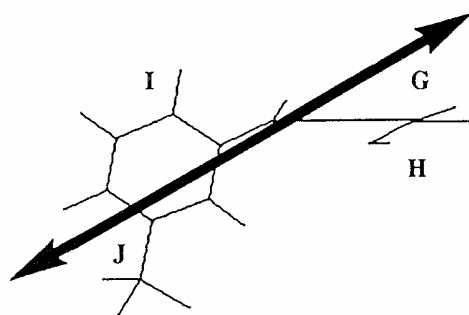


Figura 32. Vector d'orientació per la interacció dels derivats *N*-aril-antranílics en el locus de la COX i que connectaria els mínims de potencial del grup carboxílic amb el del segon anell aromàtic.

La distribució del potencial electrostàtic en l'entorn molecular indica un possible vector d'orientació en el locus de l'enzim, aquest vector d'orientació que es mostra en la figura 32 connectaria el grup carboxílic amb el segon anell aromàtic, vector que coincideix amb l'obtingut pel derivat arilacètic amfenac representat en la figura fet que coincideix amb els resultats obtinguts pels compostos arilacètics (Amfenac i Fenclofenac) estudiats en l'apartat 4.2.2 i en la figura 24d (pàg. 124).

Com el mecanisme d'aquests compostos és similar al dels arilacètics es van calcular com paràmetres electrònics la suma de la densitat electrònica  $\pi$  dels àtoms de carboni dels anells aromàtics que es mostren en la Taula 4.

A l'igual que per l'Amfenac i Fenclofenac resulta que la densitat electrònica correlaciona amb l'activitat farmacològica definida per  $p\Delta V$  que correspon al logaritme negatiu de la disminució del volum de l'edema pleural provocat per l'injecció de blau de carragenina. Tanmateix la diferència entre la densitat electrònica dels dos anells aromàtics ( $\pi_A - \pi_B$ ) també correlaciona amb l'activitat antiinflamatòria *in vivo* segons l'equació 2. La capacitat predictiva es mostra en la Taula 5 on es comparen els valors d'activitat observats experimentalment amb els calculats amb l'equació 2.

$$p\Delta V = 2.17 (\pm 0.04) (\pi_A - \pi_B) + 3.73 (\pm 0.07) \quad (\text{eq. 2})$$

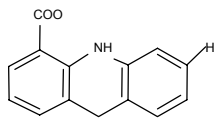
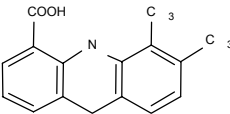
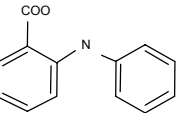
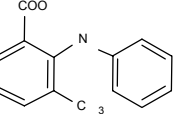
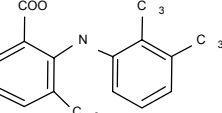
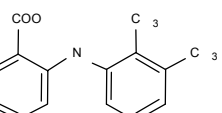
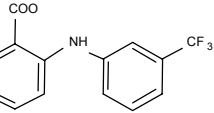
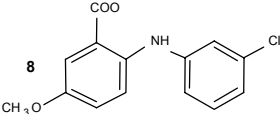
$$n = 8, r = 0.916, s = 0.181, F = 29.16$$

La incorporació d'altres paràmetres com de distància o estèrics i de lipofília va millorar significativament l'equació 1, com paràmetre de distància és va prendre la distància d'encaix en el centre actiu els dos punt d'interacció obtinguts per superposició amb l'àcid araquidònic, aquesta distància va resultar l'existent entre el carboni del grup carboxil  $C_7$  i el substituent en posició meta  $R_{24}$  ( $dC_7-R_{24}$ ) i que s'indica en la taula- 4.

Com a paràmetre per avaluar la lipofília-hidrofília dels derivats *N*-Ariilantranílics es va calcular el Log P (taula-4) amb ajuda del programa TRIBL [21]. La incorporació d'aquests dos paràmetres  $dC_7-R_{24}$  i Log P va acabar d'ajustar l'activitat amb els paràmetres estudiats, ( $r = 0.969$ ,  $n = 8$ ,  $s = 0.171$ ,  $F = 36.21$ ).

Per tant els derivats fenàmics (a l'igual que els fenilacètics) actuarien amb un possible mecanisme d'inhibició competitiva de la COX-1, sent important la llibertat conformacional dels grups actius (carboxílic, amino i del segon anell aromàtic) per primer fixar-se al locus receptor i segon permetre una transferència de càrrega electrònica que es produiria a través del segon anell aromàtic tenint especial rellevància l'angle entre els dos anells aromàtics i la lipofília d'aquests inhibidors.



Compost	% Inh.	pΔV Obs.	pΔV Calc.
1 	29 %	1.4624	
2 	22 %	1.3424	
3 	55 %	1.7403	
4 	25 %	1.3979	
5 	24 %	1.3802	1.3368
6  (Mefenamic Acid)	50 %	1.6989	1.6732
7  (Flufenamic Acid)	60 %	1.7781	1.7420
8 	30 %	1.4771	1.4328

Taula 5. Valors d'activitats observades experimentalment i calculades segons l'equació 2 dels derivats fenàmics.

Posteriors estudis QSAR recollits en l'article de l'apèndix: *QSAR in the nonsteroidal anti-inflammatory agents: The fenamic acids*. C.G. Wermuth (ed.) en Trends in QSAR and Molecular Modeling 92, pp. 560-561 (1993) on s'amplia la sèrie de compostos estudiats (n=19) i fent servir altres activitats antiinflamatòries també obtingudes de la bibliografia amb els estudis de Kaltenbronn i Scherrer [25] fent servir el test *in vivo* de Finney [28] de disminució de l'eritema provocat per radiació U.V

Aquests resultats van corroborar la importància dels paràmetres electrònics com la densitat electrònica i les energies de l'orbital HOMO en especial del segon anell aromàtic (anell B) resultats que concordaven plenament amb els obtinguts inicialment amb els compostos arilacètics. Però, a més van aportar com a novetat la importància que té el moment dipolar en aquests compostos, correlacionant amb l'activitat veure l'article de l'apèndix referit: *QSAR in the nonsteroidal anti-inflammatory agents: The fenamic acids*. C.G. Wermuth (ed.) en Trends in QSAR and Molecular Modeling 92, pp. 560-561 (1993). Aquests resultats demostren que la relació entre la densitat electrònica dels dos anells aromàtics confereix una certa polaritat a la molècula, fet que facilita la correcta interacció amb el receptor i posterior transferència de càrrega electrònica. Alguns d'aquests moments dipolars es mostren en la taula-2 de l'article: *Molecular electrostatic potential in differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) by non-steroidal antiinflammatory drugs*. *J. of Molec.Struct. (Theochem)*, 397, 59-77 (1997).

L'estudi d'altres derivats *N*-arilantranílics amb potència antiinflamatòria similar als àcids meclofenàmic i l'àcid niflúmic van servir per verificar els resultats anteriors obtinguts pels derivats de l'àcid acridan-carboxílic i de l'àcid mefenàmic i flufenàmic, aquests resultats es mostren en l'anterior article i en: *Conformational analysis of the antiinflammatory fenamates: a molecular mechanics and semiempirical molecular orbital study*. *J. of Molec.Struct. (Theochem)*, 335, 215-227 (1995).

En aquests estudis els mètodes de mecànica molecular (MM) obtenen conformacions més planars que els mètodes semiempírics AM1 i PM3 que entre ells dos obtenen en línies generals resultats força similars amb diferències no significatives.

L'**àcid meclofenàmic** a l'igual que l'àcid mefenàmic (figura 28, pàg. 128) pot adoptar dues conformacions de mínima energia: una metil- $\beta$  (amb el grup metil del segon anell aromàtic per sobre del pla de l'anell) i una metil- $\alpha$  (amb el grup metil per sota), també cal indicar que ambdues conformacions tenen una preferència per adoptar una configuració *cis* del grup metil respecte al grup carboxílic, el més important però, és l'angle que formen els dos anells aromàtics que és més perpendicular que en la resta de compostos *N*-arilantranílics: meclofenàmic 75°, mefenàmic 50°, flufenàmic 44°, niflúmic 9° (PM3), aquest fet és degut al volum dels substituents en posicions *orto* del segon anell, que al tractar-se de dos àtoms de clor i ser grups voluminosos fan que l'àcid meclofenàmic adopti una configuració antiplanar dels dos anells aromàtics, disposició que dificulta la conjugació dels electrons del grup amino amb els dos anells aromàtics. Com veurem més endavant aquest fet serà clau per entendre el diferent mecanisme d'inhibició de l'àcid meclofenàmic de la resta de compostos.

Aquest estudi conformacional també va verificar l'anterior estudi AM1 on l'àcid mefenàmic presentava dues conformacions de menor energia: una dimetil- $\beta$  (amb els grups dimetil per sobre de l'anell aromàtic) i una altra dimetil- $\alpha$  (amb els grups dimetil per sota de l'anell aromàtic).

Per últim, els **àcids niflúmic i flufenàmic** presenten 4 conformacions de mínima energia: 2 trifluorometil- $\beta$  (amb el grup trifluorometil per sobre de l'anell aromàtic) i 2 trifluorometil- $\alpha$  (amb el grup trifluorometil per sota de l'anell aromàtic), cadascuna d'aquestes parelles de conformacions es diferencien entre si per la disposició *cis* o *trans* del grup trifluorometil respecte al grup carboxílic.

Cal destacar que l'àcid niflúmic és el derivat antranílic que adopta una conformació quasi planar dels dos anells aromàtics 9° (PM3), aquesta disposició és deguda a la substitució del grup fenil per un anell piridino.

En quant a la distribució dels orbitals frontera HOMO–LUMO en l'àcid mefenàmic, flufenàmic i niflúmic es localitza en els dos anells aromàtics, aquesta distribució és deguda a l'elevat grau de piramidalització d'aquests compostos que permet la conjugació  $\pi$ – $\pi$  entre els dos anells aromàtics amb implicació del par d'electrons de l'àtom de nitrogen.

Cal destacar, que l'**àcid niflúmic** presenta una energia de l'orbital LUMO molt més baixa que la resta de derivats (-1.6 eV) com mostra la taula 3 de l'article de l'apèndix: *Conformational analysis of the antiinflammatory fenamates: a molecular mechanics and semiempirical molecular orbital study. J.of Molec.Struct. (Theochem)*, 335, 215-227 (1995).

Aquest fet podria indicar que aquest compost és més susceptible d'un atac nucleòfil que la resta de fenamats.

En quant a l'**àcid meclofenàmic** mostra una distribució exclusiva de l'orbital HOMO en el primer anell aromàtic (fragment antranílic), aquesta distribució és deguda a la disposició perpendicular dels dos anells aromàtics (75°, AM1) motivada per la substitució de dos àtoms halogenats en el 2n anell aromàtic. Aquesta disposició dificulta el fenomen de conjugació electrònica entre l'àtom de nitrogen del grup amino i el segon anell aromàtic concentrant l'orbital HOMO en el fragment antranílic.

Aquesta característica també queda patent en la representació dels mapes de potencial electrostàtic molecular (PEM) i en l'estudi de les càrregues electrostàtiques. Així en quant als mapes de PEM, apareix un mínim de potencial molt més negatiu que en la resta de compostos en l'entorn del grup amino (mínim E= -29,97 Kcal/mol, 3-21G), i un augment remarcable de la càrrega electrostàtica de l'àtom de nitrogen.

Aquest resultat podria explicar la diferència en el mecanisme d'inhibició temps-dependent de l'àcid meclofenàmic respecte a la resta de derivats, sent en aquest compost més irreversible degut a una unió més forta susceptible d'un atac electròfil més intens en l'entorn del grup amino.

D'altra banda s'ha fet un estudi comparatiu per tal de definir quina és la base de càlcul que millor reproduceix les propietats moleculars dels compostos objecte d'estudi. Entre aquestes propietats s'han estudiat les càrregues electrostàtiques de cada àtom, el moment dipolar i les energies dels mínims de PEM.

Aquestes propietats moleculars s'han calculat en primer lloc amb el programa CHELPG (versió Merz-Kollman) amb la base *ab initio* 6-31G\*\*, que és la que millor reproduceixen la càrrega electrostàtica en l'entorn molecular, però a costa d'una gran despesa de càlcul, aquests valors s'han correlacionat amb les semiempíriques: MNDO, AM1, *ab initio*: STO-3G, 3-21G i 6-31G\*.

Els resultats es mostren en la Taula 3 de l'article de l'apèndix: *Molecular electrostatic potential in differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) by non-steroidal antiinflammatory drugs. J. of Molec.Struct. (Theochem), 397, 59-77 (1997).*

Els coeficients de correlació indiquen que la base 3-21G és la que millor reproduceix els valors obtinguts per la base 6-31G\*\* i amb un despesa de càlcul molt més acurada. Per aquest motiu s'ha seleccionat en posteriors càlculs el mètode *ab initio* 3-21G.

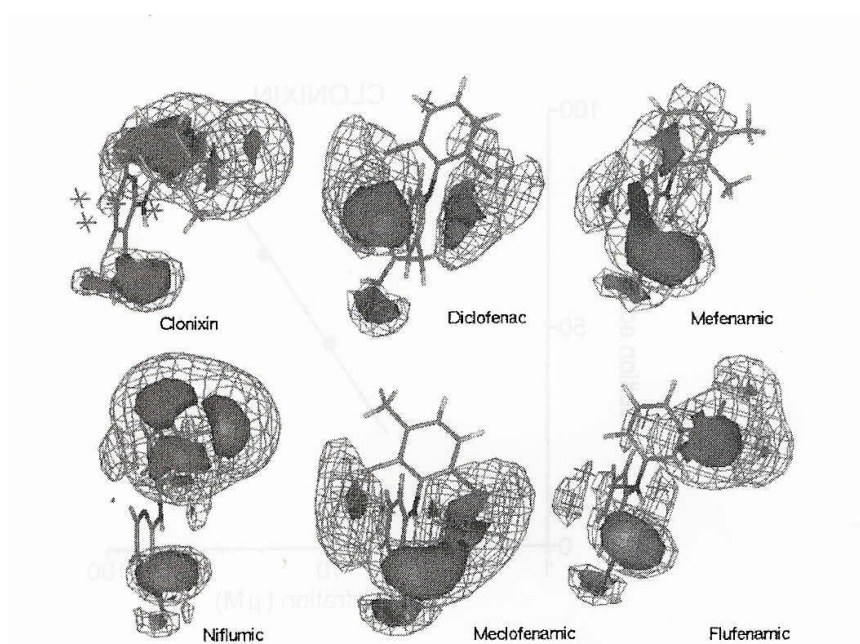


Figura 33. Representació dels mapes de PEM per els derivats antranílics comparats amb el diclofenac i la clonixina. Els contorns sòlids corresponen a un potencial de  $-20$  Kcal/mol i els discontinus a  $-10$  Kcal/mol.

Del resultat dels mapes de PEM de la figura 33 indica que aquests derivats presenten en general tres possibles punts d'interacció amb la COX i que serien clau en el mecanisme d'inhibició :

- el grup carboxílic que a l'igual que en els derivats arilacètics seria un primer punt d'interacció.
- el grup amino susceptible d'un atac electròfil o no el qual explicaria la tendència a seguir un mecanisme temps-dependent o temps independent.
- el segon anell aromàtic (anell B) que en funció de la natura química del substituent faria que la unió fos més forta amb la COX.

Alguns compostos com els derivats de l'àcid niflúmic poden presentar un quart punt d'interacció que es correspondria amb un mínim de PEM que es situa en l'entorn del nitrogen piridino, aquest mínim addicional podria explicar un altre tipus d'inhibició amb la COX.

La superposició dels mapes de PEM mostra una similitud en quant a la distribució del PEM en l'àcid meclofenàmic i el diclofenac, que situen els mínims de PEM en l'entorn del 1r anell aromàtic amb una distribució cònica que es mostra en la figura 34 a i b; mentre que en la resta de fenamats aquests mínims es localitzen en el 2n anell aromàtic, fet que coincideix amb la similitud de mecanisme d'inhibició de la COX de l'àcid meclofenàmic i diclofenac que seria temps dependent amb una unió forta quasi irreversible.

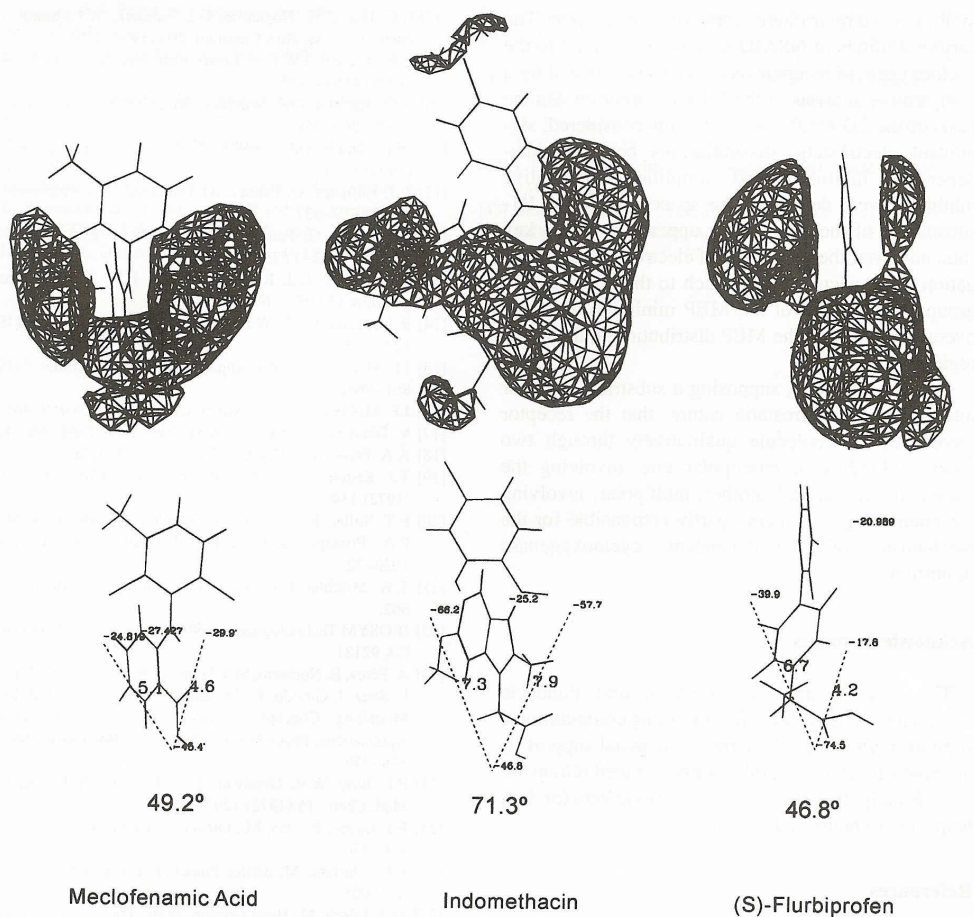


Figura 34a. Similitud de la distribució del PEM en l'àcid meclofenàmic, indometacina i flurbiprofen amb indicació de l'angle entre els mínims, en aquests tres compostos el PEM es distribueix en l'entorn del primer anell aromàtic.

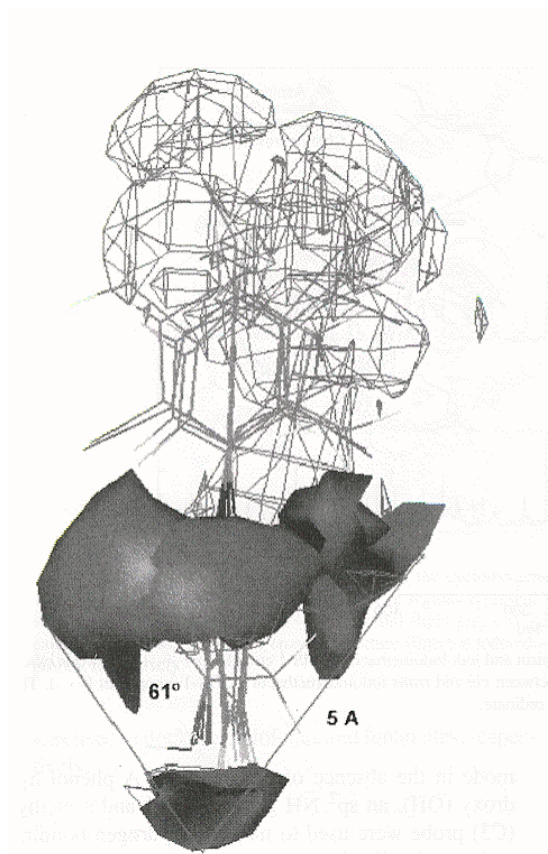


Figura 34b. Superposició dels mapes de PEM dels fenamats amb el diclofenac. Els contorns sòlids corresponen als mínims de l'àcid meclofenàmic i del diclofenac, mentre que les línies discontinües corresponen a les regions negatives per l'àcid flufenàmic, mefenàmic i niflúmic. Tots els contorns representen valors de potencial de  $-20$  Kcal/mol.

### **4.3 Estudi del mecanisme d'inhibició competitiva temps dependent dels derivats Arilpropionics en el locus del receptor de la COX-1**

#### **4.3.1 Estudi conformacional i estructural dels Arilpropionics**

La família dels derivats arilpropionics constitueixen una important de família d'AINE amb un gran nombre de compostos comercialitzats degut a la seva eficàcia en el tractament dels processos inflamatoris, així per exemple destaquem el naxoprén (Antalgin<sup>®</sup>, Denaxpren<sup>®</sup>, Naprosyn<sup>®</sup>), el ketoprofén (Arcental<sup>®</sup>, Fastum<sup>®</sup>, Orudis<sup>®</sup>), el flurbiprofén (Froben<sup>®</sup>, Neartrol<sup>®</sup>, Tulip<sup>®</sup>), l'ibuprofén (Algiadin<sup>®</sup>, Altior<sup>®</sup>, Neobufen<sup>®</sup>, Espidifen<sup>®</sup>) i el piroprofén (Rengasil<sup>®</sup>) entre altres l'estructura d'alguns d'aquests compostos es representa en la figura 35.

Tots aquests derivats presenten en comú l'esquelet de l'àcid 2-fenilpropioníc, sent l'isòmer S l'actiu, també presenten una similitud de mecanisme d'inhibició de la COX-1 i COX-2 amb els *N*-arilantranílics i els derivats arilacètics [29-30]: així segons els efectes que causen en la cinètica de reacció de la COX-1 l'ibuprofén, el cicloprofén, el naxoprén tindrien un mecanisme d'inhibició competitiva temps independent similar a l'àcid mefenàmic, és a dir que la unió amb la COX no dependria del temps, mentre que el flurbiprofén, el piroprofén i el ketoprofén es trobarien en el grup d'inhibidors competitius temps-dependents d'unió forta conjuntament amb l'indometacina, el diclofenac, l'àcid meclofenàmic [31-32].

##### **4.3.1.1 Metodologia i etapes d'estudi**

Han estat similars que pels anteriors derivats *N*-Arilantranílics, i que hem descrit en l'apartat 4.2.3.1 (pàgines 126-127), però a més s'ha incorporat la tècnica de: *Molecular Modeling* per la superposició tant de les conformacions de mínima energia com dels mapes de PEM com de camp de forces GRID [34-35]. que s'han comparat per superposició amb compostos de les anteriors famílies estudiades Fenilacètics i *N*-Arilantranílics. Aquestes tècniques de modelatge s'han realitzat fent servir el hardware gràfic d'un ordinador Silicon Graphics<sup>®</sup> 4D/TG35 i utilitzant els programes de modeling de Biosym/MSI.



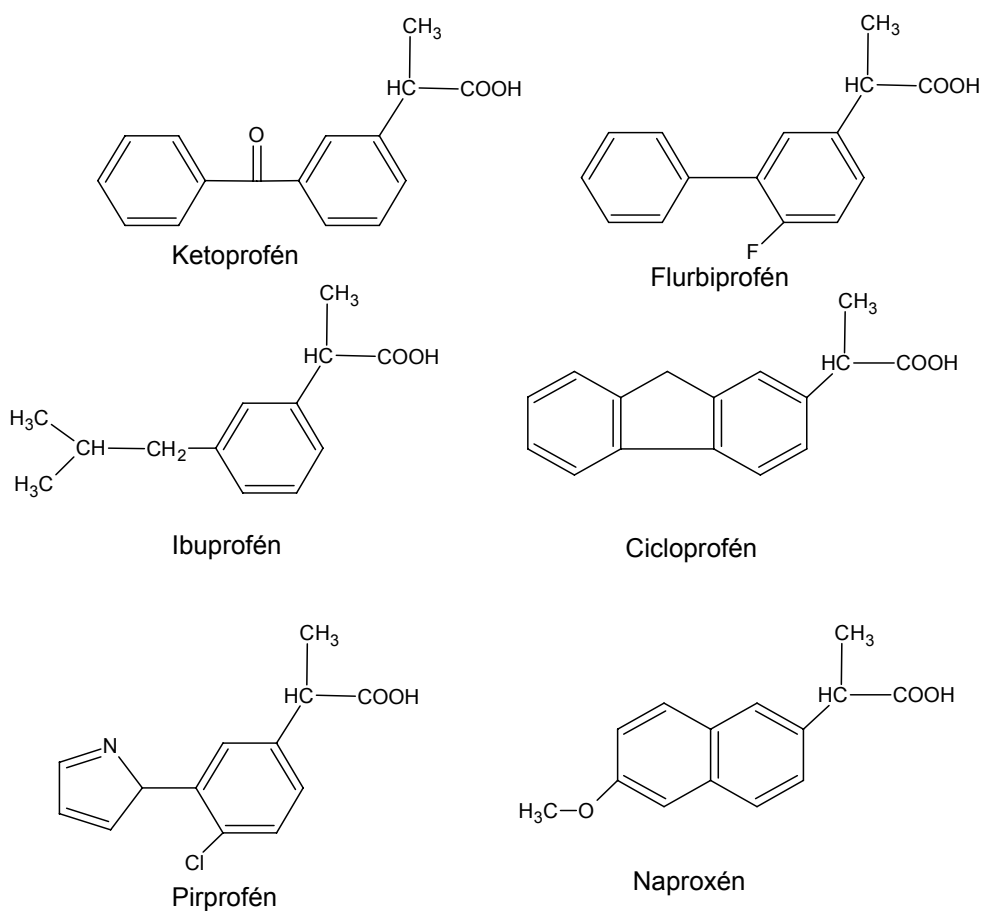


Figura 35. Estructura molecular d'alguns dels derivats Arilpropionics

#### 4.3.1.2 Resultats i discussió

Com en les anteriors famílies, l'estudi conformational mostra una llibertat de rotació del grup carboxílic i del carboni  $C_{\alpha}$  unit al primer anell aromàtic. Sent els compostos para substituïts: ketoprofen (amb un grup benzoïl) i l'ibuprofen (amb un grup benzil) els únics compostos que presenten 8 conformacions de mínima energia similars a les obtingudes per l'Amfenac i Fenclofenac: 4 conformacions: 2 "phenyl-up" amb el grup fenil del substituent cap amunt respecte al pla de l'anell aromàtic central i 2 "phenyl-down" amb el grup fenil del substituent cap avall respecte al pla de l'anell aromàtic central.

Per tant, conformacionalment aquests dos compostos arilpropionics: ketoprofén i l'ibuprofén tenen una llibertat de gir molt similar a la que presenten dels inhibidors arilacètics i *N*-arilantranílics amb igual mecanisme d'inhibició temps dependent, fet que indicaria la possibilitat que tots ells tinguessin una mateixa adaptabilitat al locus del receptor.

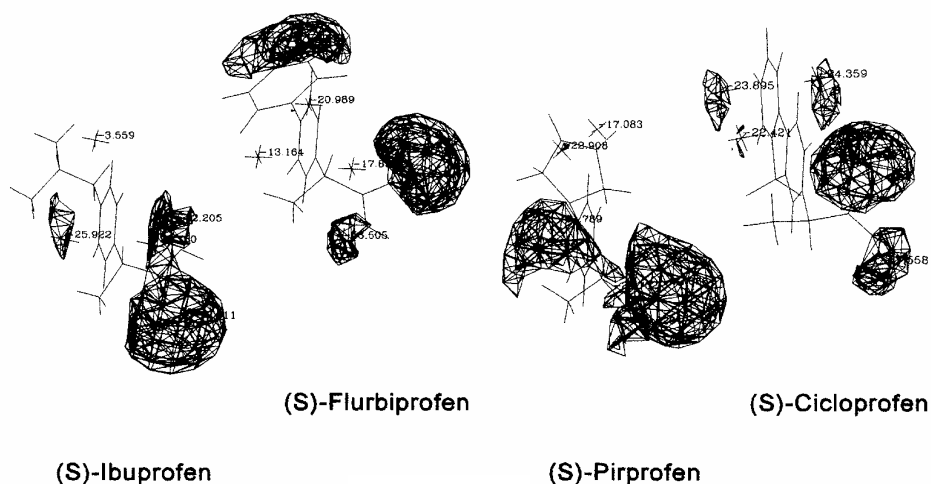


Figura 36. Distribució del PEM amb valor de  $-10$  Kcal/mol dels derivats Arilpropionics

L'estudi comparatiu dels mapes de PEM de les conformacions de mínima energia que es representen en la Figura 36 mostren una similitud de la distribució del potencial electrostàtic del (S)-flurbiprofén amb el (S)-pirprofén ja que s'observen dos mínims de potencial ben definits un en el grup carboxílic i un altre en el segon anell aromàtic, mentre que aquest segon mínim no s'observa en el (S)-ibuprofén i (S)-cicloprofén que mostren un únic mínim en el primer anell aromàtic (fragment fenilpropioníc).

Per altra banda la distribució de la càrrega electrostàtica en el (S)-flurbiprofén és molt similar a la que mostren la indometacina i l'àcid meclofenàmic, tenint aquests compostos un mecanisme conegut [31-33] d'inhibició competitiva temps-dependent amb unió forta, fet que es dedueix per la similitud dels mapes de 3D-PEM d'aquests tres compostos (Figura 34a) i als que es podria afegir un quart: el (S)-pirprofén que mostra un mapa de PEM similar al del (S)-flurbiprofén.

Aquests AINE amb mecanisme temps-depent mostren una superfície de PEM cònica i amb el vèrtex en el grup carboxílic molt similar a la que presentaven l'àcid meclofenàmic i el diclofenac en la figura 34b i amb un mínim de potencial electrostàtic molt negatiu en

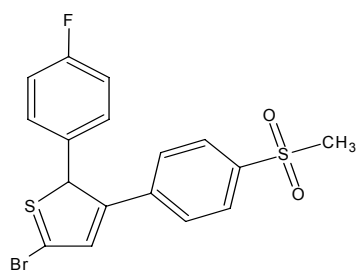
l'entorn del primer anell aromàtic que seria susceptible d'un atac electròfil, mentre que els temps-independents àcids flufenàmic, mefenàmic i niflúmic localitzen el PEM majoritàriament en l'entorn del segon anell aromàtic (contorn discontinu) no sent susceptibles d'un atac electròfil en el primer anell aromàtic.

A aquestes diferències d'entorn electrostàtic en les molècules dels compostos arilpropionics cal afegir les estructurals derivades de la geometria com per exemple l'angle entre els dos anells aromàtics que es comparen amb els compostos Arilacètics i *N*-Arilantranílics en la taula 6. També i degut a la importància que com hem vist tenen les propietats electròniques per diferenciar la interacció en el locus de la COX-1 mitjançant un possible atac electròfil (temps dependent) o no (temps independent) s'han incorporat els valors de les energies dels orbitals frontera HOMO-LUMO. En aquest sentit els compostos temps dependents

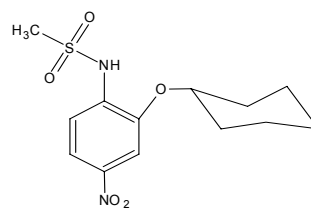
#### **4.4 Estudi del mecanisme d'inhibició competitiva temps dependent en el locus del receptor de la COX-2**

L'isoenzim COX-2 té més interès d'inhibició que la COX-1, ja que com hem vist en el capítol 2 els futurs AINE tenen un perfil d'inhibició selectiva de la COX-2 respectant al màxim l'activitat de la COX-1 que intervé en la producció de prostaglandines que intervien en funcions reguladores de l'organisme. Recordarem que els AINE inhibidors de la COX-2 poden agrupar-se [5] en quatre grups : 1) inhibidors competitius temps independents com l'ibuprofè, el cicloprofè i l'àcid mefenàmic; 2) inhibidors temps-dependents d'unió forta com la indometacina, el diclofenac, l'àcid meclofenàmic, el flurbiprofè, el ketoprofè, pirprofè, el NS-398, SC-558, DUP-697; 3) temps-dependents d'unió dèbil que fan una unió dèbil: el naxoprè i 4) Irreversible d'unió covalent com l'aspirina.

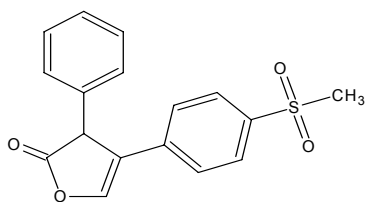
L'objectiu d'aquest capítol és analitzar també les propietats moleculars que condicionen les diferents interaccions d'aquests inhibidors en el centre actiu de la COX-2 .



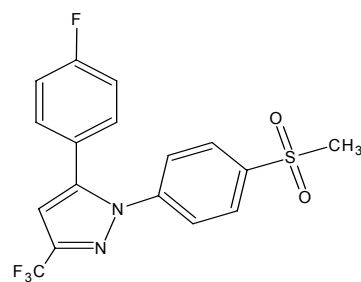
DUP-697



NS-398



Rofecoxib



SC-58125

Figura 37. Inhibidors selectius de la COX-2 temps dependent amb unió forta, tots ells tenen en comú un grup voluminós o sulfonil que s'adaptaria a la cavitat hidrofòbica que presenta la COX-2 (*side-pocket*).

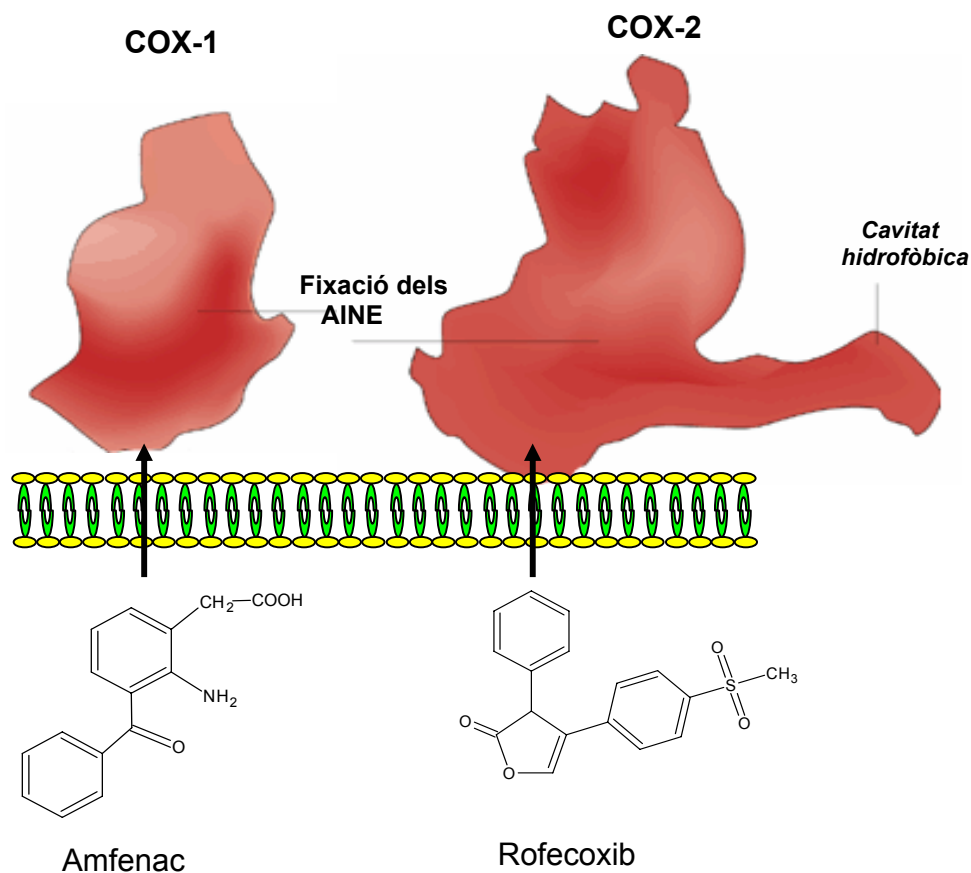


Figura 38. Representació dels isoenzims COX-1 i COX-2 amb dos AINE's que les inhibirien, els inhibidors de la COX-2 presenten en comú un grup voluminós o sulfonil que s'adaptaria a la cavitat hidrofòbica que presenta la COX-2 [27].

#### 4.4.1 Metodologia i etapes d'estudi

En una primera etapa s'ha construït el model de la COX-2 humana a partir de les dades cristal·logràfiques de la COX-2 de ratolí de diversos complexos: lligada al SC-558, també s'ha comparat la seva homologia amb la COX-1 humana, i amb el complex COX-1 de xai -iodosupfè, ja que la COX-1 i COX-2 tenen un elevat grau de similitud de seqüència. Tots els possibles residus ionitzables s'han considerat en l'estat que presentarien a pH fisiològic.

Els inhibidors escollits per l'estudi són els AINE més representatius de les famílies d'arilacètics (diclofenac, indometacina (indolacètic)), *N*-Aril-antranílics (Àcid mefenàmic, Àcid Meclofenàmic), (2*S*)-Arilpropionics (flurbiprofè, ketoprofè, naxoprè) i també s'han inclòs en aquest estudi potents inhibidors selectius de la COX-2 com el NS-398 i el SC-58125, la fórmula estructural d'aquests compostos es representa en la figura 37, com s'indica en la figura 38 aquests inhibidors tenen la presència d'un grup voluminós o sulfonil que s'adaptaria a la cavitat hidrofòbica de la COX-2 [27].

Les estructures d'aquests inhibidors que s'han utilitzat per l'anàlisi de *docking* amb la COX-2 s'han obtingut dels anteriors estudis del mecanisme d'inhibició de la COX-1, i van resultar de l'anàlisi conformacional i posterior optimització total de la geometria amb la base *ab initio* HF/6-31G(d) amb el programa Gaussian 94.

En una etapa posterior s'han analitzat amb ajuda del programa GRID les regions dels inhibidors que presenten àrees favorables a interaccionar químicament amb certs residus o grups químics (probes) com un grup hidroxil (OH), oxigen carboxil (O::, nitrogen amb par d'electrons lliure (N:=), aigua (H<sub>2</sub>O), grup hidrofòbic (C3) i altres. En aquestes energies d'interacció que calcula el programa GRID té en compte [34-35] les interaccions de Lennard-Jones, electrostàtiques i de pont d'hidrogen.

El *docking* d'aquests inhibidors amb la COX-2 s'ha realitzat amb el programa AutoDock 3.0 [36-37], que explora de forma automàtica l'anclatge conformacional de cada inhibidor amb el centre actiu de la COX-2, com hem vist en el capítol 3 per realitzar aquesta exploració AutoDock es fonamenta en la combinació d'algoritmes genètics amb camps de forces (Lamarckian genetics).

S'han realitzat dos estudis: el primer consisteix en què que Autodock reproduïxi el mode d'unió observat experimentalment (a partir de dades cristal·logràfiques i de mutacions) dels AINE a la COX-2 i el segon estudi realitzat és d'anclatge dels inhibidors al centre actiu de la COX-2. Aquesta segona exploració s'ha realitzat en un cub de 30 Å i amb una entramat de 0.25 Å. S'han realitzat un mínim de 100 simulacions de 50 cicles per cada inhibidor amb una temperatura inicial de simulació de 310°K i una constant dielèctrica  $\epsilon$  de 4r.

Els possibles complexos d'unió amb la COX-2 de mínima energia resultants d'AutoDock s'han optimitzats posteriorment amb mètodes de dinàmica molecular fent servir el programa AMBER 5.0. el mètode SHAKE ha estat utilitzat per mantenir les distàncies

d'enllaç.

Aquest programa ha permès calcular les càrregues les energies d'interacció de van der Waals per a cada complex (inhibidor-enzim). Prèviament s'han calculat les càrregues electrostàtiques a nivell.

Per últim per cada inhibidor s'ha calculat l'energia lliure d'unió tal i com s'indica en l'equació 2 :

$$\Delta G_x = \Delta G_x (\text{inhibidor-COX2}) - [\Delta G_x (\text{COX2}) + \Delta G_x (\text{inhibidor})] \quad (2)$$

El component electrostàtic  $\Delta G_{ele}$  que inclou l'efecte d'apantallament del solvent a la unió inhibidor-enzim s'ha determinat per l'equació de Poisson-Boltzmann (PB) implementada en el mòdul Delphi del programa Insight-II [43] i utilitzant les càrregues atòmiques *ab initio* (HF/6-31G) calculades prèviament per a cada inhibidor. Entre els components no-electrostàtics s'han determinat l'energia d'interacció de Lennard-Jones  $\Delta G_{vdw}$  i l'energia d'accessibilitat del solvent  $\Delta G_{SAS}$  [44].

#### 4.4.2 Resultats i discussió

El nostre model de COX-2 humana obtingut per les tècniques d'homologia presenta una gran similitud amb la COX-2 de ratolí mantenint-se la mateixa seqüència d'aminoàcids en un 87 % en el centre actiu. En comparació amb el centre actiu de la COX-1 existeixen variacions en alguns residus: així la His<sup>513</sup> i la Ile<sup>523</sup> de la COX-1 no es mantenen i en la COX-2 ocupen aquestes posicions la Arg<sup>513</sup> i Val<sup>523</sup>.

Degut a aquest canvi en la posició 523 (tenint la valina un menor volum que la isoleucina) el centre actiu de la COX-2 permet un major volum d'entrada dels inhibidors, sent més accessible dades que concorden amb estudis del centre actiu de la COX-2 obtinguts per altres autors [45].

#### 4.4.2.1 Estudi del mecanisme d'inhibició de la COX-2 pels compostos Arilacètics i Indolacètics

El resultat del complex obtingut amb el programa AutoDock 3.0 amb la COX-2 humana amb el posicionament en el centre actiu de la *cis*-indometacina (*cis*: fragment benzoil respecte a l'anell indòlic) concorda plenament amb les dades cristal·logràfiques [46-47], unint-se el grup carboxílic amb el grup guanidino de l'Arg<sup>120</sup>, fet que també succeeix en l'isoenzim COX-1.

Per altra part com es mostra en figura 4 de l'article de l'apèndix *Molecular modelling of the differential interaction between several non-steroidal anti-inflammatory drugs and human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 (h-PGHS-2)*. *J. of Molec. Graphics and Modelling*, 20, 329-343 (2002), l'oxigen del grup carbonil de la *cis*-indometacina s'uneix per pont d'hidrogen al grup hidroxil de la Ser<sup>530</sup> i el gru o-metoxi encaixa selectivament amb la Tyr<sup>355</sup> i l'Arg<sup>513</sup>. La *cis*-indometacina presenta una contribució de van der Waals a l'energia lliure d'unió amb la Val<sup>523</sup> molt més favorable (-4.8 Kcal/mol) que altres inhibidors que es mostren en la taula 1 de l'esmentat article. Tot semblaria indicar que aquesta Val<sup>523</sup> seria determinant en la interacció i en el mecanisme dels inhibidors selectius de la COX-2, ja que estudis de canvi per mutació de la Val<sup>523</sup> per una isoleucina (Ile<sup>523</sup> → Val<sup>523</sup>) mostra una notable pèrdua d'activitat per aquest compost [48].

D'altra banda el diclofenac a l'igual que els fenamats també s'uneix mitjançant el grup carboxílic a l'Arg<sup>120</sup>, però adopta una posició més distant, fet que es tradueix en una unió més dèbil que altres compostos, però més forta en comparació amb la COX-1, aquest fet és degut a la presència en la COX-2 d'una leucina en la posició 384 que genera un locus hidrofòbic més favorable pel posicionament d'un àtom halogenat per la interacció amb la Ser<sup>530</sup>. Del resultat de l'energia d'interacció amb els principals residus del centre actiu de la COX-2 que es mostren en la taula-1, és dedueix que l'energia de van de Waals per la unió amb la Val<sup>523</sup> és menys favorable (-1,5 Kcal/mol) sent més favorable per la interacció amb la Ala<sup>527</sup> (-3,7 Kcal/mol) i Ser<sup>530</sup> (-1,9 Kcal/mol).



#### 4.4.2.2 **Estudi del mecanisme d'inhibició de la COX-2 pels compostos Arilpropionics**

L'optimització d'AMBER dels complexos (S)-flurbiprofen, (S)-naproxen i (S)-ketoprofen amb la COX-2 mostra que aquests tres derivats formen una unió iònica entre l'oxigen carboxílic amb el nitrogen del grup guanidino de l'Arg<sup>120</sup> mantenint una distància d'enllaç per aquests tres compostos compresa entre 2.4 i 2.6 Å coincidint amb les dades cristal·logràfiques [49].

D'altra banda tal i com s'observa en la figura 3 de l'article *Molecular modelling of the differential interaction between several non-steroidal anti-inflammatory drugs and human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 (h-PGHS-2)*. *J. of Molec. Graphics and Modelling*, 20, 329-343 (2002), el segon anell aromàtic formaria unions de van der Waals amb la Val<sup>523</sup> i Tyr<sup>385</sup>.

Aquestes unions podrien ser responsables d'una unió més forta amb la COX-2 que es traduiria en un mecanisme d'inhibició temps-dependent.

L'estudi de les contribucions de van der Waals i electrostàtica a l'energia lliure d'unió mostra que el flurbiprofen degut a la substitució d'un àtom de fluor en la posició 3 del 1r. anell aromàtic presenta una interacció amb la COX-2 més favorable ( $\Delta G_{\text{ele}} = -11.8$  Kcal/mol) que altres compostos de la mateixa família (ketoprofen  $-6.8$  Kcal/mol, naxopren  $-4.2$  Kcal/mol). La contribució de van der Waals a l'energia lliure d'interacció amb la Val<sup>523</sup> és pel flurbiprofen tan favorable ( $-4.9$  Kcal/mol) que els compostos inhibidors selectius SC-58125 ( $-4.7$  Kcal/mol).

#### 4.4.2.3 **Estudi del mecanisme d'inhibició de la COX-2 pels compostos N-aril-antranílics**

En comparació entre els derivats N-aril-antranílics l'àcid meclofenàmic fa una unió més forta i estable que la resta de fenamats sent similar a la del diclofenac, aquest fet és degut a la presència en aquests dos compostos d'àtoms halogenats en el 2n anell aromàtic, sent la contribució electrostàtica ( $\Delta G_{\text{ele}}$ ) a l'energia lliure d'unió més favorable (àcid meclofenàmic  $-4.3$  Kcal/mol, diclofenac  $-4.1$  Kcal/mol) que per altres fenamats (àcid mefenàmic  $-16.4$  Kcal/mol). A més del resultat d'AMBER indica que la contribució de van der Waals per l'energia d'interacció de l'àcid meclofenàmic amb la Val<sup>523</sup> és

significativa (-3.7 Kcal/mol) i comparable amb els inhibidors selectius NS-398 (-3.5 Kcal/mol) i SC-58125 (-4.7 Kcal/mol).

En el mecanisme d'inhibició temps-dependent dels fenamats amb el centre actiu de la COX-2 té un paper significatiu la Tyr<sup>355</sup> ja que recents estudis indiquen que una mutació per aquest residu (Tyr<sup>355</sup> → Phe) mostren una pèrdua de la capacitat d'inhibició de la COX-2 pels fenamats entre ells l'àcid meclofenàmic [50].

A l'igual que en la COX-1 la unió per pont salí del grup carboxílic dels inhibidors arilpropionics a l'Arg<sup>120</sup> seria clau en la inhibició temps-dependent de la COX-2, però no imprescindible en els inhibidors antranílics, aquests ocuparien un espai hidrofòbic que a diferència de la COX-1 tindria la COX-2 (*hidrofòbic pocket*) format per residus complementaris com la Val<sup>523</sup> la interacció amb aquest espai hidrofòbic potenciaria la unió amb els residus de Tyr<sup>385</sup> i Ser<sup>530</sup>.

Un altre factor a tenir en compte és el posicionament de les molècules d'aigua en el centre actiu de la COX-2, en especial en l'entrada al centre actiu, ja que aquestes poden influir en les unions per pont d'hidrogen amb els residus clau en aquesta part de l'enzim com l'Arg<sup>120</sup>, Tyr<sup>355</sup>, Arg<sup>513</sup>, Tyr<sup>385</sup> i Glu<sup>524</sup>. La localització d'aquesta molècula d'aigua i dels residus claus es mostren en les figures 4 –11 de l'article *Molecular modelling of the differential interaction between several non-steroidal anti-inflammatory drugs and human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 (COX-2)*. *J. of Comp.-Aided Molecular Design*, 16, 683-709 (2002) on també es mostren els complexos formats per la COX-2 amb diversos inhibidors de les famílies dels arilacètics, *N*-arilantranílics i *N*-arilpropionics.

Com mostren els diagrames de la figura 9 els compostos temps dependents estableixen la presència d'una molècula d'aigua a l'entrada del locus del receptor de la COX-2 afavorint així la seva permanència durant més temps en el centre actiu i podent establir unions complementàries amb més residus adjacents.

Aquestes interaccions es corresponen amb els resultats obtinguts per altres autors, com recentment el del grup de Marnett [51] que confirma experimentalment la importància dels residus de Ser<sup>530</sup> i Tyr<sup>385</sup> en el complex d'inhibició del diclofenac-COX-2 on el grup carboxílic de l'inhibidor després de rotar 90° formaria ponts d'hidrogen amb les Ser<sup>530</sup> i Tyr<sup>385</sup>. Aquest autor considera [56] que el mecanisme d'inhibició de la COX-2 és un procés dinàmic i que tindria lloc en diverses etapes.

Llorens i col.laboradors [52] afirmen que el grup carboxílic dels inhibidors COX-2 interacciona amb l'Arg<sup>120</sup>, el grup carbonil formaria un pont d'hidrogen amb la Ser<sup>530</sup> i un tercer grup voluminós com ara un anell aromàtic s'uniria en la cavitat hidrofòbica de la COX-2 (*side pocket*). També apunten que el diclofenac pot interaccionar amb el par Tyr<sup>385</sup>/ Ser<sup>530</sup> en dues conformacions diferents, ambdues interaccions són consistents amb els resultats de mutagènesis i de GRID.

Altres investigadors (Soliva i cols. ) [53] consideren que la COX2 seria en part adaptable a canvis locals en l'estructura de l'inhibidor adaptant el locus d'unió al lligant . i podria adaptar-se a canvis de l'inhibidor un cop aquest ha quedat fixat en el locus de l'enzim.

## **4.5 Estudi del mecanisme radicalari d'inhibició del procés inflamatori**

### **4.5.1 Introducció**

Un altre mecanisme antiinflamatori és la captació o interferència dels radicals lliures iniciadors i/o mediadors del procés inflamatori que com hem descrit en el capítol 2, es formen a partir de la mateixa lesió cel·lular (hidroxil HO·, òxid O·, superòxid O<sub>2</sub>· i hidroperòxid HOO·) igualment existrien radicals intermedis del substracte en transformació com el radical hidroperòxid derivat de l'araquidonat corresponent ROO·.

També diversos estudis [54-56] d'espectroscopia electrònica de resonància paramagnètica (EPR), han detectat la presència d'una acumulació radicalària prèvia a la síntesis de la PGH<sub>2</sub>. Aquest radical podria correspondre a radicals tirosils (Tyr·) o de serina (Ser·) que participarien en la catàlisi ciclooxigenàsica o lipooxigenàsica, aleshores el seu mecanisme d'inhibició podria catalogar-se com inhibidors reversibles temps-independents.

Aquest mecanisme de captació de radicals lliures i neutralització de radicals mediadors és propi d'un grup reduït d'antiinflamatoris no esteroïdals. Els salicilats a més d'acetilar covalentment un residu de Serina (Ser<sup>529</sup>) poden captar radicals lliures i minorar els efectes nocius dels radicals, en aquest sentit s'han dissenyat diversos derivats fenòlics com entre ells el R-830 [57], ONO-3144 [58], el MK-447 [59-60] i el CI-986 [61] entre altres, l'estructura d'alguns d'aquests derivats es representa en la figura 39, tots ells tenen en comú la presència d'un grup hidroxil que seria el que actuaria com neutralitzador de radicals podent també interaccionar, amb l'avantatge sobre els salicilats clàssics de no causar irritació gàstrica ni reaccions creuades ja que no cotenen el grup carboxílic en la seva estructura.

Però un dels antiinflamatoris que durant dècades s'havia pensat que podia actuar amb aquest mecanisme és el paracetamol (acetaminofè) sent més antipirètic i analgèsic que antiinflamatori.

El paracetamol compta amb més de 100 especialitats farmacèutiques que l'inclouen com únic principi actiu en la seva composició (Actron<sup>®</sup>, Gelocatil<sup>®</sup>, Termalgin<sup>®</sup>...) i més de 500 especialitats on es troba en combinació amb altres derivats principalment amb l'àcid acetil salicílic (A.A.S) (Frenadol<sup>®</sup>, Cortafriol<sup>®</sup>....) precisament per tal d'augmentar-li la potència antiinflamatòria que no té, en aquest sentit també es va idear de combinar-lo ja no tan sols en quant a composició si no també molecularment obtenint un éster de paracetamol i A.A.S. el benorilat (Benorile<sup>®</sup>, Doline<sup>®</sup>, Vetedol<sup>®</sup>) que es mostra en la figura 39.

Però diversos autors han qüestionat perquè el paracetamol tenint efectes antipirètics i analgèsics tan marcats i adaptant-se al model d'inhibició de la COX-2 perquè no és antiinflamatori ? [63-66]

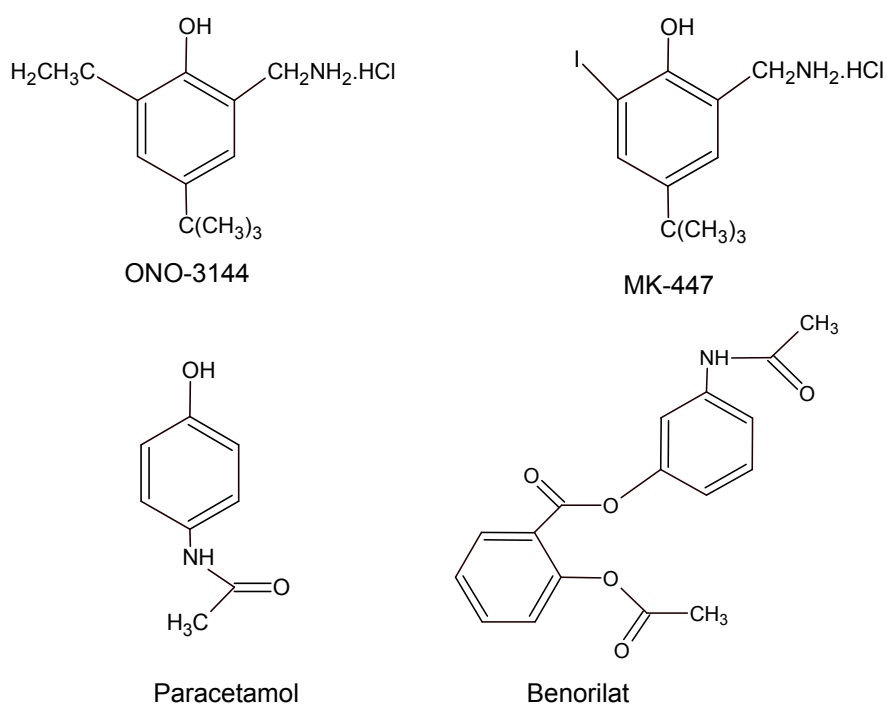


Figura 39. Derivats fenòlics amb possible mecanisme antioxidant.

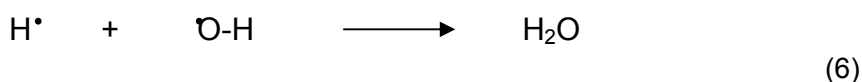
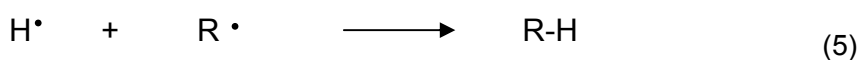
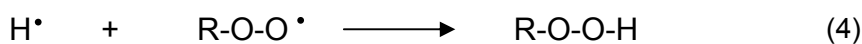
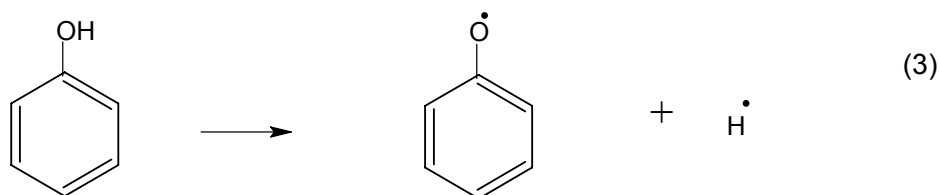
La resposta es troba en què el paracetamol actuaria inhibint a la COX-3 [67] un isoenzim de la COX que es localitzaria en el cervell i que seria molt sensible a aquest fàrmac, tenint relació amb els centres termoregulador i sensitius del dolor, fet que explicaria l'eficàcia del paracetamol com antipirètic i analgèsic [68].

### 4.5.2 Estudi del mecanisme radicalari d'inhibició dels fenols

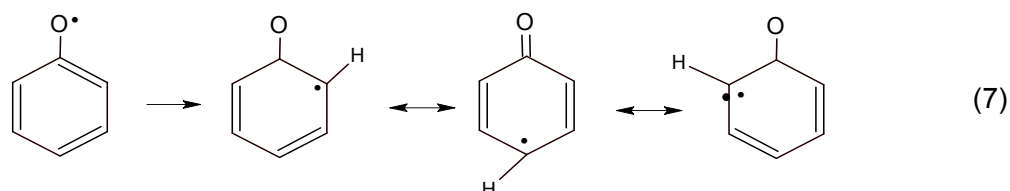
L'acció antiinflamatòria dels fenols és deguda al seu poder antioxidant com neutralitzadors de radicals, així els fenols:

- 1) Actuarien com sequestrants: captant els radicals formats per cèl.lules fagocítiques o generats durant la lesió cel.lular inhibint-los [57-62].
- 2) Bloquejarien la síntesi de prostaglandines i de leucotriens prevenint l'abstracció de l'hidrogen de l'àcid araquidònic en les primeres etapes de transformació en prostaglandines (figura 2 pàgina 13).
- 3) Neutralitzarien els radicals intermedis de reacció formats durant la síntesi de prostaglandines, com ara el radical hidroperòxid format a partir de l'àcid araquidònic, d'aquesta forma interferirien la unió del substracte amb la COX i/o amb la LOX [69-70].
- 4) Transformarien els radicals hidroperòxid en productes no radicalaris com alcohol o aigua [54].
- 5) Inhibirien el radical tirosil (Tyr<sup>385</sup>) essencial en la catàlisi ciclooxigenàsica [55].

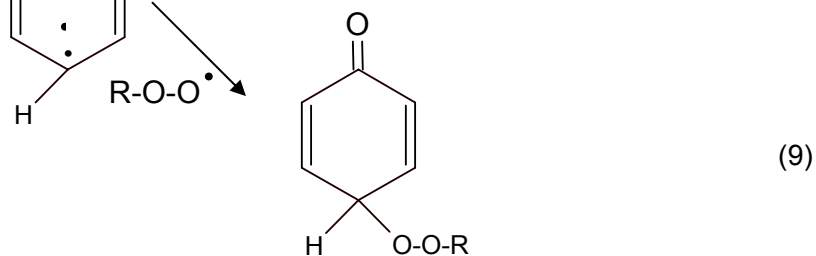
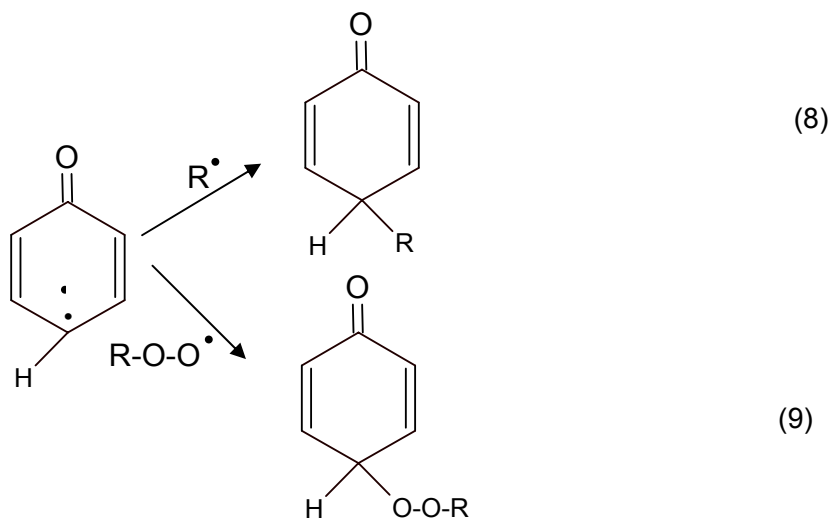
Però, perquè puguin produir-se tots els anteriors mecanismes es necessita la formació del radical fenòxid (eq. 3), el qual implica la neutralització de radicals nocius (eqs. 3 i 4) o la conversió d'ells en productes no radicalaris com alcohol o aigua (eq. 5).



Els radicals intermedis de reacció serien neutralitzats mentre que el radical fenòxid quedaria estabilitzat en equilibri de resonància amb un radical cetona (eq. 7):



Aquest radical cetona mitjançant la reacció de *Guareschi-Lustgarten* [71] pot neutralitzar nous radicals intermedis que puguin aparèixer durant el procés inflamatori (eqs. 8 i 9).



Per tant, els derivats fenòlics presenten un doble mecanisme com antiinflamatoris: el primer la neutralització dels radicals mediadors-iniciadors mitjançant la donació del seu hidrogen i segon la capacitat neutralitzar a aquests radicals a través de la cetona radical derivada del corresponent radical fenòxid.

És per això, que la facilitat de formació i posterior estabilitat del radical és un factor a tenir en compte en l'estudi de la relacions estructura activitat d'aquests compostos.

#### 4.5.2.1 Metodologia i etapes d'estudi

En una primera etapa s'ha estudiat la viabilitat del mecanisme de formació del radical fenòxid a partir del compost cap de sèrie fenol per després i amb ajuda de tècniques QSAR relacionar quantitativament la major o menor facilitat de formació d'aquest radical amb l'activitat antiinflamatòria per una sèrie de 25 derivats fenòlics.

Les activitats antiinflamatòries s'han obtingut a partir dels estudis de Dewhirst detallats en la referència [57], aquest autor ha fet servir una modificació del mètode de Vanderhoek i Lands [72], que consisteix en la mesura *in vitro* de la concentració que inhibeix en un 50 % a l'enzim ciclooxigenasa obtinguda de vesícules seminals de xai. S'han seleccionat un total de vint-i-cinc compostos derivats del fenol amb diferent natura química dels seus substituents (grups electronatracients i electrodonadors).

La geometria molecular per cadascun dels compostos estudiats que s'indiquen en les taules 1 i 2 dels articles de l'apèndix : *QSAR study of Phenols: Relation between the phenoxyl radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 15, 219-223 (1996) i *Theoretical prediction of the phenoxyl radical formation capacity and cyclooxygenase inhibition relationships by phenolic compounds. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 21, 605-612 (2002).

Aquestes geometries han estat obtingudes inicialment a partir de dades cristal·logràfiques i de la base de dades estructurals de Cambridge (CSD). Posteriorment s'han optimitzat per dinàmica molecular amb ajuda del programa DISCOVER i amb el suport d'una SGI 4D/35 workstation, les geometries finals s'han analitzat comparant-se amb els mètodes semiempíric AM1 i *ab initio* HF/6-31G(d) respectivament.

L'estudi de la formació del radical fenòxid s'ha realitzat pel mètode termodinàmic de la coordenada de reacció prenent com coordenada la distància d'enllaç O-H, l'estat de transició s'ha localitzat calculant la matriu de les constants de força amb ajut del *keyword* FORCE i detectant la presència d'un vector propi negatiu, l'estructura dels estats de transició corresponents s'han optimitzat amb el mètodes SIGMA i TS descrits en el capítol 3, pàgina 44.



Donada la importància de formació radicalària en aquests compostos, també s'ha estudiat la densitat electrònica en el punt crític per l'enllaç O-H ( $\rho_{OH}$ ), mètode que hem descrit en el capítol 3, pàgina 97 i que s'ha obtingut amb els programes GAUSSIAN-94 i EXTREME [73-74].

Entre altres paràmetres que es relacionaran amb l'activitat antiinflamatòria seran els termodinàmics com les entalpies de formació del radical fenòxid, energia de reacció així com les càrregues de Mulliken en diferents àtoms, la densitat en el punt crític  $\rho_{OH}$  i altres paràmetres com el ClogP obtingut amb ajuda del programa ClogP [75].

Per tal d'avaluar l'efecte del solvent s'han calculat les energies lliures de solvatació dels estats fonamentals i dels corresponents radicals fenòxid amb ajuda del programa AMSOL 6.5.3 [76] i fent ús del model de solvatació AM1-SM2 [77-78].

D'altra banda, per a cada compost s'han representat els mapes de PEM amb el programa MEPSIM [79] i amb el programa GRID [34-35] diferents probes de GRID1 per tal d'analitzar les àrees d'interacció molecular amb els possibles lligands del centre actiu de la COX.

Aquests resultats han servit per realitzar tècniques de modelització molecular el model de la COX-2 humana obtinguda per homologia de l'estudi de la inhibició dels derivats antranílics, arilpropionics i arilacètics. S'ha fet l'anclatge sobre el receptor de la COX-2 amb ajuda del programa AutoDock 3.0 [36].

## **4.5.2.2 Resultats i discussió**

### **4.5.2.2.1 Estudi de la formació del radical fenòxid**

La capacitat de formació del radical fenòxid i la seva posterior estabilitat ha estat estudiada mitjançant el mètode de la coordenada de reacció explicat en el capítol 3, pàgines 45-46. En el present cas, la coordenada de reacció correspon a la distància d'enllaç entre l'àtom d'oxigen i l'hidrogen del grup hidroxil. En la figura 40 es representa el perfil energètic obtingut, en abscesses es representa la distància O-H per a increments de 0,01Å i en coordenades es representa l'entalpia de formació en kcal/mol.

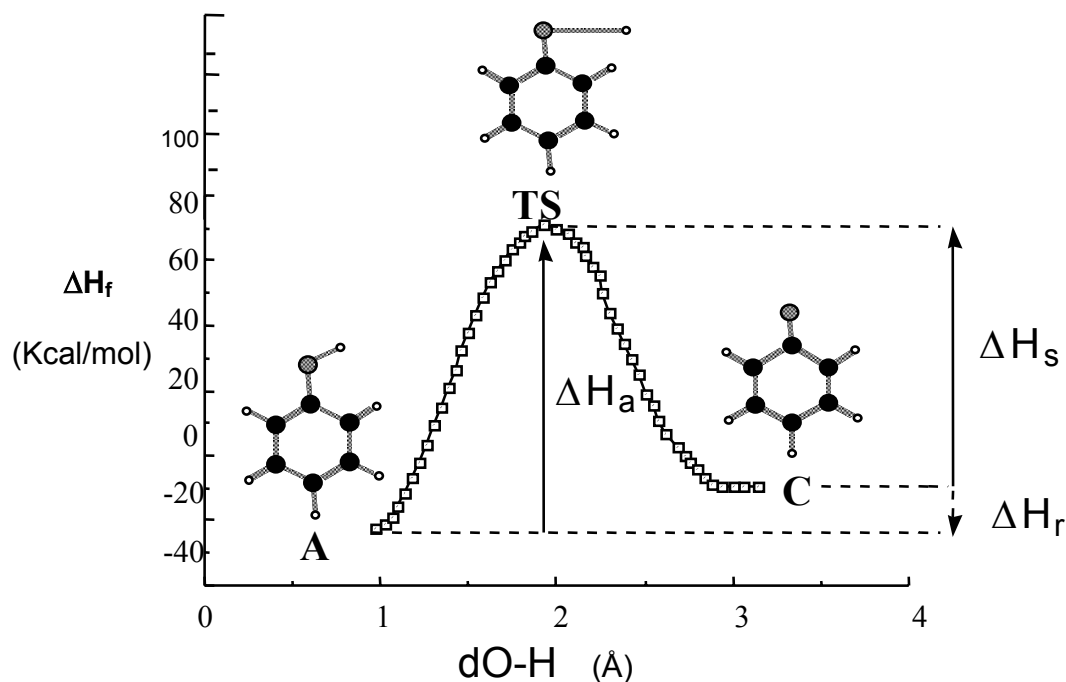


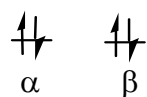
Figura 40. Perfil energètic de la coordenada de reacció per la formació del radical fenòxid  $\Delta H_a$  és l'entalpia d'activació,  $\Delta H_s$  és l'entalpia d'estabilització i  $\Delta H_r$  és l'entalpia de reacció.

És convenient estudiar aquesta coordenada de reacció en capa oberta mitjançant el formalisme d'Hartree-Fock no restringit (UHF) i també en capes tancades fent servir el formalisme d'Hartree-Fock restringit (RHF). Alhora cal tenir en compte, que en el radical intermedi l'àtom d'oxigen pot existir en dos possibles estats electrònics: en l'estat de singlet i en el de triplet.

L'estat de singlet correspon a una configuració electrònica de l'àtom d'oxigen amb els spins aparellats  $O(d^1)$  i l'estat de triplet correspon a una configuració amb els spins desaparellats  $O(p^3)$  tal i com es representa en la figura 41.

Per tant, segons aquests estats electrònics de l'àtom d'oxigen cal estudiar la formació del radical fenòxid en els quatre possibles camins de reacció per la seva formació, aquests són: singlet-RHF, singlet-UHF, triplet RHF i triplet-UHF.

## a) singlet

O(d<sup>1</sup>)

## b) triplet

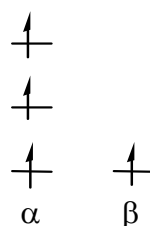
O(p<sup>3</sup>)

Figura 41. Possibles estats electrònics que pot presentar l'àtom d'oxigen hidroxílic

Els perfils energètics d'aquests camins de reacció han estat obtinguts amb el mètode semiempíric AM1 i es comparen en la figura 42 i en la taula 7. Com a resultat el radical fenòxid en estat de singlet és 50 Kcal/mol més estable que el triplet. També l'estat de transició (TS) resulta més estable que en qualsevol dels altres mètodes. Aquest resultat concorda plenament amb estudis d'Espectroscopia de Resonància Paramagnètica (EPR) que demostren l'existència d'una senyal de singlet durant la incubació de fenol amb l'àcid araquidònic en presència de la COX [80-81].

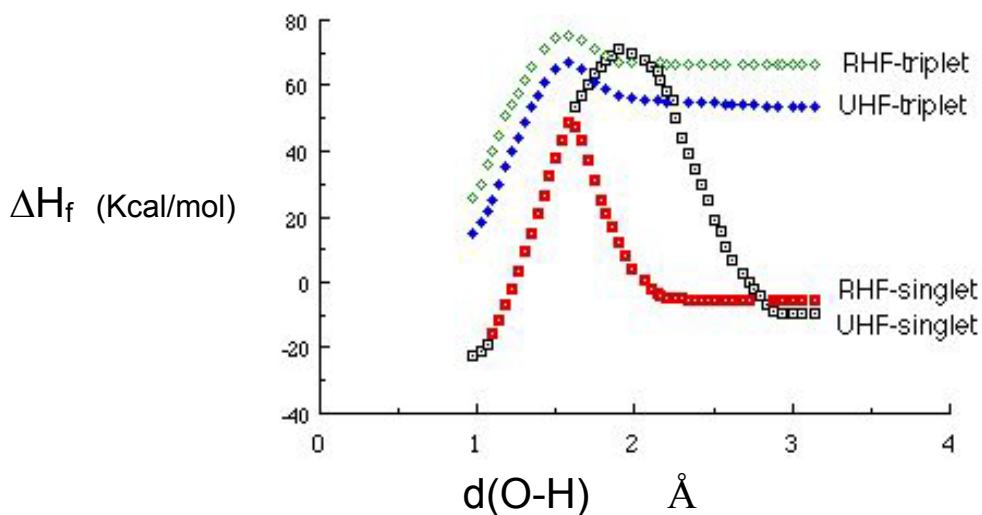


Figura 42. Superposició dels perfils energètics per la formació del radical fenòxid amb els diferents formalismes: RHF-singlet, UHF-singlet, RHF-triplet i UHF-triplet.

Tanmateix, altres estudis semiempírics (MNDO) sobre el radical fenòlic assenyalen que l'estat electrònic de singlet és més estable que el de triplet [82].

D'altra banda, com s'observa en la figura 42 el perfil de la corba energètica RHF-singlet és molt pronunciat, pel contrari s'observa un perfil més uniforme pel camí UHF-singlet.

	A	TS	C
Singlet RHF	-22,24	45,92	3,12
Singlet UHF	-22,24	54,82	4,72
Triplet RHF	35,06	72,80	66,96
Triplet UHF	26,59	61,20	55,75

Taula 7. Entalpies de formació en Kcal/mol per cadascun dels possibles camins de reacció Per la formació del radical fenòxid (C) a partir del fenol (A) passant per l'estat de transició (TS).

Cal destacar la dificultat del mètode AM1 per l'optimització de l'estat de transició, ja que es tracta d'una estructura poc estable, però que finalment s'ha aconseguit fent ús del mètode TS que hem descrit en el capítol 3, apartat 3.3.5.

Per últim, no s'observen diferències en la geometria dels quatre estats de transició (TS) corresponents a cadascun dels camins de reacció, sent idèntics l'angle d'enllaç entre l'hidrogen fenòlic i l'anell aromàtic.

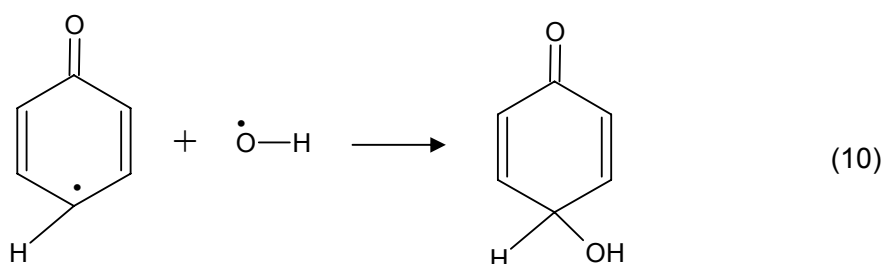
Tampoc existeixen diferències apreciables en la geometria dels estats fonamentals. Per tant, s'ha procedit a estudiar la formació del radical fenòxid dels derivats de la taula-1 de l'article *QSAR study of Phenols: Relation between the phenoxyl radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism. Quant. Struc.-Act. Relat., 15, 219-223 (1996)*, establint-se una relació quantitativa estructura activitat que s'ha verificat amb els compostos de la taula-2 amb un total de 21 derivats fenòlics. Per tal de reduir el volum de càlcul ha estat necessari procedir a escollir el camí de reacció més convenient, tenint en compte les dades experimentals i evitant possibles problemes de càlcul, ja que els radicals en principi són molècules inestables.

Atenent aquests criteris el radical format per la via singlet resulta més estable que el triplet i a més les dades experimentals [80-81] confirmen la presència d'aquest estat electrònic en estudis experimentals del fenol incubat amb la COX.

Per tant, dels quatre possibles camins de reacció, ara, cal discernir entre dos possibles: RHF-singlet o UHF-singlet. Atenent al perfil de la corba energètica de la figura 42, la més uniforme és per una configuració electrònica en capes obertes (UHF), és per això que finalment s'ha optat per estudiar la formació radicalària dels derivats fenòlics fent ús la via UHF-singlet.

El resultat de les entalpies de formació amb el mètode semiempíric AM1 per l'estat fonamental  $\Delta H(A)$ , estat de transició  $\Delta H(TS)$  i radical  $\Delta H(C)$ , es mostren en la taula-1 de l'article: *QSAR study of Phenols: Relation between the phenoxyl radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism. Quant. Struc.-Act. Relat., 15, 219-223 (1996)* i amb el formalisme *ab initio* HF/6-31G(d) s'indiquen en la taula-1 de l'article: *Theoretical prediction of the phenoxyl radical formation capacity and cyclooxygenase inhibition relationships by phenolic compounds. Quant. Struc.-Act.Relat., 21, 605-612 (2002)*, a més s'han estudiat com paràmetres termodinàmics, aquells que permetin conèixer la facilitat de formació del radical i la seva posterior estabilitat, aquests paràmetres es defineixen en la figura 39 i són: les energies d'activació ( $\Delta H_a$ ), d'estabilització ( $\Delta H_s$ ) i de reacció ( $\Delta H_r$ ).

Una vegada minimitzat el radical fenòxid també s'ha estudiat la viabilitat del mecanisme de captació del radical hidròxil  $H-O\cdot$  per aproximació d'aquest a la posició *para* del anell fenil tal i com s'esquemmatitza de forma general en l'equació 8 per la captació de qualsevol radical, que s'ha refet pel radical hidroxil en l'equació 10:



Amb el formalisme UHF-singlet s'ha obtingut el gràfic de la figura 43.

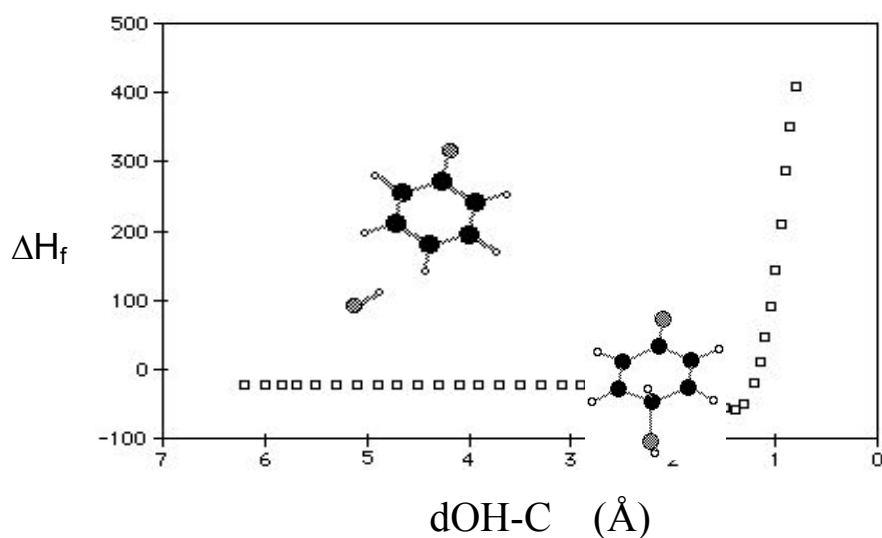


Figura 43. Gràfic energètic de l'estudi mecanístic d'aproximació del radical hidroxil al radical Fenòxid segons l'equació 10.

#### 4.5.2.2 Relació quantitatives estructura-activitat

Els resultats obtinguts indiquen que els compostos més actius presenten una menor entalpia de reacció ( $\Delta H_r$ ) per la formació del radical fenòxid que els derivats poc actius que mostren un valor més elevat indicant una certa dificultat per la formació del corresponent radical fenòxid.

Aquesta dificultat o facilitat per la formació del radical és deguda principalment a una doble causa: la primera la natura electronatraitent o electrodonadora dels substituents i segon la posició *orto*, *para* o *meta* en què es situen aquests substituents, ja que com hem vist en l'equació 7 en el mecanisme dels fenols, és important l'efecte de resonància en l'anell aromàtic [83].

En aquest sentit els substituents electrodonadors (metil, etil, terbutil..) en posició *orto* i/o *para* afavoreixen la ruptura de l'enllaç (ex: 2,4,6-trimetilfenol  $\Delta H_r = 362$  Kcal/mol) i la consegüent formació del radical, amb el qual aquests compostos són actius com antiinflamatoris.

Pel contrari (veure taula-1 de l'article *Theoretical prediction of the phenoxy radical... Quant. Struc.-Act.Relat.*, 21,605-612 (2002) els grups halogenats com el clor, brom, fluor augmenten el dèficit electrònic de l'àtom d'oxigen i com a conseqüència aquest atrau el par d'electrons que comparteix amb l'hidrogen, formant el radical amb més dificultat (ex. 2-Cl  $\Delta H_T = 365$  Kcal/mol).

La relació quantitativa estructura-activitat ve definida per les equacions 11 (formalisme AM1,  $r=0.950$ ) i 12 (formalisme *ab-initio*  $r=0.920$ ) obtenint una correlació similar entre  $\Delta H_T$  i l'activitat antiinflamatòria *in vitro*.

$$\begin{aligned} \log 1/I50 &= -0.63 \Delta H_T (\pm 0.12) + 14.05 (\pm 3.07) \\ n &= 15, \quad r=0.950, \quad s=0.242, \quad F=121.53 \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \log 1/I50 &= -0.53 \Delta H_T (\pm 0.06) + 189.41 (\pm 21.97) \\ n &= 16, \quad r=0.920, \quad s=0.315, \quad F=75.81 \end{aligned} \quad (12)$$

Aquest resultat es confirma amb l'estudi de la densitat en el punt crític per l'enllaç O-H ( $\rho_{OH}$ ) i que es mostra en la Taula 1 de l'article *Theoretical prediction of the phenoxy radical. Quant. Struc. - Act.Relat.*, 21, 605-612 (2002) on els compostos actius presenten substituents electrodonadors preferentment en les posicions *orto* i *para* tenen una densitat elevada (per exemple: 246-trimetilfenol  $\rho_{OH} = 0.3689$ ) i els menys actius solen tenir aquests substituents en *meta* o bé presenten àtoms halogenats (ex. comp. 2-clorofenol  $\rho_{OH} = 0.3663$ ). L'anàlisi de regressió lineal mostra un coeficient de correlació de  $r=0.879$  i que es descriu en l'equació 13:

$$\begin{aligned} \log 1/I50 &= 53.16 \rho_{OH} (\pm 7.70) - 197.20 (\pm 28.30) \\ n &= 16, \quad r=0.879, \quad s=0.380, \quad F=47.60 \end{aligned} \quad (13)$$

Com seria d'esperar, aquestes dos paràmetres que correlacionen amb l'activitat ( $r=0.920$ ) i  $\rho_{OH}$  ( $r=0.879$ ), també correlacionen entre sí amb un coeficient  $r=0.938$ , correlació que ve definida per l'equació 14 :

$$\begin{aligned} \rho_{OH} &= -8.15 \Delta H_T + 6.65 (\pm 0.29) \\ n &= 16, \quad r=0.938, \quad s=0.004, \quad F=103.30 \end{aligned} \quad (14)$$

Altres paràmetres electrònics també guarden una relació significativa amb l'activitat com ara les càrregues de Mulliken dels carbons aromàtics de les posicions *orto* i *para*, que sumades dins del paràmetre càrrega total ( $Q_t$ ) reflecteix millor les variacions degudes a la presència de substituents en aquestes posicions ( $r=0.802$ ), en aquest sentit una càrrega molt negativa d'aquests carbons dificulta la formació radicalària. Tanmateix, una càrrega molt negativa en l'àtom d'oxigen afavoreix la formació del radical fenòxid, de forma que la càrrega electrònica de l'àtom de oxigen també està relacionada amb la major o menor facilitat de formació radicalària i per tant amb l'activitat antiinflamatòria ( $r=0.802$ ).

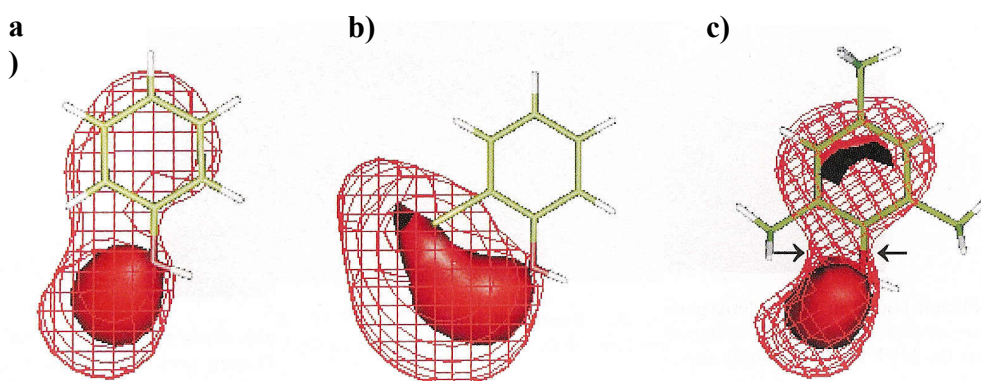


Figura 44. Mapes de PEM per a) fenol, b) un derivat poc actiu i c) un derivat més actiu, els contorns sòlids representen corbes d'isopotencial de  $-20$  i les discontinues de  $-10$  Kcal/mol.

Aquests resultats es confirmen amb la representació dels mapes de PEM, que es mostren per a tres compostos representatius en la figura 44 que compara els mapes de PEM per a tres derivats; el fenol ( $IC_{50}=1600 \mu\text{M}$ ), un derivat poc actiu (2-clorofenol) ( $IC_{50}=800 \mu\text{M}$ ), i un tercer més actiu el 2,4,6-trimetilfenol ( $IC_{50}=7 \mu\text{M}$ ), tots els derivats presenten un mínim de potencial localitzat en l'oxigen fenòlic. Aquest mínim en el compost menys actiu el 2-clorofenol s'estén fins a la posició *orto* per l'existència de l'àtom de clor en aquesta posició dificultant la ruptura de l'enllaç O-H.

Per al contrari, el compost més actiu: el 2,4,6-trimetilfenol presenta una estrangulació en aquest mínim facilitant la ruptura de l'enllaç O-H i la consegüent formació radicalària.



En quant als paràmetres de lipofilia s'ha calculat el ClogP dades que es mostren en la taula 1 de l'article més actualitzat *Theoretical prediction of the phenoxyl radical. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 21, 605-612 (2002) com a resultat aquest paràmetre també correlaciona amb l'activitat ( $r=0.789$ ) indicant un elevat ClogP afavoreix l'activitat antiinflamatòria sent necessari un cert caràcter lipòfob d'aquestes molècules per accedir bé al centre actiu de la COX.

#### 4.5.2.2.3 Efecte del solvent

Per tal d'estudiar l'efecte del solvent en la formació del radical fenòxid s'ha procedit a calcular fent ús del programa AMSOL 6.5.3 [76] amb el model de solvatació AM1-SM2 [77-78] les energies lliures de solvatació pels diferents estats: fonamental  $\Delta H(A)$ , estat de transició  $\Delta H(TS)$  i radical  $\Delta H(C)$ ; així com l'energia de reacció ( $\Delta H_r$ ). Els resultats es mostren en la taula següent:

Nº	compost	A	TS	C	$\Delta H_r$
1	<b>fenol</b>	-28,80	67,74	5,25	34,05
2	<b>2-metil</b>	-34,44	62,11	-7,5	26,94
3	<b>3-metil</b>	-36,43	60,90	-2,23	34,20
4	<b>4-metil</b>	-29,79	61,23	-8,28	21,51
5	<b>2-Br</b>	-22,31	40,97	6,39	28,70
6	<b>2,3-dimetil</b>	-40,76	57,18	-14,51	26,25
7	<b>2,4-dimetil</b>	-41,79	57,73	-15,85	25,94
8	<b>2,5-dimetil</b>	-42,93	39,45	-15,02	27,91
9	<b>2,6-dimetil</b>	-40,85	40,13	-15,07	25,78
10	<b>3,4-dimetil</b>	-43,21	54,40	-15,32	27,89
11	<b>3,5-dimetil</b>	-43,70	53,87	-9,05	34,65
12	<b>2,3,5-trimetil</b>	-48,69	53,37	-22,02	26,67
13	<b>2,3,6-trimetil</b>	-47,72	33,55	-22,05	25,67
14	<b>2,4,6-trimetil</b>	-48,18	31,97	-24,05	24,13
15	<b>2,3,5,6-tetramet.</b>	-53,80	28,06	-30,24	23,56

Taula 8. Entalpies de formació i energia de reacció  $\Delta H_r$  en Kcal/mol obtingudes amb el programa AMSOL.

L'anàlisi de correlació lineal mostra com els resultats obtinguts a partir del mètode de solvatació es mantenen respecte als inicials AM1 i HF/6-31G(d) *ab initio* així els estats A, TS i el radical fenòxid C obtenen respectivament coeficients  $r$  de correlació de 0,781; 0,646 i 0,872 i l'energia de reacció per la formació del radical fenòxid  $\Delta H_r$  de :  $r=0.717$ .

Comparativament aquests valors de correlació són lleugerament més baixos que els inicials, degut possiblement a un emmascarament o interferència de les molècules d'aigua amb els àtoms de les molècules estudiades, però que en línies generals corroboren la viabilitat de la formació del radical fenòxid en un medi integrat per la molècula de la COX i l'inhibidor envoltat de molècules d'aigua.

#### **4.5.2.2.4 Mètodes directes d'estudi de la interacció dels fenols en el locus actiu de l'enzim COX-2**

El model de la COX-2 humana obtingut en apartats anteriors per l'estudi mecanístic del derivats fenilacètics, arilntranílics i arilpropionics s'ha fet servir en aquest apartat per explorar amb ajuda del programa AutoDock 3.0 l'anclatge del fenol i els seus derivats a la COX2-humana.

A més s'han representat els mapes de PEM i GRID en els per tal de localitzar així les possibles àrees d'interacció dels inhibidors amb els residus de la COX2.

Com a resultat el fenol s'uneix al final d'una llarga cavitat hidrofòbica propera al grup HEMO amb una correcta interacció amb els residus de Ser<sup>530</sup> i His<sup>351</sup> però per accedir al centre actiu cal travessar un entorn hidrofòbic format pels residus de Leu<sup>353</sup>, Phe<sup>198</sup>, Phe<sup>381</sup> i Phe<sup>580</sup>.

La distància entre el grup hidroxil del fenol i l'àtom de ferro del grup prostètic és de 9 Å, distància que permetria una possible transferència protònica. Aquesta distància és similar a la distància entre el grup hidroxil de la Tyr<sup>385</sup> i l'àtom de ferro prostètic.

El resultat dels mapes de GRID per la interacció hidrofòbica (probe DRY) es mostra en la figura 45, el fenol i el 2-clorfenol que són pocs actius mostren un àrea d'interacció reduïda, metreque el 2,4,6-trimetilfenol sent més actiu presenta una major àrea d'interacció hidrofòbica conferida pels 3 grups metils.

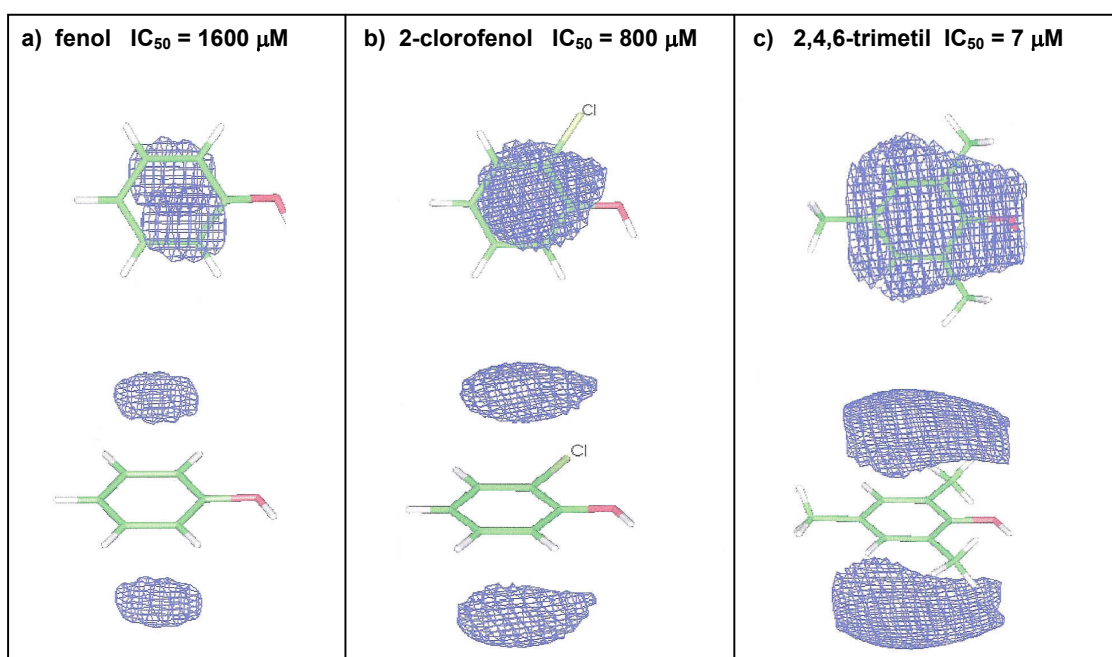


Figura 45 Mapes de GRID per la interacció hidrofòbica (DRY) els contorns de línies blaves representen corbes isoenergètiques de  $-1,5$  Kcal/mol. Es representa el mateix mapa en visió planar i transversal per dos derivats poc actius: a) fenol i b) 2-clorfenol, en c) un derivat més actiu: el 2,4,6-trimetilfenol, aquest últim presenta una àrea d'interacció hidrofòbica més extensa.

Les àrees d'interacció hidrofòbica són més extenses en el 2,4,6-trimetilfenol que en el fenol, permetent per el derivat trimetilat mantenir unes interaccions complementàries amb els residus de Trp<sup>387</sup>, His<sup>351</sup>, Val<sup>434</sup> i lleu<sup>517</sup>. Mantinent al mateix temps una interacció electrostàtica de l'anell aromàtic amb la Ser<sup>530</sup> i la His<sup>351</sup> aquests resultats d'interacció en el locus actiu de la COX2 humana es recullen en la figures 3 i 4 de l'article *Theoretical prediction of the phenoxyl radical. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 21, 605-612 (2002).

Per tant, aquests mètodes directes confirmen els resultats de QSAR obtinguts pels mètodes indirectes i corroboren la interacció dels fenols en el locus actiu de la COX2.

## 4.6 Estudi del mecanisme d'inhibició dual de la COX i 5-LOX dels Di-*tert*-butil-fenols

Com hem vist en el capítol 2 i en l'apartat 2.7 (futurs fàrmacs antiinflamatoris) un grup farmacològic de gran interès són els inhibidors duals de la COX-2 i la 5-LOX [84], en les pàgines 28 i 29 es citen i s'indiquen les fórmules d'alguns d'aquests compostos, molts d'ells tenen en comú la presència d'un grup di-*tert*-butil-fenol (DTBP) amb un segon anell aromàtic substituït com la telbufelona [87], el CI-986 [61], CI-1004, el S-2474, el R-830 [57,85], el BF-389 [86] o el CI-987 (veure estructura en la figura 46) amb aplicació no tan sols en processos inflamatoris, si no també en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i l'esclerosi múltiple.

En aquest apartat s'intentarà establir quins paràmetres tenen en comú aquests fàrmacs capaços d'inhibir al mateix temps la COX i la 5-LOX establint un model que ha de verificar-se amb inhibidors selectius de la COX i selectius de la 5-LOX.

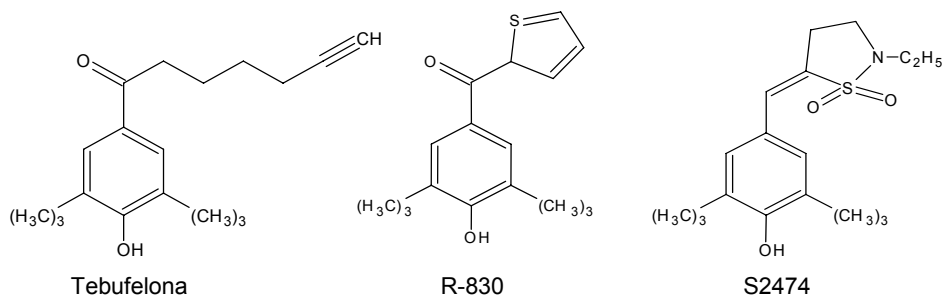


Figura 46. Estructura molecular d'alguns dels derivats DTBP inhibidors de la COX-2 i 5-LOX

### 4.6.1 Metodologia i etapes d'estudi

En una primera etapa s'ha obtingut per mecànica molecular implementada en el programa InsightII la geometria molecular de 24 derivats del di-*tert*-butil-fenol (DTBP) que es mostren en les taules 1 i 2 de l'article de l'apèndix *QSAR study of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors 2,6-di-tert-butylphenol derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11, 4207 –4216 (2003).*

Degut a l'existència d'un segon anell aromàtic que connecta amb el grup principal DTBP a través d'un grup carbonil o amino ha estat necessari plantejar un anàlisi conformacional amb optimització total de la geometria per la rotació de 0° a 355° graus de l'angle ( $\alpha^\circ$ ) que permet la lliure rotació del segon nucli aromàtic i amb optimització total de la geometria per cada increment de 5° amb la funció d'ona semiempírica AM1 implementada en el programa MOPAC 6.0 ESP.

Així mateix, la geometria de les conformacions de mínima energia ha estat optimitzada novament amb la base HF/6-31G(d) del programa GAUSSIAN-94. Aquesta base és la que millor reproduïa les propietats moleculars dels compostos estudiats. Paral·lelament i amb l'objectiu de seleccionar la/les possible/s conformacion/s bioactiva/es s'han comparat per superposició (*fitting*) les geometries de les conformacions de mínima energia amb la tebufelona, un compost dual de la mateixa família amb una elevada potencia antiinflamatòria com inhibidor de la COX i 5-LOX [87].

El possible mecanisme d'inhibició d'aquests derivats de la COX i la 5-LOX s'ha estudiat per mètodes indirectes de tècniques QSAR, relacionant diversos paràmetres per una part termodinàmics per estudiar la formació radicalària, en aquest cas del radical di-*tert*-butilfenòxid obtingut pel mètode de la coordenada de reacció i per altra de la densitat electrònica en el punt crític de l'enllaç O-H i per altra els derivats de l'estructura com les càrregues de Mulliken en diferents àtoms així com les energies dels orbitals frontera HOMO-LUMO i el ClogP obtingut amb ajuda del programa ClogP [75]. Aquests paràmetres s'han relacionat independentment i per separat amb cadascuna de les dues activitats antiinflamatòries COX i 5-LOX, finalment el model QSAR proposat per la inhibició de cada enzim ha estat validat amb sèries d'inhibidors selectius COX i selectius 5-LOX.

Les activitats antiinflamatòries així com els compostos seleccionats han estat obtinguts dels estudis de *Swingle et. al.* [85] i venen definides per la mesura *in vitro* de la concentració que inhibeix en un 50 % a l'enzim ciclooxigenasa obtinguda de vesícules seminals de xai i per la concentració que inhibeix en un 50 % a la 5-lipooxigenasa obtinguda de pulmó de cobai. S'han seleccionat un total de vint-i-quatre compostos derivats del DTBP i amb diferent natura química dels seus substituents amb major o menor activitat per inhibir ambdues dual COX i 5-LOX.

S'han utilitzat dues sèries complementàries: una formada per 5 inhibidors COX selectius i una altra constituïda per 5 inhibidors 5-LOX selectius. Aquestes dues sèries complementàries d'inhibidors selectius han estat utilitzades amb el propòsit de validar els models proposats per una part d'inhibició de la COX i per altra de la 5-LOX.

D'altra banda, per a cada compost s'han representat els mapes de PEM i de diferents probes de GRID [34-35] (hidrofílic, hidrofòbic, fèrric, ferròs) per tal d'identificar les àrees d'interacció molecular amb els possibles lligands del centre actiu de la COX i 5-LOX.

## **4.5 Estudi del mecanisme radicalari d'inhibició del procés inflamatori**

### **4.5.1 Introducció**

Un altre mecanisme antiinflamatori és la captació o interferència dels radicals lliures iniciadors i/o mediadors del procés inflamatori que com hem descrit en el capítol 2, es formen a partir de la mateixa lesió cel·lular (hidroxil HO·, òxid O·, superòxid O<sub>2</sub>· i hidroperòxid HOO·) igualment existrien radicals intermedis del substracte en transformació com el radical hidroperòxid derivat de l'araquidonat corresponent ROO·.

També diversos estudis [54-56] d'espectroscopia electrònica de resonància paramagnètica (EPR), han detectat la presència d'una acumulació radicalària prèvia a la síntesis de la PGH<sub>2</sub>. Aquest radical podria correspondre a radicals tirosils (Tyr·) o de serina (Ser·) que participarien en la catàlisi ciclooxigenàsica o lipooxigenàsica, aleshores el seu mecanisme d'inhibició podria catalogar-se com inhibidors reversibles temps-independents.

Aquest mecanisme de captació de radicals lliures i neutralització de radicals mediadors és propi d'un grup reduït d'antiinflamatoris no esteroïdals. Els salicilats a més d'acetilar covalentment un residu de Serina (Ser<sup>529</sup>) poden captar radicals lliures i minorar els efectes nocius dels radicals, en aquest sentit s'han dissenyat diversos derivats fenòlics com entre ells el R-830 [57], ONO-3144 [58], el MK-447 [59-60] i el CI-986 [61] entre altres, l'estructura d'alguns d'aquests derivats es representa en la figura 39, tots ells tenen en comú la presència d'un grup hidroxil que seria el que actuaria com neutralitzador de radicals podent també interaccionar, amb l'avantatge sobre els salicilats clàssics de no causar irritació gàstrica ni reaccions creuades ja que no cotenen el grup carboxílic en la seva estructura.

Però un dels antiinflamatoris que durant dècades s'havia pensat que podia actuar amb aquest mecanisme és el paracetamol (acetaminofè) sent més antipirètic i analgèsic que antiinflamatori.

El paracetamol compta amb més de 100 especialitats farmacèutiques que l'inclouen com únic principi actiu en la seva composició (Actron<sup>®</sup>, Gelocatil<sup>®</sup>, Termalgin<sup>®</sup>...) i més de 500 especialitats on es troba en combinació amb altres derivats principalment amb l'àcid acetil salicílic (A.A.S) (Frenadol<sup>®</sup>, Cortafriol<sup>®</sup>....) precisament per tal d'augmentar-li la potència antiinflamatòria que no té, en aquest sentit també es va idear de combinar-lo ja no tan sols en quant a composició si no també molecularment obtenint un éster de paracetamol i A.A.S. el benorilat (Benorile<sup>®</sup>, Doline<sup>®</sup>, Vetedol<sup>®</sup>) que es mostra en la figura 39.

Però diversos autors han qüestionat perquè el paracetamol tenint efectes antipirètics i analgèsics tan marcats i adaptant-se al model d'inhibició de la COX-2 perquè no és antiinflamatori ? [63-66]

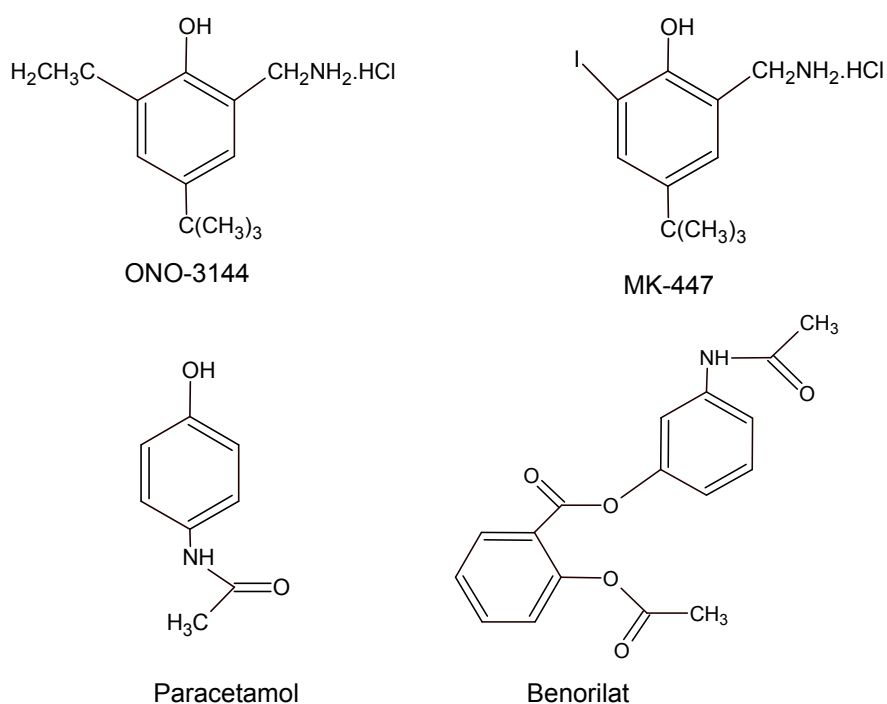


Figura 39. Derivats fenòlics amb possible mecanisme antioxidant.

La resposta es troba en què el paracetamol actuaria inhibint a la COX-3 [67] un isoenzim de la COX que es localitzaria en el cervell i que seria molt sensible a aquest fàrmac, tenint relació amb els centres termoregulador i sensitius del dolor, fet que explicaria l'eficàcia del paracetamol com antipirètic i analgèsic [68].

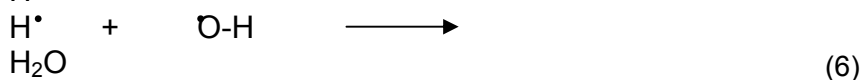
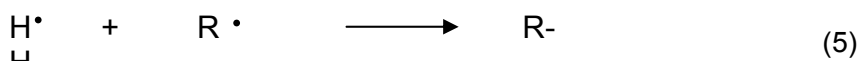
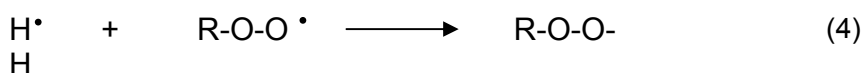
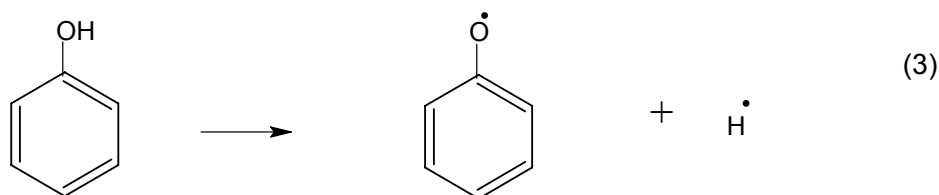


### 4.5.2 Estudi del mecanisme radicalari d'inhibició dels fenols

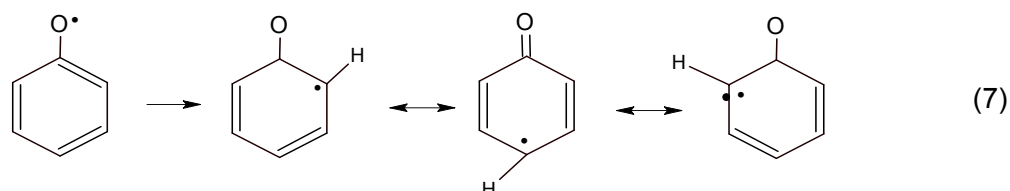
L'acció antiinflamatòria dels fenols és deguda al seu poder antioxidant com neutralitzadors de radicals, així els fenols:

- 1) Actuarien com sequestrants: captant els radicals formats per cèl.lules fagocítiques o generats durant la lesió cel.lular inhibint-los [57-62].
- 2) Bloquejarien la síntesi de prostaglandines i de leucotriens prevenint l'abstracció de l'hidrogen de l'àcid araquidònic en les primeres etapes de transformació en prostaglandines (figura 2 pàgina 13).
- 3) Neutralitzarien els radicals intermedis de reacció formats durant la síntesi de prostaglandines, com ara el radical hidroperòxid format a partir de l'àcid araquidònic, d'aquesta forma interferirien la unió del substracte amb la COX i/o amb la LOX [69-70].
- 4) Transformarien els radicals hidroperòxid en productes no radicalaris com alcohol o aigua [54].
- 5) Inhibirien el radical tirosil (Tyr<sup>385</sup>) essencial en la catàlisi ciclooxigenàsica [55].

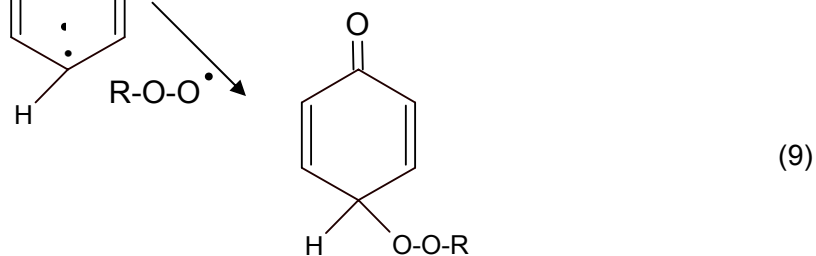
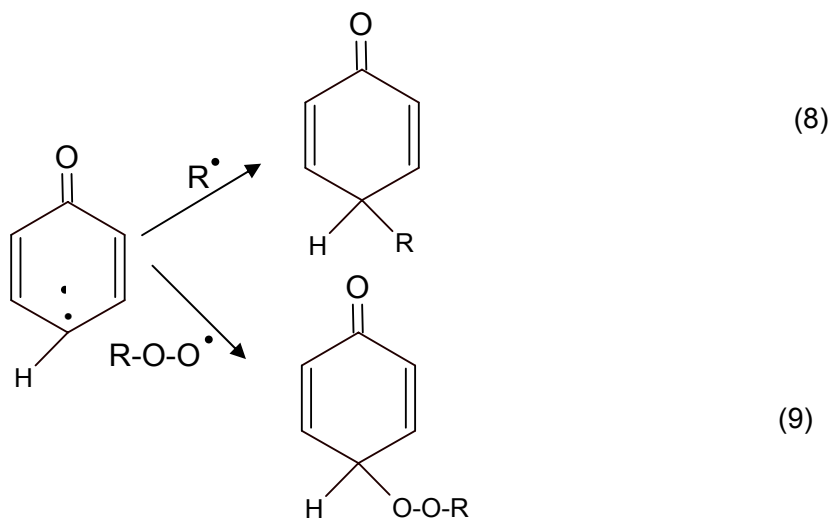
Però, perquè puguin produir-se tots els anteriors mecanismes es necessita la formació del radical fenòxid (eq. 3), el qual implica la neutralització de radicals nocius (eqs. 3 i 4) o la conversió d'ells en productes no radicalaris com alcohol o aigua (eq. 5).



Els radicals intermedis de reacció serien neutralitzats mentre que el radical fenòxid quedaria estabilitzat en equilibri de resonància amb un radical cetona (eq. 7):



Aquest radical cetona mitjançant la reacció de *Guareschi-Lustgarten* [71] pot neutralitzar nous radicals intermedis que puguin aparèixer durant el procés inflamatori (eqs. 8 i 9).



Per tant, els derivats fenòlics presenten un doble mecanisme com antiinflamatoris: el primer la neutralització dels radicals mediadors-iniciadors mitjançant la donació del seu hidrogen i segon la capacitat neutralitzar a aquests radicals a través de la cetona radical derivada del corresponent radical fenòxid.

És per això, que la facilitat de formació i posterior estabilitat del radical és un factor a tenir en compte en l'estudi de la relacions estructura activitat d'aquests compostos.

#### 4.5.2.1 Metodologia i etapes d'estudi

En una primera etapa s'ha estudiat la viabilitat del mecanisme de formació del radical fenòxid a partir del compost cap de sèrie fenol per després i amb ajuda de tècniques QSAR relacionar quantitativament la major o menor facilitat de formació d'aquest radical amb l'activitat antiinflamatòria per una sèrie de 25 derivats fenòlics.

Les activitats antiinflamatòries s'han obtingut a partir dels estudis de Dewhirst detallats en la referència [57], aquest autor ha fet servir una modificació del mètode de Vanderhoek i Lands [72], que consisteix en la mesura *in vitro* de la concentració que inhibeix en un 50 % a l'enzim ciclooxigenasa obtinguda de vesícules seminals de xai. S'han seleccionat un total de vint-i-cinc compostos derivats del fenol amb diferent natura química dels seus substituents (grups electronatracients i electrodonadors).

La geometria molecular per cadascun dels compostos estudiats que s'indiquen en les taules 1 i 2 dels articles de l'apèndix : *QSAR study of Phenols: Relation between the phenoxyl radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 15, 219-223 (1996) i *Theoretical prediction of the phenoxyl radical formation capacity and cyclooxygenase inhibition relationships by phenolic compounds. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 21, 605-612 (2002).

Aquestes geometries han estat obtingudes inicialment a partir de dades cristal·logràfiques i de la base de dades estructurals de Cambridge (CSD). Posteriorment s'han optimitzat per dinàmica molecular amb ajuda del programa DISCOVER i amb el suport d'una SGI 4D/35 workstation, les geometries finals s'han analitzat comparant-se amb els mètodes semiempíric AM1 i *ab initio* HF/6-31G(d) respectivament.

L'estudi de la formació del radical fenòxid s'ha realitzat pel mètode termodinàmic de la coordenada de reacció prenent com coordenada la distància d'enllaç O-H, l'estat de transició s'ha localitzat calculant la matriu de les constants de força amb ajut del *keyword* FORCE i detectant la presència d'un vector propi negatiu, l'estructura dels estats de transició corresponents s'han optimitzat amb el mètodes SIGMA i TS descrits en el capítol 3, pàgina 44.

Donada la importància de formació radicalària en aquests compostos, també s'ha estudiat la densitat electrònica en el punt crític per l'enllaç O-H ( $\rho_{OH}$ ), mètode que hem descrit en el capítol 3, pàgina 97 i que s'ha obtingut amb els programes GAUSSIAN-94 i EXTREME [73-74].

Entre altres paràmetres que es relacionaran amb l'activitat antiinflamatòria seran els termodinàmics com les entalpies de formació del radical fenòxid, energia de reacció així com les càrregues de Mulliken en diferents àtoms, la densitat en el punt crític  $\rho_{OH}$  i altres paràmetres com el ClogP obtingut amb ajuda del programa ClogP [75].

Per tal d'avaluar l'efecte del solvent s'han calculat les energies lliures de solvatació dels estats fonamentals i dels corresponents radicals fenòxid amb ajuda del programa AMSOL 6.5.3 [76] i fent ús del model de solvatació AM1-SM2 [77-78].

D'altra banda, per a cada compost s'han representat els mapes de PEM amb el programa MEPSIM [79] i amb el programa GRID [34-35] diferents probes de GRID1 per tal d'analitzar les àrees d'interacció molecular amb els possibles lligands del centre actiu de la COX.

Aquests resultats han servit per realitzar tècniques de modelització molecular el model de la COX-2 humana obtinguda per homologia de l'estudi de la inhibició dels derivats antranílics, arilpropionics i arilacètics. S'ha fet l'anclatge sobre el receptor de la COX-2 amb ajuda del programa AutoDock 3.0 [36].

## **4.5.2.2 Resultats i discussió**

### **4.5.2.2.1 Estudi de la formació del radical fenòxid**

La capacitat de formació del radical fenòxid i la seva posterior estabilitat ha estat estudiada mitjançant el mètode de la coordenada de reacció explicat en el capítol 3, pàgines 45-46. En el present cas, la coordenada de reacció correspon a la distància d'enllaç entre l'àtom d'oxigen i l'hidrogen del grup hidroxil. En la figura 40 es representa el perfil energètic obtingut, en abscesses es representa la distància O-H per a increments de 0,01Å i en coordenades es representa l'entalpia de formació en kcal/mol.

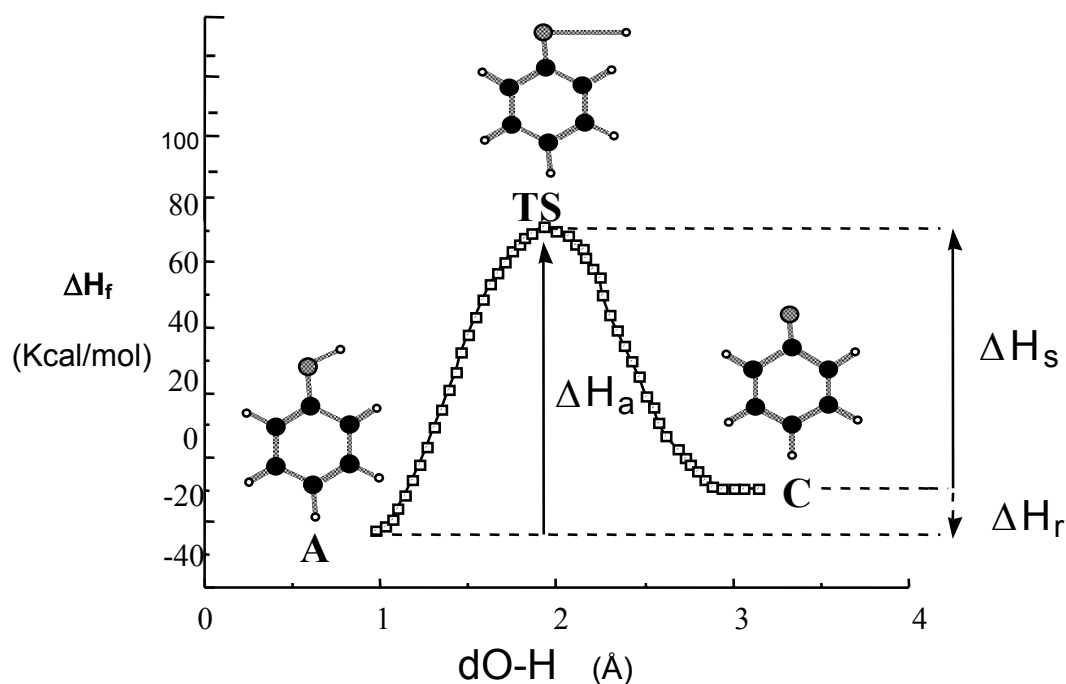


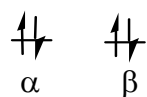
Figura 40. Perfil energètic de la coordenada de reacció per la formació del radical fenòxid  $\Delta H_a$  és l'entalpia d'activació,  $\Delta H_s$  és l'entalpia d'estabilització i  $\Delta H_r$  és l'entalpia de reacció.

És convenient estudiar aquesta coordenada de reacció en capa oberta mitjançant el formalisme d'Hartree-Fock no restringit (UHF) i també en capes tancades fent servir el formalisme d'Hartree-Fock restringit (RHF). Alhora cal tenir en compte, que en el radical intermedi l'àtom d'oxigen pot existir en dos possibles estats electrònics: en l'estat de singlet i en el de triplet.

L'estat de singlet correspon a una configuració electrònica de l'àtom d'oxigen amb els spins aparellats  $O(d^1)$  i l'estat de triplet correspon a una configuració amb els spins desaparellats  $O(p^3)$  tal i com es representa en la figura 41.

Per tant, segons aquests estats electrònics de l'àtom d'oxigen cal estudiar la formació del radical fenòxid en els quatre possibles camins de reacció per la seva formació, aquests són: singlet-RHF, singlet-UHF, triplet RHF i triplet-UHF.

## a) singlet

O(d<sup>1</sup>)

## b) triplet

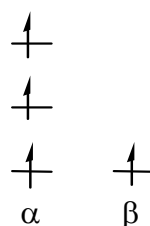
O(p<sup>3</sup>)

Figura 41. Possibles estats electrònics que pot presentar l'àtom d'oxigen hidroxílic

Els perfils energètics d'aquests camins de reacció han estat obtinguts amb el mètode semiempíric AM1 i es comparen en la figura 42 i en la taula 7. Com a resultat el radical fenòxid en estat de singlet és 50 Kcal/mol més estable que el triplet. També l'estat de transició (TS) resulta més estable que en qualsevol dels altres mètodes. Aquest resultat concorda plenament amb estudis d'Espectroscopia de Resonància Paramagnètica (EPR) que demostren l'existència d'una senyal de singlet durant la incubació de fenol amb l'àcid araquidònic en presència de la COX [80-81].

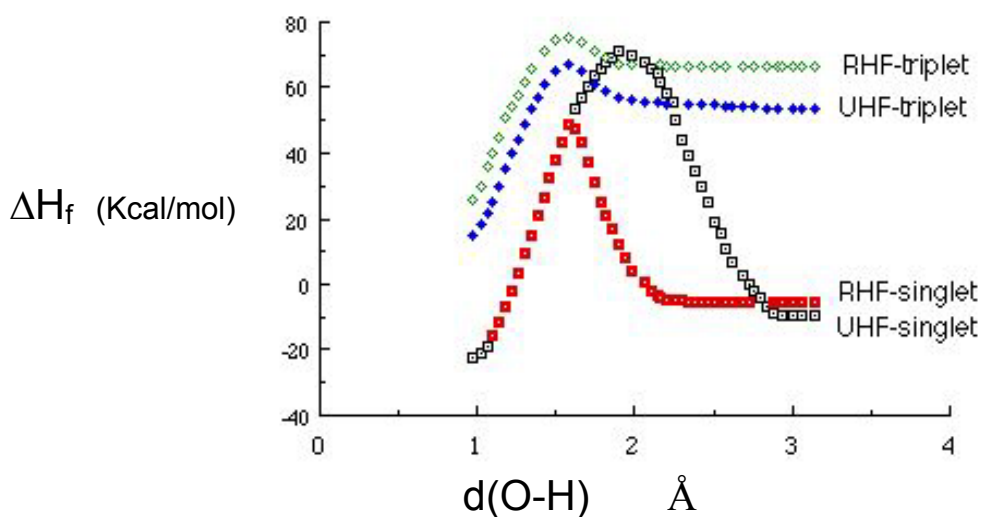


Figura 42. Superposició dels perfils energètics per la formació del radical fenòxid amb els diferents formalismes: RHF-singlet, UHF-singlet, RHF-triplet i UHF-triplet.

Tanmateix, altres estudis semiempírics (MNDO) sobre el radical fenòlic assenyalen que l'estat electrònic de singlet és més estable que el de triplet [82].

D'altra banda, com s'observa en la figura 42 el perfil de la corba energètica RHF-singlet és molt pronunciat, pel contrari s'observa un perfil més uniforme pel camí UHF-singlet.

	A	TS	C
Singlet RHF	-22,24	45,92	3,12
Singlet UHF	-22,24	54,82	4,72
Triplet RHF	35,06	72,80	66,96
Triplet UHF	26,59	61,20	55,75

Taula 7. Entalpies de formació en Kcal/mol per cadascun dels possibles camins de reacció Per la formació del radical fenòxid (C) a partir del fenol (A) passant per l'estat de transició (TS).

Cal destacar la dificultat del mètode AM1 per l'optimització de l'estat de transició, ja que es tracta d'una estructura poc estable, però que finalment s'ha aconseguit fent ús del mètode TS que hem descrit en el capítol 3, apartat 3.3.5.

Per últim, no s'observen diferències en la geometria dels quatre estats de transició (TS) corresponents a cadascun dels camins de reacció, sent idèntics l'angle d'enllaç entre l'hidrogen fenòlic i l'anell aromàtic.

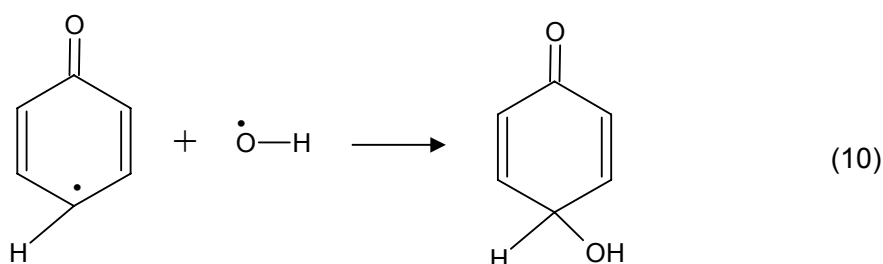
Tampoc existeixen diferències apreciables en la geometria dels estats fonamentals. Per tant, s'ha procedit a estudiar la formació del radical fenòxid dels derivats de la taula-1 de l'article *QSAR study of Phenols: Relation between the phenoxyl radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism. Quant. Struc.-Act. Relat., 15, 219-223 (1996)*, establint-se una relació quantitativa estructura activitat que s'ha verificat amb els compostos de la taula-2 amb un total de 21 derivats fenòlics. Per tal de reduir el volum de càlcul ha estat necessari procedir a escollir el camí de reacció més convenient, tenint en compte les dades experimentals i evitant possibles problemes de càlcul, ja que els radicals en principi són molècules inestables.

Atenent aquests criteris el radical format per la via singlet resulta més estable que el triplet i a més les dades experimentals [80-81] confirmen la presència d'aquest estat electrònic en estudis experimentals del fenol incubat amb la COX.

Per tant, dels quatre possibles camins de reacció, ara, cal discernir entre dos possibles: RHF-singlet o UHF-singlet. Atenent al perfil de la corba energètica de la figura 42, la més uniforme és per una configuració electrònica en capes obertes (UHF), és per això que finalment s'ha optat per estudiar la formació radicalària dels derivats fenòlics fent ús la via UHF-singlet.

El resultat de les entalpies de formació amb el mètode semiempíric AM1 per l'estat fonamental  $\Delta H(A)$ , estat de transició  $\Delta H(TS)$  i radical  $\Delta H(C)$ , es mostren en la taula-1 de l'article: *QSAR study of Phenols: Relation between the phenoxyl radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism. Quant. Struc.-Act. Relat., 15, 219-223 (1996)* i amb el formalisme *ab initio* HF/6-31G(d) s'indiquen en la taula-1 de l'article: *Theoretical prediction of the phenoxyl radical formation capacity and cyclooxygenase inhibition relationships by phenolic compounds. Quant. Struc.-Act.Relat., 21, 605-612 (2002)*, a més s'han estudiat com paràmetres termodinàmics, aquells que permetin conèixer la facilitat de formació del radical i la seva posterior estabilitat, aquests paràmetres es defineixen en la figura 39 i són: les energies d'activació ( $\Delta H_a$ ), d'estabilització ( $\Delta H_s$ ) i de reacció ( $\Delta H_r$ ).

Una vegada minimitzat el radical fenòxid també s'ha estudiat la viabilitat del mecanisme de captació del radical hidròxil  $H-O\cdot$  per aproximació d'aquest a la posició *para* del anell fenil tal i com s'esquemmatitza de forma general en l'equació 8 per la captació de qualsevol radical, que s'ha refet pel radical hidroxil en l'equació 10:



Amb el formalisme UHF-singlet s'ha obtingut el gràfic de la figura 43.



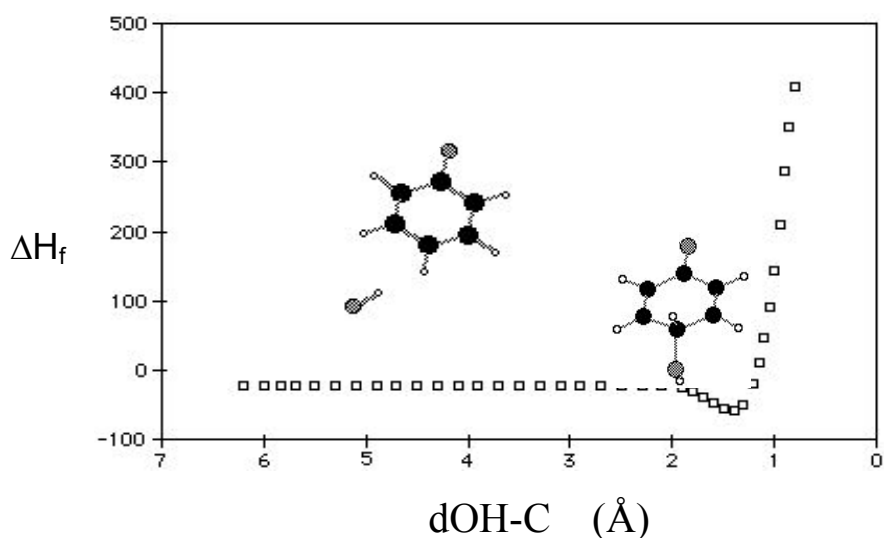


Figura 43. Gràfic energètic de l'estudi mecanístic d'aproximació del radical hidroxil al radical Fenòxid segons l'equació 10.

#### 4.5.2.2 Relació quantitatives estructura-activitat

Els resultats obtinguts indiquen que els compostos més actius presenten una menor entalpia de reacció ( $\Delta H_f$ ) per la formació del radical fenòxid que els derivats poc actius que mostren un valor més elevat indicant una certa dificultat per la formació del corresponent radical fenòxid.

Aquesta dificultat o facilitat per la formació del radical és deguda principalment a una doble causa: la primera la natura electronatraitent o electrodonadora dels substituents i segon la posició *orto*, *para* o *meta* en què es situen aquests substituents, ja que com hem vist en l'equació 7 en el mecanisme dels fenols, és important l'efecte de resonància en l'anell aromàtic [83].

En aquest sentit els substituents electrodonadors (metil, etil, terbutil..) en posició *orto* i/o *para* afavoreixen la ruptura de l'enllaç (ex: 2,4,6-trimetilfenol  $\Delta H_f = 362$  Kcal/mol) i la consegüent formació del radical, amb el qual aquests compostos són actius com antiinflamatoris.

Pel contrari (veure taula-1 de l'article *Theoretical prediction of the phenoxy radical... Quant. Struc.-Act.Relat.*, 21,605-612 (2002) els grups halogenats com el clor, brom, fluor augmenten el dèficit electrònic de l'àtom d'oxigen i com a conseqüència aquest atrau el par d'electrons que comparteix amb l'hidrogen, formant el radical amb més dificultat (ex. 2-Cl  $\Delta H_T = 365$  Kcal/mol).

La relació quantitativa estructura-activitat ve definida per les equacions 11 (formalisme AM1,  $r=0.950$ ) i 12 (formalisme *ab-initio*  $r=0.920$ ) obtenint una correlació similar entre  $\Delta H_T$  i l'activitat antiinflamatòria *in vitro*.

$$\begin{aligned} \log 1/I50 &= -0.63 \Delta H_T (\pm 0.12) + 14.05 (\pm 3.07) \\ n &= 15, \quad r=0.950, \quad s=0.242, \quad F=121.53 \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \log 1/I50 &= -0.53 \Delta H_T (\pm 0.06) + 189.41 (\pm 21.97) \\ n &= 16, \quad r=0.920, \quad s=0.315, \quad F=75.81 \end{aligned} \quad (12)$$

Aquest resultat es confirma amb l'estudi de la densitat en el punt crític per l'enllaç O-H ( $\rho_{OH}$ ) i que es mostra en la Taula 1 de l'article *Theoretical prediction of the phenoxy radical. Quant. Struc. - Act.Relat.*, 21, 605-612 (2002) on els compostos actius presenten substituents electrodonadors preferentment en les posicions *orto* i *para* tenen una densitat elevada (per exemple: 246-trimetilfenol  $\rho_{OH} = 0.3689$ ) i els menys actius solen tenir aquests substituents en *meta* o bé presenten àtoms halogenats (ex. comp. 2-clorofenol  $\rho_{OH} = 0.3663$ ). L'anàlisi de regressió lineal mostra un coeficient de correlació de  $r=0.879$  i que es descriu en l'equació 13:

$$\begin{aligned} \log 1/I50 &= 53.16 \rho_{OH} (\pm 7.70) - 197.20 (\pm 28.30) \\ n &= 16, \quad r=0.879, \quad s=0.380, \quad F=47.60 \end{aligned} \quad (13)$$

Com seria d'esperar, aquestes dos paràmetres que correlacionen amb l'activitat ( $r=0.920$ ) i  $\rho_{OH}$  ( $r=0.879$ ), també correlacionen entre sí amb un coeficient  $r=0.938$ , correlació que ve definida per l'equació 14 :

$$\begin{aligned} \rho_{OH} &= -8.15 \Delta H_T + 6.65 (\pm 0.29) \\ n &= 16, \quad r=0.938, \quad s=0.004, \quad F=103.30 \end{aligned} \quad (14)$$

Altres paràmetres electrònics també guarden una relació significativa amb l'activitat com ara les càrregues de Mulliken dels carbons aromàtics de les posicions *orto* i *para*, que sumades dins del paràmetre càrrega total ( $Q_t$ ) reflecteix millor les variacions degudes a la presència de substituents en aquestes posicions ( $r=0.802$ ), en aquest sentit una càrrega molt negativa d'aquests carbons dificulta la formació radicalària. Tanmateix, una càrrega molt negativa en l'àtom d'oxigen afavoreix la formació del radical fenòxid, de forma que la càrrega electrònica de l'àtom de oxigen també està relacionada amb la major o menor facilitat de formació radicalària i per tant amb l'activitat antiinflamatòria ( $r=0.802$ ).

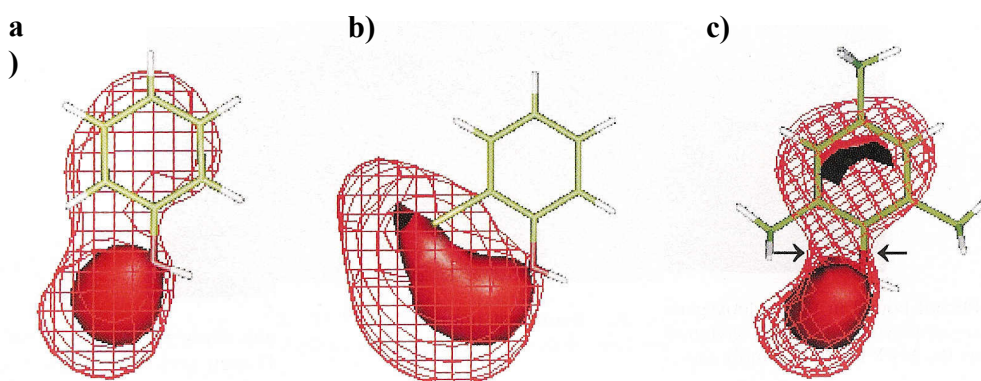


Figura 44. Mapes de PEM per a) fenol, b) un derivat poc actiu i c) un derivat més actiu, els contorns sòlids representen corbes d'isopotencial de  $-20$  i les discontinues de  $-10$  Kcal/mol.

Aquests resultats es confirmen amb la representació dels mapes de PEM, que es mostren per a tres compostos representatius en la figura 44 que compara els mapes de PEM per a tres derivats; el fenol ( $IC_{50}=1600 \mu\text{M}$ ), un derivat poc actiu (2-clorofenol) ( $IC_{50}=800 \mu\text{M}$ ), i un tercer més actiu el 2,4,6-trimetilfenol ( $IC_{50}=7 \mu\text{M}$ ), tots els derivats presenten un mínim de potencial localitzat en l'oxigen fenòlic. Aquest mínim en el compost menys actiu el 2-clorofenol s'estén fins a la posició *orto* per l'existència de l'àtom de clor en aquesta posició dificultant la ruptura de l'enllaç O-H.

Per al contrari, el compost més actiu: el 2,4,6-trimetilfenol presenta una estrangulació en aquest mínim facilitant la ruptura de l'enllaç O-H i la consegüent formació radicalària.

En quant als paràmetres de lipofilia s'ha calculat el ClogP dades que es mostren en la taula 1 de l'article més actualitzat *Theoretical prediction of the phenoxyl radical. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 21, 605-612 (2002) com a resultat aquest paràmetre també correlaciona amb l'activitat ( $r=0.789$ ) indicant un elevat ClogP afavoreix l'activitat antiinflamatòria sent necessari un cert caràcter lipòfob d'aquestes molècules per accedir bé al centre actiu de la COX.

#### 4.5.2.2.3 Efecte del solvent

Per tal d'estudiar l'efecte del solvent en la formació del radical fenòxid s'ha procedit a calcular fent ús del programa AMSOL 6.5.3 [76] amb el model de solvatació AM1-SM2 [77-78] les energies lliures de solvatació pels diferents estats: fonamental  $\Delta H(A)$ , estat de transició  $\Delta H(TS)$  i radical  $\Delta H(C)$ ; així com l'energia de reacció ( $\Delta H_r$ ). Els resultats es mostren en la taula següent:

Nº	compost	A	TS	C	$\Delta H_r$
1	<b>fenol</b>	-28,80	67,74	5,25	34,05
2	<b>2-metil</b>	-34,44	62,11	-7,5	26,94
3	<b>3-metil</b>	-36,43	60,90	-2,23	34,20
4	<b>4-metil</b>	-29,79	61,23	-8,28	21,51
5	<b>2-Br</b>	-22,31	40,97	6,39	28,70
6	<b>2,3-dimetil</b>	-40,76	57,18	-14,51	26,25
7	<b>2,4-dimetil</b>	-41,79	57,73	-15,85	25,94
8	<b>2,5-dimetil</b>	-42,93	39,45	-15,02	27,91
9	<b>2,6-dimetil</b>	-40,85	40,13	-15,07	25,78
10	<b>3,4-dimetil</b>	-43,21	54,40	-15,32	27,89
11	<b>3,5-dimetil</b>	-43,70	53,87	-9,05	34,65
12	<b>2,3,5-trimetil</b>	-48,69	53,37	-22,02	26,67
13	<b>2,3,6-trimetil</b>	-47,72	33,55	-22,05	25,67
14	<b>2,4,6-trimetil</b>	-48,18	31,97	-24,05	24,13
15	<b>2,3,5,6-tetramet.</b>	-53,80	28,06	-30,24	23,56

Taula 8. Entalpies de formació i energia de reacció  $\Delta H_r$  en Kcal/mol obtingudes amb el programa AMSOL.

L'anàlisi de correlació lineal mostra com els resultats obtinguts a partir del mètode de solvatació es mantenen respecte als inicials AM1 i HF/6-31G(d) *ab initio* així els estats A, TS i el radical fenòxid C obtenen respectivament coeficients  $r$  de correlació de 0,781; 0,646 i 0,872 i l'energia de reacció per la formació del radical fenòxid  $\Delta H_r$  de :  $r=0.717$ .

Comparativament aquests valors de correlació són lleugerament més baixos que els inicials, degut possiblement a un emmascarament o interferència de les molècules d'aigua amb els àtoms de les molècules estudiades, però que en línies generals corroboren la viabilitat de la formació del radical fenòxid en un medi integrat per la molècula de la COX i l'inhibidor envoltat de molècules d'aigua.

#### **4.5.2.2.4 Mètodes directes d'estudi de la interacció dels fenols en el locus actiu de l'enzim COX-2**

El model de la COX-2 humana obtingut en apartats anteriors per l'estudi mecanístic del derivats fenilacètics, arilntranílics i arilpropionics s'ha fet servir en aquest apartat per explorar amb ajuda del programa AutoDock 3.0 l'anclatge del fenol i els seus derivats a la COX2-humana.

A més s'han representat els mapes de PEM i GRID en els per tal de localitzar així les possibles àrees d'interacció dels inhibidors amb els residus de la COX2.

Com a resultat el fenol s'uneix al final d'una llarga cavitat hidrofòbica propera al grup HEMO amb una correcta interacció amb els residus de Ser<sup>530</sup> i His<sup>351</sup> però per accedir al centre actiu cal travessar un entorn hidrofòbic format pels residus de Leu<sup>353</sup>, Phe<sup>198</sup>, Phe<sup>381</sup> i Phe<sup>580</sup>.

La distància entre el grup hidroxil del fenol i l'àtom de ferro del grup prostètic és de 9 Å, distància que permetria una possible transferència protònica. Aquesta distància és similar a la distància entre el grup hidroxil de la Tyr<sup>385</sup> i l'àtom de ferro prostètic.

El resultat dels mapes de GRID per la interacció hidrofòbica (probe DRY) es mostra en la figura 45, el fenol i el 2-clorfenol que són pocs actius mostren un àrea d'interacció reduïda, metreque el 2,4,6-trimetilfenol sent més actiu presenta una major àrea d'interacció hidrofòbica conferida pels 3 grups metils.

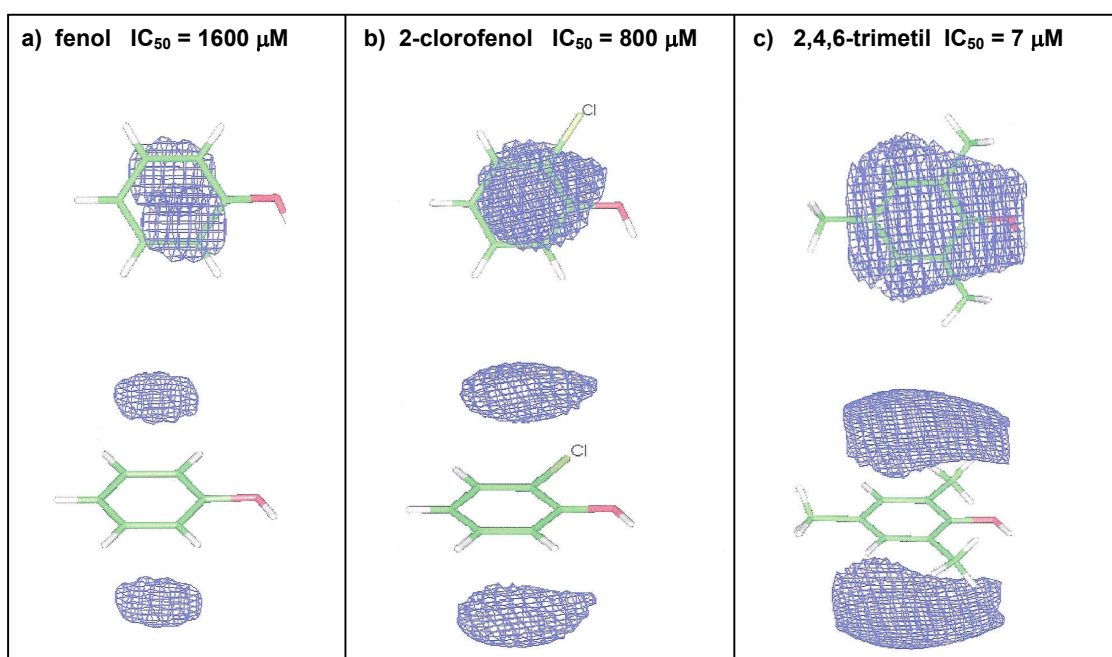


Figura 45 Mapes de GRID per la interacció hidrofòbica (DRY) els contorns de línies blaves representen corbes isoenergètiques de  $-1,5$  Kcal/mol. Es representa el mateix mapa en visió planar i transversal per dos derivats poc actius: a) fenol i b) 2-clorfenol, en c) un derivat més actiu: el 2,4,6-trimetilfenol, aquest últim presenta una àrea d'interacció hidrofòbica més extensa.

Les àrees d'interacció hidrofòbica són més extenses en el 2,4,6-trimetilfenol que en el fenol, permetent per el derivat trimetilat mantenir unes interaccions complementàries amb els residus de Trp<sup>387</sup>, His<sup>351</sup>, Val<sup>434</sup> i lleu<sup>517</sup>. Mantinent al mateix temps una interacció electrostàtica de l'anell aromàtic amb la Ser<sup>530</sup> i la His<sup>351</sup> aquests resultats d'interacció en el locus actiu de la COX2 humana es recullen en la figures 3 i 4 de l'article *Theoretical prediction of the phenoxyl radical. Quant. Struc.-Act. Relat.*, 21, 605-612 (2002).

Per tant, aquests mètodes directes confirmen els resultats de QSAR obtinguts pels mètodes indirectes i corroboren la interacció dels fenols en el locus actiu de la COX2.

## 4.6 Estudi del mecanisme d'inhibició dual de la COX i 5-LOX dels Di-*tert*-butil-fenols

Com hem vist en el capítol 2 i en l'apartat 2.7 (futurs fàrmacs antiinflamatoris) un grup farmacològic de gran interès són els inhibidors duals de la COX-2 i la 5-LOX [84], en les pàgines 28 i 29 es citen i s'indiquen les fórmules d'alguns d'aquests compostos, molts d'ells tenen en comú la presència d'un grup di-*tert*-butil-fenol (DTBP) amb un segon anell aromàtic substituït com la telbufelona [87], el CI-986 [61], CI-1004, el S-2474, el R-830 [57,85], el BF-389 [86] o el CI-987 (veure estructura en la figura 46) amb aplicació no tan sols en processos inflamatoris, si no també en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i l'esclerosi múltiple.

En aquest apartat s'intentarà establir quins paràmetres tenen en comú aquests fàrmacs capaços d'inhibir al mateix temps la COX i la 5-LOX establint un model que ha de verificar-se amb inhibidors selectius de la COX i selectius de la 5-LOX.

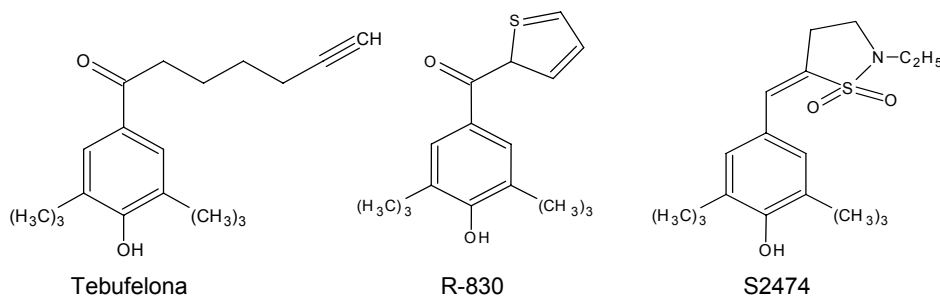


Figura 46. Estructura molecular d'alguns dels derivats DTBP inhibidors de la COX-2 i 5-LOX

### 4.6.1 Metodologia i etapes d'estudi

En una primera etapa s'ha obtingut per mecànica molecular implementada en el programa InsightII la geometria molecular de 24 derivats del di-*tert*-butil-fenol (DTBP) que es mostren en les taules 1 i 2 de l'article de l'apèndix *QSAR study of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors 2,6-di-tert-butylphenol derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11, 4207 –4216 (2003).*

Degut a l'existència d'un segon anell aromàtic que connecta amb el grup principal DTBP a través d'un grup carbonil o amino ha estat necessari plantejar un anàlisi conformacional amb optimització total de la geometria per la rotació de 0° a 355° graus de l'angle ( $\alpha^\circ$ ) que permet la lliure rotació del segon nucli aromàtic i amb optimització total de la geometria per cada increment de 5° amb la funció d'ona semiempírica AM1 implementada en el programa MOPAC 6.0 ESP.

Així mateix, la geometria de les conformacions de mínima energia ha estat optimitzada novament amb la base HF/6-31G(d) del programa GAUSSIAN-94. Aquesta base és la que millor reproduïa les propietats moleculars dels compostos estudiats. Paral·lelament i amb l'objectiu de seleccionar la/les possible/s conformacion/s bioactiva/es s'han comparat per superposició (*fitting*) les geometries de les conformacions de mínima energia amb la tebufelona, un compost dual de la mateixa família amb una elevada potencia antiinflamatòria com inhibidor de la COX i 5-LOX [87].

El possible mecanisme d'inhibició d'aquests derivats de la COX i la 5-LOX s'ha estudiat per mètodes indirectes de tècniques QSAR, relacionant diversos paràmetres per una part termodinàmics per estudiar la formació radicalària, en aquest cas del radical di-*tert*-butilfenòxid obtingut pel mètode de la coordenada de reacció i per altra de la densitat electrònica en el punt crític de l'enllaç O-H i per altra els derivats de l'estructura com les càrregues de Mulliken en diferents àtoms així com les energies dels orbitals frontera HOMO-LUMO i el ClogP obtingut amb ajuda del programa ClogP [75]. Aquests paràmetres s'han relacionat independentment i per separat amb cadascuna de les dues activitats antiinflamatòries COX i 5-LOX, finalment el model QSAR proposat per la inhibició de cada enzim ha estat validat amb sèries d'inhibidors selectius COX i selectius 5-LOX.

Les activitats antiinflamatòries així com els compostos seleccionats han estat obtinguts dels estudis de *Swingle et. al.* [85] i venen definides per la mesura *in vitro* de la concentració que inhibeix en un 50 % a l'enzim ciclooxigenasa obtinguda de vesícules seminals de xai i per la concentració que inhibeix en un 50 % a la 5-lipooxigenasa obtinguda de pulmó de cobai. S'han seleccionat un total de vint-i-quatre compostos derivats del DTBP i amb diferent natura química dels seus substituents amb major o menor activitat per inhibir ambdues dual COX i 5-LOX.



S'han utilitzat dues sèries complementàries: una formada per 5 inhibidors COX selectius i una altra constituïda per 5 inhibidors 5-LOX selectius. Aquestes dues sèries complementàries d'inhibidors selectius han estat utilitzades amb el propòsit de validar els models proposats per una part d'inhibició de la COX i per altra de la 5-LOX.

D'altra banda, per a cada compost s'han representat els mapes de PEM i de diferents probes de GRID [34-35] (hidrofílic, hidrofòbic, fèrric, ferròs) per tal d'identificar les àrees d'interacció molecular amb els possibles lligands del centre actiu de la COX i 5-LOX.

## 4.6.2 Resultats i discussió

### 4.6.2.1 Estudi conformacional

En la majoria de derivats estudiats de la família dels DTBP la variació estructural ve definida per una banda per la presència o absència d'un o dels dos grups di-*tert*-butils en posicions *orto* ( $R_1$  i  $R_2$  en la fórmula molecular de la figura 47) i per altra banda pel substituent en posició *para* de l'anell di-*tert*-butil-fenol ( $R_3$ ).

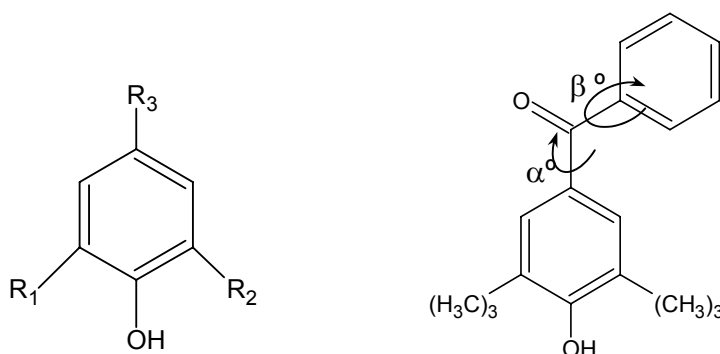


Figura 47. Estructura molecular dels DTBP amb definició dels angles de lliure rotació.

La lliure rotació del substituent en posició *para* és possible a través d'un enllaç simple, per aquest motiu a partir de la geometria optimitzada per mecànica molecular (MM) amb el programa Insight-II [13] s'ha procedit a realitzar un exhaustiu anàlisi conformacional amb optimització total de la geometria per a cada 5° de rotació de l'angle del substituent en *para* amb l'anell fenòlic ( $\alpha^\circ$ ) en un interval comprès entre 0° i 355°. Per motius de volum de càlcul aquestes optimitzacions van realitzar-se en una primera fase amb el mètode semiempíric AM1 per després i una vegada obtingudes les conformacions de mínima energia en una segona etapa optimitzar-les amb la base *ab initio* HF/6-31G(d).

Els resultats d'aquest estudi s'il·lustren a mode d'exemple en les figures 48, 49 i 50.

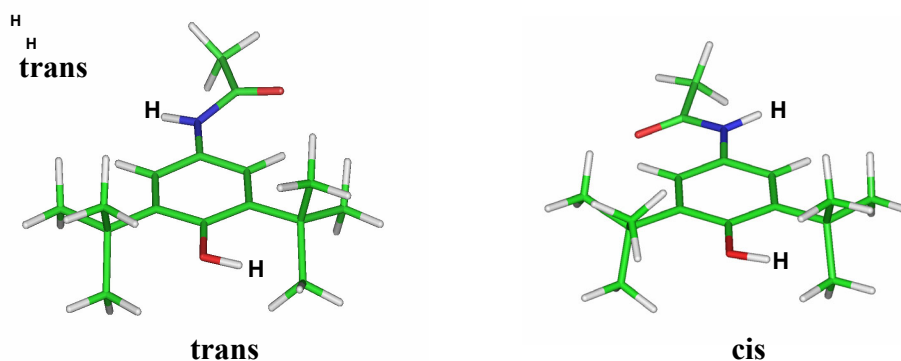


Figura 48. Conformacions de mínima energia pel compost *p*-acetamido-DTBP.

El compost COX-selectiu *p*-acetamido-DTBP (compost n° 15) bàsicament obté dues conformacions de mínima energia anomenades respectivament: *cis* i *trans* segons la disposició de l'hidrogen amino respecte a l'hidrogen fenòlic, amb només dues conformacions aquest compost resulta menys actiu per inhibir a la COX ( $IC_{50}=5 \times 10^{-5} \mu M$ ) que altres compostos que presenten major nombre de conformacions com és el cas del compost n° 6 dual *N*-metil-amido-DTBP (COX,  $IC_{50}=2 \times 10^{-6} \mu M$ ) representat en la figura 46 amb quatre conformacions: dues *cis* i dues *trans* que alhora atenen a la disposició de l'oxigen carbonil respecte al pla de l'anell aromàtic poden ser:  $\alpha$  si es disposa per sobre i  $\beta$  si es disposa per sota.

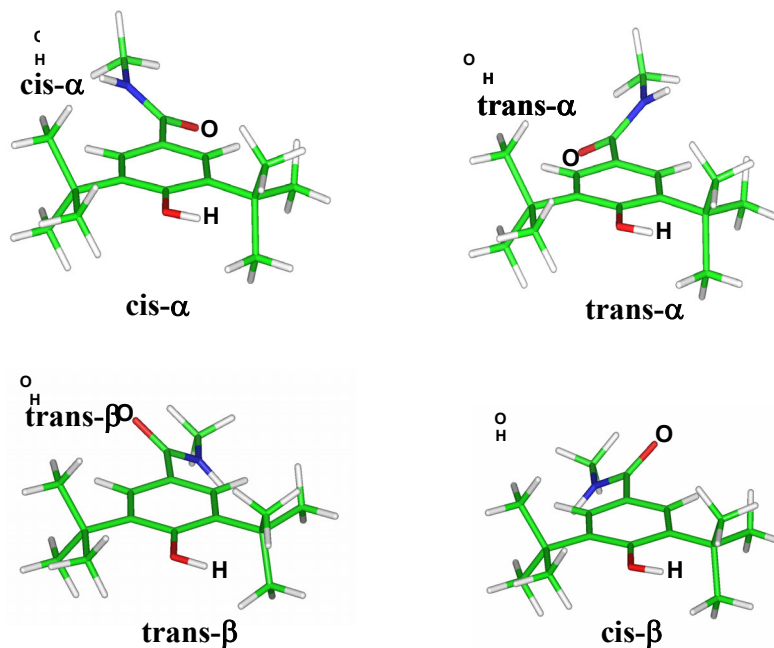


Figura 49. Conformacions de mínima energia pel compost *N*-metilamido-DTBP.

Fins a sis conformacions de mínima energia poden mostrar alguns compostos com el compost 5-LOX selectiu *p*-bencil-DTBP (comp.21  $IC_{50}=7 \times 10^{-7} \mu\text{M}$ ), conformacions que es dibuixen en la figura 50.

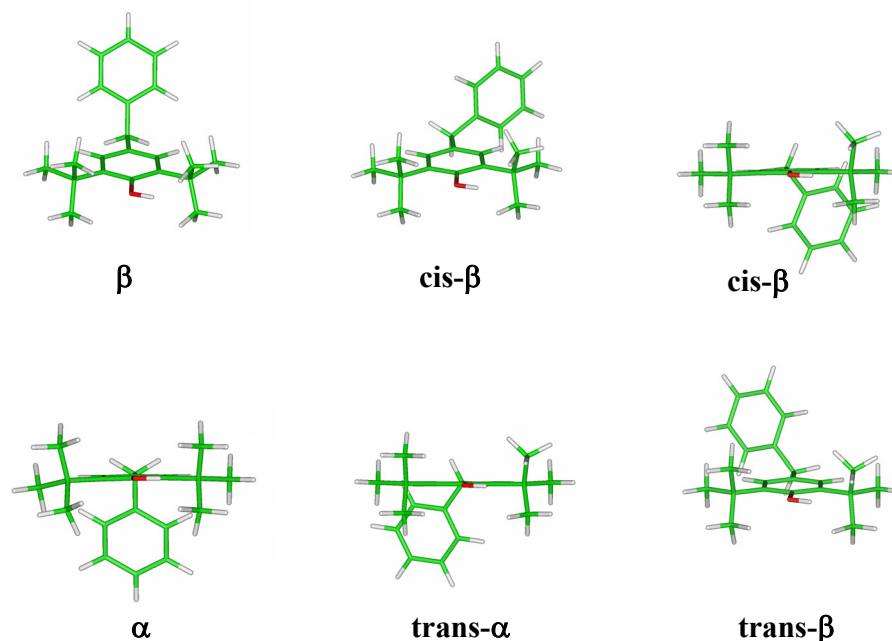


Figura 50. Conformacions de mínima energia pel compost *p*-bencil-DTBP.

Alguns compostos estructuralment molt similars com els derivats *p*-2-piridil-carbonil (22) i *p*-4-piridil-carbonil (23) que mostren quatre conformacions: trans- $\alpha$ , cis- $\alpha$ , trans- $\beta$  i cis- $\beta$ . Però si es comparen el compost 2-piridil presenta una conformació planar més rígida de l'oxigen carbonil que el corresponent 4-piridil tal i com mostra la figura 51.

Aquest efecte podria ser degut a un efecte de piramidalització de l'àtom de nitrogen que es troba més proper al grup carbonil en el 2-piridil curiosament aquest derivat més planar és també menys actiu ( $IC_{50}=5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ ) que el més flexible (4-piridil,  $IC_{50}=1 \times 10^{-7} \mu\text{M}$ ), aquest resultat corrobora la importància de la flexibilitat per una millor adaptació del segon anell aromàtic al centre actiu dels enzims.

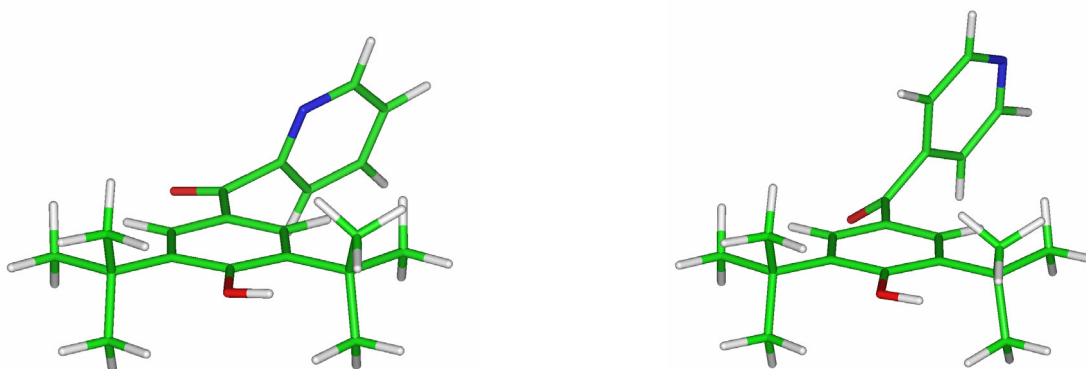


Figura 51. Comparació de l'estructura molecular pel mateix conformatore en els dos compostos p-(2-piridil)-carbonil-DTBP i p-(4-piridil)-carbonil-DTBP.

Una vegada obtingudes les conformacions de mínima energia aquestes s'han superposat amb les conformacions també de mínima energia per la telbufelona, potent inhibidor dual de la COX i la 5-LOX, superposicions que es mostren en la figura 52 per les conformacions cis- $\beta$  de diversos derivats amb un correcte ajust de RMS comprès entre 0,01 i 0,015. També mostren correctes superposicions amb valors de RMS similars per els conformers : trans- $\alpha$ , cis- $\alpha$ , i trans- $\beta$ .

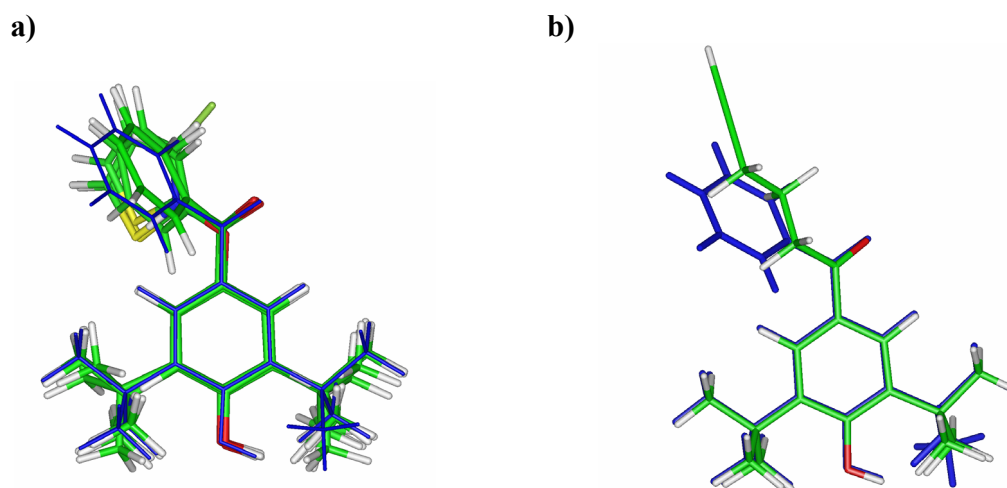


Figura 52. a) Superposició de la conformació cis- $\beta$  entre inhibidors duals DTBP, b) el derivat actiu p-benzoil-DTBP amb la telbufelona.

#### 4.6.2.2 Estudi de la formació del radical di-*tert*-butil-fenòxid

A l'igual que per l'anterior família dels fenols es va considerar necessari estudiar la capacitat de formació del radical fenòxid i la seva posterior estabilitat per aquesta nova sèrie de compostos DTBP. S'ha fet servir el mateix mètode de la coordenada de reacció prenent com variable la distància d'enllaç O-H i amb la funció d'ona semiempírica AM1.

Existeixen tres estats possibles definits com A l'estat fonamental, TS l'estat de transició i C el radical fenòxid.

Aquests tres estats es defineixen en la figura 53 amb indicació del perfil energètic que correspon al camí de la coordenada de reacció.

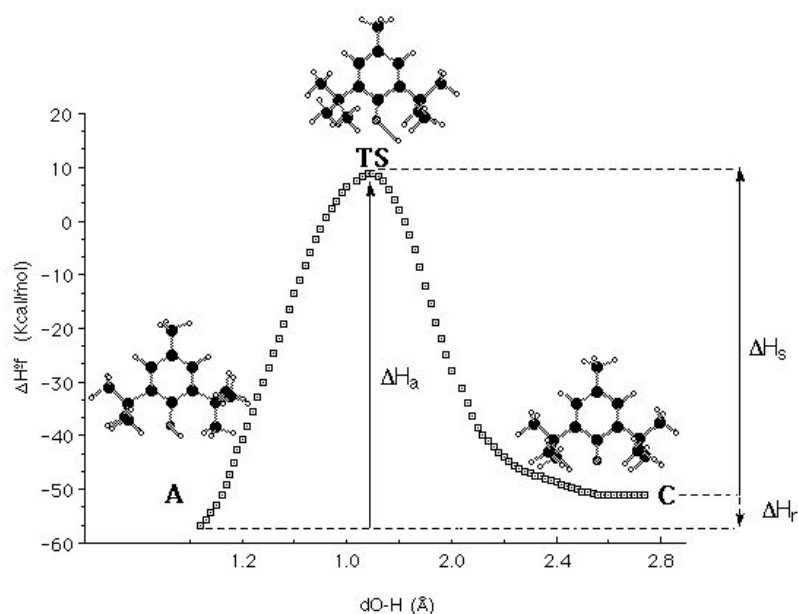


Figura 53. Formació del radical di-*tert*-butil-fenòxid pel mètode de la coordenada de reacció, amb indicació dels estats: fonamental (A), estat de transició (TS) i radical di-*tert*-butil-fenòxid (C).  $\Delta H_a$  és l'entalpia d'activació,  $\Delta H_s$  és l'entalpia d'estabilització i  $\Delta H_r$  és l'entalpia de reacció.

A l'igual que per els fenols i atenent als possibles estats electrònics de l'oxigen fenòlic s'han considerat els quatre possibles formalismes UHF-singlet, UHF-triplet, RHF-singlet i RHF-triplet.

En aquest estudi hi havien dos objectius: per una banda el de seleccionar el formalisme que hauria de servir de base per l'estudi de formació radicalària dels compostos de la sèrie i per l'altra el de verificar-comparar els resultats obtinguts pels fenols amb els DTBP. Com era d'esperar del formalisme UHF-singlet enfront dels altres mètodes, així en la taula-9 i figura 54 s'indiquen els valors termodinàmics de les entalpies de formació per l'estat fonamental (A), estat de transició (TS) i radical di-*tert*-butil-fenòxid (C).

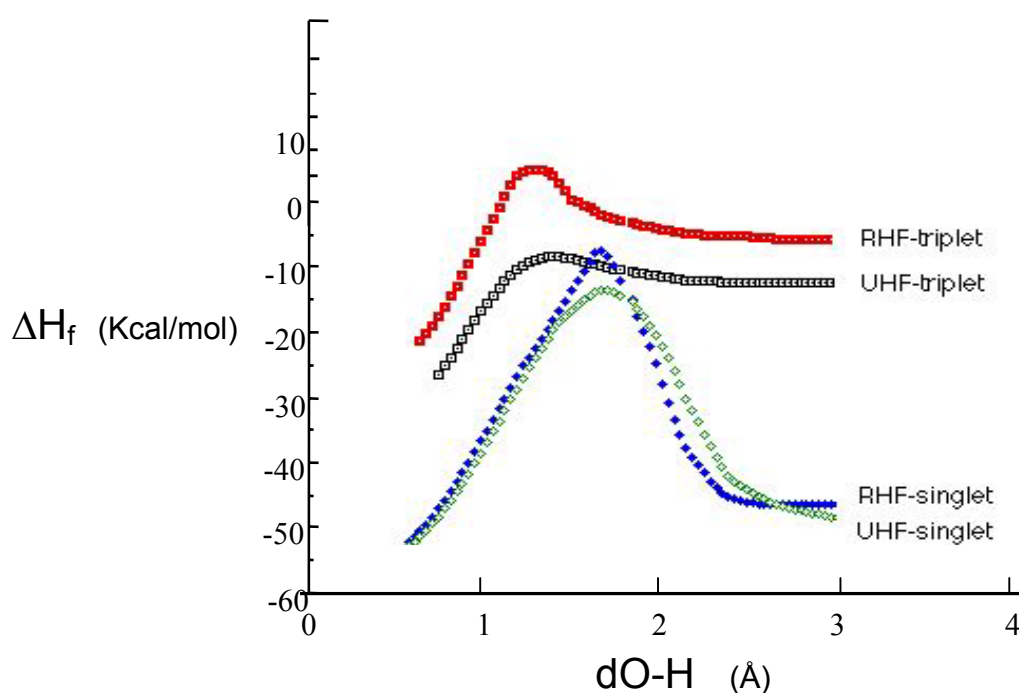


Figura 54. Superposició dels perfils energètics per la formació del radical di-*tert*-butil-fenòxid amb els diferents formalismes: RHF-singlet, UHF-singlet, RHF-triplet i UHF-triplet obtinguts amb el mètode semiempíric AM1.

Com a resultat la via del UHF-singlet resulta un camí més estable que els altres possibles camins de reacció. Si comparem amb el diagrama energètic del fenols de la pàgina 161 i figura 42, existeix una certa similitud en la posició que ocupa cadascun dels mètodes, sent el més estable l'obtingut per la via de l'UHF-singlet, per aquest motiu s'ha seleccionat aquest mètode per l'estudi de formació radicalària de cadascun dels compostos de la sèrie.

	A	TS	C
Singlet RHF	-58,01	-5,34	-44,95
Singlet UHF	-58,34	-11,02	-48,85
Triplet RHF	-16,08	8,87	-2,34
Triplet UHF	-24,48	-5,98	-10,25

Taula 9. Entalpies de formació en Kcal/mol per cadascun dels possibles camins de reacció per la formació AM1 del radical di-*tert*-butil-fenòxid (C) a partir del DTBP (A) passant per l'estat de transició (TS).

Un altre aspecte a tenir en compte i que es va plantejar només en aquesta família dels di-*tert*-butil-fenols era si en els compostos amb diferents mínims conformacionals la formació radicalària era idèntica per a tots els conformers o bé es veia afavorida amb alguna determinada disposició espacial dels substituents. Aquest fet només és possible en aquests derivats, ja que en l'anterior família dels fenols la llibertat conformacional era més restringida.

Per tal d'analitzar la facilitat de formació radicalària en els diferents conformers es va estudiar la formació radicalària en tots els mínims conformacionals per diferents compostos.

Com a resultat es van certes diferències apreciables, que en realitat corresponien a artefactes de càlcul i que no tenien validesa experimental per tal de concloure que algun dels possibles mínims conformacionals afavoria o dificultava la formació del radical di-*tert*-butil-fenòxid. Així en la figura 55 es mostren els diagrames energètics de la coordenada de reacció per la via UHF-singlet del compost *p*-benzoil-DTBP, com a resultat, un dels conformers (el *cis*- $\beta$ ) presenta un perfil energètic més uniforme que els altres mínims conformacionals, però tant el valor energètic dels estats de transició com de cadascun dels radicals tenien entalpies de formació quantitativament molt similars i les petites variacions no es repetien en altres compostos, els quals presentaven les variacions en altres conformers.



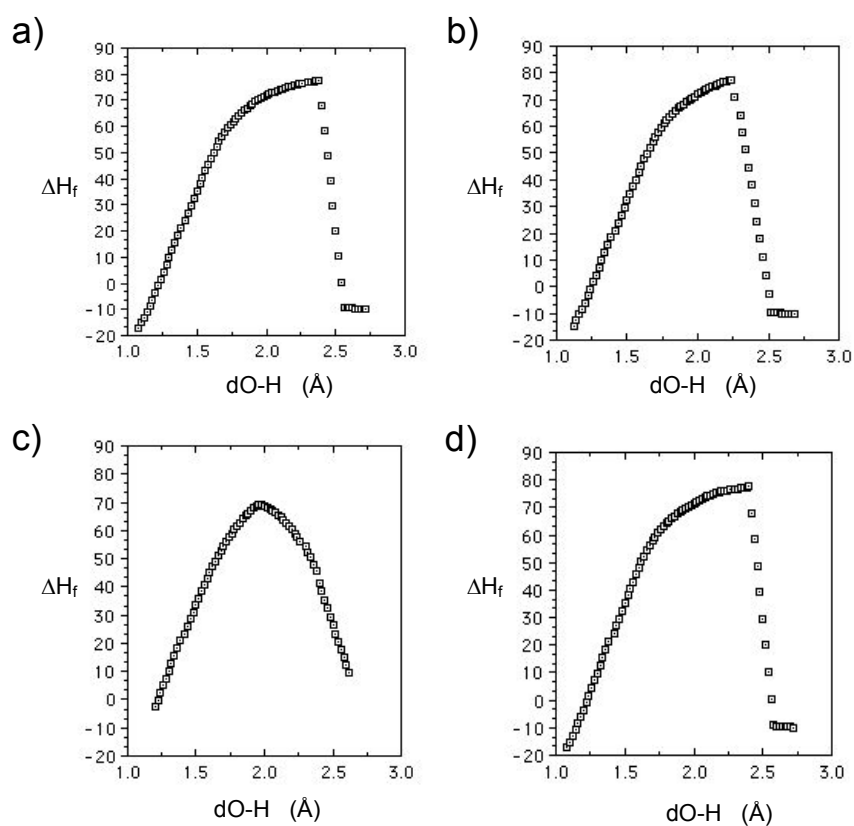


Figura 55. Comparació dels perfils energètics per la formació del radical p-benzoil-di-*tert*-butil-fenòxid per la via UHF-singlet en pels diferents mínims conformacionals a) *trans*- $\beta$ , b) *trans*- $\alpha$ , c) *cis*- $\beta$  i d) *cis*- $\alpha$ . El conformer *cis*- $\beta$  (c) presenta en principi un perfil més uniforme.

Tampoc existeix una explicació raonable des del punt de vista químic per pensar que el conformer amb el grup carbonil per sobre de l'anell fenòlic i en posició *trans* respecte a l'hidrogen fenòlic pugui afavorir l'abstracció d'aquest últim.

Per tant, tenint en compte la inestabilitat dels estats de transició cal pensar que la diferència de perfil energètic en algun dels confòrmers era deguda a algun artefacte de càlcul.

#### 4.6.2.3 Efecte del solvent

Per tal d'avaluar l'efecte del solvent s'han calculat les energies lliures de solvatació i la geometria dels compostos de la sèrie amb el programa AMSOL 6.5.3 [76] i fent ús del model de solvatació AM1-SM2 [77-78].

Com a resultat no s'observen diferències significatives en la geometria en qualsevol de les conformacions de mínima energia. Així els angles dihedres van variar entre  $5^\circ$  i  $9^\circ$  respecte a la geometria inicial optimitzada pel mètode *ab initio* HF/6-31G(d). En la figura 56 es mostra la superposició de les estructures optimitzades amb el mètode i les corresponents a AMSOL per el compost n° 16: *p*-fenilamino-DTBP.

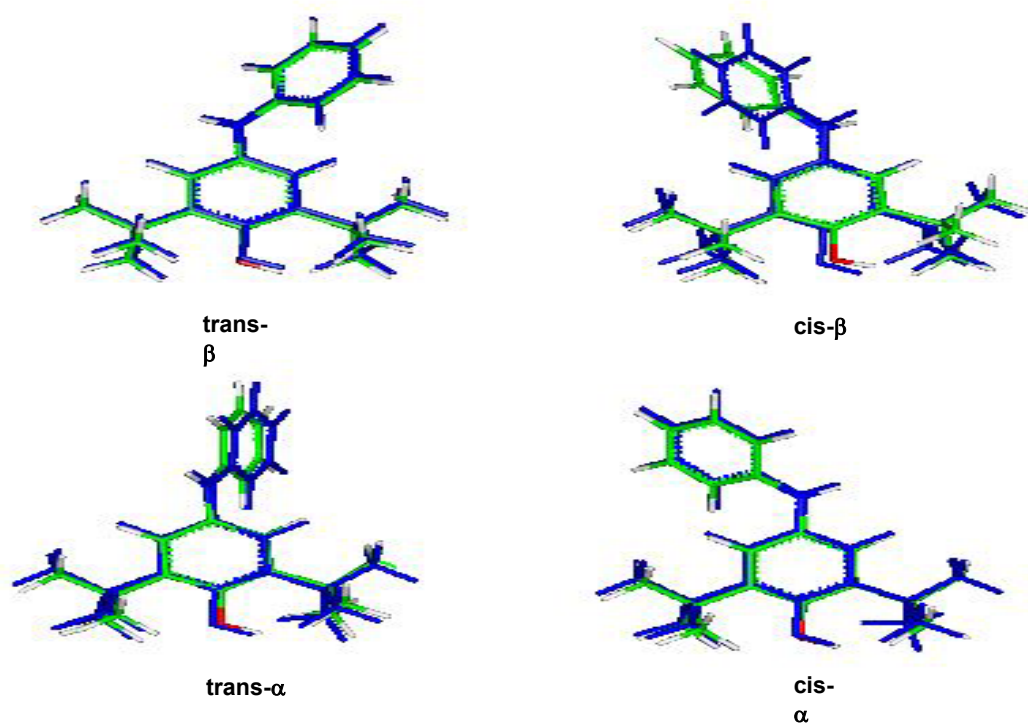


Figura 56. Superposició de les geometries HF/6-31G(d) i AM1-MM2 per les quatre conformacions de mínima energia del compost *p*-benzoil-DTBP.

#### 4.6.2.4 Relacions quantitatives estructura-activitat

Després de la formació del radical fenòxid AM1 amb el mètode de la coordenada de reacció UHF-singlet s'ha procedit a optimitzar les estructures obtingudes amb la base HF/6-31G(d) i entre altres paràmetres s'ha calculat l'entalpia de reacció per diferència entre l'entalpia de formació de l'estat fonamental i l'entalpia del radical fenòxid [ $\Delta H_r = \Delta H_r(A) - \Delta H_r(C)$ ], el resultat es mostra en la Taula-1 de l'article de l'apèndix *QSAR study of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors 2,6-di-tert-butylphenol derivatives. Bioorganic & Med. Chem.*, 11, 4207-4216 (2003).

D'acord amb els resultats dels fenols els compostos més actius mostren valors de  $\Delta H_r$  lleugerament més baixos que els compostos menys actius, però malgrat tot l'índex  $r$  de correlació amb les activitats antiinflamatòries no mostra una clara correlació amb les activitats inhibidores COX ni 5-LOX. Per aquest motiu i donat el bon resultat obtingut per l'anterior família de derivats fenòlics es va procedir a calcular la densitat electrònica en el punt crític per l'enllaç O-H ( $\rho_{O-H}$ ), el resultat també s'indica en la Taula-1 com a resultat  $\rho_{O-H}$  si correlaciona amb  $\Delta H_r$  ( $r=0.830$ ) indicant que els compostos amb major densitat electrònica en el punt crític tenen més facilitat per formar el radical fenòxid ( $\Delta H_r$  més baix) en aquest sentit els derivats mono-*tert*-butil-fenols o dimetilfenols tenen menor densitat electrònica sobre l'àtom d'oxigen i resulten més inactius, fet que podria relacionar-se amb una major dificultat per formar el corresponent radical fenòxid.

Altres paràmetres com les energies en els orbitals frontera HOMO-LUMO també s'han calculat, els resultats mostren una correlació amb l'activitat 5-LOX ( $r=0.885$ ).

Altres paràmetres electrònics que també s'han estudiat han estat entre altres les càrregues sobre l'àtom d'oxigen i la suma de les càrregues dels àtoms de carbó ( $Q_t$ ) del anell aromàtic fenòlic, com a resultat la càrrega de l'àtom d'oxigen mostra una correlació més elevada amb la 5-LOX ( $r=0.832$ ) que amb la COX ( $r=0.753$ ). Mentre que la càrrega total  $Q_t$  correlaciona preferentment amb l'activitat COX ( $r=0.804$ ).

En quant a les propietats de lipofilia-hidrofilia s'ha calculat el paràmetre ClogP que correlaciona preferentment amb la COX ( $r=0.803$ ) que amb la LOX.

Aquest resultat podria explicar el requeriment de lipofilia per accedir al locus actiu de la COX que tal i com havien indicat en el model de la COX-2 humana per accedir al centre actiu cal travessar un entorn hidrofòbic format pels residus de Leu<sup>353</sup>, Phe<sup>198</sup>, Phe<sup>381</sup> i Phe<sup>580</sup>.

#### 4.6.2.5 Representació dels mapes de PEM i GRID

Els mapes de PEM i de GRID s'han representat respectivament amb ajuda dels programes MEPSIM [79] i GRID [34-35] per a tots els compostos de la sèrie per tal d'així poder interpretar gràficament la importància dels paràmetres electrònics i de lipofilia i per altra poder identificar millor les possibles àrees d'interacció d'aquests compostos amb els dos enzims.

En els mapes de PEM s'han representat les corbes d'isopotencial de  $-10$  kcal/mol i aquelles que compten amb un potencial de  $-50$  kcal/mol o superior.

La localització dels mínims de PEM ha estat analitzada i comparada entre les diferents famílies d'inhibidors: COX selectius, 5-LOX selectius i duals. Aquests mapes de PEM, així com la localització dels mínims de potencial per a cada compost es recullen en l'apèndix d'aquesta tesi.

Els derivats DTBP inhibidors selectius de la COX tenen en comú la presència de quatre mínims de potencial :

- A) localitzat sobre l'oxigen fenòlic,
- B) i C) situats a cada banda de l'anell fenòlic,
- D) sobre un àtom electronegatiu del grup R<sub>3</sub> (O carbonil , N amino..)

A mode d'exemple en la figura 57 a) es representa el mapa de PEM pel compost COX-selectiu nº 15 *p*-acetamido-DTBP.

En quant als inhibidors 5-LOX selectius presenten un mínim adicional molt marcat: el mínim E) localitzat sobre un àtom electronegatiu del segon nucli aromàtic (substituent R<sub>3</sub>) i en canvi no presenten o presenten poc marcats els mínims B i C del primer anell aromàtic, En la figura 57b) es mostren aquests mínims com a mode d'exemple per l'inhibidor 5-LOX-selectiu *p*-(4-piridil)carbonil-DTBP.

Per altra banda els inhibidors duals COX i 5-LOX tenen la propietat de presentar tots els mínims indicant que seria possible la inhibició tant d'un enzim com de l'altre, és el cas del compost dual *p*-(5-clor-2-tienil)carbonil-DTBP que es representa en la figura 57c.

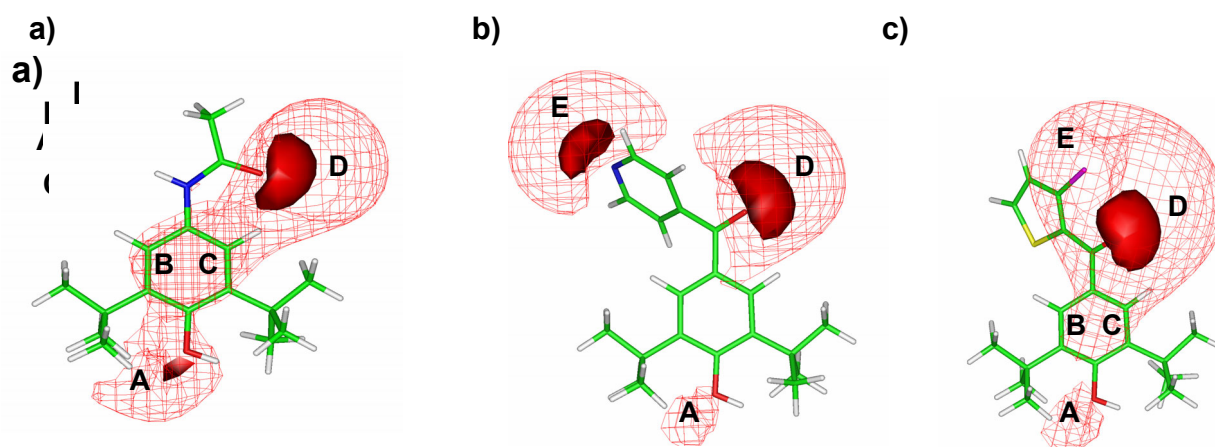


Figura 57. Mapes de PEM per a) un compost COX selectiu; (*p*-acetamido)-DTBP, b) un compost 5-LOX selectiu: *p*-(4-piridil)carbonil-DTBP, c) un inhibidor dual COX-5-LOX: el *p*-(5-clor-2-tienil)carbonil-DTBP. Els contorns sòlids corresponen a corbes d'isopotencial de  $-50$  kcal/mol i les línies valors energètics de  $-10$  kcal/mol.

Els compostos poc actius presenten el mínim A localitzat sobre l'oxigen fenòlic, però la resta de mínims tenen valors de potencial més baixos i aquests es localitzen a diferents posicions en comparació amb els mínims dels compostos més actius COX i 5-LOX.

En l'apèndix es mostren els mapes de PEM de cadascun dels inhibidors BHT estudiats, així com una taula on s'indica el valor de cada mínim com la seva localització en les coordenades de l'espai ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ). També s'ha estudiat la distància entre mínims, la figura 58 mostra a mode d'exemple la localització dels mínims de potencial i distància entre el mínim del grup fenol (A) i la resta de mínims, per a un compost de cada família.

En la figura 59 es mostra la superposició dels mínims de potencial en els d'inhibidors duals, com s'observa la localització dels mínims segueix un mateix patró, fet que indicaria una similitud dels punts reactius d'aquests inhibidors que els permetria interaccionar ambdues enzims.

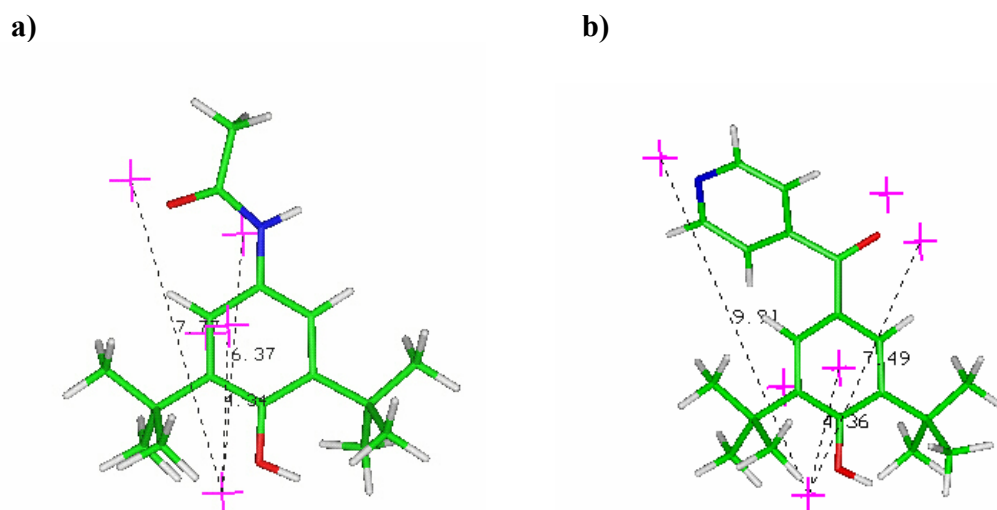


Figura 58. Localització i mesura de la distància entre mínims per a) l'inhibidor COX selectiu *p*-acetamido-DTBP i b) un inhibidor 5-LOX selectiu *p*-(4-piridil)carbonil-DTBP.

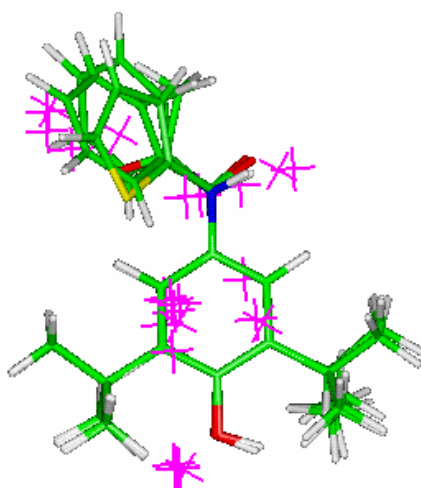


Figura 59. Superposició dels mínims de PEM pels inhibidors duals COX/ 5-LOX

En els mapes de GRID s'han representat les energies d'interacció per a diversos probes del programa: hidrofòbic DRY, aigua OH2 que a més de la hidrofília ens identifica aquelles regions susceptibles d'una donació o acceptació d'un hidrogen [88], d'altra part donada la importància de l'àtom de ferro en el mecanisme de la 5-LOX que apunten alguns autors [89-90] s'ha representat els probes de catió fèrric (FE3+) com ferrós (FE2+).

L'àrea d'interacció hidrofòbica DRY en els inhibidors COX selectius es situa principalment a l'entorn del primer anell aromàtic, mentre que en els inhibidors LOX selectius apareix una segona àrea d'interacció hidrofòbica situada entorn al 2n. anell aromàtic. Els compostos duals mantenen ambdues àrees d'interacció. En la figura 60 es mostren els mapes de GRID per aquestes interaccions hidrofòbiques.

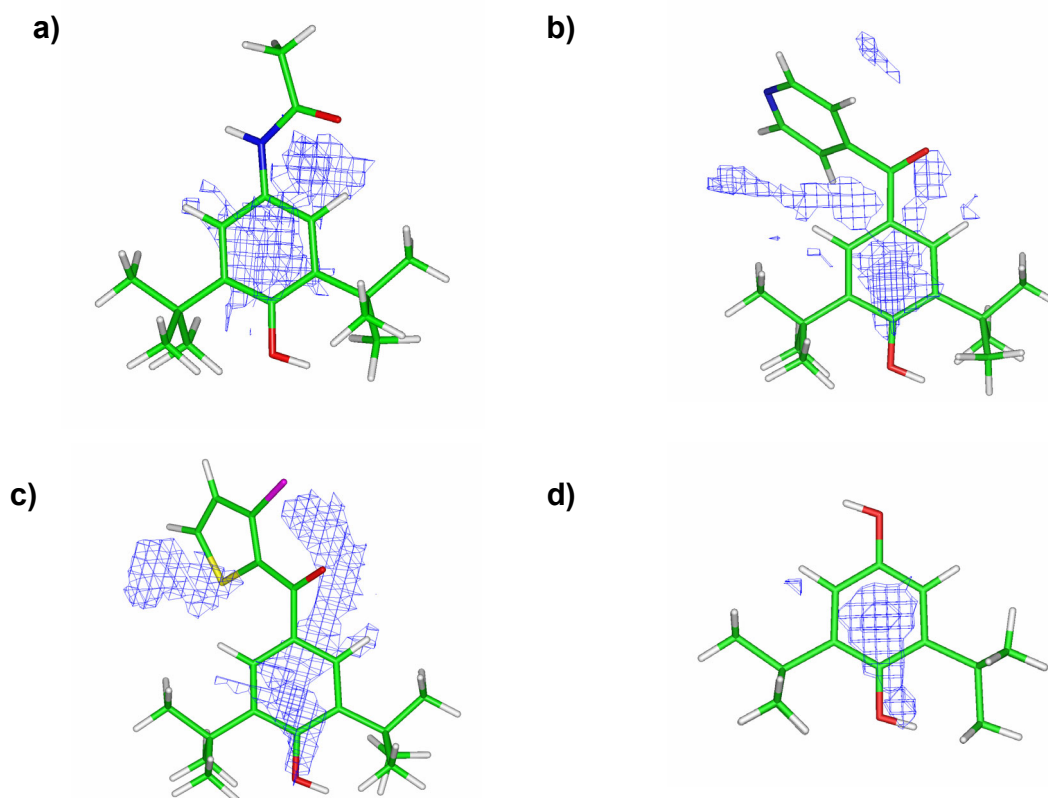


Figura 60. Mapes de GRID per la interacció hidrofòbica (DRY probe) per: a) un compost COX selectiu; (*p*-acetamido)-DTBP, b) un compost 5-LOX selectiu: *p*-(4-piridil)carbonil-DTBP, c) un inhibidor dual COX-5-LOX: el *p*-(5-clor-2-tienil)carbonil-DTBP i d) un compost inactiu el *p*-hidroxi-DTBP. Les línies blaves corresponen a valors energètics de  $-1,5$  kcal/mol.

Els compostos poc actius mostren un àrea d'interacció hidrofòbica molt més reduïda que els compostos actius, així com un valor d'energia d'interacció molt inferior (-1,942 kcal/mol) que la resta de compostos que es mostren més actius (-3 kcal/mol). En l'apèndix s'han recollit les representacions dels diferents mapes de GRID per als compostos estudiats amb indicació del valor de l'energia d'interacció.

També s'han localitzat les àrees moleculars susceptibles d'una possible donació-acceptació d'un hidrogen [88] mitjançant la representació del probe aigua OH<sub>2</sub>, fet que ha permès explicar la diferència d'activitats entre els compostos: *p*-metoxi-mono-*tert*-butil-fenol (BHA) i el corresponent anàleg *p*-metoxi-di-*tert*-butil-fenol. L'única diferència entre els dos compostos radica en la presència o absència d'un grup *tert*-butil. El BHA es mostra molt actiu per els dos enzims, mentres que el *p*-metoxi-di-*tert*-butil-fenol es mostra poc actiu. A més dels factors electrònics, aquí tenen un paper important els estèrics, perquè en aquest cas la presència de dos grups *tert*-butils redueix l'àrea d'interacció per la donació de l'hidrogen fenòlic. En la figura 61 es mostren els probes per la donació-captació d'hidrogen per aquests dos compostos les línies defineixen una àrea d'interacció de -3 kcal/mol.

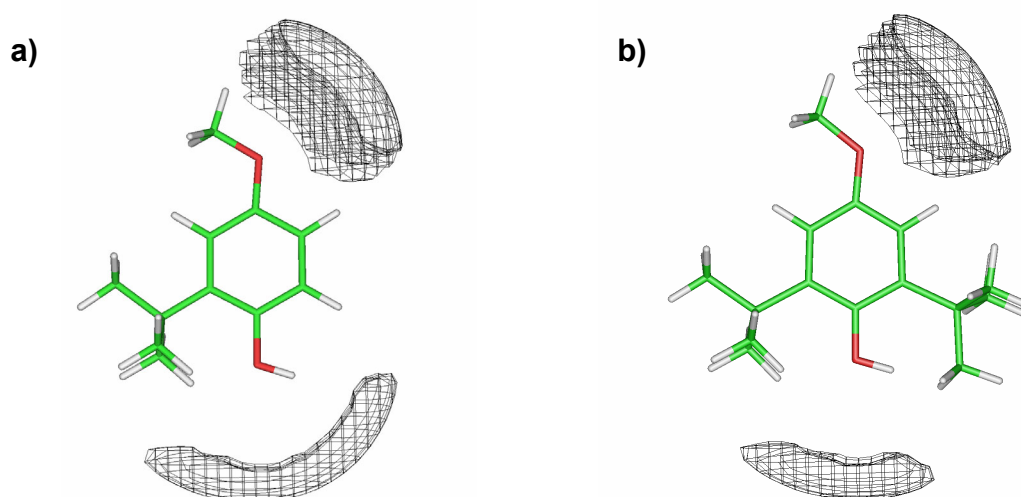


Figura 61. Mapes de GRID per la donació-acceptació d'hidrogen (OH<sub>2</sub> probe) per: a) l'inhibidor actiu BHA (*p*-metoxi-MDTB), b) el corresponent anàleg (*p*-metoxi-DTBP) que es mostra menys actiu presentant una àrea per la donació de l'hidrogen fenòlic més reduïda.



Degut al possible mecanisme de quelació de l'àtom de ferro del grup HEMO de la 5-LOX postulat per diversos autors [89-92], es va considerar oportú representar els probes per la interacció fèrrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) i ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

Ambdues es situen entorn al grup fenòlic i s'estén amb major o menor grau per l'anell aromàtic, en general els compostos actius presenten una elevada energia d'interacció per  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Sent la interacció fèrrica la que millor correlaciona amb l'activitat. En la figura 62 es representen els mapes d'interacció  $\text{Fe}^{3+}$  per un compost COX selectiu, un compost LOX selectiu, un compost dual i un compost amb poca activitat per a tots dos enzims.

Els inhibidors LOX presenten una elevada energia d'interacció per l'àtom de  $\text{Fe}^{3+}$ , dades que concorden amb estudis mecanístics de les lipoxigenases que apunten que un ferro no associat a un grup HEMO es trobaria en l'estat actiu en forma fèrrica i la possible interacció-quelació amb l'àtom d'oxigen dels DTBP inhibiria l'activitat 5-LOX [79].

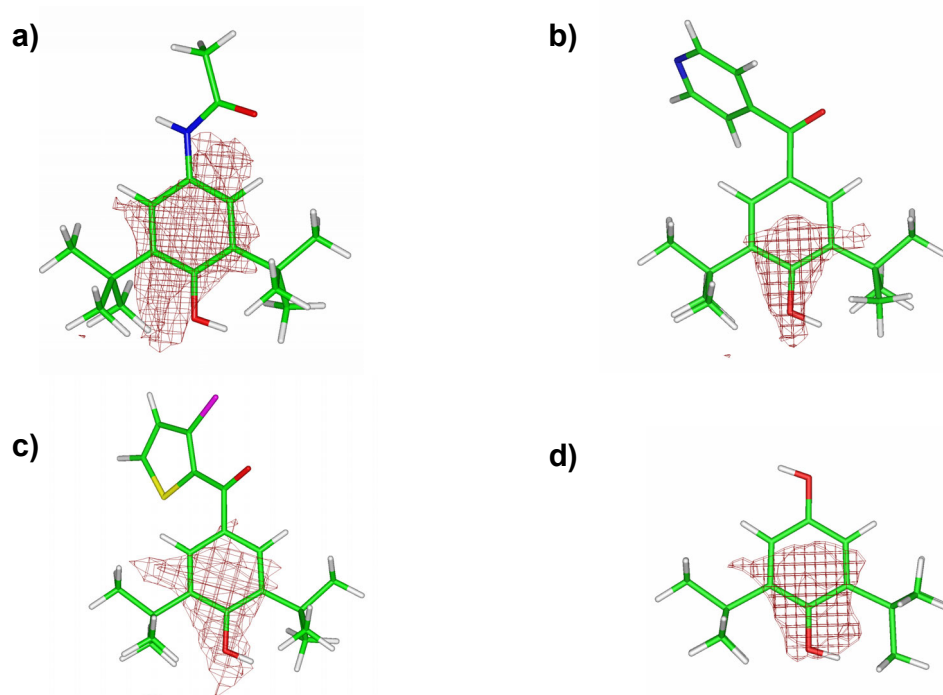


Figura 62. Mapes de GRID per la interacció amb el catió fèrric ( $\text{Fe}^{3+}$  probe) per: a) un compost COX selectiu; (*p*-acetamido)-DTBP, b) un compost 5-LOX selectiu: *p*-(4-piridil)carbonil-DTBP, c) un inhibidor dual COX-5LOX: el *p*-(5-clor-2-tienil)carbonil-DTBP i d) un compost inactiu el *p*-hidroxi-DTBP. Les línies corresponen a valors energètics de  $-10$  kcal/mol.

Els resultats de correlació lineal mostren una relació quantitativa entre l'activitat inhibidora 5-LOX i la màxima energia d'interacció per l'àtom de Fe<sup>3+</sup> que es mostra en la següent equació:

$$pIC_{50}(LOX) = -0.13 (\pm 0.02) Fe^{3+} + 2.79 (\pm 0.34) \quad (11)$$

n=14      r=0.907      s=0.440      F=55.88

Alhora l'energia d'interacció per l'àtom de Fe<sup>3+</sup> correlaciona amb l'energia de l'orbital ocupat de major energia (EHOMO) amb un coeficient de correlació  $r = -0.850$  en el sentit que els compostos amb una elevada energia de l'orbital ocupat de major energia tenen una major energia d'interacció per l'àtom de Fe<sup>3+</sup>, dada que ens indica que els compostos amb dificultat de cedir l'electró de la capa més externa tindran també més dificultat per reduir a l'àtom de ferro Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> sent menys actius com inhibidors de la 5-LOX.

De forma que el model QSAR proposat per la inhibició de la 5-LOX seria un mecanisme redox basat en la quelació-reducció de l'àtom de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> inactivant així l'enzim. Aquest mecanisme ha estat validat per una sèrie de compostos 5-LOX selectius, acomplint-se amb una desviació de les activitats calculades respecte les experimentals compresa entre el -3,57 i el 1% obtenint un coeficient de correlació  $r=0,915$  i  $n=19$ .

Paral·lelament la inhibició de la COX requeriria d'un elevat ClogP i amb menor càrrega atòmica en els posicions *orto+para* (menor  $Qt$ )

$$pIC_{50}(COX) = -1.11 Qt (\pm 0.29) + 0.37 (\pm 0.07) CLogP + 3.02 (\pm 0.32) \quad (12)$$

n=14    r=0.919    s=0.405    F=29.81

Aquest model també ha estat validat amb una sèrie d'inhibidors COX-selectius obtenint una desviació entre les activitats calculades amb el model i les determinades experimentalment compresa entre -7,38 i 8,83 % amb un coeficient de correlació  $r=0,989$  i  $n=19$ .

Aquest model comportaria un mecanisme d'interacció  $\pi$ - $\pi$  amb la COX amb formació del radical fenòxid (donació de l'hidrogen) fet que seria indispensable per la inhibició de tots dos enzims.

#### 4.7 Referències bibliogràfiques del capítol

- [1] DeWitt, D.L. i Smith, W.E. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1412-1416 (1988).
- [2] Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J. I Needleman, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.*, 263, 3550-3553 (1988).
- [3] Fitzpatrick, F.A. i Wynalda, M.A. Aspirin causes irreversible inactivation of Prostaglandin Endoperoxide Synthase. *Prostaglandins*, 12, 1037-1051 (1976).
- [4] Arenas, M.T. Dos nous inhibidors de la COX-2: celecoxib i rofecoxib. *Circ. Farm.*, 58, 74-78 (2000).
- [5] DeWitt, D.L. COX-2 selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol. Pharm.*, 55, 625-631(1999).
- [6] Mehler, E.L. i Gerhards, J. *Mol. Pharm.*, Interaction model for the antiinflammatory action of benzoic, salicylic acids and phenols. *Int. J. Quantum Chem.* 35, 205-214 (1989).
- [7] Welstead Jr. W.J., Moran, H.W., stanffer, H.F., Turnbull, L.F. and Sancilio, L.F. Amfenac: (2-amino-3-benzoylphenyl)acetic acid a new non-steroidal anti-inflammatory drug. *J. Med. Chem.*, 22, 1074-1082 (1979).
- [8] Walsh, D.A., Moran, H.W., Shamblee, D.A., Welstead, Jr. W.J., Nolan, J., Sancilio, L.F. i Graff, G. C.H., Smith, G. i White, A.H. Synthesis and structure-activity study of (2-amino-3-benzoylphenyl)acetic and analogues. *J. Med. Chem.*, 33, 2296-2304 (1990).
- [9] Palm, J.H. Refinement of the crystal structure of phenyl acetic acid. *Acta Crystallographica*, 21, 473-476 (1966).
- [10] Bats, J.W. i Canenbley, R. Refinement of the crystal structure of phenyl acetic acid. *Acta Crystallographica*, C40, 993-997 (1984).
- [11] Colin, H.L., Kennard, C.H i White, A.H. Crystal structure of {2[(2,6dichlorophenyl)amino] phenyl}acetic acid i [2-(2,4-dichlorophenoxy)phenyl]acetic acid. *Acta Crystallographica*, B37, 1317-1324 (1981).
- [12] Allen, F.H., Kennard, O i Taylor, R. Systematic analysis of structural data as research technique in organic chemistry. *Acc. Chem. Res.*, 16, 146-154 (1983).

- [13] BIOSYM Technologies, Inc., 10065 Barnes Canyon Road, San Diego, USA, CA 92121.
- [14] Atkinson, D.C. Godfrey, K.E. i Myers, P.L. Synthesis and structure-activity study of Fenclofenac: [2-(2,4-dichlorophenoxy)phenyl]acetic acid and analogues. *J. Med. Chem.*, 26, 1353-1367 (1983).
- [15] Manel López Martínez. Descripción de un modelo de interacción para la inhibición del enzima ciclooxigenasa por los AINE a través de la modelización molecular del ácido araquidónico. Tesis Doctoral (1995).
- [16] Samuelsson, B., *Lipid Metabolism*, S.J. Wakil, Ed. Academic Press, New York, USA (1970).
- [17] Gund, P. i Shen, T.Y. A model for the prostaglandin synthetase cyclooxygenation site and its inhibition by antiinflammatory arylacetic acids. *J. Med. Chem.*, 20, 1146-1152 (1977).
- [18] Joan Ruiz Soriano. QSAR en el grup d'antiinflamatoris no esteroïdals derivats de l'Amfenac. Tesina de Llicenciatura (1994).
- [19] Estrella Lozoya toribio. QSAR en el grup d'antiinflamatoris no esteroïdals derivats del Fenclofenac. Tesina de Llicenciatura (1996).
- [20] Appleton, R.A. i Brown, K. Conformational requirements at the prostaglandin cyclooxygenase receptor site: a template for designing non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Prostaglandins.*, 18, 29-34 (1979).
- [21] Roberson, W., ApSimon, J.W. i Herman, L. *Quantum Chemistry Program Exchange Bull.*, 7, 88 (1987).
- [22] Dhanaraj, V. i Vijayan, M. Crystal structure-study of *N*-phenylanthranilic acid. *Acta Crystallographica*, B44, 406-414 (1988).
- [23] Westby, T.R. i Barfknecht C.F. Acridan-4-carboxylic acids and *N*-Aryl-2-amino-3-toluic acids as planar and antiplanar analogs of anti-inflammatory *N*-Arylanthranilic acids. *J. Med. Chem.*, 16, 40-43 (1973).
- [24] Scherrer, R.A. Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. Rainsford, K.D. and Path, M.R.C. Eds. 66-81, CRC Press. Inc., Florida (1985).
- [25] Kaltenbronn, M.J.S. i Scherrer, R.A. *Structure-activity relationships in a series of anti-inflammatory N-Arylanthranilic acids.* *Arzneim.-Forsch. Drug. Res.*, 33, 621-640 (1983).
- [26] Moser, P., Sallmann, A. i Wiesenberg, I. Quantitative Structure-Activity Study of Diclofenac 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenylacetic acid and analogues. *J. Med. Chem.*, 33, 2358-2368 (1990).
- [27] Luong, C. flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Struc. Biol.*, 3, 927-933 (1996).
- [28] Finney, D.J. *Probit Analysis in Quantitative Bioassays.* Reynolds, I.J (Ed.) Cambridge University, Press, New York (1952).

- [29] Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J. i Vane, J.R. Selectivity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11693-11697 (1994).
- [30] Meade, E.A., Smith, D.L. i DeWitt, D.L. Differential inhibition of Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *OJ. Biol. Chem.*, 268, 6610-6614 (1993).
- [31] Rome, L.H. i Lands, W.E.M. Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4863-4865 (1995).
- [32] Smith, W.L. i Song, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and 2. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68-69, 115-128 (2002).
- [33] Pouplana, R., Pérez, C., Sánchez, J., Lozano, J.J. i Puig-Parellada, P. The structural and electronical factors that contribute affinity for the time-dependent inhibition of PGHS-1 by indomethacin, diclofenac and fenamates. *J. Comp-Aided Mol. Design*, 13, 297-313 (1999).
- [34] Goodford, P.J. A computational procedure for determining energetically favourable binding sites on biological important macromolecules. *J. Med. Chem.*, 28, 849-857 (1985).
- [35] GRIN, GRID, GRAB and GROUP, version 16,0; Molecular Discovery Ltd. 4, Chandos Street, W1A 3BQ, London, U.K. (1998).
- [36] AutoDock: Automated Docking of flexible ligands to receptors. Vs. 3.0 in: Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. i Olson, A.J. The scripps research institute, La Jolla CA, (1998).
- [37] Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. i Olson, A.J. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.*, 19, 1639-1662 (1998).
- [38] Pal, I., Odenwaller, R. i Marnett, L.J. 7-Oxabicycloheptyl prostanoid Acids: Potent, time-dependent cyclooxygenase inhibitors that induce a conformational change in the prostaglandin endoperoxide synthase protein. *J. Med. Chem.*, 35, 2340-2342 (1992).
- [39] Mancini, J.A., Riendeau, D., Falgoutyret, J.P., Vickers, P.J. i O'Neill, G.P. Arginine 120 of Prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J. Biol. Chem.*, 270, 29372-82 (1995).
- [40] Garavito, R.M., Malkowski, M.G. i DeWitt, D.L.. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and 2. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 68-69, 129-152 (2002).
- [41] Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Dildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C. i Stallings, W.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by antiinflammatory agents. *Nature*, 384, 644-648 (1996).
- [42] DeWitt, D.L. COX-2 selective inhibitors: the new. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by antiinflammatory agents. *Nature*, 384, 644-648 (1996).

- [43] Insight II. Biosym Technologies Inc. 10065, Barnes Canyon road, San Diego, CA 92121 (1993).
- [44] Barril, X., Gelpi, J.L, López, J.M., Orozco, M. i Luque, F.J. How accurate MD/LR and PB/SA calculations can predict the relative binding affinities? Acetylcholinesterase hupurine inhibidors as a test case. *Theor. Chem. Acc.*, 106, 2-9 (2001).
- [45] Smith, W.L..., DeWitt, D.L. i Garavito, R.M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochem.*, 69, 145-182 (2000).
- [46] Loll, P.J., Picot, D., Ekabo, O. i Garavito, R.M. Synthesis and use of iodinated nonsteroidal anti-inflammatory drug analogues as crystallographic probes of the prostaglandin H-2 synthase, cyclooxygenase active site. *Biochemistry*, 35, 7330-7340 (1996).
- [47] Picot, D., Loll, P.J. i Garavito, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H-2 synthase-1. *Nature*, 367, 243-249 (1994).
- [48] Wong, E., Bayly, C., Waterman, H.L., Riendeau, D. i Mancini, J.A. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2 selective inhibitors by a double His<sup>513</sup> → Arg and Ile<sup>523</sup> → Val mutation. *J. Biol. Chem.*, 272, 9280-9286 (1997).
- [49] Selinsky, B.S., Gupta, K., Sharkey, C.T. i Loll, P.J. Structural analysis of NSAID binding by prostaglandins H<sub>2</sub> synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. *Biochem.*, 40, 5172-5180 (2001).
- [50] So, O. Y., Scarafia, L.E., Mak, A.Y., Callan, O.H. i Swinney, D.C. The dynamics of prostaglandin H synthases. *J. Biol. Chem.*, 273, 5801-5807 (1998).
- [51] Rowlinson, S.W., Kiefer, J.R., Prusakiewicz, Plawlitz, J., Kozak, K.R., Kalgutkar, A.S., Stalling, W.C., Kurumbalt, R.G. i Marnett, L.J. a novel mechanism of COX-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J. Biol. Chem.*, ( 2003) in press.
- [52] Llorens, O., Pérez, J.J., Palomer, A. i Mauleon, D. Differential binding mode of diverse cyclooxygenase inhibitors. *J. Mol. Graph. and Mod.*, 20, 359-371 (2002).
- [53] Soliva, R., Almansa, C., Kalo, S., Luque, F.J. i Orozco, M. Theoretical studies on the inhibition mechanism of cyclooxygenase-2. Is there a unique recognition site ? *J. Med. Chem.*, 46, 1372-1382 (2003).
- [54] Hsuanyu, Y. I Dunfort, H.B. Prostaglandin H synthase kinetics. The effect of substituted phenols on cylooxygenase activity and the substituent effect on phenolic preoxidating activity. *J. Biol. Chem.*, 267, 17649-17657 (1992).
- [55] Bakovic, M. i Dunford, H.B. Intimate relation between Cyclooxygenase and Peroxidase activities of Prostaglandin H synthase. Peroxidase reaction of ferulic acid and its influence on the reaction of arachidonic acid. *Biochem.*, 33, 6475-6482 (1994).
- [56] Marnett, L.J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 68-69, 153-164 (2002).
- [57] Dewhirst, F.E. Structure-Activity Relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins*, 20, 209-222 (1980).

- [58] Aishita, H., Morimura, T., Obata, T., Miura, Y., Miyamoto, T., Tsuboshima, M. i Mizushima, Y. ONO-3144 a new anti-inflammatory drug and its possible mechanism of action. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 261, 316-327 (1983).
- [59] Cheeseman, K.H. i Forni, L.G. An investigation of the novel anti-inflammatory agents MK-447 and ONO-3144. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 4225-4233 (1988).
- [60] Schrier, D.J., Baragi, V.M., Connor, D.T., Dyer, R.D., Jordan, J.H. i Imre, K.M. New compounds as useful to inhibit inflammation processes. *Prostaglandins*, 47, 17-29 (1994).
- [61] Robertson, D.G., Loewen, G., Walsh, K.M., Dethloff, L.A., Sigler, R.S., Dominick, M.A. i Urda, E.R. Subacute and subchronic toxicology studies of CI-986, a novel anti-inflammatory compound. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 20, 446-455 (1993).
- [62] Puig-Parellada, P. i Planas, J.M. Synovial fluid degradation induced by free radicals in vitro action of several free radical scavengers and anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 535-537 (1978).
- [63] Flower, R.J. & Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the antipyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*, 240, 410-411 (1972).
- [64] Simmons, D.L., Wagner, D. & Westover, K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2, and fever. *Clin. Infect. Dis.*, 31, suppl. 5, S211-S218 (2000).
- [65] Simmons, D.L., Botting, R.M., Robertson, P.M., Madsen, M.L., & Vane, J.R. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid anti-inflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3275-3280 (1999).
- [66] Warner, T.D. i Mitchell, J.A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13371-13373 (2002).
- [67] Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., & Simmons, D.L. COX-3 a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13926-13931 (2002).
- [68] Botting, R.M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase-3? *Clin. Infect. Dis.*, 31, suppl. 5, S202-S210 (2000).
- [69] Egan, R.W., Paxton, J. i Kuehl, F.A. Mechanism of irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J. Biol. Chem.*, 251, 7329-7335 (1976).
- [70] Rao, G.H.R., Tate, M.R., Murthy, M., Hebbel, R.P. i White, J.G. Influence of antioxidants on arachidonic acid metabolism and platelet function. *Biochem. Med. and Metab. Biol.*, 51, 74-79 (1994).
- [71] Brieskorno, C.H. i Kallmayer, H.J. *Arch. Pharm., (Weinheim. Ger.)*, Inhibitors of proteins mediated inflammation steps. 304, 799-714 (1994), 374-381 (1973).
- [72] Vanderhoek, J.Y. i Lands, W.E.M. The inhibition of the fatty acid oxygenase of sheep vesicular gland by antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta*, 296, 374-381 (1973).

- [73] Biegler-Ksning, F.W., Bader, R.F.W., Tang, T.H., Calculation of the Average Properties of Atoms in Molecules (AIM). *J. Comput. Chem.* 3, 317-329 (1982).
- [74] Bader, R.F.W, and Essén, H., The characterization of atomic interactions, *J. Chem. Phys.* 80, 1943-1957 (1984).
- [75] ClogP programa dissenyat pel Dr. Albert Leo i Dr. David Weininger. Biobyte corporation 201 W, 4th. St. Suite nº 204, Claremont, CA 91711, USA (1996).
- [76] AMSOL 6.5.3: An SCF program including free energies of solvation and class IV charges. Hawkins, G.D., Giesen, D.J., Lynch, G.C, Chambers, C.C., Rossi, I., Storer, J.W., Li, J., Zhu, T., Rinaldi, D., Liotards, D.A., Cramer, C.J. i Truhlar, D.G. Dep. Of chemistry. Univ. Minnesota, Minneapolis, MI, 55455-0431, USA..
- [77] Cramer, C.J. i Truhlar, D.G. General parameterized SCF model for free energies solvation in aqueous solution *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 8305-83111 (1991).
- [78] Giessen, D.J., Gu, M.Z. i Cramer, C.J. An universal organic solvation model *J. of Phys. Chem.*, 100, 19824-19839 (1996).
- [79] Sanz, F., Manaut, F., Rodríguez, J., Lozoya E., and López de Briñas, E. MEPSIM: A computational package for analysis and comparison of molecular electrostatic potentials. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 7, 337-347 (1993).
- [80] Tsai, A., Palmer, G. i Kulmacz, R.J. Characterization of the Tyrosyl radicals in ovine Prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 267, 17753-17759 (1992).
- [81] Tsai, A., Palmer, G., Xiao, G., Swinney, D.C. i Kulmacz, R.J. Structural characterization of arachidonyl radicals formed by prostaglandin H synthase-2 and prostaglandin H synthase-1 reconstituted with mangano protoporphyrin IX. *J. Biol. Chem.*, 273, (388-94) (1998).
- [82] Korzekwa, K., Trager, W., Gouterman, M., Spangler, D. i Loew, G.H. Cytochrome P450 mediated aromatic oxidation: A theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4273-4279 (1985).
- [83] Zhang, H.Y., Sun, Y.M. i Chen, D.Z. OH bond dissociation energies of phenolic compounds are determined by field inductive effect or resonance effect? A DTF study. *Quant. Struc.-Act. Relat.*, 20, 148-152 (2001).
- [84] Celotti, F. i Laufer, S. Anti-inflammatory drugs: ew multitarget compounds to face an old problem: the dual inhibition oncept. *Pharmacological Research*, 43, 429-436 (2001).
- [85] Swingle, K.F., Bell, R.L., Moore, G.G.I. In Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs; Rainsford PH. D.K.D. i Path, M.R.C. Eds. CRC, Florida, vol.3, p.105, (1989).
- [86] Wong, S., Lee, S.L., Frierson, M.R., Miskowski, T.A., Rigby, b.S., Schmolka, S.J., Naismith, R.W., Kreutzer, D.C., Lindquist, R. antiarthritic profile of BF-389, a novel anti-inflammatory agent with low ulcerogenic liability. *Agents Actions*, 37, 90-98 (1992).



- [87] Doyle, M.J., Eichhold, T.H., Hynd, B.A, Weisman, S.M. Tebufelone a new and potent anti-inflammatory inhibitor of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase enzymes. *Pharm. Biomed. Anal.*, 8, 137-142 (1990).
- [88] Segarra, V., López, M., Ryder, H. i Palacios, J.M. Prediction of drug permeability based on Grid calculations. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 18, 474-481 (1999).
- [89] Skrzypczak-Jankun, E., Funk, M.O. Jr., Boyington, J.C. i Amzel, L.M. Lipoxygenase: a molecular complex with a non-heme iron. *Journal of Molecular Structure*. 374, 47-52 (1996).
- [90] Young, R.N., Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 671-685 (1999).
- [91] Prigge, S.T., Boyington, J.C., Faig, M., Doctor, K.S., Gaffney, B.J. i Amzel, L.M. *Biochimie*, 79, 629-636 (1997).
- [92] Nelson, M.J., Batt, D.G., Thompson, J.S. i Wright, S.W. Reduction of the active-site iron by potent inhibitors of lipoxygenases. *J. Biol. Chem.*, 266, 8225-8229 (1991).
- [93] Dannhardt, G. I Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.*, 36, 109-126 (2001).
- [94] Warner, T.D. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 96, 7563-7568 (1999).
- [95] Malkowski, M.G., Ginell, S., Smith, W.L. i Garavito, R.M. The X-ray crystal structure of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 complexed with arachidonic acid. *Science*, 289, 1933-1937 (2000).

