



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“MECANISMOS DE REACCIÓN Y BIOGÉNESIS DE TERPENOS CON
POSIBLE ACTIVIDAD SOBRE RECEPTORES OPIOIDES”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JAVIER ALEJANDRO POSADA SALGADO

TUTOR: Dra. Karina Martínez Mayorga
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2016

**Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de
Fisicoquímica del Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca asignada durante mis estudios de Doctorado (239976), sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico principalmente a mi madre y familia que sin su apoyo y amor no hubiera sido posible.

A mi **abuelo** que está pasando por momentos muy difíciles de salud. Esto te lo dedico a ti que eres mi figura paterna y siempre haré que te sientas orgulloso de lo que tu has creado.

A mi tutor de Licenciatura **Dr. Julio Flores Rodríguez**. Te extraño mucho, todos los días me pregunto cómo seguiré viviendo sin tu compañía, sin tus enseñanzas, y cada uno de tus consejos, que tanto apreciaba. Lo único que me brinda un poco de consuelo, es el saber que un día volveremos a estar juntos, y en ese momento nada ni nadie volverá a separarnos. Gracias por todo y hasta siempre amigo mío.

A mi tutor de Maestría **Dr. Eugene Bratoeff**. Gracias por todas tus enseñanzas y consejos, sin eso, lo que he logrado no sería nada.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, abuelos, hermanos y sobrinos que siempre me han apoyado en todos los aspectos de mi vida, gracias por su amor y cariño.

A la **UNAM** que me dio la oportunidad de formarme profesionalmente a nivel posgrado. A la facultad de Química y al Instituto de Química donde realicé mis estudios de posgrado.

A la **Dra. Karina Martínez Mayorga**, gracias por enseñarme a ser mas independiente, optimista y versátil en el aspecto académico, lo cual me ha servido para desarrollar y concluir con éxito mis estudios de Doctorado. Además de agradecerle la confianza depositada en mí y las oportunidades brindadas durante mi estancia.

Al **Dr. Gabriel Cuevas** de quien aprendí que la constancia, disciplina y responsabilidad son herramientas fundamentales para el desarrollo de un proyecto de investigación.

Al **Dr. Alfredo Ortega** que me enseñó que la perseverancia y conocimiento son los pilares para llegar muy alto y que sin sus brillantes aportaciones en la realización de este proyecto, este no se hubiera realizado satisfactoriamente.

Al **Dr. Gustavo Ávila Zárraga** quien me apoyó incondicionalmente durante mis estudios doctorales y que contribuyó de una manera muy objetiva en la realización y guía del proyecto.

A **Josefina Tenopala** que siempre me ha ayudado y apoyado en todo y es una persona a quien le tengo muchísima estima. Gracias por estos seis años de aguantarme y asesorarme en todo momento.

Al jurado asignado para la revisión de esta tesis. Gracias por sus aportaciones.

A los co-autores de las publicaciones realizadas. En especial a la **Dra. Iris Lindberg** por dejarme participar en la realización y desarrollo de proyectos de investigación.

Al personal del IQ que siempre están para ayudarnos en todo momento.

A mi entrañable amiga **Bianca Valderrama** que siempre me ha cuidado, consentido y asesorado en todo momento. Gracias por aguantarme y por tu cariño y comprensión. La estancia contigo en el Doctorado fue muy divertida aunque te me hayas escapado dos veces a tierras lejanas, se que esta es una amistad que perdurará por siempre y estaremos para ayudarnos en cualquier momento. Te quiero mucho!

Al **M. en A.S. Alberto González** que me ha apoyado en todo momento.

Al **Q. Andrés Marmolejo** por su compañerismo y por su apoyo en todo momento.

A mis compañeros del **laboratorio 1** que me apoyaron en todo momento.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Alfredo Ortega Hernández

Vocal: Dr. Fernando Cortés Guzmán

Vocal: Dr. Fausto Rivero Cruz

Vocal: Dr. Gabriel Navarrete Vázquez

Secretario: Dra. Laura Domínguez Dueñas

Dra. Karina Martínez Mayorga (Tutora)

M. en C. Javier Alejandro Posada Salgado (Sustentante)

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- J. Alejandro Posada-Salgado., Elihú Bautista., Gabriel Cuevas., Karina Martínez-Mayorga. **A theoretical biogenesis overview of diterpenes isolated from *Salvia microphylla*.** *Journal of Molecular Modeling* (2015) 21:360 (DOI:10.1007/s00894-015-2841-8)
- Bruno Ramos-Molina., Adam N. Lick., Elias H. Blanco., J. Alejandro Posada-Salgado., Karina Martinez-Mayorga., Alan T. Johnson., Guan-Sheng Jiao., Iris Lindberg. **Identification of potent and compartment-selective small molecule furin inhibitors using cell-based assays.** *Biochemical Pharmacology* (2015) 96; 2; 107-118 (DOI:10.1016/j.bcp.2015.05.008)

PRESENTACIONES EN FOROS ACADÉMICOS

- QUIMIUNAM 2015 **“Biogenesis of terpenoids isolated from *Salvia microphylla* and theoretical study on the reaction mechanism involved”**. Ciudad Universitaria., Abril 2015
- Simposio Interno del Instituto de Química (2015). **“Modulación de la función de receptores de opioides y sus precursores mediante productos naturales y moléculas pequeñas”**. Ciudad Universitaria., Junio 2015

Simposio Interno del Instituto de Química (2016). **“Mecanismos de reacción y biogénesis de terpenos con posible actividad sobre receptores opioides”**.

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

FIGURA 1. POSTULADO FUNDAMENTAL DE LA TEORÍA DE EYRING	9
FIGURA 2. MAPA DE HIDROFOBICIDAD	18
FIGURA 3. MODELO TRIDIMENSIONAL DEL RECEPTOR DE OPIOIDES. EN ROJO SE PRESENTAN LAS THM	18
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LA MORFINA EN 2D	19
FIGURA 5. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA FURINA. LOS SUBSITIOS SON MOSTRADOS EN COLORES. EN AMARILLO SE MUESTRA EL LIGANDO CO-CRISTALIZADO Y EN NEGRO EL LIGANDO 2f	22
ESQUEMA 1. RUTAS DE BIOSÍNTESIS PARA LA FORMACIÓN DE LOS TERPENOS	26
FIGURA 6. DITERPENOS RECIENTEMENTE AISLADOS	28
ESQUEMA 2. BIOGÉNESIS PROPUESTA PARA LOS DITERPENOS AISLADOS	30
FIGURA 7. COMPUESTO 2 CON LACTONA EN CONFORMACIÓN DE SILLA Y COMPUESTO 6 CON LACTONA EN CONFORMACIÓN DE BOTE	33
FIGURA 8. COORDENADA DE REACCIÓN PARA GENERAR 3 A PARTIR DE 1 POR MEDIO DE UNA REACCIÓN DE ELECTROCICLIZACIÓN CATALIZADA POR LUZ	34
FIGURA 9. COORDENADA DE REACCIÓN PARA GENERAR 5 A PARTIR DE 1 POR MEDIO DE UNA REACCIÓN DE ELECTROCICLIZACIÓN CATALIZADA POR CALOR	36
FIGURA 10. VISTA EXTRACELULAR DEL RECEPTOR M_{μ}. EN AMARILLO BU72 CO-CRISTALIZADO EN EL SITIO DE UNIÓN. EN VERDE LA SALIDA DE DOCKING CON BU72	47
FIGURA 11. ORIENTACIONES OBTENIDAS DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS (GRIS) CON LA MORFINA (VERDE) EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}. EL RECUADRO ROJO INDICA LA ORIENTACIÓN DEL NITRÓGENO POSITIVO DENTRO DEL RECEPTOR	50
FIGURA 12. PLIF DE LOS MORFINANOS EN ESTUDIO	51
FIGURA 13. MODO DE UNIÓN DE LA MORFINA EN EL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}	52
FIGURA 14. ACOPLAMIENTO DE M1 DENTRO DEL SITIO ACTIVO DE RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}	53
FIGURA 15. ACOPLAMIENTO DE M4 DENTRO DEL SITIO ACTIVO DEL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}	54

FIGURA 16. ACOPLAMIENTO DE M8 DENTRO DEL SITIO ACTIVO DEL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}	55
ESQUEMA 3. DITERPENOS AISLADOS Y EVALUADOS EN EL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}	58
FIGURA 17. PLIF DE LOS DITERPENOS EN ESTUDIO	60
FIGURA 18. ACOPLAMIENTO DEL DITERPENO 4 (VERDE) COMPARADO CON EL LIGANDO CO-CRISTALIZADO BU72 (AMARILLO)	61
FIGURA 19. INTERACCIONES EN DOS DIMENSIONES DEL DITERPENO 4 EN EL SITIO DE ACTIVO DEL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ}	62
FIGURA 20. VISTA EXTRACELULAR DEL RECEPTOR OPIOIDE M_{μ} CON LOS CINCO COMPUESTOS ALINEADOS DE LA MISMA FORMA EN EL SITIO ACTIVO	63
FIGURA 21. ESTRUCTURA CRISTALIZADA DE LA FURINA. SE MUESTRA LA ESTRUCTURA SECUNDARIA JUNTO CON EL LIGANDO CO-CRISTALIZADO	70
FIGURA 22. ORIENTACIONES RELATIVAS DEL LIGANDO CO-CRISTALIZADO (AMARILLO) Y EL ACOPLAMIENTO REALIZADO CON EL LIGANDO CO-CRISTALIZADO EN MOE (VERDE)	71
FIGURA 23. PLIF DE SALIDAS DE DOCKING DE LOS DERIVADOS SOBRE LA FURINA	76
FIGURA 24. ORIENTACIONES RELATIVAS DE LOS DERIVADOS QUE NO PRESENTAN ACTIVIDAD Y EL CO-CRISTAL (VERDE)	77
FIGURA 25. ORIENTACIONES RELATIVAS DE LOS DERIVADOS 1a (AZUL), 1b (MORADO) Y EL CO-CRISTAL (VERDE)	78
FIGURA 26. INTERACCIONES CON LA FURINA	79
FIGURA 27. POTENCIALES ELECTROSTÁTICOS EN EL COMPLEJO ENZIMA-LIGANDO CON LOS COMPUESTOS 1a Y 1b	79
FIGURA 28. ORIENTACION DEL LIGANDO 2f SOBRE EL SITIO DE UNIÓN DE LA FURINA	80

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ENERGÍAS RELATIVAS A 1 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95	31
TABLA 2. DERIVADOS MORFINANOS ESTUDIADOS	40
TABLA 3. VALORES DE K_i (nM) PARA LOS 40 COMPUESTOS DERIVADOS DE LA MORFINA	42
TABLA 4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS MORFINANOS	43
TABLA 5. PREDICCIÓN CONFÓRMEROS DE MENOR ENERGÍA	45
TABLA 6. ENERGÍAS DE UNIÓN ENTRE LOS LIGANDOS Y EL RECEPTOR	49
TABLA 7. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DITERPENOS BAJO ESTUDIO	58
TABLA 8. COMPUESTOS ANALIZADOS Y SUS CONSTANTES DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	67
TABLA 9. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DERIVADOS	74
TABLA 10. PREDICCIÓN CONFÓRMEROS DE MENOR ENERGÍA	75
TABLA SI1. COORDENADAS CARTESIANAS DE 1 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	88
TABLA SI2. COORDENADAS CARTESIANAS DE TS_{1-6} AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	89
TABLA SI3. COORDENADAS CARTESIANAS DE 6 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	90
TABLA SI4. COORDENADAS CARTESIANAS DE $TS_{6-Enolate}$ AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	91
TABLA SI5. COORDENADAS CARTESIANAS DE Enolate AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	92
TABLA SI6. COORDENADAS CARTESIANAS DE $TS_{Epimerization}$ AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	93
TABLA SI7. COORDENADAS CARTESIANAS DE 2 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	94
TABLA SI8. COORDENADAS CARTESIANAS DE TS_{Epo} AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	95

TABLA SI9. COORDENADAS CARTESIANAS DE 11 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	97
TABLA SI10. COORDENADAS CARTESIANAS DE TS₁₁₋₃ AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	98
TABLA SI11. COORDENADAS CARTESIANAS DE 3 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	99
TABLA SI12. COORDENADAS CARTESIANAS DE TS₁₋₁₀ AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	100
TABLA SI13. COORDENADAS CARTESIANAS DE 10 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	102
TABLA SI14. COORDENADAS CARTESIANAS DE 1stTS_{AllylicOxidation} AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	103
TABLA SI15. COORDENADAS CARTESIANAS DE SELENOXIDE COMPLEX1 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	105
TABLA SI16. COORDENADAS CARTESIANAS DE 2ndTS_{AllylicOxidation} AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	107
TABLA SI17. COORDENADAS CARTESIANAS DE SELENOXIDE COMPLEX2 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	109
TABLA SI18. COORDENADAS CARTESIANAS DE TS_{AlcoholFormation} AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	111
TABLA SI19. COORDENADAS CARTESIANAS DE 4 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	113
TABLA SI20. COORDENADAS CARTESIANAS DE TS₄₋₅ AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	114
TABLA SI21. COORDENADAS CARTESIANAS DE 5 AL NIVEL DE TEORÍA mPW1B95/6-31+G(d,p)	116

CONTENIDO

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1. BIOGÉNESIS DE DITERPENOS DE TIPO <i>neo-clerodano</i> AISLADOS DE <i>Salvia microphylla</i>.	3
2. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES MEDIANTE PRODUCTOS NATURALES Y MOLÉCULAS PEQUEÑAS.	3
3. MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE PRO-HORMONA CONVERTASAS.	3
3. METODOLOGÍA	4
OPTIMIZACION DE LAS GEOMETRÍAS	4
ESTUDIOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA	4
PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS	4
PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING)	5
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS PARA PREDECIR PROPIEDADES ADME	5
PROTEIN-LIGAND INTERACTION FINGERPRINTS	6
4. ANTECEDENTES	7
SUPERFICIE DE ENERGÍA POTENCIAL	7
TEORÍA DEL ESTADO DE TRANSICIÓN	8
RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y DISEÑO MOLECULAR	10
DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE BIOMACROMOLÉCULAS	14
RECEPTORES OPIOIDES	15
RECEPTOR OPIOIDE MU	16
FARMACÓFORO DE LA MORFINA	19
PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE NEUROPEPTIDOS	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
CAPÍTULO 1 BIOGÉNESIS DE DITERPENOS DE TIPO <i>neo-clerodano</i> AISLADOS DE <i>Salvia microphylla</i>.	25
HIPÓTESIS BIOGENÉTICAS	27
CONCLUSIONES	37
CAPÍTULO 2 MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES DE OPIOIDES MEDIANTE PRODUCTOS NATURALES Y MOLÉCULAS PEQUEÑAS.	39
MORFINANOS	39
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS MORFINANOS	42
OPTIMIZACIÓN DE GEOMETRÍA MOLECULAR	45
ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)	46
DOCKING MORFINA	52
DOCKING DE M1	53

DOCKING DE M4	54
DOCKING DE M8	55
DITERPENOS	57
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DITERPENOS	58
ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)	59
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	64
CAPÍTULO 3 MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE PRO-HORMONA CONVERTASAS	67
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DERIVADOS	73
OPTIMIZACIÓN DE GEOMETRÍA MOLECULAR	75
ESTUDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)	76
CONCLUSIONES	82
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
7. ANEXOS	87
8. PUBLICACIONES	117

1D	unidimensional
2D	bidimensional
3D	tridimensional
Å	ångström
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
Ala	alanina
Arg	arginina
Asp	ácido aspártico
CAMD	Computer-Aided Molecular Design
CoA	acetil coenzima A
d	difusa
DOXP	1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
ET	estado de transición
G	guanidina
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
HEM	hormona estimulante de los melanocitos
His	histidina
HMG	β -hidroxi- β -metilglutaril
Ile	isoleucina
Kcal	kilocaloría
Ki	constante de inhibición enzimática
Leu	leucina
logP	coeficiente de partición octanol-agua
MDB	MOE database
Me	metilo
MWt	peso molecular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nM	nanoMolar
p	polarizada
PDB	Protein Data Bank
pH	potencial de iones hidrógeno
pK	constante de disociación ácida
PLIF	Protein Ligand Interaction Fingerprints
POMC	pro-opiomelanocortina
Pro	prolina
RMN	resonancia magnética nuclear
RMSD	Root-mean-square deviation
SAR	Relaciones estructura-actividad
SEP	superficie de energía potencial

Ser	serina
SNC	sistema nervioso central
T_PSA	área topológica de la superficie polar
TET	teoría del estado de transición
TFD	teoría de funcionales de la densidad
THM	hélices transmembranales
TM	Trademark (marca registrada)
Trp	triptofano
TS	Transition State (Estado de transición)
Tyr	tirosina
Val	valina
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
β -LPH	beta-lipotropina
ΔE	diferencia de energía
ΔG	cambio de energía de Gibbs
μM	microMolar

RESUMEN

Los productos naturales son una excelente fuente de moléculas bioactivas. El establecimiento de los mecanismos de reacción involucrados en la biosíntesis de productos naturales es relevante. Hipótesis biogénicas han sido formuladas, pero la información experimental que las sustenta es limitada. En este sentido, la química computacional ha jugado un papel importante que ha dado sustento a dichas hipótesis.

En este trabajo se aborda los mecanismos de reacción asociado a la biogénesis de diterpenos de tipo neo-clerodano recientemente aislados de *Salvia microphylla*, usando el funcional de tercera generación mPW1B95. Se obtuvieron los estados de transición e intermediarios que conectan a los metabolitos que se aislaron de la *Salvia microphylla* que da sustento a la hipótesis biogénica propuesta.

Compuestos diterpénicos de la flora mexicana, tal como la Salvinorina A, han marcado una nueva era en el campo de los receptores opioides. Dada la importancia terapéutica de estos receptores (participan en procesos fisiológicos, incluyendo el dolor, adicción y los trastornos del estado de ánimo, entre otros) y de los productos naturales en ese campo, resulta relevante explorar la posibilidad de que los diterpenos aislados de *Salvia microphylla* sean moduladores de los receptores opioides. Por lo tanto, este estudio incluyó el modelado molecular de estos compuestos y su comparación con derivados morfínicos, como referencia. Como era de esperarse los diterpenos estudiados mostraron diferente modo de unión, respecto a los morfínicos. Estos modelos apoyan la hipótesis de la orientación del grupo furanil de los diterpenos hacia la parte extracelular del

receptor.

Por su parte, las pro-hormona convertasas están implicadas en la liberación de neuropéptidos endógenos. Como parte de la búsqueda de compuestos bioactivos, la última parte de este trabajo consistió en el modelado molecular de moduladores de la furina, la endoproteasa prototipo de la familia de las pro-hormona convertasas. El análisis de las relaciones estructura-actividad y los modelos de acoplamiento subrayaron la importancia de los subsitios S1 y S2 en el proceso de reconocimiento molecular, sugiriendo así modificaciones estructurales para la generación de futuros inhibidores de furina. Las pro-hormona convertasas son relevantes en dolor, diabetes, cáncer, infecciones y propagación viral, por lo tanto son blancos terapéuticos de diversas enfermedades. Muchos grupos de investigación han identificado compuestos no peptídicos con una alta eficiencia inhibitoria sobre la furina. En este trabajo se aborda el estudio de acoplamiento molecular de compuestos derivados de la guanidil-2,5-didesoxiestreptamina.

ABSTRACT

It is well accepted that natural products are an excellent source of bioactive molecules. Establishing the reaction mechanisms in the biosynthesis of natural products is paramount. Biogenetic hypotheses have been generated but based on limited experimental information. In this sense, computational chemistry studies play a key role to support such hypothesis.

This work is focused on the mechanism associated to the biogenesis of neo-clerodane type diterpenes, recently isolated from *Salvia microphylla*, using the third generation mPW1B95 functional. We obtained the transition states and intermediates that connect the metabolites isolated from *Salvia microphylla*, which support the proposed biogenetic hypothesis.

Diterpenes from flora Mexicana, such as Salvinorin A have marked new era in the field of opioid receptors. Due to the therapeutic relevance of these receptors (they are involved in pain, addiction, drug addiction and mood) along with the importance of natural products on this field, it is relevant to explore the possibility that the diterpenes isolated from *Salvia microphylla* as modulator of the opioid receptors. Thus, this study included the molecular modeling of these compounds and its comparison with morphinan derivatives, as reference. As expected, the diterpenes studied here, showed different binding modes with respect to the morphinanes. These models support the hypothesis of the orientation of the furanyl group towards the extracellular side of the receptor.

In turn, pro-hormone convertases are implicated in the release of endogenous

neuropeptides. In the search of bioactive molecules, the last part of this work consisted on the molecular modeling of furin regulators. The analysis of the structure-activity relationships and the binding models highlighted the importance of the subsites S1 and S2 during the molecular recognition process, thus suggesting structural modifications for the generation of future furin inhibitors. Several groups have identified non-peptide compounds with high inhibitory potency against furin in vitro, although their efficacy in various cell-based assays is largely unknown. In this work we show that certain guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives exhibit interesting properties and molecular docking into furin is fully discussed.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son estructuralmente diversos¹. Establecer los mecanismos de reacción involucrados en la biosíntesis de productos naturales es fundamental. Las hipótesis formuladas han sido generadas con información experimental limitada, a las cuales se les conoce como hipótesis biogénéticas. Algunas de estas contribuciones son muy relevantes aunque en su tiempo fueron muy discutidas; por lo que la aplicación de los métodos computacionales es de utilidad ya que permiten establecer la naturaleza de los estados estacionarios que corresponden a energías mínimas y estados de transición en la superficie de energía potencial. En este trabajo se aborda la biogénesis de diterpenos de tipo neo-clerodano aislados de *Salvia microphylla*. Usando el funcional de tercera generación mPW1B95. El desempeño de este funcional fue comparado con el funcional M062X. Se encontró que para estos sistemas, el funcional mPW1B95 es el más adecuado para determinar la magnitud de la energía de activación y la habilidad de explorar la superficie de energía potencial.

Los receptores de opioides, participan en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el dolor, la adicción y los trastornos del estado de ánimo, entre otros. Los opioides (algunos de ellos terpenos como la Salvinorina A)², ya sea endógenos (producidos por el propio organismo) o exógenos (administrados externamente), se unen de forma específica y reversible a estos receptores, ejerciendo así su función biológica. Debido a la relevancia terapéutica de los receptores opioides, intensas investigaciones se han dirigido para comprender su estructura y función. Han sido identificados al menos tres tipos de receptores opioides (Mu, Delta, Kappa) cuyas estructuras de rayos X fueron publicadas recientemente. Estas estructuras tridimensionales permiten investigar a nivel atómico las características estructurales que promueve la unión de afinidad y afinidad de sus ligandos y en última instancia indagar los mecanismos de la actividad de estos receptores. Además, estas estructuras tridimensionales se

pueden utilizar como plantillas para el desarrollo de modelos moleculares de otros GPCRs (receptores acoplados a proteínas G). Se espera que los modelos moleculares ayuden a llenar los vacíos en las estructuras 3D de otros GPCRs, así como ser utilizados para investigar los mecanismos de activación, postular sitios alostéricos, desarrollar estudios de las relaciones de la estructura-función. El segundo capítulo está enfocado al estudio de reconocimiento molecular sobre el receptor opioide Mu de compuestos tipo morfina y de los diterpenos abordados en el capítulo 1.

La furina es una proproteína convertasa que está implicada en una variedad de procesos patógenos, tales como la activación bacteriana, la propagación viral, y el cáncer³. Además, la furina está implicada en la liberación de neuropéptidos endógenos, involucrados en la regulación de dolor. Una vía alterna a la regulación de receptores opioide es a través de la regulación de prohormona convertasas y con ello la generación de neuropéptidos. Se han identificado compuestos no peptídicos altamente inhibitorios *in vitro*, aunque su eficacia en ensayos basados en células es en gran parte desconocida. En este estudio se enfoca en derivados de 2,5-guanidil didesoxiestreptamina como inhibidores de la furina.

Este trabajo multidisciplinario fue realizado en conjunto con grupos de investigación de diversas disciplinas de la química que van desde la síntesis orgánica, los productos naturales, la bioquímica, y por último el modelado molecular de sistemas biológicos. Todo esto con el fin de racionalizar la producción y efecto de moléculas bioactivas como lo son los diterpenos aislados de *Salvia*. Este trabajo recae entonces en el estudio computacional de la información química contenida en las moléculas pequeñas como moduladores de funciones biológicas, lo que queda enmarcado en la química biológica computacional.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer los mecanismos de reacción y biogénesis que dan lugar a terpenos con posible actividad sobre receptores opioides así como las interacciones involucradas en el reconocimiento molecular de estos receptores por moléculas pequeñas y la modulación de proteínas generadoras de péptidos opioides.

Objetivos específicos

1. Biogénesis de diterpenos de tipo neo-clerodano aislados de *Salvia microphylla*. Evaluar por métodos computacionales las posibles rutas mecanísticas para la transformación y biogénesis terminal de los diterpenos aislados de la *Salvia microphylla*.

2. Modulación de la función de receptores de opioides mediante productos naturales y moléculas pequeñas. Identificar las interacciones involucradas en el reconocimiento molecular de diterpenos aislados de *Salvia microphylla* y confrontarlos con el modo de unión de la morfina y derivados, por el receptor opioide Mu.

3. Modulación de la función de Pro-hormona Convertasas. Identificar las interacciones involucradas en el reconocimiento molecular de diversas moléculas por la furina, una pro-hormona convertasa.

3. METODOLOGÍA

Optimización de las geometrías

Los compuestos morfínicos fueron construidos en Chem3D, ChemOffice 2008 y las geometrías fueron optimizadas con HyperChem v.8.0.10 mediante un protocolo de mecánica molecular empleando el campo de fuerza AMBER y finalmente optimizando hasta un gradiente de energía menor o igual a 0.01 Kcal/mol, utilizando el algoritmo de Polak-Riviere de gradientes conjugados.

Los compuestos diterpénicos fueron optimizados ocupando supercómputo en teoría de funcionales de la densidad (TFD) usando el nivel de teoría mPW1B95 con la base polarizada y difusa 6-31+G(d,p). Esto a sabiendas que en trabajos anteriores ha proporcionado buenos resultados con estructuras diterpénicas¹.

Estudios de estructura electrónica

Los cálculos de estructura electrónica se llevaron a cabo utilizando el programa Gaussian 09 en el marco de la teoría de funcionales de la densidad con el nivel de teoría mPW1B95, éste nivel de teoría ha generado buenos resultados en el estudio de la biogénesis de productos naturales y moléculas pequeñas con la base polarizada y difusa 6-31+G(d,p). Las geometrías de los estados estacionarios y estados de transición fueron optimizadas sin restricciones. La búsqueda de los estados de transición se realizó ocupando la metodología QST3 con la cual se verificó que los estados estacionarios conectaran adecuadamente. Los resultados se visualizaron con el programa GaussView 5.0.

Preparación de los ligandos

La optimización de los diterpenos empleados se describe en el capítulo 1. Posteriormente, se asignaron cargas atómicas Gasteiger-Marsilli fusionando los hidrógenos no-polares a su carbono adyacente. Estas estructuras, en formato MDB se utilizaron en MOE 2010.

Preparación de las proteínas y acoplamiento molecular (docking)

Las coordenadas atómicas del receptor opioide Mu (PDB: 51CM, resolución 2.10Å) se obtuvieron de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB, por sus siglas en Ingles). Estas estructuras se prepararon en el programa MOE 2010 con el que se removieron las moléculas de agua cristalográficas, contra-iones y ligandos presentes en las estructuras. Posteriormente, a las estructuras se añadieron todos los hidrógenos y finalmente fueron relajadas utilizando 2000 pasos usando el campo de fuerza MMFF94. A las estructuras se les asignaron cargas Gasteiger-Marsilli y los hidrógenos no-polares se fusionaron a su carbono adyacente. Estas estructuras en formato MDB se utilizaron en MOE 2010. Siguiendo el mismo protocolo, las coordenadas atómicas de la furina (PDB: 4OMC, resolución 2.30Å) se obtuvieron de la base de datos PDB . La furina se encuentra co-cristalizada con el inhibidor competitivo *m*-guanidometil-fenilacetil-Arg-Val-Arg-4-aminidobencilamida⁴. Estas estructuras fueron preparadas en el programa MOE 2010 de manera análoga al receptor opioide Mu.

Características fisicoquímicas de los compuestos para predecir propiedades ADME

Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME): Se describió la disposición de los compuestos en estudio en el organismo. Estos cuatro criterios tienen una influencia directa sobre el nivel del fármaco y su farmacocinética al ser expuesto a los tejidos y por tal razón, influyen el rendimiento y actividad farmacológica del compuesto medicamentoso. Esta propiedad es importante al momento de diseñar fármacos y se rige por ciertos criterios y variables⁵.

Entre estas variables se encuentran los diferentes criterios para determinar el coeficiente de partición y de distribución octanol-agua ($\log P$ y $\log D$) respectivamente. Los cuales son **S+logP** donde el valor calculado está basado en cerca de 13,000 compuestos seleccionados y determinados de valores experimentales realizados por Hansch⁶, **MlogP** aquí el valor calculado se basa en los parámetros establecidos por los estudios realizados por Moriguchi⁷, y

finalmente **S+LogD** el cual es una estimación de la distribución octanol-agua y donde se consideran factores como son el pH y diferentes estados de protonación.

Protein-Ligand Interaction Fingerprints (PLIF's)

Este enfoque de interacción estructural tiene como objetivo captar una representación 1D binaria entre la presencia o ausencia de las interacciones entre el ligando y los aminoácidos de la proteína. Con esto se construye un gráfico donde se describe claramente si hay interacción con los sitios esperados en cuanto a la afinidad ligando-receptor.

4. ANTECEDENTES

Superficie de energía potencial

En química la superficie de energía potencial (SEP) es la energía de una molécula representada como una hipersuperficie que tiene como variables a las posiciones de los átomos en el espacio. El estudio de la SEP es muy importante en química computacional, ya que sobre esta superficie se encuentran las posiciones de los átomos de una molécula que minimizan la energía, lo cual corresponde a la geometría de equilibrio. A través de una búsqueda en la SEP se puede hallar la geometría de un estado de transición (ET) que se encuentra en un trayecto sobre la SEP que une a dos geometrías de equilibrio.

El concepto de SEP surge al utilizar la aproximación de Born-Oppenheimer. En esta aproximación se postula que debido a que los núcleos en los átomos son mucho más grandes que los electrones, los primeros permanecerán sin movimiento en la escala de tiempo que se mueven los segundos, por lo que al moverse el núcleo de un átomo la densidad electrónica alrededor de éste se redistribuirá instantáneamente. Lo anterior permite plantear para cada estado electrónico no degenerado un Hamiltoniano electrónico independiente del tiempo, con lo que la energía de una molécula dependerá exclusivamente de los grados de libertad que tengan los núcleos. Debido a que para cada estado electrónico existe una SEP la aproximación de Born-Oppenheimer será una buena aproximación siempre y cuando las distintas SEP no se acerquen demasiado o se crucen.

En general la totalidad de la SEP no se puede visualizar, ya que esta superficie está en un espacio de $N+1$ dimensiones, donde N son los grados de libertad de los núcleos de una molécula. Lo que normalmente se hace para visualizar la SEP es sólo graficar dos de los grados de libertad y la energía, con lo que la SEP asemeja a un paisaje montañoso. Los valles (mínimos) son las estructuras de equilibrio de una molécula. El trayecto de mínima energía entre dos valles es a lo que se conoce como coordenada de reacción. En este trayecto el punto de

máxima energía se le conoce como punto de silla y corresponde con la geometría del ET. Siguiendo una trayectoria de reacción la diferencia de energía entre un valle y otro, permite conocer la energía de reacción y la diferencia entre un valle y un punto de silla, se asocia con la energía de activación de la reacción. La forma del valle permite calcular el espectro vibracional. Uno de los métodos mecánico cuánticos más populares en estos días para estudiar problemas en química es la teoría de funcionales de la densidad (TFD), sólo en el 2008 se publicaron alrededor de 10,000 trabajos que utilizaron esta teoría. Esto refleja la conveniencia de utilizar la metodología TFD, siendo ésta la que tiene mejor relación precisión-costo computacional. A diferencia de la mayoría de los métodos en química cuántica la TFD plantea utilizar como descriptor absoluto de un sistema químico a la densidad electrónica en lugar de utilizar a la función de onda.

Teoría del Estado de Transición

Para comparar de forma rigurosa y cuantitativa los resultados de un experimento con la SEP se necesita conocer una gran cantidad de puntos de la SEP alrededor de la coordenada de reacción y calcular un número significativo de trayectorias con esta SEP que se promediarán para obtener una constante de rapidez de reacción (k) comparable con la medida experimentalmente. Esto resulta computacionalmente impráctico incluso para moléculas medianas. La teoría que se usa con más frecuencia para simplificar este problema es la teoría del estado de transición (TET). En 1930, el mexicano Henry Eyring planteó la TET. Con esta teoría sólo se necesita conocer la SEP en las regiones de los mínimos y el máximo en una coordenada de reacción. La teoría postula que todas las moléculas de reactivos que alcancen la energía del ET se convertirán en productos. Entonces, el ET estará en equilibrio con los reactivos pero reaccionará irreversiblemente hacia los productos (**Figura 1**).

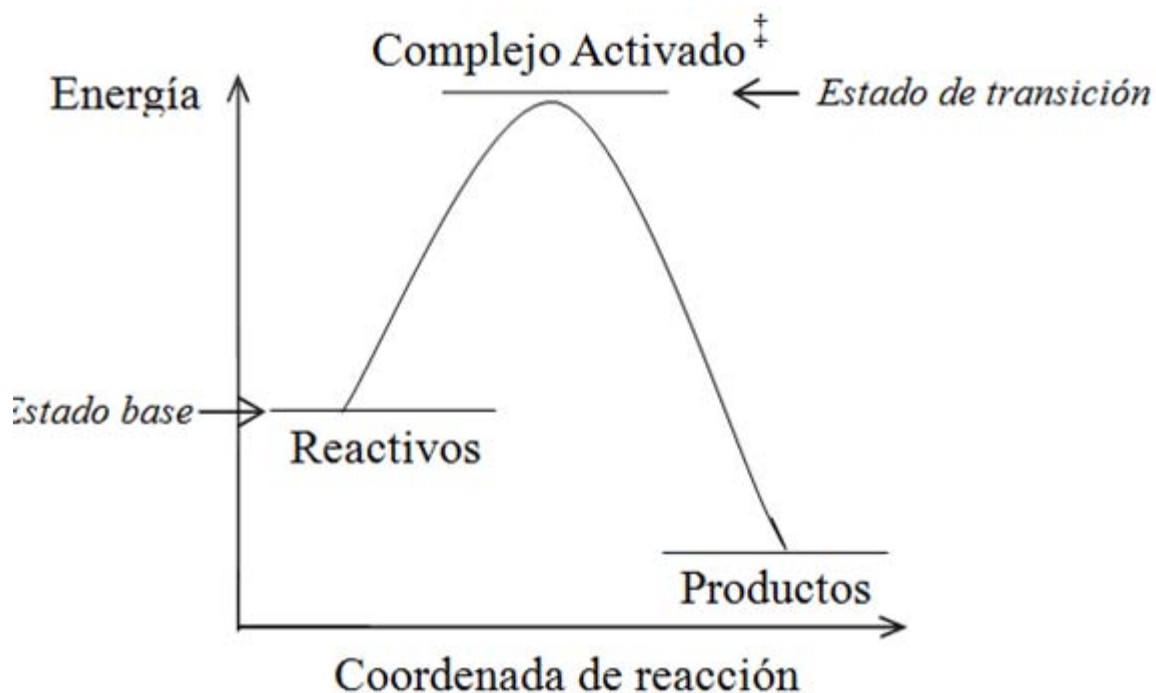


Figura 1. Postulado Fundamental de la teoría de Eyring

Con esto se aborda el estudio del mecanismo de reacción con bases físicas, por lo que a continuación se aborda la biogénesis terminal de algunos terpenoides de interés fundamental para entender el funcionamiento de la maquinaria enzimática celular.

Los productos naturales son estructuralmente muy diversos⁸. El conocimiento de las rutas biosintéticas que los generan se ve limitado a la inferencia de los mecanismos de reacción que los generan, con base a la relación estructural entre reactivos y productos⁹. Por lo tanto, la aplicación de los métodos computacionales es fundamental ya que permiten establecer la naturaleza de los estados estacionarios que corresponden a energías mínimas y estados de transición en la superficie de energía potencial. En años recientes la simulación de procesos químicos por medio de la computadora y los programas desarrollados para dicho fin son una herramienta muy útil¹⁰⁻¹⁶. La aplicación de la química computacional, se ha extendido exponencialmente gracias al desarrollo de computadoras cada

vez más rápidas en el procesamiento de datos y a la optimización de los algoritmos que resuelven a las ecuaciones que describen a los complicados sistemas químicos. Aunque las ecuaciones que describen a las moléculas están descritas desde principios del siglo pasado, estas sólo se han podido resolver aproximadamente, ya que las soluciones son muy complejas. Es hasta finales del siglo pasado que estas aproximaciones son lo suficientemente buenas para aplicarlas a sistemas químicos reales. En estos días la química computacional sigue creciendo con cada vez mejores aproximaciones. Esta forma de hacer química tiene la ventaja de que se puede acceder a etapas de una reacción que sería imposible en un experimento. Además permite planear mejor los experimentos, lo que desde el punto de vista económico abarata los costos de éstos. Con los avances actuales en química computacional es posible estudiar problemas tan complejos como es la biogénesis de productos naturales. Recientemente se inició una línea de investigación tendiente a establecer los mecanismos por los cuales los esqueletos fundamentales adquieren su diversidad¹⁷. Así, la combinación de los métodos experimentales para determinar mecanismos de reacción con los métodos computacionales actuales, permiten abordar este problema con eficiencia.

Reconocimiento molecular y diseño molecular

La asociación entre moléculas biológicamente relevantes, tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos juega un papel central en la transducción de señal. Por tanto, la orientación relativa del dúo interactuante puede afectar el tipo de señal producida (ejemplo, agonismo contra antagonismo). Por lo que el acoplamiento molecular gana importancia al predecir la fuerza y el tipo de señal producida. El acoplamiento molecular es usado para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña, que serán candidatos a fármacos, con la proteína que será donde ejercerán su acción, con lo que se podrá predecir la afinidad y la actividad de la molécula pequeña. Y es por eso que este método tiene un rol muy importante en el diseño racional de fármacos. Dada la importancia

biológica y farmacéutica, se han hecho grandes esfuerzos buscando mejorar el método usado para predecir el acoplamiento molecular

La respuesta a un fármaco dado viene determinada en gran medida por la capacidad de los distintos receptores celulares para reconocerlo como agonista o antagonista y evocar o no una respuesta. La formación de complejos en los que participan moléculas biológicas no es un fenómeno exclusivo de la Farmacología, sino que se contempla en otras ramas de la Biología, como la Bioquímica (e.g. complejos de Michaelis entre enzimas y sustratos) o la Inmunología (e.g. complejos antígeno- anticuerpo), y de la propia Química, donde las interacciones entre moléculas "huéspedes" (guests) y "hospedadoras" (hosts) han abierto nuevas perspectivas en la denominada Química Supramolecular. Lo que confiere a la Farmacología un carácter propio es el efecto que surge como consecuencia de esa unión, y su posible manipulación con fines terapéuticos. Con la progresiva identificación de los mediadores celulares implicados en estas respuestas, la creciente caracterización de los diferentes receptores celulares involucrados, y la mejor comprensión de los mecanismos transductores y amplificadores de la señal inicial, la Farmacología moderna persigue profundizar en el conocimiento de los pasos intermedios que separan la formación del complejo fármaco-receptor de la respuesta fisiológica o bioquímica observada.

El receptor debe ser contemplado, pues, como un sitio discriminador capaz de distinguir entre posibles ligandos y moléculas que no poseen afinidad de unión. Pero además, hay que considerarlo como el primer responsable de la serie de acontecimientos que pueden traducir esa interacción en una respuesta celular. Desde el punto de vista de los ligandos, esto quiere decir que su fijación al receptor no va a conducir invariablemente a la producción de una respuesta máxima, sino que existirá, en función de su eficacia, una gradación de respuestas, que servirá para su clasificación como agonistas, agonistas parciales o antagonistas.

La síntesis de nuevos compuestos con capacidad para interactuar con receptores específicos es el objetivo prioritario de la llamada Química

Farmacéutica o Química Médica. Hasta hace relativamente poco tiempo, estas síntesis se realizaban al azar o, en el mejor de los casos, estaban guiadas por el estudio más o menos cuantitativo del efecto que diversas modificaciones introducidas en la estructura de distintos fármacos o ligandos endógenos conocidos ejercían sobre una determinada acción farmacológica. En gran medida, esto era la consecuencia lógica del desconocimiento existente sobre la estructura de los receptores. En los últimos años el panorama ha cambiado sustancialmente gracias a los avances en muchas y variadas disciplinas, que han hecho posible la identificación de numerosas macromoléculas diana y el conocimiento de su secuencia de nucleótidos o aminoácidos, e incluso, en algunos casos, la elucidación a nivel atómico de su estructura y la de sus complejos con inhibidores. Todo un arsenal de nuevas metodologías, con un importante componente matemático y computacional, hacen uso de esta información para crear modelos tridimensionales de receptores y ligandos, estudiar sus preferencias conformacionales, dilucidar la naturaleza y magnitud de las fuerzas interatómicas que gobiernan su interacción, y analizar el comportamiento dinámico de cada molécula por separado y de sus respectivos complejos. Estos procedimientos ayudan a comprender mejor el comportamiento de estos sistemas a nivel submolecular, permiten establecer comparaciones entre teoría y datos experimentales, e incluso permiten realizar predicciones cuantitativas, por lo que constituyen herramientas muy poderosas para diseñar nuevas moléculas con afinidad por un determinado receptor.

Muchos de los fármacos hoy disponibles en la industria farmacéutica fueron caracterizados en su día mediante técnicas de “*screening*” convencionales, consistentes en evaluar en una batería lo más amplia posible de ensayos biológicos el mayor número posible de sustancias, tanto de origen natural como sintético, elegidas más o menos al azar. Con este procedimiento se consiguen identificar nuevas moléculas prototipo pertenecientes a una clase estructural determinada y con potencial en una área terapéutica concreta. Modificaciones químicas subsiguientes tienden a producir “análogos” de esas estructuras con una

mayor actividad o una menor incidencia de efectos colaterales. Este método de descubrimiento de nuevos agentes con actividad biológica es interesante desde el punto de vista de que puede convertir a nuevas clases estructurales de compuestos en fármacos potenciales pero, al estar basado fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, consume mucho tiempo y requiere grandes recursos económicos. El porcentaje de éxitos se ha estimado inferior a 1 por cada 10.000 compuestos sintetizados¹⁸.

Los primeros intentos dirigidos a incrementar la probabilidad de sintetizar un análogo activo se basaron en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica. De ahí surgió el estudio de las relaciones estructura-actividad o SAR, acrónimo de *Structure-Activity Relationships*. Estos estudios pueden realizarse de manera cuantitativa, lo que nos lleva los modelos QSAR, del acrónimo *Quantitative Structure-Activity Relationships*. En los últimos 10 años tanto los métodos de SAR como QSAR y son usados por todas las compañías farmacéuticas y centros de investigación importantes hacen uso de alguna de estas tecnologías para optimizar la rentabilidad de sus síntesis y mejorar sus expectativas de dar con una nueva sustancia que pueda ser explotada comercialmente.

Una vez identificados y aislados los receptores opioides, la investigación se puede complementar mediante procedimientos bioquímicos y fisicoquímicos con la finalidad de determinar las relaciones estructura-actividad y la conformación del receptor. Una forma indirecta de obtener información acerca de los receptores es mediante el estudio de las relaciones estructura-actividad (SAR por sus siglas en Inglés). Para ello se selecciona un fármaco prototipo, se modifica después sistemáticamente su estructura molecular. Se quitan o se agregan sustituyentes en varias posiciones y en diferentes configuraciones estéricas. Una serie de estos fármacos químicamente relacionados se conocen como serie de congéneres. Probando los miembros de una serie congénica y al observar cómo afecta su potencia biológica por las modificaciones en su estructura molecular, se pueden

inferir conclusiones acerca del modo de la interacción del fármaco con la superficie receptora, así como de la conformación del receptor. Estudios de SAR con una serie de compuestos analgésicos opioides dan por resultado una gran cantidad de material para deducir las propiedades del receptor que interviene en su capacidad de aliviar el dolor.

En los *métodos de modelado* se consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y son importantes, entre otros, el análisis conformacional, la mecánica cuántica, los campos de fuerzas, la termodinámica estadística, y los gráficos moleculares interactivos. Estos últimos permiten la representación y manipulación de las moléculas en tres dimensiones, lo que proporciona una información espacial que es esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares¹⁹. El término *modelado molecular* no es exclusivo de los estudios encaminados al diseño de nuevos fármacos, sino que es aplicable en otras áreas de investigación, como la ingeniería de proteínas o la química de polímeros. CAMD (*Computer-Aided Molecular Design*) engloban a un número considerable de procedimientos, basados en el uso de ordenadores, encaminados a relacionar actividad con estructura molecular. Como su propio nombre indica, su fin último es utilizar estas relaciones para predecir compuestos con un determinado perfil de actividades²⁰.

Determinación de la estructura tridimensional de biomacromoléculas

La primera descripción detallada de la forma molecular de una proteína data de 1958, cuando se aplicaron técnicas de cristalografía de rayos X a la mioglobina de ballena²¹. Hoy en día, la calidad de las estructuras determinadas en disolución con las técnicas de RMN es comparable a la conseguida con técnicas de difracción de rayos X utilizando cristales, con la ventaja añadida de que muestran transiciones estructurales que pueden ser de crucial importancia para las propiedades funcionales²². En Abril de 1993, el Banco de Datos de Proteínas (PDB) de Brookhaven (Upton, NY 11973, USA), principal depositario de coordenadas

atómicas de macromoléculas biológicas procedentes de cristalografía de rayos X y de resonancia magnética nuclear²³, contaba ya con 982 proteínas, y disponía de aproximadamente un centenar de estructuras de ácidos nucleicos y una decena de carbohidratos. La co-cristalización de enzimas con inhibidores competitivos del sustrato proporciona mucha información estructural sobre el proceso de acoplamiento, que en muchas ocasiones conlleva cambios conformacionales significativos. Más aún, los complejos de enzimas con análogos del estado de transición del sustrato han servido como base para revelar las interacciones responsables de la catálisis, algunos de cuyos componentes dinámicos se pueden deducir comparando la estructura de la enzima acomplejada con la de la proteína libre²⁴.

Receptores opioides

El empleo de analgésicos opioides constituye la piedra angular de diversas técnicas en anestesia y control del dolor postoperatorio, así como en el tratamiento del dolor crónico y en las enfermedades terminales en clínicas del dolor. Se sabe del empleo de extractos del opio desde hace unos 5,000 años, habiéndose utilizado sus propiedades analgésicas, antidiarreicas y su acción antitusígena. En 1806, el químico alemán Friederich Sertürner aisló por primera vez el principio activo del opio dándole el nombre de morfina, en referencia a Morfeo, dios de los sueños en la literatura griega. El opio contiene más de 20 alcaloides distintos. Después del descubrimiento de la morfina sobrevino pronto el aislamiento de otros alcaloides del opio. En 1975, se identifican por primera vez las sustancias endógenas en diversas estructuras del sistema nervioso central de varias especies animales y en el hombre, designándosele con el nombre genérico de opioides endógenos con el nombre de encefalinas. Se han identificado tres familias distintas de péptidos opioides endógenos: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Cada familia deriva de un polipéptido precursor diferente y tiene una distribución anatómica característica. Estos precursores se designan con los nombres de proencefalina (también llamada proencefalina A), pro-opiomelanocortina (POMC) y

prodinorfina (también llamada proencefalina B). La POMC se fracciona en el organismo mediante procesos enzimáticos y da origen a la hormona estimulante de los melanocitos (HEM), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y beta-lipotropina (β -LPH); dentro de la secuencia de los 91 aminoácidos que contiene la β -LPH se encuentra la beta-endorfina y la HEM. En 1973, tres grupos de investigación trabajando en forma separada con analgésicos opioides agonistas y antagonistas radiomarcados identifican la familia de los receptores opioides en el sistema nervioso central y periférico de animales y en el hombre. Los receptores opioides resultan ser los sitios específicos con los cuales interactúan los agonistas opioides endógenos y exógenos y sus antagonistas para exhibir sus acciones y efectos clínicos. Existen datos convincentes que demuestran que el SNC tiene cuando menos tres clases principales de receptores de opioides, designados mu, kappa y delta, también se cuenta con fuerte evidencia que indica la presencia de varios subtipos de receptores de cada clase. Los estudios de fijación en receptores demuestran perfiles de afinidad diferentes para cada clase, en tanto que los estudios funcionales han establecido sus perfiles farmacológicos. Además, los estudios autorradiográficos han demostrado distribuciones únicas para cada clase de receptor dentro del encéfalo y la médula espinal. En el pasado, la designación de un receptor opioide único se basó en estudios con la naloxona, que es un antagonista de todos los subtipos de receptores de opioides.

Receptor opioide Mu

La mayor parte de los opioides utilizados en clínica son relativamente selectivos por los receptores mu, lo que refleja su similitud con la molécula de morfina. Sin embargo, es importante señalar que los fármacos que son relativamente selectivos en dosis estándar interactúan con subtipos adicionales de receptores cuando se administran en dosis suficientemente altas, lo que sugiere posibles cambios en su perfil farmacológico. Algunos fármacos, en particular los agonistas y los antagonistas mixtos interactúan con más de una clase de receptor en las dosis clínicas habituales. Son de interés particular las acciones de estos fármacos,

puesto que pueden actuar como agonistas en un receptor y antagonistas en otro. Los receptores μ se definieron al principio por su afinidad con la morfina. No se han establecido otros ligandos endógenos para este receptor, pero varios de los péptidos opioides interactúan con los receptores μ . La beta-endorfina tiene gran afinidad con los receptores μ , que también poseen gran afinidad por las encefalinas. Del mismo modo, la dinorfina A se fija con gran avidez a los receptores μ , pero no tanto como a los receptores kappa. La morfina y otros agonistas de los opioides del tipo de la morfina producen analgesia primordialmente por interacción con los receptores μ de los opioides. Otras consecuencias de la activación de los receptores μ , incluyen depresión respiratoria, miosis, reducción de la motilidad gastrointestinal y sensación de bienestar y placer (euforia). Dado que el receptor en estudio es una proteína transmembranal, los residuos de aminoácidos que conforman las alfas-hélices de su estructura pueden disponerse de dos formas 1) interaccionando con otras hélices en la parte interna de la proteína o 2) pueden estar expuestos hacia los lípidos membranales; por ello se llevó a cabo un análisis de la distribución de los residuos en la región transmembranal del receptor μ , como se observa en la **Figura 2**. En esta figura se muestra la distribución superficial de residuos de acuerdo a su hidrofobicidad, en color rojo se presentan los aminoácidos hidrofóbicos y en gris los hidrofílicos. El modelo del receptor μ exhibe un total de siete hélices transmembranales (7 THM) y una hélice yuxtamembranal (H8). La región N-terminal se ubica en la región extracelular y el dominio C-terminal en la región citoplasmática, se presentan tres *loops* (asas) extracelulares y tres intracelulares (**Figura 3**).

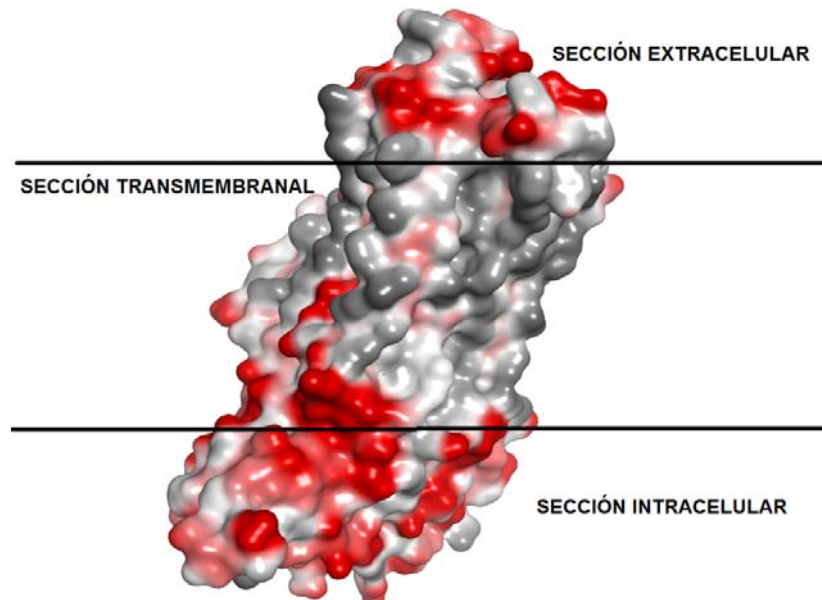


Figura 2. Mapa de hidrofobicidad

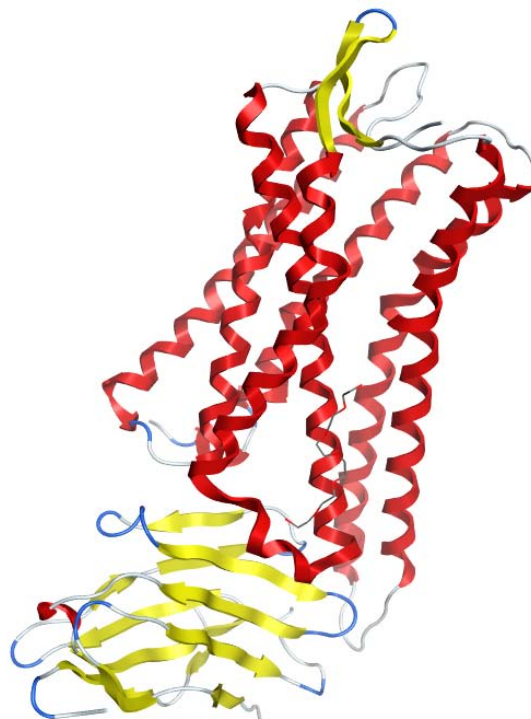


Figura 3. Modelo tridimensional del receptor de opioides. En rojo se presentan las THM

Farmacóforo de la morfina

Se sabe que los analgésicos opioides actúan en las vías de dolor del sistema nervioso central y que todos los congéneres estudiados penetran fácilmente la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro y a la médula espinal (debido a su alta liposolubilidad). Sin embargo, en el pasado no se sabía la forma en que se llevaba a cabo el efecto analgésico ni cuáles eran los efectos bioquímicos involucrados en lo particular.

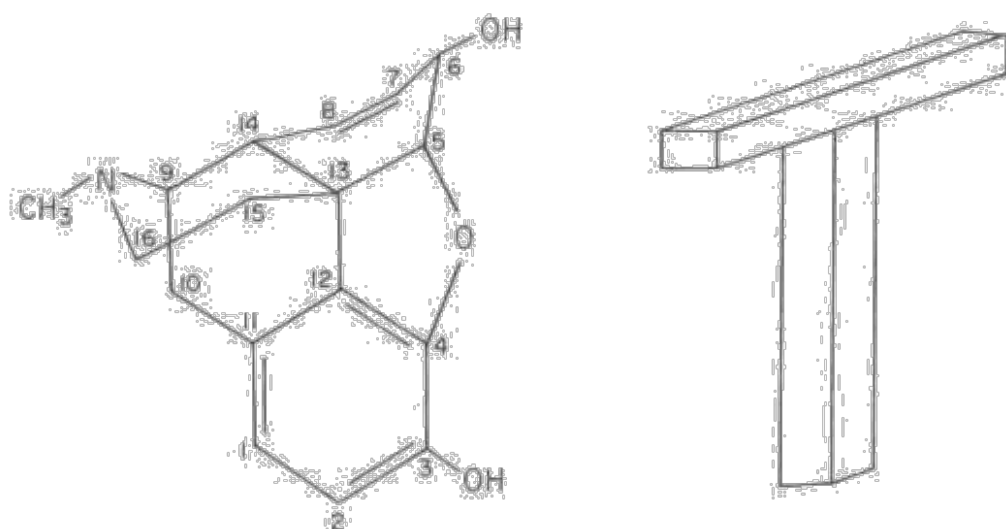


Figura 4. Representación de la Morfina en 2D

La **figura 4** muestra la molécula de la morfina en su representación plana habitual. Este agente fue considerado por mucho tiempo como un derivado fenantrénico sustituido, lo que efectivamente es; pero después se descubrió que el anillo piperidina era fundamental, aunque el núcleo fenantrénico se podía modificar y aun eliminar sin perder su acción analgésica. El átomo de nitrógeno de este anillo es alrededor de 80% catiónico al pH fisiológico ($pK = 7.9$), por lo que se supone que un elemento importante en la interacción fármaco-receptor puede ser la unión iónica con un sitio aniónico en la superficie receptora. Los analgésicos opioides (del tipo de la morfina) se pueden considerar como compuestos N-

metilpiperidínicos con anillos sustituyentes. Sólo se puede tener una comprensión real de la geometría de la molécula con un modelo molecular a escala. El átomo de nitrógeno se encuentra en una superficie hidrofóbica plana que contiene nueve átomos de carbono, los del anillo de piperidina (C9, C14, C13, C15 y C16) y los del anillo parcialmente saturado (C13, C5, C6, C7, C8 y C14). Los otros dos anillos sobresalen en el plano perpendicular, con el grupo hidroxifenólico del C3 a una distancia máxima del nitrógeno. El átomo de oxígeno en C3 parece ser esencial para la actividad analgésica, lo que sugiere que un puente de hidrógeno o un grupo amino en el receptor pueda estabilizar el complejo fármaco-receptor. El OH (hidroxilo) alcohólico en posición C6, la insaturación de C7-C8 y el puente de oxígeno no son necesarios para la acción analgésica; un congénere sintético, el levorfanol, no contiene estos grupos, sin embargo, es más potente que la morfina. Es evidente por el modelo molecular que los dos grupos esenciales (nitrógeno y OH fenólico) no pueden interactuar conjuntamente en un sitio receptor plano. Por tanto, cabe suponer que el receptor opioide debe tener la forma de una cavidad irregular, en la que puede encajar la molécula de la morfina y hacer los contactos necesarios en las diferentes paredes de la cavidad receptora. Gran parte de las regiones hidrofóbicas que comprenden la porción horizontal y vertical de la T, idealmente entrarían en contacto íntimo con las regiones hidrofóbicas de la superficie receptora, proporcionando uniones por medio de las fuerzas de Van der Waals.

Producción endógena de neuropéptidos

La proproteína convertasa (PC) furina es una endoproteasa dependiente de calcio que se encuentra ampliamente distribuida en las células y tejidos de mamíferos. La proteína furina, codificada por el gen PCSK3, consiste en cuatro dominios diferentes: un prodominio, en el que participan en el plegamiento y la activación; un dominio catalítico, que incluye los aminoácidos distribuidos en una tríada Asp-His-Ser típico de todos los miembros de la familia de las convertasas; el dominio homo B (también llamado el dominio P), que es esencial para la actividad enzimática y se sabe que contribuyen a las propiedades enzimáticas (de unión a

calcio, la dependencia del pH, y la especificidad de sustrato); y el dominio C-terminal. La furina contiene un dominio transmembrana C-terminal; dentro de este último dominio, la enzima es capaz de unirse a las proteínas y de dividir a sus sustratos dentro de los tres compartimentos subcelulares distintos. Debido a esta compleja función, la furina es capaz de sintetizar una amplia gama de proteínas precursoras. Algunos de los sustratos más notables de furina incluyen factores de crecimiento y receptores.

La sobreexpresión de la furina humana se relaciona con el aumento de potencial carcinogénico. La alta actividad de furina se asocia con un mayor procesamiento proteolítico del precursor con el tipo de membrana metaloproteinasa 1, además, la furina participa en la activación de muchas toxinas bacterianas, tales como ántrax, difteria, Shiga y toxinas de *Pseudomonas aeruginosa*, así como en la ruptura de glicoproteínas presentes en virus necesarias para la replicación viral incluyendo la gripe aviar H5N1, el VIH y el virus Ébola.

Debido a su participación en tantos procesos relacionados con la enfermedad, la furina se ha convertido en un objetivo potencialmente importante en el diseño de fármacos inhibidores.

Un número de inhibidores sintéticos de la furina se han sintetizado recientemente, la administración terapéutica de los inhibidores de furina han sido frecuentemente propuestos para el tratamiento de infecciones virales y patógenos.

Curiosamente, una serie de moléculas pequeñas no peptídicas basadas en un esqueleto de 2,5-didesoxistreptamina fue estudiado como potencial inhibidor de esta proteína. En este trabajo se realizó un estudio de la relación estructura-actividad de estos derivados de 2,5-didesoxistreptamina así como su estudio de acoplamiento (docking) utilizando técnicas de simulación computacional.

La furina es sintetizada a través de precursores conocidos como prohormona convertasas 1/3 y 2^{25,26}. Estas proteínas son precursores importantes de múltiples hormonas peptídicas y precursores de neuropéptidos. Estas proproteínas son dependientes de calcio con un pH ligeramente ácido. Las convertasas juegan un

rol muy importante en procesos bioquímicos como son formación de embriones, niveles de azúcar e insulina y mecanismos de control hormonal. Patologías importantes como son la diabetes, el Alzheimer y metástasis tumoral han sido relacionadas con el mal funcionamiento de estas proteínas²⁷⁻²⁹.

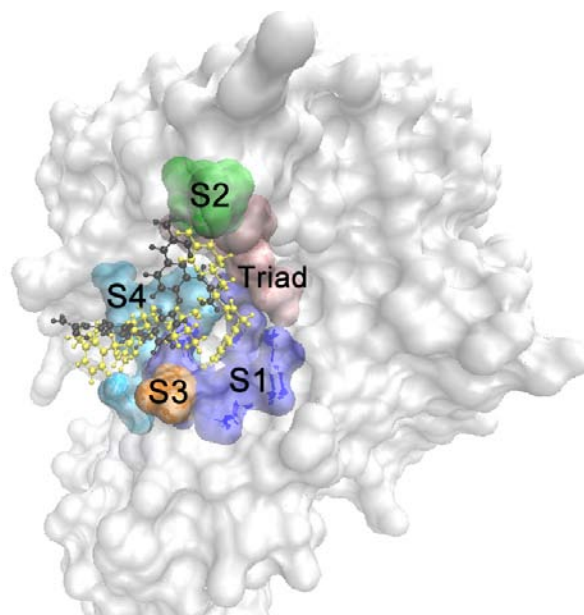


Figura 5. Estructura cristalográfica de la furina. Los subsitios son mostrados en colores. En amarillo se muestra el ligando co-cristalizado y en negro el ligando 2f.

La proproteína furina fue recientemente cristalizada y resuelta a una resolución de 2.3 Å³⁰. La estructura de la furina es mostrada en la **Figura 5**. Los aminoácidos clave en el sitio de anclaje de la furina son Ser368, His194 y Asp153 los cuales forman la denominada “triada”. Cerca de la triada se encuentra definido el sitio catalítico los cuales son denominados como subsitios S1, S2, etc. Los cuales son contrapartes de los segmentos del inhibidor co-cristalizado P1, P2, etc. Esta nomenclatura es propuesta por Schechter and Berger³¹. Los subsitios de la furina que son claves para la inhibición se forman por los siguientes aminoácidos.

Subsitio S1: Ser253, Gly255, Ser293, Asp258, Asp306, Ala292 y Pro256, este subsitio con pH ligeramente ácido es preferido por cadenas laterales básicas o cargadas electronegativamente. Se reporta que derivados que tienen cadenas laterales que interactúan con este subsitio aumentan la afinidad y actividad sobre

la inhibición de furina³².

Subsitio S2: Asp154, Asn192 y Asp191.

Subsitio S3: Glu257

Subsitio S4: Glu236, Asp264, Trp254 y Tyr308

Basados en la estructura cristalizada de la furina, se han determinado similitudes y diferencias entre los sitios de anclaje de otras prohormonas³⁰. Diversas estrategias para inhibir a las prohormona convertasas se han estudiado en los últimos años³³ partiendo de productos naturales en donde se han realizado modificaciones estructurales^{29,34}. Derivados peptídicos han resultado grandes inhibidores de prohormona convertasas^{33,35-37}. La selección y el entendimiento de metodologías computacionales son aspectos claves para proponer, la creación, en análisis y la exploración de compuestos químicos con propiedades terapéuticas relevantes. Estos aspectos se describen en la literatura, un ejemplo de esto son los estudios SAR³⁸. Una de las técnicas mas usadas comúnmente es el acoplamiento molecular o “docking”^{39,40}, esto para generar una correlación entre las energías de acoplamiento y la actividad biológica exhibida por los compuestos químicos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

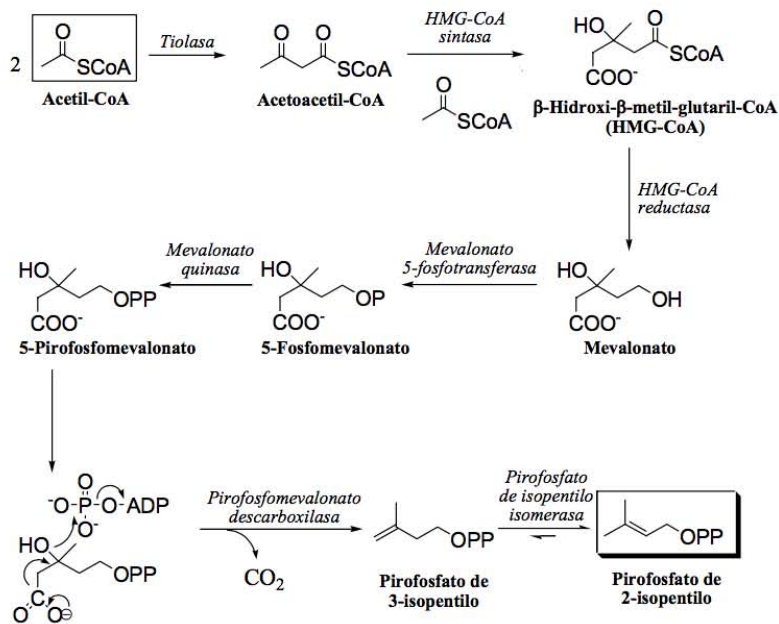
Biogénesis de diterpenos de tipo neo-clerodano aislados de *Salvia microphylla*.

En investigaciones recientes se abordó el origen biogenético del compuesto 6-epidesacetilaurenobiolido¹ utilizando métodos espectroscópicos como resonancia magnética nuclear dinámica y métodos computacionales, para así conocer los cambios conformacionales que sufren las moléculas y poder establecer las interacciones y conformaciones entre posibles intermediarios para de esta forma, poder fijar pautas y determinar el origen biogenético de dicho compuesto. También recientemente se abordó la biogénesis de la epiconfertina⁸, en donde los diferentes métodos computacionales dieron soporte a las transformaciones biogénicas propuestas.

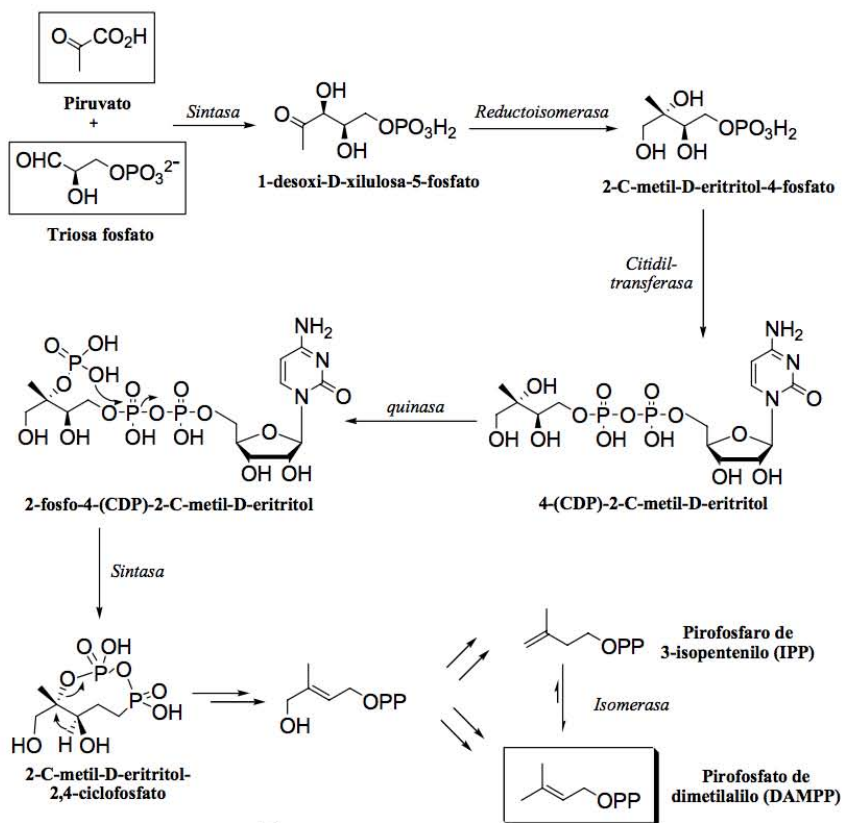
Los terpenoides son productos naturales que están formados por unidades de cinco átomos de carbono llamadas isopreno. En la mayoría de los terpenoides las unidades de isopreno están unidos por enlaces cabeza-cola además de algunos enlaces complementarios. La clasificación de los terpenoides es a través del número de unidades de isopreno que tiene; así, los que tienen una sola unidad de isopreno se les conoce como hemiterpenos, los de dos como monoterpenos, los de tres como sesquiterpenos, los de cuatro como diterpenos, los de cinco como sesterpenos, los de seis como triterpenos, los de ocho como carotenos y los de más de ocho como n-poliisoprenoides.

Las unidades de isopreno pueden ser generadas por dos rutas metabólicas, por la ruta del ácido mevalónico y por la ruta del 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulosa. Los animales usan exclusivamente la ruta del ácido mevalónico, pero en plantas y otros organismos inferiores se utilizan ambas rutas.

La ruta del ácido mevalónico comienza con una molécula de acetil coenzima-A (CoA) que se une a otra molécula de acetil CoA, a través de una condensación tipo Claisen para formar acetoacetil CoA. Una tercera molécula de acetil CoA se une de manera estereoespecífica para producir el β -hidroxi- β -metilglutaril CoA (HMG-CoA). Posteriormente, el HMG-CoA se reduce a través de dos moléculas de NADPH a ácido mevalónico (**Esquema 1**).



A Ruta mevalónica



B Ruta no mevalónica

ESQUEMA 1. Rutas de biosíntesis para la formación de los terpenos. A: Ruta mevalónica. B: Ruta no mevalónica (DOXP)

Hipótesis Biogénicas

Las hipótesis biogénicas de los productos naturales están basadas en proponer mecanismos de reacción razonables que permitan explicar la formación de un compuesto a partir de otro que usualmente se encuentra en la misma fuente natural. Para sustentar una hipótesis biogénica, los investigadores llevan a cabo una secuencia de reacciones en el laboratorio con la premisa de que estas reacciones siguen, en general, los mismos principios que las reacciones que ocurren en los seres vivos. El inconveniente de este esquema es que, en la realidad, al interior de las células casi todas las reacciones están catalizadas por enzimas. Sin embargo, por lo general, la eficiencia lograda por la catálisis enzimática es muy superior a la lograda por síntesis en el laboratorio. A pesar de esto la modelación biomimética es una buena aproximación para sustentar hipótesis biogénicas, ya que en muchos casos es posible obtener los compuestos clave de la ruta biogénica. Las enzimas parecen ser fundamentales para la selección del conformero inicial y para explicar los elevados rendimientos químicos con que proceden estas transformaciones.

La Salvinorina A, aislada por primera vez en 1982² por el Dr. Ortega en el Instituto de Química, es el primer agente psicotrópico no alcaloide agonista al receptor opioide kappa. Un gran número de derivados de Salvinorina A han sido sintetizados con el fin de modificar sus propiedades farmacológicas y disminuir efectos secundarios indeseables⁴¹. La *Salvia divinorum* ha sido ampliamente utilizada por sus propiedades alucinógenas⁴². Las Salvias son el género más amplio de la familia de las Lamiáceas y ha sido usada en la medicina tradicional mexicana como tratamiento para disentería, diarrea, insomnio y por sus propiedades abortivas, expectorantes y antipiréticas⁴³. Los metabolitos que se reportan aislados de este género de plantas incluyen triterpenos⁴⁴, flavonoides⁴⁵, sesterterpenos⁴⁶ y diterpenos.

Los diterpenos de las Salvias son en su mayoría abietanos y neo-clerodanos los cuales se generan en una amplia variedad de estructuras modificadas. Algunos de estos diterpenos han mostrado propiedades citotóxicas⁴⁷, antiprotozoarias⁴⁸, y

fitotóxicas⁴⁹. Recientemente se caracterizaron diterpenos de *Salvia microphylla* con actividad citotóxica⁵⁰.

En la industria farmacéutica, los productos naturales pueden utilizarse como precursores para preparar moléculas más complejas o para establecer los mecanismos relacionados con su actividad farmacológica y así poder diseñar nuevos compuestos más potentes de interés farmacéutico⁵¹⁻⁶⁰. La exploración de los productos naturales tiene aún mucho futuro, ya que apenas se ha analizado un pequeño porcentaje de las especies tanto animales como vegetales, y es pertinente mencionar que aún no se conocen todas las especies que habitan la tierra. El conocimiento de su biosíntesis es aún más limitado en comparación a la caracterización de productos naturales, por lo que en este campo hay mucho más que investigar⁹.

En este apartado se evaluó la biogénesis computacional de cinco compuestos recientemente aislados de *Salvia microphylla* (**Figura 6**). Basados en nuestra experiencia en rutas biogenéticas y en la estructura de los compuestos aislados de la *S. microphylla* los metabolitos hipotéticos y la biogénesis propuesta se muestra en el **Esquema 2**.

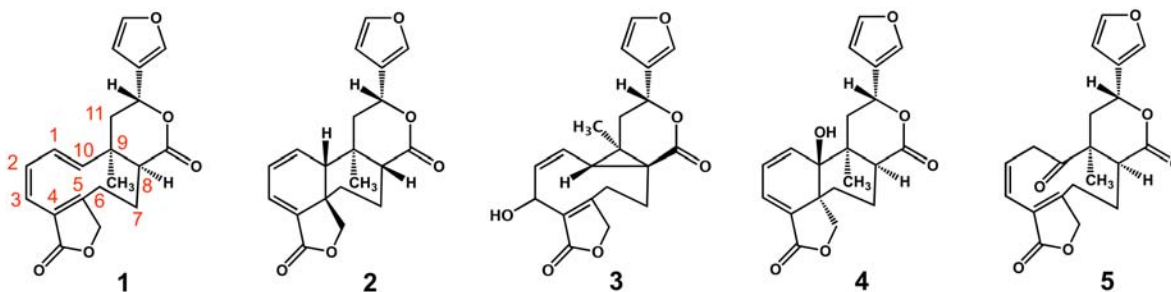
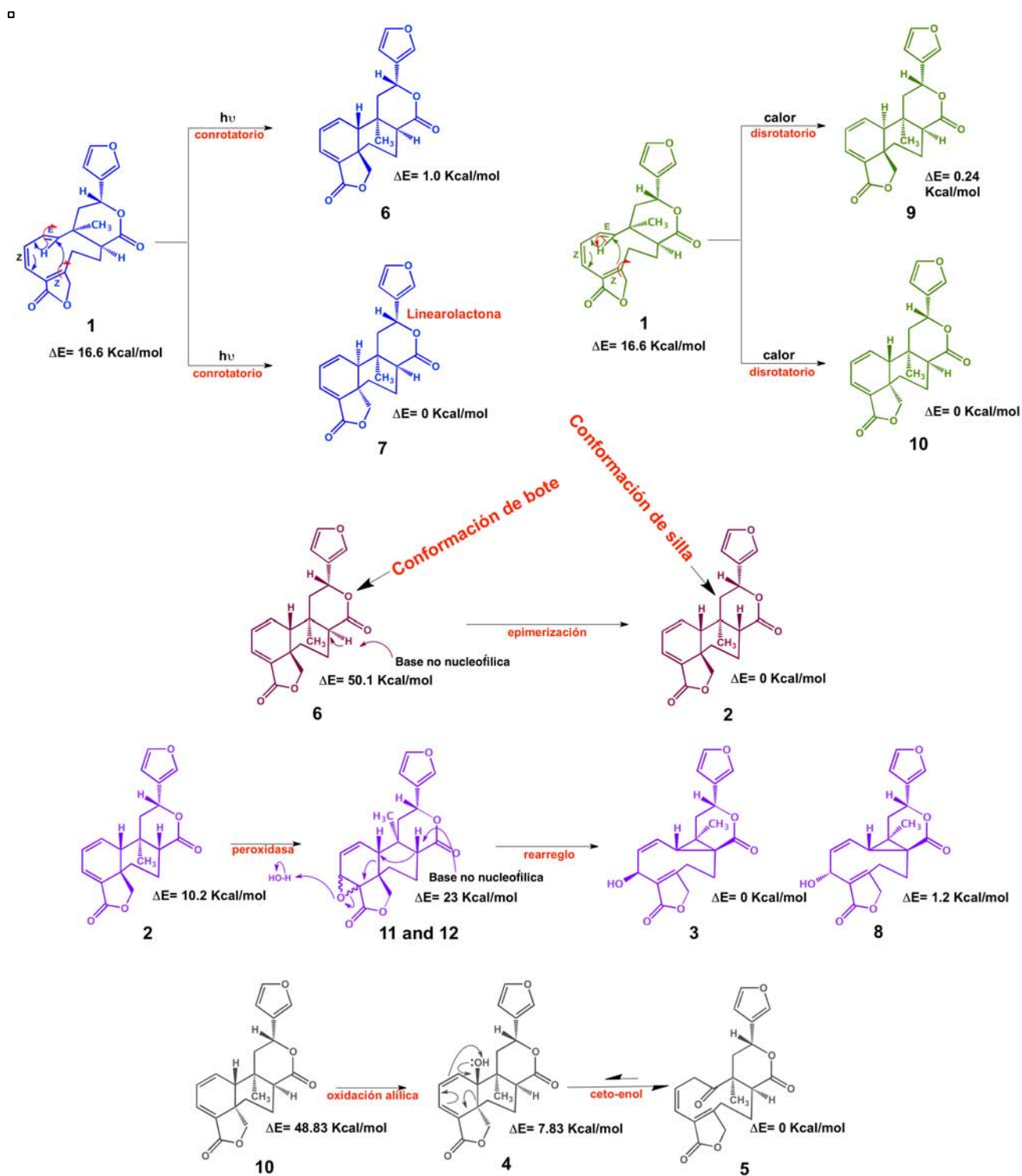


Figura 6. Diterpenos recientemente aislados

Como un primer paso se optimizaron las geometrías de los cinco diterpenos de tipo neo-clerodano mostrados en la **figura 6** usando el funcional de tercera generación mPW1B95 con la base polarizada y difusa 6-31+G(d,p) y se calcularon las frecuencias correspondientes en donde no se obtuvieron frecuencias imaginarias lo que define a los compuestos **1-5** como mínimos energéticos en la

superficie de energía potencial. Con estos resultados se observó que el compuesto de mayor energía es el compuesto **1**. De esta forma se generó una hipótesis biogenética que parte del compuesto **1** para generar el compuesto **5** con los compuestos **2**, **3** y **4** como intermediarios de la misma.

Observando las estructuras de **1** y **2**, se sometió el compuesto **1** a una reacción de tipo electrocíclico en donde se sabe que la reacción electrocíclica catalizada por luz y la catalizada por calor compiten entre sí, de esta forma podemos dar lugar a la creación de los compuestos **6** y **7** de forma fotoquímica y los compuestos **9** y **10** de manera térmica (**Esquema 2**). En los cuales **6** y **10** se definen como intermediarios hipotéticos que ayudan a la formación de los demás compuestos. Para esta reacción se simuló el estado de transición más adecuado para que conectara al compuesto **1** con el compuesto **6** y al compuesto **1** con el compuesto **10**. Es de importancia mencionar que el compuesto **7** y el compuesto **9** se presentan en otras variedades de Salvias con los nombres de Linearolactona y Linearilfolina respectivamente pero estructuralmente no dan lugar a la formación de ningún intermediario importante en la hipótesis biogenética que se estudia en este trabajo.



ESQUEMA 2. Biogénesis propuesta para los diterpenos aislados

TABLA 1. Energías relativas a 1 al nivel de teoría mPW1B95

ENERGÍAS RELATIVAS A 1	
mPW1B95	
COMPUESTO	ENERGÍA (Kcal/mol)
1	0
TS ₁₋₆	25
6	-15.35
TS _{6-Enolate}	4
Enolate	-8.09
TS _{epimerization}	-5.15
2	-35.76
TS _{epox}	-10.20
11	-23.75
TS ₁₁₋₃	4.32
3	-45.87
TS ₁₋₁₀	13.43
10	-18.56
1stTS _{allylicOxidation}	6.47
Selenoxide Complex1	-3.19
2ndTS _{allylicOxidation}	-4.22
Selenoxide Complex2	-7.13
TS _{alcoholFormation}	3.21
4	-13.23
TS ₄₋₅	-2.12
5	-27.43

Al nivel mPW1B95/6-31+G(d,p) se observa que la distancia entre los carbonos C5 y C10 del compuesto **1** es de 3.25 Å. Como se mencionó anteriormente el compuesto **1** se propone como precursor en la hipótesis biogenética; por esto

todas las energías que se reporten a continuación (**tabla 1**) serán relativas a **1**. Se procedió a buscar el estado de transición que conectara a **1** con **6**. Para la localización de los estados de transición se utilizó el método QST3 en donde la posible estructura del estado de transición se encontró por medio de un barrido de las coordenadas entre los carbonos que están implicados en el cambio estructural, posteriormente la posible estructura del estado de transición se optimizó para encontrar la frecuencia vibracional que diera lugar al estado de transición adecuado. Con esta metodología se halló el estado de transición que conecta a **1** con **6** (TS_{1-6}) en donde la distancia entre los carbonos C5 y C10 es de 2.40 Å con una energía relativa a **1** de 15 Kcal/mol, para posteriormente converger en **6** que tiene una distancia entre los carbonos C5 y C10 de 1.55 Å y una energía de -15 Kcal/mol. De igual forma se procedió con el compuesto **1** para generar el compuesto **10**, encontrándose el estado de transición que conecta ambos mínimos energéticos (TS_{1-10}) en donde se observa una distancia entre los carbonos C5 y C10 de 2.10 Å y una energía de 13 Kcal/mol, esta disminución energética puede deberse a la distancia que presenta entre los carbonos con respecto a TS_{1-6} .

La estructura de TS_{1-10} converge en **10** con una distancia entre C5 y C10 de 1.54 Å y una energía de -18 Kcal/mol.

Para obtener el compuesto **2** primero se debió realizar la epimerización del protón en C8 del compuesto **6** el cual se encuentra en posición alfa, es de importancia comentar que la energía relativa a **1** entre **2** y **6** es de -35 Kcal/mol y -15 Kcal/mol respectivamente; esto es atribuido a que la lactona que está implicada tiene una conformación de silla en **2** y una conformación de bote en **6** lo cual lo hace energéticamente menos estable en donde la contribución energética de los átomos restantes de la molécula desfavorece la energía de **6**. La **figura 7** muestra ambas estructuras de forma tridimensional.

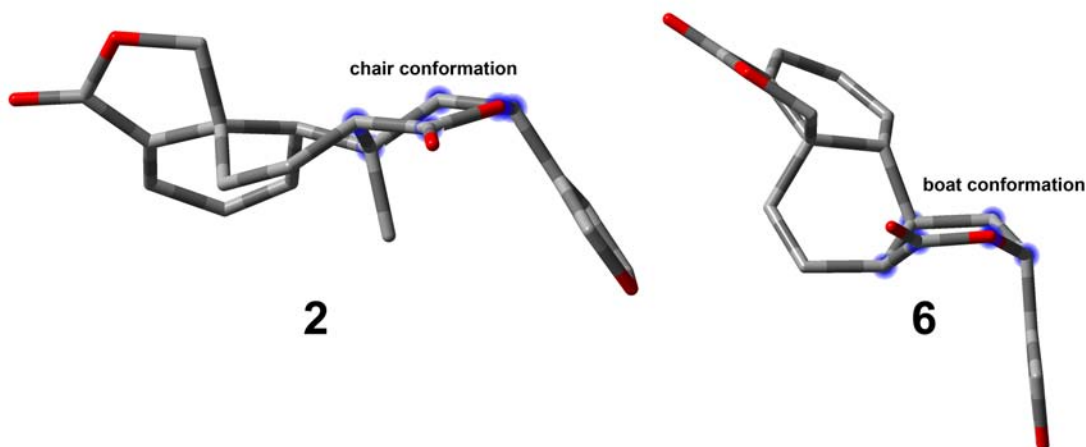


Figura 7. Compuesto 2 con lactona en conformación de silla y compuesto 6 con lactona en conformación de bote

Primero se encontró el estado de transición para la desprotonación en **6** y formación del anión enolato ($TS_{6-Enolate}$) con la metodología descrita anteriormente, se encontró una energía de -1 Kcal/mol respecto a **1** para la abstracción del protón en el estado de transición. Esto dio lugar a la formación del anión enolato en donde se observa la planaridad del carbono C8 y la deslocalización correspondiente con el carbonilo este anión presenta una energía de -8 Kcal/mol.

Para hallar el compuesto **2** se adiciona el protón al anión enolato con su respectivo estado de transición ($TS_{Epimerization}$) con una energía de -5 Kcal/mol y la convergencia a **2** con una energía de -35 Kcal/mol.

Para la formación del compuesto **3** primero se debió de realizar la epoxidación del compuesto **2** en los carbonos C3 y C4; se estudió también la formación del compuesto epoxidado en C1 y C2 sin embargo; como se sabe el compuesto epoxidado 1,6 es menos estable que el 1,4 debido a la separación de cargas que se generan en condiciones básicas. De esta forma se logró un intermediario **11** el cual se muestra en el **esquema 2**. epoxidado en C3 y C4 con orientación alfa con el cual se trabajó para encontrar un estado de transición (TS_{11-3}) que conectara al compuesto epoxidado **11** con **3**. Para este estado de transición, el cual tiene una energía relativa de 4 Kcal/mol, se encontró algo interesante, y es que la formación

de un anión en el carbono C8 genera una deslocalización de cargas con lo cual el cierre del ciclo para formar un ciclopropano entre los carbonos C8 y C10 se realiza de manera concertada debido a la capacidad inductiva del oxígeno del epóxido, lo cual deriva en la apertura del enlace entre los carbonos C5 y C10 para de esta forma generar un compuesto seco neo-clerodano y el posterior reacomodo de las dobles ligaduras y la formación del alcohol en posición alfa en el carbono C3 formando el compuesto **3** con una energía relativa de -45 Kcal/mol (**Figura 8**).

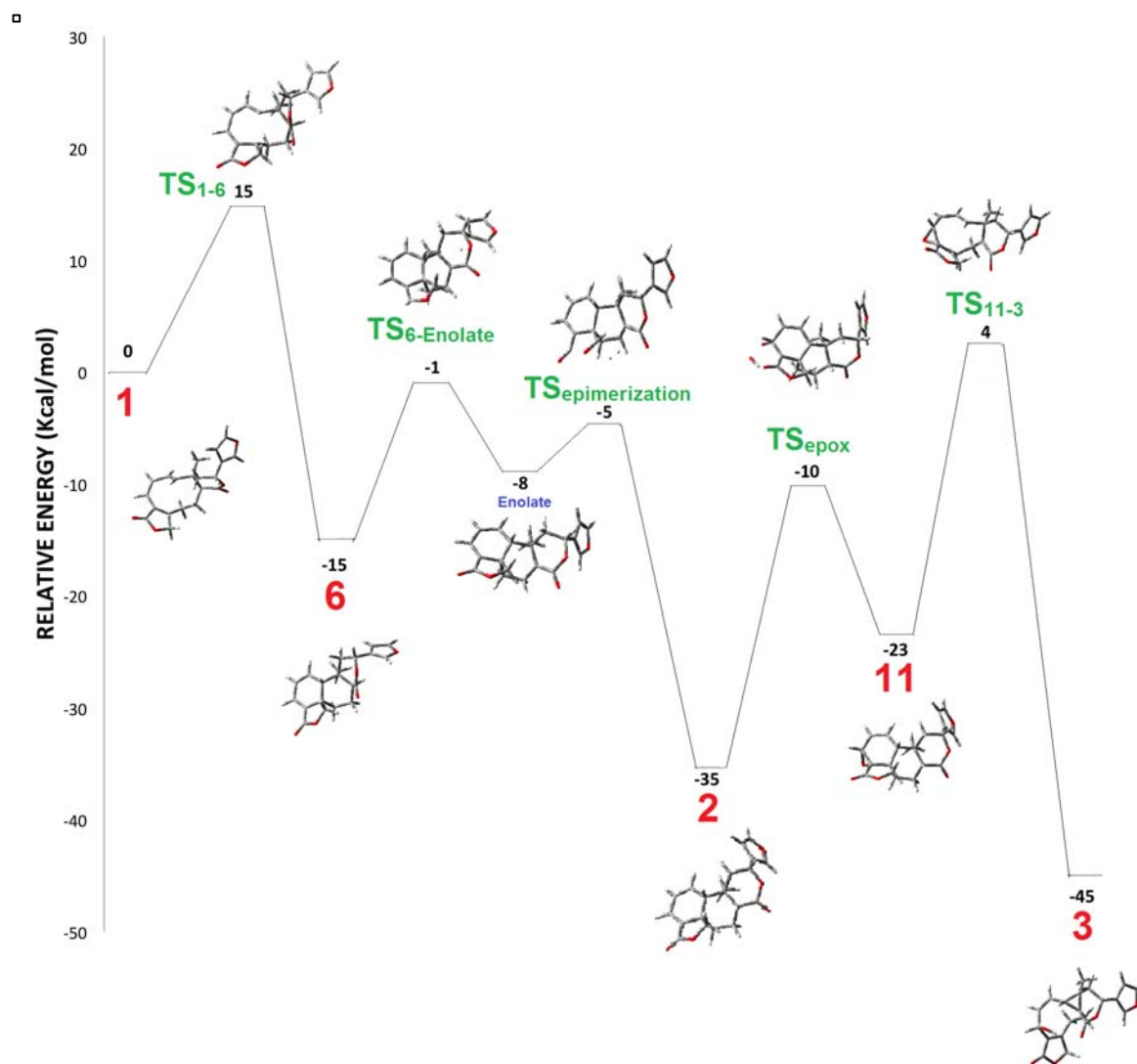


Figura 8. Coordenada de reacción para generar **3** a partir de **1** por medio de una reacción de electrociclización catalizada por luz

Retomando la formación del compuesto **10** por el cierre electrocíclico realizado de manera térmica se puede obtener de esta forma el diterpeno **4** proponiendo una oxidación alílica en el protón del carbono C10. Como se sabe en las plantas este tipo de reacciones se llevan a cabo de forma enzimática, sin embargo; simular este tipo de reacciones resulta complejo, por esto se decidió proponer esta reacción ocupando dióxido de selenio como un posible reactivo para dar lugar a esta transformación, como sabemos el dióxido de selenio es útil en las oxidaciones orgánicas convirtiendo un grupo metileno alílico en el correspondiente alcohol. En términos del mecanismo de reacción, el dióxido de selenio y el sustrato alílico reaccionan a través de procesos pericíclicos a partir de una reacción eno que activa el enlace C-H. El segundo paso es una reacción sigmatrópica [2,3]. Por lo tanto en este mecanismo encontramos dos estados de transición los cuales convergen a los respectivos complejos de selenóxido y los cuales se muestran en el **esquema 2**. con la posterior eliminación del complejo selenóxido y la formación del alcohol en la posición C10 para dar lugar al diterpeno **4** con una energía relativa de -13 Kcal/mol.

Por último la formación del compuesto **5** resulta del equilibrio ceto-enólico que se puede presentar en el diterpeno **4** y que resulta energéticamente muy estable debido a la deslocalización de las dobles ligaduras y posterior reacomodo para formar el compuesto **5** que es propiamente un seco neo clerodano con el carbonilo en el carbono C10, la energía de activación relativa para este estado de transición resulta de -2 Kcal/mol para la posterior formación del compuesto cetónico con una energía relativa de -27 Kcal/mol (**Figura 9**).

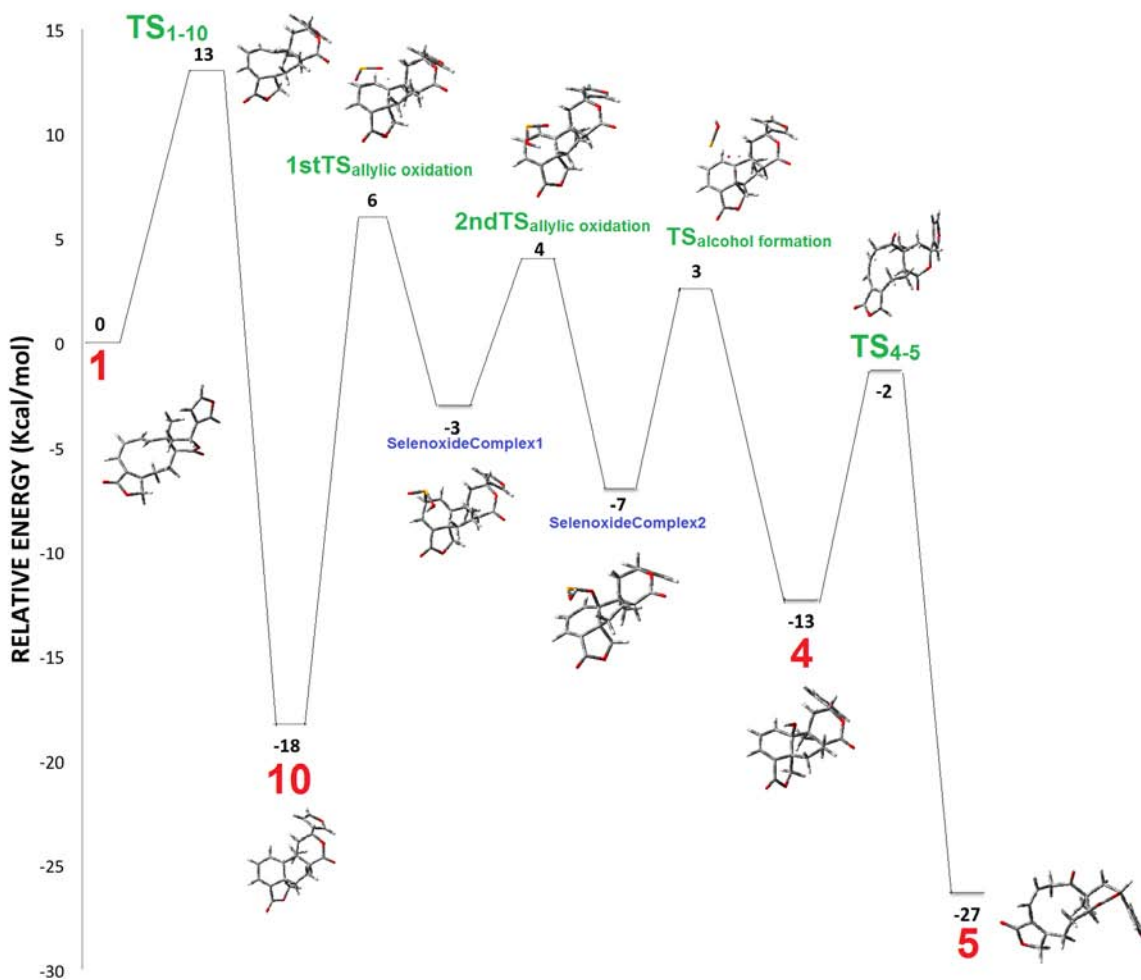


Figura 9. Coordenada de reacción para generar 5 a partir de 1 por medio de una reacción de electrociclización catalizada por calor.

CONCLUSIONES

Las teorías biogenéticas planteadas son apoyadas por los cálculos realizados en este trabajo, ya que sus teorías concuerdan con el mecanismo de reacción aquí descrito. Los resultados computacionales explican el origen de los intermediarios aislados.

El mecanismo de la reacción es guiado por el hecho de que el producto de un paso elemental siempre es más estable que su antecesor y que las barreras energéticas son pequeñas. Estos resultados sugieren que el papel de las enzimas que catalizan esta reacción en los sistemas biológicos es el de seleccionar al conformero inicial.

Del análisis minucioso de las trayectorias de reacción se demostró que las moléculas sufren todos los cambios conformacionales necesarios para que las condiciones estereoelectrónicas se cumplan. Lo anterior pone de manifiesto la importancia que en algunas circunstancias tiene el análisis completo de la coordenada de reacción, tanto en la parte geométrica como en la energética.

No queda duda de que el funcional mPW1B95 es una buena elección para tratar sistemas similares, ya que mostró un buen desempeño. Este funcional mejora la descripción de las barreras energéticas y de las geometrías de los ET.

CAPÍTULO 2

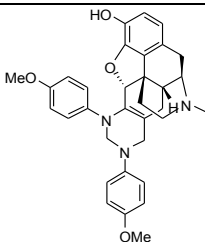
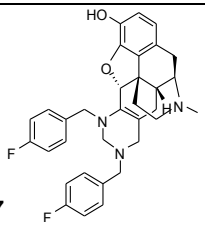
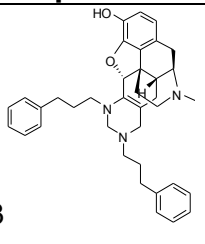
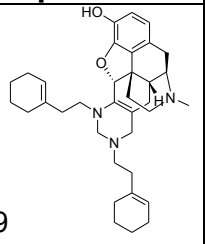
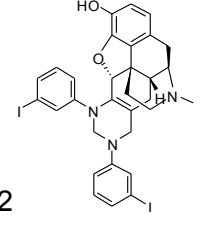
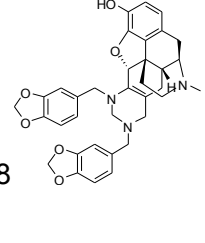
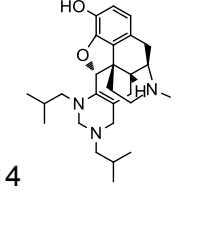
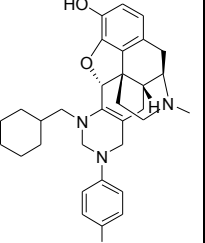
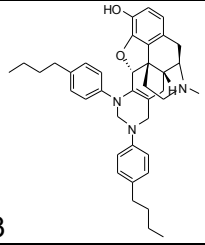
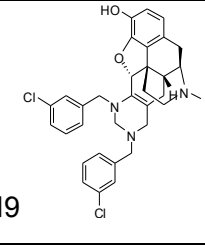
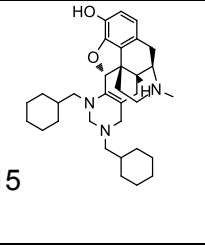
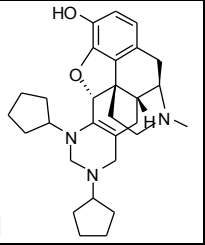
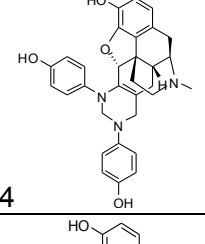
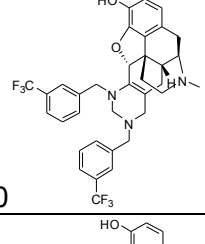
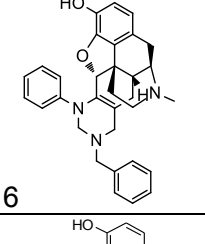
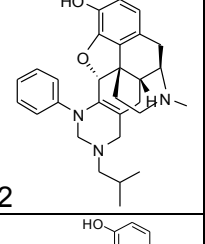
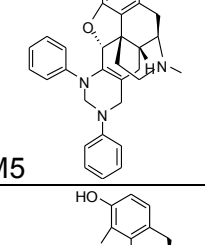
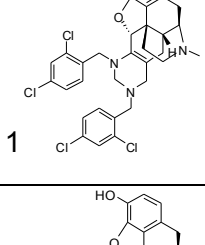
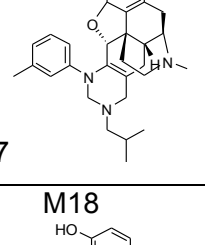
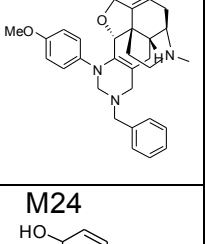
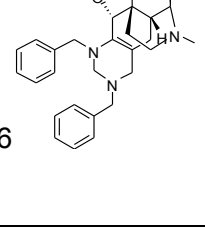
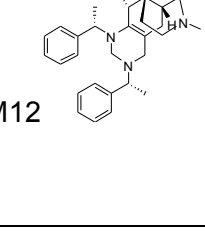
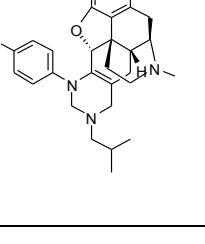
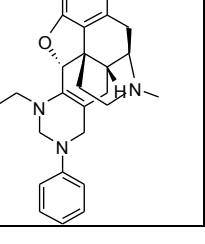
Modulación de la función de receptores de opioides mediante productos naturales y moléculas pequeñas.

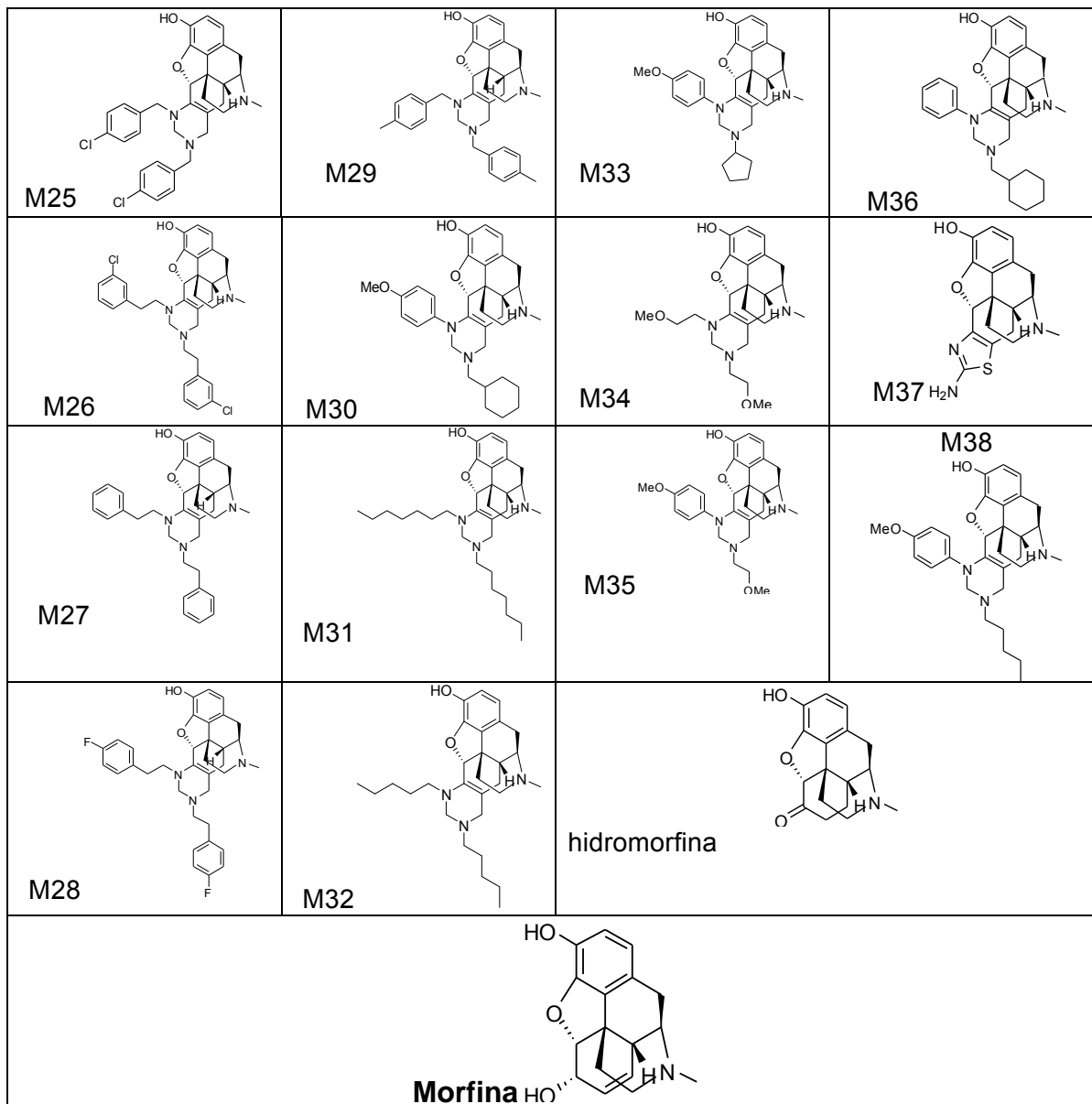
Papaver somniferum, es la fuente de todos los opiáceos, cuyo alcaloide principal es la morfina, conocida por su efecto agonista al receptor opioide Mu. A lo largo de la historia se han hecho esfuerzos bajo diferentes puntos de vista para proponer sustancias de tipo morfinano con diferente perfil farmacológico. Los modos de unión propuestos para la morfina, su farmacoforo y modos de acción están reportados en la literatura^{61,62} Uno de los grupos de investigación líderes en el mundo en química combinatoria es el Instituto *Torrey Pines for Molecular Studies* (TPIMS). TPIMS ha dedicado esfuerzos en la generación de péptidos, péptido miméticos y compuestos heterocíclicos con actividad agonista o antagonista de los receptores opiodes mediante la reconocida metodología “tea bag” desarrollada en el mismo instituto. Actualmente, TPIMS cuenta con un compuesto en fase II de pruebas clínicas.⁶²

MORFINANOS

En este apartado se muestra el estudio computacional de cuarenta estructuras de tipo morfinano (incluyendo la morfina) sintetizados y evaluados biológicamente en receptor opioide Mu por nuestros colaboradores en el Instituto TPIMS Port St. Lucie, Florida. Los compuestos se enlistan a continuación en la **tabla 2**.

Tabla 2. Derivados morfínicos estudiados

Compuesto	Compuesto	Compuesto	Compuesto
 <p>M1</p>	 <p>M7</p>	 <p>M13</p>	 <p>M19</p>
 <p>M2</p>	 <p>M8</p>	 <p>M14</p>	 <p>M20</p>
 <p>M3</p>	 <p>M9</p>	 <p>M15</p>	 <p>M21</p>
 <p>M4</p>	 <p>M10</p>	 <p>M16</p>	 <p>M22</p>
 <p>M5</p>	 <p>M11</p>	 <p>M17</p>	 <p>M23</p>
 <p>M6</p>	 <p>M12</p>	 <p>M18</p>	 <p>M24</p>



Se realizaron pruebas biológicas de los 40 compuestos sintetizados sobre el receptor opioide Mu, las constantes de inhibición (K_i) correspondientes se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Valores de K_i (nM) para los 40 compuestos derivados de la morfina

Compuesto	K_i (nM)	Compuesto	K_i (nM)	Compuesto	K_i (nM)	Compuesto	K_i (nM)
M1	2.3*	M11	7.21	M21	4.69	M31	4.95
M2	88.02	M12	5.22	M22	10.54	M32	3.65
M3	4.08	M13	14.4	M23	11.46	M33	6.14
M4	1.23*	M14	5.21	M24	6.54	M34	5.66
M5	6.11	M15	7.23	M25	2.65*	M35	6.23
M6	4.99	M16	3.8	M26	19.77	M36	1.93*
M7	4.85	M17	10.27	M27	4.81	M37	7.7
M8	0.21*	M18	5.72	M28	7.6	M38	7.31
M9	5.32	M19	6.32	M29	7.65	hidromorfina	5.34
M10	4.7	M20	7.62	M30	12.2		
MORFINA $K_i = 3.2$ nM							

*Compuestos más potentes que la morfina

Como se puede apreciar en la **tabla 3** las constantes de inhibición varían de 0.21 a 88.02 nM, donde cinco de los compuestos resultaron ser más afines al receptor opioide μ que la propia morfina. El compuesto **M8** presentó la mejor afinidad.

Características fisicoquímicas de los compuestos morfínicos

La predicción de las propiedades fisicoquímicas se realizó con el programa Medchem Designer (TM) v.2.0.034. Las propiedades calculadas fueron: $S+\log P$, $S+\log D$, $M\log P$ y MW, estas propiedades son relevantes para estimar el perfil de biodisponibilidad oral según lo planteado por Lipinski⁶³⁻⁶⁵. En su estudio Lipinski observó que los fármacos aprobados tenían en general 10 o menos enlaces rotables, área de la superficie polar no mayor a 140 \AA^2 , no más de tres átomos donadores de hidrógeno y no más de tres átomos aceptores de hidrógeno, peso molecular (MW) no mayor a 500 g/mol, coeficiente de partición ($\log P$) entre -0.4 y 5.6. Cabe mencionar que estas observaciones fueron hechas para fármacos administrados vía oral y que tanto los péptidos como los compuestos inorgánicos fueron excluidos. Actualmente, y en el espíritu de generar reglas como la de Lipinski, se han propuesto otras reglas empíricas enfocadas a mejorar la selección de moléculas en vías de ser fármacos, como la regla de Oprea llamadas también *lead-like*⁶⁶. Ambas reglas siguen siendo útiles como primer filtro para seleccionar las moléculas para estudios posteriores.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las diferentes moléculas estudiadas en cuanto a sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (**tabla 4**).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de los morfínanos

Compuesto	MlogP	S+logP	S+logD	RuleOf5	RuleOf5_Code	MW	T_PSA
M1	3.918	5.019	4.162	1	Mw	537.6	57.64
M2	5.814	7.019	6.275	2	Mw,LP	729.4	39.18
M3	6.518	9.337	8.684	2	Mw,LP	589.8	39.18
M4	3.545	3.921	3.078	1	Mw	509.6	79.64
M5	5.076	5.339	4.464	1	LP	477.6	39.18
M6	4.913	5.033	4.001	2	Mw,LP	505.6	39.18
M7	5.633	5.9	4.923	2	Mw,LP	541.6	39.18
M8	3.607	3.592	2.67	1	Mw	593.6	76.1
M9	5.814	6.366	5.386	2	Mw,LP	574.5	39.18
M10	6.345	6.755	5.934	2	Mw,LP	641.6	39.18
M11	6.17	7.195	6.265	2	Mw,LP	643.4	39.18
M12	5.278	5.658	4.657	2	Mw,LP	533.7	39.18
M13	5.634	6.864	5.822	2	Mw,LP	561.7	39.18
M14	4.239	4.606	3.196	1	LP	437.6	39.18
M15	5.389	6.708	5.498	2	Mw,LP	517.7	39.18
M16	4.996	5.19	4.241	1	LP	491.6	39.18
M17	4.845	5.253	4.084	1	LP	471.6	39.18
M19	5.585	7.139	6.036	2	Mw,LP	541.7	39.18
M20	4.905	5.989	5.039	2	Mw,LP	527.7	48.41
M21	4.633	4.467	3.251	1	LP	461.6	39.18
M22	4.652	4.758	3.575	1	LP	457.6	39.18
M23	4.678	5.12	4.074	2	Mw,LP	521.6	48.41
M24	4.996	5.137	4.072	1	LP	491.6	39.18
M25	5.814	6.504	5.506	2	Mw,LP	574.5	39.18
M26	6.17	7.13	6.067	2	Mw,LP	602.6	39.18
M27	5.278	5.88	4.788	2	Mw,LP	533.7	39.18
M28	5.993	6.685	5.753	2	Mw,LP	569.6	39.18
M29	5.278	6.134	5.125	2	Mw,LP	533.7	39.18

M30	4.905	5.832	4.734	2	Mw,LP	527.7	48.41
M31	5.389	8.128	6.984	2	Mw,LP	521.7	39.18
M32	4.633	5.94	4.621	1	LP	465.6	39.18
M33	4.531	4.77	3.687	1	LP	499.6	48.41
M34	2.302	2.028	0.924	0	<None>	441.5	57.64
M35	4.341	4.825	3.688	1	LP	487.6	48.41
M36	5.223	5.895	4.889	1	LP	497.6	39.18
M37	2.48	1.84	0.691	0	<None>	341.4	71.61
M38	4.531	5.442	4.31	2	Mw,LP	501.6	48.41
hidromorfina	2.442	1.206	0.029	0	<None>	285.3	49.77
morfina	2.442	1.064	-0.053	0	<None>	285.3	52.93

A partir de los datos obtenidos y haciendo uso de lo planteado con la regla de Lipinski, se seleccionaron aquellos morfínicos con mejor perfil, partiendo de la base de que una molécula que viole más de un código puede presentar bajas biodisponibilidad oral⁶⁵. Las moléculas que solo violan una de las reglas de los 5, se mantuvieron en estudio, como ha sido sugerido previamente⁶⁴.

En la **Tabla 4**, se hace resumen las propiedades fisicoquímicas de los morfínicos, las moléculas que se colorean en rojo se descartaron por violar dos de las reglas de Lipinski. Las celdas coloreadas en amarillo presentan las propiedades de morfínicos que resultaron ser más activos que la morfina, así mismo las coloreadas en color verde son los compuestos **morfina** y su derivado oxidado **hidromorfina** que sirven como referencia. En cuanto a los datos obtenidos para la predicción de las propiedades fisicoquímicas de los diferentes compuestos se tiene: valores de área topológica de la superficie polar (T_PSA) entre 39.18-79.64 Å², lo que evidencia aspectos como: predicción de la absorción intestinal humana, transporte molecular pasivo a través de las membranas y penetración de la barrera cerebral, teniendo como referencia el máximo que es de 140 Å², lo cual también puede indicar la menor presencia de grupos funcionales polares tales como oxígeno y nitrógeno en las diferentes moléculas^{67,68}. El coeficiente de partición de Moriguchi (MlogP ≤ 4.15) presenta valores entre 2.302-6.518, este

parámetro fue el único que se violó en algunos morfínicos, lo cual indica que éstos compuestos exhiben alta lipofilidad y podrían llegar a presentar problemas asociados a mayores tiempos de retención en el organismo y una mayor metabolización hepática previa a su excreción, generando posiblemente metabolitos tóxicos^{69,70}. Para el peso molecular ($MW \leq 500g/mol$) se obtuvieron valores entre 285.3-729.4 g/mol, el cual si se excede afecta, de manera directamente proporcional, la permeabilidad a través de la barrera intestinal y vascular⁷¹.

Partiendo de los valores predichos de los 40 morfínicos (**tabla 2**) y luego de aplicar la selección de los candidatos usando la regla de Lipinski, se obtuvieron 18 compuestos contando a la morfina y la hidromorfina los cuales muestran valores aceptables entre los rangos establecidos para los diferentes parámetros analizados.

Optimización de geometría molecular

Los 18 compuestos seleccionados que se sometieron a optimizaciones geométricas mediante un protocolo de mecánica molecular empleando el campo de fuerza AMBER y finalmente optimizando hasta un gradiente de energía menor o igual a 0.01 Kcal/mol, utilizando el algoritmo de Polak-Riviere de gradientes conjugados.

con el fin de encontrar las conformaciones moleculares de mínima energía (las más estables), en donde se ajustan las coordenadas atómicas para encontrar una configuración en la cual fuerzas sobre los átomos se reduzca a cero.

Tabla 5. Predicción conformeros de menor energía

Compuesto	ENERGÍA (Kcal/mol)	Gradiente (Kcal/mol)
M1	33.860276	0.009281
M4	33.135627	0.009453
M5	30.127751	0.009114
M8	35.654872	0.009876
M14	34.182981	0.009253

M16	33.847801	0.009635
M17	33.298179	0.009567
M21	31.279917	0.009348
M22	34.109273	0.009374
M24	34.727189	0.009935
M32	42.758362	0.009354
M33	33.852467	0.009243
M34	34.788261	0.009465
M35	34.872011	0.009352
M36	35.256739	0.009473
M37	29.989272	0.009793
hidromorfina	29.210522	0.009327
morfina	29.143138	0.009917

De acuerdo a las geometrías optimizadas para cada compuesto (**Tabla 5**) se obtuvo que la molécula con mayor contenido de energía potencial y optimizando hasta un gradiente energético menor o igual a 0.01 kcal/mol, es M32 valor de 42.758362 kcal/mol con un gradiente de convergencia de 0.009354 kcal/mol. Los morfinaos energéticamente más estables son la morfina y la hidromorfina con valores de 29.143138 Kcal/mol y 29.210522 Kcal/mol respectivamente y es de esperarse debido a que estos compuestos se presentan en la naturaleza y por ende la naturaleza tiende a la menor energía. Sin embargo muchos de estos compuestos presentan energías similares a la de la morfina e hidromorfina.

Estudio de acoplamiento molecular (docking molecular)

Los estudios de acoplamiento molecular se llevaron a cabo para predecir la orientación y conformación que corresponda al mínimo local de energía libre de unión de los compuestos candidatos con el sitio activo del receptor opioide Mu (5C1M). Los estudios se realizaron utilizando el software MOE en su versión 2010. Se realizaron 40 corridas por compuesto en el sitio activo del receptor opioide Mu.

A modo de validación se realizó el docking del ligando co-cristalizado BU72, que es un morfinao que actúa como agonista en el receptor opioide Mu. En la **Figura 10** se muestra de manera gráfica el sitio de unión de BU72, desde la vista extracelular del receptor⁷².

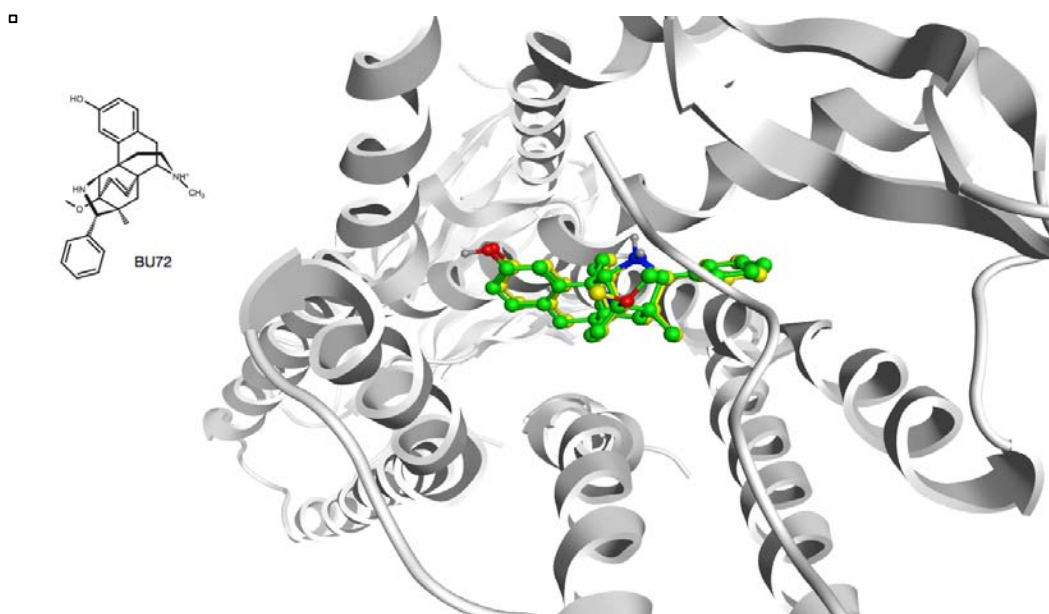


Figura 10. Vista extracelular del receptor Mu. En amarillo BU72⁷² co-cristalizado en el sitio de unión. En verde la salida de docking con BU72

Como se puede apreciar en la imagen, el modo de unión predicho para BU72 es idéntico a la orientación y conformación del ligando co-cristalizado, el RMSD entre estas dos estructuras es de 0.57 Å. Cabe hacer notar que este tipo de estudio requiere un análisis conformacional exhaustivo, dado que la conformación bioactiva no sea la más estable termodinámicamente, debido a que la energía libre de asociación supera generalmente la energía necesaria para que el ligando sufra un cambio conformacional. Con esto se realizó el cálculo de la geometría y la naturaleza del sitio de unión, con lo cual es posible obtener orientaciones con mayor capacidad de unión al receptor, pudiéndose calcular además la energía de

unión, y predecir así la energía con la que los compuestos interactuarán con el blanco molecular.

Para los acoplamientos moleculares se descartaron los compuestos que violaron más de uno de los criterios de la regla de Lipinski como se describió en el apartado anterior. Empleando el software MOE 2010 se llevó a cabo el acoplamiento de los compuestos que no fueron descartados en el proceso ADME con el receptor opioide Mu.

Un hecho interesante es que el esqueleto morfínico de BU72, que es un agonista al receptor opioide Mu se une en una orientación similar a la observada previamente para los compuestos antagonistas. Además, las diferencias estructurales del receptor opioide Mu en su estado activo e inactivo son relativamente sutiles⁷². La mayoría de las interacciones entre BU72 y el receptor opioide Mu activo son hidrófobas o aromáticas en la naturaleza, con la excepción de dos interacciones polares conservadas.

Para el caso del programa MOE, la energía de unión se describe bajo la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

La energía de unión entre el complejo ligando-receptor, es generalmente expresado en términos termodinámicos como energía libre de Gibbs ($\Delta G_{\text{unión}}$), el cual considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, así como energías de solvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales (t/r en la ecuación).

Las energías y modos de unión de los 18 morfínicos estudiados aquí se asemejan a lo observado para la morfina, la hidromorfina, y BU72, esto sugiere un posible modo de acción similar, es decir, como agonistas del receptor opioide Mu.

En la **Tabla 6** se presentan los resultados obtenidos para los compuestos estudiados.

Tabla 6. Energías de unión entre los ligandos y el receptor.

Compuesto	ENERGÍA (Kcal/mol)
morfina	-14.76761
hidromorfina	-13.87432
BU72	-14.09342
M37	-13.43847
M5	-10.22574
M21	-10.11841
M4	-12.35176
M17	-12.95495
M16	-12.04438
M33	-13.13621
M1	-13.4422
M22	-13.14793
M14	-15.84041
M24	-14.03408
M34	-13.94498
M35	-12.68893
M36	-16.14169
M8	-15.84041
M32	-16.60041

Como puede observarse en la **tabla 6** las energías de unión entre las orientaciones seleccionadas y la morfina, hidromorfina y el co-cristal BU72, tienen valores similares, con esto se puede suponer que los modos de unión del ligando-receptor son energéticamente adecuadas.

En la **figura 11** se muestra la orientación predicha para los morfínicos estudiados aquí, en comparación con la morfina, dentro del sitio de unión del receptor opioide Mu. La forma de T descrita anteriormente se puede apreciar con el átomo de nitrógeno con carga positiva en la parte de abajo en el recuadro de color rojo, lo

cual es un punto clave de afinidad con el receptor opioide Mu que será descrito a fondo más adelante. Todos los compuestos se orientan en forma similar a la morfina.

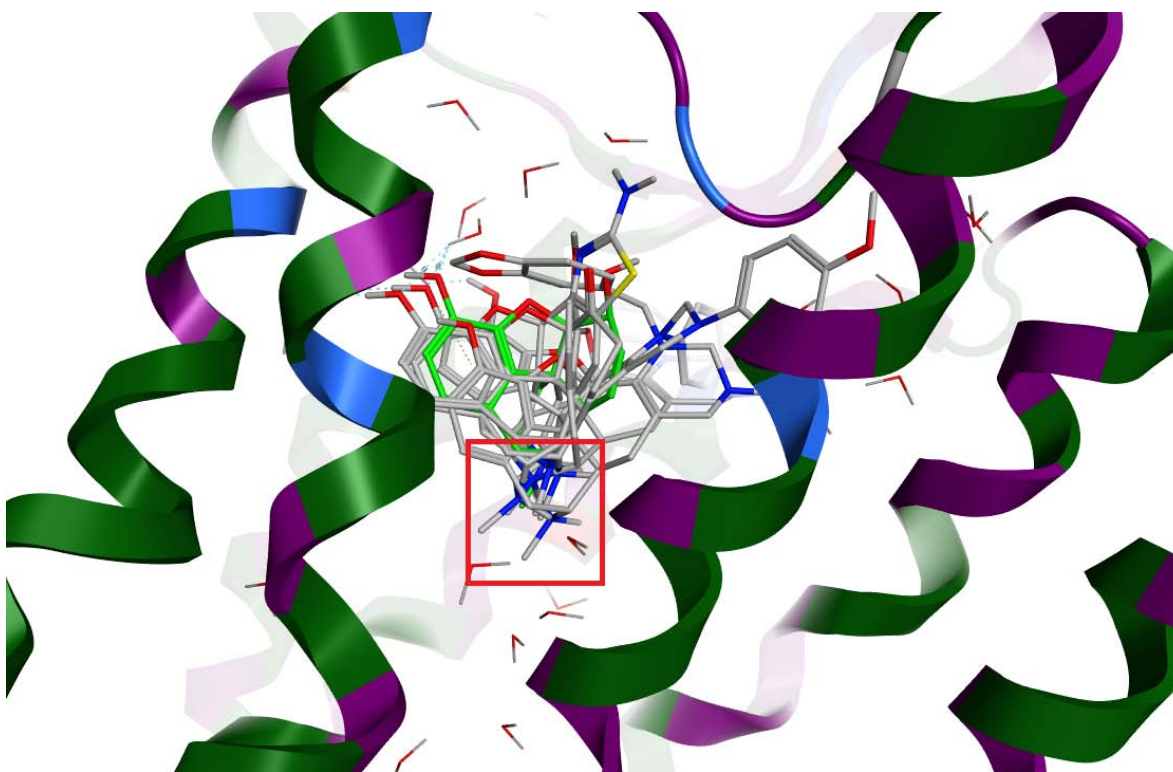


Figura 11. Orientaciones obtenidas de los compuestos estudiados (gris) con la morfina (verde) en el sitio de unión del receptor opioide Mu. El recuadro rojo indica la orientación del nitrógeno positivo dentro del receptor

Para verificar cuales son los aminoácidos con los que tienen interacción los compuestos se realizó un procedimiento que se denomina PLIF por sus siglas en inglés (Protein-Ligand Interaction Fingerprints). Esta metodología permite la comparación de las interacciones entre los ligandos y el receptor. La representación gráfica del PLIF es un esquema en dos dimensiones. En el eje de las X se grafican los aminoácidos interactuantes y en cada renglón en el eje de las ordenadas corresponde a cada uno de los ligandos bajo estudio. El PLIF contiene información binaria, donde la presencia de una interacción se representa con un

cuadro lleno y la ausencia como un cuadro vacío. De esta manera es posible observar las interacciones más conservadas entre los ligandos así como la comparación entre ellos. En la **figura 12** se muestra el PLIF realizado a 360 salidas de docking de los 18 compuestos reportados anteriormente y con los cuales se hizo una búsqueda conformacional dentro del sitio activo para determinar las mejores orientaciones que expliquen la afinidad de estos compuestos sobre el receptor opioide Mu.

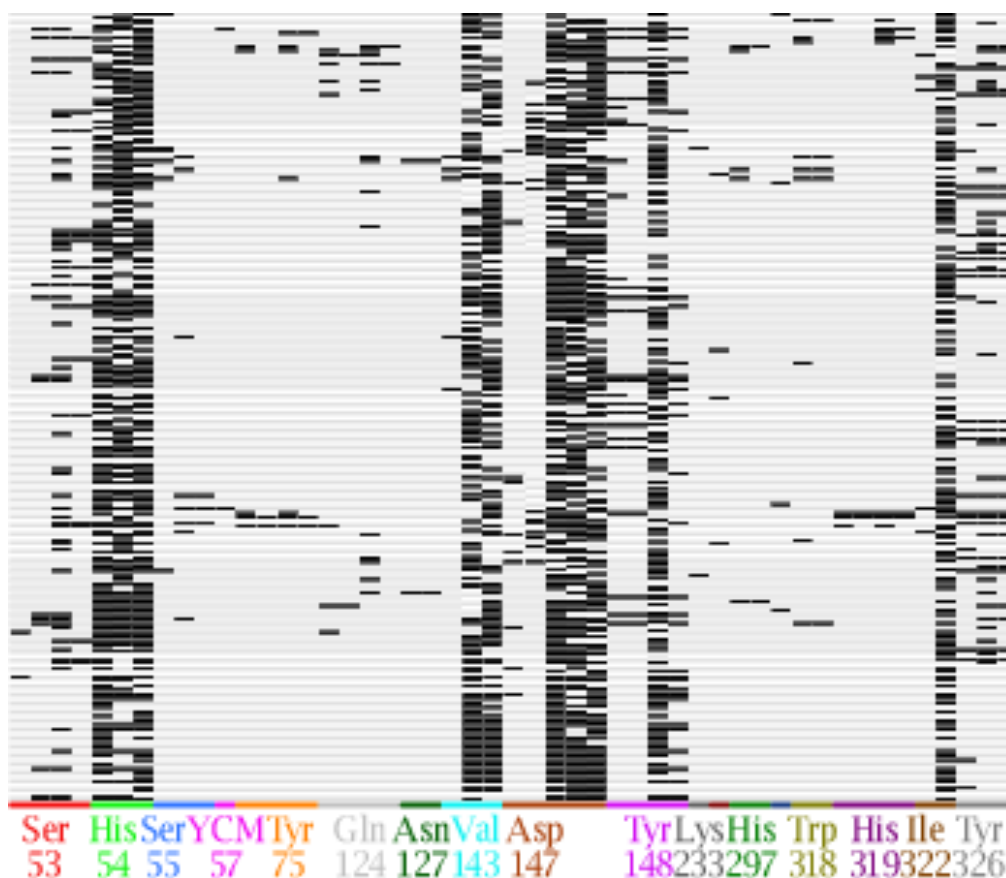


Figura 12. PLIF de los morfinaos en estudio

Como podemos notar en la **figura 12** son varios aminoácidos los implicados en el sitio de unión del receptor opioide Mu, entre los cuales se encuentran: Ser53, His54, Ser55, Tyr75, Asp147, Tyr148, etc. Sin embargo, los aminoácidos responsables de la afinidad en el sitio de unión del receptor opioide Mu son la His54, Val143, Asp147, Tyr148 e Ile322. Como se puede notar en el PLIF, estas

interacciones son las más frecuentes para los compuestos bajo estudio.

Anteriormente mencionamos los compuestos más potentes que la morfina siendo éstos el **M1**, **M4** y **M8**. A continuación nos enfocamos en el estudio de acoplamiento molecular de estos compuestos.

Docking morfina:

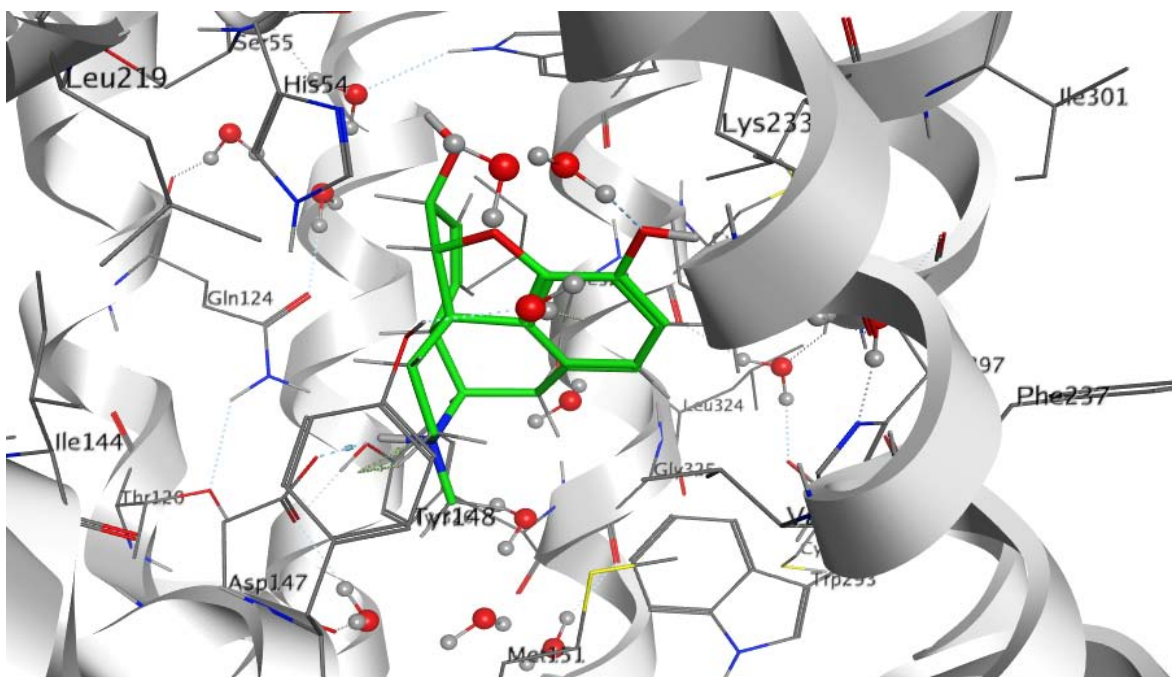


Figura 13. Modo de unión de la morfina en el receptor opioide Mu.

En la **Figura 13**, se muestra la visualización del acoplamiento de la **morfina** con el receptor opioide Mu. La energía de unión calculada para este complejo es de -20.7649 kcal/mol. Según este modelo, los aminoácidos que participan en el reconocimiento molecular para esta molécula son: Asp147, His54 y Tyr148, los cuales forman parte del sitio activo del receptor. La relevancia de algunas de estas interacciones es la siguiente:

- Asp147: La interacción con este aminoácido es la principal responsable de la afinidad que presentan. Corresponde a una interacción de tipo iónico entre el átomo de nitrógeno positivo del ligando y ácido carboxílico de

Asp147.

- Tyr148. La interacción con este aminoácido es de tipo CH- π confiriendo también afinidad hacia el sitio de unión.
- Las interacciones propias con moléculas de agua también se presentan debido al carácter polar del grupo hidroxilo de la morfina⁷².

Docking de M1:

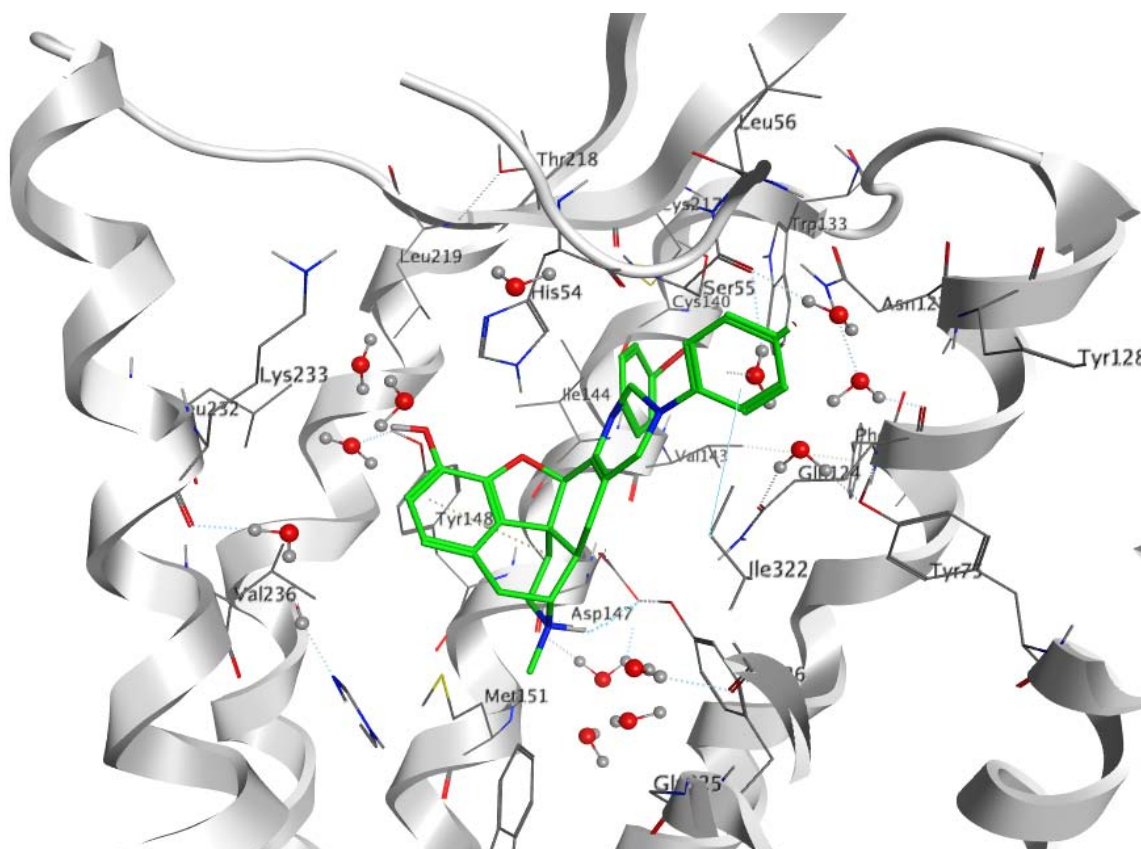


Figura 14. Acoplamiento de M1 dentro del sitio activo de receptor opioide Mu.

En la **Figura 14**, se muestra la visualización del acoplamiento del receptor opioide Mu con **M1** con un valor de energía de -19.9086 kcal/mol las interacciones relevantes fueron con los aminoácidos Asp147, Ile322 y Tyr148.

- Asp147: Como se mencionó anteriormente la interacción iónica de los derivados morfínicos con este aminoácido es clave en la afinidad hacia el

sitio de unión y conformación adoptada por el compuesto dentro del sitio de unión.

- Ile322: Debido a la presencia de anillos aromáticos en la molécula del derivado morfínico, hay un anclaje con una interacción de tipo CH- π . Es posible que esta interacción sea la responsable del aumento de la actividad que presenta **M1** sobre el receptor opioide Mu.

- Lys217: interacciona con Leu56 por medio de hidrogeno-oxigeno a 2.173 Å.

También está presente la interacción con moléculas estructurales con el grupo hidroxilo del morfínico cercano a la Lys233.

Docking de M4:

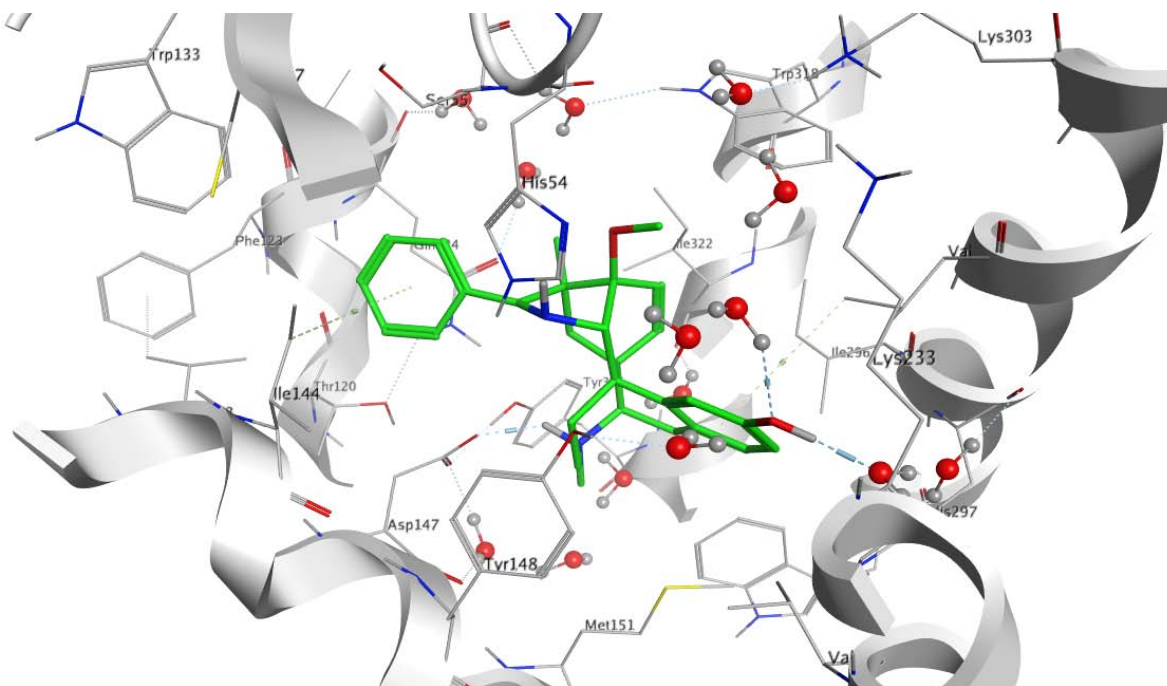


Figura 15. Acoplamiento de M4 dentro del sitio activo del receptor opioide Mu

En la **figura 15** se muestra el acoplamiento del compuesto **M4**. En este acoplamiento se mantiene la interacción con el Asp147, las interacciones con el disolvente son importantes, se muestran moléculas de agua interactuando con los

hidroxilos del derivado. La His54 está a una distancia de 2.4 Å con la amina secundaria del derivado morfínico. Se muestra también una interacción de tipo CH- π entre la Ile144 y el anillo aromático del ligando y con la Val300, esto puede ser un indicio de la afinidad exhibida en este derivado y su valor alto de actividad al receptor opioide Mu de 1.23 nM.

Docking de M8:

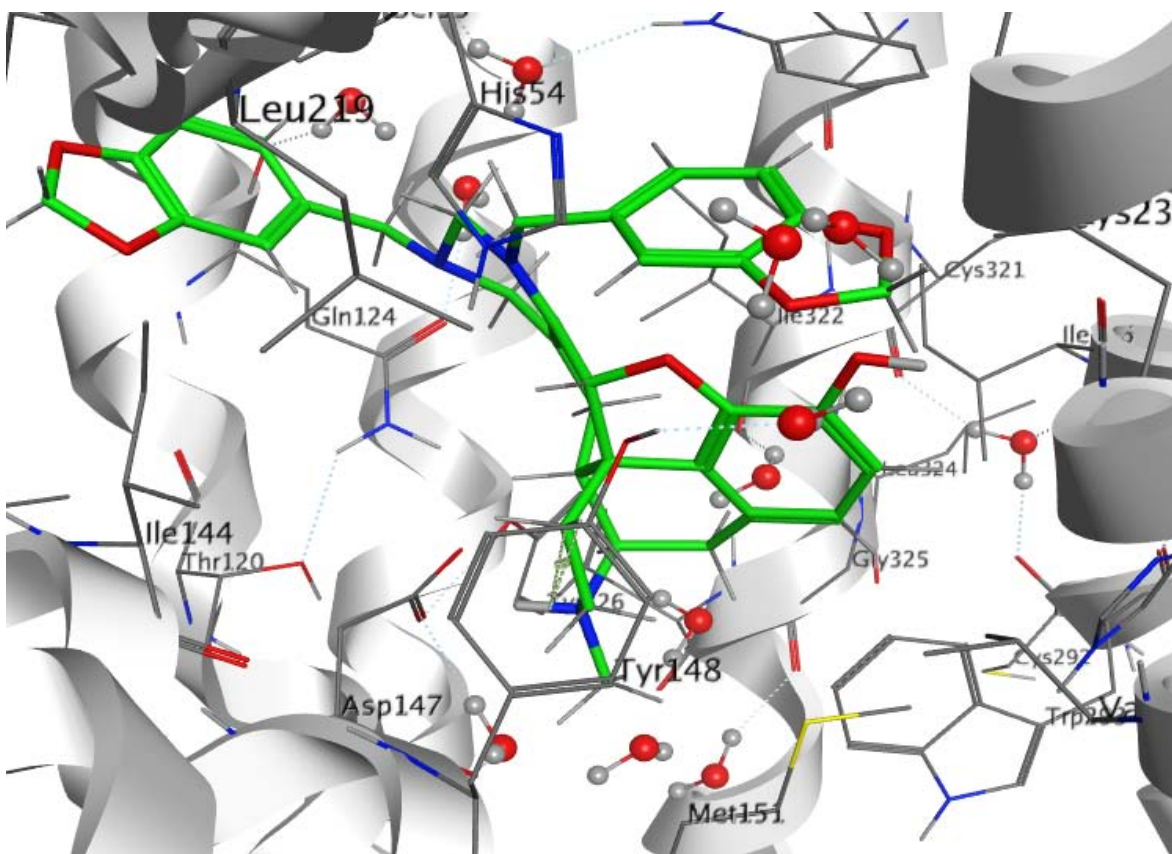


Figura 16. Acoplamiento de M8 dentro del sitio activo del receptor opioide Mu.

En la **figura 16** se muestra el acoplamiento del compuesto **M8**. En este acoplamiento se mantiene la interacción con Asp147, sin embargo hay otras interacciones que están presentes en este acoplamiento, la interacción CH- π con la Tyr148 y puentes de hidrógeno formados con las moléculas de agua y los grupos aromáticos del morfínico. La His54 también se encuentra a una distancia de 2.6 Å con la amina secundaria del derivado morfínico. Si bien mantiene las

interacciones propias de la morfina; esto puede ser un indicativo de la alta afinidad al receptor, cuyo valor es de 0.21 nM. Siendo este morfina el más activo de nuestro grupo de compuestos. Esta información es relevante para entender la diferencia en afinidad al receptor opioide Mu debido al cambio estructural de la morfina, cuya información enriquece nuestro conocimiento en el proceso de reconocimiento molecular y que puede ser extrapolado a otros ligandos, como los productos naturales descritos en el Capítulo 1 y que son el objeto de estudio de la siguiente sección.

DITERPENOS

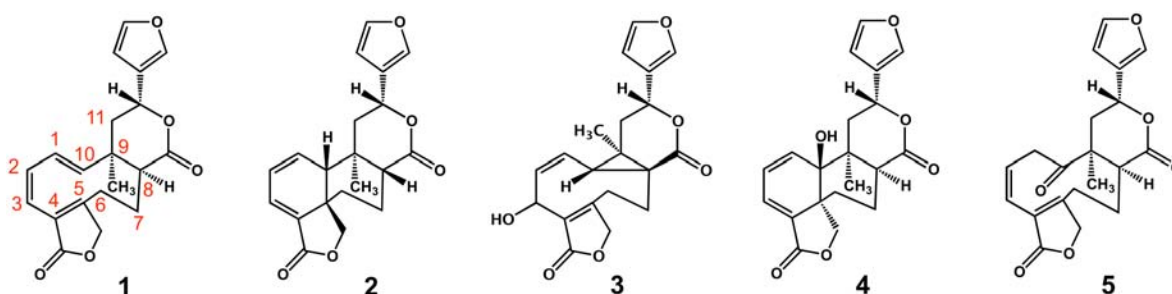
En este apartado se muestra el estudio computacional de cinco estructuras de tipo diterpeno neo-clerodano aisladas de *Salvia microphylla*, que fueron discutidos en el capítulo uno de esta tesis, sobre el receptor opioide Mu. Debido a la similitud estructural de estos diterpenos con la Salvinorina A también referenciada y discutida en el capítulo uno se generó una hipótesis respecto a la posible interacción de estos compuestos en el receptor opioide Mu. Pruebas biológicas de estos compuestos serán relevantes en trabajos futuros para corroborar esta hipótesis. Además de la Salvinorina A, otro ejemplo relacionado es la actividad sedante, antidiarreica y antitusiva de infusiones de *Salvia microphylla*, estas propiedades coinciden con efectos observados para compuestos que actúan vía el receptor opioide Mu⁷³. Por lo tanto, resulta imperante conocer los blancos moleculares responsables de dicho efecto. El mejor entendimiento de los diferentes mecanismos biológicos involucrados y su modulación ha permitido explorar y diseñar moléculas con una amplia gama de afinidades y selectividades con el objetivo final de atenuar efectos secundarios indeseables. Como se sabe, tanto los ligandos opioides agonistas como los antagonistas tienen relevancia terapéutica. La modulación de estos receptores involucra un exquisito y sofisticado reconocimiento molecular, por ejemplo, un cambio mínimo en la estructura del ligando puede conducir a cambios de función de agonistas a antagonistas o a agonistas inversos⁶¹.

La importancia de estos compuestos radica en que no presentan ningún átomo de nitrógeno positivo en su estructura con lo cual no pueden ser denominados alcaloides. Como se sabe la Salvinorina A, aislada de la *Salvia divinorum* y selectiva al receptor opioide kappa, rompió un paradigma en el campo de los opioides, debido a que antes se creía que la interacción y función biológica de cualquier compuesto que tuviera actividad sobre estos receptores era generada por la presencia de un átomo de nitrógeno positivo y por la interacción iónica que éste presenta con el aminoácido Asp138 del receptor opioide kappa (correspondiente al Asp147 del receptor opioide Mu).

Con estos antecedentes nos dimos a la tarea de evaluar computacionalmente los diterpenos aislados y generar hipótesis de unión ante el receptor que empleamos como estudio en este trabajo, el receptor opioide Mu. De igual forma como procedimos con los compuestos de tipo morfina se evaluaron *in silico* las propiedades fisicoquímicas de los diterpenos.

Propiedades fisicoquímicas de los diterpenos

En el **esquema 3** se presentan los diterpenos que se estudiaron en este apartado.



Esquema 3. Diterpenos aislados y evaluados en el receptor opioide Mu.

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de los diterpenos bajo estudio

Name	MlogP	S+logP	S+logD	RuleOf5	RuleOf5_Code	MW	T_PSA
1	1.869	3.033	3.033	0	<None>	340.378	65.74
2	1.948	2.647	2.647	0	<None>	340.378	65.74
3	1.177	1.961	1.961	0	<None>	356.378	85.97
4	1.177	1.621	1.621	0	<None>	356.378	85.97
5	1.097	1.773	1.773	0	<None>	356.378	82.81

A partir de los datos obtenidos en la **tabla 7** y haciendo uso de lo mencionado en

la regla de Lipinski, se obtuvo que todos estos compuestos satisfacen los 5 criterios, por lo tanto se predicen con un buen perfil de biodisponibilidad oral.

Estudio de acoplamiento molecular (docking molecular)

Con la misma metodología descrita para los morfínicos se llevó a cabo la búsqueda conformacional de los diterpenos en el sitio activo del receptor opioide Mu. Las moléculas ya habían sido previamente optimizadas encontrándose sus conformeros de menor energía ocupando teoría de funcionales de la densidad usando el nivel de teoría mPWW1B95 con la base polarizada y difusa 6-31+G(d,p). Ya teniendo las estructuras en su mínima energía se prepararon los ligandos agregando las cargas parciales para la correcta interacción con el sitio del receptor opioide Mu. El receptor de igual forma fue preparado con la misma metodología descrita en el apartado anterior y se hizo una corrida de 30 acoplamientos y búsquedas conformacionales de los 5 diterpenos. La búsqueda conformacional se realizó sin restricciones y ocupando el campo de fuerzas MMFF94 en el software MOE en su versión 2010.

El PLIF de los compuestos diterpénicos se muestra a continuación en la **figura 17**.

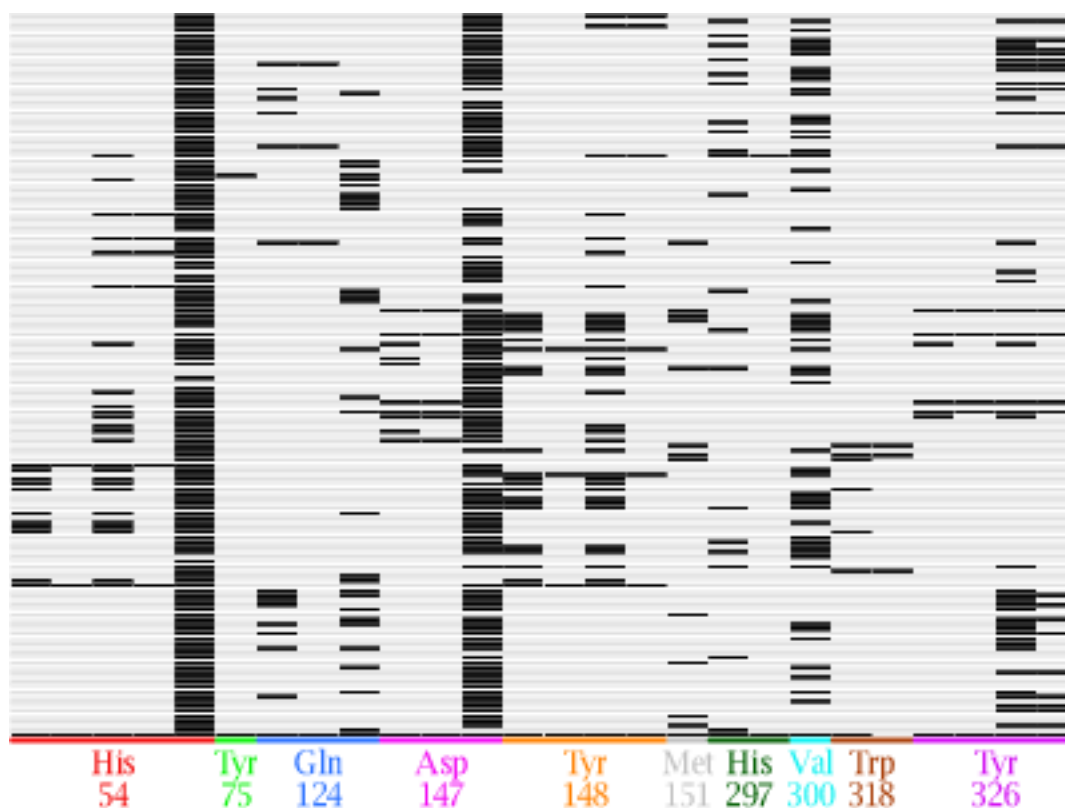


Figura 17. PLIF de los diterpenos en estudio

Como se puede observar en la **figura 17**, los aminoácidos que con mayor frecuencia presentaron interacción con los diterpenos son la His54 y Asp147. Cabe mencionar que la interacción que presentan con el Asp147 no es la misma interacción presentada en los compuestos morfínicos; en este caso con los diterpenos se presenta un desplazamiento de moléculas de agua lo que genera que haya interacciones hidrofóbicas entre el ligando y el aminoácido Asp147, también es de notar que la orientación del furano de los diterpenos se orienta preferentemente hacia la parte extracelular del receptor opioide Mu. Para comparar la forma de unión de los compuestos de tipo morfínico se realizó un acoplamiento entre el sitio activo del receptor y el diterpeno **4** con el ligando co-cristalizado BU72, en la **figura 18** se muestra la comparación de ambos acoplamientos.

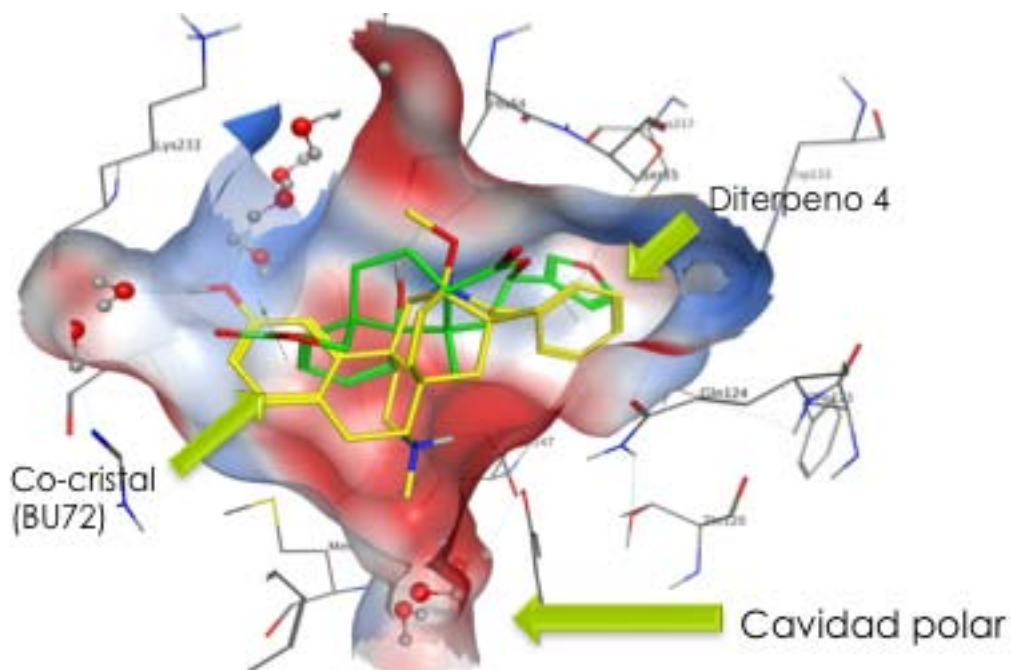


Figura 18. Acoplamiento del diterpeno 4 (verde) comparado con el ligando co-cristalizado BU72 (amarillo)

En la **figura 18** se puede apreciar la orientación relativa que se tiene con el diterpeno **4** y el compuesto BU72 que se presenta en el cristal. Resulta alentador que la parte aromática del diterpeno **4** el cual es un furano se encuentra en la misma región que la sección aromática del compuesto BU72. En la imagen también puede observarse una cavidad polar, la cual está formada por moléculas de agua y que, a pesar de no tener interacción con ningún fragmento de los dos compuestos, es relevante en la afinidad del receptor. El modelo de acoplamiento del diterpeno **4** se muestran en la **figura 19**.

□

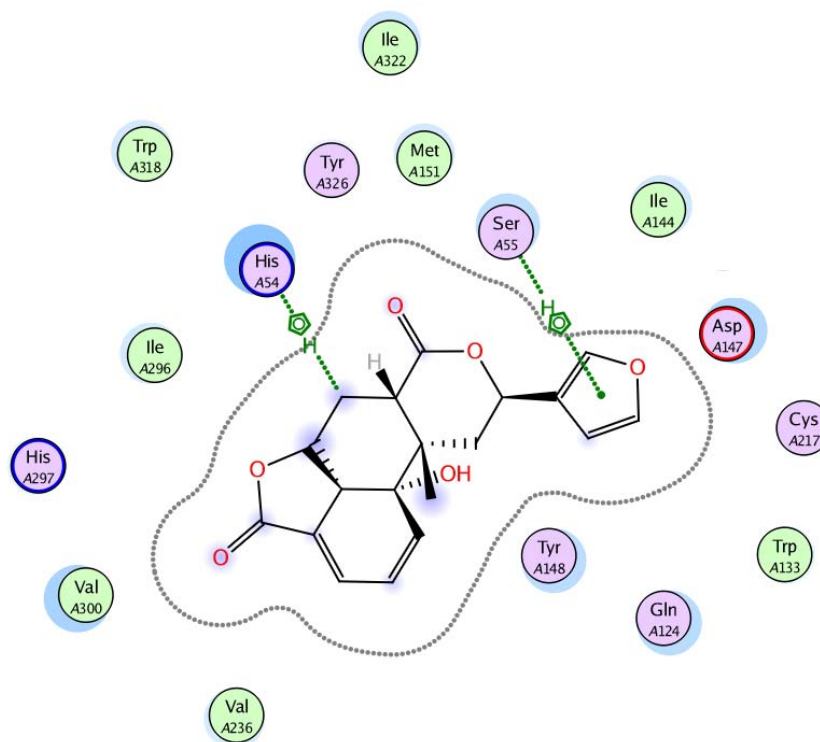


Figura 19. Interacciones en dos dimensiones del diterpeno 4 en el sitio de activo del receptor opioide Mu

Como se mencionó en la **figura 17**, las interacciones más notables entre los diterpenos y el receptor son con la His54 y el Asp147; en el diterpeno **4** se puede apreciar también que el furano presenta una interacción de tipo CH- π con el aminoácido Ser55 (**figura 19**).

En la **figura 20** se presentan las orientaciones de los cinco diterpenos en estudio en el receptor opioide Mu en donde se observa la posición del furano hacia la zona extracelular del receptor opioide Mu. Estas orientaciones son bien reportadas para la Salvinorina A en el receptor opioide Kappa⁷⁴.

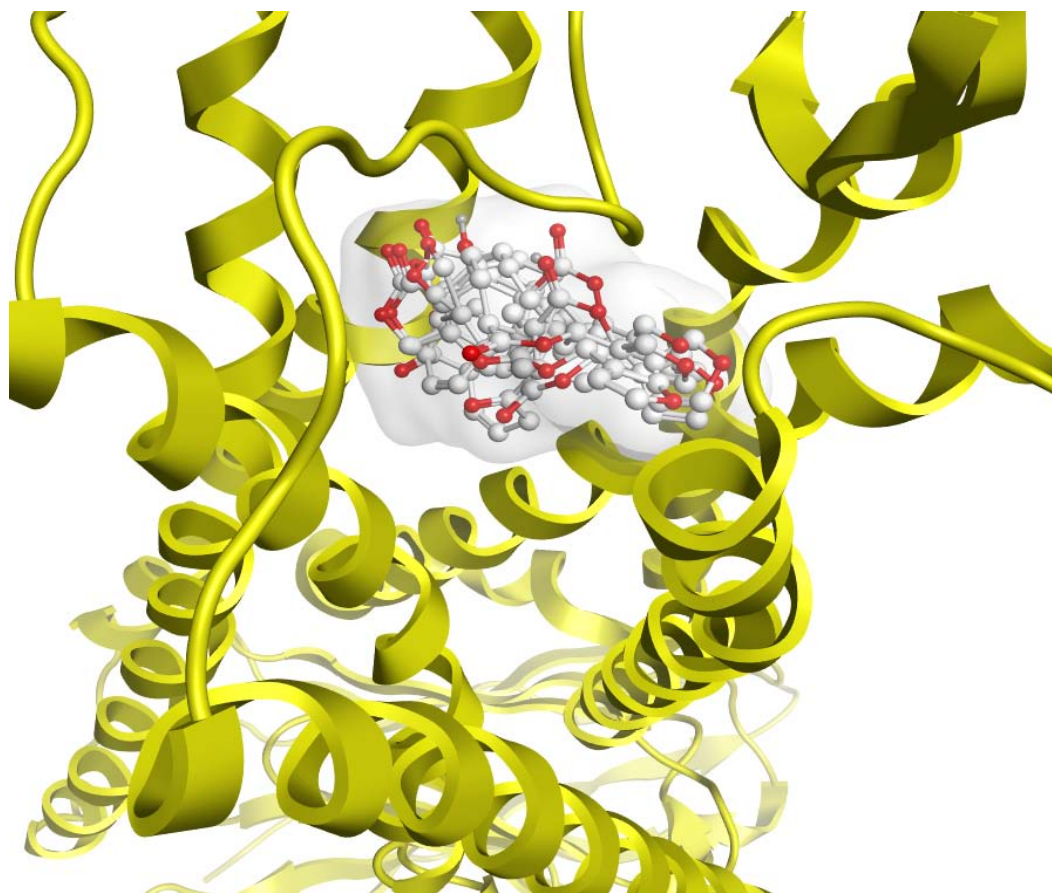


Figura 20. Vista extracelular del receptor opioide Mu con los cinco compuestos alineados de la misma forma en el sitio activo.

Los modos de unión obtenidos por los compuestos diterpénicos sugieren una complementariedad tanto de forma como de carácter electrostático en el receptor opioide Mu sugiriendo así la posible afinidad de estos compuestos aislados de *Salvia microphylla* al receptor opioide Mu, dando sustento a su actividad antitusiva y antidiarreica, que son características de la interacción con este receptor.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se abordó el estudio de una serie de derivados de la morfina, dado que la diferencia en actividad de los 40 derivados morfínicos es pequeña. Estos compuestos pueden considerarse equipotentes. Por lo tanto, nuestro criterio de análisis se basó tanto en la afinidad de los compuestos como en su perfil fisicoquímico. De los cuales de 40 moléculas derivadas, solamente **M1**, **M4** y **M8** tienen una actividad biológica importante, incluso mayor que la propia morfina y que estos compuestos cumplen con las reglas de Lipinski.

Con respecto a los diterpenos, fue posible generar la hipótesis del modo de unión de estos compuestos. Las muestras físicas de estos compuestos son polvos estables, por lo que, a manera de perspectiva se evaluarán experimentalmente en el receptor opioide μ y así verificar nuestra hipótesis de su efecto agonista.

Dado que la Salvinorina A se une al receptor opioide kappa en un sitio alostérico muy cercano al sitio de unión, es necesario explorar una región amplia del receptor, tal como se hizo en este trabajo. La búsqueda puede ampliarse incluso a regiones más cercanas a la zona extracelular y extender así la zona explorada de unión.

En cuanto a los descriptores de biodisponibilidad oral $MlogP$ y T_{PSA} , se recomiendan mejorar sus valores ideando las estrategias para adicionar grupos que le confieran características farmacológicas, pero cuidando que el peso molecular del compuesto no se exceda de 500 g/mol, de este modo se podría solventar la posible retención de los compuestos en el proceso de excreción y que se generen de este modo la menor cantidad de metabolitos en el hígado que puedan llegar a ser tóxicos.

Los modos de unión aquí descritos son razonables, lo cual da soporte a su veracidad. La incorporación de flexibilidad del receptor permitirá evaluar la estabilidad del complejo ligando-receptor. Estos estudios se están realizando en nuestro grupo de trabajo mediante dinámica molecular.

El modelado molecular continúa su evolución aplicando una gran variedad de métodos computacionales al problema de identificar las complejas relaciones existentes entre estructuras moleculares y actividades biológicas en términos de interacciones entre los átomos constituyentes. El fin último de utilizar estas relaciones de forma predictiva para diseñar compuestos con un determinado perfil de actividad ya ha dado sus frutos en algunas ocasiones. Esta capacidad refleja la introducción tanto de nuevas metodologías como de ordenadores con la potencia suficiente para aplicar estos tratamientos al análisis de modelos moleculares detallados.

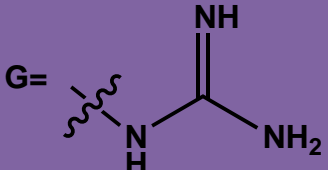
CAPÍTULO 3

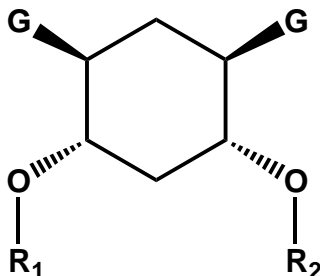
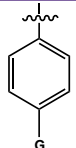
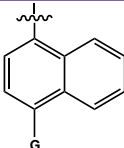
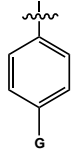
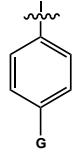
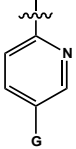
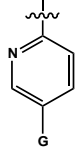
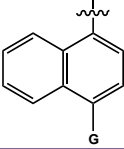
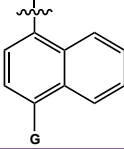
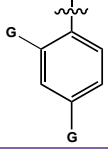
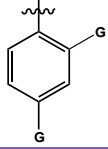
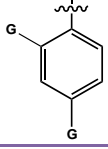
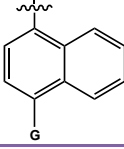
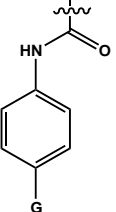
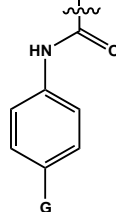
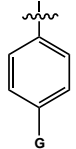
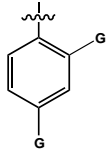
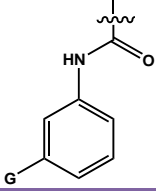
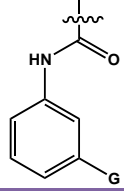
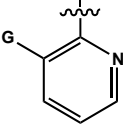
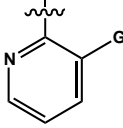
Modulación de la función de Pro-hormona Convertasas.

Las prohormona convertasas están implicadas en la liberación de neuropéptidos endógenos, incluyendo aquellos relacionados con la modulación endógena del dolor, como el péptido opioide β -endorfina. La proteína prototipo de la familia de las prohormona convertasas es la furina, por lo que ha sido estudiada desde el punto de vista farmacológico, bioquímico y estructural^{3,32}. En este apartado se muestra el análisis de las relaciones estructura-actividad de una serie de 19 compuestos derivados de la 2,5-didesoxiestreptamina con capacidad inhibitoria hacia la furina. Estos compuestos fueron sintetizados en el grupo del Dr. Guan Sheng Jiao del Departamento de Química de la compañía Hawaii Biotec. Inc. y evaluados biológicamente en el grupo de la Dra. Iris Lindberg de la Universidad de Maryland. Como resultado de esta colaboración, partes de este análisis fueron publicadas en la revista *Biochemical Pharmacology*³.

Como primer paso se analizó el modo de unión del ligando co-cristalizado, *m*-guanidometil-fenilacetil-Arg-Val-Arg-4-aminidobencilamida, con la furina. Para establecer las relaciones estructura-actividad de los compuestos, se clasificaron en 4 grupos en base al esqueleto principal de las moléculas, como se muestra en la **tabla 8**. Los compuestos de la serie 1 (1a-1m) se clasificaron dependiendo de los sustituyentes R1 y R2 al igual que los compuestos de la serie 2 (2a-2f), los valores de constantes de inhibición (K_i) son presentados en la **tabla 8**.

Tabla 8. Compuestos analizados y sus constantes de inhibición enzimática

				
Esqueleto	Nombre	R1	R2	Ki (μM)

	1a			0.006
	1b			0.012
	1c			0.042
	1d			0.069
	1e			0.169
	1f			0.404
	1g			0.812
	1h			0.89
	1i			1.768
	1j			> 100

	1k			> 100
	1l			> 100
	1m			> 100
	2d			2.7
	2a			8.3
	2e			1.2
	2b			5.5
	2f			0.4
	2c			1.5

Los cinco compuestos más potentes presentan actividades inhibitorias a esta enzima menor a 0.4 μM . Se realizó el acoplamiento molecular para postular modos de unión e interacciones relevantes entre estos compuestos y la furina. Los experimentos de acoplamiento molecular fueron realizados ocupando el programa MOE en su versión 2010 y la estructura de la furina fue extraída del PDB.

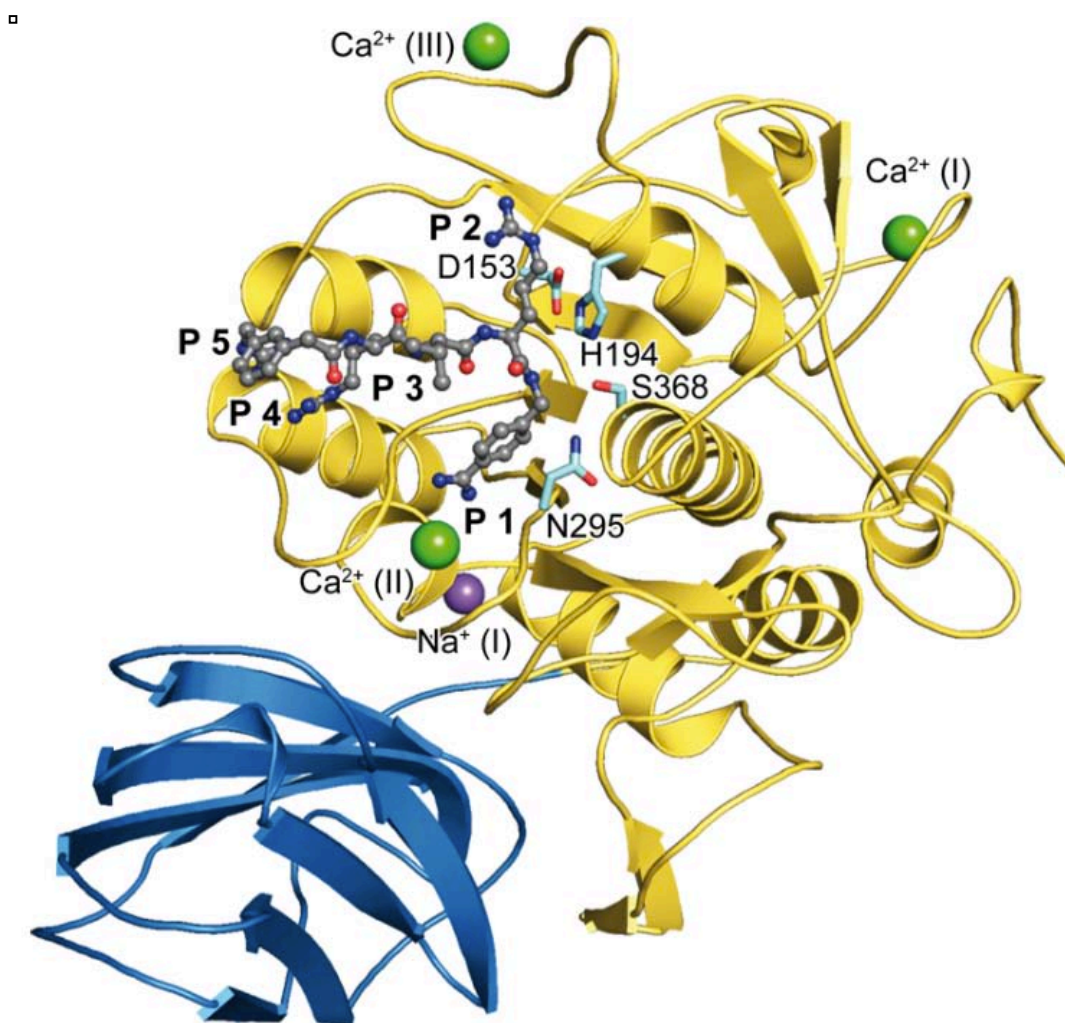


Figura 21. Estructura cristalizada de la furina⁴. Se muestra la estructura secundaria junto con el ligando co-cristalizado.

Se realizó el acoplamiento molecular del ligando co-cristalizado con furina a manera de validación. El modelo obtenido por docking reprodujo el modo de unión del ligando co-cristalizado. Se observó que las cadenas laterales P (**Figura 21**)

son similares entre nuestro modelo de acoplamiento y el ligando co-cristalizado.

Figura 22.

□

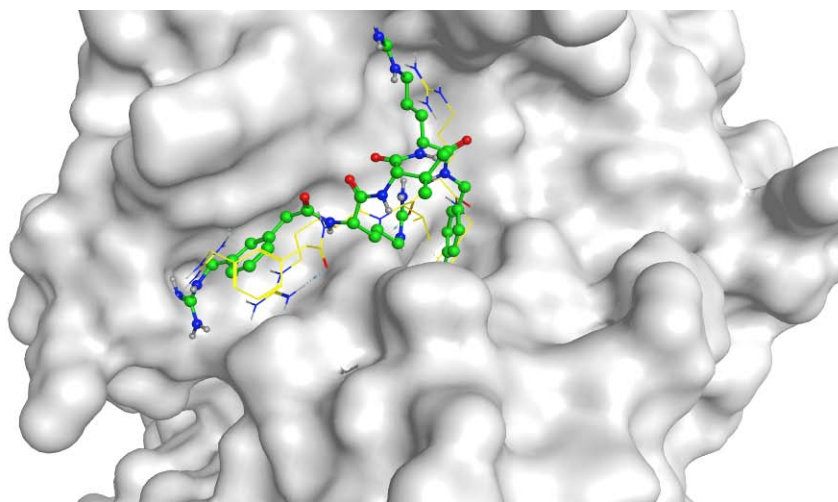


Figura 22. Orientaciones relativas del ligando co-cristalizado (amarillo) y el acoplamiento realizado con el ligando co-cristalizado en MOE (verde)

Como se menciona en los antecedentes los subsitios clave para la afinidad inhibitoria de la enzima son llamados S1, S2... ; S1 y S4 estas regiones tienen alta especificidad hacia la arginina en el proceso de reconocimiento molecular y pueden ser ocupados por cadenas con naturaleza de tipo electrostática como es la guanidina o anillos de bencilo. Es por esto que la guanidina (G) es un farmacóforo relevante, más adelante se explicará que los cambios en la orientación son de vital importancia para la afinidad hacia la enzima. En la **tabla 8** se muestran los compuestos con mayor actividad, los que tienen una actividad intermedia y los que no presentan capacidad inhibitoria hacia la furina. Los compuestos de la serie 1 y los de la serie 2 en donde los derivados más potentes en términos de inhibición de la furina son el compuesto **1a** y el **2f** con valores de 0.006 μM y 0.4 μM respectivamente. Del compuesto **1e** se pueden inferir algunos factores importantes y es que la presencia del grupo guanidina (G) en el anillo aromático en posición *para* es de vital importancia en la capacidad inhibitoria de la enzima por eso la respuesta biológica está tan definida con una constante de inhibición del orden de 6 nM. Comparando el compuesto **1e** con el compuesto **1b** que también presenta

una buena capacidad inhibitoria del orden de 0.012 μM se puede observar el hecho de que la sustitución del grupo naftilo del compuesto **1e** con la guanidina (G) en posición *para* es importante para la respuesta inhibitoria sobre la furina.

Los compuestos **1b** y **1e** pueden compararse estructuralmente con los compuestos **2b** y **2e** respectivamente, estos últimos pertenecientes a la serie 2 de los compuestos sintetizados, en estas 4 estructuras se puede notar la ausencia del par de guanidinas en el ciclohexano que corresponden a las estructuras primarias de los 4 compuestos, y se puede notar en estos casos que el compuesto **1a** con su contraparte **2b** presentan una diferencia significativa en el valor de inhibición (K_i) en donde **1b** presenta un K_i de 0.012 μM mientras que **2b** presenta un K_i de 5.5 μM . Esto nos hace pensar que la presencia de las guanidinas (G) en el ciclohexano es de vital importancia para la capacidad inhibitoria del compuesto sobre la proteína. Este hecho también puede visualizarse en los compuestos **2d** y **2a** con respecto a sus contrapartes **1b** y **1e** respectivamente en donde se puede observar que la pérdida del ciclohexano con las guanidinas (G) hace que la capacidad inhibitoria decaiga en el orden de 10000 veces la reportada para los compuestos de la serie 1, aquí también notamos que la libertad conformacional que ofrece una cadena alifática como en los compuestos **2d** y **2a** no es favorable probablemente debido a la cantidad de conformaciones y grados de libertad que ofrece sobre el sitio de unión del ligando con la proteína. Se llegó a esta conclusión observando a los compuestos **2f** y **2c** correspondientes a la serie 2 los cuales presentan actividades inhibitorias importantes y es el hecho de que si comparamos los compuestos **2a**, **2d**, **2e** y **2b** las constantes de inhibición son muy distintas a las presentadas por los compuestos **2f** y **2c**, con esto inferimos que la libertad conformacional en el esqueleto de la molécula, ya sea la cadena alifática o el ciclohexano presentes en los otros casos es poco favorable para la capacidad inhibitoria debido a que el anillo aromático es un segmento de la molécula plano y que carece de libertad conformacional y por lo tanto de grados de libertad, los sitios de unión importantes son realizados por las cadenas laterales que presentan grupos aromáticos y guanidinas (G) en posiciones *orto* y *para* y en posición *para*.

Del estudio estructura-actividad también se puede determinar que la presencia de guanidinas en la posición meta de los anillos aromáticos es desfavorable como puede notarse en los compuestos **1j**, **1k** y **1m** en donde la presencia de la guanidina (G) en posición *meta* elimina cualquier tipo de interacción importante con la proteína que pueda generar un comportamiento de inhibición. De aquí se puede concluir que la presencia de guanidinas (G) en los derivados es importante. Sin embargo cuando esta guanidina se encuentra en posición meta de los anillos aromáticos se nulifica la actividad biológica. También la presencia de un heteroátomo como el nitrógeno en los anillos aromáticos de tipo piridina como en los compuestos **1c**, **1k** y **1l** no aumentan considerablemente la afinidad hacia el receptor así como la presencia de cadenas laterales de tipo guanidin-amida como en los compuestos **1g**, **1i** y **1r**. De esto se puede concluir que para mejorar la capacidad inhibitoria hacia la furina es favorable que las cadenas laterales de la molécula cuenten con anillos aromáticos en su estructura con un grupo guanidina (G) en *orto* o *para* preferentemente en *para* y un núcleo central que de preferencia sea un ciclohexano sustituido con guanidinas para una mejor afinidad hacia los sitios de unión que se discutirán más adelante y se presentarán los mejores sitios de unión y las orientaciones adecuadas para que los compuestos presenten una actividad inhibitoria importante.

Propiedades fisicoquímicas de los derivados

Como en el capítulo anterior se realizó el estudio fisicoquímico de los derivados basándose principalmente en los valores de logP, peso molecular y área topológica de superficie polar, los resultados de estas pruebas se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de los derivados.

Name	MlogP	S+logP	S+logD	RuleOf5	RuleOf5_Code	MW	T_PSA
1a	1.303	1.206	-1.718	2	Mw,TP	546.6	266.06
1b	0.609	0.249	-2.606	1	TP	496.5	266.06
1c	-0.417	0.219	-2.869	1	TP	498.5	142.26
1d	1.884	2.156	-0.854	2	Mw,TP	596.6	324.26
1e	-0.301	0.046	-2.989	2	Mw,TP	610.6	291.84
1f	1.076	1.598	-1.637	2	Mw,TP	603.6	291.84
1g	0.552	-0.438	-2.884	2	Mw,TP	582.6	389.86
1h	0.392	0.492	-2.617	2	Mw,TP	553.6	266.06
1i	0.552	-0.359	-2.497	2	Mw,TP	582.6	327.96
1j	-0.718	0.462	-2.817	1	TP	498.5	291.84
1k	0.094	0.603	-2.647	1	TP	498.5	324.26
1l	0.554	0.53	-1.987	1	TP	384.4	142.26
1m	1.063	0.498	-2.342	2	Mw,TP	582.6	266.06
2d	1.902	1.123	-1.306	1	TP	342.4	142.26
2a	0.843	0.853	-2.03	1	TP	456.5	327.96
2e	1.12	1.287	-1.946	1	TP	496.5	266.06
2b	2.208	1.744	-1.174	1	TP	382.4	324.26
2f	1.298	1.273	-1.827	1	TP	490.5	168.04
2c	2.378	1.933	-0.698	1	TP	376.4	266.06

En cuanto a los datos obtenidos para la predicción de las propiedades fisicoquímicas de los diferentes compuestos se tiene que todos violan la regla de área topológica de la superficie polar (T_PSA) entre 142.26-389.86 Å², lo que evidencia aspectos como: una alta presencia de grupos funcionales polares tales como el átomo de oxígeno y el átomo de nitrógeno en las diferentes moléculas^{67,68}. El coeficiente de partición de Moriguchi (MlogP ≤ 4.15) presenta valores entre -0.718-2.378, este parámetro fue óptimo en todos los derivados lo cual indica que éstos compuestos presentan muy baja lipofilia y no presentarán problemas de biodisponibilidad elevada con lo cual su excreción será acelerada^{69,70}. Para el peso molecular (MW ≤ 500g/mol) se obtuvieron valores entre 342.4-610.8 g/mol, el cual si se excede podría afectar de manera directamente proporcional la permeabilidad a través de la barrera intestinal y vascular⁷¹, solo algunos compuestos violaron este criterio. Se concluyó que todos

los compuestos evaluados cumplen con un buen potencial farmacológico, con estos parámetros claros se decidió continuar con el estudio *in silico*.

Optimización de geometría molecular

Los 19 derivados se sometieron a optimizaciones geométricas con el fin de encontrar las conformaciones moleculares de mínima energía, en donde se ajustan las coordenadas atómicas para encontrar una configuración en la cual la red de fuerzas sobre los átomos se reduzca a cero.

Tabla 10. Predicción conformeros de menor energía

Compuesto	ENERGÍA (Kcal/mol)	Gradiente (Kcal/mol)
1a	123.527026	0.009121
1b	122.334327	0.009643
1c	122.422751	0.009312
1d	123.635811	0.009122
1e	122.352671	0.009213
1f	123.726026	0.009816
1g	124.652619	0.009714
1h	123.536126	0.009218
1i	124.661319	0.009174
1j	122.426711	0.009931
1k	121.922345	0.009114
1l	122.822342	0.009223
1m	125.021352	0.009415
2d	109.871578	0.009122
2a	108.823882	0.009123
2e	107.236541	0.009313
2b	108.223521	0.009421
2f	104.154578	0.009254
2c	105.1657792	0.0096524
co-cristal⁴	102.257153	0.009254

De acuerdo a las geometrías optimizadas para cada compuesto (**Tabla 10**) se establece que los derivados presentan energías similares a la presentada por el ligando co-cristalizado.

Estudio de acoplamiento molecular (docking molecular)

Los estudios de acoplamiento molecular se llevaron a cabo para predecir la orientación y conformación que corresponda al mínimo local de energía libre de unión de los derivados sobre furina. Los estudios se realizaron utilizando el software MOE en su versión 2010 aplicando búsqueda conformacional. Se realizaron 40 corridas por compuesto en el sitio de unión de la enzima. De inicio se realizó un docking con el ligando co-cristalizado *m*-guanidometil-fenilacetil-Arg-Val-Arg-4-aminidobencilamida, a modo de corroborar que el método empleado era el apropiado (**Figura 22**) para las corridas que se realizaron con cada uno de los 19 compuestos evaluados de la serie 1 y la serie 2. El ligando co-cristalizado actúa como un inhibidor competitivo sobre el sitio catalítico de la enzima. Se realizó el acoplamiento molecular de los derivados estudiados y se generó un PLIF (**Figura 23**).

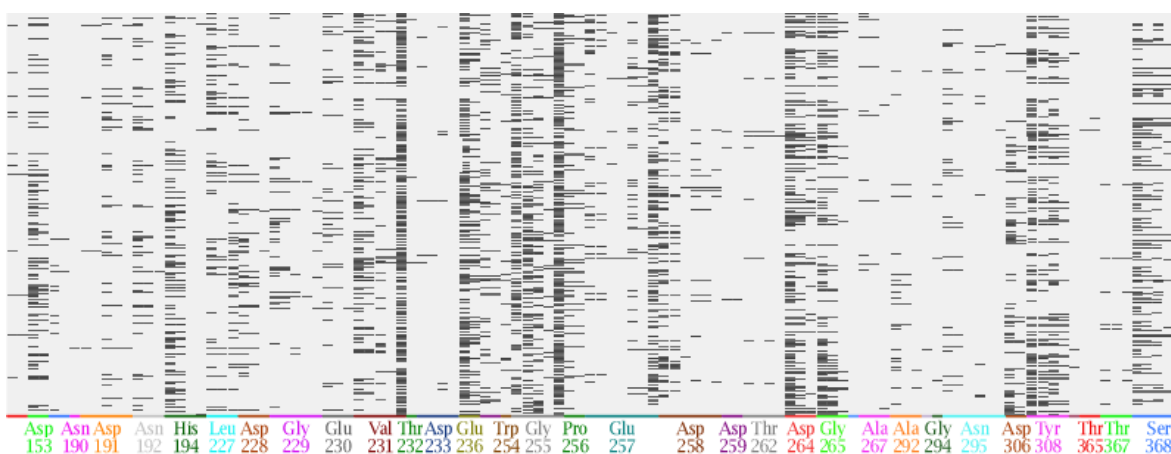


Figura 23. PLIF de salidas de docking de los derivados sobre la furina

En la **figura 23**, se pueden apreciar las interacciones preferidas dentro de la furina. Es notable la alta población que se tiene en interacciones importantes, por

ejemplo: la interacción con Asp153, His194 y Ser 368 los cuales son aminoácidos que forman la triada de la enzima, en donde se realiza catálisis de la enzima. También hay una alta población en las interacciones con Gly255, Asp 306 y Pro256 los cuales forman el subsitio S1 de la furina y que incrementa notablemente la afinidad y la actividad inhibitoria³². El subsitio S4 también presenta interacciones importantes con los derivados como se muestra en la alta población con respecto a Glu236, Asp264, Trp254 y Tyr308. Sin embargo son pobres las interacciones con el subsitio S2. Para verificar más a detalle las interacciones que se realizan nos centramos en los compuestos que no presentan actividad los cuales corresponden a la serie 1 y son **1j**, **1k**, **1l** y **1m**. Las orientaciones relativas entre estos cuatro compuestos y el ligando co-cristalizado se presentan en la **figura 24**.

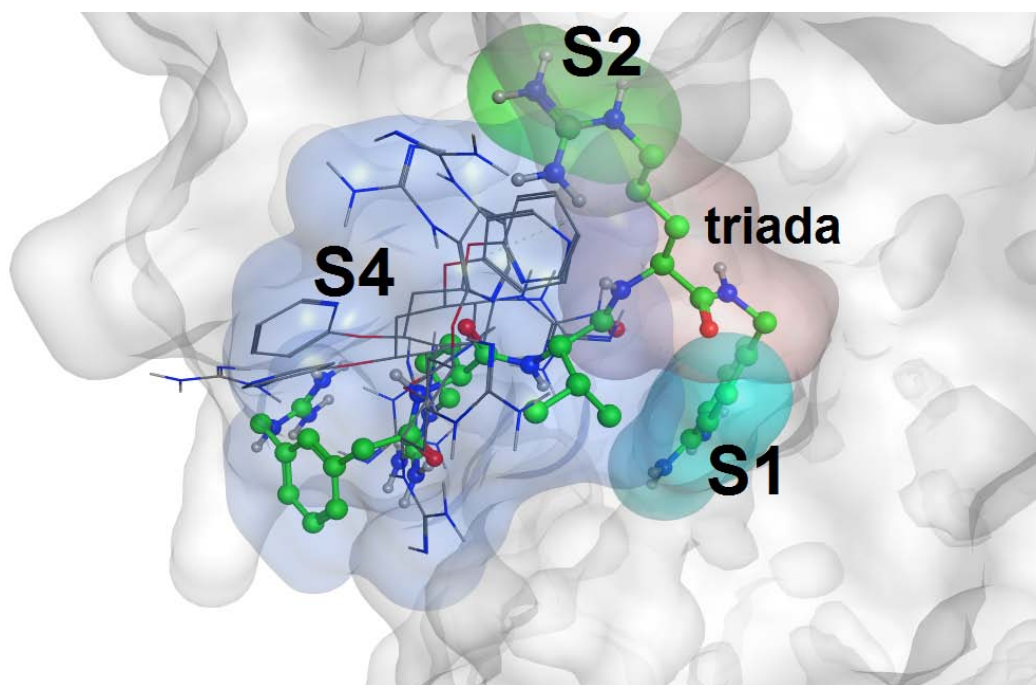


Figura 24. Orientaciones relativas de los derivados que no presentan actividad y el co-cristal (verde)

Como se aprecia en la **figura 24**, los compuestos que no presentan actividad sobre la furina tienen poca interacción con subsitios importantes y selectivos como son S1, S2 y la triada, también puede observarse la interacción que tiene el

ligando co-cristalizado con el subsitio S1 y que este si presenta todas las interacciones clave para la inhibición, esto explica la nula actividad que exhiben los compuestos **1j-1m**.

Con respecto a los derivados de la serie 1 que si presentan actividad biológica sobresaliente, son los compuestos **1a** y **1b**, analizando los acoplamientos que se realizaron para estos derivados puede observarse lo siguiente:

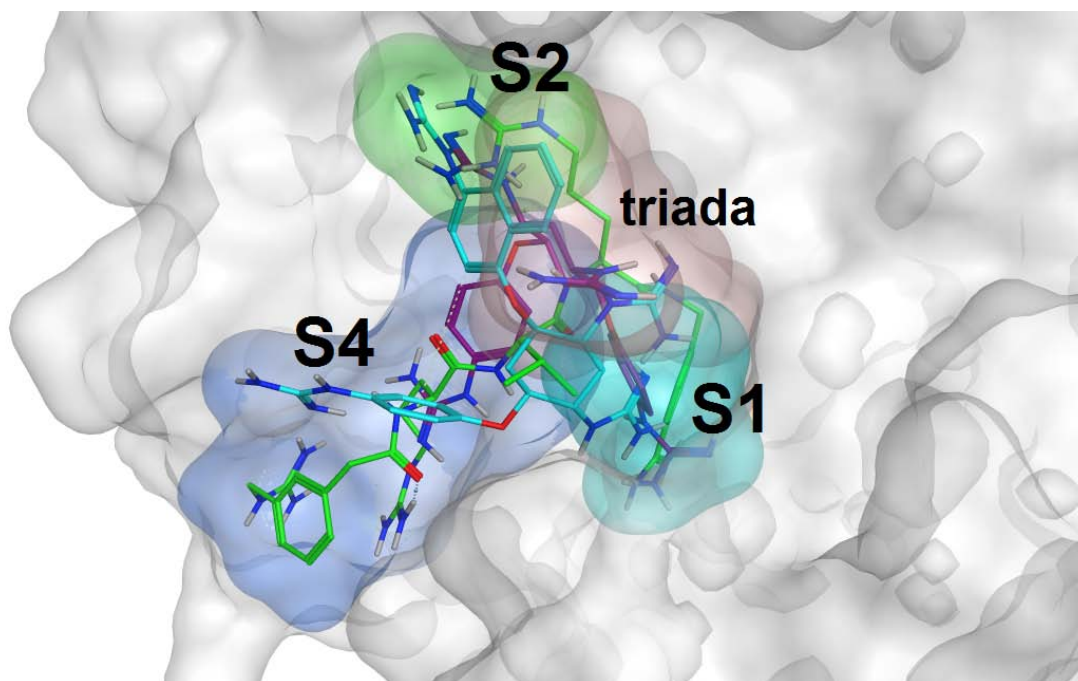


Figura 25. Orientaciones relativas de los derivados **1a** (azul), **1b** (morado) y el co-cristal (verde)

Las orientaciones mostradas en la **figura 25** son clave para definir la razón por la cual estos derivados **1a** y **1b** son tan activos con valores de 0.006 nM y 0.012 nM respectivamente. Es claro que estos derivados interactúan con todos los sitios con los que el co-cristal interactúa, y es notable la interacción en el subsitio S1 de la furina. Se puede observar también que las orientaciones de los grupos guanidino tienen preferencia sobre subsitios como son el S1 y el S2 como se define en los antecedentes, estos subsitios prefieren grupos electroattractores y con un pH ligeramente ácido.

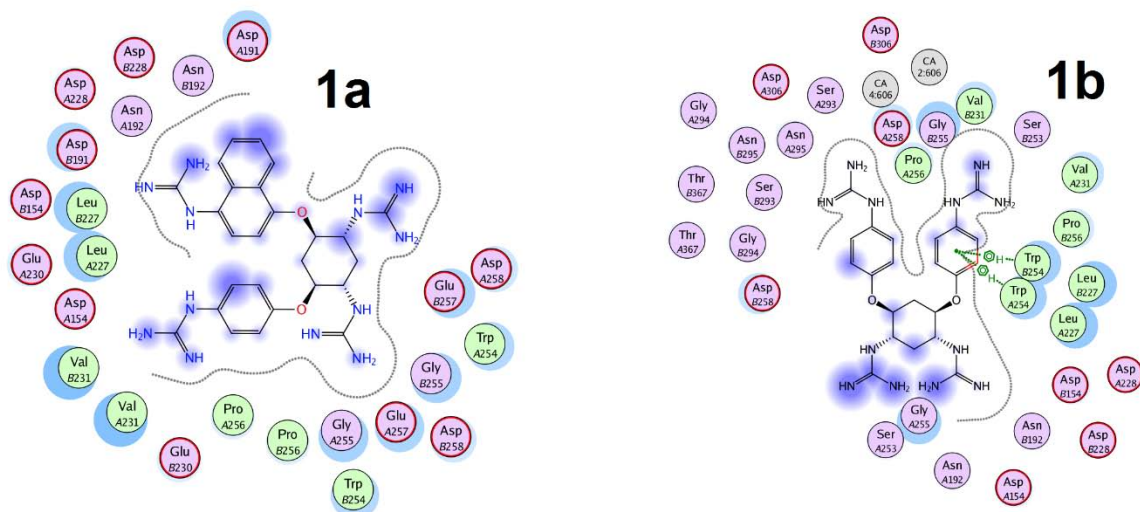


Figura 26. Interacciones con la furina

En la figura anterior se presenta un diagrama de interacciones en 2D en donde se aprecian los complejos enzima-ligando formados y los aminoácidos implicados en esta afinidad; en el compuesto 1b hay interacciones fuertes de tipo $\pi-\pi$ entre uno de los anillos aromáticos y el Trp254, de igual forma interacciones entre los grupos guanidino y el Asp258 que son esenciales en la afinidad del subsitio S1. En el diagrama de interacciones de 1b se observan los átomos de calcio y los complejos metálicas que se forman entre estos y los aminoácidos presentes.

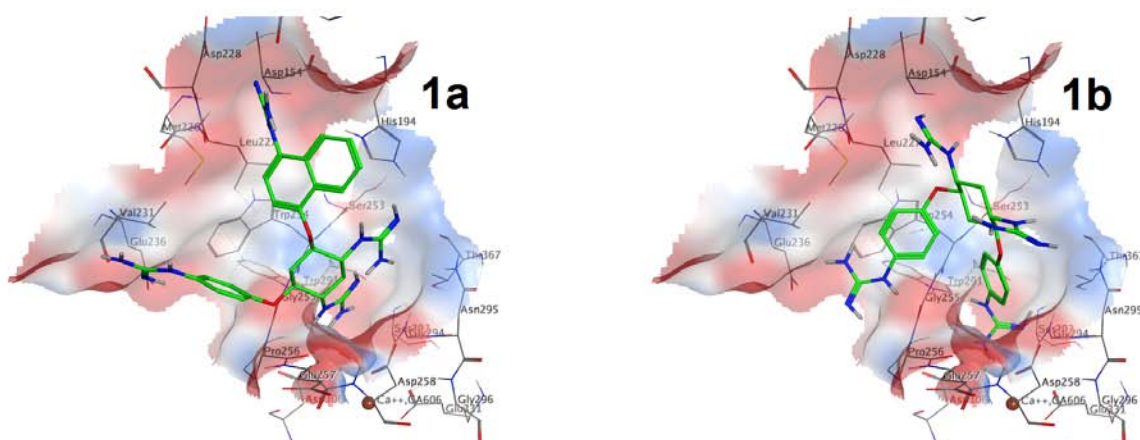


Figura 27. Potenciales electrostáticos en el complejo enzima-ligando con los compuestos 1a y 1b

En la **figura 27**, se muestra el sitio de unión enzima-ligando y se muestran los potenciales electrostáticos, en rojo son zonas ricas en densidad electrónica mientras que en azul son deficientes de densidad electrónica. Por esta razón, las guanidinas presentes en los ligandos se orientan hacia las zonas rojas, las guanidinas como se explicaba en el estudio SAR realizado anteriormente son muy importantes debido la presencia de grupos con alta densidad electrónica del sitio de unión. En esta figura se observan las interacciones descritas en el diagrama en dos dimensiones. Con respecto a la serie 2 de los derivados estudiados se tiene un compuesto que exhibe una actividad biológica notable y es el compuesto **2f**, el docking de este ligando fue ampliamente discutido en el artículo publicado³ y se discutirá a continuación:

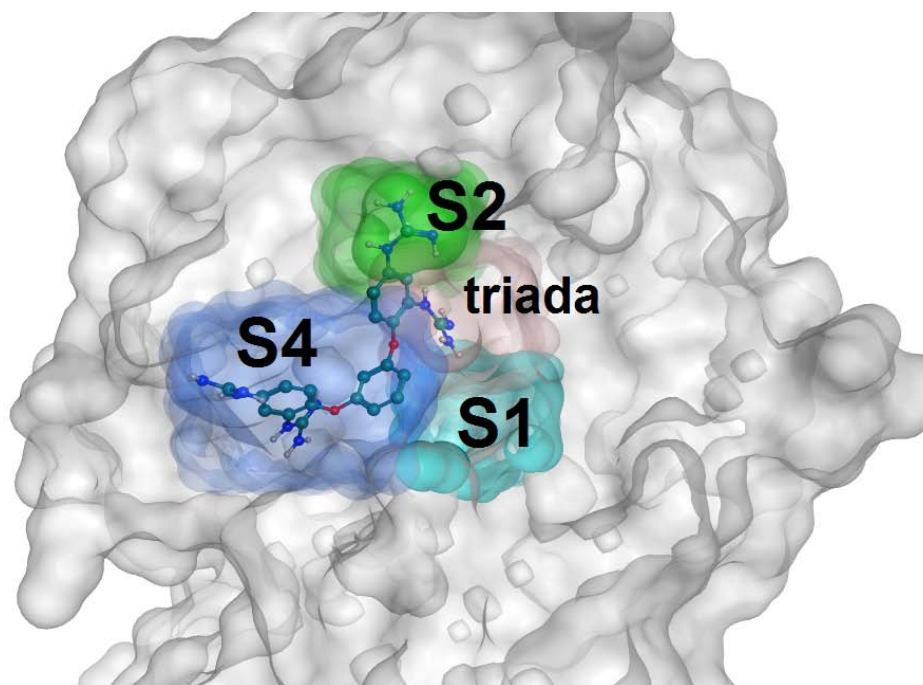


Figura 28. Orientación del ligando **2f** sobre el sitio de unión de la furina

Anteriormente se hizo hincapié en la importancia de grupos cargados en inhibidores furina. En la **figura 28** se muestra la orientación del compuesto **2f**. Esta molécula resulta ser la más activa entre los compuestos análogos de la serie 2. Se

muestra cómo el compuesto **2f** es capaz de orientarse de manera favorable hacia el subsitio S2, también en el subsitio S4 y en la triada. Estos subsitios son relevantes para la especificidad. Sin embargo, el subsitio S1 está desocupado. Esto podría ser la razón, al menos en parte, para la disminución de la potencia inhibidora mostrada por este compuesto en comparación con la inhibición exhibida por otros congéneres 2,5-didesoxistreptamina tales como el compuesto **1a** y el **1b** que si presentan interacción directa sobre el subsitio S1.

CONCLUSIONES

Se estudió un grupo de 19 didesoxiestreptaminas como inhibidores de la furina. La síntesis y evaluación biológica se realizó gracias a la colaboración con los grupos de los doctores Guan Sheng Jiao y Iris Lindberg. Los compuestos 1a, 1b y 2f compuestos tuvieron la mayor capacidad inhibitoria hacia la enzima.

Se realizaron estudios de acoplamiento molecular, identificando factores estructurales determinantes de la unión enzima-ligando sobre la furina. Se logró determinar la importancia de la interacción sobre los subsitios S1 y S2, los cuales son claves para la capacidad inhibitoria de los derivados.

Cabe mencionar que una de las debilidades de los modelos de docking son las funciones utilizadas para el cálculo de las energías de acoplamiento. Dado que el proceso de reconocimiento molecular de las didesoxiestreptaminas en furina recae fuertemente en interacciones de tipo electrostático, sería conveniente considerar, por ejemplo, las fluctuaciones en la polarización de las distribuciones electrónicas de átomos y moléculas, así como la dependencia de la distribución de cargas atómicas con la conformación.

Los métodos de modelado molecular actualmente disponibles son posiblemente suficientes para tratar de solucionar multitud de problemas interesantes, aunque requieren buenas dosis de creatividad, ingenio y experiencia.

Los modelos pueden ayudar a mejorar la percepción del problema bioquímico o farmacológico estudiado y pueden sugerir la realización de nuevos experimentos. En el mejor de los casos, proporcionan guías cualitativas, y en ocasiones cuantitativas, para el diseño de nuevos compuestos.

Además de la afinidad sobre una diana en particular, el contar con distintas cabezas de serie permite visualizar diferentes modos de unión; es por esto, que en el caso particular de la furina resulta atractiva la búsqueda de nuevos esqueletos moleculares, manteniendo los grupos electropositivos como la guanidina en

orientaciones apropiadas. Esto incrementará el repertorio molecular disponible para la generación de moléculas con diferentes perfiles farmacológicos y toxicológicos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Barquera-Lozada, J. E.; Cuevas, G. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 874.
- (2) Ortega, A.; Blount, J. F.; Manchand, P. S. *J. Chem. Soc.* **1982**, *1*, 2505–2508.
- (3) Ramos-Molina, B.; Lick, A. N.; Blanco, E. H.; Posada-Salgado, J. A.; Martinez-Mayorga, K.; Johnson, A. T.; Jiao, G.-S.; Lindberg, I. *Biochemical Pharmacology* **2015**, *96*, 107.
- (4) Dahms, S. O.; Harges, K.; Becker, G. L.; Steinmetzer, T.; Brandstetter, H.; Than, M. E. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1113–1118.
- (5) Nieto-Draghi, C.; Fayet, G.; Creton, B.; Rozanska, X.; Rotureau, P.; Hemptinne, J.-C. d.; Ungerer, P.; Rousseau, B.; Adamo, C. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 13093.
- (6) Hansch, C. e. a. *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constraints*, 1995.
- (7) I, M.; S, H.; Q, L.; I, N.; Y, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 127.
- (8) Barquera-Lozada, J. E.; Quiroz-García, B.; Quijano, L.; Cuevas, G. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2139.
- (9) Richards, J. H.; Hendrickson, J. B. *The biosynthesis of steroids, terpenes and acetogenins* New York, 1964.
- (10) Gao, D.; Pan, Y.-K.; Byun, K.; Gao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4045.
- (11) Rajamani, R.; Gao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12768.
- (12) Allermann, R. K.; Young, N. J.; Ma, S.; Truhlar, D. G.; Gao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *128*, 13008.
- (13) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 295.
- (14) Kurti, L.; Chein, R. J.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9031.
- (15) Jenson, C.; Jorgensen, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846.
- (16) Hess, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10286.
- (17) Khasenov, B. B.; Turdybekov, K. M. *Chem. Nat. Prod.* **2001**, *37*, 451.
- (18) Sheridan, R. P.; Venkataraghavan, R. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 322.
- (19) Langridge, R.; Ferrin, T. E.; Kuntz, I. D.; Connolly, M. L. *Science* **1981**, *211*, 661.
- (20) Hopfinger, A. J. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1133.
- (21) Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. *Nature* **1958**, *181*, 662.
- (22) Wuthrich, K. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 55.
- (23) Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. B.; Meyer, E. F. J.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *J. Molec. Biol.* **1977**, *112*, 535.
- (24) Lolis, E.; Petsko, G. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 597.
- (25) Seidah, N. G.; Chretien, M. *Brain Res.* **1999**, *848*, 45.
- (26) Steiner, D. F. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 31.
- (27) Rouille, Y.; Bianchi, M.; Irminger, J. C.; Halban, P. A. *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 119.
- (28) Bennett, B. D.; Denis, P.; Haniu, M.; Teplow, D. B.; Kahn, S.; Louis, J. C.; Citron, M.; Vassar, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275.
- (29) Coppola, J.; Bhojani, M. S.; Ross, B. D.; Rehemtulla, A. *Neoplasia* **2008**, *10*.

- (30) Henrich, S.; Cameron, A.; Bourenkov, G. P.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Lindberg, I.; Bode, W.; Than, M. E. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*.
- (31) Schechter, I.; Berger, A. *Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*.
- (32) F., L.-V.; K., M. n.-M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4462.
- (33) Fugere, M.; Day, R. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*.
- (34) Bontemps, Y.; Scamuffa, N.; Calvo, F.; Khatib, A. M. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*.
- (35) Cameron, A.; Appel, J.; Houghten, R. A.; Lindberg, I. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*.
- (36) Kacprzak, M. M.; Peinado, J. R.; Than, M. E.; Appel, J.; Henrich, S.; Lipkind, G.; Houghten, R. A.; Bode, W.; Lindberg, I. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*.
- (37) Becker, G. L.; Sielaff, F.; Than, M. E.; Lindberg, I.; Routhier, S.; Day, R.; Lu, Y.; Garten, W.; Steinmetzer, T. *J. Med. Chem.* **2010**, *43*.
- (38) Scior, T.; Medina-Franco, J. L.; Do, Q. T.; Martinez-Mayorga, K.; Rojas, J. A. Y.; Bernard, P. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*.
- (39) Kolb, P.; Irwin, J. J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*.
- (40) Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wei, B. Q.; Irwin, J. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*.
- (41) Holden, K. G.; Tidgewell, K.; Marquam, A.; Rothman, R. B.; Navarro, H. n.; Prinszano, T. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *17*, 6111.
- (42) Domínguez, V. G.; Berlin, B.; Castro, R. A. E.; Estrada, L. E. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, 2002; Vol. 73, p 39–80.
- (43) Kamatou, G. P. P.; Makunga, N. P.; Ramogola, W. P. N.; Viljoen, A. M. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 664–672.
- (44) Topçu, G.; Türkmen, Z.; Ulubelen, A.; Schilling, J. K.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 118–121.
- (45) Gödkil, G.; Topçu, G.; Sönmez, U.; Ulubelen, A. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 799–800.
- (46) Moghaddam, F. M.; Farimani, M. M.; Seirafi, M.; Taheri, S.; Khavasi, H. R.; Sendker, J.; Proksch, P.; Wray, V.; Edrada, R. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1601–1605.
- (47) Xu, G.; Yang, J.; Wang, Y. Y.; Peng, L. Y.; Yang, X. W.; Pan, Z. H.; Liu, E. D.; Li, Y.; Zhao, Q. S. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12157–12161.
- (48) Calzada, F.; Yopez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Bautista, E.; Maldonado, E.; Ortega, A. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 662–665.
- (49) Bisio, A.; Damonte, G.; Fraternali, D.; Giacomelli, E.; Salis, A.; Romussi, G.; Cafaggi, S.; Ricci, D.; De Tommasi, N. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 265–275.
- (50) Bautista, E.; Maldonado, M.; Ortega, A. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1088.
- (51) Hendrickson, J. B. *Tetrahedron* **1959**, *7*, 82.
- (52) Barton, D. H. R.; Bockmann, O. C.; de Mayo, P. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2263.
- (53) Ruzicka, L. *Pure Appl. Chem.* **1963**, *6*, 493.
- (54) Parker, W.; Roberts, J. S.; Ramaje, R. *Quart. Rev.* **1967**, *21*, 331.
- (55) Herz, W. *J. Chem. Soc.* **1971**, *16*, 32.
- (56) Hanson, J. R. *Terpenoid Biosynthesis in Comprehensive Organic Chemistry* New York, 1979.
- (57) Geissman, T. A. *Adv. Phytochem.* **1973**, *6*, 65.
- (58) Fischer, N. H.; Oliver, E. J.; Fischer, H. D. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1979**, *38*, 77.

- (59) Cane, D. E. *Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*; Elsevier: Oxford, 1999; Vol. 2.
- (60) Goodwin, T. W. *Natural substances formed biologically from mevalonic acid*; Academic Press: New York; Vol. 29.
- (61) Eguchi, M. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*.
- (62) Yongye., A. B.; Appel., J. R.; Giulianotti., M. A.; Dooley., C. T.; Medina-Franco., J. L.; Nefzi., A.; Houghten., R. A.; Martínez-Mayorga., K. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5583.
- (63) Cirilo, A.; Llombart, C.; Tamargo, J. *Introducción a la química terapéutica. 2a ed.*; Ediciones Díaz de Santos: Barcelona, 2003.
- (64) Peniche, A. *Revista Teoría y Praxis Investigativa* **2011**, *6*, 77.
- (65) Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B.; Feeney, P. *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, 4.
- (66) Oprea T, I.; Davis A, M.; Teague S, J.; Leeson P, D. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1308.
- (67) Sangshetti, J.; Kalam Khan, F.; Chouthe, R.; Damale, M.; Shinde, D. *Chinese Chemical Letters* **2014**, *25*, 1033.
- (68) Lubes, G. *Avances en Química.* **2009**, *4*, 101.
- (69) Scherrer, R.; Donovan, S. *Analytical chemistry* **2009**, *81*, 2768.
- (70) Carolina, L.; Talevi, A.; Bruno-Blanch, L. *Lat. Am. J. Pharm.* **2007**, *26*, 244.
- (71) Pardridge, W. *The Japanese journal of pharmacology* **2001**, *87*, 97.
- (72) Huang., W.; Manglik., A.; Venkatakrisnan., A. J.; Laeremans., T.; Feinberg., E. N.; Sanborn., A. L.; Kato., H. E.; Livingston., K. E.; Thorsen., T. S.; Kling., R. C.; Granier., S.; Gmeiner., P.; Husbands., S. M.; Traynor., J. R.; Weis., W. I.; Steyaert., J.; Dror., R. O.; Kobilka., B. K. *Nature* **2015**, *524*, 315.
- (73) McLeod, R. L.; Tulshian, D. B.; Hey, J. A. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2003**, *13*.
- (74) Roth., B. L.; Baner., K.; Westkaemper., R.; Siebert., D.; Rice., K. C.; Steinberg., S.; Ernsberger., P.; Rothman., R. B. *PNAS* **2002**, *99*.

7. ANEXOS

Coordenadas cartesianas y energías de los diterpenos estudiados de *Salvia microphylla*, sus intermediarios y los estados de transición calculados en el nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p).

Tabla SI1. Coordenadas cartesianas de 1 al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9648066 hartrees). Zero point energy 0.339845 hartrees.

C	-4.865867	-8.039118	-1.025463
C	-4.054319	-7.833167	0.162852
C	-2.929795	-7.135437	0.439350
C	-4.734612	-4.907004	-1.097408
C	-4.663210	-5.789805	-2.099994
C	-5.155123	-7.165108	-2.001313
C	-2.074548	-6.259625	-0.402361
C	-4.051444	-3.553288	-1.124273
C	-2.512107	-3.791064	-1.028996
C	-2.096611	-4.791756	0.071443
C	-3.749768	-1.412469	0.284873
C	-4.501110	-2.730947	0.106274
H	-1.027666	-6.638030	-0.385952
H	-5.298842	-9.051873	-1.070774
H	-4.206263	-5.542866	-3.063005
H	-5.797141	-7.474897	-2.834430
H	-2.768367	-4.671443	0.945118
H	-3.734668	-1.106108	1.364593
H	-5.590017	-2.530291	0.036178
H	-2.373659	-6.338829	-1.470575
H	-1.082110	-4.530688	0.443298
H	-2.156833	-4.180843	-2.019965
H	-4.373712	-3.344339	1.022517
H	-5.243698	-5.163848	-0.166856
C	-4.380492	-2.811024	-2.426493
H	-4.111499	-3.392139	-3.315070
H	-5.453632	-2.593393	-2.496135
H	-3.858986	-1.848406	-2.499471
C	-4.473974	-8.574400	1.404098
O	-5.380438	-9.316043	1.651601
O	-3.552106	-8.268725	2.424565
C	-2.531724	-7.375517	1.885665
H	-1.570161	-7.904757	2.000844
H	-2.552625	-6.472192	2.517494
C	-1.761649	-2.496240	-0.775350
O	-0.638584	-2.258725	-1.150028
O	-2.319523	-1.516585	0.019035
C	-4.252673	-0.280617	-0.550131
C	-3.501098	0.620073	-1.266229
C	-5.636315	0.113780	-0.707218
O	-4.329247	1.560752	-1.878308
H	-2.458159	0.764781	-1.455714
C	-5.636895	1.221679	-1.511183
H	-6.478559	-0.380074	-0.264638
H	-6.371273	1.879412	-1.919324

Tabla SI2. Coordenadas cartesianas de TS_{1-6} al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9249665 hartrees). Zero point energy 0.338184 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-280.47 cm^{-1}).

C	3.717432	1.420235	-0.852207
C	3.493450	0.188100	-0.371256
C	2.348671	-0.322362	0.386805
C	0.658312	1.141688	-0.494463
C	1.420927	2.358471	-0.773825
C	2.754809	2.514911	-0.820860
C	2.092229	0.065217	1.795757
C	-0.376001	1.212655	0.603374
C	-0.479467	-0.099451	1.436250
C	0.735283	-0.413041	2.326846
C	-2.256964	0.209978	-0.868846
C	-1.776087	1.410906	-0.049975
H	2.899798	-0.343031	2.447825
H	4.642433	1.627186	-1.410140
H	0.785818	3.237098	-0.968486
H	3.183830	3.510068	-0.969545
H	0.774112	-1.511784	2.507097
H	-2.028327	0.335143	-1.958831
H	-2.513317	1.651735	0.743960
H	2.169957	1.174961	1.896899
H	0.570830	0.042493	3.324757
H	-1.365078	0.010114	2.124505
H	-1.758040	2.306864	-0.700217
H	0.445689	0.490707	-1.334369
C	-0.130140	2.389792	1.566320
H	0.905174	2.376831	1.942268
H	-0.284863	3.358733	1.080472
H	-0.792757	2.356663	2.437077
C	4.296076	-1.008951	-0.780655
O	5.411390	-1.131884	-1.205536
O	3.490712	-2.138998	-0.624212
C	2.178829	-1.752410	-0.071999
H	1.977816	-2.491194	0.724438
H	1.450647	-1.890729	-0.890886
C	-0.805196	-1.268853	0.533136
O	-0.462778	-2.419395	0.680859
O	-1.554208	-1.041348	-0.601483
C	-3.708485	-0.076550	-0.665996
C	-4.294036	-1.288657	-0.392662
C	-4.779973	0.891817	-0.766453
O	-5.678692	-1.145943	-0.305149
H	-3.946763	-2.289159	-0.241435
C	-5.944345	0.208081	-0.543042
H	-4.655952	1.934358	-0.982166
H	-6.984337	0.444016	-0.506550

Tabla SI3. Coordenadas cartesianas de **6** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.989268 hartrees). Zero point energy 0.342394 hartrees.

C	-5.457785	-7.872512	-0.082818
C	-4.194803	-7.545012	0.213905
C	-3.594285	-6.151635	0.078911
C	-4.670616	-5.031009	0.081309
C	-6.042600	-5.520485	-0.323211
C	-6.391296	-6.810672	-0.449967
C	-2.741970	-6.092869	-1.203010
C	-4.303817	-3.781015	-0.803961
C	-2.765565	-3.550521	-0.835297
C	-1.968202	-4.777087	-1.310812
C	-4.081306	-1.418364	0.282146
C	-5.015162	-2.535519	-0.189767
H	-2.033709	-6.945647	-1.231492
H	-5.839095	-8.891908	0.003861
H	-6.773264	-4.728898	-0.503319
H	-7.388733	-7.113357	-0.765978
H	-1.020050	-4.850682	-0.731031
H	-4.571868	-0.795328	1.075954
H	-5.742196	-2.114662	-0.912621
H	-3.406581	-6.224090	-2.083946
H	-1.653972	-4.625235	-2.362153
H	-2.563994	-2.716996	-1.567552
H	-5.637009	-2.846793	0.675493
H	-4.762050	-4.673849	1.145108
C	-4.777290	-3.953425	-2.258582
H	-4.424359	-4.907610	-2.680204
H	-5.868113	-3.953178	-2.350701
H	-4.398200	-3.152258	-2.903382
C	-3.203220	-8.397995	0.918443
O	-3.067152	-9.587114	1.014010
O	-2.317226	-7.551163	1.586509
C	-2.663648	-6.147593	1.332121
H	-1.686847	-5.650076	1.194528
H	-3.149892	-5.777635	2.246625
C	-2.277591	-3.052394	0.508769
O	-1.352659	-3.449894	1.172746
O	-2.975410	-1.980486	1.048340
C	-3.535158	-0.535071	-0.790284
C	-2.378539	0.207122	-0.721890
C	-4.135097	-0.245699	-2.074451
O	-2.206600	0.944908	-1.890527
H	-1.597455	0.341788	-0.003163
C	-3.308252	0.647036	-2.701637
H	-5.055252	-0.659634	-2.438106
H	-3.293219	1.163314	-3.635765

Tabla SI4. Coordenadas cartesianas de **TS_{6-Enolate}** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9584322 hartrees). Zero point energy 0.338147 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-95.81 cm⁻¹).

C	3.971120	1.637740	0.001801
C	3.573702	0.361706	0.076060
C	2.117703	-0.084649	0.128393
C	1.181918	0.940518	-0.573326
C	1.689921	2.356680	-0.463044
C	2.959227	2.680773	-0.163278
C	1.698889	-0.316980	1.595255
C	-0.306812	0.820016	-0.066103
C	-0.532143	-0.562848	0.467504
C	0.280686	-0.917332	1.679774
C	-2.438841	0.159736	-1.329050
C	-1.267108	1.129017	-1.262915
H	2.424163	-0.983328	2.097666
H	5.021835	1.930323	-0.002395
H	0.950984	3.130212	-0.675161
H	3.293145	3.712937	-0.084891
H	0.345711	-2.020851	1.788513
H	-3.100101	0.315635	-2.205388
H	-1.608093	2.175843	-1.237324
H	1.742163	0.646498	2.137569
H	-0.220270	-0.557392	2.598247
H	-2.474674	0.254009	0.810467
H	-0.708616	1.023029	-2.219029
H	1.185461	0.689265	-1.669094
C	-0.604265	1.851726	1.051757
H	0.185530	1.828797	1.815998
H	-0.666576	2.876444	0.681204
H	-1.543645	1.608815	1.560331
C	4.419108	-0.850392	-0.053660
O	5.593784	-1.047800	0.112496
O	3.607204	-1.899261	-0.481261
C	2.212538	-1.450517	-0.616705
H	1.618115	-2.263406	-0.168430
H	2.016025	-1.386893	-1.695702
C	-1.143667	-1.593047	-0.215900
O	-1.320813	-2.785233	-0.057378
O	-2.020978	-1.161784	-1.367041
C	-3.351533	0.237529	0.006785
C	-4.171052	-0.948539	0.185909
C	-4.321590	1.351013	0.167199
O	-5.435282	-0.632682	0.455133
H	-3.905936	-2.011002	0.124371
C	-5.530061	0.817337	0.438560
H	-4.042392	2.390351	0.076599
H	-6.530582	1.137870	0.640778

Tabla SI5. Coordenadas cartesianas de **Enolate** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9776988 hartrees). Zero point energy 0.331170 hartrees.

C	3.754235	1.896854	0.101667
C	3.508440	0.579933	0.084106
C	2.104257	-0.017236	0.159801
C	1.071889	0.925280	-0.511087
C	1.392433	2.372081	-0.248432
C	2.623796	2.822337	0.061084
C	1.724852	-0.293927	1.626721
C	-0.426263	0.529576	-0.129956
C	-0.439053	-0.833776	0.456469
C	0.375387	-1.042041	1.695615
C	-2.453490	-0.346751	-1.462916
C	-1.244028	0.599312	-1.457232
H	2.514804	-0.879685	2.125741
H	4.761359	2.309460	0.086427
H	0.556181	3.064564	-0.362214
H	2.830301	3.870568	0.246152
H	0.551316	-2.126987	1.849200
H	-2.864202	-0.447409	-2.499056
H	-1.564918	1.632128	-1.658984
H	1.657701	0.666042	2.168139
H	-0.187752	-0.698400	2.584754
H	-0.591441	0.294697	-2.298481
H	1.173436	0.786791	-1.621496
C	-1.021320	1.545605	0.876470
H	-0.370304	1.652937	1.747716
H	-1.201770	2.527774	0.442057
H	-1.980766	1.159550	1.243935
C	4.465637	-0.519656	-0.162372
O	5.670376	-0.581253	-0.087225
O	3.760556	-1.634784	-0.588979
C	2.305891	-1.356417	-0.604724
H	1.848109	-2.233442	-0.116554
H	2.019417	-1.320860	-1.662815
C	-1.154927	-1.903963	-0.037941
O	-1.201834	-3.094027	0.271876
O	-2.060163	-1.679837	-1.162884
C	-3.558459	0.087322	-0.542323
C	-4.002334	-0.558169	0.582182
C	-4.385698	1.265158	-0.701198
O	-5.074185	0.145167	1.154984
H	-3.725580	-1.446198	1.110784
C	-5.278819	1.261700	0.336208
H	-4.285457	1.982233	-1.488371
H	-6.072986	1.884764	0.668034

Tabla SI6. Coordenadas cartesianas de $TS_{\text{epimerization}}$ al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9730137 hartrees). Zero point energy 0.335827 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-789.26 cm^{-1}).

C	3.820814	1.876339	0.143210
C	3.543088	0.565873	-0.022845
C	2.119946	0.039544	0.169696
C	1.078554	1.052953	-0.359024
C	1.440285	2.427536	0.135340
C	2.718139	2.800060	0.370671
C	1.905189	-0.291490	1.661396
C	-0.397631	0.527509	-0.052628
C	-0.302485	-0.789634	0.648036
C	0.459290	-0.759098	1.935937
C	-2.340246	-0.554579	-1.356256
C	-1.115377	0.370778	-1.423459
H	2.638170	-1.041136	2.005501
H	4.833355	2.281556	0.068716
H	0.618409	3.142218	0.236853
H	2.970696	3.807370	0.700669
H	0.448874	-1.751688	2.430490
H	-2.643460	-0.872513	-2.388234
H	-1.422268	1.358897	-1.810336
H	2.116252	0.620714	2.254854
H	-0.023696	-0.074929	2.662404
H	-0.419438	-0.053602	-2.169913
H	1.182317	1.122799	-1.477730
C	-1.162463	1.551094	0.806424
H	-0.640146	1.765161	1.743659
H	-1.366392	2.486658	0.283489
H	-2.137374	1.129651	1.097382
C	4.402543	-0.507249	-0.485708
O	5.539690	-0.802174	-0.607213
O	3.434947	-1.532706	-1.054742
C	2.161984	-1.212927	-0.733891
H	1.824415	-2.449889	0.140999
H	1.428309	-1.430492	-1.518577
C	-1.158600	-1.868163	0.379704
O	-1.190733	-2.979367	0.898981
O	-2.009359	-1.818676	-0.760613
C	-3.526261	0.027920	-0.655815
C	-4.217569	-0.518085	0.396974
C	-4.202486	1.259150	-1.005654
O	-5.295542	0.301891	0.744219
H	-4.128576	-1.402487	0.992704
C	-5.256364	1.384947	-0.141055
H	-3.913973	1.920392	-1.796612
H	-6.040991	2.087561	0.021107
H	1.021390	-2.292854	0.291194

Tabla SI7. Coordenadas cartesianas de **2** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1150.0217938 hartrees). Zero point energy 0.342243 hartrees.

C	-5.631564	-7.695845	-0.787324
C	-4.537087	-7.608758	-0.020649
C	-3.746215	-6.328923	0.213343
C	-4.631576	-5.061374	0.046191
C	-5.760975	-5.267864	-0.937014
C	-6.195095	-6.470147	-1.349294
C	-2.539941	-6.292105	-0.746419
C	-3.802089	-3.782901	-0.345313
C	-2.351755	-3.928377	0.186839
C	-1.611897	-5.102004	-0.478902
C	-3.633053	-1.266216	0.187289
C	-4.425341	-2.561952	0.377583
H	-1.966910	-7.238294	-0.674319
H	-6.157860	-8.636745	-0.961388
H	-6.239438	-4.350857	-1.287595
H	-7.007418	-6.579045	-2.066766
H	-0.758145	-5.406017	0.159820
H	-3.812151	-0.561505	1.042232
H	-5.465427	-2.408464	0.026816
H	-2.918454	-6.253747	-1.789231
H	-1.146633	-4.771131	-1.430876
H	-4.509638	-2.773203	1.462621
H	-5.123321	-4.871086	1.039282
C	-3.783843	-3.561621	-1.863495
H	-3.609623	-4.498746	-2.408235
H	-4.721731	-3.131098	-2.233071
H	-2.992532	-2.864514	-2.167937
C	-3.989714	-8.658904	0.871118
O	-4.083265	-9.854736	0.890195
O	-3.251053	-8.021580	1.876783
C	-3.259006	-6.571088	1.676398
H	-2.219162	-6.269694	1.873203
H	-3.934064	-6.160642	2.441800
C	-1.556314	-2.649833	0.029356
O	-0.377854	-2.551632	-0.204716
O	-2.192277	-1.446592	0.288077
C	-3.889212	-0.563976	-1.106169
C	-2.954747	-0.061498	-1.979241
C	-5.188714	-0.228647	-1.648202
O	-3.586571	0.566776	-3.052835
H	-1.885923	-0.034980	-2.023205
C	-4.960540	0.448278	-2.816151
H	-6.131467	-0.465558	-1.197491
H	-5.557946	0.901078	-3.575663
H	-2.397235	-4.113715	1.294182

Tabla SI8. Coordenadas cartesianas de TS_{epox} al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9810613 hartrees). Zero point energy 0.414333 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-33.68 cm^{-1}).

C	3.294629	1.674994	0.016062
C	3.208158	0.261031	-0.317305
C	1.909916	-0.484727	-0.190602
C	0.736109	0.320898	-0.837191
C	0.941360	1.823963	-0.749535
C	2.046437	2.427584	-0.368753
C	1.592680	-0.820654	1.281287
C	-0.696667	-0.060582	-0.289421
C	-0.644883	-1.505385	0.247287
C	0.288771	-1.640557	1.462502
C	-3.066988	-0.617911	-1.182904
C	-1.673494	-0.046423	-1.485122
H	2.433713	-1.380075	1.673266
H	4.180006	2.121945	-0.412814
H	0.097893	2.423605	-1.045861
H	2.083374	3.499953	-0.311014
H	0.514401	-2.690462	1.603114
H	-3.506332	-0.965792	-2.108000
H	-1.779757	0.960269	-1.871494
H	1.559163	0.112106	1.827315
H	-0.241869	-1.321793	2.349924
H	-1.236003	-0.651748	-2.271370
H	0.741667	0.072068	-1.895266
C	-1.171456	0.883598	0.840268
H	-0.373195	1.063761	1.543649
H	-1.489023	1.838968	0.445891
H	-2.013007	0.460115	1.373800
C	4.221332	-0.491716	-0.880075
O	5.400966	-0.275560	-1.139517
O	3.691148	-1.786670	-1.178538
C	2.263770	-1.780566	-0.995454
H	1.984737	-2.683366	-0.469881
H	1.785365	-1.776134	-1.969126
C	-2.021558	-2.026665	0.585319
O	-2.301452	-2.668489	1.560502
O	-3.005358	-1.800990	-0.344022
C	-4.027339	0.336592	-0.539451
C	-4.800369	0.074603	0.521818
C	-4.365088	1.678576	-0.976234
O	-5.601999	1.167832	0.801186
H	-4.892880	-0.774557	1.151080
C	-5.307664	2.130386	-0.138153
H	-3.941825	2.207533	-1.798539
H	-5.839552	3.046912	-0.065556
H	-0.284339	-2.137011	-0.560603
O	3.369001	1.948746	1.498933

O	4.612320	1.328293	1.957060
H	4.534508	0.446163	1.540575

Tabla SI9. Coordenadas cartesianas de **11** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1150.0026547 hartrees). Zero point energy 0.345854 hartrees.

C	-5.778960	-7.625497	-0.864638
C	-4.436317	-7.622410	-0.177334
C	-3.656420	-6.335025	0.137264
C	-4.549672	-5.058738	0.093652
C	-5.789815	-5.170654	-0.758815
C	-6.345034	-6.303809	-1.199652
C	-2.467252	-6.238691	-0.834284
C	-3.743277	-3.772151	-0.326732
C	-2.278006	-3.904876	0.165961
C	-1.539729	-5.059410	-0.532792
C	-3.582804	-1.253516	0.198650
C	-4.356295	-2.556392	0.414750
H	-1.890656	-7.185921	-0.827754
H	-6.259906	-4.208652	-0.989145
H	-7.246352	-6.313701	-1.813307
H	-3.755187	-0.542767	1.050116
H	-5.407908	-2.410986	0.096044
H	-2.872419	-6.158562	-1.869599
H	-0.683475	-5.380415	0.093868
H	-4.405303	-2.766385	1.502062
H	-4.927858	-4.897982	1.142430
C	-3.781064	-3.560519	-1.844553
H	-3.645437	-4.506014	-2.389279
H	-4.726773	-3.120889	-2.182060
H	-2.991555	-2.879112	-2.185744
C	-4.064725	-8.669740	0.852389
O	-4.315349	-9.835637	0.945138
O	-3.332290	-8.047388	1.856084
C	-3.156036	-6.622926	1.586369
H	-2.076395	-6.452624	1.731730
H	-3.733091	-6.105401	2.369105
C	-1.498251	-2.616308	0.004249
O	-0.323938	-2.508201	-0.245888
O	-2.139441	-1.420338	0.279863
C	-3.867785	-0.566428	-1.096556
C	-2.953758	-0.068344	-1.993515
C	-5.179742	-0.243824	-1.615854
O	-3.610396	0.545179	-3.060533
H	-1.886198	-0.036433	-2.059302
C	-4.978653	0.421896	-2.795204
H	-6.112053	-0.480724	-1.144086
H	-5.593622	0.863024	-3.547644
H	-6.475739	-8.460853	-0.727653
O	-4.546979	-8.019173	-1.565782
H	-2.292624	-4.104454	1.271280
H	-1.076160	-4.702779	-1.477292

Tabla SI10. Coordenadas cartesianas de **TS₁₁₋₃** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9579222 hartrees). Zero point energy 0.373406

hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-340.37 cm⁻¹).

C	3.575842	1.546040	-0.414400
C	3.450154	0.084835	0.071430
C	2.329252	-0.478956	0.753945
C	0.608004	1.234185	-0.612005
C	1.264026	2.370113	-0.060360
C	2.609552	2.530694	0.060928
C	1.696492	-0.033502	2.000125
C	-0.853366	0.993148	-0.386743
C	-0.535436	-0.010533	0.675709
C	0.169690	0.343854	1.937476
C	-2.449376	-0.780138	-1.315515
C	-1.508646	0.381844	-1.651654
H	1.788506	-0.838551	2.760862
H	0.623000	3.148365	0.368840
H	3.027460	3.353483	0.638461
H	-2.714248	-1.358682	-2.236343
H	-2.043475	1.162431	-2.217736
H	2.248376	0.841549	2.399477
H	-0.321925	-0.168834	2.790109
H	-0.721815	-0.004733	-2.330155
H	1.145724	0.551372	-1.262945
C	-1.688097	2.187001	0.096730
H	-1.313873	2.568091	1.053805
H	-1.687017	3.003526	-0.627257
H	-2.724955	1.873045	0.268717
C	4.004283	-1.009118	-0.843666
O	4.942742	-1.037598	-1.600782
O	3.192463	-2.123197	-0.740677
C	2.065728	-1.835750	0.189347
H	2.073228	-2.658599	0.919599
H	1.164974	-1.900283	-0.447665
C	-0.950778	-1.358903	0.575978
O	-0.764567	-2.317130	1.312993
O	-1.770090	-1.767016	-0.536218
C	-3.706715	-0.351912	-0.619563
C	-4.099810	-0.651582	0.659129
C	-4.763380	0.447552	-1.204265
O	-5.354602	-0.085485	0.926282
H	-3.684597	-1.200849	1.477480
C	-5.729631	0.583586	-0.244591
H	-4.754859	0.842936	-2.198801
H	-6.676226	1.062262	-0.168814
H	4.085860	1.729191	-1.360464
O	4.438907	1.006726	0.642142
H	0.080316	1.429145	2.134706

Tabla SI11. Coordenadas cartesianas de **3** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1150.0379052 hartrees). Zero point energy 0.343093 hartrees.

C	-4.743409	-7.640782	0.252272
C	-3.245295	-7.595084	0.272343
C	-2.354723	-6.824461	-0.384898
C	-5.457958	-4.815945	-0.654474
C	-5.618063	-6.020057	-1.497223
C	-5.318429	-7.257579	-1.091207
C	-2.520329	-5.842856	-1.487697
C	-5.241452	-3.415257	-1.217173
C	-4.118919	-4.100834	-0.399381
C	-2.764094	-4.406257	-1.007774
C	-4.963726	-1.496485	0.392961
C	-5.937265	-2.258210	-0.513092
H	-1.611346	-5.846695	-2.131463
H	-6.057537	-5.839266	-2.481533
H	-5.489097	-8.115814	-1.745213
H	-1.963560	-4.140474	-0.279886
H	-5.502745	-0.779339	1.065655
H	-6.392394	-1.562340	-1.245593
H	-3.341884	-6.162884	-2.167236
H	-2.602294	-3.717610	-1.867543
H	-6.789909	-2.630393	0.094100
H	-6.116236	-4.914276	0.239703
C	-5.069854	-3.211569	-2.699074
H	-4.539803	-4.042784	-3.181391
H	-6.043391	-3.119343	-3.199114
H	-4.498523	-2.295170	-2.907866
C	-2.512902	-8.496714	1.215306
O	-2.851928	-9.374995	1.952895
O	-1.135835	-8.197509	1.109160
C	-0.958433	-7.131109	0.130967
H	-0.266237	-7.529480	-0.628497
H	-0.500236	-6.285799	0.675191
C	-3.958054	-3.658885	1.032940
O	-3.483390	-4.312543	1.931642
O	-4.395987	-2.397827	1.392091
C	-3.857701	-0.803418	-0.328844
C	-2.524901	-0.783243	0.004105
C	-4.005331	0.031834	-1.501767
O	-1.813257	0.009514	-0.897011
H	-1.922010	-1.209212	0.776921
C	-2.755655	0.498929	-1.808475
H	-4.929129	0.236345	-2.006252
H	-2.329136	1.133749	-2.552981
O	-5.282524	-6.813742	1.295227
H	-4.618080	-6.155016	1.618795
H	-5.115225	-8.660937	0.546391

Tabla SI12. Coordenadas cartesianas de TS_{1-10} al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9434045 hartrees). Zero point energy 0.338836

hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-787.95 cm^{-1}).

C	-3.766716	-1.317513	-1.175615
C	-3.571870	-0.300348	-0.217289
C	-2.457637	0.538038	-0.009281
C	-0.960434	-0.531486	-1.038175
C	-1.393884	-1.842803	-1.137251
C	-2.711449	-2.107742	-1.587991
C	-2.160669	1.797681	-0.780393
C	0.366235	-0.106961	-0.428913
C	0.302259	1.398628	-0.027856
C	-0.687464	2.240336	-0.858813
C	2.814311	0.244782	-1.174612
C	1.439740	-0.312784	-1.527367
H	-2.571765	1.709236	-1.811173
H	-4.795903	-1.616179	-1.404034
H	-0.780838	-2.683359	-0.808830
H	-2.912516	-3.034490	-2.125923
H	-0.362090	2.247119	-1.919064
H	1.526456	-1.392900	-1.761064
H	-2.763073	2.614379	-0.316174
H	-0.614856	3.300168	-0.524671
H	1.094076	0.166279	-2.467303
C	-4.351306	-0.392717	1.047390
O	-5.438318	-0.814131	1.325190
O	-3.556484	0.148779	2.079423
C	-2.311501	0.657158	1.514785
H	-1.502148	0.012960	1.915230
H	-2.220690	1.684331	1.901933
H	-0.022740	1.458515	1.047375
C	0.679662	-0.935863	0.824480
H	-0.173091	-0.950683	1.520929
H	0.915375	-1.977550	0.578083
H	1.548199	-0.548109	1.371547
C	1.634131	2.130893	-0.061607
O	1.813453	3.220500	0.431970
O	2.734430	1.623084	-0.713593
H	3.440458	0.378240	-2.097964
C	3.586252	-0.528054	-0.158053
C	4.275897	-0.029300	0.920896
C	3.806197	-1.958674	-0.167774
O	4.914173	-1.063656	1.605341
H	4.438398	0.939820	1.343542
C	4.607125	-2.236918	0.907042
H	3.412537	-2.643446	-0.892076

H	5.048466	-3.108587	1.336591
H	-1.275549	0.089536	-1.895201

Tabla SI13. Coordenadas cartesianas de **10** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9943839 hartrees). Zero point energy 0.342112 hartrees

C	-3.659324	-1.888713	-0.641858
C	-3.530784	-0.625961	-0.203495
C	-2.211287	0.123119	-0.093568
C	-1.051292	-0.648242	-0.771200
C	-1.236043	-2.134141	-0.837912
C	-2.463612	-2.677878	-0.932360
C	-2.235620	1.520297	-0.761830
C	0.343602	-0.136901	-0.296611
C	0.234908	1.399405	-0.057000
C	-0.815995	2.078007	-0.965157
C	2.724368	0.236740	-1.218907
C	1.356273	-0.404633	-1.436726
H	-2.762296	1.465004	-1.734294
H	-4.626616	-2.395084	-0.679450
H	-0.331057	-2.735370	-0.907102
H	-2.613488	-3.740025	-1.123067
H	-0.515033	1.973900	-2.025533
H	1.482008	-1.495788	-1.581444
H	-2.840292	2.222748	-0.152387
H	-0.818856	3.170991	-0.763339
H	0.939587	-0.023266	-2.392782
C	-4.464720	0.049629	0.735246
O	-5.651527	0.190402	0.798790
O	-3.653168	0.567447	1.765107
C	-2.234464	0.326624	1.453308
H	-1.919580	-0.562852	2.019572
H	-1.718248	1.228717	1.816092
H	-0.092312	1.564402	1.010128
C	0.776709	-0.838660	0.994019
H	-0.037135	-0.911340	1.724235
H	1.123182	-1.862228	0.805120
H	1.612187	-0.320975	1.483264
C	1.531578	2.170003	-0.201708
O	1.703223	3.296356	0.201477
O	2.616019	1.644714	-0.873405
H	3.288530	0.308933	-2.187783
C	3.585746	-0.416709	-0.189958
C	4.289117	0.194807	0.819648
C	3.892158	-1.829420	-0.114838
O	5.018248	-0.751110	1.540916
H	4.411253	1.198920	1.167807
C	4.753867	-1.985521	0.937532
H	3.512181	-2.584222	-0.773575
H	5.265837	-2.798280	1.402599
H	-1.133309	-0.357769	-1.870906

Tabla SI14. Coordenadas cartesianas de 1stTS_{allylicOxidation} al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9544960 hartrees). Zero point energy 0.344027 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-379.19 cm⁻¹).

C	3.262228	-0.095288	-1.277637
C	2.805424	1.039072	-0.730254
C	1.416989	1.230129	-0.140019
C	0.505496	0.025521	-0.433256
C	0.948561	-0.952749	-1.320428
C	2.360011	-1.260971	-1.417073
C	1.427810	1.470927	1.384485
C	-0.994761	0.274382	-0.151321
C	-1.106849	1.339866	0.979511
C	0.042191	1.235305	2.007912
C	-3.053953	-0.913480	0.853780
C	-1.623813	-1.051364	0.339991
H	2.169239	0.791384	1.865764
H	4.275650	-0.183452	-1.680263
H	0.235452	-1.627375	-1.802799
H	2.656083	-1.950451	-2.227466
H	0.021855	0.235044	2.493500
H	-1.599967	-1.810871	-0.464621
H	1.792759	2.492024	1.609379
H	-0.124633	1.967360	2.825612
H	-0.987293	-1.471933	1.158299
C	3.384958	2.392477	-0.924660
O	4.495612	2.823045	-1.039263
O	2.297513	3.280421	-1.040005
C	1.034823	2.560266	-0.867720
H	0.609827	2.405043	-1.871519
H	0.404516	3.243539	-0.276025
H	-1.048836	2.363615	0.511603
C	-1.682582	0.775658	-1.425627
H	-1.125453	1.585629	-1.910990
H	-1.802078	-0.023703	-2.166042
H	-2.693385	1.154355	-1.219248
C	-2.414671	1.320656	1.744310
O	-2.833181	2.241007	2.405247
O	-3.208041	0.192765	1.783052
H	-3.321186	-1.778517	1.519165
C	-4.097193	-0.753299	-0.203172
C	-5.119555	0.164366	-0.231311
C	-4.259117	-1.593001	-1.370883
O	-5.917372	-0.036775	-1.358114
H	-5.442589	0.969379	0.395287
C	-5.362224	-1.127806	-2.035295
H	-3.631192	-2.419888	-1.634109
H	-5.895366	-1.386341	-2.922924
Se	2.620156	-2.400594	0.365771
O	3.929839	-1.686187	1.017538

O	1.330732	-1.651611	1.236681
H	0.817851	-0.719969	0.632086

Tabla SI15. Coordenadas cartesianas de **Selenoxide Complex1** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9698902 hartrees). Zero point energy 0.346446 hartrees

C	3.10265523	0.16872501	-1.23028310
C	2.53703719	1.29073610	-0.77217506
C	1.14539909	1.37205811	-0.16553201
C	0.30546702	0.16084201	-0.51944404
C	0.88080907	-0.95491707	-1.00280407
C	2.34786718	-1.10897309	-1.20181609
C	1.18966009	1.45482611	1.37692111
C	-1.18055409	0.25636902	-0.16497401
C	-1.34372210	1.24916410	1.02344908
C	-0.16932301	1.14332309	2.02069215
C	-3.12569724	-1.12622009	0.82583006
C	-1.69875813	-1.13197709	0.28148702
H	1.95369215	0.73417105	1.75688214
H	4.10604031	0.15434101	-1.67033813
H	0.28234802	-1.82473214	-1.28150510
H	2.57946720	-1.71943213	-2.10832516
H	-0.14702401	0.12623301	2.46051719
H	-1.63818712	-1.84768414	-0.56278704
H	1.55226912	2.45232519	1.69036813
H	-0.34420803	1.83548614	2.87098322
H	-1.01973708	-1.52788412	1.06667508
C	3.01419623	2.67806421	-0.99570008
O	4.09564031	3.16355324	-1.17456809
O	1.88580214	3.51207927	-1.01087308
C	0.67293905	2.72904521	-0.77264106
H	0.17023901	2.61767320	-1.74723813
H	0.07244501	3.35180025	-0.09045101
H	-1.35684510	2.29889118	0.61624105
C	-1.94084315	0.76550406	-1.39618111
H	-1.47373711	1.65612613	-1.83436014
H	-1.98269015	0.00488600	-2.18533117
H	-2.98031723	1.02574008	-1.15764109
C	-2.63221420	1.10506709	1.80669814
O	-3.10247323	1.96190815	2.51646919
O	-3.33798626	-0.08143701	1.81324814
H	-3.31406425	-2.03986216	1.45164911
C	-4.20260732	-0.99532607	-0.20015802
C	-5.30445142	-0.17566001	-0.14762301
C	-4.31576633	-1.76733414	-1.41916111
O	-6.10797045	-0.37512503	-1.27028210
H	-5.68200743	0.55521804	0.53661204
C	-5.47228940	-1.36310410	-2.03034116
H	-3.61952628	-2.51027819	-1.75231313
H	-6.00055546	-1.60977413	-2.92425922
Se	2.99747423	-2.23755517	0.35389903
O	4.57858435	-2.40503618	-0.05059300
O	3.22497225	-0.94784507	1.57191812

H 4.17689532 -0.78241106 1.77203014

Tabla SI16. Coordenadas cartesianas de 2ndTS_{allylicOxidation} al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9715316 hartrees). Zero point energy 0.345769 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-326.41 cm⁻¹).

C	3.263035	-0.359186	-1.362215
C	2.905763	0.798885	-0.790136
C	1.529864	1.074123	-0.199410
C	0.530371	-0.034175	-0.542615
C	0.883362	-1.008460	-1.466302
C	2.255466	-1.439884	-1.488686
C	1.566566	1.325110	1.325076
C	-0.931077	0.271370	-0.174399
C	-0.965156	1.312528	0.982427
C	0.195005	1.090665	1.974678
C	-3.031911	-0.832133	0.833318
C	-1.618140	-1.026227	0.298787
H	2.316254	0.653785	1.800600
H	4.253792	-0.521423	-1.792125
H	0.132352	-1.600257	-1.976625
H	2.524008	-2.235141	-2.201364
H	0.148955	0.044133	2.358191
H	-1.624439	-1.774964	-0.515629
H	1.926341	2.353260	1.531345
H	0.075623	1.754288	2.854054
H	-0.983150	-1.479512	1.103450
C	3.579226	2.112024	-0.961858
O	4.721479	2.461072	-1.051681
O	2.560556	3.075311	-1.062425
C	1.248447	2.436756	-0.918369
H	0.835599	2.319234	-1.932413
H	0.654533	3.154388	-0.331303
H	-0.857595	2.343937	0.545524
C	-1.629354	0.850002	-1.415240
H	-1.062722	1.663117	-1.879802
H	-1.782353	0.082350	-2.183897
H	-2.624901	1.244209	-1.171399
C	-2.257956	1.340250	1.772729
O	-2.603806	2.259122	2.478886
O	-3.123680	0.268527	1.782593
H	-3.329205	-1.692707	1.490884
C	-4.087126	-0.608210	-0.199995
C	-5.086929	0.333912	-0.177736
C	-4.285853	-1.397850	-1.396637
O	-5.906326	0.194972	-1.299168
H	-5.378971	1.123492	0.481997
C	-5.386779	-0.881892	-2.025961
H	-3.677453	-2.224938	-1.702729
H	-5.937721	-1.092972	-2.914847
Se	2.267163	-2.351927	0.475133
O	3.576528	-1.407679	1.248367

O	1.028819	-1.310830	0.920089
H	3.218013	-0.618399	1.743536

Tabla SI17. Coordenadas cartesianas de **Selenoxide Complex2** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9761690 hartrees). Zero point energy 0.34742 hartrees

C	3.157753	-0.033505	-1.830671
C	2.890077	0.864436	-0.870443
C	1.556590	0.985609	-0.150076
C	0.613085	-0.216088	-0.453931
C	0.844639	-0.851405	-1.798126
C	2.078636	-0.890815	-2.333467
C	1.662073	1.123374	1.385309
C	-0.885074	0.141938	-0.097277
C	-0.888977	1.104927	1.125421
C	0.310660	0.857295	2.067752
C	-3.056624	-0.918782	0.788484
C	-1.642716	-1.151623	0.267274
H	2.431034	0.421966	1.776546
H	4.123984	-0.077593	-2.336955
H	-0.001515	-1.369272	-2.243130
H	2.302254	-1.477163	-3.226369
H	0.278065	-0.194227	2.424920
H	-1.666053	-1.839758	-0.598464
H	2.040195	2.130907	1.651754
H	0.215337	1.497360	2.968622
H	-1.063744	-1.696381	1.053684
C	3.545819	2.196348	-0.745648
O	4.670198	2.600677	-0.714873
O	2.478393	3.121357	-0.724297
C	1.195219	2.401737	-0.712360
H	0.814263	2.386197	-1.744807
H	0.546418	3.009210	-0.060363
H	-0.807549	2.165095	0.748083
C	-1.533352	0.827192	-1.307197
H	-0.875623	1.553300	-1.796721
H	-1.833632	0.101735	-2.074098
H	-2.452304	1.358866	-1.024039
C	-2.151704	1.080596	1.963656
O	-2.423801	1.907902	2.802755
O	-3.085462	0.072570	1.853015
H	-3.428816	-1.822790	1.342234
C	-4.067438	-0.513073	-0.232392
C	-4.975688	0.514067	-0.147158
C	-4.318404	-1.188128	-1.488106
O	-5.784768	0.538267	-1.284435
H	-5.207600	1.273036	0.569762
C	-5.355520	-0.524476	-2.086676
H	-3.786845	-2.045564	-1.849115
H	-5.908998	-0.615228	-2.994467
Se	2.268460	-2.382497	0.380085
O	3.290947	-1.540732	1.558293
O	0.878869	-1.302461	0.501479

H 3.084146 -1.793208 2.488334

Tabla SI18. Coordenadas cartesianas de $TS_{\text{alcoholFormation}}$ al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9596911 hartrees). Zero point energy 0.353974 hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-26.9 cm^{-1}).

C	-3.415169	-0.198689	-1.661691
C	-3.126965	-1.074432	-0.686999
C	-1.764979	-1.195487	-0.017416
C	-0.801479	-0.047790	-0.403461
C	-1.101715	0.618081	-1.698089
C	-2.347018	0.646010	-2.207376
C	-1.823356	-1.252260	1.526893
C	0.681152	-0.436464	-0.106534
C	0.718902	-1.365285	1.150878
C	-0.425185	-1.064776	2.145282
C	2.896378	0.629058	0.695685
C	1.483852	0.847880	0.188467
H	-2.499486	-0.444293	1.878980
H	-4.393885	-0.151419	-2.135835
H	-0.289617	1.187843	-2.147909
H	-2.607022	1.274152	-3.051939
H	-0.336264	0.015002	2.470969
H	1.487354	1.499974	-0.706810
H	-2.279991	-2.198820	1.866419
H	-0.317258	-1.685172	3.052510
H	0.899738	1.459881	0.931596
C	-3.797769	-2.373822	-0.512694
O	-4.933540	-2.767640	-0.461486
O	-2.763867	-3.340828	-0.465156
C	-1.460854	-2.656317	-0.511976
H	-1.107166	-2.697600	-1.551243
H	-0.816628	-3.250364	0.150986
H	0.581486	-2.430296	0.804516
C	1.295842	-1.181627	-1.305111
H	0.620860	-1.944809	-1.706202
H	1.512991	-0.489071	-2.126298
H	2.240740	-1.668453	-1.044738
C	2.022626	-1.361099	1.914739
O	2.338048	-2.196800	2.736798
O	2.969023	-0.372149	1.755523
H	3.268595	1.534411	1.245174
C	3.899180	0.229062	-0.340184
C	4.812607	-0.792817	-0.272959
C	4.118192	0.900939	-1.604134
O	5.601101	-0.815605	-1.429368
H	5.057282	-1.552726	0.435819
C	5.144767	0.242956	-2.224716
H	3.560654	1.747457	-1.955356
H	5.672225	0.332733	-3.145316
S	-1.903097	3.037880	0.399924
O	-0.442535	4.047584	0.813529
O	-1.116429	1.199341	0.430156

H	-0.070717	4.426930	0.007491
H	-0.747063	1.036785	1.678161

Tabla SI19. Coordenadas cartesianas de **4** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9858900 hartrees). Zero point energy 0.343621 hartrees

C	-3.619935	-1.897181	-0.407063
C	-3.484874	-0.612087	-0.045580
C	-2.164917	0.140051	0.011331
C	-1.008237	-0.662290	-0.661849
C	-1.196914	-2.163563	-0.627648
C	-2.426336	-2.703881	-0.671200
C	-2.196146	1.526845	-0.674030
C	0.400694	-0.115112	-0.231614
C	0.282640	1.419788	-0.000289
C	-0.776955	2.071593	-0.916052
C	2.773558	0.249314	-1.156301
C	1.405868	-0.389344	-1.368472
H	-2.732513	1.460320	-1.640782
H	-4.586998	-2.406074	-0.398491
H	-0.291171	-2.762107	-0.697538
H	-2.582673	-3.776217	-0.799779
H	-0.495959	1.894054	-1.976902
H	1.517780	-1.478731	-1.528525
H	-2.785675	2.239577	-0.062504
H	-0.769384	3.171097	-0.769493
H	0.976217	-0.004702	-2.326396
C	-4.403794	0.110798	0.879545
O	-5.586636	0.270964	0.947122
O	-3.569491	0.641165	1.882797
C	-2.158735	0.373257	1.554152
H	-1.846728	-0.507241	2.136074
H	-1.624284	1.278360	1.886458
H	-0.033971	1.599416	1.066662
C	0.833577	-0.807745	1.065915
H	0.028202	-0.882495	1.803619
H	1.198327	-1.826661	0.883089
H	1.667320	-0.276738	1.546722
C	1.576153	2.194381	-0.165615
O	1.735342	3.331931	0.212450
O	2.670675	1.658853	-0.807331
H	3.333633	0.321274	-2.127582
C	3.639361	-0.403187	-0.129862
C	4.349717	0.208050	0.874735
C	3.941665	-1.816739	-0.053357
O	5.079459	-0.739089	1.594782
H	4.477683	1.212357	1.219563
C	4.808248	-1.973629	0.994847
H	3.556491	-2.570651	-0.710326
H	5.320500	-2.787016	1.458175
O	-1.061181	-0.388160	-2.093109
H	-1.941483	-0.622078	-2.459693

Tabla SI120. Coordenadas cartesianas de **TS₄₋₅** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1149.9681850 hartrees). Zero point energy 0.342106

hartrees. 1 frecuencia imaginaria (-18.81 cm⁻¹).

C	2.565568	0.768371	1.622429
C	3.322149	0.074411	0.596688
C	3.194300	-0.149121	-0.730558
C	-0.019813	2.207522	-0.367884
C	1.225970	2.538775	0.383644
C	1.670852	1.764552	1.551114
C	2.236672	0.364158	-1.742906
C	-0.795170	0.877941	-0.172050
C	0.103155	-0.354038	-0.426525
C	0.877886	-0.347261	-1.758733
C	-2.782166	-0.419572	-1.179218
C	-1.950607	0.860149	-1.197669
H	2.103971	1.477309	-1.589972
H	2.801122	0.373865	2.631058
H	1.287173	3.626618	0.570480
H	1.213882	2.112326	2.491000
H	0.247001	0.107114	-2.553427
H	-2.606721	1.742513	-1.031182
H	2.676550	0.289197	-2.763815
H	1.047988	-1.400136	-2.082499
H	-1.534085	1.024889	-2.215345
C	4.533805	-0.686469	1.084885
O	5.044002	-0.795447	2.161988
O	5.102138	-1.355859	-0.011743
C	4.294354	-1.086274	-1.195970
H	3.917978	-2.066513	-1.541025
H	4.982439	-0.648222	-1.938247
H	0.833228	-0.451366	0.422416
C	-1.337410	0.867963	1.260512
H	-0.544810	0.837020	2.015879
H	-1.959100	1.749498	1.463047
H	-1.978046	-0.006640	1.445704
C	-0.730775	-1.629307	-0.415850
O	-0.342146	-2.706551	-0.035308
O	-1.994875	-1.630380	-0.961131
H	-3.211327	-0.631061	-2.194243
C	-3.870744	-0.446551	-0.156632
C	-4.203101	-1.488630	0.675675
C	-4.821975	0.613062	0.102417
O	-5.307118	-1.148720	1.456901
H	-3.823793	-2.472511	0.856735
C	-5.664853	0.150446	1.076589
H	-4.843264	1.564787	-0.391560

H	-6.511040	0.525082	1.607780
O	-0.428423	3.008771	-1.187741
H	2.223645	2.390961	-0.646262

Tabla SI21. Coordenadas cartesianas de **5** al nivel de teoría mPWB95/6-31+G(d,p) (-1150.0085191 hartrees). Zero point energy 0.344265 hartrees

C	3.563601	-1.074948	0.167026
C	3.188318	0.313811	0.403980
C	2.263899	0.845251	1.231693
C	1.911666	-1.433548	-1.686980
C	3.005427	-1.865299	-0.756991
C	1.320142	0.203553	2.180179
C	-0.495092	-0.747026	-0.750264
C	-0.671923	-0.701499	0.799513
C	0.580864	-1.025843	1.636098
C	-3.077201	-0.827871	-0.665428
C	-1.812809	-1.174839	-1.449366
H	1.903752	-0.112391	3.080982
H	4.373755	-1.435282	0.810892
H	2.042177	-1.935107	-2.674418
H	3.324081	-2.904206	-0.880524
H	1.280864	-1.688796	1.093807
H	-1.866242	-0.744963	-2.467243
H	0.584842	0.941143	2.568034
H	0.275549	-1.650899	2.514545
H	-1.811506	-2.284383	-1.594805
C	3.893985	1.417361	-0.323726
O	4.754095	1.456790	-1.153458
O	3.337807	2.638700	0.124397
C	2.315487	2.359099	1.127541
H	1.386247	2.820387	0.753933
H	2.649765	2.857821	2.053940
H	-0.999054	0.347825	1.051628
C	-0.096968	0.642629	-1.255268
H	0.849943	0.986227	-0.823519
H	0.011909	0.668185	-2.346593
H	-0.860277	1.392249	-1.003107
C	-1.816434	-1.583918	1.291304
O	-1.824788	-2.278208	2.277005
O	-3.023725	-1.513097	0.617731
H	-3.980061	-1.317611	-1.120003
C	-3.347841	0.623227	-0.455229
C	-3.676062	1.257471	0.718264
C	-3.391055	1.628045	-1.496646
O	-3.911817	2.613242	0.485497
H	-3.808136	0.963649	1.737231
C	-3.731907	2.806206	-0.888766
H	-3.197478	1.451832	-2.536819
H	-3.895033	3.815595	-1.196062
C	0.555134	-1.833246	-1.132671
O	0.267904	-3.003133	-1.014797
H	1.994379	-0.349975	-1.907158

8. PUBLICACIONES

A theoretical biogenesis overview of diterpenes isolated from *Salvia microphylla*

J. Alejandro Posada-Salgado¹ · Elihú Bautista¹ · Gabriel Cuevas¹ · Karina Martínez-Mayorga¹

Received: 1 June 2015 / Accepted: 16 October 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Establishing the reaction mechanisms involved in the biosynthesis of natural products plays an important role in phytochemistry and pharmacology. Mechanistic studies of the biogenesis of natural products have been mainly explored by means of theoretical calculations, and taking into account experimental structures of reagents and products. Using a hybrid meta density functional theory method (mPW1B95), we studied the mechanisms associated with the biogenesis of five neo-clerodanes isolated from *Salvia microphylla*. The reaction mechanisms presented here explain the formation of the five neo-clerodanes and coincides with the formulated biogenetic hypothesis.

Keywords Biogenesis · Clerodanes · Diterpenes · Quantum chemical calculations · *Salvia*

Introduction

Natural products have historically been the source of bioactive molecules, including drugs and drug leads. Chemical transformations that contribute to the great variety and complexity of such chemical compounds are by themselves relevant as an inspiration for chemical synthetic challenges and increase our understanding of reaction mechanisms.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00894-015-2841-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Karina Martínez-Mayorga
kmtzm@unam.mx

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico 04510

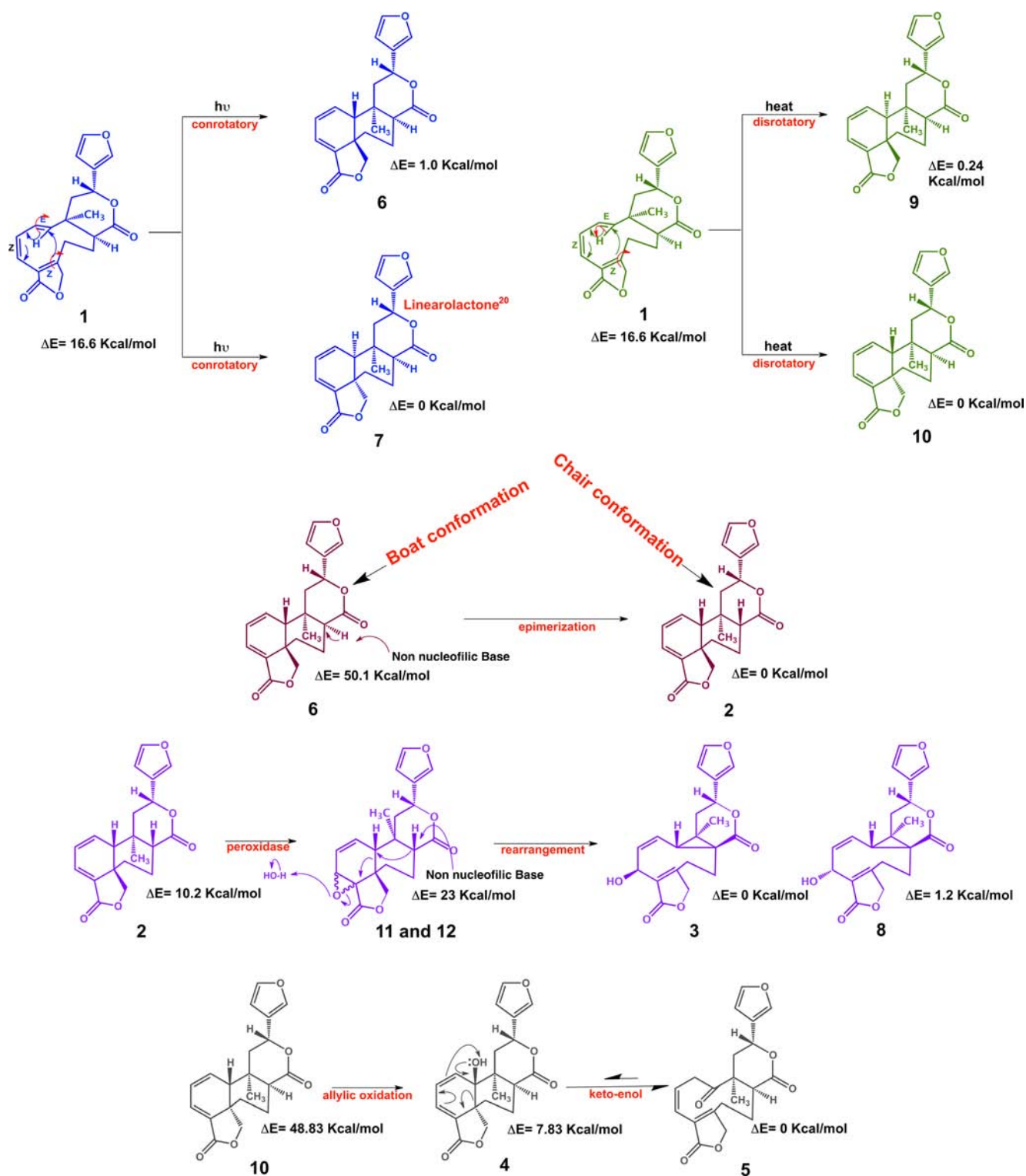
Salvinorin A, isolated for the first time in 1982 from *Salvia divinorum* [1], is the first non-nitrogenous κ -opioid selective agonist ever known. A number of derivatives of salvinorin A have been produced, with the aim of modulating their pharmacological properties and diminishing undesirable side effects for therapeutic use [2]. *Salvia divinorum* has been used for centuries in religious rituals and as a recreational drug for its hallucinogenic properties [3]. *Salvia*, the largest genus from the Lamiaceae family, has been used in traditional Mexican medicine for dysentery, diarrhea, and insomnia and for its abortive, expectorant, and antipyretic properties [4]. Metabolites reported from this genus include triterpenes [5], flavonoids [6], sesterterpenes [7], and diterpenes. Diterpenes from *Salvia* are mainly abietanes and neo-clerodanes, which in turn enclose a variety of modified chemical structures. Some of these diterpenes have shown cytotoxic [8], antiprotozoal [9], and phytotoxic activities [10]. Recently, we characterized diterpenes from *Salvia microphylla* with cytotoxic activity [11]. Structural and pharmacological studies of compounds isolated from *Salvia* are warranted.

Interestingly, this large variety of chemical compounds is produced with a limited number of biosynthetic pathways [12]. Computational methods are valuable to establish the reaction mechanisms of these transformations as well as for the determination of activation energies and mapping of potential energy surfaces [13]. A large and growing body of literature on reaction mechanisms has been accumulating for 20+ years [14]. These investigations illuminate our understanding on how natural products acquire their structural diversity. Thus, the combination of experimental evidence and computational methods appears as a suitable strategy to explore the chemical transformations involved on the synthesis of natural products. Potential energy surface of a reaction mechanism is analogous to that of conformational landscapes. For example, our research group has addressed the theoretical study of the

reaction mechanisms of the terminal biogenesis of 8-epiconferin and 6-epidesacetylarenobolide [15] [16] using dynamic nuclear magnetic resonance (NMR) and computational methods. In this work, we explore the biogenesis of diterpenes isolated from *Salvia microphylla* [11].

Methodology

Quantum chemical calculations were performed with Gaussian 09, geometries were optimized without geometry constraints using the density functional theory (DFT) hybrid



Scheme 1 Proposed terminal biogenesis of neo-clerodane type compounds from compound 1

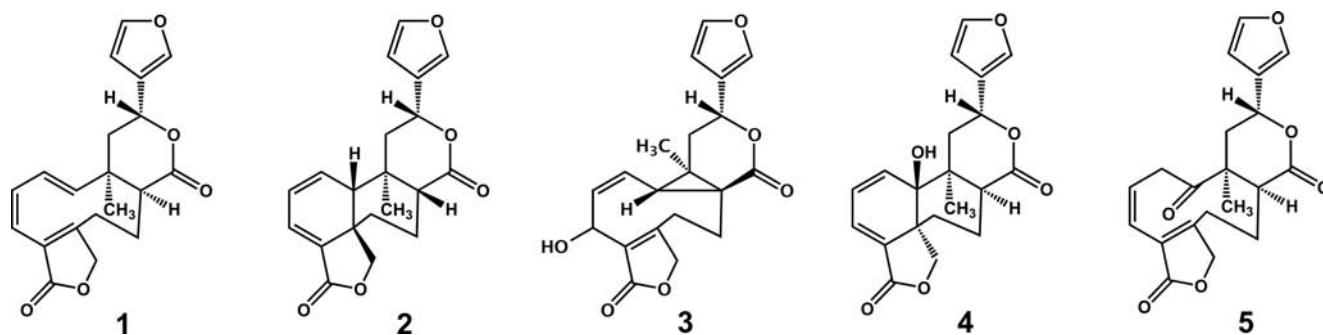


Fig. 1 Neo-clerodane type compounds isolated from *Salvia microphylla*

method with mPW1B95 functional. The double split valence polarized and diffuse 6-31+G(d,p) basis set was used for geometry optimization and frequency calculations.

Recent studies in small molecules and in terpenoids have shown that the third generation mPW1B95 density functional produces more reliable thermochemical kinetic data than B3LYP density functional [16]. Initially, calculations were performed using M06-2X and mPW1B95 level of theory. However, in this investigation M06-2X was unable to generate the related transition states.

All energies are reported with zero-point energy corrections and are not scaled for comparative purpose. The 6-31+G(d,p) basis functions were used because addition of diffuse functions to double split valence basis appears to be more important than increasing to a triplet split valence basis, when calculating reaction energies and activation energies with DFT.

In this work, we calculated the TSs using the *QST3* methodology [17] to find the best TSs geometry as a maximum energy state in the potential energy surface, all the TSs calculated have one imaginary frequency.

Results and discussion

In this work, we explore the theoretical biogenesis of five compounds previously isolated from *Salvia microphylla* [11]. Based on our previous knowledge on biogenetic routes [18] and on the isolated compounds from *Salvia microphylla*,

hypothetical metabolites and its biogenesis are proposed, shown in Scheme 1.

First, we evaluated the best energetic values for the proposed biogenetic pathway (Scheme 1).

A feasible first step in this mechanism is the electrocyclic reaction to obtain compounds **6** and **10** shown in Fig. 1. Recently, it was described that the undertaking of conformational analysis requires consideration of the conformational process as a sequence of elementary conformational steps [19].

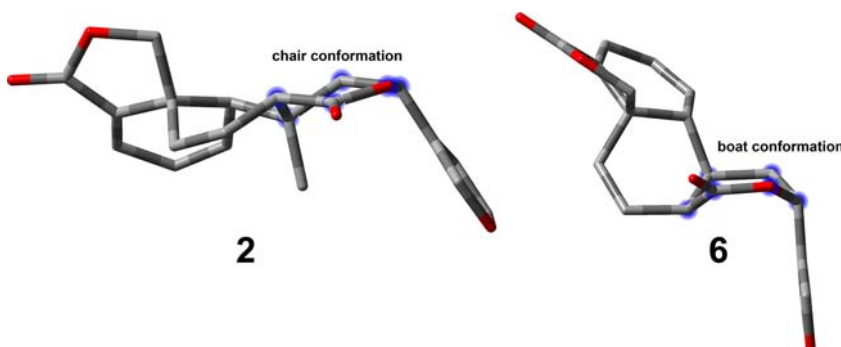
Diterpenes shown in Fig. 1 are structurally related and chemical transformations can be proposed. Based on previous biogenic studies and plausible chemical reactions, the formation of compounds **2–5** from compound **1** can be hypothesized.

The chemical reactions that conduct to the formation of compounds **2–12** from compound **1** are shown in Scheme 1. To assess the viability of these transformations, we calculated the energy of each of these structures for each single reaction.

The first step consists of the formation of a mixture of compounds **6** and **7** with the conrotatory cyclization promoted by light. It is known that the reaction promoted by light competes with the one promoted by heat. Thus, the formation of compounds **9** and **10** is plausible; and are referred here as hypothetical compounds. Compound **7**, also known as linearolactone [20], is reported in the literature as energetically more stable than its diastereomer, compound **6**, as we show in Scheme 1.

In a second step, compound **6** is transformed to compound **2** via epimerization by subtraction of the acidic proton of the

Fig. 2 Minimum energy conformations of compounds **2** and **6** calculated at mPW1B95 6-31+G(d,p) level of theory



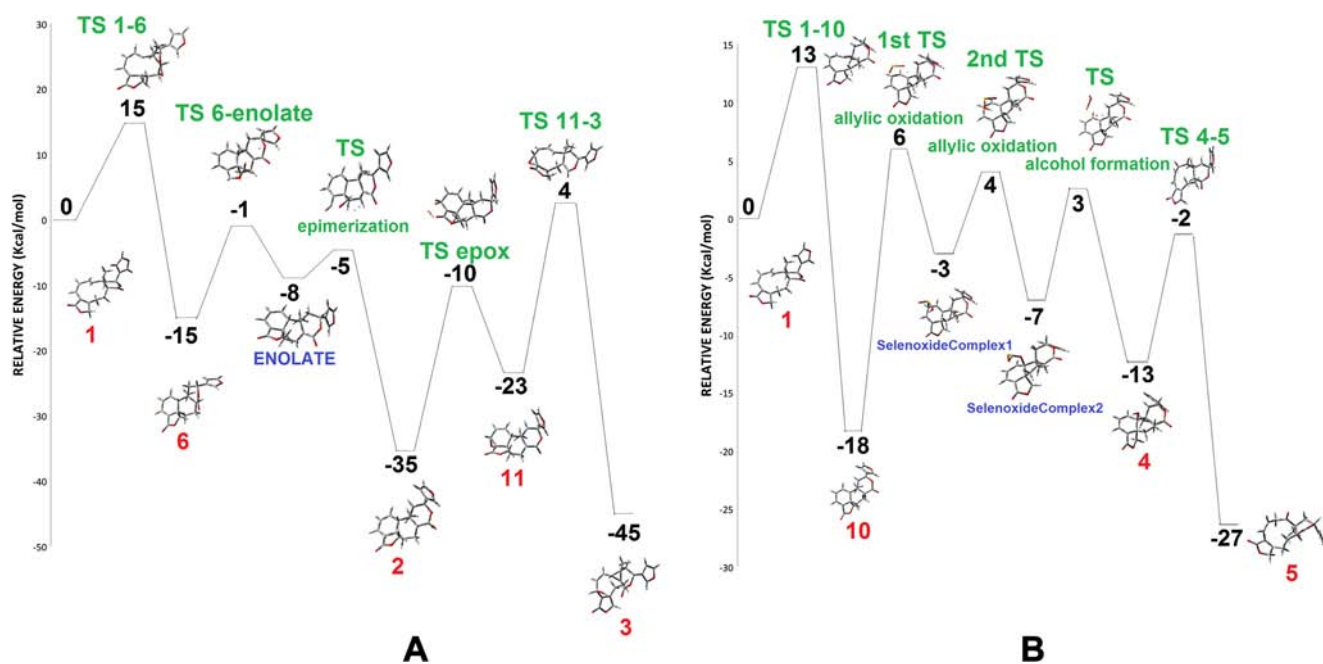


Fig. 3 Reaction coordinate of formation of compounds 2–5 from compound 1, following photochemical (a) and thermal (b) transformation

δ -lactone in basic media with non nucleophilic base. After epimerization the δ -lactone on compound 2 is in a chair conformation and is 50.1 kcal mol⁻¹ more stable than compound 6, which is in a boat conformation (Fig. 2).

Compound 2 can then form compounds 11 and 12 using peroxide; the epoxide formed prefer position 1,4 than 1,6 because the charge separation creates less stable compounds.

The compounds 3 and 8 can be formed in basic media with a concerted mechanism due the inductive capacity of epoxide oxygen.

Compound 10 is more stable by 0.24 kcal mol⁻¹ than its diastereoisomer, compound 9. Compound 10 can be oxidized to compound 4 via pericyclic reaction by example oxidation with selenium dioxide. Compound 4 is more stable than compound 10 by 41 kcal mol⁻¹. Lastly, compound 4 is in keto-enol equilibrium with compound 5 which is 7.83 kcal mol⁻¹ more stable.

To get an idea of how reliable our biogenetic hypothesis obtained with DFT showing compound 1 as a precursor of the biogenesis of compounds 2–5 is, all energies of these compounds and intermediates were referred to compound 1, calculated with mPW1B95 and the basis set 6-31+G(d,p). The energies of compounds 1–5, their transition states, and intermediates are shown in Fig. 3. Compound 1 renders compounds 3 and 5 with a downhill energy transformation.

Conclusions

The genus *Salvia* continues to be an important source of a large number of diterpenoids. In this work, the biogenesis of

five neo-clerodane-type compounds isolated from *Salvia microphylla* [11] were theoretically evaluated using computational methods. The biogenetic pathways that conduct to these compounds allow investigating the bases of their structural diversity. The high structural similarity of the terpenes studied here with salvinorin A, suggests the exploration of similar therapeutic properties. Investigation of therapeutic properties may lead to unprecedented findings, such as the one observed for salvinorin A.

The results presented here support the rationalizations of the biogenesis of these diterpenes. More specifically, the computational results explain the origin of the intermediates and transition states calculated. Based on our data, the third generation density functionals, such as mPW1B95, significantly improve the description of the energetic barriers and have a reasonable representation of the potential energy surface for terpenoids and small molecules. Therefore, mPW1B95 appears to be the best choice to calculate the energetics and transition states of the proposed biogenesis.

Acknowledgments The authors acknowledge Institute of Chemistry for financial support at UNAM. Authors thank Dr. Alfredo Ortega for his contribution and support for the development of this work. *JAPS* also acknowledge to CONACyT, for the granted scholarship (239976).

References

- Ortega A, Blount JF, Manchand PS (1982) *J Chem Soc* 1:2505–2508
- Holden KG, Tidgewell K, Marquam A, Rothman RB, Navarro HN, Prisinzano TE (2007) *Bioorg Med Chem* 17:6111–6115

3. Domínguez VG, Berlin B, Castro RAE, Estrada LE (2002) Serie Botánica. vol 73. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México
4. Kamatou GPP, Makunga NP, Ramogola WPN, Viljoen AM (2008) *J Ethnopharmacol* 119:664–672
5. Topçu G, Türkmen Z, Ulubelen A, Schilling JK, Kingston DGI (2004) *J Nat Prod* 67:118–121
6. Gödkil G, Topçu G, Sönmez U, Ulubelen A (1997) *Phytochemistry* 46:799–800
7. Moghaddam FM, Farimani MM, Seirafi M, Taheri S, Khavasi HR, Sendker J, Proksch P, Wray V, Edrada R (2010) *J Nat Prod* 73:1601–1605
8. Xu G, Yang J, Wang YY, Peng LY, Yang XW, Pan ZH, Liu ED, Li Y, Zhao QS (2010) *J Agric Food Chem* 58:12157–12161
9. Calzada F, Yopez-Mulia L, Tapia-Contreras A, Bautista E, Maldonado E, Ortega A (2010) *Phytother Res* 24:662–665
10. Bisio A, Damonte G, Fraternali D, Giacomelli E, Salis A, Romussi G, Cafaggi S, Ricci D, De Tommasi N (2011) *Phytochemistry* 72:265–275
11. Bautista E, Maldonado M, Ortega A (2014) *J Nat Prod* 77:1088–1092
12. Richards JH, Hendrickson JB (1964) *The biosynthesis of steroids, terpenes and acetogenins*. Benjamin, New York
13. Allermann RK, Young NJ, Ma S, Truhlar DG, Gao J (2007) *J Am Chem Soc* 128:13008–13013
14. Gershenzon J, Croteau R (1990) *Biochemistry of the mevalonic acid pathway to terpenoids*. Plenum, New York
15. Barquera-Lozada JE, Quiroz-García B, Quijano L, Cuevas G (2010) *J Org Chem* 75:2139–2146
16. Barquera-Lozada JE, Cuevas G (2009) *J Org Chem* 74:874–883
17. Kassaei MZ, Koohi M, Arshadi S (2005) *THEOCHEM* 724:61–71
18. Ortega A, Maldonado E (1989) *Heterocycles* 29:635–638
19. Fernández-Alonso MC, Asensio JL, Cañada FJ, Jiménez-Barbero J, Cuevas G (2003) *Phys Chem* 4:748–753
20. Esquivel B, Cárdenas J, Ramamoorthy TP, Rodríguez-Hahn L (1986) Clerodane diterpenoids of *Salvia lineata*. *Phytochemistry* 25:2381–2384



Identification of potent and compartment-selective small molecule furin inhibitors using cell-based assays



Bruno Ramos-Molina^a, Adam N. Lick^a, Elias H. Blanco^a, J. Alejandro Posada-Salgado^b, Karina Martinez-Mayorga^b, Alan T. Johnson^c, Guan-Sheng Jiao^{c,1}, Iris Lindberg^{a,*}

^a Department of Anatomy and Neurobiology, School of Medicine, University of Maryland-Baltimore, MD, USA

^b Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Department of Chemistry, Hawaii Biotech, Inc., Aiea, HI, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2015

Accepted 11 May 2015

Available online 21 May 2015

Keywords:

Furin

Proprotein convertases

Furin inhibitors

Cell-based assays

Protease

ABSTRACT

The proprotein convertase furin is implicated in a variety of pathogenic processes such as bacterial toxin activation, viral propagation, and cancer. Several groups have identified non-peptide compounds with high inhibitory potency against furin *in vitro*, although their efficacy in various cell-based assays is largely unknown. In this study we show that certain guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives exhibit interesting *ex vivo* properties. Compound **1b** (1,1'-(4-((2,4-diguanidino-5-(4-guanidinophenoxy)cyclohexyl)oxy)-1,3-phenylene)diguanidine) is a potent and cell-permeable inhibitor of cellular furin, since it was able to retard tumor cell migration, block release of a Golgi reporter, and protect cells against *Bacillus anthracis* (anthrax) and *Pseudomonas aeruginosa* intoxication, with no evident cell toxicity. Other compounds based on the 2,5-dideoxystreptamine scaffold, such as compound **1g** (1,1'-(4,6-bis(4-guanidinophenoxy)cyclohexane-1,3-diyl)diguanidine) also efficiently protected cells against anthrax, but displayed only moderate protection against *Pseudomonas* exotoxin A and did not inhibit cell migration, suggesting poor cell permeability. Certain bis-guanidinophenyl ether derivatives such as **2f** (1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy) benzene) exhibited micromolar potency against furin *in vitro*, low cell toxicity, and highly efficient protection against anthrax toxin; this compound only slightly inhibited intracellular furin. Thus, compounds **1g** and **2f** both represent potent furin inhibitors at the cell surface with low intracellular inhibitory action, and these particular compounds might therefore be of preferred therapeutic interest in the treatment of certain bacterial and viral infections.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The proprotein convertase (PC) furin is a calcium-dependent serine endoprotease with a neutral pH optimum that is widely distributed in mammalian cells and tissues. The furin protein, encoded by the *PCSK3* gene, consists of four different domains: a

prodomain, involved in folding and activation; a catalytic domain, which includes the catalytic triad Asp-His-Ser typical of all proprotein convertase family members; the homo B domain (also called the P domain), which is essential for enzyme activity and is known to contribute to enzymatic properties (calcium binding, pH dependence, and substrate specificity); and the C-terminal domain (for reviews see [1,2]). Furin contains a C-terminal transmembrane domain/cytoplasmic tail within this latter domain, which enables this enzyme to bind cytoplasmic routing proteins and to cleave its substrates within three distinct subcellular compartments, the trans-Golgi network (TGN); the plasma membrane; and the endosomal compartment following its retrieval from the cell surface (reviewed in [3]). Due to this complex cellular itinerary, furin is capable of cleaving a wide range of precursor proteins. Some of the more notable substrates of furin include growth factors and receptors, serum proteins, extracellular matrix components, and protease precursors (e.g. matrix metalloproteinases) [4]. Furin typically processes

Abbreviations: AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; CHO, Chinese hamster ovary; ER, endoplasmic reticulum; G, guanidino group; GRAP, Golgi-retained alkaline phosphatase; LF, lethal factor; MMP, matrix metalloproteinases; PA, protective antigen; PC, proprotein convertase; pRTKR-MCA, Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide; SEAP, secreted alkaline phosphatase; TGN, trans-Golgi network.

* Corresponding author at: Department of Anatomy and Neurobiology, School of Medicine, University of Maryland-Baltimore, 20 Penn St, HSF2, S251, Baltimore, MD 21201, USA. Tel.: +1 410 706 4778; fax: +1 410 706 2512.

E-mail addresses: jiao@hibiotech.com (G.-S. Jiao),

ilindberg@som.umaryland.edu (I. Lindberg).

¹ G.-S. Jiao is co-corresponding author regarding the inhibitor chemistry.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.008>

0006-2952/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

precursor proteins at sites with the consensus sequence Arg-X-X-Arg, where the middle residues are also often basic residues; the most frequent site is Arg-X-Lys/Arg-Arg [1].

The furin knockout mouse dies early during embryonic development; death is thought to derive from an inability to produce correctly processed vital growth factors [5]. Furin is not, however, required for tissue viability after development, as tissue-specific knockout mice exist ([6]; reviewed in [7]), as do cell lines which do not express furin (e.g. LoVo; [8]). Furin activity contributes to numerous human pathological conditions such as Alzheimer's disease, arthritis, atherosclerosis, and cancer [9–12]. Overexpression of human furin is correlated with increased carcinogenic potential [4,13–15]. High furin activity is associated with increased proteolytic processing of the precursor to the membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) [16] and insulin-like growth factor-1 (IGF1), as well as of the IGF1 receptor present on the surface of tumor cells [17]; these actions may explain the correlation of increased furin activity with carcinogenesis. Furthermore, host cell furin participates in the activation of many bacterial toxins, such as anthrax, diphtheria, Shiga and *Pseudomonas aeruginosa* toxins [18,19] as well as in the activating cleavage of viral envelope glycoproteins necessary for the propagation of many viral pathogens including H5N1 avian influenza, human immunodeficiency, and Ebola viruses [20–22]. Because of its involvement in so many disease-related processes, furin has emerged as a potentially important drug target.

Therapeutic administration of furin inhibitors has been frequently proposed for the treatment of viral and pathogenic infections [23–25]. Additionally, inhibitors of furin and PACE4 (another member of the convertase family) have been used to reduce cancer cell invasiveness [26] and to block tumor growth in mice [17,27–29]. A number of synthetic inhibitors against furin have been recently generated using the crystal structure of furin [30]. However, most prior studies of non-peptide furin inhibitors have been carried out *in vitro*, providing only limited information on the potency or toxicity of these compounds within cells. Interestingly, a series of non-peptide small molecules based on a 2,5-dideoxystreptamine scaffold was previously shown to potently inhibit furin *in vitro* [31]. In the work presented here, we have performed a systematic structure–activity relationship study of these 2,5-dideoxystreptamine derivatives using multiple cell-based assays, identifying the most potent, non-toxic, and compartment-selective inhibitors of cellular furin activity. In addition, we report novel bis-guanidinophenyl ether compounds with high inhibitory potency for furin *in vitro*; these inhibitors also exhibit low cellular toxicity and efficiently protect cells against anthrax and *Pseudomonas* toxemias.

2. Materials and methods

2.1. Compound synthesis

All of the compounds in the study were synthesized at Hawaii Biotech, Inc. (Aiea, HI). Compounds **1a–c**, **e–k**, **m**, and **p–r** were prepared following the procedures described previously [31]. Compounds **2a–f** (**a**, 1,3-bis(4-guanidinophenoxy)propane; **b**, *cis*-1,3-bis(4-guanidinophenoxy)cyclohexane; **c**, 1,3-bis(4-guanidinophenoxy)benzene; **d**, 1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy)propane; **e**, *cis*-1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy)cyclohexane; **f**, 1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy)benzene) were synthesized *via* reaction of 1,3-propanediol, *cis*-1,3-cyclohexanediol, or 1,3-benzenediol with 1-fluoro-4-nitrobenzene or 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, followed by hydrogenation, guanidination with *N,N'*-bis(tert-butoxycarbonyl)-*N''*-trifluoromethanesulfonylguanidine, and deprotection with trifluoroacetic acid (Fig. 1).

2.2. Enzyme assays and determination of IC₅₀ values

Soluble human furin was purified from the conditioned medium of methotrexate-amplified, stably transfected CHO DG44 cells as previously described [32]. The furin assay was performed in 96-well polypropylene microtiter plates in a final volume of 100 μ l, containing 100 mM HEPES, pH 7.0, 5 mM CaCl₂, 0.1% Brij 35, 0.1% NaN₃, and 0.1 mg/ml BSA. The substrate Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (pRTKR-MCA; Peptides International, Lexington, KY) was used at a final concentration of 100 μ M. Furin was used at a final concentration of 15 nM. Reaction mixtures were incubated at 37 °C and fluorescence measurements (380 nm excitation, 460 nm emission) were taken under kinetic conditions every minute for 60 min in a SpectraMax M2 microplate reader. For IC₅₀ assays, serial dilutions of compounds were performed to give final concentrations between 100 nM and 250 μ M in 50 μ l. After a 30-min preincubation at room temperature, pRTKR-MCA was added, and residual enzyme activities were monitored by measuring aminomethylcoumarin fluorescence intensity. Data were analyzed using Prism 5 as described previously [33].

2.3. Enzyme kinetics

Studies of furin inhibition kinetics were carried out at various concentrations of pRTKR-MCA ranging from 0 to 200 μ M in the presence and absence of inhibitors. For all kinetic measurements, the compounds were preincubated with enzyme for 30 min before the addition of substrate. All assays were performed in triplicate in 96-well microplates. Inhibition constants (K_i) were determined using the equation $K_i = IC_{50}/(1 + ([S]/K_m))$ [32,34]. The K_m value of furin used for this substrate was 8 μ M, as described previously [35].

2.4. SEAP activity assays

CHO-GRAPfurin cells were obtained as a kind gift of Dr. A. Rehemtulla (University of Michigan). These cells, expressing the hybrid reporter protein GRAPfurin consisting of the secreted alkaline phosphatase (SEAP) protein fused to a Golgi retention signal *via* a specific furin recognition/cleavage site [36], were plated in 96-well plates and incubated with OptiMem containing 100 μ M of either drug or vehicle for 16–20 h. The medium was collected, centrifuged, and heated for 30 min at 65 °C to inactivate endogenous alkaline phosphatases; SEAP activity remains unaffected after heating. Two and a half μ l of heated medium sample were mixed with 100 μ l of assay buffer (100 mM Tris-HCl, pH 10, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) and 100 μ l of 36 μ M 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) in 50 mM Tris, pH 10. Fluorescence was measured by excitation at 365 nm and recording emission at 460 nm continuously during incubation at 37 °C for 1 h. SEAP liberated from the furin reporter is secreted; thus, SEAP levels present in the medium are proportional to the activity of Golgi furin [26].

2.5. Cell migration assays

HT1080 fibrosarcoma cells (ATCC# CCL-121) were cultured to 80% confluence in growth medium (MEM with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 1:100 non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 1% penicillin-streptomycin and 1% gentamicin). Cells were plated in Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies) plates (10⁵ cells per well) following the manufacturer's protocol. The next day, the growth medium was removed and the wells were rinsed with Dulbecco's PBS (D-PBS; Ca⁺⁺- and Mg⁺⁺-free), and the cells were incubated in assay medium (MEM with 2 mM L-glutamine, 10%

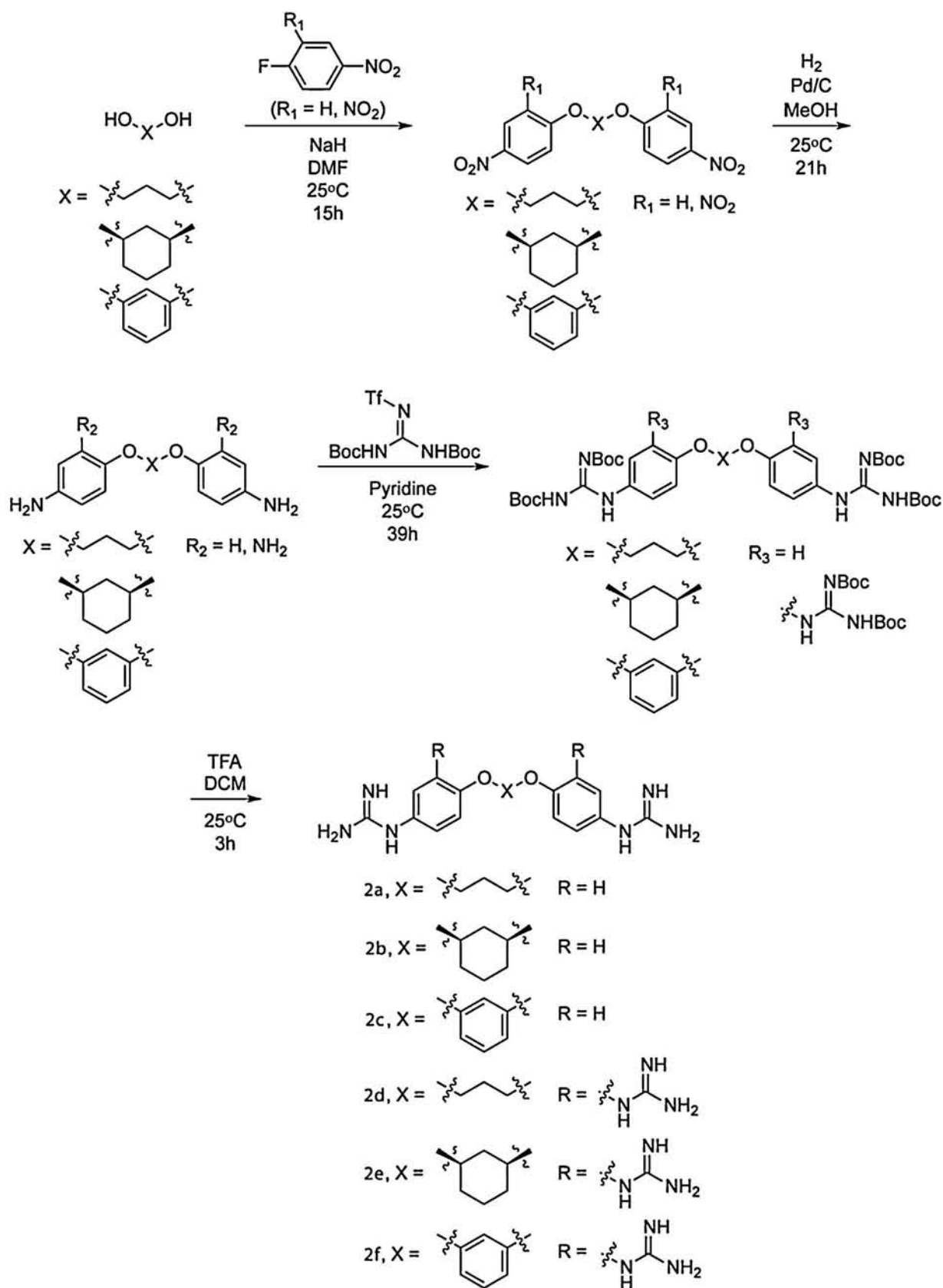


Fig. 1. Synthesis of bis-guanidinophenyl ether compounds 2a–f.

heat shocked FBS, 1:100 non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 1% penicillin-streptomycin and 1% gentamicin) in the presence or absence of inhibitor for 20–24 h at 37 °C and 5% CO₂. After incubation the cells were rinsed with D-PBS (containing

calcium and 20 mM HEPES), and incubated with the Live/Dead Cell Stain Kit containing 2 μM calcein AM and 4 μM ethidium homodimer (EthD-1) for 30 min at 37 °C and 5% CO₂. The fluorescence was measured at 485/528 nm excitation/emission

for calcein AM, and 530/645 nm for EthD-1. The experiments were repeated independently 2–3 times for each inhibitor. The results are presented as the percentage of survival \pm SD for the mean of all assays.

2.6. *Pseudomonas* exotoxin A assays

Chinese Hamster Ovary (CHO) DG44 cells were cultured to 80% confluence in growth medium (DMEM:F12 (1:1) with 2 mM L-glutamine, 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin). CHO DG44 cells were seeded into microtiter plates (10^4 per well) and treated 24 h later with 50 ng/ml *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (List Biologicals) in the presence or absence of 10 or 100 μ M of inhibitor for 20–24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cell viability was monitored by incubation for 2–4 h with the mitochondrial dye WST-1 (Roche). The experiments were repeated independently 3–5 times for the various sets of inhibitors, using triplicate wells each time. The results are presented as the percentage of survival \pm SD for the mean of all assays.

2.7. Anthrax toxin assays

The effect of all compounds on anthrax toxemia was studied in the murine macrophage cell line RAW267.7. Cells were grown in RPMI medium with 10% fetal bovine serum, seeded into microtiter plates (10^4 per well), and treated 12 h later with 400 ng/ml protective antigen (PA) and 200 ng/ml lethal factor (LF) (List Biologicals) in the presence of either 10 or 100 μ M of each inhibitor for a 2 h period. Inhibitors were added immediately following treatment of cells with PA + LF. Cell viability was monitored with WST-1. The experiments were repeated independently three times using triplicate wells. The results are presented as the percentage of survival \pm SD from the mean of all assays.

2.8. Cytotoxicity assays

In order to assess the ability of each compound to affect cytotoxicity, a 24 h cytotoxicity assay was performed in CHO DG44, HT1080 and RAW267.7 cells using the mitochondrial dye WST-1. Cells were seeded in 96-well plates to achieve 50% confluence the next day, and then incubated with each compound or vehicle in triplicate. After incubation with inhibitors, cells were further incubated for 2–4 h with 10 μ l of WST-1 reagent per well, and the absorbance was measured at 450 and 600 nm. To distinguish effects on cell proliferation from effects on cell viability, a 2 h cytotoxicity assay was performed in parallel (not shown). No differences were observed at these two periods of incubation. Independent experiments were performed on at least 3 occasions, with the results presented \pm SD for the mean of all assays.

2.9. Molecular modeling

The atomic coordinates of furin were obtained from the X-ray crystal structure of human furin in complex with the competitive inhibitor meta-guanidinomethyl-Phac-RVR-Amba [37] (PDB-entry 4OMC). Enzyme preparation was performed using the program “Molecular Operating Environment” (MOE version 2013). As a validation step, our docking of the co-crystallized ligand was able to closely reproduce the orientation and conformation reported in this X-ray structure. First, each molecule was aligned to the co-crystallized ligand using the flexible alignment methodology implemented in MOE, and then the best alignment was selected for docking into the catalytic pocket.

3. Results

3.1. Structure–activity relationship studies of guanidylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives using cell-based assays

A previous study identified a series of non-peptide small molecules based on the 2,5-dideoxystreptamine scaffold which exhibited great inhibitory activity against furin *in vitro* [31]. However, in this study only limited data were reported on the cellular potencies of these compounds. Here we have tried to elucidate the structure–activity relationships of these 2,5-dideoxystreptamine derivatives using four different compartment-specific cell-based assays. Table 1 summarizes the cell-based assays and the cell lines used in this work: (1) CHO-GRAPfurin cell/SEAP assay to test furin cleavage within the trans-Golgi network (TGN); (2) HT1080 fibrosarcoma cell migration assay to test the furin-mediated activating cleavage of matrix metalloproteinases in the TGN; (3) CHO-DG44 cell/*Pseudomonas* exotoxin A assay to test furin activity in the endocytic pathway; and (4) RAW264.7 macrophage cell/anthrax assay to examine furin activity at the cell surface. In order to assess the general cytotoxicity of the compounds under study, control cytotoxicity experiments were also conducted in both CHO and HT1080 cells.

For a better structural understanding, the 2,5-dideoxystreptamine compounds were divided into four structurally similar groups. Fig. 2 shows the structures, effects on cellular furin activity, and the cytotoxicity of a set of guanidylated 2,5-dideoxystreptamine phenyl ether derivatives. The molecules **1a**, **1b** and **1g** exhibited nanomolar potency against furin *in vitro* (Fig. 2A) and showed negligible toxicity either in CHO cells (Fig. 2B) or in HT1080 cells (data not shown) at 100 μ M. However, only **1a** and **1b** were able to inhibit intracellular furin, as judged by the release of SEAP from Golgi stores by cleavage of the reporter at the furin consensus site (Fig. 2C). Both of these compounds were also good inhibitors of cell migration (Fig. 2D). Despite its high potency *in vitro*, compound **1g** was unable to inhibit either TGN-associated furin or cell migration (Fig. 2C and D). Interestingly, compound **1b** was capable of blocking both *Pseudomonas* and anthrax toxemia at low doses (Fig. 2E and F). Compound **1g** also potentially prevented anthrax toxicity (Fig. 2F). Considering its inability to block furin activity in the TGN, and its modest effect on furin activity in the endocytic pathway (as demonstrated by the *Pseudomonas* exotoxin A assays (Fig. 2E)), compound **1g** might represent a good candidate for selective extracellular inhibition. On the other hand, compound **1h**, whose main difference from **1a**, **1b** and **1g** is the absence of guanidino groups at the *para* position, not only showed no or very weak furin inhibition *in vitro* and within cells, but also exhibited poor protection against bacterial toxins.

In an effort to determine whether modification of the ring structure affects assay selectivity, we assessed the effect of a set of guanidylated 2,5-dideoxystreptamine pyridinyl ether analogs, the heterocyclic analogs of phenyl ether derivatives, on cellular furin activity (Fig. 3). While none of these compounds were toxic (Fig. 3B), in accord with their poor inhibitory potencies against furin *in vitro* (Fig. 3A), compounds **1m**, **1j** and **1k** showed no or very

Table 1

Cell-based assays and cell lines used to test furin activity within different cellular compartments. GRAP: Golgi-retained alkaline phosphatase; SEAP: secreted alkaline phosphatase; TGN: trans-Golgi network.

Assay	Compartment	Cell line
SEAP activity	TGN	CHO-GRAPfurin
Cell migration	TGN	HT1080
<i>Pseudomonas</i> exotoxin A	Endosomes	CHO DG44
Anthrax	Cell surface	RAW264.7

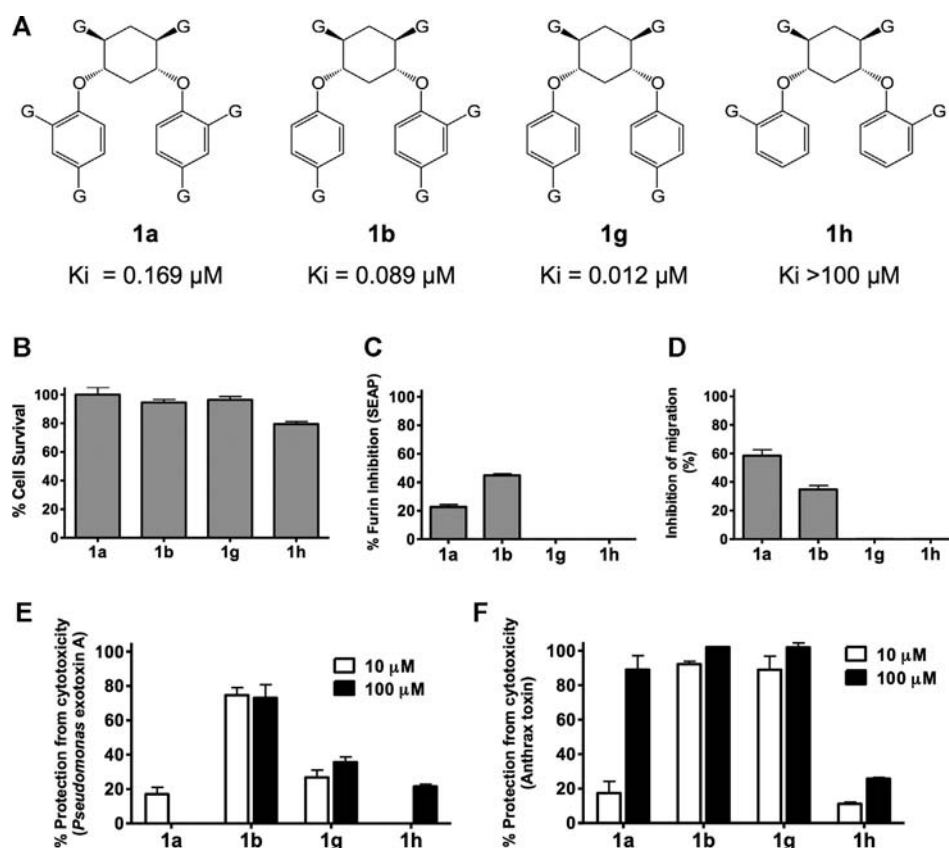


Fig. 2. Effect of guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine phenyl ether derivatives **1a**, **1b**, **1g** and **1h** on cellular furin activity. (A) The chemical structures and K_i values of compounds **1a**, **1b**, **1g** and **1h**. K_i values were taken from the literature [31]. (B) CHO cells were incubated with each compound at a final concentration of 100 μM for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, and cell viability was monitored by incubation for 2 h with WST-1. (C) CHO-GRAPfurin cells, expressing Golgi-retained secreted alkaline phosphatase, was incubated with 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the SEAP activity was measured in the medium. (D) Migration of HT1080 cells after incubation with 100 μM of each inhibitor for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (E) Protection from *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A cytotoxicity in CHO DG44 cells in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (F) Protection from anthrax toxin cytotoxicity in RAW264.7 cells incubated in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Where no error bar is visible, errors were within the range of the data shown. Compounds showing zero inhibition lack data bars. G, guanidino group.

weak inhibition of cellular furin (Fig. 3C–F). However, compound **1i** exhibited near complete protection against *Pseudomonas* and anthrax toxins at 100 μM (Fig. 3E and F), the former action suggesting its effective uptake by endocytosis. Note that **1i** possesses biological properties similar to those of **1g** (e.g. protection against exotoxin A and anthrax toxin, and no inhibition of TGN-related furin activity), in agreement with its structural homology with this compound (Fig. 2A). These data indicate that the addition of a nitrogen atom to the aromatic ring at the *ortho* position improves the protective action against *Pseudomonas* toxin, but may lessen protection against anthrax toxin.

As shown in Fig. 4, the analogs **1c**, **1e** and **1f**, which possess increasing hydrophobicity via replacement of one or two phenyl groups by naphthyl groups, exhibited high *in vitro* potency against furin (Fig. 4A), although they were also moderately cytotoxic and showed poor inhibitory capacity against intracellular furin (Fig. 4B and C). Interestingly, compound **1f** significantly inhibited cell migration, protected against *Pseudomonas* exotoxin A at low concentrations, and effectively blocked anthrax toxemia (Fig. 4D–F). By contrast, **1c** was also able to inhibit migration (more efficiently than **1f**), but did not protect against exotoxin A, and blocked anthrax toxicity less efficiently than **1f** (Fig. 4E and F). Compound **1e**, which differs from **1c** by the absence of a guanidino group at the *ortho* position, did not possess any inhibitory effect on migration, but exhibited better protection against bacterial toxins (Fig. 4D–F). In general, however, despite their mild cytotoxicity (**1c**, **1e**), compounds in this third set containing the more hydrophobic groups seem to specifically exhibit increased inhibitory potency on

cell migration in comparison to similar, more polar, 2,5-dideoxystreptamine derivatives (Figs. 2D, 3D, and 4D).

The analogous carbamate compounds **1q** and **1p** (Fig. 5A), containing guanidino groups at the *meta*- and *para*-positions of the phenyl ring respectively, displayed micromolar potency against furin *in vitro*, but were moderately cytotoxic (**1q**, **1p**) and, except for **1p**, did not inhibit intracellular furin even at a concentration of 100 μM (Fig. 5C and D). The analog **1r**, which includes guanidino groups at the *ortho*-position, was totally unable to inhibit furin, either *in vitro* or intracellularly. In comparison to **1q**, the **1p** analog was much less toxic (Fig. 5B), inhibited cell migration by almost 40% (Fig. 5D), and completely protected cells against *Pseudomonas* toxin (Fig. 5E). By contrast, this compound only poorly blocked anthrax toxemia (Fig. 5F). As evidenced by comparing compounds **1p** and **1g** (Fig. 2), the presence of the carbamate groups appears to decrease both the inhibitory capacity on furin *in vitro* and the protective effect against anthrax toxin at the cell surface. However, the carbamate groups likely improve cell permeability and/or uptake, as demonstrated by the superior inhibitory effects of this set of compounds on cell migration and on endosomal activation of exotoxin A at 100 μM .

3.2. Inhibition of furin activity *in vitro* and *ex vivo* by bis-guanidinophenyl ether compounds

Given the limited inhibition of intracellular furin by guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives, we designed and synthesized a series of compounds in which the guanidino phenyl

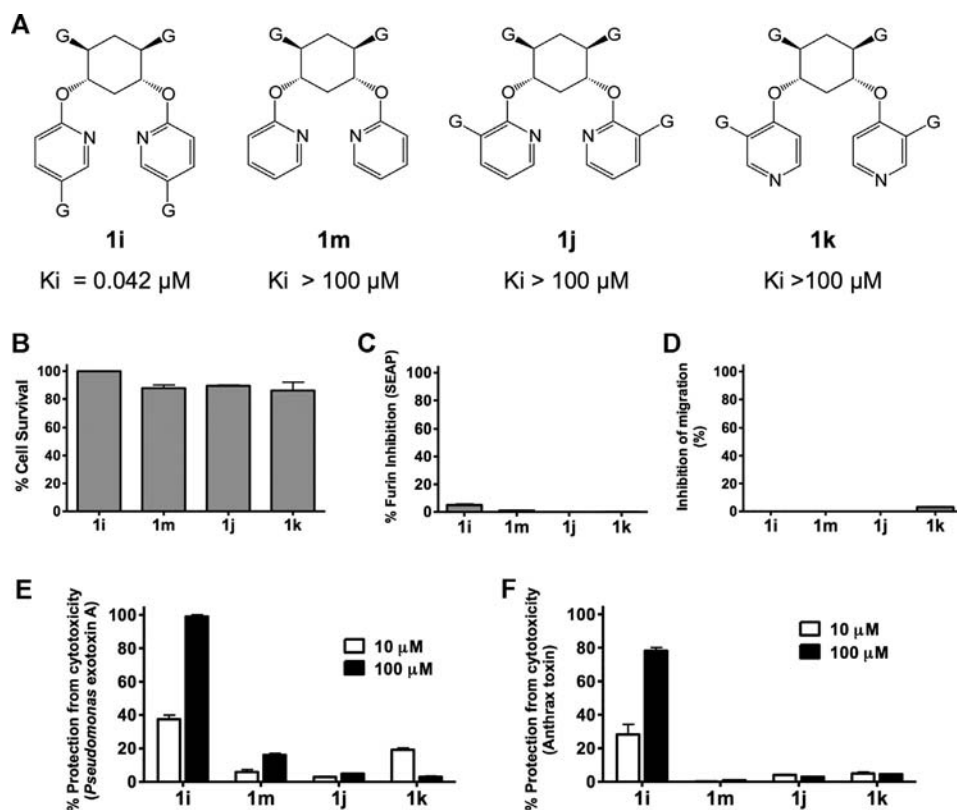


Fig. 3. Effect of guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine pyridinyl ether derivatives **1i**, **1m**, **1j** and **1k** on cellular furin activity. (A) Chemical structures and K_i values (taken from [31]). (B) CHO cells were incubated with each compound at 100 μM for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, and cell viability was monitored by incubation for 2 h with WST-1. (C) Inhibition of SEAP secretion in the conditioned medium from CHO-GRAPfurin cells incubated with 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (D) Inhibition of migration of HT1080 cells after incubation with each inhibitor (100 μM) for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (E) Protection from *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A cytotoxicity in CHO DG44 cells in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (F) Protection from anthrax toxin cytotoxicity in RAW264.7 cells incubated in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Where no error bar is visible, errors were within the range of the data shown. Compounds showing zero inhibition lack data bars. G, guanidino group.

groups were maintained (for maintaining potency against furin) but the middle linker—the polar 1,3-diguanidinocyclohexane group—was replaced by less polar groups, such as propane (compounds **2a** and **2d**), cyclohexane (compounds **2b** and **2e**), or benzene (compounds **2c** and **2f**), in order to observe whether the cellular activity could be improved. The synthesis of these compounds is described in detail in Fig. 1.

The efficacy of these new molecules in inhibiting furin *in vitro* was initially characterized by determining IC_{50} values [38] and further by obtaining K_i s, as described in “Materials and Methods”. These data revealed that this series of bis-guanidinophenyl ether compounds inhibited furin in the micromolar range *in vitro*, substantially less potent than the guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives (Fig. 6). The mechanism of inhibition was competitive (not shown). Interestingly, the addition of two guanidino groups to the phenyl ring improved the inhibitory potency 3–4 times (*i.e.* **2a** vs **2d**; **2b** vs **2e**; **2c** vs **2f**). The inhibitory potency of these compounds against furin was also dependent on the middle linker group, in the order of benzene > cyclohexane > propane (Fig. 6). Several dideoxystreptamine furin inhibitors—such as compound **1g**—are known to exhibit substantial cross-inhibition with the proprotein convertases PC5 and PACE4 [31]. While these two enzymes were not available for testing, the bis-guanidinophenyl ether compounds did not inhibit PC2 even at 100 μM , and of compounds **2b** to **2e**, only **2d** and **2e** were found to inhibit PC1/3, and only at high concentrations (51% and 38% inhibition respectively at 100 μM , with no inhibition detected at 10 μM).

Excepting compound **2c**, which was slightly toxic at 10 μM and highly toxic at 100 μM , the bis-guanidinophenyl ether compounds

were not toxic at 10 μM , and only certain derivatives such as **2a**, **2b** and **2f** showed slight or modest cell toxicity at 100 μM (Fig. 7A). The high cell toxicity of **2c** may be due to the presence of the middle aromatic group. In fact, the addition of guanidino groups at the *ortho*-positions of the phenyl ring significantly alleviated toxicity (**2c** vs **2f**). Fig. 7B shows that compounds **2a**, **2b** and **2c** were able to inhibit 30–50% of cellular furin activity within the TGN, although these results were directly correlated with cytotoxicity and thus may not reflect actual furin inhibition. Compounds **2d**, **2e** and **2f** inhibited only 10–15% of TGN-associated furin activity, suggesting poor entry into this compartment. All of these compounds were able to inhibit the migration of HT1080 fibrosarcoma cells, the most potent inhibitor being **2c** (Fig. 7C). Again, however, this effect may be associated with cellular toxicity, since these cells were not viable after a 1-day incubation with 100 μM of this compound (data not shown). The remainder of these compounds effectively inhibited cellular migration, from around 40% (**2a**, **2b** and **2d**) to 20–25% (**2e** and **2f**); since only limited cytotoxicity was seen, these compounds represent the second most effective compounds on cell migration, after **1a** and **1c** (60–70% protection).

In the endocytic pathway, compounds **2d**, **2e** and **2f** exhibited good protection against *Pseudomonas* toxemia, increasing the cell viability to 40% in the case of **2f** at 100 μM (Fig. 7D). All of these compounds, except **2c**, also showed moderate protection against *Pseudomonas* exotoxin A at 10 μM , suggesting good uptake into the endosomal system. In agreement with the idea of poor cellular permeability into the TGN of CHO-GRAPfurin cells (Fig. 7B), compounds **2d**, **2e** and **2f** exhibited potent cell activity at the cell surface, with excellent protection against anthrax toxicity at

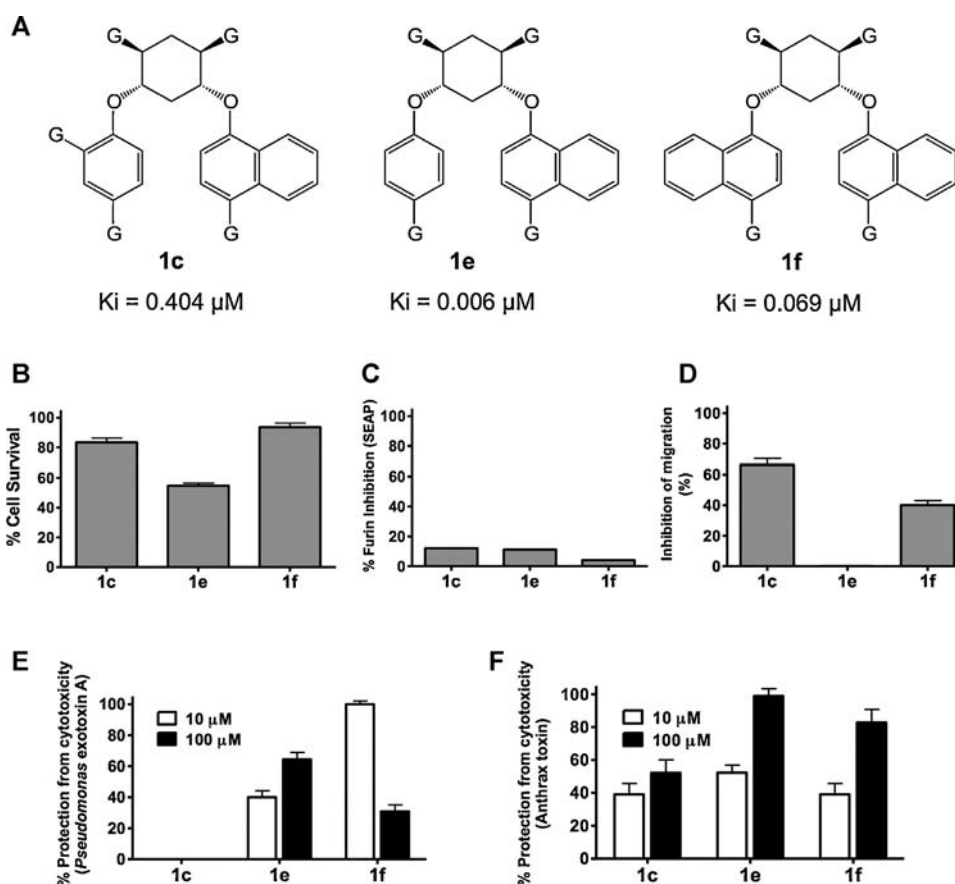


Fig. 4. Effect of guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine phenyl/naphthyl ether derivatives **1c**, **1e** and **1f** on intracellular furin activity. (A) Chemical structures and K_i values (taken from [31]). (B) General cytotoxicity. CHO cells were incubated with each compound at 100 μM for 24 h at 37 $^\circ\text{C}$, and cell viability was monitored by incubation for 2 h with WST-1. (C) Inhibition of intracellular furin activity. CHO-GRAPfurin cells were incubated with 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^\circ\text{C}$, and SEAP activity was measured in the medium. (D) Inhibition of migration of HT1080 cells during incubation of 100 μM of each inhibitor for 24 h at 37 $^\circ\text{C}$. (E) Protection from cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in CHO DG44 cells in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^\circ\text{C}$. (F) Protection from cytotoxicity of anthrax toxin in RAW264.7 cells incubated in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 2 h at 37 $^\circ\text{C}$. Where no error bars are visible, errors were within the range of the data shown. Compounds showing zero inhibition lack data bars. G, guanidino group.

100 μM inhibitor (Fig. 7E). Interestingly, inhibitor **2f** showed almost complete protection at only 10 μM ; it was also the most potent of this series *in vitro* ($K_i = 0.4 \mu\text{M}$; Fig. 6). Conversely, compound **2a** was unable to block anthrax toxicity even at 100 μM , which is likely related to its intrinsically low potency *in vitro* toward furin ($K_i = 8.3 \mu\text{M}$, Fig. 6). These data are consistent with the idea that inhibitory potency against anthrax toxemia is most closely correlated with inhibition in *in vitro* assays.

3.3. Docking of 1,3-bis(2,4-diguadinophenoxy) benzene (compound **2f**) into the catalytic pocket of human furin

In previous studies [39] we emphasized the importance of positively charged groups in furin inhibitors. We also showed a possible binding orientation of 2,5-dideoxystreptamine derivatives into the furin, PC1/3, and PC2 binding sites [33]. Our previously reported binding model of 2,5-dideoxystreptamines into the PC1/3 catalytic site [33] showed a likely preferred orientation of the naphthyl group into the S1 pocket. In this orientation the guanidino group at the *para* position reaches deep into the S1 subsite, making favorable hydrogen bond interactions with the carbonyl oxygen atoms of Pro256 and Ala292.

An example of this binding pose for the novel compound **2f** is shown in Fig. 8. This molecule is the most active amongst the analogous compounds shown in Fig. 6; a comparison with the

co-crystallized ligand (guanidinomethyl-phenylacetyl-Arg-Val-Arg-(amidomethyl)-benzamide (m-guanidinomethyl-Phac-RVR-Amba) [37] shows how compound **2f** is able to nicely orient in a similar pose toward the S2, S3, and S4 sites. These subsites have been proposed to be relevant for achieving specificity in the recently published crystal structure of human furin [37]. In the orientation shown in Fig. 8, however, the S1 subsite is unoccupied. This could potentially represent the reason, at least in part, for the decreased inhibitory potency exhibited by this compound as compared to the submicromolar inhibition exhibited by other 2,5-dideoxystreptamine congeners such as compound **1e** (assuming similar binding poses).

4. Discussion

The proprotein convertase furin is known to act in various subcellular compartments including the TGN, the cell surface, and the endocytic compartment (reviewed in [3]). Despite the fact that the potency of inhibitors directed to furin action on the cell surface (for example the cleavage of the anthrax toxin PA) correlates well with *in vitro* inhibitor potency, inhibitory potency for previously published inhibitors in this cell-based assay is generally several orders of magnitude lower than that observed in the test tube [31,32,40–43]. This occurs most likely for reasons of inhibitor stability, very low *in vivo* substrate concentrations, and loss of

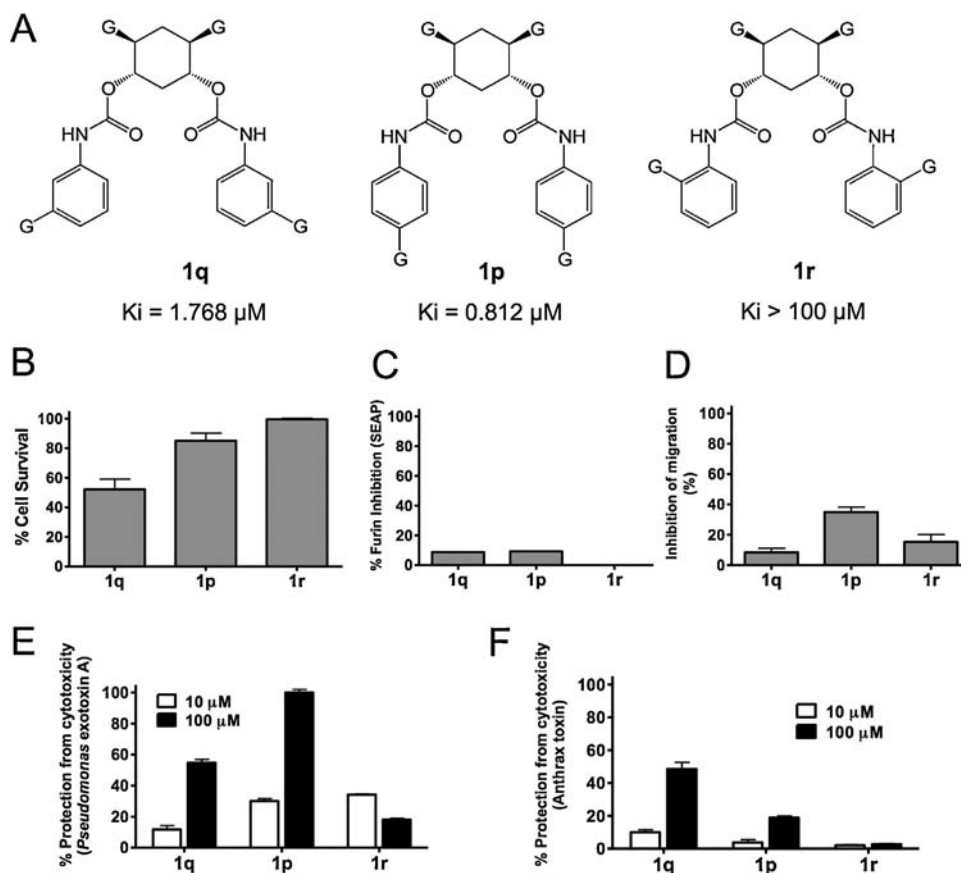


Fig. 5. Effect of guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine phenyl carbamate derivatives **1q**, **1p** and **1r** on cellular furin activity. (A) Structures of carbamate derivatives and their K_i s (taken from [31]). (B) CHO cells were incubated with each compound at 100 μM for 24 h; cell viability was then monitored by incubation for 2 h using WST-1. (C) Inhibition of SEAP activity secreted into the conditioned medium by CHO-GRAPfurin cells incubated with 100 μM of each inhibitor for 20–24 h. (D) Inhibition of migration of HT1080 cells during incubation with 100 μM of each inhibitor for 24 h at 37 °C. (E) Protection from cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in CHO DG44 cells in the presence of 10 μM or 100 μM of each inhibitor for 20–24 h. (F) Protection from cytotoxicity of anthrax toxin in RAW264.7 cells incubated in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 2 h. Where no error bars are visible, errors were within the range of the data shown. G, guanidino group.

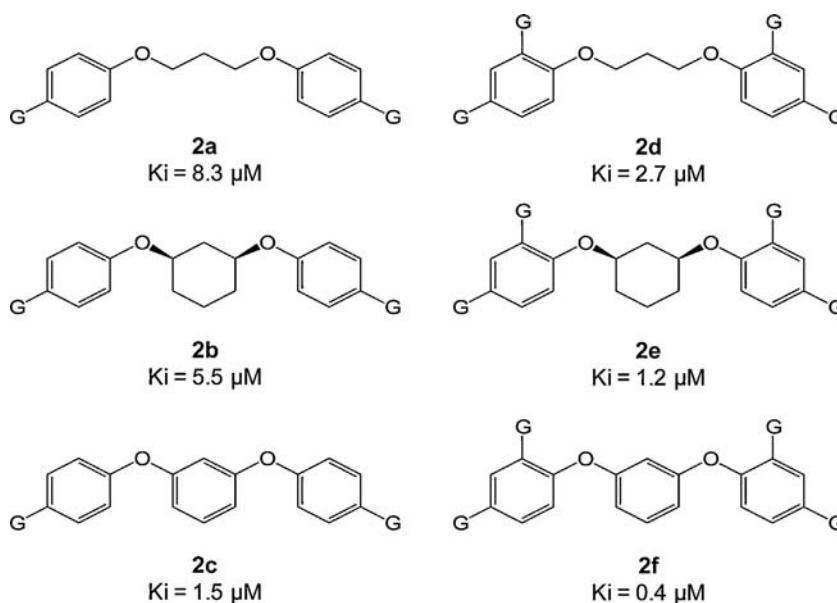


Fig. 6. Chemical structures of the bis-guanidinophenyl ether compounds tested as furin inhibitors. **2a**: 1,3-bis(4-guanidinophenoxy) propane; **2b**: 1,3-bis(4-guanidinophenoxy) cyclohexane; **2c**: 1,3-bis(4-guanidinophenoxy) benzene; **2d**: 1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy) propane; **2e**: 1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy) cyclohexane; **2f**: 1,3-bis(2,4-diguanidinophenoxy) benzene. K_i values were calculated as described in the “Materials and Methods”. G, guanidino group.

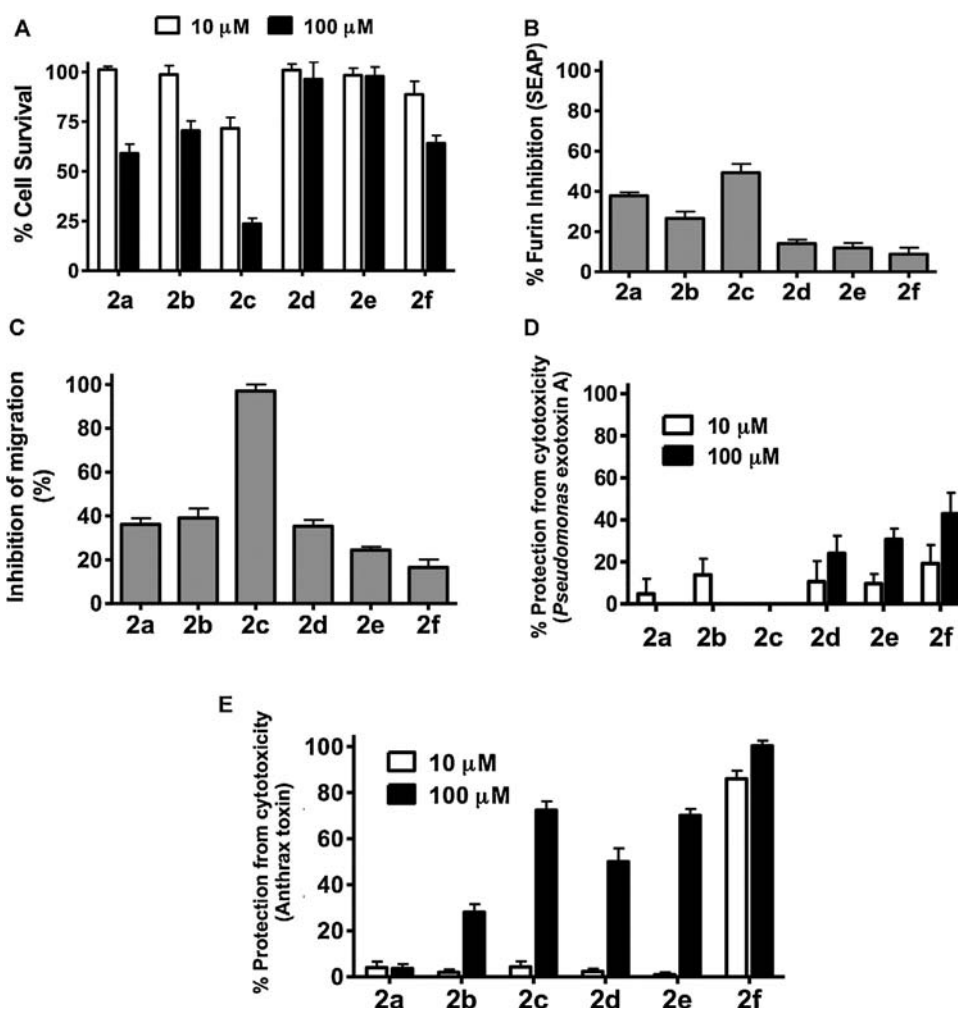


Fig. 7. Cell-based assays for bis-guanidinophenyl ether compounds. (A) CHO cells were incubated with each compound at 10 μM and 100 μM for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, and cell viability was monitored by incubation for 2 h with WST-1. (B) CHO-GRAPfurin cells were incubated with 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the SEAP activity was measured in the medium. (C) Migration of HT1080 cells after incubation of 100 μM of each inhibitor for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (D) Cell toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in CHO DG44 cells in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 20–24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. (E) Cytotoxicity of anthrax toxin in RAW264.7 cells incubated in the presence of 10 μM and 100 μM of each inhibitor for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$.

inhibitor on cell surfaces. Inhibitor access to other subcellular compartments in which furin acts, such as the endosomes and TGN, is likely even more difficult, and the particular biophysical qualities which permit chemical transport across cell membranes or endocytic uptake are still poorly defined. Although reasonably clear structure–activity relationships which generally coincide with prior structural knowledge can be proposed for the 2,5-dideoxystreptamines described in this paper, the challenge of developing structure–activity relationship studies on *in vivo* data is evident. In the work discussed below, the varying ability of 2,5-dideoxystreptamine derivatives to modulate furin to different extents and to exhibit differing toxicity levels makes these compounds versatile for drug discovery efforts to begin to define compartment-specific furin inhibitors.

The involvement of proprotein convertases, especially furin, in various human pathologies is now well documented (reviewed in [44,45]). For example, furin expression is elevated in certain kinds of tumors such as those derived from ovary, breast, head and neck, skin, brain and lung compared to normal adjacent tissue [15,16,46–49], and furin or furin-like activity contributes to tumor progression, aggressiveness, metastasis, and angiogenesis [27,50,51]; reviewed in [12]. Furin processing of substrates such as the metalloproteases stromelysin-3 and pro-membrane type-1

matrix metalloproteinase (proMT1-MMP) facilitates cell invasion and metastasis [14,52]. In particular, the furin-mediated activation of proMT1-MMP primarily occurs within the TGN, and its mature form, MT1-MMP, is rapidly secreted into the extracellular space [53,54] where it acts to degrade extracellular macromolecules (e.g. fibronectin, fibrin, vitronectin, laminin-1 and -5, and collagens) and adhesion molecules (e.g. CD44, integrins, and tissue transglutaminase). Furin-mediated activation of other MMPs such as gelatinase and collagenase 3 also contributes to the metastatic potential of tumor cells [14,55,56].

In agreement with the idea that convertase overexpression enhances metastasis, administration of peptide-based convertase inhibitors can limit tumor progression. While the non-selective irreversible convertase inhibitor dec-RVKR-CMK decreases skin tumor progression [57], this highly reactive compound exhibits significant cell toxicity [58]. The most potent peptide-based convertase inhibitors are likely the multi-Leu peptides developed by the Day group, which block viral infection [59] as well as tumor growth [28,29,60]; and the peptide analogs recently developed by the Steinmetzer group [25,61] which potentially inhibit bacterial toxin activation. However, because peptide-based drugs suffer from potential stability problems, several groups have instead sought small molecule inhibitors.

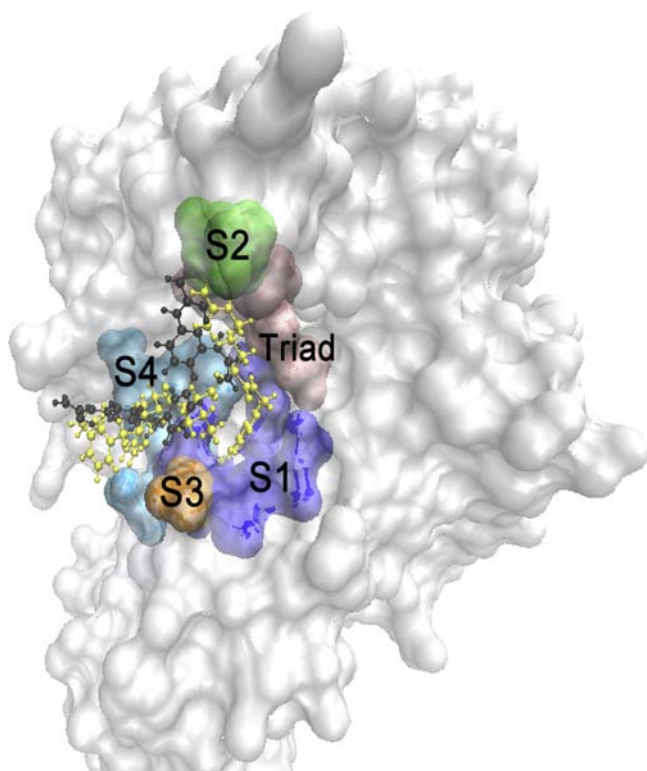


Fig. 8. Binding orientation of molecule **2f** into the furin catalytic pocket. Molecular surface representation of human furin; residues forming the catalytic triad and subsites S1–S4 are colored. Molecule **2f** and the co-crystallized ligand [37] are shown as black and yellow stick representations, respectively.

Many different kinds of small molecule drugs that act as competitive furin inhibitors and that are relatively specific for this enzyme have now been identified [26,31,43]. In a compound library screen, the cell-permeable naphthofluorescein disodium salt B3 prevented cell mobility and invasiveness of human fibrosarcoma HT1080 cells by inhibiting proMT1-MMP processing [26]. We found that the guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives **1a** and **1b** strongly prevented the migration of HT1080 cells (by 60% and 35%, respectively), while showing no significant cell toxicity. Given that these compounds were also able to inhibit TGN furin in GRAPfurin CHO cells, compounds **1a** and **1b** might represent useful inhibitors to reduce cancer cell metastasis.

Other compounds based on the 2,5-dideoxystreptamine scaffold, including **1c**, **1f** and **1p**, also displayed significant inhibition of cell migration (30–40%) with low general cytotoxicity. In contrast, while the bis-guanidinophenyl ether compounds **2a**, **2b** and **2c** also inhibited migration, they were toxic at high doses. For example, **2c** completely inhibited cell mobility, but probably solely as a consequence of a severe decrease in cell viability. In the case of **2d**, **2e** and **2f**, we did not observe cytotoxicity, but these compounds only exhibited a modest 15–35% inhibition of HT1080 cell migration. Taken together, the guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives constitute a promising group of compounds with therapeutic potential in cancer models, and should be subjected to further *in vivo* testing.

Protein convertase cleavages of bacterial and viral proteins are also essential for the pathogenicity of a number of bacteria and viruses [4,45]. Furin therefore also represents an attractive target for the treatment of certain bacterial and viral infections. In fact, various peptide-based furin inhibitors have been used to block and/or delay anthrax toxemia both in cells and in live animals by

inhibiting furin-catalyzed processing of the anthrax PA protein [32,62,63]. Additionally, furin has also emerged as a target for the prevention of the cytotoxic activation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and Shiga toxin [25,40,59,64]. Thus, the general convertase inhibitor nona-D-arginine peptide [65,66] provides efficient topical treatment of severe corneal keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*, particularly when combined with the antibiotic ciprofloxacin [67]. The present results show that the most promising small molecule compounds for the prevention of anthrax toxemia are likely the 2,5-dideoxystreptamine derivatives **1b** and **1g**, and the bis-guanidinophenyl ether compound **2f**, all of which exhibited complete inhibition of anthrax toxicity at 10 μ M, and none of which displayed significant cell toxicity at this concentration in a variety of cell lines. Compound **1b** was also able to completely prevent *Pseudomonas* toxin cytotoxicity at this same dose. Since compound **1b** also inhibited cell migration, this compound exhibits promise as a potent broad spectrum furin inhibitor for the treatment of furin-related pathologies. Other compounds, including **1i** or **1p**, also completely prevented *Pseudomonas* toxemia, but only at 100 μ M; **1i** was also capable of blocking anthrax toxicity at this same concentration. In general, the compounds based on the bis-guanidinophenyl ether scaffold (except **2a**) potentially inhibited anthrax toxin activation, and showed relatively good protection against *Pseudomonas* exotoxin A at 100 μ M. Taking into account the lack of toxicity and cell permeability of compound **2f** at low doses, its lack of effect on intracellular and endosomal furin, and its potent inhibition of furin at the cell surface, we suggest that this compound might be profitably exploited for selective protection against cell surface furin action (for example as occurs in anthrax infection) with potentially negligible side effects. However, direct evidence for the lack of cell penetration of this molecule, as well as of other compounds such as **1g**, should be confirmed in *ex vivo* studies using labeled compounds.

In conclusion, we have here elucidated interesting structure–activity relationships for each subgroup of inhibitors; while we could not determine universal molecular characteristics that control the cellular inhibitory activity in each specific compartment, *i.e.* the TGN, endosome, and cell surface, we have provided “proof of concept” that compartment selectivity of furin inhibitors can be addressed by fine-tuning of molecular structures. We suggest the use of the 2,5-dideoxystreptamine derivative **1b** (1,1'-(4-((2,4-diguandino-5-(4-guanidinophenoxy)cyclohexyl)oxy)-1,3-phenylene)diguandine) as a general non-peptide small molecule furin inhibitor to combat cancer and/or infectious agents whose mode of action requires intracellular host furin activity. Additional studies in animals will be necessary to corroborate the efficacy of this promising compound. In addition, we have identified the compartment-selective compounds **1g** and **2f** for the treatment of pathogenic bacterial infections – such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Bacillus anthracis* – with poor inhibitory capacity for intracellular furin. We suggest that further development of compartment-specific inhibitors in cell-based assays will be helpful to avoid potential side effects caused by the deregulation of normal furin activity and to rule out cytotoxic compounds.

Conflicts of interest

No potential conflicts of interest are present.

Grant support

This work was supported by the National Institutes of Health Grant R01 DA05084-27.

Acknowledgements

We thank Dr. A. Rehemtulla for providing us with the GRAPfurin cell system, and NIH grant R01 DA05084-27 for support. KMM thanks the Instituto de Quimica for financial support. We also thank John Giddens and Zephan Melville for performing preliminary studies of the Grap-furin and anthrax assays respectively.

References

- [1] K. Nakayama, Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins, *Biochem. J.* 327 (Pt 3) (1997) 625–635.
- [2] N.G. Seidah, The proprotein convertases, 20 years later, *Methods Mol. Biol.* 768 (2011) 23–57.
- [3] S.S. Molloy, E.D. Anderson, F. Jean, G. Thomas, Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis, *Trends Cell Biol.* 9 (1999) 28–35.
- [4] G. Thomas, Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 753–766.
- [5] A.J. Roebroek, L. Umans, I.G. Pauli, E.J. Robertson, F. van Leuven, W.J. Van de Ven, et al., Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin, *Development* 125 (1998) 4863–4876.
- [6] A.J. Roebroek, N.A. Taylor, E. Louagie, I. Pauli, L. Smeijers, A. Snellinx, et al., Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 53442–53450.
- [7] J.W. Creemers, A.M. Khatib, Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy, *Front. Biosci.* 13 (2008) 4960–4971.
- [8] S. Takahashi, K. Kasai, K. Hatsuzawa, N. Kitamura, Y. Misumi, Y. Ikehara, et al., A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (1993) 1019–1026.
- [9] B.D. Bennett, P. Denis, M. Haniu, D.B. Teplow, S. Kahn, J.C. Louis, et al., A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's β -secretase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 37712–37717.
- [10] E.C. Arner, Aggrecanase-mediated cartilage degradation, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2 (2002) 322–329.
- [11] P. Stawowy, H. Meyborg, D. Stibenz, N. Borges Pereira Stawowy, M. Roser, U. Thanabalasingam, et al., Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis, *Circulation* 111 (2005) 2820–2827.
- [12] D.E. Bassi, J. Fu, R. Lopez De Cicco, A.J. Klein-Szanto, Proprotein convertases: master switches in the regulation of tumor growth and progression, *Mol. Carcinog.* 44 (2005) 151–161.
- [13] M. Mbikay, F. Sirois, J. Yao, N.G. Seidah, M. Chretien, Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours, *Br. J. Cancer* 75 (1997) 1509–1514.
- [14] D.E. Bassi, H. Mahloogi, A.J. Klein-Szanto, The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression, *Mol. Carcinog.* 28 (2000) 63–69.
- [15] J. Fu, D.E. Bassi, J. Zhang, T. Li, E. Nicolas, A.J. Klein-Szanto, Transgenic over-expression of the proprotein convertase furin enhances skin tumor growth, *Neoplasia* 14 (2012) 271–282.
- [16] D.E. Bassi, H. Mahloogi, L. Al-Saleem, R. Lopez De Cicco, J.A. Ridge, A.J. Klein-Szanto, Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines, *Mol. Carcinog.* 31 (2001) 224–232.
- [17] A.M. Khatib, G. Siegfried, A. Prat, J. Luis, M. Chrétien, P. Metrakos, et al., Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions, *J. Biol. Chem.* 27 (2001) 30686–30693.
- [18] V.M. Gordon, K.R. Klimpel, N. Arora, M.A. Henderson, S.H. Leppla, Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases, *Infect. Immun.* 63 (1995) 82–87.
- [19] O. Garred, B. van Deurs, K. Sandvig, Furin-induced cleavage and activation of shiga toxin, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10817–10821.
- [20] A. Basak, M. Zhong, J.S. Munzer, M. Chretien, N.G. Seidah, Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides, *Biochem. J.* 353 (2001) 537–545.
- [21] M. Moulard, E. Decroly, Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases, *Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2000) 121–132.
- [22] V. Volchkov, H. Feldmann, V.A. Volchkova, H.D. Klenk, Processing of the Ebola virus glycoprotein by proprotein convertase furin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 5762–5767.
- [23] T. Komiyama, J.A. Swanson, R.S. Fuller, Protection from anthrax toxin-mediated killing of macrophages by the combined effects of furin inhibitors and chloroquine, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (9) (2005) 3875–3882.
- [24] S. Ozden, M. Lucas-Hourani, P.E. Ceccaldi, A. Basak, M. Valentine, S. Benjannet, et al., Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 21899–21908.
- [25] G.L. Becker, Y. Lu, K. Hards, B. Strehlow, C. Levesque, I. Lindberg, et al., Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 21992–22003.
- [26] J.M. Coppola, M.S. Bhojani, B.D. Ross, A. Rehemtulla, A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness, *Neoplasia* 10 (2008) 363–370.
- [27] D. Bassi, R. Lopez de Cicco, H. Mahloogi, S. Zucker, G. Thomas, J. Klein-Szanto, Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10326–10331.
- [28] F. D'Anjou, F. Couture, R. Desjardins, R. Day, Knockdown strategies for the study of proprotein convertases and proliferation in prostate cancer cells, *Methods Mol. Biol.* 1103 (2014) 67–82.
- [29] R. Longuespee, F. Couture, C. Levesque, A. Kwiatkowska, R. Desjardins, S. Gagnon, et al., Implications of proprotein convertases in ovarian cancer cell proliferation and tumor progression: insights for PACE4 as a therapeutic target, *Transl. Oncol.* 7 (2014) 410–419.
- [30] M. Fugere, R. Day, Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition, *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (2005) 294–301.
- [31] G.S. Jiao, L. Cregar, J. Wang, S.Z. Millis, C. Tang, S. O'Malley, et al., Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 19707–19712.
- [32] M.M. Kacprzak, J.R. Peinado, M.E. Than, J. Appel, S. Henrich, G. Lipkind, et al., Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36788–36794.
- [33] M. Vivoli, T.R. Caulfield, K. Martinez-Mayorga, A.T. Johnson, G.S. Jiao, I. Lindberg, Inhibition of prohormone convertases PC1/3 and PC2 by 2,5-dideoxystreptamine derivatives, *Mol. Pharmacol.* 81 (2012) 440–454.
- [34] E. Apletalina, J. Appel, N.S. Lamango, R.A. Houghten, I. Lindberg, Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26589–26595.
- [35] A. Cameron, Y. Fortenberry, I. Lindberg, The SAAS granin exhibits structural and functional homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1, *FEBS Lett.* 473 (2000) 135–138.
- [36] J.M. Coppola, C.A. Hamilton, M.S. Bhojani, M.J. Larsen, B.D. Ross, A. Rehemtulla, Identification of inhibitors using a cell-based assay for monitoring Golgi-resident protease activity, *Anal. Biochem.* 364 (2007) 19–29.
- [37] S.O. Dahms, K. Hards, G.L. Becker, T. Steinmetzer, H. Brandstetter, M.E. Than, X-ray structures of human furin in complex with competitive inhibitors, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 1113–1118.
- [38] H.J. Motulsky, A. Christopoulos, Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, 2003.
- [39] F. Lopez-Vallejo, K. Martinez-Mayorga, Furin inhibitors: importance of the positive formal charge and beyond, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 4462–4471.
- [40] F. Jean, K. Stella, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, A.J. Reason, et al., Alpha1-antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 7293–7298.
- [41] G.S. Jiao, L. Cregar, M.E. Goldman, S.Z. Millis, C. Tang, Guanidinylated 2,5-dideoxystreptamine derivatives as anthrax lethal factor inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 1527–1531.
- [42] J.R. Peinado, M.M. Kacprzak, S.H. Leppla, I. Lindberg, Cross-inhibition between furin and lethal factor inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 (2004) 601–605.
- [43] T. Komiyama, J.M. Coppola, M.J. Larsen, M.E. van Dort, B.D. Ross, R. Day, et al., Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 15729–15738.
- [44] N.G. Seidah, A. Prat, The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 367–383.
- [45] F. Couture, F. D'Anjou, R. Day, On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications, *Biomol. Concepts* 2 (2011) 421–438.
- [46] R.E. Page, A.J. Klein-Szanto, S. Litwin, E. Nicolas, R. Al-Jumaily, P. Alexander, A.K. Godwin, et al., Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer, *Cell Oncol.* 29 (2007) 289–299.
- [47] M. Cheng, P.H. Watson, J.A. Paterson, N. Seidah, M. Chretien, R.P. Shiu, Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer, *Int. J. Cancer* 71 (1997) 966–971.
- [48] J. Mercapide, R. Lopez De Cicco, D.E. Bassi, J.S. Castresana, G. Thomas, A.J. Klein-Szanto, Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 1740–1746.
- [49] J.A. Schalken, A.J. Roebroek, P.P. Oomen, S.S. Wagenaar, F.M. Debruyne, H.P. Bloemers, et al., fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas, *J. Clin. Invest.* 80 (1987) 1545–1549.
- [50] G. Siegfried, A. Basak, J.A. Cromlish, S. Benjannet, J. Marcinkiewicz, M. Chretien, et al., The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1723–1732.
- [51] B.K. McColl, K. Paavonen, T. Karnezis, N.C. Harris, N. Davydova, J. Rothacker, et al., Proprotein convertases promote processing of VEGF-D, a critical step for binding the angiogenic receptor VEGFR-2, *FASEB J.* 21 (2007) 1088–1098.
- [52] H. Sato, T.T. Kinoshita, K. Nakayama, M. Seiki, Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2, *FEBS Lett.* 393 (1996) 101–104.
- [53] J. Cao, A. Rehemtulla, W. Bahou, S. Zucker, Membrane type matrix metalloproteinase 1 activates pro-gelatinase A without furin cleavage of the N-terminal domain, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30174–30180.

- [54] M. Mazzone, M. Baldassarre, G. Beznoussenko, G. Giacchetti, J. Cao, S. Zucker, et al., Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 6275–6287.
- [55] I. Yana, S.J. Weiss, Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 2387–2401.
- [56] M. Seiki, Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion, *Cancer Lett.* 194 (2003) 1–11.
- [57] D.E. Bassi, J. Zhang, J. Cenna, S. Litwin, E. Cukierman, A.J. Klein-Szanto, Proprotein convertase inhibition results in decreased skin cell proliferation, tumorigenesis, and metastasis, *Neoplasia* 12 (2010) 516–526.
- [58] A.G. Remacle, K. Gawlik, V.S. Golubkov, G.W. Cadwell, R.C. Liddington, P. Cieplak, et al., Selective and potent furin inhibitors protect cells from anthrax without significant toxicity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010) 987–995.
- [59] H. Gagnon, S. Beauchemin, A. Kwiatkowska, F. Couture, F. D'Anjou, C. Levesque, et al., Optimization of furin inhibitors to protect against the activation of influenza hemagglutinin H5 and Shiga toxin, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 29–41.
- [60] A. Kwiatkowska, F. Couture, C. Levesque, K. Ly, R. Desjardins, S. Beauchemin, et al., Design, synthesis, and structure–activity relationship studies of a potent PACE4 inhibitor, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 98–109.
- [61] G.L. Becker, F. Sielaff, M.E. Than, I. Lindberg, S. Routhier, R. Day, et al., Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 1067–1075.
- [62] M.S. Sarac, J.R. Peinado, S.H. Leppla, I. Lindberg, Protection against anthrax toxemia by hexa-D-arginine in vitro and in vivo, *Infect. Immun.* 72 (2004) 602–605.
- [63] S.S. Molloy, P.A. Bresnahan, S.H. Leppla, K.R. Klimpel, G. Thomas, Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16396–16402.
- [64] M.S. Sarac, A. Cameron, I. Lindberg, The furin inhibitor hexa-D-arginine blocks the activation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in vivo, *Infect. Immun.* 70 (2002) 7136–7139.
- [65] A. Cameron, J. Appel, R.A. Houghten, I. Lindberg, Polyarginines are potent furin inhibitors, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 36741–36749.
- [66] M. Fugere, J. Appel, R.A. Houghten, I. Lindberg, R. Day, Short polybasic peptide sequences are potent inhibitors of PC5/6 and PC7: use of positional scanning-synthetic peptide combinatorial libraries as a tool for the optimization of inhibitory sequences, *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 323–332.
- [67] P. Karicherla, J.A. Hobden, Nona-D-arginine therapy for *Pseudomonas aeruginosa* keratitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 256–262.