

UN MODELO DE INTERACCION DE CARGAS EN QUINOLONAS

J.A. Padrón y R. Carrasco*

Centro de Química Farmacéutica, Calle y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 6 de febrero de 1997.

RESUMEN. Se analiza el modelo de Linus L. Shen sobre el mecanismo de acción antibacteriana de las quinolonas. Se realizó un estudio QSAR con el empleo de las cargas netas sobre diferentes posiciones en una serie de 18 moléculas. Se obtuvo un grupo de ecuaciones que las relacionan con la actividad biológica medida sobre cepas de *E. coli* H560. Se evaluó la validez de las ecuaciones para predecir las conformaciones más activas para un compuesto de naturaleza quiral y se evaluó su capacidad predictiva con una muestra de prueba de 16 estructuras. Se discuten las implicaciones de la asociación anillo-anillo en la unión al ADN y la inhibición de la ADN girasa.

ABSTRACT. Shen's model antibacterial action mechanism of quinolones was analyzed. A QSAR study was developed with the net charges at several positions of the quinolone moiety in a training set of 18 molecules. Four equations which correlate the net charges with the biological activity, measured against strains of *E. coli* H560 were obtained. The model was validated with a test set of 16 other structures, and was also employed to predict the more active conformations of a quiral compound. The relative relevance of ring-ring association on the binding with ADN and ADN-gyrase inhibition, is discussed.

INTRODUCCION

El desarrollo de las fluoroquinolonas durante la segunda mitad de la década de los ochenta constituye un paso de avance dentro de la terapia antimicrobiana. Estos fármacos, de naturaleza sintética y amplio espectro contra microorganismos Gram (+) y Gram (-), se utilizan en el tratamiento de infecciones de los tractos urinario, respiratorio y gastrointestinal, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades óseas, cutáneas y de tejidos blandos y como profilaxis para la cirugía transretal.

Las quinolonas: modelos sobre su mecanismo de acción

La acción de las quinolonas se ejerce a través de la inhibición del superenrollamiento del ADN por la ADN girasa presente en la bacteria cuya actividad es antagonizada por estas estructuras. Por tanto, interfieren en la replicación del ADN, la segregación del cromosoma bacteriano y la transcripción.

La ADN girasa es una topoisomerasa tetramérica de tipo II que consta de dos pares de subunidades: un par denominado *gyr A* (105 000 DA) encargada de la ruptura y recierre de la doble cadena del ADN y un segundo par, *gyr B* (95 000 DA) encargado de la transducción energética necesaria para esta operación.¹⁻³ Las mutaciones puntuales en la secuencia aminoacídica de la enzima dan lugar a la resistencia contra las fluoroquinolonas. Este hecho hizo pensar que la farmacodinamia de estos fármacos era un mecanismo de inhibición de la actividad enzimática de forma específica, a través de un sitio receptor hipotéticamente situado en la subunidad *gyr A* de la enzima^{4,5} y posiblemente un segundo sitio activo en la subunidad *gyr B*.⁶

El modelo de Shen

En 1985, Shen y col., al realizar un estudio de ultrafiltración del ligando unido usando [³H] norfloxacin, comprueban que no hay niveles de radiación significativos en la ADN gi-

rasa y sí en el ADN puro, en dependencia de la cantidad y topología de éste,⁵ fundamentalmente en forma de cadena sencilla y, en menor cuantía, ADN superenrollado. Esta unión quinolona-ADN es específica y saturable, altamente cooperativa y directamente proporcional con la constante de superenrollamiento.⁶ Se plantea entonces que la inhibición de la ADN girasa por las quinolonas se basa en un conjunto de interacciones por puentes de hidrógeno que se establecen entre los átomos de oxígeno 14 y 19 de los grupos carbonilo y carboxilo (Fig. 1) del anillo quinolónico con los de nitrógeno de las bases del ADN.

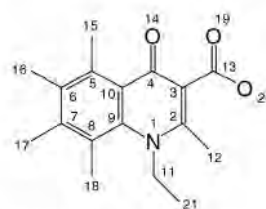


Fig. 1. Posiciones consideradas para el análisis.

Estas interacciones se establecen luego de la apertura del ADN provocada por la ADN girasa, lo cual crea un sitio de entrada (*DNA gate*) para las quinolonas. El fármaco requiere para unirse a las bases del ADN la formación de un tetrámero por dos tipos de asociaciones (Fig 2): $\pi\pi$ entre los anillos A y B de las quinolonas (formación de un dímero), y por interacciones hidrofóbicas entre los sustituyentes en el N₁ de dos dímeros. Ambas interacciones han sido observadas en la estructura cristalina del ácido nalidíxico.⁵

Este complejo puede insertarse en el espacio abierto entre las cadenas del ADN e impedir el recierre de ellas, lo cual explicaría la alta cooperatividad entre la enzima y la unión quinolona-ADN, al definir un sitio único de acción en el *DNA gate* que sólo puede aparecer tras la acción de la ADN girasa y da respuesta también a la especificidad de esta unión. También explica la necesidad de la lipofilicidad en el sustituyente sobre N₁, lo cual hasta ese momento no había podido explicar

ningún modelo precedente y se relacionaba con su difusión a través de las membranas. Según esta hipótesis, las quinolonas sólo pueden adoptar una disposición espacial única para la actividad antibacteriana. La disminución de la actividad antibacteriana frente a mutaciones puntuales en la ADN girasa se explica en función de diferencias en el tamaño del DNA gate.

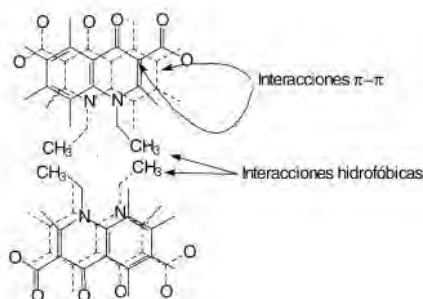


Fig. 2. Interacciones entre moléculas de quinolona. Tetrámero formado.

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionó un conjunto de 18 estructuras derivadas del cambio de más de un sustituyente a la vez en cada posición (Tabla I) que incluye derivados de quinolona (1), naltiridina (2) y piridopirimidina (3) (Fig. 3), de interés clínico⁷ y en muestra de prueba de 16 compuestos⁸ (Tabla II). Como criterio de actividad se utilizaron los datos de la concentración mínima inhibitoria (µg/mL) contra la *Escherichia coli* H560 para cada una de las estructuras, obtenidos por microvaloración estándar.⁹

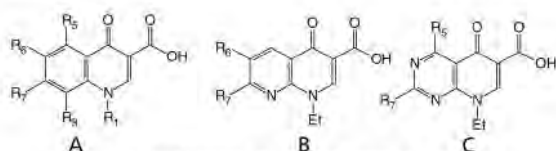


Fig. 3. Estructura de los derivados utilizados en la muestra de prueba.

Se utilizó el método AM1¹⁰ con optimización total de geometría para el cálculo de las cargas, programado en

MOPAC V. 6.0. Todas las estructuras fueron construidas con ayuda del programa MOBY V 2.00, y se optimizaron previamente con subrutinas de ángulos estándar y de valencia mediante el método MM2. Los procedimientos de ajuste entre los dímeros del ofloxacin R y S también se desarrollaron con este programa.

Los programas utilizados fueron ejecutados en una microcomputadora compatible IBM, 486 DX-4, 66 MHz, 16 MB RAM, con pantallas gráficas VGA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Si el modelo de Shen de mecanismo de acción de las quinolonas es válido, la interacción de las moléculas respectivas entre sí y con las bases de ADN deben estar mediadas por las cargas electrostáticas sobre los diferentes átomos del sistema base y los grupos carbonilo y carboxilo. Debe ser posible entonces hallar un sistema de ecuaciones que permita establecer una correlación entre la carga neta sobre los átomos del núcleo central de las quinolonas con su actividad biológica. El análisis se realizó sobre las estructuras en forma de anión, puesto que su formación es altamente factible dada la notable basicidad que le confieren las bases del ADN al entorno. Se calcularon las cargas sobre las diferentes posiciones del anillo (Fig. 1).

Como descriptores adicionales, se incluyeron en la búsqueda del modelo, la raíz cúbica de la masa molar como índice de la difusión del fármaco, una variable *dummy* (q19 + D, q20 + D, q14 + D, D) con valor D = 0 si el sustituyente en la posición 7 no es heterociclo y D = 1 si posee al menos un heteroátomo en sistema cíclico en esa posición que ya ha sido empleada¹¹ y la suma de los índices topológicos de orden cero de los sustituyentes en N₁ y C 7, pues está reportado en un modelo teórico¹² sobre la estructura cristalina del complejo ADN-doxorrubicina, análogo tetracíclico de las quinolonas, que estas posiciones son las que establecen interacciones con la doble cadena del ADN, aunque en ese trabajo se plantea que la entrada del dímero quinolona-quinolona por el sitio de corte de la ADN-girasa está por esa razón, impedida (Tabla III).

Con el método de análisis de regresión lineal múltiple por pasos, se obtuvo el sistema de ecuaciones siguiente*:

$$\log 1/MIC = 0,475 q6 (0,000 019) + 0,754 (D + q19) (0,010 187) + 5,858 \quad (1)$$

$$r = 0,884 7 \quad F = 27,03 \quad S = 0,446 \quad p < 0,000 00 \quad r^2_{PRESS} = 0,423 \quad s_{PRESS} = 7,707$$

$$\log 1/MIC = 10,203 q6 (0,000 003) + 151,673 q4 (0,000 45) - 0,776 q14 (0,004 4) - 320,875 q13 (0,007) + 79,439 \quad (2)$$

$$r = 0,947 \quad F = 28,11 \quad S = 0,331 \quad p < 0,000 00 \quad r^2_{PRESS} = 0,578 \quad s_{PRESS} = 5,635$$

$$\log 1/MIC = 4,141 q6 (0,000 307) + 12,031 q1 (0,083) + 1,300 DIF (0,003) - 0,48 25 \quad (3)$$

$$r = 0,920 7 \quad F = 25,89 \quad S = 0,387 \quad p < 0,000 01 \quad r^2_{PRESS} = 0,628 \quad s_{PRESS} = 4,953$$

$$\log 1/MIC = 5,482 q6 (0,000 018) + 0,752 (D + q20) (0,010 1) + 5,892 \quad (4)$$

$$r = 0,884 8 \quad F = 27,06 \quad S = 0,446 \quad p < 0,000 01 \quad r^2_{PRESS} = 0,294 \quad s_{PRESS} = 9,422$$

Para los estudios *in vitro* se plantea la necesidad de un coeficiente de correlación superior a 0,9.¹³ Los valores encontrados en este trabajo, que oscilan entre 0,884 y 0,946 pueden ser aceptados, puesto que el término *in vitro* no es completamente exacto para el ensayo de microvaloración estándar de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), pues se realiza a cepas vivas de la bacteria y no se ex-

cluyen totalmente factores relacionados con la difusión del fármaco a través de membrana u otras interacciones metabólicas que influyan sobre la actividad de las quinolonas.

Tanto los valores de Fischer (> 25) como de desviación estándar (< 0,5) son aceptables. La relativamente baja significación estadística de la variable que representa la carga en la posición N₁ (ecuación 3), pudiera excluir la ecuación corres-

*Entre paréntesis se reporta la significación estadística de cada término de la expresión.

pendiente del análisis atendiendo a un criterio puramente estadístico. No obstante, ha sido considerada como parte del modelo por incluir la difusión en términos de la raíz cubica de la masa molecular (es su componente lineal), junto con las

cargas netas asociadas a las posiciones 1 y 6, consideradas imprescindibles para la acción antibacteriana de estos compuestos. La suma de los índices de conectividad de orden cero en las posiciones 11 y 7 no resulta significativa en ningún caso.

TABLA I
Muestra de entrenamiento

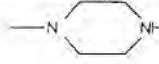

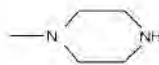



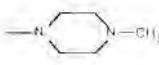

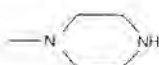

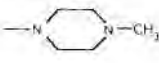
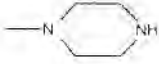

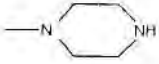
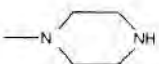
Compuestos	R ₁	R ₈	R ₇	R ₆	Actividad (MIC µg/mL)
1a	Et	H		F	0,1
1b		H		F	0,025
1c	CH ₃ -NH-	H		F	0,025
1d	F-CH ₂ CH ₂ -	H		F	0,1
1e	Et	H		F	0,1
1f	Et	F		F	0,1
1g	Et	F		F	0,1
1h	Et	H		H	6,3
1i	Et	H	CH ₃	F	0,4
1j	Et	H	-NH-CH ₃	F	3,1
1k	Et	H		F	1,6
1l	-O-CH ₂ -CH(CH ₃)-			F	0,1
2a	Et	-		F	0,1
2b	Et	-	CH ₃	H	6,3
2c	Et	-	CH ₃	F	3,1
2d	Et	-		F	3,1
3a	Et	-		-	3,1
3a	Et	-		[-NH ₂ EN R ₅]	3,1

TABLA II
Muestra de prueba

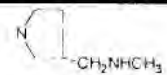
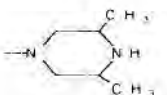
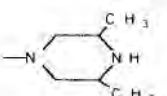
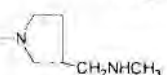
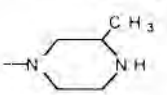
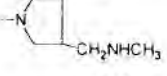
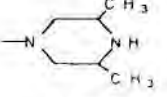

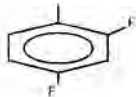
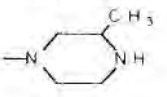

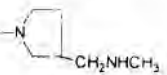

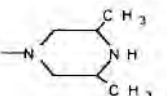

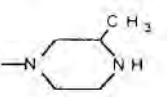
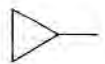

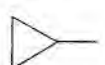
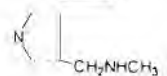


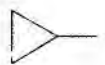
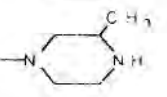
Compuesto	R ₁	R ₆	R ₇	R ₅	Actividad (MIC µg/mL)
a5	Et	H		H	0,100
a3	Et	H		H	0,200
b3	Et	F		H	0,200
b5	Et	F		H	0,100
b2	Et	F		H	0,100
c5	Et	Cl		H	0,200
c3	Et	Cl		H	1,600
c1	Et	Cl		H	0,100
d2		H		H	0,050
e5		H		H	0,200
f3		H		H	0,025
g2		F		H	0,025
g1		F		H	0,050
h5		Cl		H	0,050
r1		H		OH	0,025
s2		F		OH	0,050

TABLA III
Valores de las cargas sobre los átomos que aparecen en las ecuaciones de regresión

C	Valores de carga							Valores <i>dummy</i>		Otros descriptores			
	q1	q4	q6	q12	q13	q14	q19	q20D	+q19	D+q20	DIF	ΣTop	log1/MIC
1a	-0,220	0,317	0,041	0,175	0,380	-0,300	-0,529	-0,575	0,471	0,425	6,828	5,770	6,503
1b	-0,161	0,316	0,055	0,177	0,378	-0,288	-0,527	-0,576	0,473	0,424	6,912	5,890	7,121
1c	-0,159	0,322	0,061	0,183	0,380	-0,288	-0,532	-0,566	0,468	0,434	6,933	6,220	7,125
1d	-0,190	0,318	0,045	0,183	0,380	-0,296	-0,527	-0,573	0,473	0,427	7,049	6,360	6,544
1e	-0,190	0,317	0,057	0,173	0,380	-0,292	-0,530	-0,571	0,470	0,429	6,926	6,720	6,521
1f	-0,181	0,316	0,084	0,180	0,381	-0,284	-0,528	-0,568	0,472	0,432	7,049	6,720	6,544
1g	-0,183	0,317	0,085	0,184	0,380	-0,282	-0,527	-0,573	0,473	0,427	6,954	5,770	6,526
1h	-0,208	0,320	-0,160	0,178	0,379	-0,299	-0,532	-0,577	0,468	0,423	6,896	5,770	4,678
1i	-0,189	0,315	0,030	0,173	0,380	-0,292	-0,528	-0,573	-0,528	-0,573	6,284	2,000	5,793
1j	-0,187	0,319	-0,021	0,173	0,380	0,705	-0,529	-0,572	-0,529	-0,572	6,409	3,050	4,929
1k	-0,197	0,318	0,014	0,173	0,380	-0,293	-0,530	-0,573	0,470	0,427	6,718	5,270	5,277
1l	-0,209	0,323	0,019	0,183	0,382	-0,294	-0,523	-0,582	0,477	0,418	7,116	7,410	6,556
2a	-0,186	0,327	0,002	0,178	0,382	-0,297	-0,530	-0,568	0,470	0,432	6,835	5,770	6,504
2b	-0,197	0,328	-0,256	0,183	0,379	0,692	-0,530	-0,579	-0,530	-0,579	6,137	2,000	4,564
2c	-0,203	0,324	-0,054	0,177	0,382	0,694	-0,527	-0,576	-0,527	-0,576	6,293	2,000	4,905
2d	-0,200	0,324	-0,219	0,180	0,380	-0,303	-0,529	-0,577	0,471	0,430	6,704	5,770	4,987
3a	-0,189	0,330	-0,192	0,179	0,382	-0,300	-0,526	-0,570	0,474	0,430	6,711	5,770	4,989
3b	-0,185	0,343	-0,275	0,172	0,384	0,656	-0,534	-0,566	0,466	0,434	6,820	5,770	5,010

C Compuesto. DIF (Masa molar)^{1/3}. ΣTop Suma de los índices topológicos de orden cero de los sustituyentes en N₁ y C 7. log1/MIC Actividad real del compuesto. q# Carga neta del átomo en la posición #.

En todas las ecuaciones aparece la carga neta sobre la posición seis, lo que confirma la importancia de la presencia del flúor en ella. Las ecuaciones 1 y 4 son equivalentes; esto es explicable pues equivalentes son también los átomos de oxígeno e n l rupo carboxilato. Lase cuaciones 2y3d ifieren notablementede las restantes y dan información diferente acerca del comportamiento de las quinolonas en esta muestra. La variable *dummy*, que de forma empírica corrige la actividad ante la presencia de heterociclos en la posición 7, se incluye en el análisis, ya que la experiencia demuestra una mayor efectividad antibacteriana de los compuestos donde este tipo de sustituyentes está presente.

La ecuación 2 es la de mayor *r* (0,95) aunque en ella intervienen cuatro variables. En la superposición de estructuras del dímero, el átomo en la posición 16 (F) coincidiría con el C₁₃ y IF tiene un δ⁻ que ajustaría con el δ⁺ del C₁₃; algo similar ocurre entre el C₆ y IC₃; e l O₁₄, se superpondría al H₁₅ y IC₄, a IC₅, cada par, con valores de carga neta de diferente signo, que en este modelo químico-cuántico en ausencia de disolvente, corroboraría la hipótesis de Shen acerca de la existencia del tipo de agrupación molecular ya mencionada. En esa ecuación, las contribuciones medias de cada variable a la actividad serían: 0,2; 45; -0,24 y -128 (q₆, q₄, q₁₄ y q₁₃ respectivamente), o sea, para incrementar la potencia es necesario aumentar la carga positiva en C₄ y aumentar la carga negativa en O₁₄ así como disminuir la carga positiva en C₁₃. Según este esquema, la sustitución del C=O endocíclico por un C=S pudiera favorecer el incremento de la potencia. Por razones estéricas, la interacción del tetrámero de este hipotético derivado con las bases del ADN, puede limitarse.

También, la mayor facilidad de oxidación del C=S puede impedirle llegar al blanco.

La ecuación 3 incluye la difusión de los fármacos. Una de las principales vías de acceso al citoplasma es la vía de las purinas, por la semejanza estructural de las quinolonas con estas. Esta ecuación sugiere un incremento de la masa molecular de las quinolonas, bien por adición de grupos voluminosos o átomos pesados en la estructura y la posibilidad de sustituir en N₁ con grupos desactivantes que reduzcan el δ⁻ de ese átomo, como formas de incrementar la potencia.

Vistas de conjunto las cuatro ecuaciones, hacen posible sugerir que el aumento de la actividad puede lograrse sustituyendo el átomo de O₁₄ por S y las posiciones con H, por átomos pesados o grupos voluminosos.

Dos de las ecuaciones (2 y 3), presentan valores de *r*²_{PRESS} aceptables aunque los de *S*_{PRESS} son altos. Esto sugiere un bajo valor predictivo de ellas.¹³ Se realizó una determinación de la capacidad de predicción del modelo para 16 nuevos compuestos (Tablas II^B y IV). La predicción de la actividad por las ecuaciones arrojó una pobre correlación con la actividad experimental. El sistema de ecuaciones obtenido que relaciona la actividad biológica con la carga neta sobre diferentes posiciones del anillo de las quinolonas no parece por tanto, generalizable al resto de los compuestos de esta familia.

Una comparación de la muestra de prueba con respecto al ad ee ntrenamiento (Tablas I) revela que las únicas diferencias apreciables se refieren al heterociclo sustituido en la posición 7 y l as ustitución del cloro en la posición 8e n l os compuestos **c5**, **c3** y **c1**. El mayor volumen del cloro respecto

al flúor puede limitar la aproximación de las moléculas para la formación del dímero y este se encuentra presente en cuatro derivados de 16 que componen la muestra de prueba y puede pesar al momento del análisis, no obstante, la lejanía de esta posición con respecto a las que aparecen en las ecuaciones. El cloro en posición 8 puede constituir una barrera a la libre rotación de los sustituyentes en 7 y 1. Es posible pensar en-

tonces que las correlaciones obtenidas son casuales o que para la muestra de prueba, está presente la posibilidad de otro mecanismo de acción, competitivo o excluyente del modelo propuesto por Shen. Obsérvese sin embargo, que no existe diferencia de actividades entre los compuestos **c1** (muestra de entrenamiento) y **1g** (muestra de prueba) ante la sustitución de flúor por cloro.

TABLA IV
Datos de la muestra de prueba

C	Valores de carga								Otros descriptores			
	q1	q4	q6	q12	q13	q14	q19	q20D+q	19	D+q20	DIF	log1/MIC
a5	-0,200	0,305	0,055	0,180	0,374	-0,278	-0,517	-0,584	0,483	0,416	7,116	6,557
a3	-0,200	0,306	0,053	0,179	0,374	-0,278	-0,517	-0,585	0,483	0,415	7,022	6,238
b3	-0,190	0,306	0,081	0,182	0,375	-0,276	-0,519	-0,580	0,481	0,420	7,142	6,260
b5	-0,197	0,312	0,022	0,179	0,377	-0,282	-0,520	-0,581	0,480	0,419	7,233	6,578
b2	-0,190	0,307	0,081	0,182	0,375	-0,273	-0,518	-0,580	0,482	0,420	7,049	6,544
c5	-0,187	0,308	0,067	0,181	0,373	-0,273	-0,521	-0,579	0,479	0,421	7,336	6,295
c3	-0,190	0,308	0,068	0,181	0,375	-0,273	-0,519	-0,580	0,481	0,420	7,248	5,376
c1	-0,185	0,306	0,069	0,181	0,373	-0,269	-0,520	-0,577	0,480	0,423	7,065	6,547
d2	-0,176	0,305	0,051	0,188	0,370	-0,272	-0,512	-0,584	0,488	0,416	7,467	6,920
e5	-0,213	0,313	0,061	0,178	0,372	-0,287	-0,520	-0,587	0,480	0,413	7,296	6,288
f3	-0,172	0,306	0,056	0,182	0,367	-0,272	-0,518	-0,587	0,482	0,413	7,103	7,156
g2	-0,162	0,303	0,083	0,183	0,372	-0,268	-0,516	-0,581	0,484	0,419	7,129	7,161
g1	-0,160	0,305	0,084	0,183	0,372	-0,267	-0,516	-0,580	0,484	0,420	7,036	6,843
h5	-0,165	0,307	0,062	0,179	0,381	-0,276	-0,519	-0,571	0,481	0,429	7,410	6,910
r1	-0,188	0,323	0,006	0,179	0,376	-0,322	-0,519	-0,579	0,481	0,421	7,022	7,141
s2	-0,166	0,320	0,047	0,182	0,378	-0,308	-0,517	-0,574	0,483	0,426	7,232	6,879

C Compuesto. DIF (Masa molar)^{1/3}. log1/MIC Actividad real del compuesto. q# carga neta del átomo en la posición #.

Las diferencias en el sustituyente en la posición 7 no son considerables desde el punto de vista electrónico a los efectos de la formación del hipotético dímero y no es posible un impedimento de tipo estérico del sustituyente en 7 sobre el sistema bicíclico de la segunda molécula. No fue posible encontrar una correlación entre la suma de los índices topológicos de orden cero de los sustituyentes en esta posición y la 1 en la muestra de entrenamiento. Esto evidencia poca o ninguna importancia de la sustitución en esta posición a los efectos del modelo de interacción de cargas planteado. Por otra parte, en la posición 7 de esa misma muestra aparecen 9 compuestos de 18 con grupo >N-H, mientras que en la de prueba aparecen en todos, con un valor medio de la actividad mayor en la muestra de entrenamiento que en la de prueba. Esto sugiere la posibilidad de un anclaje del grupo en 7 a la enzima que puede potenciarse por puentes de hidrógeno. En tal sentido, nótese como en el compuesto **c3** es el menos activo de la muestra de entrenamiento, en el cual está impedido estéricamente el grupo >N-H para la formación de puentes de hidrógeno por dos grupos metilo adyacentes y tiene también el efecto ya discutido del cloro en la posición 8.

Se hizo también un análisis semicuantitativo del carácter predictivo como modelo en su conjunto, de las ecuaciones 1-4. Se consideraron como válidas las predicciones en un intervalo de error de 0,3 en unidades logarítmicas. La ecuación 2 tiene sólo un 19 % de acierto mientras que las restantes pre-

sentan un 50 % (Tabla V). En total, el modelo tiene un 42 % de acierto en las predicciones. Eliminando la ecuación 2, este porcentaje aumentaría al 50.

Atendiendo a la naturaleza del sustituyente en 7 y analizando cada caso por el número de ecuaciones que aciertan en la predicción (Tabla VI), se encuentra que los fragmentos mejor predichos son los menos bloqueados (A y D) con 50 y 55 % respectivamente, mientras que el de mayor impedimento estérico (C) es el de peor pronóstico según el modelo.

Si se comparan las muestras, estas están en dos espacios de datos diferentes: ambas presentan medias y medianas distintas. Se les realizó la prueba t-Student para un valor de $p = 0,0067$ por lo que existen diferencias significativas entre ambas. Desde un punto de vista metodológico, no se tiene la obligación de buscar un ajuste en los espacios de datos de las muestras. Precisamente, la capacidad predictiva de un modelo se basa en la posibilidad de generalizar y extender la predicción a un entorno de datos diferente al de partida.

Si el mecanismo de acción de las quinolonas depende solamente de aspectos electrostáticos, ambas muestras debían ser correctamente predichas por las ecuaciones del modelo. Puede pensarse entonces que otros factores adicionales estén presentes en el mecanismo de acción de estos compuestos.

TABLA V
Actividades predichas por cada ecuación contra la actividad real (ACT) para la muestra de prueba

Compuesto	Actividad	Ec. 1	Residual	Ec. 2	Residual	Ec. 3	Residual	Ec. 4	Residual
a5	6,55706	,5238	-0,0332	6,4684	-0,0886	6,5976	0,0406	6,5065	-0,0505
a3-	6,2388	6,5129	0,2741	6,5997	0,3609	6,4676	0,2288	6,4948	0,2560
b3	6,2607	6,6646	0,4039	6,5629	0,3022	6,8595	0,5988	6,6521	0,3914
b5	6,5782	6,3409	-0,2373	6,2339	-0,3443	6,6486	0,0704	6,3279	-0,2503
b2	6,5447	6,6654	0,1217	6,7123	0,1676	6,7378	0,1931	6,6521	0,1074
c5	6,2956	6,5865	0,2909	7,3629	1,0673	7,0897	0,7941	6,5761	0,2805
c3	5,3768	6,5935	1,2167	6,7313	1,3545	6,9392	1,5624	6,5808	1,2040
c1	6,5477	6,5982	0,0505	7,0768	0,5291	6,7703	0,2226	6,5886	0,0409
d2	6,9208	6,5057	-0,4151	7,7064	0,7856	7,3262	0,4054	6,4846	-0,4362
e5	6,2885	6,5544	0,2659	8,3917	2,1032	6,7000	0,4115	6,5372	0,2487
f3	7,1567	6,5285	-0,6282	8,8717	1,7150	6,9213	-0,2354	6,5098	-0,6469
g2	7,1615	6,6779	-0,4846	7,0847	-0,0768	7,1874	0,0259	6,6623	-0,4992
g1	6,8433	6,6833	-0,1600	7,3975	0,5542	7,0944	0,2511	6,6685	-0,1748
h5	6,9107	6,5606	-0,3501	4,5955	-2,3152	7,4296	0,5189	6,5547	-0,3560
r1	7,1418	6,2540	-0,8878	8,0910	0,9492	6,4169	-0,7249	6,2417	-0,9001
s2	6,8792	6,4800	-0,3992	7,4016	0,5224	7,2418	0,3626	6,4702	-0,4090
Acierto (%)			5019				505		0
Total									42 %

* Si en lugar de utilizar el valor 0,3 como umbral de error para la predicción de la actividad, se hubiera empleado el de 0,5, los porcentajes de acierto serían: 81, 38, 69 y 81 para las ecuaciones 1-4 y 67 para el total respectivamente. El valor 0,3 representa el 4,8 % de error con respecto a la media de la actividad y 0,5 representa el 81 %.

Si las correlaciones no son casuales sino, no generalizables para todos los compuestos de esta familia, deben existir otros factores hasta el momento no incluidos en el modelo de Shen. El análisis de la muestra de prueba revela la posible influencia del sustituyente en la posición 7 sobre la actividad. Esta puede estar asociada a variaciones de volumen, de tamaño, a la presencia o no de grupos >N-H que contribuyan al anclaje con la ADN girasa, o al número de grados de libertad rotacionales que promuevan una conformación preferencial para el anclaje a la enzima o que faciliten la entrada por el sitio de corte del ADN. Tampoco es posible descartar la presencia de otros mecanismos que cooperen o compitan con el de Shen para la unión de las quinolonas al ADN. Esta ecuación es diferente de las anteriores y aunque incluye al osición 6, el coeficiente de la posición 6 es inferior a la posición 1, mientras que en las ecuaciones 1 y 4 es el término más importante. Con la muestra de prueba como muestra de entrenamiento, se obtuvo la ecuación 5. En ella aparecen las cargas sobre las posiciones 1 y 6, pero esta fue la única ecuación que se pudo obtener de esa muestra. Esto refuerza el criterio de la posibilidad de mecanismos de acción competitivos entre diferentes familias de quinolonas.

$$\log_{10} MIC = 18,057(0,00013)q_1 - 0,722(0,01007)q_6 + 10,423(5) \\ r = 0,856 \quad F = 16,5 \quad s = 0,187$$

Estos resultados no validan el modelo de Shen para explicar por sí sólo el mecanismo de acción de las quinolonas antibacterianas, pero tampoco lo descartan. El cálculo de las estructuras en su forma aislada, el empleo de métodos semiempíricos y la incorporación de variables *dummy*s on aproximaciones que han posibilitado este análisis y abierto

nuevas interrogantes sobre otros posibles mecanismos competitivos.

Determinación de la capacidad predictiva del modelo sobre 10 confórmers del ofloxacin

El modelo de Shen puede parecer insuficiente para explicar el potente efecto de aquellas estructuras que presentan un tercer anillo en el núcleo farmacofórico, fusionado por las posiciones 1 y 8, como es el caso del ofloxacin (11, Tabla I). La no planaridad del anillo (por aparecer en él hibridaciones sp^3) y la presencia de un centro quiral en estas estructuras, sugiere un impedimento de tipo estérico que favorece la actividad de aquellas conformaciones que no dificulten las atracciones electrostáticas-Van der Waals que requiere la formación del dímero.


Se trabajó sobre un grupo de 5 confórmers S y 5 R del ofloxacin. La evidencia experimental¹⁴⁻¹⁶ señala que el enantiómero S(-) presenta una potencia relativa de 8 a 128 veces mayor que el R(+). Las estructuras de los 10 confórmers empleados se muestran en las figuras 3y4.

Se realizó un análisis por métodos de ajuste mediante mecánica molecular. Para ello, se fijaron las distancias entre las posiciones de dos anillos 3-6', 10-10', 6-3' y 9-9' a una distancia menor de 5 Å, con una constante de fuerza de enlace de 5. Se forzó la aproximación de ellas hasta formar el dímero, por optimizaciones sucesivas de las estructuras con el método MM2. Se verificó que en los confórmers s3 y r2 la distancia mínima entre los elementos del dímero entra en el campo de las atracciones electrostáticas (alrededor de 2,8 Å). Esta observación se corroboró mediante gráficos de atraccio-

nes de Van der Waals. El resto de los conformeros presenta una distancia entre estructuras superior a los 3,2 Å, que a pesar de que no pueda descartarse una posible interacción electrostática sí señala a los dos isómeros anteriores como los dimeros más estables. Estos resultados concuerdan con

los reportados por Shen⁷ y explicarían la diferencia de actividades (*s3* y *r2* son enantiómeros) por poseer patrones de asociación diferentes. Sin embargo, la evidencia experimental reporta cantidades de radioactividad equivalentes en el ADN tratado con estos enantiómeros marcados.¹⁶

TABLA VI
Acierto en la predicción según el sustituyente en R7

Sustituyente en R7				
	A	B	C	D
a5	—	—	—	4/4
a3	—	—	3/4	—
b3	—	—	0/4	—
b5	—	—	—	3/4
b2	—	4/4	—	—
c5	—	—	—	2/4
c3	—	—	0/4	—
c1	3/4	—	—	—
d2	—	0/4	—	—
e5	—	—	—	2/4
f3	—	—	1/4	—
g2	—	2/4	—	—
g1	3/4	—	—	—
h5	—	—	—	0/4
r1	0/4	—	—	—
s2	—	0/4	—	—
Acierto (%)	5037	,5	25	55

Se sometieron las estructuras a un análisis de potencia relativa mediante el modelo de ecuaciones obtenidas, para intentar explicar esa marcada diferencia de efectividad entre los isómeros *R* y *S*.

Optimizadas las geometrías por el método AM1, se utilizaron los valores de cargas (y de los otros descriptores) para sustituirlos en las ecuaciones del modelo y predecir su actividad (Tabla VII).

TABLA VII
Predicciones de las ecuaciones para los 10 conformeros del ofloxacin empleados

Conformeros	Ecuación			
	1234			
s1	6,2799	6,8862	6,3039	6,2646
s2	6,1141	5,3899	6,2157	6,1129
s3	6,3222	6,2766	6,33706	,3212
s4	6,3299	5,3011	6,5336	6,3222
s5	6,3150	4,4923	6,5092	6,3057
r1	6,2712	6,6861	6,2595	6,2499
r2	6,2831	7,3561	6,2599	6,2708
r3	6,2657	5,77806	2313	6,2496
r4	6,5661	5,3909	6,6396	5,9380
r5	6,3150	6,5875	7,4115	6,3020

Según los resultados (Tabla VIII), no es posible predecir la conformación más activa mediante el sistema de ecuaciones encontrado, pues no hay un resultado coherente en torno a cuál de ellas predomina. A diferencia del resultado experimental que señala al enantiómero S como más potente que el R, en las predicciones realizadas ocurre lo contrario en la mayoría de los casos (para las ecuaciones 1, 2 y 3). Esta evidencia apunta a que el modelo no puede generalizarse para este tipo de estudios y las diferencias entre enantiómeros no dependen solamente de factores electrónicos.

TABLA VIII
Enantiómeros más activos, según las ecuaciones 1-4

Enantiómeros	Ecuación			
	12	34		
"R"	r4*	r2	r4	r5
"S"	s4	s1	s4	s4*

* Enantiómero más activo.

CONCLUSIONES

La extrapolación del modelo de interacción de cargas del núcleo básico de las quinolonas, a otros derivados con sustituyentes diferentes en la posición 7, no da una buena predicción de la actividad, por lo tanto, no es posible generalizar el modelo de Shen de formación de dímero. Las modificaciones introducidas a dichos sustituyentes, que incluyen la presencia de grupos >N-H y un mayor número de grados de libertad rotacionales, introducen elementos estructurales no presentes en la muestra de entrenamiento y éstos pueden promover conformaciones preferenciales que faciliten la entrada por el sitio de corte del ADN y contribuciones al anclaje con la ADN girasa por puentes de hidrógeno. Tampoco es posible validar el modelo de Shen para las diferencias de actividad biológica entre enantiómeros, ya que aparentemente, esta no depende solamente de factores electrónicos. No debe descartarse la posible participación de otros mecanismos que cooperen o compitan con el de Shen para la unión de las quinolonas al ADN.

BIBLIOGRAFIA

1. Cozarrelli N.R. DNA topoisomerasas. *Cell*, **22**, 327, 1980.

- Kirchhausen T., Wang J.C. and Harrison S.G. DNA gyrase and its complexes with DNA: direct observation by electron microscopy. *Cell*, **41**, 933, 1985.
- Gellert M. DNA gyrase and DNA supercoiling. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 35, 1981.
- Yamagashi J., Yoshida H., Yamayoshi M. and Nakamura S. Nalidixic acid-resistant mutations of the gyr B gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 367, 1986.
- Shen L.L. and Pernet A.G. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: The target of the drug is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **82**, 307, 1985.
- Shen L.L. Molecular Mechanism of DNA gyrase inhibition by Quinolone Antibacterials. *Advances in Pharmacology*, **29A**, 285, 1994.
- Domagala M.J., Bridges A.J. and Culbertson L.G. Synthesis and Biological activity of 5-amino- and 5-hydroxyquinolones, and the overwhelming influence of the remote N1 substituent in determining the structure-activity relationship. *J. Med. Chem.*, **34**, 1142, 1991.
- Domagala M.J., Hanna L.D. and Heifetz C.L. New Structure-activity relationship of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.*, **29**, 394, 1986.
- Cohen M.A., Griffin T.J. and Bien P.A. The standar microtitration assay. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **28**, 766, 1985.
- Dewar M.J., Zoebish E.G. and Healy E.F. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902, 1985.
- Llorente B. and Rivero N. Carrasco R., Martinez R.S. y Estrada E. A QSAR Study of Quinolones Based on Electrotopological State Index., *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **13**, 419, 1994.
- Llorente B, Leclerc F. and Cedergren R. Using SAR and QSAR analysis to model the activity and structure of the Quinolone/DNA complex. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **4**, 61, 1996.
- Kubinyi Hugo QSAR: Hansh analysis and related approaches. VCH Publishers, New York, USA, 1993.
- Hayakawa I., Atarashi S. and Yokohama S. Synthesis and antibacterial activities of optically active Ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**, 163, 1986.
- Hoshino K., Sato K., Akahane K. and Yoshida A. Significance of the methyl group on the oxazine ring of ofloxacin derivatives in the inhibition of bacterial and mammalian type II topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 309, 1991.
- Immamura M. and Shibamura S. Inhibition of DNA gyrase by optically active ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 325, 1987.